
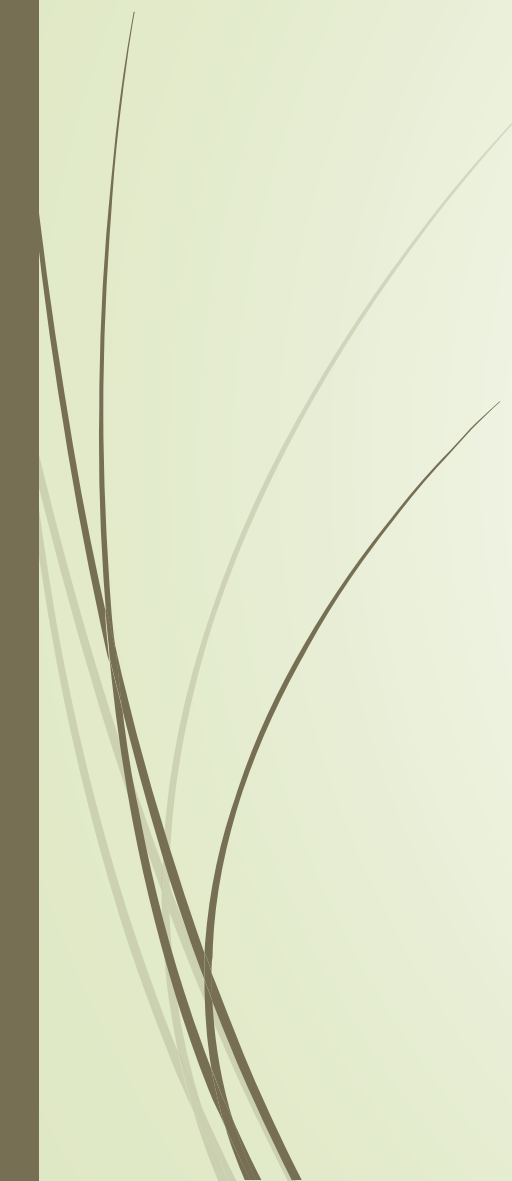
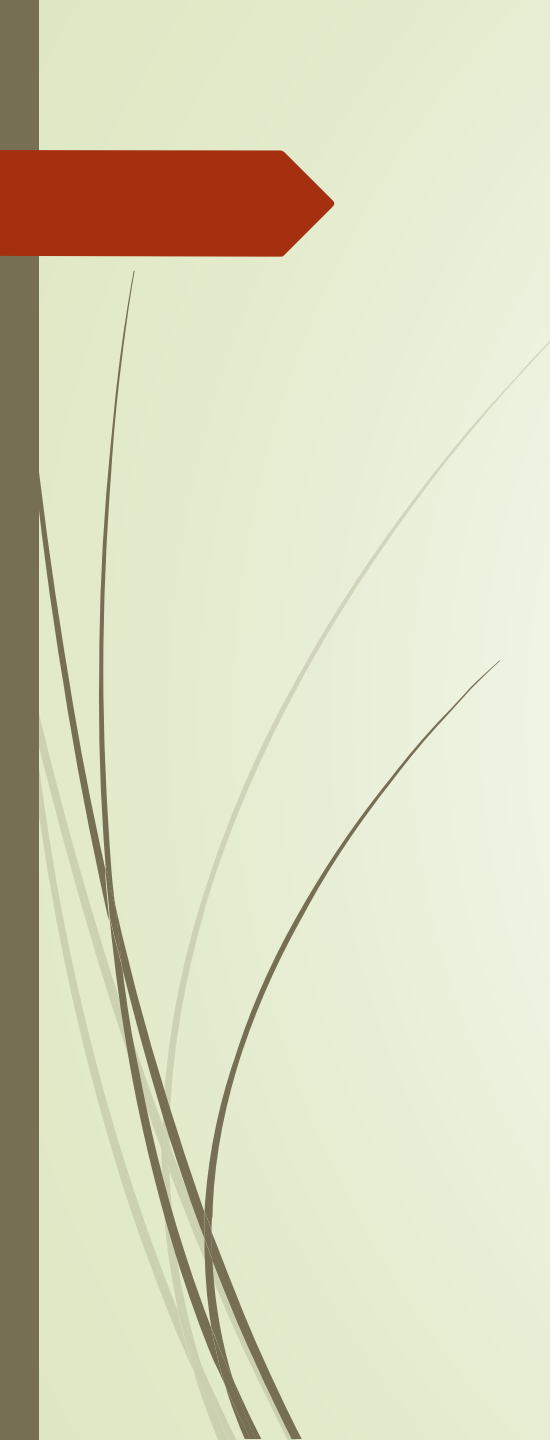


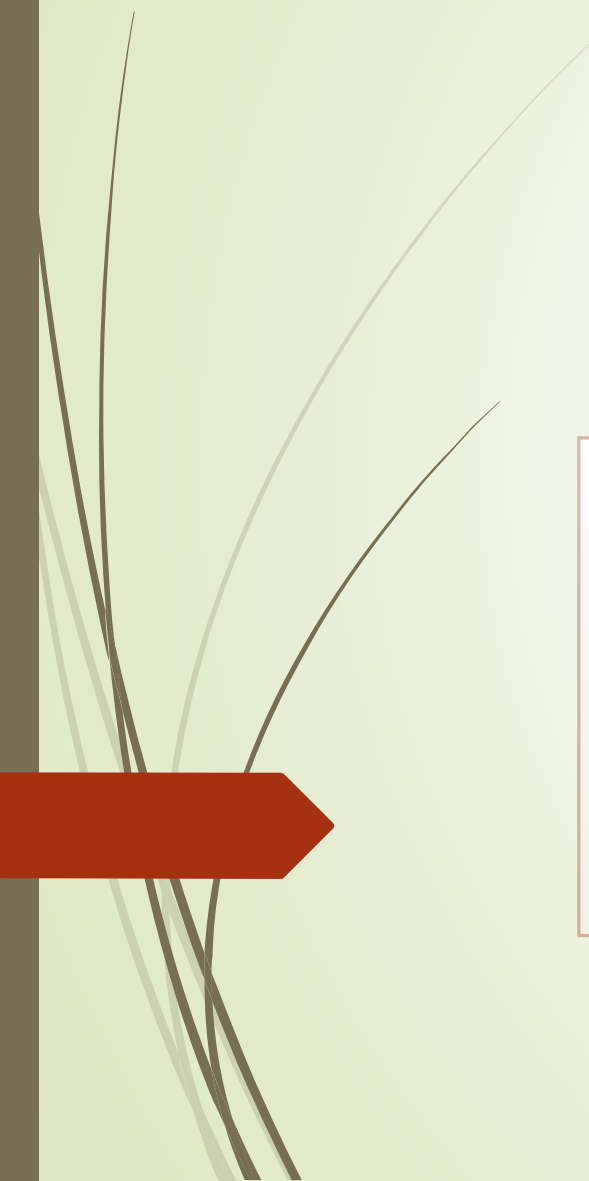


ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Μάθημα 5^ο

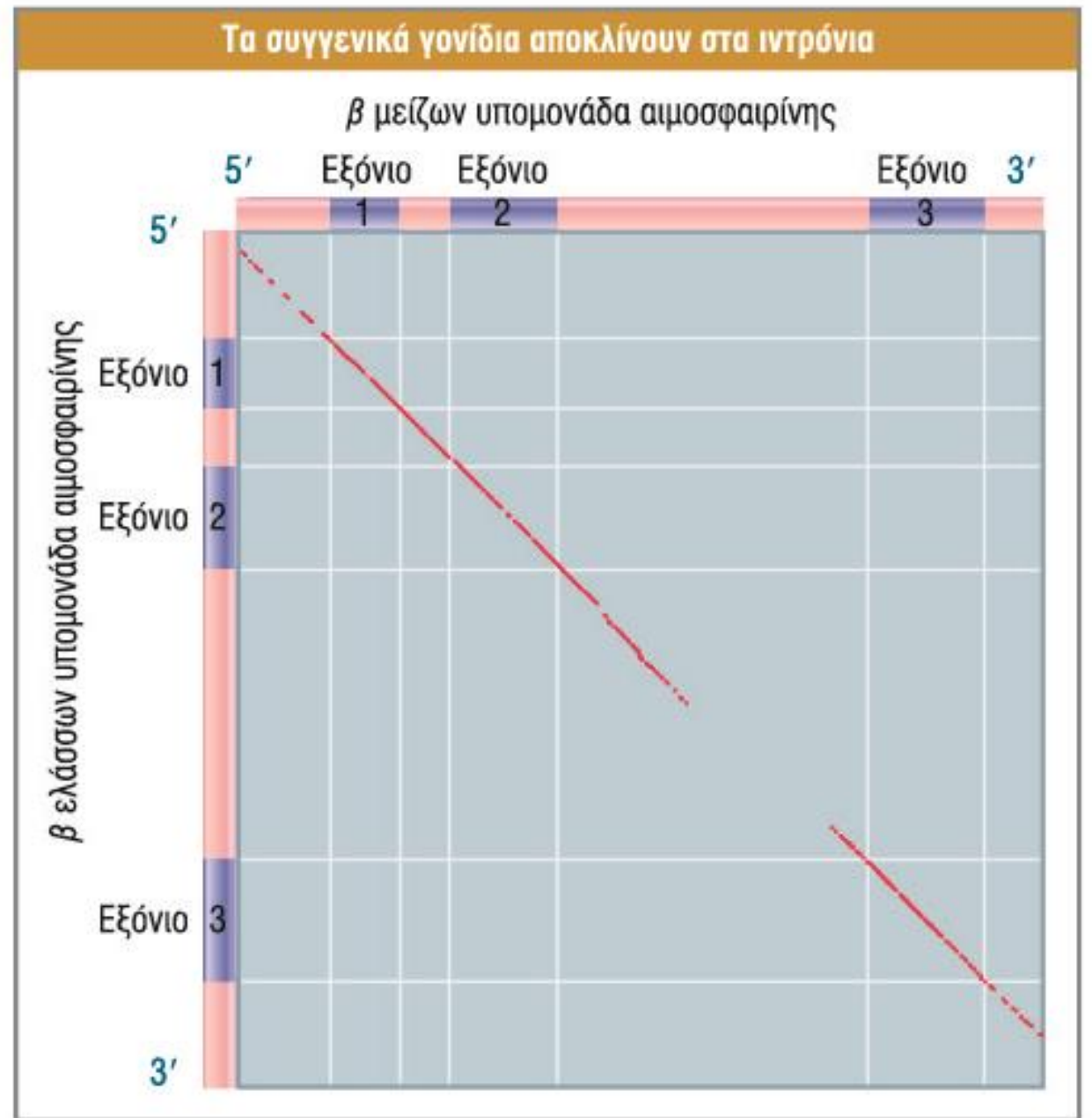
- 
- 
- ✓ PCR
 - ✓ Real Time PCR-FRET & εφαρμογές τους
 - ✓ Single cell sequencing
 - ✓ Blots: Southern, Northern, western, Southwestern, Northwestern
 - ✓ Μικροσυστοιχίες- Microarrays
 - ✓ RNA-seq
 - ✓ Array-CGH
 - ✓ Διαγονιδιακά ποντίκια- Transgenic mice

- 
- ✓ PCR
 - ✓ Real Time PCR-FRET & εφαρμογές τους
 - ✓ Single cell sequencing
 - ✓ Blots: Southern, Northern, western, Southwestern, Northwestern
 - ✓ Μικροσυστοιχίες- Microarrays
 - ✓ RNA-seq
 - ✓ Array-CGH
 - ✓ Διαγονιδιακά ποντίκια- Transgenic mice

- 
- ✓ Συντηρημένη αλληλουχία των εξονίων
 - ✓ Αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν ≥ 1 πολυπεπίδια
 - ✓ Κοινή οργάνωση οικογένειας γονιδίων

Οι Αλληλουχίες των γονιδίων β μείζονος και β ελάσσονος σφαιρίνης ποντικού:

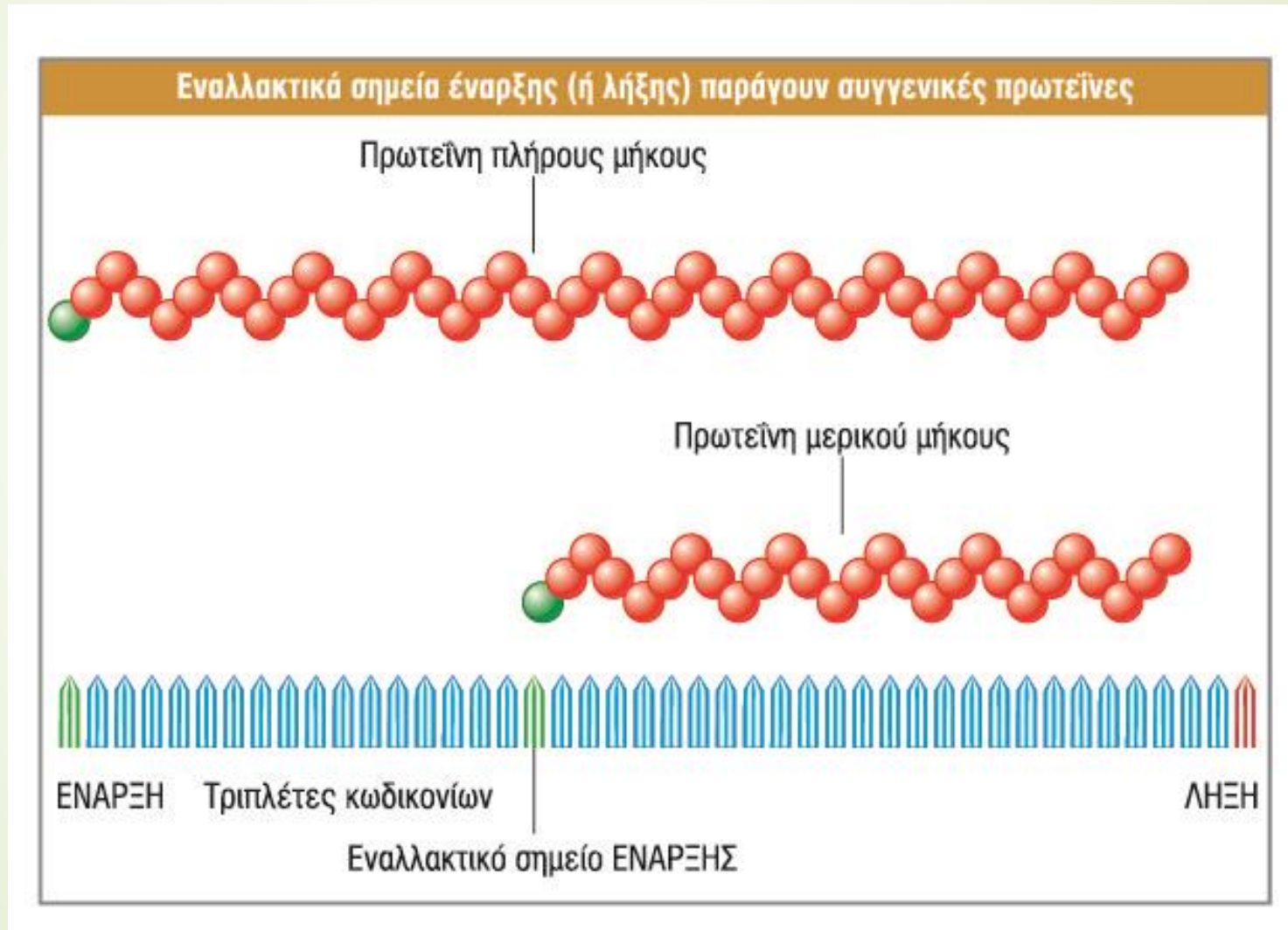
- ✓ Στενά συγγενικές αλληλουχίες στις κωδικοποιητικές περιοχές
- ✓ Διαφέρουν στις μη μεταφραζόμενες UTR και στο μεγάλο ιντρόνιο



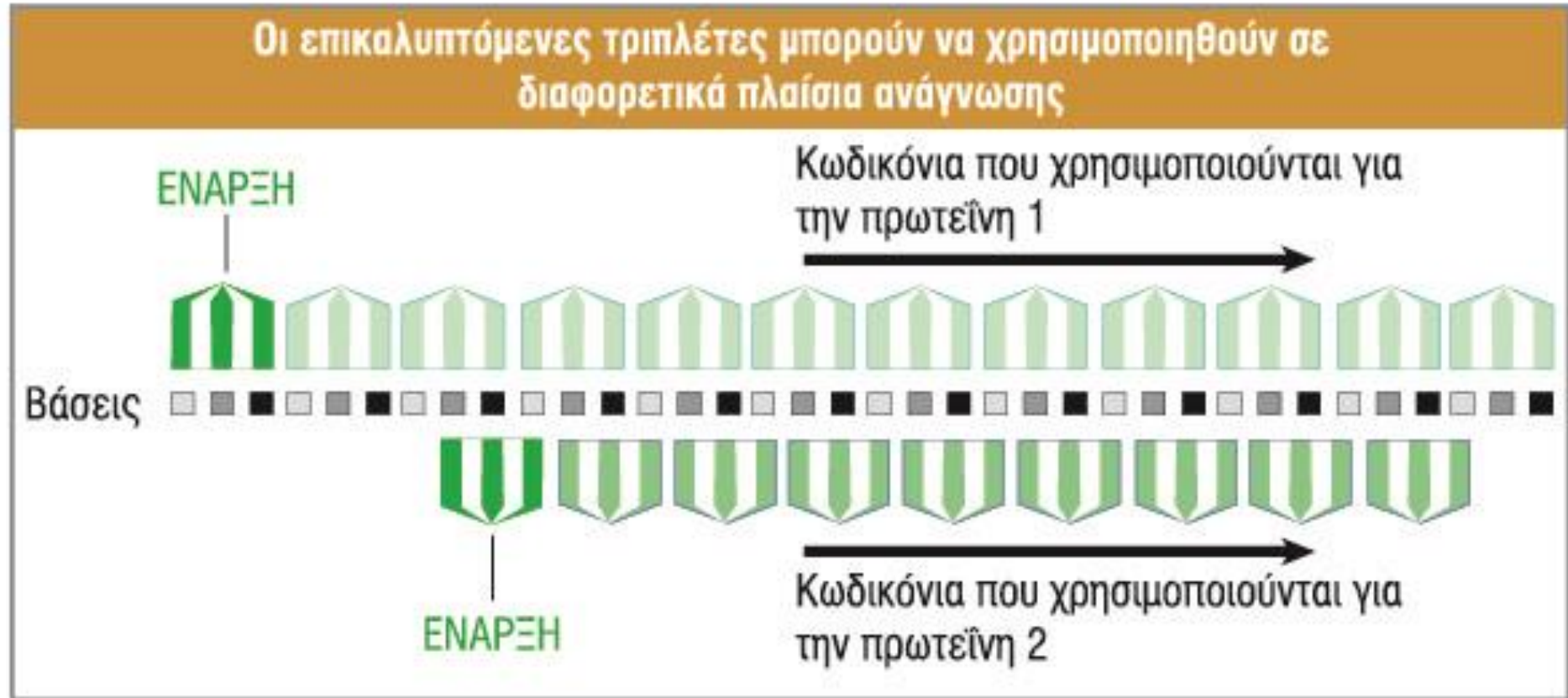
Αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν ≥ 1 πολυπεπτίδια

- ✓ Επικαλυπτόμενα γονίδια: ένα γονίδιο είναι μέρος ενός άλλου γονιδίου
 - Αλληλοεπικαλυπτόμενα γονίδια που μεταγράφονται από τις δυο συμπληρωματικές αλυσίδες DNA
- ✓ Επικαλυπτόμενα γονίδια με διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης: σε ορισμένα ιικά και μιτοχονδριακά γονίδια.
- ✓ Εναλλακτικά πολυπεπτίδια που προκύπτουν ως προϊόν εναλλακτικής συρραφής εξονίων ή προαιρετική παρουσία ορισμένων εξονίων.

Αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν ≥ 1 πολυπεπτίδια

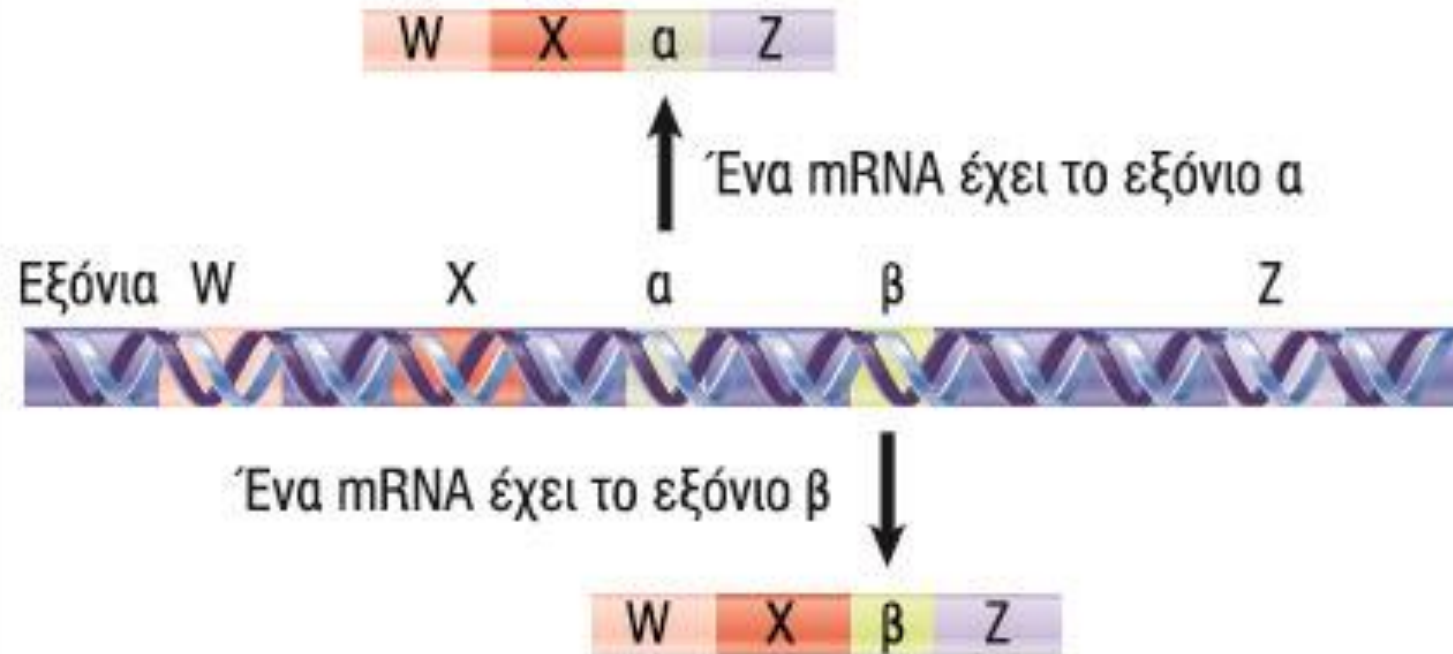


Αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν ≥ 1 πολυπεπτίδια

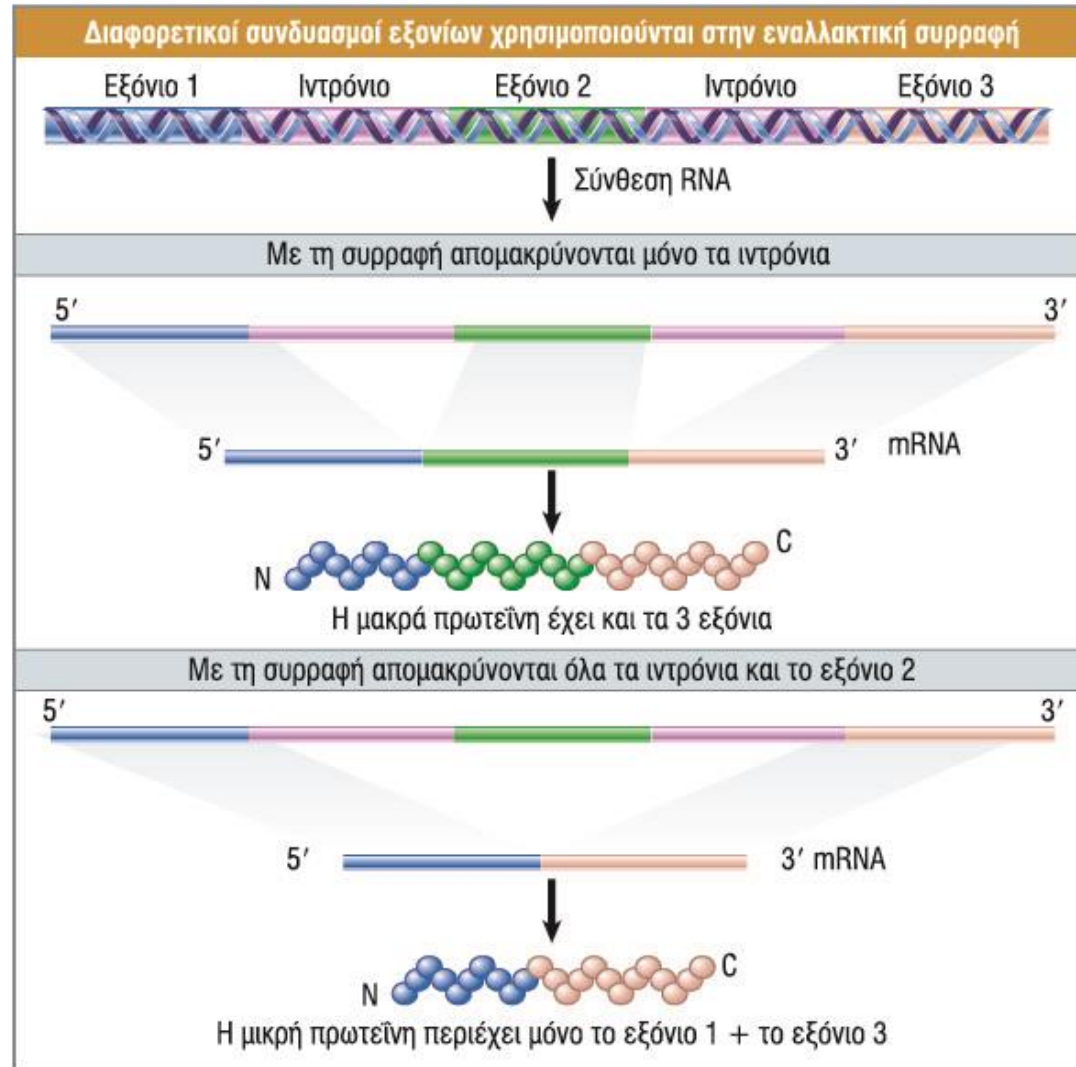


Αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν ≥ 1 πολυπεπίδια

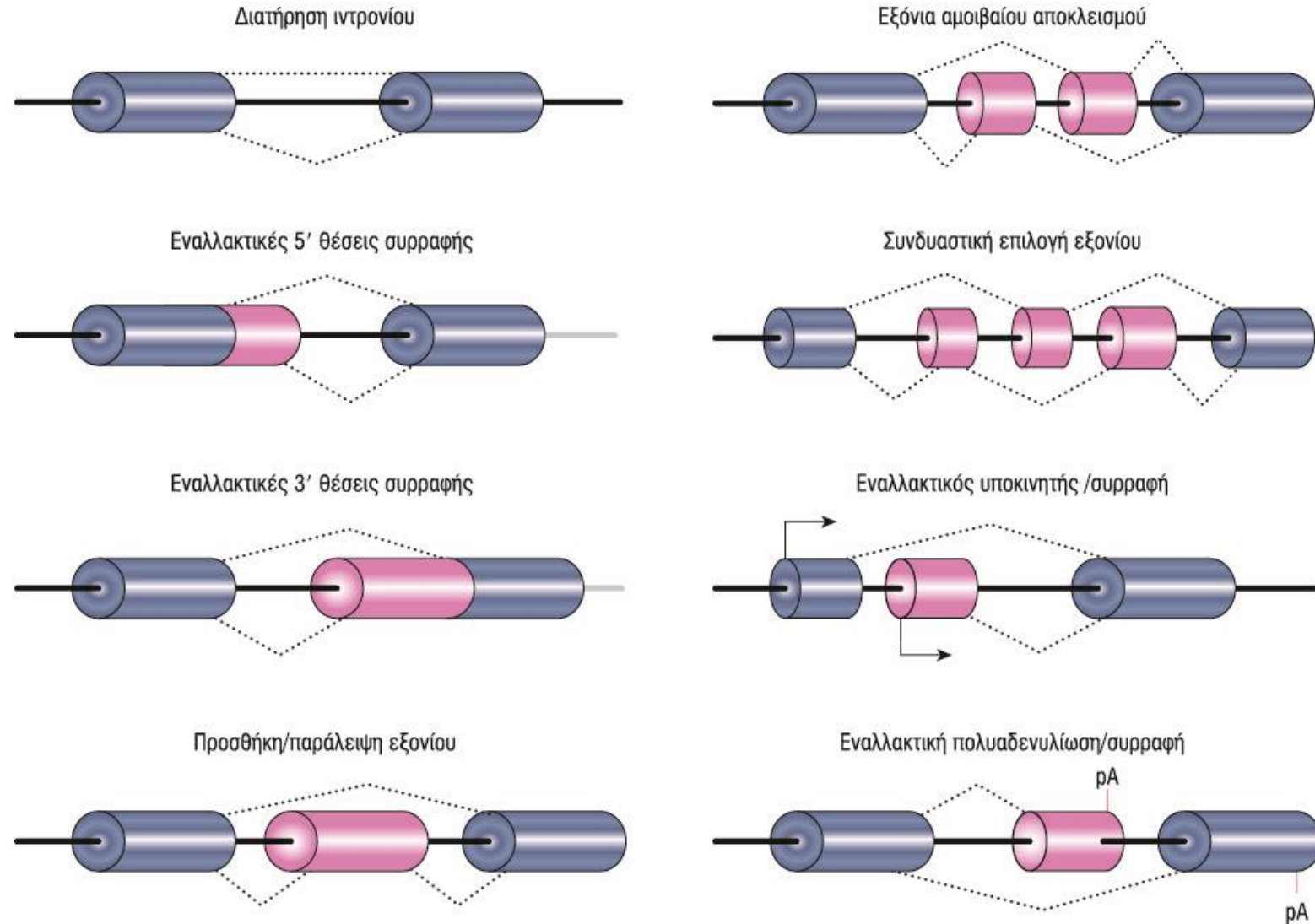
Η εναλλακτική συρραφή μπορεί να αντικαταστήσει εξόνια



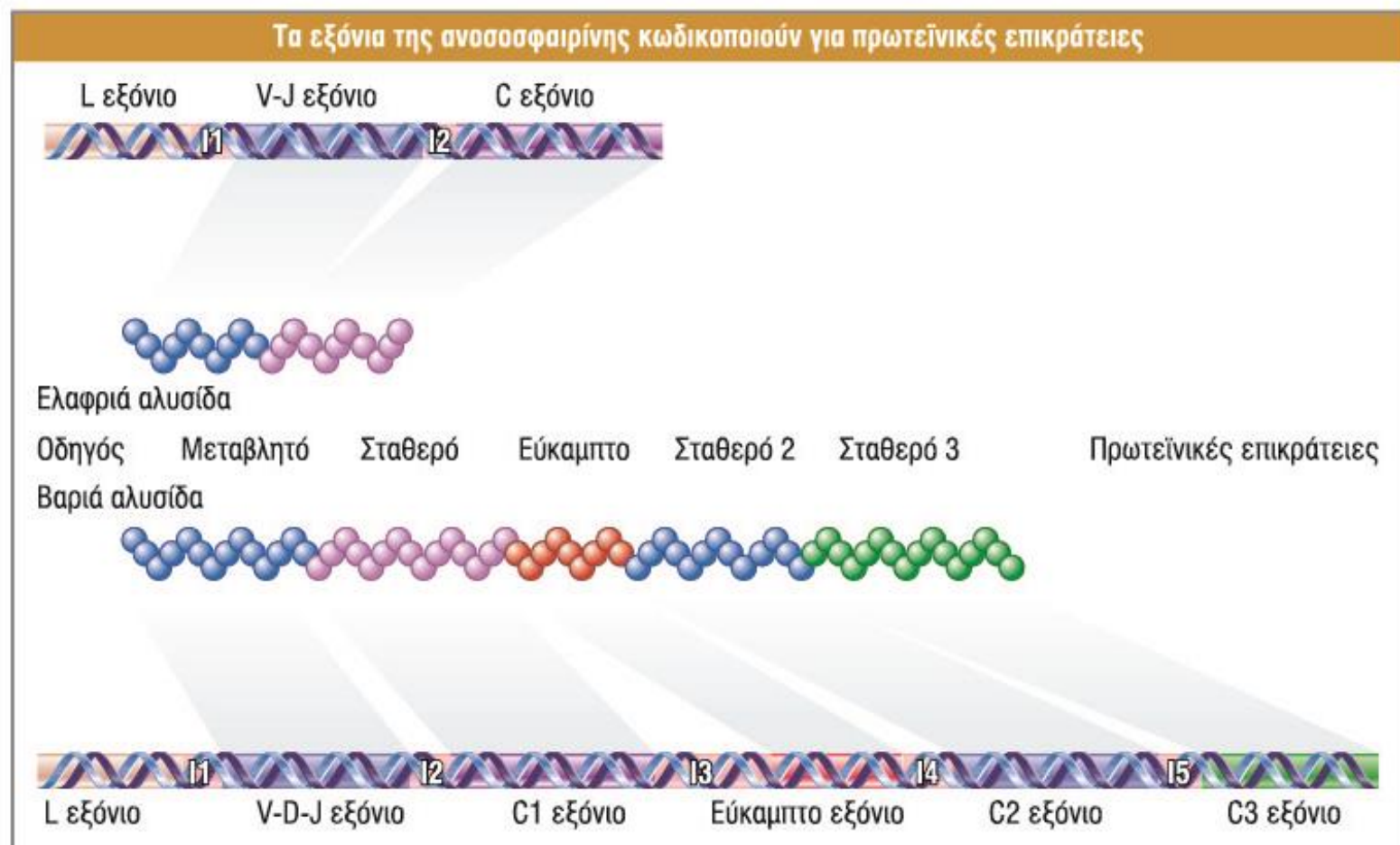
Αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν ≥ 1 πολυπεπίδια



Αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν ≥ 1 πολυπεπτίδια

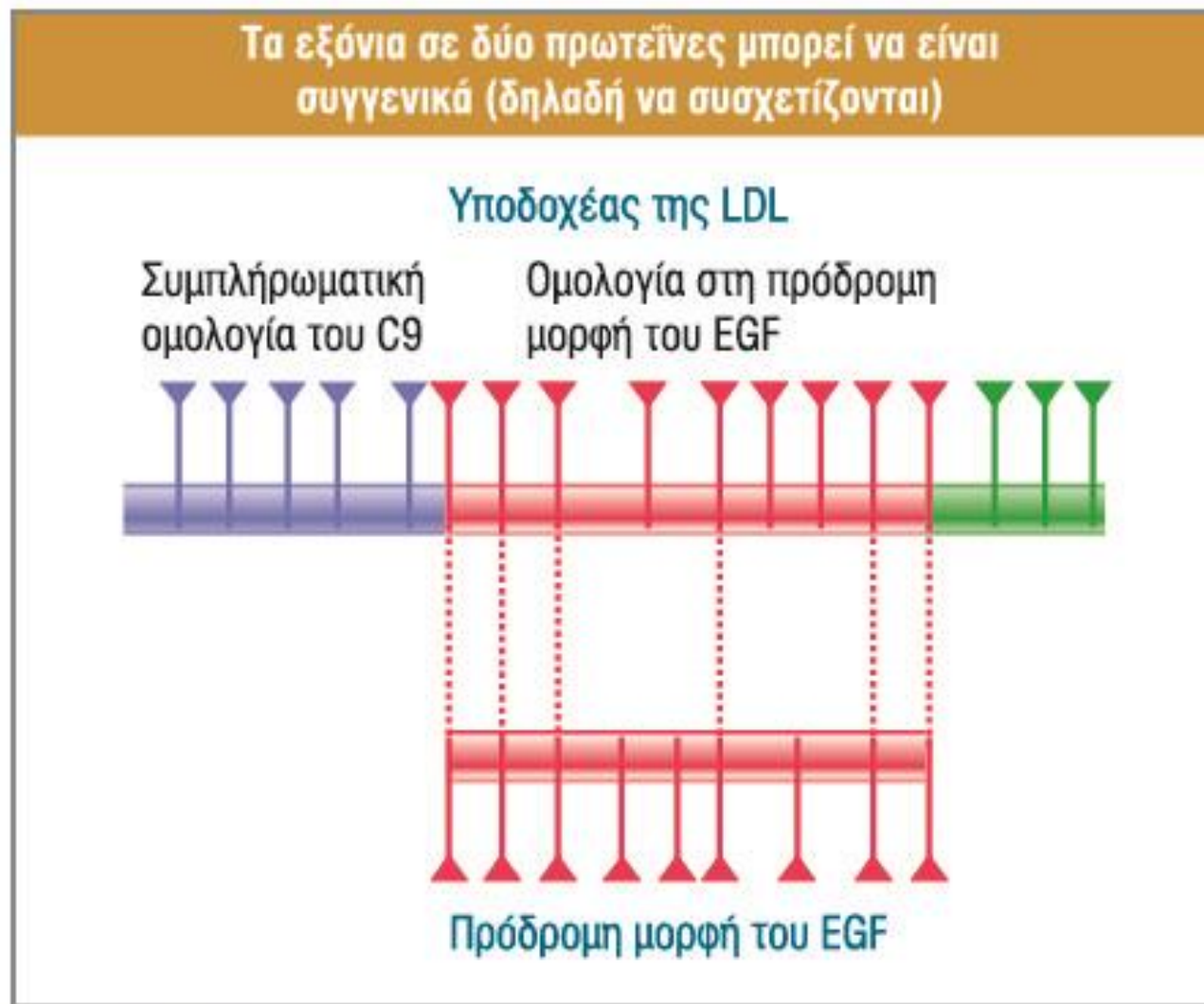


Εξόνια-λειτουργικές πρωτεϊνικές επικράτειες (Domains)



Οι ελαφριές αλυσίδες και οι βαριές αλυσίδες της ανοσοσφαιρίνης κωδικοποιούνται από γονίδια των οποίων οι δομές αντιστοιχούν στις διακριτές επικράτειες της πρωτεΐνης. Κάθε πρωτεϊνική επικράτεια αντιστοιχεί σε ένα εξόνιο. Τα ιντρόνια είναι με αριθμό Ι1 έως Ι5.

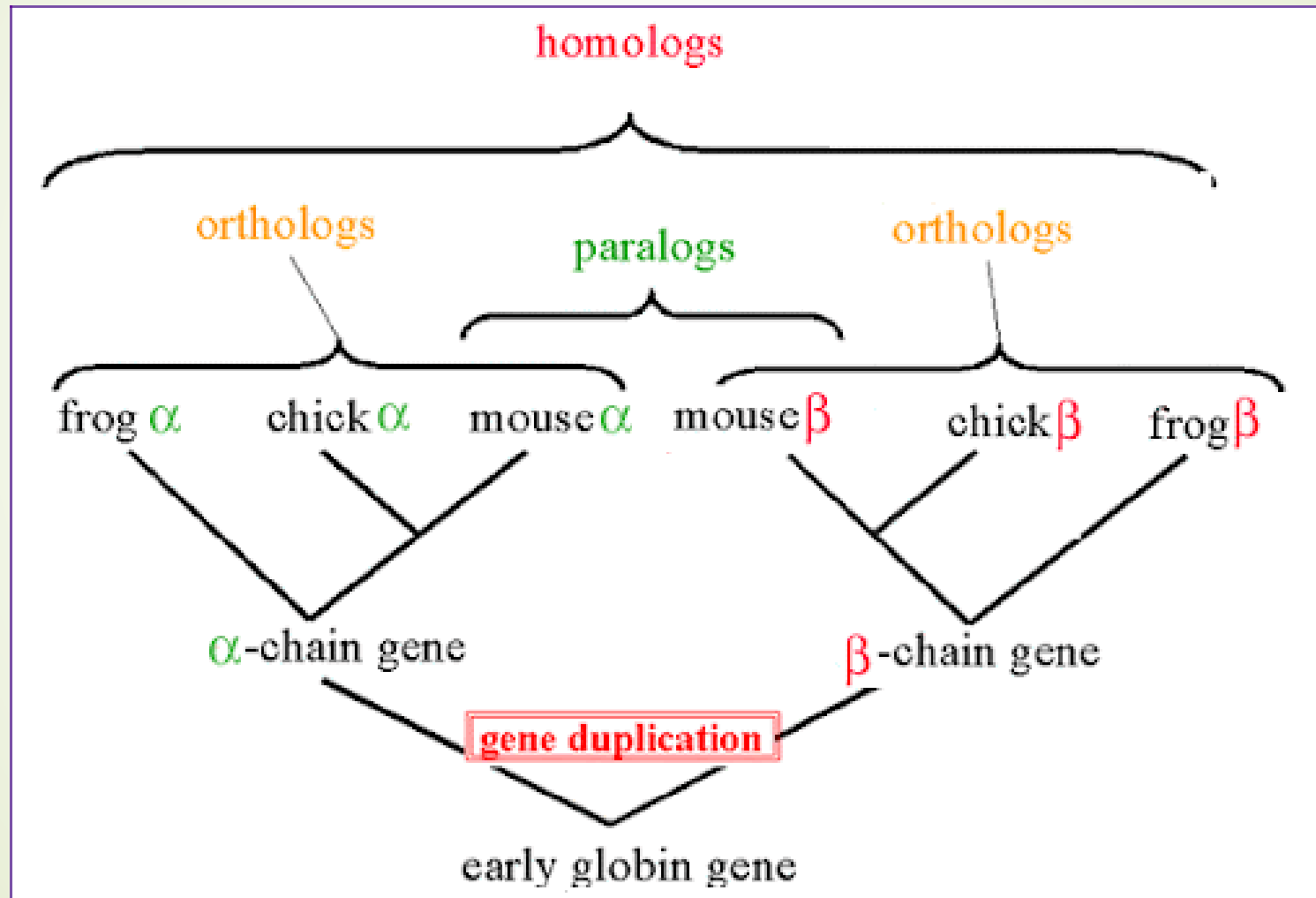
Εξόνια-λειτουργικές πρωτεϊνικές επικράτειες (Domains)

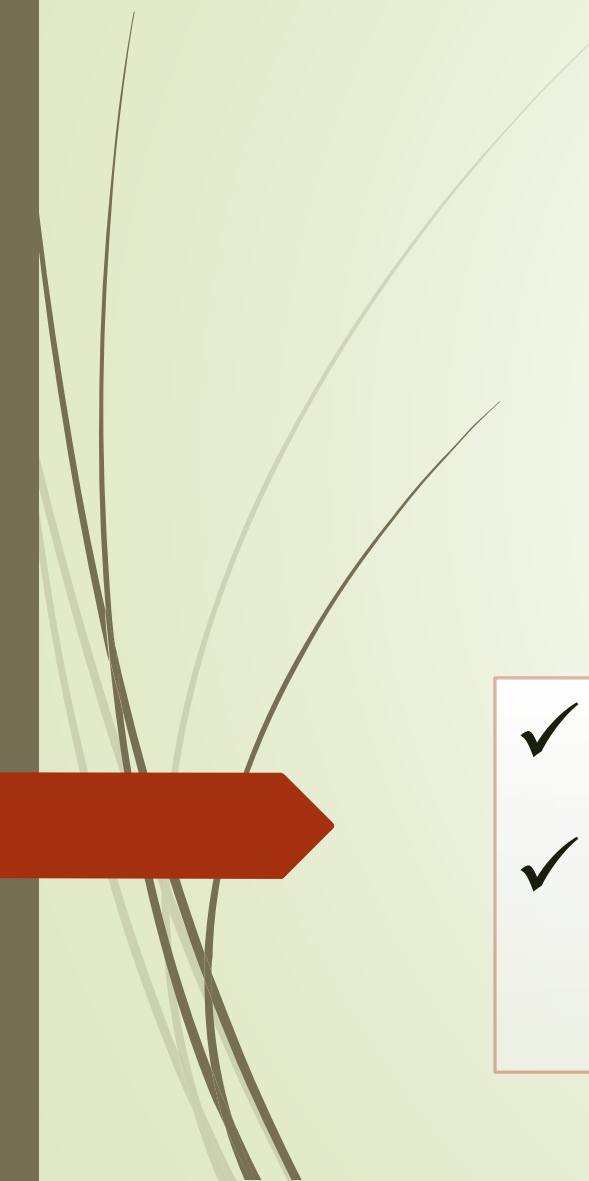


Κοινή οργάνωση οικογένειας γονιδίων

- ✓ **Γονιδιακή οικογένεια:** Ένα σύνολο γονιδίων που προέκυψαν από τον διπλασιασμό ενός προγονικού γονιδίου και κωδικοποιούν συγγενικές ή πανομοιότυπες πρωτεΐνες ή RNAs.
- ✓ **Υπερ-οικογένεια:** Σύνολο γονιδίων που παρουσιάζουν μια σχετική συγγένεια λόγω μιας πιθανής προέλευσης από κοινό πρόγονο αλλά πλέον, εμφανίζουν σημαντική ποικιλομορφία.
- ✓ **Ορθόλογα γονίδια:** Συγγενή γονίδια (σε σχέση με τη λειτουργία) σε διαφορετικά είδη.
- ✓ **Ομόλογα γονίδια:** Συγγενικά γονίδια στο ίδιο είδος ή μεταξύ διαφορετικών ειδών, όπως αλληλόμορφα σε ομόλογα χρωμοσώματα ή πολλαπλά γονίδια μέσα στο ίδιο γονιδίωμα που μοιράζονται ένα κοινό πρόγονο.
- ✓ **Παράλογα γονίδια:...**

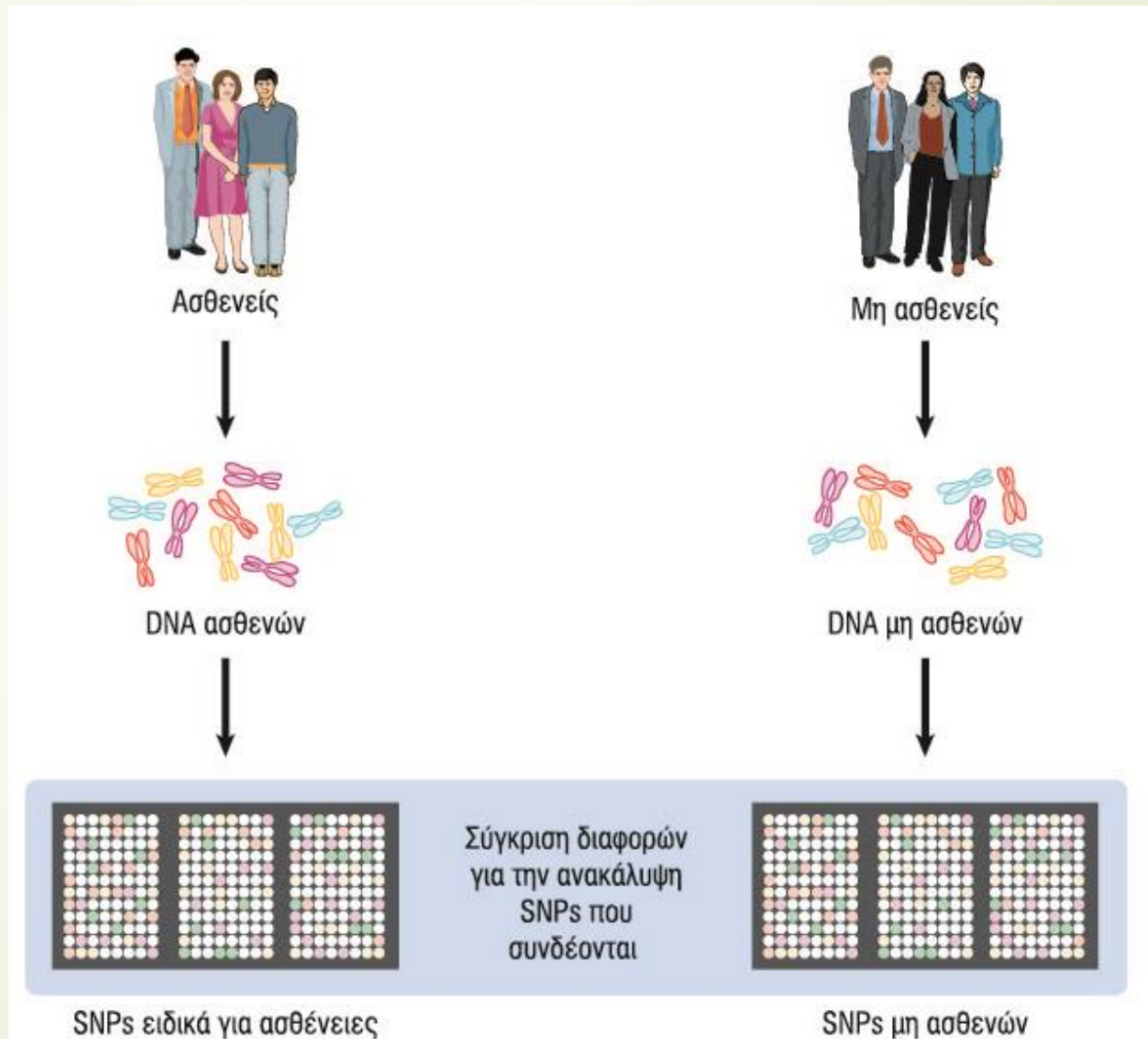
Κοινή οργάνωση οικογένειας γονιδίων



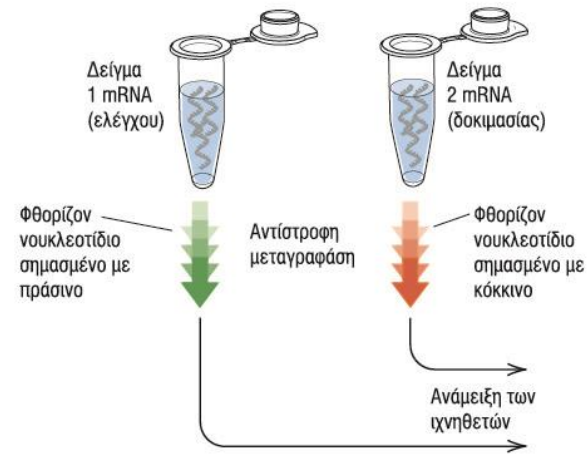
- 
- ✓ GWAS- genome-wide association study
 - ✓ mtDNA & ανθρώπινα φυλογενετικά δέντρα

Μελέτη Συσχέτισης Ολόκληρου του Γονιδιώματος- (genome-wide association study) GWAS

Σε μια μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος, τόσο οι ασθενείς όσο και οι ομάδες ελέγχου μη ασθενών για μια συγκεκριμένη διαταραχή (όπως καρδιακές παθήσεις, σχιζοφρένεια ή μονογονιδιακή διαταραχή) ελέγχονται για SNPs σε ολόκληρο το γονιδιώμα τους. Μπορούν να εντοπιστούν κατ' αυτόν τον τρόπο, εκείνα τα SNP που στατιστικά βρίσκονται πιο συχνά σε ασθενείς από ό,τι σε μη ασθενείς.



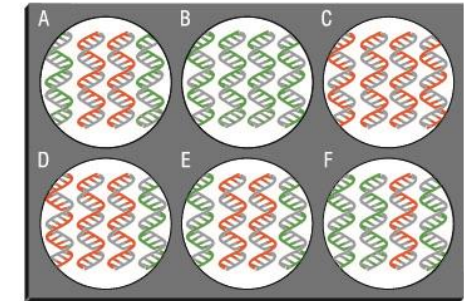
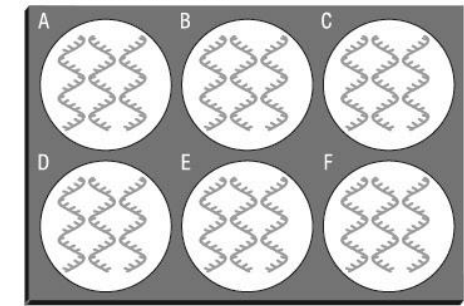
Μικροσυστοιχίες DNA



✓ Το ερευνητικό δείγμα είναι στο διάλυμα

✓ Το γνωστό δείγμα – ακινητοποιημένο

DNA μικροσυστοιχία (τσιπ)

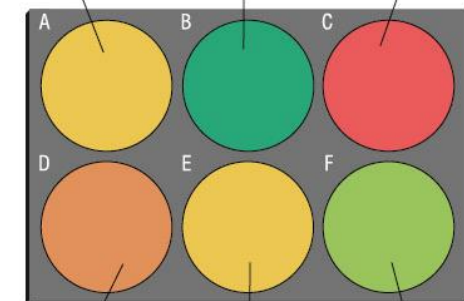


Σάρωση με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού

Το γονίδιο A εκφράζεται εξίσου στα δείγματα 1 και 2

Το γονίδιο B υποεκφράζεται κατά πολύ στο δείγμα 2

Το γονίδιο C είναι υψηλά υπερεκφραζόμενο στο δείγμα 2



Το γονίδιο D υπερεκφράζεται μέτρια στο δείγμα 2

Το γονίδιο E εκφράζεται στο ίδιο επίπεδο στα δείγματα 1 και 2

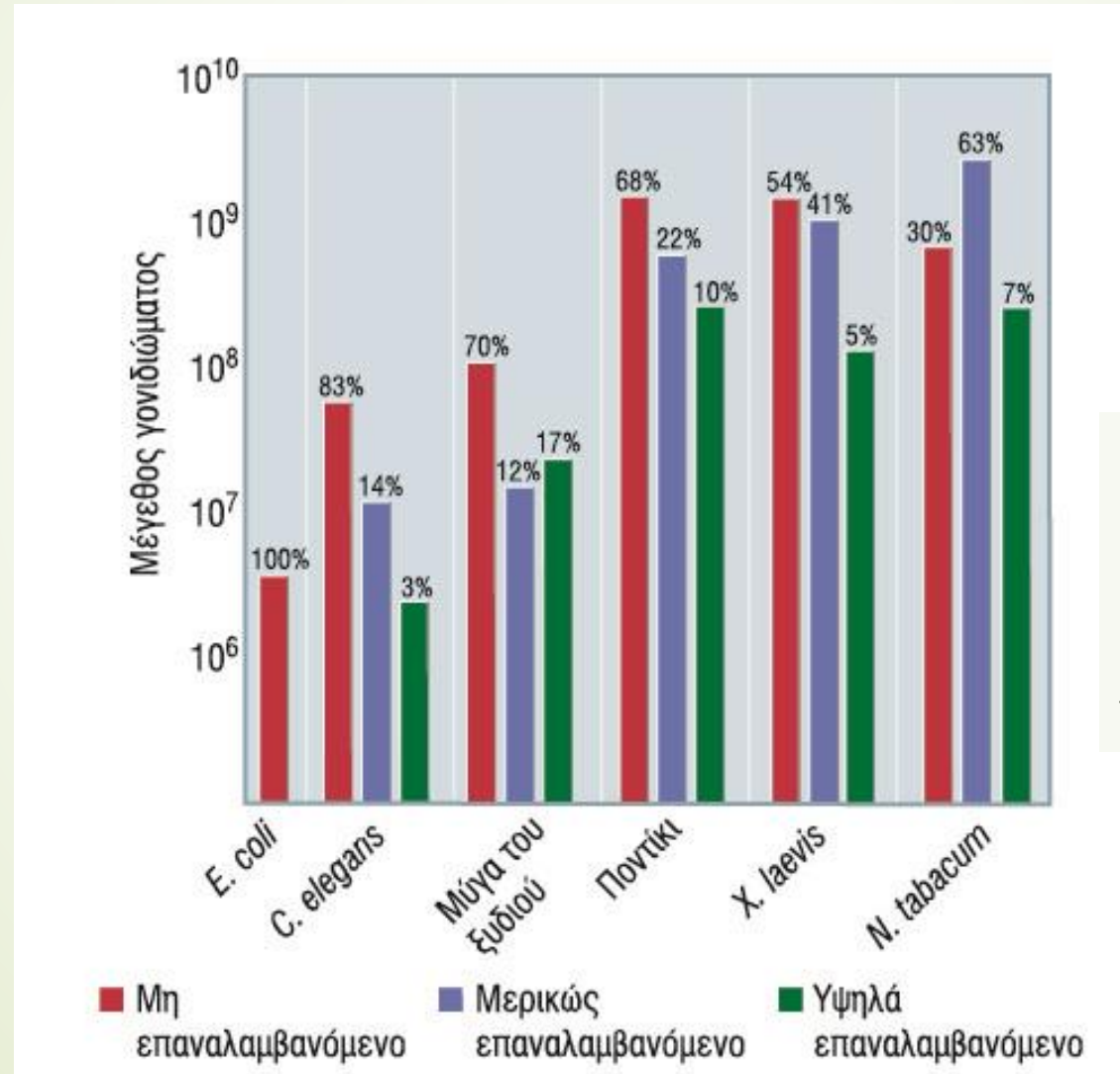
Το γονίδιο F υποεκφράζεται μέτρια στο δείγμα 2

Ευκαρυωτικό γονιδίωμα


Οι αλληλουχίες DNA που συνθέτουν ένα ευκαρυωτικό γονιδίωμα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες:

- ✓ Μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που είναι μοναδικές.
- ✓ Μερικώς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που είναι διάσπαρτες και επαναλαμβάνονται λίγες φορές, με ορισμένα αντίγραφα τα οποία δεν είναι πανομοιότυπα.
- ✓ Υψηλά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που είναι βραχείες και συνήθως επαναλαμβάνονται σαν συστοιχίες σε σειρά.

Η απόλυτη περιεκτικότητα σε μη επαναλαμβανόμενο DNA αυξάνεται αναλογικά με το μέγεθος του γονιδιώματος ($\max \approx 2 \cdot 10^9$ bp).



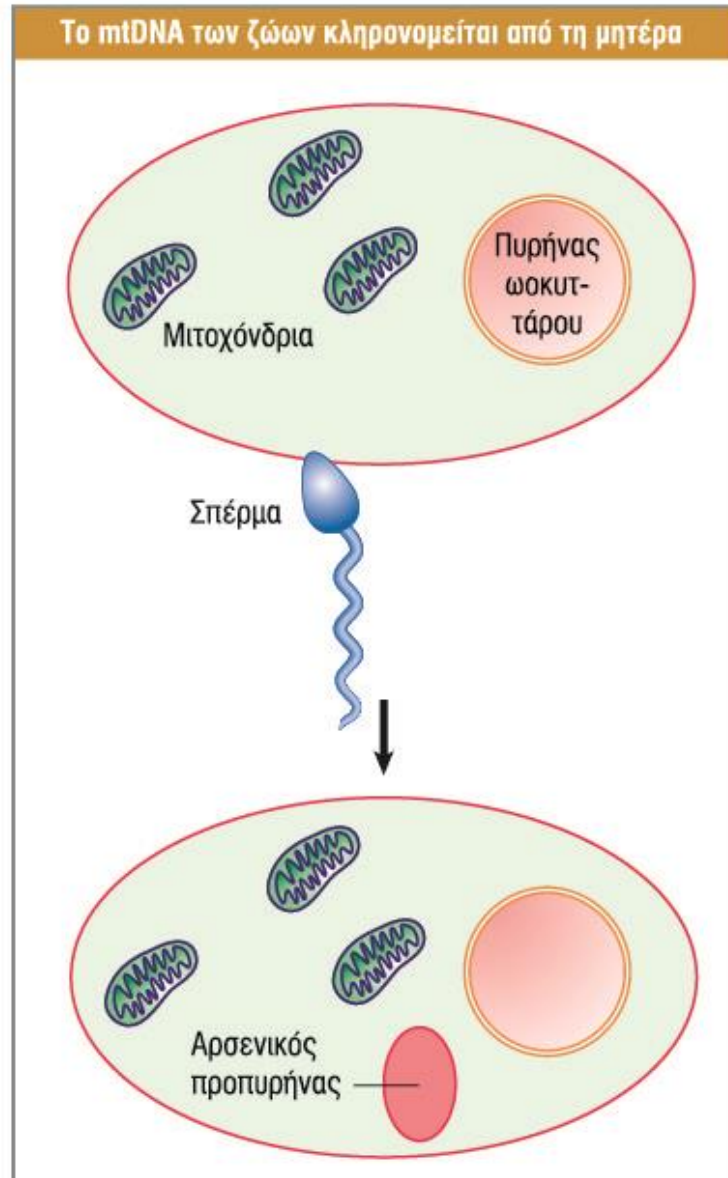
Οι αναλογίες διαφορετικών συστατικών (τύπων) των αλληλουχιών ποικίλλουν μεταξύ των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων.



Πως μπορείτε να προσδιορίσετε τα ευκαρυωτικά
γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες;

mtDNA

Το mtDNA των ζώων κληρονομείται από τη μητέρα



Το DNA από το σπερματοζώαριο εισέρχεται στο ωοκύτταρο για να σχηματίσει τον αρσενικό προπυρήνα στο γονιμοποιημένο ωάριο, αλλά όλα τα μιτοχόνδρια παρέχονται από το ωοκύτταρο.

Χρήση του mtDNA για την ανασυγκρότηση ανθρώπινων φυλογενετικών γενεών

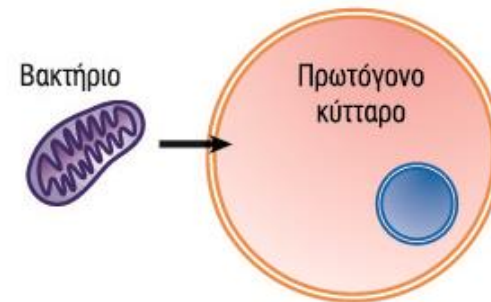
- ✓ Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες έχουν γονιδιώματα που δείχνουν μη-μεντελική κληρονομικότητα. Συνήθως είναι μητρικά κληρονομήσιμα.
- ✓ Τα γονιδιώματα των οργανιδίων μπορεί να υποστούν διαχωρισμό στα σωματικά κύτταρα των φυτών.
- ✓ Συγκρίσεις ανθρώπινου μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), υποδεικνύουν ότι ο σημερινός άνθρωπος προέρχεται από έναν μόνο πληθυσμό που υπήρχε περίπου 200.000 χρόνια πριν.

mtDNA

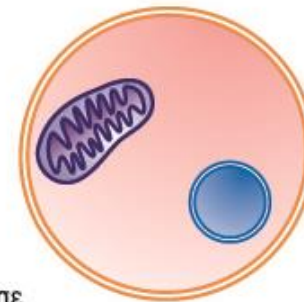
Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα έχουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (κυρίως για τα σύμπλοκα I-IV της αναπνοής), rRNA & tRNA.

Είδος	Μέγεθος	Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες	Γονίδια που κωδικοποιούν RNA
Μύκητες	19-100	8-14	10-28
Φυτά	186-386	27-34	21-30
Ζώα	16-17	13	4-24
Πρώτιστα	6-100	3-26	2-27

Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες εξελίχθηκαν με ενδοσυμβίωση

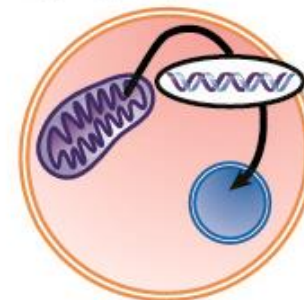


Ενδοσυμβίωση



Το βακτήριο εξελίσσεται σε μιτοχόνδριο, χάνοντας γονίδια που είναι απαραίτητα για την ανεξάρτητη ζωή

Τα γονίδια μεταφέρονται από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα



Τα μιτοχόνδρια προήλθαν από ενδοσυμβιωτικό γεγονός, όταν ένα βακτήριο αιχμαλωτίστηκε (παγιδεύτηκε) από ένα ευκαρυωτικό κύτταρο.

Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες εξελίχθηκαν με ενδοσυμβίωση

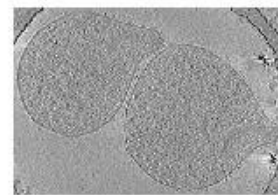
- ✓ Τα περισσότερα από τα γονίδια των μιτοχονδριακών και χλωροπλαστικών γονιδιωμάτων έχουν μεταφερθεί στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του οργανιδίου.
- ✓ Οι φυλογενετικές αναλύσεις δείχνουν ότι η μεταφορά των γονιδίων έχει συμβεί ανεξάρτητα σε πολλές διαφορετικές γενεαλογίες.
- ✓ Η μεταφορά των γονιδίων του μιτοχονδρίου στον πυρήνα συνέβη μόνο πρώιμα κατά την εξέλιξη των ζωικών κυττάρων, αλλά είναι πιθανό ότι στα φυτικά κύτταρα η διαδικασία να συνεχίζεται ακόμη σήμερα.



Γονιδιωματικές αλληλουχίες και εξέλιξη

Ο ελάχιστος αριθμός γονιδίων που απαιτείται για κάθε τύπο οργανισμού αυξάνει ανάλογα με την πολυπλοκότητά του

500 γονίδια
Ενδοκυττάριο (παρασιτικό)
βακτήριο



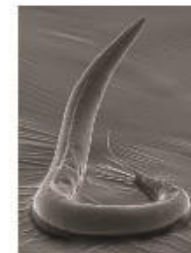
1.500 γονίδια
Ανεξάρτητο ζωντανό βακτήριο



5.000 γονίδια
Μονοκύτταρος ευκαρυώτης



13.000 γονίδια
Πολυκύτταρος ευκαρυώτης



25.000 γονίδια
Ανώτερα φυτά



25.000 γονίδια
Θηλαστικά



Ευκαρυωτικό γονιδίωμα

✓ Συγκριτική γονιδιωματική (Comparative genomics)

Ο τομέας μελέτης που εξετάζει τις ομοιότητες και τις διαφορές μεταξύ αλληλουχιών DNA, γονιδίων, διάταξης γονιδίων, ρυθμιστικών αλληλουχιών και άλλων γονιδιωματικών ορόσημων για να προσδιοριστεί η συγγένεια των διαφορετικών οργανισμών.

✓ Απόμακρο ή Διακριτή ομάδα (Outgroup)

Στη συγκριτική γονιδιωματική, ένα είδος που είναι λιγότερο συγγενικό με το είδος που ερευνάται, αλλά είναι αρκετά κοντά για να δείξει σημαντική ομοιότητα.

Ευκαρυωτικό γονιδίωμα

✓ Νησίδες παθογένειας (Pathogenicity islands)

Περιοχές DNA που υπάρχουν στα παθογόνα βακτηριακά γονιδιώματα αλλά απουσιάζουν από τους μη παθογόνους συγγενείς τους.

✓ Οριζόντια μεταφορά (Horizontal transfer)

Η μεταφορά του DNA από ένα κύτταρο στο άλλο με διαδικασία όπως βακτηριακή **σύζευξη**, διαφορετική από την κυτταρική διαίρεση.

Τα μεγέθη των γονιδιωμάτων και οι αριθμοί των γονιδίων

Είδη	Γονιδιώματα (σε Mb)	Γονίδια	Θνησιγόνος γενετικός τόπος
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58	470	~300
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1,11	834	
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,83	1.743	
<i>Methanococcus jannaschi</i>	1,66	1.738	
<i>Bacillus subtilis</i>	4,2	4.100	
<i>Escherichia coli</i>	4,6	4.288	1.800
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13,5	6.023	1.090
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12,5	4.929	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	119	25.498	
<i>Oryza sativa (rice)</i>	466	~32.000	
<i>Drosophila melanogaster</i>	165	13.601	3.100
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97	18.424	
<i>Homo sapiens</i>	3.300	~25.000	

Τα μεγέθη των γονιδιωμάτων και οι αριθμοί των γονιδίων

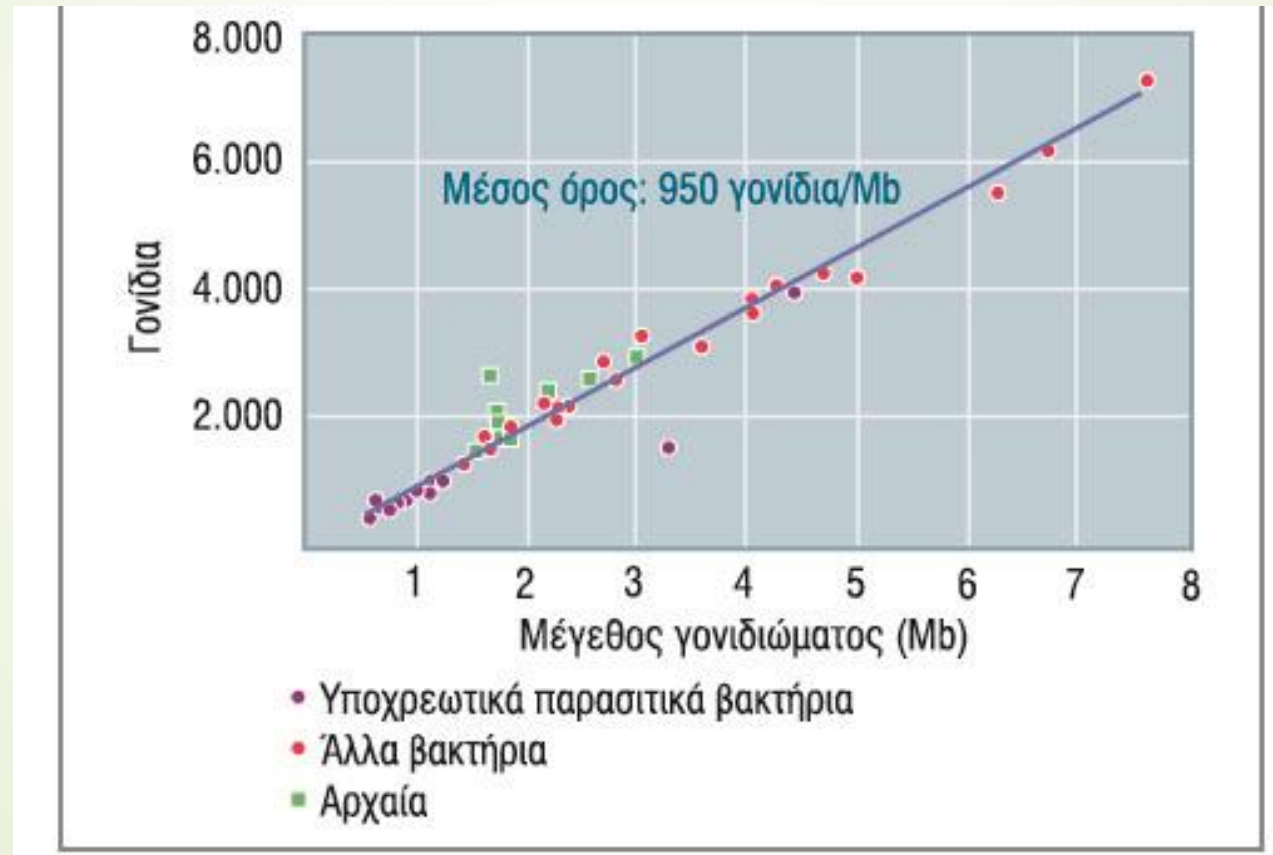
- ✓ Στους προκαρυώτες το μεγαλύτερο μέρος του DNA $\approx 85-90\%$ κωδικοποιεί RNA ή πολυπεπίδια

Όλοι οι προκαρυώτες με μέγεθος $\leq 1.5\text{Mb}$ είναι παράσιτα

- ✓ Τα αρχαία διαθέτουν βιολογικές ιδιότητες που είναι ενδιάμεσες μεταξύ άλλων προκαρυωτών και εκείνων των ευκαρυωτών, με μεγέθη γονιδιωμάτων τους 1,5 - 3 Mb, που αντιστοιχεί σε 1.500 έως 2.700 γονίδια.
- ✓ Τα γονιδιώματα των αρχαίων και των μικρότερων ανεξάρτητων βακτηρίων υποδεικνύουν τον ελάχιστο αριθμό γονιδίων που είναι απαραίτητος ώστε να καταστήσει ένα κύτταρο ικανό να λειτουργεί ανεξάρτητα στο περιβάλλον του.

Το μικρότερο γονιδίωμα αρχαίου διαθέτει περίπου 1.500 γονίδια.

Το μέγεθος του βακτηριακού γονιδιώματος είναι ανάλογο με τον αριθμό των γονιδίων

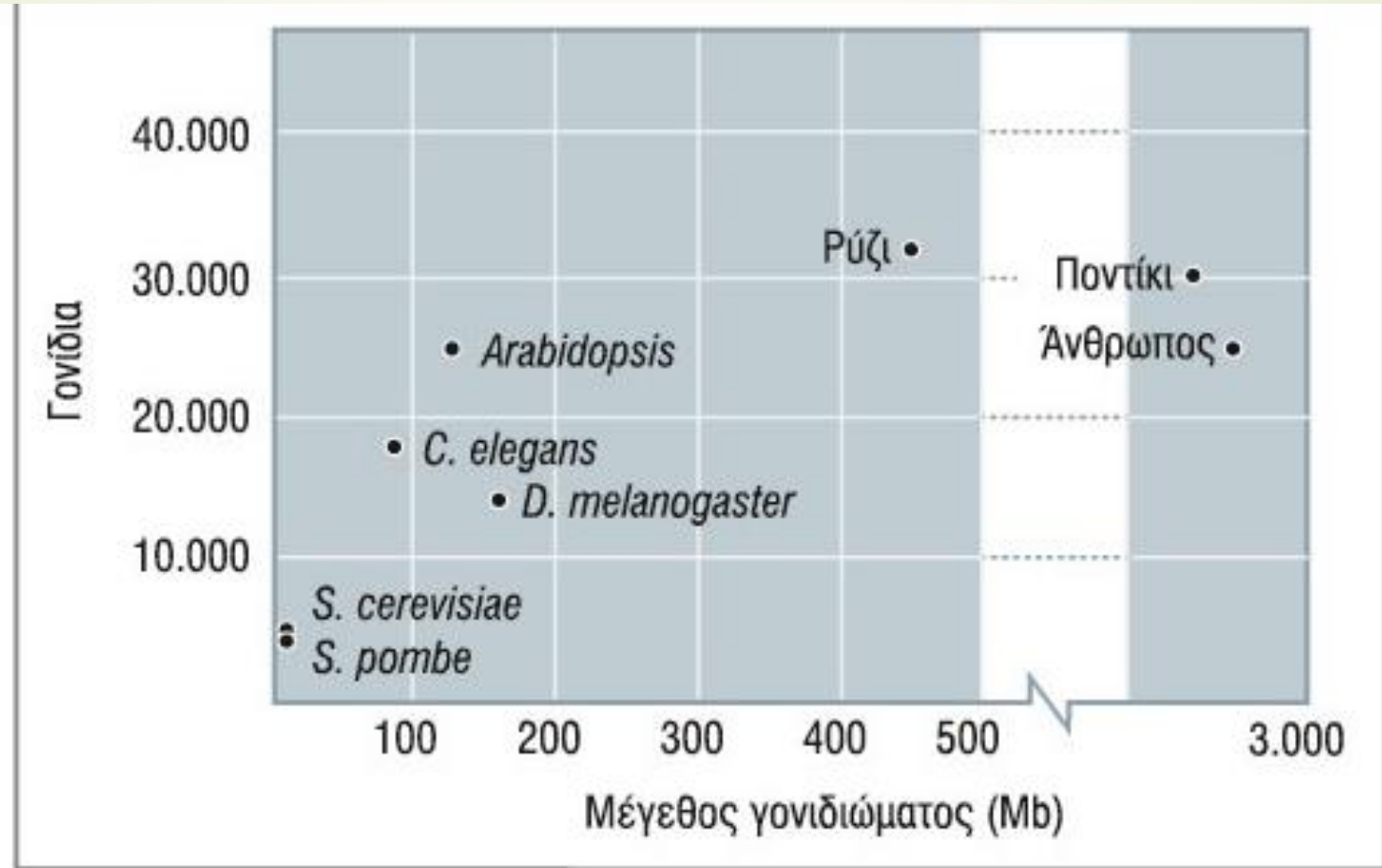




Ο ελάχιστος αριθμός γονιδίων για ένα:

- παρασιτικό προκαρυώτη είναι περίπου 500,
- ελεύθερο ζωντανό μη παρασιτικό προκαρυώτη είναι περίπου 1.500.

Ο αριθμός των γονιδίων ενός ευκαρυώτη κυμαίνεται από 6000 έως 32.000.



Ο αριθμός των γονιδίων δε σχετίζεται με το μέγεθος του γονιδιώματος ή την πολυπλοκότητα του οργανισμού.



Ο αριθμός των γονιδίων ενός ευκαρυώτη
κυμαίνεται από 6000 έως 32.000.

- ✓ Το φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει ενδιάμεσο μέγεθος γονιδιώματος μεταξύ του σκουληκιού και της μύγας των φρούτων, αλλά διαθέτει μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων (περίπου 25.000) και από τα δύο.
- ✓ Το γονιδίωμα του ρυζιού (*Oryza sativa*) είναι περίπου 43 φορές μεγαλύτερο από αυτό του *Arabidopsis*, αλλά ο αριθμός των γονιδίων είναι μόνο περίπου 25% περισσότερο και εκτιμάται σε περίπου 32.000.

Το επαναλαμβανόμενο DNA καταλαμβάνει το 42-45% του γονιδιώματος.

Το ποσοστό των γονιδίων που βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα ↑ με το μέγεθος του γονιδιώματος στους πολυκύτταρους ευκαρυώτες.

	Μοναδικά γονίδια (%)	Οικογένειες με 2-4 μέλη (%)	Οικογένειες με >4 μέλη (%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	89	10	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72	19	9
<i>Drosophila melanogaster</i>	72	14	14
<i>Caenorhabditis elegans</i>	55	20	26
<i>Arabidopsis thaliana</i>	35	24	41

Ο αριθμός των γονιδίων δε σχετίζεται με το μέγεθος του γονιδιώματος ή την πολυπλοκότητα του οργανισμού.

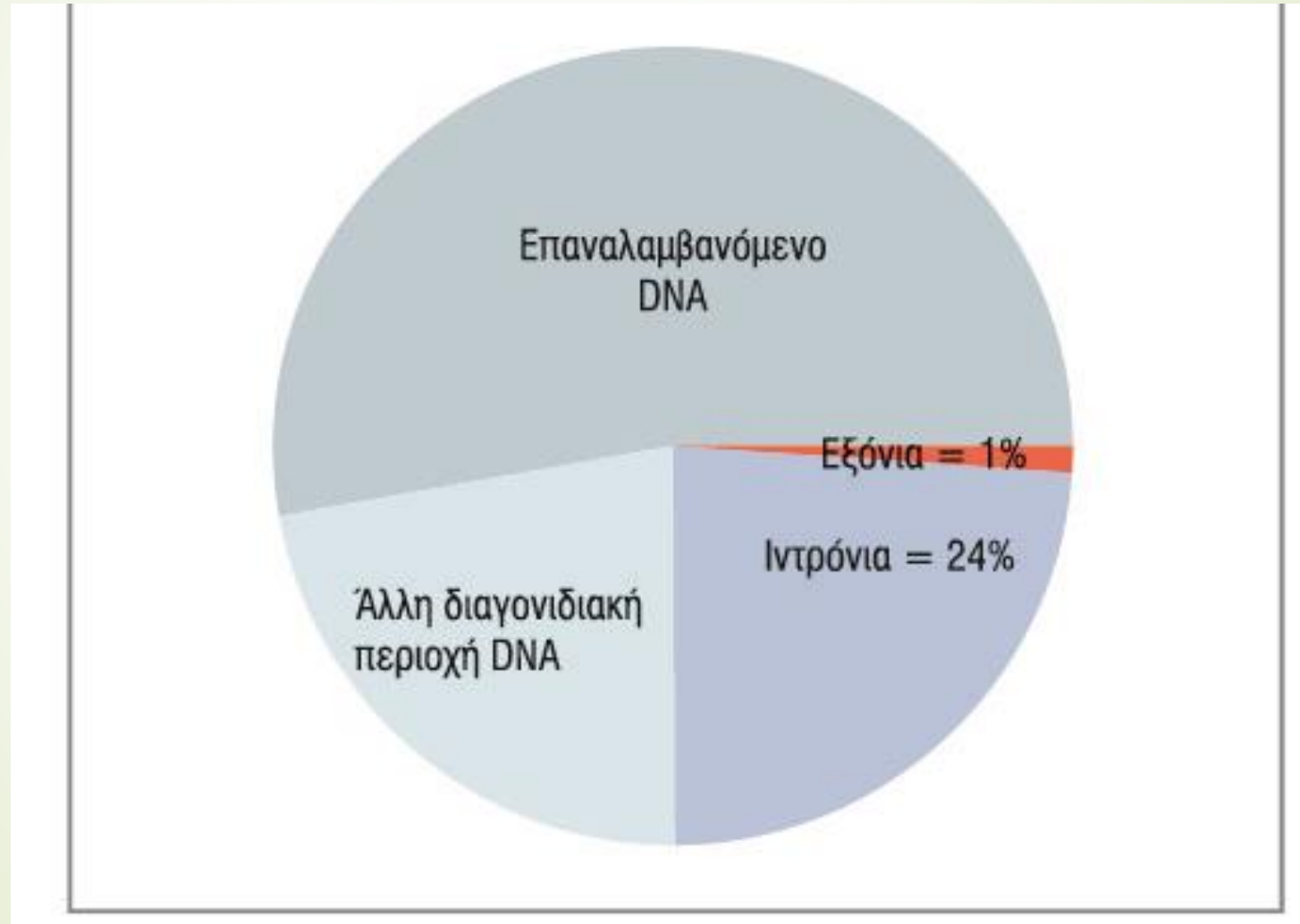


Το ανθρώπινο γονιδίωμα

Το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει λιγότερα γονίδια από ότι αναμενόταν

- ✓ Μόνο το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελείται από εξόνια.
- ✓ Τα εξόνια αποτελούν περίπου το 5% κάθε γονιδίου, επομένως τα γονίδια (εξόνια συν ιντρόνια) αποτελούν περίπου το 25% του γονιδιώματος.
- ✓ Το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει περίπου 20.000 γονίδια.
- ✓ Περίπου το 60% των ανθρώπινων γονιδίων παρουσιάζουν εναλλακτική συρραφή.
- ✓ Έως και το 80% των εναλλακτικών συρραφών αλλάζουν την πρωτεϊνική αλληλουχία, επομένως το ανθρώπινο πρωτέωμα έχει 50.000-60.000 πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

Τα γονίδια καταλαμβάνουν το 25% του ανθρώπινου γονιδιώματος, ενώ οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αποτελούν $\leq 1\%$ του γονιδιώματος



50% του ανθρώπινου γονιδιώματος-επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

- ✓ Τρανσποζόνια (**Transposons**) (είτε ενεργά, είτε ανενεργά) αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (**45%** του γονιδιώματος). Όλα τα τρανσποζόνια βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα.
- ✓ Τα επεξεργασμένα ψευδογονίδια (**pseudogenes**), περίπου 3.000 συνολικά, αντιπροσωπεύουν περίπου το 0,1% του συνολικού DNA. (Πρόκειται για αλληλουχίες που προκύπτουν από ένθεση μέσα στο γονιδίωμα ενός αντίστροφα μεταγραφόμενου DNA που είναι αντίγραφο μιας αλληλουχίας mRNA)

50% του ανθρώπινου γονιδιώματος-επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

- ✓ **Επαναλήψεις απλών αλληλουχιών** (υψηλά επαναλαμβανόμενου DNA όπως επαναλήψεις CA) που αντιπροσωπεύουν περίπου το 3% του γονιδιώματος.
- ✓ **Διπλασιασμοί περιοχών (Segmental duplications)** (περιοχές 10-300 kb που έχουν διπλασιαστεί σε μια νέα θέση) που αντιστοιχούν περίπου στο 5% του γονιδιώματος.
- ✓ **Διαδοχικές (ευθείες) επαναλήψεις (Tandem repeats)** σχηματίζουν μεγάλες περιοχές ενός συγκεκριμένου τύπου αλληλουχίας. Αυτά βρίσκονται ιδιαίτερα σε κεντρομερή και τελομερή.