

ΘΕΜΑ 4

38. Η μεσογειακή αναιμία ή θαλασσαιμία είναι μια ασθένεια που εμφανίζεται κυρίως στη γεωγραφική περιοχή της Μεσογείου και είναι αποτέλεσμα της μειωμένης παραγωγής των φυσιολογικών σφαιρινών της αιμοσφαιρίνης, κάτι που ελέγχεται γενετικά με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Από τις δύο βασικές μορφές της ασθένειας (α και β) η β-μεσογειακή αναιμία αποτελεί τη συχνότερη μορφή στη χώρα μας και εμφανίζεται είτε σε ομόζυγη μορφή, με το όνομα β-μεσογειακή αναιμία ή νόσος του Cooley, είτε σε ετερόζυγη μορφή, με το όνομα “στίγμα”. Σε ένα ζευγάρι ο άντρας είναι γνωστό ότι έχει “στίγμα”, ενώ η γυναίκα με πρόσφατες εξετάσεις αίματος αποδείχθηκε απολύτως φυσιολογική ως προς τη σύνθεση των αιμοσφαιρινών της. Το ζευγάρι αυτό αποφασίζει να αποκτήσει παιδιά και ζητά γενετική συμβουλή.

α. Στη συζήτηση που είχε το ζευγάρι με τον γενετικό σύμβουλο αναφέρθηκε ο όρος “πολλαπλά αλληλόμορφα”. Να περιγράψετε τον όρο αυτό στο ζευγάρι και να εξηγήσετε γιατί τα ανέφερε ο γενετικός σύμβουλος (Μονάδες 2). Να αναφέρετε τα αλληλόμορφα που εμφανίζονται στους γονότυπους των δύο γονέων (Μονάδες 4).

β. Να προβλέψετε την πιθανότητα το παραπάνω ζευγάρι να αποκτήσει παιδί που θα φέρει το “στίγμα” της μεσογειακής αναιμίας (Μονάδες 3).

γ. Να αναλύσετε δύο τρόπους με τους οποίους μπορεί οι γονείς να διαπίστωσαν το γόνότυπό τους σχετικά με τη β' θαλασσαιμία (Μονάδες 4).

Μονάδες 13

α. Είναι γνωστό ότι στα διπλοειδή κύτταρα υπάρχουν δύο αλληλόμορφα για μία ορισμένη γενετική θέση, ενώ ένα απλοειδές κύτταρο, όπως ένας γαμέτης, έχει μόνο ένα. Εάν στον πληθυσμό υπάρχουν τρία ή περισσότερα αλληλόμορφα για μία γενετική θέση, τότε αυτά ονομάζονται **πολλαπλά αλληλόμορφα**. Πολλά γονίδια που ευθύνονται για τη δημιουργία ασθενειών έχουν **πολλαπλά αλληλόμορφα γονίδια**, όπως συμβαίνει στη β-θαλασσαιμία. Έτσι εξηγείται η αναφορά του γενετικού συμβούλου στον όρο “πολλαπλά αλληλόμορφα”. Η β-θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, δηλαδή προκαλείται από πολλά διαφορετικά είδη γονιδιακών μεταλλάξεων όπως αντικαταστάσεις, ελλείψεις και προσθήκες βάσεων. Τα συμπτώματα της ασθένειας διαφέρουν μεταξύ διαφόρων ατόμων και κυμαίνονται από σοβαρή αναιμία (παντελής έλλειψη πολυπεπτιδικής αλυσίδας β, συνεπώς και HbA) έως λιγότερο σοβαρή αναιμία (ελάττωση σύνθεσης πολυπεπτιδικής αλυσίδας β, συνεπώς σύνθεση HbA σε πολύ μικρή ποσότητα) και σχετίζονται με το είδος της μετάλλαξης που τα προκαλεί. Όσον αφορά τα αλληλόμορφα της β- αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, η γυναίκα έχει 2 φυσιολογικά αλληλόμορφα και ο άντρας ένα μόνο φυσιολογικό αλληλόμορφο.

β. Αν το φυσιολογικό αλληλόμορφο της β αλυσίδας το συμβολίσουμε με B, τότε το παθολογικό θα το συμβολίσουμε με β, δεδομένου του αυτοσωμικού υπολειπόμενου τρόπου κληρονομιάς του. Επομένως οι γονότυποι του ζευγαριού ως προς τα γονίδια των β- αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης θα είναι BB και Bβ. Από την παραπάνω διασταύρωση η πιθανότητα να γεννηθεί παιδί με “στίγμα” είναι 50% ($\frac{1}{2}$).

γ. Το ζευγάρι μπορεί να ταυτοποιήσει την ύπαρξη ή μη μεταλλάξεων στα αλληλόμορφα γονίδια που συμμετέχουν στη σύνθεση των β- αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης με την ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (μοριακή διάγνωση) και με διάφορες βιοχημικές δοκιμασίες. Στην δεύτερη αυτή περίπτωση στα ομόζυγα άτομα παρατηρείται σε πολλές περιπτώσεις αύξηση της HbF, η οποία υποκαθιστά μερικώς τη λειτουργία της HbA, ενώ στα ετερόζυγα άτομα-φορείς παρατηρείται αυξημένη σύνθεση HbA₂, η οποία αποτελεί διαγνωστικό δείκτη.

39. Ο αλφισμός αποτελεί ένα γνωστό μεταβολικό νόσημα. Οι πάσχοντες από αλφισμό έχουν λεπτό δέρμα που παρουσιάζει μεγάλη ευπάθεια στις λοιμώξεις και ελαττωματική όραση. Στις βαρύτερες μορφές του, οι δύο κυριότερες επιπλοκές του αλφισμού είναι η τύφλωση και η εμφάνιση καρκινωμάτων του δέρματος. Δύο υποψήφιοι γονείς, στα πλαίσια γενετικής καθοδήγησης, στην προσπάθεια απόκτησης απογόνου, μαθαίνουν μετά από μια σειρά ειδικών εξετάσεων ότι είναι ετερόζυγοι ως προς ένα γονίδιο που ευθύνεται για το νόσημα αυτό.

α. Να αιτιολογήσετε τη μεγάλη ετερογένεια που, όπως περιγράφηκε παραπάνω, εμφανίζει η ασθένεια του αλφισμού (μονάδες 3).

β. Εάν το ζευγάρι προχωρήσει σε κύηση, να αναφέρετε τις διαδικασίες που θα ακολουθηθούν για να ληφθούν εμβρυϊκά κύτταρα (μονάδες 2) και να εξηγήσετε με ποιο τρόπο θα διαπιστωθεί εάν το έμβρυο φέρει τη συγκεκριμένη πάθηση (μονάδες 2).

γ. Αν υποθέσουμε ότι το ζευγάρι αποκτά έναν φυσιολογικό απόγονο, να βρείτε ποια είναι η πιθανότητα το παιδί αυτό να είναι ετερόζυγο (μονάδες 2) και να δικαιολογήσετε την απάντησή σας (μονάδες 3).

Μονάδες 12

α. Στα άτομα που πάσχουν από αλφισμό υπάρχει έλλειψη της χρωστικής μελανίνης στο δέρμα, στα μαλλιά και στην ίριδα του οφθαλμού. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη ή μείωση της ενεργότητας ενός από τα ένζυμα, που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό της χρωστικής μελανίνης. Επειδή, λοιπόν, κάποια άτομα εμφανίζουν παντελή έλλειψη της ενεργότητας του ενζύμου, ενώ άλλα εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου, ο αλφισμός εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια.

β. Για να διαπιστωθεί εάν το έμβρυο πάσχει από αλφισμό, θα πρέπει να διενεργηθεί προγεννητικός έλεγχος. Αυτός προϋποθέτει εξέταση εμβρυϊκών κυττάρων από το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Η συλλογή των εμβρυϊκών κυττάρων που θα εξεταστούν μπορεί να γίνει με δυο τρόπους: είτε με την αμνιοπαρακέντηση κατά τη 12η-16η εβδομάδα κύησης είτε με τη λήψη χοριακών λαχνών κατά την 9η-12^η εβδομάδα κύησης. Τα εμβρυϊκά κύτταρα που θα συλλεχθούν με οποιοδήποτε από τους παραπάνω τρόπους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση DNA προκειμένου να ανιχνευτεί το μεταλλαγμένο γονίδιο, καθώς πρόκειται για ασθένεια που οφείλεται σε γονιδιακή μετάλλαξη.

γ. Η διασταύρωση των ετερόζυγων γονέων είναι:

P (γονότυποι): ♀ Aa × ♂ Aa

Γαμέτες: A, a A, a

F1 (γονοτυπικές αναλογίες): 1 AA : 2 Aa : 1 aa

F1 (φαινοτυπικές αναλογίες): 3 φυσιολογικά : 1 με αλφισμό

Στην περίπτωση που το ζευγάρι αποκτήσει φυσιολογικό παιδί, η πιθανότητα το παιδί αυτό να είναι ετερόζυγο είναι 2/3. Σε κάθε γέννηση φυσιολογικού απογόνου υπάρχει πιθανότητα 1/3 να είναι φυσιολογικός ομόζυγος με γονότυπο AA και πιθανότητα 2/3 να είναι φυσιολογικός ετερόζυγος με γονότυπο Aa.

58. Η τεχνική παραγωγής των μονοκλωνικών αντισωμάτων αναπτύχθηκε το 1975 και είναι παρόμοια για όλες τις εφαρμογές τους. Τα μονοκλωνικά αντισώματα επειδή αναγνωρίζουν ειδικά έναν αντιγονικό καθοριστή, είναι πολύ χρήσιμα ως ανοσοδιαγνωστικά. Μπορούν να ανιχνεύσουν στα υγρά του σώματος (αίμα, ούρα κ.ά.) ουσίες, που είναι υπεύθυνες για ποικίλες ασθένειες, παθογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και τη διακύμανση της συγκέντρωσης διάφορων προϊόντων του μεταβολισμού, η οποία μπορεί να σχετίζεται με την πιθανότητα εμφάνισης κάποιων ασθενειών.

α. Να περιγράψετε τα βασικά βήματα παραγωγής των μονοκλωνικών αντισωμάτων εναντίον του κορωνοϊού της νόσου Covid19 (μονάδες 6).

β. Στην εικόνα παρουσιάζεται ένα αρνητικό (αριστερά) και ένα θετικό (δεξιά) ανοσοδιαγνωστικό τεστ εναντίον του κορωνοϊού της covid19. Σε ένα ανοσοδιαγνωστικό τεστ (κοινώς γνωστό ως “self test”) εναντίον του συγκεκριμένου κορωνοϊού βρίσκονται “κολλημένα” μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον κάποιου ειδικού τμήματος του ιού. Με βάση τις παραπάνω πληροφορίες και τις γνώσεις σας σχετικά με τα μονοκλωνικά αντισώματα, να εξηγήσετε πώς νομίζετε ότι ανιχνεύεται ο κορωνοϊός covid19 με το self test (μονάδες 5). Να αναφέρετε δύο πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής (μονάδες 2).



Μονάδες 13

α. Κατά την τεχνική παρασκευής μονοκλωνικών αντισωμάτων εισάγεται σε ποντικό ένα αντιγόνο, όπως για παράδειγμα ο κορωνοϊός της νόσου covid19, το οποίο ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα του ποντικού και μετά από κάποιο χρονικό διάστημα ξεκινάει η παραγωγή αντισωμάτων εναντίον του από εξειδικευμένα Β λεμφοκύτταρα. Έπειτα από δύο εβδομάδες αφαιρείται ο σπλήνας του ποντικού και απομονώνονται τα Β λεμφοκύτταρα. Αυτά συντήκονται με καρκινικά κύτταρα και παράγονται τα υβριδώματα που παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον κάποιου αντιγονικού καθοριστή του αντιγόνου του κορωνοϊού. Τα υβριδώματα αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (-80oC) και μπορούν να αποψυχθούν και να παράγουν οποιαδήποτε στιγμή το μονοκλωνικό αντίσωμα.

β. Τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν, προσδένονται επιλεκτικά και έτσι ανιχνεύουν έναν συγκεκριμένο αντιγονικό καθοριστή, ο οποίος μπορεί να είναι μια πρωτεΐνη στην επιφάνεια του ιού. Η σύνδεση με αυτόν γίνεται οπτικά αντιληπτή (θετικό τεστ). Έτσι, όταν δεν υπάρχει ο αντιγονικός καθοριστής δεν υπάρχει σύνδεση, και το τεστ χαρακτηρίζεται ως αρνητικό (αριστερά). Αντίθετα, όταν υπάρχει ο αντιγονικός καθοριστής, η σύνδεση αυτού με το αντίσωμα γίνεται οπτικά αντιληπτή και το τεστ χαρακτηρίζεται ως θετικό (δεξιά).

Η τεχνική ανίχνευσης είναι ευαίσθητη και γρήγορη (εναλλακτικά: απλή, ακριβής και οικονομική).

65. Η τρισωμία 13, γνωστή και ως σύνδρομο “Patau”, είναι μια αριθμητική χρωμοσωμική ανωμαλία που προκαλείται από την παρουσία ενός τρίτου αντιγράφου του χρωμοσώματος 13. Το επιπλέον γενετικό υλικό διαταράσσει την ομαλή ανάπτυξη του ατόμου. Τα άτομα με σύνδρομο “Patau” εμφανίζουν σοβαρή διανοητική καθυστέρηση και καρδιακές ανωμαλίες. Έστω ότι στο χρωμόσωμα 13 υπάρχει μία γενετική θέση στην οποία εδράζονται τα αλληλόμορφα γονίδια Γ / γ που ελέγχουν ένα συγκεκριμένο γνώρισμα.

α. Να περιγράψετε έναν μηχανισμό με τον οποίο μπορεί να προκύψει ένα άτομο με σύνδρομο “Patau” (μονάδες 6).

β. Ένα ζευγάρι απευθύνεται σε γενετιστή για προγεννητικό έλεγχο και τα ευρήματα μιας εξέτασης υποδεικνύουν ότι το έμβρυο πάσχει από το προαναφερόμενο σύνδρομο. Να εξηγήσετε με ποιους τρόπους διέγνωσε ο γενετιστής την πάθηση του εμβρύου (μονάδες 2) και να περιγράψετε τους πιθανούς γονότυπους που θα έχει το έμβρυο σε σχέση με τα αλληλόμορφα Γ / γ (μονάδες 4).

Μονάδες 12

α. Ένα άτομο με τρισωμία 13 μπορεί να προκύψει με μη διαχωρισμό είτε των ομολόγων χρωμοσωμάτων του 13ου ζεύγους κατά τη μείωση I, είτε με μη αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων ενός διπλασιασμένου 13ου χρωμοσώματος κατά τη μείωση II. Αυτός ο μη διαχωρισμός μπορεί να έχει συμβεί είτε σε θηλυκό είτε σε αρσενικό άωρο γεννητικό κύτταρο που πραγματοποιεί μείωση. Έτσι, αν ενωθεί ο γαμέτης με την αριθμητική χρωμοσωμική ανωμαλία με έναν φυσιολογικό γαμέτη θα προκύψει ζυγωτό με τρισωμία 13.

β. Ο γενετιστής πραγματοποίησε προγεννητικό έλεγχο με καρυότυπο σε εμβρυϊκά κύτταρα που λήφθηκαν είτε με αμνιοπαρακέντηση είτε με λήψη χοριακών λαχνών.

Οι πιθανοί γονότυποι του εμβρύου ως προς τα αλληλόμορφα Γ / γ είναι ΓΓΓ, ΓΓγ, Γγγ, γγγ.

77. Ένας από τους βασικούς στόχους της Ιατρικής στον οποίο συμβάλλει η βιοτεχνολογία, είναι η αποτελεσματική θεραπεία διαφόρων ασθενειών για τις οποίες έχουν κατανοηθεί τόσο οι βιοχημικοί τους μηχανισμοί, όσο και το γενετικό τους υπόβαθρο. Η παραγωγή και η χρήση των φαρμακευτικών πρωτεϊνών, αποτελούν ένα σημαντικό βήμα προς την επίτευξη του στόχου αυτού και επιτυγχάνεται σήμερα με την εφαρμογή σύγχρονων τεχνολογιών, όπως αυτής του ανασυνδυασμένου DNA.

α. Να εξηγήσετε τι είναι οι φαρμακευτικές πρωτεΐνες (μονάδες 3) και να αναφέρετε τα μειονεκτήματα της παραγωγής τους με παλαιότερες μεθόδους βιοτεχνολογίας, που εφαρμόζονταν πριν την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA (μονάδες 3).

β. Να αναφέρετε τις νέες δυνατότητες που προσέθεσε η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA στον τομέα της βιοτεχνολογίας που αφορά στην παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών (μονάδες 2). Να καταγράψετε δυο φαρμακευτικές πρωτεΐνες που μπορούν να παραχθούν με τη βοήθεια της βιοτεχνολογίας, καθώς και τις ασθένειες στις οποίες χορηγούνται (μονάδες 4).

Μονάδες 12

α. Οι φαρμακευτικές πρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. (Φυσιολογικά, παράγονται στο σώμα υγιών ανθρώπων σε συγκεκριμένες ποσότητες. Σε ορισμένους, όμως, ανθρώπους δεν παράγονται καθόλου ή παράγονται με μειωμένη λειτουργικότητα εξαιτίας διάφορων παραγόντων, συνηθέστερα γενετικής αιτιολογίας, δηλαδή των μεταλλάξεων). Στα άτομα που πάσχουν από κάποια ασθένεια πρέπει να χορηγούνται εξωγενώς, ως φάρμακα, για την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Πριν από την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, οι περισσότερες φαρμακευτικές πρωτεΐνες: 1. ήταν διαθέσιμες σε πολύ μικρές ποσότητες, 2. η παραγωγή τους ήταν πολύ ακριβή και 3. συχνά η βιολογική δράση τους δεν ήταν πλήρως κατανοητή. (Έτσι, συχνά προκαλούσαν ανεπιθύμητες επιδράσεις στους ασθενείς που χορηγούνταν).

β. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA έδωσε τη δυνατότητα παραγωγής φαρμακευτικών πρωτεϊνών σε σημαντικές ποσότητες, τόσο για τον αποτελεσματικό έλεγχο της δράσης τους, όσο και για ευρεία κατανάλωση. Σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί τα γονίδια του ανθρώπου για περισσότερες από 300 φαρμακευτικές πρωτεΐνες. Δύο γνωστές φαρμακευτικές πρωτεΐνες που έχουν παραχθεί με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, είναι η α1-αντιθρυψίνη για την θεραπεία του εμφυσήματος και η ινσουλίνη για τη θεραπεία του διαβήτη (εναλλακτικά: οι ι-

ντερφερόνες που χορηγούνται ως αντιϊικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες).

98. Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ) αποτελεί περίπτωση καρκίνου του μυελού των οστών. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 60 έτη. Στην Ευρώπη διαγιγνώσκονται 1-2 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, το χρόνο. Έχουν εντοπιστεί περιπτώσεις ΧΜΛ στις οποίες οι ασθενείς φέρουν μία αμοιβαία μετατόπιση τμημάτων ανάμεσα στο χρωμόσωμα 9 και το χρωμόσωμα 22, η οποία προκαλεί σύντηξη δύο γονιδίων των BCR και ABL (πρωτοογκογονίδιο). Το παθολογικό χρωμόσωμα που προκύπτει από την σύντηξη των δύο χρωμοσωμάτων ονομάστηκε Χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, από την πόλη όπου έγινε η ανακάλυψή του, και το χμιαϊκό γονίδιο BCR-ABL, που προκύπτει από τη σύντηξη των δύο χρωμοσωμάτων, αποδείχθηκε το 1990 ότι ευθύνεται για την εκδήλωση ΧΜΛ.

α. Να περιγράψετε πως μπορεί η παραπάνω μετατόπιση να οδηγεί στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου, συμπεριλαμβάνοντας τις γνώσεις σας από τα γονίδια που σχετίζονται με την καρκινογένεση (μονάδες 6).

β. Να εξηγήσετε πότε (κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου) και εξαιτίας ποιων επιβαρυντικών παραγόντων μπορεί να προκύψει μία αμοιβαία μετατόπιση σαν την προαναφερόμενη (μονάδες 4) και να αναφέρετε τη διαγνωστική μέθοδο με την οποία μπορεί να ανιχνευτεί (μονάδες 3).

Μονάδες 13

α. Υπάρχουν δύο τύποι γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Σχετικές έρευνες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο καρκίνος σε γενετικό επίπεδο είναι το αποτέλεσμα:

- Μετατροπής πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια
- Απουσίας λειτουργικότητας ογκοκατασταλτικών γονιδίων και
- Αδρανοποίησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA.

Δεδομένου ότι το ένα από τα δύο γονίδια και συγκεκριμένα το ABL, είναι πρωτοογκογονίδιο, ο συγκεκριμένος καρκίνος θα μπορούσε να σχετίζεται με τη μετατροπή του σε ογκογονίδιο. Συγκεκριμένα, μέσω της αμοιβαίας μετατόπισης δημιουργείται το χμιαϊκό γονίδιο BCR-ABL, το οποίο υπερλειτουργεί, επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και αυτή η αλλαγή οδηγεί πιθανότατα σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μυελού των οστών.

β. Η αμοιβαία μετατόπιση αποτελεί δομική χρωμοσωμική ανωμαλία. Οι δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες συμβαίνουν (οποτεδήποτε) κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και είναι αποτέλεσμα της δράσης μεταλλαξογόνων παραγόντων, όπως οι ακτινοβολίες και διάφορες χημικές ουσίες. Διαγνωστικά, η ΧΜΛ μπορεί να ανιχνευτεί με ανάλυση καρυότυπου, όπου έχει γίνει χρώση των χρωμοσωμάτων με τεχνικές που δημιουργούν ζώνες στο χρωμόσωμα, όπως η χρώση Giemsa.

116. Οι ιντερφερόνες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς. Με τη σύνδεση των ιντερφερονών στα υγιή κύτταρα ενεργοποιείται η παραγωγή άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών στο εσωτερικό τους. Οι ιντερφερόνες σήμερα αποτελούν σημαντικό φάρμακο για πολλές ασθένειες όπως οι λευχαιμίες, η ηπατίτιδα και το μελάνωμα, γι' αυτό προέκυψε η ανάγκη της παραγωγής τους σε μεγάλες ποσότητες μέσω cDNA βιβλιοθηκών.

α. Να αναφέρετε τα βήματα για την δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών που να εκφράζουν το/τα γονίδια των ιντερφερονών (μονάδες 2) και να εξηγήσετε πως θα γίνει η επιλογή του κατάλληλου κλώνου μετασχηματισμένων βακτηρίων που θα εκφράζουν το γονίδιο μιας συγκεκριμένης

ιντερφερόνης (μονάδες 2).

β. Να ονομάσετε την κατάλληλη συσκευή (μονάδες 3) και να γράψετε με ποιο είδος καλλιέργειας θα πρέπει να καλλιεργηθούν αυτά τα βακτήρια για να πετύχουμε αυξημένη παραγωγή της ιντερφερόνης, με δεδομένο ότι τα βακτήρια παράγουν την ιντερφερόνη κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής τους (μονάδες 3).

γ. Άλλες φαρμακευτικές πρωτεΐνες που παρασκευάζονται με μεθόδους βιοτεχνολογίας επιλέγεται να παράγονται μέσω των διαγονιδιακών ζώων και όχι μέσω cDNA βιβλιοθηκών σε βακτήρια. Να αιτιολογήσετε γιατί μπορεί να συμβαίνει αυτό (μονάδες 3).

Μονάδες 13

α. Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- Απομόνωση του συνολικού ώριμου mRNA, από κατάλληλα κύτταρα (π.χ. κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιό).
- Κατασκευή δίκλωνων μορίων DNA (με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και της DNA πολυμεράσης) και ενσωμάτωσή τους σε πλασμίδια.
- Μετασηματισμός βακτηρίων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και πολλαπλασιασμός τους σε υγρό θρεπτικό υλικό.
- Επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων και στη συνέχεια εκείνων που περιέχουν το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την επιθυμητή ιντερφερόνη με τη χρήση κατάλληλων ιχνηθετημένων ανιχνευτών, δηλαδή μονόκλωνων μορίων DNA ή RNA με αλληλουχία συμπληρωματική και αντιπαράλληλη με το επιθυμητό γονίδιο (εναλλακτικά μπορεί να γίνει η ανίχνευση της ίδιας της ιντερφερόνης με τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων).

β. Η ανάπτυξη των βακτηρίων που επιλέχθηκαν θα πραγματοποιηθεί σε βιοαντιδραστήρα, με συνεχή καλλιέργεια, για παραγωγή του μορίου της ιντερφερόνης σε μεγάλη ποσότητα (με δεδομένο ότι παράγουν την ιντερφερόνη κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής τους).

γ. Τα διαγονιδιακά ζώα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χρήσιμων πρωτεϊνών σε μεγάλη ποσότητα. Είναι δυνατή η παραγωγή πρωτεϊνών, όπως η ινσουλίνη και η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη, από βακτήρια. Στις περισσότερες, όμως, περιπτώσεις οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι ακριβώς ίδιες με τις πρωτεΐνες του ανθρώπου, επειδή τα βακτήρια δεν διαθέτουν τους μηχανισμούς τροποποίησης των πρωτεϊνών που διαθέτουν οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Επιπρόσθετα, δεν είναι δυνατόν να γίνουν αυτές οι τροποποιήσεις *in vitro* (όπως στην περίπτωση της προΐνσουλίνης με τη χρήση κατάλληλου ενζύμου). Συνεπώς, η παραγωγή πρωτεϊνών (σε μεγάλες ποσότητες) που γίνονται λειτουργικές με πολύπλοκες τροποποιήσεις, πρέπει να γίνεται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως τα ζώα. Μια πολλά υποσχόμενη ιδέα είναι η παραγωγή πρωτεϊνών από κύτταρα των μαστικών αδένων των ζώων, για παράδειγμα των προβάτων και των αγελάδων. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η συλλογή της πρωτεΐνης από το γάλα των ζώων.

135. Η γονιδιακή θεραπεία είναι μια εφαρμογή της βιοτεχνολογίας που αξιοποιεί την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και τις γνώσεις μας σχετικά με την αλληλουχία και την οργάνωση του ανθρώπινου γονιδιώματος, προκειμένου να επιτύχουμε την “γενετική” διόρθωση του παθολογικού φαινοτύπου με την εισαγωγή του φυσιολογικού αλληλόμορφου στα πάσχοντα κύτταρα.

α. Να εξηγήσετε πως το πρόγραμμα αποκρυπτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος συνέβαλε στην ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας (μονάδες 4). Να αναφέρετε δύο προϋποθέσεις που πρέπει να ισχύουν, ώστε να προχωρήσουμε σε εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας για μια ασθένεια (μονάδες 2).

β. Να εξηγήσετε γιατί με τις μεθόδους που γνωρίζετε δεν έχει νόημα να προβούμε σε γονιδιακή

θεραπεία ασθένειας που οφείλεται σε επικρατές γονίδιο (μονάδες 3). Να αναλύσετε το λόγο για τον οποίο κατά την γονιδιακή θεραπεία ασθενειών που αποδίδονται σε παθολογικά ερυθροκύτταρα, η επέμβαση δεν μπορεί να γίνει στα ώριμα ερυθροκύτταρα (μονάδες 3).

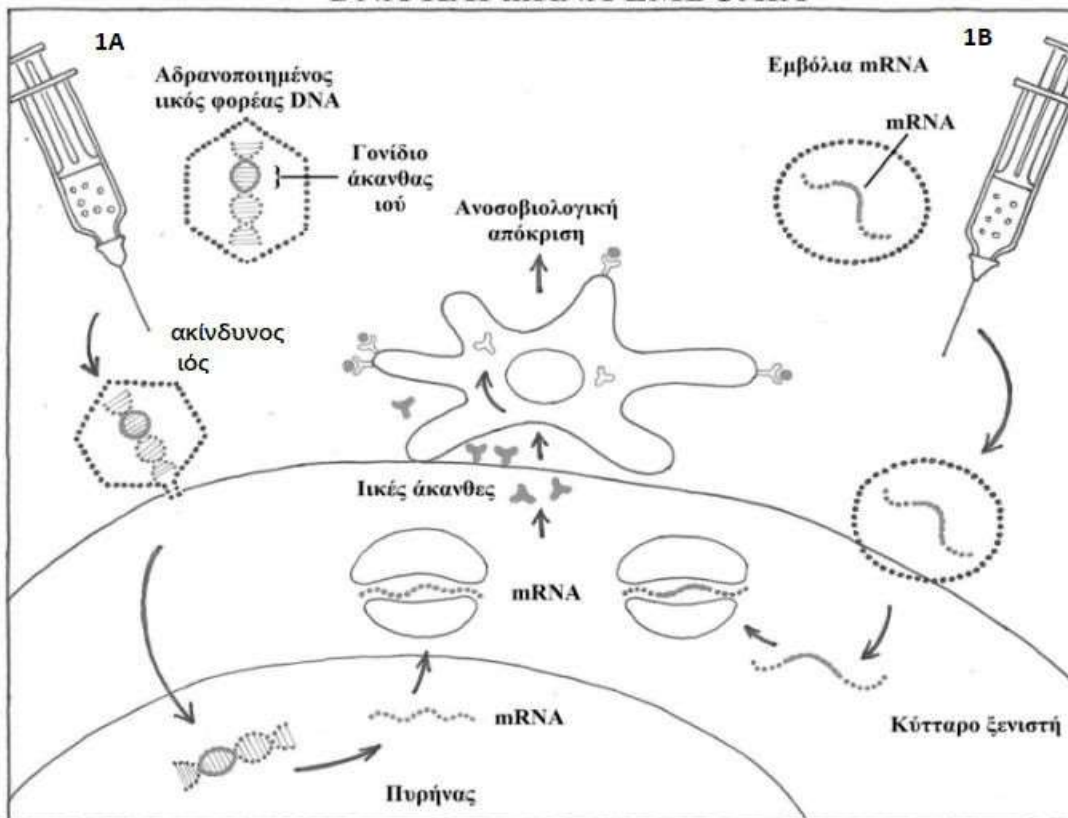
Μονάδες 12

α. Περισσότερες από 4.000 ασθένειες οφείλονται σε γονιδιακές μεταλλάξεις και πολλές από αυτές εμφανίζονται στις μεγάλες ηλικίες. Μερικές οφείλονται σε ένα μόνο γονίδιο, άλλες σε αλληλεπίδραση δύο ή περισσότερων γονιδίων και ακόμη περισσότερες σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η ακτινοβολία και οι χημικές ουσίες. Σήμερα έχουν χαρτογραφηθεί και κλωνοποιηθεί τα γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για ασθένειες όπως η κυστική ίνωση, η ασθένεια του Huntington, η μυϊκή δυστροφία Duchenne κ.α. Η χαρτογράφηση όλων των γονιδίων στα χρωμοσώματα ήταν ένας από τους κύριους στόχους του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος, ενώ με τις μεθόδους της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA πολλά μεταλλαγμένα γονίδια κλωνοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν με τα φυσιολογικά αλληλόμορφά τους, για να εξακριβωθεί το είδος των μεταλλάξεων. Πιο συγκεκριμένα με την ολοκλήρωση του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος, προσδιορίστηκαν το σύνολο των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών, καθώς και οι περιοχές του γονιδιώματος με άγνωστη λειτουργία. Επίσης έγινε προσδιορισμός της θέσης και της αλληλουχίας των γονιδίων που έχουν μεταλλαγή και σχετίζονται με διάφορες ασθένειες. Οι γνώσεις αυτές έδωσαν τη δυνατότητα ανάπτυξης θεραπείας που στηρίζεται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και ονομάζεται γονιδιακή θεραπεία. Αυτή έχει ως στόχο να «διορθώσει» τη γενετική βλάβη, εισάγοντας στους ασθενείς φυσιολογικά αλληλόμορφα του μεταλλαγμένου γονιδίου. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας είναι, εκτός από την κλωνοποίηση του φυσιολογικού γονιδίου, και ο προσδιορισμός των κυττάρων που εμφανίζουν τη βλάβη από την ασθένεια (εναλλακτικά: η δυνατότητα να παρέμβουμε στα κύτταρα αυτά *ex vivo* ή *in vivo*, το υπεύθυνο αλληλόμορφο να είναι υπολειπόμενο, η ασθένεια να είναι μονογονιδιακή και τα κύτταρα να επιβιώνουν στον οργανισμό μετά την τροποποίησή τους).

β. Η εισαγωγή του φυσιολογικού αλληλομόρφου δεν αναμένεται να αναστείλει την έκφραση του παθολογικού αλληλομόρφου στα πάσχοντα κύτταρα αν το παθολογικό αλληλόμορφο είναι επικρατές (με τις τεχνολογίες που αναφέρονται στην παρούσα ύλη, δεν πραγματοποιείται αντικατάσταση του παθολογικού αλληλομόρφου). Έτσι, σε αυτή την περίπτωση, η εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας με την είσοδο του φυσιολογικού αλληλομόρφου στα πάσχοντα κύτταρα, δεν αναμένεται να επιδιορθώσει το φαινότυπο των κυττάρων που πάσχουν. Αντίθετα, όταν ο παθολογικός φαινότυπος αποδίδεται στην έκφραση υπολειπόμενου αλληλομόρφου, η εισαγωγή του επικρατούς φυσιολογικού γονιδίου επαναφέρει τον φυσιολογικό φαινότυπο στα πάσχοντα κύτταρα. Στην περίπτωση που θέλουμε να επαναφέρουμε τον φυσιολογικό φαινότυπο σε ερυθρά αιμοσφαίρια καταφεύγουμε στην εισαγωγή του φυσιολογικού αλληλομόρφου όχι στα ίδια τα ώριμα ερυθροκύτταρα, αλλά στα πρόδρομα κύτταρα αυτών. Αυτό είναι απαραίτητο καθώς τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν φέρουν πυρήνα. Επομένως δεν μπορούν να “επιδιορθωθούν”.

154. Η παρασκευή εμβολίων έναντι του νέου κορονοϊού, SARS-CoV-2, αποτελεί ένα μεγάλο επίτευγμα της σύγχρονης Βιολογίας. Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται δύο από τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή εμβολίων κατά τη διάρκεια της πανδημίας της νόσου COVID-19.

DNA ΚΑΙ mRNA ΕΜΒΟΛΙΑ



Εικόνα 1

Πιο συγκεκριμένα στην Εικόνα 1A παρουσιάζεται η εισαγωγή (μέσω εμβολίου) του γονιδίου που κωδικοποιεί για μία επιφανειακή πρωτεΐνη (ική άκανθα) του ιού, που δρα ως αντιγονικός καθοριστής στα άτομα που εμβολιάζονται. Το γονίδιο εισάγεται με τη βοήθεια κατάλληλου ιικού φορέα DNA, όπως συνηθίζεται σε αυτήν την κατηγορία εμβολίων (εμβόλιο DNA). Από την άλλη μεριά, στην Εικόνα 1B παρουσιάζεται η εισαγωγή του mRNA για το ίδιο τμήμα του γονιδίου της ιικής άκανθας, το οποίο, όμως, εισάγεται με τη βοήθεια ενός νανομοριακού λιπιδικού καλύμματος (εμβόλιο RNA). Παρακάτω φαίνονται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του γονιδίου (εικόνα 2α) και του αντίστοιχου mRNA μετάγραφου, που κωδικοποιεί την επιφανειακή πρωτεΐνη του ιού (εικόνα 2β). Γνωρίζουμε ότι τα τμήματα της επιφανειακής πρωτεΐνης του ιού, που στοχεύουν να παράξουν και τα δύο είδη εμβολίων μέσα στο σώμα του εμβολιαζόμενου είναι απόλυτα όμοια, ενώ δεν λαμβάνει χώρα κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση μετά τη σύνθεσή τους.

1-TATAACCACCAATGTTATTGCT T C TT T C TTGACCC AAAATTTT-OH

2-ATATTGGTGGTTACAATAACGAAGAAAGAACTGGGTTTAAAA

Εικόνα 2α

3'-UUUUAAAACCCAGUUCUUUCUUCGUUAUUGUAACCACC-5'

Εικόνα 2β

α. Να αναφέρετε σε ποια κατηγορία εμβολίων νέας γενιάς ανήκει το εμβόλιο της εικόνας 1A (μονάδες 2) και να περιγράψετε πως λειτουργούν τα εμβόλια αυτά (μονάδες 3).

β. Να γράψετε την αλληλουχία των αμινοξέων που παράγει τόσο το εμβόλιο DNA όσο και το εμβόλιο mRNA (μονάδες 3).

γ. Η ομάδα που αναπτύσσει τα εμβόλια υποστηρίζει ότι η αλληλουχία των αμινοξέων του

τμήματος της ιικής ακίδας, που έχει επιλέξει για την παρασκευή του εμβολίου, μπορεί να διασφαλίσει προστασία από μια πληθώρα μεταλλάξεων. Μελετώντας προσεκτικά την αλληλουχία των αμινοξέων του πεπτιδίου που παράγεται και αξιοποιώντας τις ιδιότητες του γενετικού κώδικα, να εξηγήσετε την αισιοδοξία των μελών της ερευνητικής ομάδας (μονάδες 5).

Μονάδες 13

		Δεύτερο γράμμα					
		U	C	A	G		
U	UUU	Φαινοαλανίνη (phe)	UCLU	UUAU	Τοροσίνη (try)	UGU	κυστεΐνη (cys)
	UUC		UCC	UAC		UGC	
	UUA	Λευκίνη (leu)	UCA	UAA	λήξη	UGA	λήξη
	UUG		UCG	UAG	λήξη	UGG	Τροποφάνη (trp)
C	CUU		CCU	CAU	ιστιδίνη (his)	CGU	
	CUC	Λευκίνη (leu)	CCC	CAC		CGC	Αργινίνη (arg)
	CUA		CCA	CAA	Γλουταμίνη (glu)	CGA	
	CUG		CCG	CAG		CGG	
A	AUU	Ισολευκίνη (ile)	ACU	AAU	Ασπαραγίνη (asp)	AGU	Σερίνη (ser)
	AUC		ACC	AAC		AGC	
	AUA		ACA	AAA	Λυσίνη (lys)	AGA	Αργινίνη (arg)
	AUG	Μεθειονίνη (met) έναρξη	ACG	AAG		AGG	
G	GUU		GCU	GAU	Ασπαραγικό οξύ (asp)	GGU	
	GUC	βαλίνη (val)	GCC	GAC		GGC	Γλυκίνη (gly)
	GUA		GCA	GAA	γλουταμικό οξύ (glu)	GGA	
	GUG		GCG	GAG		GGG	

α. Το εμβόλιο της εικόνας 1α αποτελεί εμβόλιο από ζωντανούς γενετικά τροποποιημένους ιούς. Στα συγκεκριμένα εμβόλια, γονίδια από επικίνδυνο ιό (εδώ αναφερόμαστε στον κορονοϊό) ή άλλο μικροοργανισμό ενσωματώνονται σε άλλον ιό, που είναι αβλαβής για τον άνθρωπο (πχ. ιός της δαμαλίτιδας). Ο γενετικά τροποποιημένος ιός που προκύπτει εξακολουθεί να είναι αβλαβής. Ωστόσο, παράγει την αντιγονική πρωτεΐνη του ιού ή του μικροοργανισμού, εισάγεται στο σώμα και προκαλεί έντονη ανοσολογική αντίδραση.

β. Η περιοχή στη κωδική αλυσίδα του DNA που μεταφράζεται τόσο στο εμβόλιο DNA όσο και στο εμβόλιο mRNA έχει την εξής αλληλουχία:

5'..ATG-TTA-TTG-CTT-CTT-TCT-TGA..3'

Από αυτήν προκύπτει το πεπτίδιο: NH₂-Met-Leu-Leu-Leu-Leu-Ser-COOH

γ. Μελετώντας τον γενετικό κώδικα παρατηρούμε ότι για τα παραπάνω αμινοξέα (εκτός από αυτό της Met) υπάρχουν πολλά συνώνυμα κωδικόνια: Για τη Leu 6 και για τη Ser 6. Επομένως, με βάση τον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα αρκετές μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν στη σύνθεση του ίδιου πεπτιδίου της ακίδας (σιωπηλές) και αυτό καθιστά το εμβόλιο ιδιαίτερα ισχυρό απέναντι σε μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν στο γονίδιο της πρωτεΐνης της ακίδας του ιού.

158. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ, όπως και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA), ενέκριναν το φάρμακο “betibeglogene autotemcel”, την πρώτη γονιδιακή θεραπεία για τη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από β-θαλασσαιμία (ή μεσογειακή αναιμία).

α. Να γράψετε αν τα ώριμα ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαδικασία της γονιδιακής θεραπείας που αναφέρεται παραπάνω (μονάδες 2) και να εξηγήσετε ποιο είδος γονιδίου πρέπει να ενσωματωθεί στα κατάλληλα κύτταρα (μονάδες 4).

β. Να γράψετε τα βήματα της γονιδιακής θεραπείας που πιστεύετε ότι ακολουθούνται αν γνωρίζετε ότι πραγματοποιείται *ex vivo* (μονάδες 4) και να εξηγήσετε τον κίνδυνο που περιορίσε

α. Για τη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας δεν επιλέγονται τα ώριμα ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος καθώς από αυτά απουσιάζει ο πυρήνας και, συνεπώς, το γενετικό υλικό, οπότε θα ήταν αδύνατη η ενσωμάτωση και έκφραση του φυσιολογικού αλληλομόρφου. Το δε φυσιολογικό αλληλόμορφο είναι το γονίδιο της β πολυπεπτιδικής αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης HbA, καθώς η αιμοσφαιρίνη αυτή αποτελείται από δύο α και δύο β αλυσίδες, και στα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια εκφράζονται και τα δύο αντίστοιχα γονίδια που τις κωδικοποιούν, ενώ στους ασθενείς με β θαλασσαιμία πρέπει να εισαχθεί το φυσιολογικό β αλληλόμορφο για να καλύψει την έλλειψη ή τη μη φυσιολογική παραγωγή της β πολυπεπτιδικής, που προκαλεί το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο β.

β. Η διαδικασία που ακολουθείται στη γονιδιακή θεραπεία της παραπάνω ασθένειας είναι η εξής:

- Κατάλληλα κύτταρα του παιδιού (εναλλακτικά: Πρόδρομα ερυθροκύτταρα) παραλαμβάνονται και πολλαπλασιάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες.
- Το φυσιολογικό γονίδιο της β πολυπεπτιδικής αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης (αφού κλωνοποιηθεί) ενσωματώνεται σε έναν ιό-φορέα (ο οποίος έχει καταστεί αβλαβής) με τις τεχνικές του ανασυδασμένου DNA.
- Ο γενετικά τροποποιημένος ιός εισάγεται στα κύτταρα.
- Τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα εισάγονται με ενδοφλέβια ένεση στο παιδί και παράγουν τη β αλυσίδα.

Επειδή τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα δεν ζουν για πάντα μέσα στον οργανισμό - δηλαδή η θεραπεία δεν είναι μόνιμη- χρειάζεται, πιθανώς, και άλλη έγχυση τέτοιων κυττάρων.

Στις περισσότερες περιπτώσεις ως φορείς χρησιμοποιούνται ιοί οι οποίοι αν και καθίστανται αβλαβείς, έχουν μικρή πιθανότητα να προκαλέσουν παρενέργειες και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνο. Αυτός ήταν ο κίνδυνος που έπρεπε να ξεπεραστεί. Έτσι λοιπόν η ανάπτυξη πιο κατάλληλων φορέων ήταν ο στόχος για τη βελτίωση των μεθόδων της γονιδιακής θεραπείας.

169. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος ολοένα και περισσότερα πρωτόκολλα αλληλούχισης DNA (προσδιορισμού της αλληλουχίας της πρωτοταγούς διάταξης) από διάφορα είδη κυττάρων και οργανισμών ή ακόμη και γενετικού υλικού από ιούς υλοποιούνται σε εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας ανά τον κόσμο καθημερινά, στα πλαίσια μιας εργαστηριακής “ρουτίνας”. Από ένα αντίστοιχο πρωτόκολλο αλληλούχισης του γενετικού υλικού ενός στελέχους βακτηρίου προέκυψε και η παρακάτω αλληλουχία DNA.

PO₄--TTTCCAAATGAGTAAAAAACAACGTAAGTATGGGTT-- OH

α. Ξέροντας ότι το παραπάνω τμήμα DNA ανήκει σε ένα προκαρυωτικό γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για πεπτίδιο, να εξηγήσετε αν η δοθείσα αλυσίδα είναι η κωδική ή η μη κωδική του γονιδίου και να γράψετε το mRNA που παράγεται από την μεταγραφή του (μονάδες 4). Να υπολογίσετε τον αριθμό των αμινοξέων που θα συγκροτούν το παραγόμενο ολιγοπεπτίδιο μετά την μετάφραση του mRNA μορίου (μονάδες 2).

β. Τελικά βρέθηκε ότι το γονίδιο αυτό αποτελεί το μοναδικό γονίδιο ανθεκτικότητας ενός είδους πλασμιδίων, το οποίο προσδίδει ανοχή στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη στα βακτήρια που το φέρουν. Ένας μεταπτυχιακός φοιτητής σκέφτεται να πραγματοποιήσει κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ενός ιού, με τη χρήση των συγκεκριμένων πλασμιδίων, ως φορείς κλωνοποίησης, και να κόψει τόσο τους φορείς, όσο και το γονιδίωμα του ιού με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Ως ξενιστές θα χρησιμοποιήσει βακτήρια χωρίς ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Γνωρίζει ότι τα πλασμίδια κόβονται σε μία θέση από το ένζυμο αυτό, αλλά

δεν γνωρίζει που βρίσκεται αυτή η θέση. Να εξηγήσετε αν θεωρείτε κατάλληλα αυτά τα πλασμίδια και να διερευνήσετε τυχόν πρόσθετες προϋποθέσεις που πρέπει να πληροί ένα πλασμίδιο για να θεωρηθεί κατάλληλο ως φορέας κλωνοποίησης (μονάδες 7).

Μονάδες 13

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'--TTTCCAA-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-GTATGGGTT 3'

3' AAAGGTT-TAC-TCA-TTT- TTT- TTT- TGC- ATT-CATACCCAA 5'

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 ανοχής στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη, 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.

170. Η γονιδιακή θεραπεία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1990, με μια διαδικασία που είναι γνωστή με τον όρο *ex vivo* για τη θεραπεία της έλλειψης του ενζύμου της απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA) και έκτοτε, με τη χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, εφαρμόζεται στη θεραπεία πολλών σοβαρών γενετικών ασθενειών όπως η κυστική ίνωση και διάφορες μορφές καρκίνου, αλλά ακόμη και στη θεραπεία του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Στα πλαίσια εφαρμογής *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας θέλουμε να "παρέμβουμε" θεραπευτικά σε ευκαρυωτικά κύτταρα, εισάγοντας σε αυτά το επιθυμητό γονίδιο.

α. Να περιγράψετε τα βήματα της διαδικασίας εισαγωγής του επιθυμητού γονιδίου στα κύττα-

ρα αυτά (μονάδες 4). Να αναφέρετε ένα παράδειγμα ασθένειας, όπου το παραπάνω πρωτόκολλο δεν θα μπορούσε να εφαρμοστεί και θα χρειαζόταν να καταφύγουμε σε *in vivo* εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας (μονάδες 2).

β. Να διερευνήσετε αν τα κύτταρα που θα προκύψουν από τις διαδοχικές διαιρέσεις των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια θα συνεχίσουν να εκφράζουν το ενσωματωμένο γονίδιο (μονάδες 3). Μετά την εισαγωγή των τροποποιημένων κυττάρων στον ασθενή, να αναφέρετε αν περιμένουμε το νέο χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών να εμφανίζεται και στα αντίστοιχα κύτταρα των απογόνων του ατόμου, που θα υποστεί τη γονιδιακή θεραπεία (μονάδες 3).

Μονάδες 12

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 γονιδίωμα 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.

177. Τα μονοκλωνικά αντισώματα συνεισφέρουν σημαντικά στην αύξηση της ευαισθησίας κλινικών δοκιμασιών, όπως ο προσδιορισμός των ομάδων αίματος του συστήματος ABO. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιούνται τα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-A και αντι-B, τα οποία συνδέονται με τα αντιγόνα A και B, αντίστοιχα, της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων. Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζονται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ελέγχου του αίματος 5 ατόμων με τα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-A και αντι-B. Το σύμβολο (+), χρησιμοποιείται αν το μονοκλωνικό αντίσωμα συνδέεται με το αντιγόνο, και το σύμβολο (-), αν δεν συνδέεται.

Μονοκλωνικό αντίσωμα	Ελένη	Σάκης	Φλώρα	Βασίλης	Ευτύχης
αντι-A	-	-	-	+	+
αντι-B	-	-	+	+	-

Ο Σάκης και η Φλώρα είναι παιδιά της Ελένης που τα απέκτησε με δύο διαφορετικούς άνδρες, τον Βασίλη και τον Ευτύχη.

α. Να αναφέρετε δύο επιπρόσθετες χρήσεις που μπορεί να έχουν τα μονοκλωνικά αντισώματα, εκτός από ανοσοδιαγνωστικά (μονάδες 4).

β. Να γράψετε την ομάδα αίματος καθενός από τα άτομα που αναφέρονται στον πίνακα (μονάδες 5).

γ. Να εξηγήσετε ποιος μπορεί να είναι ο πατέρας του κάθε παιδιού (μονάδες 3).

Μονάδες 12

α. Τα μονοκλωνικά αντισώματα, εκτός από ανοσοδιαγνωστικά, χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά, με πιο ενδιαφέρουσα εφαρμογή αυτή, που αφορά στη θεραπεία του καρκίνου. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή οργάνων συμβατών για μεταμόσχευση.

β. Η Ελένη και ο Σάκης έχουν ομάδα αίματος 0, επειδή στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων τους δεν συνδέεται κανένα μονοκλωνικό αντίσωμα σε κάποιο αντιγόνο. Η Φλώρα έχει ομάδα αίματος Β, καθώς στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων της ανιχνεύεται το αντιγόνο Β. Ο Βασίλης έχει ομάδα αίματος ΑΒ, αφού στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων του υπάρχουν τόσο το αντιγόνο Β, όσο και το αντιγόνο Α. Ο Ευτύχης έχει ομάδα αίματος Α επειδή εντοπίζεται το αντιγόνο Α στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων του.

γ. Ο Βασίλης, έχοντας ομάδα αίματος ΑΒ, έχει γονότυπο $I^A I^B$ και επομένως δεν μπορεί να μεταβιβάσει στο παιδί του αλληλόμορφο i . Άρα δεν μπορεί να είναι ο πατέρας του Σάκη, ο οποίος πρέπει, έχοντας ομάδα αίματος 0, να έχει κληρονομήσει από ένα αλληλόμορφο i από κάθε γονέα. Άρα ο Βασίλης είναι πατέρας της Φλώρας. Ο Ευτύχης είναι πατέρας του Σάκη και έχει γονότυπο $I^A i$, καθώς έχει κληροδοτήσει στον Σάκη το αλληλόμορφο i .

