



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΛΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΛΕΙ (ΠΕΓΑ)**

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί

Βασικές τεχνολογικές προσεγγίσεις

Κώστας Ματθιόπουλος

Τα φυτά, τα ζώα ή οι μικροοργανισμοί που έχουν υποστεί αλλαγές μέσω γενετικής μηχανικής ονομάζονται γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί ή ΓΤΟ (GMO: Genetically Modified Organism). Η γενετική μηχανική (genetic engineering), καλούμενη επίσης και γενετική τροποποίηση (genetic modification), είναι ο άμεσος χειρισμός του γονιδιώματος ενός οργανισμού με τη χρήση της βιοτεχνολογίας. Με τον τρόπο αυτό, νέο DNA που έχει πρώτα απομονωθεί και αντιγραφεί με τη χρήση μεθόδων μοριακής κλωνοποίησης, μπορεί να εισαχθεί στο γονιδίωμα ενός ξενιστή. Γονίδια μπορούν επίσης να αφαιρεθούν ή να καταστραφούν με τη χρήση νουκλεάσης. Ακόμη, με τη γονιδιακή στόχευση (gene targeting), μια διαφορετική τεχνική που χρησιμοποιεί ομόλογο ανασυνδυασμό, μπορεί να αλλάχθει ένα ενδογενές γονίδιο, μπορεί να αφαιρεθεί ή να προστεθεί κάποιο εξόνιο ή και ολόκληρο γονίδιο, ή να εισαχθούν στοχευμένα σημειακές μεταλλάξεις.

Οι πρώτοι ΓΤΟ που δημιουργήθηκαν ήταν τα βακτήρια το 1973. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια δημιουργήθηκαν το 1974. Βακτήρια που παράγουν ινσουλίνη κυκλοφόρησαν για πρώτη φορά στο εμπόριο το 1982 και τα γενετικώς τροποποιημένα τρόφιμα έχουν αρχίσει να πωλούνται από το 1994. Το *Glofish*, τα φθορίζοντα ψαράκια που φαίνονται στην Εικόνα 1, ο πρώτος ΓΤΟ που σχεδιάστηκε ως κατοικίδιο, πωλήθηκε για πρώτη φορά στις Ηνωμένες Πολιτείες τον Δεκέμβριο του 2003.

Οι τεχνικές γενετικής μηχανικής έχουν εφαρμοστεί σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένης της έρευνας, της γεωργίας, της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας και της ιατρικής. Ένζυμα που χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά, φάρμακα όπως η ινσουλίνη και η ανθρώπινη αυξητική



Εικόνα 1. Glofish, το πρώτο διαγονιδιακό κατοικίδιο.

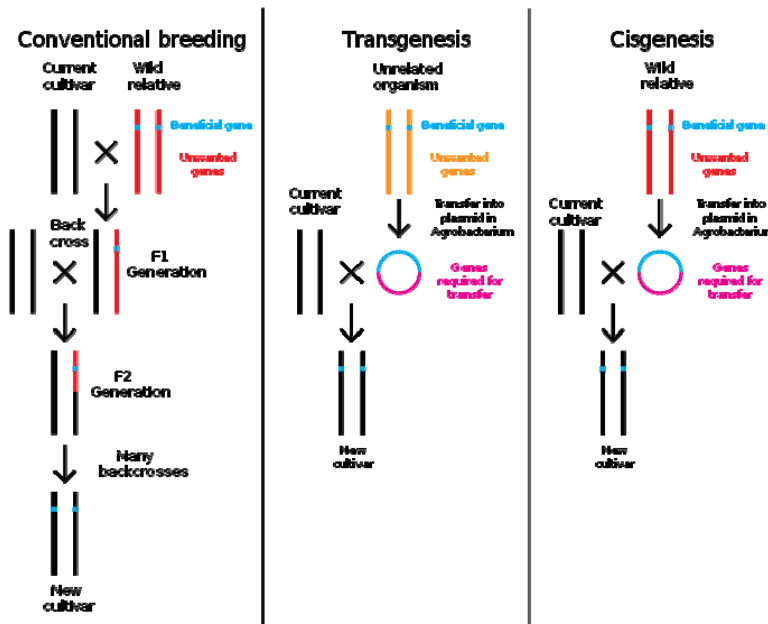
ορμόνη, είναι πλέον δυνατό να κατασκευάζονται από γενετικά τροποποιημένα κύτταρα. Πειραματικές γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές και γενετικά τροποποιημένα ζώα, όπως ποντίκια ή ψάρια - ζέβρες, που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς και γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες έχουν πλέον εμπορευματοποιηθεί.

Η γενετική μηχανική αλλάζει το γονιδίωμα ενός οργανισμού χρησιμοποιώντας τεχνικές που αφαιρούν κληρονομήσιμο υλικό ή εισάγοντας DNA που έχει παρασκευαστεί εκτός του οργανισμού. Αυτό επιτελείται είτε απευθείας στον οργανισμό είτε αρχικά σε ένα κύτταρο που στη συνέχεια ενσωματώνεται στον ξενιστή. Η διαδικασία αυτή απαιτεί τη χρήση διαγονιδιακής τεχνολογίας ώστε να δημιουργηθούν νέοι συνδυασμοί κληρονομήσιμου γενετικού υλικού που στη συνέχεια θα ενσωματωθεί είτε μέσω ενός φορέα (πχ μεταθετού στοιχείου) είτε απευθείας μέσω μικροενέσεων, μακροέγχυσης και μικροέγκλεισης.

Η γενετική μηχανική κανονικά δεν περιλαμβάνει την παραδοσιακή αναπαραγωγή ζώων και φυτών (Εικόνα 2), εξωσωματική γονιμοποίηση, επαγωγή πολυπλοειδίας (στα φυτά), μεταλλαξιγένεση και σύντηξη κυττάρων που δεν χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένα νουκλεϊκά οξέα ή ένα γενετικά τροποποιημένο οργανισμό κατά τη διαδικασία.

Ωστόσο, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει επίσης ορίσει, υπό την ευρεία έννοια, τη γενετική μηχανική έτσι ώστε να περιλαμβάνει τόσο την επιλεκτική αναπαραγωγή όσο και άλλα μέσα τεχνητής επιλογής. Η συνθετική βιολογία είναι

συμβατικές μεθόδους αναπαραγωγής. Το αντίστοιχο Καναδικό ρυθμιστικό σύστημα βασίζεται στο κατά πόσο ένα προϊόν έχει καινοτόμα χαρακτηριστικά, ανεξάρτητα από τη μέθοδο προέλευσης. Με άλλα λόγια, ένα προϊόν προσδιορίζεται ως γενετικά τροποποιημένο αν φέρει κάποιο χαρακτηριστικό που δεν βρέθηκε προηγουμένως στο είδος είτε παρήχθη χρησιμοποιώντας παραδοσιακές μεθόδους αναπαραγωγής (π.χ., επιλεκτική αναπαραγωγή, κυτταρική σύντηξη, αναπαραγωγή με μετάλλαξη) ή γενετική μηχανική.



Εικόνα 2. Η σύγκριση της γενετικής βάσης της παραδοσιακής και διαγονιδιακής εκτροφής.

αναπτυσσόμενος κλάδος της Βιολογίας που προωθεί περαιτέρω τη γενετική μηχανική με την εισαγωγή τεχνητά δημιουργημένου DNA σε έναν οργανισμό.

Ο οργανισμός που προκύπτει από την εισαγωγή ξένου γενετικού υλικού λέγεται διαγονιδιακός (transgenic). Εάν το γενετικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι από το ίδιο είδος ή είδος που μπορεί με φυσική διαδικασία να δώσει απογόνους με τον ξενιστή, ο προκύπτων οργανισμός καλείται ομογονιδιακός (cisgenic). Η γενετική μηχανική μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση γενετικού υλικού από τον οργανισμό-στόχο, δημιουργώντας έναν οργανισμό με απενεργοποιημένο γονίδιο (gene knockout). Στην Ευρώπη η γενετική τροποποίηση είναι συνώνυμη με τη γενετική μηχανική, ενώ στις ΗΠΑ η γενετική τροποποίηση μπορεί επίσης να παραπέμπει σε

Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί

Τα βακτήρια ήταν οι πρώτοι οργανισμοί που υπέστησαν γενετική τροποποίηση. Όταν πλασμιδιακό DNA που περιέχει νέα γονίδια εισαχθεί μέσα στο βακτηριακό κύτταρο, τα βακτήρια θα εκφράσουν τα γονίδια αυτά, παράγοντας τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Τέτοια γονίδια μπορούν να κωδικοποιούν φάρμακα ή ένζυμα που επεξεργασίας τροφίμων ή άλλων υποστρωμάτων. Φυτά έχουν επίσης τροποποιηθεί για προστασία απέναντι σε έντομα, ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα, αντοχή σε ιούς, ενισχυμένη διατροφή, ανοχή σε περιβαλλοντικές πιέσεις, ακόμη και για παραγωγή κατάλληλων εμβολίων. Γενετικά τροποποιημένα ζώα χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα, ως πειραματόζωα και για παραγωγή γεωργικών ή φαρμακευτικών προϊόντων. Ανάμεσά τους περιλαμβάνονται ζώα με απενεργοποιημένα γονίδια, με αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες, με ορμόνες για επιπλέον ανάπτυξη, ή με ικανότητα να εκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες στο γάλα τους.

Λίγη ιστορία

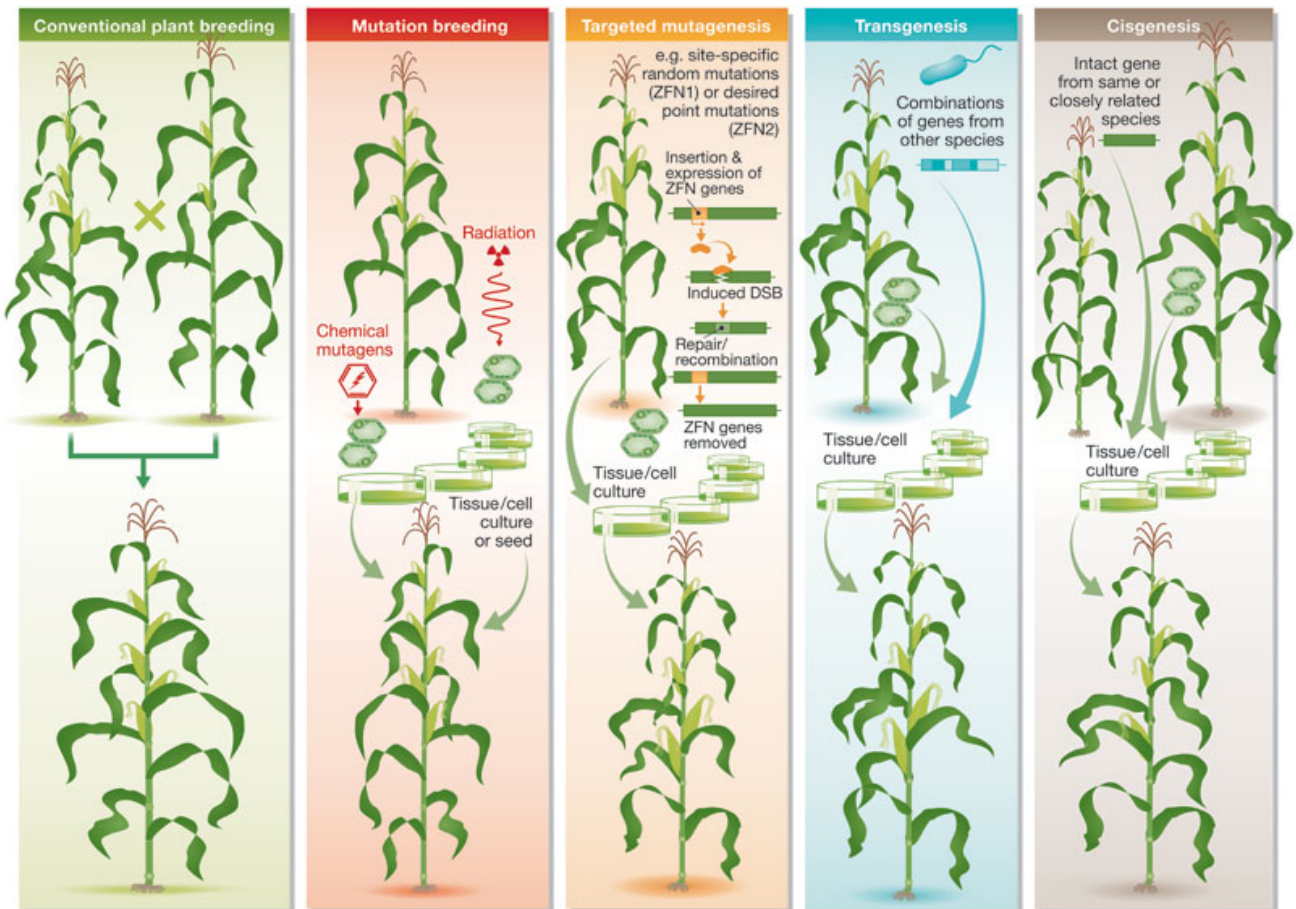
Ο άνθρωπος άλλαξε τα γονιδιώματα των ειδών επί χιλιάδες χρόνια. Μάλιστα, δεν θα ήταν υπερβολή να πούμε ότι ένα από τα προϊόντα αυτής της



Εικόνα 3. Η εξέλιξη του καλαμποκιού.

μακραιώνης παρέμβασης, ο αραβόσιτος, είναι στην πραγματικότητα ένα αφύσικο 'τέρας' που έχει δημιουργηθεί από τον άνθρωπο. Αν ο αραβόσιτος,

γρήγορα θα εξαφανιστεί εντελώς, για τον απλό λόγο ότι αδυνατεί να διασπείρει τα σπέρματά του. Τα σπέρματα (οι κόκκοι) του καλλιεργούμενου καλαμποκιού είναι όχι μόνο μονίμως στερεωμένα στον κεντρικό άξονα (κώνο), αλλά περιβάλλονται και από σκληρά και αλληλεπικαλυπτόμενα προστατευτικά φύλλα (Εικόνα 3). Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά απουσίαζαν από τον άγριο αραβόσιτο και είναι προϊόντα της τεχνητής επιλογής που έκανε ο άνθρωπος. Άλλωστε, τα περισσότερα γεωργικά είδη που καλλιεργούνται σήμερα τα οφείλουμε σε σταδιακές βελτιώσεις που ουσιαστικά ξεκίνησαν από το νεολιθικό άνθρωπο. Η συνηθέστερη μέθοδος βελτίωσης ενός φυτού, για παράδειγμα, είναι η σταυρωτή επικονίαση με φυτά του ίδιου είδους. Ορισμένες τεχνικές, όμως, στηρίζονται στην υβριδοποίηση ανάμεσα σε δύο απομακρυσμένα είδη του ίδιου γένους. Η υβριδοποίηση ανάμεσα σε άτομα απομακρυσμένων γενών είναι ακόμη πιο ασυνήθιστη, όπως αυτή ανάμεσα στο σίτο (*Triticum aestivum*) και τη σίκαλη (*Secale cereale*) που δημιούργησε τη σιτοσίκαλη (triticale) ήδη από το 1870. Σε κάθε περίπτωση, μετά από αλληπάλληλες επαναδιασταυρώσεις ανάμεσα σε επιλεγμένα



όπως τον γνωρίζουμε σήμερα, αφεθεί στη φύση, όχι μόνο δεν θα μπορέσει να επιβιώσει αλλά πολύ

άτομα, σταδιακά διαχωρίζονται τα στελέχη με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Στο γενετικό επίπεδο,

ολόκληρες περιοχές γονιδιωμάτων ανταλλάσσονται ανάμεσα στα διασταυρούμενα άτομα, περιοχές που περιέχουν ένα τεράστιο αριθμό γονιδίων.

Η προσπάθεια της επιτάχυνσης αυτής της διαδικασίας αλλά και η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, οδήγησε σε πιο μεθοδευμένες προσεγγίσεις (Εικόνα 4). Οι επιστήμονες αρχικά χρησιμοποίησαν είτε χημικά είτε φυσικά μεταλλαξιγόνα, επιλέγοντας στη συνέχεια τα μεταλλάγματα εκείνα με τις επιθυμητές ιδιότητες. Πιο εξεζητημένες τεχνικές έδωσαν τη δυνατότητα στοχευμένων αλλαγών (μεταλλάξεων) σε συγκεκριμένα γονίδια. Τέλος, η είσοδος της γενετικής μηχανικής έδωσε τη δυνατότητα εισαγωγής γονιδίων από οργανισμούς εντελώς διαφορετικούς από τον οργανισμό-στόχο και τη δημιουργία διαγονιδιακών ειδών με ασύλληπτες ιδιότητες.

Η γενετική μηχανική ως άμεσος τρόπος χειρισμού του DNA από τον άνθρωπο, υφίσταται μόλις από τη δεκαετία του 1970. Το 1972 ο Paul Berg δημιούργησε τα πρώτα μόρια ανασυνδυασμένου DNA συνδυάζοντας DNA από τον ιό πιθήκου SV40 με εκείνο του ιού λάμδα. Το 1973 οι Herbert Boyer και Stanley Cohen δημιούργησαν τον πρώτο διαγονιδιακό οργανισμό, εισάγοντας γονίδια αντίστασης σε αντιβιοτικά στο πλασμίδιο ενός βακτηρίου *Escherichia coli*. Ένα χρόνο αργότερα ο Rudolf Jaenisch δημιούργησε ένα διαγονιδιακό ποντίκι με την εισαγωγή ξένου DNA σε έμβρυό του, καθιστώντας το το πρώτο στον κόσμο διαγονιδιακό ζώο. Αυτά τα επιτεύγματα είχαν ως αποτέλεσμα να εκφραστούν ανησυχίες της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους από τη γενετική μηχανική, τα οποία συζητήθηκαν για πρώτη φορά σε βάθος στο Συνέδριο Asilomar το 1975. Μία από τις κύριες συστάσεις από αυτή τη

Chakrabarty έκρινε ότι η γενετικά τροποποιημένη ζωή θα μπορούσε να κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας. Η ινσουλίνη που παράγεται από βακτήρια, με την εμπορική ονομασία "humulin", εγκρίθηκε να κυκλοφορήσει στο εμπόριο από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων το 1982.

Στη δεκαετία του 1970 ο μεταπτυχιακός φοιτητής Steven Lindow του Πανεπιστημίου του Wisconsin-Madison μαζί με τους DC Arny και C Upper βρήκε ένα βακτήριο, που προσδιόρισε ως *Pseudomonas syringae*, που έπαιξε σημαντικό ρόλο στην επαγωγή πυρήνων κρυστάλλωσης κατά το σχηματισμό πάγου και το 1977 ανακάλυψε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος που δεν είχε την ιδιότητα αυτή. Αργότερα, δημιούργησε με επιτυχία ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος το οποίο μείωνε τον σχηματισμό πάγου. Το 1983, μια εταιρεία βιοτεχνολογίας, η Advanced Genetic Sciences (AGS) έκανε αίτηση για κυβερνητική έγκριση δοκιμών πεδίου με το ανασυνδυασμένο στέλεχος του *P. syringae* για την προστασία των καλλιεργειών από τον παγετό, αλλά περιβαλλοντικές ομάδες και άλλοι διαδηλωτές καθυστέρησαν τις δοκιμές πεδίου για τέσσερα χρόνια με νομικές παρεμβάσεις. Το 1987, το τροποποιημένο στέλεχος του *P. syringae* έγινε ο πρώτος γενετικά τροποποιημένος οργανισμός που απελευθερώθηκε στο περιβάλλον, όταν ένα χωράφι με καλλιέργεια φράουλας και ένας αγρός καλλιέργειας πατάτας στην Καλιφόρνια ψεκάστηκαν με αυτό.

Οι πρώτες δοκιμές στον τομέα των γενετικά τροποποιημένων φυτών πραγματοποιήθηκαν στη Γαλλία και τις ΗΠΑ το 1986, με φυτά καπνού που είχαν "κατασκευαστεί" για να είναι ανθεκτικά στα ζιζανιοκτόνα. Η Λαϊκή Δημοκρατία της Κίνας ήταν η πρώτη χώρα για που κυκλοφόρησε στο εμπόριο διαγονιδιακά φυτά, παρουσιάζοντας φυτά καπνού ανθεκτικ

ά στον ιό της

μωσαϊκής το 1992. Το 1994 η εταιρεία Monsanto - Calgene έλαβε έγκριση για να κυκλοφορήσει στο εμπόριο την τομάτα *Flavr Savr*, τομάτα με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής μετά την κοπή της από το φυτό, ώστε να αντέχει στα ράφια των εμπορίων χωρίς να σαπίζει. Το 1994, η Ευρωπαϊκή Ένωση ενέκρινε την εμπορία φυτών καπνού κατασκευασμένων για να είναι ανθεκτικά στο ζιζανιοκτόνο *bromoxynil*, καθιστώντας την την πρώτη εμπορική καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων φυτών στην Ευρώπη. Το 1995, η ποικιλία πατάτας Bt κρίθηκε ως ασφαλής από την

Εικόνα 4. Οι βασικοί τρόποι εκτροφής, από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα.

συνάντηση ήταν ότι θα πρέπει να καθιερωθεί από την κυβέρνηση εποπτεία της έρευνας ανασυνδυασμένου DNA, έως ότου η τεχνολογία θεωρηθεί ασφαλής.

Το 1976 η Genentech, η πρώτη εταιρεία γενετικής μηχανικής, ιδρύθηκε από τους Herbert Boyer και Robert Swanson και ένα χρόνο αργότερα η εταιρεία παρήγαγε μια ανθρώπινη πρωτεΐνη (σωματοστατίνη) από το βακτήριο *E. coli*. Η Genentech ανακοίνωσε την παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης το 1978. Το 1980, το Ανώτατο Δικαστήριο των ΗΠΑ στην υπόθεση *Diamond κατά*

Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος, αφού εγκρίθηκε από την Υπηρεσία Ελέγχου Τροφίμων, καθιστώντας την το πρώτο ζιζανιοκτόνο φυτό που εγκρίθηκε στις ΗΠΑ. Το 2009, 11 διαγονιδιακά φυτά αναπτύχθηκαν εμπορικά σε 25 χώρες, με τη σειρά, κατά καλλιεργούμενη έκταση, ΗΠΑ, Βραζιλία, Αργεντινή, Ινδία, Καναδάς, Κίνα, Παραγουάη και Νότια Αφρική.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και στις αρχές της δεκαετίας του 1990, κατευθυντήριες γραμμές για την αξιολόγηση της ασφάλειας των γενετικά τροποποιημένων φυτών και τροφίμων δόθηκαν από οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του FAO και της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας.

Το 2010, επιστήμονες στο Ινστιτούτο Craig Venter ανακοίνωσαν ότι δημιούργησαν το πρώτο συνθετικό βακτηριακό γονιδίωμα και το πρόσθεσαν ότι σε κύτταρο που δεν περιείχε DNA. Το βακτήριο, που ονομάστηκε Synthia, ήταν η πρώτη στον κόσμο συνθετική μορφή ζωής.

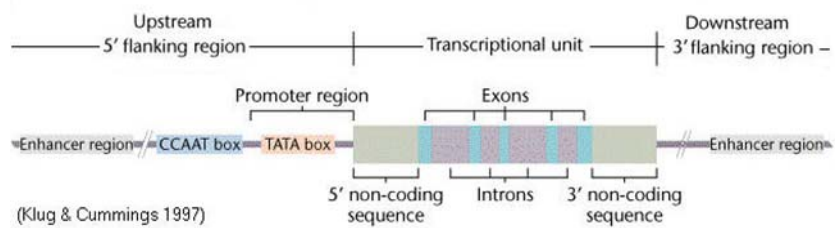
Η διαδικασία

Το πρώτο βήμα είναι να επιλεγεί και να απομονωθεί το γονίδιο που θα εισαχθεί στον γενετικώς τροποποιημένο οργανισμό. Από το 2012, τα περισσότερα εμπορευματοποιημένα ΓΤ φυτά έχουν γονίδια που μεταφέρονται σε αυτούς που παρέχουν προστασία έναντι των εντόμων ή ανοχή στα ζιζανιοκτόνα. Το γονίδιο μπορεί να απομονωθεί και να κλωνοποιηθεί με τις τεχνολογίες που συζητήσαμε σε προηγούμενο μάθημα.

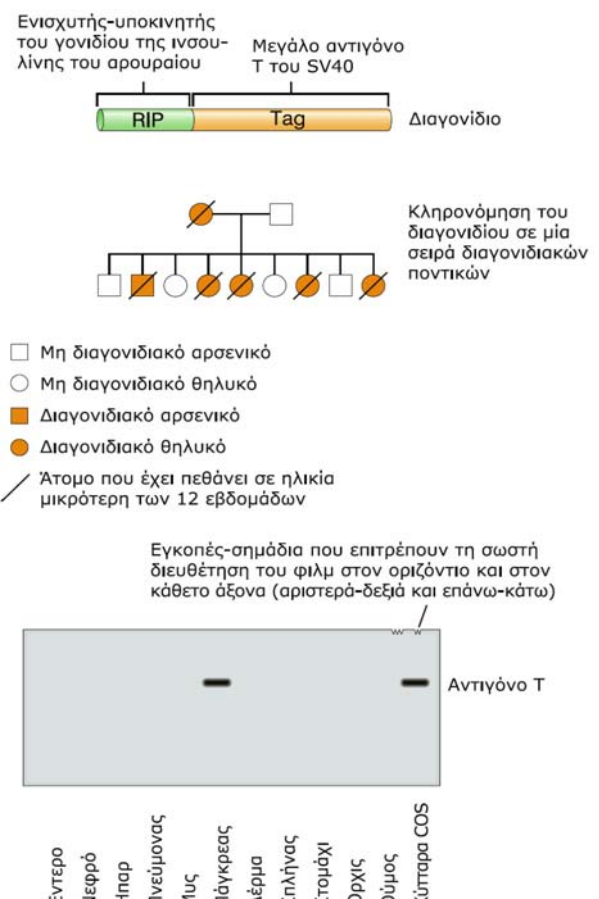
Είναι σημαντικό να αναφερθεί εδώ ότι το γονίδιο που πρόκειται να εισαχθεί μέσα στο γενετικώς τροποποιημένο οργανισμό πρέπει να συνδυάζεται με άλλα γενετικά στοιχεία, προκειμένου να λειτουργήσει σωστά. Το γονίδιο μπορεί επίσης να τροποποιηθεί σε αυτό το στάδιο για καλύτερη έκφραση ή αποτελεσματικότητα. Το γονίδιο που πρόκειται να εισαχθεί πρέπει να περιέχει έναν υποκινητή και ένα τερματιστή, καθώς και ένα επιλέξιμο γενετικό δείκτη.

Ο **υποκινητής** (promoter) είναι μια περιοχή ανοδικά του γονιδίου, όπου προσδένεται η RNA πολυμεράση που θα εκκινήσει τη μεταγραφή

(Εικόνα 5). Στην περιοχή αυτή υπάρχουν πολλές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από μια πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται εκεί και παίζουν σημαντικότερο ρόλο τόσο στη σωστή τοποθέτηση της RNA πολυμεράσης στο σημείο έναρξης της μεταγραφής, όσο και στην ιστοειδική έκφραση του γονιδίου. Ακόμη ανοδικότερα, συχνά υπάρχει και μια πιο εκτεταμένη περιοχή ενισχυτή (enhancer) όπου επίσης προσδένονται άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες. Για παράδειγμα, αν δημιουργηθεί ένας διαγονιδιακός ποντικός που φέρει τη ρυθμιστική περιοχή (υποκινητής-ενισχυτής) του γονιδίου της ινσουλίνης του αρουραίου (RIP: Rat Insulin Promoter) συνδεδεμένης με το γονίδιο του μεγάλου αντιγόνου T (Tag: large I antigen) του



Εικόνα 5. Η βασική οργάνωση ενός ευκαρυωτικού γονιδίου.

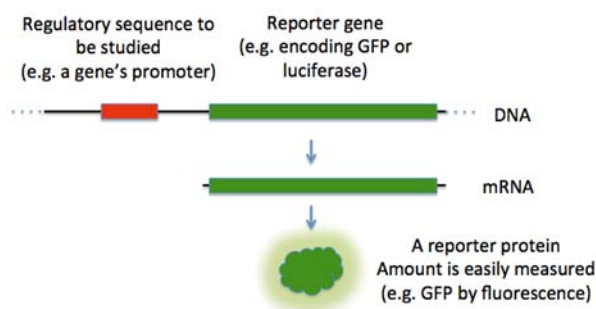


Εικόνα 6. Έκφραση διαγονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς.

ογκογόνου ιού SV40, τότε η έκφραση του Tag θα κατευθυνθεί στα κύτταρα β των νησίδων του Langerhans στο πάγκρεας. Πράγματι, σε ανάλογο πείραμα, ποντικοί που έφεραν το διαγονίδιο RIP-Tag πέθαναν σε ηλικία 9-12 εβδομάδων και η παθολογοανατομική ανάλυση που έγινε έδειξε υπερπλασία και όγκους στα νησίδια Langerhans. Όλοι οι άλλοι ιστοί των διαγονιδιακών ποντικών ήταν φυσιολογικοί, παρόλο που και εκείνοι έφεραν το διαγονίδιο στα κύτταρά τους (Εικόνα 6). Κατά συνέπεια, η ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της ινσουλίνης είχε κατευθύνει την έκφραση του Tag στον κατάλληλο κυτταρικό τύπο. Έκτοτε, οι ποντικοί RIP-Tag έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες για τον καρκίνο. Παρόμοια, αν θέλουμε να δημιουργήσουμε μια διαγονιδιακή αγελάδα ή κατσίκια στον οποίων το γάλα να παράγεται ινσουλίνη, αναπτυξιακή ορμόνη ή αντιθρομβωτικοί παράγοντες, θα συνδέσουμε τα αντίστοιχα γονίδια με εξειδικευμένο υποκινητή γονιδίων που εκφράζονται στο μαστοφόρο αδένια του ζώου αυτού. Αυτή είναι η βάση πάνω στην οποία αναπτύχθηκαν τα «φαρμακοπαραγωγικά» ζώα, που θα συζητήσετε σε επόμενο μάθημα.

Ο **τερματιστής** είναι η περιοχή όπου τερματίζεται η μεταγραφή. Εξίσου σημαντική λοιπόν είναι και η επιλογή ενός ισχυρού τερματιστή που θα διασφαλίζει το σωστό και αποτελεσματικό τερματισμό των μεταγράφων ώστε να εξασφαλίζεται η παραγωγή του επιθυμητού πρωτεϊνικού προϊόντος.

Τέλος, ο **επιλέξιμος γενετικός δείκτης** χρειάζεται για τον εύκολο εντοπισμό των κυττάρων που έχουν μετασηματιστεί με το διαγονίδιο. Ορισμένοι προσδίδουν το χαρακτηριστικό της επιλεκτικής επιβίωσης στα κύτταρα στα οποία έχουν εισαχθεί. Τέτοιοι δείκτες προϋποθέτουν την καλλιέργεια σε ειδικό μέσο επιλογής που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά ή από το οποίο απουσιάζουν τα αντίστοιχα θρεπτικά συστατικά, προκειμένου να εξαλειφθούν όσα κύτταρα δεν διαθέτουν το DNA που φέρει το γονίδιο-δείκτη. Άλλοι δείκτες επιτρέπουν τον εντοπισμό και το διαχωρισμό κυττάρων με βάση άλλου τύπου ιδιότητες τις οποίες προσδίδουν. Στα βακτήρια, για παράδειγμα, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με ένα ειδικό χημικό υπόστρωμα (X-gal), κατά το μεταβολισμό του οποίου από τη β-γαλακτοσιδάση δημιουργείται ένα χαρακτηριστικό μπλε ίζημα. Σε ένα παρόμοιο σύστημα επιλογής στα φυτά χρησιμοποιείται ένα άλλο γονίδιο της *E. coli* το



Εικόνα 7. Φθορίζοντες γενετικοί δείκτες.

οποίο κωδικοποιεί τη β-γλυκουρονιδάση (GUS, β-glucuronidase), που θα μάθετε σε επόμενο μάθημα. Σε ζωντανά ζωικά κύτταρα, ένας πολύ ευέλικτος δείκτης που χρησιμοποιείται είναι ένας οπτικός δείκτης, η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP: Green Fluorescence Protein) που συναντάται σε ένα είδος μέδουσας. Η πρωτεΐνη αυτή απορροφά το μπλε φως και εκπέμπει πράσινο. Έτσι, τα κύτταρα που εκφράζουν GFP εκπέμπουν πράσινο φως, όταν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και εκτίθενται σε υπεριώδη φωτισμό (Εικόνα 7). Η GFP χρησιμοποιείται πλέον συχνά ως δείκτης της ενεργότητας ενός υποκινητή στα κύτταρα. Μπορεί να ανιχνευτεί ακόμη και σε ακέραιους ζωντανούς οργανισμούς, επιτρέποντας μας να εντοπίσουμε εύκολα σε ποια κύτταρα είναι ενεργός ένας υποκινητής. Μπορεί, επίσης, χωρίς να χάνει τις ιδιότητές της, να προσαρτηθεί στα άκρα άλλων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται ο εντοπισμός τους και να προσδιορίζεται η θέση τους μέσα στα κύτταρα.

Τις περισσότερες φορές, κατά τη δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών η εισαγωγή του νέου γενετικού υλικού γίνεται τυχαία μέσα στο γονιδίωμα του ξενιστή. Δηλαδή ο ερευνητής δεν έχει τον έλεγχο του σημείου όπου θα εισαχθεί το διαγονίδιο αλλά, όμως, επιβεβαιώνει τόσο τη θέση όσο και τις ιδιότητες του διαγονιδίου εκ των υστέρων. Άλλες τεχνικές επιτρέπουν την εισαγωγή νέου γενετικού υλικού σε μια συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα του ξενιστή, ή τη δημιουργία στοχευμένων μεταλλάξεων ικανών να απενεργοποιήσουν ενδογενή γονίδια (knock outs). Η τεχνική της γονιδιακής στόχευσης χρησιμοποιεί ομόλογο ανασυνδυασμό για να στοχεύσει τις επιθυμητές αλλαγές σε συγκεκριμένο ενδογενές γονίδιο. Αυτό συμβαίνει σε σχετικά χαμηλή συχνότητα σε φυτά και ζώα και γενικά απαιτεί τη χρήση επιλέξιμων δεικτών. Η συχνότητα της γονιδιακής στόχευσης μπορεί να ενισχυθεί σε

μεγάλο βαθμό με τη χρήση επεξεργασμένων νουκλεασών, όπως νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger nucleases), ενδονουκλεάσες μηχανικής παλιννόστησης (homing nucleases), ή νουκλεάσες δημιουργούμενες από μηχανισμό μεταγραφής (TALENs: transcription activator-like effector nucleases). Εκτός από την ενίσχυση της γονιδιακής στόχευσης, οι επεξεργασμένες νουκλεάσες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να εισαγάγουν μεταλλάξεις σε ενδογενή γονίδια ώστε να το απενεργοποιήσουν.

Μέθοδοι μετασχηματισμού κυττάρων

Τα βακτήρια είναι εκ φύσεως σε θέση να δεχθούν ξένο DNA. Αυτό μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς: σύζευξη, μεταγωγή ή μετασχηματισμό.

Η **βακτηριακή σύζευξη** (conjugation) (Εικόνα 8) αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται μονόδρομη μεταφορά γενετικών πληροφοριών μεταξύ ενός βακτηριακού κυττάρου-δότη και ενός βακτηριακού κυττάρου-δέκτη μέσω άμεσης κυτταρικής επαφής. Πρωτοανακαλύφθηκε το 1951 από τον Joshua Lederberg. Έχει



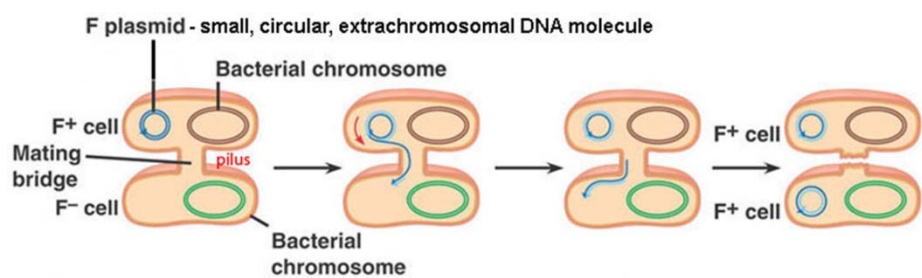
Εικόνα 8. Βακτηριακή σύζευξη.

παρατηρηθεί σε πολλά είδη βακτηρίων, είναι όμως καλύτερα μελετημένη στο κωλοβακτηρίδιο *E. coli*. Η ιδιότητα του δότη παρέχεται στο αντίστοιχο κύτταρο από την παρουσία ενός πλασμιδίου που ονομάζεται παράγοντας F (Fertility factor, παράγοντας γονιμότητας). Ο παράγοντας F φέρει μια σειρά γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη

βακτηριακή σύζευξη και τη μεταφορά DNA από το δότη στο δέκτη. Τα κύτταρα που φέρουν τον παράγοντα γονιμότητας είναι δότες γονιδίων και συμβολίζονται με F^+ , ενώ αυτά που δεν τον φέρουν είναι δέκτες γονιδίων και συμβολίζονται με F^- . Τα F^+ και F^- βακτήρια διαφέρουν και φαινοτυπικά. Τα πρώτα φέρουν συζευκτικά νημάτια που είναι απαραίτητα για τη σύζευξη, ενώ τα δεύτερα δεν φέρουν. Σε αντιστοιχία με τους ανώτερους οργανισμούς τα βακτήρια F^+ θεωρούνται αρσενικά άτομα ενώ τα F^- θηλυκά σε διασταυρώσεις βακτηρίων.

Κατά τη διασταύρωση $F^+ \times F^-$ εκείνο που μεταφέρεται από το δότη στο δέκτη είναι ο παράγοντας F (Εικόνα 8), καθώς αντιγράφεται με τον τύπο αντιγραφής του κυλιόμενου κύκλου. Η μεταφορά του F διαρκεί περίπου δύο λεπτά. Σε εργαστηριακές καλλιέργειες, εάν ένας μικρός αριθμός κυττάρων F^+ αναμιχθεί με περίσσεια κυττάρων F^- , σε λίγες ώρες όλα τα κύτταρα θα μετατραπούν σε F^+ . Στους φυσικούς, όμως, πληθυσμούς η μεταφορά αυτή δεν είναι τόσο αποτελεσματική, γι αυτό μόνο ένα μικρό ποσοστό βακτηρίων *E. coli* στη φύση είναι F^+ .

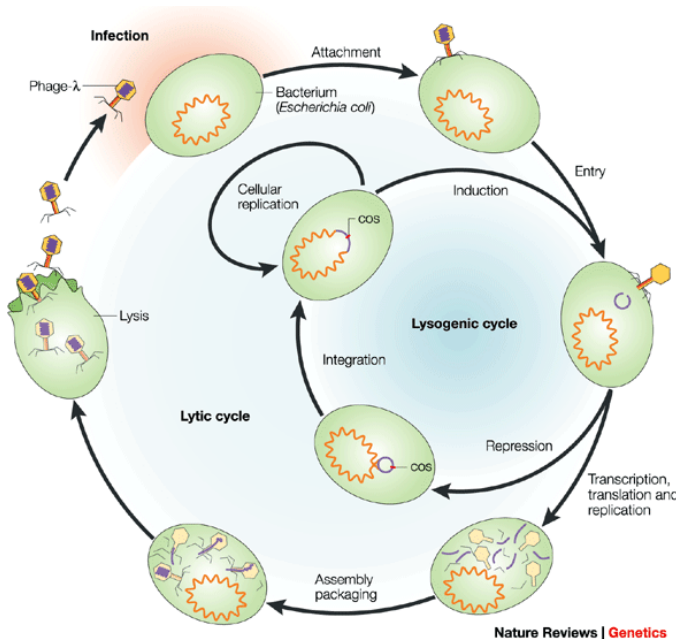
Το πλασμίδιο F από καιρό σε καιρό και με συχνότητα περίπου 1×10^{-6} ενσωματώνεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα της *E. coli* με ένα απλό διασελισμό που συμβαίνει μεταξύ μιας ομόλογης αλληλουχίας που υπάρχει και στο F και στο χρωμόσωμα. Το βακτηριακό χρωμόσωμα παραμένει κυκλικό, αλλά γίνεται μεγαλύτερο όσο και το πλασμιδιακό DNA που ενσωματώνεται. Κύτταρα που φέρουν ενσωματωμένο το F μπορούν να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν. Οι παραλλαγές αυτές ονομάζονται στελέχη υψηλής συχνότητας ανασυνδυασμού ή Hfr (High frequency of recombination), γιατί σε διασταυρώσεις $Hfr \times F^-$ δίνουν ψηλές συχνότητες ανασυνδυασμού. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι ο ενσωματωμένος F διατηρεί την ικανότητα μεταφοράς του στο βακτήριο δέκτη κατά τη βακτηριακή σύζευξη και, καθώς περνάει σ' αυτό, παρασύρει και βακτηριακά γονίδια του δότη.



Conjugation and transfer of an F plasmid from an F^+ donor to an F^- recipient

Εικόνα 9. Μεταφορά του παράγοντα F κατά τη βακτηριακή σύζευξη και δημιουργία Hfr κυττάρων.

Η **μεταγωγή** (transduction) είναι μια διαδικασία κατά την οποία βακτηριοφάγοι (φάγοι) μεσολαβούν για να μεταφερθεί βακτηριακό DNA από ένα βακτήριο, δότη, σε ένα άλλο, δέκτη. Άλλας πούμε, αρχικά, δυο λόγια για τον κύκλο ζωής των βακτηριοφάγων. Όταν ένας φάγος μολύνει ένα κύτταρο, μπορεί να ακολουθήσει δύο αλληλοεξαιρούμενες πορείες (Εικόνα 10): μπορεί να δράσει ως παθογόνος φάγος οδηγώντας στη λύση του κυττάρου στο οποίο έχει εισέλθει,



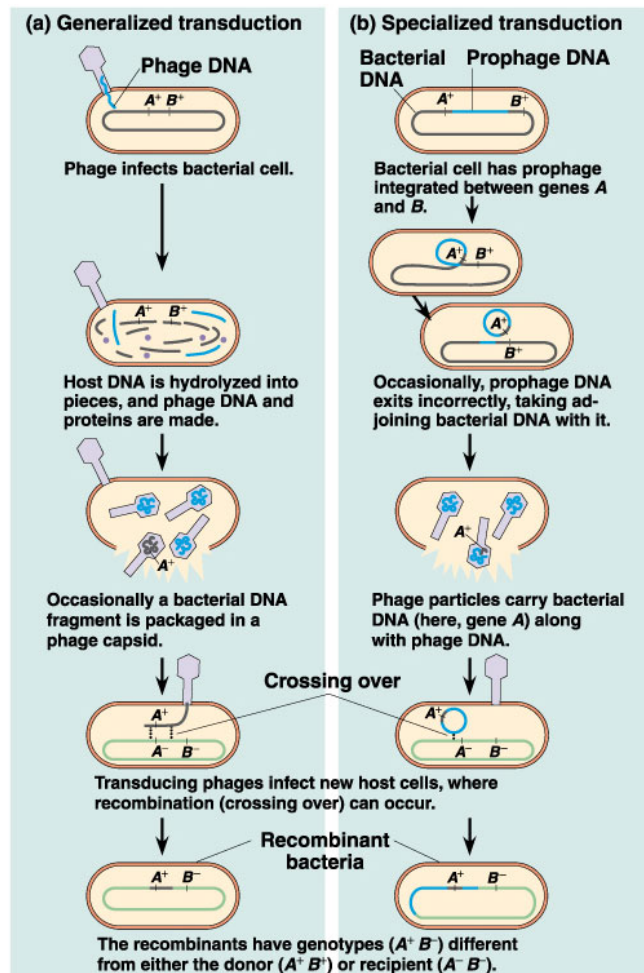
Εικόνα 10. Οι δύο κύκλοι ζωής ενός βακτηριοφάγου.

παράγοντας πολλά αντίγραφα του εαυτού του, είτε μπορεί να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή ως προφάγος, διπλασιαζόμενος συγχρόνως με το βακτηριακό γονιδίωμα. Ένα κύτταρο που φέρει ένα προφάγο λέγεται λυσιγόνο, γιατί το DNA του προφάγου μπορεί, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, να απελευθερωθεί ή επαχθεί από το βακτηριακό χρωμόσωμα και να επιστρέψει πάλι στη λυτική φάση.

Όταν ένας προφάγος αποδεσμευτεί από το βακτηριακό χρωμόσωμα, μπορεί να πάρει μαζί του ένα μικρό γειτονικό τμήμα από το DNA του ξενιστή, χάνοντας κάποιο μέρος του δικού του γονιδιώματος κατά τη διαδικασία. Έτσι, ένα σωματίδιο φάγου μπορεί να μεσολαβήσει στη μεταφορά ενός βακτηριακού γονιδίου ή ενός μέρους του βακτηριακού γονιδίου από το ένα κύτταρο στο άλλο σε μια διεργασία που λέγεται μεταγωγή. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι φάγων που κάνουν μεταγωγή: φάγοι γενικευμένης μεταγωγής και φάγοι ειδικευμένης μεταγωγής. Οι φάγοι γενικευμένης μεταγωγής δεν έχουν μια ειδική θέση

εισαγωγής στο γονιδίωμα του ξενιστή τους ενώ οι φάγοι ειδικευμένης μεταγωγής εισάγονται σε ένα μοναδικό σημείο στο γονιδίωμα του ξενιστή.

Κατά τη διάρκεια της λυτικής φάσης, οι φάγοι **γενικευμένης μεταγωγής** κωδικοποιούν μια ενδοουκλεάση που κόβει το DNA του βακτηρίου σε κομμάτια (Εικόνα 11-α). Κάποια από αυτά τα κομμάτια που έχουν μέγεθος ίσο με το DNA του φάγου μπορούν κατά το στάδιο της πλήρωσης της κεφαλής του φάγου και κατά τη λύση του κυττάρου να ελευθερωθούν στο περιβάλλον. Στη συνέχεια, αυτοί οι μεταγωγοί φάγοι μπορούν να μολύνουν άλλα βακτήρια, χωρίς όμως να προκαλούν λύση, μια και το DNA που φέρουν δεν είναι του φάγου (η μόλυνση είναι ιδιότητα του καψιδίου). Το DNA του βακτηρίου μπορεί στη συνέχεια να ανασυνδυαστεί με ομόλογο του βακτηριακού γονιδιώματος και να δώσει βακτήρια από ανασυνδυασμό. Επειδή η νουκλεάση κόβει το DNA του βακτηρίου τυχαία, στα καψίδια μπορεί να ενσωματωθεί οποιοδήποτε κομμάτι βακτηριακού DNA. Για το λόγο αυτό το είδος αυτό



Εικόνα 11. Γενικευμένη και ειδικευμένη μεταγωγή φάγων.

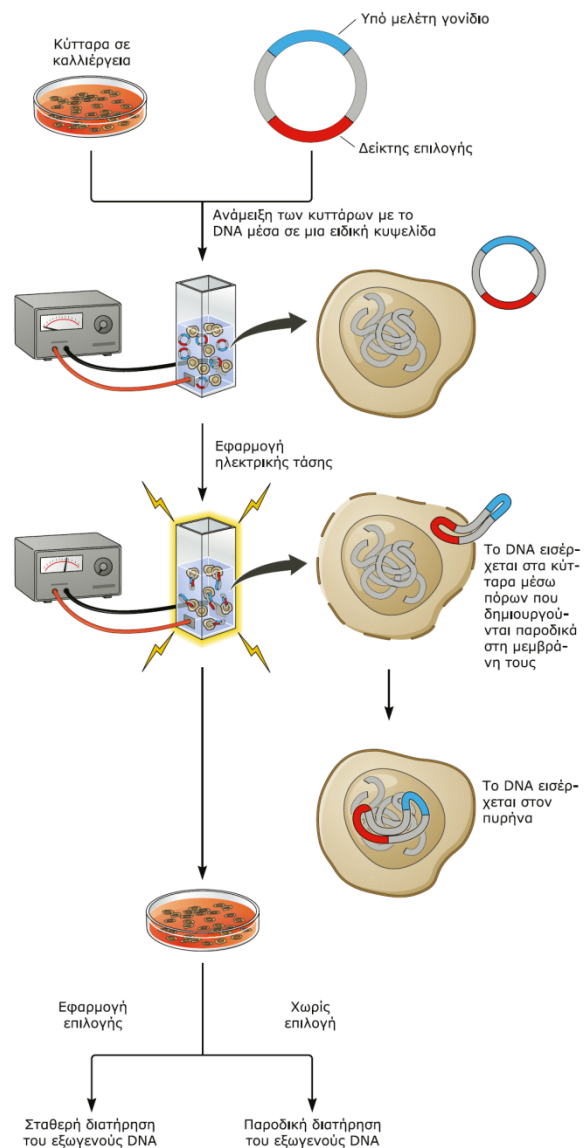
της μεταγωγής ονομάζεται γενικευμένη.

Η **ειδικευμένη μεταγωγή** συμβαίνει μόνο στα κύτταρα ξενιστές τα οποία έχουν ένα ενσωματωμένο προφάγο σε ένα συγκεκριμένο σημείο του γονιδιώματός τους. Σε περίπτωση ενεργοποίησης του λυτικού κύκλου (πχ κατόπιν ακτινοβολήσης) ο προφάγος επέρχεται επαγωγή του προφάγου και ακριβής αποκοπή του από το βακτηριακό χρωμόσωμα. Όμως, με συχνότητα 10^{-6} έως 10^{-7} μπορεί να συμβεί ανώμαλη αποκοπή, με αποτέλεσμα να παίρνει μαζί του και βακτηριακό DNA. Επειδή οι θέσεις ρήξης δεξιά ή αριστερά του φάγου δεν είναι σταθερές, το μήκος του DNA των ανώμαλων αποκοπών δεν είναι σταθερό. Εάν το μήκος του DNA από την ανώμαλη αποκοπή είναι περίπου ίσο με το μέγεθος του φάγου, τότε μπορεί να πακεταρισθεί στην κεφαλή του καψιδίου του φάγου, εάν όμως έχει μήκος μεγαλύτερο ή μικρότερο, δεν μπορεί. Οι μεταγωγοί αυτοί φάγοι δεν μπορούν να μεταπέσουν σε λυσογόνο κατάσταση, γιατί τους λείπουν γονίδια. Μπορούν όμως να μολύνουν κύτταρα συγχρόνως και με κανονικούς φάγους και να ενσωματωθούν στο βακτηριακό χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν μεροδιπλοειδή κύτταρα για τα γονίδια των περιοχών που μεταφέρουν. Αυτό το είδος μεταγωγής ονομάζεται **ειδικευμένη μεταγωγή** γιατί μεταφέρονται ορισμένα μόνο βακτηριακά γονίδια (τα γειτονικά της θέσης εισόδου του φάγου στο γονιδίωμα του ξενιστή), σε αντίθεση με τη γενικευμένη μεταγωγή κατά την οποία μπορεί να μεταφερθεί οποιοδήποτε βακτηριακό γονίδιο.

Τέλος, κατά το **μετασχηματισμό** (transformation) ένα κύτταρο δέκτης αποκτά γονίδια από ελεύθερο DNA που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο. Στο εργαστήριο αυτό το DNA απομονώνεται από τα κύτταρα δότες. Στη φύση το ελεύθερο DNA προέρχεται από τυχαία καταστροφή των βακτηρίων. Ο μετασχηματισμός αρχίζει με την είσοδο ενός κομματιού DNA από το θρεπτικό μέσο στο δέκτη και τελειώνει με την αντικατάσταση ομολόγου κομματιού DNA που υπάρχει στο δέκτη. Όλα τα βακτήρια δεν είναι δεκτικά στην πρόσληψη γυμνού DNA. Μπορούμε όμως με κατάλληλη επεξεργασία με ορισμένα άλατα, όπως το χλωριούχο ασβέστιο, να τα μετατρέψουμε σε δεκτικά.

Μια άλλη αποτελεσματική μέθοδος για την εισαγωγή τμημάτων DNA είναι η **ηλεκτροδιάτρηση** (electroporation, Εικόνα 12). Κατά την

ηλεκτροδιάτρηση, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ένα διάλυμα που περιέχει DNA και δέχονται ένα σύντομο ηλεκτρικό παλμό, ο οποίος προκαλεί το παροδικό άνοιγμα οπών στην εξωτερική τους



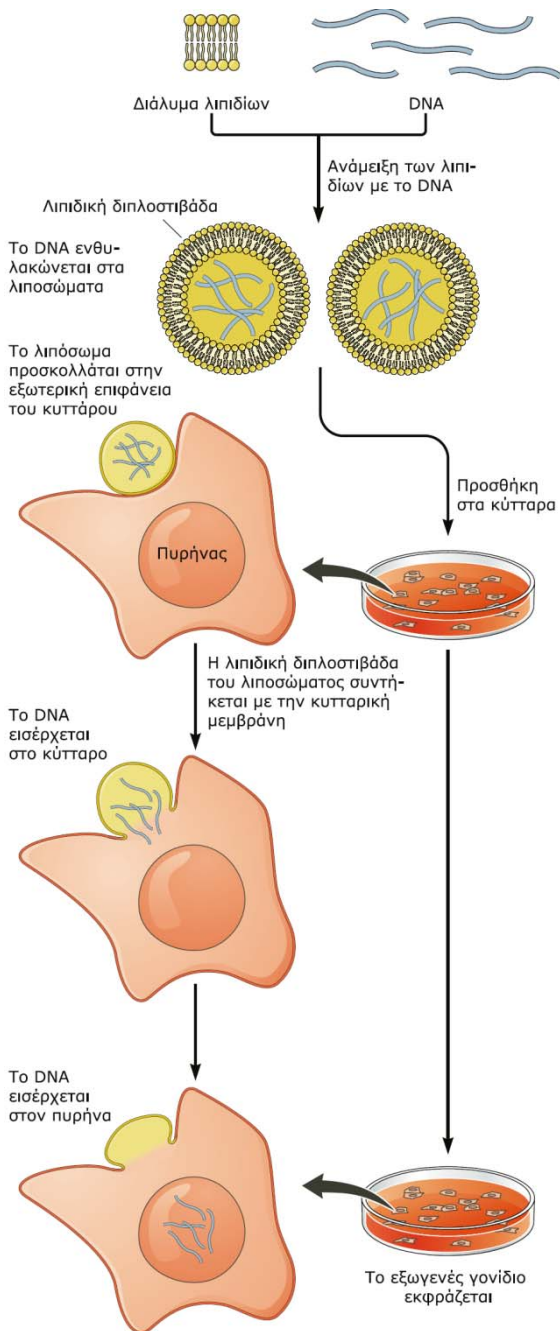
Εικόνα 12. Ηλεκτροδιάτρηση.

μεμβράνη (και στο κυτταρικό τοίχωμα, αν πρόκειται για βακτήρια). Το DNA εισέρχεται μέσω των πόρων αυτών στο κυτταρόπλασμα και κατόπιν, αν πρόκειται για ευκαρυωτικά κύτταρα, ένα μέρος του περνά στον πυρήνα.

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι ένα αποτελεσματικό μέσο εισαγωγής DNA στα περισσότερα ζωικά κύτταρα, όμως τα πρώτα πειράματα μεταφοράς γονιδίων σε ζωικά κύτταρα έγιναν με ογκογόνους ιούς DNA (δηλαδή ιούς που προκαλούν όγκους και που τα γονίδιά τους είναι κωδικοποιημένα με τη μορφή DNA). Κατά τη μέθοδο αυτή απομονωνόταν γυμνό κικό DNA και μεταφερόταν σε μια καλλιέργεια

κυττάρων. Παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά δεν είχαν ποτέ εκτεθεί στον πλήρη ιό, παρήγαν τελικά ολοκληρωμένους μολυσματικούς ιούς, γεγονός που αποδείκνυε ότι είχαν προσλάβει εξωγενές DNA. Αυτή η διαδικασία παραγωγής μολυσματικών ιών μέσω μεταφοράς γυμνού DNA ονομάστηκε διαμόλυνση, για να διακριθεί από τη μόλυνση που είναι η φυσιολογική διαδικασία εισαγωγής των ιών στα κύτταρα.

Σήμερα υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι άμεσης μεταφοράς DNA σε ζωικά κύτταρα. Η απλούστερη ίσως στην κατανόησή της (αν και

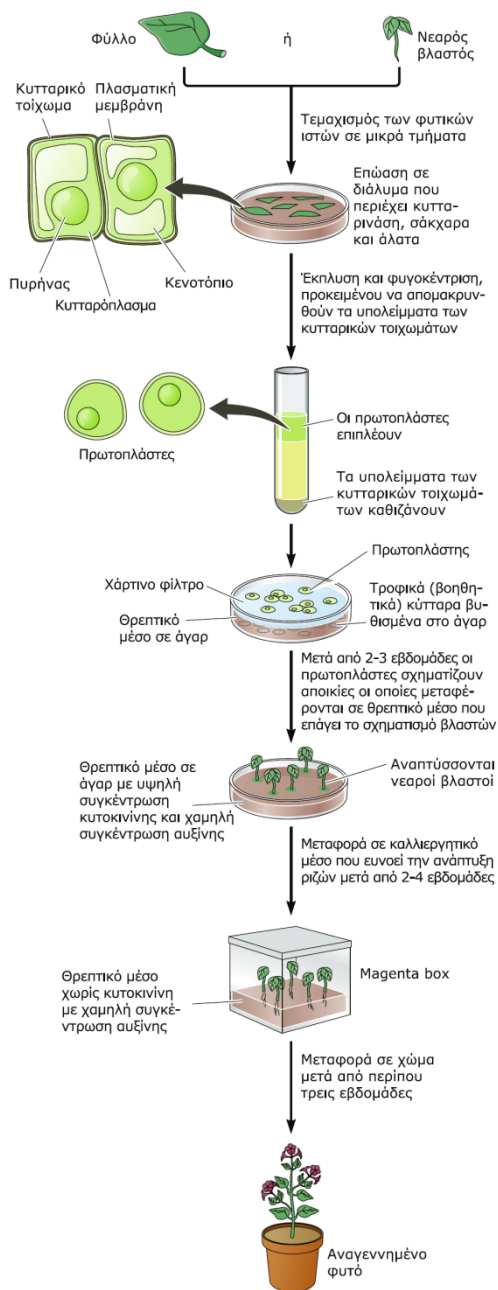


Εικόνα 13. Διαμόλυνση με χρήση λιποσωμάτων.

αρκετά δύσκολη στην εφαρμογή της) είναι η **μικροέγχυση**, κατά την οποία το DNA ενίεται κατευθείαν στον πυρήνα των κυττάρων μέσω λεπτών γυάλινων βελονών. Η μικροέγχυση είναι μία αποτελεσματική διαδικασία όσον αφορά τη συχνότητα της επιτυχούς έκβασής της ανά κύτταρο: μεγάλο ποσοστό των κυττάρων προσλαμβάνει το DNA. Την εποχή ωστόσο που πρωτoάρχισε να εφαρμόζεται ήταν μία χρονοβόρα διαδικασία, καθώς δεν ήταν δυνατόν να γίνει ένεση παρά σε λίγο μόνο κύτταρα σε κάθε πείραμα. Για μία ακόμη φορά, όμως, η χρήση των υπολογιστών έφερε επανάσταση σε μία τεχνική. Στην προκειμένη περίπτωση, χάρη στην αυτοματοποίηση της μεθόδου με τη βοήθεια συσκευών ελεγχόμενων από ένα υπολογιστή, μπορεί σήμερα να γίνει ένεση εκατοντάδων κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα.

Η επανάσταση που έκανε τη μεταφορά γονιδίων εργαλείο ρουτίνας για τους ερευνητές οι οποίοι μελετούν ζωικά κύτταρα, ήταν η ανακάλυψη ότι τα ζωικά κύτταρα προσλαμβάνουν αποτελεσματικά DNA στη μορφή ιζήματος με φωσφορικό ασβέστιο. Η διαπίστωση αυτή προέκυψε από παλαιότερες μελέτες που έδειχναν ότι δισθενή κατιόντα, όπως το ασβέστιο και το μαγνήσιο, ευνοούσαν την πρόσληψη DNA από τα βακτήρια. Το DNA είναι επίσης δυνατόν να ενθυλακωθεί σε τεχνητά λιπιδικά κυστίδια που ονομάζονται **λιποσώματα**, τα οποία συντήκονται στη συνέχεια με την κυτταρική μεμβράνη, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους απευθείας μέσα στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 13).

Οι ίδιες μέθοδοι μεταφοράς εξωγενούς DNA που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη γονιδίων σε βακτηριακά και ζωικά κύτταρα εφαρμόζονται και στα φυτά, αν και στα φυτικά κύτταρα υπάρχει μία ιδιαίτερη δυσκολία σε ό,τι αφορά την εισαγωγή εξωγενούς DNA. Περιβάλλονται από ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από κυτταρίνη, το οποίο συνιστά μεγάλο εμπόδιο στην προσπάθεια αποτελεσματικής μεταφοράς γονιδίων. Μία προσέγγιση που μπορεί να εφαρμοστεί έγκειται στην αφαίρεση αυτού του τοιχώματος με τη χρήση κυτταρινάσης, ενός ενζύμου που παράγουν ορισμένοι μύκητες. Έτσι προκύπτει ο λεγόμενος **πρωτοπλάστης**, ο οποίος περιβάλλεται μόνο από κυτταρική μεμβράνη και προσφέρεται πολύ περισσότερο για πειραματικούς χειρισμούς, όπως η εισαγωγή DNA με διαμόλυνση ή ηλεκτροδιάτρηση. Οι πρωτοπλάστες όχι μόνο προσλαμβάνουν σχετικά εύκολα μακρομόρια, όπως το DNA, αλλά είναι και συχνά σε θέση να



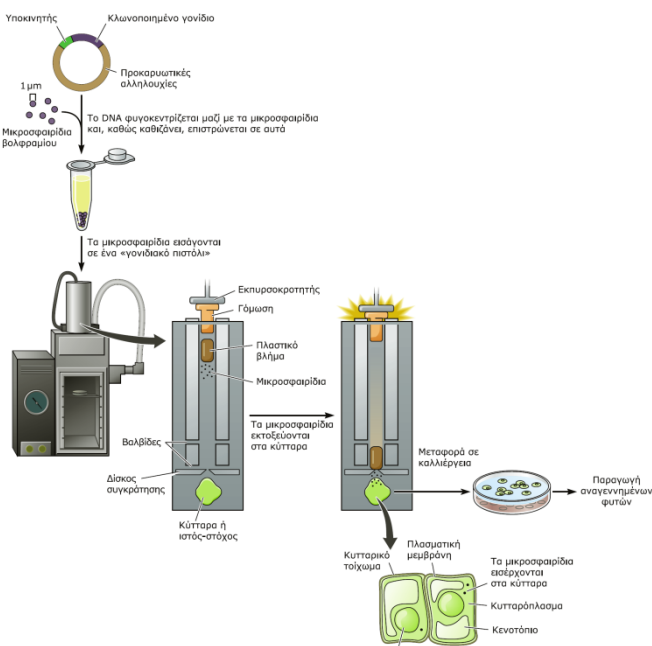
Εικόνα 14. Αναγέννηση φυτών από πρωτοπλάστες.

αναγεννούν ολόκληρα φυτά, όπως άλλωστε και τα περισσότερα φυτικά κύτταρα (Εικόνα 14). Δυστυχώς, παρόλο που έχουν χρησιμοποιηθεί πρωτοπλάστες με επιτυχία σε πολλά είδη, στην περίπτωση της ομάδας φυτών με τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία – των δημητριακών – είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί η αναγέννηση ολόκληρου του φυτού από πρωτοπλάστες. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται μια εντυπωσιακά άμεση προσέγγιση (Εικόνα 15), κατά την οποία το DNA προσκολλάται στην επιφάνεια μικροσφαιριδίων από βολφράμιο ή χρυσό διαμέτρου 1μm, τα οποία βάλονται με μεγάλη ταχύτητα σε ανέπαφα κύτταρα (σαν σκάγια από

κυνηγετικό όπλο) με τη χρήση βαλλιστικής συσκευής που ονομάζεται **διαγονιδιακό πιστόλι** (gene gun). Το «γονιδιακό πιστόλι», αν και αναπτύχθηκε αρχικά στα φυτά, σήμερα χρησιμοποιείται και για την άμεση εισαγωγή DNA σε ζωικά κύτταρα, είτε βρίσκονται σε καλλιέργεια είτε απευθείας στους ιστούς που σχηματίζουν.

Ένας ακόμη τρόπος εισαγωγής εξωγενούς υλικού σε ζωικά κύτταρα είναι με τη χρήση ιών, που από τη φύση τους αποτελούν πολύ αποτελεσματικά συστήματα μεταφοράς γονιδίων. Οι ιοί αναπτύσσονται μόνο μέσα στο κυτταρικό περιβάλλον και για το λόγο αυτό είναι υποχρεωμένοι να εισάγουν το γονιδίωμά τους στα κύτταρα προκειμένου να πολλαπλασιαστούν. Χάρη στην εξέλιξη και στη φυσική επιλογή έχουν αναπτύξει έξυπνους τρόπους για να το πετυχαίνουν αυτό. Μάλιστα, οι πρώτες μέθοδοι μεταφοράς γονιδίων σε βακτήρια έγιναν με τη βοήθεια βακτηριοφάγων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως μέχρι και σήμερα για τη μεταφορά γονιδίων. Η στρατηγική είναι απλή: το γονιδίο-στόχος ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του φάγου και μεταφέρεται μέσα στο κύτταρο μετά τη μόλυνση με το φάγο.

Οι πρώτοι **υικοί φορείς** για κύτταρα θηλαστικών βασίστηκαν στον ογκογόνο ιό του πιθήκου SV40, στον οποίο οι επιστήμονες κατάφεραν να υποκαταστήσουν ορισμένα από τα γονίδια του με άλλα της επιλογής τους. Εντούτοις, η χρήση ιών όπως ο SV40 ήταν περιορισμένη, αφού μόνο μικρά

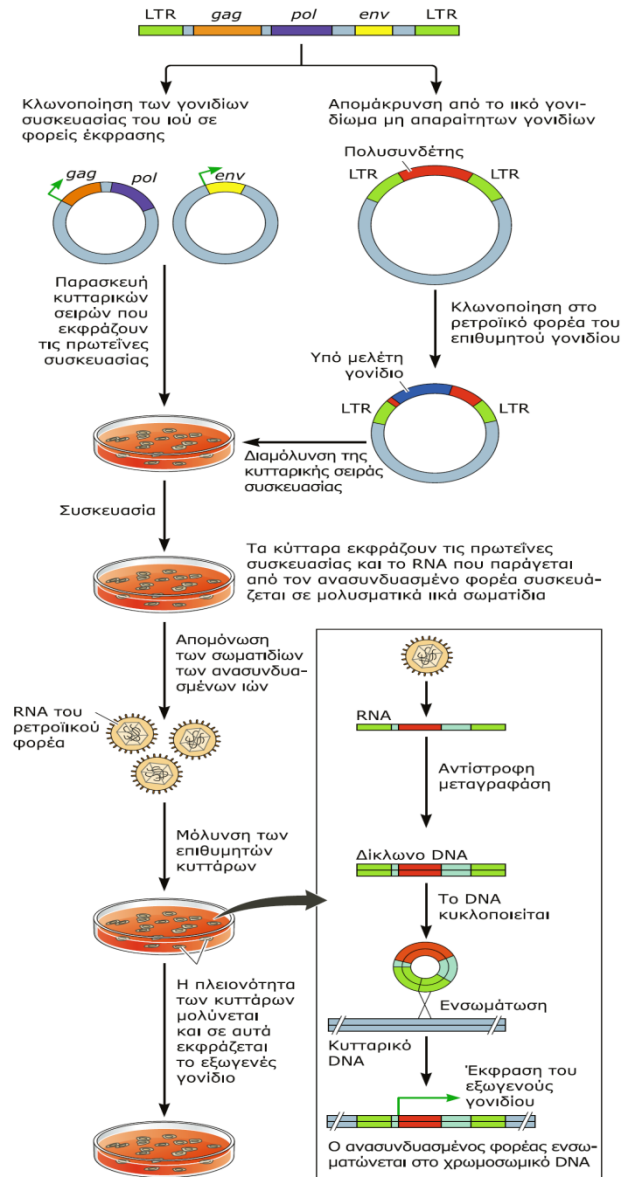


Εικόνα 15. Άμεση μεταφορά DNA σε φυτικά κύτταρα με βομβαρδισμό μικροσφαιριδίων.

γονίδια μπορούν να εντεθούν στο γονιδιώμα του. Η ιδέα, όμως, της υποκατάστασης γονιδίων διαφόρων ιών με άλλα (διαγονίδια) έτσι ώστε ο ίδιος ο ιός να μετατραπεί σε φορέας των γονιδίων αυτών, διερευνήθηκε σε πολλά διαφορετικά συστήματα.

Πολλοί ιοί είναι λυτικοί: αφού αντιγραφούν μέσα στα κύτταρα τα σκοτώνουν προκαλώντας τη λύση τους, ώστε να απελευθερωθούν και να μεταδώσουν τη μόλυνση. Γι αυτό και τέτοιοι ιοί δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς για τη μόνιμη εισαγωγή και σταθερή έκφραση ενός γονιδίου σε κύτταρα. Διάφοροι μη λυτικοί ιοί, όμως, που ανήκουν στις ομάδες των ρετροϊών (retroviruses), των αδενοϊών (adenoviruses) και των αδενο-σχετιζόμενων ιών (adeno-associated viruses) έχουν τροποποιηθεί έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά γονιδίων σε ζωικά κύτταρα. Οι ρετροϊοί, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται και οι λεντιοί, όπως ο HIV, αφού μολύνουν τα κύτταρα, χρησιμοποιούν την αντίστροφη μεταγραφή τους για να μετατρέψουν το γονιδιώμα τους από RNA σε DNA. Στη συνέχεια, αυτό το ιικό DNA ενσωματώνεται στο γονιδιώμα του ξενιστή με τη μορφή «προϊού», όπου παραμένει μόνιμα και αντιγράφεται μαζί με το DNA του ξενιστή σε κάθε κυτταρική διαίρεση. Σε αντίθεση με τους ρετροϊούς, το γονιδιώμα των αδενοϊών και αδενο-σχετιζόμενων ιών είναι DNA. Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί ονομάστηκαν έτσι όχι επειδή συγγενεύουν με τους αδενοϊούς αλλά επειδή χρειάζονται τη βοήθεια ενός αδενοϊού προκειμένου να αντιγραφούν. Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί, όπως και οι ρετροϊοί, ενσωματώνονται στο γονιδιώμα, ενώ οι αδενοϊοί διατηρούνται ως εξωχρωμοσωμικά μόρια DNA. Οι παραπάνω ιοί προσφέρονται ιδιαίτερα ως φορείς, γιατί μπορούν να μολύνουν σχεδόν κάθε τύπο κυττάρου. Μάλιστα, παρόλο που οι περισσότεροι ρετροϊοί προσβάλλουν μόνο κύτταρα που διαιρούνται, οι λεντιοί, οι αδενοϊοί και αδενο-σχετιζόμενοι ιοί είναι σε θέση να μολύνουν και μη διαιρούμενα κύτταρα. Καθώς πολλά διαφοροποιημένα κύτταρα στον εγκέφαλο, στους μυς και σε άλλους ιστούς ενήλικων ατόμων δεν διαιρούνται, η ανάπτυξη των παραπάνω ιικών φορέων έχει διευρύνει σημαντικά το φάσμα των πειραμάτων που μπορούν να διεξαχθούν σε αυτούς του εξειδικευμένους κυτταρικούς ιστούς.

Οι ιικοί φορείς κατασκευάζονται αφαιρώντας τα περισσότερα από τα γονίδια του ιού, δημιουργώντας έτσι χώρο προκειμένου να



Εικόνα 16. Χρήση ενός ρετροϊικού φορέα για τη σταθερή και μακροπρόθεσμη έκφραση ενός εξωγενούς γονιδίου.

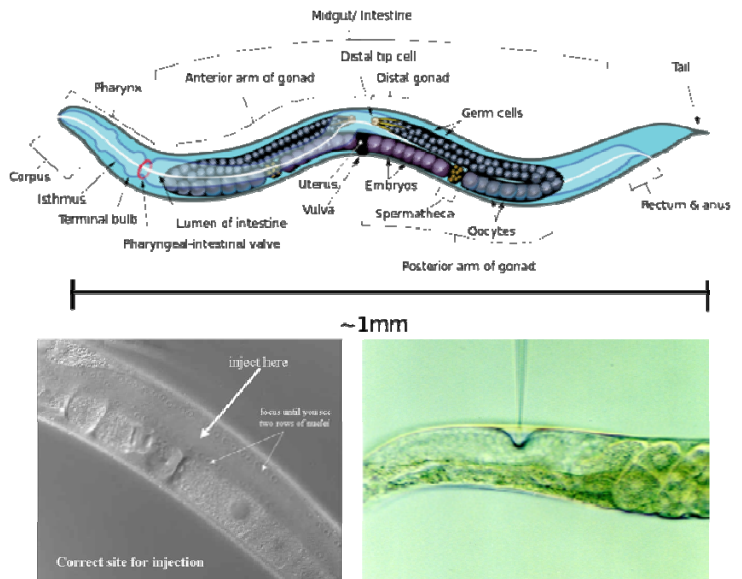
εισαχθούν τα γονίδια που μας ενδιαφέρουν (Εικόνα 16). για το λόγο αυτό, δεν έχουν πλέον την ικανότητα να αντιγράφονται αυτόνομα. Οι φορείς φέρουν συνήθως ένα δείκτη επιλογής, καθώς και το εξωγενές DNA που μεταφέρουν. Για την παρασκευή ανασυνδυασμένων ιικών σωματιών διαμολύνουμε κάποια κατάλληλη κυτταρική σειρά, που ονομάζεται κυτταρική σειρά συσκευασίας (packaging cell line), με ανασυνδυασμένο, γυμνό ιικό DNA. Τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς συσκευασίας φέρουν έναν προϊό ενσωματωμένο σε κάποιο χρωμόσωμά τους, με όλα τα γονιδιά του ακέραια, ο οποίος όμως δε διαθέτει την αλληλουχία που κατευθύνει τη συσκευασία του γονιδιώματός του μέσα στις ιικές πρωτεΐνες του

περιβλήματος. Επομένως, αυτός ο «βοηθητικός» προϊός παράγει όλες τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη συγκρότηση μολυσματικών ικών σωματίων, αλλά το δικό του γονιδίωμα δεν είναι σε θέση να συσκευαστεί σε αυτά. Οι ανασυνδυασμένοι ρετροϊκοί φορείς φέρουν το εξωγενές DNA ενσωματωμένο ανάμεσα στις αλληλουχίες που κατευθύνουν τη συσκευασία τους, έτσι ώστε το RNA που συντίθεται από αυτό να συσκευάζεται σε μολυσματικά σωματίδια τα οποία ελευθερώνονται από το κύτταρο. Τα ανασυνδυασμένα ιικά στελέχη που προκύπτουν (τα οποία φέρουν το γονίδιο που μας ενδιαφέρει αλλά δε διαθέτουν, όπως ο ιός αγρίου τύπου, την ικανότητα παραγωγής νέων μολυσματικών σωματίων) μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να μολύνουν διάφορα κύτταρα-στόχους. Κατά τη μόλυνση, το ανασυνδυασμένο γονιδίωμα μεταγράφεται αντίστροφα σε DNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης και κατόπιν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή.

Οι αδενοϊκοί φορείς εισέρχονται στον πυρήνα, αλλά δεν αντιγράφονται. Παρόμοια, οι αδενοσχετιζόμενοι ιοί εισέρχονται στον πυρήνα, όπου το γονιδίωμά τους (το οποίο αποτελείται από μονόκλωνο DNA) μετατρέπεται σε δίκλωνο και κατόπιν ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου-ξενιστή. Και στις δύο περιπτώσεις, το κύτταρο εκφράζει το νέο γονίδιο που έχει εισαχθεί με τη βοήθεια του ιού, αλλά δεν παράγει ποτέ ιούς, διότι το ανασυνδυασμένο γονιδίωμα του ιού στερείται τα απαραίτητα ιικά γονίδια.

Δημιουργία διαγονιδιακών σκωλήκων *Caenorhabditis elegans*

Διαγονιδιακοί *C. elegans* δημιουργούνται με απευθείας ένεση του DNA, που έχει απομονωθεί από βακτηριακούς κλώνους (Εικόνα 17). Η στρατηγική που χρησιμοποιείται βασίζεται στην κατανόηση της βιολογίας αναπαραγωγής του σκώληκα αυτού. Οι γονάδες του σκώληκα είναι συνκυτιακές, δηλαδή υπάρχουν πολλοί πυρήνες μέσα σε μία γονάδα. Ένα συνκυτιακό κύτταρο αποτελεί ένα μεγάλο μέρος του ενός βραχίονα της γονάδας και το άλλο συνκυτιακό κύτταρο του άλλου. Οι πυρήνες δεν σχηματίζουν κύτταρα μέχρι τη μείωση, όταν ξεκινάει και ο σχηματισμός αυγών και σπερματοζωαρίων. Το διάλυμα DNA ενίεται στη



Εικόνα 17. Δημιουργία διαγονιδιακών σκωλήκων.

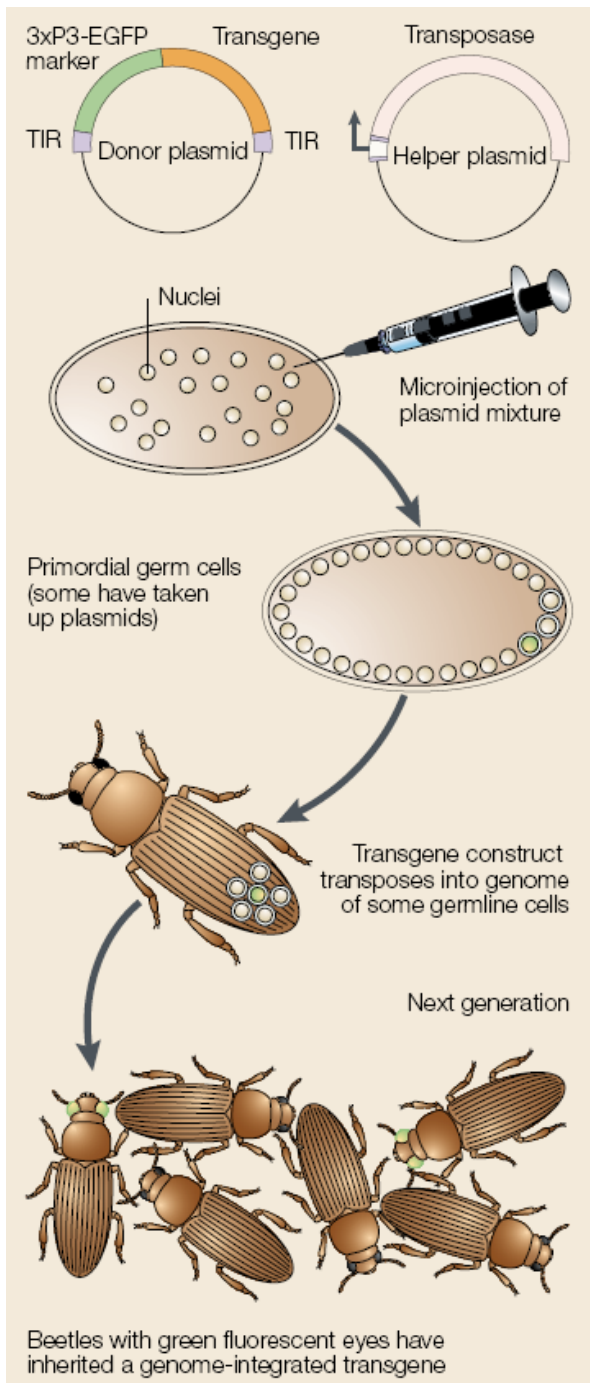
συνκυτιακή περιοχή σε έναν από τους δύο βραχίονες, εκθέτοντας έτσι περισσότερους από 100 πυρήνες πρόδρομων γαμετικών κυττάρων στο μετασχηματιζόμενο DNA. Εντελώς τυχαία, κάποιος από αυτούς τους πυρήνες θα ενσωματώσει το DNA αυτό κατά τις μειωτικές διαιρέσεις. Ας θυμηθούμε ότι η πυρηνική μεμβράνη διαλύεται κατά τη μίτωση και μείωση και έτσι το κυτταρόπλασμα μέσα στο οποίο έχουμε ενέσει το DNA γίνεται ένα συνεχές με το πυρηνόπλασμα για ένα μέρος του κυτταρικού κύκλου.

Δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων

Το πρώτο έντομο που μετασχηματίστηκε ήταν η φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*. Ο μηχανισμός μετασχηματισμού βασίστηκε στις ιδιότητες ενός μεταθετού στοιχείου, του P. Τα μεταθετά στοιχεία είναι τμήματα DNA που έχουν την ικανότητα να μετατίθενται από ένα σημείο σε άλλο μέσα στο γονιδίωμα που τα περιέχει. Έχουν ανακαλυφθεί πολλά συστήματα μεταθετών στοιχείων από διάφορα έντομα, όπως το Hobo, Mariner, Minos, PiggyBac και άλλα. Αυτό που χρησιμοποιείται πιο ευρέως σήμερα είναι το PiggyBac, λόγω της αποτελεσματικότητάς του σε πολλά διαφορετικά έντομα αλλά και της ευκολίας στη χρήση του.

Η παραγωγή διαγονιδιακών εντόμων απαιτεί την ταυτόχρονη εισαγωγή δύο διαφορετικών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (Εικόνα 18). Το ένα

περιέχει τα άκρα του μεταθετού (TIR: Terminal Inverted Repeats), ανάμεσα στα οποία έχει τοποθετηθεί το διαγονίδιο που μας ενδιαφέρει και ότι άλλο χρειάζεται. Το άλλο, ο βοηθός, περιέχει την τρανσποζάση, αλλά όχι τα κατάλληλα άκρα. Έτσι, η τρανσποζάση θα κόψει το τμήμα ανάμεσα στα TIRs του πρώτου πλασμιδίου και θα το ενσωματώσει στο γονιδίωμα του εντόμου. Το πλασμίδιο βοηθός, όμως, επειδή δεν φέρει TIRs δεν θα ενσωματωθεί και στη συνέχεια θα αποικοδομηθεί.



Εικόνα 18. Δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων.

Όπως και στο *C. elegans*, το DNA ενίεται σε ένα συνκύτιο, στην περίπτωση αυτή ένα πρώιμο έμβryo εντόμου. Το DNA ενίεται ειδικά στο πίσω άκρο του συνκυτιακού αυγού, αφού εκεί βρίσκονται οι πυρήνες που θα οδηγήσουν στη δημιουργία των γονάδων. Τα ενήλικα άτομα που θα αναπτυχθούν από αυτά τα αυγά θα περιέχουν ορισμένα διαγονιδιακά γαμετικά κύτταρα αλλά τα σωματικά τους κύτταρα δεν θα περιέχουν το διαγονίδιο.

Οι απόγονοι των εντόμων (F1) στα οποία το διαγονίδιο είχε ενσωματωθεί σε γαμετικά κύτταρα θα εκφράσουν το διαγονίδιο. Για την ευκολότερη διαλογή και παρακολούθηση των διαγονιδιακών απογόνων, στην αρχική κατασκευή του ανασυνδυασμένου μεταθετού έχει προστεθεί και ένας γενετικός δείκτης (πχ EGFP).

Σήμερα, μεγάλες προσπάθειες καταβάλλονται για τη δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων γεωργικής και υγειονομικής σημασίας τα οποία θα μπορούσαν να δώσουν λύσεις σε σημαντικά εντομολογικά προβλήματα. Για παράδειγμα, κάποιες προσπάθειες εντοπίζονται στη δημιουργία διαγονιδιακών ανωφελών κουνουπιών που είναι ανίκανα να μεταδώσουν ελονοσία, μία από τις πιο θανατηφόρες νόσους στην Αφρικανική Ήπειρο. Έτσι, αν μπορούσαμε να αντικαταστήσουμε τους φυσικούς πληθυσμούς ανωφελών κουνουπιών με τα διαγονιδιακά, θα μειωνόταν η νόσος χωρίς να εξαλειφθούν τα κουνούπια. Άλλες προσπάθειες συγκεντρώνονται στη δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών της Μεσογειακής μύγας. Η μύγα αυτή αφήνει τα αυγά της σε πάνω από 200 διαφορετικά είδη φρούτων και λαχανικών. Οι προνύμφες που εκκολάπτονται τρέφονται από τα φρούτα αυτά, καταστρέφοντάς τα. Η δημιουργία διαγονιδιακών αρσενικών μυγών που μεταφέρουν παράγοντες στειρότητας στο σπέρμα τους θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη μείωση των φυσικών πληθυσμών.

Βιβλιογραφία

Brown TA (2007). Γονιδιώματα – Σύγχρονες Ερευνητικές Προσεγγίσεις. Πρώτη Ελληνική Έκδοση (μετάφραση της 3^{ης} αγγλικής έκδοσης), Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης (2010).

Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB (2008). Biology. Pearson International, Eight Edition.

Griffiths AJF, Gelbart WM, Lewontin RC, Miller JH (2002). Modern genetic analysis: integrating genes and genomes. WH Freeman and Co, Second Edition.

Russel PJ (2009). i Genetics. Πρώτη Ελληνική Έκδοση (Μετάφραση της Πρώτης Αγγλικής Έκδοσης), Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & Σία.

Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA (2007). Ανασυνδυασμένο DNA, Γονίδια και Γονιδιώματα – Μια συνοπτική παρουσίαση. Πρώτη Ελληνική Έκδοση (μετάφραση της 3^{ης} αγγλικής έκδοσης), Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & Σία (2007).