Κεφάλαιο 8: Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στην Ιατρική

Ασκήσεις και λύσεις

Μεθοδολογία, 26 ερωτήσεις κλειστού τύπου, 25 επαναληπτικές ερωτήσεις θεωρίας, 7 ασκήσεις και ένα διαγώνισμα αυτοαξιολόγησης, όλα με αναλυτικές απαντήσεις.

1 Μεθοδολογία
2 Ερωτήσεις κλειστού τύπου
3 Ερωτήσεις θεωρίας
4 Ασκήσεις
5 Διαγώνισμα
6 Λύσεις

1 Μεθοδολογία

Στις ασκήσεις αυτού του κεφαλαίου ζητείται συνήθως να διαλέξεις τη σωστή μέθοδο και να αιτιολογήσεις κάθε βήμα της. Ξεκίνα από το ποια κύτταρα αφορά το πρόβλημα.

Ποια μέθοδος για ποιο πρόβλημα

Τι ζητείται	Μέθοδος	Γιατί
Μεγάλη ποσότητα μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης	**Βακτήρια με cDNA**	Το γονίδιο κλωνοποιείται ως cDNA και τα βακτήρια καλλιεργούνται σε βιοαντιδραστήρα.
Ανίχνευση μιας ουσίας σε υγρό του σώματος	**Μονοκλωνικά αντισώματα**	Κάθε αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά έναν αντιγονικό καθοριστή.
Στόχευση φαρμάκου σε συγκεκριμένα κύτταρα	**Μονοκλωνικά αντισώματα**	Μεταφέρουν το φάρμακο μόνο στα κύτταρα που αναγνωρίζουν.
Αντιμετώπιση ασθένειας από ένα υπολειπόμενο γονίδιο	**Γονιδιακή θεραπεία**	Προστίθεται ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο στα κύτταρα που εμφανίζουν τη βλάβη.

Γονιδιακή θεραπεία: ex vivo ή in vivo

Τι βλέπω	Συμπέρασμα	Εξήγηση
Ελεύθερα κύτταρα, π.χ. κύτταρα του αίματος	**Ex vivo**	Παραλαμβάνονται, τροποποιούνται σε καλλιέργεια και επιστρέφουν με ένεση.
Κύτταρα ιστού, π.χ. επιθήλιο των πνευμόνων	**In vivo**	Δεν μπορούν να αφαιρεθούν. Ο ιός-φορέας εισάγεται στον οργανισμό.

Παραγωγή μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης από βακτήρια

1. Βρες σε ποια κύτταρα εκφράζεται το γονίδιο. Από αυτά απομονώνεται το ολικό ώριμο mRNA.
2. Το mRNA γίνεται δίκλωνο cDNA, που ενσωματώνεται σε πλασμίδια.
3. Τα πλασμίδια εισάγονται σε βακτήρια (μετασχηματισμός). Το αντιβιοτικό επιλέγει τα μετασχηματισμένα βακτήρια.
4. Ο ανιχνευτής εντοπίζει τον κλώνο με το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.
5. Ο κλώνος καλλιεργείται σε βιοαντιδραστήρα και το προϊόν παραλαμβάνεται και καθαρίζεται.
6. Αν το προϊόν είναι πρόδρομο μόριο, όπως η προϊνσουλίνη, χρειάζεται ενζυμική κατεργασία.

Αριθμητικά που ζητούνται συχνά: ένα πεπτίδιο με ν αμινοξέα έχει ν − 1 πεπτιδικούς δεσμούς. Μια αλυσίδα ν αμινοξέων κωδικοποιείται από ν κωδικόνια και ένα κωδικόνιο λήξης, δηλαδή από (ν + 1) × 3 βάσεις του mRNA.

Γονιδιακή θεραπεία και κληρονομικότητα: τα τροποποιημένα κύτταρα γίνονται ααΑ, αλλά οι γαμέτες του ατόμου μένουν όπως ήταν. Στις διασταυρώσεις το άτομο λογαριάζεται με τον αρχικό του γονότυπο.

2 Ερωτήσεις κλειστού τύπου

Σε κάθε ερώτηση πολλαπλής επιλογής σωστή είναι μόνο μία απάντηση. Οι απαντήσεις είναι στο τέλος.

Πολλαπλής επιλογής

1. Σε ένα κύτταρο που τροποποιήθηκε με γονιδιακή θεραπεία μπορούμε να βρούμε:

α) DNA βακτηρίου.
β) γενετικό υλικό του ιού-φορέα και το φυσιολογικό αλληλόμορφο.
γ) γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό.
δ) μόνο το φυσιολογικό αλληλόμορφο, χωρίς το μεταλλαγμένο.

2. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται βιοτεχνολογικά από:

α) Β λεμφοκύτταρα που καλλιεργούνται στο εργαστήριο.
β) υβριδώματα.
γ) γενετικά τροποποιημένα βακτήρια.
δ) καρκινικά κύτταρα.

3. Η μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη στα κύτταρα του παγκρέατος είναι παράδειγμα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο:

α) της μεταγραφής.
β) μετά τη μεταγραφή.
γ) της μετάφρασης.
δ) μετά τη μετάφραση.

4. Ποια πρόταση για την ινσουλίνη είναι λανθασμένη;

α) Είναι πρωτεΐνη.
β) Είναι ορμόνη.
γ) Η προϊνσουλίνη γίνεται ινσουλίνη με την αφαίρεση εσωνίων.
δ) Συντίθεται στα ριβοσώματα ειδικών κυττάρων του παγκρέατος.

5. Η γονιδιακή θεραπεία της ανεπάρκειας ADA με τροποποίηση λεμφοκυττάρων:

α) κληρονομείται στους απογόνους.
β) πρέπει να επαναλαμβάνεται τακτικά.
γ) γίνεται με πλασμίδια ως φορείς.
δ) είναι in vivo γονιδιακή θεραπεία.

6. **Ο μετασχηματισμός βακτηρίων χρησιμοποιείται: 1. στην κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, 2. στην κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, 3. στην παραγωγή ανθρώπινης πρωτεΐνης από βακτήρια. Σωστές είναι:**

α) μόνο η 1.
β) η 1 και η 2.
γ) η 2 και η 3.
δ) και οι τρεις.

7. **Το υβρίδωμα:**

α) παράγει πολλά διαφορετικά αντισώματα.
β) δεν πολλαπλασιάζεται σε καλλιέργεια.
γ) παράγει ένα είδος αντισώματος και πολλαπλασιάζεται συνεχώς.
δ) είναι γενετικά τροποποιημένο βακτήριο.

8. **Η αυξητική ορμόνη παράγεται από κύτταρα της υπόφυσης. Για να παραχθεί από βακτήρια, το ολικό ώριμο mRNA απομονώνεται από κύτταρα:**

α) του παγκρέατος.
β) της υπόφυσης.
γ) του σπλήνα.
δ) οποιουδήποτε ιστού.

9. **Οι ιντερφερόνες:**

α) είναι αντισώματα.
β) καταστρέφουν απευθείας τους ιούς.
γ) προκαλούν στα γειτονικά υγιή κύτταρα την παραγωγή πρωτεϊνών που εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών.
δ) παράγονται φυσιολογικά μόνο από βακτήρια.

10. **Ο προσδιορισμός των ομάδων αίματος με μονοκλωνικά αντισώματα είναι εφαρμογή:**

α) θεραπευτική.
β) ανοσοδιαγνωστική.
γ) γονιδιακής θεραπείας.
δ) ελέγχου συμβατότητας μεταμοσχεύσεων.

11. **Η ινσουλίνη αποτελείται από ένα πεπτίδιο 21 αμινοξέων και ένα πεπτίδιο 30 αμινοξέων. Ο συνολικός αριθμός των πεπτιδικών δεσμών στα δύο πεπτίδια είναι:**

α) 51.
β) 50.
γ) 49.
δ) 48.

12. **Στην in vivo γονιδιακή θεραπεία της κυστικής ίνωσης τα κύτταρα-στόχοι είναι:**

    α) λεμφοκύτταρα.
    β) κύτταρα του παγκρέατος.
    γ) επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων.
    δ) γαμέτες.

Σωστό ή Λάθος

1. Η ινσουλίνη που απομονώνεται από πάγκρεας χοίρων είναι ίδια με την ανθρώπινη.

2. Το γονίδιο της ινσουλίνης υπάρχει μόνο στα κύτταρα του παγκρέατος.

3. Τα βακτήρια που φέρουν το γονίδιο της ινσουλίνης παράγουν προϊνσουλίνη.

4. Οι ιντερφερόνες παράγονται από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιό.

5. Κάθε Β λεμφοκύτταρο παράγει ένα μόνο είδος αντισώματος.

6. Τα Β λεμφοκύτταρα διατηρούνται εύκολα σε κυτταροκαλλιέργειες.

7. Τα υβριδώματα μπορούν να φυλάσσονται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους −80 °C.

8. Το τεστ κύησης είναι θεραπευτική εφαρμογή των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

9. Με τη γονιδιακή θεραπεία το μεταλλαγμένο γονίδιο αντικαθίσταται από το φυσιολογικό.

10. Ένα άτομο που υποβλήθηκε σε γονιδιακή θεραπεία μεταβιβάζει το φυσιολογικό αλληλόμορφο στους απογόνους του.

11. Στην ex vivo γονιδιακή θεραπεία τα κύτταρα τροποποιούνται έξω από τον οργανισμό.

12. Στη γονιδιακή θεραπεία της κυστικής ίνωσης χρησιμοποιείται αδενοϊός ως φορέας.

13. Η cDNA βιβλιοθήκη κυττάρων παγκρέατος περιέχει όλα τα γονίδια του ανθρώπου.

14. Η πρώτη γονιδιακή θεραπεία εφαρμόστηκε σε ασθενή με κυστική ίνωση.

Αντιστοίχιση

1. Να αντιστοιχίσετε κάθε ασθένεια της στήλης Ι με την αντιμετώπισή της στη στήλη ΙΙ. Ένα στοιχείο της στήλης ΙΙ περισσεύει.

1. Διαβήτης	**Α.** Ιντερφερόνες
2. Ανεπάρκεια ADA	**Β.** In vivo γονιδιακή θεραπεία με αδενοϊό
3. Κυστική ίνωση	**Γ.** Ινσουλίνη
4. Ιώσεις	**Δ.** Ex vivo γονιδιακή θεραπεία σε λεμφοκύτταρα
	Ε. Μονοκλωνικά αντισώματα ως φορείς αντικαρκινικών φαρμάκων

Σωστή σειρά

1. Να βάλετε στη σωστή σειρά τα στάδια παραγωγής ανθρώπινης ινσουλίνης από βακτήρια.

Α. Επιλογή του βακτηριακού κλώνου με ιχνηθετημένο ανιχνευτή.

Β. Αφαίρεση του ενδιάμεσου πεπτιδίου με κατάλληλο ένζυμο.

Γ. Απομόνωση του ολικού ώριμου mRNA από κύτταρα του παγκρέατος.

Δ. Καλλιέργεια των βακτηρίων σε βιοαντιδραστήρα.

Ε. Σύνθεση δίκλωνου cDNA και ενσωμάτωσή του σε πλασμίδια.

Ζ. Μετασχηματισμός βακτηρίων και ανάπτυξή τους παρουσία αντιβιοτικού.

Η. Διαχωρισμός στερεών και υγρών συστατικών και παραλαβή της προϊνσουλίνης.

Συμπλήρωση κενών

1. Η ινσουλίνη αποτελείται από _____ αμινοξέα και παράγεται από ειδικά κύτταρα του _____.

2. Το πρόδρομο μόριο της ινσουλίνης ονομάζεται _____ και μετατρέπεται σε ινσουλίνη με την αφαίρεση ενός ενδιάμεσου _____.

3. Οι ιντερφερόνες είναι _____ πρωτεΐνες που παράγονται από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από _____.

4. Το τμήμα του αντιγόνου που αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα ονομάζεται _____ _____.

5. Το υβρίδωμα προκύπτει από τη σύντηξη ενός _____ κυττάρου με ένα _____.

6. Η πρώτη γονιδιακή θεραπεία εφαρμόστηκε το _____ σε ασθενή με έλλειψη του ενζύμου _____.

7. Στην _____ γονιδιακή θεραπεία τα κύτταρα τροποποιούνται έξω από τον οργανισμό, ενώ στην _____ μέσα σε αυτόν.

---

3 Επαναληπτικές ερωτήσεις θεωρίας

Οι απαντήσεις είναι στο τέλος.

1. Πώς έχει συμβάλει η Βιοτεχνολογία στη διάγνωση, στην πρόληψη και στη θεραπεία των ασθενειών;

2. Τι είναι οι φαρμακευτικές πρωτεΐνες; Να αναφέρετε τρία παραδείγματα.

3. Τι γνωρίζετε για τη χημική σύσταση και τον ρόλο της ινσουλίνης;

4. Πώς παραλαμβανόταν παλαιότερα η ινσουλίνη; Ποια πλεονεκτήματα έχει η παραγωγή της με μεθόδους Βιοτεχνολογίας;

5. Γιατί για την παραγωγή ινσουλίνης από βακτήρια ξεκινάμε από το mRNA και όχι από το ίδιο το γονίδιο;

6. Ποια είναι συνοπτικά τα στάδια κλωνοποίησης και απομόνωσης του γονιδίου της ινσουλίνης;

7. Τι είναι η προϊνσουλίνη και σε τι διαφέρει από την ινσουλίνη;

8. Να αναφέρετε ένα παράδειγμα τροποποίησης πρωτεΐνης μετά τη μετάφραση.

9. Τι γνωρίζετε για τις ιντερφερόνες;

10. Τι είναι αντιγόνο, αντίσωμα και αντιγονικός καθοριστής;

11. Τι είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα; Να περιγράψετε τα στάδια παραγωγής ενός μονοκλωνικού αντισώματος που θα χρησιμοποιηθεί σε τεστ κύησης.

12. Τι είναι τα υβριδώματα; Γιατί για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων χρησιμοποιούνται υβριδώματα και όχι Β λεμφοκύτταρα;

13. Τι γνωρίζετε για τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων ως ανοσοδιαγνωστικών; Να αναφέρετε δύο παραδείγματα.

14. Πώς χρησιμοποιούνται τα μονοκλωνικά αντισώματα ως θεραπευτικά μέσα;

15. Πώς βοηθούν τα μονοκλωνικά αντισώματα στις μεταμοσχεύσεις;

16. Τι είναι η γονιδιακή θεραπεία; Πότε και σε ποια ασθένεια εφαρμόστηκε για πρώτη φορά;

17. Σε ποια βιοτεχνολογική μέθοδο στηρίζεται η γονιδιακή θεραπεία; Τι πρέπει να είναι γνωστό για να εφαρμοστεί;

18. Σε ποια μεταβολική διεργασία συμμετέχει το ένζυμο ADA; Τι προκαλεί η έλλειψή του;

19. Ποια διαδικασία ακολουθείται στη γονιδιακή θεραπεία της ανεπάρκειας ADA;

20. Ποια διαδικασία ακολουθείται στη γονιδιακή θεραπεία της κυστικής ίνωσης;

21. Τι είναι η ex vivo και τι η in vivo γονιδιακή θεραπεία; Ποια εφαρμόζεται σε ασθένειες που αφορούν ελεύθερα κύτταρα και ποια σε ασθένειες που αφορούν κύτταρα ενός ιστού;

22. Γιατί η γονιδιακή θεραπεία, όπως εφαρμόζεται σήμερα, δεν μεταβιβάζεται στους απογόνους; Σε ποια περίπτωση θα μεταβιβαζόταν;

23. Γιατί η γονιδιακή θεραπεία της ανεπάρκειας ADA με λεμφοκύτταρα δεν είναι μόνιμη;

24. Τι είναι το πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος;

25. Σε τι συμβάλλει το πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος;

---

4 Ασκήσεις

Οι ασκήσεις 1 έως 3 αφορούν τις φαρμακευτικές πρωτεΐνες και τα μονοκλωνικά αντισώματα, οι 4 έως 6 τη γονιδιακή θεραπεία και η 7 συνδυάζει ύλη από τα Κεφάλαια 2 και 4. Οι λύσεις είναι στο τέλος.

1. Η ινσουλίνη αποτελείται από το πεπτίδιο Α, με 21 αμινοξέα, και το πεπτίδιο Β, με 30 αμινοξέα. Έστω ότι η προϊνσουλίνη από την οποία προέρχεται είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 86 αμινοξέων.

   α) Πόσοι πεπτιδικοί δεσμοί υπάρχουν στην προϊνσουλίνη; Πόσοι σε κάθε πεπτίδιο της ινσουλίνης και πόσοι συνολικά;

   β) Πόσα αμινοξέα αφαιρούνται κατά τη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη;

   γ) Πόσες βάσεις έχει τουλάχιστον το τμήμα του ώριμου mRNA από το κωδικόνιο έναρξης έως και το κωδικόνιο λήξης, αν η προϊνσουλίνη διατηρεί τη μεθειονίνη της;

   δ) Γιατί ο αριθμός αυτός είναι μικρότερος από τον αριθμό των ζευγών βάσεων του γονιδίου;

2. Μια εταιρεία θέλει να παραγάγει ανθρώπινη αυξητική ορμόνη από βακτήρια. Η ορμόνη παράγεται φυσιολογικά από κύτταρα της υπόφυσης. Κατασκευάζεται cDNA βιβλιοθήκη με 8.000 βακτηριακούς κλώνους, που αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικό. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται υβριδοποιείται με 6 από αυτούς.

α) Από ποια κύτταρα απομονώθηκε το mRNA και γιατί;

β) Τι εξασφαλίζει η παρουσία του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό;

γ) Τι είναι ο ανιχνευτής και γιατί υβριδοποιείται μόνο με 6 από τους 8.000 κλώνους;

δ) Ποια βήματα ακολουθούν μέχρι να παραληφθεί η ορμόνη;

3. Για να παραχθεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον μιας ορμόνης, η ορμόνη χορηγείται σε ποντίκι. Από τη σύντηξη των Β λεμφοκυττάρων του με καρκινικά κύτταρα προκύπτουν 600 υβριδώματα. Τα 15 παράγουν αντισώματα εναντίον της ορμόνης και από αυτά μόνο τα 4 αναγνωρίζουν τον αντιγονικό καθοριστή που μας ενδιαφέρει.

α) Από ποιο όργανο του ποντικού απομονώθηκαν τα Β λεμφοκύτταρα;

β) Γιατί τα 15 υβριδώματα δεν παράγουν όλα το ίδιο αντίσωμα;

γ) Γιατί τα υπόλοιπα 585 υβριδώματα δεν παράγουν αντισώματα εναντίον της ορμόνης;

δ) Πώς εξασφαλίζεται ότι το αντίσωμα θα είναι διαθέσιμο και μετά από χρόνια;

4. Ένας άνδρας με ανεπάρκεια ADA (γονότυπος αα, αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια) υποβάλλεται με επιτυχία σε ex vivo γονιδιακή θεραπεία.

α) Ποια αλληλόμορφα έχουν μετά τη θεραπεία τα λεμφοκύτταρα που τροποποιήθηκαν και ποια τα υπόλοιπα κύτταρά του;

β) Ποιους γαμέτες παράγει;

γ) Αποκτά παιδί με γυναίκα φορέα (Αα). Ποια είναι η πιθανότητα το παιδί να πάσχει;

δ) Ποια θα ήταν η πιθανότητα αν η γυναίκα ήταν ομόζυγη για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (ΑΑ);

5. Δύο υγιείς γονείς αποκτούν παιδί με κυστική ίνωση (αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια). Έστω Κ το φυσιολογικό αλληλόμορφο και κ το μεταλλαγμένο.

α) Ποιοι είναι οι γονότυποι των γονέων;

β) Ποια είναι η πιθανότητα το επόμενο παιδί τους να πάσχει; Ποια η πιθανότητα να πάσχουν και τα δύο επόμενα παιδιά τους;

γ) Ποια είναι η πιθανότητα ένα υγιές παιδί τους να είναι φορέας;

δ) Ποιος τύπος γονιδιακής θεραπείας εφαρμόζεται στο παιδί που πάσχει και γιατί όχι ο άλλος;

6. Τρεις γενετικές ασθένειες οφείλονται σε υπολειπόμενα γονίδια που έχουν κλωνοποιηθεί. Η πρώτη αφορά κύτταρα του αίματος, η δεύτερη τα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού και η τρίτη κύτταρα του ήπατος.

α) Ποιος τύπος γονιδιακής θεραπείας ταιριάζει σε κάθε περίπτωση;

β) Τι κοινό έχουν οι φορείς που χρησιμοποιούνται και στους δύο τύπους;

γ) Σε ποια από τις τρεις περιπτώσεις η θεραπεία αναμένεται να χρειάζεται συχνότερες επαναλήψεις και γιατί;

7. Σε ένα εργαστήριο γίνονται τρεις προσπάθειες παραγωγής ανθρώπινης ινσουλίνης από βακτήρια και αποτυγχάνουν και οι τρεις. Να εξηγήσετε γιατί.

α) Στην πρώτη, στο πλασμίδιο ενσωματώθηκε το γονίδιο της ινσουλίνης όπως απομονώθηκε από το DNA ανθρώπινων κυττάρων.

β) Στη δεύτερη, το mRNA απομονώθηκε από κύτταρα του ήπατος.

γ) Στην τρίτη, όλα έγιναν σωστά, αλλά το προϊόν χορηγήθηκε αμέσως μετά τον καθαρισμό του και δεν είχε δράση ινσουλίνης.

---

5 Διαγώνισμα αυτοαξιολόγησης

Σύνολο 40 μονάδες. Προτεινόμενος χρόνος: 45 λεπτά. Οι απαντήσεις είναι στο τέλος.

1. 5 μονάδες Να χαρακτηρίσετε τις παρακάτω προτάσεις ως σωστές (Σ) ή λανθασμένες (Λ):

i. Η ινσουλίνη ρυθμίζει το ποσοστό της γλυκόζης στο αίμα.

ii. Οι ιντερφερόνες είναι αντιβιοτικά.

iii. Τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν έναν αντιγονικό καθοριστή.

iv. Στην ex vivo γονιδιακή θεραπεία ο ιός-φορέας εισάγεται με βρογχοσκόπιο.

v. Το υβρίδωμα προκύπτει από σύντηξη δύο κυττάρων.

2. 4 μονάδες Να αντιστοιχίσετε κάθε όρο της στήλης Ι με την περιγραφή του στη στήλη ΙΙ. Ένα στοιχείο της στήλης ΙΙ περισσεύει.

Στήλη Ι	Στήλη ΙΙ
1. Υβρίδωμα	**Α.** Φορέας γονιδίου στην in vivo γονιδιακή θεραπεία
2. Αδενοϊός	**Β.** Πρόδρομο μόριο ορμόνης
3. Προϊνσουλίνη	**Γ.** Αντιιική πρωτεΐνη
4. Ιντερφερόνη	**Δ.** Σύντηξη Β λεμφοκυττάρου με καρκινικό κύτταρο
	Ε. Ένζυμο του μεταβολισμού των πουρινών

3. 6 μονάδες Για την παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης από βακτήρια κατασκευάζεται cDNA βιβλιοθήκη από κύτταρα του παγκρέατος. Να εξηγήσετε γιατί κατασκευάζεται cDNA και όχι γονιδιωματική βιβλιοθήκη, και γιατί χρησιμοποιούνται κύτταρα του παγκρέατος.

4. 7 μονάδες Να περιγράψετε τα στάδια παραγωγής ενός μονοκλωνικού αντισώματος.

5. 8 μονάδες Μια ορμόνη αποτελείται από δύο πεπτίδια, με 18 και 27 αμινοξέα. Προέρχεται από ένα πρόδρομο μόριο που είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 60 αμινοξέων.

α) Πόσοι πεπτιδικοί δεσμοί υπάρχουν συνολικά στα δύο πεπτίδια της ορμόνης;

β) Πόσα αμινοξέα αφαιρέθηκαν από το πρόδρομο μόριο;

γ) Πόσες βάσεις έχει το τμήμα του mRNA από το κωδικόνιο έναρξης έως και το κωδικόνιο λήξης, αν το πρόδρομο μόριο διατηρεί τη μεθειονίνη του;

6. 10 μονάδες Ένα κορίτσι πάσχει από μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια που οφείλεται στην έλλειψη ενός ενζύμου των λεμφοκυττάρων.

α) Ποιος τύπος γονιδιακής θεραπείας θα εφαρμοστεί; Να περιγράψετε συνοπτικά τη διαδικασία.

β) Θα χρειαστεί να επαναληφθεί η θεραπεία;

γ) Αν το κορίτσι αποκτήσει αργότερα παιδί με υγιή άνδρα που δεν είναι φορέας, ποια είναι η πιθανότητα το παιδί να πάσχει και ποια να είναι φορέας;

6 Λύσεις

Ερωτήσεις κλειστού τύπου

Πολλαπλής επιλογής

1. **β)** Το φυσιολογικό γονίδιο μπαίνει στο κύτταρο μαζί με το γενετικό υλικό του ιού που το μεταφέρει. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο παραμένει.
2. **β)** Τα Β λεμφοκύτταρα δεν επιβιώνουν για πολύ σε καλλιέργεια και τα καρκινικά κύτταρα δεν παράγουν το αντίσωμα.
3. **δ)** Η πρωτεΐνη έχει ήδη συντεθεί και τροποποιείται για να γίνει λειτουργική (Κεφάλαιο 2).
4. **γ)** Από την προϊνσουλίνη αφαιρείται ένα ενδιάμεσο πεπτίδιο. Τα εσώνια αφαιρούνται από το πρόδρομο mRNA.
5. **β)** Τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα δεν ζουν για πάντα.
6. **δ)** Σε όλες τις περιπτώσεις ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πρέπει να μπει σε βακτήριο-ξενιστή.
7. **γ)**Έχει την ιδιότητα του Β λεμφοκυττάρου να παράγει αντίσωμα και του καρκινικού κυττάρου να διαιρείται συνεχώς.
8. **β)** Το mRNA ενός γονιδίου υπάρχει μόνο στα κύτταρα όπου το γονίδιο εκφράζεται.
9. **γ)** Παράγονται από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιό.
10. **β)** Τα αντισώματα ανιχνεύουν συγκεκριμένες ουσίες. Το ίδιο ισχύει για το τεστ κύησης.
11. **γ)**Ένα πεπτίδιο με ν αμινοξέα έχει ν – 1 πεπτιδικούς δεσμούς: 20 + 29 = 49.
12. **γ)** Ο αδενοϊός-φορέας φτάνει σε αυτά με βρογχοσκόπιο.

Σωστό ή Λάθος

1. **Λ**Έχει μικρές διαφορές στη σύσταση των αμινοξέων, γι’ αυτό μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις.
2. **Λ** Υπάρχει σε όλα τα κύτταρα, αλλά εκφράζεται μόνο σε ειδικά κύτταρα του παγκρέατος.
3. **Σ** Η μετατροπή σε ινσουλίνη γίνεται μετά, με κατάλληλο ένζυμο.
4. **Σ** Δρουν στα γειτονικά υγιή κύτταρα.
5. **Σ** Γι’ αυτό ο κλώνος του παράγει μονοκλωνικά αντισώματα.
6. **Λ** Δεν επιβιώνουν για πολύ έξω από τον οργανισμό. Γι’ αυτό χρειάζονται τα υβριδώματα.
7. **Σ**Έτσι το αντίσωμα παράγεται όποτε χρειαστεί.
8. **Λ** Είναι ανοσοδιαγνωστική εφαρμογή.
9. **Λ** Το μεταλλαγμένο παραμένει. Προστίθεται ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο.
10. **Λ** Η θεραπεία εφαρμόζεται σε σωματικά κύτταρα. Οι γαμέτες δεν αλλάζουν.
11. **Σ** Στη συνέχεια εισάγονται πάλι σε αυτόν.
12. **Σ** Είναι in vivo γονιδιακή θεραπεία.
13. **Λ** Περιέχει μόνο τα γονίδια που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά.
14. **Λ** Εφαρμόστηκε το 1990 σε ασθενή με ανεπάρκεια του ενζύμου ADA.

Αντιστοίχιση

1 – Γ · 2 – Δ · 3 – Β · 4 – Α. Περισσεύει το Ε.

Σωστή σειρά

Γ → Ε → Ζ → Α → Δ → Η → Β.

Συμπλήρωση κενών

1. 51, παγκρέατος
2. προϊνσουλίνη, πεπτιδίου
3. αντιικές, ιό
4. αντιγονικός καθοριστής
5. καρκινικού, Β λεμφοκύτταρο
6. 1990, ADA (απαμινάση της αδενοσίνης)
7. ex vivo, in vivo

Ερωτήσεις θεωρίας

1. - **Διάγνωση:** μονοκλωνικά αντισώματα ως ανοσοδιαγνωστικά, ανιχνευτές και PCR για τον εντοπισμό μεταλλαγμένων γονιδίων.
   - **Πρόληψη:** έγκαιρος εντοπισμός μεταβολών που προοιωνίζονται μια ασθένεια, προγεννητικός έλεγχος, παραγωγή εμβολίων.
   - **Θεραπεία:** φαρμακευτικές πρωτεΐνες, μονοκλωνικά αντισώματα ως θεραπευτικά, γονιδιακή θεραπεία.
2. Είναι οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα. Αρκετές παράγονται από γενετικά τροποποιημένα βακτήρια.

   Παραδείγματα: ινσουλίνη, ιντερφερόνες, αυξητική ορμόνη.
3. Είναι ορμόνη που αποτελείται από **51 αμινοξέα**, σε δύο μικρά πεπτίδια που συγκρατούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Παράγεται από ειδικά κύτταρα του παγκρέατος.

   Ρυθμίζει τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και ειδικότερα το ποσοστό της γλυκόζης στο αίμα. Η έλλειψη ή η μείωσή της προκαλεί διαβήτη.
4. Από πάγκρεας χοίρων και βοοειδών. Η διαδικασία ήταν δαπανηρή και πολύπλοκη, και η ινσουλίνη των ζώων, επειδή διαφέρει λίγο στη σύσταση των αμινοξέων, μπορούσε να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις.

   Η ινσουλίνη από βακτήρια είναι ίδια με την ανθρώπινη και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.
5. Το γονίδιο της ινσουλίνης περιέχει εσώνια. Τα βακτήρια δεν διαθέτουν μηχανισμό ωρίμανσης του mRNA, άρα δεν θα μπορούσαν να αφαιρέσουν τα εσώνια και θα παρήγαν μη λειτουργική πρωτεΐνη.

   Το cDNA φτιάχνεται από το ώριμο mRNA, οπότε δεν περιέχει εσώνια.
6. 1. Απομόνωση του ολικού ώριμου mRNA από κύτταρα του παγκρέατος.
   2. Σύνθεση δίκλωνων μορίων cDNA και ενσωμάτωσή τους σε πλασμίδια.
   3. Μετασχηματισμός βακτηρίων και πολλαπλασιασμός τους παρουσία αντιβιοτικού.

4. Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης κυττάρων παγκρέατος.
5. Επιλογή, με ιχνηθετημένο ανιχνευτή, του κλώνου που περιέχει το γονίδιο της προϊνσουλίνης.

7. Είναι το πρόδρομο μόριο της ινσουλίνης, δηλαδή το προϊόν του γονιδίου της. Είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα που περιέχει ένα ενδιάμεσο πεπτίδιο.

   Η ινσουλίνη προκύπτει όταν ένα ένζυμο αφαιρέσει το ενδιάμεσο πεπτίδιο. Αποτελείται από δύο πεπτίδια και είναι λειτουργική.

8. Η μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη: μετά τη σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αφαιρείται ένα ενδιάμεσο πεπτίδιο, ώστε η πρωτεΐνη να γίνει βιολογικά λειτουργική.

9. Είναι **αντιικές πρωτεΐνες** που παράγονται, σε πολύ μικρές ποσότητες, από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιό. Προκαλούν στα γειτονικά υγιή κύτταρα την παραγωγή άλλων πρωτεϊνών, που εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών.

   Σήμερα παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από γενετικά τροποποιημένα βακτήρια και χρησιμοποιούνται ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

10. **Αντιγόνο:** κάθε ξένη ουσία που προκαλεί στον οργανισμό την παραγωγή αντισωμάτων. **Αντίσωμα:** πρωτεΐνη που παράγεται από τα Β λεμφοκύτταρα και αναγνωρίζει ειδικά έναν αντιγονικό καθοριστή. **Αντιγονικός καθοριστής:** το τμήμα του αντιγόνου που αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα.

11. Είναι αντισώματα που παράγονται από έναν κλώνο Β λεμφοκυττάρων και αναγνωρίζουν έναν αντιγονικό καθοριστή.
    1. Το αντιγόνο, εδώ η ορμόνη που ανιχνεύει το τεστ, χορηγείται με ένεση σε ποντίκι.
    2. Μετά από περίπου δύο εβδομάδες αφαιρείται ο σπλήνας και απομονώνονται τα Β λεμφοκύτταρα.
    3. Τα Β λεμφοκύτταρα συντήκονται με καρκινικά κύτταρα και σχηματίζονται υβριδώματα.
    4. Επιλέγεται το υβρίδωμα που παράγει το επιθυμητό αντίσωμα.
    5. Το υβρίδωμα καλλιεργείται και παράγει το αντίσωμα σε μεγάλες ποσότητες.

12. Είναι υβριδικά κύτταρα που προκύπτουν από τη σύντηξη Β λεμφοκυττάρων με καρκινικά κύτταρα.

    Τα Β λεμφοκύτταρα δεν επιβιώνουν για πολύ έξω από τον οργανισμό και δεν διατηρούνται σε κυτταροκαλλιέργειες. Το υβρίδωμα παράγει το αντίσωμα και ταυτόχρονα πολλαπλασιάζεται συνεχώς.

13. Ανιχνεύουν στα υγρά του σώματος ουσίες υπεύθυνες για ασθένειες, παθογόνους μικροοργανισμούς και μεταβολές στη συγκέντρωση προϊόντων του μεταβολισμού που μπορεί να προοιωνίζονται μια ασθένεια.

    Παραδείγματα: προσδιορισμός των ομάδων αίματος, τεστ κύησης.

14. Γίνονται μεταφορείς ισχυρών φαρμάκων, π.χ. αντικαρκινικών. Επειδή αναγνωρίζουν ειδικά τα κύτταρα-στόχους, το φάρμακο προσβάλλει μόνο αυτά και όχι τα υγιή κύτταρα.

15. Αναγνωρίζουν ειδικά αντιγόνα που υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων.Έτσι ελέγχεται αν τα όργανα του δότη είναι συμβατά με τον λήπτη.

16. Είναι η «διόρθωση» της γενετικής βλάβης με την εισαγωγή φυσιολογικών αλληλομόρφων του μεταλλαγμένου γονιδίου σε κύτταρα του ασθενούς.

    Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1990, σε ένα κορίτσι με ανεπάρκεια του ενζύμου ADA.

17. Στην τεχνολογία του **ανασυνδυασμένου DNA**: το φυσιολογικό γονίδιο ενσωματώνεται σε έναν ιό-φορέα που έχει γίνει αβλαβής.

    Πρέπει να έχει κλωνοποιηθεί το υπεύθυνο γονίδιο και να είναι γνωστά τα κύτταρα στα οποία εμφανίζεται η βλάβη.

18. Συμμετέχει στον μεταβολισμό των πουρινών στα κύτταρα του μυελού των οστών.

    Η έλλειψή του προκαλεί σοβαρή ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος.

19. 1. Λεμφοκύτταρα του ασθενούς παραλαμβάνονται και πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια.
    2. Το φυσιολογικό γονίδιο της ADA ενσωματώνεται σε έναν αβλαβή ιό-φορέα.
    3. Ο ιός μολύνει τα λεμφοκύτταρα και τους μεταφέρει το γονίδιο.
    4. Τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα επιστρέφουν στον ασθενή με ενδοφλέβια ένεση και παράγουν ADA.

20. Το φυσιολογικό γονίδιο ενσωματώνεται σε έναν αβλαβή αδενοϊό. Ο αδενοϊός εισάγεται στον οργανισμό με βρογχοσκόπιο ή με ψεκασμό, μολύνει τα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων και τους μεταφέρει το γονίδιο.

21. **Ex vivo:** τα κύτταρα τροποποιούνται έξω από τον οργανισμό και εισάγονται πάλι σε αυτόν. Εφαρμόζεται σε ελεύθερα κύτταρα, όπως τα κύτταρα του αίματος, που μπορούν να παραληφθούν και να καλλιεργηθούν.

    In vivo: τα κύτταρα τροποποιούνται μέσα στον οργανισμό. Εφαρμόζεται όταν τα κύτταρα ανήκουν σε ιστό από τον οποίο δεν μπορούν να αφαιρεθούν, όπως το επιθήλιο των πνευμόνων.

22. Γιατί εφαρμόζεται μόνο σε **σωματικά κύτταρα**. Το γενετικό υλικό των γαμετών δεν αλλάζει.

    Θα μεταβιβαζόταν μόνο αν τροποποιούνταν γεννητικά κύτταρα ή το ζυγωτό.

23. Τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής. Όταν πεθάνουν, ο οργανισμός παράγει νέα λεμφοκύτταρα, που δεν έχουν το φυσιολογικό γονίδιο. Γι' αυτό χρειάζονται τακτικές επαναλήψεις.

24. Διεθνές ερευνητικό πρόγραμμα που ξεκίνησε το 1990, με στόχο να προσδιοριστεί η αλληλουχία των βάσεων του ανθρώπινου γονιδιώματος και να χαρτογραφηθούν τα γονίδιά του, δηλαδή να εντοπιστεί η θέση τους στα χρωμοσώματα.

25. - Στην κατανόηση της οργάνωσης και της λειτουργίας του γονιδιώματος.
    - Στον εντοπισμό των γονιδίων που ευθύνονται για ασθένειες, άρα στη διάγνωση και στη γονιδιακή θεραπεία τους.
    - Στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων.
    - Στη μελέτη της εξέλιξης, με σύγκριση του γονιδιώματος του ανθρώπου με εκείνο άλλων οργανισμών.

Ασκήσεις

1. **α)** Προϊνσουλίνη: 86 − 1 = **85**. Πεπτίδιο Α: 21 − 1 = 20. Πεπτίδιο Β: 30 − 1 = 29. Συνολικά στην ινσουλίνη: **49**.

   β) 86 − 51 = **35 αμινοξέα**.

   γ) 86 κωδικόνια αμινοξέων και 1 κωδικόνιο λήξης: 87 × 3 = **261 βάσεις**.

δ) Το γονίδιο περιέχει επιπλέον εσώνια, που αφαιρούνται κατά την ωρίμανση, καθώς και αλληλουχίες που μεταγράφονται αλλά δεν μεταφράζονται (5΄ και 3΄ αμετάφραστες περιοχές).

2. **α)** Από κύτταρα της **υπόφυσης**, γιατί μόνο εκεί εκφράζεται το γονίδιο της αυξητικής ορμόνης και υπάρχει το mRNA του.

   β) Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Επιβιώνουν επομένως μόνο τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν.

   γ) Είναι ιχνηθετημένο μονόκλωνο μόριο DNA ή RNA, συμπληρωματικό προς τμήμα του γονιδίου της ορμόνης. Η βιβλιοθήκη περιέχει cDNA από όλα τα γονίδια που εκφράζονται στην υπόφυση. Μόνο οι 6 κλώνοι περιέχουν το cDNA της αυξητικής ορμόνης.

   δ)Ένας από τους κλώνους καλλιεργείται σε βιοαντιδραστήρα (ζύμωση). Ακολουθούν ο διαχωρισμός στερεών και υγρών συστατικών με διήθηση ή φυγοκέντρηση, η απομόνωση και ο καθαρισμός της ορμόνης.

3. **α)** Από τον **σπλήνα**.

   β) Η ορμόνη έχει περισσότερους από έναν αντιγονικούς καθοριστές. Για καθέναν ενεργοποιείται διαφορετικός κλώνος Β λεμφοκυττάρων, που παράγει διαφορετικό αντίσωμα.

   γ) Ο σπλήνας περιέχει Β λεμφοκύτταρα που παράγουν αντισώματα και για άλλα αντιγόνα, με τα οποία είχε έρθει σε επαφή το ποντίκι.

   δ) Το υβρίδωμα φυλάσσεται στην κατάψυξη, στους −80 °C, και καλλιεργείται ξανά όποτε χρειαστεί.

4. **α)** Τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα: **ααΑ**. Όλα τα υπόλοιπα κύτταρα: **αα**.

   β) Μόνο γαμέτες με το αλληλόμορφο **α**. Η θεραπεία δεν άλλαξε τα γεννητικά του κύτταρα.

   γ) αα × Αα: οι απόγονοι είναι Αα ή αα σε αναλογία 1 : 1. Η πιθανότητα να πάσχει το παιδί είναι **1/2**.

   δ) αα × ΑΑ: όλοι οι απόγονοι είναι Αα, υγιείς φορείς. Η πιθανότητα είναι **0**.

5. **α)** Και οι δύο είναι ετερόζυγοι: **Κκ**.

   β) Κκ × Κκ: 1 ΚΚ : 2 Κκ : 1 κκ. Πιθανότητα να πάσχει: **1/4**. Για δύο παιδιά: 1/4 × 1/4 = **1/16**.

   γ) Από τα υγιή παιδιά (1 ΚΚ : 2 Κκ) φορείς είναι τα **2/3**.

   δ) In vivo, με αδενοϊό που εισάγεται με βρογχοσκόπιο. Τα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων δεν μπορούν να αφαιρεθούν από τον οργανισμό, να τροποποιηθούν και να επιστρέψουν, όπως απαιτεί η ex vivo θεραπεία.

6. **α)** Κύτταρα του αίματος: **ex vivo**, γιατί μπορούν να παραληφθούν, να καλλιεργηθούν και να επιστρέψουν με ένεση. Επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού και κύτταρα του ήπατος: **in vivo**, γιατί ανήκουν σε ιστούς από τους οποίους δεν μπορούν να αφαιρεθούν.

   β) Είναι ιοί που έχουν γίνει αβλαβείς και στους οποίους έχει ενσωματωθεί, με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

   γ) Στην ex vivo θεραπεία των κυττάρων του αίματος, γιατί τα τροποποιημένα κύτταρα έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής. Η in vivo έχει μονιμότερα αποτελέσματα.

7. **α)** Το γονίδιο περιέχει εσώνια. Τα βακτήρια δεν διαθέτουν μηχανισμό ωρίμανσης, οπότε το mRNA μεταφράζεται μαζί με τα εσώνια και δεν παράγεται η σωστή πρωτεΐνη.

   β) Το γονίδιο της ινσουλίνης δεν εκφράζεται στα κύτταρα του ήπατος. Το mRNA του δεν υπάρχει εκεί, άρα η cDNA βιβλιοθήκη δεν περιέχει τον κατάλληλο κλώνο.

γ) Τα βακτήρια παράγουν προϊνσουλίνη. Παραλείφθηκε η ενζυμική αφαίρεση του ενδιάμεσου πεπτιδίου που τη μετατρέπει σε λειτουργική ινσουλίνη.

Διαγώνισμα

1. i. Σ · ii. Λ, είναι αντιιικές πρωτεΐνες · iii. Σ · iv. Λ, αυτό γίνεται στην in vivo · v. Σ.
2. 1 – Δ · 2 – Α · 3 – Β · 4 – Γ. Περισσεύει το Ε, που περιγράφει την ADA.
3. cDNA, γιατί προέρχεται από ώριμο mRNA και δεν περιέχει εσώνια. Τα βακτήρια δεν μπορούν να αφαιρέσουν εσώνια.

   Πάγκρεας, γιατί το γονίδιο της ινσουλίνης εκφράζεται μόνο σε ειδικά κύτταρά του, άρα μόνο εκεί υπάρχει το mRNA του.
4. 1. Χορήγηση του αντιγόνου με ένεση σε ποντίκι.
   2. Αφαίρεση του σπλήνα μετά από περίπου δύο εβδομάδες και απομόνωση των Β λεμφοκυττάρων.
   3. Σύντηξη με καρκινικά κύτταρα και σχηματισμός υβριδωμάτων.
   4. Επιλογή του υβριδώματος που παράγει το επιθυμητό αντίσωμα.
   5. Καλλιέργεια του υβριδώματος και παραλαβή του αντισώματος.
5. **α)** 17 + 26 = **43**.

   β) 60 − (18 + 27) = **15 αμινοξέα**.

   γ) 61 κωδικόνια × 3 = **183 βάσεις**.
6. **α) Ex vivo**. Λεμφοκύτταρα παραλαμβάνονται και καλλιεργούνται, μολύνονται με αβλαβή ιό που φέρει το φυσιολογικό γονίδιο και επιστρέφουν στον οργανισμό με ενδοφλέβια ένεση.

   β) Ναι, γιατί τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα δεν ζουν για πάντα.

   γ) Η θεραπεία δεν αλλάζει τους γαμέτες: το κορίτσι δίνει μόνο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Με πατέρα ομόζυγο φυσιολογικό, όλα τα παιδιά είναι ετερόζυγα. Πιθανότητα να πάσχει: **0**. Πιθανότητα να είναι φορέας: **1**.

Σημειώσεις Βιολογίας Προσανατολισμού Γ΄ Λυκείου. Κεφάλαιο 8.