

ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΣΤΟ 5^ο ΚΡΙΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟΥ Γ ΛΥΚΕΙΟΥ

ΘΕΜΑ Α

A1: γ. A2: α. A3: δ. A4: α. A5: β.

ΘΕΜΑ Β

B1.

Σύνδρομο	Αριθμός αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων	Αριθμός φυλετικός χρωμοσωμάτων	Αριθμός μορίων DNA στον καρυότυπο	Αριθμός μορίων DNA στα φυλετικά χρωμοσώματα στον καρυότυπο
Down	45	2	94	4
Klinefelter	44	3	94	6
Turner	44	1	90	2
Cri-du-Chat	44	2	92	4

B2. Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και θανατώνουν άλλους μικροοργανισμούς ή αναστέλλουν την ανάπτυξή τους. Είναι προϊόντα του μεταβολισμού τους και σήμερα ορισμένα από αυτά παράγονται σε μεγάλες ποσότητες σε βιοαντιδραστήρες. Πολλά αντιβιοτικά μπορούν να συντεθούν και χημικά, αλλά η διαδικασία είναι τόσο ακριβή και επίπονη που δεν μπορεί να συγκριθεί σε κόστος με την παραγωγή από βακτήρια και από μύκητες. Η παγκόσμια χρήση των αντιβιοτικών για την καταπολέμηση των μικροβίων έχει βελτιώσει σημαντικά την υγεία των ανθρώπων και αναμφίβολα έχει σώσει εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές.

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA άρχισε πρόσφατα να εφαρμόζεται με στόχο:

- Την κλωνοποίηση όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για τη βιοσύνθεση ενός αντιβιοτικού.
- Την ανάπτυξη αντιβιοτικών με ισχυρότερη δράση εναντίον ορισμένων μικροβίων και με λιγότερες παρενέργειες.
- Την κατασκευή γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών με στόχο τη μεγαλύτερη απόδοση στην παραγωγή αντιβιοτικών.

Η στρεπτομυκίνη μπορεί να παρεμποδίσει α) την πρόσδεση του mRNA στη μικρή υπομονάδα β) την προσέγγιση του tRNA στο ριβόσωμα ή στο mRNA γ) στο σχηματισμό λειτουργικού ριβοσώματος δ) σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού ε) παρεμπόδιση λειτουργίας κάποιου ενζύμου που εμπλέκεται στη μετάφραση ζ) την κίνηση ριβοσώματος κατά μήκος του mRNA κ.α.

B3. α) 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 τη φαρμακευτική πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.
- Μικροέγχυση του γονιδίου στον πυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου του ζώου.
- Τοποθέτηση του γενετικά τροποποιημένου ζυγωτού 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.

β) Ο κλώνος του ζώου θα έχει γενετικό υλικό από το είδος του και από το ανθρώπινο είδος, από το οποίο έχει τη γενετική πληροφορία που κωδικοποιεί την σύνθεση της φαρμακευτικής πρωτεΐνης.

ΘΕΜΑ Γ

Γ1.

I) Για το γονίδιο Α στο 2^ο χρωμόσωμα η κωδική αλυσίδα βρίσκεται στον κλώνο (II).

Για το γονίδιο Β στο 9^ο χρωμόσωμα η κωδική αλυσίδα βρίσκεται στον κλώνο (I).

Για το γονίδιο Γ στο 14^ο χρωμόσωμα η κωδική αλυσίδα βρίσκεται στον κλώνο (I).

II) Τα γονίδια των αντισωμάτων εκφράζονται στα Β-λεμφοκυττάρων. Ο μηχανισμός που καθορίζει ποια γονίδια μεταγράφονται σε κάθε κυτταρικό τύπο είναι ο μηχανισμός ρύθμισης στο επίπεδο της μεταγραφής. Έτσι στα Β-λεμφοκύτταρα υπάρχει ο κατάλληλος συνδυασμός των μεταγραφικών παραγόντων που είναι υπεύθυνος για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή του γονιδίου των αντισωμάτων Υ(Α).

Στα Β-λεμφοκύτταρα του ατόμου (1) έχει συμβεί μετατόπιση του γονιδίου Β μετά τον Υ(Α) όπως φαίνεται στο σχήμα.

Για το γονίδιο Β όπως αναφέρθηκε παραπάνω η κωδική αλυσίδα βρίσκεται στον κλώνο I, δηλαδή έχει αλληλουχία 5'-CGATA TGGTA-3' ενώ η μη κωδική αλυσίδα έχει αλληλουχία 3'-CCTAT ACCAT-5'. Παρατηρούμε ότι στο Β-λεμφοκύτταρο του ατόμου (1) το γονίδιο Β μετά την μετατόπιση έχει συνδεθεί με το 3' άκρο της μη κωδικής αλυσίδας του προς τον υποκινητή του γονιδίου Α. Η RNA πολυμεράση προσδένεται στον υποκινητή για να ξεκινήσει τη μεταγραφή, η οποία γίνεται με προσανατολισμό 5'→3' και το παραγόμενο mRNA είναι συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο με τη μη κωδική αλυσίδα. Έτσι σε αυτό το Β-λεμφοκύτταρο το γονίδιο Β θα μεταγράφεται συνεχώς και θα

παράγεται ένα μόριο mRNA από τη μετάφραση του οποίου θα παράγεται η πεπτιδική αλυσίδα που αυτό κωδικοποιεί. Συνεπώς το γονίδιο (B) θα υπερλειτουργεί. Επειδή η υπερλειτουργία του γονιδίου αυτού αποτελεί τη γενετική βάση της εμφάνισης του καρκίνου, συμπεραίνουμε ότι το γονίδιο (B) είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο, δηλαδή ο φυσιολογικός ρόλος του γονιδίου αυτού (B) είναι να ενεργοποιεί την κυτταρική διαίρεση όταν είναι απαραίτητο. Όμως λόγω της παραπάνω μετατόπισης το γονίδιο B υπερλειτουργεί ενεργοποιώντας έτσι συνεχώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, δηλαδή έχει μετατραπεί σε ογκογονίδιο. Έτσι το κύτταρο διαιρείται ανεξέλεγκτα και μετατρέπεται σε καρκινικό.

Στο B-λεμφοκύτταρο του ατόμου (2) έχει συμβεί μετατόπιση του γονιδίου Γ μετά τον Υ(A) όπως φαίνεται στο σχήμα.

Για το γονίδιο (Γ) η κωδική αλυσίδα βρίσκεται στον κλώνο (I) δηλαδή έχει αλληλουχία 3'-AATTA CGTAT-5' ενώ η μη κωδική αλυσίδα του έχει αλληλουχία 5'-TTAAT GCATA-3'. Παρατηρούμε ότι στο B-λεμφοκύτταρο του ατόμου (2) το γονίδιο Γ μετά την μετατόπιση έχει συνδεθεί με το 3' άκρο της κωδικής αλυσίδας του προς τον υποκινητή του γονιδίου A. Έτσι ενώ θα γίνεται συνεχώς η μεταγραφή θα παράγεται ένα μη λειτουργικό RNA αφού θα μεταγράφεται η κωδική αλυσίδα του γονιδίου Γ με αποτέλεσμα να μην παράγεται πρωτεΐνη. Έτσι έχει ανασταλεί η δράση του γονιδίου Γ. Επειδή η αναστολή της δράσης του γονιδίου αυτού αποτελεί τη γενετική βάση του καρκίνου συμπεραίνουμε ότι το γονίδιο Γ είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο του οποίου ο φυσιολογικός ρόλος είναι να ελέγχει την κυτταρική διαίρεση αναστέλλοντάς την όποτε είναι απαραίτητο. Έτσι η αναστολή της δράσης του γονιδίου Γ, λόγω της μετατόπισης, αφαιρεί από το κύτταρο τη δυνατότητα ελέγχου του πολλαπλασιασμού του με αποτέλεσμα την καρκινογένεση.

Γ2. i) Έστω A το φυσιολογικό αλληλόμορφο και a το υπολειπόμενο της ομοκυστινουρίας. Η γονότυπος της μητέρας είναι AA εφόσον είναι υγιής και γνωρίζει ότι δεν είναι φορέας και aa ο γονότυπος του πατέρα που νοσεί. Η μητέρα, όσον αφορά την ομάδα αίματος, έχει γονότυπο I^Bi εφόσον το έμβρυο έχει ομάδα αίματος 0 και έχει κληρονομήσει ένα αλληλόμορφο από κάθε γονέα.

Συνεπώς οι γονότυποι των γονέων είναι οι εξής:

Πατέρας: aaⁱⁱ

Μητέρα: AA^{I^Bi}

ii) Το έμβρυο έχει γονότυπο Aaa και αυτό είναι αποτέλεσμα μη διαχωρισμού.

Συγκεκριμένα συνέβη μη διαχωρισμός είτε των ομολόγων χρωμοσωμάτων του 21^{ου} ζεύγους στην 1^η μειωτική διαίρεση είτε των αδελφών χρωματίδων του ενός 21^{ου}

χρωμοσώματος στη 2^η μειωτική διαίρεση κατά την δημιουργία γαμετών στον πατέρα οπότε προέκυψε σπερματοζωάριο με 2 αντίγραφα του 21^{ου} χρωμοσώματος αντί για ένα. Όταν ο γαμέτης αυτός γονιμοποίησε ωάριο με ένα 21^ο χρωμόσωμα στο οποίο εδράζεται το φυσιολογικό αλληλόμορφο A δημιουργήθηκε έμβρυο με τρισωμία 21 το οποίο φέρει 2 υπολειπόμενα αλληλόμορφα για την ομοκυστινουρία που κληρονόμησε από τον πατέρα του και ένα φυσιολογικό από τον μητέρα του. Όσον αφορά την ομάδα αίματος ο γονότυπος του εμβρύου είναι ii και κληρονόμησε ένα αλληλόμορφο από κάθε γονέα.

iii) Αρχικά θα πρέπει να γίνει παραλαβή εμβρυικών κυττάρων είτε με αμνιοπαρακέντηση είτε με λήψη χοριακών λαχνών. Στη συνέχεια προκειμένου να διαπιστωθεί η τρισωμία 21 θα πρέπει τα κύτταρα να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια, να κατασκευαστεί καρυότυπος και να παρατηρηθούν τα χρωμοσώματα στο μικροσκόπιο.

ΘΕΜΑ Δ

Δ1. Η κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση με την οποία θα προετοιμαστεί το cDNA του γονιδίου, προκειμένου να κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο pUC, είναι η E3 γιατί κόβει εκατέρωθεν του γονιδίου (δεξιά και αριστερά). Αντίθετα η περιοριστική ενδονουκλεάση E4 είναι ακατάλληλη γιατί κόβει το γονίδιο σε μια θέση μέσα στην αλληλουχία βάσεων που αντιστοιχεί σε αμινοξέα και δεν θα μπορεί να κλωνοποιηθεί.

Δ2. Η περιοριστική ενδονουκλεάση με την οποία θα επεξεργαστούμε το πλασμίδιο ώστε να ενσωματώσουμε σε αυτό το cDNA του γονιδίου X για να εκφραστεί, είναι η E2. Τα μονόκλωνα άκρα που προκύπτουν από τη δράση της E2 είναι συμπληρωματικά με τα μονόκλωνα άκρα που αφήνει η περιοριστική ενδονουκλεάση E3. Έτσι μετά τη δράση της DNA δεσμάσης το γονίδιο X θα ενσωματωθεί στο πλασμίδιο.

Δ3. Η αλληλουχία των 6 ζευγών βάσεων (δεξιά και αριστερά) του τμήματος του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου που θα προκύψει από τη δράση της DNA δεσμάσης στα σημεία της ένωσης του πλασμιδίου με το cDNA του γονιδίου X είναι:

5'-GAATTG ----- γονίδιο X ----- CAATTC-3'

3'-CTTAAC ----- GTTAAG-5'

Δ4. Μετά την ανάμειξη των ανοιγμένων πλασμιδίων με τα κομμάτια cDNA του γονιδίου X και την προσθήκη της DNA δεσμάσης, μερικά πλασμίδια ενσωμάτωσαν το cDNA του γονιδίου X και ανασυνδυάστηκαν ενώ μερικά άλλα ξαναέγιναν κυκλικά χωρίς να ενσωματώσουν το γονίδιο X. Στη συνέχεια τα βακτήρια E. coli επεξεργάζονται ώστε τα τοιχώματά τους να γίνουν παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια, τα πλασμίδια να εισέλθουν σε αυτά και να μετασχηματιστούν. Έτσι προκύπτουν βακτήρια που δεν προσέλαβαν πλασμίδια, δηλαδή δεν μετασχηματίστηκαν, βακτήρια που

μετασχηματίστηκαν με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Τα βακτήρια που δεν μετασχηματίστηκαν δεν επιβιώνουν παρουσία αντιβιοτικού αφού δεν διαθέτουν πλασμίδια και είναι έτσι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά.

Τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έχουν ανθεκτικότητα μόνο στην αμπικιλίνη αφού το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη έχει κοπεί από την περιοριστική ενδονουκλεάση E2 και έχει ενσωματωθεί σε αυτό το γονίδιο X. Και τέλος τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έχουν ανθεκτικότητα και στα δύο αντιβιοτικά.

Έτσι στο τρυβλίο 1 επιβιώνουν τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με ανασυνδυασμένο και μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, ενώ στο τρυβλίο 2 επιβιώνουν μόνο όσα βακτήρια μετασχηματίστηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Οι δύο επιπλέον αποικίες του τρυβλίου 1 που είναι μαυρισμένες, αφορούν βακτήρια που επιβιώνουν μόνο παρουσία αμπικιλίνης και όχι παρουσία καναμικίνης και κατά συνέπεια έχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Δ5. Η πάνω αλυσίδα του γονιδίου X είναι η κωδική και η κάτω η μη κωδική αλυσίδα συμπίερασμα στο οποίο καταλήγουμε με βάση την κατεύθυνση της μεταγραφής του σχήματος. Η μεταγραφή γίνεται με προσανατολισμό 5'→3' και το mRNA είναι συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο με τη μη κωδική αλυσίδα.

Το γονίδιο X μπορεί να ενσωματωθεί με δύο τρόπους στο πλασμίδιο.

Στον ένα τρόπο το γονίδιο X έχει ενσωματωθεί με το 3' άκρο της μη κωδικής αλυσίδας προς την πλευρά του υποκινητή και έτσι το γονίδιο θα μπορεί να εκφραστεί. Αν λοιπόν το γονίδιο X ενσωματωθεί με αυτόν τον τρόπο τότε με τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης E4 θα προκύψουν 2 τμήματα μήκους 1000 και 4000 ζευγών βάσεων. Μπορεί όμως το γονίδιο X να ενσωματωθεί με τέτοιο τρόπο ώστε το 5' άκρο της μη κωδικής αλυσίδας να βρίσκεται προς τον υποκινητή. Στην περίπτωση αυτή όμως με τη δράση της E4 θα προκύψουν 2 τμήματα μήκους 2000 και 3000 ζευγών βάσεων και το γονίδιο δεν θα μπορεί να εκφραστεί.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα πλασμίδια της αποικίας #2 μπορούν να εκφράσουν το cDNA του γονιδίου X.