

**ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ(ΕΚΠΑ)**  
**ΚΑΤΑΤΑΚΤΗΡΙΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ**  
**ΑΚ.ΕΤΟΥΣ 2023-2024**  
**ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟ ΜΑΘΗΜΑ:**  
**ΒΙΟΛΟΓΙΑ**

**1. Τι είναι οι δομές Holliday;**

Η ακτινοβολία, σφάλματα στη διαδικασία της αντιγραφής και εξωγενείς χημικοί παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν δίκλωνες εντομές στο DNA. Τέτοιες βλάβες είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες, επειδή οδηγούν σε κατακερματισμό των χρωμοσωμάτων και απώλεια γονιδίων όταν διαιρεθεί το κύτταρο. Η επιδιόρθωση αυτού του τύπου βλάβης είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Κάθε χρωμόσωμα περιέχει μοναδικές πληροφορίες. Αν ένα χρωμόσωμα υποστεί μια δίκλωνη εντομή, και τα κομμάτια που έσπασαν απομακρυνθούν, τότε το κύτταρο δε θα διαθέτει ελεύθερο αντιγραφο για ν' αντιγράψει την πληροφορία που πλέον απουσιάζει. Για να διαχειριστούν αυτόν το δυνητικά καταστροφικό τύπο βλάβης του DNA, τα κύτταρα διαθέτουν δύο βασικές στρατηγικές. Η πρώτη περιλαμβάνει γρήγορη σύνδεση των δύο σπασμένων άκρων, πριν απομακρυνθούν και χαθούν τα κλάσματα DNA. Αυτός ο μηχανισμός επιδιόρθωσης, που καλείται μη ομόλογος ανασυνδυασμός, πραγματοποιείται σε πολλούς τύπους κυττάρων και διεξάγεται από μια εξειδικευμένη ομάδα ενζύμων που «καθαρίζουν» τα σπασμένα άκρα και τα επανασυνδέουν με τη συνδρομή της DNA λιγκάσης. Αυτός ο τρόπος επιδιορθώνει τη βλάβη γρήγορα, αλλά έχει ένα τίμημα: κατά τη διάρκεια του «καθαρισμού» της εντομής προκειμένου να είναι έτοιμη για σύνδεση, νουκλεοτίδια συχνά χάνονται από τη θέση της επιδιόρθωσης. Αν όμως η ατελής επιδιόρθωση επηρεάσει την έκφραση ενός γονιδίου, το κύτταρο θα έχει συνέπειες. Επομένως, ο μη ομόλογος ανασυνδυασμός αποτελεί επικίνδυνη στρατηγική για την επιδιόρθωση θραυσμένων χρωμοσωμάτων. Η εναλλακτική στρατηγική που διαθέτουν τα κύτταρα για την επιδιόρθωση δίκλωνων εντομών χωρίς σφάλματα, καλείται ομόλογος ανασυνδυασμός.

Για την ακρίβεια στην περίπτωση επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό αν πραγματοποιηθεί μια δίκλωνη εντομή αμέσως μετά την αντιγραφή του DNA, τότε η άθικτη διπλή έλικα μπορεί να λειτουργήσει ως εκμαγείο για την επιδιόρθωση της (ομόλογης) διπλής έλικας που φέρει τη θραύση. Με άλλα λόγια, οι πληροφορίες του άθικτου κλώνου της διπλής έλικας χρησιμοποιούνται για την επιδιόρθωση του συμπληρωματικού σπασμένου κλώνου. Επειδή τα δύο μόρια DNA είναι ομόλογα - δηλαδή έχουν ταυτόσημες αλληλουχίες ο ομόλογος ανασυνδυασμός οδηγεί στην πλήρη επιδιόρθωση της δίκλωνης εντομής, χωρίς απώλεια γενετικής πληροφορίας. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός συχνά ενεργοποιείται λόγω εντομής μετά την αντιγραφή του DNA αλλά πριν την κυτταρική διαίρεση, όταν οι δύο διπλοί κλώνοι (πατρικός και νεοσυντεθειμένος) βρίσκονται ακόμα κοντά. Για την έναρξη της επιδιόρθωσης, μια νουκλεάση πέπτει προς τα πίσω τα 5' άκρα των δύο σπασμένων κλώνων στο σημείο της θραύσης. Με τη συνδρομή εξειδικευμένων ενζύμων, ένα από τα σπασμένα άκρα «εισβάλλει» στο άθικτο ομόλογο δίκλωνο DNA και αναζητεί μια συμπληρωματική

αλληλουχία μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Μόλις βρεθεί ένα ακριβές, εκτεταμένο ταίριασμα, ο κλώνος που εισβάλλει επιμηκύνεται μέσω μιας επιδιορθωτικής DNA πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας το συμπληρωματικό κλώνο ως εκμαγείο. Όταν η επιδιορθωτική πολυμεράση περάσει το σημείο στο οποίο πραγματοποιήθηκε η εντομή, ο νέος επιδιορθωμένος κλώνος συνδέεται ξανά με τον αρχικό, δημιουργώντας ζεύγη βάσεων που συγκρατούν τους δύο κλώνους της σπασμένης διπλής έλικας. Η επιδιόρθωση έπειτα ολοκληρώνεται με σύνθεση DNA στα 3' άκρα των δύο κλώνων της σπασμένης διπλής έλικας και σύνδεση των κλασμάτων DNA με τη συνδρομή της λιγκάσης. Το ενδιάμεσο μόριο που σχηματίζεται μετά τη δράση της DNA λιγκάσης και στο οποίο διασταυρώνονται οι δύο αλυσίδες που ανταλλάχθηκαν ονομάζεται κόμβος Holliday. Για να ξανασηματιστούν δύο ανεξάρτητα μόρια DNA, οι δύο επιχιαζόμενοι κλώνοι πρέπει να κοπούν. Αν όμως κοπούν πριν δημιουργηθεί ο κόμβος Holliday τα δύο μόρια θα διαχωρίζονταν το ένα από το άλλο σχεδόν αμετάβλητα. Ωστόσο, η ενδιάμεση αυτή δομή ανταλλαγής μπορεί να πραγματοποιήσει διάφορες περιστροφικές κινήσεις, ώστε οι δύο αρχικά μη διασταυρωμένοι κλώνοι να επιχιαστούν ή και το αντίστροφο. Αν οι διασταυρωμένοι κλώνοι κοπούν μετά από μία τέτοια περιστροφή, ένα τμήμα κάθε αρχικής έλικας DNA θα συνδέεται με ένα τμήμα της άλλης έλικας. Με άλλα λόγια, τα δύο μόρια του DNA θα έχουν επιχιαστεί και έτσι θα έχουν παραχθεί δύο μόρια DNA με νέα αλληλουχία.

## 2. Περιγράψτε την τεχνική CRISPR-Cas 9

Τα βακτήρια χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς για να προστατευθούν από το ξένο DNA. Τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν μια πρώτη γραμμή άμυνας. Πρόσφατα, η ανακάλυψη ενός άλλου βακτηριακού συστήματος άμυνας οδήγησε στην ανάπτυξη μιας ευαίσθητης μεθόδου για την τροποποίηση γονιδίων σε μια ποικιλία κυττάρων, ιστών και οργανισμών. Αυτή η μέθοδος που καλείται CRISPR στηρίζεται στο βακτηριακό ένζυμο Cas9 που παράγει μια δίκλωνη εντομή σ' ένα μόριο DNA. Σε αντίθεση με τα ένζυμα περιορισμού, η Cas9 δεν εξειδικεύεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Για ν' αναγνωρίσει μια ειδική αλληλουχία-στόχο, το ένζυμο χρησιμοποιεί ένα μόριο RNA-οδηγό. Το RNA οδηγός συνδέεται στην Cas9 και της επιτρέπει να αναγνωρίσει και να συνδεθεί σε μια συμπληρωματική αλληλουχία DNA. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την Cas9 έχει τροποποιηθεί γενετικά σε διάφορους οργανισμούς. Συνεπώς, για να στοχεύσουμε ένα -ή πολλαπλά- γονίδια με τη μέθοδο CRISPR χρειάζεται απλώς να εισαγάγουμε τα κατάλληλα μόρια RNA-οδηγούς. Οι δίκλωνες εντομές, όπως εκείνες που προκαλούνται από την Cas9, συχνά επιδιορθώνονται με ομόλογο ανασυνδυασμό - μια διεργασία που χρησιμοποιεί την πληροφορία ενός άθικτου κλάσματος DNA για να επιδιορθώσει την εντομή. Συνεπώς, ένα γονίδιο μπορεί ν' αντικατασταθεί με τη μέθοδο CRISPR από μια τροποποιημένη μορφή του, η οποία λειτουργεί ως εκμαγείο για την ομόλογη επιδιόρθωση. Έτσι, ένα γονίδιο-στόχος μπορεί να κοπεί επιλεκτικά και ν' αντικατασταθεί με μεγάλη αποτελεσματικότητα από μια πειραματικά τροποποιημένη μορφή του γονιδίου. Συνεπώς, η μέθοδος CRISPR αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο για την παραγωγή διαγονιδιακών οργανισμών. Η μέθοδος CRISPR έχει προσαρμοστεί ώστε να

ενεργοποιεί/απενεργοποιεί επιλεκτικά ένα γονίδιο. Σε αυτήν την περίπτωση, μια καταλυτικά ανενεργός πρωτεΐνη Cas9 μπορεί να συντηχθεί μ' έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή ή καταστολέα. Αυτός ο υβριδικός μεταγραφικός ρυθμιστής μπορεί να κατευθυνθεί σ' ένα γονίδιο-στόχο από το κατάλληλο RNA-οδηγό.

### **3. Τι είναι ο χειριστής, καταστολέας, ενεργοποιητής και υποκινητής;**

Ο έλεγχος της μεταγραφής συνήθως ασκείται κατά την έναρξη της μεταγραφής.

Ο υποκινητής είναι μία περιοχή του γονιδίου που περιέχει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων που βρίσκεται αμέσως πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής για τη σύνθεση του RNA. Μόλις συνδεθεί ισχυρά με τον υποκινητή, η RNA πολυμεράση αποδιατάσσει την περιοχή της διπλής έλικας που βρίσκεται ακριβώς μπροστά από τον υποκινητή κι έτσι εκτίθεται ένα μικρό τμήμα του DNA. Στη συνέχεια, ο ένας από τους δύο εκτεθειμένους κλώνους του DNA δρα ως εκμαγείο για να σχηματιστούν συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων με τα εισερχόμενα τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια, δύο από τα οποία συνδέονται μεταξύ τους από την πολυμεράση κι έτσι αρχίζει η σύνθεση της αλυσίδας του RNA. Κατόπιν, η αναπτυσσόμενη αλυσίδα RNA επιμηκύνεται, έως ότου η RNA πολυμεράση συναντήσει ένα δεύτερο σήμα πάνω στο DNA, την αλληλουχία τερματισμού, οπότε σταματά και απελευθερώνει τόσο το εκμαγείο DNA όσο και το νεοσυντεθειμένο μετάγραφο RNA. Επειδή η πολυμεράση πρέπει να προσδεθεί ισχυρά πριν ξεκινήσει τη μεταγραφή, ένα τμήμα DNA θα μεταγραφεί μόνο αν υπάρχει ένας υποκινητής ανοδικά αυτού του τμήματος. Αυτό διασφαλίζει ότι το τμήμα ενός μορίου DNA που περιέχει ένα γονίδιο μπορεί να μεταγραφεί σε RNA.

Εκτός από τον υποκινητή, σχεδόν όλα τα γονίδια επιπλέον διαθέτουν ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση των γονιδίων. Ορισμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες έχουν μήκος μόλις 10 ζευγών νουκλεοτιδίων και δρουν ως απλοί γονιδιακοί διακόπτες που απαντούν σ' ένα ορισμένο σήμα. Τέτοιοι απλοί ρυθμιστικοί διακόπτες είναι πολύ συχνοί στα βακτήρια. Άλλες ρυθμιστικές αλληλουχίες, ιδίως στους ευκαρυώτες, έχουν πολύ μεγάλο μήκος (ορισμένες φορές πάνω από 10.000 ζεύγη βάσεων) και δρουν σαν μοριακοί μικροεπεξεργαστές που απαντούν σε ποικίλα σήματα, τα οποία συνδυαστικά καθορίζουν τη συχνότητα έναρξης της μεταγραφής.

Οι ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA δε δρουν αυτόνομα. Για να προκαλέσουν κάποιο αποτέλεσμα αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες οι οποίες καλούνται μεταγραφικοί ρυθμιστές. Η πρόσδεση μιας μεταγραφικής ρυθμιστικής πρωτεΐνης σε μια ρυθμιστική αλληλουχία DNA λειτουργεί ως διακόπτης για τον έλεγχο της μεταγραφής. Ακόμη και το απλούστερο βακτήριο κωδικοποιεί αρκετές εκατοντάδες μεταγραφικούς ρυθμιστές, καθένας από τους οποίους αναγνωρίζει μια διαφορετική αλληλουχία DNA κι έτσι ρυθμίζει διαφορετική ομάδα γονιδίων. Στον άνθρωπο υπάρχουν πολλοί περισσότεροι γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία και την

πολυπλοκότητα αυτής της μορφής γονιδιακής ρύθμισης για την ανάπτυξη και τη λειτουργία ενός πολύπλοκου οργανισμού.

Ο καταστολέας είναι μια πρωτεΐνη καταστολής της μεταγραφής η οποία σε ενεργό μορφή αδρανοποιεί τα γονίδια. Άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες των βακτηριακών γονιδίων λειτουργούν με αντίθετο τρόπο, δηλαδή ενεργοποιούν αντίστοιχα γονίδια. Αυτές οι πρωτεΐνες ενεργοποίησης της μεταγραφής δρουν σ' εκείνους τους υποκινητές, οι οποίοι είναι οριακά ικανοί να δράσουν από μόνοι τους και να συνδεθούν με την RNA πολυμεράση. Αυτοί οι υπολειτουργικοί υποκινητές μπορεί να γίνουν πλήρως λειτουργικοί από ενεργοποιητικές πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται σε μια γειτονική ρυθμιστική αλληλουχία κι εφάπτονται με την RNA πολυμεράση κατά τέτοιο τρόπο ώστε να την βοηθήσουν ν' αρχίσει τη μεταγραφή. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι ενεργοποιητές και οι καταστολείς αξιοποιούν τη δομή της χρωματίνης για να συμβάλλουν στην ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση των γονιδίων. Η δομή της χρωματίνης μπορεί ν' αλλάξει με σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης ή ένζυμα που τροποποιούν ομοιοπολικά τις ιστόνες οι οποίες σχηματίζουν τον «πυρήνα» του νουκλεοσωματίου. Πολλοί γονιδιακοί ενεργοποιητές αξιοποιούν αυτούς τους μηχανισμούς προσελκύνοντας στους υποκινητές, πρωτεΐνες που τροποποιούν τις ιστόνες. Οι καταστολείς της έκφρασης των γονιδίων μπορεί επίσης να τροποποιήσουν τη χρωματίνη έτσι ώστε να μειωθεί η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού έναρξης της μεταγραφής. Μερικοί ευκαρυωτικοί καταστολείς δρουν σε μεμονωμένα γονίδια, ενώ άλλοι ενορχηστρώνουν το σχηματισμό μεγάλων τμημάτων της μεταγραφικά ανενεργού χρωματίνης.

Ο χειριστής αποτελεί μία αλληλουχία που εντοπίζεται στα οπερόνια των βακτηρίων. Για την ακρίβεια, αποτελεί μία ειδική αλληλουχία του υποκινητή η οποία αναγνωρίζεται από ένα μεταγραφικό ρυθμιστή. Όταν αυτός ο ρυθμιστής δεσμευτεί στον χειριστή εμποδίζει την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή παρεμποδίζοντας έτσι τη μεταγραφή του οπερονίου και την παραγωγή των ενζύμων που παράγεται από αυτό.

#### **4. Τι γνωρίζεται για τα siRNA και την προέλευσή τους;**

Τα RNA έχουν πολλές λειτουργίες στα κύτταρα. Εκτός από τα mRNA, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα μη κωδικοποιητικά RNA (non coding RNA) έχουν ποικίλες λειτουργίες. Ορισμένα από αυτά, όπως τα μεταφορικά RNA (tRNA) και τα ριβοσωμικά RNA (rRNA) έχουν βασικό δομικό και καταλυτικό ρόλο, ιδιαίτερα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Επίσης, το RNA που περιέχει η τελομεράση έχει κρίσιμο ρόλο για την ολοκλήρωση του διπλασιασμού των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων. Σήμερα γνωρίζουμε ότι πολλοί οργανισμοί, κυρίως ζώα και φυτά, παράγουν πολυάριθμες κατηγορίες μη κωδικοποιητικών RNA. Πολλά από αυτά τα μη κωδικοποιητικά RNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κι επομένως αναφέρονται ως ρυθμιστικά RNA (regulatory RNA). Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις κύριοι τύποι ρυθμιστικών RNA, τα μικροRNA (microRNA), τα μικρά παρεμβαλλόμενα

RNA (small interfering RNA) και τα μεγάλα μη κωδικοποιητικά RNA (long noncoding RNA).

Το σύστημα των μικρών παρεμβαλλόμενων RNA χρησιμοποιείται για την εξάλειψη «ξένων» μορίων RNA (συγκεκριμένα, των δίκλωνων μορίων RNA που παράγονται από πολλούς ιούς) και διάφορων γενετικών μεταθετών στοιχείων. Αυτή η διαδικασία καλείται παρεμβολή RNA (RNAi). Στο πρώτο βήμα, τα δίκλινα, ξένα RNA διασπώνται σε μικρά τμήματα μέσω μιας πρωτεΐνης που καλείται Dicer. Τα δίκλινα τμήματα RNA που προκύπτουν καλούνται μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA) και στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τα ίδια σύμπλοκα RISC που φέρουν μόρια siRNA. Το RISC απορρίπτει τη μια αλυσίδα του δίκλωνου siRNA και χρησιμοποιεί την άλλη για να αναζητήσει και να καταστρέψει ένα ξένο συμπληρωματικό μόριο RNA. Έτσι, το κύτταρο που έχει προσβληθεί στρέφει το ξένο RNA εναντίον του εαυτού του. Ταυτόχρονα, η παρεμβολή RNA μπορεί να σταματήσει επιλεκτικά τη σύνθεση εξωγενών RNA από την RNA πολυμεράση του ξενιστή. Σε αυτήν την περίπτωση, τα siRNA που παράγονται από την Dicer συσκευάζονται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που καλείται RITS. Το σύμπλοκο RITS χρησιμοποιεί το μονόκλινο siRNA ως οδηγό για να συνδεθεί σε συμπληρωματικές αλληλουχίες RNA οι οποίες παράγονται από μια RNA πολυμεράση που είναι ενεργός μεταγραφικά. Το σύμπλοκο τοποθετείται κατά μήκος του γονιδίου και προσελκύει πρωτεΐνες που τροποποιούν ομοιοπολικά τις γειτονικές ιστόνες προάγοντας τον τοπικό σχηματισμό ετεροχρωματίνης. Στη συνέχεια, η ετεροχρωματίνη παρεμποδίζει την έναρξη της μεταγραφής σε αυτό το σημείο. Ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης που καθορίζεται από την παρεμβολή RNA (RNAi) περιορίζει την εξάπλωση των μεταθετών γενετικών στοιχείων στο γονιδίωμα του ξενιστή.