

ΘΕΜΑ 4

82. Κατά τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων, με την μέθοδο της μικροέγχυσης, αξιοποιείται στο έπακρο η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και οι πληροφορίες από την αποκρυπτογράφηση των γονιδιωμάτων των οργανισμών. Η επιθυμητή αλληλουχία, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, ενσωματώνεται στο DNA του πυρήνα των κυττάρων και ακολουθεί την πορεία της πρωτεϊνοσύνθεσης, μέχρι στο τέλος η πρωτεΐνη να εκκριθεί από τα κύτταρα αυτά και να τη συλλέξουμε. Ο Δρ. Φώτης Καφάτος- πατέρας της γενετικής μηχανικής εμπνεύστηκε την αλληλούχιση του γονιδιώματος του κουνουπιού. Μια ιδέα που οδήγησε στην αποκάλυψη περιοχών του γονιδιώματος του κουνουπιού, όπου εντοπίζονται γονίδια, που, με τις πρωτεΐνες που παράγουν, καθορίζουν αν θα μπορέσει το πλασμώδιο της ελονοσίας να εγκατασταθεί και να πολλαπλασιαστεί μέσα στα κύτταρα του κουνουπιού. Στη συνέχεια, πρότεινε την τροποποίηση των παραπάνω περιοχών του γονιδιώματος των κουνουπιών, που μπορούν να “φιλοξενήσουν” το πλασμώδιο μέσα στα κύτταρά τους, έτσι ώστε να προκύψουν διαγονιδιακά κουνούπια που δεν επιτρέπουν τη μετάδοση του πλασμωδίου. Όλο αυτό το πρόγραμμα έγινε με σκοπό την παρεμπόδιση της μετάδοσης της ελονοσίας, μιας ασθένειας που ευθύνεται για ένα τεράστιο ποσοστό θανάτων στην υποσαχάρια Αφρική. Αυτή η προσέγγιση άνοιξε το δρόμο για ένα ένα σύνολο εφαρμογών της βιοτεχνολογίας που αποσκοπούν στην βελτίωση της υγείας και της ποιότητας ζωής των ανθρώπων.

α. Να περιγράψετε την πορεία της “επιθυμητής” αλληλουχίας του DNA, που εισάγεται με μικροέγχυση μέσα σε ένα κύτταρο, το οποίο τροποποιείται γενετικά με τεχνικές γενετικής μηχανικής, αναφέροντας τα οργανίδια του κυττάρου από τα οποία περνάει και τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα, μέχρι να καταλήξει στην παραγωγή και έκκριση της επιθυμητής πρωτεΐνης από τα κύτταρα του διαγονιδιακού, πλέον, ζώου (Μονάδες 7).β. Να αναφέρετε σε ποια συγκεκριμένη ιδιότητα του γενετικού κώδικα βασίζεται η επιτυχία στην παραγωγή πρωτεϊνών ενός οργανισμού στα κύτταρα ενός άλλου (Μονάδες2) και να εξηγήσετε γιατί πιστεύετε ότι απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της ιδέας του Δρ. Καφάτου ήταν η χαρτογράφηση και η αλληλούχιση του γονιδιώματος του κουνουπιού (Μονάδες 4).

Μονάδες 13

α. Πραγματοποιείται μικροέγχυση του γονιδίου (με κατάλληλο υποκινητή) στον πυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου του ζώου. Το ξένο γενετικό υλικό ενσωματώνεται συνήθως σε κάποιο από τα χρωμοσώματα του πυρήνα του ζυγωτού. Εφόσον το γονίδιο μεταβιβάζεται σε όλα τα απόγονα κύτταρα του ζυγωτού, κάθε κύτταρο του νέου οργανισμού θα το φέρει. Στο πυρήνα του κατάλληλου κυτταρικού τύπου, συντίθεται και ωριμάζει το mRNA που κωδικοποιεί τη σύνθεση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Μέσα από τους πυρηνικούς πόρους, το ώριμο mRNA περνάει στο κυτταρόπλασμα, όπου και γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση είτε στα ελεύθερα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος, είτε στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο φέρει στην εξωτερική επιφάνεια των μεμβρανών του μικρούς σχηματισμούς, τα ριβοσώματα. Στην τελευταία περίπτωση, η πρωτεΐνη που συντίθενται εισέρχεται, στη συνέχεια, στο εσωτερικό των αγωγών του δικτύου, όπου ενδέχεται να υποστεί τροποποιήσεις (π.χ. προσθήκη σακχάρων).

β. Η μεταφορά και ενσωμάτωση στο DNA των κυττάρων ενός οργανισμού, αλληλουχιών από άλλους οργανισμούς (του ίδιου ή άλλου είδους), στηρίζεται στην ιδιότητα του γενετικού κώδικα που τον καθιστά σχεδόν καθολικό. Προκειμένου να γνωρίζουμε ποιες αλληλουχίες του γονιδιώματος του κουνουπιού κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην είσοδο ή/ και στον πολλαπλασιασμό του πλασμωδίου μέσα στα κύτταρά του, έτσι ώστε να επηρεάσουμε την έκφρασή τους, εισάγοντας τις κατάλληλες αλληλουχίες DNA από άλλους οργανισμούς που θα

τις καταστήσουν ανενεργές (ή ακόμη και να τις αντικαταστήσουμε -με σύγχρονες τεχνικές- με άλλες αλληλουχίες που θα καταστούν τα κύτταρα του κουνουπιού ανίκανα να μολυνθούν από το πλασμώδιο), απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η χαρτογράφηση των γονιδίων αυτών και η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος του κουνουπιού.

86. Μετά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο οι ερευνητές κατόρθωσαν να παρασκευάσουν πολλά χημικά εντομοκτόνα για την προστασία των καλλιεργειών, τα οποία, μαζί με άλλες επιτυχημένες προσπάθειες (νέα φυτικά είδη και λιπάσματα), εξασφάλισαν υψηλές αποδόσεις στις καλλιέργειες και, συνεπώς, τροφή για εκατομμύρια ανθρώπους. Όμως, από τη δεκαετία του 1970 έγινε αντιληπτό ότι η συσσώρευση στα οικοσυστήματα των χημικών εντομοκτόνων είχε δυσμενείς επιπτώσεις στην ισορροπία τους, αλλά και στην υγεία του ανθρώπου.

Για το σκοπό αυτό, αναζητήθηκαν τρόποι αντιμετώπισης των απειλητικών, για τις καλλιέργειες, εντόμων και παρασίτων, περισσότερο φιλικό προς το περιβάλλον και λιγότερο απειλητικό προς την ισορροπία των οικοσυστημάτων, αλλά και την υγεία του ανθρώπου. Σε αυτή την προσπάθεια οι ερευνητές χρησιμοποίησαν το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*, το οποίο φέρει μια τοξίνη που είναι 80.000 δραστικότερη από πολλά χημικά εντομοκτόνα.

α. Να αναφέρετε πού ζει το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* (μονάδα 1) και να περιγράψετε την αρχική χρήση του συγκεκριμένου βακτηρίου στην προσπάθεια αντιμετώπισης των εντόμων που απειλούν τις καλλιέργειες (μονάδες 3). Να εξηγήσετε ποιος λόγος επέβαλε την αναζήτηση νέων τρόπων αξιοποίησής του από τους ερευνητές (μονάδες 2).

β. Να περιγράψετε τον τρόπο με τον οποίο η Βιοτεχνολογία κατάφερε να αξιοποιήσει τελικά την τοξίνη του *Bacillus thuringiensis* (μονάδες 4) και να εξηγήσετε πόσων ειδών οργανισμών γενετικό υλικό διαθέτει στα κύτταρά του ένα φυτό ποικιλίας Bt (μονάδες 3).

Μονάδες 13

α. Τα βακτήρια του είδους *Bacillus thuringiensis* ζουν στο έδαφος. Επειδή τα βακτήρια παράγουν τη συγκεκριμένη ισχυρή τοξίνη, στην αρχική τους χρήση, πολλαπλασιάστηκαν στο εργαστήριο και στη συνέχεια ψεκάστηκαν στον αγρό. Οι επιστήμονες αναζήτησαν νέους τρόπους χρήσης του βακτηρίου, γιατί η προαναφερόμενη τεχνική των ψεκασμών υπήρξε αρκετά δαπανηρή, μιας και τα βακτήρια δεν μπορούσαν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον και, κατά συνέπεια, χρειαζόνταν συνεχείς ψεκασμοί.

β. Οι ερευνητές απομόνωσαν το γονίδιο του βακτηρίου που παράγει την τοξίνη και στη συνέχεια έγινε μεταφορά του στα φυτά. Η μεταφορά στα φυτά έγινε με τη βοήθεια του πλασμιδίου Ti του *Agrobacterium tumefaciens*. Δημιουργήθηκαν δηλαδή ανασυνδυασμένα πλασμίδια Ti, στα οποία είχαν απενεργοποιηθεί τα γονίδια των όγκων που φέρουν και είχαν εισαχθεί γονίδια τοξίνης (ένα γονίδιο ανά πλασμίδιο). Τελικά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισήχθησαν σε φυτικά κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε ειδικές καλλιέργειες στο εργαστήριο. Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά που παράγονται με την διαδικασία αυτή είναι ανθεκτικά στα διάφορα έντομα (φυτά Bt).

Ένα φυτό ποικιλίας Bt φέρει στα σωματικά του κύτταρα γενετικό υλικό τριών ειδών οργανισμών. Το γενετικό υλικό του φυτικού είδους στο οποίο το ίδιο ανήκει, το γονίδιο της τοξίνης του *Bacillus thuringiensis* και το γενετικό υλικό του πλασμιδίου Ti (από το είδος *Agrobacterium tumefaciens*).

100. Τα διαγονιδιακά ζώα παράγονται από την στοχευμένη εισαγωγή ξένου DNA στο γονιδίωμα ενός ζώου δέκτη και συγκεκριμένα στο ζυγωτό αυτού. Αυτό αποσκοπεί στη μεταβίβαση του ξένου DNA σε όλα τα κύτταρα του νέου οργανισμού, προκειμένου κάθε κύτταρο να περιέχει το

ίδιο τροποποιημένο γενετικό υλικό, και διαμέσου των γεννητικών κυττάρων του να κληρονομηθεί στις επόμενες γενιές. Ένα από τα είδη που τροποποιούνται γενετικά συχνότερα, στα πλαίσια παραγωγής διαγονιδιακών ζώων, είναι η κατσίκα. Στα κύτταρα του μαστικού αδένος της κατσίκας υπάρχει ένας συγκεκριμένος κυτταρικός τύπος, όπου σε κάποιο από τα 28 χρωμοσώματα του είδους, εντοπίζεται και εκφράζεται το γονίδιο της καζεΐνης, μιας πρωτεΐνης του γάλακτος. Ο στόχος είναι τα διαγονιδιακά ζώα του συγκεκριμένου είδους να παράγουν την πρωτεΐνη α1 -αντιθρυψίνη στο γάλα τους. Προς τούτο, στο γενετικό υλικό ζυγωτού κατσίκας, ενσωματώνεται με σύγχρονες τεχνικές μέσα στο γονίδιο της καζεΐνης, αμέσως μετά τον υποκινητή του, με κατάλληλο προσανατολισμό, το γονίδιο της ανθρώπινης α1-αντιθρυψίνης μόνο σε ένα αντίγραφο. Παράλληλα, η ίδια διαδικασία ακολουθείται και σε ζυγωτό τράγου όπου μέσα στο γονίδιο της καζεΐνης με κατάλληλο προσανατολισμό, ενσωματώνεται το γονίδιο της ανθρώπινης α1-αντιθρυψίνης μόνο σε ένα αντίγραφο .

α. Να εξηγήσετε πως η θέση και ο προσανατολισμός ενσωμάτωσης του γονιδίου της α1- αντιθρυψίνης θα καθορίσουν την έκφρασή του στα κύτταρα του μαστικού αδένος (μονάδες 6). β. Να βρείτε την πιθανότητα να γεννηθεί, από τη διασταύρωση των παραπάνω ζώων, άτομο ομόζυγο ως προς το γονίδιο της α1-αντιθρυψίνης που να παράγει επίσης την πρωτεΐνη αυτή στο γάλα του (μονάδες 7).

Μονάδες 13

α. Ο υποκινητής της καζεΐνης στα κύτταρα του μαστικού αδένος είναι ενεργός. Δηλαδή προσδένονται σε αυτόν ο σωστός συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων και επιτρέπουν στην RNA πολυμεράση την μεταγραφή του γονιδίου μετά από αυτόν. Επομένως, εφόσον το γονίδιο της ανθρώπινης α1- αντιθρυψίνης ενσωματώνεται μετά τον υποκινητή της καζεΐνης, με τον σωστό προσανατολισμό, μεταγράφεται. Στη συνέχεια, η μετάφραση του θα πραγματοποιηθεί όπως ακριβώς θα γινόταν και στα κύτταρα του ανθρώπου, λόγω της καθολικότητας του γενετικού κώδικα και λόγω της ύπαρξης ριβοσωμάτων και κατάλληλων μηχανισμών μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων που διαθέτουν τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Επομένως, το γονίδιο της ανθρώπινης α1-αντιθρυψίνης θα εκφραστεί στα κύτταρα του μαστικού αδένος της κατσίκας. β. Η διαγονιδιακή κατσίκα θα έχει γονότυπο A-. Το ίδιο και ο διαγονιδιακός τράγος. Η διασταύρωσή τους είναι:

P (γονότυποι): A- x A-

Γαμέτες: A, - / A, -

(1^{ος} Νόμος Μέντελ)

F1: AA, A-, A-, --

Η πιθανότητα να γεννηθεί ένα ομόζυγο άτομο ως προς το γονίδιο της α1-αντιθρυψίνης είναι 1/4.

Ωστόσο, για να παράγει την α1-αντιθρυψίνη στο γάλα θα πρέπει να είναι θηλυκό (1/2). Επομένως, η πιθανότητα να γεννηθεί ομόζυγο θηλυκό ζώο είναι $1/4 \times 1/2 = 1/8$.

101. Ένας βασικός στόχος της Βιοτεχνολογίας στην παραγωγή αγροτικών προϊόντων είναι η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής τους από το χωράφι έως τον καταναλωτή. Ανάμεσα στους πρώτους φυτικούς οργανισμούς, που τροποποιήθηκαν γενετικά ήταν η ντομάτα. Η ντομάτα σαπίζει γρήγορα, διότι το ένζυμο πολυγαλακτουρονάση (PG) εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό και συμβάλλει στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος της ντομάτας. Κύριος στόχος της Βιοτεχνολογίας λοιπόν, είναι η καταστολή ή ο περιορισμός της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί το PG. Μέσα από τις προσπάθειες των ερευνητών δημιουργήθηκε η ντομάτα “Flavr Savr”, μια γενετικά τροποποιημένη ντομάτα που περιείχε το φυσιολογικό γονίδιο PG, αλλά και το γονίδιο PG τοποθετημένο ανάποδα και δίπλα στον κατάλληλο υποκινητή. Με τον όρο “ανάποδα”

εννοούμε ότι η κωδική αλυσίδα του “ανάποδου” γονιδίου αντιστοιχεί στη μεταγραφόμενη του φυσιολογικού, ώστε κατά τη μεταγραφή του να προκύπτει ένα RNA συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο του φυσιολογικού.

α. Να περιγράψετε τα βήματα με τα οποία δημιουργήθηκαν τα παραπάνω διαγονιδιακά φυτά ντομάτας (μονάδες 6).

β. Να εξηγήσετε πώς η συγκεκριμένη μεθοδολογία αυξάνει το χρόνο ζωής της ντομάτας περιορίζοντας το σάπισμα της, αν γνωρίζετε ότι τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν ένζυμα που καταστρέφουν τα δικλωνα RNA που εντοπίζονται στον πυρήνα τους (μονάδες 6).

Μονάδες 12

α. Το διαγονιδιακό φυτά προέκυψαν μέσω της γενετικής μηχανικής καθώς απομονώθηκε το γονίδιο για την PG και τοποθετήθηκε στο πλασμίδιο Ti, μετά από κατάλληλο υποκινητή αλλά με αντίστροφο προσανατολισμό. Στη συνέχεια, μετασηματίστηκαν φυτικά κύτταρα ντομάτας με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, τα οποία αναπτύχθηκαν σε ειδικές καλλιέργειες στο εργαστήριο. Έτσι δημιουργήθηκαν (μεταξύ άλλων) και επιλέχθηκαν τα διαγονιδιακά φυτά που εξέφραζαν το συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο RNA του γονιδίου PG, αλλά και το αναμενόμενο RNA από το φυσιολογικό γονίδιο PG.

β. Στη διαγονιδιακή ντομάτα εκφράζεται το γονίδιο PG και συντίθεται η πρωτεΐνη PG, που συμβάλλει στο σάπισμα της. Παράλληλα εκφράζεται και το γονίδιο που έχει τοποθετηθεί με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Έτσι, παράγεται ένα mRNA, το οποίο είναι συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο με το φυσιολογικό mRNA του γονιδίου PG. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα δύο mRNA να υβριδοποιούνται δημιουργώντας ένα δίκλωνο RNA, που το ίδιο το κύτταρο αναγνωρίζει ως ξένο και καταστρέφει με τη βοήθεια των ειδικών ενζύμων που διαθέτει. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται ή περιορίζεται η έκφραση του φυσιολογικού mRNA του PG. Άρα, καθυστερεί να σαπίσει η ντομάτα και έτσι αυξάνεται ο χρόνος ζωής της από το χωράφι στον καταναλωτή.

110. Διαγονιδιακά ονομάζονται τα ζώα εκείνα στα οποία έχει τροποποιηθεί το γενετικό τους υλικό με την προσθήκη γονιδίων, συνήθως από κάποιο άλλο είδος. Η μικροέγχυση αποτελεί μία μέθοδο, με την οποία το ξένο γενετικό υλικό ενσωματώνεται συνήθως σε κάποιο από τα χρωμοσώματα του πυρήνα του ζυγωτού του ζώου. Η ενσωμάτωση στα χρωμοσώματα του ζώου είναι απαραίτητη για την επακόλουθη αντιγραφή του ξένου γονιδίου και την παρουσία του σε όλα τα κύτταρα του ενήλικου ζώου. Για τη διαπίστωση της ενσωμάτωσης, το ξένο γονίδιο συχνά συνδέεται με ένα γονίδιο δείκτη, π.χ. χρωστικής του τριχώματος του ζώου που προσδίδει καφέ χρώμα στο ζώο. Για την παραγωγή διαγονιδιακών ζώων που θα εκφράζουν τον παράγοντα IX, πραγματοποιήθηκε μικροέγχυση στον πυρήνα ζυγωτών ζώων με άσπρο χρώμα τριχώματος (α: υπολειπόμενος αυτοσωμικός χαρακτήρας για το άσπρο χρώμα), ενώ το επιθυμητό γονίδιο συνδέθηκε με το γονίδιο που ευθύνεται για την παραγωγή καφέ χρωστικής (A: γονίδιο για το καφέ χρώμα, συνδεδεμένο με το γονίδιο της πρωτεΐνης IX).

α. Να εξηγήσετε τι είναι ο παράγοντας IX (μονάδα 1), για ποιο λόγο παρασκευάζεται και χορηγείται ως φαρμακευτική πρωτεΐνη (μονάδα 1) και να αναφέρετε ποια άλλη πρωτεΐνη του ανθρώπου έχει παρόμοιο ρόλο με τον παράγοντα αυτό (μονάδα 1).

β. Να περιγράψετε τη διαδικασία της μικροέγχυσης για την παραγωγή του παράγοντα IX (μονάδες 4).

γ. Να εξηγήσετε την πιθανή γονιδιακή σύσταση, όσον αφορά στα γονίδια του χρώματος τριχώματος και του παράγοντα IX των εξής κυττάρων: των γαμετών των αρχικών ζώων πριν γίνει η μικροέγχυση, του ζυγωτού που θα προκύψει, καθώς και των σωματικών κυττάρων του ενήλικου ζώου που θα γεννηθεί μετά τη μικροέγχυση περιγράφοντας παράλληλα το χρώμα τριχώ-

ματος που θα έχουν τα διαγονιδιακά και τα μη διαγονιδιακά ζώα που θα γεννηθούν (με δεδομένο ότι η ενσωμάτωση του ετερόλογου γονιδίου δεν επιτυγχάνεται πάντα) (μονάδες 6).

Μονάδες 13

α. Ο παράγοντας IX είναι μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στο μηχανισμό πήξης του αίματος και χορηγείται σε άτομα που πάσχουν από αιμορροφιλία Β. Η αιμορροφιλία Α είναι μια ανάλογη διαταραχή, στην οποία το αίμα δεν πήζει φυσιολογικά, λόγω έλλειψης του παράγοντα VIII, μιας άλλης αντιαιμορροφιλικής πρωτεΐνης.

β. Στη μέθοδο της μικροέγχυσης χρησιμοποιούνται ωάρια του ζώου που έχουν γονιμοποιηθεί στο εργαστήριο (*in vitro*). Σε αυτά γίνεται εισαγωγή του ξένου DNA με ειδική μικροβελόνα. Το ξένο γενετικό υλικό ενσωματώνεται συνήθως σε κάποιο από τα χρωμοσώματα του πυρήνα του ζυγωτού. Το ζυγωτό τοποθετείται, στη συνέχεια, στη μήτρα της «θετής» μητέρας, ενός ζώου στο οποίο θα αναπτυχθεί το έμβρυο.

γ. Αφού τα αρχικά ζώα είχαν άσπρο χρώμα, ο γονότυπος τους είναι αα και αντίστοιχα οι γαμέτες τους θα έχουν μόνο ένα γονίδιο α. Αμέσως μετά τη μικροέγχυση, το ζυγωτό θα έχει τη γονιδιακή σύσταση Ααα. Αν επιτευχθεί η ενσωμάτωση σε κάποιο χρωμόσωμα του γονιδίου και ακολουθήσει αντιγραφή του γονιδίου, η γονιδιακή σύσταση των σωματικών κυττάρων θα είναι επίσης Ααα, το ζώο θα έχει καφέ χρώμα και θα είναι διαγονιδιακό. Αν δεν ενσωματωθεί και δεν αντιγραφεί το ξένο γονίδιο, άρα και το συνδεδεμένο γονίδιο για το καφέ χρώμα, δε θα περιέχεται στα σωματικά κύτταρα, τα οποία θα έχουν σύσταση αα και τα αντίστοιχα ζώα θα έχουν άσπρο χρώμα.

121. Η Ελλάδα είναι μια χώρα με πλούσια πανίδα. Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών διαφορετικών βιοτόπων, όπου συναντάμε διάφορα είδη άγριων ζώων. Δυστυχώς όμως, εξαιτίας κυρίως των ανθρώπινων παρεμβάσεων (κυνήγι, καταστροφικές πυρκαγιές κλπ.) πολλά είδη ζώων βρίσκονται υπό εξαφάνιση. Ανάμεσά τους, ο Λύκος (*Canis lupus*) και το Τσακάλι (*Canis aureus*). Με τη συμβολή της σύγχρονης Γενετικής, αλλά και της Γενετικής μηχανικής θα μπορούσαν ίσως να γίνουν προσπάθειες διαιώνισης των παραπάνω ειδών, έτσι ώστε να αυξηθούν, έστω και τεχνητά, οι πληθυσμοί τους στα οικοσυστήματα. Οπότε, σε συνδυασμό με την προσπάθεια περιφρούρησης και προστασίας των οικοσυστημάτων, μπορεί να αποτραπεί η εξαφάνιση των παραπάνω ειδών.

α. Μια επιστημονική ομάδα προτείνει στο εργαστήριο Μοριακής Οικολογίας τη μέθοδο των επιλεκτικών διασταυρώσεων μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ατόμων του κάθε είδους, σε μια προσπάθεια διαιώνισης των ατόμων των προαναφερόμενων ειδών. Όμως, η πρόταση απορρίπτεται. Να εξηγήσετε τους λόγους της παραπάνω απόρριψης, αναφέροντας τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η μέθοδος των επιλεκτικών διασταυρώσεων, αν εφαρμοστεί στα πλαίσια της προσπάθειας διαιώνισης του Λύκου και του Τσακαλιού (μονάδες 6).

β. Να ονομάσετε (μονάδες 2) και να περιγράψετε τα βήματα μιας εναλλακτικής εργαστηριακής μεθόδου, με την οποία, μπορούμε ίσως να καταφέρουμε την διαιώνιση των παραπάνω ειδών (μονάδες 4).

Μονάδες 12

α. Οι ελεγχόμενες από τον άνθρωπο διασταυρώσεις ζώων προϋποθέτουν την κατάλληλη επιλογή αρσενικών και θηλυκών ατόμων από τα απειλούμενα με εξαφάνιση είδη και την διασταύρωσή τους με σκοπό τη δημιουργία απογόνων. Η πρόταση για έναν τέτοιο, λοιπόν, τρόπο διαιώνισης των προς εξαφάνιση ειδών, πιθανώς απορρίφθηκε γιατί η μέθοδος των επιλεγμένων διασταυρώσεων είναι χρονοβόρα και επίπονη, επειδή απαιτούνται συνεχείς διασταυρώσεις. (Επιπρόσθετα, αυτή η μέθοδος, δεδομένου ότι αναφερόμαστε σε άγρια ζώα, που δια-

βιούν σε απομακρυσμένους και δυσπρόσιτους βιότοπους, παρουσιάζει προφανείς τεχνικές δυσκολίες στην εφαρμογή της, όπως δυσκολίες σύλληψης, αναπαραγωγής υπό συνθήκες αιχμαλωσίας κτλ).

β. Η κλωνοποίηση ζώων μπορεί εναλλακτικά να συνεισφέρει στην προστασία από την εξαφάνιση διάφορων ζώων του πλανήτη μας. Τα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν κατά την κλωνοποίηση ζώων έχουν ως εξής: απομόνωση σωματικών κυττάρων και ωοκυττάρων από θηλυκά άτομα των υπό εξαφάνιση ζώων. Απομόνωση των πυρήνων των σωματικών κυττάρων και στη συνέχεια μεταφορά τους σε απύρηννα ωοκύτταρα του υπό εξαφάνιση είδους, που μας ενδιαφέρει, με σκοπό να κυοφορηθούν στο ίδιο ή σε συγγενικό είδος ζώου.

132. Το 1999, σε ηλικία 11 χρονών, ο Αργεντινός διεθνής ποδοσφαιριστής Λιονέλ Μέσι είχε ύψος μόλις 1,45 cm. Όπως είχε δηλώσει σε μια συνέντευξή του ήταν πάντα ο κοντύτερος και με διαφορά. Είχε το ύψος 8χρονου ή 9χρονου και αυτό ήταν εμφανές και στο γήπεδο και στην καθημερινότητά του. Εκείνη την περίοδο διαγνώστηκε με ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης, μιας ορμόνης που παράγεται από την υπόφυση του εγκεφάλου και συμβάλλει στη φυσιολογική ανάπτυξη του ατόμου. Η μόνη λύση ήταν η θεραπεία (για πάνω από τρία χρόνια) με ενέσεις ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης, που είχε παραχθεί με τεχνικές Γενετικής Μηχανικής.

α. Να γράψετε τα βήματα που ακολουθούν οι επιστήμονες για να παράξουν την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη μέσω διαγονιδιακών ζώων (μονάδες 6).

β. Η ανίχνευση των χαμηλών επιπέδων της αυξητικής ορμόνης στο αίμα ενός ασθενούς πραγματοποιείται με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων, που έχουν παραχθεί μέσω υβριδωμάτων. Να αναλύσετε τα βήματα με τα οποία παράγονται τα αντισώματα αυτά (μονάδες 7).

Μονάδες 13

α. Τα βήματα που απαιτούνται για τη παραγωγή της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης από ένα διαγονιδιακό ζώο είναι:

- Απομόνωση του ανθρώπινου γονιδίου που κωδικοποιεί την αυξητική ορμόνη.
- Μικροέγχυση του γονιδίου στο πυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου ζώου.
- Τοποθέτηση του γενετικά τροποποιημένου ζυγωτού στη μήτρα ενήλικου ζώου κατάλληλα προετοιμασμένου για κυοφορία.
- Γέννηση του διαγονιδιακού ζώου.
- Διασταυρώσεις με σκοπό να περάσει η τροποποιημένη γενετική πληροφορία στους απογόνους.
- Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός της αυξητικής ορμόνης.

β. Η διαδικασία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της αυξητικής ορμόνης έχει ως εξής: η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη χορηγείται με ένεση σε ποντίκι και προκαλεί ανοσολογική αντίδραση, με αποτέλεσμα να αρχίσει η παραγωγή αντισωμάτων από εξειδικευμένα Β-λεμφοκύτταρα. Ύστερα από 2 εβδομάδες αφαιρείται ο σπλήνας από το ζώο αυτό και απομονώνονται τα Β-λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά συντήκονται με καρκινικά κύτταρα και παράγονται υβριδώματα που παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα. Τα υβριδώματα μπορούν να φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στην κατάψυξη (-80°C) και να παράγουν οποιαδήποτε στιγμή το συγκεκριμένο αντίσωμα σε μεγάλες ποσότητες.

167. Το φυτό σόγια, επιστημονική ονομασία: *Glycine max*, είναι ένα από τα πρώτα φυτά που τροποποιήθηκαν γενετικά. Η θρεπτική αξία της σόγιας είναι πολύ υψηλή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί διατροφικά ως υποκατάστατο του κρέατος και του γάλακτος. Η εισαγωγή σε φυτά σόγιας του γονιδίου της εντομοτοξίνης, που προέρχεται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*,

προσδίδει στη σόγια μεγάλη ανθεκτικότητα εναντίον των εντόμων. Σε ένα φυτό σόγιας εντοπίστηκε δύο φορές το συγκεκριμένο γονίδιο. Το συγκεκριμένο φυτό σόγιας προέκυψε από τη διασταύρωση δύο διαφορετικών γενετικά τροποποιημένων φυτών που έφεραν το γονίδιο της εντομοτοξίνης σε διαφορετικό χρωμόσωμα το καθένα. Τα δύο αυτά γονίδια, που είχαν ενσωματωθεί σε τυχαίες θέσεις του γονιδιώματος του φυτού, έδιναν το πλεονέκτημα στο φυτό να έχει αυξημένη ανθεκτικότητα εναντίον των εντόμων. Μετά από αυτογονιμοποίηση του φυτού αυτού παρήχθησαν 975 φυτά ανθεκτικά στα έντομα και 65 φυτά που δεν είχαν καμία ανθεκτικότητα στα έντομα.

α. Με δεδομένο ότι η ενσωμάτωση του γονιδίου της εντομοτοξίνης μέσω του πλασμιδίου Ti γίνεται σε τυχαία θέση του γονιδιώματος ενός φυτού και ότι η ανθεκτικότητα των γενετικά τροποποιημένων φυτών στα έντομα είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου της εντομοτοξίνης, που φέρουν στο γονιδιώμα τους, να διερευνήσετε αν το φυτό, που έφερε δύο φορές το γονίδιο της εντομοτοξίνης, είναι ομόζυγο ως προς αυτό (μονάδες 3). Να πραγματοποιήσετε τη σχετική διασταύρωση αυτογονιμοποίησης αυτού του φυτού της σόγιας (μονάδες 3).

β. Να εξηγήσετε γιατί τα 65 φυτά που προέκυψαν από την παραπάνω αυτογονιμοποίηση του φυτού δεν είχαν καμία ανθεκτικότητα έναντι των εντόμων (μονάδες 3). Να κατηγοριοποιήσετε τα 975 φυτά, που προκύπτουν από την παραπάνω διασταύρωση και τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα έντομα, σε 4 ομάδες, με κριτήριο τον αριθμό των αντιγράφων της εντομοτοξίνης και, συνεπώς, το μέγεθος της ανθεκτικότητάς τους στα έντομα, αντιπαραβάλλοντας και τους σχετικούς γονότυπους των φυτών (μονάδες 4).

Μονάδες 13

α. Αφού η ενσωμάτωση του γονιδίου της εντομοτοξίνης γίνεται μέσω του πλασμιδίου Ti σε τυχαία θέση του γονιδιώματος ενός φυτού, τα δύο γενετικά τροποποιημένα φυτά σόγιας που αρχικά διασταυρώθηκαν μεταξύ τους και έδωσαν το φυτό με τα δύο γονίδια εντομοτοξίνης, θα έφεραν σε τυχαία θέση στο γονιδιώμα τους το γονίδιο αυτό. Τα γονίδια της εντομοτοξίνης, επομένως, ενσωματώθηκαν (όπως ορίζεται και από την εκφώνηση) σε διαφορετικά χρωμοσώματα για κάθε ένα από τα φυτά της πατρικής γενιάς. Έτσι, όταν διασταυρώθηκαν τα φυτά αυτά μεταξύ τους, τα γονίδια που έφεραν μεταβιβάστηκαν το ένα ανεξάρτητα από το άλλο στους απογόνους τους, σύμφωνα με το δεύτερο νόμο του Μέντελ (διυβριδισμός). Έτσι, το φυτό που προέκυψε και έχει το γονίδιο της εντομοτοξίνης δύο φορές δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως ομόζυγο για τα γονίδια αυτά, αφού τα φέρει σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Τα φυτά με τα δύο αντίγραφα του γονιδίου της τοξίνης στο γονιδιώμα τους αυτογονιμοποιούνται και πραγματοποιείται η ακόλουθη διασταύρωση:

$1^{A1}2^{A2-} \times 1^{A1}2^{A2-}$, όπου A το αλληλόμορφο για την εντομοτοξίνη και 1, 2 δύο τυχαία χρωμοσώματα στο γονιδίωμα της σόγιας (-, δεν υπάρχει ενσωμάτωση).

Μελετώντας την κληρονομηση ξεχωριστά στα δύο χρωμοσώματα έχουμε:

$$1^{A1-} \times 1^{A1-}$$

Γαμέτες: $1^A, 1^- / 1^A, 1^-$

F1: $1^{A1A}, 1^{A1-}, 1^{A1-}, 1^{-1}$

Φυτά με δύο γονίδια $1/4$, με ένα γονίδιο $2/4$, με κανένα γονίδιο $1/4$.

$$2^{A2-} \times 2^{A2-}$$

Γαμέτες: $2^A, 2^- / 2^A, 2^-$

F1: $2^{A2A}, 2^{A2-}, 2^{A2-}, 2^{-2}$

Φυτά με δύο αντίγραφα 1/4, ένα αντίγραφο 2/4, κανένα αντίγραφο 1/4. Εναλλακτικά, με διασταύρωση διυβριδισμού:

| | 1 ^A 2 ^A | 1 ^A 2 ⁻ | 1 ⁻ 2 ^A | 1 ⁻ 2 ⁻ |
|-------------------------------|---|---|---|---|
| 1 ^A 2 ^A | 1 ^A 1 ^A 2 ^A 2 ^A | 1 ^A 1 ^A 2 ^A 2 ⁻ | 1 ^A 1 ⁻ 2 ^A 2 ^A | 1 ^A 1 ⁻ 2 ^A 2 ⁻ |
| 1 ^A 2 ⁻ | 1 ^A 1 ^A 2 ^A 2 ⁻ | 1 ^A 1 ^A 2 ⁻ 2 ⁻ | 1 ^A 1 ⁻ 2 ^A 2 ⁻ | 1 ^A 1 ⁻ 2 ⁻ 2 ⁻ |
| 1 ⁻ 2 ^A | 1 ^A 1 ⁻ 2 ^A 2 ^A | 1 ^A 1 ⁻ 2 ⁻ 2 ^A | 1 ⁻ 1 ⁻ 2 ^A 2 ^A | 1 ⁻ 1 ⁻ 2 ^A 2 ⁻ |
| 1 ⁻ 2 ⁻ | 1 ^A 1 ⁻ 2 ^A 2 ⁻ | 1 ^A 1 ⁻ 2 ⁻ 2 ⁻ | 1 ⁻ 1 ⁻ 2 ^A 2 ⁻ | 1 ⁻ 1 ⁻ 2 ⁻ 2 ⁻ |

β. Από την παραπάνω διασταύρωση προκύπτουν 4 ομάδες φυτών:

Φυτά με τέσσερα γονίδια: 1/16, με 3 αντίγραφα: 4/16, με 2 αντίγραφα 6/16, με 1 αντίγραφο 4/16, με 0 αντίγραφα 1/16.

(Τα 65 φυτά χωρίς την εντομοτοξίνη αποτελούν λοιπόν το 1/16 των συνολικών φυτών, ενώ τα 975 φυτά που φέρουν ένα και πλέον γονίδιο ανθεκτικότητας αποτελούν το 15/16 των 1040 φυτών).

Επομένως από τα συνολικά 1040 φυτά:

- τα $1/16 \cdot 1040 = 65$ δεν έχουν καμία φορά το γονίδιο, και άρα δεν παράγουν την εντομοτοξίνη.
- τα 975 ανθεκτικά φυτά στα έντομα έχουν το γονίδιο της εντομοτοξίνης από μία έως τέσσερις φορές. Συγκεκριμένα:
 - τα $1/16 \cdot 1040 = 65$ έχουν το γονίδιο τέσσερις φορές, και παράγουν τη μέγιστη ποσότητα εντομοτοξίνης (μέγιστη ανθεκτικότητα στα έντομα).
 - τα $4/16 \cdot 1040 = 260$ έχουν το γονίδιο τρεις φορές, και παράγουν μεγάλη ποσότητα εντομοτοξίνης (μεγάλη ανθεκτικότητα στα έντομα).
 - τα $6/16 \cdot 1040 = 390$ έχουν το γονίδιο δύο φορές, και παράγουν μέση/μέτρια ποσότητα εντομοτοξίνης (μέτρια ανθεκτικότητα στα έντομα).
 - τα $4/16 \cdot 1040 = 260$ έχουν το γονίδιο μία φορά, και παράγουν μικρή ποσότητα εντομοτοξίνης (μικρή ανθεκτικότητα στα έντομα).

183. Στην ταινία επιστημονικής φαντασίας Jurassic Park, μια ομάδα γενετιστών που εργάζονταν στην εταιρεία InGen δημιουργούν ένα πάρκο με κλωνοποιημένους δεινόσαυρους σε ένα φανταστικό νησί της Κόστα Ρίκα. Σύμφωνα με το σενάριο, για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε DNA δεινοσαύρων που βρέθηκε και απομονώθηκε από προϊστορικά κουνούπια εγκλεισμένα σε κεχριμπάρι. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι η κλωνοποίηση των δεινοσαύρων, που έχουν εξαφανιστεί εδώ και εκατομμύρια χρόνια, δεν είναι εφικτή για τεχνικούς λόγους.

α. Να εξηγήσετε ποια *in vitro* μέθοδο πιθανώς χρησιμοποίησαν οι επιστήμονες του Jurassic Park για να απομονώσουν το DNA των δεινοσαύρων, αν και σήμερα είναι γνωστό ότι το DNA δεν διατηρείται στο κεχριμπάρι (μονάδες 4).

β. Να περιγράψετε τη διαδικασία που πιστεύετε ότι μπορεί να εφαρμοστεί για την κλωνοποίηση ενός θηλαστικού ζώου, που βρίσκεται υπό εξαφάνιση και φιλοξενείται σε έναν ζωολογικό κήπο (μονάδες 6).

γ. Να αναφέρετε άλλη μια περίπτωση, στην οποία θα μπορούσε να εφαρμοστεί σήμερα η κλωνοποίηση ζώων (μονάδες 2).

Μονάδες 12

α. Από τους επιστήμονες του Jurassic Park πιθανότατα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), επειδή με τη μέθοδο αυτή υπάρχει η δυνατότητα να αντιγραφούν επιλεκτικά, εκατομμύρια φορές, ειδικές αλληλουχίες DNA, από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου (*in vitro*). Άλλωστε, η μέθο-

δος αυτή χρησιμοποιείται γενικά στη μελέτη DNA από απολιθώματα.

β. Για την κλωνοποίηση ενός θηλαστικού ζώου, οι επιστήμονες θα απομονώσουν τον πυρήνα από ένα κύτταρο του μαστικού αδένου του ζώου αυτού. Στη συνέχεια, θα τον τοποθετήσουν σε ένα απύρηνο ωκύτταρο του ίδιου είδους και θα προκαλέσουν διαιρέσεις (με ηλεκτρική διέγερση) στο κύτταρο αυτό. Η μάζα των κυττάρων, που θα δημιουργηθεί μετά από κάποιες διαιρέσεις, θα εμφυτευθεί στη μήτρα του ίδιου ή συγγενικού είδους ζώου, που θα αποτελέσει τη “θετή μητέρα”.

γ. Η κλωνοποίηση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά και στον πολλαπλασιασμό διαγονιδιακών ζώων, έτσι ώστε να παραχθούν εύκολα πολλά πανομοιότυπα ζώα.

