

Wiel P. M. Hoekstra και Sjef C. M. Smeebens

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Ουτρέχτης, Ολλανδία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Έχουν διατυπωθεί πολλοί διαφορετικοί ορισμοί για τη βιοτεχνολογία και, από αυτούς, μπορούν να συναχθούν ειδικοί ορισμοί για τη φαρμακευτική βιοτεχνολογία. Γενικά, με τον όρο «βιοτεχνολογία» εννοείται η χρήση μικροοργανισμών, φυτών, ζώων ή τμημάτων αυτών για την παραγωγή χρήσιμων χημικών ενώσεων. Κατά συνέπεια, ως φαρμακευτική βιοτεχνολογία θα πρέπει να θεωρείται η βιοτεχνολογική παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων.

Κάποιες μορφές βιοτεχνολογίας υπήρχαν ήδη σε αρχαίες εποχές. Στη Βίβλο καταγράφονται οι αρχαίες ρίζες της βιοτεχνολογίας, καθώς αναφέρεται ότι ο Νώε γνώριζε πώς να φτιάχνει κρασί από σταφύλια. Επί πολλούς αιώνες τα βιοτεχνολογικά προϊόντα (βιοπροϊόντα) παράγονταν με εμπειρικό και παραδοσιακό τρόπο κατ' οίκον, χωρίς κατανόηση των βασικών επιστημονικών αρχών.

Η φύση των παραδοσιακών αυτών μεθόδων διευκρινίστηκε το 1870, όταν ο Παστέρ έδειξε ότι οι χημικές μετατροπές κατά τις διεργασίες αυτές επιτελούνται από ζωντανά κύτταρα και συνεπώς θα πρέπει να θεωρούνται βιοχημικές μετατροπές. Από εκείνη τη στιγμή, η βιοτεχνολογία έγινε πλέον επιστήμη. Κατά τις επόμενες δεκαετίες οι γνώσεις μας αυξήθηκαν και διαπιστώθηκε ο ρόλος των ενζύμων ως καταλυτών των περισσότερων βιοχημικών μετατροπών. Με βάση τις γνώσεις αυτές αναπτύχθηκαν εργαλεία που ελέγχουν και βελτιώνουν σε κάποιο βαθμό τις παραδοσιακές μεθόδους.

Μια άλλη, πολύ σημαντική επανάσταση πραγματοποιήθηκε μετά την ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας. Η θεωρία που διατυπώθηκε από τους πρωτοπόρους της Μοριακής Βιολογίας το 1950 περίπου, σύμφωνα με την οποία το DNA κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες και συνεπώς ελέγχει όλες τις κυτταρικές διεργασίες, αποτέλεσε το έναυσμα για μια νέα εποχή στη βιοτεχνολογία. Η ταχεία εξέλιξη των τεχνολογιών χειρισμού του DNA, μετά την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυσασμένου DNA κατά τη δεκαετία του 1970, επέτρεψε στους

βιοτεχνολόγους να ελέγξουν την έκφραση των γονιδίων στους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται για τη βιοτεχνολογική παραγωγή. Επιπλέον, οι νέες τεχνολογίες προσέφεραν μεθόδους εισαγωγής ξένου DNA σε οργανισμούς κάθε είδους. Όπως θα αναφέρουμε αργότερα, τέτοιοι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί προσέφεραν άπειρες νέες δυνατότητες στη βιοτεχνολογία. Η νέα μορφή της βιοτεχνολογίας, βασισμένη στη λεπτομερή γνώση του μορίου του DNA και στην ανάπτυξη τεχνικών τροποποίησης του DNA, ονομάζεται «Μοριακή Βιοτεχνολογία». Οι δυνατότητες που προσφέρουν οι μοριακές μέθοδοι στην περαιτέρω ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας ήταν προφανείς, αν και μερικές φορές οδήγησαν σε υπερβολικές προσδοκίες. Ταυτόχρονα όμως η βιοτεχνολογία αποτέλεσε αντικείμενο δημόσιας αντιπαράθεσης, κατά την οποία τέθηκε και το σημαντικό ζήτημα των πιθανών κινδύνων: Μήπως οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις εγκαταστάσεις παραγωγής συνιστούν πηγή άγνωστων κινδύνων για τα οικοσυστήματα και για τον άνθρωπο; Τέθηκε επίσης ένα σοβαρό ηθικό ζήτημα: Είναι σωστό να τροποποιείται η γενετική δομή ζωντανών οργανισμών;

Στο κεφάλαιο αυτό θα εστιάσουμε κυρίως στη νέα βιοτεχνολογία, περιγράφοντας τις μεθόδους και τους στόχους της. Αναφορικά με το ζήτημα των πιθανών κινδύνων από την τεχνολογία αυτή, θα περιοριστούμε στο να αναφέρουμε ότι λαμβάνονται κάθε είδους μέτρα ώστε να αποφευχθούν οι κίνδυνοι κατά τη χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών. Οι βιοηθικοί προβληματισμοί, αν και ενδιαφέρουντες, δεν εμπίπτουν στο αντικείμενο του κεφαλαίου αυτού.

ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Παρότι στη βιοτεχνολογία δεν χρησιμοποιούνται αποκλειστικά και μόνο κύτταρα, αλλά και ολόκληροι οργανισμοί ή και απομονωμένα συστατικά των κυττάρων, κάποιες βασικές γνώσεις κυτταρικής βιολογίας είναι απαραίτητες για την πλήρη κατανόηση της βιοτεχνολογίας.

Στη βιοτεχνολογία χρησιμοποιούνται κύτταρα από πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς. Δεν χρησιμοποιούνται μόνο προκαρυωτικά κύτταρα όπως τα απλά μονοκύτταρα βακτήρια, αλλά και ευκαρυωτικά κύτταρα όπως κύτταρα ανώτερων μικροοργανισμών, φυτών και ζώων. Αυτοί οι κυτταρικοί τύποι δεν εξετάζονται αναλυτικά. Στο κεφάλαιο αυτό θα εστιάσουμε κυρίως στις κοινές γενικές αρχές κυτταρικής βιολογίας και στις διαφοροποιήσεις που σχετίζονται με τη φαρμακευτική βιοτεχνολογία.

■ Το προκαρυωτικό κύτταρο

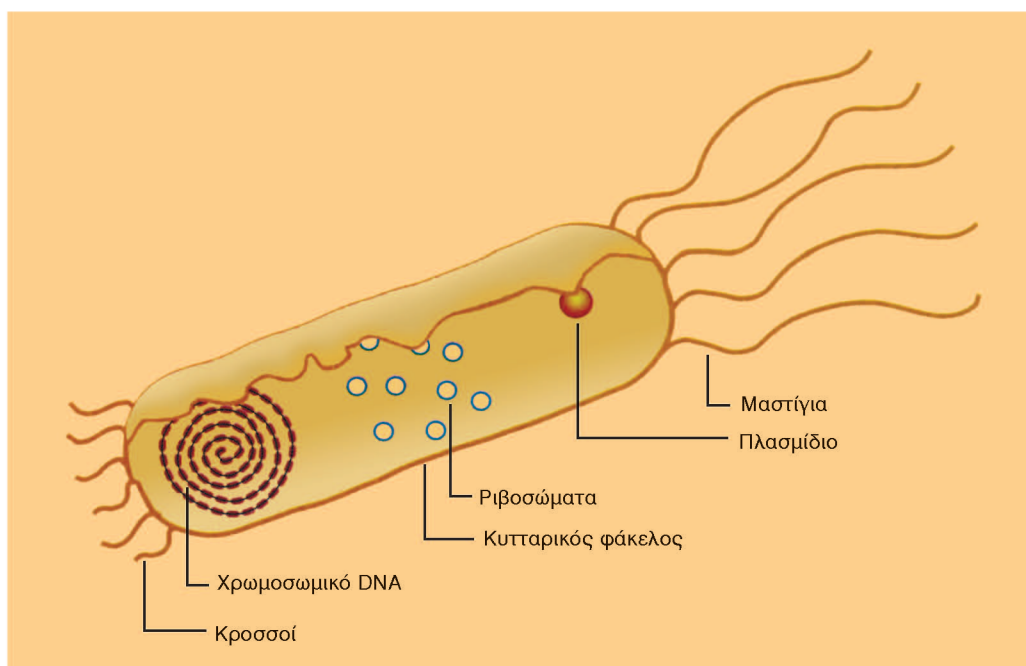
Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί, στους οποίους ανήκουν και τα βακτήρια, αποτελούν τα απλούστερα κύτταρα της φύσης. Ένα προκαρυωτικό κύτταρο φαίνεται σχηματικά στην Εικ. 1. Ένα τέτοιο κύτταρο δεν είναι τίποτε άλλο παρά κυτταρόπλασμα που περιβάλλεται από κάποιες επιφανειακές στιβάδες, που χαρακτηρίζονται γενικά ως «κυτταρικό περίβλημα» ή «φάκελος». Τα βακτήρια διακρίνονται γενικά σε δύο κύριους τύπους, τα θετικά κατά Gram και τα αρνητικά κατά Gram, ανάλογα με την αντίδρασή τους σε μια κλασική τεχνική χρώσης. Οι βασικές διαφορές μεταξύ αυτών των δύο τύπων προκαρυωτικών κυττάρων αφορούν κυρίως στη δομή του κυτταρικού φακέλου.

Ο φάκελος των βακτηριακών κυττάρων αποτελείται από μια κυτταροπλασματική μεμβράνη και από ένα πολύ χαρακτηριστικό τοίχωμα που ονομάζεται «πρωτεογλυκανική στιβάδα». Τα κύτταρα των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών φέρουν πολλαπλές στιβάδες πεπτιδογλυκανών, ενώ μόνο

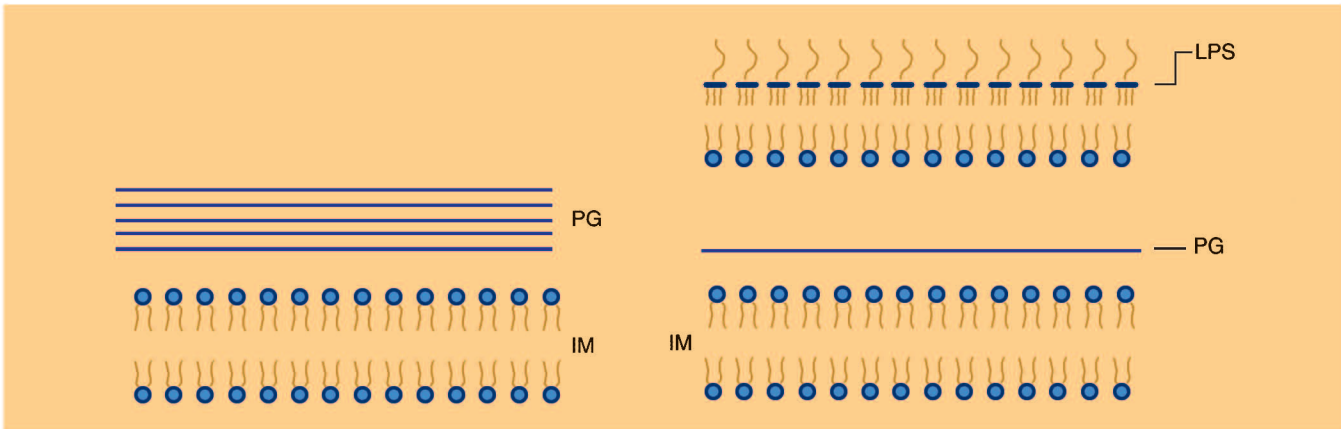
μία ή δύο τέτοιες στιβάδες παρατηρούνται στα κύτταρα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ωστόσο, η πιο σαφής διάκριση μεταξύ των δύο τύπων βακτηριακών κυττάρων είναι το ότι στα αρνητικά κατά Gram το κύτταρο περιβάλλεται από ένα ειδικό εξωμεμβρανικό στρώμα, την εξωτερική μεμβράνη (Εικ. 2). Μαζί με την κυτταροπλασματική (εσωτερική) μεμβράνη, η εξωτερική μεμβράνη σχηματίζει έναν φραγμό διαπερατότητας για τις ενώσεις που εισέρχονται και εξέρχονται από το κύτταρο.

Ένα εμφανές και ιδιαίτερο χημικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης είναι μια ένωση που ονομάζεται «λιποπολυσακχαρίτης» (LPS). Τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα που απομονώνονται από μικροοργανισμούς αρνητικούς κατά Gram πρέπει να καθαρίζονται εκτεταμένα, ιδίως όταν χρησιμοποιούνται ως φάρμακα στα ζώα ή στον άνθρωπο (Κεφάλαια 3 και 4), επειδή ο LPS που ελευθερώνεται κατά την απομόνωση του προϊόντος έχει σοβαρές τοξικές επιδράσεις στα ζώα και τους ανθρώπους, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Στα βακτηριακά κύτταρα, το DNA οργανώνεται κατά κανόνα σε ένα μεγάλο κυκλικό μόριο. Το βακτηριακό DNA δεν περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη και δεν έχει την πολύπλοκη οργάνωση του DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων. Γενικά, το βακτηριακό DNA ονομάζεται «χρωμοσωμικό», σύμφωνα με την ονοματολογία των ευκαρυωτικών κυττάρων. Επιπλέον, εκτός από το χρωμοσωμικό DNA, πολλά βακτήρια περιέχουν μικρά μόρια DNA που ονομάζονται πλασμίδια και αντιγράφονται αυ-



Εικόνα 1 ■ Τομή (τεχνητή) διαμέσου ενός βακτηριακού κυττάρου. Οι επιφανειακές δομές (κροσσοί και μαστίγια) δεν είναι απαραίτητες, αλλά επιτρέπουν στα κύτταρα να προσκολλούνται και να μετακινούνται.



Εικόνα 2 ■ Κυτταρικός φάκελος κυττάρου G+ (αριστερά) και κυττάρου G- (δεξιά). Συντομογραφίες: G+: θετικό κατά Gram, G-: αρνητικό κατά Gram, PG: πεπτιδογλυκάνες, LPS: λιποπολυσακχαρίτης, OM: εξωτερική μεμβράνη, IM: εσωτερική μεμβράνη.

τόνομα. Οι λειτουργίες που είναι απαραίτητες για το βακτηριακό κύτταρο κωδικοποιούνται συνήθως στο χρωμόσωμα ενώ οι λειτουργίες που κωδικοποιούνται από τα πλασμίδια δεν είναι συνήθως απαραίτητες. Ωστόσο, τα πλασμίδια προσφέρουν στο βακτηριακό κύτταρο ιδιότητες που μπορεί να είναι πολύ σημαντικές για την επιβίωση του βακτηρίου, όπως για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα ή σε αντιβιοτικά και η παραγωγή τοξικών πρωτεϊνών είναι πολύ γνωστές ιδιότητες που κωδικοποιούνται από πλασμίδια. Όπως θα δούμε παρακάτω, πλασμίδια χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία ως σημαντικά και απαραίτητα εργαλεία για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.

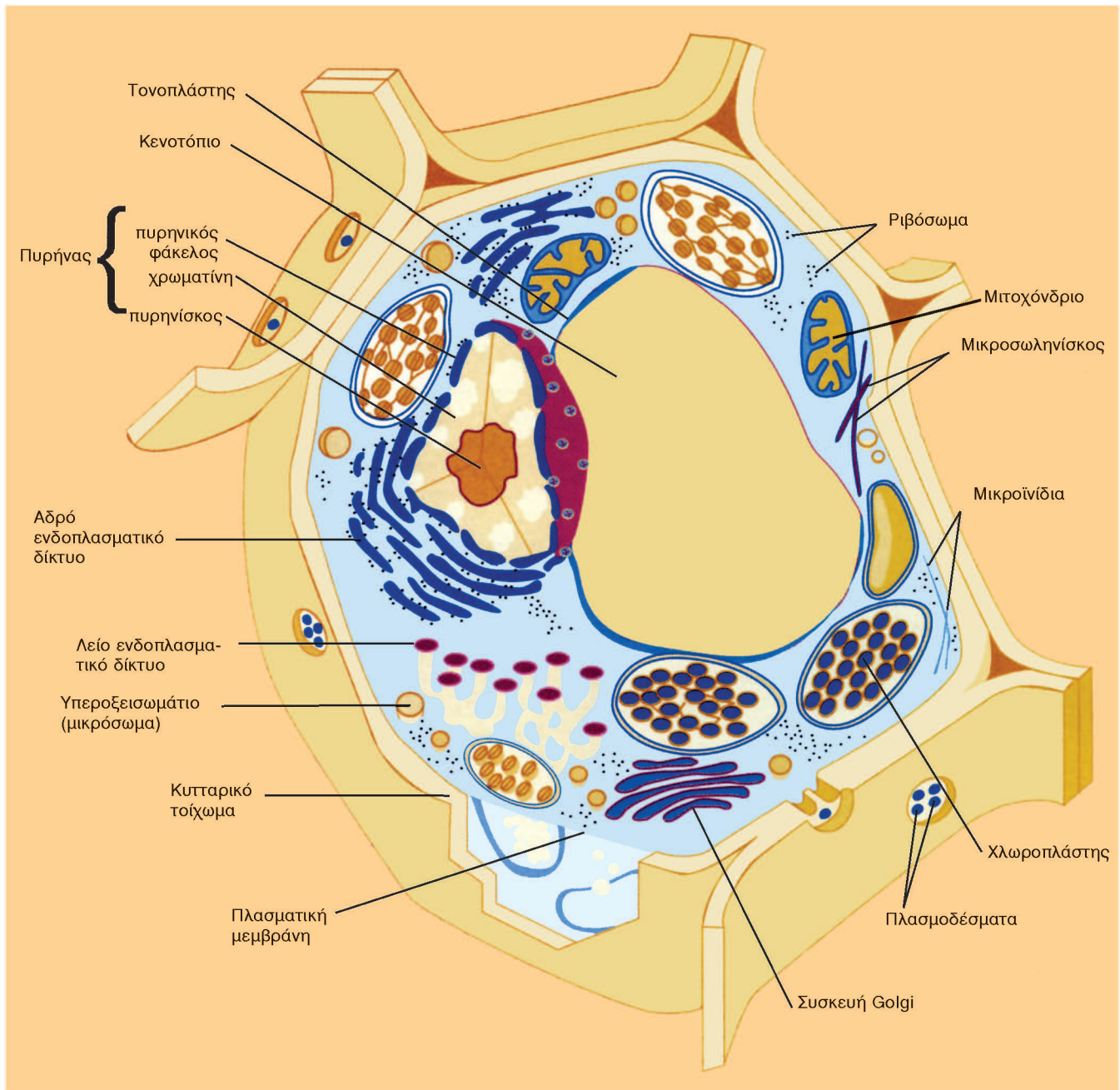
Τα πλασμίδια αναφέρονται ως μικρά μόρια DNA σε σύγκριση με το μέγεθος του χρωμοσωμικού DNA. Πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι το μέγεθος των πλασμιδίων ποικίλλει αρκετά. Τα μικρά πλασμίδια – που χρησιμοποιούνται συνήθως στη βιοτεχνολογία – αποτελούνται από περίπου 6000 δομικές μονάδες του DNA, τα ονομαζόμενα νουκλεοτίδια. Το χρωμοσωμικό DNA ενός βακτηρίου αντιθέτως περιέχει τουλάχιστον 1000 φορές περισσότερα νουκλεοτίδια, ενώ το DNA ενός φυτικού ή ζωικού κυττάρου είναι πολλές εκατοντάδες φορές μεγαλύτερο από το DNA του βακτηριακού κυττάρου. Επιπλέον, το DNA των φυτικών και των ζωικών κυττάρων δεν οργανώνεται σε ένα μοναδικό μόριο αλλά σε πολλά γραμμικά χρωμοσώματα. Για να περιγραφεί αυτή η αυξανόμενη πολυπλοκότητα των μορίων DNA στη φύση, τα μόρια παρομοιάζονται συχνά με σελίδες και βιβλία. Η νουκλεοτιδική σύσταση του DNA ενός μικρού πλασμιδίου μπορεί να γραφεί σε μία σελίδα ενός βιβλίου, χρησιμοποιώντας τα σύμβολα A, C, G και T για τα διάφορα νουκλεοτίδια του DNA. Για να γίνει το ίδιο για ένα βακτηριακό χρωμόσωμα

χρειάζεται ένα βιβλίο των 1000 σελίδων περίπου. Για να περιγραφεί το DNA ενός ζωικού ή φυτικού κυττάρου χρειάζονται μερικές εκατοντάδες βιβλία των 1000 σελίδων.

Όπως όλα τα κύτταρα, έτσι και τα βακτηριακά κύτταρα φέρουν στο κυτταρόπλασμα τους τα ριβοσώματα που απαιτούνται για την πρωτεϊνοσύνθεση, καθώς και μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων και άλλων (μακρο)μορίων απαραίτητων για την κανονική φυσιολογία του κυττάρου. Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι, εκτός από το χρωμόσωμα, τα ριβοσώματα και σε κάποιες περιπτώσεις τα πλασμίδια, κατά κανόνα δεν υπάρχουν άλλες ορατές δομές στο κυτταρόπλασμα του βακτηριακού κυττάρου, ακόμα και κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Επιπλέον, δεν υπάρχουν διαμερίσματα στο κυτταρόπλασμα του προκαρυωτικού κυττάρου.

■ Το ευκαρυωτικό κύτταρο

Η Εικόνα 3 παρουσιάζει σχηματικά ένα φυτικό κύτταρο ως παράδειγμα ευκαρυωτικού κυττάρου. Το ευκαρυωτικό κύτταρο έχει πολύ πολύπλοκη δομή, όχι μόνο λόγω της παρουσίας κυτταρικών οργανιδίων όπως ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες (αποκλειστικά στα φυτικά κύτταρα), αλλά και λόγω της παρουσίας ειδικών εσωτερικών μεμβρανών και κενωτοπίων. Αυτή η πολύπλοκη και διαμερισματοποιημένη δομή συνεπάγεται μια περίπλοκη λειτουργική συμπεριφορά και είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους κατά τα πρώτα στάδια της σύγχρονης βιοτεχνολογίας χρησιμοποιήθηκαν κυρίως απλά βακτηριακά κύτταρα, των οποίων ο χειρισμός και η τροποποίηση είναι ευκολότερα. Σήμερα οι μοριακοί βιοτεχνολόγοι χρησιμοποιούν διάφορους τύπους ευκαρυωτικών κυττάρων, αξιοποιώντας τις ταχέως αυξανόμενες γνώσεις μας στην κυτταρική βιολογία.



Εικόνα 3 ■ Φυτικό κύτταρο (σχηματική αναπαράσταση).

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Οι γενετικές πληροφορίες – που καθορίζονται χημικά από τη δομή του DNA – μεταβιβάζονται στα θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση μέσω της αντιγραφής του DNA και εκφράζονται μέσω της μεταγραφής (μετατροπή του DNA σε RNA) και της μετάφρασης (μετατροπή του RNA σε πρωτεΐνη). Αυτή η σειρά διεργασιών παρατηρείται σε όλα τα κύτταρα και ακολουθεί γενικά την ίδια πορεία. Αποτελεί μία από τις κύριες ενοποιητικές

έννοιες στην κυτταρική βιολογία. Οι πρωτοπόροι της μοριακής βιολογίας αποκάλεσαν αυτή τη σειρά διεργασιών «κεντρικό δόγμα» της βιολογίας. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι οι ρετροϊοί, μια ειδική κατηγορία ζωικών ιών με RNA, κωδικοποιούν ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του RNA σε συμπληρωματικό DNA. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση γιατί εκτελεί μια διεργασία αντίστροφη της μεταγραφής και επιτρέπει έτσι τη ροή πληροφορίας από το RNA προς το DNA. Όπως θα συζητήσουμε αργότερα, η

αντίστροφη μεταγραφάση κατέστη ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την τεχνολογία του DNA.

Οι διάφορες διεργασίες που σχετίζονται με το DNA φαίνονται σχηματικά παρακάτω:



Το «κεντρικό δόγμα» βασίστηκε σε μελέτες πάνω σε βακτήρια και ιούς. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι πολλά γονίδια στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο απ' ό,τι προβλέπεται από το δόγμα αυτό με την αυστηρή έννοια. Σε κάποιες περιπτώσεις το RNA που παράγεται από τη μεταγραφή ενός τμήματος ευκαρυωτικού DNA υφίσταται μια διεργασία που ονομάζεται «μάτισμα» (splicing) προτού απομακρυνθεί από τον πυρήνα. Κατά τη μάτισμα απομακρύνονται ορισμένα τμήματα του νεοσυντεθειμένου RNA (που καλούνται ιντρόνια) και στη συνέχεια τα υπόλοιπα τμήματα (εξόνια) συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματιστεί το ώριμο RNA που θα χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνοσύνθεση (Εικ. 4).

Πρέπει, επίσης, να αναφερθεί ότι μια νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη, αποτέλεσμα της μετάφρασης δεν είναι απαραίτητως πανομοιότυπη με την πρωτεΐνη που είναι λειτουργική στο κύτταρο, ως ένζυμο ή δομική πρωτεΐνη. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες του κυττάρου αποκτούν την τελική, λειτουργική τους μορφή μετά από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Για παράδειγμα, ένα νεοσυντιθέμενο πολυπεπτίδιο μπορεί να κοπεί από μια πεπτιδάση, να δεχθεί την προσθήκη λιπιδικών ομάδων ή να τροποποιηθεί με σύνδεση υδατανθρακικών ομάδων (γλυκοσυλίωση, ένα φαινόμενο αρκετά συχνό στα ευκαρυωτικά κύτταρα). Αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελούν σημαντικά γεγονότα για τις εξειδικευμένες λειτουργίες της πρωτεΐνης.

Η ακριβής γνώση της ροής των πληροφοριών

στο κύτταρο είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη βιοτεχνολογία, καθώς χρησιμεύει στον έλεγχο των κυτταρικών διεργασιών στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Για τον λόγο αυτό θα περιγραφούν παρακάτω τα βασικά στοιχεία και οι διεργασίες που εμπλέκονται στη ροή των γενετικών πληροφοριών.

■ Αντιγραφή του DNA

Το DNA οργανώνεται με διαφορετικούς τρόπους στους διάφορους οργανισμούς, αλλά ο πιο κοινός τρόπος οργάνωσης περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα δίκλινα μόρια DNA με ελικοειδή χωροδιάταξη. Οι κλώνοι του DNA αποτελούνται από τέσσερα ειδικά δομικά στοιχεία που συμβολίζονται A, C, G και T και αντιστοιχούν στα δεοξυριβονουκλεοτίδια 5'-τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATP), 5'-τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη (dCTP), 5'-τριφωσφορική δεοξυγουανοσίνη (dGTP) και 5'-τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη (dTTP), που συνδέονται με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Οι δύο κλώνοι της έλικας του DNA συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των νουκλεοτιδίων των διαφορετικών κλώνων. Οι κλώνοι της έλικας είναι συμπληρωματικοί ως προς τη νουκλεοτιδική τους σύσταση: μια A στον ένα κλώνο βρίσκεται πάντοτε απέναντι από μια T και μια C απέναντι από μια G (Εικ. 5). Επιπλέον, οι κλώνοι του δίκλωνου DNA είναι αντιπαράλληλοι: το 5'-P άκρο του ενός κλώνου βρίσκεται απέναντι από το 3'-OH άκρο του συμπληρωματικού κλώνου και το αντίστροφο.

Κατά τη διαίρεση των κυττάρων, οι γενετικές πληροφορίες στο μητρικό κύτταρο μεταβιβάζονται στα θυγατρικά κύτταρα μέσω της αντιγραφής του DNA. Στην πολύ πολύπλοκη διαδικασία αντιγραφής του DNA, απαραίτητη είναι η δράση των DNA πολυμερασών. Κατά την αντιγραφή, κάθε κλώνος του DNA αντιγράφεται έτσι ώστε να παραχθεί ένας συμπληρωματικός κλώνος με αντιπαράλληλο

Εικόνα 4 ■ Μάτισμα RNA.

