

Εφαρμογές Βιοτεχνολογίας στην Ιατρική

- Η Βιοτεχνολογία συμβάλλει στην πρόληψη, έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία μιας ασθένειας. Η **έγκαιρη διάγνωση** απαιτεί ανάπτυξη ευαίσθητων τεχνικών που μπορούν να εντοπίσουν την ασθένεια στα αρχικά της στάδια, πριν εμφανιστούν τα συμπτώματά της ή να ανιχνεύσει μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς ή να διαπιστώσει ύπαρξη κληρονομικής ασθένειας.
- Η **πρόληψη** σοβαρών ασθενειών (ηπατίτιδα Β, πολιομυελίτιδα, φυματίωση κ.ά.) χρειάζεται πιο εξελιγμένα, ασφαλή και οικονομικά προσιτά εμβόλια, ενώ απαιτείται η ανάπτυξη εμβολίων για πρόληψη του AIDS, της μηνιγγίτιδας και του καρκίνου.
- Η **αποτελεσματική θεραπεία** προϋποθέτει κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών και του γενετικού υπόβαθρου της ασθένειας για να εφαρμοστεί η κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή ή η γενετική επιδιόρθωση της βλάβης.
- Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, της τεχνικής PCR και των μορίων-ανιχνευτών βελτίωσε την παραγωγή ευρείας κλίμακας διαγνωστικών ουσιών (μονοκλωνικά αντισώματα), εμβολίων και φαρμακευτικών προϊόντων. Η **γονιδιακή θεραπεία** στηρίζεται στη εφαρμογή τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA για θεραπεία γενετικών ασθενειών (κυστική ίνωση, AIDS και τύπων καρκίνου)

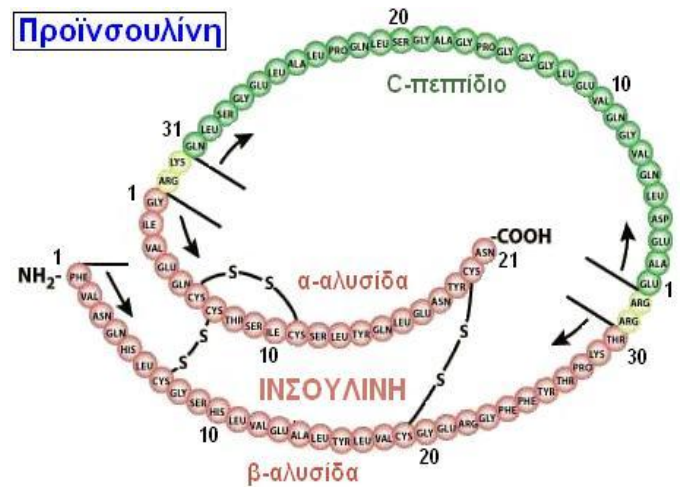
Σύνθεση πρωτεϊνών από βακτήρια με Γενετική Μηχανική

- Πάνω από 300 **φαρμακευτικές πρωτεΐνες** παράγονται πλέον φτηνότερα, σε σημαντικότερες ποσότητες με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, με κλωνοποίηση των γονιδίων του ανθρώπου. Μεταξύ των πρώτων που παρασκευάστηκαν είναι η ινσουλίνη, οι ιντερφερόνες και η αυξητική ορμόνη.

Φαρμακευτικές πρωτεΐνες με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA			
<i>Πρωτεΐνη</i>	<i>Χρήση ή Θεραπεία σε</i>	<i>Πρωτεΐνη</i>	<i>Χρήση ή Θεραπεία σε</i>
α ₁ -αντιθρυψίνη	εμφύσημα	παράγοντας VIII	αιμορροφιλία Α
καλσιτονίνη	οστεοπόρωση	παράγοντας IX	αιμορροφιλία Β
χοριονική γοναδοτροπίνη	γυναικεία στειρότητα	αυξητική ορμόνη	αχονδροπλασία
ενδορφίνες, εγκεφαλίνες	αναλγητικοί παράγοντες	ινσουλίνη	διαβήτη
επιδερμικός αυξητικός παράγων	τραύματα	ιντερλευκίνες	καρκίνο, ανοσοποιητικό
Παράγων νέκρωσης όγκων	αντικαρκινικός παράγων	ερυθροποιητίνη	αναιμία
Ενεργοποιητής πλασμινογόνου (tPA)	θρομβολυτικός παράγων	Ιντερφερόνες α,β,γ	αντιιικοί-αντικαρκινικοί παράγοντες

- Η **ινσουλίνη** είναι ορμόνη αποτελούμενη από 51 αμινοξέα που παράγεται σε ειδικά κύτταρα του παγκρέατος και ρυθμίζει το μεταβολισμό των υδατανθράκων (ειδικά της γλυκόζης) στο αίμα. Ο διαβήτης είναι ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μείωση ή έλλειψη ινσουλίνης και από αυτόν πάσχουν πάνω από 60.000.000 άτομα στον κόσμο.
- Η ινσουλίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των διαβητικών. Πριν το 1982 οι πηγές ινσουλίνης ήταν το πάγκρεας από χοίρους και βοοειδή και παραγόταν από εκχύλιση των ιστών αυτών. Η ινσουλίνη αυτή είχε μικροδιαφορές στη σύσταση από την ανθρώπινη προκαλώντας αλλεργικές αντιδράσεις ενώ ήταν δαπανηρή.
- Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο μικρά πεπτίδια, Α και Β, που συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Το γονίδιο της ινσουλίνης παράγει την **προϊνσουλίνη** που τελικά μετατρέπεται σε ινσουλίνη.

- Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της ανθρώπινης ινσουλίνης από βακτήρια είναι η παραγωγή της προΐνσουλίνης σε βακτηριακή καλλιέργεια και η ενζυμική μετατροπή της σε ινσουλίνη. Κατασκευάζεται cDNA βιβλιοθήκη από κύτταρα παγκρέατος που εκφράζουν το γονίδιο ινσουλίνης και επιλογή του κλώνου που περιέχει το γονίδιο, με τα εξής στάδια κλωνοποίησης και απομόνωσης του γονιδίου :



- απομόνωση συνολικού mRNA από κύτταρα ανθρώπινου παγκρέατος
 - κατασκευή δίκλωνων μορίων cDNA και ενσωμάτωση σε πλασμίδια
 - μετασχηματισμός βακτηρίων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και πολλαπλασιασμός τους σε θρεπτικό υλικό
 - επιλογή βακτηρίων που περιέχουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την προΐνσουλίνη
 - ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών σε βιοαντιδραστήρα, συλλογή της προΐνσουλίνης και μετατροπή της σε ινσουλίνη από ένζυμο που αφαιρεί το ενδιάμεσο πεπτιδίο
- Οι **ιντερφερόνες** είναι αντιϊκές πρωτεΐνες που παράγουν κύτταρα μολυσμένα 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 συγγενείς πρωτεΐνες ταξινομούμενες σε 3 ομάδες (α, β, γ) ανάλογα με τη βιοχημική ενεργότητά τους. Ενδιαφέρουν σαν αντιϊκοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Παράγονται σε ελάχιστα ποσά στο σώμα όμως η παραγωγή τους σήμερα σε πολύ μεγάλα ποσά γίνεται με μέθοδο παρόμοια με αυτή της παραγωγής ινσουλίνης.

Μονοκλωνικά αντισώματα

- Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικά μόρια παραγόμενα από τα Β-λεμφοκύτταρα όταν ένα αντιγόνο (μικροοργανισμός, ιός ή ξένο υλικό) προσβάλλει τον οργανισμό. Τα αντισώματα αντιδρούν με το αντιγόνο και το εξουδετερώνουν.
- Ένα αντίσωμα αναγνωρίζει μόνο μία συγκεκριμένη περιοχή του αντιγόνου, τον **αντιγονικό καθοριστή**. Ένα μεγάλο αντιγόνο (μικροοργανισμός) έχει πολλούς αντιγονικούς καθοριστές και άρα παράγονται πολλά είδη αντισωμάτων εναντίον του.
- Κάθε είδος αντισώματος που αναγνωρίζει έναν αντιγονικό καθοριστή, παράγεται από μια ομάδα όμοιων Β-λεμφοκυττάρων (έναν κλώνο) και ονομάζονται **μονοκλωνικά**.
- Τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται στην Ιατρική σαν διαγνωστικά για την ανίχνευση ασθενειών ή σαν εξειδικευμένα φάρμακα εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών ή καρκινικών κυττάρων επομένως είναι σημαντική η παραγωγή τους σε μεγάλες ποσότητες. Όμως τα Β-λεμφοκύτταρα δεν επιβιώνουν για πολύ έξω από το σώμα και δεν διατηρούνται σε κυτταροκαλλιέργειες. Αυτή την ιδιότητα την αποκτούν όταν συντηχθούν με καρκινικά κύτταρα οπότε προκύπτουν τα **υβριδώματα** που μπορούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες αντισώματος.
- Η τεχνική παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων αναπτύχθηκε μετά το 1975. Ένα

επιλεγμένο αντιγόνο χορηγείται με ένεση σε ποντίκι οπότε προκαλείται ανοσολογική αντίδραση με αποτέλεσμα να αρχίσει η παραγωγή αντισωμάτων από εξειδικευμένα Β-λεμφοκύτταρα. Δύο εβδομάδες μετά αφαιρείται ο σπλήνας και απομονώνονται τα Β-λεμφοκύτταρα που συντήκονται κατόπιν με καρκινικά κύτταρα οπότε δημιουργούνται τα υβριδώματα που παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα. Τα υβριδώματα μπορούν να φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στην κατάψυξη (-80 °C).

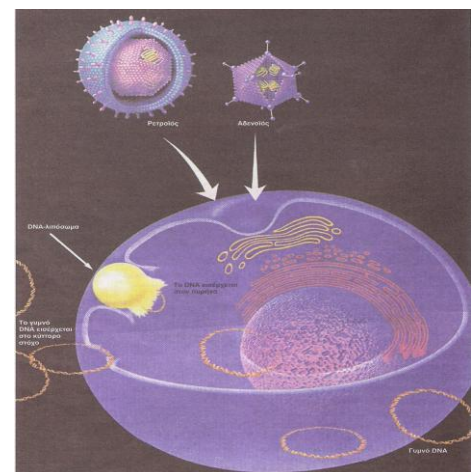
- Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν τις παρακάτω εφαρμογές :
 - **Ανοσοδιαγνωστικά.** Επειδή τα μονοκλωνικά αναγνωρίζουν έναν αντιγονικό καθοριστή μπορούν να ανιχνεύσουν στα υγρά του σώματος (αίμα, ούρα κ.ά.) ουσίες υπεύθυνες για ασθένειες, παθογόνους μικροοργανισμούς ή διακύμανση της συγκέντρωσης προϊόντων του μεταβολισμού που προοιωνίζει εμφάνιση κάποιας ασθένειας. Η ανίχνευση είναι γρήγορη, απλή, ευαίσθητη, ακριβής και επιτρέπει διάγνωση ασθενειών σε πολύ αρχικά στάδια πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων. Μπορούν να συνεισφέρουν στην αύξηση της ευαισθησίας κλινικών δοκιμασιών (προσδιορισμός ομάδων αίματος, εξακρίβωση πιθανής κύησης). Ειδικά ανοσοδιαγνωστικά τεστ κατασκευάστηκαν που περιέχουν μονοκλωνικά αντισώματα για ειδικές ορμόνες που παράγονται κατά την κύηση.
 - **Θεραπευτικά.** Έχουν εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν στην εξωτερική τους επιφάνεια μεγάλη ποικιλία αντιγόνων που δεν υπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά αντιγόνα. Έτσι μπορούν να κατασκευαστούν μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον αυτών των αντιγόνων, οπότε είναι πολύ ειδικά μόνο για τα καρκινικά κύτταρα και μπορούν έτσι να γίνουν μεταφορείς ισχυρών αντικαρκινικών φαρμάκων. Όταν εισαχθούν στον οργανισμό, βρίσκουν και προσβάλλουν τους καρκίνους στόχους και τα αντικαρκινικά φάρμακα που είναι συνδεδεμένα μ' αυτά δρουν κατευθείαν στα καρκινικά κύτταρα και τα καταστρέφουν. Επιτρέπουν επομένως τη θεραπεία χωρίς χειρουργική επέμβαση ή χημειοθεραπεία που έχει δυσάρεστες επιπτώσεις.
 - **Επιλογή συμβατών οργάνων προς μεταμόσχευση.** Τα κύτταρα των οργάνων έχουν στην επιφάνειά τους ειδικά αντιγόνα επιφανείας που αναγνωρίζονται από ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα. Με τα μονοκλωνικά μπορεί να γίνει έλεγχος των οργάνων δωρητών για να διαπιστωθεί αν ταιριάζουν ανοσολογικά με αυτά των ασθενών, οπότε αποφεύγεται η απόρριψη του μοσχεύματος.

Γονιδιακή θεραπεία

- Πάνω από 4000 ασθένειες οφείλονται σε γονιδιακές μεταλλάξεις και εμφανίζονται σε μεγάλες ηλικίες. Μερικές οφείλονται σε ένα μόνο γονίδιο, άλλες σε αλληλεπίδραση δύο ή περισσότερων γονιδίων και πολλές σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (ακτινοβολία, χημικές ουσίες). Όλες σχεδόν προκαλούν δυσμορφίες, το 80 % διανοητική καθυστέρηση και το 20 % θάνατο σε παιδική ηλικία.
- Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA σε συνδυασμό με γενεαλογικά δέντρα οδήγησε στον εντοπισμό της θέσης στα χρωμοσώματα (**χαρτογράφηση**) πολλών μεταλλαγμένων γονιδίων που προκαλούν ασθένειες. Επίσης ορισμένα μεταλλαγμένα γονίδια κλωνοποιήθηκαν για να συγκριθούν με τα φυσιολογικά αλληλόμορφα και να

εξακριβωθεί το είδος των μεταλλάξεων (όπως στην κυστική ίνωση, την ασθένεια του Huntington, την μυϊκή δυστροφία του Duchenne κ.ά.).

- Οι γνώσεις αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη θεραπειάς που στηρίζεται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και ονομάζεται **γονιδιακή θεραπεία**. Στόχος της είναι να διορθώσει τη γενετική βλάβη εισάγοντας στον ασθενή το φυσιολογικό αλληλόμορφο του μεταλλαγμένου. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας είναι η κλωνοποίηση του υπεύθυνου γονιδίου και ο προσδιορισμός των κυττάρων που εμφανίζουν τη βλάβη από την ασθένεια.
- Η γονιδιακή θεραπεία πρωτοεφαρμόστηκε το 1990 σε ένα τετράχρονο κορίτσι που έπασχε από ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος οφειλόμενη σε έλλειψη του ενζύμου **απαμινάση της αδενοσίνης (ADA)** το οποίο συμμετέχει στο μεταβολισμό των πουρινών (A, G) στα κύτταρα του μυελού των οστών. Η έλλειψη αυτή οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που παράγει το ένζυμο ADA. Η ασθένεια εμφανίζει αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας και οι ασθενείς πάσχουν από χρόνιες μολύνσεις, έχουν προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου και πολλοί πεθαίνουν σε λίγους μήνες.
- Η διαδικασία γονιδιακής θεραπείας που εφαρμόστηκε ήταν η εξής :
 - Λεμφοκύτταρα του παιδιού παραλαμβάνονται και πολλαπλασιάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες
 - Το φυσιολογικό γονίδιο της απαμινάσης της αδενοσίνης ενσωματώνεται σε ιό-φορέα (που έχει καταστεί αβλαβής) με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA
 - Ο γενετικά τροποποιημένος ιός εισάγεται στα λεμφοκύτταρα
 - Τα γενετικά τροποποιημένα λεμφοκύτταρα εισάγονται με ενδοφλέβια ένεση στο παιδί και παράγουν το ένζυμο ADA.
- Τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα δεν ζουν για πάντα μέσα στον οργανισμό οπότε χρειάζεται συνεχής έγχυση τέτοιων κυττάρων. Τα άτομα όμως αυτά μπορούν να ζουν φυσιολογικά κάνοντας τακτική θεραπεία.
- Ο τύπος αυτής της γονιδιακής θεραπείας ονομάζεται **ex vivo** γιατί τα κύτταρα τροποποιούνται εκτός οργανισμού και κατόπιν εισάγονται και πάλι σ' αυτόν.
- Κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά, να αναπτυχθούν σε κυτταροκαλλιέργειες και να εισαχθούν με ένεση στον οργανισμό.
- Ο Anderson και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν έξυπνους φορείς που προσβάλλουν τα κύτταρα του ιστού που πάσχει, δηλαδή τα φυσιολογικά γονίδια ενσωματώνονται σε μόρια φορείς που εισάγονται κατευθείαν στον οργανισμό. Αυτή η γονιδιακή θεραπεία ονομάστηκε **in vivo** και εφαρμόστηκε το 1993 για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης.

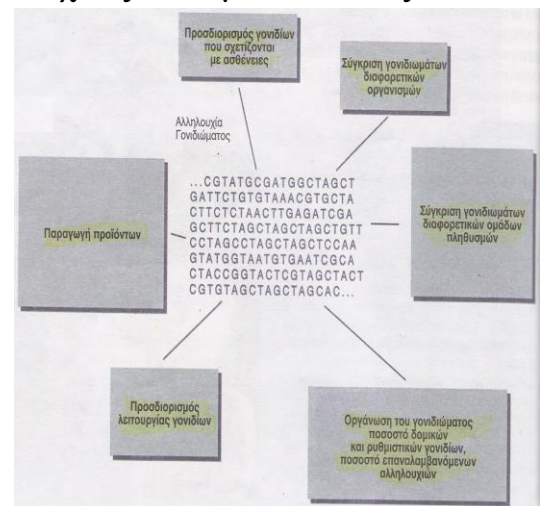


Γονιδιακή θεραπεία in vivo
(εισαγωγή φυσιολογικού γονιδίου μέσω ιών,
λιποσωμάτων ή γυμνού DNA)

- Η κυστική ίνωση οφείλεται σε μετάλλαξη ενός γονιδίου (7^ο χρωμόσωμα) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (CFTR=Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων των πνευμόνων (έλεγχος διέλευσης χλωρίου μέσω της κυτταρικής μεμβράνης) και παρουσιάζει αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας.
- Το φυσιολογικό γονίδιο ενσωματώθηκε σε έναν αδενοϊό. Ο ανασυνδυασμένος ιός εισήλθε στον οργανισμό με ψεκάσμο με τη βοήθεια βρογχοσκοπίου και μόλυνε τα κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος. Μετά την εισαγωγή του στα κύτταρα, το φυσιολογικό γονίδιο ενσωματώθηκε στο γονιδιώμα τους και παρήγαγε το φυσιολογικό προϊόν.
- Η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας είναι ακόμα περιορισμένη διότι υπάρχουν προβλήματα με τη χρήση των φορέων. Αν και καθίστανται αβλαβείς, υπάρχει μικρή πιθανότητα να προκαλέσουν παρενέργειες και σε μερικές περιπτώσεις καρκίνο. Με τις μεθόδους της γονιδιακής θεραπείας δεν αντικαθίσταται το μεταλλαγμένο γονίδιο στα κύτταρα του οργανισμού αλλά ενσωμάτωση του φυσιολογικού γονιδίου στο γονιδίωμα μερικών σωματικών κυττάρων και συνεπώς δεν μεταβιβάζεται στους απογόνους.

Πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος

- Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από 3×10^9 ζεύγη βάσεων DNA καταναμημένα σε χρωμοσώματα. Το 1986 ξεκίνησε 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 άρχισε το 1990 και χάρις στην αυτοματοποίηση των εργαστηριακών μεθόδων ολοκληρώθηκε το 2001.
- Η ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος συμβάλει :
 - Στη μελέτη της οργάνωσης και λειτουργίας του γονιδιώματος. Προσδιορίστηκαν το σύνολο των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (<40.000), οι ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών και οι περιοχές με άγνωστη λειτουργία.
 - Στην ανάπτυξη μεθοδολογίας διάγνωσης και θεραπείας ασθενειών με την εύρεση της θέσης και της αλληλουχίας των γονιδίων που σχετίζονται με ασθένειες.
 - Στη μελέτη της εξέλιξης του ανθρώπινου γονιδιώματος. Γι' αυτό παράλληλα προγράμματα προσδιορισμού της αλληλουχίας άλλων ειδών (πρόβατο, σκύλος, αγελάδα, έντομα, γεωσκώληκας, μικροοργανισμοί) θα αποκαλύψουν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ειδών
 - Στη μαζική παραγωγή προϊόντων με τις μεθόδους της Βιοτεχνολογίας μετά την απομόνωση των γονιδίων που είναι χρήσιμα στη Γεωργία, την Κτηνοτροφία, την Φαρμακοβιομηχανία και τη Βιομηχανία.



Εφαρμογές προγράμματος ανθρώπινου γονιδιώματος