



ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Δρ. Γκατζίδου Ελισάβετ
Μέλος Ε.ΔΙ.Π.
Εργαστήριο Βιολογίας
Τμήμα Ιατρικής ΔΠΘ

Οργάνωση Ευκαρυωτικού Γονιδιώματος

Γονιδιωματική

- ▣ Το πεδίο της Μοριακής Γενετικής που ασχολείται με τη δομή, τη λειτουργία, την εξέλιξη, τη χαρτογράφηση και την επεξεργασία γονιδιωμάτων.
- ▣ Ασχολείται με τη λειτουργική μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος.
- ▣ Ασχολείται με τη δομή και λειτουργία των γονιδίων σε μοριακό επίπεδο.

Ιστορία

- ▣ 1869: 1^η Απομόνωση DNA
- ▣ 1953: Ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA – Watson J, Crick F, Wilkins M, Franklin R.
- ▣ 1977: 1^η αλληλούχιση γονιδιώματος 5386 bp (Βακτηριοφάγος ΦX-174) – Sanger F.
- ▣ 1981: 1^η αλληλούχιση μιτοχονδρίου – Anderson
- ▣ 1983: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Mullis KB.
- ▣ 2000: Αλληλούχιση Ανθρώπινου Γονιδιώματος

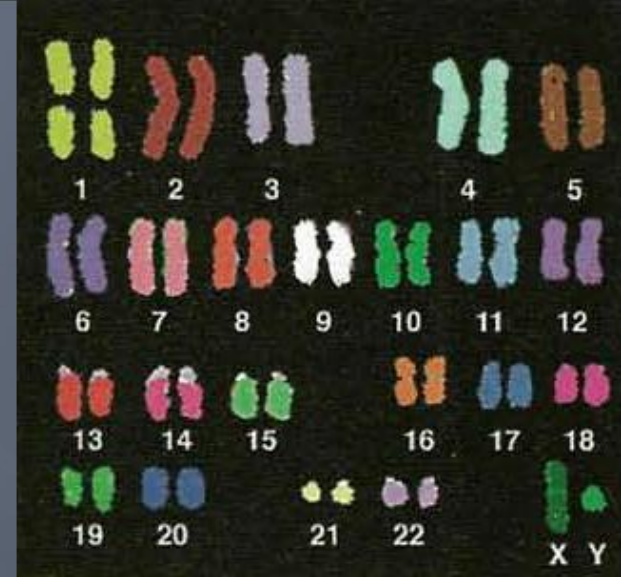
Η δομή του DNA «κρύβει» ένα μηχανισμό για την κληρονομικότητα

- ▣ Το DNA κωδικοποιεί πληροφορίες με τη σειρά ή την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων κατά μήκος ενός κλώνου.
- ▣ Γονίδια περιέχουν οδηγίες για την παραγωγή πρωτεϊνών.
- ▣ Η έκφραση των γονιδίων είναι μία διαδικασία όπου το κύτταρο μεταγράφει την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός γονιδίου σε αλληλουχία RNA κι έπειτα μεταφράζει αυτή την πληροφορία σε αλληλουχία αμινοξέων μιας πρωτεΐνης.
- ▣ Το σύνολο των πληροφοριών στο DNA ενός οργανισμού καλείται **γονιδίωμα (genome)** του οργανισμού.
- ▣ Η συνολική ποσότητα αυτών των πληροφοριών είναι εντυπωσιακή.

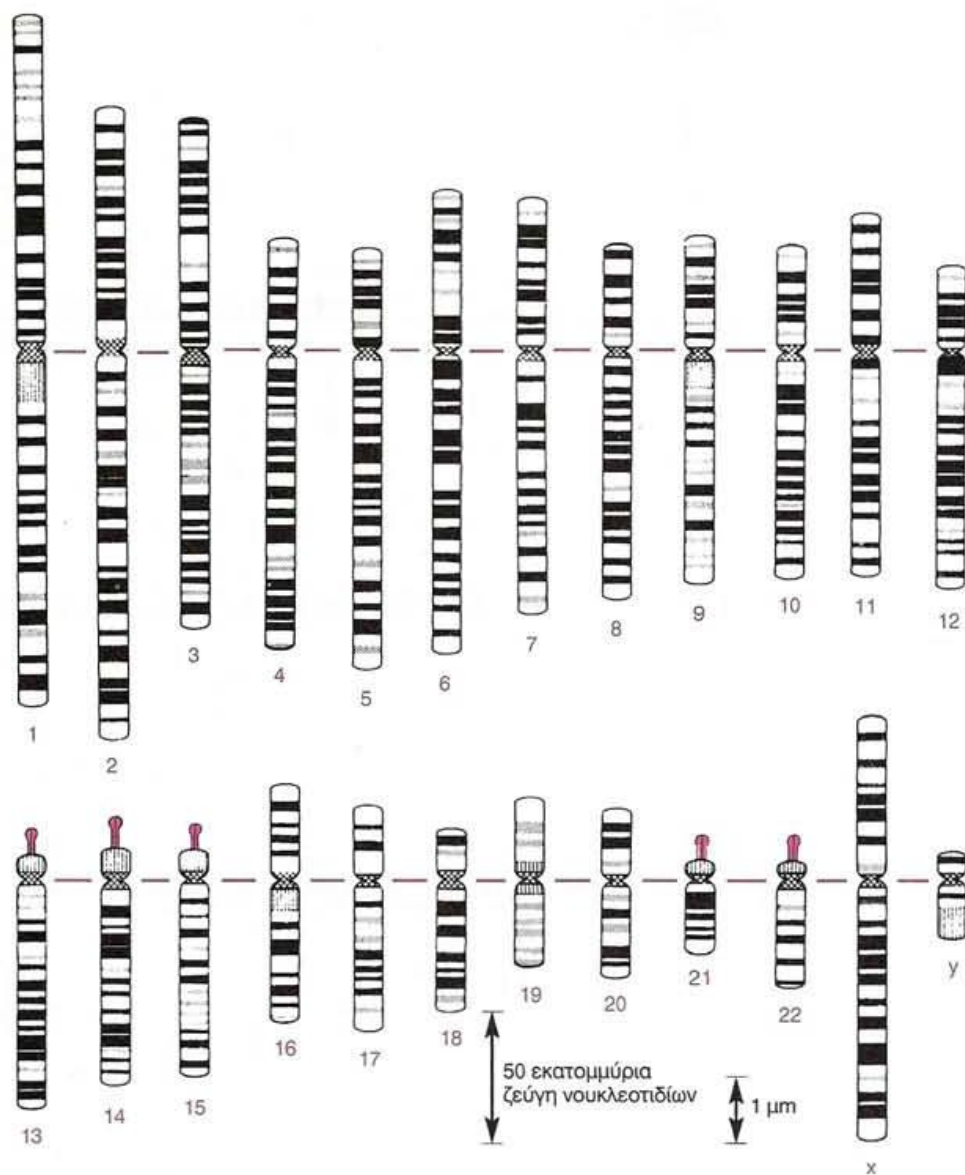
Η δομή των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων

- ▣ Στους ευκαρυώτες, το DNA κατανέμεται σε μία ομάδα διαφορετικών χρωμοσωμάτων.
- ▣ Κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από ένα μοναδικό, μακρύ, γραμμικό μόριο DNA που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες οι οποίες διπλώνουν και συσκευάζουν τη λεπτή ίνα του DNA σε μία πιο συμπαγή δομή.
- ▣ Το σύμπλοκο πυρηνικού DNA και πρωτεϊνών καλείται **χρωματίνη**.

Η δομή των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων



- Όλα τα κύτταρα του ανθρώπου περιέχουν 2 αντίγραφα του κάθε χρωμοσώματος, ένα μητρικής και ένα πατρικής προέλευσης.
- Τα δύο χρωμοσώματα κάθε ζευγαριού καλούνται **ομόλογα**.
- Το μόνο ζεύγος μη ομόλογων χρωμοσωμάτων είναι το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων στους άνδρες, οι οποίοι κληρονομούν ένα χρωμόσωμα Y από τον πατέρα και ένα χρωμόσωμα X από τη μητέρα τους.
- Η παρουσίαση του συνόλου των **46 χρωμοσωμάτων** του ανθρώπου καλείται **καρυότυπος** του ανθρώπου.



Εικόνα 5-13. Τα πρότυπα της ζώνωσης των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου. Τα χρωμοσώματα αριθμούνται από το 1 έως το 22 περίπου κατά σειρά μεγέθους. Ένα τυπικό σωματικό (μη γαμετικό) ανθρώπινο κύτταρο περιέχει δύο αντίγραφα του κάθε χρωμοσώματος όπως επίσης και δύο φυλετικά χρωμοσώματα, τα οποία είναι δύο χρωμοσώματα X στις γυναίκες και από ένα χρωμόσωμα X και χρωμόσωμα Y στους άνδρες. Τα χρωμοσώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό αυτών των χαρτών χρώστηκαν σ' ένα πρώιμο στάδιο της μίτωσης, ενώ ήταν πολύ συμπαγή. Η οριζόντια γραμμή αναπαριστά την εντόπιση του κεντρομεριδίου, το οποίο φαίνεται σαν μια περισφιξη πάνω στα μιτωτικά χρωμοσώματα. Τα επάρματα πάνω στα χρωμοσώματα 13, 14, 15, 21 και 22 υποδηλώνουν την εντόπιση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μεγάλα ριβοσωματικά μόρια RNA. Τα πρότυπα αυτά προκύπτουν μετά από χρώση των χρωμοσωμάτων με τη χρωστική Giemsa, η οποία παράγει σκούρες ζώνες σε περιοχές πλούσιες σε ζεύγη νουκλεοτιδίων A-T. (Προσαρμοσμένο από: U. Franke, *Cytogenet. Cell Genet.* 31:24-32, 1981).

Τεχνικές χρώσης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προτύπων χρωμοσωματικής ζώνωσης

TABLE 7.1 STAINING TECHNIQUES USED TO PRODUCE CHROMOSOME BANDING PATTERNS

Technique	Procedure	Banding pattern
G-banding	Mild proteolysis followed by staining with Giemsa	Dark bands are AT-rich; pale bands are GC-rich
R-banding	Heat denaturation followed by staining with Giemsa	Dark bands are GC-rich; pale bands are AT-rich
Q-banding	Stain with quinacrine	Dark bands are AT-rich; pale bands are GC-rich
C-banding	Denature with barium hydroxide and then stain with Giemsa	Dark bands contain constitutive heterochromatin (see Section 10.1)

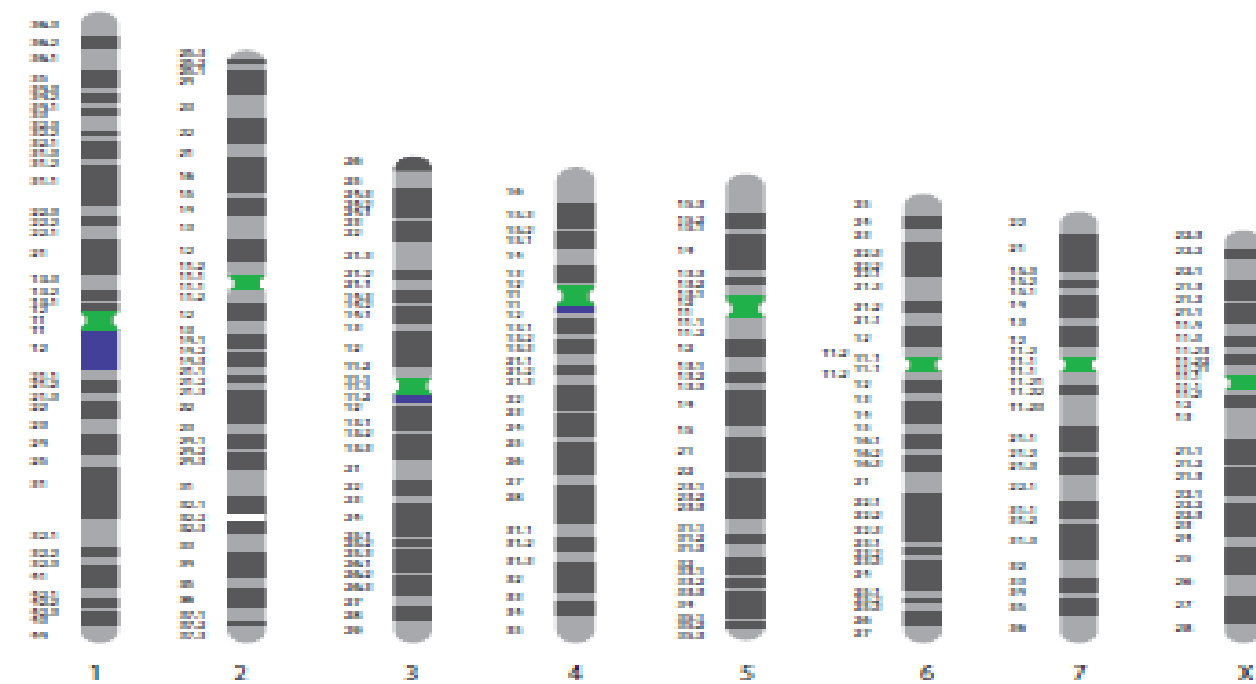
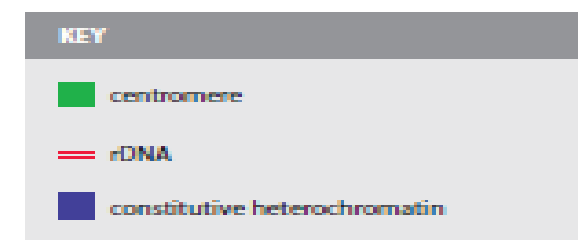
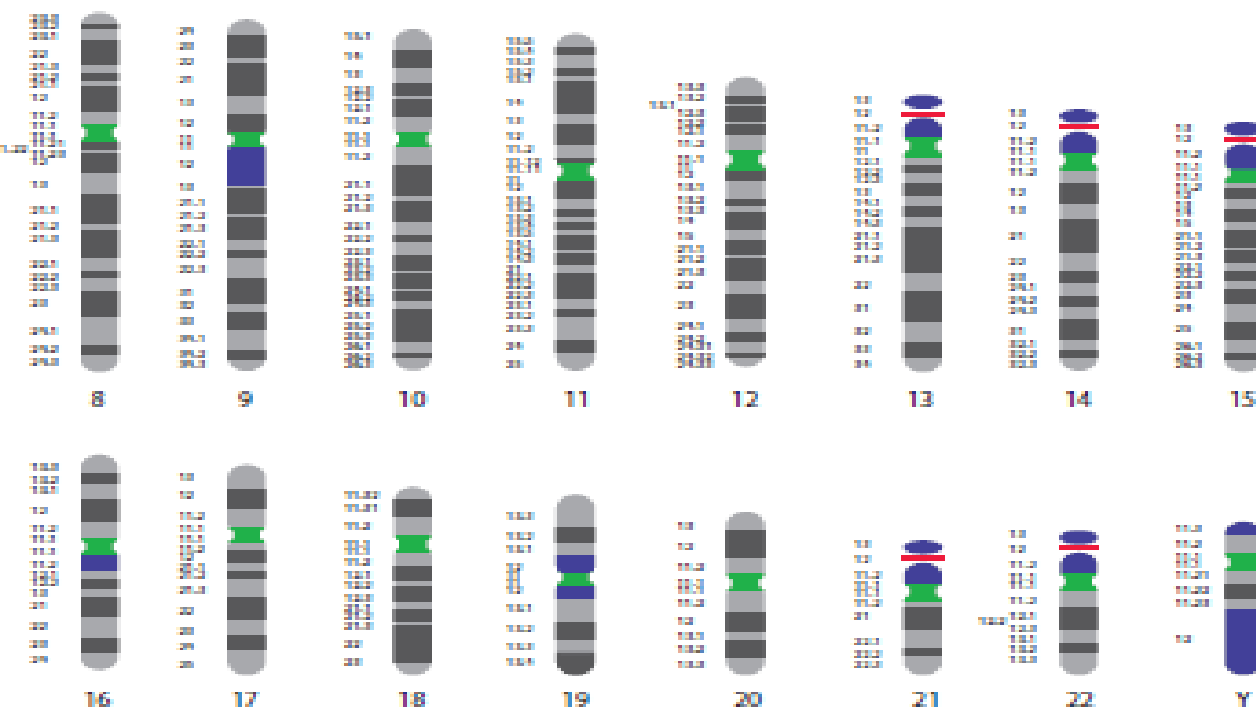


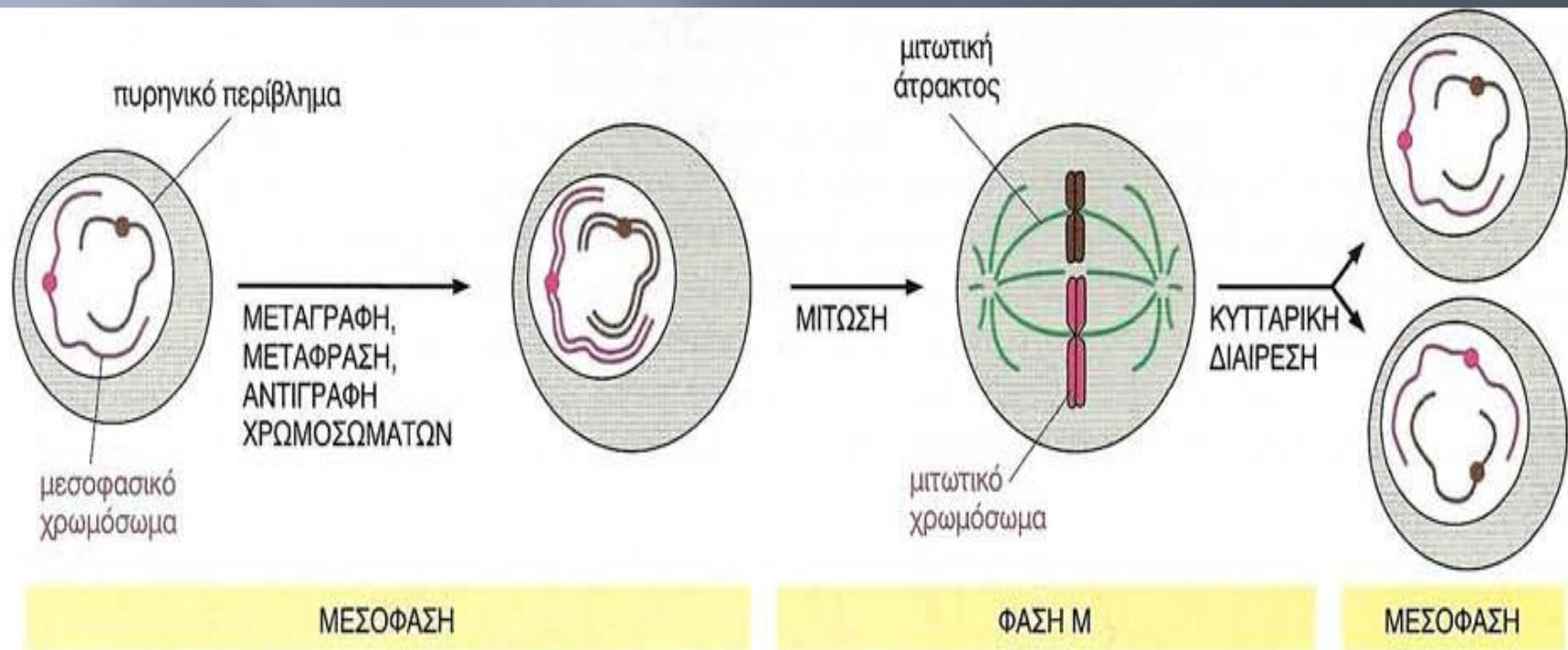
Figure 7.6 The human karyogram. The chromosomes are shown with their G-banding patterns. Chromosome numbers are given below each structure, and the band numbers are listed to the left. rDNA is a region containing a cluster of repeat units for the ribosomal RNA genes (Section 7.3). Constitutive heterochromatin is very compact chromatin that has few or no genes (Section 10.1).



Γονίδιο

- ▣ Η σημαντικότερη λειτουργία των χρωμοσωμάτων είναι να μεταφέρουν τα **γονίδια**.
- ▣ **Γονίδιο:** το τμήμα του DNA που περιέχει τις πληροφορίες για την παρασκευή μιας ορισμένης πρωτεΐνης.

Τα χρωμοσώματα βρίσκονται σε διαφορετικές καταστάσεις κατά τη διάρκεια ζωής του κυττάρου.



Μεσοφασικά Χρωμοσώματα

- ▣ Τα μεσοφασικά χρωμοσώματα είναι μακρύτερα και λεπτότερα από τα μιτωτικά.
- ▣ Οργανώνονται μέσα στον πυρήνα:
 1. Κάθε χρωμόσωμα τείνει να καταλαμβάνει συγκεκριμένη θέση του πυρήνα και, συνεπώς, διαφορετικά χρωμοσώματα δεν εμπλέκονται μεταξύ τους σε σημαντικό βαθμό.
 2. Συγκεκριμένες περιοχές χρωμοσωμάτων εφάπτονται σε σημεία της πυρηνικής μεμβράνης ή του πυρηνικού υμένα.

Ευκαρυωτικό Χρωμόσωμα

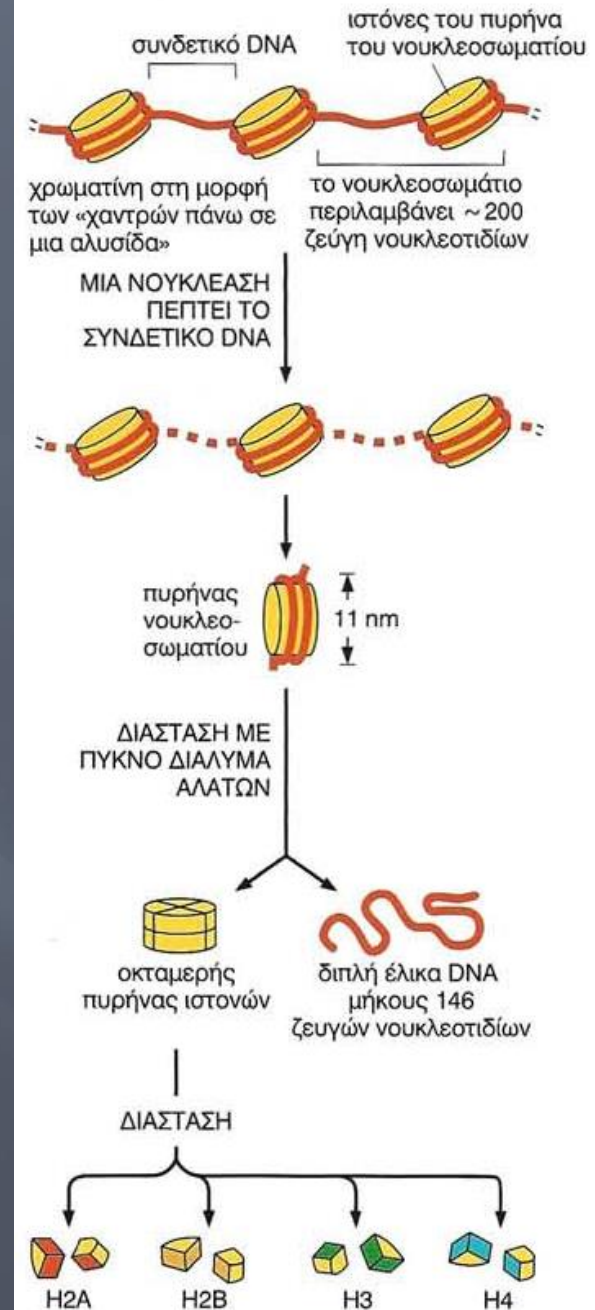
- ▣ Οι πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA για να δημιουργήσουν τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα:
 1. **Ιστόνες**
 2. Υπόλοιπες χρωμοσωμικές πρωτεΐνες - **Μη ιστόνες**

Νουκλεοσωμάτιο

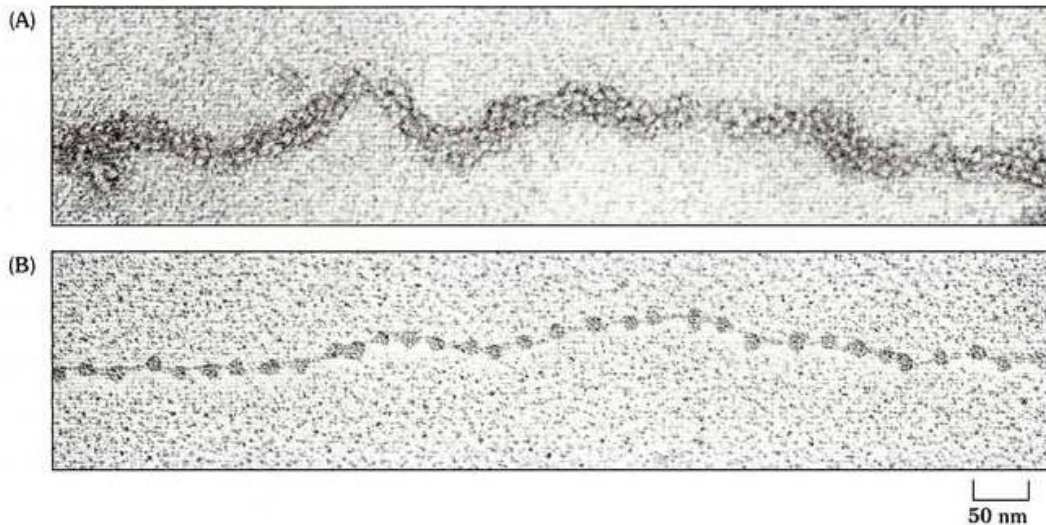
- ▣ Ο **πυρήνας** ενός νουκλεοσωματίου αποτελείται απο ένα σύμπλοκο 8 πρωτεϊνικών μορίων ιστονών (ανά 2 μόρια των ιστονών H_2A , H_2B , H_3 και H_4) κι ενός τμήματος DNA, μήκους ~ 147 ζευγών νουκλεοτιδίων.
- ▣ Το οκταμερές των ιστονών σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό «πυρήνα» γύρω από τον οποίο περιελίσσεται η δίκλωνη έλικά του DNA.
- ▣ Το συνδετικό DNA ανάμεσα σε δύο πυρήνες νουκλεοσωματίου ποικίλει από μερικά ζεύγη νουκλεοτιδίων μέχρι 80.
- ▣ Ο σχηματισμός των νουκλεοσωματίων μετατρέπει ένα μόριο DNA σε μία ίνα χρωματίνης με μήκος $\sim 1/3$ του αρχικού και προσφέρει το πρώτο επίπεδο συσκευασίας του DNA.

Νουκλεοσωμάτιο

Εικόνα 5-22. Η σύσταση του νουκλεοσωματίου. Ένα νουκλεοσωμάτιο περιέχει έναν πρωτεϊνικό πυρήνα αποτελούμενο από οκτώ μόρια ιστονών. Όπως φαίνεται στην εικόνα, ο πυρήνας του νουκλεοσωματίου απελευθερώνεται από τη χρωματίνη μετά από πέψη του συνδετικού DNA με μια νουκλεάση, ένα ένζυμο που διασπά το DNA. (Η νουκλεάση αποδομεί το εκτεθειμένο DNA, αδυνατεί όμως να αποδομήσει το περιελιγμένο DNA γύρω από το νουκλεοσωμάτιο). Μετά τη διάσπαση του απομονωμένου νουκλεοσωματίου στον πρωτεϊνικό πυρήνα και το DNA, μπορεί να καθοριστεί το μήκος του τμήματος του DNA που είχε περιελιχθεί γύρω από τον πυρήνα. Το τμήμα αυτό έχει μήκος 146 ζευγών νουκλεοτιδίων και περιελίσσεται γύρω από τον πυρήνα των ιστονών σχεδόν δύο φορές.



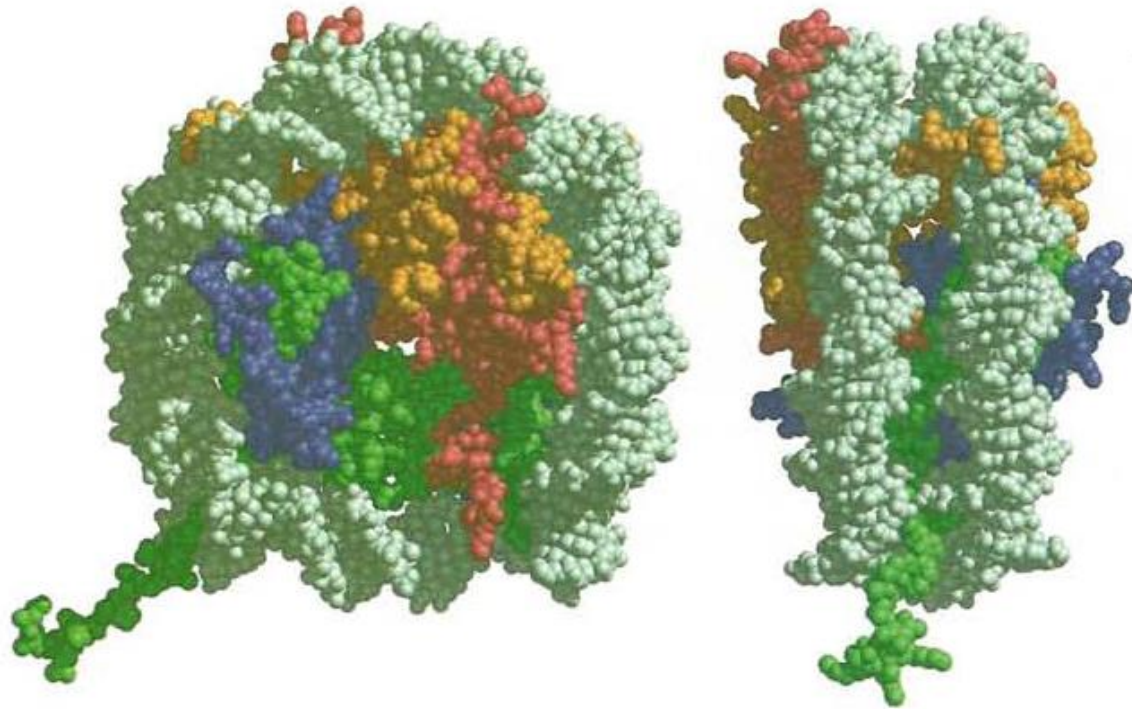
Νουκλεοσωμάτιο



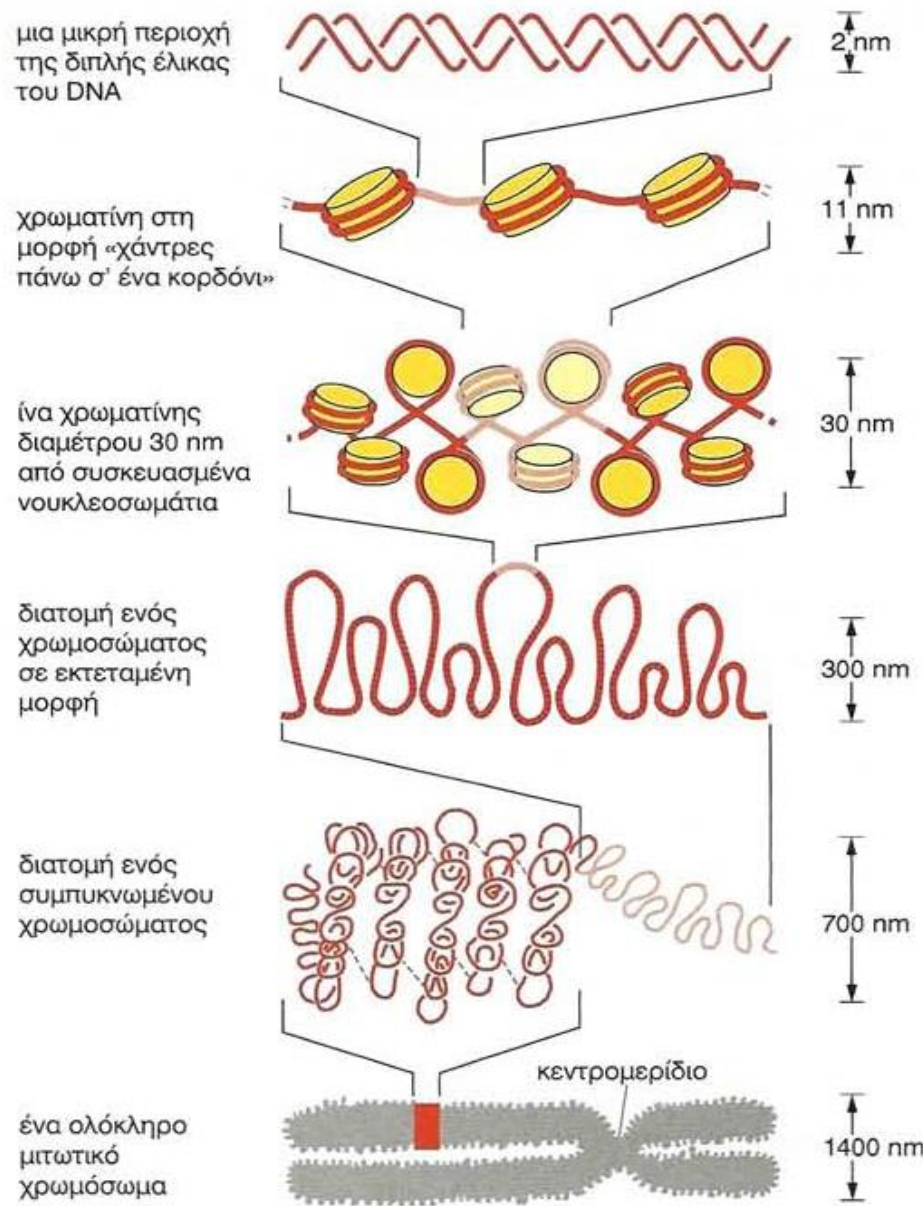
Εικόνα 5-21. Τα νουκλεοσωμάτια όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (Α) Η χρωματίνη που απομονώνεται άμεσα από έναν μεσοφασικό πυρήνα φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαν ένα πάχους 30 nm. (Με την άδεια της Barbara Hamkalo). (Β) Στην ηλεκτρονιομικρογραφία φαίνεται ένα τμήμα χρωματίνης το οποίο έχει αποσυσκευαστεί (ή αλλιώς «αποσυμπυκνωθεί») πειραματικά έτσι ώστε ν' αποκαλυφθούν τα νουκλεοσωμάτια. (Με την άδεια της Victoria Foe).

Η δομή του «πυρήνα» του νουκλεοσωματίου

Εικόνα 5-23. Η δομή του «πυρήνα» του νουκλεοσωματίου, όπως καθορίζεται με την τεχνική της περίθλασης των ακτίνων Χ, αποκαλύπτει πώς το DNA συνδέεται σφιχτά γύρω από τον δισκοειδή πυρήνα των ιστονών. Κάθε ιστόνη αποδίδεται χρωματικά όπως στην Εικόνα 5-22. Η έλικα του DNA αποδίδεται με γκρι χρώμα. Ένα τμήμα της ουράς της ιστόνης H3 προεξέχει από το νουκλεοσωμάτιο (οι ουρές των άλλων ιστονών δεν παρουσιάζονται στην εικόνα). (Αναδημοσιεύεται από: K. Luger et al., *Nature* 389:251-260, 1997. © Macmillan Magazines Ltd.).



Εικόνα 5-24. Επίπεδα συσκευασίας της χρωματίνης. Ορισμένα από τα επίπεδα συσκευασίας της χρωματίνης τα οποία φαίνεται ότι οδηγούν στη δημιουργία του πολύ συμπυκνωμένου μιτωτικού χρωμοσώματος. Το δίκλωμα ενός μορίου DNA σε νουκλεοσώματα είναι το πιο κατανοητό επίπεδο συσκευασίας. Οι δομές που αντιστοιχούν στα περαιτέρω επίπεδα συσκευασίας της χρωματίνης είναι πιο υποθετικές.



ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ: ΚΑΘΕ ΜΟΡΙΟ DNA ΕΧΕΙ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΕΙ ΣΕ ΕΝΑ ΜΙΤΩΤΙΚΟ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΕΙΝΑΙ 10,000 ΦΟΡΕΣ ΒΡΑΧΥΤΕΡΟ ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΟΥ DNA

Figure 7.3 Two models of the 30 nm chromatin fiber. The solenoid model (A) has been in favor for several years but recent experimental evidence supports the helical ribbon (B). Reprinted with permission from Dorigo et al., *Science*, 306, 1571–1573. Copyright 2004 AAAS.

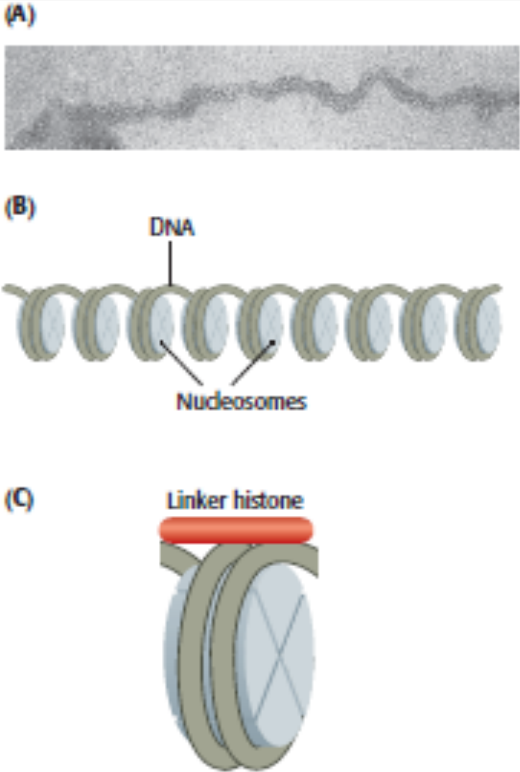
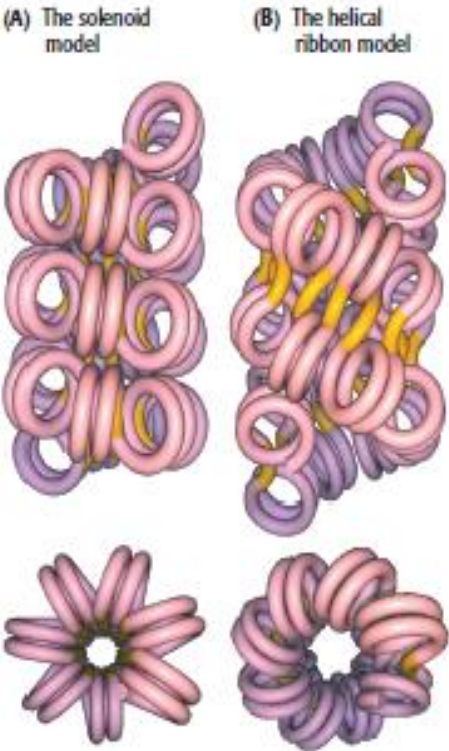
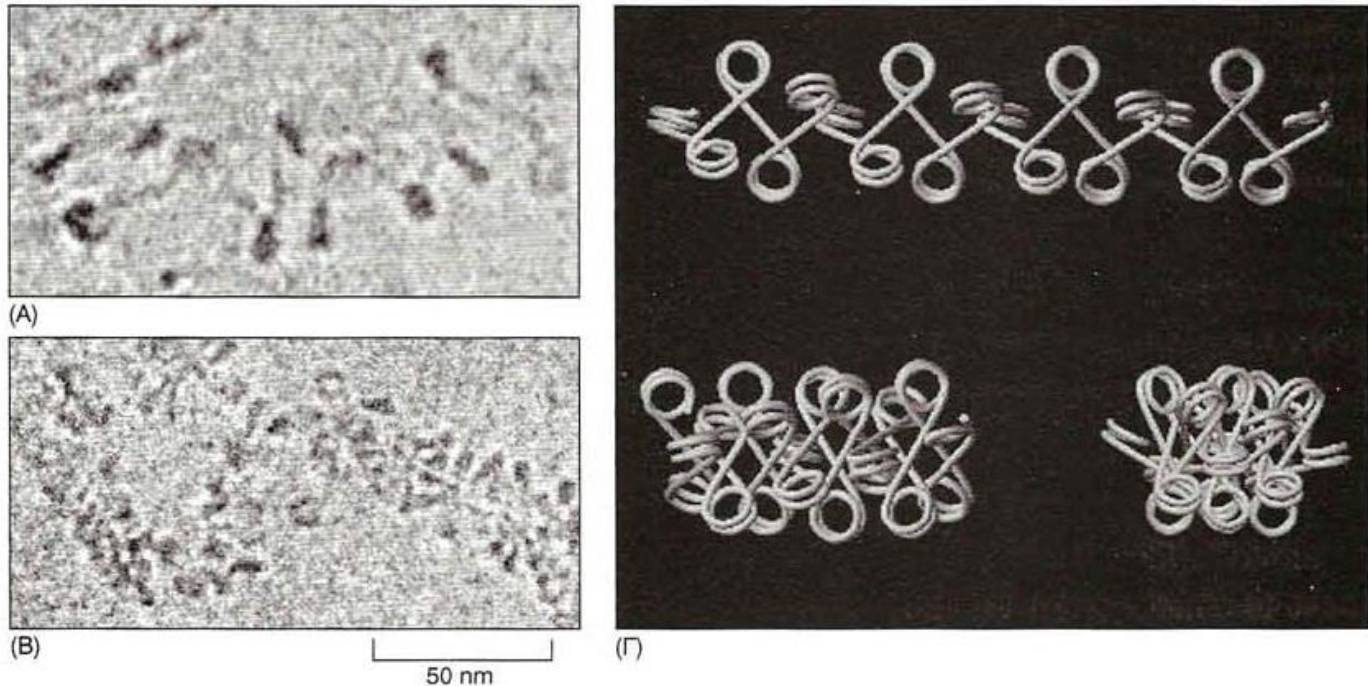


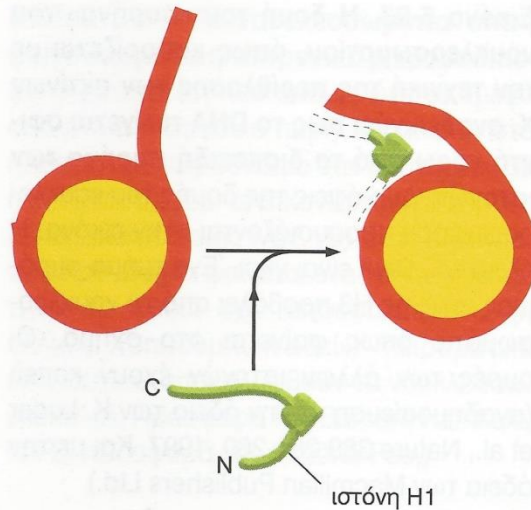
Figure 7.2 Nucleosomes. (A) Electron micrograph of a purified chromatin strand showing the “beads-on-a-string” structure. (B) The model for the “beads-on-a-string” structure, in which each bead is a barrel-shaped nucleosome with the DNA wound twice around the outside. Each nucleosome is made up of eight proteins: a central tetramer of two histone H3 and two histone H4 subunits, plus a pair of H2A–H2B dimers, one above and one below the central tetramer (see Figure 10.13). (C) The precise position of the linker histone relative to the nucleosome is not known but, as shown here, the linker histone may act as a clamp, preventing the DNA from detaching from the outside of the nucleosome. Image (A) courtesy of Dr Barbara Hamkalo.

Επίπεδα συσκευασίας της χρωματίνης



Εικόνα 5-25. Οι ίνες της χρωματίνης πιθανόν συσκευάζονται σύμφωνα μ' ένα μοντέλο ζιγκ-ζαγκ. (Α και Β) Ηλεκτρονιομικρογραφίες που παρέχουν ενδείξεις για τα μοντέλα στο (Γ) (πάνω και κάτω αριστερά). Η δομή της ίνας χρωματίνης των 30 nm ίσως είναι συνδυασμός αυτών των παραλλαγών ζιγκ-ζαγκ. Η αλληλομετατροπή των παραλλαγών πιθανόν συμβαίνει με επέκταση και συσπείρωση της ίνας (σαν ένα ακορντεόν). Στα διαγράμματα του (Γ) δεν παρουσιάζονται οι πυρήνες των ιστονών. (Από: J. Bednar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14173-14178, 1998. © National Academy of Sciences).

Επίπεδα συσκευασίας του DNA



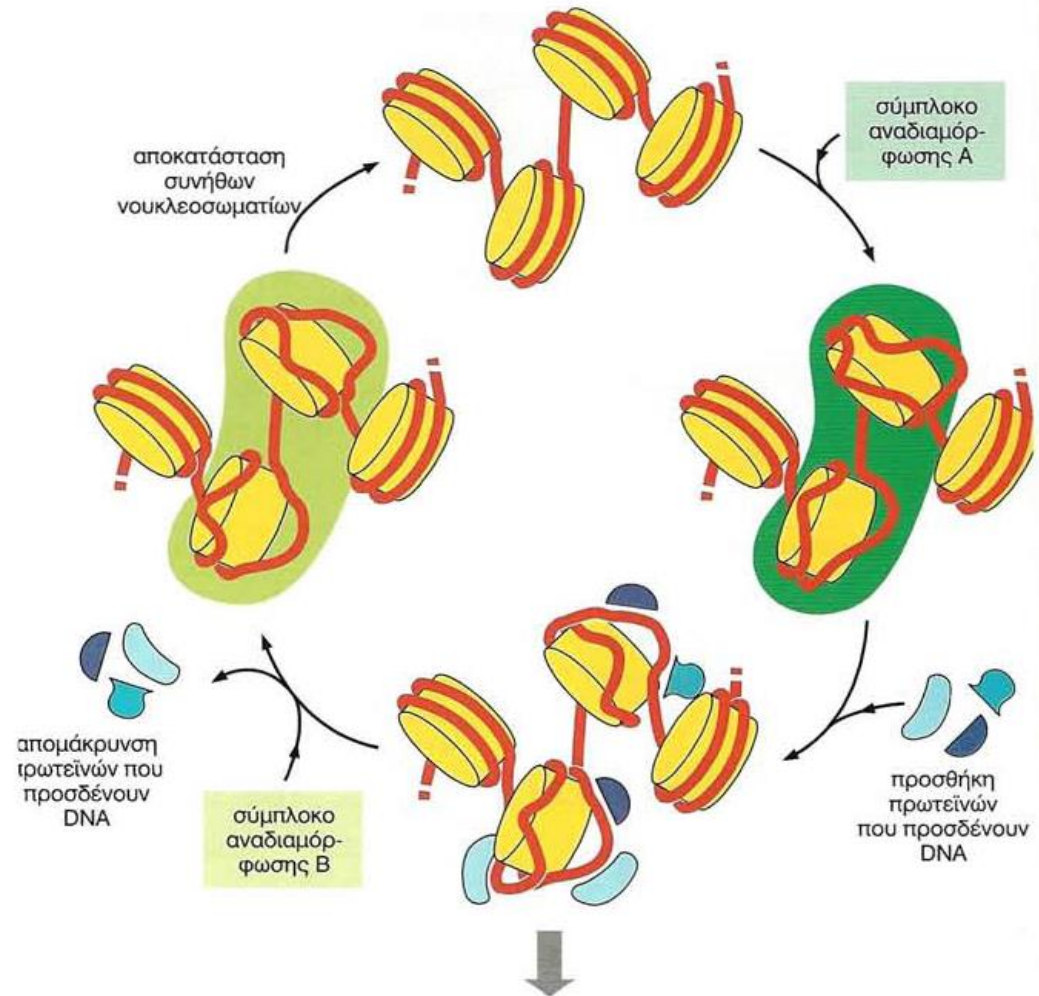
Εικόνα 5-24. Μια συνδετική ιστόνη βοηθά δύο νουκλεοτίδια να συμπλησιάσουν και σχηματίζει μια ίνα μήκους 30-nm. Η ιστόνη H1 αποτελείται από μια σφαιρική περιοχή κι ένα ζεύγος μακριών ουρών στο C-τελικό και το N-τελικό της άκρο. Η σφαιρική περιοχή περιέχει επιπλέον 20 ζεύγη βάσεων του DNA που προβάλλει από τον «πυρήνα» του νουκλεοσωματίου, ιδιότητα που θεωρείται σημαντική για το σχηματισμό της ίνας μήκους 30-nm. Η μακριά C-τελική ουρά είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στη χρωματίνη, αλλά η θέση της όπως και η θέση της N-τελικής ουράς, δεν είναι γνωστή.

Αλλαγές στη δομή των νουκλεοσωματίων επιτρέπουν πρόσβαση στο DNA

- ▣ Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν αρκετούς τρόπους για να αναδιαμορφώνουν γρήγορα την τοπική δομή της χρωματίνης.
 1. Σύμπλοκα Αναδιαμόρφωσης της Χρωματίνης (Chromatin Remodeling Complexes)
 2. Αντιστρεπτή χημική τροποποίηση των ιστονών.

Σύμπλοκα Αναδιαμόρφωσης Χρωματίνης

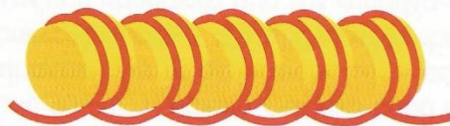
Εικόνα 5-29. Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης τροποποιούν τη δομή των νουκλεοσωμάτων. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, διαφορετικά σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης αποδομούν και αναδομούν τα νουκλεοσωμάτια. Ωστόσο, θεωρητικά, το ίδιο σύμπλοκο θα μπορούσε να καταλύει και τις δύο αντιδράσεις. Οι πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA μπορεί να εμπλέκονται στην έκφραση γονιδίων, στην αντιγραφή ή στην επιδιόρθωση του DNA.



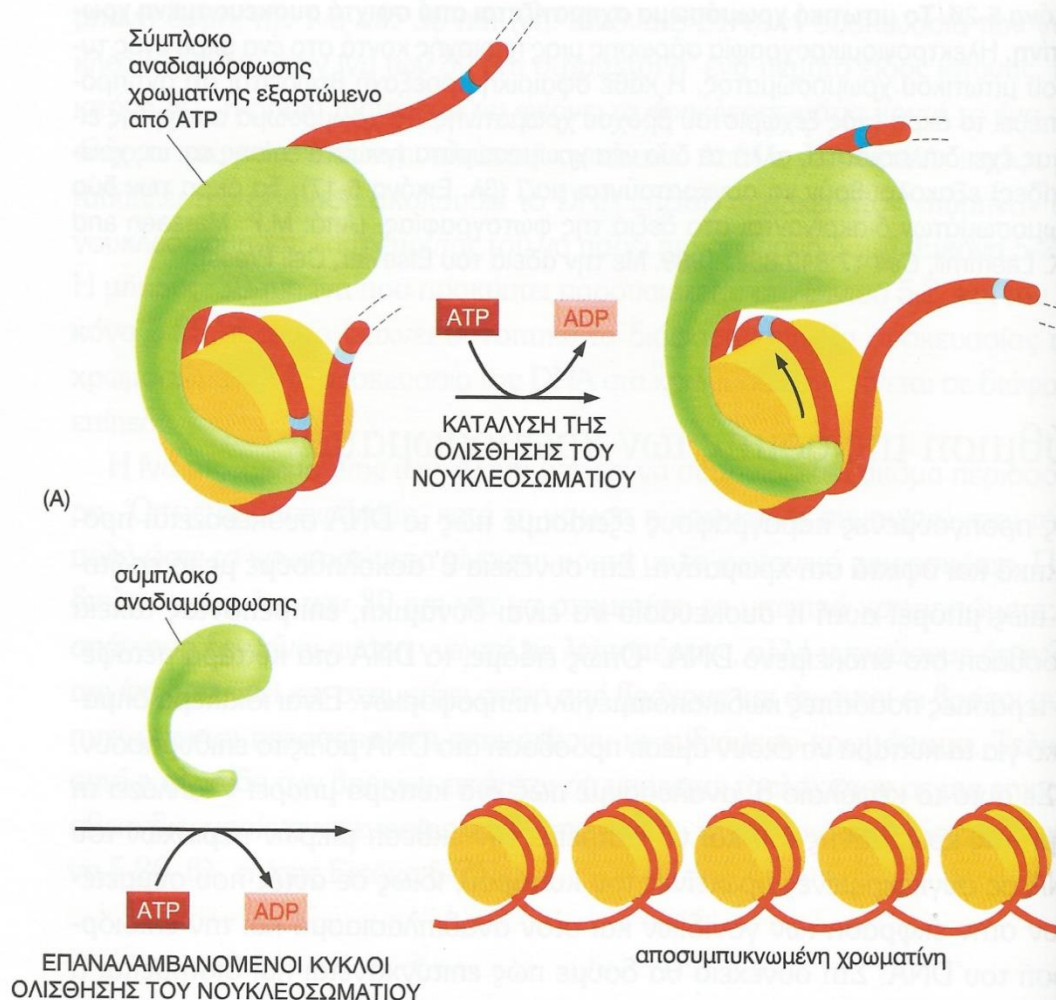
Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ, Η ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΫΠΟΘΕΤΟΥΝ ΠΡΟΣΒΑΣΗ ΣΕ DNA ΣΥΣΚΕΥΑΣΜΕΝΟ ΣΕ ΝΟΥΚΛΕΟΣΩΜΑΤΙΑ

Σύμπλοκα Αναδιαμόρφωσης Χρωματίνης

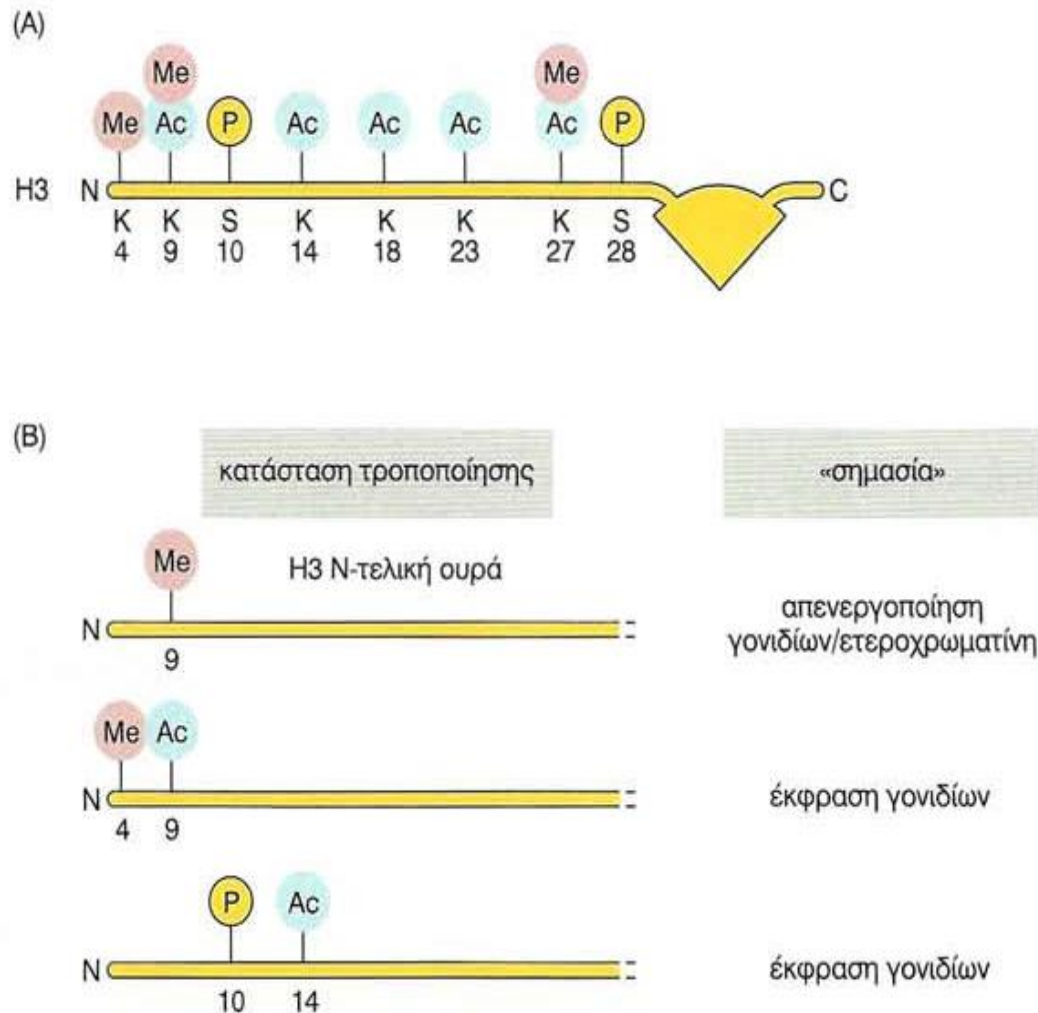
Εικόνα 5-27. Συμπλέγματα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης επανατοποθετούν και τυλίγουν το DNA γύρω από το νουκλεοσωμάτιο (A) Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι υδρόλυσης του ATP επιτρέπουν στο σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης να χαλαρώσει το DNA του νουκλεοσωματίου και να ολισθήσει γύρω από τον πυρήνα των ιστονών. Αυτό επανατοποθετεί (ολισθαίνει) το νουκλεοσωμάτιο, εκθέτοντας το DNA σε διαφορετικές πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μετατόπιση απαιτούνται πολλαπλοί κύκλοι υδρόλυσης του ATP. (B) Πολλαπλοί κύκλοι ολίσθησης του νουκλεοσωματίου μπορεί να προ καλέσουν αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, εκθέτοντας το υποκείμενο DNA σε άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου. Αντίστροφα, άλλου τύπου ολισθήσεις μπορεί να συμπυκνώσουν τη χρωματίνη μιας συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής.



(B) συμπυκνωμένη χρωματίνη



Αντιστρεπτή χημική τροποποίηση της ουράς των ιστονών



Εικόνα 5-30. Το πρότυπο τροποποίησης της ουράς των ιστονών πιθανόν υπαγορεύει πώς θα «χειριστεί» το κύτταρο μια περιοχή της χρωματίνης. (A) Κάθε ιστόνη μπορεί να τροποποιηθεί με ομοιοπολική προσθήκη αρκετών διαφορετικών μορίων. Για παράδειγμα, η ιστόνη H3 μπορεί ν' αποδεχθεί μια ακετυλομάδα (Ac), μια μεθυλομάδα (Me) ή μια φωσφορική ομάδα (P). Μερικές θέσεις (π.χ. Lys 9 και Lys 27) τροποποιούνται με δύο ή περισσότερους τρόπους. (B) Οι διαφορετικοί συνδυασμοί τροποποιήσεων της ουράς των ιστονών ίσως αποτελούν ένα είδος «κώδικα των ιστονών». Σύμφωνα με την υπόθεση του κώδικα των ιστονών, κάθε τροποποίηση προσδίδει ένα ειδικό μήνυμα στο τμήμα της χρωματίνης στο οποίο συμβαίνει. Μόνο λίγα από αυτά τα μηνύματα είναι γνωστά.