

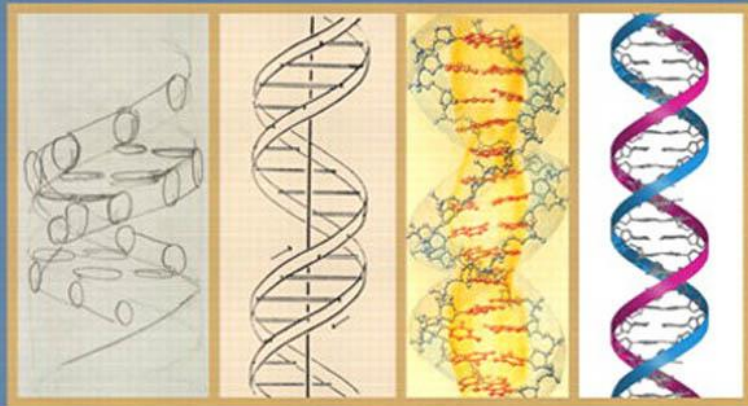
ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Αργυρώ Σγουρού, Assistant Prof.,

Laboratory of Biology
School of Science and Technology
Hellenic Open University

MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE

SEVENTH EDITION

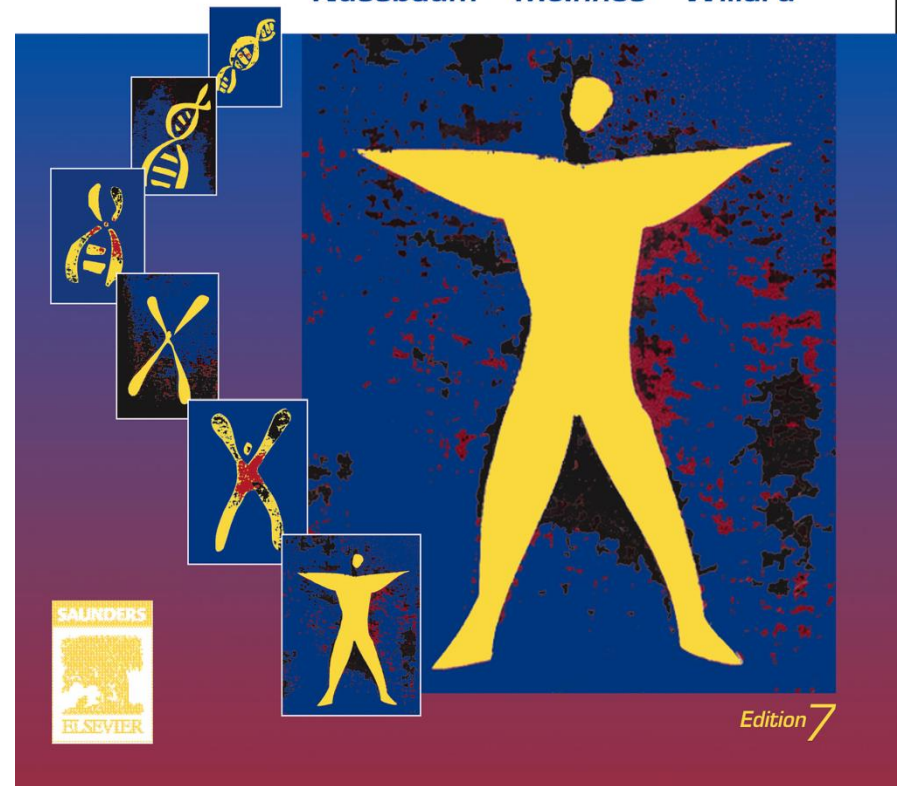


WATSON • BAKER • BELL
GANN • LEVINE • LOSICK

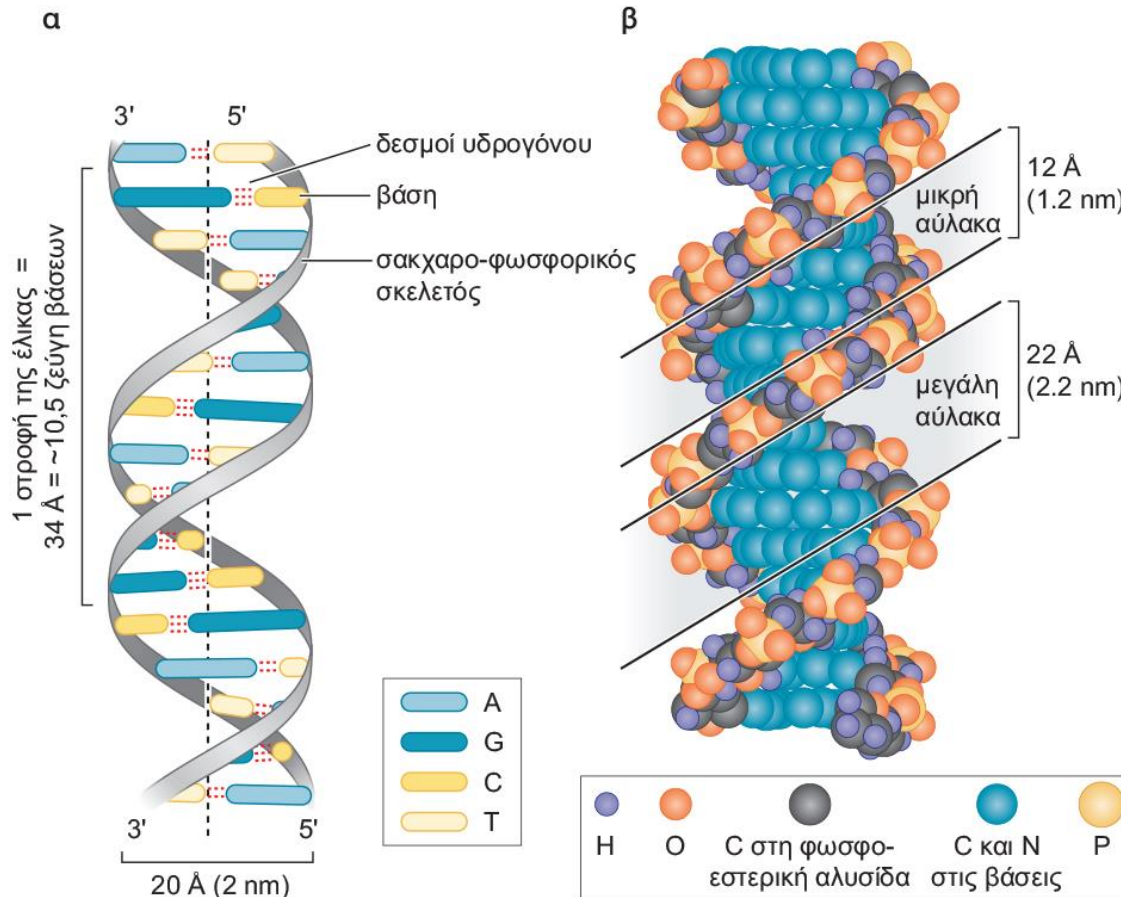
Thompson & Thompson

GENETICS IN MEDICINE

Nussbaum McInnes Willard

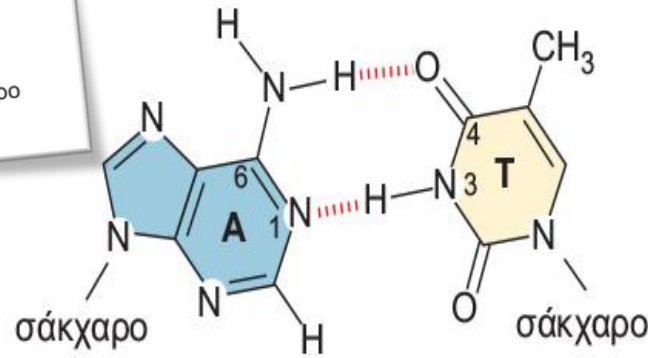
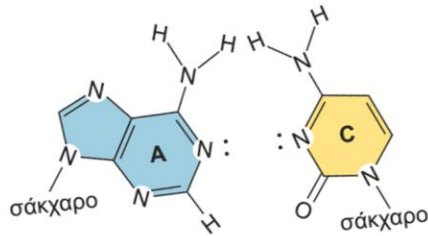
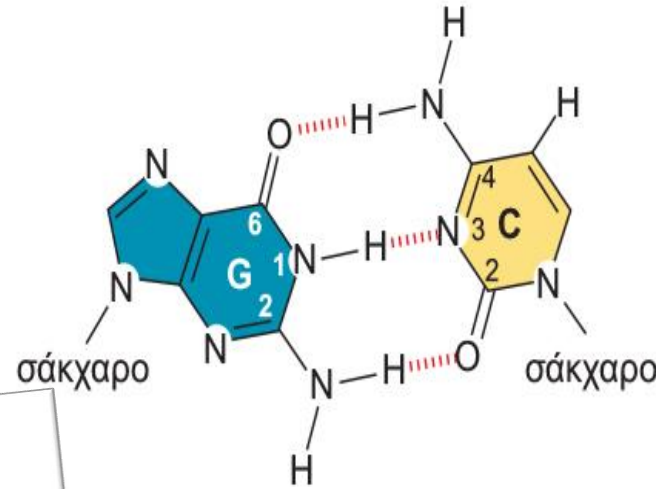
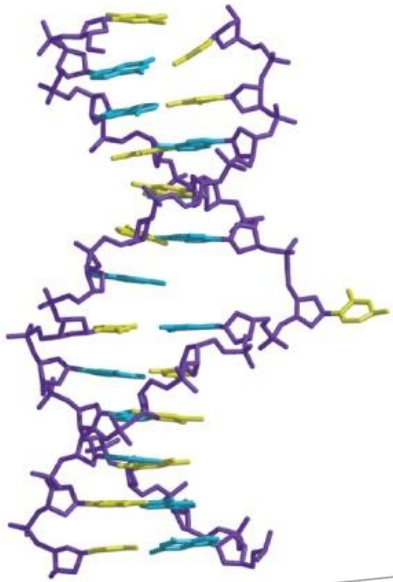


Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος

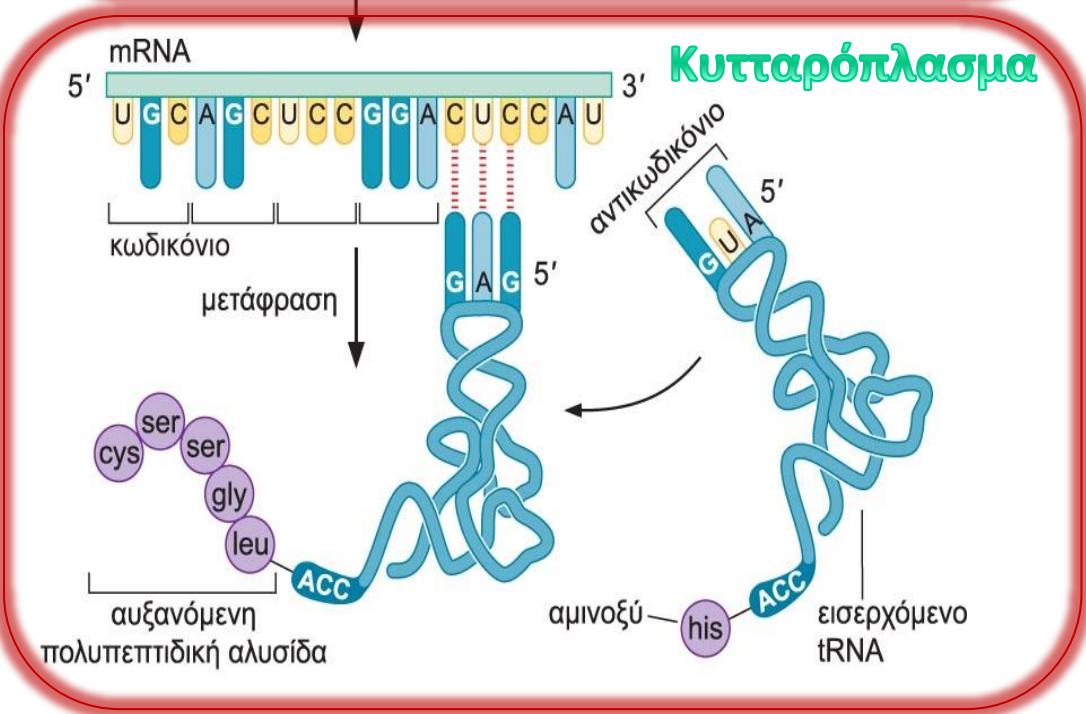
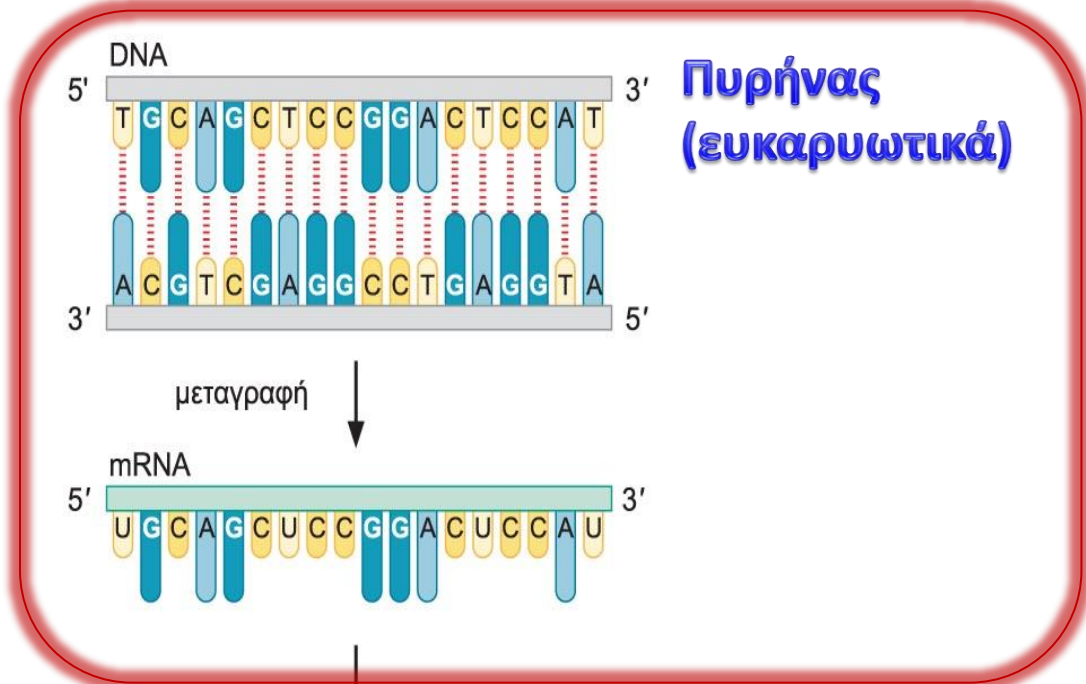


- Το μόριο του DNA αποτελείται από δύο περιελιγμένες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες με αντιπαράλληλο προσανατολισμό
- 4 δεοξυριβονουκλεοτίδια είναι οι δομικοί λίθοι, που συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικό δεσμό (κορμός της έλικας)
- Στο υδρόφοβο εσωτερικό της έλικας οι απέναντι αζωτούχες βάσεις συνδέονται με 2-3 δεσμούς υδρογόνου
- Η περιέλιξη των αντιπαράλληλων αλυσίδων δημιουργεί δύο διακριτές αύλακες, τη μικρή και τη μεγάλη

Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος



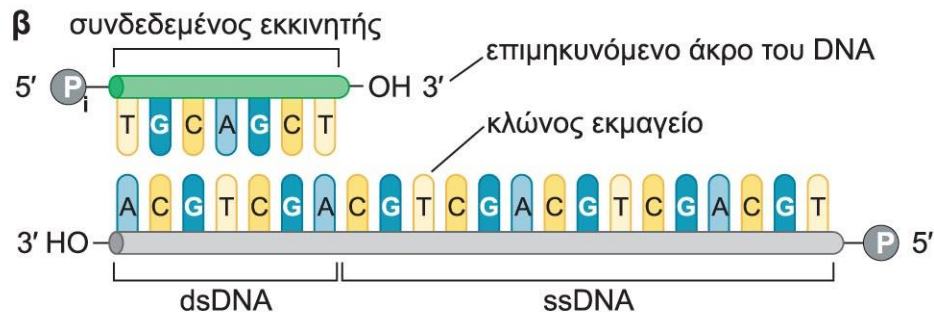
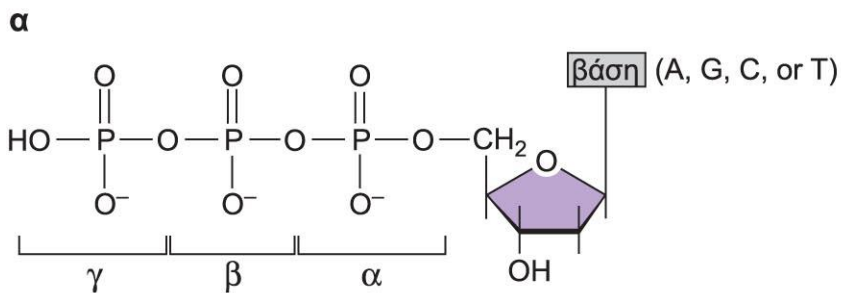
- Οι αζωτούχες βάσεις είναι μεταξύ τους ανά δύο συμπληρωματικές: A-T και C-G
- Η διπλή έλικα σταθεροποιείται από το ζευγάρισμα και την επιστοίβαξη των βάσεων
- Βάσεις που ζευγαρώνουν με μη ορθό τρόπο προβάλλουν από την διπλή έλικα και γίνονται αναγνωρίσιμο υπόστρωμα για τα επιδιορθωτικά ένζυμα



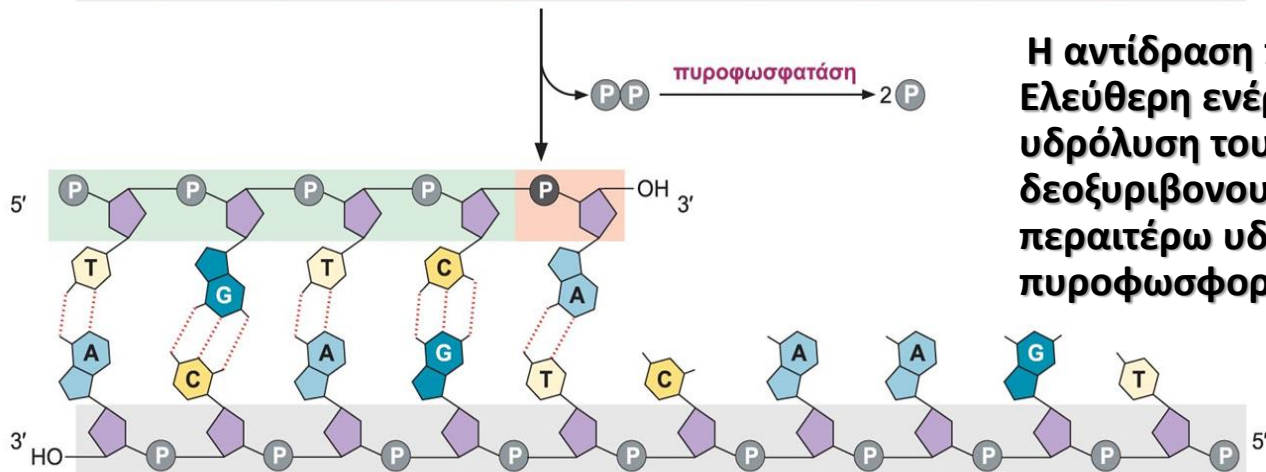
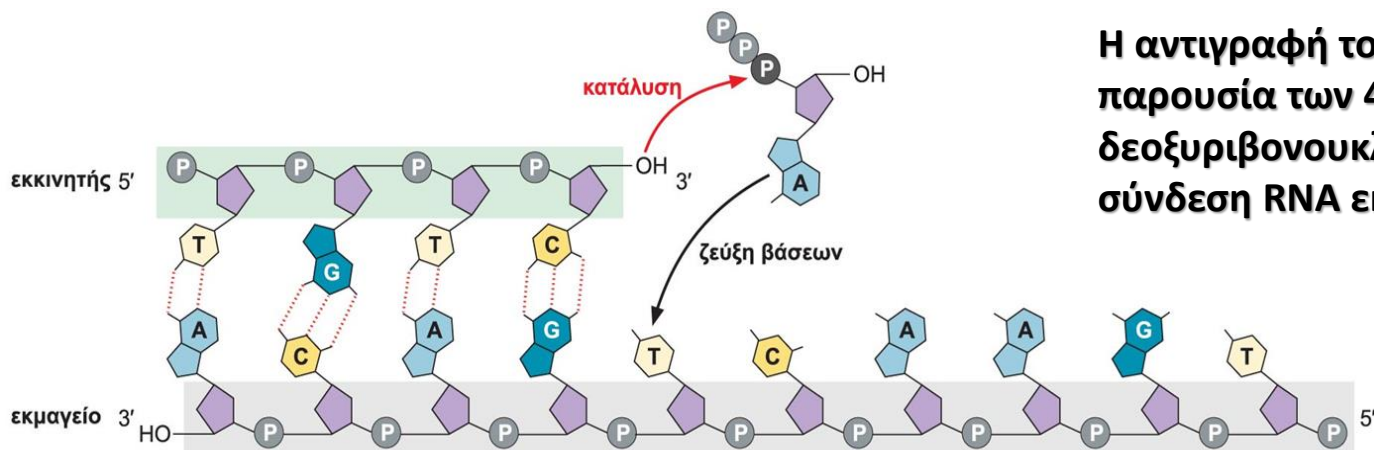
Η ροή της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες



Το γονιδίωμα αντιγράφεται με μεγάλη ακρίβεια για τη διαιώνισή του στα θυγατρικά κύτταρα



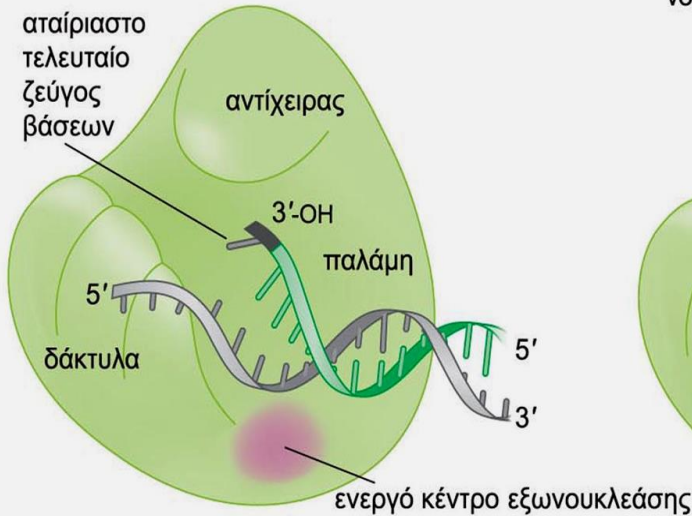
Η αντιγραφή του DNA απαιτεί την παρουσία των 4 τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (α) και την σύνδεση RNA εκκινητών στο εκμαγείο (β)



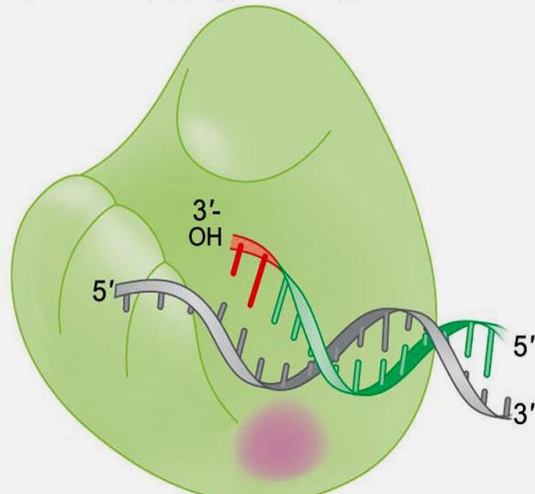
Η αντίδραση πολυμερισμού του DNA: Ελεύθερη ενέργεια παρέχεται από την υδρόλυση του τριφωσφορικού δεοξυριβονουκλεοτιδίου και την περαιτέρω υδρόλυση του πυροφωσφορικού

Η DNA πολυμεράση έχει και επιδιορθωτική ικανότητα (proofreading enzyme), γεγονός που αυξάνει συνολικά την πιστότητα της αντιγραφής του DNA (και κατ' επέκταση του γονιδιώματος στα θυγατρικά κύτταρα)

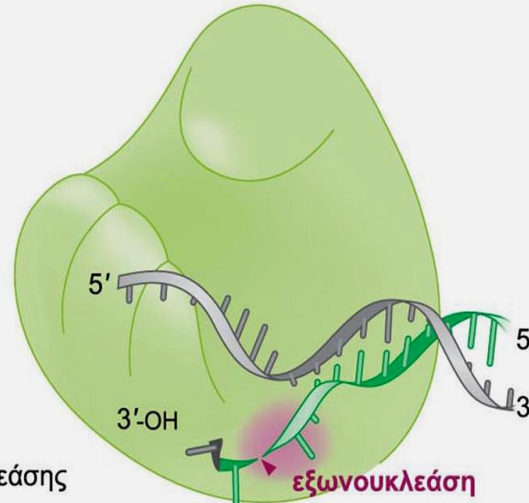
α βραδεία ή καθόλου σύνθεση DNA



γ επανέναρξη της σύνθεσης DNA



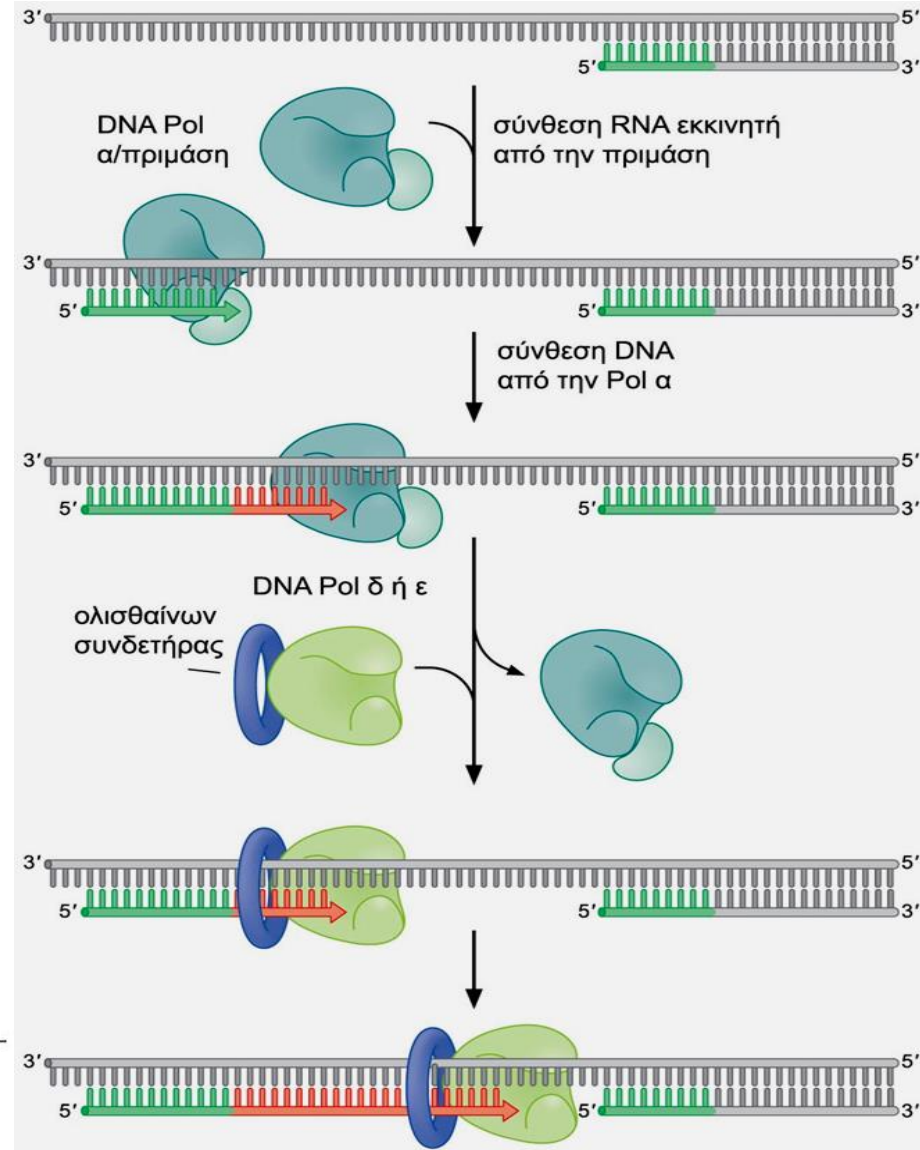
β απομάκρυνση του (των) αταίριαστού (-ων) νουκλεοτιδίου (-ων)



- 3'-5' εξωνουκλεολυτική δράση υπάρχει σε διαφορετικό ενεργό κέντρο του ενζύμου της DNA πολυμεράσης
- Οι εξωνουκλεάσες διορθωτικού ελέγχου μειώνουν την εμφάνιση λανθασμένων ζευγών βάσεων σε $1/10^7$ προστιθέμενα νουκλεοτίδια
- Τα ένζυμα επιδιόρθωσης κατά τη μετα-αντιγραφική επιδιόρθωση, μειώνουν ακόμα περισσότερο αυτό το ποσοστό ($1/10^{10}$)

Ευκαρυωτικές	Αριθμός Υπομονάδων	Λειτουργία
Pol α	4	Σύνθεση εκκινήτη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA
Pol β	1	Επιδιόρθωση εκτομής βάσης
Pol γ	3	Αντιγραφή και επιδιόρθωση μιτοχondριακού DNA
Pol δ	2 – 3	Σύνθεση του συνοδού (ή καθυστερούντος) κλώνου DNA (lagging strand), επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων και βάσεων
Pol ε	4	Σύνθεση οδηγού κλώνου DNA, επιδιόρθωση εκτομής βάσεων και νουκλεοτιδίων
Pol θ	1	Επιδιόρθωση DNA των διασταυρούμενων συνδέσεων (cross-links)
Pol ζ	1	TLS
Pol λ	1	Επιδιόρθωση DNA συνδεδεμένη με τη Μείωση
Pol μ	1	Σωματική υπερμεταλλαγή (hypermutation)
Pol κ	1	TLS
Pol η	1	Σχετικά ακριβής σύνθεση διαμέσου της βλάβης (TLS) πέρα από τα cis-syn διμερή κυκλοβουτανίου
Pol ι	1	TLS, σωματική υπερμεταλλαγή
Rev1	1	TLS

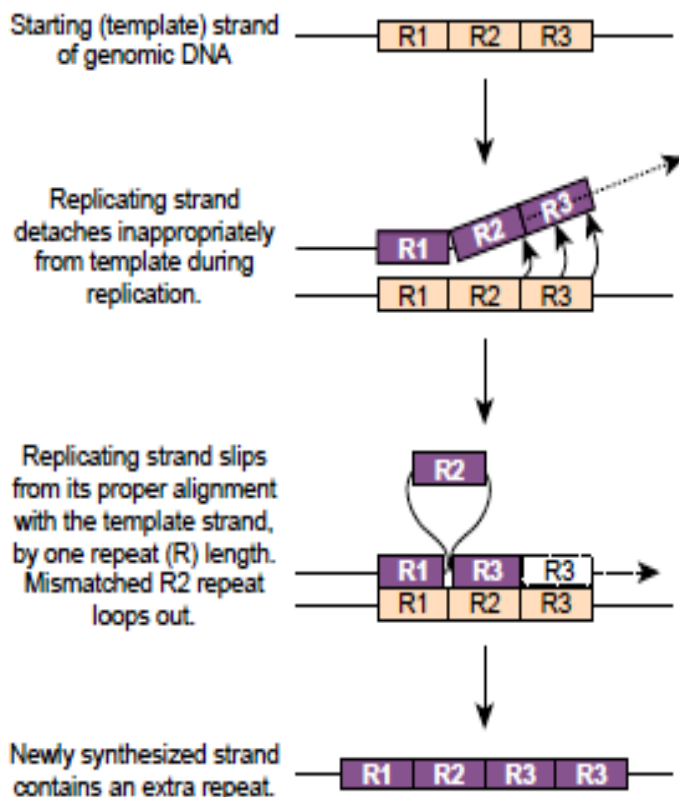
Η εναλλαγή των ευκαρυωτικών DNA πολυμερασών στην διχάλα αντιγραφής



TLS: Σύνθεση διαμέσου της βλάβης (translesion synthesis)

Στοιχεία από Sutton M.D. and Walker G.C. 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 8342–8349, και αναφορές στο εν λόγω άρθρο.

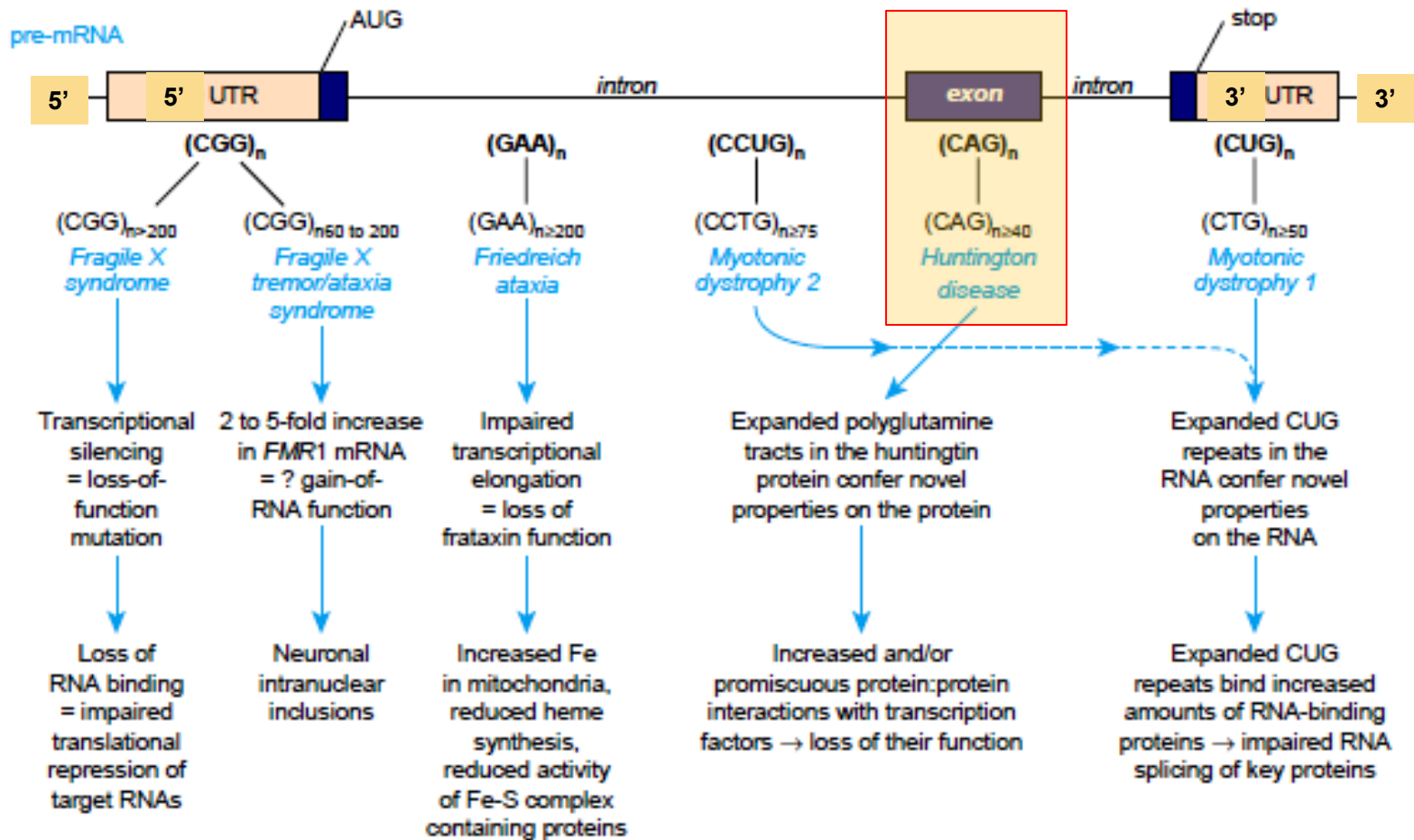
Επέκταση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο DNA κατά την αντιγραφή του γονιδιώματος



Σχηματική αναπαράσταση της επέκτασης της αλληλουχίας των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων κατά την διαδικασία της αντιγραφής του DNA

Εισαγωγή μιας (ή περισσότερων) επιπλέον τριπλετών συμβαίνει όταν ο νεοσυντιθέμενος κλώνος του DNA αποσυνδέεται κατά παρέκκλιση από τον κλώνο εκμαγείου κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γονιδιώματος. Όταν επανασυνδεθεί με τον κλώνο εκμαγείου, ο νέος κλώνος μπορεί να ολισθήσει προς τα πίσω (ή εμπρός) και να ευθυγραμμιστεί με τον κλώνο εκμαγείου με εσφαλμένο τρόπο, δημιουργώντας μία θηλιά. Μόλις αρχίσει η νέα σύνθεση του DNA, το λανθασμένα ευθυγραμμισμένο μόριο θα περιέχει ένα ή περισσότερα επιπλέον αντίγραφα της επανάληψης (ανάλογα με τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων αντιγράφων που ολισθαίνουν).

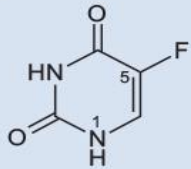
Επέκταση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο DNA



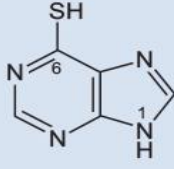
Οι θέσεις των επεκτάσεων επαναλαμβανόμενων τρινουκλεοτιδίων και της αλληλουχίας κάθε τρινουκλεοτιδίου σε πέντε αντιπροσωπευτικές νόσους, οι οποίες παρουσιάζονται σε ένα σχηματικό γενικό πρόδρομο mRNA. Ο ελάχιστος αριθμός επαναλήψεων στην αλληλουχία DNA του προσβεβλημένου γονιδίου που σχετίζεται με τη νόσο επισημαίνεται. Αναφέρεται επίσης η επίδραση της επέκτασης στο μεταλλαγμένο RNA ή πρωτεΐνη.

Αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα, ανάλογα των δεοξυριβονουκλεοτιδίων, στοχεύουν στην αναστολή της DNA πολυμεράσης και της αντίστροφης μεταγραφάσης αντίστοιχα

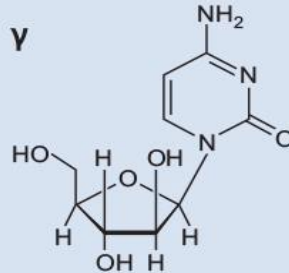
α



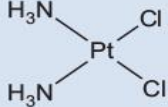
β



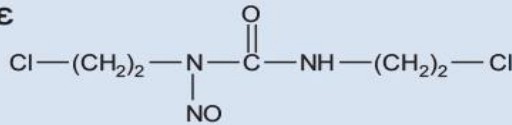
γ



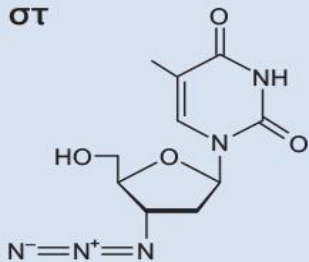
δ



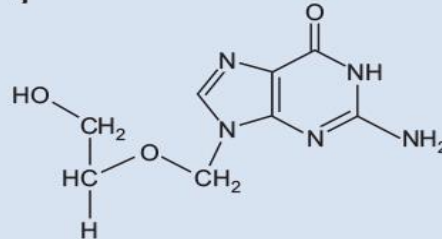
ε



στ



ζ



α. 5-φθοριοουρακίλη (αναστολή θυμιδικής συνθετάσης→ αναστολέας της σύνθεσης πουρινών και πυριμιδινών)

β. 6-μερκαπτοπουρίνη (ενσωμάτωση στο DNA)

γ. αραβινοσίδιο της κυτοσίνης (ανάλογο της δεοξυκυτιδίνης→ ενσωμάτωση στο DNA)

δ. σισπλατίνη (διασυνδέσεις μεταξύ παρακείμενων G καταλοίπων)

ε. δις-χλωροαιθύλο-νιτροζουρία

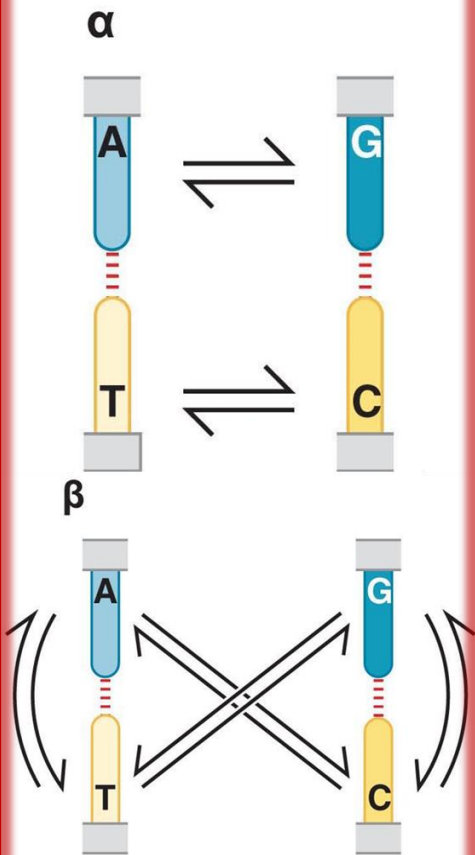
στ. αζιδοθυμίνη

ζ. ακυκλοβίρη

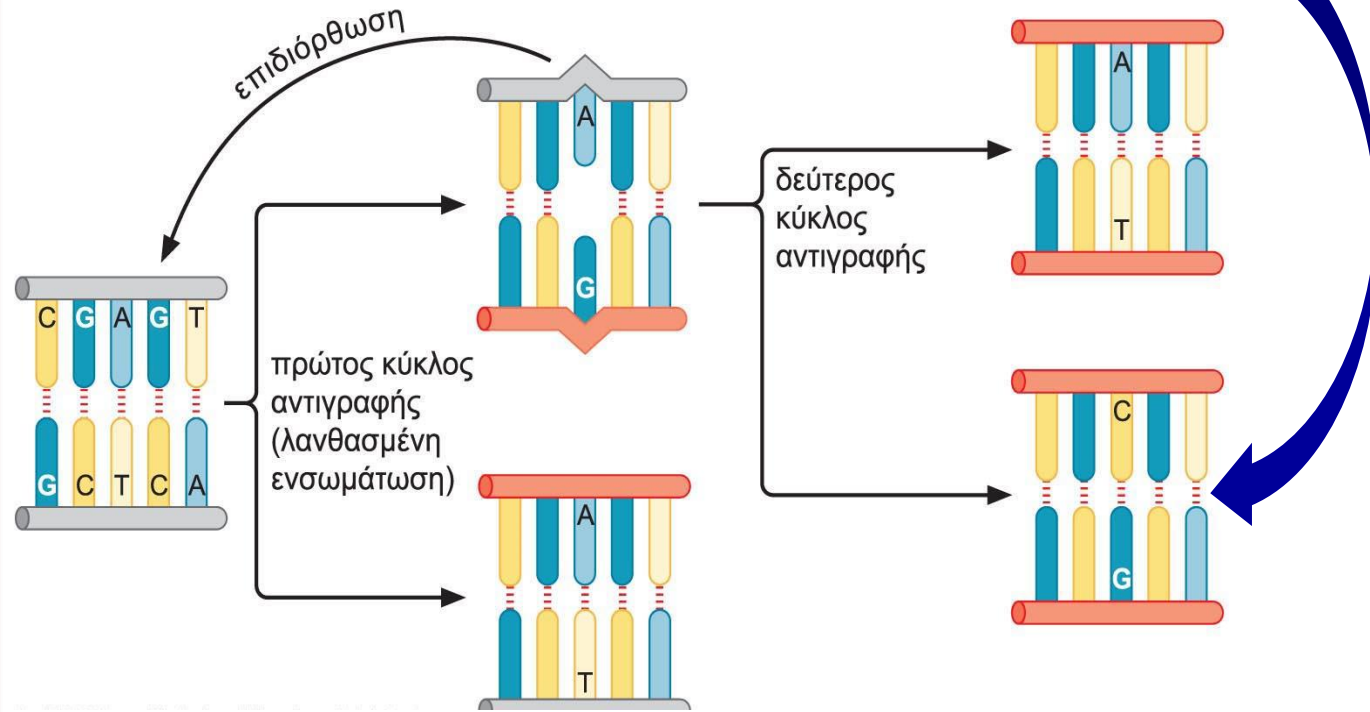
(αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης)

Αλλαγές της αλληλουχίας των νουκλεοτιδικών βάσεων ή χημική παραλλαγή του γονιδιώματος ενεργοποιούν μηχανισμούς επιδιόρθωσης

α. Μεταπτώσεις
β. Μεταστροφές

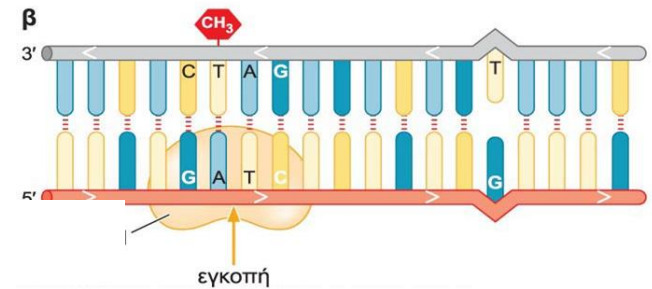
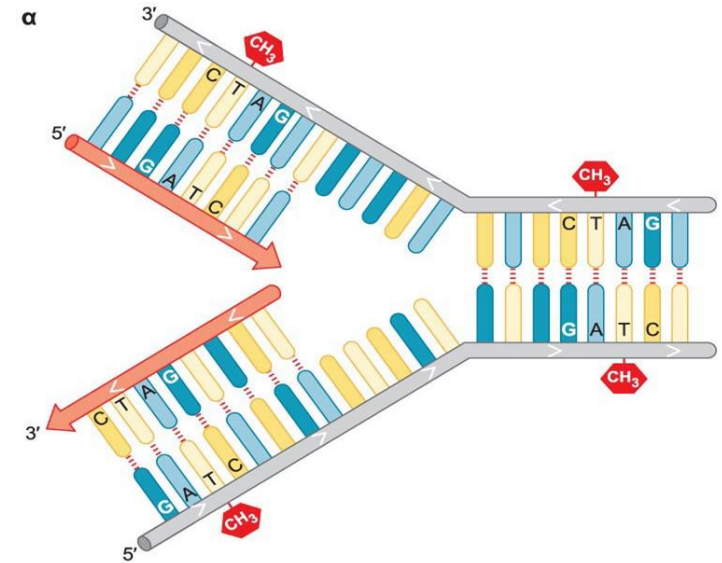
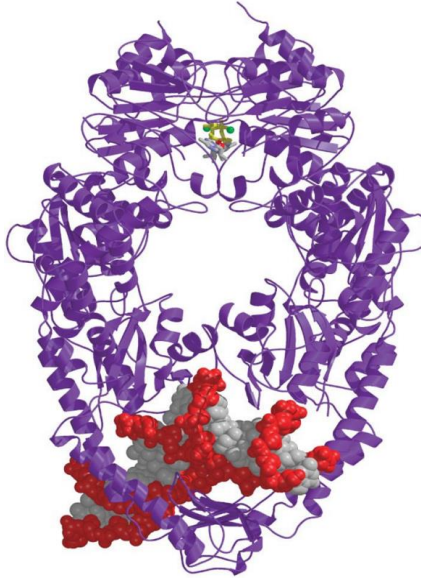
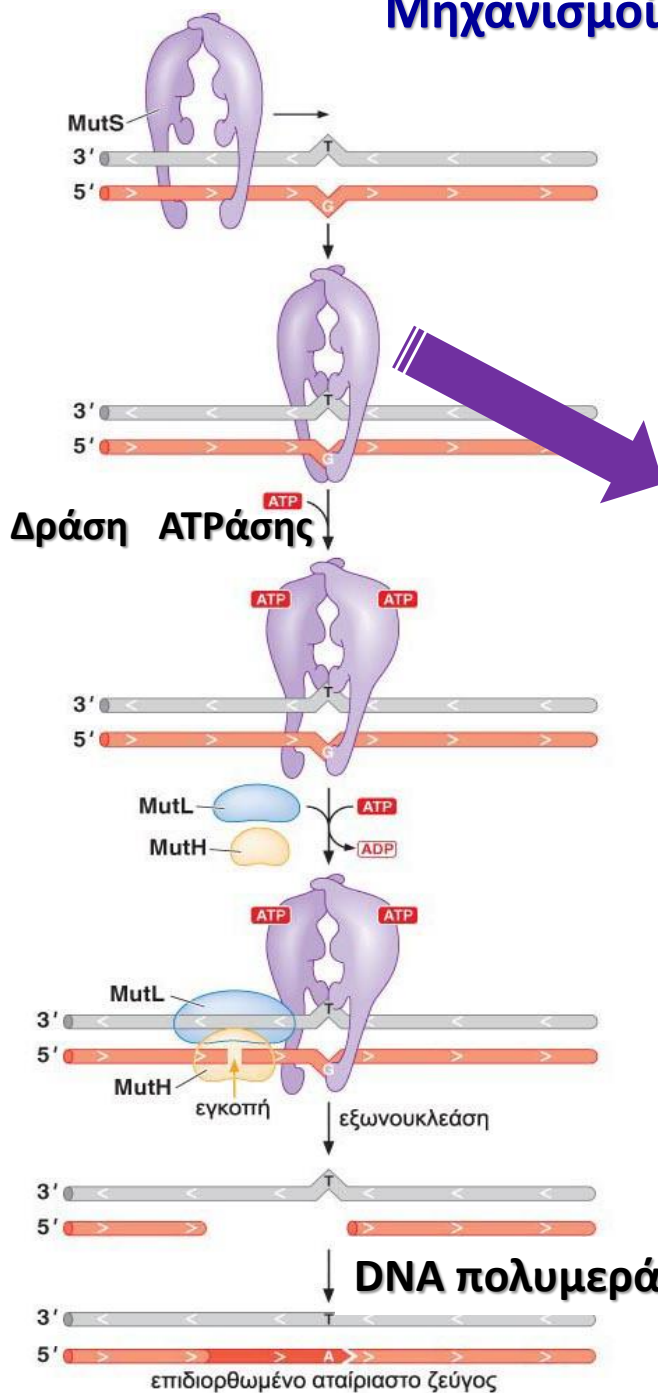


Αποτυχία του μηχανισμού επιδιόρθωσης προκαλεί μόνιμη αλλαγή βάσης στο γονιδίωμα

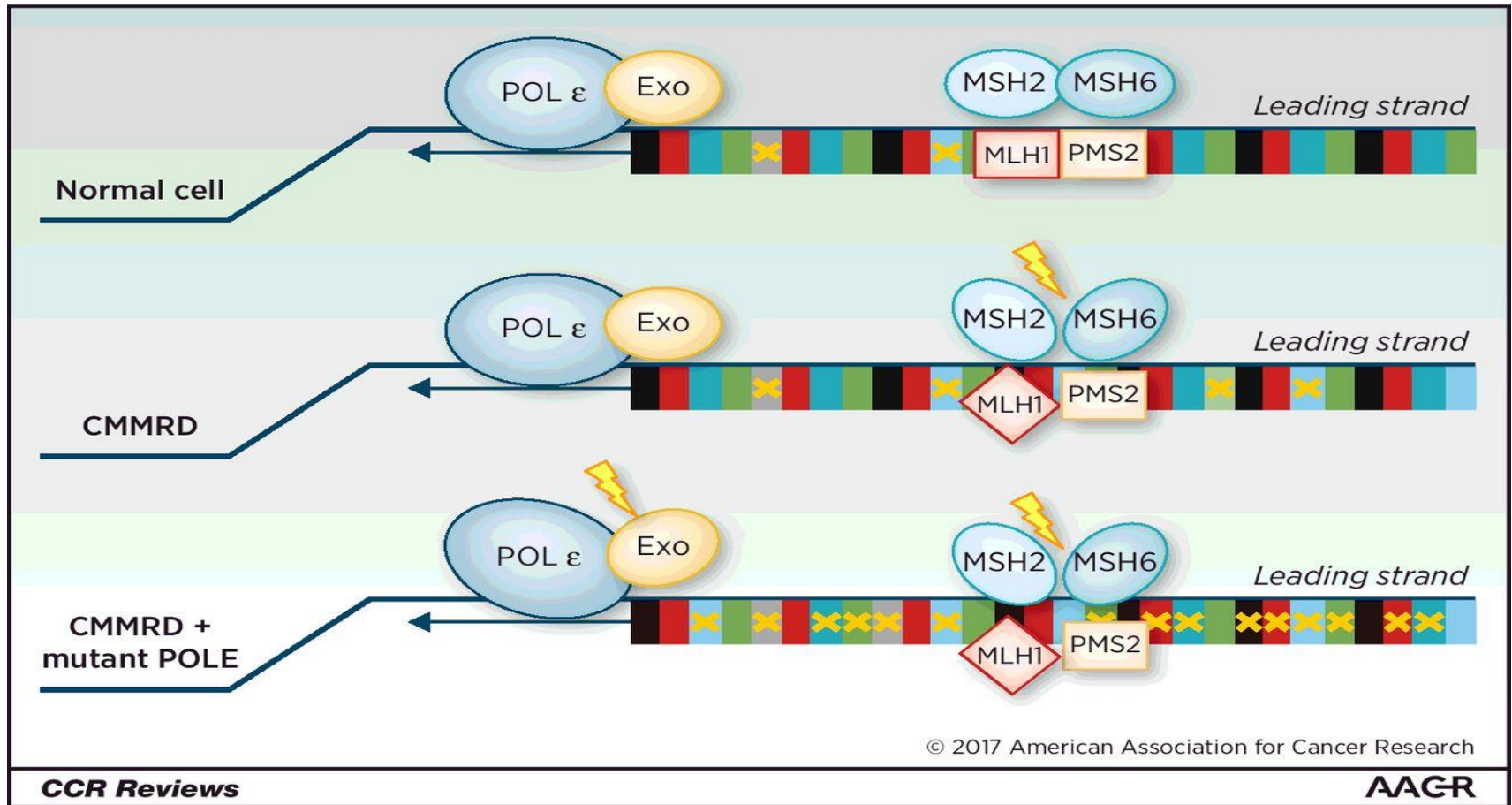


Μηχανισμοί επιδιόρθωσης κατά την αντιγραφή

Το βακτήριο E.coli «σημαδεύει» τη γονική αλυσίδα του DNA με μεθυλίωση των A καταλοίπων στο τετρανουκλεοτίδιο GATC, προκειμένου να ξεχωρίσει τα λάθη στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα



Κληρονομικά ελαττώματα ή μεταλλάξεις στην DNA πολυμεράση ε ή στα ένζυμα επιδιόρθωσης του γονιδιώματος (ομόλογα της mutS) οδηγεί στη σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων και σε αυξημένο κίνδυνο καρκίνου

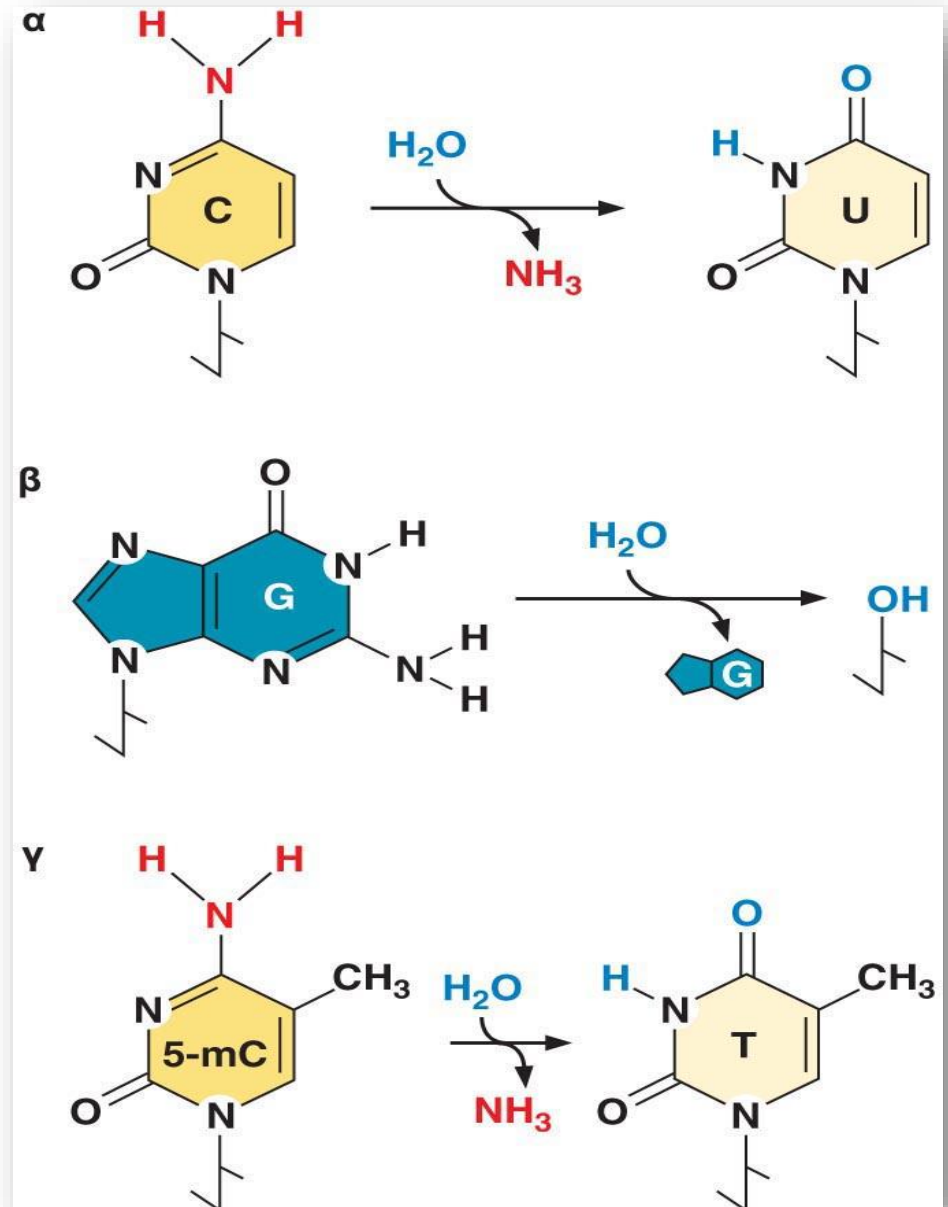


Συνδυασμός μεταλλάξεων στην επικράτεια της εξωνουκλεολυτικής δράσης της DNA πολυμεράσης POLE και στα ένζυμα επιδιόρθωσης οδηγεί σε μια εξαιρετικά γρήγορη συσσώρευση μεταλλάξεων και εμφάνιση καρκίνου σε μικρά παιδιά (CMMRD, constitutional mismatch repair deficiency syndrome)

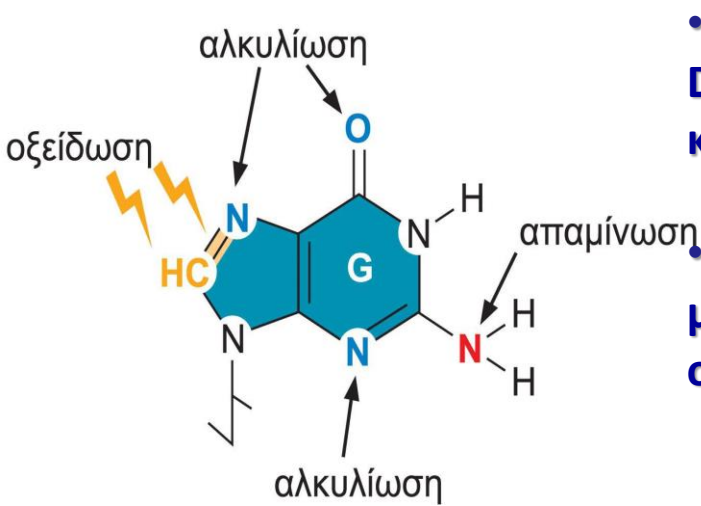
Συνήθεις υδρολυτικές βλάβες του DNA: Απαμίνωση (α. γ.) – Απουρίνωση (β.)

Εκτός των λαθών κατά την αντιγραφή, περιβαλλοντικοί και χημικοί παράγοντες (ακτινοβολία, μεταλλαξιγόνες ουσίες), προκαλούν αυθόρμητες βλάβες στο γονιδίωμα

Οι θέσεις που φέρουν μετατροπή της κυτοσίνης σε μεθυλο-κυτοσίνη είναι συνηθισμένες στο γονιδίωμα (επιγενετικές τροποποιήσεις), αλλά αποτελούν θερμά σημεία για μεταλλάξεις, καθώς η αυθόρμητη απαμίνωση σε θυμίνη δεν αναγνωρίζεται από τα συστήματα επιδιόρθωσης



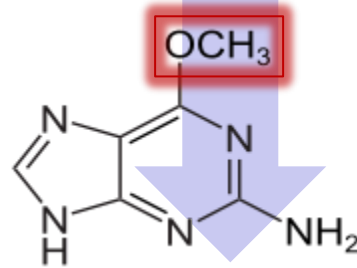
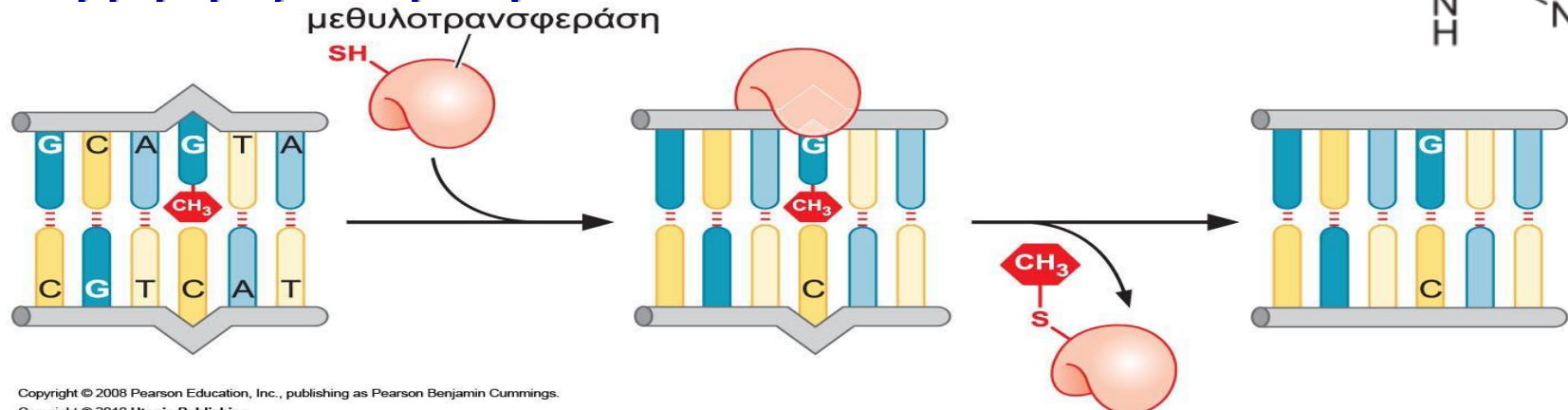
- Αλκυλιωτικές χημικές ουσίες (νιτροζαμίνες) παράγουν την O⁶-μεθυλογουανίνη, που ζευγαρώνει κατά παρέκλιση με θυμίνη (T αντί κυτοσίνης C)
- Ελεύθερες ρίζες και δραστικά παράγωγα οξυγόνου (H₂O₂, O₂⁻, OH) προκαλούν οξείδωση της γουανίνης (οξοG), η οποία ζευγαρώνει και με αδενίνη (A αντί κυτοσίνης C) προκαλώντας μεταστροφή από G-C σε A-T (απαντάται πολύ συχνά σε καρκινικές βλάβες)



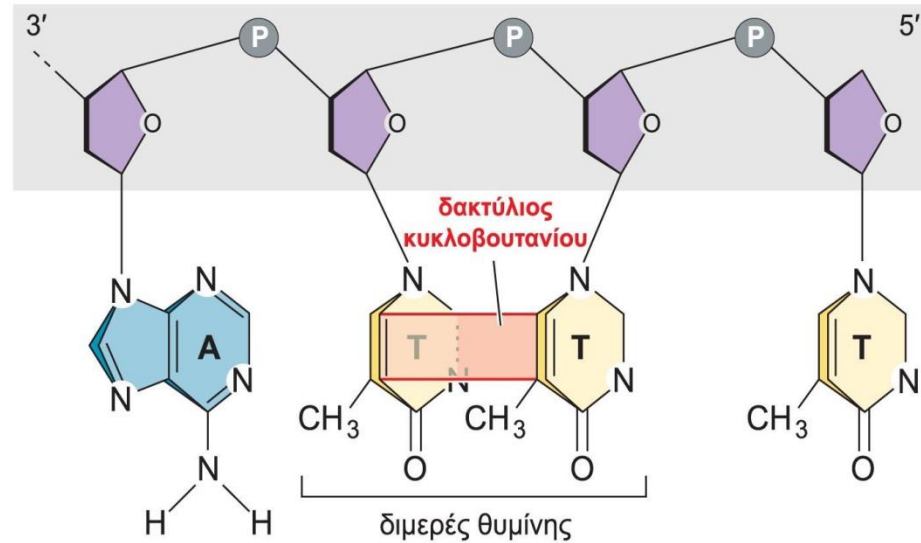
• Αποτελεί την πιο συχνή οξειδωτική βλάβη του DNA. Εμφανίζεται με μέση συχνότητα 2.400 ανά κύτταρο, αλλά έχει πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής

• Αυξημένα επίπεδα της οξοG σε έναν ιστό μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτης του οξειδωτικού στρες

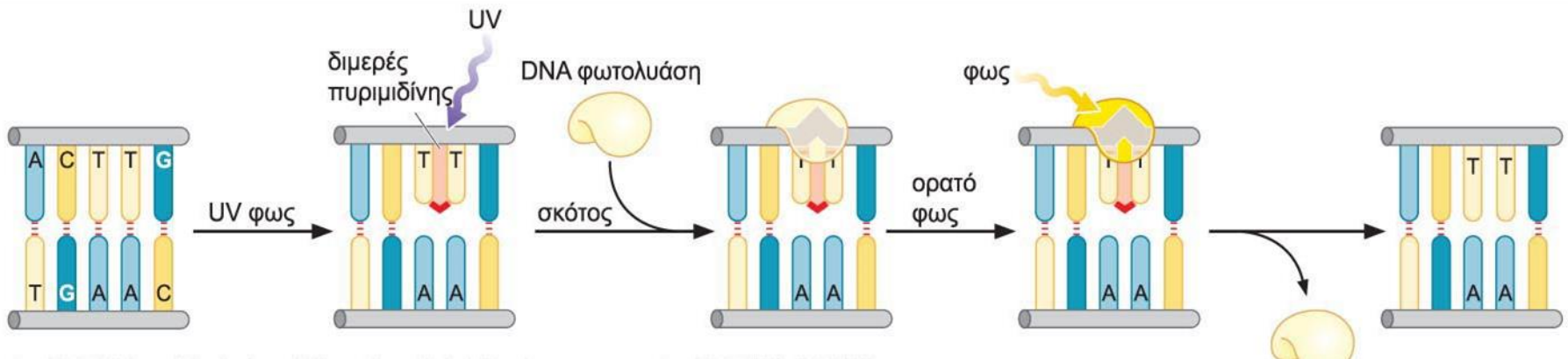
Άμεση αναστροφή της βλάβης από τη μεθυλοτρανσφεράση: Ενεργόβόρος αντίδραση



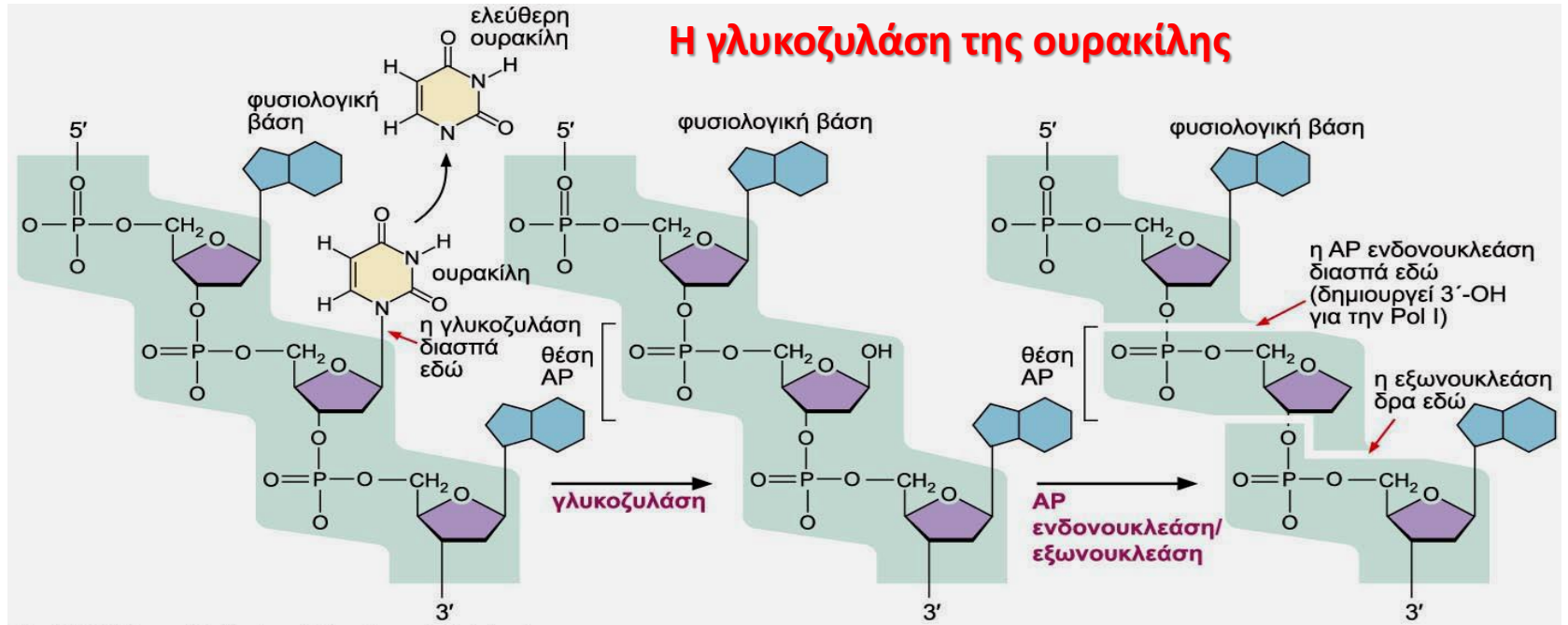
Διμερή θυμίνης από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας



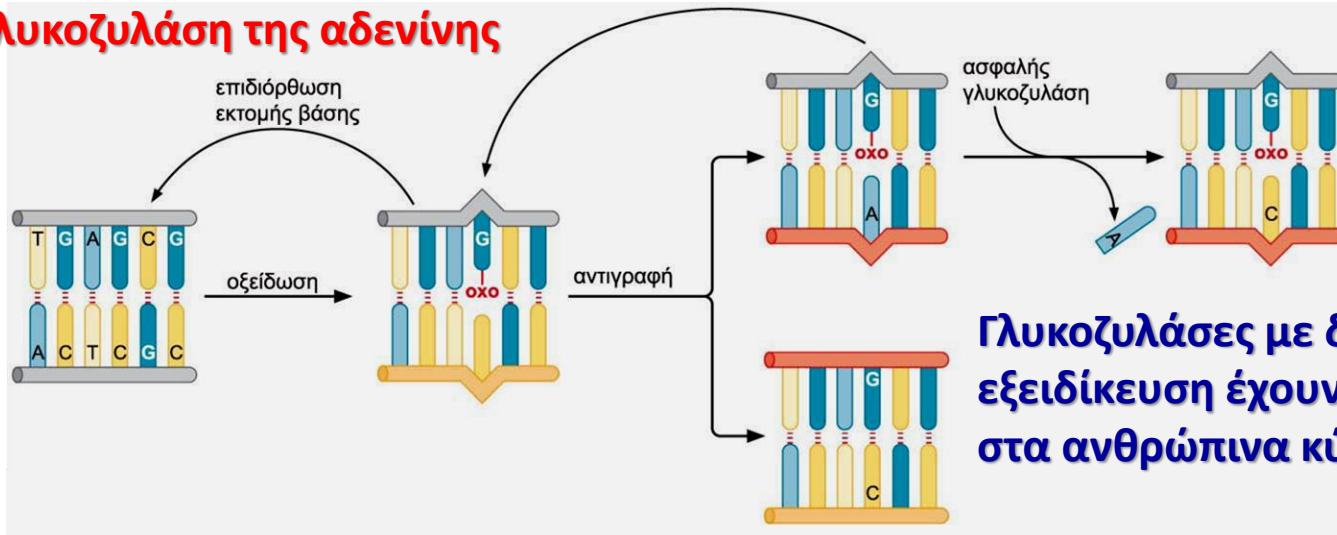
Άμεση αναστροφή της βλάβης με φωτοενεργοποίηση της DNA φωτολυάσης

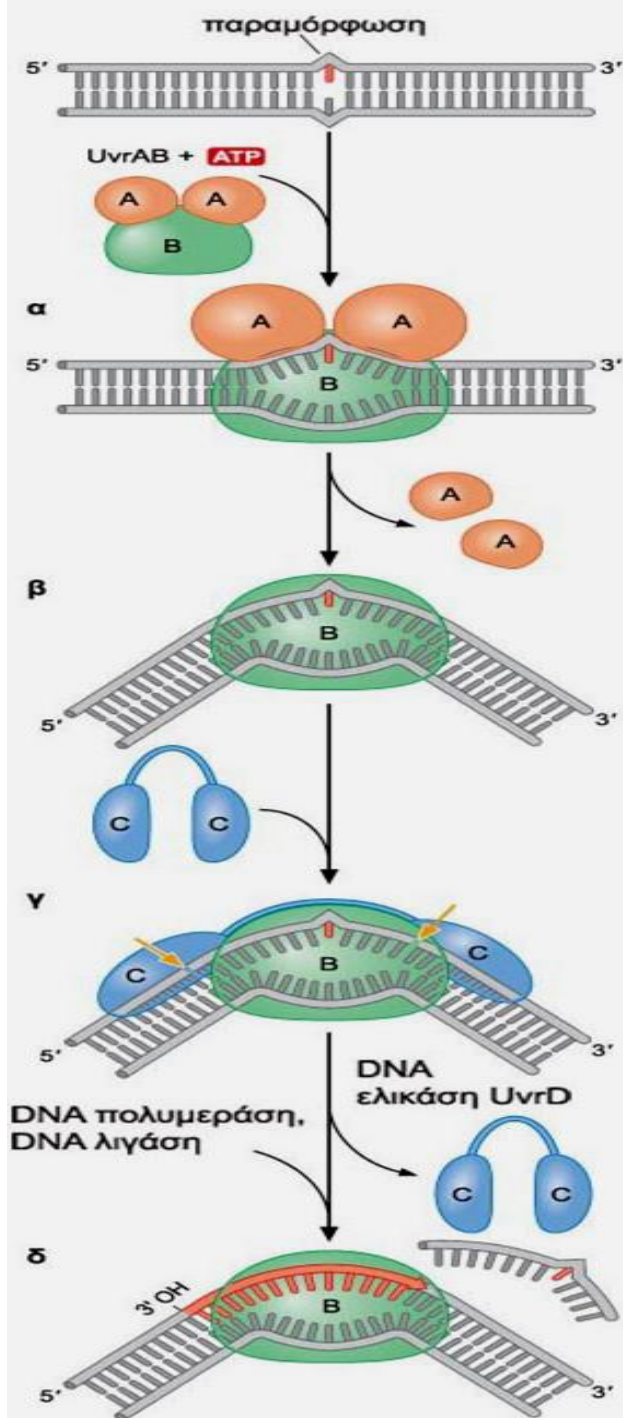


Γλυκοζυλάσες και νουκλεάσες συνεργάζονται για την απομάκρυνση βάσεων μέσω εκτομής



Η γλυκοζυλάση της αδενίνης





Επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (E. Coli)

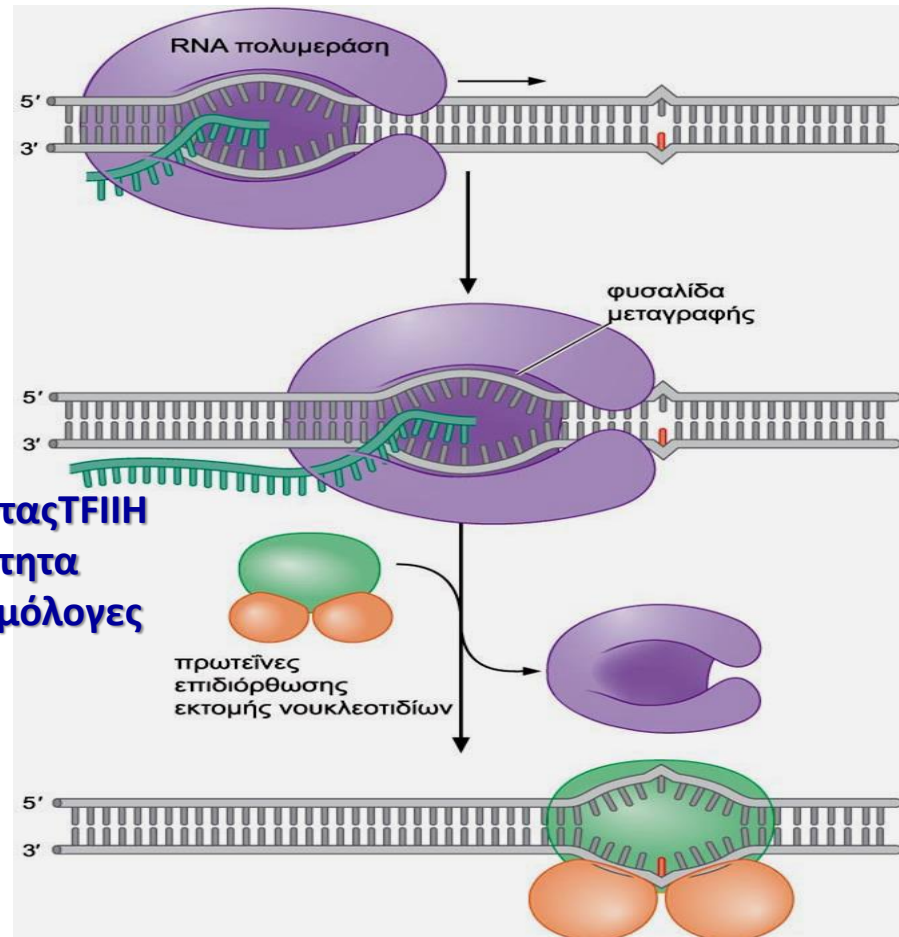
- Τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτό τον μηχανισμό επιδιόρθωσης προκαλούν διπλή θραύση της αλυσίδας που φέρει την βλάβη
- Αναγνωρίζουν παραμορφώσεις της δίκλωνης έλικας προερχόμενες κυρίως από την υπερϊώδη ακτινοβολία

Μεταλλάξεις σε αντίστοιχα ανθρώπινα γονίδια που συμμετέχουν είτε στον μηχανισμό επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίων (NER), είτε στην DNA πολυμεράση που δρα διαμέσου βλάβης (Pol η), προκαλεί την μελαχρωματική ξηροδερμία

Ασθένεια και τρόπος κληρονομιάς	Συμπτώματα	Λειτουργίες που επηρεάζονται	Χρωμοσωμική θέση ¹ και αριθμός OMIM
Μελαχρωματική ξηροδερμία (XP, Xeroderma Pigmentosum) – αυτοσωμικό υποτελές	Εναισθησία στο φως, δημιουργία φακίδων και όγκων στο δέρμα, μπορεί να οδηγήσει σε πρόωμο θάνατο λόγω των κακοήθων όγκων.	Επιδιόρθωση του DNA που έχει υποστεί βλάβες από ακτινοβολία UV ή χημικές ουσίες.	9q34.1 – 278700

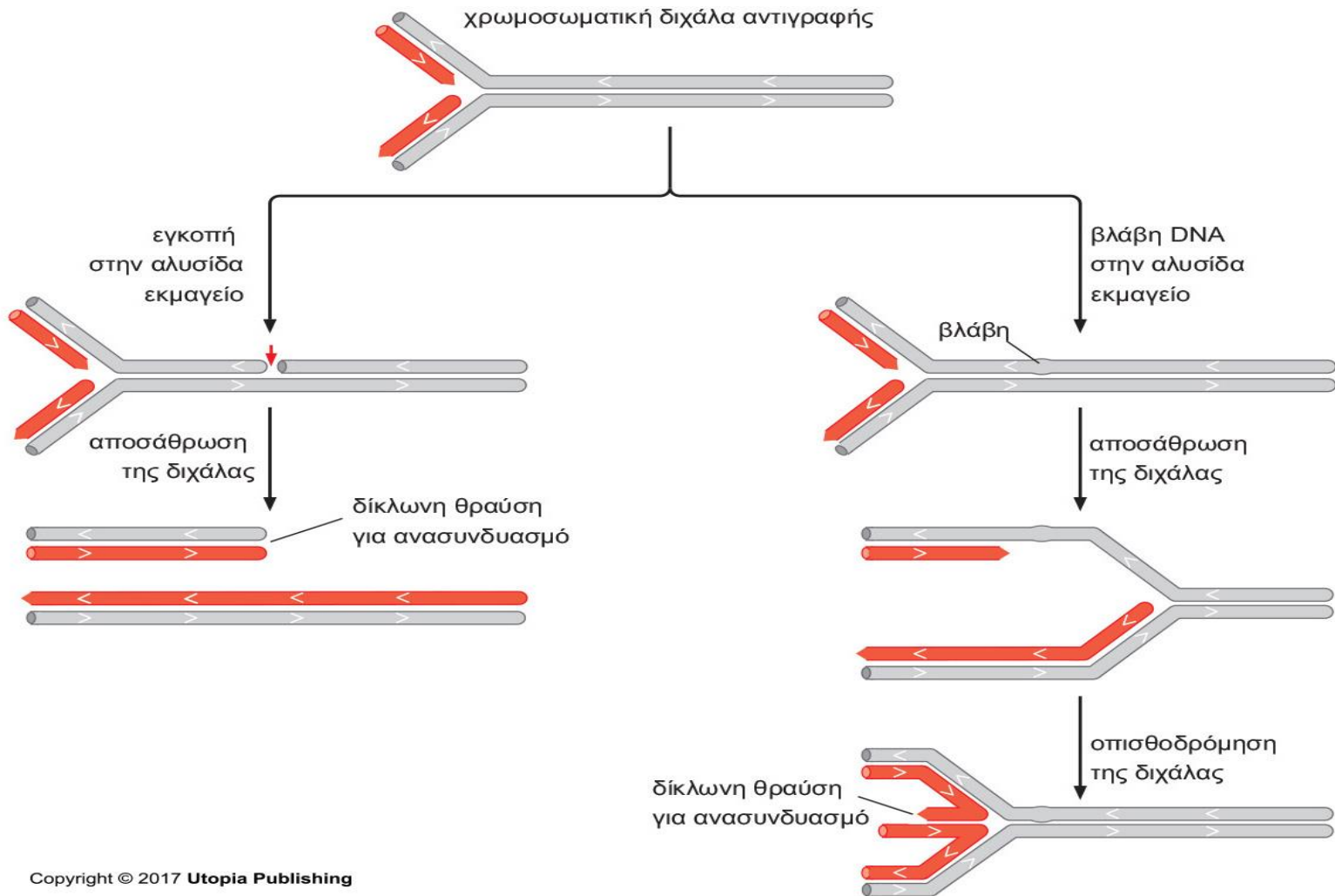
Η επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων κατά την μεταγραφή

Επιδιόρθωση συζευγμένη με τη μεταγραφή

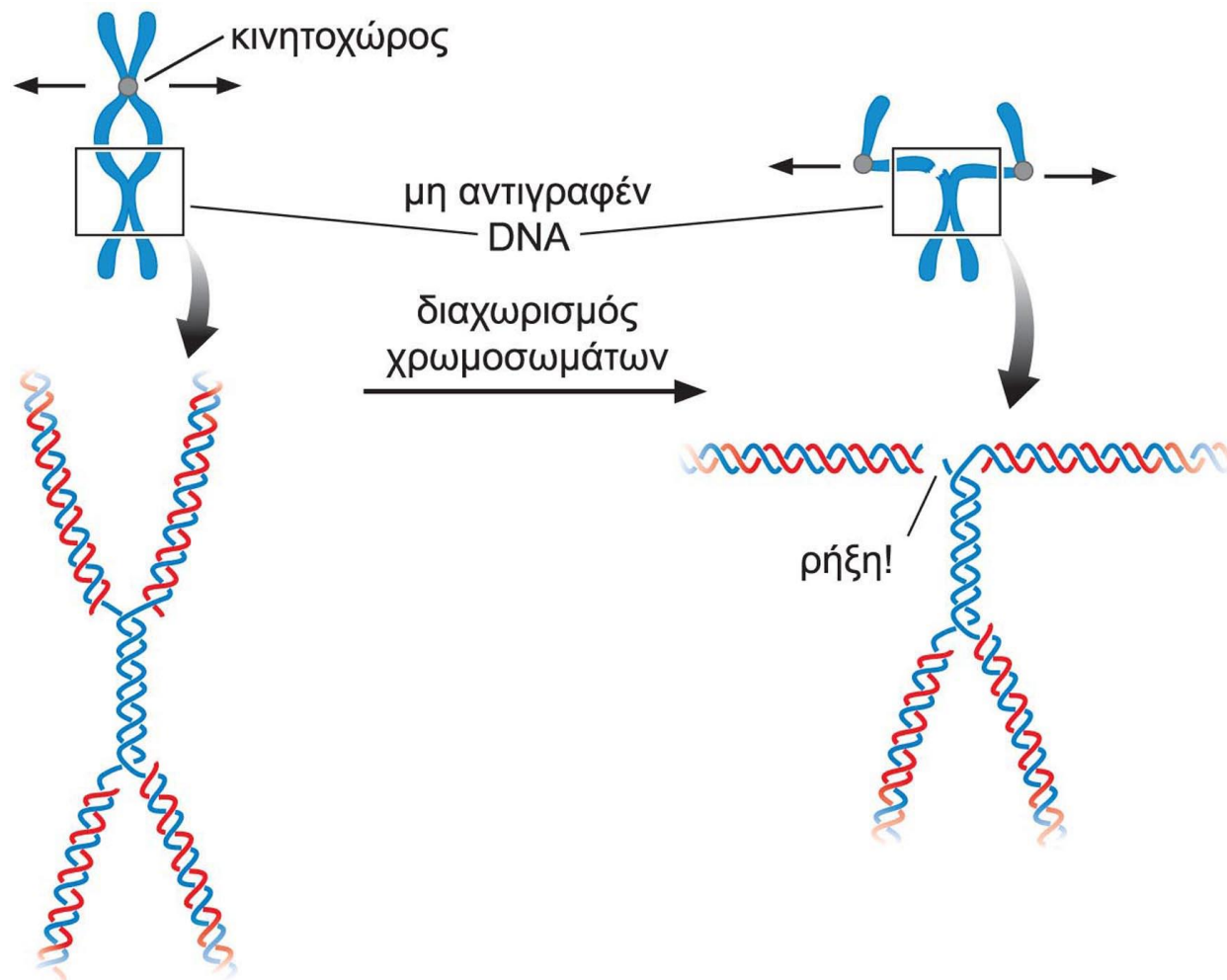


**Μεταγραφικός παράγοντας TFIIH
και πρωτεΐνες με ενεργότητα
ελικάσης XPA και XPD (ομόλογες
της UvrB στην *E. Coli*)**

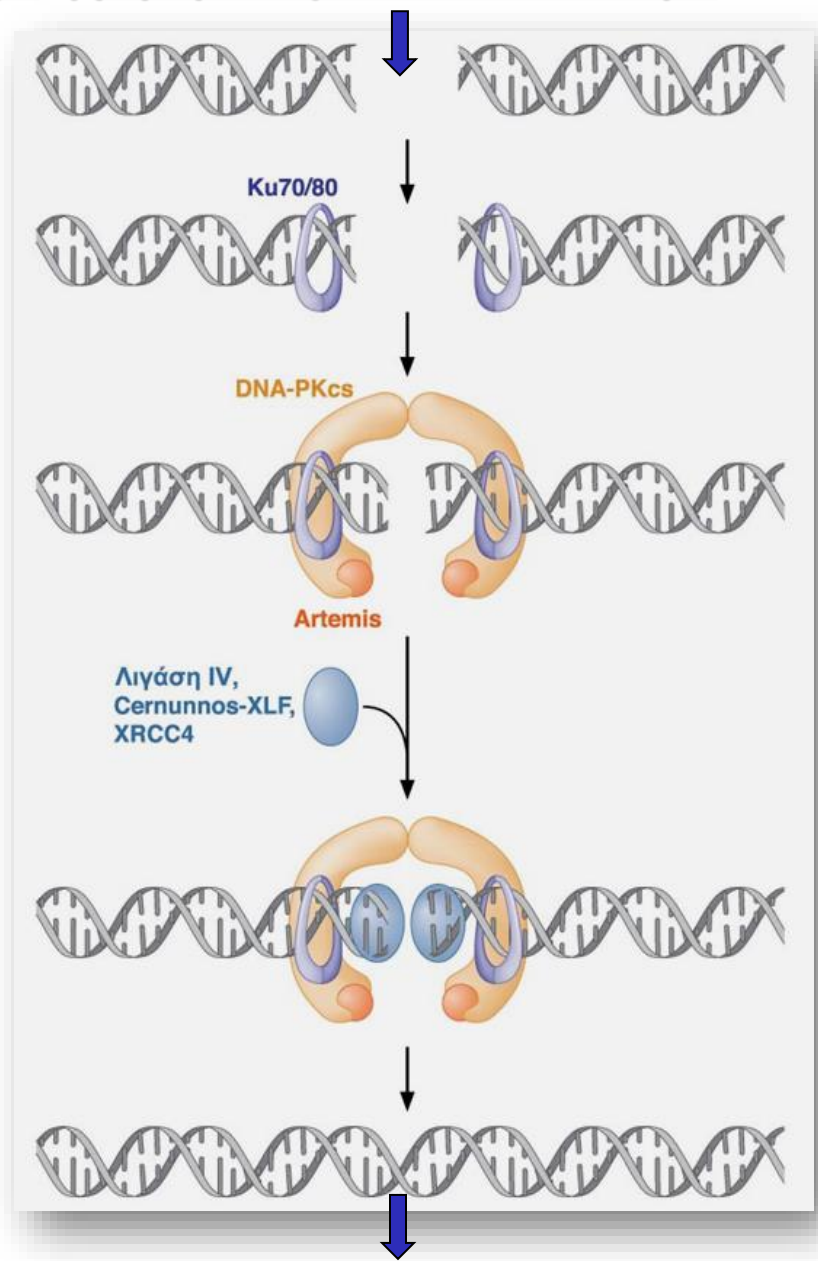
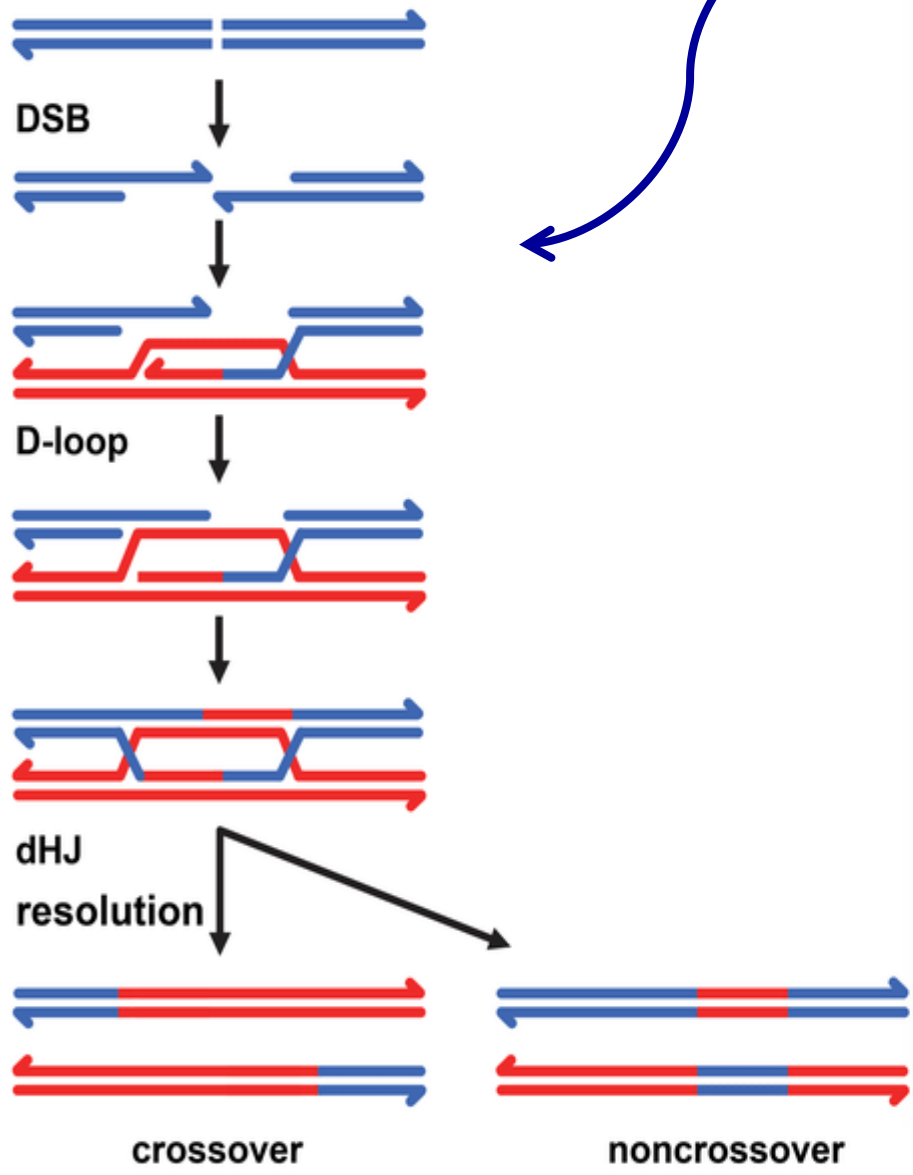
- Η ακτινοβολία γ και οι ακτίνες X (ιονίζουσα ακτινοβολία) προκαλούν δίκλωνες θραύσεις στις αλυσίδες του DNA
- Βλάβη στο DNA εκμαγείο μπορεί επίσης να οδηγήσει στον σχηματισμό δίκλωνης θραύσης



Γενωμική αστάθεια ως αποτέλεσμα λαθών και μη ολοκλήρωσης κατά την διάρκεια της αντιγραφής

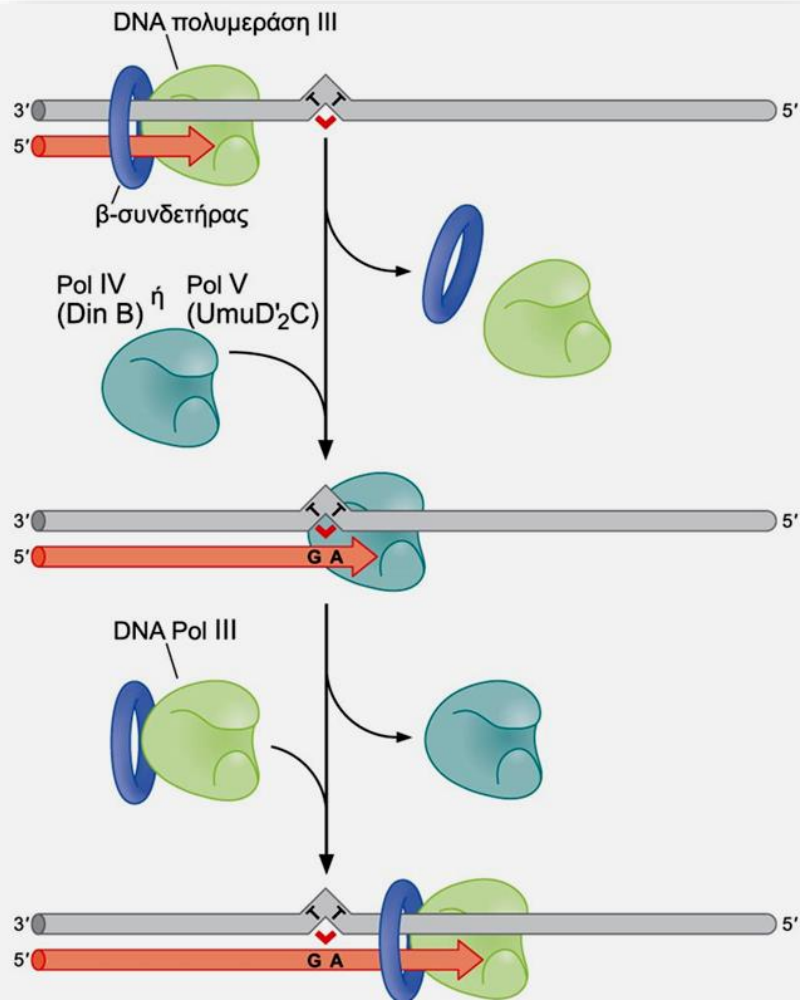


Επιδιόρθωση ρήξεων ή ελλειμμάτων με ομόλογο ή μη ομόλογο ανασυνδυασμό



Η οδός αυτή προκαλεί αλλαγές στην αλληλουχία

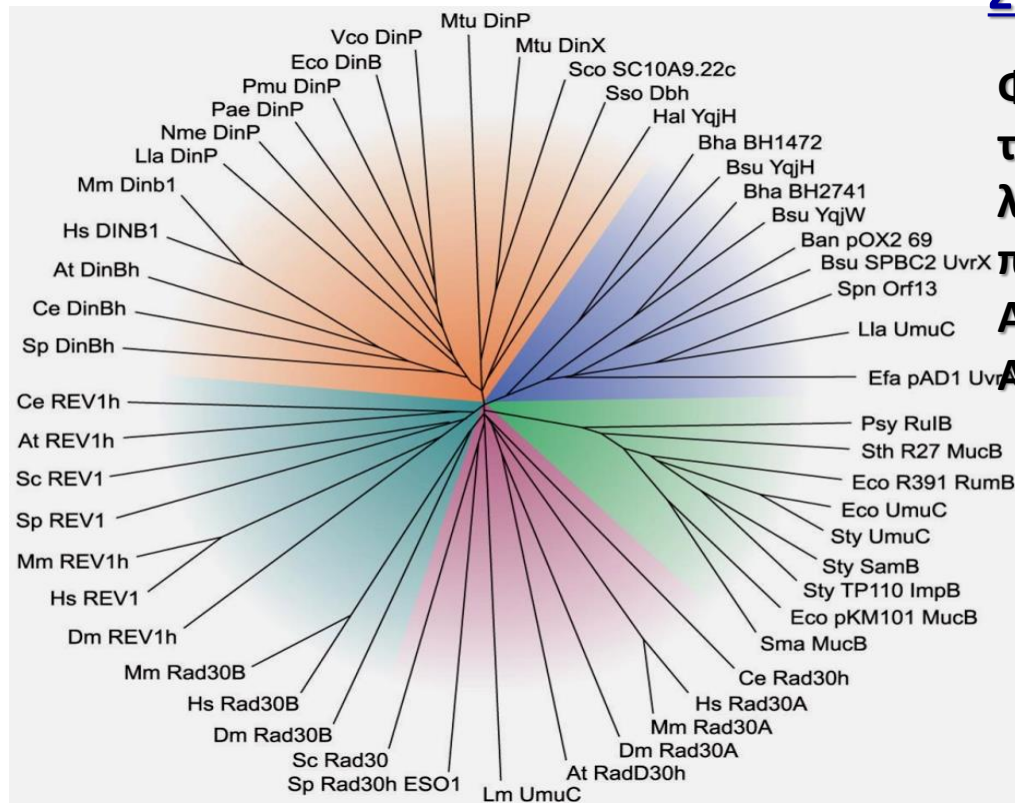
Σύνθεση DNA διαμέσου της βλάβης



- Αυτή η οδός επιδιόρθωσης προεξοφλεί την ανοχή της βλάβης και αποτελεί τελευταία διέξοδο προκειμένου να μην αφήσει ημιτελή την αντιγραφή του γονιδιώματος
- Είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε λάθη και εισάγει ως επί το πλείστον μεταλλαγές στο DNA, ενώ η αρχική βλάβη παραμένει στο γονιδίωμα
- Πραγματοποιείται με τη βοήθεια της συντηρημένης οικογένειας πολυμερασών Υ, οι οποίες δεσμεύονται στον ολισθαίνοντα συνδετήρα εφόσον υποστεί ουβικουιλίνωση

ΠΙΝΑΚΑΣ 9-1 Συστήματα Επιδιόρθωσης DNA

Τύπος	Βλάβη	Ένζυμο
Επιδιόρθωση αταίριαστων ζευγών	Λάθη αντιγραφής	MutS, MutL και MutH στο <i>E. coli</i> · MSH, MLH και PMS στον άνθρωπο
Φωτοενεργοποίηση	Διμερή πυριμιδίνης	DNA φωτολυάση
Επιδιόρθωση εκτομής βάσης	Βλαφθείσα βάση	DNA γλυκοζυλάση
Επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων	Διμερή πυριμιδίνης Ογκώδες προϊόν προσθήκης σε βάση	UvrA, UvrB, UvrC, and UvrD στο <i>E. coli</i> · XPC, XPA, XPD, ERCCI-XPF και XPG στον άνθρωπο
Επιδιόρθωση δίκλωνων ρήξεων	Δίκλωνες ρήξεις	RecA και RecBCD στο <i>E. coli</i>
Σύνθεση DNA διαμέσου της βλάβης	Διμερές πυριμιδίνης ή απουρινική θέση	Υ-οικογένεια DNA πολυμερασών, όπως η UmuC στο <i>E. coli</i>

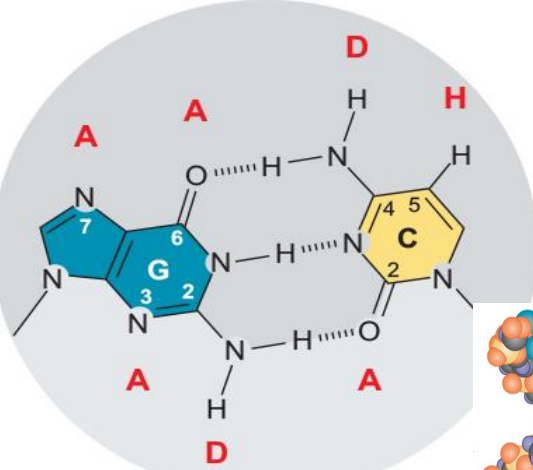


Σύνθεση DNA διαμέσου της βλάβης

Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας Υ των πολυμερασών, οι οποίες λειτουργούν χωρίς υψηλή πιστότητα και παρακάμπτουν βλάβες στο DNA. Απαντώνται από τα Βακτήρια και τα Αρχαία έως τους Ευκαρυώτες

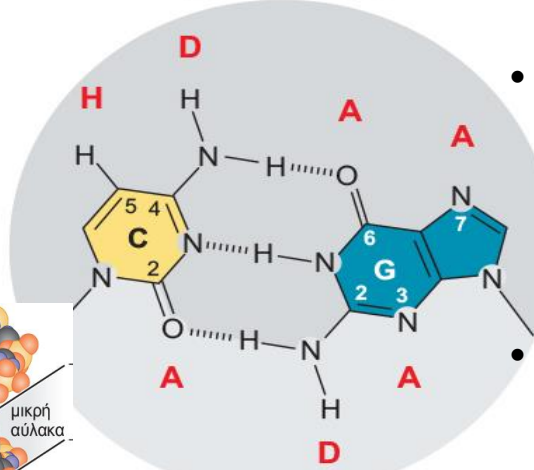
Η μεγάλη αύλακα του DNA είναι πλούσια σε χημική πληροφορία

μεγάλη αύλακα



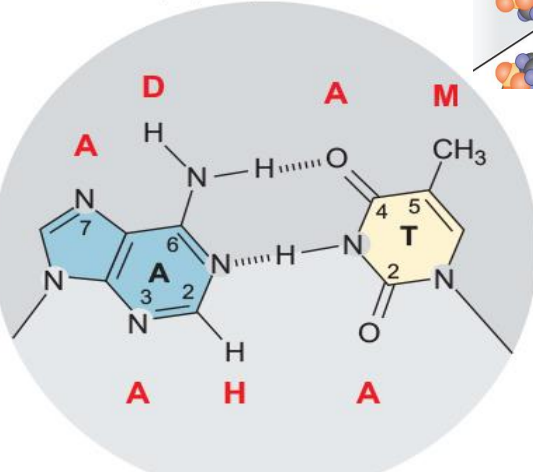
μικρή αύλακα

μεγάλη αύλακα



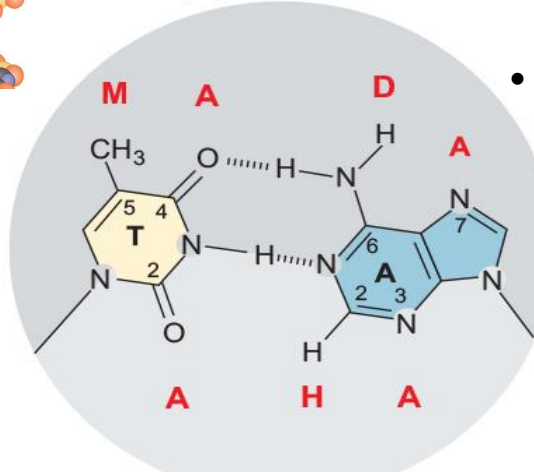
μικρή αύλακα

μεγάλη αύλακα

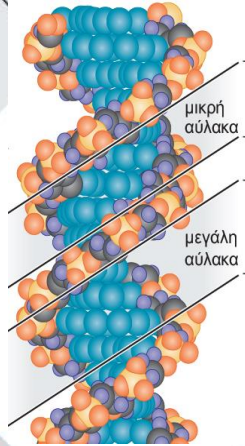


μικρή αύλακα

μεγάλη αύλακα

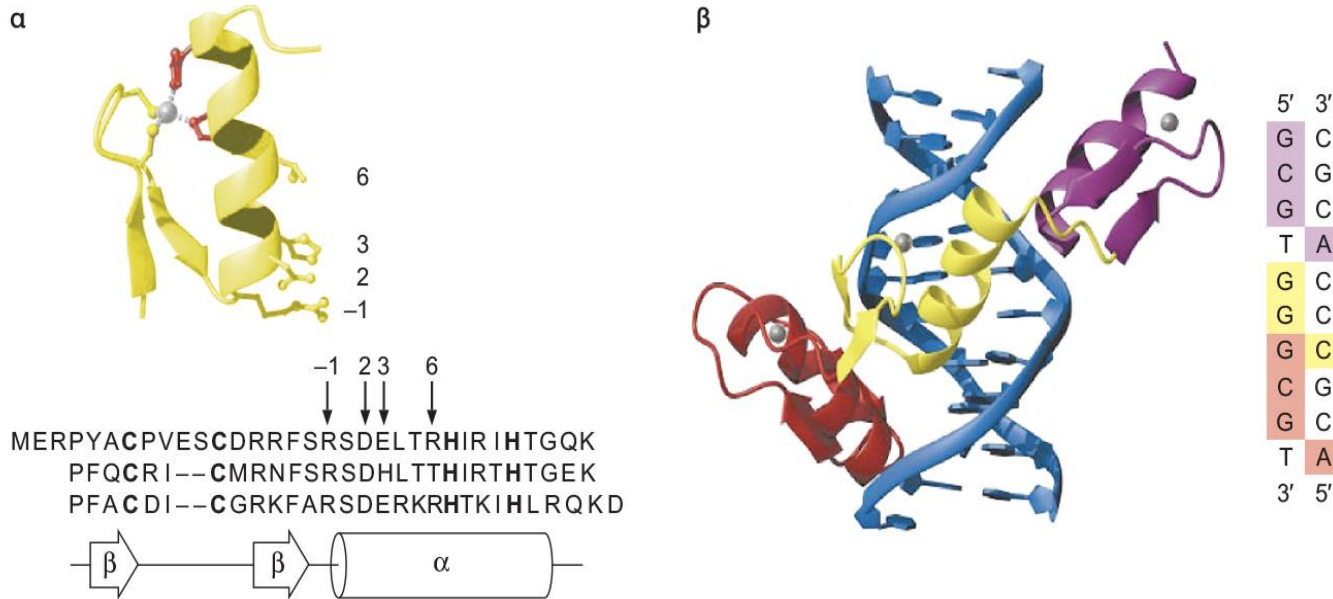


μικρή αύλακα



- Ο κώδικας των χημικών ομάδων στην μεγάλη αύλακα προσδιορίζει την ταυτότητα του ζεύγους βάσεων
- Σύμφωνα με αυτά τα πρότυπα οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA αναγνωρίζουν με σαφήνεια την αλληλουχία πρόσδεσης χωρίς να διαταράξουν την διπλή έλικα
- Περιοχές του DNA με όμοια διαδοχή βάσεων έχουν δυνατότητα κάμψης, που αποτελεί τρόπο «έμμεσης» ανάγνωσης και αλληλεπίδρασης με ειδικές πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες με δακτύλους ψευδαργύρου αλληλεπιδρούν με τις μεγάλες άλακες του DNA



α. Τα περίπου 30 αμινοξικά κατάλοιπα σε κάθε δάκτυλο ψευδαργύρου δημιουργούν οριακά το υδρόφοβο περιβάλλον για την προφύλαξη του ιόντος Zn^{2+} . Δύο κυστεΐνες και δύο ιστοιδίνες συγκρατούν συνεργατικά τον Zn^{2+} που χρησιμεύει για την κάμψη του πρωτεϊνικού μορίου

β. Τρεις δάκτυλοι ψευδαργύρου σε αλληλεπίδραση με τις μεγάλες άλακες του DNA

Πρωτεΐνες αναγνώρισης της μικρής αύλακας του DNA

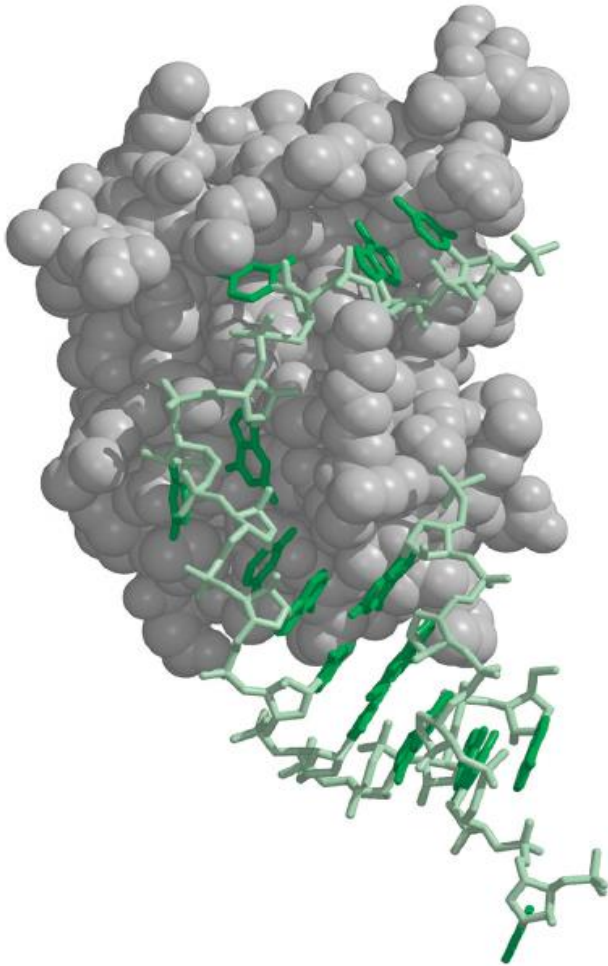


• Στην μικρή αύλακα η αλληλουχία βάσεων δεν καθορίζει κάποιο ειδικό μοτίβο, τα ζεύγη A:T και T:A ή C:G και G:C δεν διαφοροποιούνται.

• Η αλληλουχία βάσεων όμως, επηρεάζει την φυσική τάση της έλικας να κάμπτεται και παρέχει τη δυνατότητα «έμμεσης αναγνώρισης» από πρωτεΐνες που προσδέονται και σταθεροποιούν την κάμψη της δίκλωνης έλικας του DNA.

• Η πρωτεΐνη LEF-1 (παράγοντας 1 του ενισχυτή των λεμφοκυττάρων) φέρει τρεις α -έλικες και τοποθετείται στην μικρή αύλακα του DNA, ενώ μία πλευρική αλυσίδα εισέρχεται ανάμεσα σε δύο γειτονικά ζεύγη βάσεων και σταθεροποιεί μία κάμψη κατά 90° περίπου, του DNA.

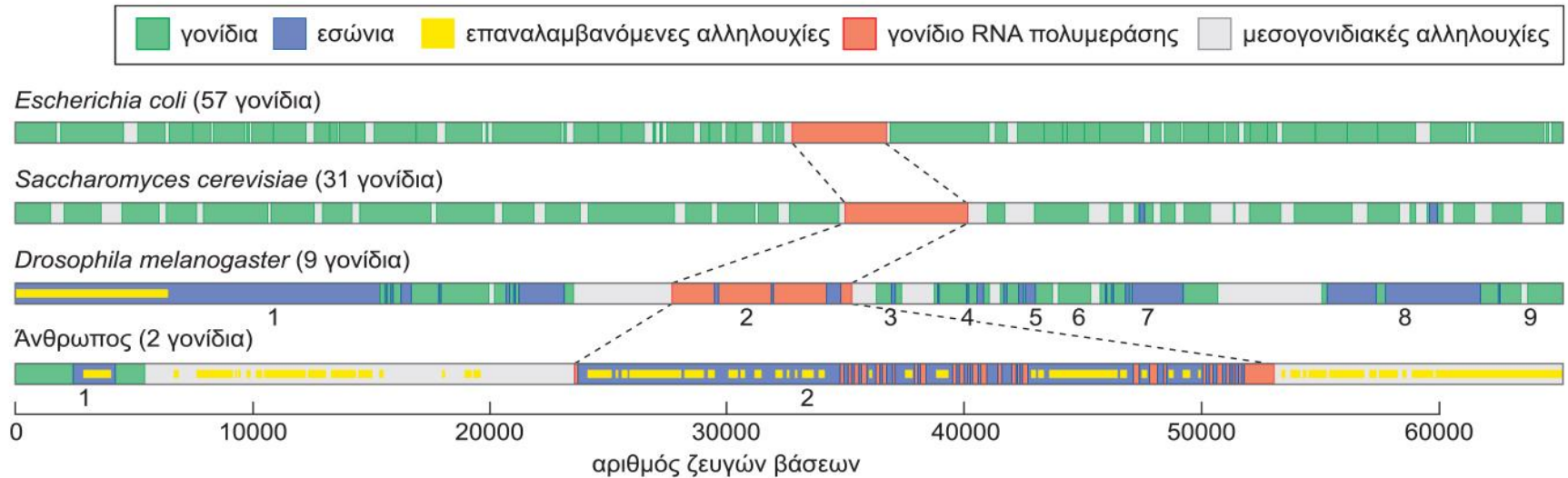
Πρωτεΐνες αναγνώρισης RNA



• Τα μόρια RNA φέρουν μεγάλη ποικιλία τοπικών δομών και οι τριτοταγείς αλληλεπιδράσεις δημιουργούν μερικές σταθερές και καλά χαρακτηρισμένες διαμορφώσεις (π.χ. στο tRNA).

• Το πρωτεϊνικό μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA recognition motif, RRM) αποτελείται από 80-90 αμινοξέα και χαρακτηρίζει πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με RNA σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (π.χ. κατά τη συρραφή του RNA).

Σύγκριση της πυκνότητας γονιδίων μεταξύ διαφορετικών οργανισμών

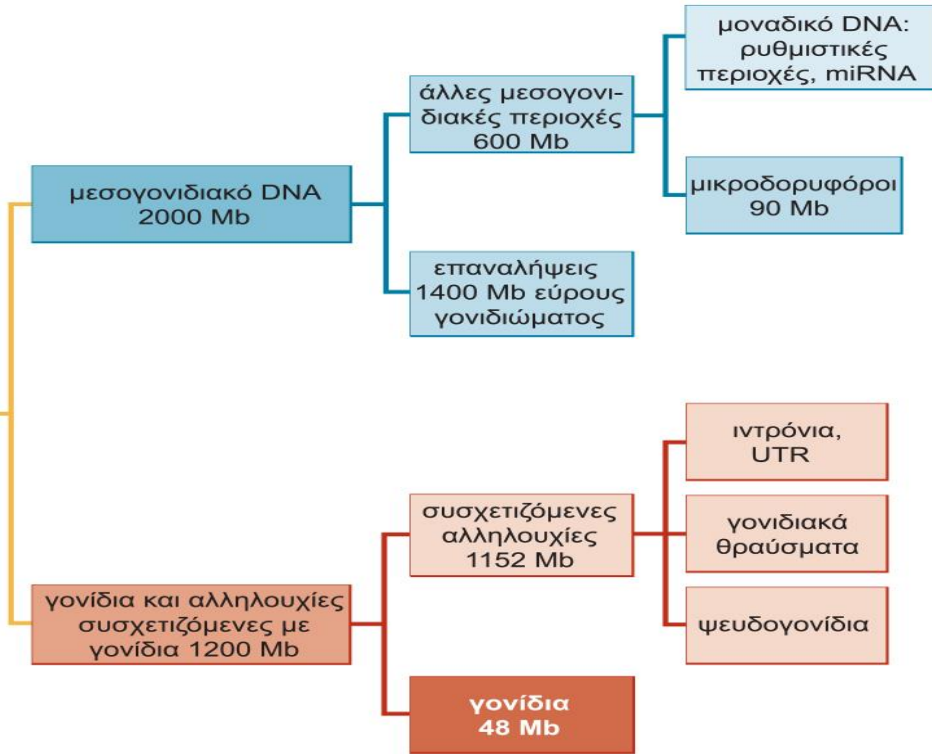


- Περιοχή γονιδιώματος 65 χιλιάδων νουκλεοτιδικών βάσεων από διαφορετικούς οργανισμούς
- Περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί την RNA πολυμεράση (κόκκινη περιοχή)
- Βασική παρατήρηση: Κατ' αναλογία με την κλιμακωτή αύξηση της πολυπλοκότητας του οργανισμού, μειώνεται ο αριθμός των γονιδίων (πράσινες περιοχές) και αυξάνονται οι μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες στα γονιδιώματα

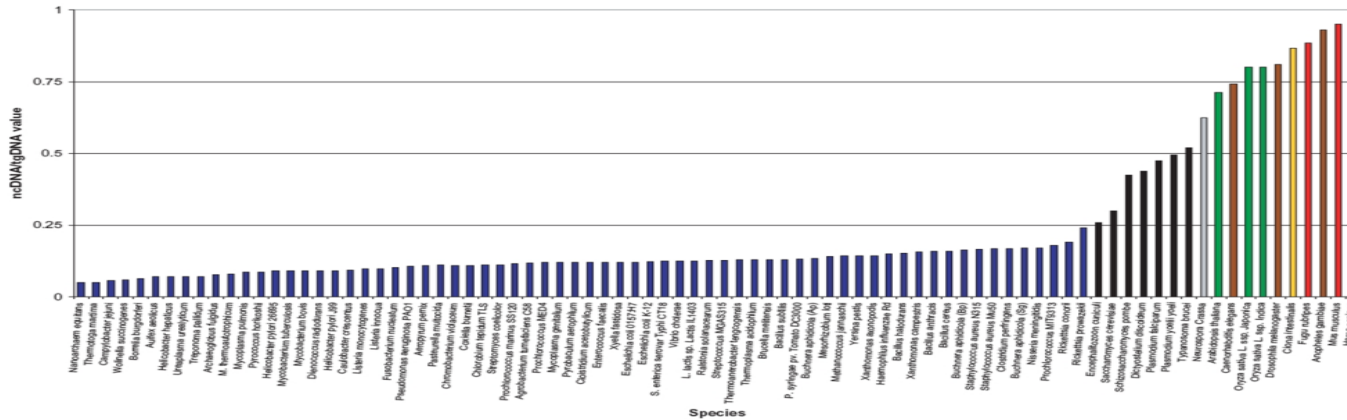
Η οργάνωση του ανθρώπινου γονιδιώματος

- Περίπου το 5% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες
- Το υπόλοιπο 95% αποτελείται από μεσογονιδιακές αλληλουχίες (εσώνια, μη μεταφράσιμα άκρα, ψευδογονίδια και επαναλαμβανόμενο DNA)
- Μεγάλο μέρος της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει άγνωστη λειτουργία

ανθρώπινο γονιδίωμα 3200 Mb



Αναλογία non-coding DNA



Εξέλιξη

Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες



• Το μη κωδικοποιητικό κλάσμα του γονιδιώματος αποτελείται από δύο κατηγορίες ακολουθιών DNA: το μοναδικό DNA χαμηλού αριθμού αντιγράφων και το επαναλαμβανόμενο DNA.

• Το επαναλαμβανόμενο DNA μπορεί με τη σειρά του να υποδιαιρεθεί περαιτέρω:

A. Τα αντίγραφα ενός μοτίβου επανάληψης βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο σε μια συστοιχία (διαδοχικές επαναλήψεις, tandem repeats).

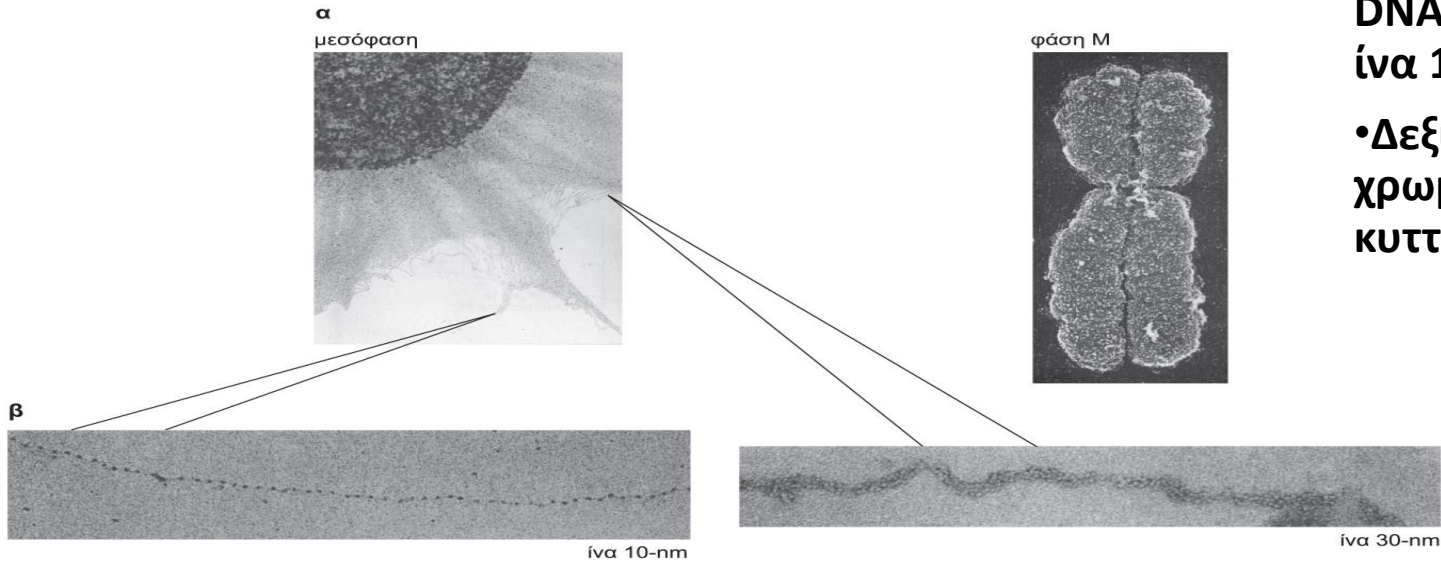
B. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι διασκορπισμένες σε όλο το γονιδίωμα και ως μεμονωμένες μονάδες επαναλήψεων πλαισιώνονται από μοναδική ακολουθία (διασπαρμένες επαναλήψεις, interspersed repeats)

Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

- Οι περισσότερες διασπαρμένες επαναλήψεις προέρχονται από τα μεταθετά στοιχεία DNA, ή transposons: τα DNA τρανσποζόνια και τα ρετροτρανσποζόνια.
- Τα DNA τρανσποζόνια θεωρούνται ανενεργά στο ανθρώπινο γονιδίωμα λόγω της συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια της φυλογενετικής πορείας των σπονδυλωτών.
- Τα ρετροτρανσποζόνια είναι τα πιο σημαντικά μεταθετά στοιχεία στο ανθρώπινο γονιδίωμα, καθότι αφορούν σε ένα μεγάλο μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος (έως και το 45%), ενώ εξακολουθούν να είναι εν μέρη ενεργά.
- Οι διαδοχικές επαναλήψεις υποδιαιρούνται περαιτέρω:
 - Δορυφόροι (satellites): πολύ επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA με μήκη από ένα έως αρκετές χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Το δορυφορικό DNA είναι άφθονο στα χρωμοσωμικά κεντρομερίδια, στα τελομερή και στην ετεροχρωματίνη.
 - Μίνι-δορυφόροι (Minisatellites): μικρότερες διαδοχικές επαναλήψεις, οι οποίες βρίσκονται κυρίως στις υπο-τελομερείς περιοχές των χρωμοσωμάτων. Συχνά είναι πολύ πολυμορφικές ως προς τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων και λόγω αυτής της ιδιότητάς τους ο πληθυσμός φέρει πολλαπλά αλληλόμορφα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες VNTRs (variable number of tandem repeats).
 - Μικρο-δορυφόροι (Microsatellites): φέρουν μικρές επαναλαμβανόμενες μονάδες (Short Tandem Repeats, STRs) συνήθως 1-5 bp. Οι μικρο-δορυφόροι είναι πολύ συνηθισμένοι στο γονιδίωμα, βρίσκονται και στην ευχρωματίνη, είναι πολύ πολυμορφικοί και χρησιμοποιούνται πολύ συχνά ως γενετικοί δείκτες.

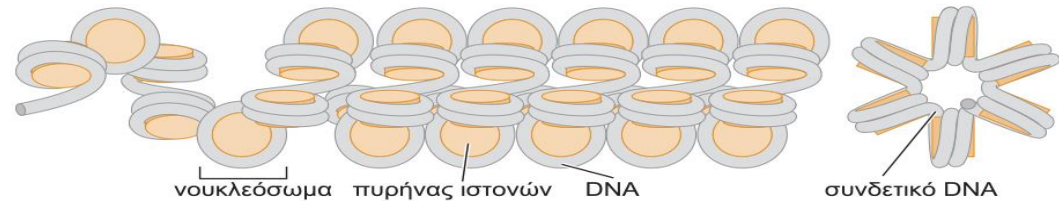
Η δομή της χρωματίνης

- Αριστερά μεσοφασικό DNA και χρωματινική ίνα 10 και 30nm
- Δεξιά συμπυκνωμένο χρωμόσωμα κατά την κυτταρική διαίρεση

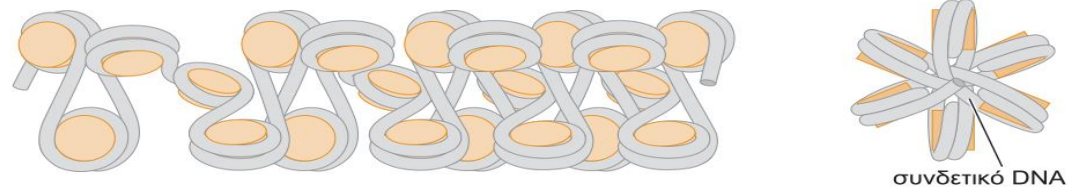


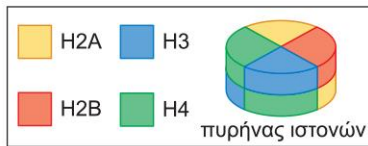
- Μοντέλα συσπείρωσης της χρωματίνης
- Το DNA μεταξύ των νουκλεοσωμάτων ονομάζεται συνδετικό

α σωληνοειδές



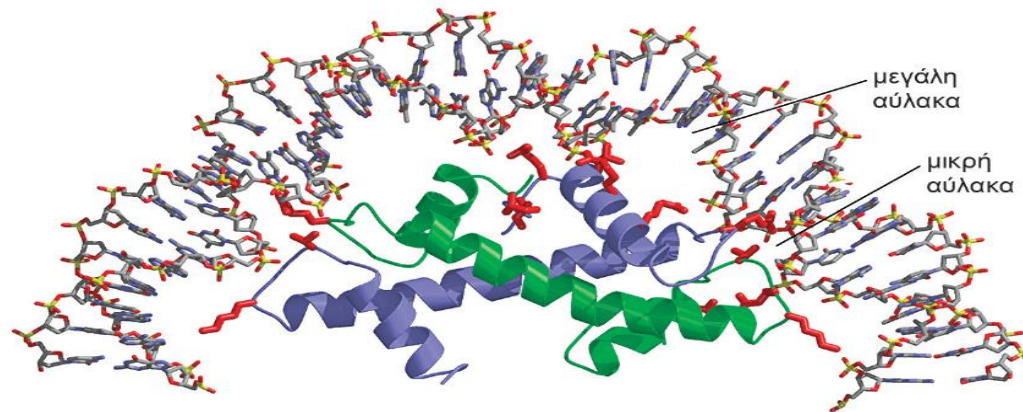
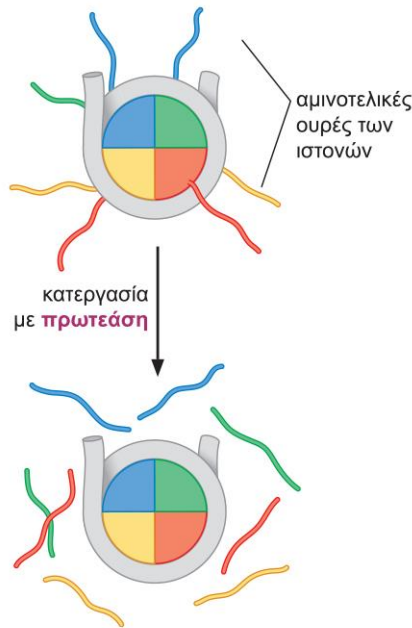
β ζιγκ – ζαγκ





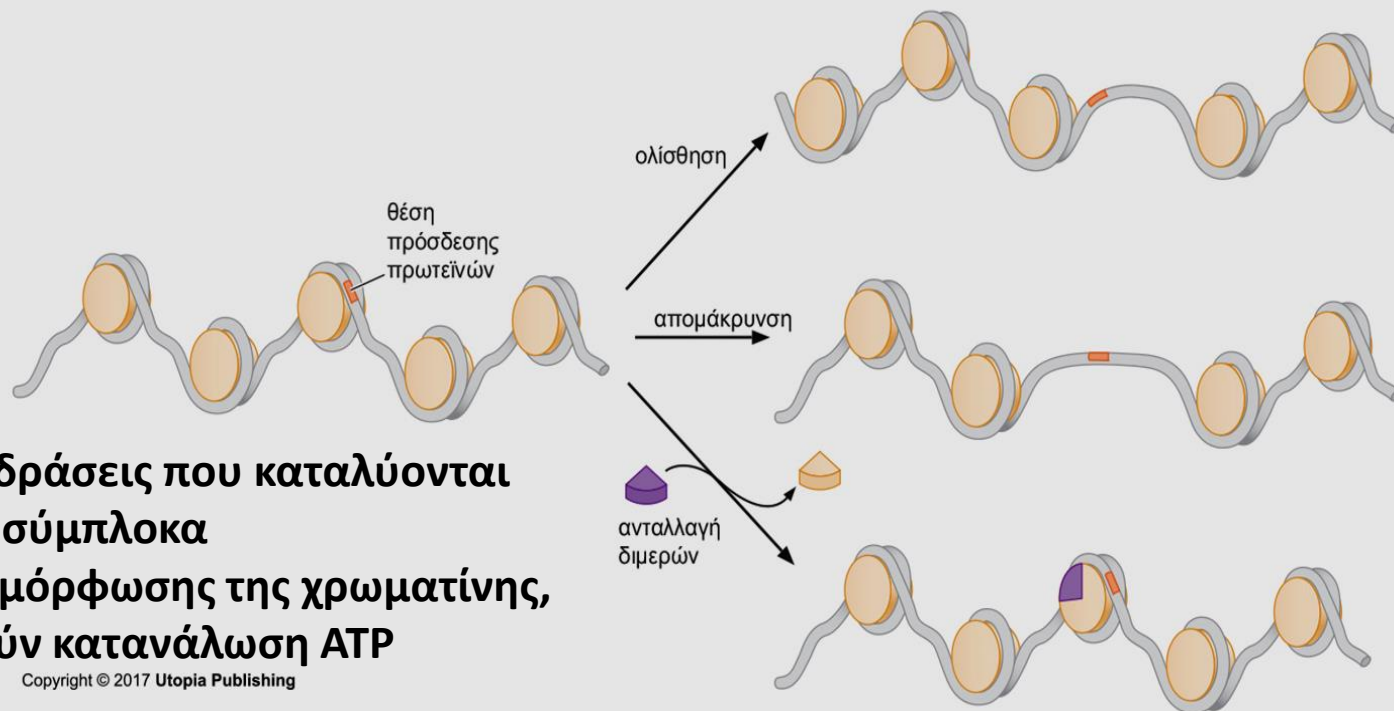
Η δομή της χρωματίνης

- Ο τετραμερής πυρήνας των ιστονών γύρω από τον οποίο, τυλίγεται η δίκλωνη έλικα του DNA
- Οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών πρωτεϊνών προεξέχουν της δομής του νουκλεοσώματος σε συγκεκριμένες θέσεις



- Η αλληλεπίδραση του DNA με τις ιστόνες γίνεται μέσω δεσμών υδρογόνου και δεν εξαρτάται από την αναγνώριση ειδικής αλληλουχίας για τη σύνδεση του νουκλεοσώματος
- Όλοι οι δεσμοί απαντώνται στη μικρή αύλακα του DNA
- Ο μεγάλος αριθμός δεσμών υδρογόνου παρέχει την κινητήρια δύναμη για την κάμψη της έλικας του DNA γύρω από τον πυρήνα των ιστονών
- Οι θετικά φορτισμένες ιστόνες αλληλεπιδρούν με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό του DNA

Η αναδιάταξη της χρωματίνης και η προσβασιμότητά της σε πρωτεΐνες διευκολύνεται από την δράση των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης ή αναδιάταξης της χρωματίνης, τα οποία μετακινούν τα νουκλεοσώματα



Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, απαιτούν κατανάλωση ATP

Copyright © 2017 Utopia Publishing

ΠΙΝΑΚΑΣ 7-6 Συμπλέγματα αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων εξαρτώμενα από την ATP

Τύπος	Αριθμός υπομονάδων	Επικράτειες δέσμευσης ιστονών	Ολίσθηση	Μεταφορά
SWI/SNF	8 – 11	Βρωμο-επικράτεια	Ναι	Ναι
ISWI	2 – 4	Βρωμο-επικράτεια, επικράτεια SANT, δάκτυλος PHD	Ναι	Όχι
CHD	8 – 10	Χρωμο-επικράτεια, δάκτυλος PHD	Ναι	Όχι
SWR1	12 – 14	Βρωμο-επικράτεια, επικράτεια SANT	Ναι	nd
INO80	10 – 12	Καμία	Ναι	nd

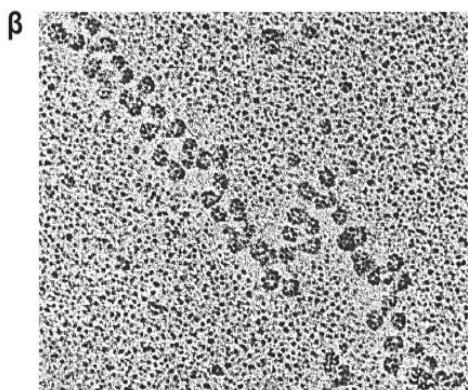
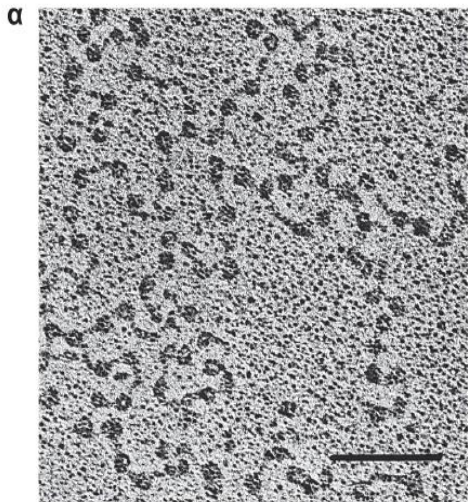
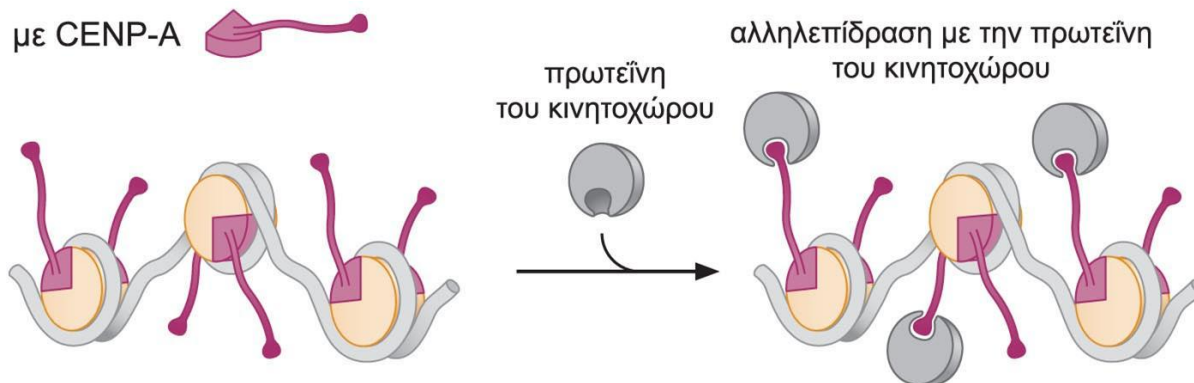
nd, μη καθορισμένη

Ευχρωματίνη-Ετεροχρωματίνη

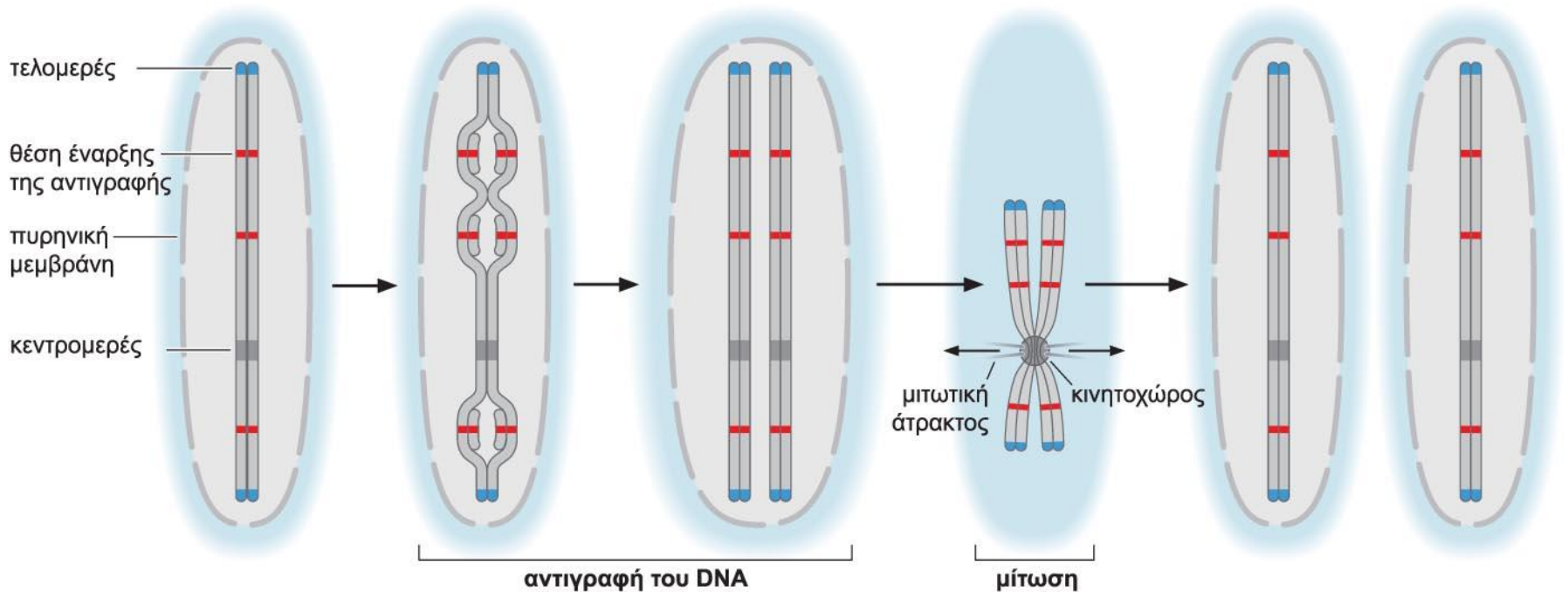
Στην ετεροχρωματίνη τα νουκλεοσώματα συγκροτούνται σε μεγαλύτερα συναθροίσματα
Αυτό οδηγεί σε ένα φραγμό της γονιδιακής έκφρασης

Παραλλάγματα των ιστονών αλλάζουν τη λειτουργία των νουκλεοσωμάτων

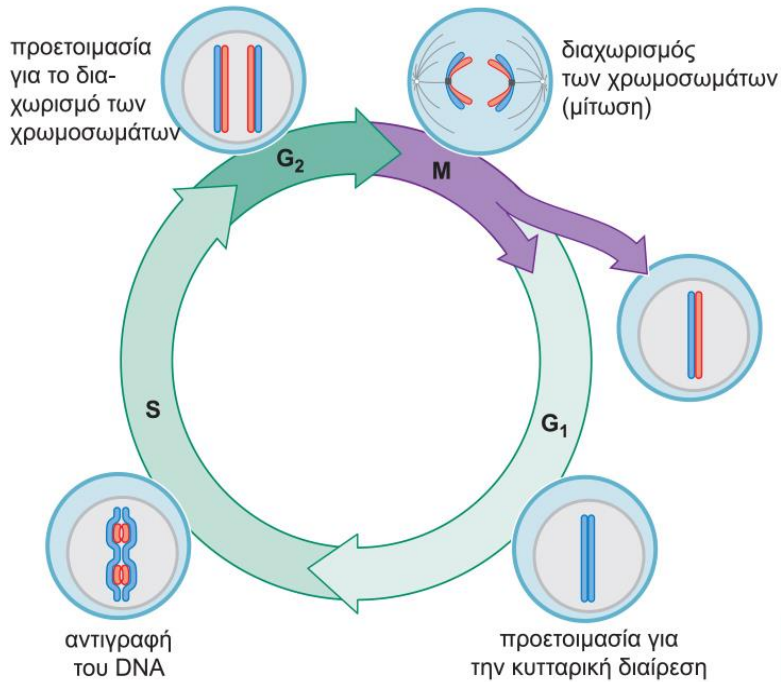
- Η ιστόνη H2A.X φωσφορυλιώνεται όταν γεινιάζει με διπλή θραύση στο DNA και αποτελεί σήμα αναγνώρισης για τα ένζυμα επιδιόρθωσης
- Η CENP-A αντικαθιστά την ιστόνη H3 και κατά τη διάρκεια της μίτωσης αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κινητοχώρου των χρωμοσωμάτων



Τα κεντρομερή και τα τελομερή είναι απαραίτητα για την συντήρηση του γονιδιώματος σε κάθε αντιγραφικό κύκλο



Ο κυτταρικός κύκλος

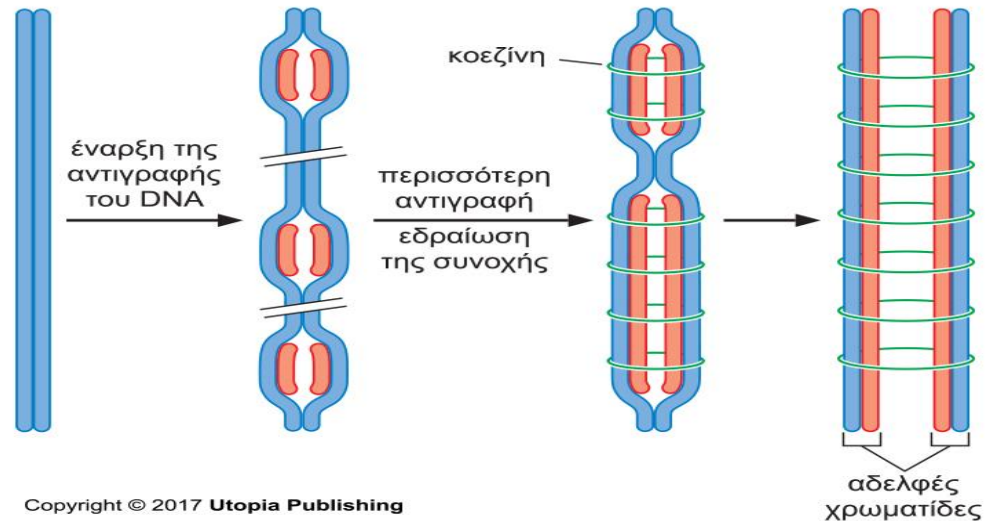


• Τα γεγονότα που απαιτούνται για την ολοκλήρωση ενός μονήρους κύκλου κυτταρικής διαίρεσης, ονομάζονται κυτταρικός κύκλος

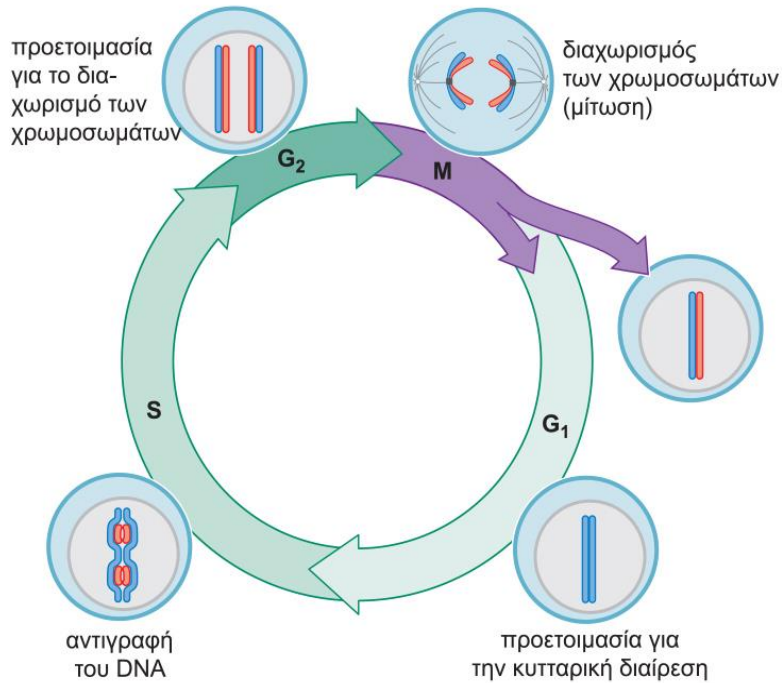
• Ο μιτωτικός κύκλος διαίρεσης διαιρείται στις φάσεις G₁, S, G₂ και M

• Ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων πραγματοποιείται στην φάση S και παράγει δύο πανομοιότυπες αδελφές χρωματίδες για κάθε χρωμόσωμα

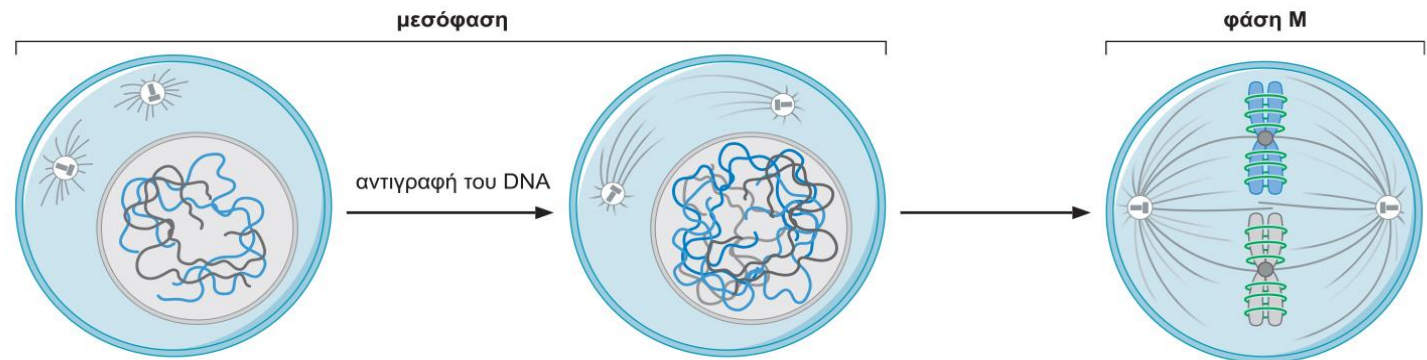
γεγονότα – κλειδιά κατά τη φάση S



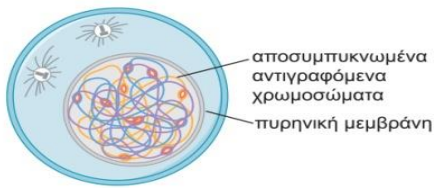
Οι αλλαγές της χρωματίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου



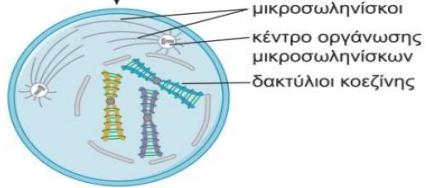
- Τα χρωμοσώματα βρίσκονται στον μέγιστο βαθμό συμπύκνωσης κατά την φάση M και είναι αποσυμπιερωμένα κατά τη μεσόφαση, στις φάσεις G₁, S και G₂



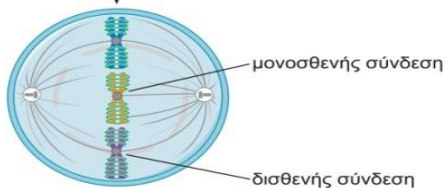
μεσόφαση



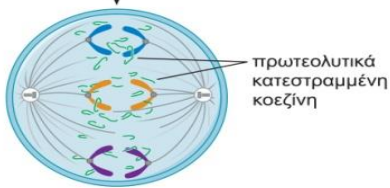
πρόφαση



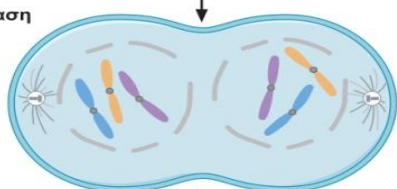
μετάφαση



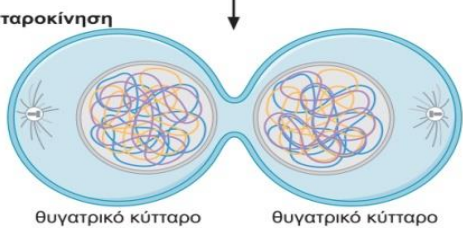
ανάφαση



τελόφαση

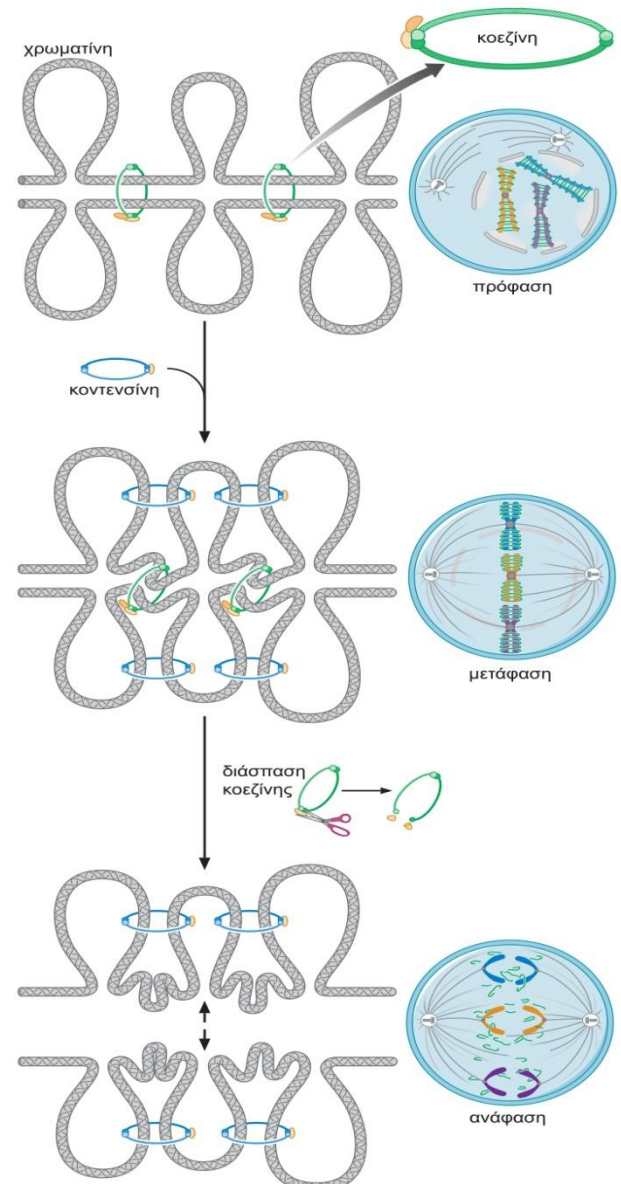


κυτταροκίνηση

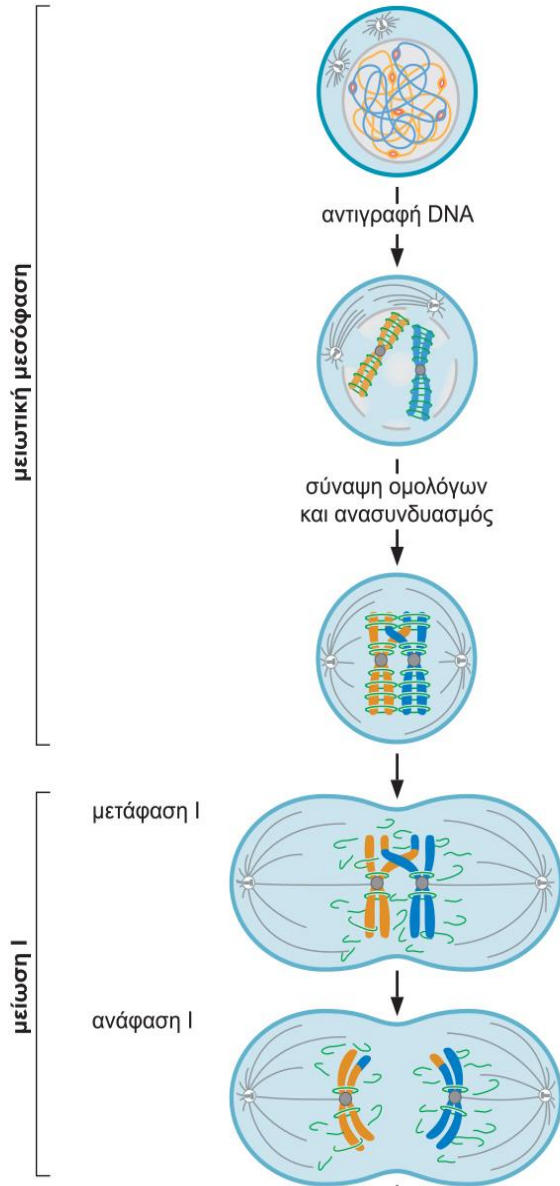


Η μίτωση διατηρεί σταθερό το γονικό χρωμοσωματικό αριθμό

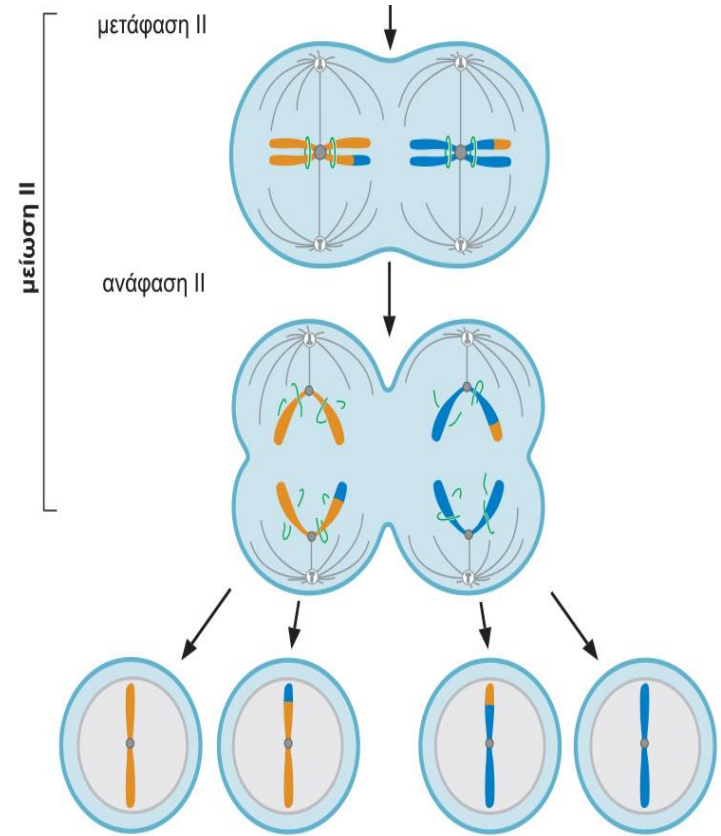
Η δομή και δράση των κοεζινών και κοντενσινών κατά τη μίτωση



Η μείωση είναι εξειδικευμένη κυτταρική διαίρεση που μειώνει το γονικό χρωμοσωματικό αριθμό και πραγματοποιείται αποκλειστικά στα γαμετικά κύτταρα

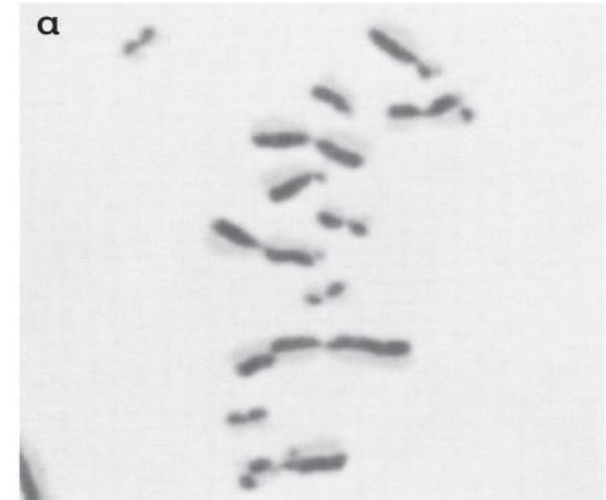
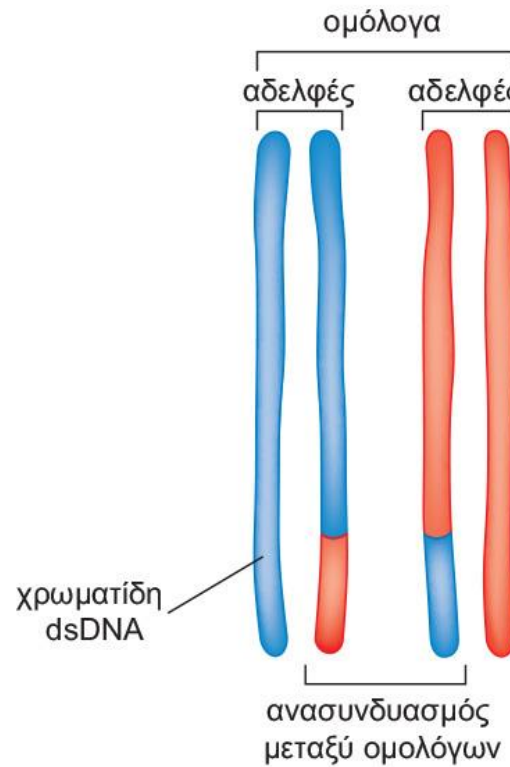
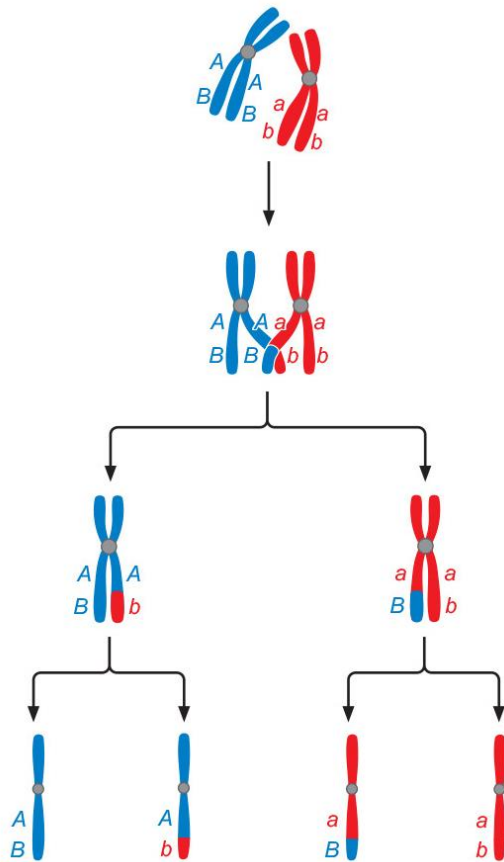


Κατά την διάρκεια του ζευγαρώματος των ομόλογων χρωμοσωμάτων, στην 1^η μειωτική διαίρεση, γίνεται ανταλλαγή γενετικού υλικού (ομόλογος ανασυνδυασμός)



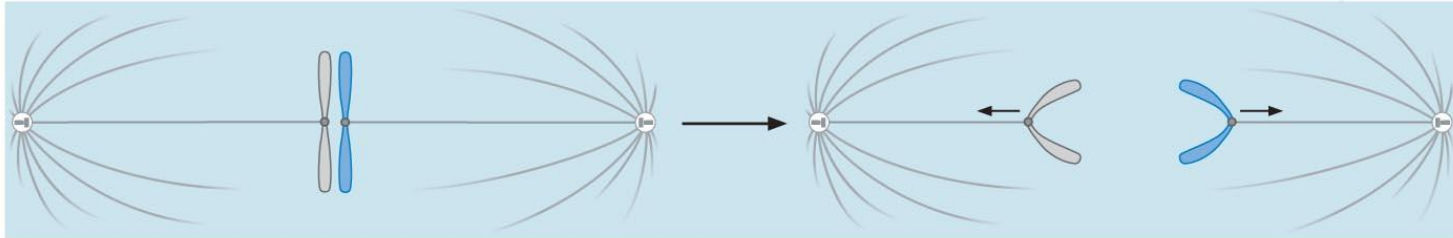
Παραγωγή 4 γαμετών με απλοειδές γονιδίωμα

Στους ευκαρυώτες ο ομόλογος ανασυνδυασμός απαιτείται για τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης και οδηγεί σε ανταλλαγή χρωμοσωμικών περιοχών, κυρίως μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων



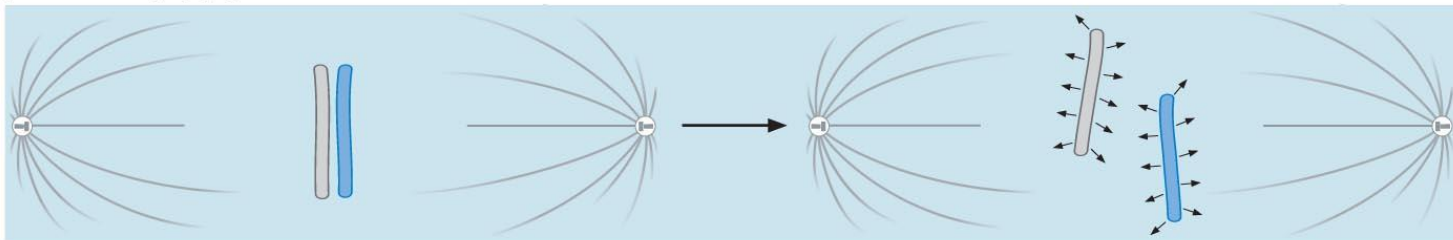
Βλάβες στον αριθμό των κεντρομερών έχουν ως αποτέλεσμα σε σοβαρές βλάβες σε κυτταρικό επίπεδο

α ένα κεντρομερές



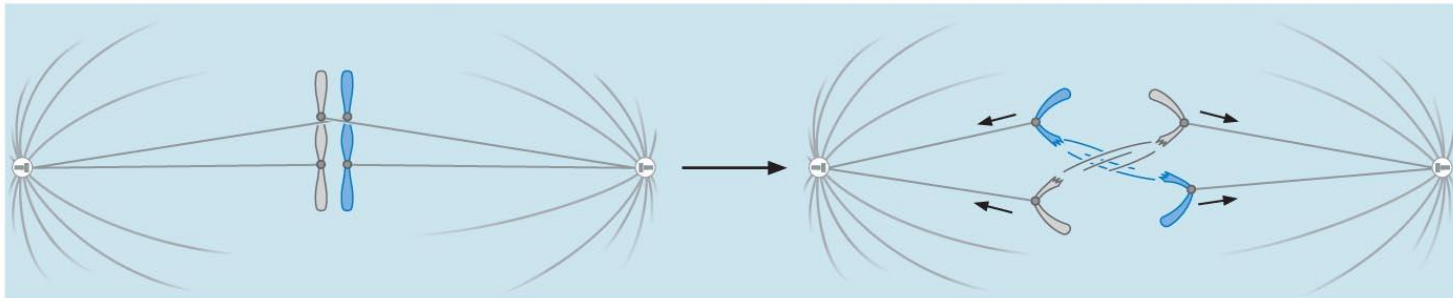
ένα χρωμόσωμα για κάθε κύτταρο

β κανένα κεντρομερές



τυχαίος διαχωρισμός του χρωμοσώματος

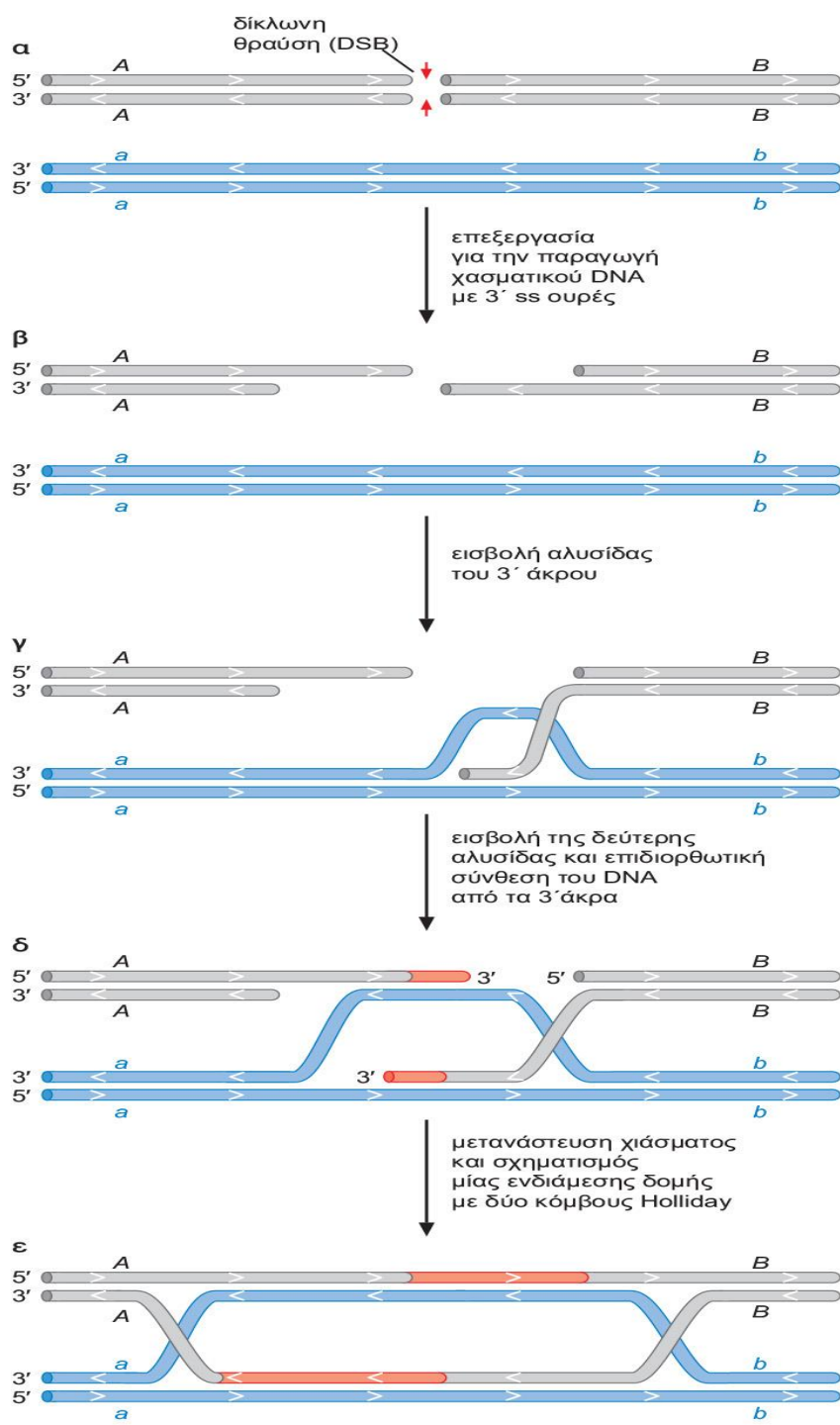
γ δύο κεντρομερή



χρωμοσωματική ρήξη
(λόγω των περισσότερων του ενός κεντρομερών)

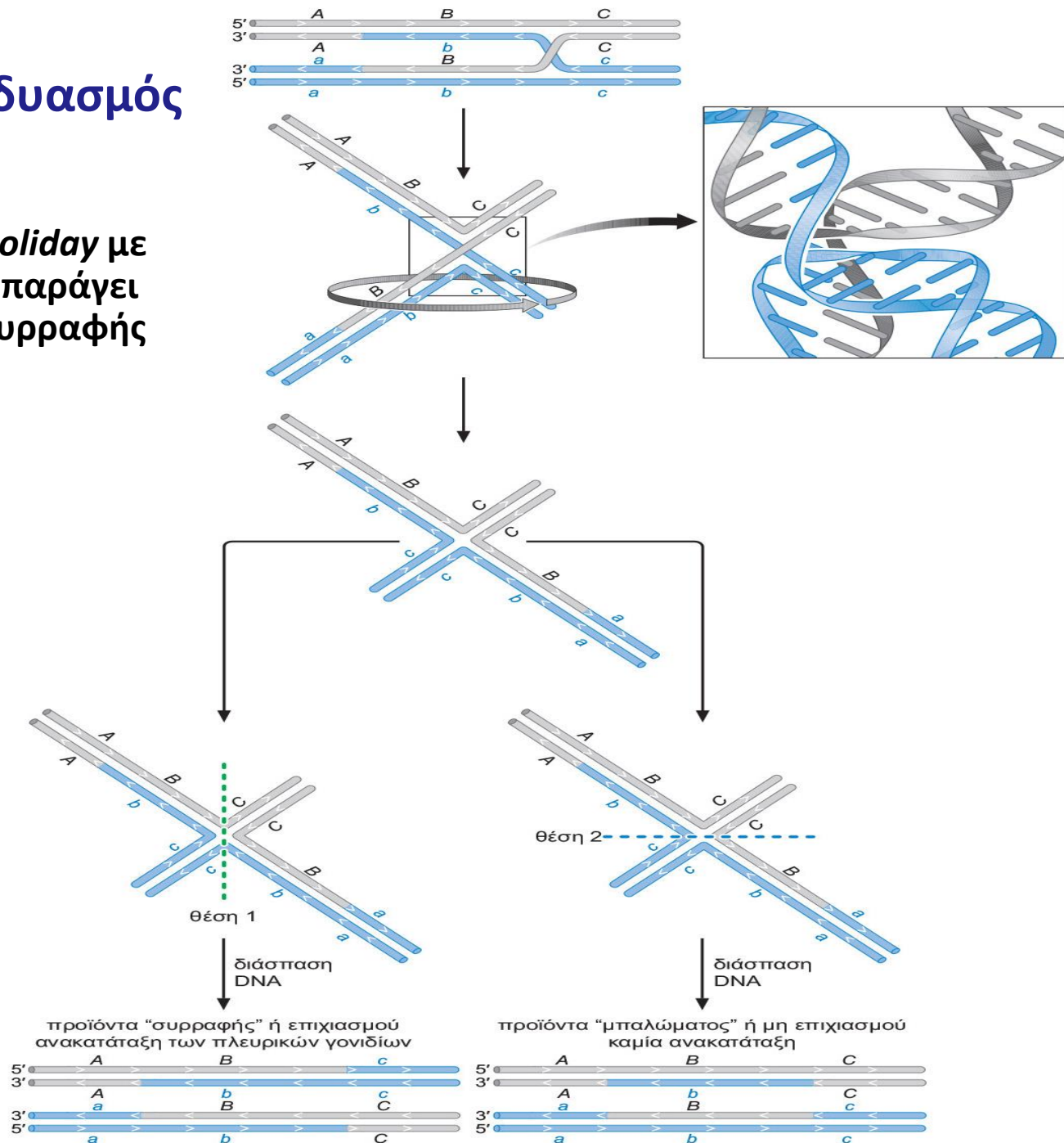
Ομόλογος ανασυνδυασμός

- Ευθυγράμμιση ομόλογων χρωσωμάτων
- Δημιουργία διπλής θραύσης στο DNA
- Εισβολή αλυσίδας και ζευγάρωμα βάσεων μεταξύ των ανασυνδυαζόμενων κλώνων
- Σχηματισμός κόμβων *Holiday* και μετανάστευση διακλάδωσης



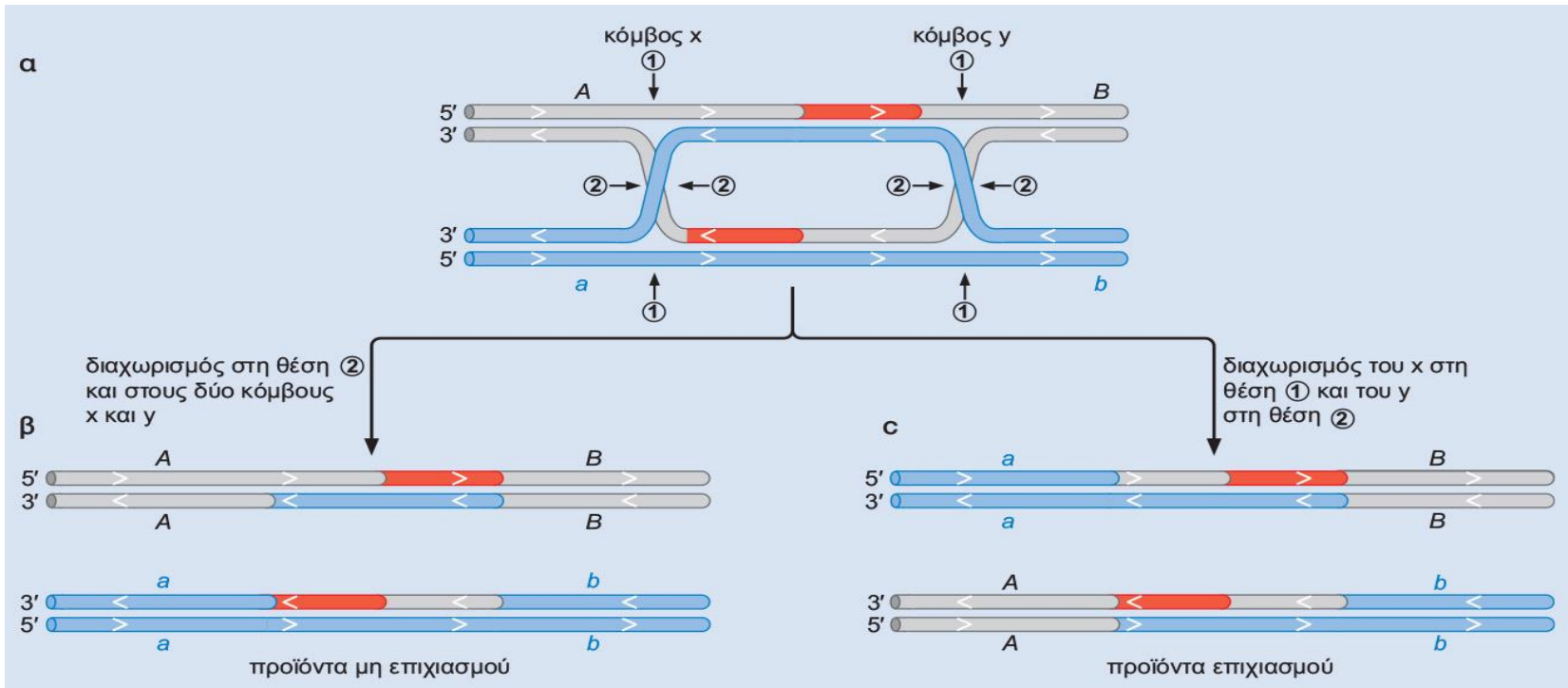
Ομόλογος ανασυνδυασμός

Διάσπαση του κόμβου *Holiday* με εναλλακτικούς τρόπους, παράγει διαφορετικά προϊόντα συρραφής



Ομόλογος ανασυνδυασμός

Διάσπαση του κόμβου *Holiday* με εναλλακτικούς τρόπους, παράγει διαφορετικά προϊόντα συρραφής



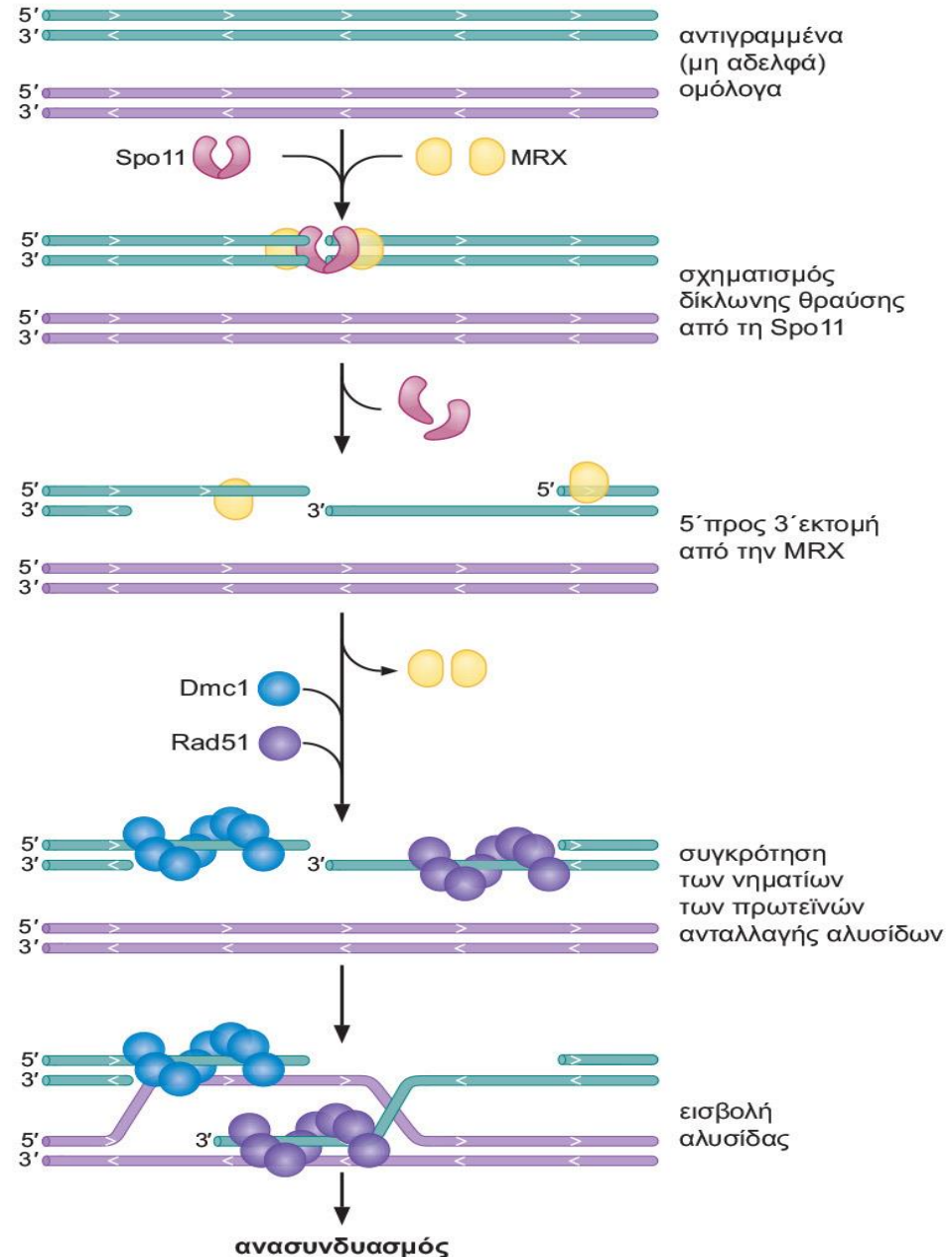
Απουσία ανασυνδυασμού τα ομόλογα χρωμοσώματα συχνά αποτυγχάνουν να ευθυγραμμιστούν κατάλληλα στην 1^η μειωτική διαίρεση και υπάρχει υψηλή συχνότητα χρωμοσωματικής απώλειας στους γαμέτες.

Ανάλογα με την τομή του κόμβου *Holiday*, από τον ανασυνδυασμό μπορεί να προκύψουν προϊόντα επιχιασμού και μη επιχιασμού

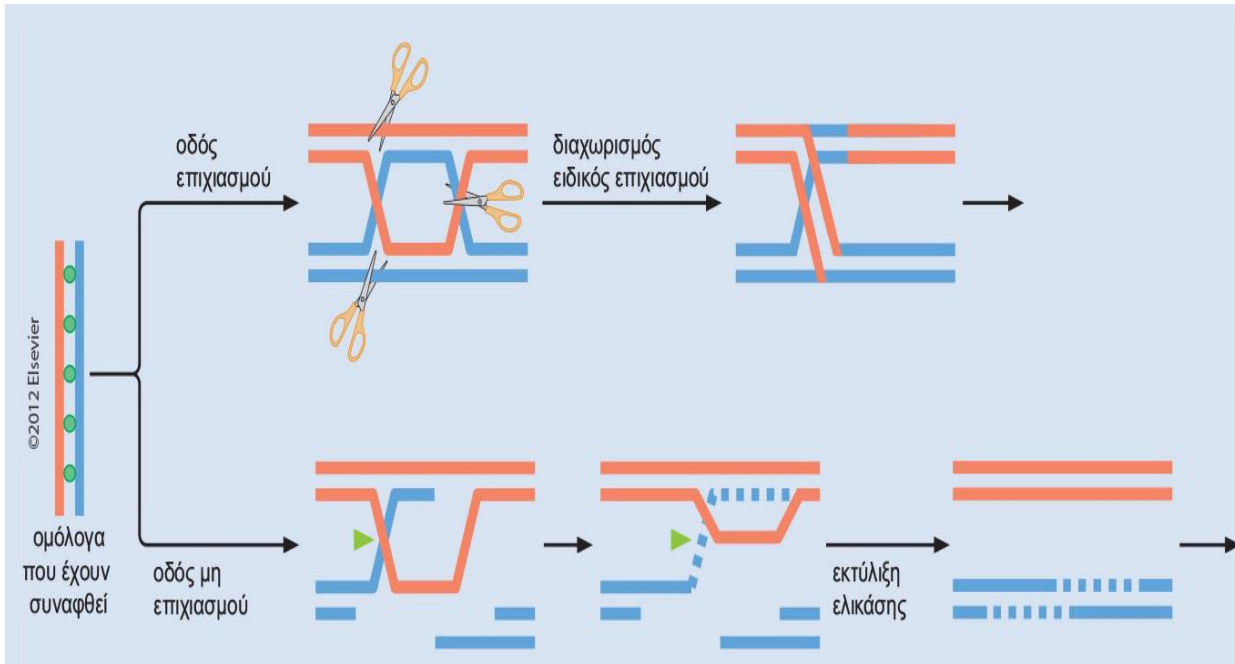
Επισκόπηση του μειωτικού ανασυνδυασμού

- Σχηματισμός δίκλωνων θραύσεων, συνήθως σε πιο «ανοικτές» δομές χρωματίνης από την Spo11
- Το σύμπλοκο MRX επεξεργάζεται τα άκρα και αποδεσμεύει τη Spo11
- Οι πρωτεΐνες ανταλλαγής αλυσίδων Dmc1 και Rad51 συγκροτούνται στις ουρές ssDNA και συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό
- Ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται κατά προτίμηση μεταξύ των μη αδελφών ομόλογων χρωματίδων

Η πρωτεΐνη BRCA2 που ενοχοποιείται για το ήμισυ των περιπτώσεων οικογενούς καρκίνου του μαστού, έχει άμεση διαμεσολάβηση στον επιδιορθωτικό αυτό μηχανισμό μέσω αλληλεπίδρασης με τη Rad51



Πρωτεΐνες που συνδέονται με την πρόωση γήρανση και τον καρκίνο προάγουν ένα εναλλακτικό μονοπάτι επεξεργασίας των κόμβων *Holiday*



Η διαταραχή της ελικάσης της οικογένειας RecQ (πράσινο βέλος), αποσυναρμολογεί τα εμπλεκόμενα μόρια και οδηγεί στην κατάρρευση του κόμβου *Holiday* πριν τον ανασυνδυασμό.

Απώλεια ανασυνδυασμού

Σύνδρομο (Γονίδιο)	Κύρια κλινικά χαρακτηριστικά	Προδιάθεση για καρκίνο
Σύνδρομο Bloom (BLM)	Νανισμός, γαμψή μύτη, στενό πρόσωπο, μελάγχρωση του δέρματος, ερυθρότητα και ευρυαγγείες στο δέρμα, διανοητική καθυστέρηση, διαβήτης τύπου II, ανοσοανεπάρκεια, παθήσεις πνευμόνων, χαμηλή ή μηδενική γονιμότητα	Πρώιμη εμφάνιση με φυσιολογική κατανομή ιστού και τύπου
Σύνδρομο Werner (WRN)	Καταρράκτης άμφω, βράγχος φωνής, δερματικές αλλοιώσεις, λεπτά άκρα, πρόωρο γκριζάρισμα τριχωτού κεφαλής/αλωπεκία, κάτισχο προσωπείο, κοντό ανάστημα, οστεοπόρωση, υπογοναδισμός, διαβήτης, αποτιτάνωση μαλακών ιστών	πρώιμη εμφάνιση πρωτοπαθών σαρκωμάτων και όγκων μεσεγχυματικής προέλευσης
Σύνδρομο Rothmund-Thomson (RECQ4)	Ποικιλοδερμία, νεανικός καταρράκτης, καθυστέρηση αύξησης, σκελετική δυσπλασία, αλωπεκία, υπογοναδισμός	Πρώιμη εμφάνιση οστεοσαρκωμάτων

Πολυμορφισμοί σε τυπικό γονιδίωμα ανθρώπου

Τα άτομα διαφέρουν σημαντικά σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών, που καθορίζονται εν μέρει από παραλλαγές μεταξύ των γονιδιωμάτων. **Οποιοδήποτε γονιδίωμα φέρει τα ακόλουθα:**

- ≈ 5 έως 10 εκατομμύρια SNP (ποικίλλει ανάλογα με τον πληθυσμό)
- 25.000-50.000 σπάνιες παραλλαγές (συγκεκριμένες μεταλλάξεις ή μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε $<0,5\%$ των ατόμων που ελέγχθηκαν)
- ≈ 75 νέες μεταλλάξεις ζευγών βάσεων που δεν ανιχνεύθηκαν στα γονικά γονιδιώματα
- 3-7 νέες πολυμορφικές θέσεις με διαφορετικό αριθμό νουκλεοτιδικών επαναλήψεων (Copy Number Variants, CNVs) που περιλαμβάνουν ≈ 500 kb DNA, πιο συχνά στους μικροδορυφόρους
- 200.000-500.000 ενθέσεις νουκλεοτιδικών βάσεων (1-50 bp) (ποικίλλει ανά πληθυσμό)
- 500-1000 απαλοιφές νουκλεοτιδικών βάσεων (1-45 kb), επικαλύπτοντας ≈ 200 γονίδια
- ≈ 150 απαλοιφές νουκλεοτιδικών βάσεων μέσα σε γονίδια
- ≈ 200 -250 μετατοπίσεις στο πλαίσιο ανάγνωσης
- 10.000-12.000 συνώνυμα SNP
- 8.000-11.000 μη συνωνύμων SNP σε 4.000-5.000 γονίδια
- 175-500 σπάνιες μη συνώνυμες παραλλαγές
- 1 νέα μη συνώνυμη μετάλλαξη
- ≈ 100 πρόωρα κωδικόνια διακοπής
- 40-50 παραλλαγές που διαταράσσουν την ορθή αποκοπή των ιντρονίων και συρραφή των εξονίων κατά την ωρίμανση του mRNA
- 250-300 γονίδια με πιθανές παραλλαγές απώλειας λειτουργίας
- ≈ 25 γονίδια που προβλέπεται ότι θα απενεργοποιηθούν εντελώς

Το διεθνές πρόγραμμα: 1000 Genomes Project

- Το έργο "1000 Genomes" διεξήχθη μεταξύ του 2008 και του 2015, δημιουργώντας το μεγαλύτερο δημόσιο κατάλογο δεδομένων ανθρώπινων παραλλαγών και γονότυπων. Το Κέντρο Συντονισμού Δεδομένων στο EMBL-EBI έλαβε συνεχή χρηματοδότηση από το Wellcome Trust Institute για τη διατήρηση και επέκτασή του.
- Ο στόχος του προγράμματος 1000 Genomes ήταν να βρεθούν οι περισσότερες γενετικές παραλλαγές με συχνότητες τουλάχιστον 1% στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν.
- Το πρόγραμμα 1000 Genomes αποτέλεσε το πρώτο σχέδιο για την λεπτομερή αλληλούχιση των γονιδιωμάτων ενός μεγάλου αριθμού ανθρώπων, ώστε να παρέχει μια περιεκτική πηγή για την ανθρώπινη γενετική ποικιλομορφία. Τα δεδομένα από το πρόγραμμα 1000 Genomes έγιναν γρήγορα διαθέσιμα στην παγκόσμια επιστημονική κοινότητα μέσω ελεύθερα προσβάσιμων δημόσιων βάσεων δεδομένων.
- Οποιαδήποτε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος περιέχει γενικά περιορισμένο αριθμό απλοτύπων. Τα δεδομένα συνδυάστηκαν μεταξύ των δειγμάτων για να καταστεί δυνατή η αποτελεσματική ανίχνευση των περισσότερων από τις παραλλαγές σε μια περιοχή.

Επιπτώσεις των μεταλλάξεων και των πολυμορφισμών στην κλινική γενετική

Αν και είναι αυτονόητο ότι νέες μεταλλάξεις ή σπάνιες παραλλαγές στον πληθυσμό μπορεί να έχουν κλινικές συνέπειες, φαίνεται λιγότερο προφανές ότι κάποιες κοινές πολυμορφικές παραλλαγές μπορεί να σχετίζονται με παθολογία.

Έχει τεκμηριωθεί πλέον ότι είναι πιθανό κάποιο άτομο να φέρει δύο διακριτά αλληλόμορφα που κωδικοποιούν πολυπεπίδια, δομικά διαφορετικά, στο 20% περίπου όλων των γονιδιακών τόπων (που κωδικοποιούν πρωτεΐνες). Όταν συγκρίνονται άτομα από διαφορετικές γεωγραφικές ή φυλετικές ομάδες, έχει βρεθεί ότι ένα ακόμη μεγαλύτερο κλάσμα πρωτεϊνών παρουσιάζει ανιχνεύσιμους πολυμορφισμούς. Επιπλέον, ακόμη και όταν το γονιδιακό προϊόν είναι πανομοιότυπο, τα επίπεδα έκφρασης αυτού του προϊόντος μπορεί να είναι πολύ διαφορετικά μεταξύ διαφορετικών ατόμων και η διαφορά αυτή εξαρτάται από ένα συνδυασμό γενετικών και επιγενετικών παραλλαγών.

Έτσι, μέσα στο ανθρώπινο είδος υπάρχει ένα εντυπωσιακό ποσοστό βιοχημικής ατομικότητας στη σύνθεση των ενζύμων και άλλων γονιδιακών προϊόντων. Επιπλέον, επειδή τα γονιδιακά προϊόντα αλληλεπιδρούν με άλλα στα πλαίσια λειτουργικών και βιοχημικών μονοπατιών, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι κάθε άτομο, ανεξάρτητα από την κατάσταση της υγείας του, έχει ένα μοναδικό, γενετικά καθορισμένο χημικό ρεπερτόριο και έτσι ανταποκρίνεται με έναν μοναδικό τρόπο στις περιβαλλοντικές, διαιτητικές και φαρμακολογικές επιδράσεις. Αυτή η έννοια της χημικής ατομικότητας προτάθηκε για πρώτη φορά πριν από έναν αιώνα από τον Garrod.

Το ευρύ ζήτημα της «φυσιολογικής λειτουργίας» (που ξεχωρίζει από την παθολογική λειτουργία), μιας βασικής έννοιας στην ανθρώπινη βιολογία και στην κλινική ιατρική, δεν μπορεί να καθοριστεί σε αυστηρά πλαίσια όταν πρόκειται για το ανθρώπινο γονιδίωμα.