7-8-9

Βιολογία Θετικής Κατεύθυνσης
Γ΄ Γενικού Λυκείου

Βιοτεχνολογία

Τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια της φωτογραφίας, στα οποία "απουσιάζει" το γονίδιο της λεπτίνης, χρησιμοποιούνται σε πειράματα μελέτης απώλειας βάρους.

ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΣΠΑΝΟΣ
2ο Γενικό Λύκειο Κορίνθου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο:Αρχές και μεθοδολογία της Βιοτεχνολογίας

Εκπαιδευτικοί στόχοι:

Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης αυτού του κεφαλαίου ο μαθητής θα πρέπει να μπορεί:

- Να περιγράφει τις μεθόδους που χρησιμοποιεί η Βιοτεχνολογία και να δίνει παραδείγματα με τις εφαρμογές της
- Να αναφέρει τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών
- Να αναφέρει στοιχεία από τη μεθοδολογία καλλιέργειας μικροοργανισμών
- Να σχεδιάζει την καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών σε κλειστή καλλιέργεια και να εξηγεί τις διάφορες φάσεις της.
- Να αναφέρει δύο τρόπους καλλιέργειας μικροοργανισμών και να εντοπίζει τις διαφορές τους
- Να διακρίνει ανάμεσα στη βιομάζα και τα ένζυμα που παράγονται εξωκυτταρικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Βιβλίο καθηγητή

Τι πρέπει να γνωρίζω προτού ξεκινήσω την μελέτη του κεφαλαίου

1. Τη τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA πολύ καλά.
2. Μερικά απλά παραδείγματα καθημερινής ζωής, όπου μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων διατροφής.
3. Το γεγονός ότι τα βακτήρια αναπαράγονται μονογονικά με απλή διχοτόμηση και ότι ο αριθμός τους αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό.
4. Τι είναι αυτότροφοι και τι ετερότροφοι οργανισμοί.

Η Βιοτεχνολογία προσφέρει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης των ζωντανών οργανισμών για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων

Οι ζωντανοί οργανισμοί χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων. Παλαιότερα χρησιμοποιούντο κυρίως για την παραγωγή ψωμιού, μπίρας και κρασιού. Σήμερα οι εξελίξεις στην Επιστήμη και στην Τεχνολογία δίνουν τη δυνατότητα χρησιμοποίησης των ζωντανών οργανισμών για την παραγωγή ευρείας κλίμακας προϊόντων όπως τροφίμων, αντιβιοτικών και εμβολίων. 0 όρος Βιοτεχνολογία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ούγγρο Kark Ereky το 1919, για να περιγράψει τη «διαδικασία παραγωγής προϊόντων από ακατέργαστα υλικά με τη βοήθεια ζωντανών οργανισμών».

Σήμερα η Βιοτεχνολογία αποτελεί συνδυασμό Επιστήμης και Τεχνολογίας με στόχο την εφαρμογή των γνώσεων που έχουν αποκτηθεί από τη μελέτη των ζωντανών οργανισμών για την παραγωγή σε ευρεία κλίμακα χρήσιμων προϊόντων. Τέτοια προϊόντα είναι, για παράδειγμα, η αλκοόλη, που παράγεται με ζύμωση, και η ανθρώπινη ινσουλίνη, που παράγεται από γενετικά τροποποιημένα βακτήρια. Η Βιοτεχνολογία συνεισφέρει σε διάφορους τομείς όπως είναι η Ιατρική, η γεωργία, η κτηνοτροφία, η βιομηχανία και η προστασία του περιβάλλοντος.

Βιοτεχνολογία με την ευρεία έννοια είναι η χρήση ζωντανών οργανισμών προς όφελος του ανθρώπου.

Η Βιοτεχνολογία στηρίζεται κυρίως σε τεχνικές καλλιέργειας και ανάπτυξης των μικροοργανισμών και σε τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA. Οι τελευταίες βρίσκουν άμεση εφαρμογή στη Βιοτεχνολογία, επειδή παρέχουν τη δυνατότητα εισαγωγής νέων επιθυμητών ιδιοτήτων στους ζωντανούς οργανισμούς σε μικρότερο χρόνο και με μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι στο παρελθόν. Το νέο στη Βιοτεχνολογία είναι όχι οι ιδέες εφόσον και στο παρελθόν είχαν γίνει προσπάθειες τροποποίησης των ιδιοτήτων των οργανισμών, αλλά οι τεχνικές για την υλοποίηση τους.

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

Βιοτεχνολογία: Συνδυασμός Επιστήμης και Τεχνολογίας με στόχο την εφαρμογή των γνώσεων που έχουν αποκτηθεί από την μελέτη των ζωντανών οργανισμών για την παραγωγή σε ευρεία κλίμακα χρήσιμων προϊόντων

Οι μικροβιακές καλλιέργειες αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για τη Βιοτεχνολογία

Οι μικροοργανισμοί όταν βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες, αυξάνονται σε μέγεθος και διαιρούνται με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού τους. Τα κύτταρα που προκύπτουν μετά από κάθε διαίρεση έχουν πρακτικά το ίδιο μέγεθος με το αρχικό κύτταρο. 0 ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών, δηλαδή ο ρυθμός με τον οποίο διαιρούνται τα κύτταρά του, καθορίζεται από το **χρόνο διπλασιασμού.** Κάθε είδος μικροοργανισμού έχει χαρακτηριστικό χρόνο διπλασιασμού.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού και κατά συνέπεια το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το ρΗ, το O_2 και η θερμοκρασία.

Όπως και όλοι οι υπόλοιποι οργανισμοί, για να αναπτυχθεί ένας μικροοργανισμός είναι απαραίτητο να μπορεί να προμηθεύεται από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται μια σειρά **θρεπτικών συστατικών.** Σ' αυτά περιλαμβάνονται ο άνθρακας, το άζωτο, διάφορα μεταλλικά ιόντα και το νερό. Η πηγή C για τους αυτότροφους μικροοργανισμούς είναι το CO_2 της ατμόσφαιρας, ενώ για τους ετερότροφους διάφορες οργανικές ενώσεις όπως οι υδατάνθρακες. Η πηγή Ν για τους περισσότερους μικροοργανισμούς είναι τα αμμωνιακά ή τα νιτρικά ιόντα ($N0"_3$). Τέλος, τα μεταλλικά ιόντα είναι απαραίτητα για την πραγματοποίηση των χημικών αντιδράσεων στο κύτταρο και ως συστατικά διαφόρων μορίων.

Το **ρΗ** επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι αναπτύσσονται σε ρΗ 6-9. Υπάρχουν όμως μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε διαφορετικό ρΗ, όπως είναι τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, που αναπτύσσονται σε pH 4-5.

Η **παρουσία ή απουσία O_2** μπορεί να βοηθήσει ή να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Υπάρχουν μικροοργανισμοί που για την ανάπτυξη τους απαιτούν υψηλή συγκέντρωση O_2 **(υποχρεωτικά αερόβιοι)** όπως τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium.* Άλλοι μικροοργανισμοί, όπως οι μύκητες που χρησιμοποιούνται στην αρτοβιομηχανία, ανήκουν στην κατηγορία των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται παρουσία O_2 με ταχύτερο ρυθμό απ' ότι απουσία O_2 **(προαιρετικά αερόβιοι).** Τέλος, υπάρχουν μικροοργανισμοί όπως βακτήρια του γένους *Clostridium* για τους οποίους το O_2 είναι τοξικό **(υποχρεωτικά αναερόβιοι).**

Η **θερμοκρασία** είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται άριστα σε θερμοκρασία 20-45° C. Για παράδειγμα, η *Escherichia coli,* που χρησιμοποιείται σε πειράματα Μοριακής Βιολογίας, αναπτύσσεται άριστα σε θερμοκρασία 37° C. Υπάρχουν όμως ορισμένοι που για την ανάπτυξη τους απαιτούν θερμοκρασία μεγαλύτερη από 45° C, όπως αυτοί που αναπτύσσονται κοντά σε θερμοπηγές, και άλλοι που αναπτύσσονται σε θερμοκρασία μικρότερη των 20° C .

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν στο εργαστήριο και σε βιομηχανική κλίμακα

Οι επιστήμονες είχαν ήδη αρχίσει από τα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα τις προσπάθειες για την καλλιέργεια βακτηρίων και μυκήτων. Ο Louis Pasteur στο Παρίσι υπήρξε από του πρωτοπόρους αυτής της προσπάθειας. Για το σκοπό αυτό ήταν απαραίτητη η απομόνωση αρχικά των διαφόρων ειδών βακτηρίων ή μυκήτων, η παρασκευή κατάλληλων θρεπτικών υλικών και η διαμόρφωση κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης. Σήμερα οι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων όπως αντιβιοτικά ή ένζυμα μπορούν να αναπτυχθούν στο εργαστήριο και σε μεγάλη κλίμακα στις βιομηχανικές μονάδες κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας. Για την ανάπτυξη τους χρησιμοποιούνται τεχνητά θρεπτικά υλικά. Αυτά πρέπει να περιέχουν πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου και ιόντα. Στην περίπτωση αερόβιων μικροοργανισμών, είναι απαραίτητη η παρουσία οξυγόνου. Τα **θρεπτικά υλικά** που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο εργαστήριο μπορεί να είναι υγρά ή στερεά. Τα υγρά θρεπτικά υλικά περιέχουν όλα τα θρεπτικά συστατικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως διαλυμένα σε νερό. Τα στερεά θρεπτικά υλικά παρασκευάζονται με ανάμιξη των υγρών θρεπτικών υλικών με ένα πολυσακχαρίτη που προέρχεται από φύκη το **άγαρ**. Το άγαρ είναι ρευστό σε θερμοκρασίες πάνω από 45°C αλλά στερεοποιείται σε μικρότερες θερμοκρασίες. Μία καλλιέργεια ξεκινάει με την προσθήκη μικρής ποσότητας κυττάρων στο θρεπτικό υλικό, μια διαδικασία που ονομάζεται **εμβολιασμός**. Μετά τον εμβολιασμό οι μικροοργανισμοί παραμένουν σε ένα κλίβανο που εξασφαλίζει σταθερή θερμοκρασία κατάλληλη για την ανάπτυξη τους. Με αυτό τον τρόπο σε μικρό χρονικό διάστημα, 12-76 ωρών, παράγεται μεγάλος αριθμός βακτηρίων. Οι καλλιέργειες αυτές μπορούν να διατηρηθούν σε αδρανή μορφή στην κατάψυξη (-80°C) για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Για την αποφυγή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών, εκτός εκείνων που πρόκειται να καλλιεργηθούν, τα θρεπτικά υλικά και οι συσκευές αποστειρώνονται πριν από την έναρξη της καλλιέργειας.

Όταν γίνεται καλλιέργεια μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα (βιομηχανική καλλιέργεια) χρησιμοποιούνται κατάλληλες συσκευές που ονομάζονται **ζυμωτήρες ή βιοαντιδραστήρες.** Οι βιοαντιδραστήρες επιτρέπουν τον έλεγχο και τη ρύθμιση των συνθηκών (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση O_2) που αφορούν την καλλιέργεια. Στο θρεπτικό υλικό, που προστίθεται στους βιοαντιδραστήρες, χρησιμοποιούνται φθηνές πηγές άνθρακα όπως η μελάσα που αποτελεί παραπροϊόν της επεξεργασίας ζαχαροκάλαμου ή σακχαρότευτλων. Η καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα ξεκινάει με τον εμβολιασμό από μια αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών που έχει γίνει στο εργαστήριο. Μέσα στο βιοαντιδραστήρα οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται χρησιμοποιώντας τα συστατικά του θρεπτικού υλικού. Όλες οι διεργασίες πρέπει να γίνονται κάτω από στείρες συνθήκες για να μην γίνει μόλυνση της καλλιέργειας. Ο ίδιος ο βιοαντιδραστήρας και το θρεπτικό υλικό αποστειρώνονται πριν από τη χρήση. Με τον όρο **ζύμωση** εννοούμε την διαδικασία ανάπτυξης

μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες. Ο όρος ζύμωση παλαιότερα χρησιμοποιείτο μόνον για αναερόβιες διεργασίες αλλά σήμερα χρησιμοποιείται με την ευρεία έννοια και περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες αερόβιες και αναερόβιες. Το προϊόντα της ζύμωσης είναι είτε τα ίδια τα κύτταρα που ονομάζονται **βιομάζα** είτε προϊόντα των κυττάρων όπως πρωτεΐνες και αντιβιοτικά.

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να καλλιεργηθούν με διαφορετικούς τρόπους

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ζυμώσεων, οι οποίοι μπορούν να εφαρμοστούν ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν. Δύο ευρέως χρησιμοποιούμενοι τύποι είναι η κλειστή και η συνεχής καλλιέργεια.

Κλειστή καλλιέργεια: Σ' αυτό τον τύπο ζύμωσης τοποθετείται στο βιοαντιδραστήρα ορισμένη ποσότητα αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού, η οποία εμβολιάζεται με αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών. Η καλλιέργεια συνεχίζεται μέχρι την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Στην κλειστή καλλιέργεια οι φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η λανθάνουσα, η εκθετική, η στατική και η φάση θανάτου.

Κατά τη **λανθάνουσα φάση** ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που προέρχεται από την αρχική καλλιέργεια παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα, για να προσαρμοστούν στις καινούριες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται. Στη συνέχεια, οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, επειδή η καλλιέργεια πραγματοποιείται κάτω από άριστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης O_2 και στο υλικό καλλιέργειας υπάρχουν άφθονα θρεπτικά συστατικά. Αυτή η φάση ανάπτυξης ονομάζεται **εκθετική,** επειδή ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται εκθετικά. Ακολουθεί η **στατική φάση,** κατά την οποία ο πληθυσμός των βακτηρίων δεν αυξάνεται, λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή λόγω συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Τέλος κατά τη **φάση θανάτου** ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται. Παρ' ότι η διαδοχή των φάσεων ανάπτυξης σε κάθε κλειστή καλλιέργεια είναι συγκεκριμένη η διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί παράγουν χρήσιμα προϊόντα συνήθως κατά τη διάρκεια της εκθετικής και της στατικής φάσης ανάπτυξης τους.

Συνεχής καλλιέργεια: Σ' αυτό τον τύπο καλλιέργειας οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά. Ταυτόχρονα, απομακρύνονται από την καλλιέργεια κύτταρα και άχρηστα προϊόντα.

Η παραλαβή των προϊόντων ζύμωσης απαιτεί τη χρησιμοποίηση σειράς τεχνικών καθαρισμού

Τελική κατεργασία είναι η διεργασία καθαρισμού του προϊόντος που παραλαμβάνεται από το βιοαντιδραστήρα. Αρχικά, γίνεται διαχωρισμός των υγρών από τα στερεά συστατικά, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα κύτταρα. Αυτό γίνεται συνήθως με διήθηση ή με φυγοκέντρηση. Το επιθυμητό προϊόν μπορεί να περιλαμβάνεται στα στερεά ή υγρά συστατικά. Από όπου παραλαμβάνεται με τη χρήση καταλλήλων μεθόδων.

Τα προϊόντα της ζύμωσης μπορούν να αξιοποιηθούν μόνο όταν είναι απόλυτα καθαρά, δηλαδή όταν δεν έχουν προσμείξεις

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

Μύκητες: Ένα από τα πέντε βασίλεια που περιλαμβάνει ευκαρυωτικούς ετερότροφους μονοκύτταρους ή πολυκύτταρους οργανισμούς.

Εμβολιασμός: Η προσθήκη μικρού αριθμού μικροοργανισμών σε νέο περιβάλλον, όπου και θα αναπτυχθούν, όπως για παράδειγμα σε βιοαντιδραστήρα.

Αποστείρωση: Μέθοδος διαδικασίας απομάκρυνσης ή θανάτωσης όλων των ζωντανών οργανισμών από κάποιο υλικό. Μπορεί να πραγματοποιηθεί με^ φιλτράρισμα ή τη χρησιμοποίηση θερμοκρασίας, ακτινοβολίας ή χημικών ουσιών.

Βιοαντιδραστήρας: Δοχείο μέσα στο οποίο πραγματοποιείται μία βιολογική αντίδραση συνήθως ζύμωση ή βιομετατροπή. Το μέγεθος των αντιδραστήρων που χρησιμοποιούνται για ζύμωση διαφέρει ανάλογα με τη χρήση τους από 3 λίτρα (βιοαντιδραστήρας που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για ερευνητικούς σκοπούς) μέχρι μερικές χιλιάδες λίτρα (βιοαντιδραστήρας που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία για παραγωγή προϊόντων).

Ζύμωση: Καταβολική πορεία κατά την οποία οξειδώνονται οργανικές ουσίες χωρίς την παρουσία οξυγόνου.

Βιομάζα: Μεγάλη ποσότητα οργανικής βιολογικής ύλης που περιλαμβάνει ζωντανά και νεκρά κύτταρα μαζί με τα συστατικά τους. Η βιομάζα μαζί με τα προϊόντα ζύμωσης (όπως εξωκυτταρικά ένζυμα) είναι το προϊόν από την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρα.

Φυγοκέντρηση: Μέθοδος διαχωρισμού ουσιών σε κάποιο αιώρημα με την εκμετάλλευση του διαφορετικού τους βάρους.

ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΛΥΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών καθορίζεται από το **χρόνο διπλασιασμού,** δηλαδή από το ρυθμό με τον οποίο διαιρούνται τα κύτταρά του, και είναι χαρακτηριστικός για κάθε μικροοργανισμό. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού και κατά συνέπεια τον ρυθμό ανάπτυξης είναι, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, το pH, το οξυγόνο και η θερμοκρασία.

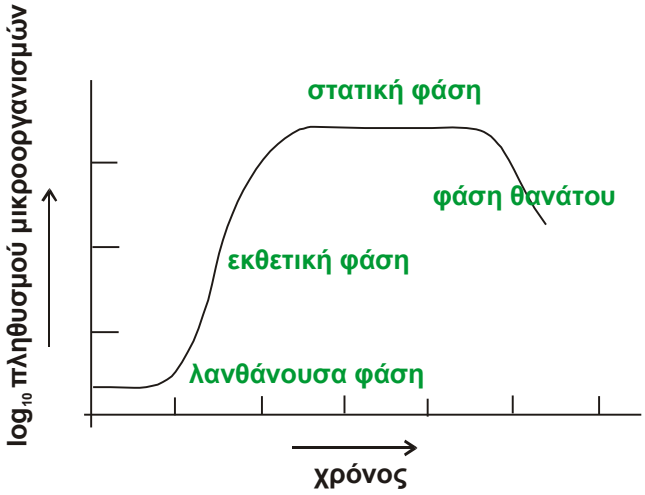
Για την επίλυση προβλημάτων πρέπει να έχουμε υπόψη μας τα παρακάτω:

1. Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών καθορίζεται από το χρόνο διπλασιασμού το χρόνο δηλαδή που απαιτείται ένας πληθυσμός σε δεδομένες συνθήκες να γίνει διπλάσιος.
2. Ο χρόνος διπλασιασμού κάθε μικροοργανισμού εξαρτάται εκτός από το είδος του οργανισμού και από την συνθήκες πολλαπλασιασμού. Η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το pH, η διαθεσιμότητα οξυγόνου και η θερμοκρασία είναι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά το χρόνο διπλασιασμού και κατά συνέπεια και το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών
3. Με την προϋπόθεση ότι οι συνθήκες ανάπτυξης παραμένουν σταθερές και υπάρχει άφθονη παροχή τροφής οι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται εκθετικά. Ένας αρχικός πληθυσμός A_0 ενός είδους μικροοργανισμού, που έχει χρόνο διπλασιασμού Τ, σε χρόνο t ο πληθυσμός Α θα έχει γίνει ίσος με: $A= A_0 \cdot 2t/T$
4. Σε καλλιέργειες στο εργαστήριο ή στην βιομηχανία προηγείται της εκθετικής φάσης ανάπτυξης μια φάση προσαρμογής των οργανισμών που έχουν εισαχθεί με εμβολιασμό στο δοχείο της καλλιέργειας. Κατά την αρχική αυτή φάση ο πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός και προσαρμόζεται στις συνθήκες της καλλιέργειας.
5. Αν η καλλιέργεια είναι συνεχής, δηλαδή διαρκώς προστίθενται θρεπτικά συστατικά στην καλλιέργεια και ταυτόχρονα απομακρύνονται τα διάφορα απόβλητα των μικροοργανισμών της καλλιέργειας η καλλιέργεια βρίσκεται διαρκώς σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
6. Αν η καλλιέργεια είναι κλειστή μετά την εκθετική φάση ανάπτυξης ο πληθυσμός σταθεροποιείται (στατική φάση) και μετά από κάποιο χρόνος η καλλιέργεια περνάει στη φάση θανάτου όπότε παρατηρείται σταδιακή μείωση του πληθυσμού.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Κλειστή καλλιέργεια :

Τοποθετείται στο βιοαντιδραστήρα **ορισμένη** ποσότητα αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού μέχρι να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν. Οι φάσεις ανάπτυξης των οργανισμών είναι, η λανθάνουσα, η εκθετική, η στατική και η φάση θανάτου.



λανθάνουσα φάση: ο πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός

εκθετική φάση: ο πληθυσμός αυξάνεται εκθετικά

στατική φάση: ο πληθυσμός δεν αυξάνεται, λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή λόγω συσσώρευσης τοξικών αποβλήτων από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών.

φάση θανάτου: ο πληθυσμός μειώνεται.

Η διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών και τα χρήσιμα προϊόντα παράγονται συνήθως στη εκθετική ή στατική φάση της ανάπτυξής τους.

Συνεχής καλλιέργεια : Οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται **συνεχώς** με θρεπτικά συστατικά και ταυτόχρονα απομακρύνονται από την καλλιέργεια κύτταρα και άχρηστα προϊόντα. Άρα οι μικροοργανισμοί βρίσκονται συνεχώς σε ανάπτυξη.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ- ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΜΕ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

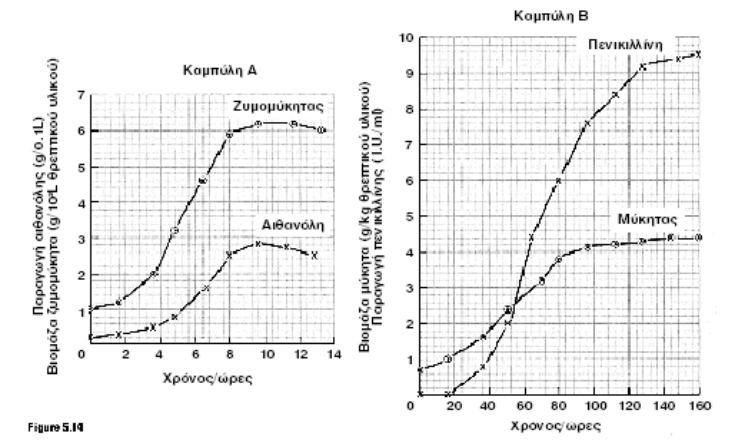
1. Συμπληρώστε με τις κατάλληλες λέξεις τα κενά:
Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το …….. , το ……., και η ……Σε μια μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται κατάλληλες συσκευές, οι ……., Προϊόντα της ζύμωσης είναι η ……. η τα …… Κατά τη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός των μικροοργανισμών παραμένει …….. Η φάση κατά την οποίο ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται με ταχύ ρυθμό ονομάζεται ……

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού είναι η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, το *pH*, το O_2, και η *θερμοκρασία*, Σε μια μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται κατάλληλες συσκευές, οι *βιοαντιδραστήρες (ή ζυμωτήρες).* Προϊόντα της ζύμωσης είναι η *βιομάζα* ή τα *προϊόντα κυττάρων* Κατά τη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός των μικροοργανισμών παραμένει σταθερός Η φάση κατά την οποία ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται με ταχύ ρυθμό ονομάζεται *εκθετική*.

2. Για την παραλαβή ενός προϊόντος που εκκρίνεται από κύτταρα στρεπτομύκητα ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια. Διαγράψτε εκείνο που δεν ισχύουν:
α. διαχωρισμός και παραλαβή των κυττάρων του μύκητα
β. διαχωρισμός των υγρών οπό το στερεά συστατικά
γ. παραλαβή των υγρών συστατικών
δ. παραλαβή των στερεών συστατικών
ε. καθαρισμός του επιθυμητού προϊόντος

Δεν ισχύουν τα α. και δ.

3. **Στις παρακάτω γραφικές παραστάσεις απεικονίζεται η ανάπτυξη δύο μικροοργανισμών του *Saccharomyces* και του *Penicillium* και η παραγωγή προϊόντων τους, όταν αυτοί καλλιεργηθούν σε βιοαντιδραστήρες. Η καμπύλη Α αφορά την ανάπτυξη του ζυμομύκητα *Saccharomyces* και την παραγωγή αιθανόλης, ενώ η καμπύλη Β την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium* και την παραγωγή πενικιλίνης. α. εξηγήστε τις αλλαγές στην ανάπτυξη του *Saccharomyces* για τα διαστήματα 0-2, 2-6, 8-10, και 12-14 ώρες β. εντοπίστε τις φάσεις ανάπτυξης του μύκητα *Saccharomyces* σε σχέση με την παραγωγή αιθανόλης γ. εντοπίστε τις φάσεις ανάπτυξης του μύκητα *Penicillium* σε σχέση με την παραγωγή πενικιλίνης**.



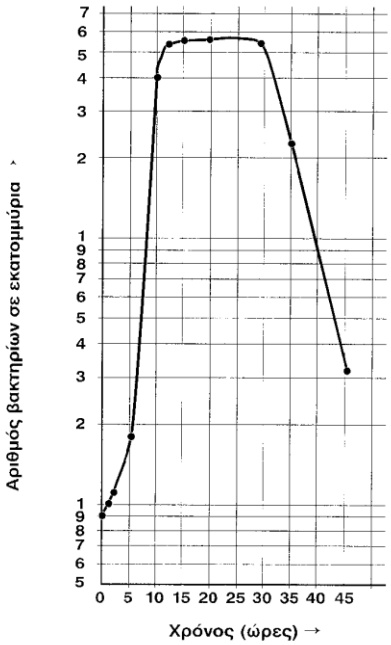
α. Στο διάστημα 0-2 έχουμε τη λανθάνουσα φάση, στο διάστημα 2-6 έχουμε την εκθετική φάση, στο διάστημα 8-10 έχουμε τη στατική φάση, και στο διάστημα 12-14 ώρες έχουμε τη φάση θανάτου
β. Η παραγωγή αιθανόλης ακολουθεί τις φάσεις ανάπτυξης του μύκητα *Saccharomyces.*
γ. Η παραγωγή πενικιλίνης στη λανθάνουσα φάση είναι μηδενική. Στην αρχή της εκθετικής φάσης είναι ελάχιστη, αλλά αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Από το μέσο της εκθετικής φάσης και στη στατική φάση έχουμε μεγάλη αύξηση στην παραγωγή πενικιλίνης. Η μεγαλύτερη ποσότητα πενικιλίνης παράγεται κατά τη στατική φάση.

4. Ποιες είναι οι συνθήκες που πρέπει να ελέγχονται για την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρες; Για ποιο λόγο είναι απαραίτητη η διασφάλιση συνθηκών ασηψίας;

Για την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρες πρέπει να ελέγχονται το pH, η παρουσία ή απουσία 0_2 και η θερμοκρασία. Η διασφάλιση συνθηκών ασηψίας είναι απαραίτητη, για να μην αναπτυχθούν άλλοι μικροοργανισμοί.

5. Στον πίνακα Α υπάρχουν το αποτελέσματα μετρήσεων του αριθμού βακτηρίων από καλλιέργεια μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 30° C. Χρησιμοποιώντας το δεδομένα αυτά κατασκευάστε την καμπύλη μεταβολής του αριθμού των βακτηρίων σε συνάρτηση με το χρόνο. Εξηγήστε τους παράγοντες που επηρεάζουν το σχήμα της καμπύλης.

Χρόνος (ώρες)	Αριθμός βακτηρίων σε εκατομμύρια
0	9
1	10
2	11
5	18
10	400
12	550
15	550
20	550
30	550
35	225
45	30



Στην αρχή έχουμε τη λανθάνουσα φάση, κατά την οποία ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που προέρχεται από την αρχική καλλιέργεια αυξάνεται με πολύ μικρό ρυθμό. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα, για να προσαρμοστούν στις καινούριες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται. Στη συνέχεια, έχουμε την εκθετική φάση, κατά την οποία οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, επειδή η καλλιέργεια πραγματοποιείται κάτω από άριστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης 0_2 και επειδή στο υλικό της καλλιέργειας υπάρχουν άφθονα θρεπτικά συστατικά. Στην εκθετική φάση ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται εκθετικά, Ακολουθεί η στατική φάση, κατά την οποία ο πληθυσμός των βακτηρίων δεν αυξάνεται (0 αριθμός των βακτηρίων που παράγονται είναι περίπου ίσος με τον αριθμό των βακτηρίων που θανατώνονται) λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό των βακτηρίων, Τέλος, έχουμε τη φάση θανάτου κατά την οποία ο αριθμός των βακτηρίων μειώνεται

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο: Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στην Ιατρική

Εκπαιδευτικοί στόχοι:

Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης αυτού του κεφαλαίου ο μαθητής θα πρέπει να μπορεί:

- Να περιγράφει τον τρόπο εφαρμογής των μεθόδων της Γενετικής Μηχανικής στην παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών, μονοκλωνικών αντισωμάτων, εμβολίων και αντιβιοτικών.
- Να αναφέρει τις βασικές αρχές της γονιδιακής θεραπείας και να εξηγεί τους περιορισμούς της.
- Να αναφέρει τις εφαρμογές του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος και να εξηγεί τη σημασία τους.

Βιβλίο καθηγητή

Τι πρέπει να γνωρίζω προτού ξεκινήσω την μελέτη του κεφαλαίου

1. Τη διαφορά των όρων διάγνωση, πρόληψη και θεραπεία.
2. Την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, την μέθοδο PCR, και την μέθοδο των ανιχνευτών DNA.
3. Τι είναι αλλεργία.
4. Ότι μετά την μετάφραση, η παραγόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα υφίσταται χημικές τροποποιήσεις για να μετατραπεί σε λειτουργικό πρωτεϊνικό μόριο.
5. Τι είναι και πως κατασκευάζεται η c DNA βιβλιοθήκη.
6. Τι είναι βιοαντιδραστήρας και πως γίνεται η παραγωγή προϊόντων σε αυτόν.
7. Ότι τα χημικά φάρμακα έχουν πάντοτε παρενέργειες.
8. Τι είναι γενετικές ασθένειες και τους πιθανούς λόγους στους οποίους οφείλονται αυτές.
9. Τι είναι ανοσολογική ανεπάρκεια.
10. Τι είναι ιοί και τι γενετικό υλικό έχουν.
11. Τι είναι καρκίνος.
12. Τον αριθμό των ζευγών βάσεων σε κάθε ανθρώπινο κύτταρο.

Η Βιοτεχνολογία έχει συμβάλει αποτελεσματικά σε τρεις βασικούς στόχους της Ιατρικής, που είναι η έγκαιρη **διάγνωση** μιας ασθένειας, η **πρόληψη** και η αποτελεσματική **θεραπεία της.**

Η έγκαιρη διάγνωση μιας ασθένειας απαιτεί την ανάπτυξη ευαίσθητων τεχνικών, που μπορούν να εντοπίσουν την ασθένεια στα αρχικά της στάδια πριν να εμφανιστούν τα συμπτώματα της στον οργανισμό, να ανιχνεύσουν κάποια μόλυνση από παθογόνους οργανισμούς ή να διαπιστώσουν την ύπαρξη κάποιας κληρονομικής ασθένειας.

Η **πρόληψη** σοβαρών ασθενειών όπως η ηπατίτιδα Β, η πολιομυελίτιδα και η φυματίωση χρειάζονται πιο εξελιγμένα, επαρκώς ασφαλή αλλά και οικονομικά προσιτά εμβόλια. Επίσης η ανάπτυξη εμβολίων για την πρόληψη ασθενειών όπως το AIDS, η μηνιγγίτιδα, και ο καρκίνος είναι πλέον επιτακτική ανάγκη.

Η **αποτελεσματική θεραπεία** προϋποθέτει την κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών και του γενετικού υπόβαθρου της ασθένειας, για να εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία είτε με φαρμακευτική αγωγή είτε ακόμη και με «γενετική διόρθωση» της βλάβης.

Η Βιοτεχνολογία συνεισφέρει ουσιαστικά στους παραπάνω στόχους με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, με τη χρήση της τεχνικής PCR, καθώς και ανιχνευτών DNA. Οι τεχνικές αυτές βρίσκουν εφαρμογή στη βελτίωση και παραγωγή σε ευρεία κλίμακα ευαίσθητων διαγνωστικών ουσιών όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα, αποτελεσματικών εμβολίων και φαρμακευτικών προϊόντων. Πρόσφατα, ένας νέος τομέας της Βιοτεχνολογίας αναπτύσσεται ταχύτατα, η **γονιδιακή θεραπεία,** που στηρίζεται στη εφαρμογή της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA στη θεραπεία πολλών σοβαρών γενετικών ασθενειών όπως η κυστική ίνωση, το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) και διάφοροι τύποι καρκίνου.

Πλήθος «φαρμακευτικών» πρωτεϊνών συντίθεται από βακτήρια με μεθόδους Γενετικής Μηχανικής

Πριν από την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, οι περισσότερες **φαρμακευτικές πρωτεΐνες**, δηλαδή πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών, ήταν διαθέσιμες σε πολύ μικρές ποσότητες, η παραγωγή τους ήταν πολύ ακριβή και συχνά η βιολογική δράση τους δεν ήταν πλήρως κατανοητή. 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. Μεταξύ των πρώτων μορίων που παρασκευάστηκαν είναι η ινσουλίνη, οι ιντερφερόνες και η αυξητική ορμόνη.

Η **ινσουλίνη** είναι μια ορμόνη, που αποτελείται από 51 αμινοξέα και παράγεται από ειδικά κύτταρα του παγκρέατος. Η ορμόνη αυτή ρυθμίζει το μεταβολισμό των υδατανθράκων και ειδικότερα το ποσοστό της

γλυκόζης στο αίμα. Ο διαβήτης είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από έλλειψη ή μείωση ινσουλίνης και υπολογίζεται ότι πάνω από 60.000.000 άτομα στον κόσμο πάσχουν από διαβήτη.

Η ινσουλίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των διαβητικών ατόμων. Πριν από το 1982 οι κύριες πηγές ινσουλίνης ήταν το πάγκρεας από χοίρους και από βοοειδή. Η ινσουλίνη παραγόταν από την εκχύλιση αυτών των ιστών με μια δαπανηρή και πολύπλοκη διαδικασία και επιπλέον, επειδή είχε μικρές διαφορές στη σύσταση των αμινοξέων της από την ανθρώπινη, προκαλούσε αλλεργικές αντιδράσεις.

Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο μικρά πεπτίδια, Α και Β, που συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Το γονίδιο της ινσουλίνης παράγει ένα πρόδρομο μόριο, την προϊνσουλίνη, το οποίο μετατρέπεται τελικά σε ινσουλίνη.

Μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της ανθρώπινης ινσουλίνης στα βακτήρια είναι η παραγωγή του πρόδρομου μορίου της σε μια βακτηριακή καλλιέργεια και η μετατροπή της σε ινσουλίνη με ενζυμική κατεργασία.

Η μέθοδος περιλαμβάνει την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης από τα κύτταρα του παγκρέατος στα οποία εκφράζεται το γονίδιο της ινσουλίνης και την επιλογή του κλώνου που περιέχει το γονίδιο. Συνοπτικά τα στάδια κλωνοποίησης και απομόνωσης του γονιδίου της ινσουλίνης είναι:

• Απομόνωση του συνολικού mRNA, από κύτταρα του ανθρώπινου παγκρέατος.

• Κατασκευή δίκλωνων μορίων DNA και ενσωμάτωση τους σε πλασμίδια.

• Μετασχηματισμός βακτηρίων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και πολλαπλασιασμός τους σε υγρό θρεπτικό υλικό.

• Επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί το πρόδρομο μόριο της ινσουλίνης.

• Ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών σε βιοαντιδραστήρα για παραγωγή του πρόδρομου μορίου της ινσουλίνης. Η προϊνσουλίνη συλλέγεται και με κατάλληλο ένζυμο, που αφαιρεί το ενδιάμεσο πεπτίδιο, μετατρέπεται σε ινσουλίνη.

Οι **ιντερφερόνες** είναι αντιικές πρωτεΐνες, που παράγονται από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς. Οι πρωτεΐνες αυτές, επάγουν την παραγωγή άλλων πρωτεϊνών από τα γειτονικά υγιή κύτταρα οι οποίες εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών σ' αυτά. Οι ιντερφερόνες είναι οικογένεια συγγενών πρωτεϊνών, που ταξινομούνται ανάλογα με τη χημική και βιολογική ενεργότητα τους σε τρεις ομάδες: τις ιντερφερόνες α, β και γ.

Οι ιντερφερόνες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως αντιικοί και πιθανόν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Παράγονται σε ελάχιστες ποσότητες στο σώμα και γι' αυτό δεν ήταν η ευρεία χρήση τους στη θεραπεία ασθενειών. Όμως, μετά την κλωνοποίηση ορισμένων γονιδίων ιντερφερονών, είναι σήμερα δυνατή η παραγωγή τους σε μεγάλες ποσότητες, με παρόμοια μέθοδο παραγωγής με αυτή της ινσουλίνης.

Μονοκλωνικά αντισώματα

«Το ιδανικό φάρμακο», είπε ο πρωτοπόρος Γερμανός γιατρός Ehrlich, «πρέπει να μπορεί να εξουδετερώνει τις μολύνσεις χωρίς να προκαλεί παρενέργειες στον οργανισμό». Η φύση έχει φτιάξει ένα τέλειο «φάρμακο», τα αντισώματα.

Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικά μόρια, που παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος, όταν ένα αντιγόνο (παθογόνος μικροοργανισμός, ιός ή ξένο υλικό) προσβάλει τον οργανισμό. Τα αντισώματα αντιδρούν με το αντιγόνο και το εξουδετερώνουν.

Ο οργανισμός μας είναι ικανός να παράγει αντισώματα εναντίον κάθε ξένου αντιγόνου. Στην πραγματικότητα, ένα αντίσωμα αναγνωρίζει μόνο μια περιοχή μόνο του αντιγόνου, η οποία ονομάζεται **αντιγονικός καθοριστής.** Ένα μεγάλο αντιγόνο, π.χ. ένας μικροοργανισμός, έχει πολλούς αντιγονικούς καθοριστές γι' αυτό παράγονται πολλά είδη αντισωμάτων εναντίον του.

Κάθε είδος αντισώματος που αναγνωρίζει έναν αντιγονικό καθοριστή παράγεται από μια ομάδα όμοιων Β-λεμφοκυττάρων, που αποτελούν έναν κλώνο. Τα αντισώματα που παράγεται από ένα κλώνο Β-λεμφοκυπάρων ονομάζεται **μονοκλωνικά.**

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πολύ σημαντικά στην Ιατρική και χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικά για την ανίχνευση ασθενειών ή ως εξειδικευμένα φάρμακα εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών ή ακόμη καρκινικών κυττάρων. Ήταν, επομένως, σημαντικό να γίνει δυνατή η παραγωγή τους στο εργαστήριο σε μεγάλες ποσότητες. Όμως τα Β-λεμφοκύτταρα δεν επιβιώνουν για πολύ έξω από το σώμα και δεν μπορούν να διατηρηθούν σε κυτταροκαλλιέργειες. Την ιδιότητα αυτή την αποκτούν ύστερα από σύντηξη με καρκινικά κύτταρα. Τα υβριδικά κύτταρα που παράγονται ονομάζονται **υβριδώματα** και μπορούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες ενός μονοκλωνικού αντισώματος. Η τεχνική της παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων αναπτύχθηκε το 1975 και ακολουθεί την εξής διαδικασία:

Ένα επιλεγμένο αντιγόνο χορηγείται με ένεση σε ποντίκι και προκαλεί ανοσολογική αντίδραση με αποτέλεσμα να αρχίσει η παραγωγή αντισωμάτων από εξειδικευμένα Β-λεμφοκύτταρα. Ύστερα από δύο εβδομάδες αφαιρείται ο σπλήνας και απομονώνονται τα Β-λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά συντήκονται με καρκινικά κύτταρα και παράγονται τα 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 μονοκλωνικό αντίσωμα σε μεγάλες ποσότητε.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν πολυάριθμες εφαρμογές και λειτουργούν ως:

- **Ανοσοδιαγνωστικά.** 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

προοιωνίζει την πιθανότητα εμφάνισης κάποιας ασθένειας. Η τεχνική ανίχνευσης είναι γρήγορη, απλή, ευαίσθητη, ακριβής και επιτρέπει τη διάγνωση ασθενειών στα πολύ αρχικά στάδια τους δηλαδή πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα. Τα αντισώματα θα συνεισφέρουν σημαντικά στην αύξηση της ευαισθησίας κλινικών δοκιμασιών όπως η τυποποίηση (προσδιορισμός) των ομάδων αίματος και η εξακρίβωση μιας πιθανής κύησης. Στην τελευταία περίπτωση έχουν κατασκευαστεί ειδικά ανοσοδιαγνωστικά τεστ, τα οποία περιέχουν μονοκλωνικά αντισώματα για ειδικές ορμόνες που παράγονται κατά την κύηση.

- **Θεραπευτικά.** Τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά. Η πιο ενδιαφέρουσα εφαρμογή τους αφορά τη θεραπεία του καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν στην εξωτερική επιφάνεια τους μεγάλη ποικιλία αντιγόνων που δεν υπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού, και ονομάζονται καρκινικά αντιγόνα. Έτσι μπορούν να κατασκευαστούν μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον αυτών των αντιγόνων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πολύ ειδικά μόνο για τα καρκινικά κύτταρα και μπορούν να «γίνουν μεταφορείς» ισχυρών αντικαρκινικών φαρμάκων. Όταν εισαχθούν στον οργανισμό, βρίσκουν και προσβάλλουν τους καρκίνους-στόχους. Τα αντικαρκινικά φάρμακα, που είναι συνδεδεμένα με τα αντισώματα, δρουν κατευθείαν στα καρκινικά κύτταρα και τα καταστρέφουν. Επιτρέπουν έτσι τη θεραπεία με αποφυγή της χειρουργικής επέμβασης και των δυσάρεστων επιπτώσεων της χημειοθεραπείας.

- **Για την επιλογή οργάνων συμβατών για μεταμόσχευση.** Τα κύτταρα των οργάνων έχουν στην επιφάνεια τους ειδικά αντιγόνα επιφανείας, που αναγνωρίζονται από ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα. Με τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορεί να γίνει έλεγχος των οργάνων δωρητών, για να διαπιστωθεί αν ταιριάζουν ανοσολογικά με τα αντίστοιχα των ασθενών. Έτσι, είναι δυνατόν να αποφευχθεί η απόρριψη και οι μεταμοσχεύσεις να είναι επιτυχείς.

Γονιδιακή θεραπεία

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 η περισσότερων γονιδίων και ακόμη περισσότερες σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η ακτινοβολία και οι χημικές ουσίες. Όλες σχεδόν οι γενετικές ασθένειες προκαλούν δυσμορφίες, το 80% όλων διανοητική καθυστέρηση και το ένα πέμπτο από αυτές θάνατο στην παιδική ηλικία.

Έως πρόσφατα η μοριακή βάση των ασθενειών αυτών δεν ήταν γνωστή. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA σε συνδυασμό με τις μεθόδους της παραδοσιακής γενετικής (γενεαλογικά δένδρα) οδήγησε στον εντοπισμό της θέσης στα χρωμοσώματα (χαρτογράφηση) πολλών μεταλλαγμένων γονιδίων, που προκαλούν τις αντίστοιχες ασθένειες. Επιπλέον ορισμένα μεταλλαγμένα γονίδια κλωνοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν με τα φυσιολογικά αλληλόμορφά τους, για να εξακριβωθεί το είδος των μεταλλάξεων. Η χαρτογράφηση όλων των γονιδίων στα χρωμοσώματα είναι ένας από τους κύριους στόχους του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος, όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Σήμερα έχουν χαρτογραφηθεί και κλωνοποιηθεί τα γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για ασθένειες όπως η κυστική ίνωση, η ασθένεια του Huntington και η μυϊκή δυστροφία Duchenne.

Οι γνώσεις αυτές έδωσαν την 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 υπεύθυνου γονιδίου, και ο προσδιορισμός των κυττάρων που εμφανίζουν τη βλάβη από την ασθένεια.

Η γονιδιακή θεραπεία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το Σεπτέμβριο του 1990 σε ένα τετράχρονο κορίτσι που έπασχε από ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ασθένεια αυτή οφείλεται στην έλλειψη του ενζύμου **απαμινάση της αδενοσίνης** (ADA), που παίρνει μέρος στον μεταβολισμό των πουρινών στα κύτταρα του μυελού των οστών. Η έλλειψη οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που παράγει το ένζυμο αυτό. Η ασθένεια εμφανίζει αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας. Οι ασθενείς πάσχουν από χρόνιες μολύνσεις, έχουν προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου σε πολύ μικρή ηλικία και πολλοί πεθαίνουν ύστερα από λίγους μήνες ζωής. Είναι γνωστή η περίπτωση ενός παιδιού που έζησε εννέα χρόνια σε έναν πλαστικό θάλαμο, για να εμποδιστεί η επαφή του με ιούς, επειδή το ανοσοποιητικό του σύστημα δεν μπορούσε να τους καταπολεμήσει.

Η διαδικασία που ακολουθείται στη γονιδιακή θεραπεία της ADA ήταν η εξής:

- Λεμφοκύτταρα του κοριτσιού παραλαμβάνονται και πολλαπλασιάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες.
- Το φυσιολογικό γονίδιο της απαμινάσης της αδενοσίνης ενσωματώνεται σε ένα φορέα-ιό (ο οποίος έχει καταστεί αβλαβής) με τις τεχνικές του ανασυδυασμένου DNA.
- Ο γενετικά τροποποιημένος ιός εισάγεται στα λεμφοκύτταρα

- Τα γενετικά τροποποιημένα λεμφοκύτταρα εισάγονται με ενδοφλέβια ένεση στο παιδί και παράγουν το ένζυμο ADA.

Βέβαια τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα δε ζουν για πάντα μέσα στον οργανισμό-δηλαδή η θεραπεία δεν είναι μόνιμη-και χρειάζεται συνεχής έγχυση τέτοιων κυττάρων. Όμως, όπως στην περίπτωση των διαβητικών, τα άτομα μπορούν να ζουν φυσιολογικά, κάνοντας σε κανονικά χρονικά διαστήματα αυτή τη θεραπεία.

Ο τύπος αυτός της γονιδιακής θεραπείας ονομάζεται ***ex vivo***, γιατί τα κύτταρα τροποποιούνται έξω από τον οργανισμό και εισάγονται πάλι σ' αυτόν.

Τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος μπορούν να τροποποιούνται γενετικά, να αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργειες και να εισάγονται με ενδοφλέβια ένεση στον οργανισμό. Τι γίνεται όμως αν πρέπει να τροποποιηθούν κύτταρα ενός άλλου οργάνου όπως ο πνεύμονας; OAnderson και οι συνεργάτες του πρότειναν μια άλλη προσέγγιση. Ανέπτυξαν «έξυπνους» φορείς, οι οποίοι προσβάλλουν ειδικά τα κύτταρα του ιστού που πάσχει. Συγκεκριμένα, τα φυσιολογικά γονίδια ενσωματώνονται σε μόρια-φορείς, που εισάγονται κατευθείαν στον οργανισμό. Το είδος αυτό της γονιδιακής θεραπείας ονομάζεται ***in vivo*** και εφαρμόστηκε για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης το 1993..

Η κυστική ίνωση οφείλεται σε μεταλλάξεις ενός γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, που είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων των πνευμόνων. Η ασθένεια παρουσιάζει υπολειπόμενη αυτοσωμική κληρονομικότητα και επηρεάζει πρωτίστως τη λειτουργία των πνευμόνων.

Το φυσιολογικό γονίδιο, ενσωματώθηκε αρχικά σε έναν αδενοϊό. Ο ανασυνδυασμένος ιός εισήλθε στον οργανισμό με ψεκασμό με τη βοήθεια βρογχοσκοπίου και μόλυνε τα κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος. Μετά την εισαγωγή του στα κύτταρα το φυσιολογικό γονίδιο ενσωματώθηκε στο γονιδίωμά τους και παρήγαγε το φυσιολογικό προϊόν.

Έως πρόσφατα η πιθανότητα επιτυχούς γονιδιακής θεραπείας ανήκε στη σφαίρα της επιστημονικής φαντασίας. Με τον προσδιορισμό γονιδίων που είναι υπεύθυνα για γενετικές ασθένειες και την εύρεση της αλληλουχίας τους δημιουργούνται νέες προοπτικές για τη γονιδιακή θεραπεία πολλών ασθενειών. Είναι βασικό να τονιστεί ότι παρόλο που η γονιδιακή θεραπεία παρουσιάζεται ως πανάκεια στην Ιατρική, η εφαρμογή της, τουλάχιστον στο άμεσο μέλλον, θα είναι περιορισμένη επειδή δεν έχουν ακόμη ξεπεραστεί προβλήματα όπως αυτά που αφορούν τη χρήση των φορέων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στις περισσότερες περιπτώσεις ως φορείς χρησιμοποιούνται ιοί οι οποίοι αν και καθίστανται αβλαβείς, έχουν μικρή πιθανότητα να προκαλέσουν παρενέργειες και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνο. Έτσι λοιπόν η ανάπτυξη πιο κατάλληλων φορέων είναι ο επόμενος στόχος για τη βελτίωση των μεθόδων της γονιδιακής θεραπείας.

Με τις μεθόδους της γονιδιακής θεραπείας δε γίνεται αντικατάσταση του μεταλλαγμένου γονιδίου σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού αλλά ενσωμάτωση του φυσιολογικού αντιγράφου του στο γονιδίωμά συγκεκριμένων σωματικών κυττάρων. Συνεπώς δεν μεταβιβάζεται στους απογόνους.

Το πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος

Όπως έχει αναφερθεί, το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από $3x10^9$ ζεύγη βάσεων DNA, το οποίο κατανέμεται σε χρωμοσώματα. Η αποκρυπτογράφηση της αλληλουχίας βάσεων του DNA πιστεύεται ότι θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε πώς έχει «κατασκευαστεί» και λειτουργεί ο ανθρώπινος οργανισμός. Για το σκοπό αυτό το 1986 ξεκίνησε μία διεθνής συνεργασία με σκοπό τη χαρτογράφηση, δηλαδή τον εντοπισμό της θέσης των γονιδίων στα χρωμοσώματα, και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Το πρόγραμμα, που φυσικά απαιτούσε τη συμβολή πολλών ερευνητών και γενναία χρηματοδότηση , ξεκίνησε το 1990 υπό την αιγίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και του Τμήματος Ατομικής Ενέργειας των Η.Π.Α. Αρχικά υπήρχε η εκτίμηση ότι το πρόγραμμα θα ολοκληρωνόταν το 2005, όμως χάρη στην αυτοματοποίηση των εργαστηριακών μεθόδων και την ανάπτυξη της πληροφορικής ολοκληρώθηκε το 2001.

Η ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος θα συμβάλει:

- Στη μελέτη της οργάνωσης και λειτουργίας του ανθρώπινου γονιδιώματος. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος θα προσδιορίσουμε το σύνολο των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών καθώς και τις περιοχές του γονιδιώματος με άγνωστη λειτουργία. Ο αριθμός των γονιδίων είχε αρχικά εκτιμηθεί το 1990 σε 100.000, ενώ σήμερα εκτιμάται ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι λιγότερα από 40.000
- Στην ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη διάγνωση και τη θεραπεία των ασθενειών με τον προσδιορισμό της θέσης και της αλληλουχίας των γονιδίων που έχουν μεταλλαγεί και σχετίζονται με διάφορες ασθένειες.
- Στη μελέτη της εξέλιξης του ανθρώπινου γονιδιώματος.Για το σκοπό αυτό βρίσκονται παράλληλα σε εξέλιξη προγράμματα προσδιορισμού της αλληλουχίας άλλων ειδών, τα οποία θα συμβάλουν στην αποκάλυψη των εξελικτικών σχέσεων που υπάρχουν μεταξύ των ειδών. Έτσι βρίσκονται σε εξέλιξη προγράμματα χαρτογράφησης γονιδιωμάτων οργανισμών όπως είναι το πρόβατο, ο σκύλος, η αγελάδα, διάφορα έντομα, ο γεωσκώληκας καθώς και πολλοί μικροοργανισμοί
- Στην μαζική παραγωγή προϊόντων, με τις μεθόδους που χρησιμοποιεί η Βιοτεχνολογία, μετά την απομόνωση των γονιδίων, τα οποία είναι χρήσιμα στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία, στη γεωργία και την κτηνοτροφία.

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

Φαρμακευτικές πρωτεΐνες: Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα. Αρκετές από αυτές όπως η ινσουλίνη και η αυξητική ορμόνη παράγονται από γενετικά τροποποιημένα βακτήρια.

Ινσουλίνη: Ορμόνη με την οποία ρυθμίζεται ο μεταβολισμός των υδατανθράκων στον άνθρωπο

Διαβήτης: Ασθένεια που χαρακτηρίζει άτομα με μειωμένη παραγωγή ή παντελή έλλειψη ινσουλίνης

Ιντερφερόνες: Μια οικογένεια πολύ συγγενών πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ιών (την αντιγραφή του νουκλεϊκού τους οξέος) στους ανώτερους οργανισμούς. Μερικές ιντερφερόνες θεωρείται ότι έχουν αντικαρκινική δράση.

Αντιγόνο: Οποιαδήποτε ουσία που αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ως ξένη προς αυτόν.

Αντιγονικός καθοριστής: Το τμήμα του αντιγόνου το οποίο αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα.

Μονοκλωνικό αντίσωμα: Αντίσωμα που παράγεται από ένα κλώνο Β-λεμφοκυττάρων γι' αυτό έχει εξειδίκευση για ένα μόνο αντιγονικό καθοριστή.

Υβρίδωμα: Υβριδική κυτταρική σειρά που παράγεται από σύντηξη ενός καρκινικού κυττάρου με ένα λεμφοκύτταρο. Τα κύτταρα της σειρά αυτής είναι αθάνατα (ιδιότητα που την κληρονομούν από τα καρκινικά κύτταρα) και παράγουν μονοκλωνικό αντίσωμα (ιδιότητα που την κληρονομούν από τα λεμφοκύτταρα).

Εμβόλιο: Εξασθενημένες ή νεκρές μορφές ενός παθογόνου μικροοργανισμού που όταν χορηγούν στον οργανισμό προκαλούν ενεργητική ανοσία.

Αντιβιοτικά: Χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και προκαλούν τον θάνατο άλλων μικροοργανισμών ή αναστέλλουν την ανάπτυξη τους.

Streptomyces: Μικροοργανισμός από τον οποίο παράγεται το μεγαλύτερο μέρος των αντιβιοτικών.

Γονιδιακή θεραπεία: Η διαδικασία με την οποία μια ασθένεια μπορεί να θεραπευτεί με γενετική τροποποίηση σωματικών κυττάρων ενός ασθενούς.

Κυστική ίνωση: Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομική ασθένεια των πνευμόνων

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ- ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΜΕ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

1. Ποια συστατικά χρειάζονται για να παραχθεί ανθρώπινη ινσουλίνη από κύτταρα E. coli;

- Απομόνωση του συνολικού mRNA, από κύτταρα του ανθρώπινου παγκρέατος.
- Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (για μα γίνει η αντίστροφη μεταγραφή του ώριμου mRNA που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της ινσουλίνης και να συντεθεί το υβρίδιο μόριο DNA-RNA)
- Θέρμανση ή χημικές ουσίες για την αποδιάταξη των κλώνων των υβριδικών μορίων.
- DNA πολυμεράση και πριμόσωμα για την κατασκευή δίκλωνων μορίων DNA.
- Μόρια ανιχνευτές για τον εντοπισμού του δίκλωνου DNA που έχει τις πληροφορίες για την προϊνσουλίνη.
- Εφαρμογή της PCR για την παραγωγή αντιγράφων του DNA
- Φορέας κλωνοποίησης (πλασμίδιο) για την ενσωμάτωση του DNA.
- Περιοριστική ενδονουκλεάση – DNA δεσμάση
- Μετασχηματισμός βακτηρίων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και πολλαπλασιασμός τους σε υγρό θρεπτικό υλικό.
- Επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί το πρόδρομο μόριο της ινσουλίνης.(με αντιβιοτικό)
- Ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών σε βιοαντιδραστήρα (θρεπτικά υλικά και κατάλληλες συνθήκες) για παραγωγή του πρόδρομου μορίου της ινσουλίνης.
- Η προϊνσουλίνη συλλέγεται και με κατάλληλο ένζυμο, αφαιρείται το ενδιάμεσο πεπτίδιο και μετατρέπεται σε ινσουλίνη

2. Σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο παράγεται ινσουλίνη
α. Σε ποια θέση στο κύτταρο γίνονται : η μεταγραφή και η μετάφραση;
β. Στη Γενετική Μηχανική η ινσουλίνη παράγεται από mRNA και όχι από DNA. Γιατί;

α. Η μεταγραφή στον πυρήνα και η μετάφραση στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος
β. Τα βακτήρια δεν διαθέτουν μηχανισμούς απομάκρυνσης των εσωνίων, οπότε αν είχε κλωνοποιηθεί το γονίδιο (DNA) θα μεταφράζονταν και τα εσώνια οπότε δεν θα είχαμε την σωστή πρωτεΐνη. Για το λόγο αυτό το γονίδιο της ινσουλίνης απομονώνεται από cDNA βιβλιοθήκες που περιέχουν το ολικό mRNA και όχι από γονιδιωματικές.

3. Παρότι ο ποντικός και ο αρουραίος δεν είναι κτηνοτροφικής σημασίας ζώα, καταναλώνονται υπέρογκα ποσά για τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος τους. Γιατί πιστεύετε ότι συμβαίνει κάτι τέτοιο;

Επειδή είναι κλασσικά πειραματόζωα της βιολογίας και της Ιατρικής, που εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες με τον άνθρωπό και πολλαπλασιάζονται εύκολα σε εργαστηριακές συνθήκες. Οι γνώσεις που αποκτώνται με την χαρτογράφηση του γονιδιώματος τους είναι ωφέλιμες για τον άνθρωπο και εξασφαλίζουν αρτιότερη κατανόηση της λειτουργίας τους και συμβάλλουν στην αποκάλυψη των σχέσεων που υπάρχουν μεταξύ των ειδών.

4. Αναφέρατε τα πλεονεκτήματα παραγωγής ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης με μεθόδους Γενετικής Μηχανικής σε σχέση με την εξαγωγή της από πτώματα

Η αυξητική ορμόνη παράγεται στην υπόφυση του ανθρώπου και παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη του. Η απουσία της ορμόνης αυτής οδηγεί σε νανισμό. Επειδή η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη είναι πολύ ειδική και δεν μπορεί να αντικατασταθεί από την αντίστοιχη ορμόνη άλλων οργανισμών, απομονωνόταν από εγκεφάλους νεκρών ανθρώπων. Η διαδικασία αυτή είναι επίπονη, χρονοβόρα, με υψηλό κόστος, έδινε ανεπαρκείς ποσότητες και εγκυμονούσε κινδύνους μετάδοσης ασθενειών. Μετά το 1985 η αυξητική ορμόνη παράγεται με τις τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA. Πιστεύεται ότι η αυξητική ορμόνη θα έχει ευρεία εφαρμογή για τη θεραπεία τραυμάτων, σπασμένων οστών, καμένων ιστών και επίσης για την καθυστέρηση της απώλειας της μυϊκής μάζας, που συμβαίνει προοδευτικά κατά τη γήρανση του οργανισμού.

5. Η ινσουλίνη ήταν η πρώτη πρωτεΐνη που παρήχθη με μεθόδους Γενετικής Μηχανικής. Για ποιο λόγο νομίζετε ότι παρήχθη η ορμόνη αυτή;

Ο διαβήτης είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από έλλειψη ή μείωση ινσουλίνης και υπολογίζεται ότι πάνω από 60.000.000 άτομα στον κόσμο πάσχουν από διαβήτη. Η ινσουλίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των διαβητικών ατόμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9ο:Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στη γεωργία και την κτηνοτροφία.

Εκπαιδευτικοί στόχοι:

Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης αυτού του κεφαλαίου ο μαθητής θα πρέπει να μπορεί:

- Να περιγράφει τους τρόπους δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών και ζώων
- Να αναφέρει συγκεκριμένα παραδείγματα νέων ιδιοτήτων στα φυτά και στα ζώα με μεθόδους της γενετικής Μηχανικής και να αναλύει τη σημασία τους στην αύξηση της φυτικής και ζωικής παραγωγής.
- Να περιγράφει τον τρόπο παραγωγής φαρμακευτικών πρωτεϊνών στο γάλα διαγονιδιακών ζώων

Βιβλίο καθηγητή

Τι πρέπει να γνωρίζω προτού ξεκινήσω την μελέτη του κεφαλαίου

1. Την διαδικασία δημιουργίας ανασυνδυασμένου πλασμιδίου πολύ καλά.
2. Το γεγονός ότι από τη στιγμή που δεν έχουμε τη δυνατότητα να καλλιεργήσουμε περισσότερες εκτάσεις και να εκθρέψουμε περισσότερα ζώα, η δημιουργία περισσότερης τροφής μπορεί να γίνει αποκλειστικά και μόνο με την αύξηση της παραγωγής ανά άτομο ή ανά μονάδα επιφάνειας.
3. Το τεράστιο πρόβλημα που δημιουργεί στον άνθρωπο και στο περιβάλλον η υπερβολική χρήση των εντομοκτόνων.
4. Τι είναι φαρμακευτικές πρωτεΐνες και ποια μειονεκτήματα έχει η παραγωγή τους από τα βακτήρια.
5. Τι είναι κλώνος.
6. Ότι γονιμοποιημένο ωάριο και ζυγωτό είναι το ίδιο πράγμα.
7. Ότι τα ζυγωτά περιέχουν μιτοχόνδρια μητρικής προέλευσης μόνο.

Οι ελεγχόμενες διασταυρώσεις οδηγούν στην τροποποίηση της γενετικής σύστασης των οργανισμών

Ο πληθυσμός του πλανήτη μας αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς. Σήμερα ο πληθυσμός είναι περίπου 6 δισεκατομμύρια, και υπολογίζεται ότι το 2050 θα ανέρχεται σε 8.5 δισεκατομμύρια. Για να καλυφθούν επαρκώς οι αυξημένες ανάγκες σε τροφή, είναι απαραίτητη η αύξηση της φυτικής και της ζωικής παραγωγής.

Ένας τρόπος βελτίωσης της φυτικής και ζωικής παραγωγής είναι οι ελεγχόμενες από τον άνθρωπο διασταυρώσεις φυτών και ζώων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται **επιλογή** φυτών και ζώων που έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως φυτά με μεγάλο μέγεθος καρπών, με ανθεκτικότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες ή ζώα που παράγουν μεγάλη ποσότητα κρέατος. Οι οργανισμοί αυτοί **διασταυρώνονται** με σκοπό τη δημιουργία απογόνων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Αυτός ο τρόπος βελτίωσης της παραγωγής είναι χρονοβόρος και επίπονος, επειδή απαιτούνται συνεχείς διασταυρώσεις. Επιπλέον οι απόγονοι που προκύπτουν φέρουν συνήθως ορισμένους μόνο από τους επιθυμητούς χαρακτήρες μαζί με άλλες μη επιθυμητές ιδιότητες.

Η δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών ανοίγει νέους δρόμους στην αύξηση της φυτικής και ζωικής παραγωγής

Η Γενετική Μηχανική δίνει τη δυνατότητα προσθήκης νέων γονιδίων απευθείας στον οργανισμό. Καθιστά συνεπώς δυνατή σε σύντομο χρονικό διάστημα τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών και ζώων, που έχουν τους επιθυμητούς χαρακτήρες όπως, για παράδειγμα, ανθεκτικότητα σε ασθένειες. Τα φυτά και τα ζώα που έχουν υποστεί γενετική αλλαγή με τη χρήση των τεχνικών Γενετικής Μηχανικής ονομάζονται **διαγονιδιακά η γενετικά τροποποιημένα** Όπως ήταν αναμενόμενο, η παραγωγή και χρήση τους δημιουργεί διάφορους προβληματισμούς, που αφορούν τις επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου, καθώς και στο περιβάλλον.

Το Agrobacterium μπορεί να μεταφέρει γονίδια στα φυτά

Το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο ζει στο έδαφος, διαθέτει τη φυσική ικανότητα να μολύνει φυτικά κύτταρα μεταφέροντας σ' αυτά ένα πλασμίδιο που ονομάζεται Ti (Ti = tumor inducing factor). Το **πλασμίδιο Ti** ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό των φυτικών κυττάρων, και δημιουργεί εξογκώματα (όγκους) στο σώμα των φυτών. Οι ερευνητές, αφού απομόνωσαν το πλασμίδιο από το βακτήριο κατόρθωσαν να απενεργοποιήσουν τα γονίδια που δημιουργούν τους όγκους τοποθετώντας στο πλασμίδιο το γονίδιο που θα προσδώσει στο φυτό μία επιθυμητή ιδιότητα. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται σε φυτικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε ειδικές καλλιέργειες στο εργαστήριο. Τα τροποποιημένα αυτά φυτικά κύτταρα τελικά δίνουν ένα νέο φυτικό οργανισμό, που περιέχει και εκφράζει το ξένο γονίδιο. Τα **διαγονιδιακά φυτά** που δημιουργούνται έχουν την ικανότητα να μεταβιβάζουν τις νέες ιδιότητες στους απογόνους τους.

Η Βιοτεχνολογία βοηθάει στον τομέα της καταπολέμησης παρασίτων και εντόμων

Οι προσπάθειες των ερευνητών επικεντρώνονται στη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών τα οποία δίνουν τη δυνατότητα στους αγρότες:

- Να προφυλάσσουν αποτελεσματικά τις καλλιέργειες από έντομα και ζιζάνια
- Να παράγουν προϊόντα τα οποία έχουν μεγαλύτερη «διάρκεια ζωής» από το χωράφι έως τον καταναλωτή.

Τα κυριότερα φυτά τα οποία έχουν τροποποιηθεί για τις παραπάνω ιδιότητες είναι η σόγια, το καλαμπόκι (για τροφή ζώων), το βαμβάκι, ο καπνός και η ελαιοκράμβη.

Τα έντομα μπορεί να δημιουργήσουν μεγάλα προβλήματα στη γεωργία και να οδηγήσουν σε σημαντική μείωση της παραγωγής. Μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο χρησιμοποιήθηκαν πολλά εντομοκτόνα. Με την πάροδο των χρόνων όμως έγινε κατανοητό ότι ήταν επικίνδυνα για τη υγεία του ανθρώπου και προκαλούσαν μεγάλη οικολογική καταστροφή. Ήταν λοιπόν αναγκαίο να βρεθούν εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος.

Το βακτήριο *Bacillus thuringiensis,* που ζει στο έδαφος, παράγει μια ισχυρή **τοξίνη**, η οποία μπορεί να καταστρέψει πολλά είδη εντόμων και σκωλήκων και είναι 80.000 φορές πιο ισχυρή από πολλά εντομοκτόνα. Τα βακτήρια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση των εντόμων. Αρχικά πολλαπλασιάζονται στο εργαστήριο και στη συνέχεια ψεκάζονται στον αγρό. Όμως η τεχνική αυτή είναι αρκετά δαπανηρή, επειδή τα βακτήρια δεν επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και κατά συνέπεια χρειάζονται συνεχείς ψεκασμοί. Για το λόγο αυτό έγιναν προσπάθειες απομόνωσης του γονιδίου του βακτηρίου που παράγει την τοξίνη, και μεταφοράς του στα φυτά. Η μεταφορά στα φυτά έγινε με τη βοήθεια του πλασμιδίου Ti του *Agrobacterium tumefaciens.* Τα τροποποιημένα γενετικά φυτά θα είναι έτσι ανθεκτικά στα διάφορα έντομα Το πρώτο φυτό στο οποίο ενσωματώθηκε το γονίδιο της ανθεκτικότητας στα έντομα του *Bacillus thuringiensis* ήταν το καλαμπόκι. (Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά αυτού του τύπου αποτελούν τις ποικιλίες Bt).

Η τροποποίηση του γενετικού υλικού των ζώων είναι δυνατή με διάφορες τεχνικές

Διαγονιδιακά ονομάζονται τα ζώα εκείνα στα οποία έχει τροποποιηθεί το γενετικό υλικό τους με την προσθήκη γονιδίων, συνήθως από κάποιο άλλο είδος. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την είσοδο του «ξένου» DNA στα κύτταρα ενός ζώου. Η σημαντικότερη από αυτές είναι η **μικροέγχυση.** Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται ωάρια του ζώου που έχουν γονιμοποιηθεί στο εργαστήριο. 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. Η μικροέγχυση αποτελεί τη μοναδική μέθοδο δημιουργίας διαγονιδιακών αγελάδων, προβάτων, χοίρων και αιγών.

Στο γάλα των διαγονιδιακών ζώων μπορούν να εκκρίνονται φαρμακευτικές πρωτεΐνες

Τα **διαγονιδιακά** ζώα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χρήσιμων πρωτεϊνών σε μεγάλη ποσότητα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί 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 δε διαθέτουν τους μηχανισμούς τροποποίησης των πρωτεϊνών που διαθέτουν οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. 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 θα είναι δυνατή η συλλογή της πρωτεΐνης από το γάλα των ζώων. Αυτός ο τρόπος παραγωγής ονομάζεται **παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών από διαγονιδιακά ζώα** (gene pharming).

Η πιο επιτυχημένη εφαρμογή αφορά την παραγωγή της ανθρώπινης α_1-αντιθρυψίνης (ATT=alpha anti-trypsin) από πρόβατα. Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται στο ήπαρ του ανθρώπου και η απουσία της, που είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης του γονιδίου, έχει ως αποτέλεσμα γενετική ασθένεια, που οδηγεί στο εμφύσημα. Για την παραγωγή της πρωτεΐνης αυτής από τα πρόβατα απομονώθηκε το φυσιολογικό γονίδιο της ΑΤΤ του ανθρώπου και στη συνέχεια με μικροέγχυση τοποθετήθηκε σε γονιμοποιημένο ωάριο προβάτου. Το πρόβατο που γεννήθηκε από το γονιμοποιημένο αυτό ωάριο ήταν η Tracy, της οποίας οι απόγονοι συνεχίζουν να έχουν το ξένο γονίδιο και να παράγουν την ΑΤΤ. Οι δυνατότητες παραγωγής τέτοιων ουσιών από διαγονιδιακά ζώα είναι πολύ μεγάλες.

Εκτός από την ΑΤΤ άλλες χρήσιμες πρωτεΐνες που παράγονται με αυτό τον τρόπο είναι ο παράγοντας IX, μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στο μηχανισμό πήξης του αίματος και χορηγείται σε άτομα που πάσχουν από αιμορροφιλία Β.

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι τα βήματα που απαιτούνται για την παραγωγή μιας φαρμακευτικής πρωτεΐνης ανθρώπινης προέλευσης από ένα διαγονιδιακό ζώο είναι τα παρακάτω:

- Απομόνωση του ανθρώπινου γονιδίου που κωδικοποιεί την φαρμακευτική πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.
- Μικροέγχυση του γονιδίου στον πυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου του ζώου.
- Τοποθέτηση του γενετικά τροποποιημένου ωαρίου στη μήτρα ενήλικου ζώου για κυοφορία.
- Γέννηση του διαγονιδιακού ζώου.
- Διασταυρώσεις με σκοπό να περάσει η τροποποιημένη γενετική πληροφορία στους απογόνους.
- Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός της φαρμακευτικής πρωτεΐνης.

Είναι φανερό ότι η χρησιμοποίηση διαγονιδιακών φυτών και ζώων για την αύξηση της φυτικής και ζωικής παραγωγής παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της κλασικής μεθόδου των διασταυρώσεων. Αυτά επιγραμματικά είναι τα παρακάτω:

- Επιλογή και προσθήκη μόνο επιθυμητών ιδιοτήτων με ταυτόχρονη διατήρηση των παλαιών επιθυμητών χαρακτηριστικών.
- Ταχύτατη παραγωγή βελτιωμένων φυτών και ζώων σε σχέση με παραδοσιακές τεχνικές.

Και ξαφνικά όλοι μιλάνε για κλωνοποίηση

Το 1997, όταν οι ερευνητές του Ινστιτούτου Roselin της Σκωτίας ανακοίνωσαν ότι κλωνοποίησαν ένα πρόβατο, το νέο έκανε αμέσως το γύρο του κόσμου με πηχυαίους τίτλους. Το πρόβατο Dolly δημιουργήθηκε, όταν ο πυρήνας ενός κυττάρου του μαστικού αδένα ενός εξάχρονου πρόβατου τοποθετήθηκε στο ωάριο ενός άλλου πρόβατου. Από το ωάριο είχε προηγουμένως αφαιρεθεί ο πυρήνας. Το έμβρυο το οποίο δημιουργήθηκε ύστερα από 3-4 διαιρέσεις εμφυτεύτηκε στη μήτρα θετής μητέρας-προβατίνας, η οποία γέννησε τη Dolly.

Η δημιουργία της Dolly δεν προξένησε έκπληξη στους βιολόγους όσο στον υπόλοιπο κόσμο, επειδή είχε προηγηθεί κλωνοποίηση αμφιβίων από την αρχή της δεκαετίας του 1960. Παρόμοια τεχνική ή χρησιμοποιήθηκε και για την κλωνοποίηση θηλαστικών.

Η κλωνοποίηση όμως είναι πολύ χρήσιμη στον πολλαπλασιασμό διαγονιδιακών ζώων. Η δημιουργία ενός διαγονιδιακού ζώου που παράγει τον ανθρώπινο παράγοντα πήξης του αίματος, για παράδειγμα, κοστίζει 1-200 εκατομμύρια ευρώ. Με κλωνοποίηση μπορούν εύκολα να παραχθούν πολλά πανομοιότυπα ζώα και έτσι ακόμη μεγαλύτερες ποσότητες του φαρμάκου.

Η κλωνοποίηση μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην προστασία από την εξαφάνιση διάφορων ζώων του πλανήτη μας. Στις καταψύξεις πολλών ζωολογικών κήπων υπάρχουν κατεψυγμένα ωάρια και σπερματοζωάρια ή έμβρυα ζώων που κινδυνεύουν να εξαφανιστούν. Πυρήνες από αυτά τα κύτταρα μπορούν να μεταφερθούν σε απύρηνα ωοκύτταρα του είδους που μας ενδιαφέρει και στη συνέχεια να κυοφορηθούν στο ίδιο ή σε συγγενικό είδος ζώου.

Επεξήγηση εννοιών και όρων:

Διαγονιδιακοί οργανισμοί: είναι οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί που έχουν δημιουργηθεί με τεχνικές Γενετικής Μηχανικής και περιέχουν γονίδια από άλλο οργανισμό, συνήθως διαφορετικού είδους.

Agrobacterium tumefasiens: Βακτήριο που προκαλεί όγκους στα φυτά με τα τη διοχέτευση στα κύτταρά τους πλασμιδίου, με σημαντικές εφαρμογές στην δημιουργία διαγονιδιακών φυτών.

Bacillus thuringiensis: Βακτήριο του χώματος, το οποίο παράγοντας ισχυρή τοξίνη, καταστρέφει πολλά είδη εντόμων και σκουληκιών

Μικροέγχυση: Μέθοδος μεταφοράς DNA με τη βοήθεια μικροβελόνας στον πυρήνα ενός ζωικού ή φυτικού κυττάρου.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ- ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΜΕ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

1. Αναφέρατε από μία μέθοδο μεταφοράς γονιδίων σε φυτά και ζώα

ΦΥΤΑ:Το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens,* το οποίο ζει στο έδαφος, διαθέτει τη φυσική ικανότητα να μολύνει φυτικά κύτταρα μεταφέροντας σ' αυτά ένα πλασμίδιο που ονομάζεται Ti (Ti = tumor inducing factor). Το **πλασμίδιο Ti** ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό των φυτικών κυττάρων, και δημιουργεί εξογκώματα (όγκους) στο σώμα των φυτών. Οι ερευνητές, αφού απομόνωσαν το πλασμίδιο από το βακτήριο κατόρθωσαν να απενεργοποιήσουν τα γονίδια που δημιουργούν τους όγκους τοποθετώντας στο πλασμίδιο το γονίδιο που θα προσδώσει στο φυτό μία επιθυμητή ι-διότητα. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται σε φυτικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε ειδικές καλλιέργειες στο εργαστήριο. Τα τροποποιημένα αυτά φυτικά κύτταρα τελικά δίνουν ένα νέο φυτικό οργανισμό, που περιέχει και εκφράζει το ξένο γονίδιο. Τα **διαγονιδιακά φυτά** που δημιουργούνται έχουν την ικανότητα να μεταβιβάζουν τις νέες ιδιότητες στους απογόνους τους.
ΖΩΑ: Η σημαντικότερη μέθοδος είναι η **μικροέγχυση**. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται ωάρια του ζώου που έχουν γονιμοποιηθεί στο εργαστήριο. 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. Η μικροέγχυση αποτελεί τη μοναδική μέθοδο δημιουργίας διαγονιδιακών αγελάδων, προβάτων, χοίρων και αιγών.

2. Αναφέρατε τις εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στη φυτική παραγωγή.

Φυτά με μεγάλο μέγεθος καρπών, με ανθεκτικότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αποτελεσματική προστασία στις καλλιέργειες από έντομα και ζιζάνια. Παραγωγή προϊόντων, τα οποία έχουν μεγαλύτερη «διάρκεια ζωής» από το χωράφι έως τον καταναλωτή.

3. Περιγράψτε τη μέθοδο με την οποία χρησιμοποιούνται βακτήρια με στόχο την εξολόθρευση βλαβερών για τις αγροτικές καλλιέργειες εντόμων.

Το βακτήριο *Bacillus thuringiensis,* που ζει στο έδαφος, παράγει μια ισχυρή **τοξίνη**, η οποία μπορεί να καταστρέψει πολλά είδη εντόμων και σκωλήκων και είναι 80.000 φορές πιο ισχυρή από πολλά εντομοκτόνα. Τα βακτήρια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση των εντόμων. Αρχικά πολλαπλασιάζονται στο εργαστήριο και στη συνέχεια ψεκάζονται στον αγρό. Όμως η τεχνική αυτή είναι αρκετά δαπανηρή, επειδή τα βακτήρια δεν επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και κατά συνέπεια χρειάζονται συνεχείς ψεκασμοί. Για το λόγο αυτό έγιναν προσπάθειες απομόνωσης του γονιδίου του βακτηρίου που παράγει την τοξίνη, και μεταφοράς του στα φυτά. Η μεταφορά στα φυτά έγινε με τη βοήθεια του πλασμιδίου Ti του *Agrobacterium tumefaciens.* Τα τροποποιημένα γενετικά φυτά θα είναι έτσι ανθεκτικά στα διάφορα έντομα

4. Με ποιο από τους παρακάτω τρόπους θα μπορούσε να προκύψει ένα μηρυκαστικό το οποίο να παράγει τον αντιπηκτικό παράγοντα ΙΧ στο γάλα του:
α. Με τη μέθοδο της επιλογής και των διασταυρώσεων.
β. Με μεθόδους Γενετικής Μηχανικής.
Αιτιολογήστε την απάντησή σας

α. Η σύνθεση του παράγοντα ΙΧ ελέγχεται από ένα ανθρώπινο γονίδιο, το οποίο δεν υπάρχει στα μηρυκαστικά άρα είναι αδύνατη η παραγωγή με τη μέθοδο της επιλογής και των διασταυρώσεων.
β. Απομόνωση του ανθρώπινου γονιδίου που κωδικοποιεί την φαρμακευτική πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Μικροέγχυση του γονιδίου στον πυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου του ζώου. Τοποθέτηση του γενετικά τροποποιημένου ωαρίου στη μήτρα ενήλικου ζώου για κυοφορία. Γέννηση του διαγονιδιακού ζώου. Διασταυρώσεις με σκοπό να περάσει η τροποποιημένη γενετική πληροφορία στους απογόνους. Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός της φαρμακευτικής πρωτεΐνης.

5. Για ποιο λόγο χρησιμοποιείται η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA σε οικόσιτα ζώα;

Παράγουν περισσότερο γάλα, είναι ανθεκτικά σε ασθένειες, παράγουν φαρμακευτικές πρωτεΐνες, έχουν ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης και αυξημένη σωματική ανάπτυξη.