

ΚΕΦΑΛΑΙΟ: 9

Τροποποίηση γενετικής σύστασης οργανισμών



Ελεγχόμενες
Διασταυρώσεις



Μέθοδοι Γενετικής Μηχανικής

Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών / ζώων

Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στη Γεωργία και την Κτηνοτροφία

- Η επίλυση του προβλήματος της παγκόσμιας πείνας
- Παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας τροφής
- Όσων αφορά τις καλλιέργειες είναι επιθυμητή η παραγωγή φυτών ανθεκτικών σε ζιζάνια και έντομα
- Μεγαλύτερη ποσότητα τροφής από την παραγωγή στο πιάτο του καταναλωτή. Παραγωγή προϊόντων με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής.
- Τροφή ανθεκτική για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αποθήκες και χώρους διανομής
- Προφύλαξη καλλιεργειών από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες.
- Παραγωγή προϊόντων πιο θελκτικών στην εμφάνιση.
- Ζώα και φυτά που εκφράζουν φαρμακευτικές πρωτεΐνες

Οργανισμοί με επιθυμητές ιδιότητες

Μέθοδος διασταυρώσεων

- Χρονοβόρος διαδικασία
- Επίπονη διαδικασία
- Επιλέγονται και διασταυρώνονται φυτά- ζώα με επιθυμητές ιδιότητες αλλά πάντα υπάρχουν και ανεπιθύμητες ιδιότητες στους προκύπτοντες οργανισμούς.
- Δεν μπορούν να παραχθούν φυτά-ζώα με ιδιότητες που δεν σχετίζονται με το είδος τους.

Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών- ζώων

- Συντομότερη διαδικασία
- Ακριβής διαδικασία – Παράγονται φυτά-ζώα μόνο με επιθυμητές ιδιότητες
- Μπορούν να παραχθούν φυτά-ζώα με ιδιότητες που δεν σχετίζονται με το είδος των οργανισμών. Πχ ζώα που εκφράζουν φαρμακευτικές πρωτεΐνες.
- Προκύπτουν προβληματισμοί για τις επιπτώσεις των διαγονιδιακών οργανισμών στον άνθρωπο και το οικοσύστημα.

Το πλασμίδιο Ti

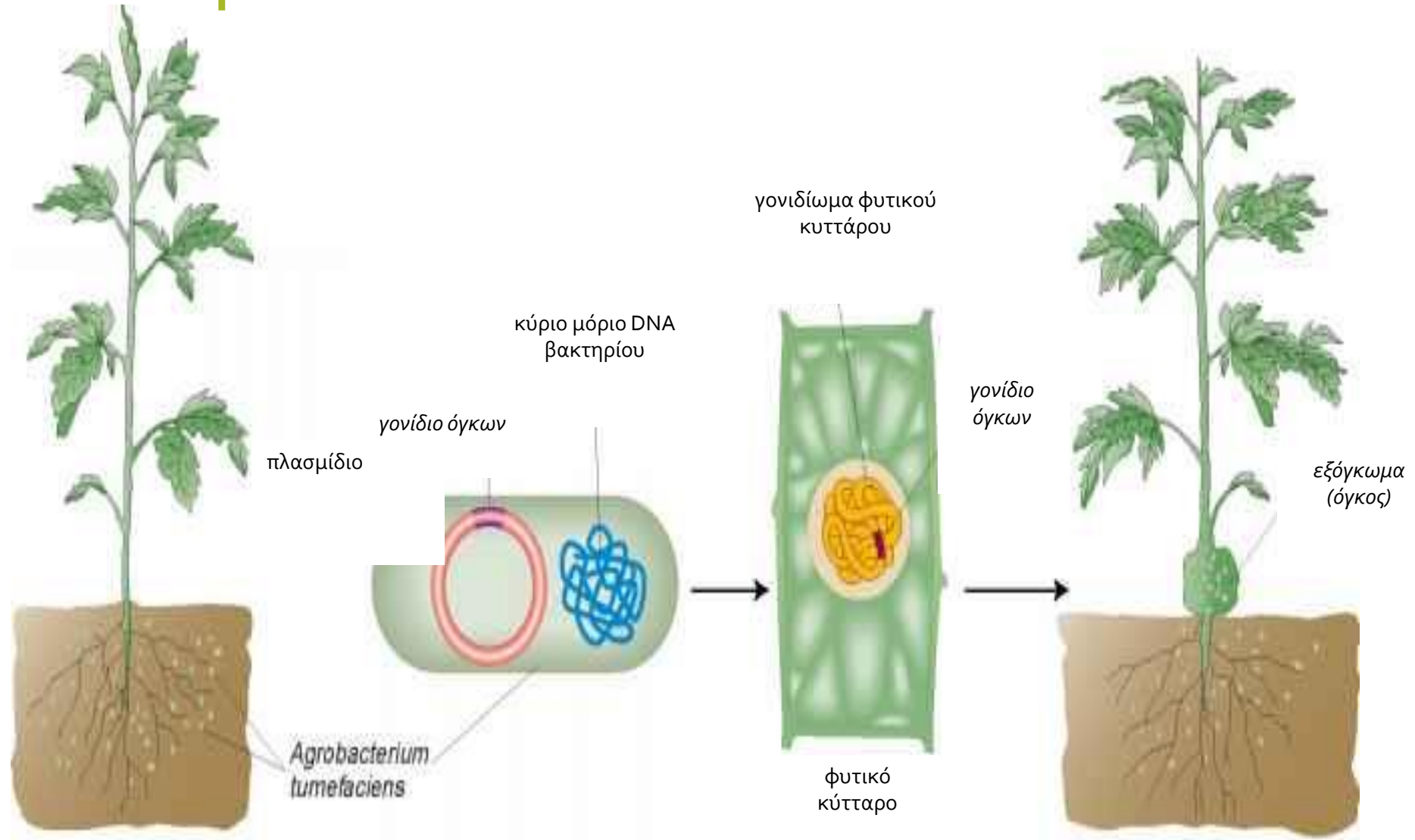
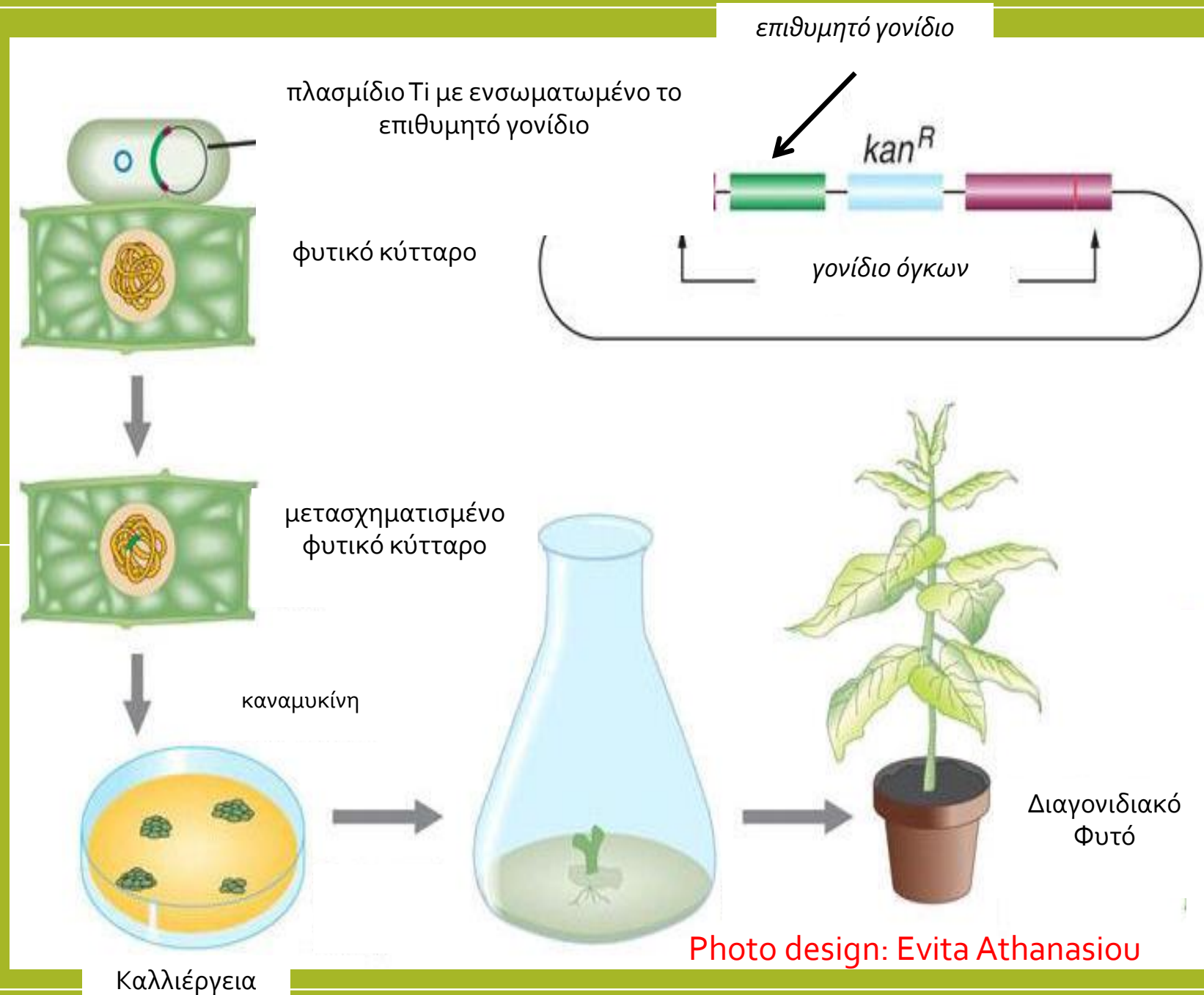


Photo design: Evita Athanasiou

Βήματα Παραγωγής

Διαγονιδιακών φυτών

* Τα διαγονιδιακά
φυτά
κληρονομούν τις
ιδιότητές τους
στους απογόνους
τους !



Πλεονεκτήματα των διαγονιδιακών φυτών

- Ανθεκτικότητα σε παρασιτοκτόνα
- Ανθεκτικότητα σε έντομα
- Βελτιωμένα χαρακτηριστικά

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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Παραγωγής διαγονιδιακών φυτών



Μέθοδος	Σχόλια
Μεταφορά γονιδίου μέσω Ti πλασμιδίου	Πολύ αποδοτική μέθοδος αλλά για λίγα είδη φυτών
Βομβαρδισμός με μικροσφαιρίδια	Εύκολος, φθηνός τρόπος, εφαρμόζεται σε πολλά είδη φυτών
Μεταφορά μέσω ιών	Λίγο αποδοτική μέθοδος
Άμεση μεταφορά γονιδίων σε φυτικούς πρωτοπλάστες	Μόνο σε πρωτοπλάστες φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρη φυτά
Μικροέγχυση DNA	Απαιτεί εμπειρία και ένα κύτταρο ανασυνδυάζεται κάθε φορά
Ηλεκτροπόρωση	Μόνο σε πρωτοπλάστες φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρη φυτά
Διάχυση μέσω λιποσωμάτων	Μόνο σε πρωτοπλάστες φυτών που αναπτύσσονται σε πλήρη φυτά

Τρόποι καταπολέμησης παρασίτων και εντόμων στη Γεωργία

A. Χρήση εντομοκτόνων

- Επικίνδυνα για την υγεία του ανθρώπου
- Προκαλούν μεγάλη οικολογική καταστροφή

B. Ψεκασμός βακτηρίων *Bacillus thuringiensis*

- Βακτήριο που ζει στο έδαφος
- Βακτήριο που παράγει μια ισχυρή τοξίνη
- Δεν επιβιώνει το βακτήριο για μεγάλο χρονικό διάστημα και πρέπει να επαναλαμβάνονται οι ψεκασμοί.

Γ. Χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών

- Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά εκφράζουν την τοξίνη του *Bacillus thuringiensis*
- Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά εκφράζοντας την τοξίνη αποδοτικά σκοτώνουν τα έντομα Και προστατεύονται.
- Δεν είναι γνωστή η εμφάνιση μιας πιθανής τοξικότητας στον άνθρωπο ή το οικοσύστημα

Ποικιλία Bt

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 (Εικόνα 9.4). 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 γενετικά τροποποιημένα φυτά θα είναι έτσι ανθεκτικά στα διάφορα έντομα (Εικόνα 9.5). 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).

Bacillus thuringiensis



το γονίδιο της τοξίνης
ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των
κυττάρων του καλαμποκιού

φυτό που προσβάλλεται από
έντομα

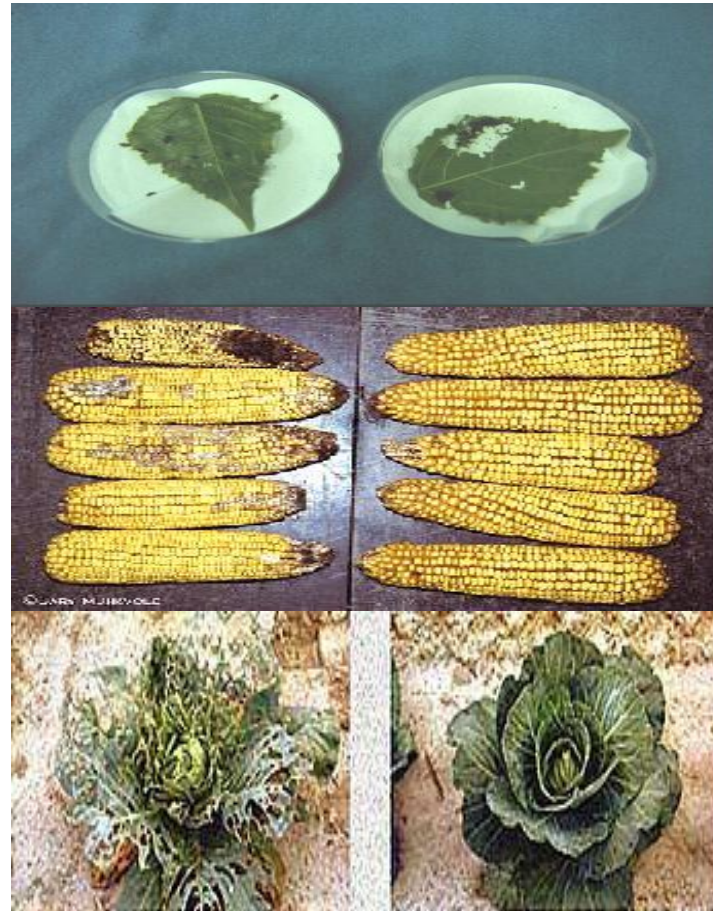
ποικιλία Bt



Ανθεκτικότητα σε έντομα

Χρησιμοποιούνται
γονίδια από το βακτήριο
Bacillus thuringiensis
που παράγουν
δηλητηριώδεις τοξίνες
για έντομα.

(Στις φωτογραφίες τα
άθικτα μέλη περιέχουν
το γονίδιο ενώ τα
προσβεβλημένα όχι)



Η ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών φυτών σε νούμερα

Ποικιλίες τοξίνης και δράση	
Kurstaki	Κάμπιες Προνύμφες
Tenobronis San Diego	Σκαθάρια
Israelensis Morrisoni	Δίπτερα
Thuringienensis	Μύγες και άλλα

% Ποσοστό φυτών που προσβλήθηκαν από έντομα				
Έντομο	Ντομάτες Άγριου τύπου		Διαγονιδιακές ντομάτες	
	Χωρίς εντομοκτόνο	Με εντομοκτόνο	Χωρίς εντομοκτόνο	Με εντομοκτόνο
Manduca	47,5	3,75	1,25	0

Φυτά που έχουν τροποποιηθεί γενετικά

- Καλαμπόκι
- Ντομάτες
- Φασόλια
- Σόγια

Καλαμπόκι

Έχουν αναπτυχθεί ποικιλίες καλαμποκιού γενετικά τροποποιημένες για να είναι ανθεκτικές στο ευρωπαϊκό παράσιτο του μίσχου του καλαμποκιού.

Παραδοσιακά το παράσιτο ελεγχόταν με τη χρήση χημικών ή βιολογικών εντομοκτόνων.

Η Ε.Ε. Έχει εγκρίνει από το 1997 τη χρήση του φυτού.



Ντομάτες

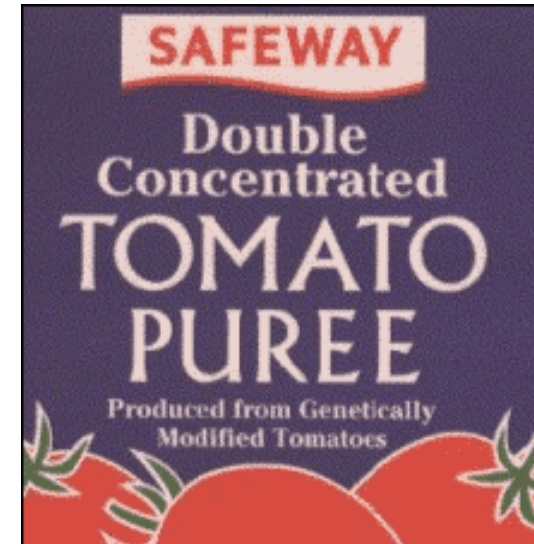
Στην Ευρώπη πωλείται ήδη ένας πουρές από ντομάτα γενετικά τροποποιημένη από την εταιρία Zeneca Plant Sciences των Η.Π.Α.

Η διαγονιδιακή ντομάτα φέρει ένα γονίδιο για την πρωτεΐνη που επιφέρει την καταστροφή της πηκτίνης της ντομάτας.

Ο πουρές αυτός έχει μεγάλα πλεονεκτήματα κατά την παραγωγή του.

Όπως μικρότερες απαιτήσεις σε ενέργεια.

Είναι άρα πιο οικονομικός...



(Φωτογραφία της ετικέτας του πουρέ που ενημερώνει και τον καταναλωτή για την παραγωγή του με την χρήση γενετικά τροποποιημένων ντοματών.)

ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΖΩΑ

Τεχνικές δημιουργίας διαγονιδιακού ζώου

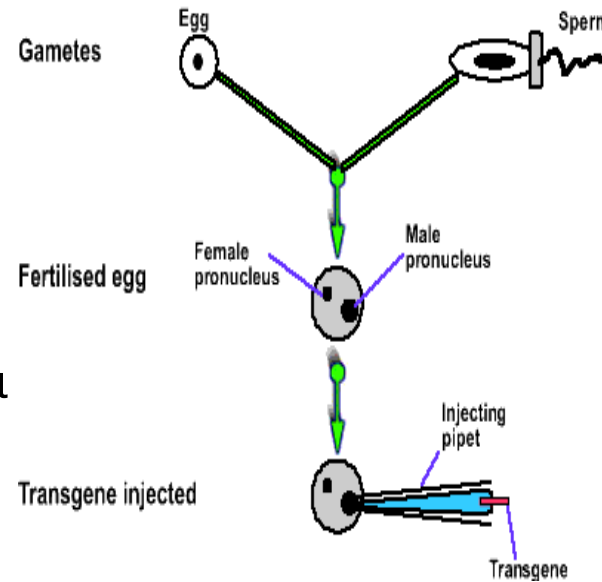
- Μέθοδος μεταφοράς DNA με μικροέγχυση
- Μέθοδος μεταφοράς DNA με ρετροϊούς
- Μέθοδος κλωνοποίησης με μεταφορά πυρήνα

Οφέλη και κίνδυνοι

ΟΦΕΛΗ	ΚΙΝΔΥΝΟΙ
Εξειδίκευση	Η υγεία των ζώων
Ταχύτητα	Μεταφορά Ιών
Ευελιξία	Απελευθέρωση γονιδίων
Οικονομία	

Μέθοδος με μικροέγχυση

- Σε αυτή τη μέθοδο καλλιεργούνται ωάρια από ζώα και γονιμοποιούνται τεχνητά.
- Ένα μικρό ποσό διαλύματος με πολλά αντίγραφα του DNA εισάγεται με ένεση στα ωάρια που κατόπιν γονιμοποιούνται.
- Μόνο ένα μικρό ποσοστό των ζυγωτών και άρα των ζώων που θα παραχθούν θα περιέχει αυτό το DNA.
- Όλα τα κύτταρα του ζώου περιέχουν το DNA που εγχύσαμε.
- Τα γονίδια που εισήχθησαν κληρονομούνται στους απογόνους



(Σχηματικά η διαδικασία με μικροένεση)



(Κύτταρο δέχεται το διάλυμα με μικροένεση)



ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΖΩΩΝ

ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΕΙΔΟΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (g/l)	
Interleukin-2	Goat	0.0005	
Factor VIII	Rabbit	0.003	
Factor IX	Pig	1	
α_1 -Antitrypsin	Sheep	20	
Fibrinogen	Goat	5	
Erythropoietin	Sheep	0.05	
Antithrombin III	Rabbit	14	
Human γ -Lactalbumin	Goat	2.5	
Insulin-like Growth Factor	Cow	1	
Protein C	Rabbit	1	
Growth Hormone	Pig	0.05	

Gene pharming- Το πρόβατο Tracy

Στόχος δημιουργίας της Tracy
Ήταν η παραγωγή της **α1**
αντιθρυψίνης
Και η έκκρισή της στο γάλα του
ζώου.

Πώς το πετύχαμε αυτό;

1. Εισάγαμε το γονίδιο της α1 αντιθρυψίνης
2. Σε φάση με τον κατάλληλο υποκινητή ώστε να εκφράζεται μέσα στο γάλα του ζώου.

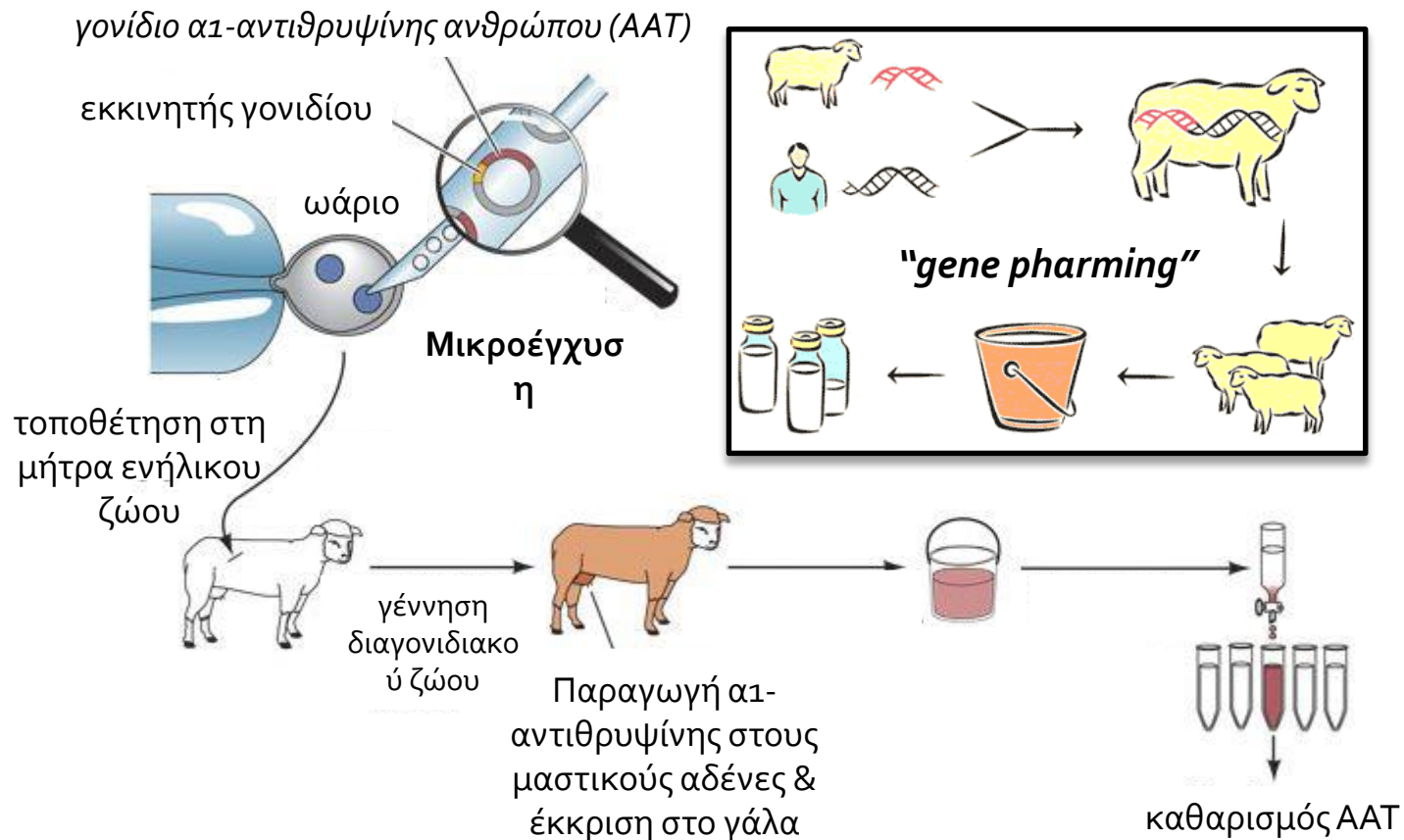


Photo design: Evita Athanasiou

Η Tracy

Η πιο επιτυχημένη εφαρμογή αφορά την παραγωγή της ανθρώπινης α_1 -ανθρυψίνης (AAT = alpha antitrypsin) 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 AAT 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 AAT. Οι δυνατότητες παραγωγής τέτοιων ουσιών από διαγονιδιακά ζώα είναι πολύ μεγάλες (Εικόνα 9.7).

Βήματα παραγωγής και απομόνωσης
Φαρμακευτικής πρωτεΐνης από διαγονιδιακά ζώα

- 
- 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.

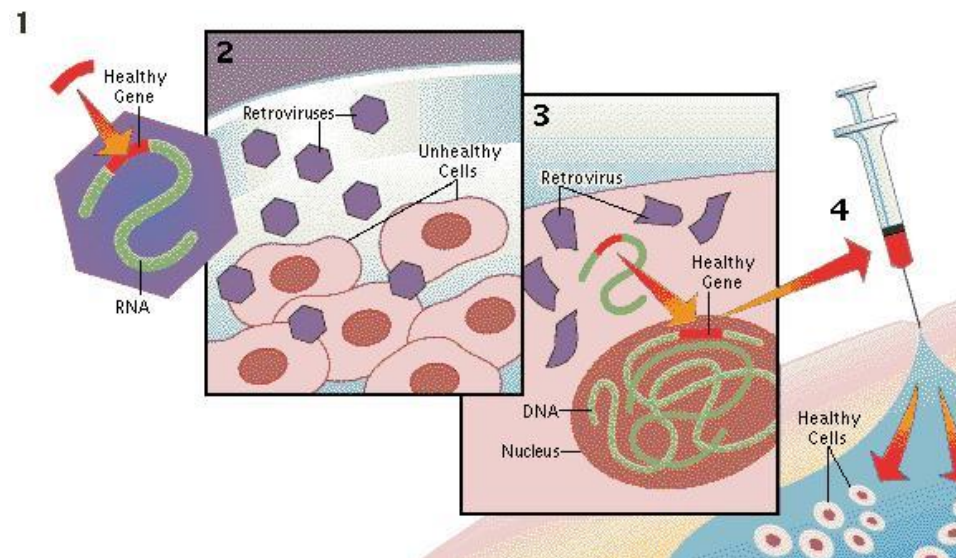
Ποιων οργανισμών το γενετικό υλικό
φέρει η Tracy ?

Μέθοδος με χρήση ρετροϊών

Οι ρετροϊοί χρησιμοποιούνται για να μεταφέρουν την ακολουθία του επιθυμητού γονιδίου και να την εισάγουν στα εμβρυϊκά κύτταρα.

Τα γονίδια εισάγονται τυχαία στο γονιδίωμα.

Άλλα κύτταρα περιέχουν το γονίδιο και άλλα όχι



(Σχηματικά η μέθοδος με τη χρήση ρετροϊών)

Διαγονιδιακά ζώα

- Ποντίκια
- Αγελάδες
- Κοτόπουλα
- Χοίροι
- Ψάρια
- Πρόβατα
- Κατσίκες

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.2: Φαρμακευτικές πρωτεΐνες που παράγονται από διαγονιδιακά ζώα

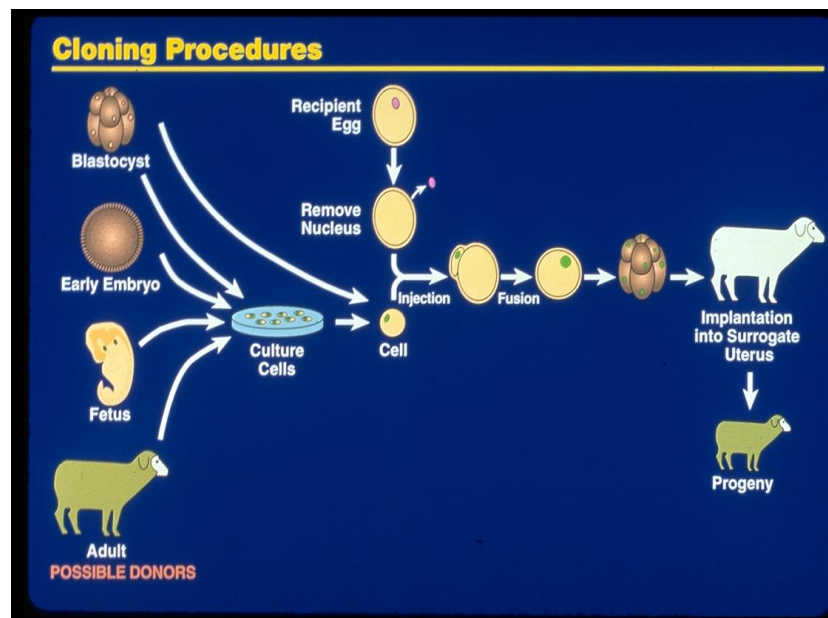
Πρωτεΐνη	Ασθένεια στην οποία χρησιμοποιείται
Ινσουλίνη	Σακχαρώδης διαβήτης
Παράγοντες VIII και IX	Αιμορροφιλία Α και Β
Ενεργοποιητής πλασμινογόνου (tPA)	Θρόμβωση αγγείων, Έμφραγμα
Ιντερφερόνες	Καρκίνος
Διαμεμβρανικός ρυθμιστής	Κυστική ίνωση
α_1 -αντιθρυψίνη (AAT)	Πνευμονικό εμφύσημα
Παράγοντας CD4	AIDS
Αυξητική ορμόνη	Αχονδροπλασία

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Μέθοδος κλωνοποίησης

Με τη μέθοδο αυτή ο πυρήνας ενός μη γονιμοποιημένου ωαρίου μπορεί να αφαιρεθεί και να αντικατασταθεί με τον πυρήνα ενός κυττάρου δότη που περιέχει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

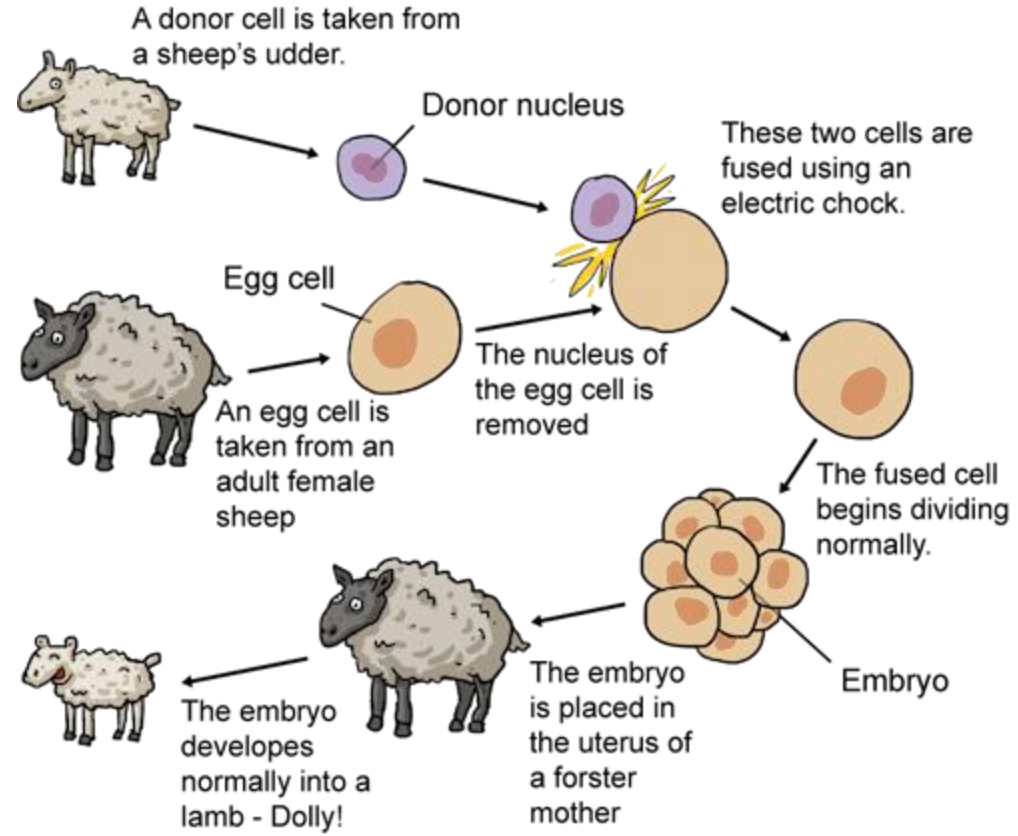
Τα ανακατασκευασμένα ωάρια κυοφορούνται από θηλυκά ζώα.



(Σχηματικά η μέθοδος κλωνοποίησης)



(Η Dolly ο πρώτος κλωνοποιημένος οργανισμός)



Ποιων οργανισμών το γενετικό υλικό
φέρει η Dolly ;

Στόχοι κλωνοποίησης

- Παραγωγή οργανισμών με επιθυμητές ιδιότητες σε μεγάλη ποσότητα
- Προστασία οργανισμών (ζώων- φυτών) από εξαφάνιση
- Διατήρηση της βιοποικιλότητας

ΘΕΜΑΤΑ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

Για να δημιουργήσουμε διαγονιδιακά φυτά χρησιμοποιούμε: (2001)

- α. τη μέθοδο της μικροέγχυσης
- β. τη μέθοδο της διαμόλυνσης
- γ. το πλασμίδιο Ti. Μονάδες 2
- Να αιτιολογήσετε την επιλογή σας.
- Μονάδες 3

Σε άτομα που πάσχουν από αιμορροφιλία Β χορηγείται ...

- α. παράγοντας ΙΧ.
- β. αυξητική ορμόνη.
- γ. ινσουλίνη.
- δ. α1 - αντιθρυψίνη.

- ΘΕΜΑ:1 2004

Το πλασμίδιο Ti απομονώνεται από ...

- α. τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus*.
- β. το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*.
- γ. το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*.
- δ. τα βακτήρια του γένους *Clostridium*.

- Θέμα :1 2004

Η μικροέγχυση είναι μέθοδος

- α. παραγωγής διαγονιδιακών ζώων.
- β. εισαγωγής ξένου DNA σε ιούς.
- γ. παραγωγής διαγονιδιακών φυτών.
- δ. παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων

- ΘΕΜΑ : 1 2006

Τα ζώα, που έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση λέγονται:

- α. πολυγενετικά.
 - β. διαγονιδιακά.
 - γ. πολυπλοειδικά.
 - δ. πολυγονικά.
-
- ΘΕΜΑ: 1 2008

Θέμα 2 2002

- Να περιγράψετε τη διαδικασία για την παραγωγή στελέχους καλαμποκιού, ποικιλίας Bt.
- **Μονάδες 10**

Θέμα : 2 / 2003

- Το 1997 οι ερευνητές του Ινστιτούτου Roslin της Σκωτίας ανακοίνωσαν ότι κλωνοποίησαν ένα πρόβατο (Dolly). Ποια διαδικασία ακολούθησαν;
- **Μονάδες 10**

Θέμα 2/ 2004

- Ποια βήματα απαιτούνται για την παραγωγή μιας
- φαρμακευτικής πρωτεΐνης ανθρώπινης προέλευσης από
- ένα διαγονιδιακό ζώο;
- Ποιος ο ρόλος των μονοκλωνικών αντισωμάτων ως
- ανοσοδιαγνωστικά;

Θέμα: 2 2005

- Ποια είναι τα πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησης διαγονιδιακών ζώων και φυτών για την αύξηση της ζωικής και φυτικής παραγωγής έναντι της κλασικής μεθόδου των διασταυρώσεων;

Θέμα: 2 2005

- Τι δυνατότητες δίνουν στους αγρότες τα γενετικά
- τροποποιημένα φυτά (Μονάδες 4) και ποια είναι τα
- κυριότερα φυτά που έχουν τροποποιηθεί γενετικά
- (Μονάδες 5);

Θέμα:: 3/ 2003

- **1.** Πώς αντιμετωπίζεται η κυστική ίνωση με γονιδιακή θεραπεία;
- **Μονάδες 10**
- **2.** Άνδρας ο οποίος πάσχει από κυστική ίνωση και υποβλήθηκε σε γονιδιακή θεραπεία για τη νόσο αποκτά παιδιά με φυσιολογική γυναίκα. Τι πιθανότητες υπάρχουν να είναι τα παιδιά τους φυσιολογικά; Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.
- **Μονάδες 15**

ΟΛΥΜΠΙΑΔΑ 2018

- 37.** Την πρωτεΐνη α1-αντιθρυψίνη θα την εντοπίσουμε σε βακτηριακό κλώνο cDNA βιβλιοθήκης που έχει κατασκευαστεί από ώριμο mRNA κυττάρων:
- A. ήπατος.
 - B. παγκρέατος.
 - Γ. που έχουν προσβληθεί από ιό.
 - Δ. μυελού των οστών.

67. Δεν είναι φαρμακευτική πρωτεΐνη:

- A. η AAT.
- B. η τυροσίνη.
- Γ. ο παράγοντας VIII.
- Δ. ο παράγοντας IX.

69. Το γενετικά τροποποιημένο πρόβατο Tracy και ένα φυτό καλαμποκιού ποικιλίας Bt περιέχουν γονίδια από:
- A. δύο και δύο διαφορετικά είδη οργανισμών, αντίστοιχα.
 - B. δύο και τρία διαφορετικά είδη οργανισμών, αντίστοιχα.
 - Γ. ένα και δύο διαφορετικά είδη οργανισμών, αντίστοιχα.
 - Δ. τρία και τρία διαφορετικά είδη οργανισμών, αντίστοιχα.

71. Κατά την κλωνοποίηση προβάτου και κατά τη διαδικασία γενετικής τροποποίησης προβάτου χρησιμοποιούνται, αντίστοιχα:
- A. γονιμοποιημένο ωάριο και απύρηνο ωάριο.
 - B. γονιμοποιημένο ωάριο και γονιμοποιημένο ωάριο.
 - Γ. απύρηνο ωάριο και απύρηνο ωάριο.
 - Δ. απύρηνο ωάριο και γονιμοποιημένο ωάριο.
-

- 72.** Κατά την κλωνοποίηση προβάτου και κατά τη διαδικασία γενετικής τροποποίησης προβάτου χρησιμοποιούνται, αντίστοιχα:
- A. ζυγωτό και σωματικό κύτταρο.
 - B. ζυγωτό και ζυγωτό.
 - Γ. σωματικό κύτταρο και ζυγωτό.
 - Δ. σωματικό κύτταρο και σωματικό κύτταρο.

ΚΑΛΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ !!!
