

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Ακαδημαϊκό Έτος 2024-25, Χειμερινό Εξάμηνο

Διδάσκοντες:

Διαμάντης Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής (**Συντονιστής**)

Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Χρήστος Κοντός, Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστηριακές Ασκήσεις:

Ελευθερία (Λάρα) Κραββαρίτη, ΕΔΙΠ (**Υπεύθυνη**)

Παρασκευή (Βιβή) Σκούρου, ΕΔΙΠ

Νίκος Αρβανίτης, ΕΔΙΠ

Συγγράματα του Μαθήματος:

- «*Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία*» (Συγγραφείς: Ρένα Λεκανίδου, Σόνια Τσιτήλου, Γεώργιος Κ. Ροδάκης)
Δωρεάν Ηλεκτρονικό Βοήθημα / Σημειώσεις- Εύδοξος [13001163]
- «*Μοριακή Βιολογία του γονιδίου*» Έκδοση 2η Ελληνική - 7η
Αμερικανική ISBN 9788-618-81298-2-5 Εύδοξος [12465336]

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΣΕΛΙΔΑ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ (URL) <https://eclass.uoa.gr/courses/BIOL173/>

Χρονοδιάγραμμα Διαλέξεων

ΔΙΑΛΕΞΗ	ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ	ΔΙΔΑΣΚΩΝ
1η	Εισαγωγικές έννοιες	Δ. ΣΙΔΕΡΗΣ
2η-3η	Δομή και ιδιότητες του DNA	Χ. ΚΟΝΤΟΣ
4η-9η	Αντιγραφή του DNA – Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί – Ρύθμιση της αντιγραφής	Δ. ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ
10η-16η	Μεταγραφή στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς – Ρύθμιση μεταγραφής	Δ. ΣΙΔΕΡΗΣ
17η-21η	Γενετικός κώδικας – Μετάφραση του mRNA σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς	Χ. ΚΟΝΤΟΣ
22η-26η	Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA	Χ. ΚΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Άσκηση	Τμήματα
1. Απομόνωση DNA	
2. Απομόνωση RNA	
3. Μετασχηματισμός	
4. Απομόνωση <u>Πλασμιδιακού DNA</u>	
5. Τιτλοδότηση φαγικής βιβλιοθήκης	
6. PCR	
7. <u>Ηλεκτροφόρηση</u>	
8. Χαρτογράφηση	

Έναρξη: 7 Οκτωβρίου 2024

- Τμήματα (θα ανακοινωθούν μέσω του eclass)
- Χρονοδιάγραμμα (θα ανακοινωθεί μέσω του eclass)
- Εγγραφή στα εργαστήρια και παραλαβή του φυλλαδίου των εργαστηριακών ασκήσεων (θα ανακοινωθεί μέσω του eclass)

Εισαγωγικά στοιχεία

Μοριακή βιολογία είναι ο κλάδος της βιολογίας που μελετά τη δομή, τη σύνθεση και τη λειτουργία της γενετικής πληροφορίας (DNA και RNA) σε μοριακό επίπεδο.

Τα όρια μεταξύ της Μοριακής Βιολογίας με εκείνα ορισμένων κλάδων της Χημείας και της Βιολογίας δεν είναι πάντα ξεκάθαρα, και ιδιαίτερα με εκείνα της Βιοχημείας και της Γενετικής.

Το όνομα "Μοριακή Βιολογία" δόθηκε το 1938 από τον Αμερικανό επιστήμονα Γουώρεν Γουίβερ.

Αντικείμενο της Μοριακής Βιολογίας

- Μοριακοί μηχανισμοί ροής (**μεταβίβασης**) και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας (**Κεντρικό Δόγμα**) σε επίπεδο κυττάρου και οργανισμού.

Βασικά Επίπεδα ροής και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας:

1. **Αντιγραφή** DNA σε DNA (*replication of DNA*)
 2. **Μεταγραφή** DNA σε RNA (*transcription of DNA*)
 3. **Μετάφραση** mRNA σε πρωτεΐνη (*translation of mRNA*)
- Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστημάτων ενός κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DNA, RNA και πρωτεϊνών.
 - Η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.
 - Η **γενετική μηχανική** (genetic engineering) ή **τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA**, που επιτρέπει την άμεση χειραγώγηση του γονιδιώματος ενός οργανισμού, ανοίγοντας νέους δρόμους στην έρευνα και παρέχοντας ποικίλες εφαρμογές, κυρίως στην ιατρική για διαγνωστικούς και άλλους σκοπούς, τη δημιουργία νέων φαρμάκων και θεραπειών (Μοριακή Ιατρική) και στη γεωργία.

Πως δημιουργήθηκε η Μοριακή Βιολογία;

- Η μικροσκοπική βιολογία ξεκίνησε το 1665.
- Ο Robert Hooke (1635-1703) ανακάλυψε ότι οι οργανισμοί αποτελούνται από κύτταρα.
- Matthias Schleiden (1804-1881) and Theodor Schwann (1810-1882) επέκτειναν περαιτέρω τη μελέτη των κυττάρων τη δεκαετία του 1830.



- Robert Hooke



- Matthias Schleiden



- Theodor Schwann

Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας 1800 - 1870

- **1865** Ο Gregor Mendel ανακάλυψε τους βασικούς κανόνες της κληρονομικότητας των μπιζελιών.
 - Κάθε άτομο έχει δύο εναλλακτικές μονάδες κληρονομικότητας για ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (**κυρίαρχο** χαρακτηριστικό γνώρισμα έναντι **υπολειπόμενου**).
- **1869** Ο Johann Miescher ανακάλυψε το DNA και το ονόμασε νουκλεΐνη.



Mendel: The Father of Genetics

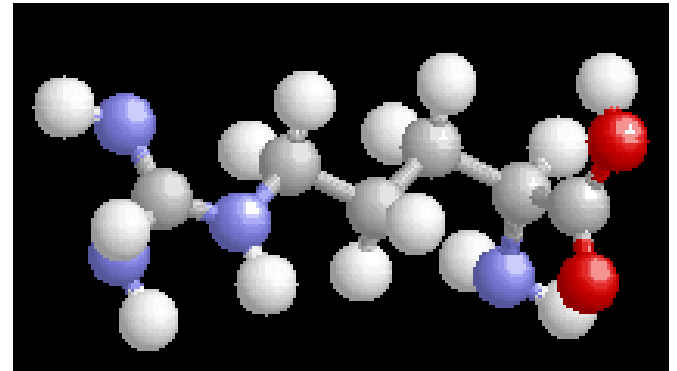


Johann Miescher

Miescher

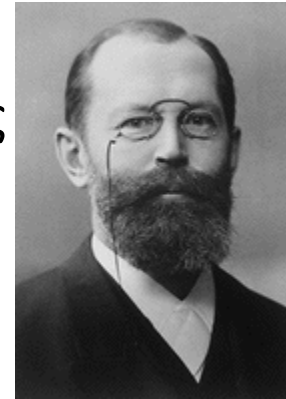
Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας 1880 - 1900

- **1881** Ο Edward Zacharias έδειξε ότι τα χρωμοσώματα αποτελούνται από νουκλεΐνη.
- **1899** Ο Richard Altmann επανονόμασε τη νουκλεΐνη σε νουκλεϊκό οξύ.
- **Έως το 1900**, ταυτοποιήθηκαν οι χημικές δομές όλων των 20 αμινοξέων.



Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας 1900 - 1911

- **1902** - Ο Emil Hermann Fischer (Nobel prize) έδειξε ότι τα αμινοξέα ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν τις πρωτεΐνες.
 - Διατύπωσε δε την άποψη ότι οι ιδιότητες των πρωτεϊνών καθορίζονται από την αμινοξική τους σύσταση.
- **1911** – Ο Thomas Morgan ανακάλυψε ότι τα γονίδια των χρωμοσωμάτων αποτελούν τις διακριτές μονάδες της κληρονομικότητας.
- **1911** Ο Pheobus Aaron Theodore Lerene ανακάλυψε το RNA.



Emil
Fischer



Thomas
Morgan

Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας 1940 - 1950

- **1941** – Οι George Beadle και Edward Tatum προσδιόρισαν ότι τα γονίδια δημιουργούν πρωτεΐνες.



George
Beadle



Edward
Tatum

- **1950** – Ο Edwin Chargaff βρήκε τη συμπληρωματικότητα των βάσεων μεταξύ κυτοσίνης - γουανίνης και αδενίνης - θυμίνης.



Edwin
Chargaff

Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας 1950 - 1952

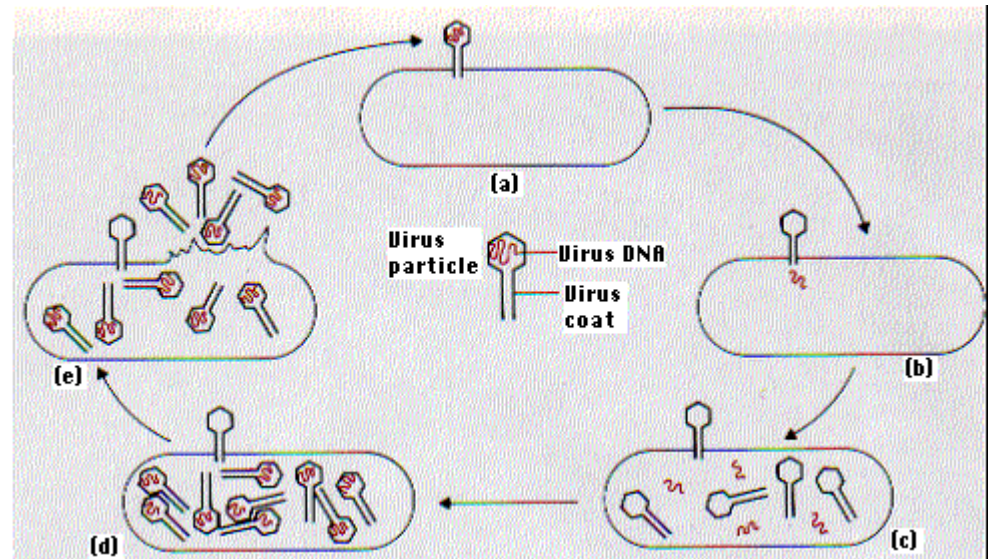
- **1950s** – Ο Mahlon Bush Hoagland απομόνωσε το πρώτο tRNA.



Courtesy of Dr. S. Chan, DNA Learning Center.
Noncommercial, educational use only.

Mahlon Hoagland

- **1952** – Οι Hershey and Chase απέδειξαν ότι το γενετικό υλικό των οργανισμών είναι το DNA



Hershey Chase Experiment

Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας 1952 - 1960

- **1952-1953** Οι James D. Watson and Francis H. C. Crick προέβλεψαν τη διπλή ελικοειδή δομή του DNA.



James Watson and Francis Crick

- **1956** Ο George Emil Palade έδειξε ότι η σύνθεση των ενζύμων γίνεται στο κυτταρόπλασμα σε «RNA-οργανίδια» που ονομάστηκαν ριβοσώματα.

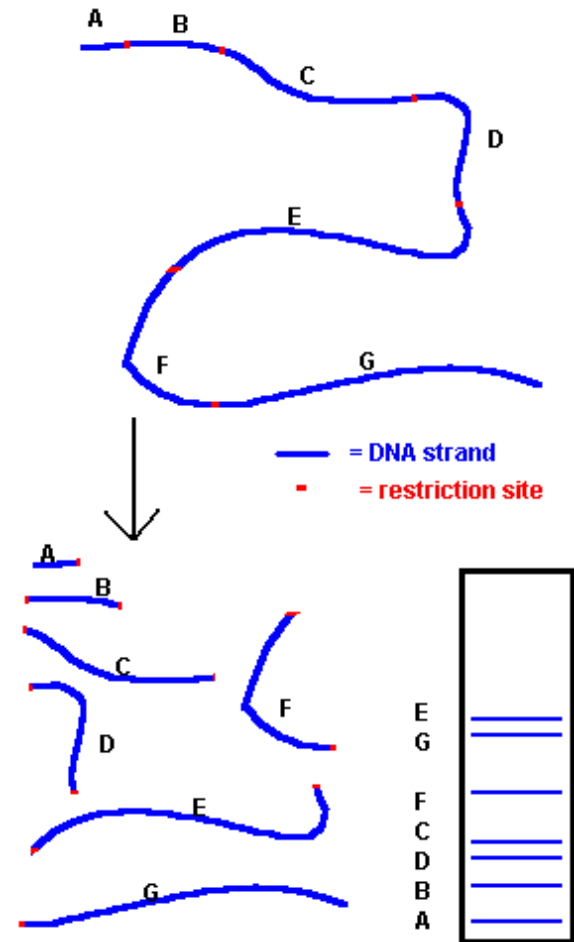


George Emil Palade

Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας δεκαετία 1970

Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA

- **1970** Οι H. Temin και D. Baltimore απομόνωσαν ανεξάρτητα την πρώτη περιοριστική ενδονουκλεάση ανοίγοντας το δρόμο στη **μοριακή κλωνοποίηση**.
- **1972** Ο Berg δημοσίευσε μια μέθοδο για τη *in vitro* συνένωση τμημάτων DNA με τη χρήση DNA λιγάσης.
- **1973** Οι Boyer και S Cohen χρησιμοποίησαν πρώτοι τα πλασμίδια για κλωνοποίηση του DNA.

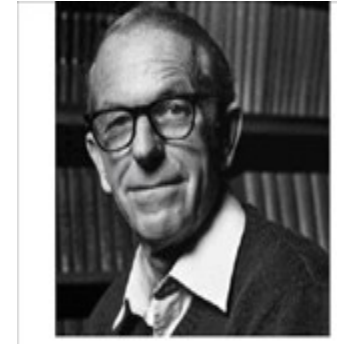


Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας 1977

- Οι **W. Gilbert** και **F. Sanger** ανέπτυξαν δύο διαφορετικές μεθοδολογίες αλληλούχισης του DNA.



Walter Gilbert



Fred Sanger

- Οι **Phillip Sharp** και **Richard Roberts** ανακάλυψαν την ύπαρξη παρεμβαλλόμενων περιοχών (**εσώνια**) εντός των γονιδίων.



Phillip Sharp



Richard Roberts

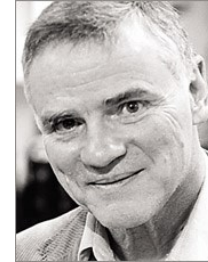
Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας 1980-90

- **1983** Ο **Kary Mullis** εισήγαγε την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης(PCR).



Kary Mullis

- **1986** Ο **Leroy Hood** ανέπτυξε αυτοματοποιημένο μηχανισμό προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA.



Leroy Hood

Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας τη δεκαετία του 90'

- **1995** John Venter: Ολοκλήρωση της αλληλούχισης του πρώτου βακτηριακού γονιδιώματος.
- **1996** Αλληλούχιση του πρώτου ευκαρυωτικού γονιδιώματος ζύμης.
- **1997** *E. Coli*
- **1998** Γονιδίωμα του *Caenorhabditis elegans*
- **1999** Πρώτο ανθρώπινο χρωμόσωμα (number 22)



John Venter

Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της Μοριακής Βιολογίας τη δεκαετία του 2000'

- **2000** Πλήρης αλληλούχιση της ευχρωματίνης της *Drosophila melanogaster*
- **2001** Ανακοίνωση των αποτελεσμάτων της αποκρυπτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος. (97%)
(Απρίλιος 2003 Ανακοίνωση των τελικών αποτελεσμάτων)



Πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος (Human genome project)



1984: Πρόταση για απόπειρα αποκρυπτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος.

1988: Θεωρητική έναρξη προγράμματος υπό την επίβλεψη του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ (NIH).

1990: Διεθνοποίηση του προγράμματος- Ευρωπαϊκή συμμετοχή: 20 Ινστιτούτα από ΗΠΑ, Καναδά, Γερμανία, Γαλλία, Μεγάλη Βρετανία, Ιαπωνία και Κίνα.

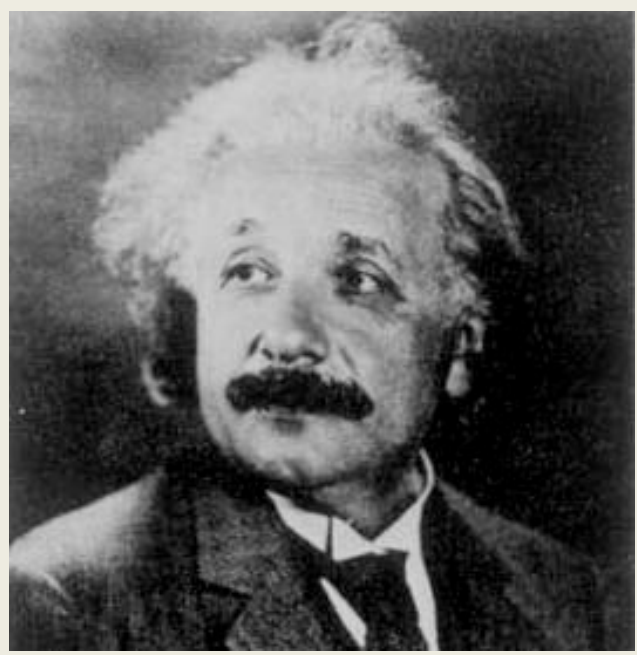
(1/10/1990, επίσημη έναρξη)

1996: Συνθήκη της Bermuda- πολιτική κοινοποίησης αποτελεσμάτων.

1999: Ίδρυση της ιδιωτικής εταιρείας Celera Genomics.

Ιούνιο 2000: Ανακοίνωση αποτελεσμάτων αποκρυπτογράφησης ανθρώπινου γονιδιώματος. (97%)

Απρίλιο 2003. Ανακοίνωση των τελικών αποτελεσμάτων.



- Είμαστε κατά 0.1% διαφορετικοί, ο ένας από τον άλλο (1/1000 βάσεις)
- 2 άνθρωποι: 3 εκατ. διαφορές / 3 δισεκ. bp
- Υπάρχουν δεκάδες εκατομμύρια πολυμορφισμοί απλών νουκλεοτιδίων (SNPs) στον πληθυσμό
 - Ένα πολύ μικρό ποσοστό από αυτούς είναι λειτουργικοί.

GATTAGATCGCGATAGAG

GATTAGATCTCGATAGAG

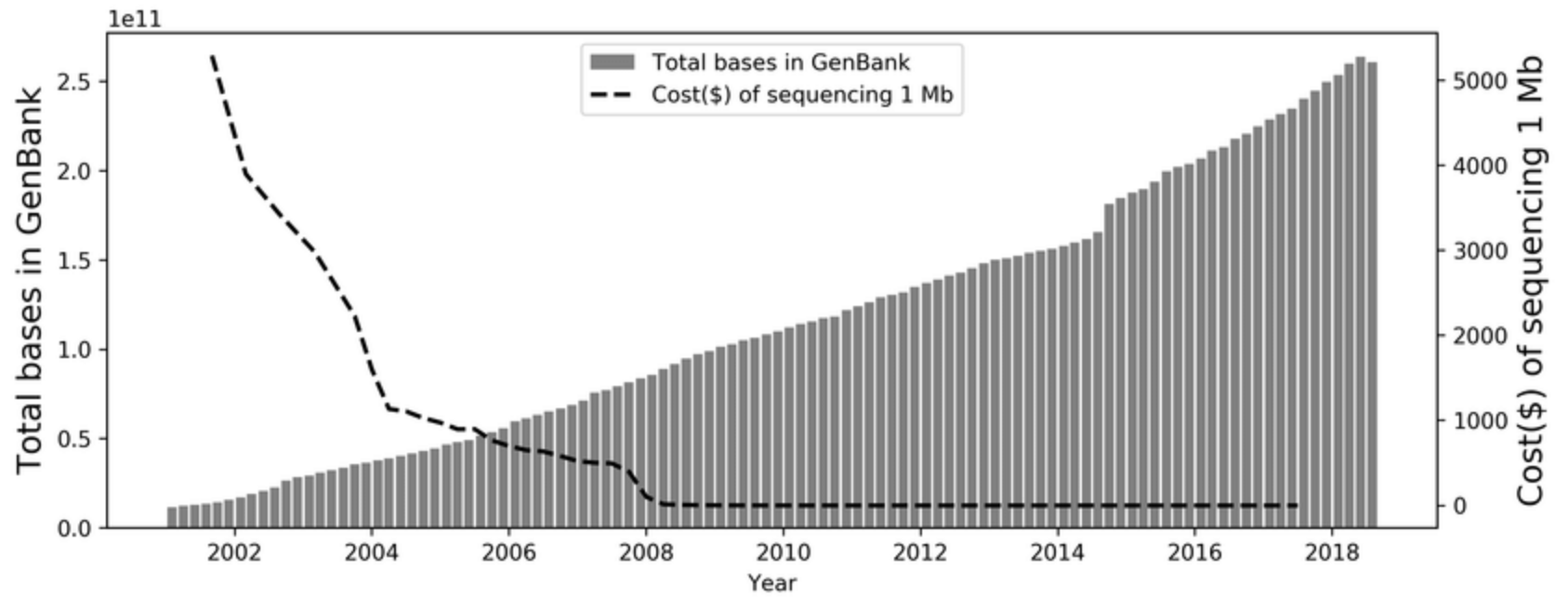
Τι είναι ‘γενετική πληροφορία;

Το σύνολο των πληροφοριών που βρίσκονται κωδικοποιημένες σε ένα ή περισσότερα μόρια νουκλεϊκού οξέος (DNA ή RNA) και μεταβιβάζονται από κύτταρο σε κύτταρο και από οργανισμό σε οργανισμό κατά την αναπαραγωγή.

(σχετικές έννοιες που θα δούμε στη συνέχεια: “**γενετικό ή γονιδιακό δυναμικό**”, “**γονιδίωμα**”, “**δυναμικό κωδικοποίησης**”)

Η έλευση των μεθόδων ταχέως προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA έχει οδηγήσει στην νέα εποχή της **γονιδιωματικής**, στην οποία καθορίζονται οι πλήρεις γονιδιωματικές αλληλουχίες για μια ευρεία ποικιλία οργανισμών.

Η σύγκριση των γονιδιωματικών αλληλουχιών παρέχει μια ισχυρή μέθοδο ταυτοποίησης κρίσιμων περιοχών του γονιδιώματος που κωδικοποιούν όχι μόνο τις πρωτεΐνες, αλλά και ρυθμιστικές περιοχές που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων και το διπλασιασμό του γονιδιώματος.





COMPARATIVE GENOMICS

NHGRI FACT SHEETS

genome.gov

Researchers choose the appropriate time-scale of evolutionary conservation for the question being addressed.



Common features of different organisms such as humans and fish are often encoded within the DNA evolutionarily conserved between them.



Looking at **closely related species** such as humans and chimpanzees shows which genomic elements are unique to each.



Genetic differences within one species such as our own can reveal variants with a role in disease.



NIH National Human Genome Research Institute



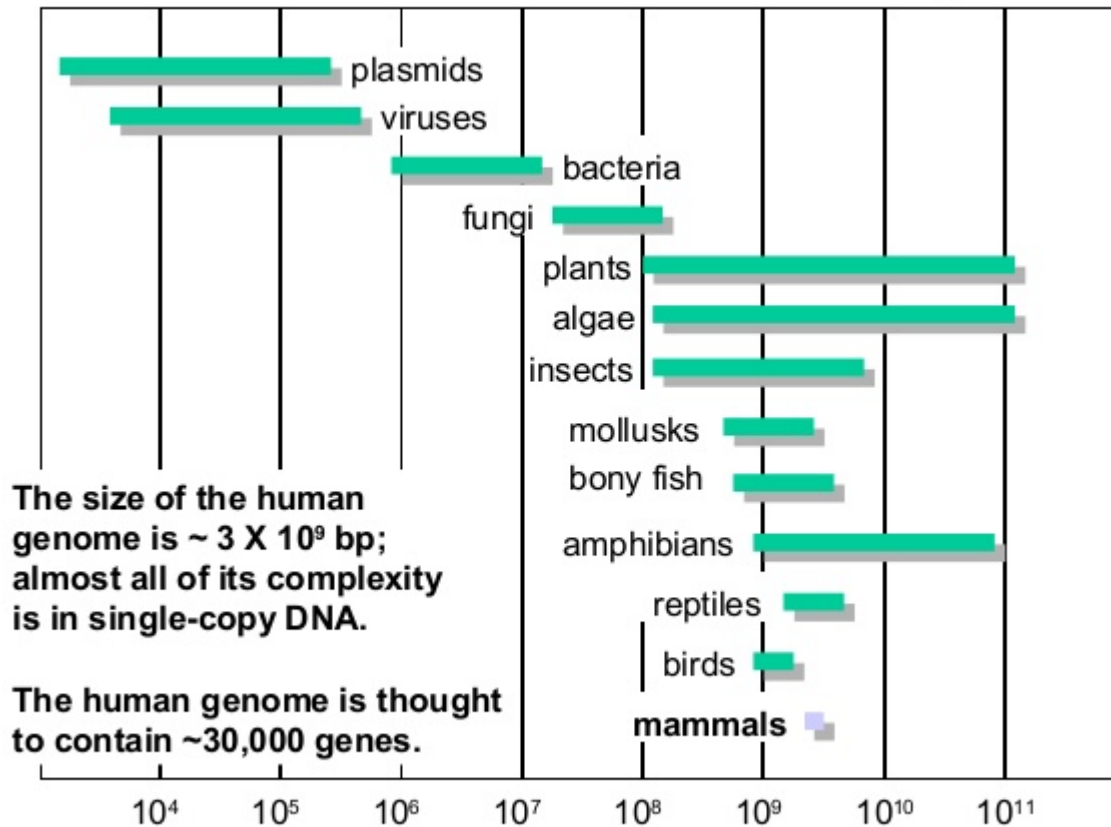
Σύγκριση του ανθρώπινου γονιδιώματος με άλλους οργανισμούς

Οργανισμός	Μέγεθος γονιδιώματος (Bases)	Υπολογιζόμενος αριθμός γονιδίων
Human (<i>Homo sapiens</i>)	3 δισεκατομμύρια	20,000
Laboratory mouse (<i>M. musculus</i>)	2.6 δισεκατομμύρια	20,000
Mustard weed (<i>A. thaliana</i>)	100 εκατομμύρια	23,000
Roundworm (<i>C. elegans</i>)	97 εκατομμύρια	19,000
Fruit fly (<i>D. melanogaster</i>)	137 εκατομμύρια	13,000
Yeast (<i>S. cerevisiae</i>)	12.1 εκατομμύρια	6,000
Bacterium (<i>E. coli</i>)	4.6 εκατομμύρια	3,200
Human immunodeficiency virus (HIV)	9700	9

Σχέση μεγέθους γονιδιώματος και πολυπλοκότητας ενός οργανισμού

Τιμή c ονομάζεται η ποσότητα του DNA στο απλοειδές γονιδίωμα και είναι χαρακτηριστική κάθε οργανισμού.

Genome sizes in nucleotide base pairs

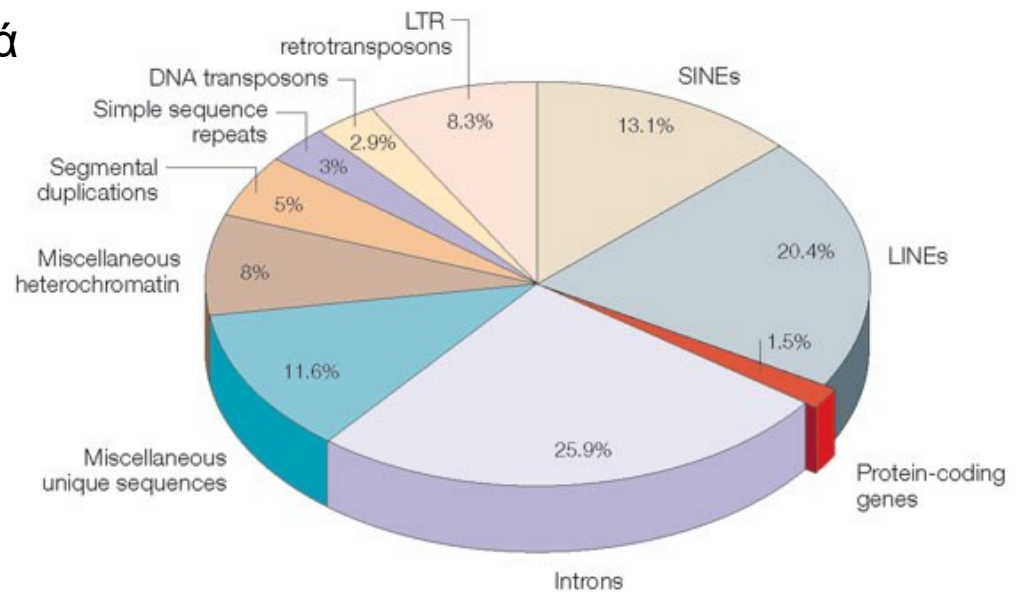


Η έκφραση **παράδοξο της τιμής c**,

- αναφέρεται στην αδυναμία συσχέτισης του μεγέθους του γονιδιώματος και της πολυπλοκότητας ενός οργανισμού,
- αλλά και στο γεγονός ότι παρατηρείται μεγάλο εύρος τιμών c ακόμα και μεταξύ ορισμένων συγγενών ειδών.

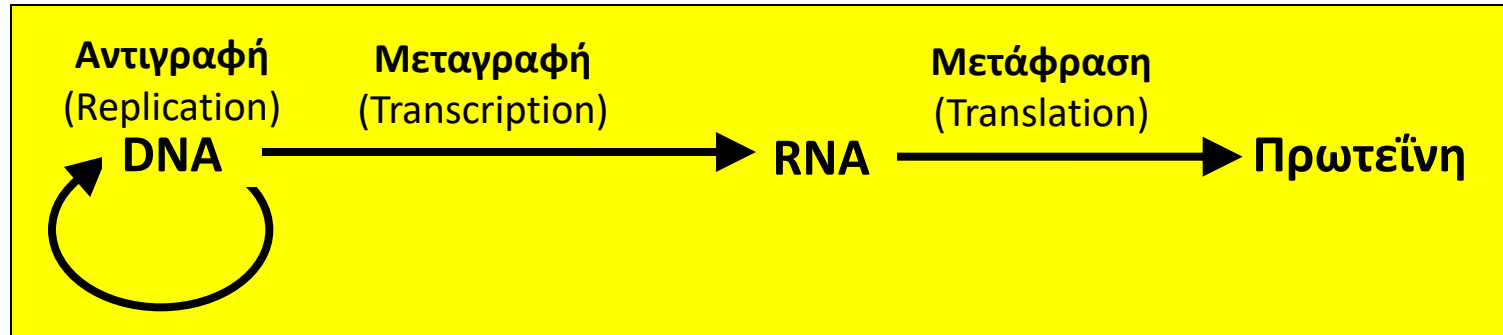
Παράδοξο της τιμής c

- Το DNA δεν κωδικοποιεί μόνο πρωτεΐνες και το mRNA δεν είναι το μοναδικό είδος RNA που μεταγράφεται.
- Υπάρχουν πολλά είδη RNA όπως τα rRNAs, tRNAs, snRNAs, snoRNAs, miRNAs, lncRNAs κ.α. που κωδικοποιούνται επίσης από το DNA.
- Εκτός από τις μεταγραφόμενες περιοχές υπάρχουν και περιοχές που αν και δεν μεταγράφονται έχουν μεγάλη σημασία για τη ρύθμιση τόσο της αντιγραφής, όσο και της έκφρασης όλων των δομικών και ρυθμιστικών γονιδίων.
- Τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια είναι διακεκομμένα (split genes) από παρεμβαλλόμενες περιοχές (introns) ποικίλου μήκους.
- Η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA στο γονιδίωμα το ποσοστό του οποίου διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό.

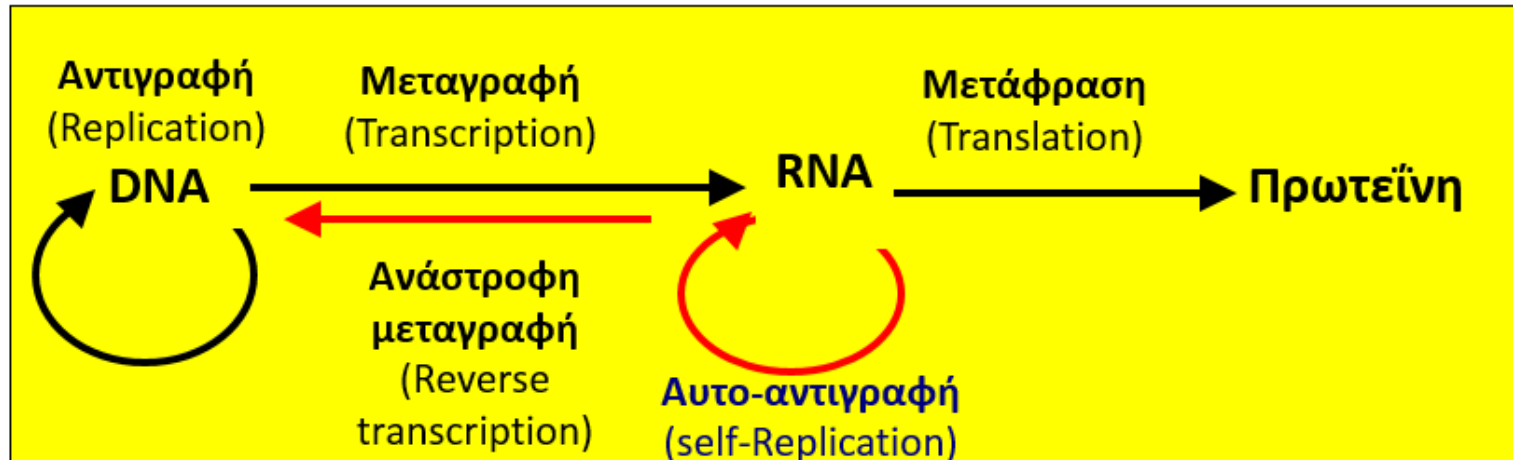


Το “Κεντρικό Δόγμα” (Central Dogma) της Μορ. Βιολογίας

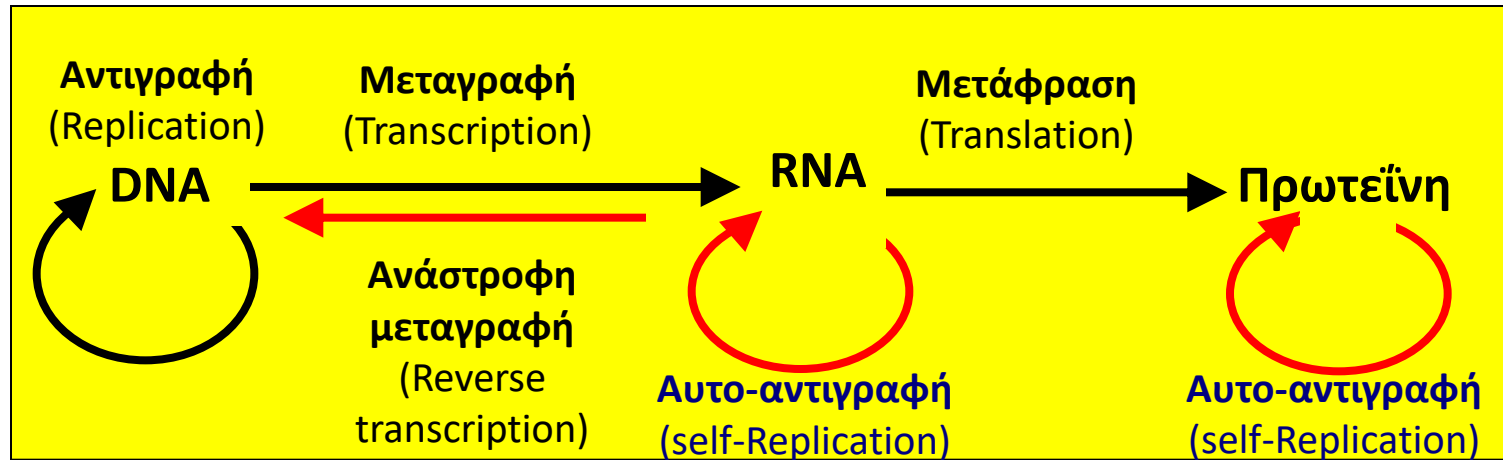
Δεκαετία '50. (κυρίως **Βιοφυσικές** προσεγγίσεις)



Δεκαετία '70. (κυρίως **Βιοχημικές** προσεγγίσεις, **Τεχνολογία του Ανασυνδυασμένου DNA, Γενετική Μηχανική**)



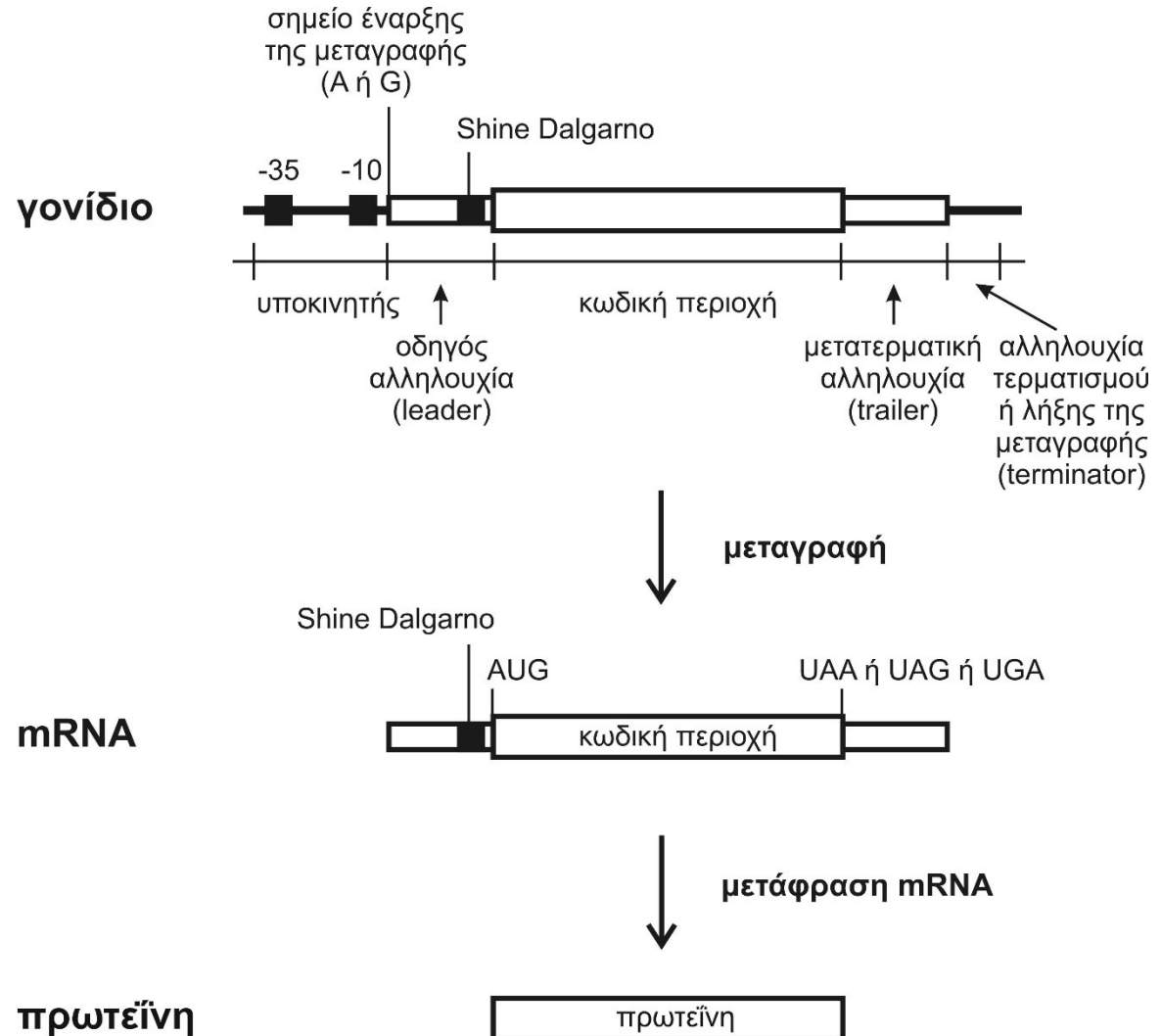
21^{ος} αιώνας. (ουσιαστική προσθήκη προσεγγίσεων Βιοπληροφορικής)



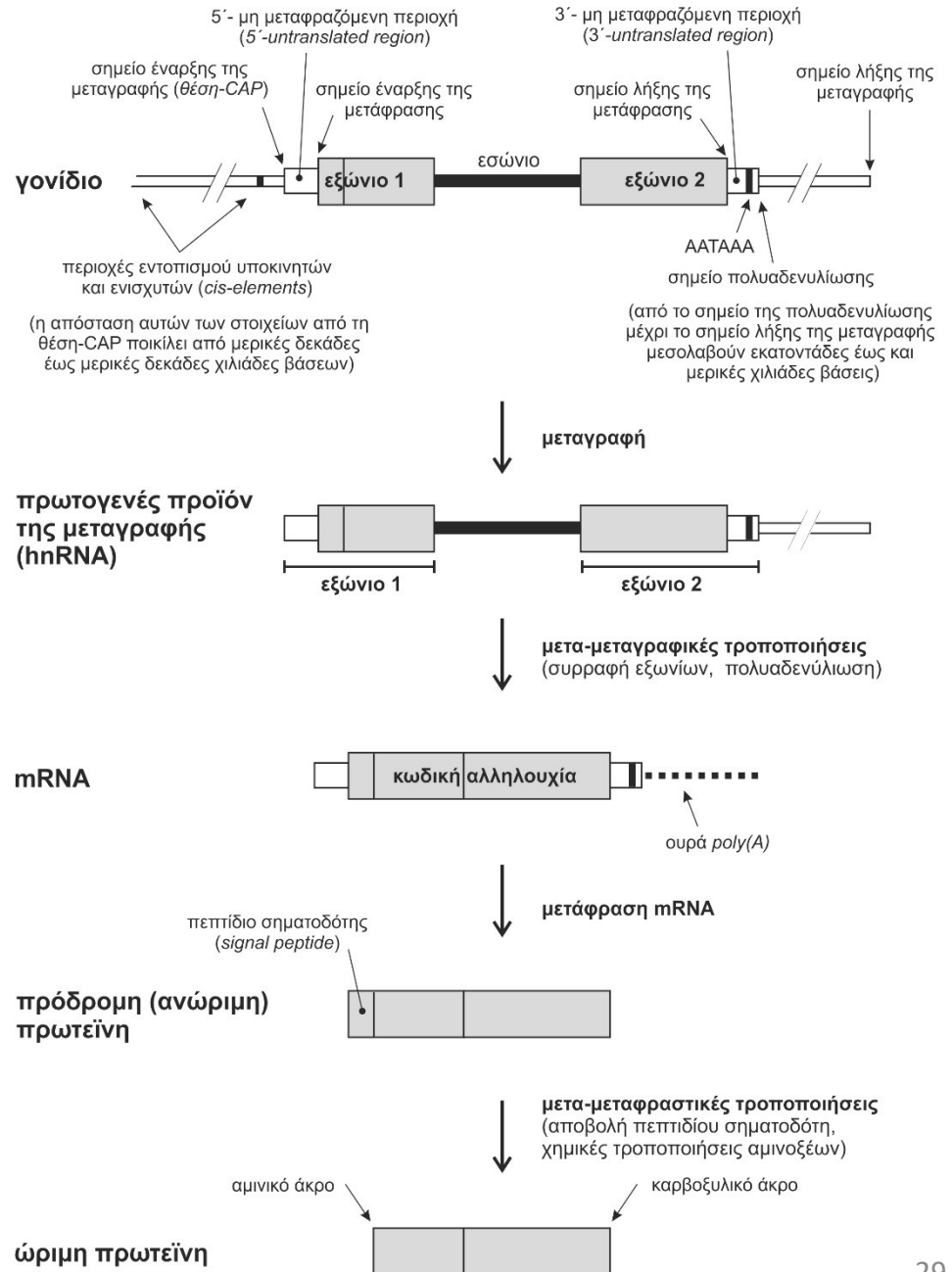
Συμπέρασμα: Όλες οι δυνατές διαδρομές είναι δυνατές, **εκτός** από αυτή που οδηγεί από πρωτεΐνη σε mRNA.

Γονίδιο: Ορισμός, Προκαρυωτικό - Ευκαρυωτικό

Προκαρυωτικό



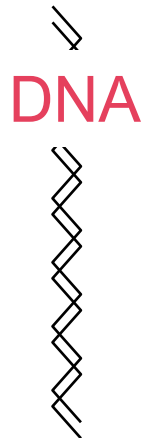
Ευκαρυωτικό



Ορισμός: Γονίδιο είναι το σύνολο των απαραίτητων DNA-αλληλουχιών για την κωδικοποίηση τουλάχιστον ενός λειτουργικού προϊόντος.

Σημείωση: Κατά συνθήκη θεωρούμε ως αρχή το σημείο έναρξης της μεταγραφής, και ως τέλος το σημείο πολυαδενυλίωσης.

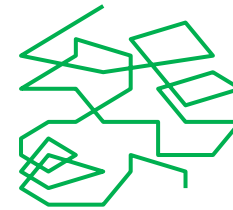
1 Γονίδιο → 1 ή περισσότερες λειτουργίες



RNA(s)

Πρωτεΐνη(ες)

Μεταγραφή / Μετάφραση



Γονιδιακή έκφραση

Γονίδιο

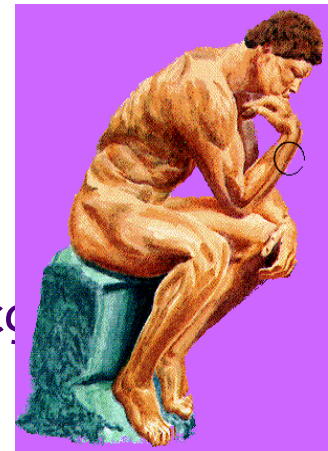


2-5 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

20.000 γονίδια

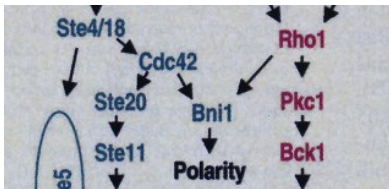
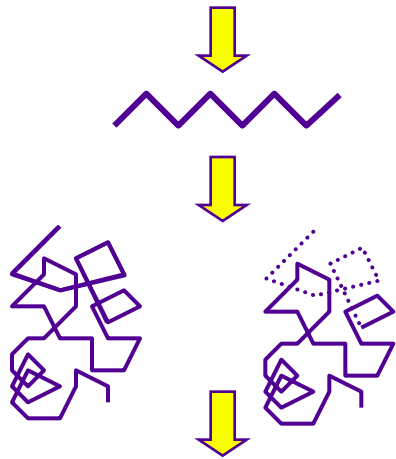


> 90.000 λειτουργίες



Η δομική γενωμική (genomics) κατάκτηση του σήμερα και τα «omics» ερωτηματικά του αύριο.

Structural genomics



Functional genomics. 1:
(transcriptomics)

Functional genomics. 2:
(Proteomics)

Metabolomics

Morphomics

Μέλλον
???

Προκλήσεις του μέλλοντος!!!!

- Ο ακριβής προσδιορισμός της λειτουργίας κάθε γονιδίου.
- Η αποκάλυψη του τρόπου ρύθμισης των γονιδίων, καθώς και του ρόλου του “πλεονάζοντος” DNA.
- Η πειραματική επιβεβαίωση της προβλεπόμενης λειτουργίας των γονιδίων.
- Ο προσδιορισμός του αριθμού των πρωτεϊνών και της λειτουργίας τους για κάθε κυτταρικό τύπο.
- Η αποκάλυψη του τρόπου αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών μεταξύ τους, αλλά και με τα υπόλοιπα βιομόρια του κυττάρου.
- Ο συσχετισμός των πολυμορφισμών κάθε ατόμου με την υγεία και τις ασθένειες.

Το βραβείο Νόμπελ Χημείας 2020 απονεμήθηκε στις Emmanuelle Charpentier και Jennifer A. Doudna «για την ανάπτυξη μιας μεθόδου για την επεξεργασία γονιδιώματος».

Γενετικό ψαλίδι: ένα εργαλείο για την επανεγγραφή του κώδικα της ζωής

Η Emmanuelle Charpentier και η Jennifer A. Doudna ανακάλυψαν ένα από τα πιο αιχμηρά εργαλεία της τεχνολογίας των γονιδίων: το γενετικό ψαλίδι CRISPR / Cas9.

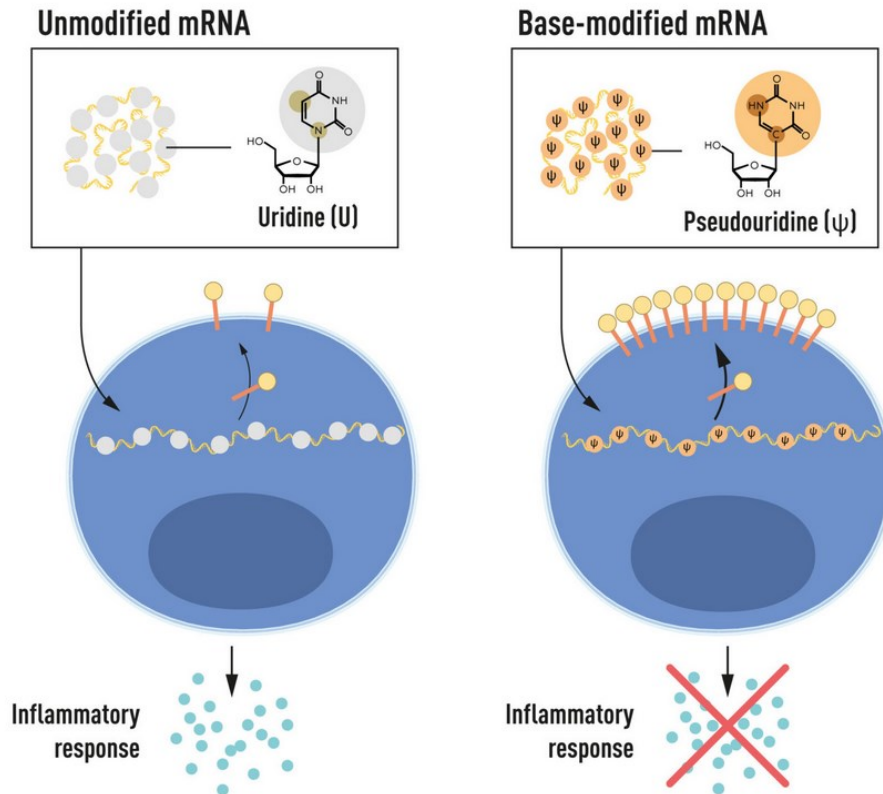


Jennifer Doudna and Emmanuelle Charpentier share the 2020 Nobel chemistry prize for their discovery of a game-changing gene-editing technique. Credit: Alexander Heinel/Picture Alliance/DPA

Χρησιμοποιώντας αυτά τα εργαλεία, οι ερευνητές μπορούν να αλλάξουν το DNA των ζώων, των φυτών και των μικροοργανισμών με εξαιρετικά υψηλή ακρίβεια. Αυτή η τεχνολογία έχει επαναστατικό αντίκτυπο στις βιοεπιστήμες, συμβάλλει σε νέες θεραπείες για τον καρκίνο και μπορεί να κάνει πραγματικότητα το όνειρο της θεραπείας των κληρονομικών ασθενειών.

Νόμπελ Ιατρικής 2023:

Απονεμήθηκε στους Katalin Kariko και Drew Weissman, για τις ανακαλύψεις τους σχετικά με τις τροποποιήσεις των νουκλεοσιδικών βάσεων που επέτρεψαν την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων mRNA κατά του COVID-19.



Ανακάλυψαν ότι το τροποποιημένο mRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εμποδίσει την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών αντιδράσεων και να αυξήσει την παραγωγή πρωτεϊνών όταν το mRNA παραδίδεται στα κύτταρα.

Είχαν δημοσιεύσει τα ευρήματά τους σε μια σημαντική εργασία του 2005, η οποία έτυχε λίγης προσοχής εκείνη την εποχή, αλλά έθεσε τα θεμέλια για κρίσιμα σημαντικές εξελίξεις στην υπηρεσία την ανθρωπότητα κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19.