

LECTURE II
**Biochemical Methods of Characterization
in Cellular (Patho)Physiology**



**Διατμηματικό Πρόγραμμα
Μεταπτυχιακών Σπουδών
στη Βιοανόργανη
February 1, 2021**

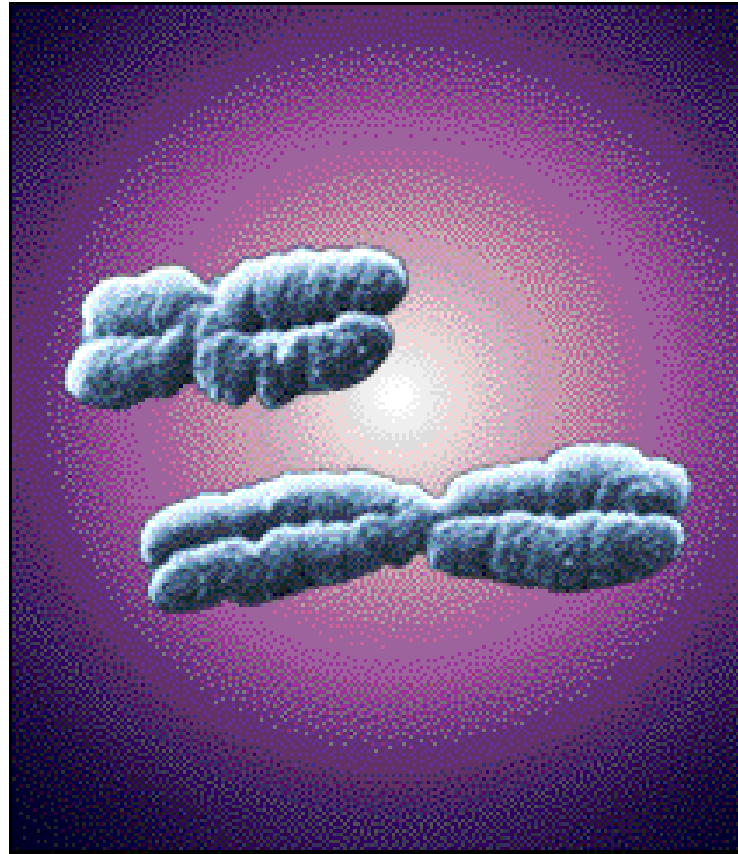


**LABORATORY OF INORGANIC CHEMISTRY
AND ADVANCED MATERIALS
DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI**

ΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ

- Η γενετική πληροφορία σε ένα χρωμόσωμα περιέχεται σε έναν μακρύ και μη διακοπτόμενο κλώνο DNA, ο οποίος περιέχει πολλά γονίδια. Στα ανώτερα θηλαστικά, τα κύτταρά τους περιέχουν σε κάθε χρωμόσωμα χιλιάδες γονίδια. Στον άνθρωπο υπάρχουν 46 διαφορετικά χρωμοσώματα ενωμένα σε 23 ζεύγη.
- Υπάρχει σε εξέλιξη η τελική ερευνητική προσπάθεια που στοχεύει στην ανακάλυψη της ακολουθίας των χρωμοσωμάτων στον άνθρωπο, τα ζώα, τη ζύμη, τον ποντικό και τα βακτήρια. Στην περίπτωση του ανθρώπινου γονιδιώματος η εργασία χαρτογράφησης έχει σχεδόν ολοκληρωθεί.
- Η χαρτογράφηση του ανθρώπινου DNA δίνει την ευκαιρία να ανακαλυφθούν νέα γονίδια και υπόσχεται να επιλύσει θεραπευτικά σημαντικές γενετικές ασθένειες.
- Έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 8000 γονίδια. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 υπεύθυνα για τον καρκίνο του μαστού, και το γονίδιο του συνδρόμου Werner, το οποίο προκαλεί πρόωμη γήρανση.

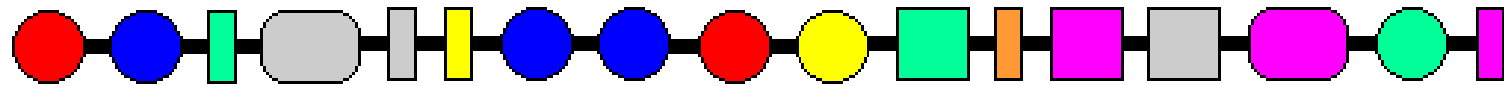
ΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ



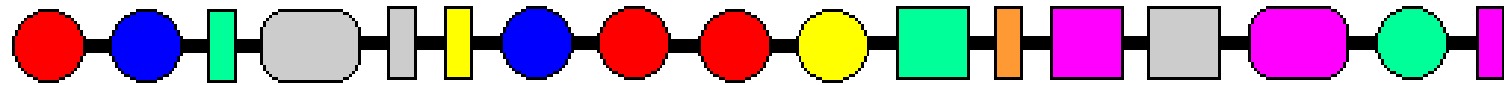
ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ DNA

- Ως αποτέλεσμα της προσπάθειας να ανακαλυφθούν διαφορές μεταξύ δύο ειδών DNA, προέκυψαν νέα τεχνολογικά μοριακά εργαλεία. Ένα από αυτά είναι επίτευξη του **περιγράμματος DNA (DNA profiling)** ή **αποτύπωση (typing – fingerprinting)**. Ερωτήματα αναφερόμενα στις διαφορές DNA από ποικίλους οργανισμούς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της σχέσης του ενός με το άλλο στη φύση.
- Σημαντική συμβολή στην διερεύνηση του θέματος αυτού προσέφερε ο Mendel, ο οποίος ανακάλυψε τον ειδικό παράγοντα που μεταφέρεται αμετάβλητος από τους προγόνους στους απογόνους. Αναγνώρισε την ύπαρξη αλληλόμορφων σε ένα γονίδιο, με το κάθε ένα από αυτά να προσδιορίζει ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του οργανισμού (π.χ. χρώμα). Έτσι, κατά την **ζευγάρωση (pairing)** δύο χρωμοσωμάτων λαμβάνει χώρα ανταλλαγή DNA, η οποία αποκαλείται **επιχιασμός (crossing over)**. Αυτή οδηγεί σε νέα χρωμοσώματα που καθορίζουν την γενετική ταυτότητα του οργανισμού.
- Με βάση την αρχή αυτή, έχει επιβεβαιωθεί ότι δύο γονίδια που βρίσκονται γενετικά κοντά δεν θα διασπασθούν μέσω διασταύρωσης, γεγονός που μπορεί να συμβεί όταν η απόσταση αυτή είναι μεγάλη. Έτσι, αναδύθηκε ο όρος **γενετική σύνδεση (genetic linkage)**.

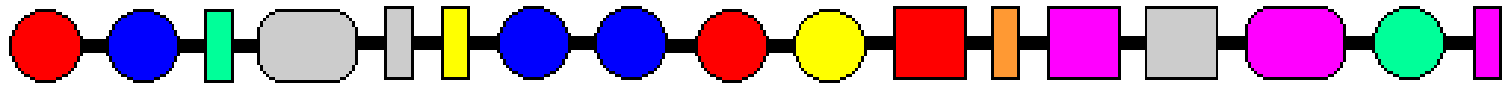
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ – ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ



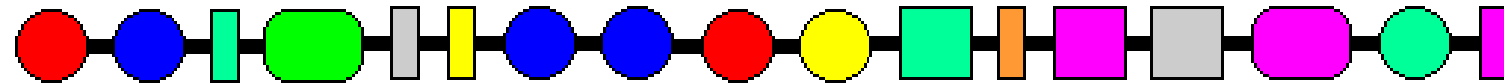
WILD TYPE PROTEIN



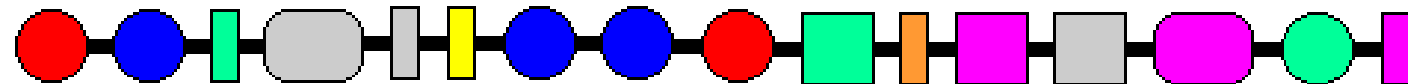
MUTANT PROTEIN 1



MUTANT PROTEIN 2



MUTANT PROTEIN 3



MUTANT PROTEIN 4

5
A
L
L
E
L
E
S

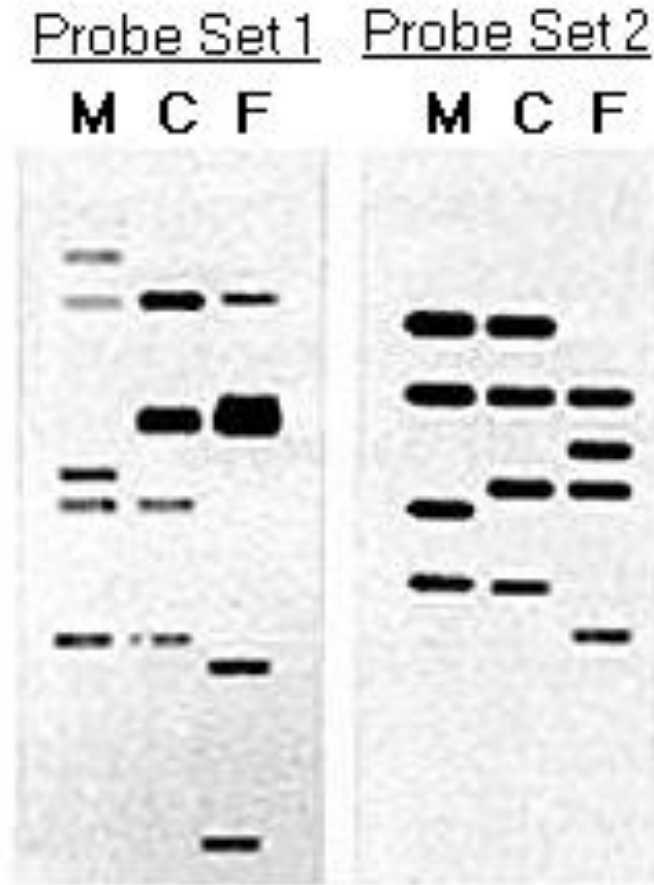
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ ΕΚ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RFLP)

- Όταν ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA ενός χρωσωμικού θραύσματος τέμνεται από ένα ένζυμο περιορισμού, προκύπτουν θραύσματα τα οποία κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (gel) εμφανίζουν ζώνες με μια συγκεκριμένη διάταξη κατά μέγεθος. Ο τύπος αυτός ή μοτίβο είναι συγκεκριμένος για το συγκεκριμένο κομμάτι DNA. Αν στο DNA αυτό εμφανισθεί μετάλλαξη τότε θα αλλάξει και ο προκύπτων τύπος κατά την επεξεργασία του DNA με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο. Αυτή η μεταβολή στον τύπο θραυσμάτων ονομάζεται **Πολυμορφισμός Μήκους Θραυσμάτων εκ Περιορισμού (RFLP)**. Ο πολυμορφισμός εμφανίζεται συχνά στο ανθρώπινο γονιδίωμα ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε γονιδιακή χαρτογράφηση. Το κύριο πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα να συμβάλλει στον εντοπισμό ενός γονιδίου σε συγκεκριμένη περιοχή του χρωμοσώματος. Η **ανάλυση RFLP** χρησιμοποιείται, επίσης, για την ανακάλυψη σχέσεως συγγένειας στα ζώα και τα φυτά. Εξίσου σημαντική είναι η RFLP ανάλυση στην ιατροδικαστική και την εγκληματολογία.

ΑΝΑΛΥΣΗ RFLP

- Οι περισσότερες περιοχές γονιδιώματος σε έναν άνθρωπο μεταβάλλονται πολύ λίγο. Υπάρχουν, όμως, περιοχές που δεν συνδέονται με δομικούς ή λειτουργικούς ρόλους και μεταβάλλονται πολύ από άτομο σε άτομο. Οι περιοχές αυτές λέγονται πολυμορφικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ενός ατόμου αντί να ερευνηθεί ολόκληρο το γονιδίωμά του. **Προσοχή!!** Η πολυμορφική περιοχή που εξετάζεται είναι δυνατόν να είναι ίδια με την αντίστοιχη ενός άλλου ατόμου.
- Οι πολυμορφικές περιοχές περιλαμβάνουν πολλαπλές ταυτόσημες ακολουθίες που περιέχουν από μερικά μέχρι 60 νουκλεοτίδια. Ο αριθμός αυτών των επαναλαμβανόμενων μονάδων μεταβάλλεται σημαντικά από άτομο σε άτομο. Κάθε τέτοια περιοχή περιλαμβάνει παράπλευρες όμορες περιοχές, οι οποίες με τη δράση ενζύμων περιορισμού οδηγούν σε θραύσματα μεταβλητού μεγέθους ανάλογα με τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Αυτές οι περιοχές ονομάζονται **διαδοχικές επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (VNTR)**.
- Κάθε VNTR περιέχει δύο θραύσματα (ένα από κάθε γονέα). Όταν δράσει επάνω του ένζυμο περιορισμού λαμβάνονται δύο ζώνες και ο παραγόμενος τύπος ονομάζεται **τύπος απλού τόπου (single locus pattern)**. Όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα VNTR, τότε η ανάλυση ονομάζεται **πολυτοπική ανάλυση (multiple locus fingerprinting)**.

ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΑΠΛΟΥ ΤΟΠΟΥ Single Locus Fingerprinting



Αποτύπωση μινιδορυφών για την απόδειξη συγγένειας χρησιμοποιώντας μίγματα δύο και τριών ανιχνευτών απλού τόπου (probe sets 1 και 2).
Οι ανιχνευθέντες τόποι στο τέκνο (C) αποτελούν ξεκάθαρα σύνθεση εκείνων που βρίσκονται στη μητέρα (M) και τον πατέρα (F).

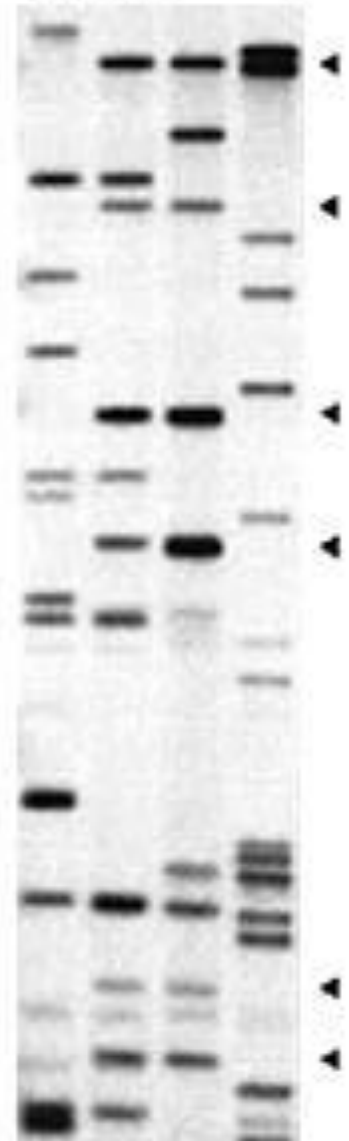
ΠΟΛΥΤΟΠΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ Multilocus Fingerprinting

Αποτύπωση μικροδορυφόρων για την εδραίωση πατρότητας

Ο ανιχνευτής (probe), (CAG)₅, αναγνωρίζει μεγάλο αριθμό τόπων.

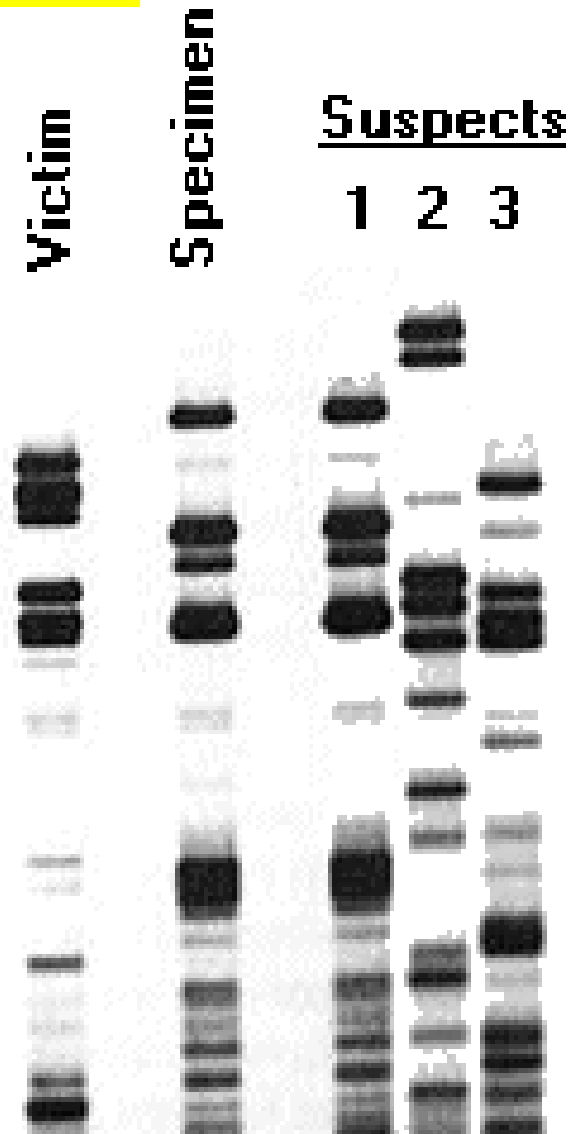
Εξετάστε τις ανιχνευθείσες ζώνες DNA του τέκνου που δεν ανιχνεύονται στο DNA από τη μητέρα.

Ποιο άρρεν είναι ο βιολογικός πατέρας του παιδιού?



ΠΟΛΥΤΟΠΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ Multilocus Fingerprinting

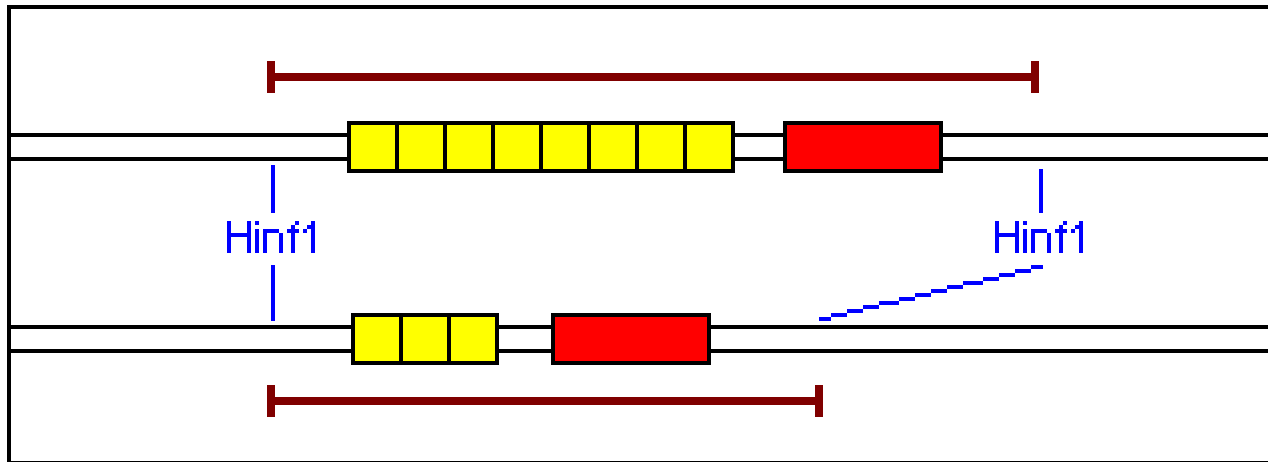
Πολυτοπική αποτύπωση για την ταυτοποίηση με αποδείξεις ιχνών από έγκλημα με υπόπτους
Ποιος ύποπτος ταυτοποιείται με το δείγμα?



Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ RFLP

- Εντοπίζεται η περιοχή RFLP
- Δρα ένζυμο περιορισμού που μπορεί να τμήσει την περιοχή RFLP
- Διεξάγεται ηλεκτροφόρηση πηκτής και ακολουθεί αποτύπωση σε χαρτί νιτροκυτταρίνης
- Χρησιμοποιείται επισημασμένος ανιχνευτής DNA συμπληρωματικός στην επαναλαμβανόμενη μονάδα του VNTR
- Προσδιορίζονται ζώνες που ανήκουν στο VNTR και άρα το μήκος κάθε VNTR. Η θέση κάθε ζώνης είναι ανάλογη με το μήκος του VNTR.
- Αν αναλυθεί μια περιοχή VNTR από δύο άτομα, τότε για κάθε άτομο θα προκύψουν δύο ζώνες (μια από κάθε γονέα). Οι τύποι των δύο αυτών αναλύσεων μπορεί να είναι ίδιοι ή να διαφέρουν. Αν ο τύπος του ενός ατόμου συγκρινόταν με τον αντίστοιχο του πατέρα ή της μητέρας του, μια από τις δύο ζώνες θα έπρεπε να είναι ίδια με εκείνη του ενός από τους γονείς.
- Για περισσότερη αξιοπιστία στο αποτέλεσμα της ανάλυσης RFLP χρησιμοποιούνται μέχρι και τέσσερις περιοχές RFLP, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη του **“Δακτυλικού Αποτυπώματος DNA” (DNA fingerprints)**. Η ανάλυση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί α) στην αναγνώριση συγγενών β) στον προσδιορισμό της πατρότητας παιδιών, και γ) στην διάγνωση γενετικών ανωμαλιών.

ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ (VNTR)



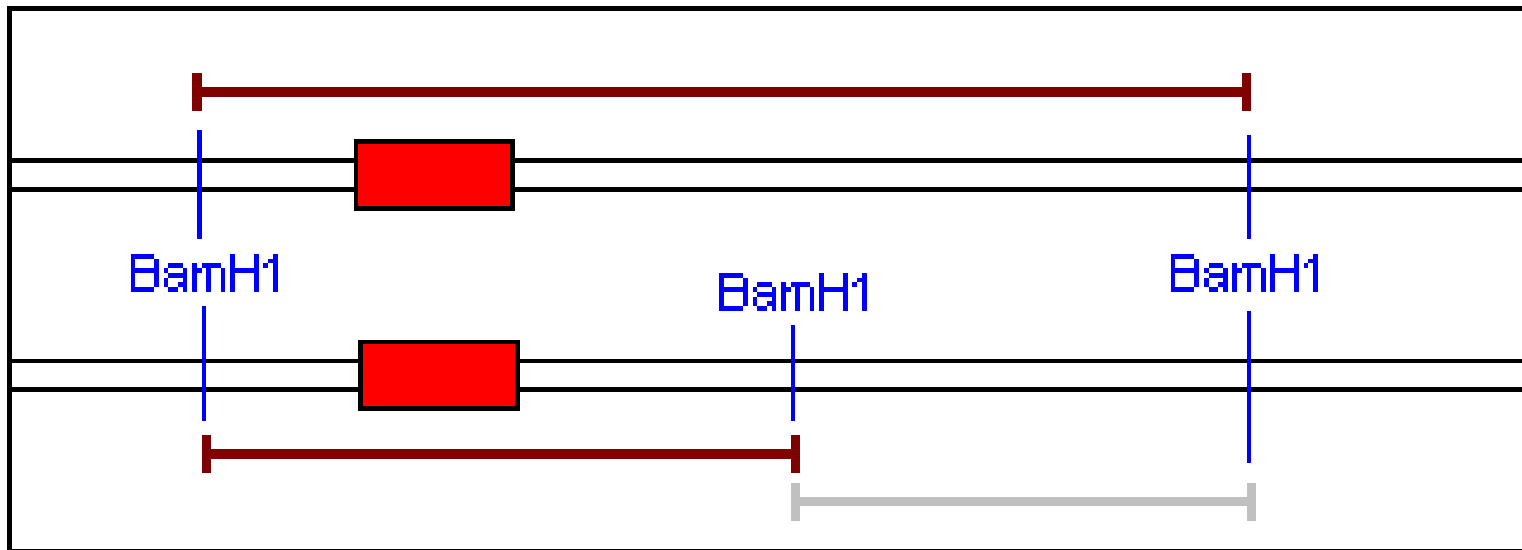
Ανάλυση του αριθμού των επαναλήψεων σε έναν ή περισσότερους τέτοιους τόπους.

Προσφέρει μια πολύ ευαίσθητη αποτίμηση της ατομικής ταυτότητας και είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται πάρα πολύ σε αποτύπωση DNA νομικών και ιατροδικαστικών υποθέσεων

Ένας τύπος VNTR με 8 έναντι 3 επαναλήψεων.

Επώαση με το ένζυμο περιορισμού HinfI παρέχει θραύσματα δύο μηκών τα οποία υβριδοποιούνται με τον ερυθρό ανιχνευτή

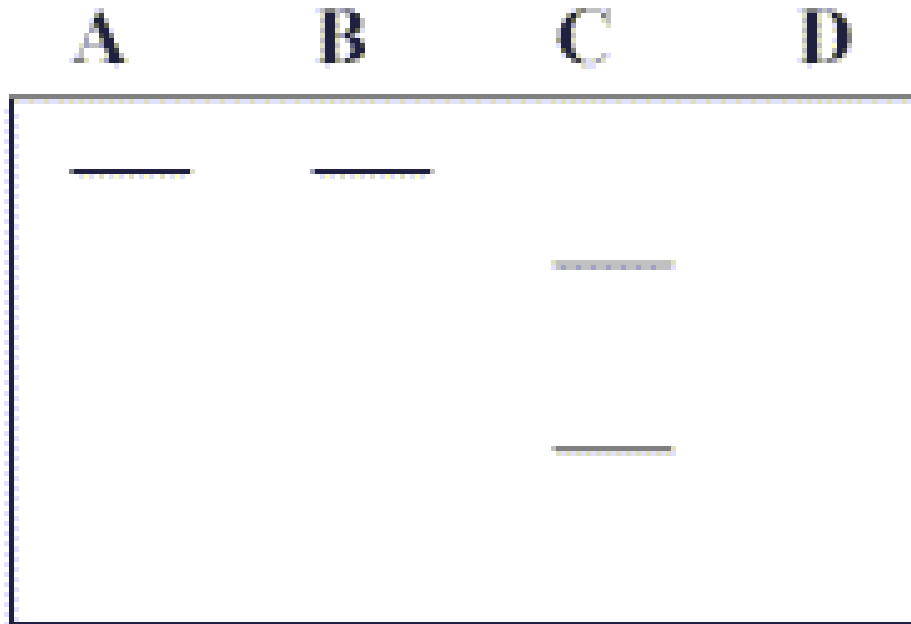
Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ RFLP



Πολυμορφισμός RFLP με BamHI στον οποίον ο επάνω κλώνος DNA διαθέτει μόνο δύο GGATCC τόπους, ενώ ο κάτω κλώνος διαθέτει μόνο τρεις.

Επώαση με επακόλουθο υβριδισμό με έναν ερυθρό ανιχνευτή αποκαλύπτει δύο θραύσματα διαφορετικού μήκους

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ



A = Normal gene - Individual 1

B = Normal gene - Individual 2

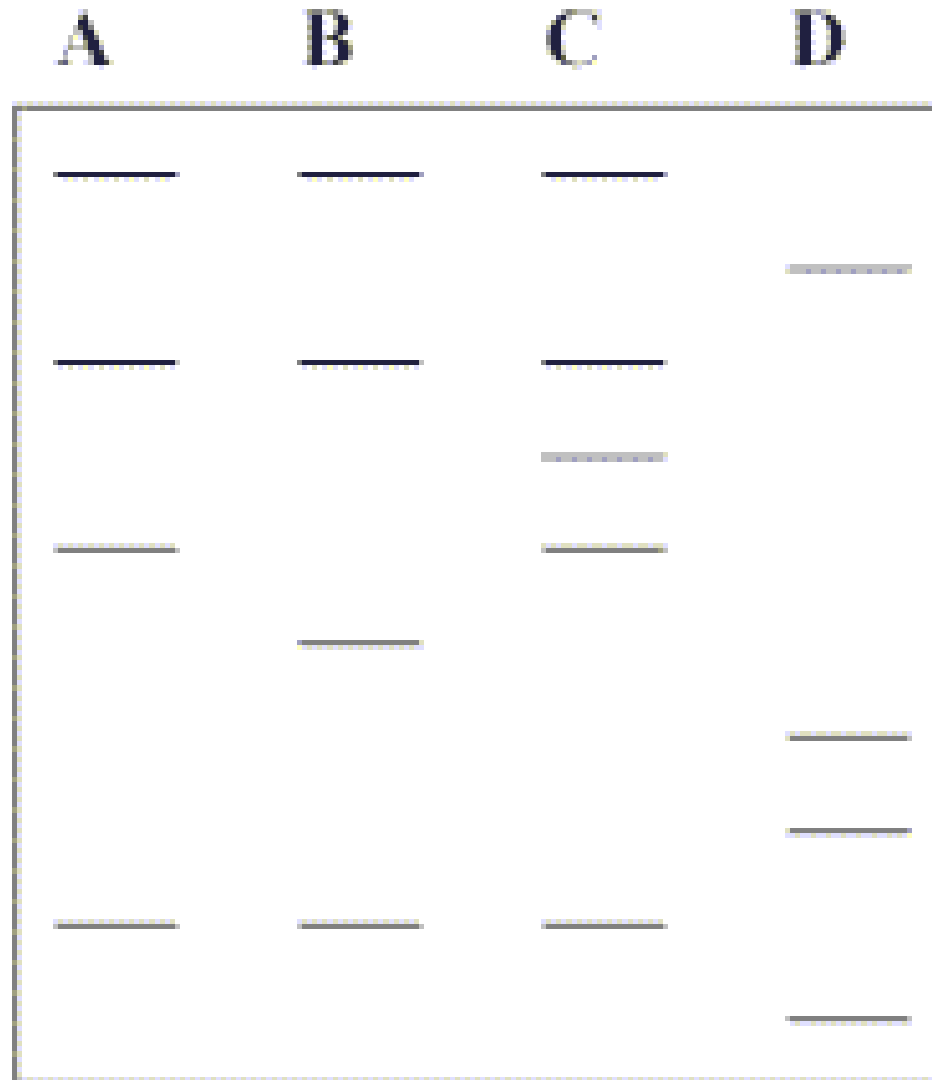
C = Point mutation

D = Deletion

ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΟ ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ

- Ενώ είναι σχετικά εφικτό να επιτευχθεί αποκλεισμός σχέσεως μεταξύ δύο ατόμων με την συμβολή της ανάλυσης RFLP, η αποκλειστική ταυτοποίηση συγκεκριμένων ατόμων είναι περισσότερο δύσκολη.
- Η αξιοπιστία της ανάλυσης RFLP ανέρχεται με την εξέταση μεγάλου αριθμού πολυμορφικών περιοχών του DNA ενός ή περισσότερων ατόμων.
- Η σημασία της προσέγγισης αυτής είναι μεγάλη στην περίπτωση της ιατροδικαστικής και των εγκληματολογικών ερευνών.

ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΕΙΔΩΝ



A, B, C = Closely related
D = Less closely related