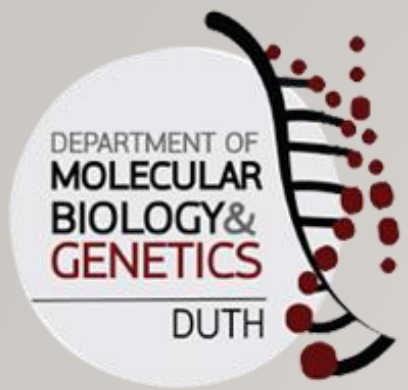




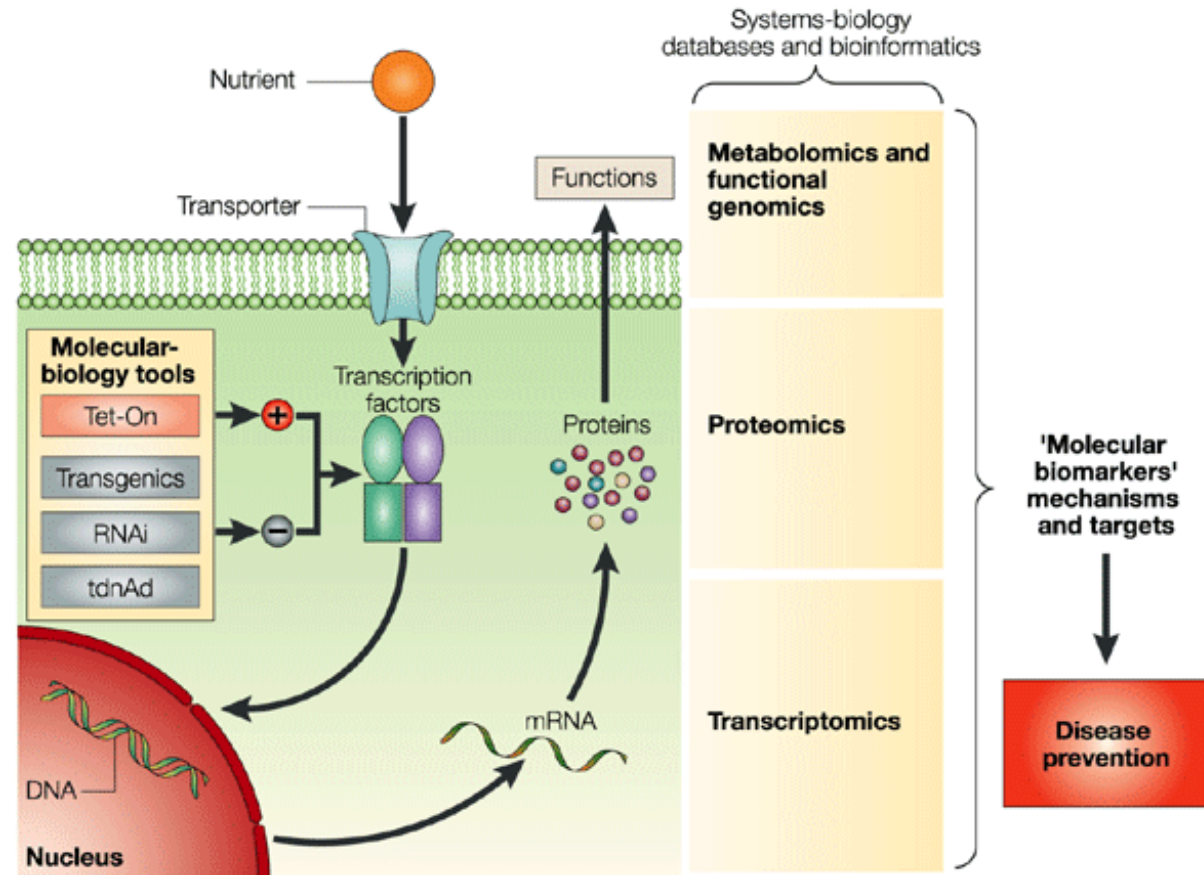
Σύγχρονες εφαρμογές της Μοριακής Βιολογίας στη Μοριακή διατροφή

Πέτρος Κολοβός
Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Βιολογίας Συστημάτων
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Μοριακή διατροφή

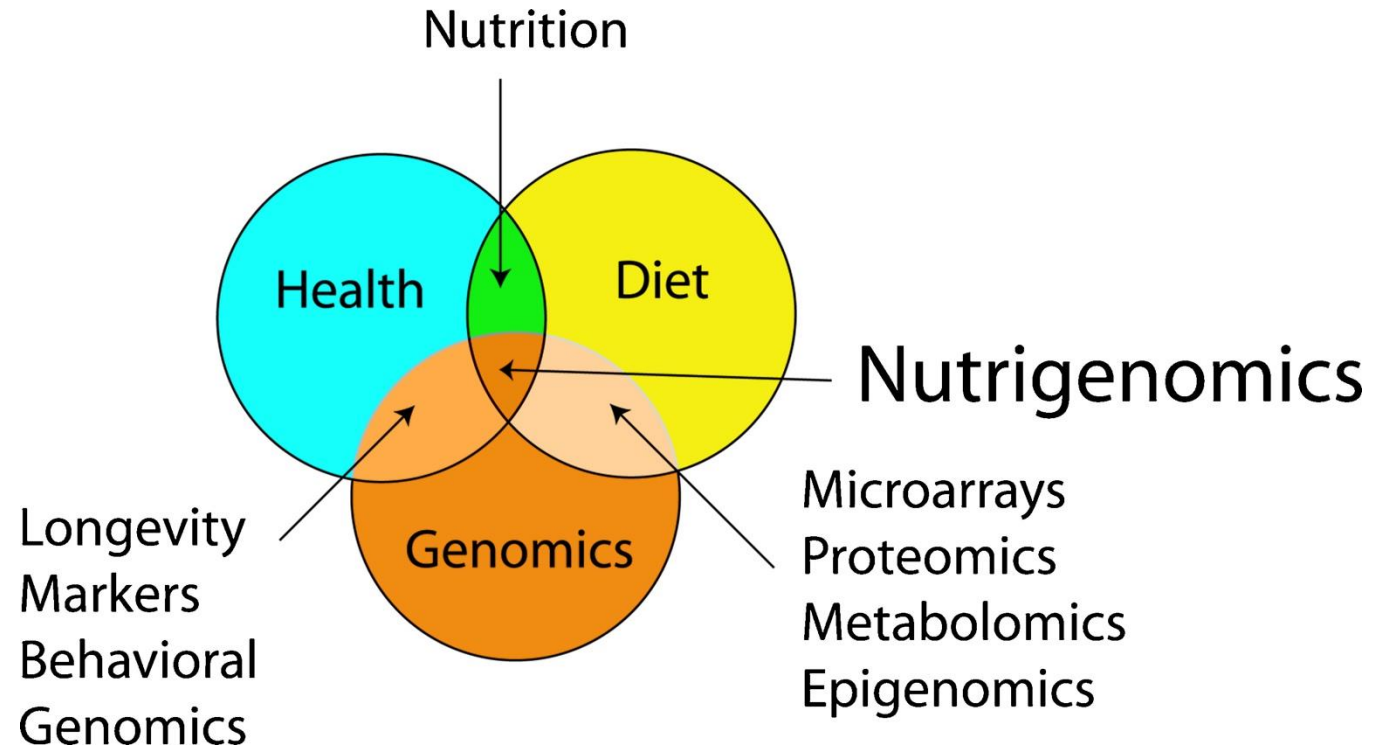
- Nutrogenomics – Nutritional genomics – Nutrigenetics – Personalized nutrition
- Η αλληλεπίδραση μεταξύ θρεπτικών ουσιών, διατροφής και της έκφρασης των γονιδίων.
- Τα γονίδια ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντολογικά ερεθίσματα;
- Ατομικό γονιδίωμα.
- Omics.....

Συνδυασμός Μοριακής διατροφής και Nutrigenomics

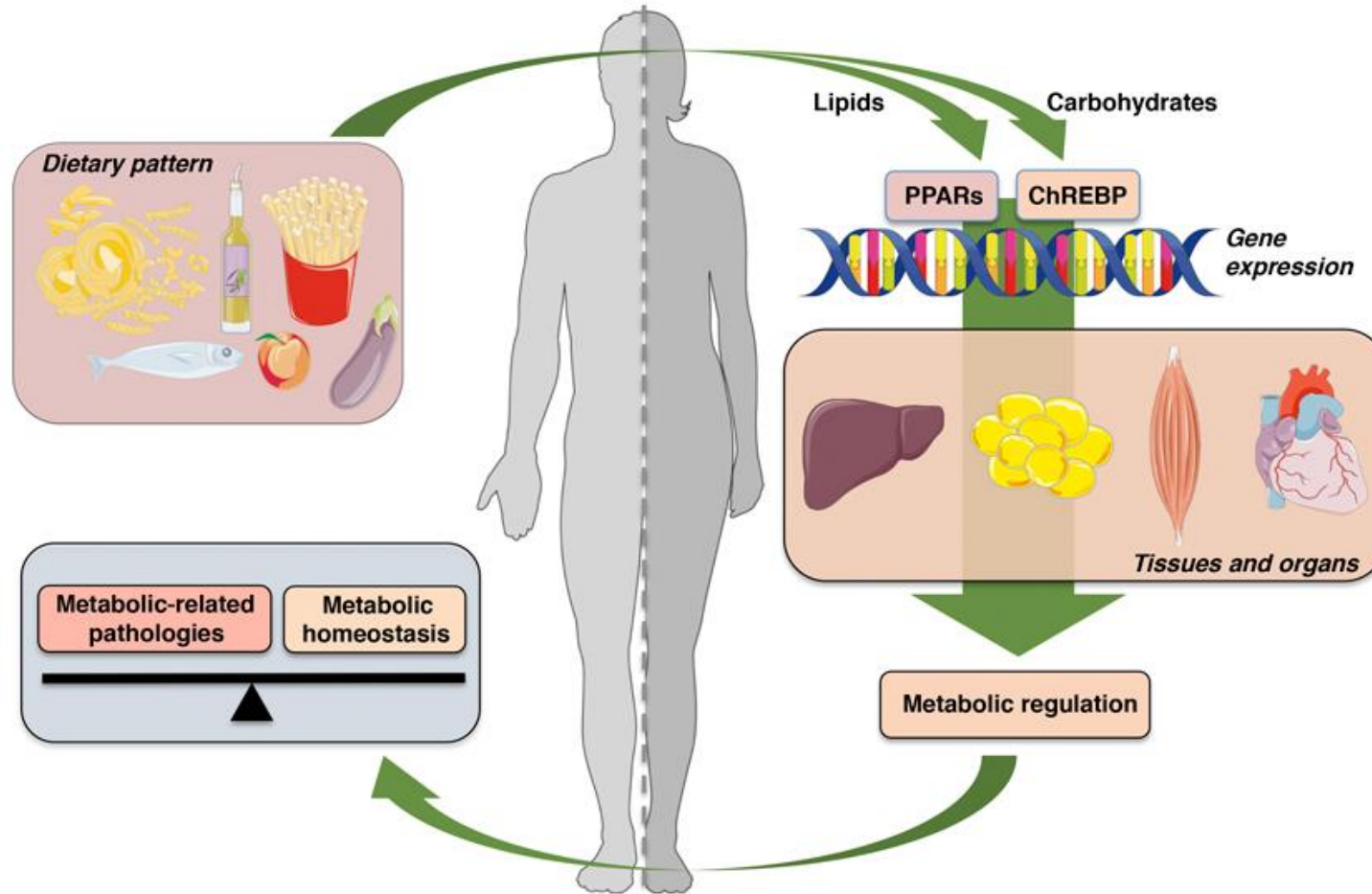


Nature Reviews | **Genetics**

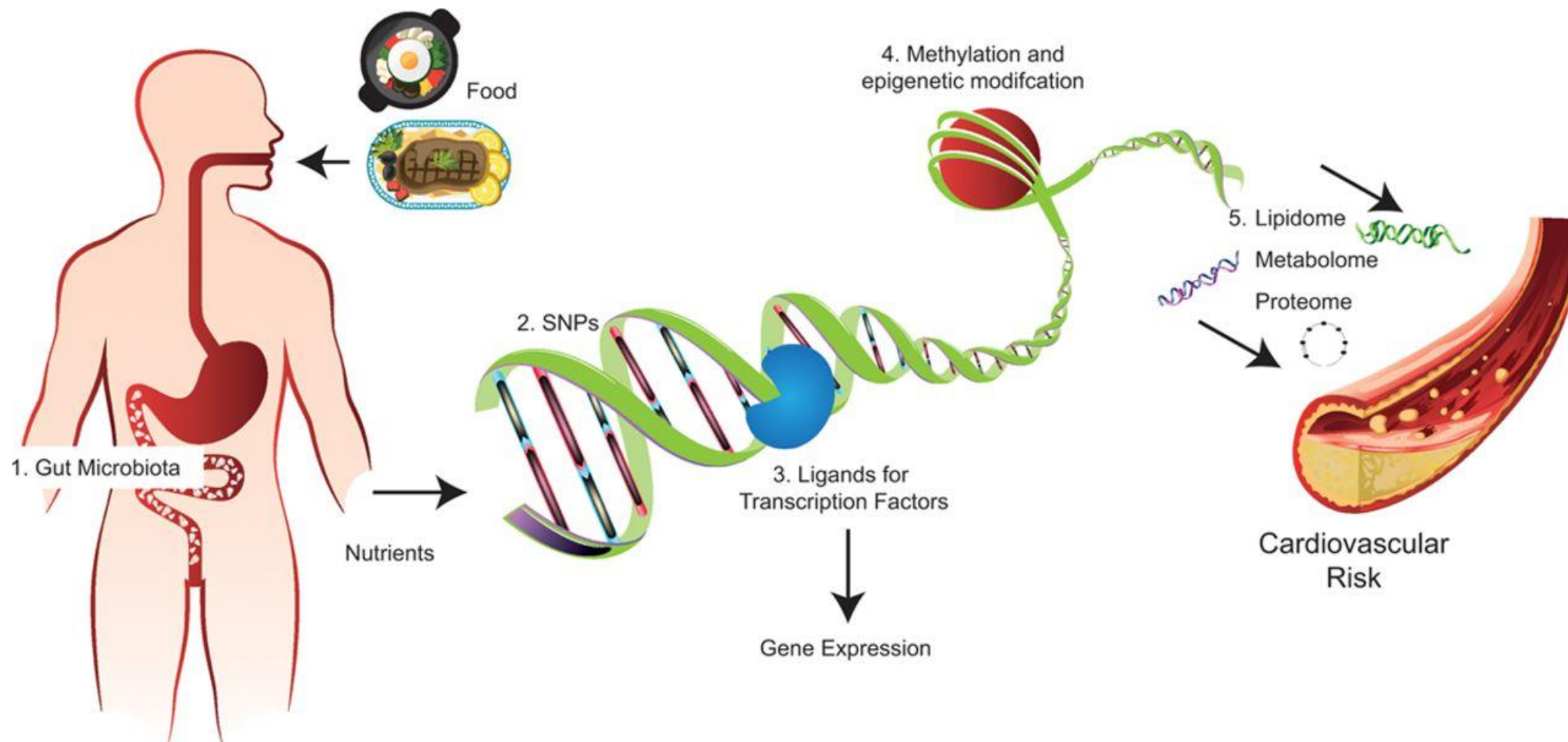
Μοριακή διατροφή



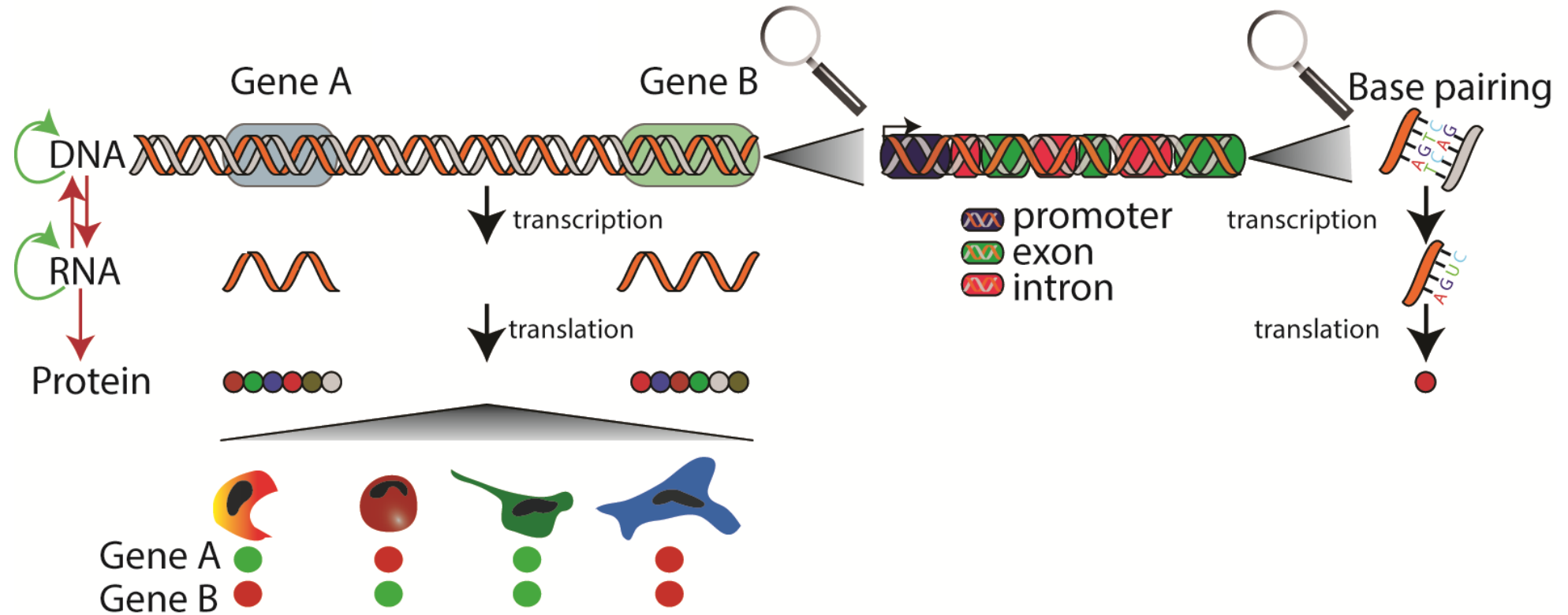
Μοριακή διατροφή



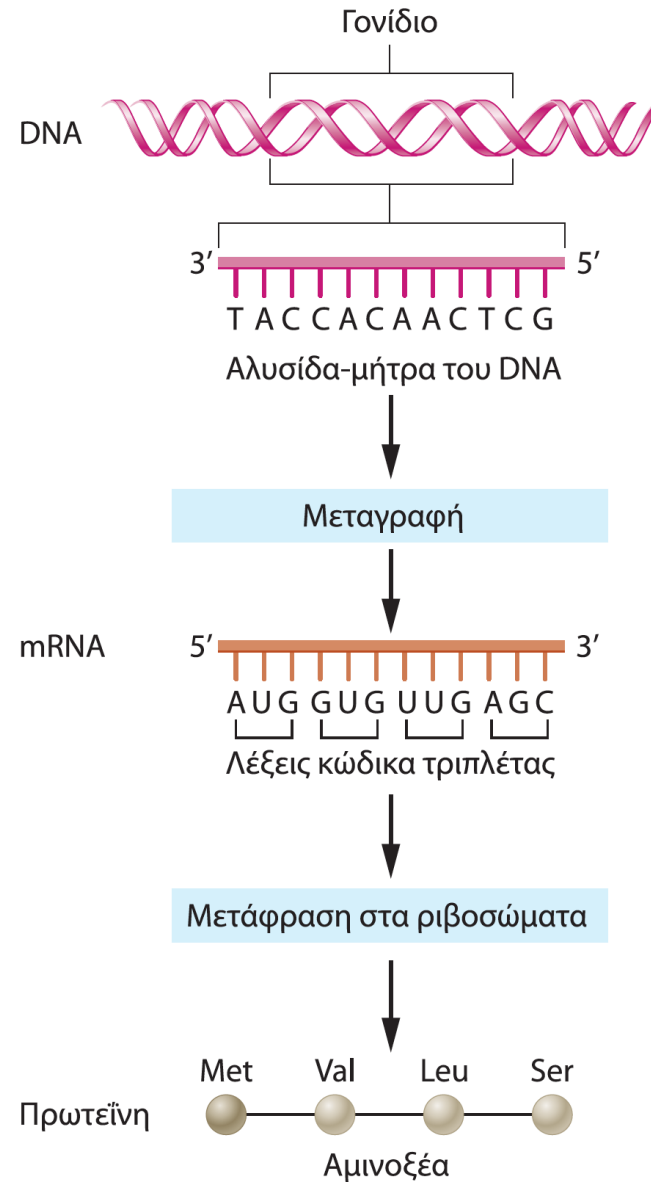
Μοριακή διατροφή



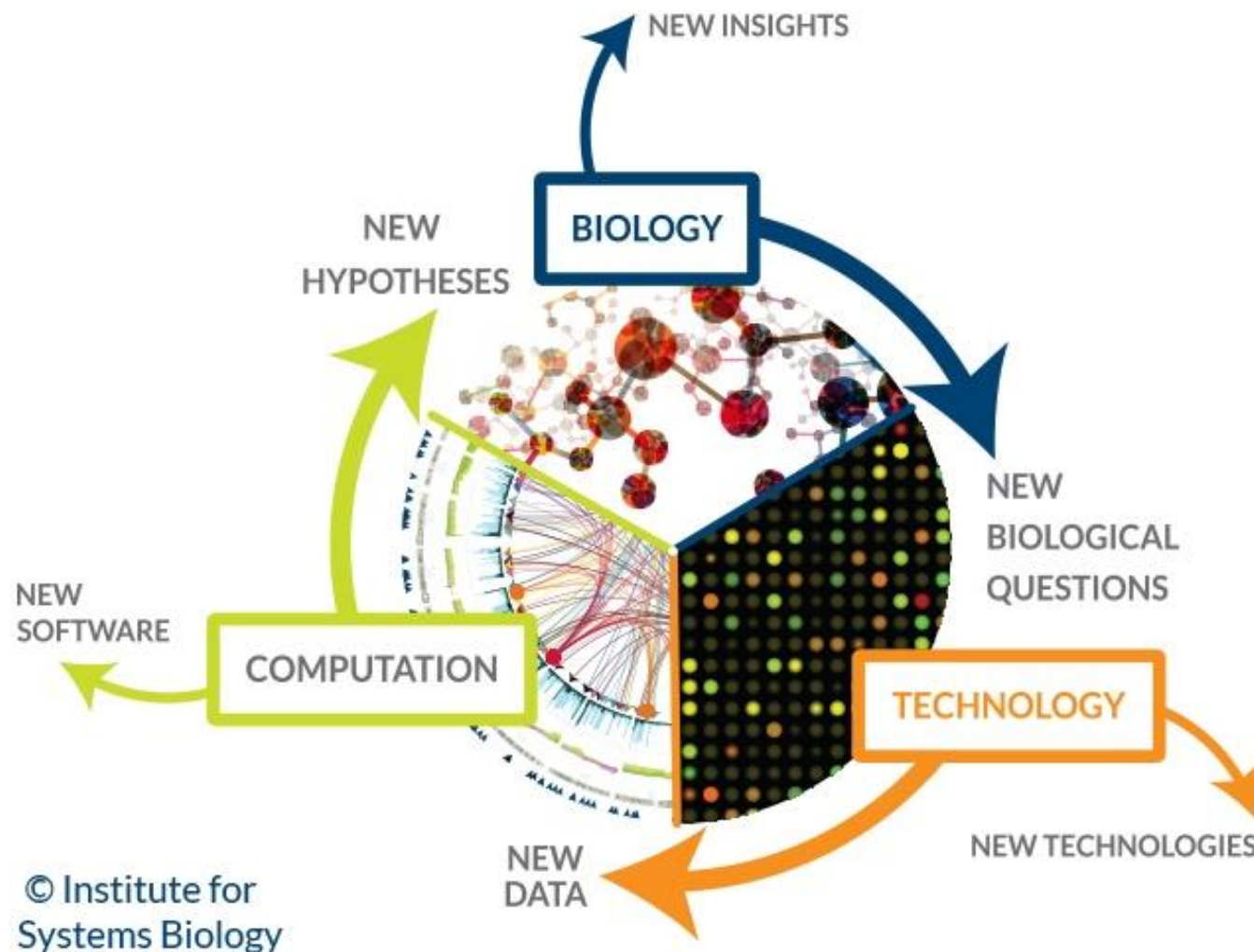
Κεντρικό δόγμα



Ροή της γενετικής πληροφορίας κατά τη γονιδιακή έκφραση



Νεοι τομείς της σύγχρονης Βιολογίας



Human genome

articles

Initial sequencing and analysis of the human genome

International Human Genome Sequencing Consortium*



nature.com/nature/volumes/409/issues/6822



SPECIAL REVIEWS

The Sequence of the Human Genome

J. Craig Venter^{1,*}, Mark D. Adams¹, Eugene W. Myers¹, Peter W. Li¹, Richard J. Mural¹, Granger G. Sutton¹, Hamilton ...

+ See all authors and affiliations

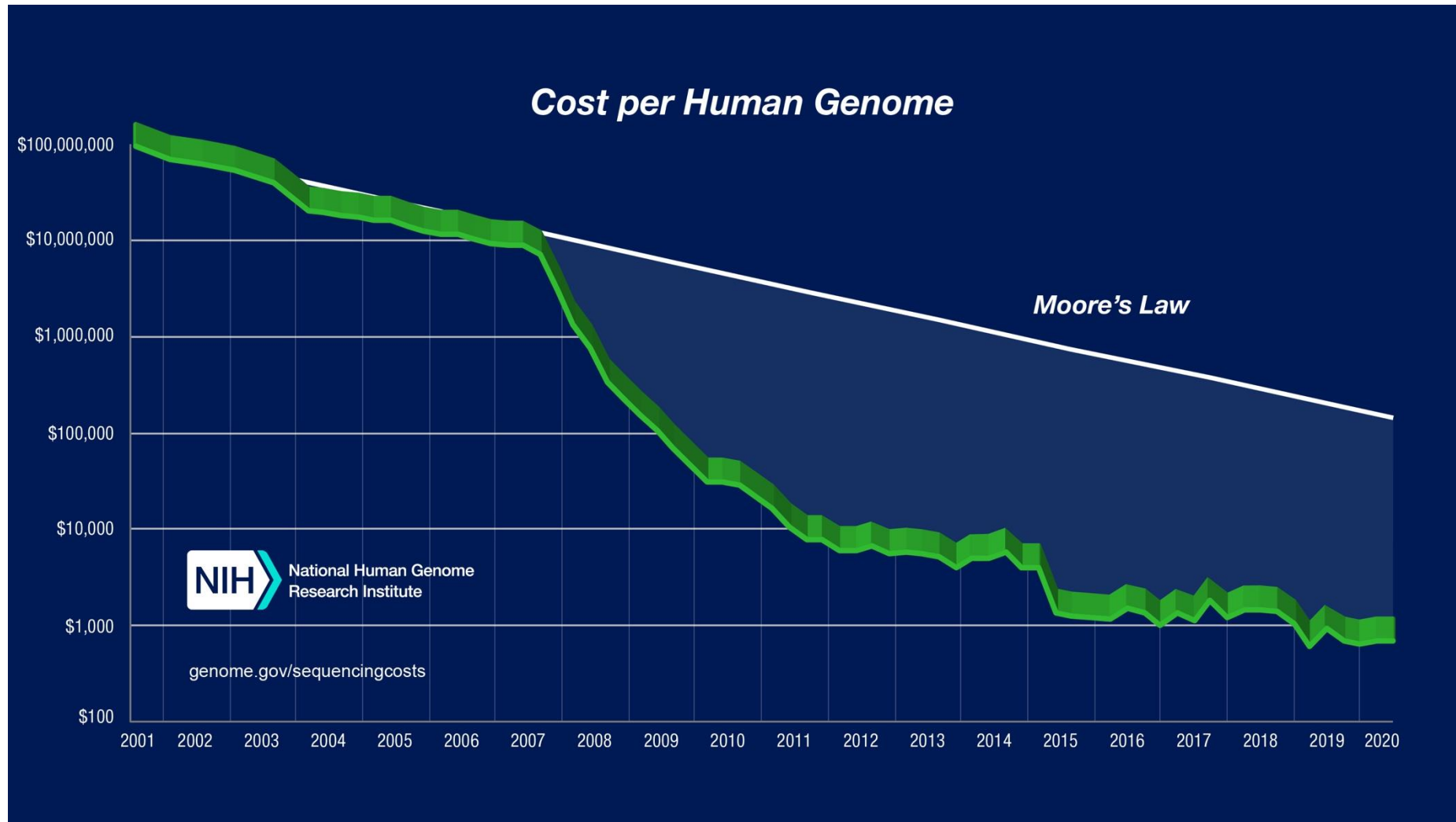
Science 16 Feb 2001:
Vol. 291, Issue 5507, pp. 1304-1351
DOI: 10.1126/science.1058040

science.sciencemag.org/content/291/5507

Lander *et al.*, 2001

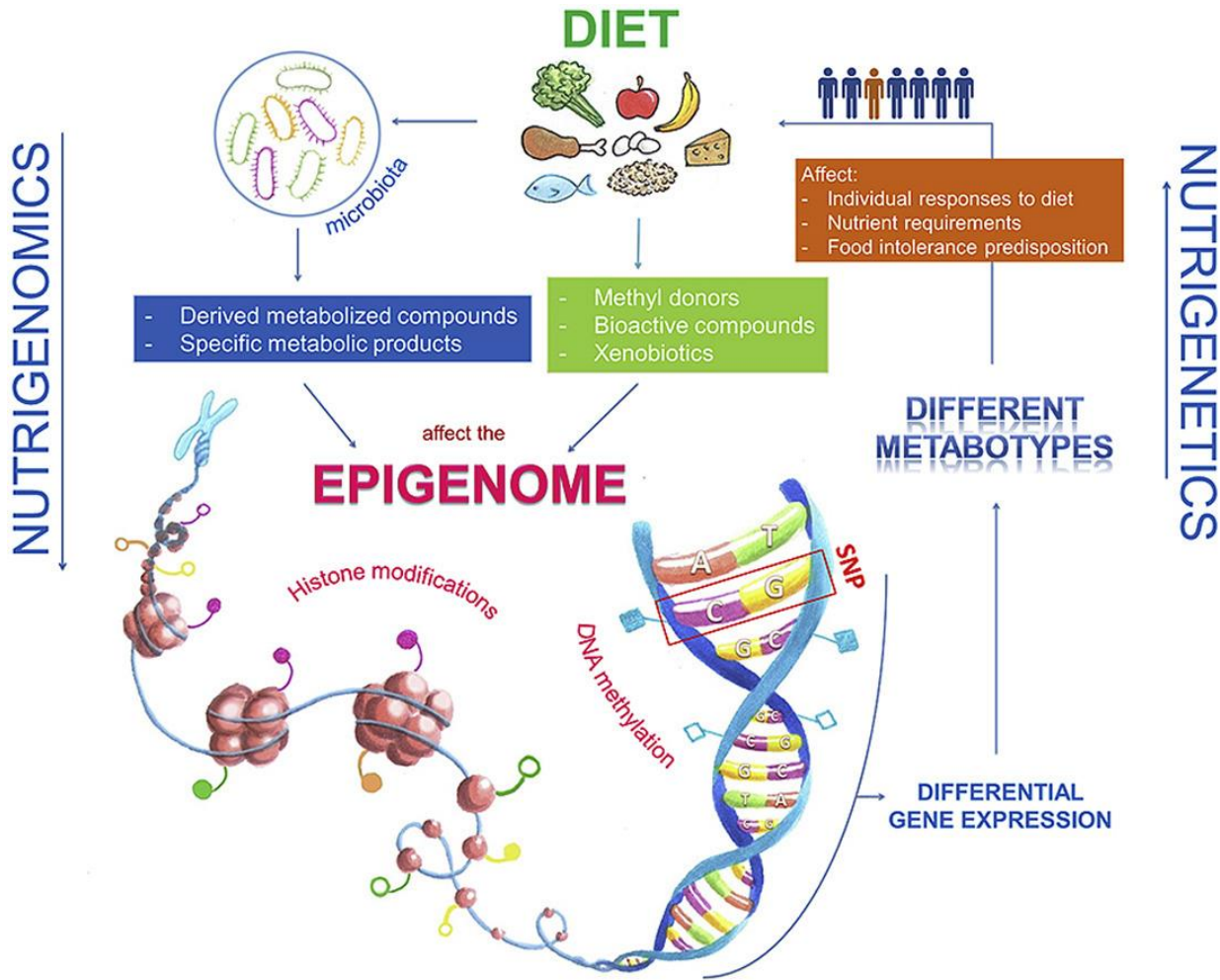
Venter *et al.*, 2001

Κόστος

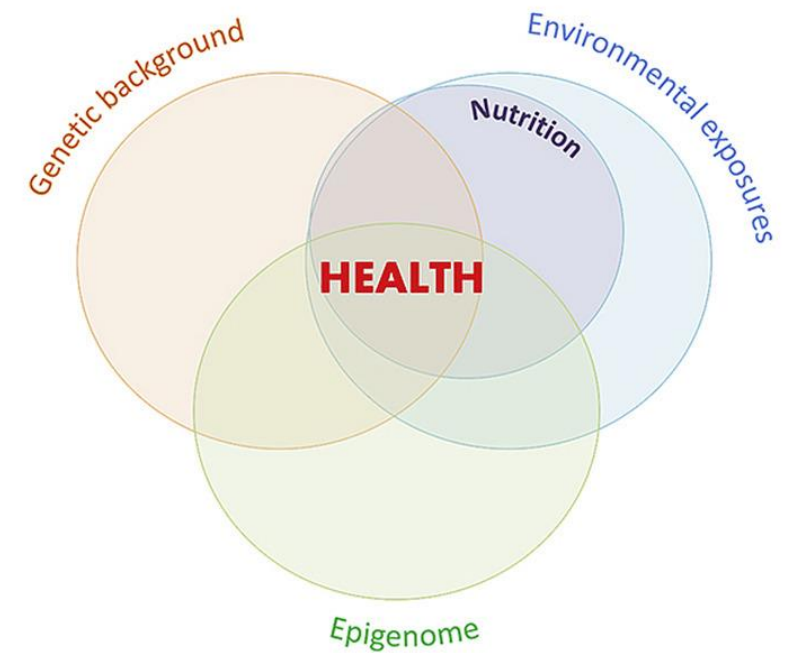


Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP)
genome.gov/sequencingcostsdata

Μοριακή διατροφή και επιγενετική



**Nutrition is as a major environmental factor
able to affect health**

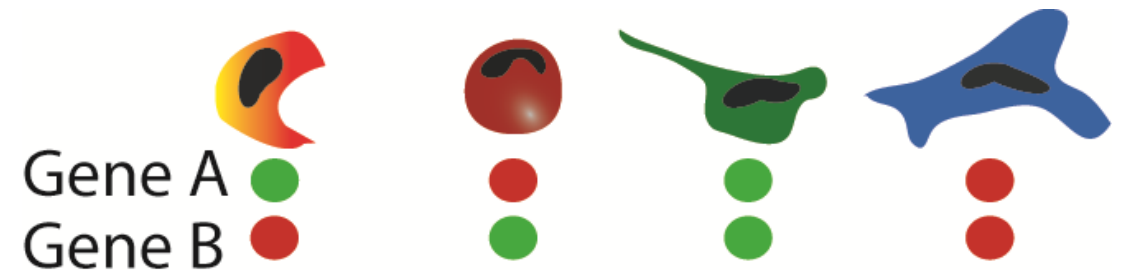


**Nutrigenetics and nutrigenomics
represent the future of personalized nutrition**

Το βιολογικό πρόβλημα

- Το γονιδίωμα ενός σύνθετου πολυκύτταρου οργανισμού, όπως του ανθρώπου, περιέχει **~22000 γονίδια** (Lander et al. 2001).
- Τα περισσότερα απ' αυτά **δεν είναι ενεργοποιημένα** σε καθέναν από τους ~200 κυτταρικούς τύπους αλλά, αντίθετα **εκφράζονται σε διαφορετικό χρονικά σημεία και με διαφορετική ένταση ανάλογα με το είδος της λειτουργίας που επιτελείται από το κάθε κύτταρο** (Luk et al. 2010).

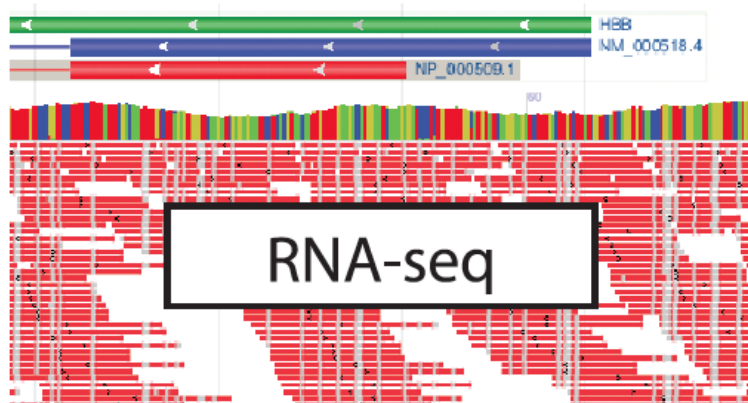
	Human	Mouse
Assembly	GRCh38.p2	GRCm38.p3
Base pairs (bp)	3.221×10^9	2.8×10^9
Coding	20300	22543
Non-coding genes	25159	12420



Μέθοδοι για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης

Αλληλούχιση RNA (RNA Sequencing)

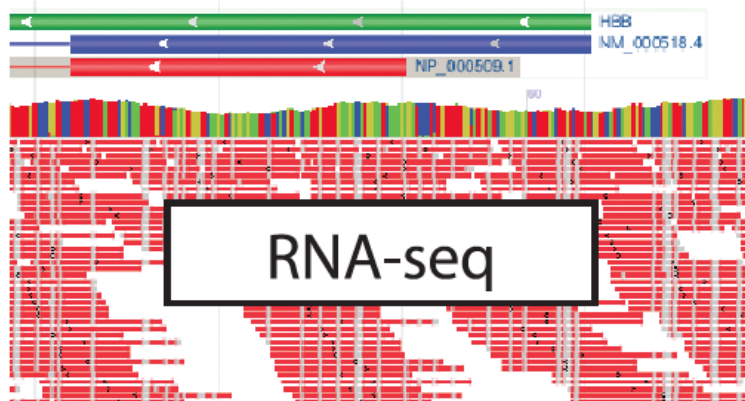
- ✓ Η υψηλή ζήτηση για αλληλούχιση χαμηλού κόστους έχει οδηγήσει την τελευταία δεκαετία στην ανάπτυξη της **αλληλούχισης υψηλής απόδοσης** (ή **αλληλούχισης επόμενης γενιάς**, next generation sequencing, **NGS**).
- ✓ Η **επεκτασιμότητα**, η **ταχύτητα** αλλά κυρίως η **σχέση κόστους-απόδοσης** των NGS εφαρμογών επιτρέπουν στους ερευνητές να μελετήσουν τα βιολογικά συστήματα σε επίπεδο που δεν ήταν δυνατό μέχρι πρότινος.
- ✓ Η NGS ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης γίνεται με τη μαζική αλληλούχιση mRNA που αρχικά απομονώνεται από το δείγμα και στη συνέχεια μετατρέπεται σε cDNA όπως στην περίπτωση των μικροσυστοιχιών.



Μέθοδοι για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης

Αλληλούχιση RNA (RNA Sequencing)

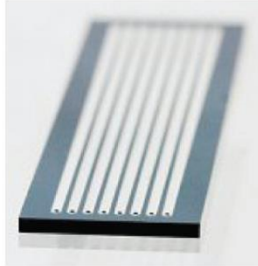
- ✓ Αρχικά το cDNA δείγμα υπόκειται σε ένα στάδιο κλασμάτωσης πριν την αλληλούχιση καθώς οι υπάρχουσες τεχνολογίες, στη συντριπτική τους πλειοψηφία, αποδίδουν αξιόπιστα αποτελέσματα για αλληλουχίες όχι μεγαλύτερες από 300-500 βάσεις.
- ✓ Στη συνέχεια και ανάλογα με την τεχνολογία που εφαρμόζεται, το cDNA ενισχύεται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (η οποία μπορεί να διενεργηθεί με διαφορετικούς τρόπους) και αλληλουχείται μαζικά συνήθως “μέσω σύνθεσης”. Αυτό σημαίνει ότι νέοι κλώνοι cDNA συντίθενται πάνω στο εκμαγείο των κλώνων του δείγματος και η διαδικασία της σύνθεσης καταγράφεται νουκλεοτίδιο-νουκλεοτίδιο (Wang, Gerstein, and Snyder 2009).



Αλληλούχιση επόμενης γενιάς

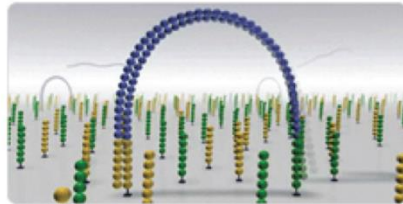
Το γονιδιωματικό DNA κόβεται σε τυχαίες θέσεις

Παρασκευή βιβλιοθήκης



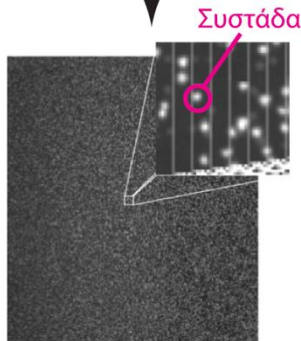
Μονόκλωνες αλυσίδες του DNA της βιβλιοθήκης ακινητοποιούνται στην επιφάνεια των οκτώ καναλιών ροής του κελιού ροής

Πολλαπλασιασμός σε στερεή φάση



Με πολλαπλασιασμό μέσω γέφυρας δημιουργούνται συστάδες αντιγράφων της ίδιας αλυσίδας (~δέκα εκατομμύρια συστάδες ανά τετραγωνικό χιλιοστό)

Αλληλούχιση μέσω σύνθεσης



- Σε κάθε κύκλο προστίθενται DNA πολυμεράση, ένας εκκινητής και οι τέσσερις αναστρέψιμοι τερματιστές, ο καθένας σημασμένος με ένα διαφορετικό φθοροφόρο
- Ανίχνευση του φθορισμού
- Ταυτοποίηση των νουκλεοτιδίων
- Άρση της παρεμπόδισης της επιμήκυνσης των υπό σύνθεση αλυσίδων

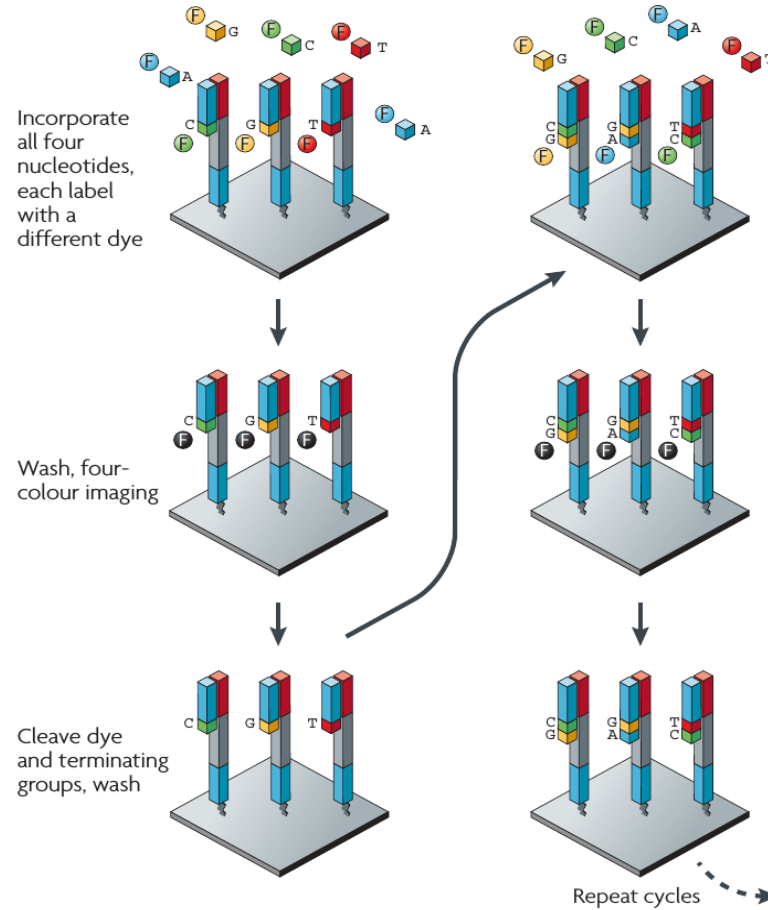
Αλληλούχιση με την τεχνολογία της Illumina.

Το γονιδιωματικό DNA κόβεται σε τυχαίες θέσεις και στα άκρα του συνδέονται δίκλωνοι προσαρμογείς ώστε να δημιουργηθεί μια βιβλιοθήκη τμημάτων DNA.

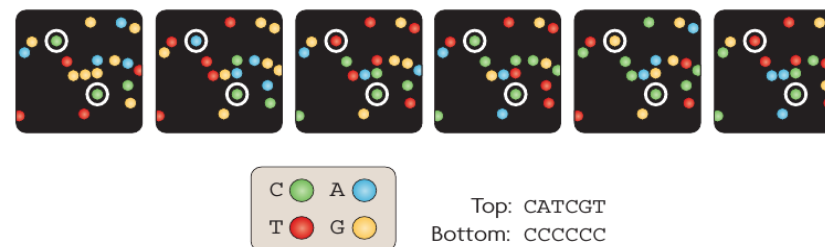
Κατόπιν, μονόκλωνες αλυσίδες του DNA της βιβλιοθήκης ακινητοποιούνται στην επιφάνεια των οκτώ καναλιών ροής ενός πλακιδίου που ονομάζεται κελί ροής (flow cell). Ακολουθεί πολλαπλασιασμός τους σε στερεή φάση (κατά τον οποίο σχηματίζουν «γέφυρες» σχήματος $\cap$), με αποτέλεσμα τη δημιουργία συστάδων, καθεμία από τις οποίες περιέχει εκατοντάδες αντίγραφα της ίδιας αλυσίδας DNA.

Αλληλούχιση επόμενης γενιάς

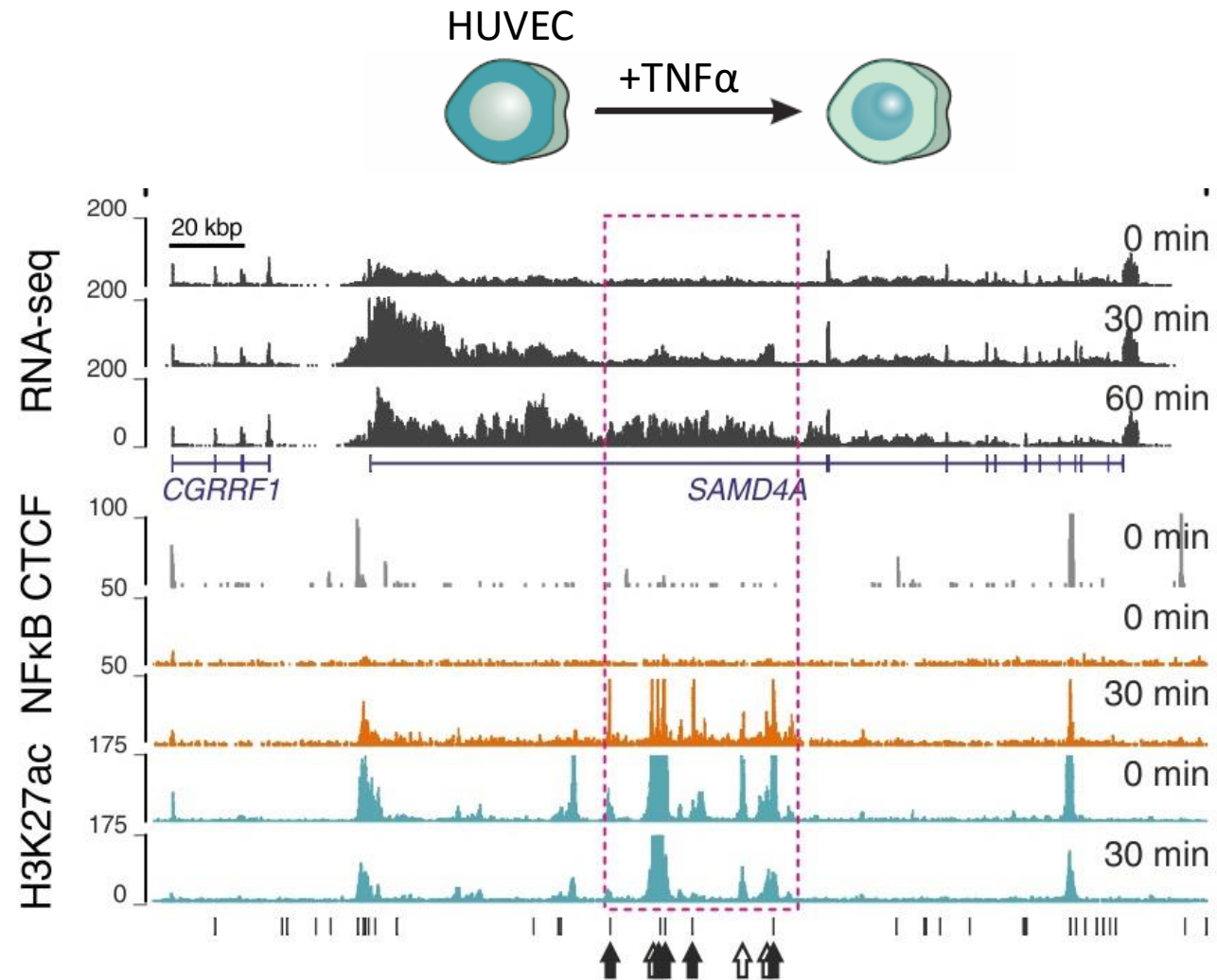
a Illumina/Solexa — Reversible terminators



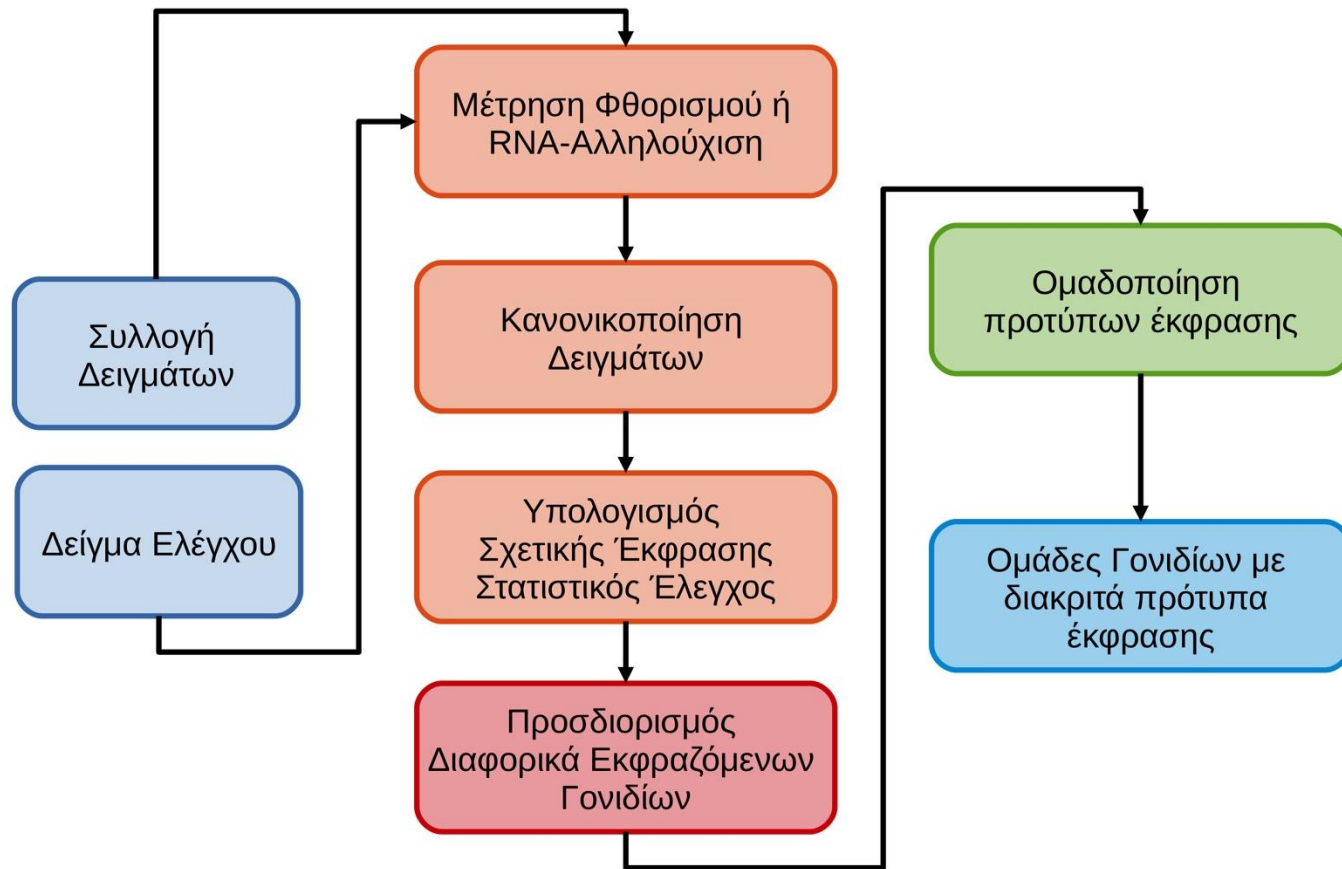
b



Παράδειγμα RNA-seq



Στάδια ανάλυσης ενός πειράματος γονιδιακής έκφρασης



Εικόνα 7.2: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων ενός πειράματος γονιδιακής έκφρασης από την αποκομιδή των πρωτογενών δεδομένων ως τη δημιουργία ομάδων γονιδίων με χαρακτηριστικά πρότυπα έκφρασης.

Αλληλούχιση RNA (RNA Sequencing)

Τα στάδια της ανάλυσης περιλαμβάνουν:

- την απομόνωση του mRNA
- την ποσοτικοποίηση του mRNA
- τον προσδιορισμό των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων
- την ομαδοποίηση γονιδίων ανάλογα με τα πρότυπα έκφρασής τους

Διαφορική έκφραση γονιδίων

Gene	Normal1	Normal2	Normal3	Normal4	Mean (Normal)	Arthritic1	Arthritic2	Arthritic3	Arthritic 4	Mean (Arthritic)	Log (Arthritic/Normal)	P-value
Vcam	4.984	3.831	4.325	3.564	4.176	2.027	2.805	2.933	2.260	2.506	-0.737	0.005
Vegfa	8.773	6.616	8.199	6.134	7.431	4.325	6.308	6.769	5.372	5.694	-0.384	0.081
Akt	0.999	1.000	1.001	1.000	1.000	1.000	1.000	1.435	0.999	1.109	0.149	0.357
Myc	3.592	2.679	2.629	2.204	2.776	2.716	4.639	7.004	5.217	4.894	0.818	0.063
Hif1a	0.796	0.642	1.862	1.691	1.248	1.283	1.344	1.000	1.090	1.179	-0.081	0.837

Ο υπολογισμός του βαθμού της μεταβολής της έκφρασης του ίδιου γονιδίου μεταξύ δύο διαφορετικών συνθηκών γίνεται με τη χρήση του λογαρίθμου του λόγου των τιμών έκφρασης στη συνθήκη μελέτης (test) προς τη συνθήκη ελέγχου (control).

$$\log_2 FC(g) = \log_2 \frac{E(g)_{test}}{E(g)_{control}}$$

Τι σημαίνει $\log_2 FC = 1$ και $\log_2 FC = -1$

Στατιστική ανάλυση



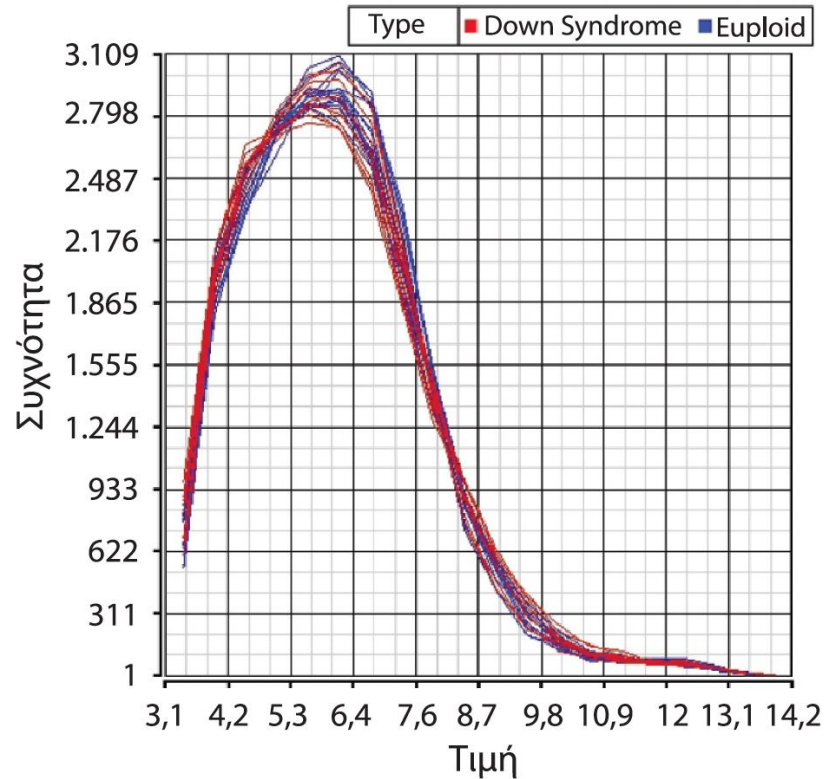
Εικόνα 7.5: Διάγραμμα “κρατήρα ηφαιστείου”, (volcano plot) από ένα πείραμα μέτρησης διαφορικής γονιδιακής έκφρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο με τη θέση στον οριζόντιο άξονα να αντιστοιχεί στο δυαδικό λογάριθμο του λόγου διαφορικής έκφρασης και τη θέση στον κάθετο άξονα να αντιστοιχεί στον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο της τιμής p-value. Με πράσινο και κόκκινο φαίνονται τα στατιστικά σημαντικά υπο- και υπερ-εκφραζόμενα γονίδια (για τιμές κατωφλίων $|\log_2FC| \geq 1.5$ και $p\text{-value} \leq 0.05$).

Τα γονίδια με $\log_2FC > 1.5$ ή $\log_2FC < -1.5$ που ταυτόχρονα έχουν $p\text{-value} \leq 0.05$ προσδιορίζονται ως ενεργοποιημένα και κατεσταλμένα αντίστοιχα.

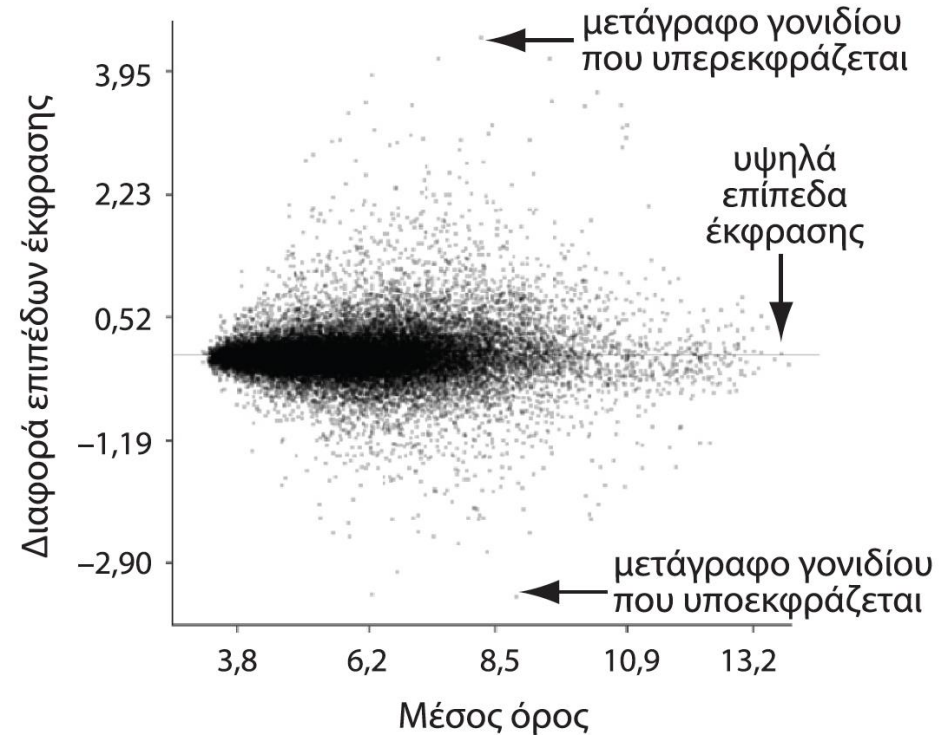
Ονομάζουμε αυτά τα γονίδια **διαφορικά εκφραζόμενα** (differentially expressed genes, DEG).

Στατιστική ανάλυση

(γ) Ιστόγραμμα τιμών έντασης

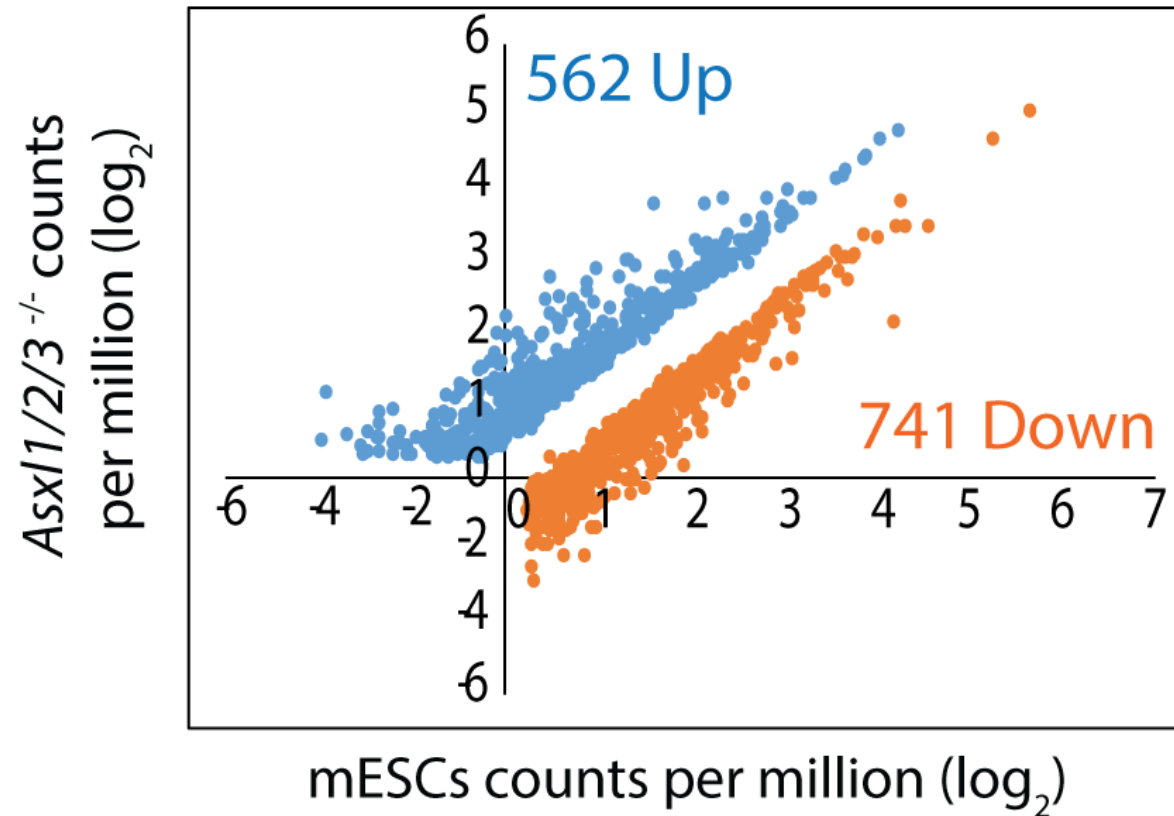


(δ) Γράφημα MA

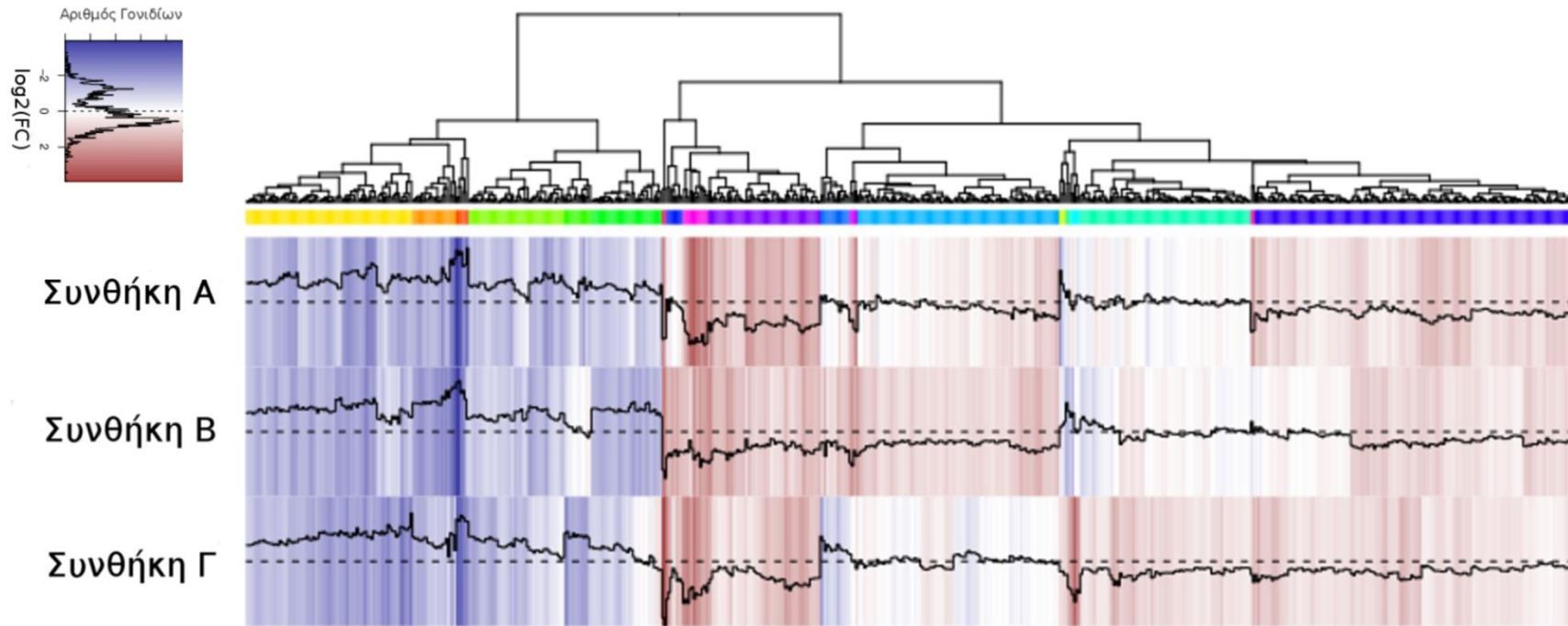


Εικόνα 11.9 Γραφικές παραστάσεις δεδομένων ελέγχου ποιότητας στο Partek. (γ) Στο ιστόγραμμα των τιμών έντασης είναι επίσης δυνατόν να εντοπιστούν δεδομένα με ακραίες τιμές. (δ) Το διάγραμμα MA δείχνει τις μέσες τιμές των λογαριθμοποιημένων (με $\log_2$) τιμών έντασης (άξονας x) και τον βαθμό μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης (άξονας y).

Διαφορική έκφραση γονιδίων και στατιστική ανάλυση

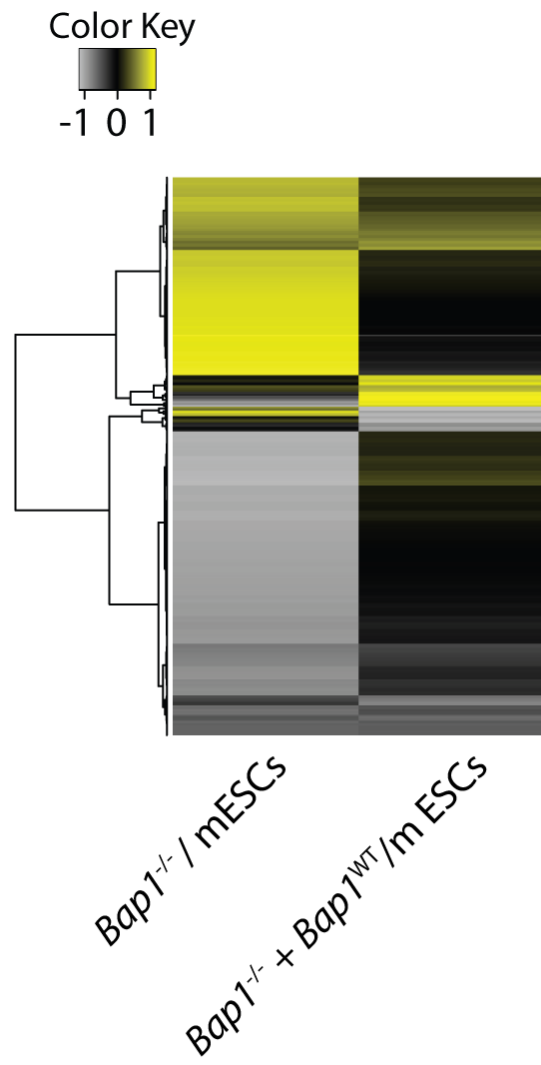


Ανάλυση γονιδίων με κοινά χαρακτηριστικά πρότυπα έκφρασης



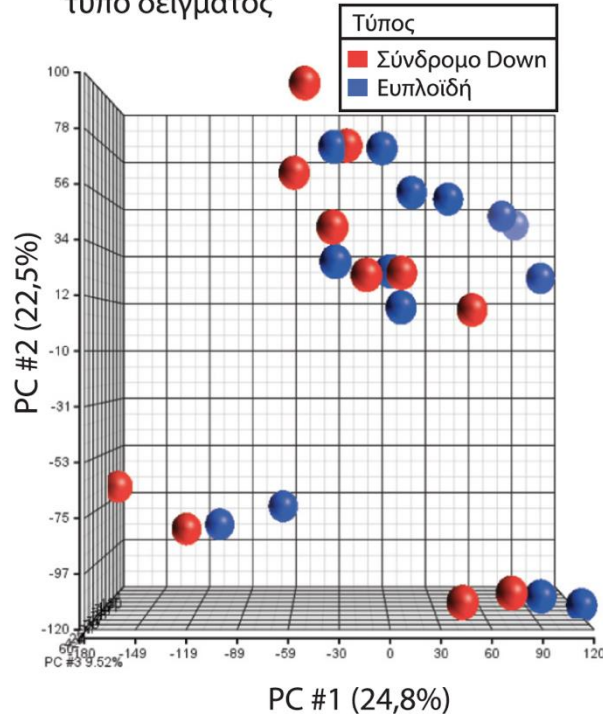
Εικόνα 7.6: Θερμικός χάρτης που αναπαριστά τις σχετικές τιμές έκφρασης 650 γονιδίων όπως αυτές μετρήθηκαν σε τρεις διαφορετικές συνθήκες (Α, Β και Γ). Το γαλάζιο αντιστοιχεί σε χαμηλότερη και το κόκκινο σε υψηλότερη έκφραση σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου, καθώς στο θερμικό χάρτη εμφανίζονται μόνο σχετικές τιμές έκφρασης. Ο χάρτης συνοδεύεται από ιεραρχική ομαδοποίηση (βλ. Παρακάτω) των γονιδίων με βάση τα πρότυπα έκφρασής τους στις τρεις συνθήκες. Γονίδια που βρίσκονται στον ίδιο κλάδο του δέντρου εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοιότητα σε ό,τι αφορά την αυξομείωση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των συνθηκών.

Heatmap

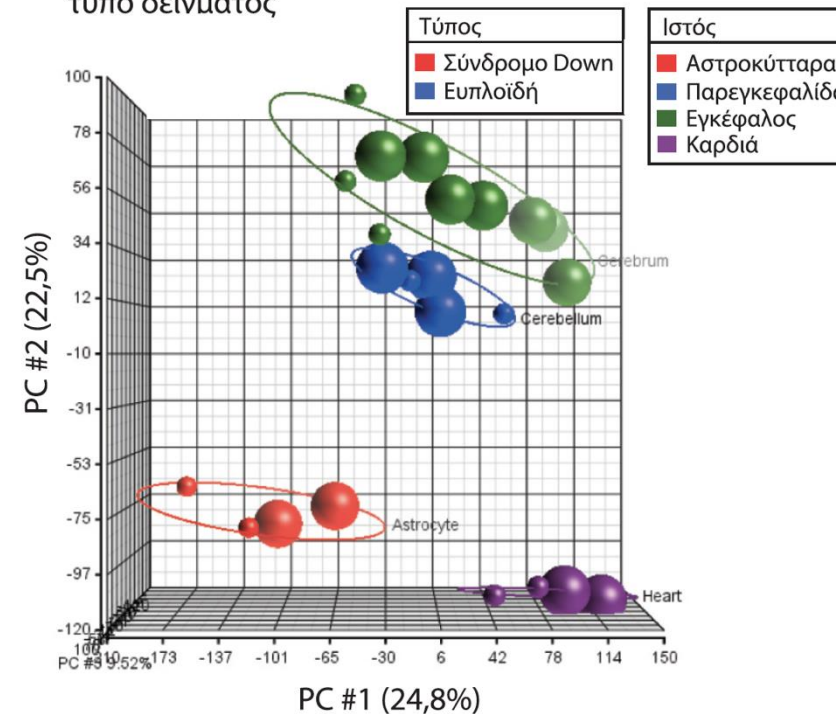


Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

(α) PCA των 25 δειγμάτων σύμφωνα με τον τύπο δείγματος



(β) PCA σύμφωνα με τον τύπο ιστού και τον τύπο δείγματος



Εικόνα 11.10 Γραφικές παραστάσεις ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA). (α) Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα δείγμα με >20.000 τιμές γονιδιακής έκφρασης. Η μέθοδος είναι μη επιβλεπόμενη, δηλαδή τα 25 σημεία δεδομένων (ένα ανά δείγμα) τοποθετούνται στον χώρο PCA αποκλειστικά με βάση τον μετασχηματισμό του αρχικού πίνακα δεδομένων. Προφανώς δεν είναι δυνατόν να γίνει σαφής διάκριση των δειγμάτων με βάση τον καρυότυπο (τύπος με σύνδρομο Down έναντι ευπλοϊδών). (β) Το ίδιο διάγραμμα PCA με αυτό στο (α), αλλά εδώ περιλαμβάνεται υπομνηματισμός σύμφωνα με την ιστολογική προέλευση των δειγμάτων. Είναι προφανής η διάκριση των δειγμάτων από 4 διαφορετικές ιστολογικές προελεύσεις (καρδιά, αστροκύτταρα και δύο περιοχές του εγκεφάλου).



Μοριακά Ψαλίδια (CRISPR-Cas9)



A Nobel Prize for genetic scissors (2021). Nat Mater 20, 1.
www.nature.com/articles/s41563-020-00895-z#citeas
Credit: ElenaBs / Alamy Stock Vector

Μοριακά Ψαλίδια (CRISPR-Cas9)



Jennifer Doudna και Emmanuelle Charpentier
Nobel Χημείας 2020

Μοριακά Ψαλίδια (CRISPR-Cas9)

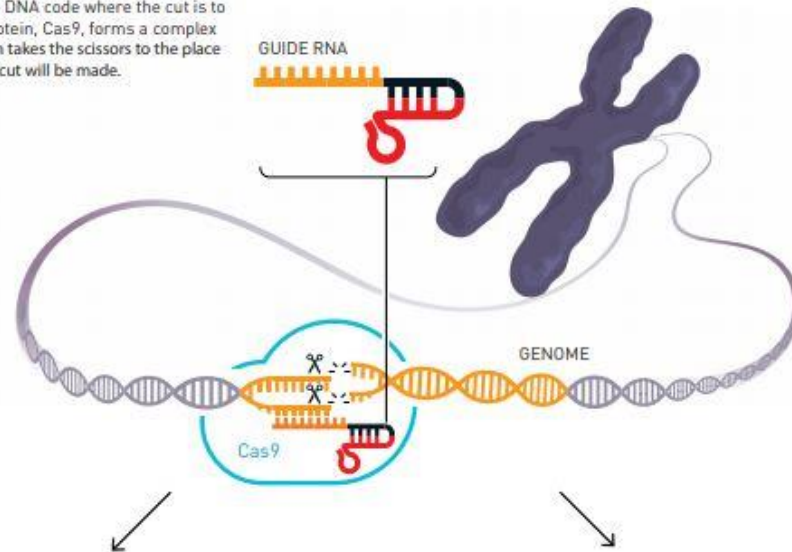


nature.com/nature/volumes/507/issues/7490
Volume 507 Issue 7490, 6 March 2014

Μοριακά Ψαλίδια (CRISPR-Cas9)

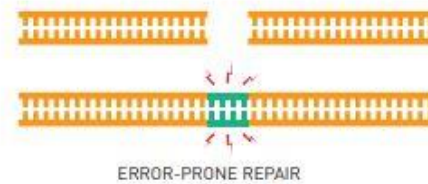
The CRISPR/Cas9 genetic scissors

When researchers are going to edit a genome using the genetic scissors, they artificially construct a guide RNA, which matches the DNA code where the cut is to be made. The scissor protein, Cas9, forms a complex with the guide RNA, which takes the scissors to the place in the genome where the cut will be made.



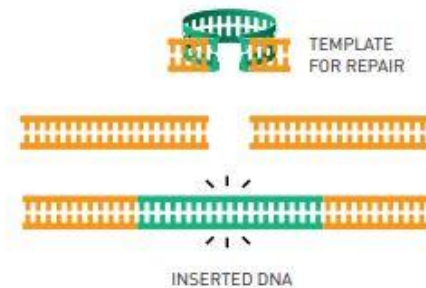
A

Researchers can allow the cell itself to repair the cut in the DNA. In most cases, this leads to the gene's function being turned off.

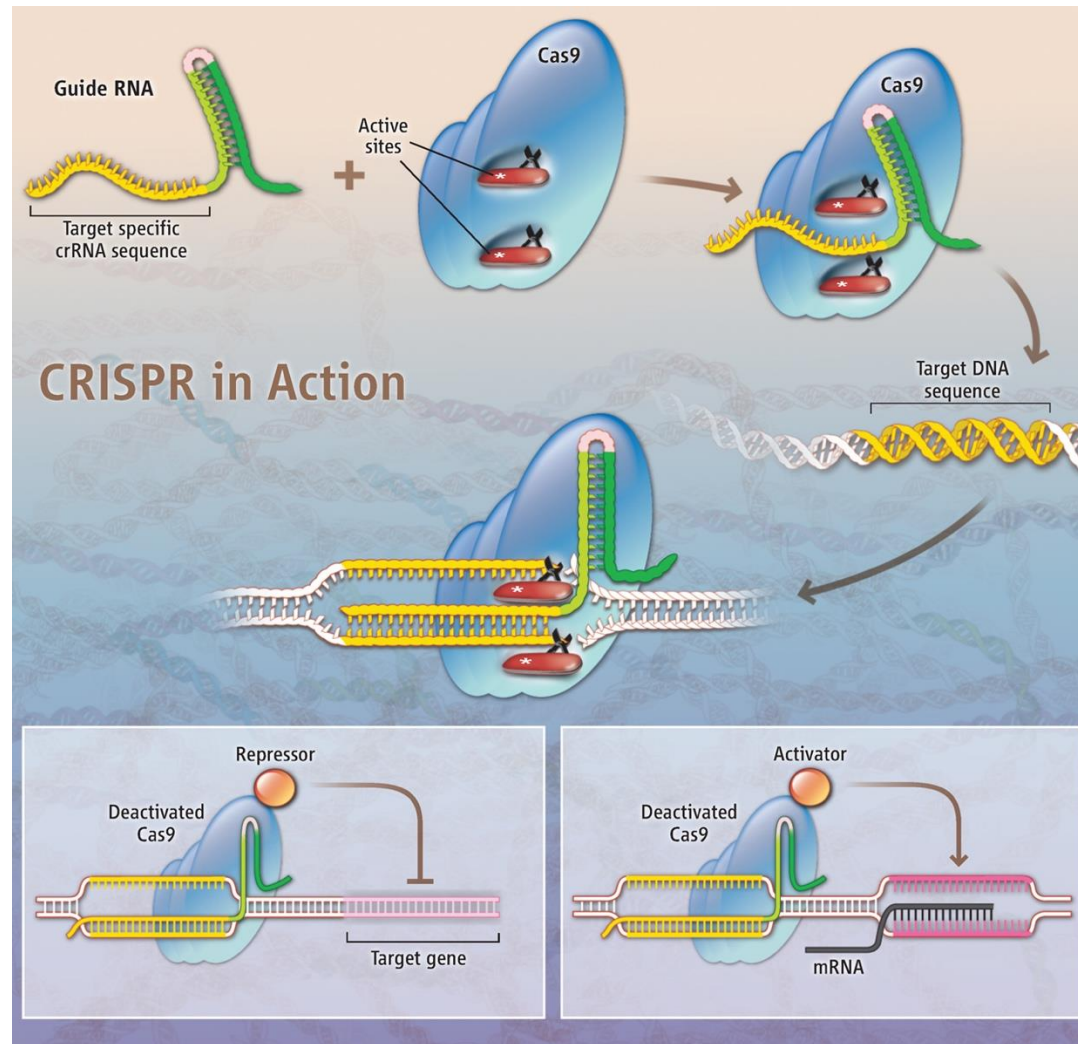


B

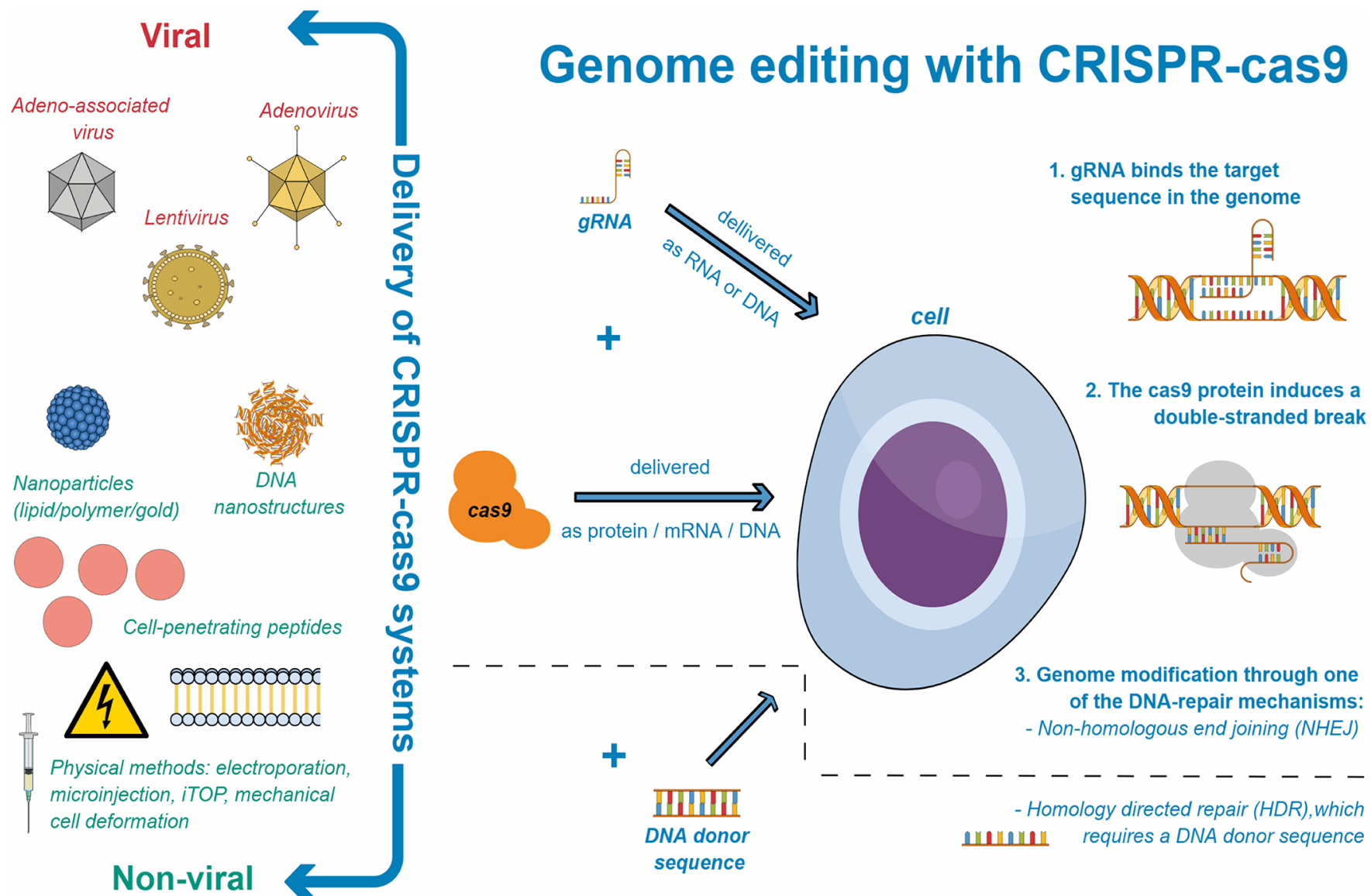
If the researchers want to insert, repair or edit a gene, they can specially design a small DNA template for this. The cell will use the template when it repairs the cut in the genome, so the code in the genome is changed.



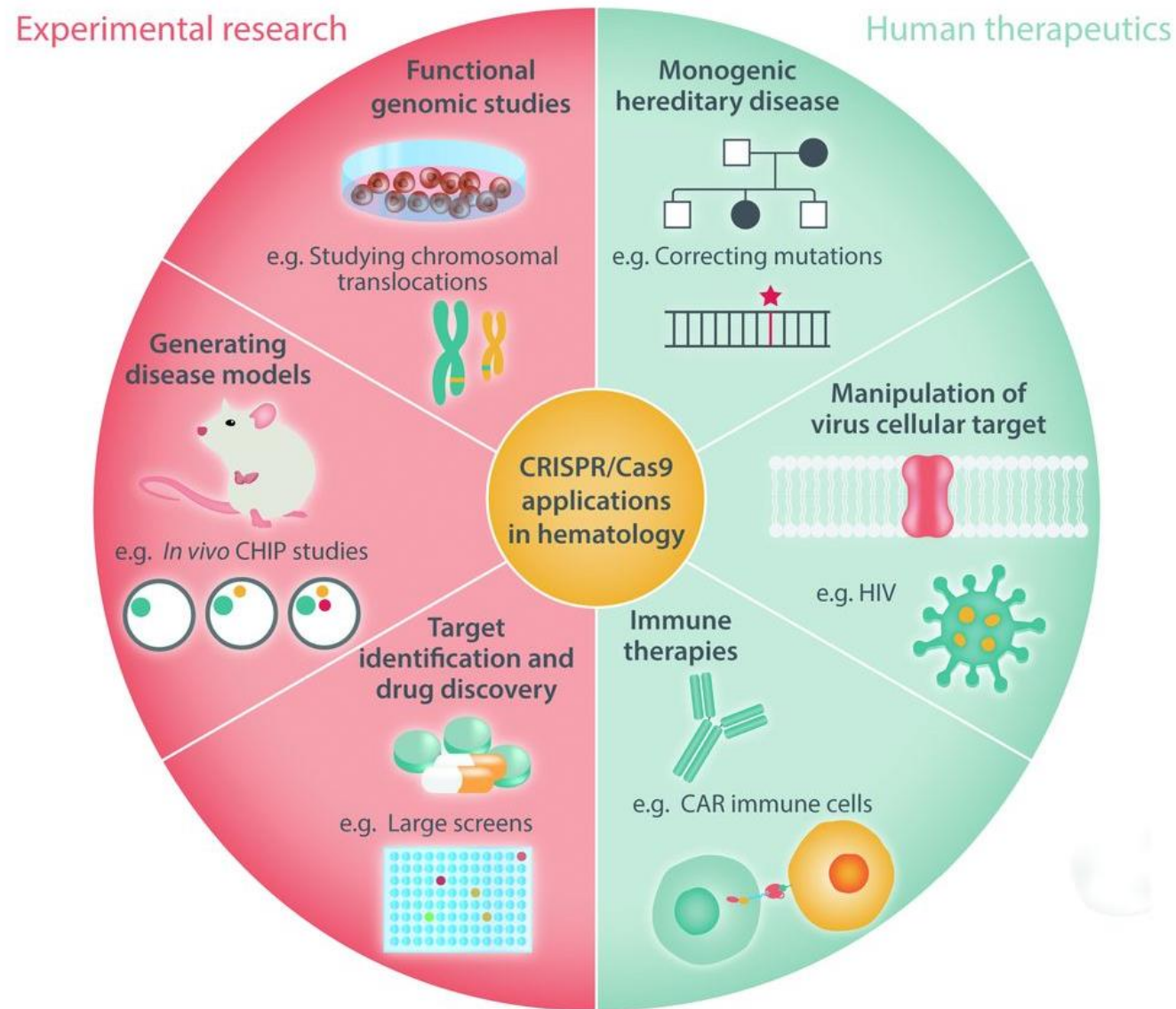
Μοριακά Ψαλίδια (CRISPR-Cas9)



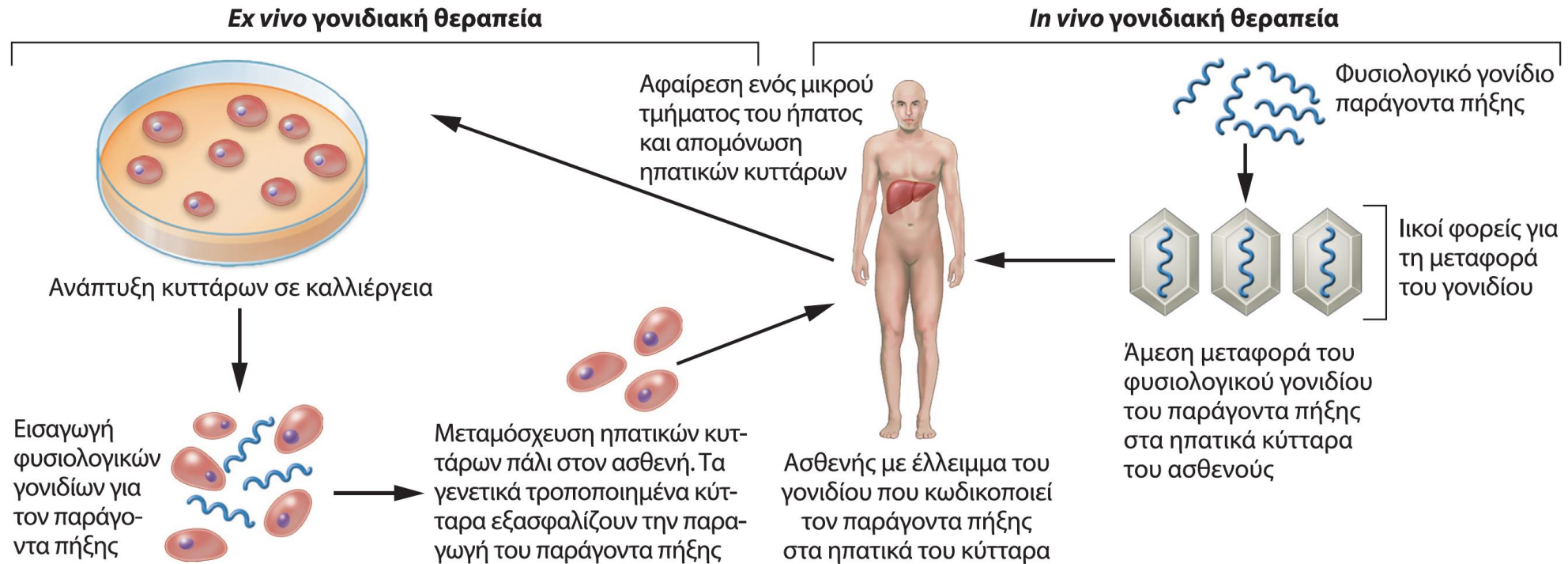
Μοριακά Ψαλίδια (CRISPR-Cas9) και θεραπεία



Μοριακά Ψαλίδια (CRISPR-Cas9) και Θεραπεία



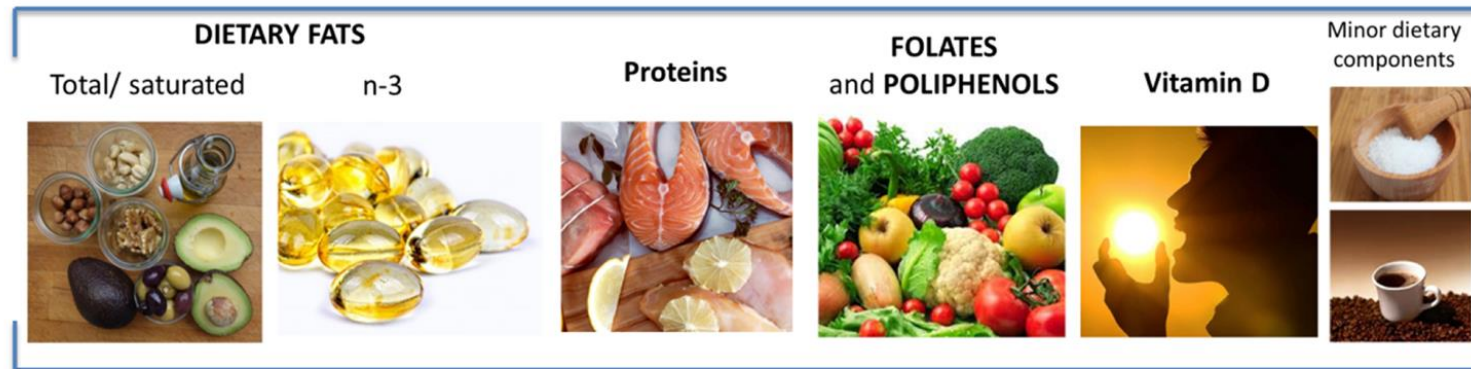
Ex vivo και in vivo γονιδιακή θεραπεία



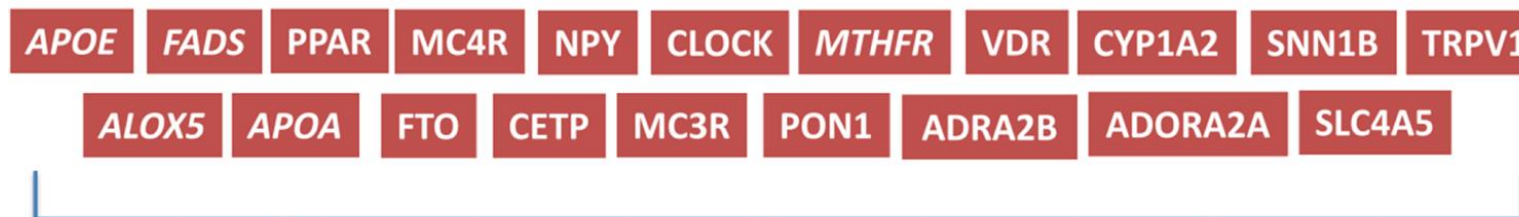
Η *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει την απομόνωση κυττάρων από τον ασθενή, την εισαγωγή φυσιολογικών αντιγράφων ενός θεραπευτικού γονιδίου σε αυτά (που κωδικοποιεί έναν παράγοντα πήξης του αίματος στο συγκεκριμένο παράδειγμα) και στη συνέχεια την επιστροφή των τροποποιημένων κυττάρων στον ασθενή, όπου θα παράγουν τον απαραίτητο παράγοντα πήξης. Οι *in vivo* προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την άμεση εισαγωγή DNA στα κύτταρα του σώματος του ασθενούς. Και οι δύο προσεγγίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά εξωγενών γονιδίων, ώστε να εξαλειφθούν οι επιπτώσεις της έκφρασης του μεταλλαγμένου ενδογενούς γονιδίου.

Μοριακή διατροφή

PERSONALIZED INTAKE OF



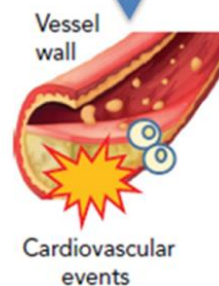
ACCORDING WITH INDIVIDUAL GENETICS:



Improves lipid profile

PREVENT

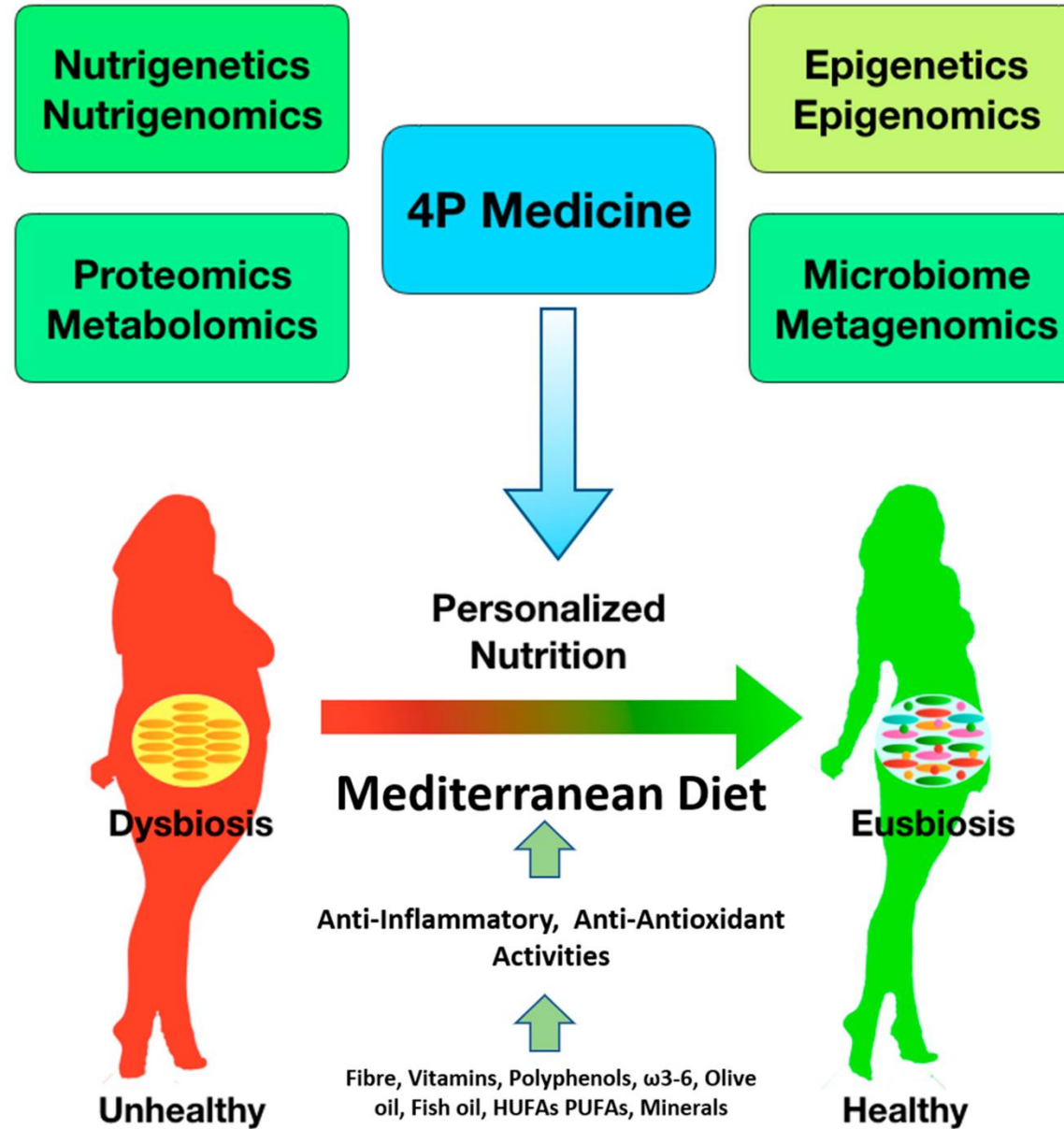
Reduces inflammation



Μοριακή διατροφή



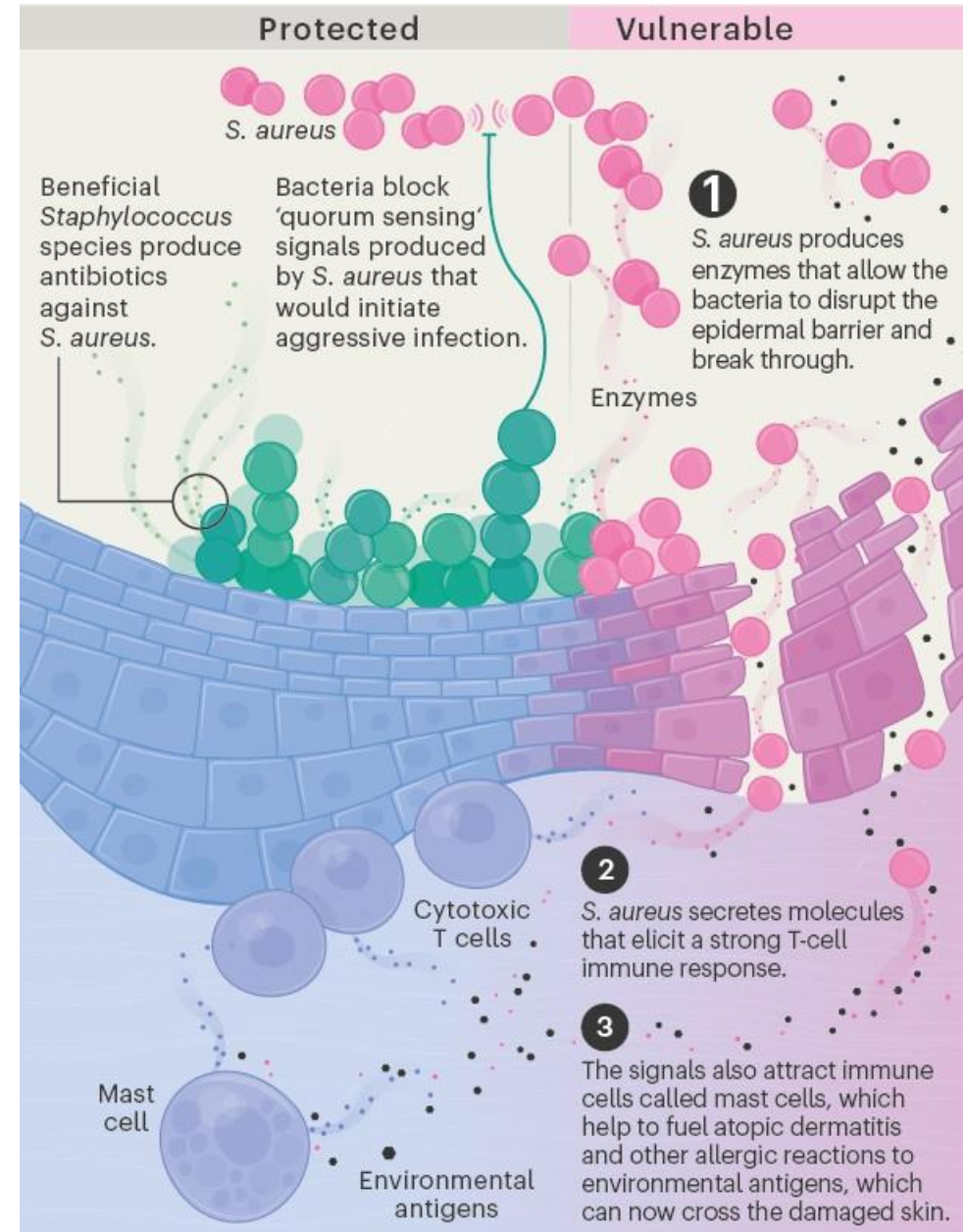
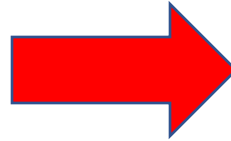
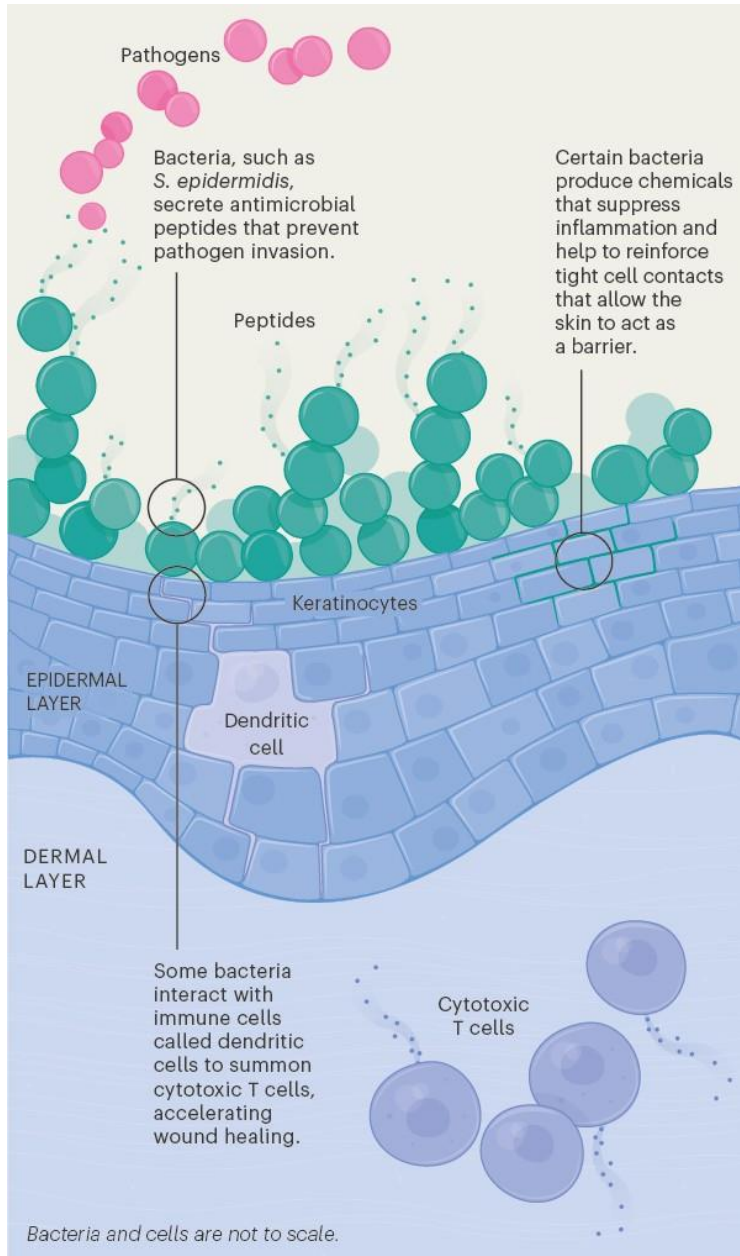
Το μέλλον στην Μοριακή διατροφή...



4P: Predictive, Personalized, Preventive, Participatory

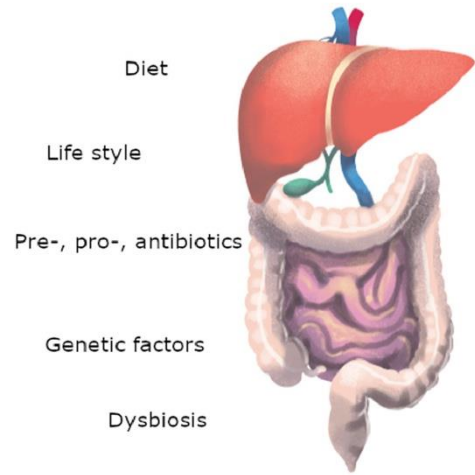
Di Renzo et al., 2019

Μικροβίωμα

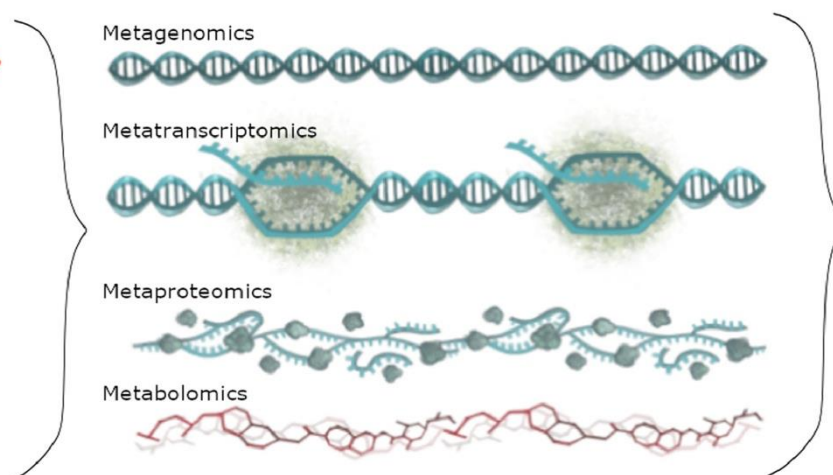


Ολιστικά συμπεράσματα - Μικροβίωμα

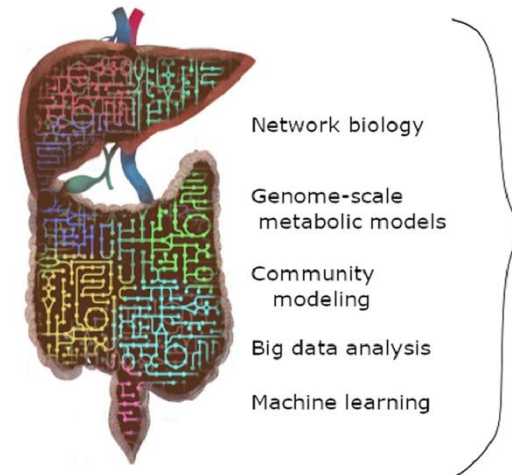
GUT-LIVER AXIS



OMICS TECHNOLOGIES



SYSTEMS BIOLOGY



TRANSLATIONAL MEDICINE

