

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Παρουσίαση 3

*Μπράλιου Γεωργία
Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Παρουσίαση 3

1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΤΚΛΟΣ

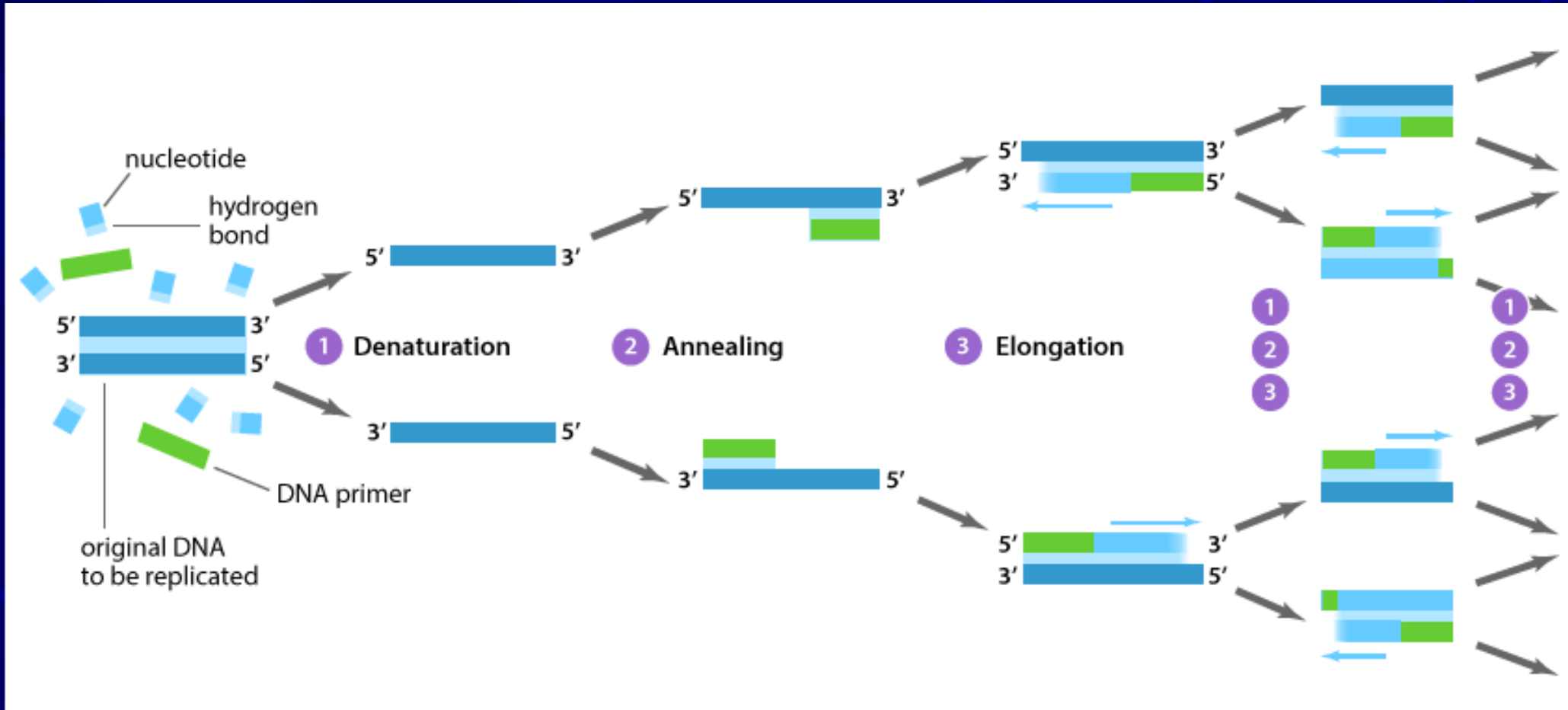
- a. Μίτωση
- b. Μείωση

2. ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ & ΝΟΥΚΛΕΟΣΩΜΑΤΑ

3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

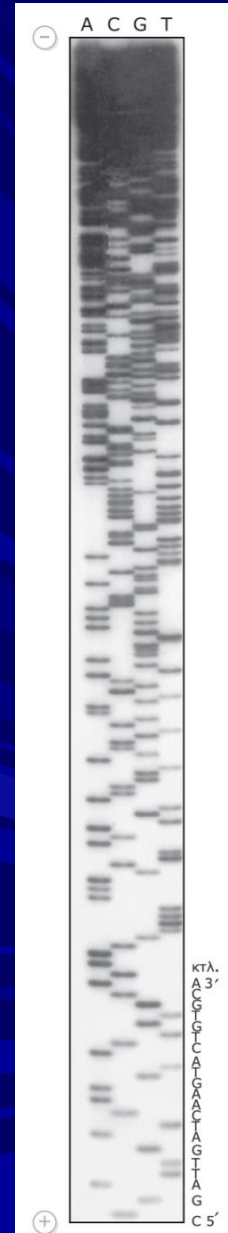
- a. Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων
- b. Περιοριστικά ένζυμα (ενδονουκλεάσες)
- c. Δημιουργία ανασυνδυασμένων τμημάτων
- d. Συμπληρωματικό DNA (cDNA)
- e. Κλωνοποίηση γονιδίου
- f. Γονιδιωματικές βιβλιοθήκες
- g. Μοριακός υβριδισμός
- h. Αποτύπωση κατά Southern & Northern
- i. Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR
- j. Προσδιορισμός αλληλουχίας DNA

i. Αλυσιωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR



j. Προσδιορισμός αλληλουχίας DNA

Αυτοραδιογράφημα ενός πηκτώματος αλληλούχισης.



ΕΙΚΟΝΑ 4.12: Η διαδικασία αλληλούχησης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων.

(a)

Δίκλωνο DNA



Δημιουργία μονόκλωνης μήτρας



Πραγματοποίηση τεσσάρων αντιδράσεων

Νουκλεοτίδιο

A

T

G

C

Μείγμα νουκλεοτιδίων

dATP
dTTP
ddTTP
dGTP
dCTP

dATP
ddATP
dTTP
dGTP
dCTP

dATP
dTTP
dGTP
dCTP
ddGTP

dATP
dTTP
dGTP
ddGTP
dCTP

Προσθήκη DNA πολυμεράσης

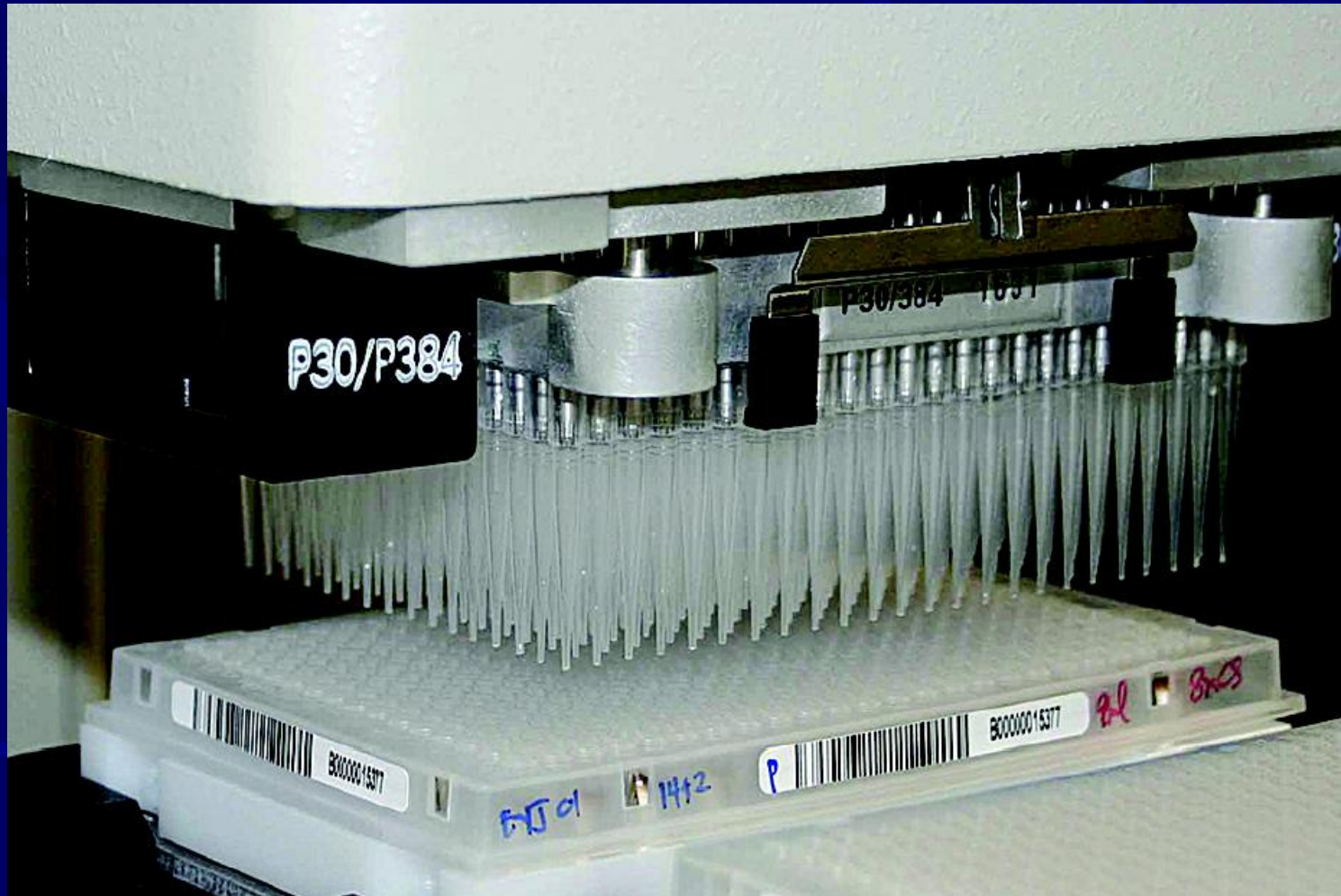


<https://www.dnalc.org/view/15479-Sanger-method-of-DNA-sequencing-3D-animation-with-narration.html>

<https://www.youtube.com/watch?v=lcqamuB6aLI>

<https://www.youtube.com/watch?v=vK-HIMaitnE>

ΕΙΚΟΝΑ 10.7: Η εισαγωγή ρομποτικών συσκευών αύξησε σημαντικά την παραγωγικότητα των προγραμμάτων αλληλούχισης γονιδιωμάτων.



Τεχνική Hunkapiller and Hood

- Κάθε διαφορετικό ddNTP έχει διαφορετικό χρώμα
- Γίνεται μια αντίδραση και με τα 4 ddNTPs
- Διαβάζεται με leizer
- Δυνατότητα αυτοματισμού
- Χρήση τριχοειδών σωληναρίων

(α)

dATP ddGTP (Yellow)

dGTP ddATP (Green)

dCTP ddTTP (Red)

dTTP ddCTP (Blue)

και

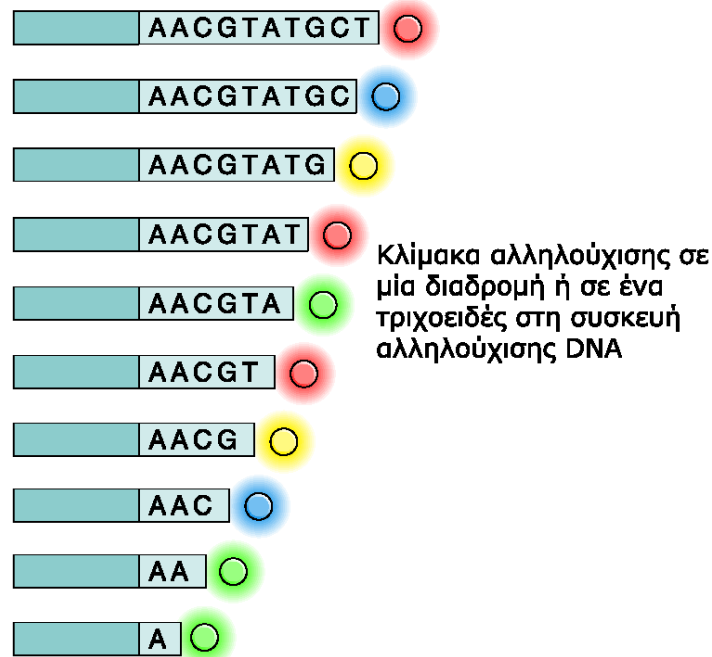
Μήτρα

Εκκινητής

DNA πολυμεράση

Αντίδραση Sanger

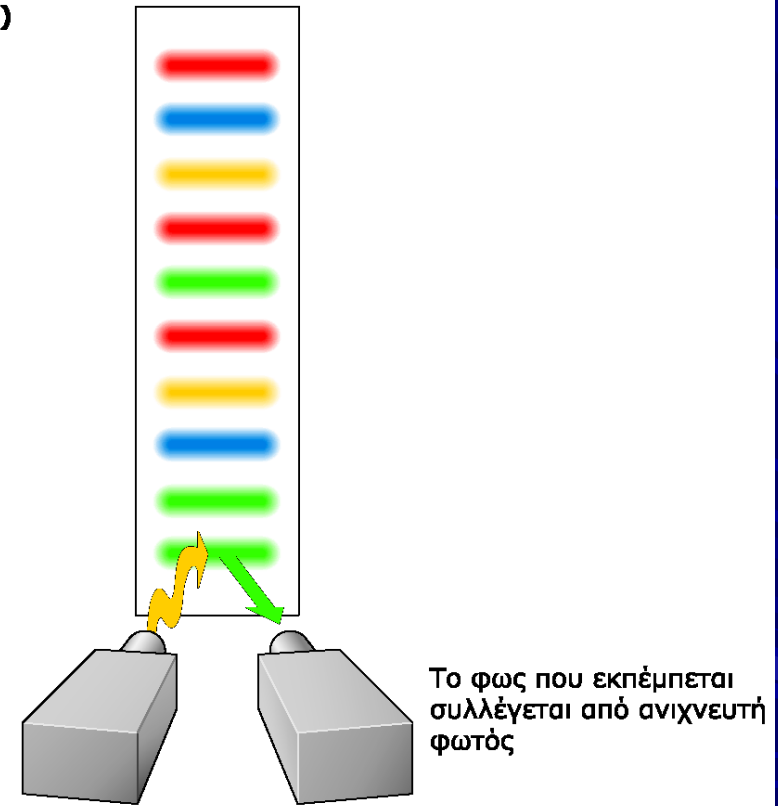
Ηλεκτροφόρηση σε συσκευή αλληλούχισης
σε πήκτωμα ή σε τριχοειδές



Αλληλουχία από κάτω προς τα πάνω
AACGTATGCT

- Κάθε διαφορετικό ddNTP έχει διαφορετικό χρώμα
- Γίνεται μια αντίδραση και με τα 4 ddNTPs
- Διαβάζεται με laser

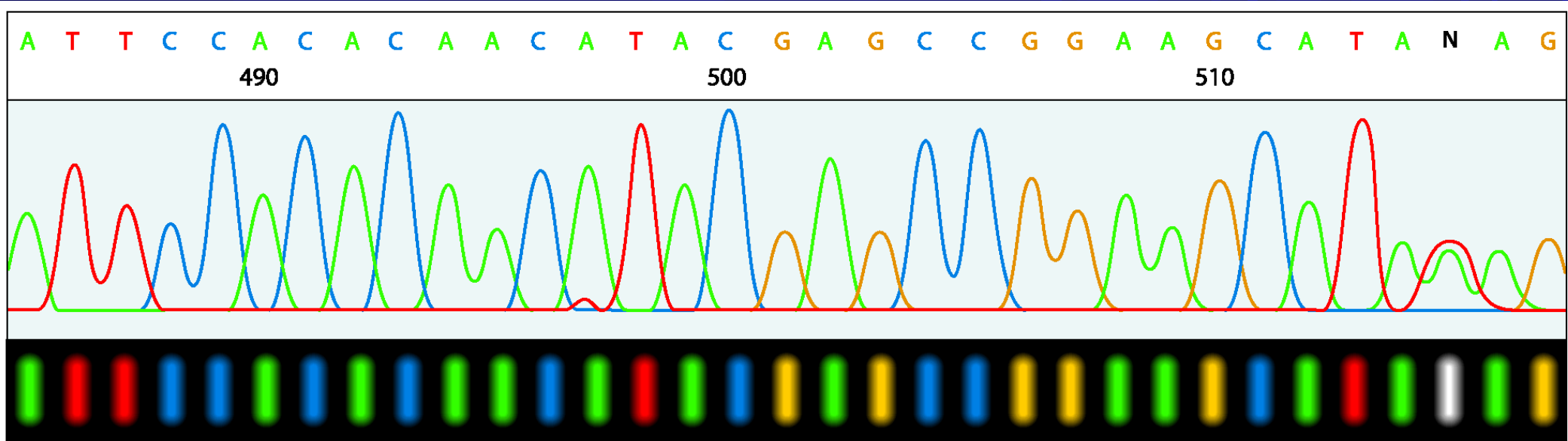
(β)



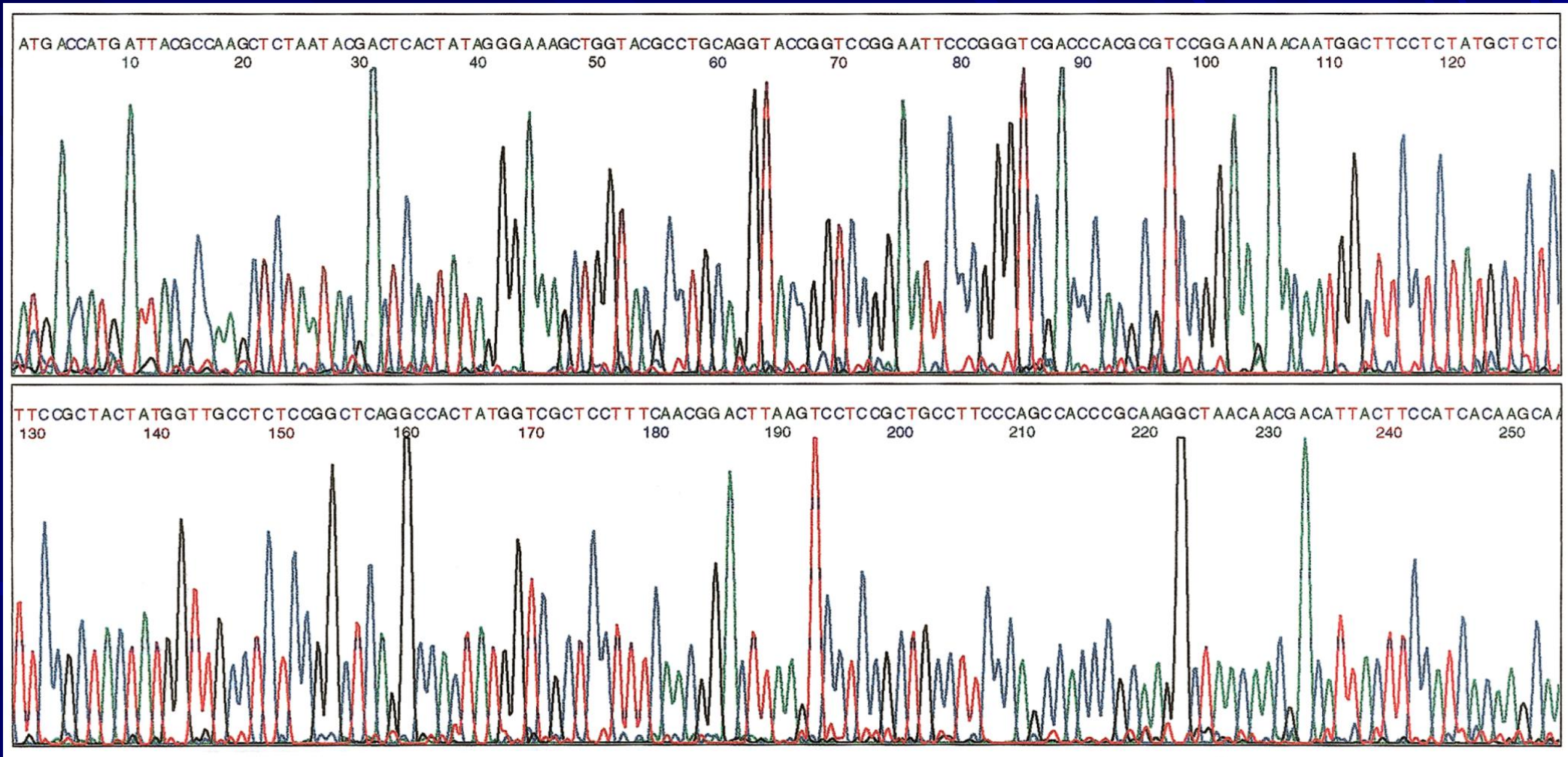
Ακτίνα λέιζερ
σάρωσης διεγείρει τις
φθορίζουσες
χρωστικές, καθώς τα
τμήματα DNA
περνούν κατά την
ηλεκτροφόρηση

Τα δεδομένα
στέλλονται σε
υπολογιστή

ΕΙΚΟΝΑ 10.13: Το αρχείο γραφήματος εκπομπής περιέχει την απεικόνιση των αποτελεσμάτων μιας αντίδρασης αλληλούχισης όπως παράγονται από έναν αυτόματο αναλυτή.



Αποτελέσματα αυτοματοποιημένης αλληλούχισης με διδεοξυ-νουκλεοτίδια σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές.



ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Παρουσίαση 4

*Μπράλιου Γεωργία
Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Διάλεξη 4

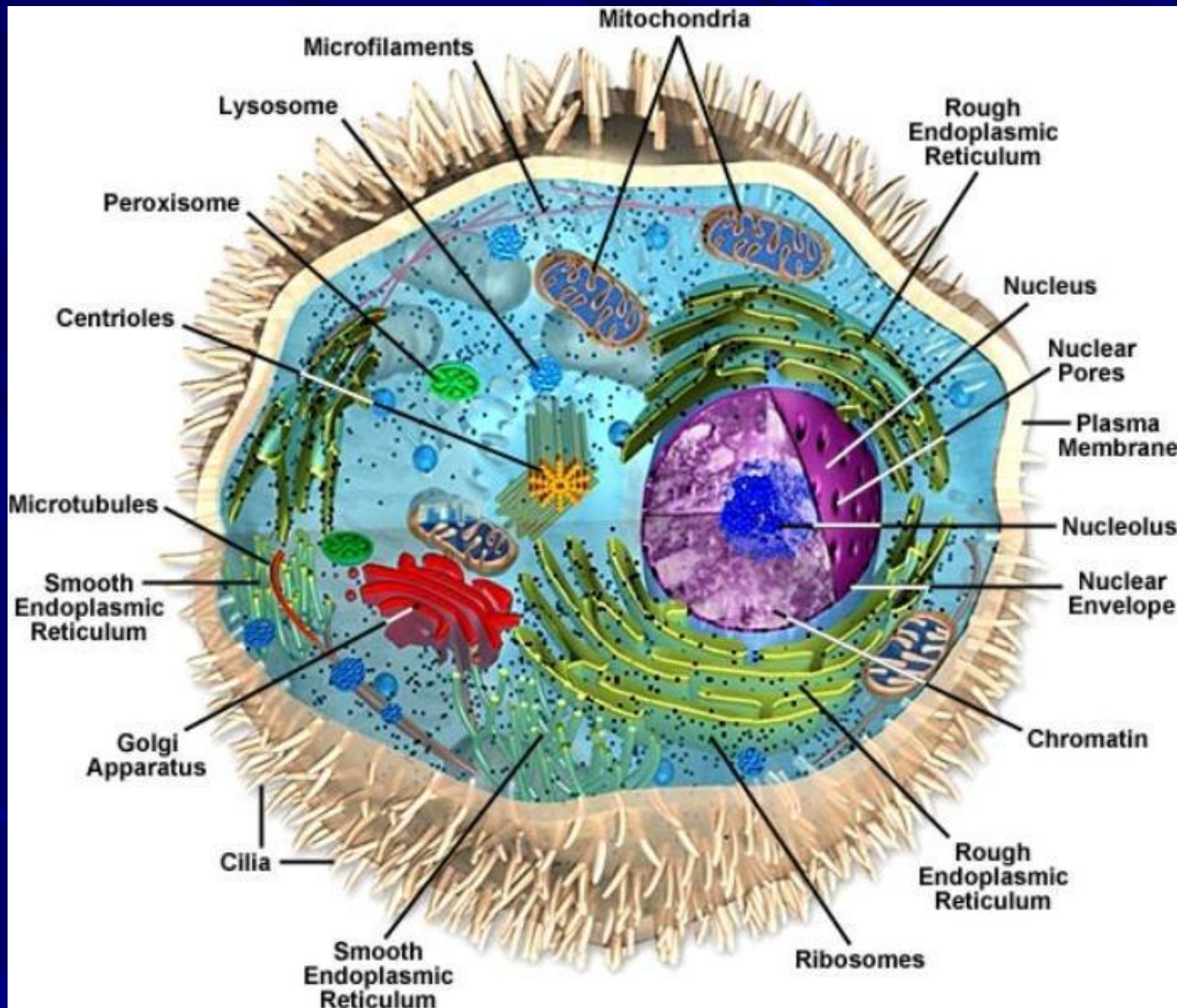
• ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

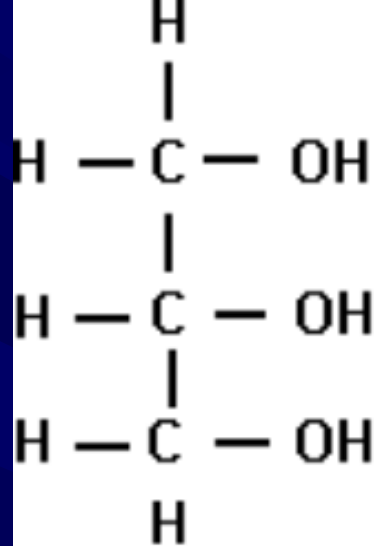
- Δομή μεμβρανών (πάχος 5nm, 50 άτομα)
- Μεμβρανική μεταφορά
- Φραγμοί
- Μεμβρανικές πρωτεΐνες
- Λειτουργίες μεμβρανικών πρωτεϊνών
- Δίαυλοι-μεταφορείς-δυναμικό της μεμβράνης
- G -protein coupled receptors (GPCRs)

• ΓΕΝΕΤΙΚΗ

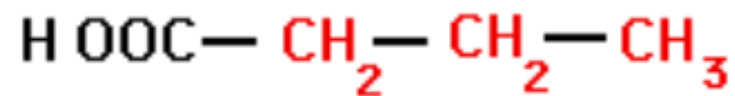
Λιπαρά οξέα

- Μακριές ανθρακικές αλυσίδες
- -COOH ομάδα
- Σχηματίζουν τα λιπίδια
- Αποθήκευση ενέργειας
- Συστατικά των μεμβρανών

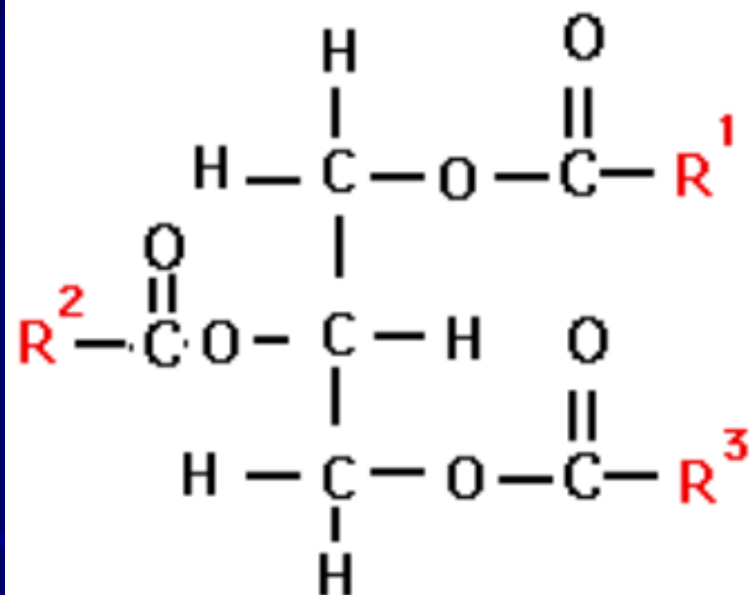




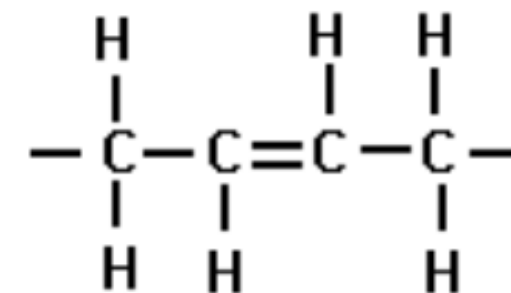
Glycerol



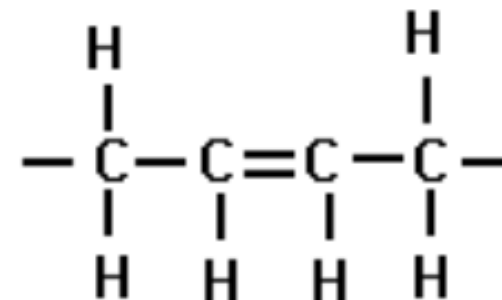
Saturated Fatty Acid (Butyric acid)



Triglyceride



Trans double bond

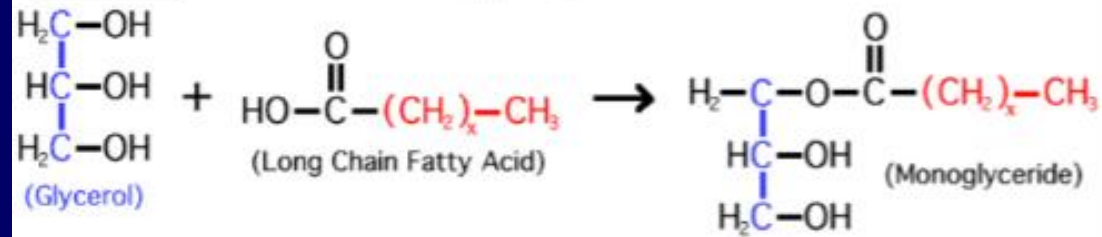


Cis double bond

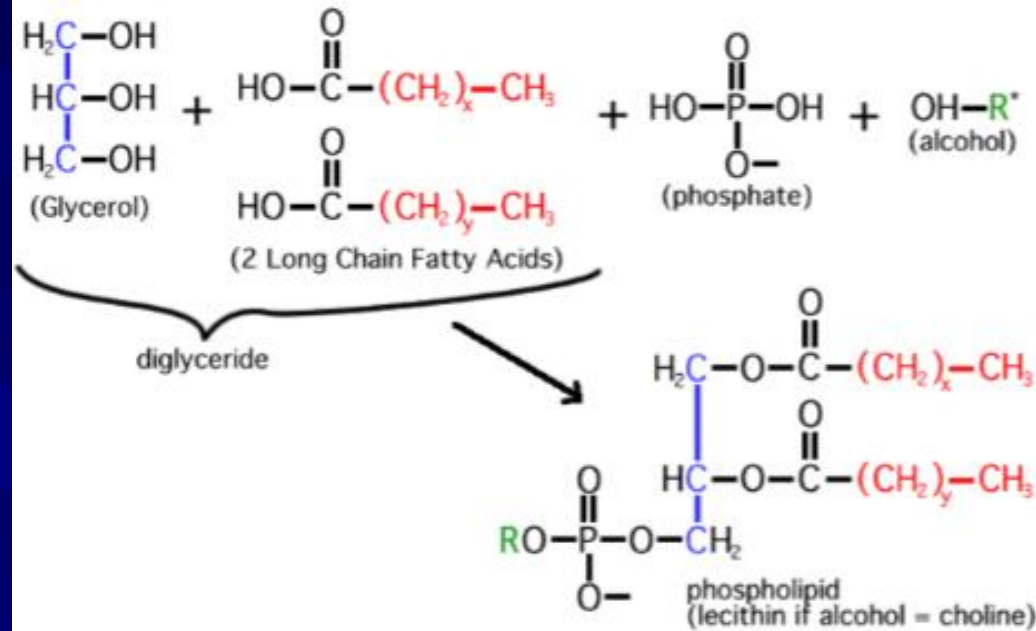
Unsaturated

Lipids

Neutral Fat



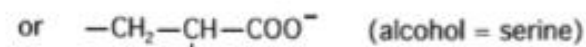
Phospholipid



Another way to draw phospholipids:

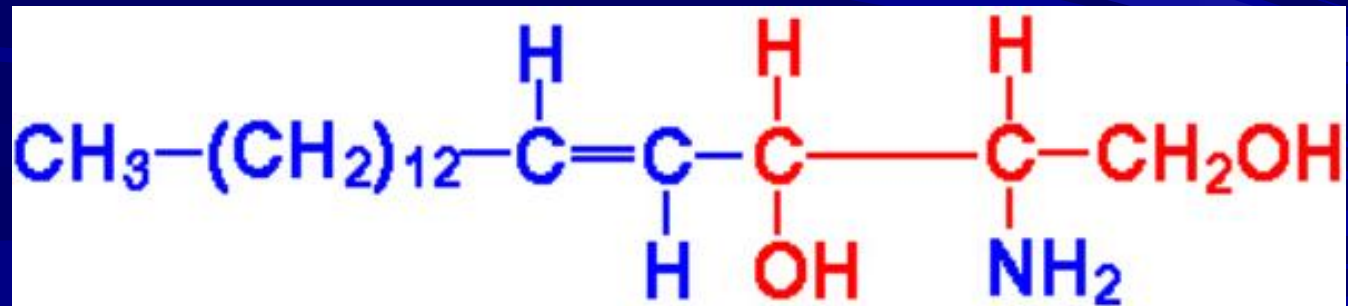
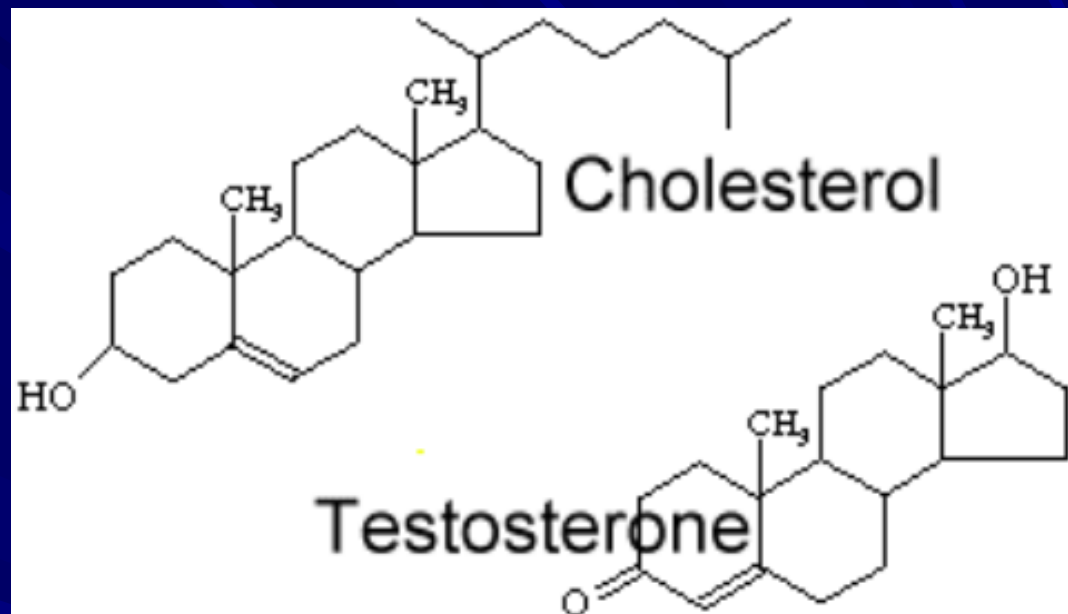
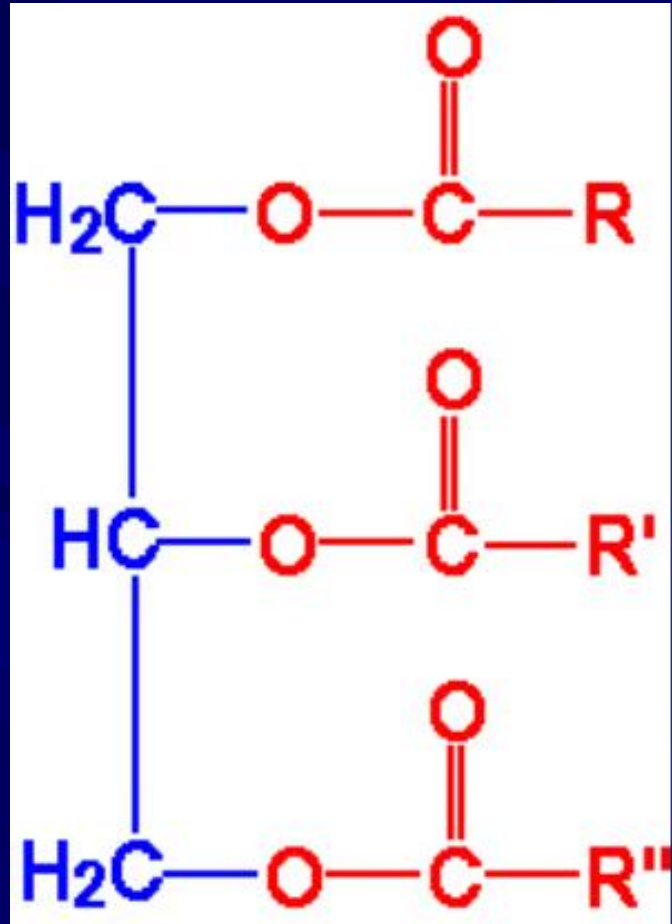


*R can = -H (alcohol = H₂O)



etc.

x and y are typically between 12 and 18



Φωσφολιπίδια

- Το πιο κοινό η φωσφατιδυλοχολίνη
- Αμφιπαθή μόρια (με υδρόφιλες και υδρόφοβες ιδιότητες)
- Δημιουργία κλωβών σε νερό
- Δημιουργία λιπιδικής διπλοστιβάδας
- Δεν υπάρχουν ελεύθερα ανοικτά άκρα (μόνο κλειστά διαμερίσματα)

Phospholipid



Phosphatidylcholine

Triglyceride



Triacylglycerol

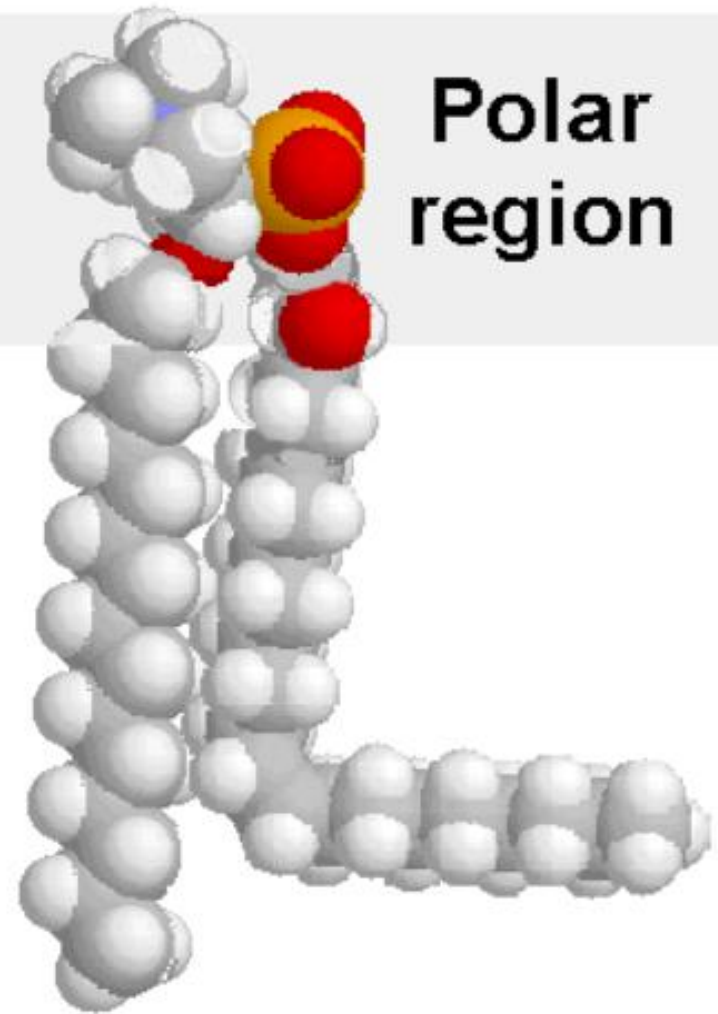
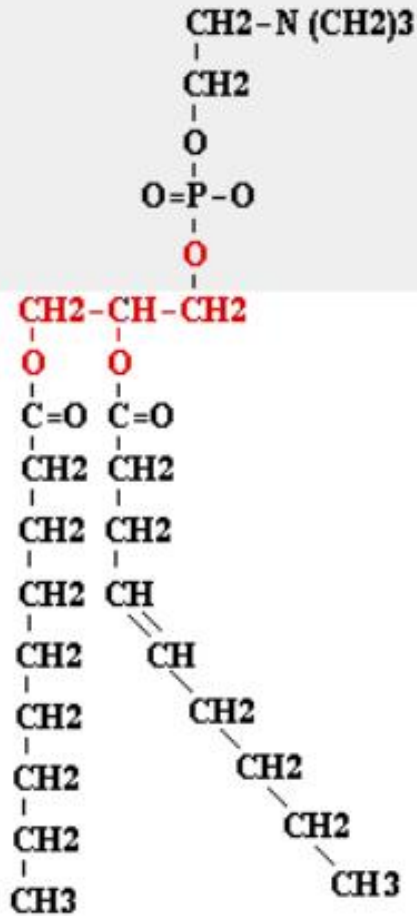
Steroid



Cholesterol

Lipid

Phospholipids



a This phospholipid molecule . . .

Polar "head"

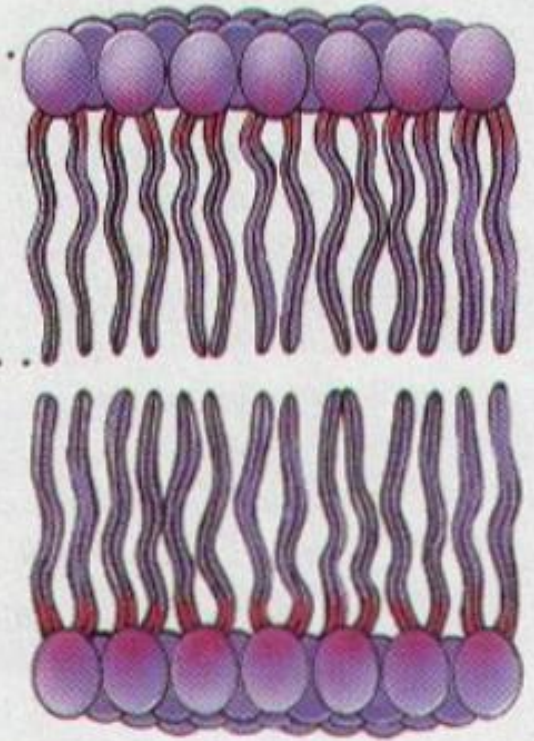


Nonpolar "tails"

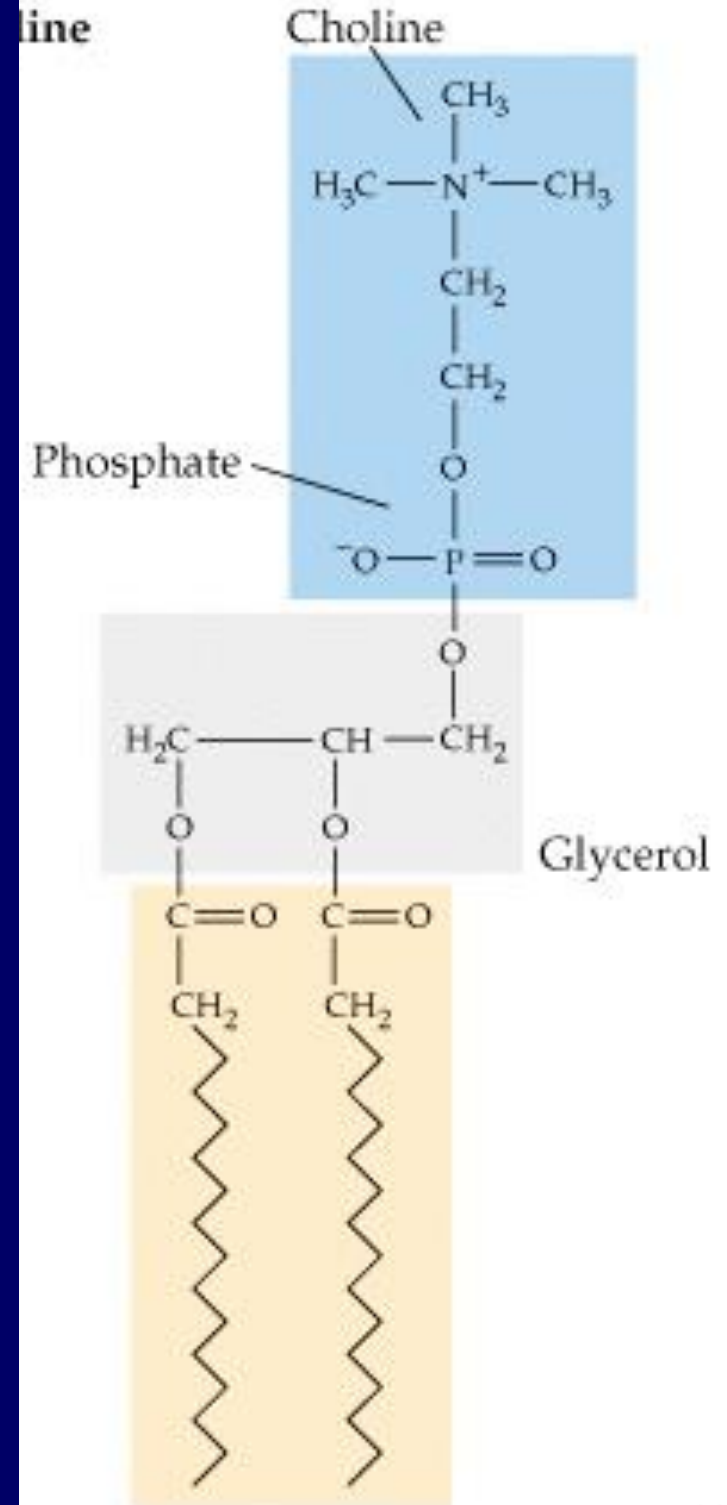
b . . . is part of a lipid bilayer.



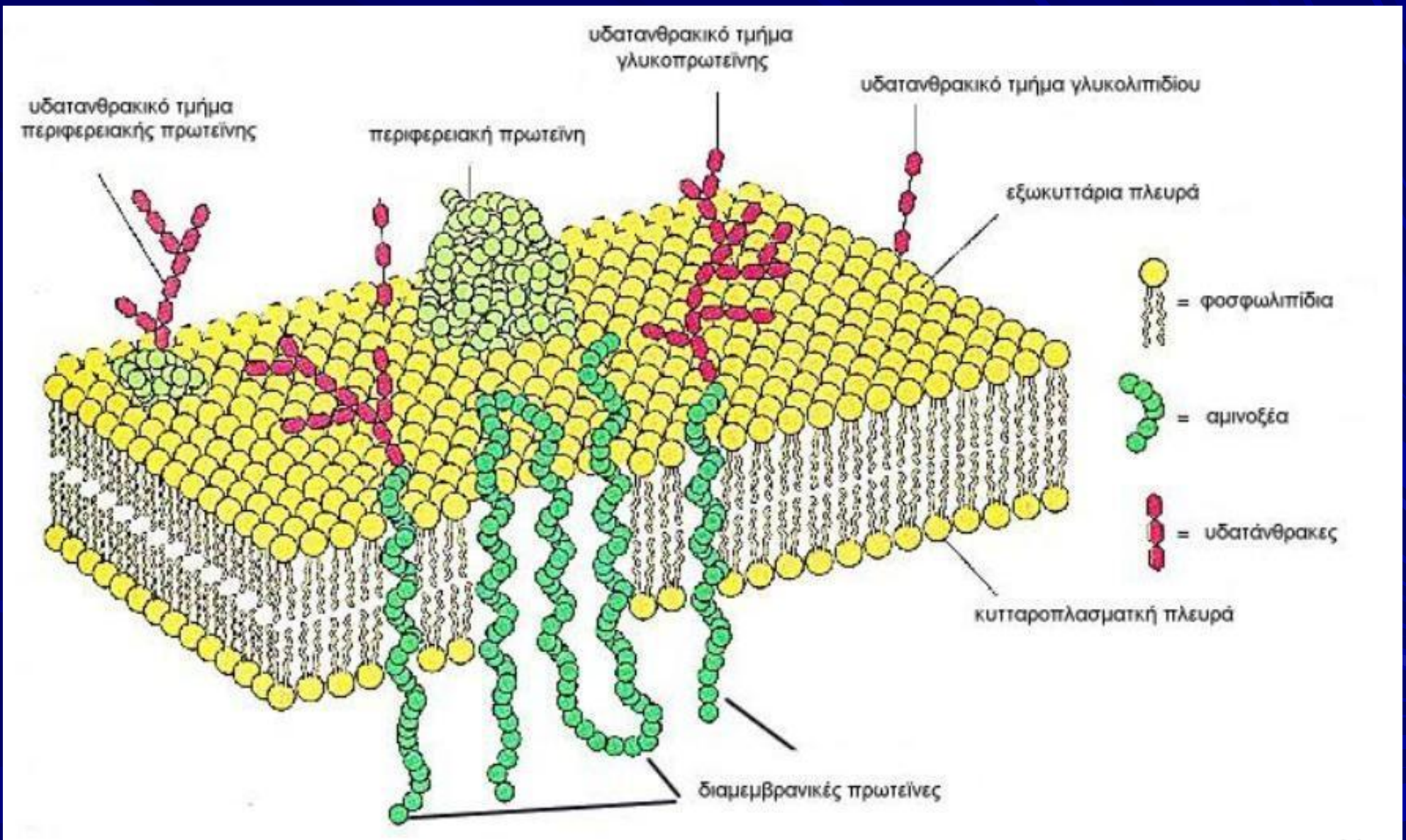
c The lipid bilayer forms the framework of the cell membrane.



φωσφατιδυλοχολίνη



Δομή της μεμβράνης

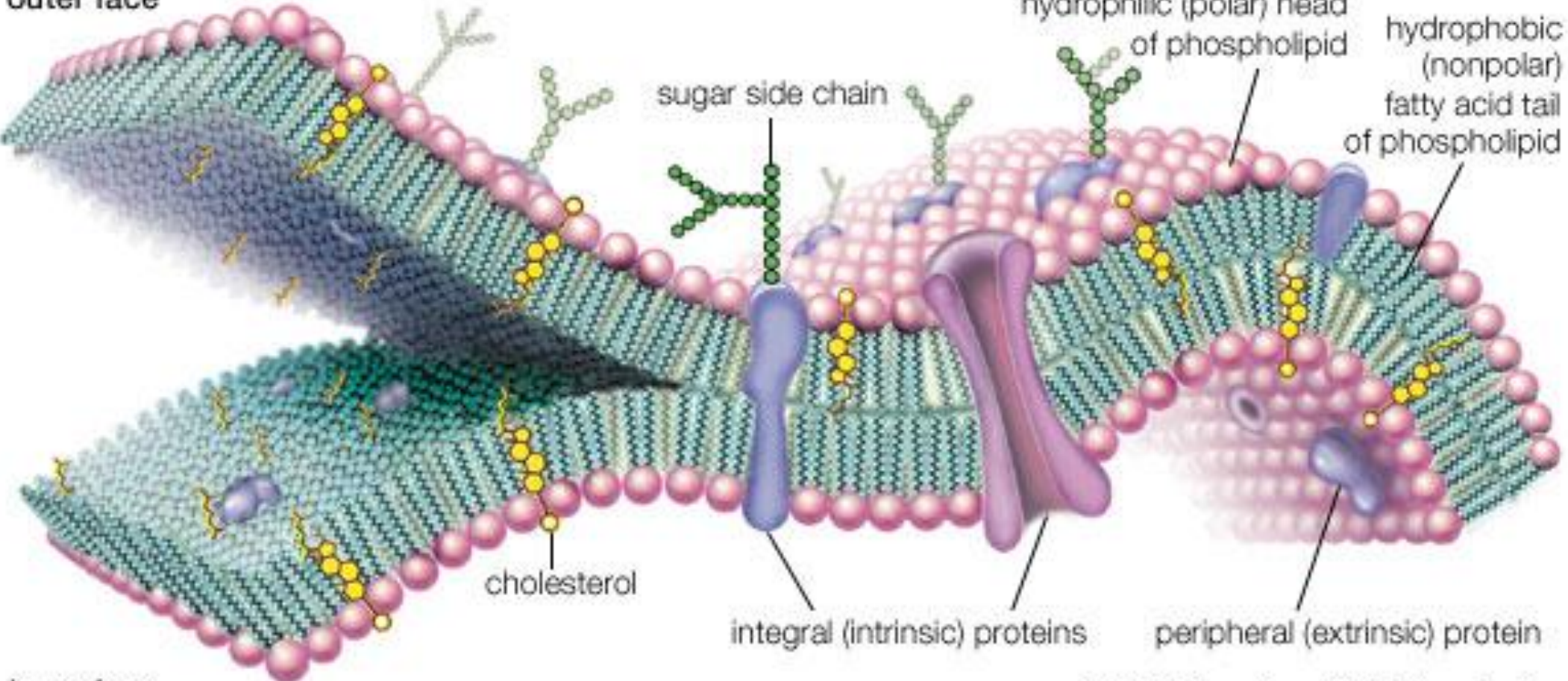


Λιπιδική διπλοστιβάδα

- Δισδιάστατο ρευστό μωσαϊκό
- Ευλυγισία
- Ρευστότητα εξαρτάται από αναλογία κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων
- Ασυμμετρία (Γλυκολιπίδια προς τα έξω)
- Η χοληστερόλη την καθιστά λιγότερο εύκαμπτη

<https://www.youtube.com/watch?v=K7yku3sa4Y8&feature=related>

outer face



hydrophilic (polar) head of phospholipid

hydrophobic (nonpolar) fatty acid tail of phospholipid

sugar side chain

cholesterol

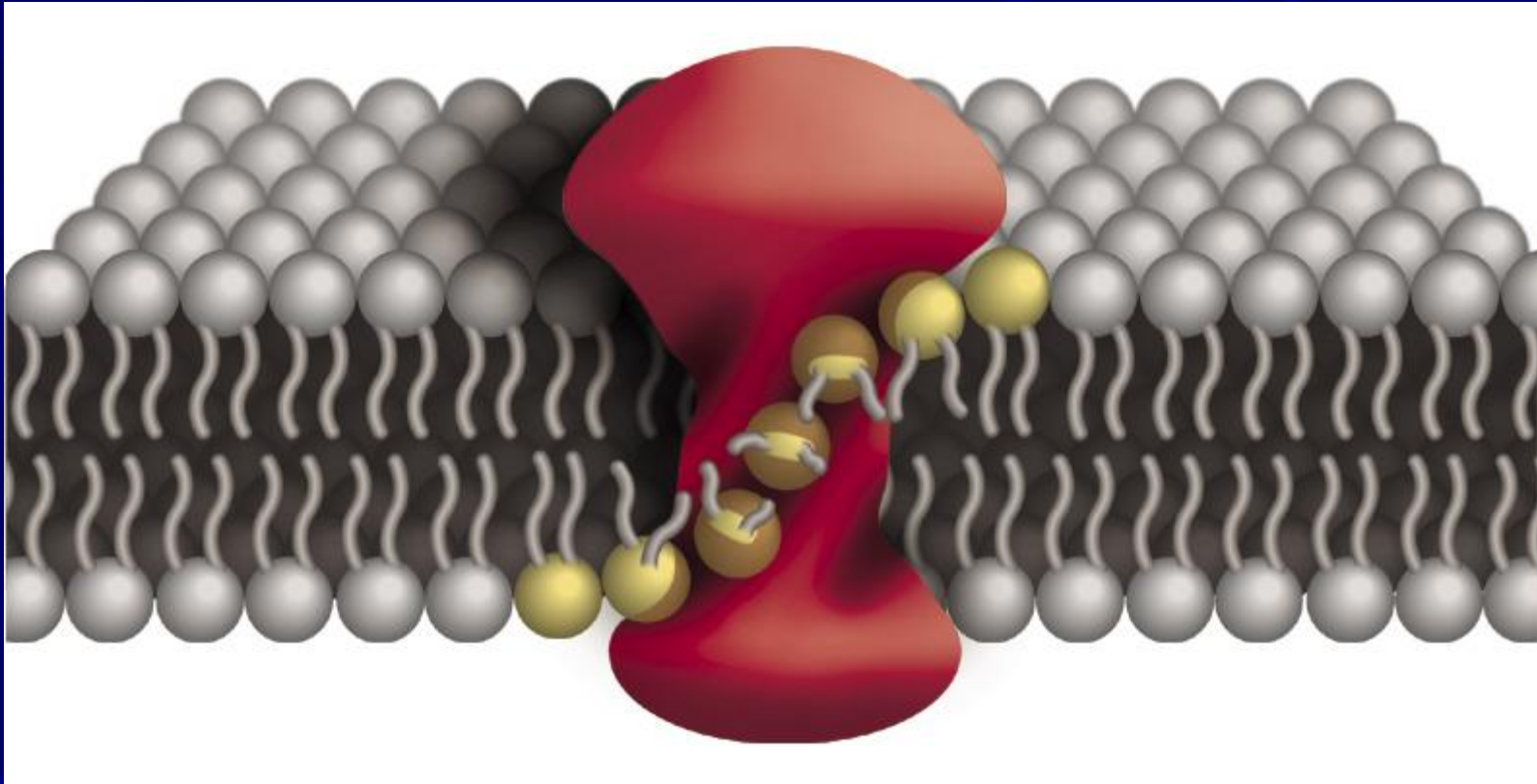
integral (intrinsic) proteins

peripheral (extrinsic) protein

inner face

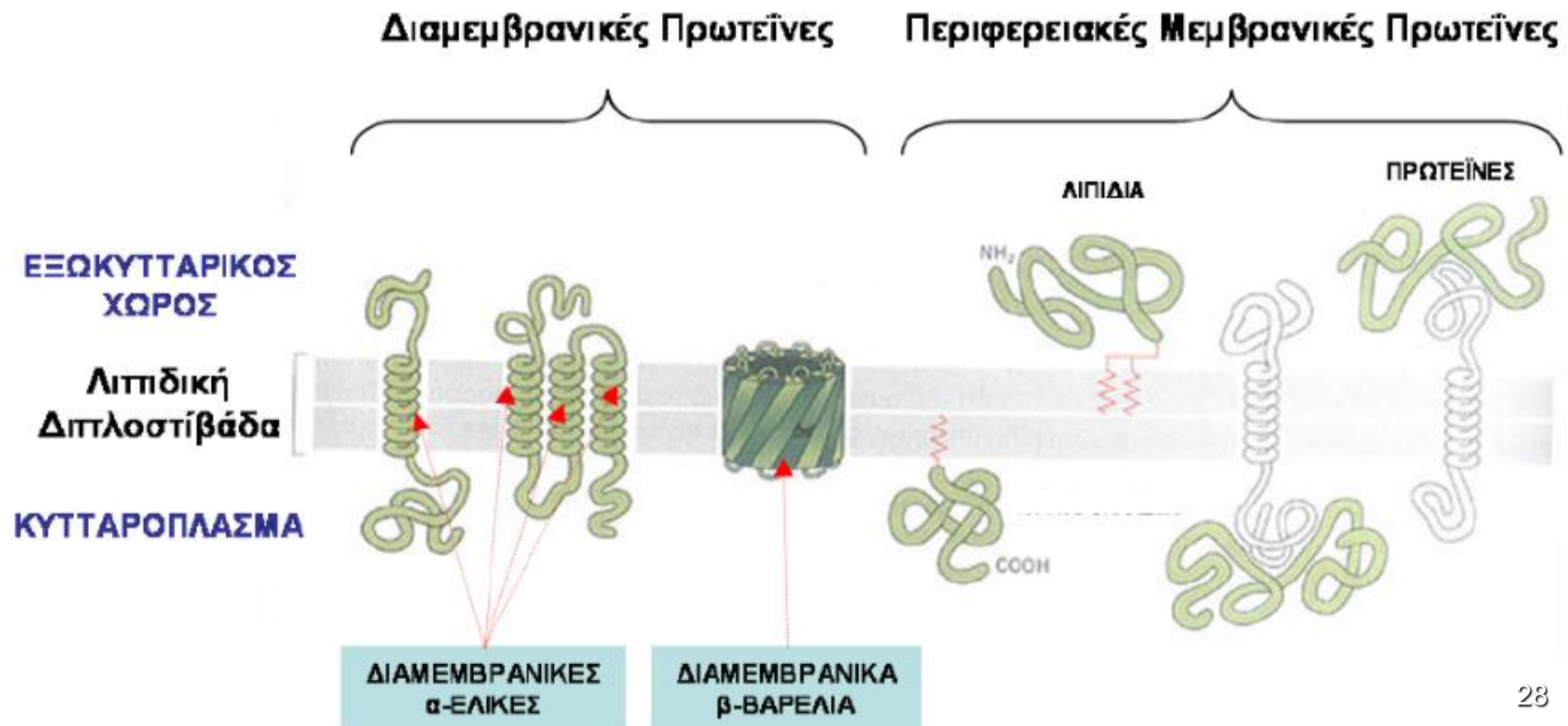
© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.

Flippases



Μεμβρανικές πρωτεΐνες

- (50% της μεμβράνης στα ζώα)
- 50 φορές περισσότερα τα λιπίδια από ότι οι πρωτεΐνες (λόγω μικρού MB)



Amino terminus

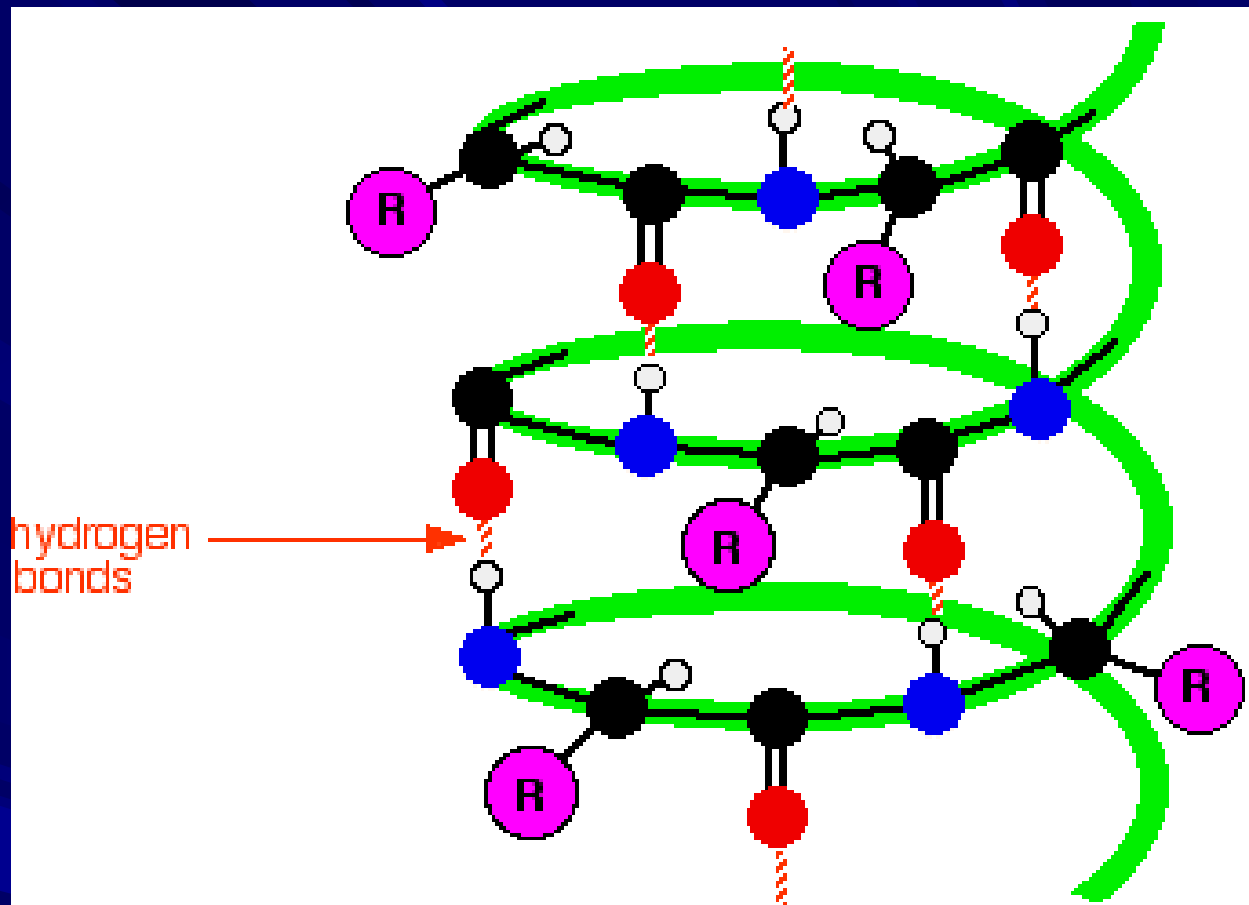
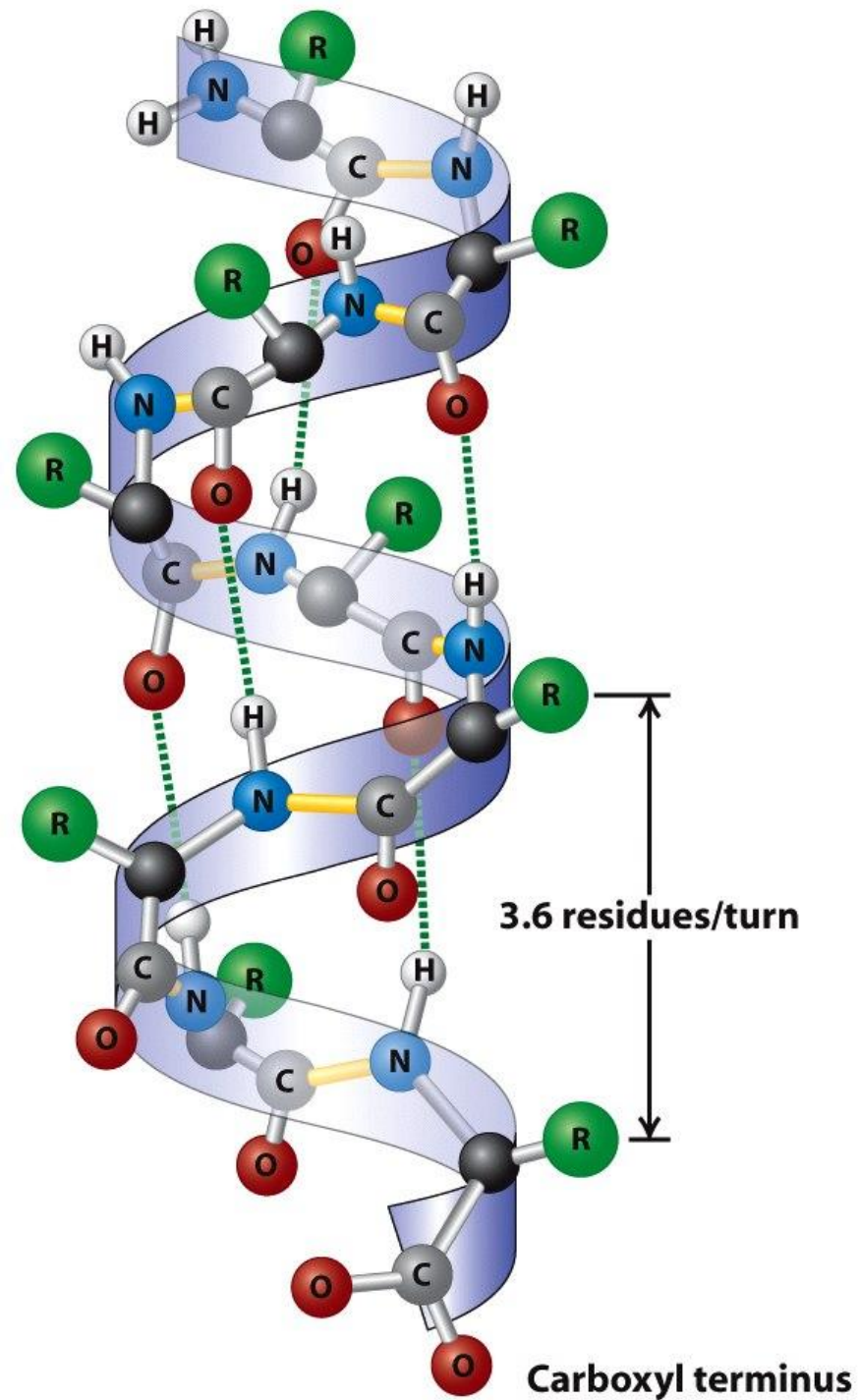


Figure 3-4
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Λειτουργίες «ενσωματωμένων» μεμβρανικών πρωτεϊνών

1. Υποδοχείς

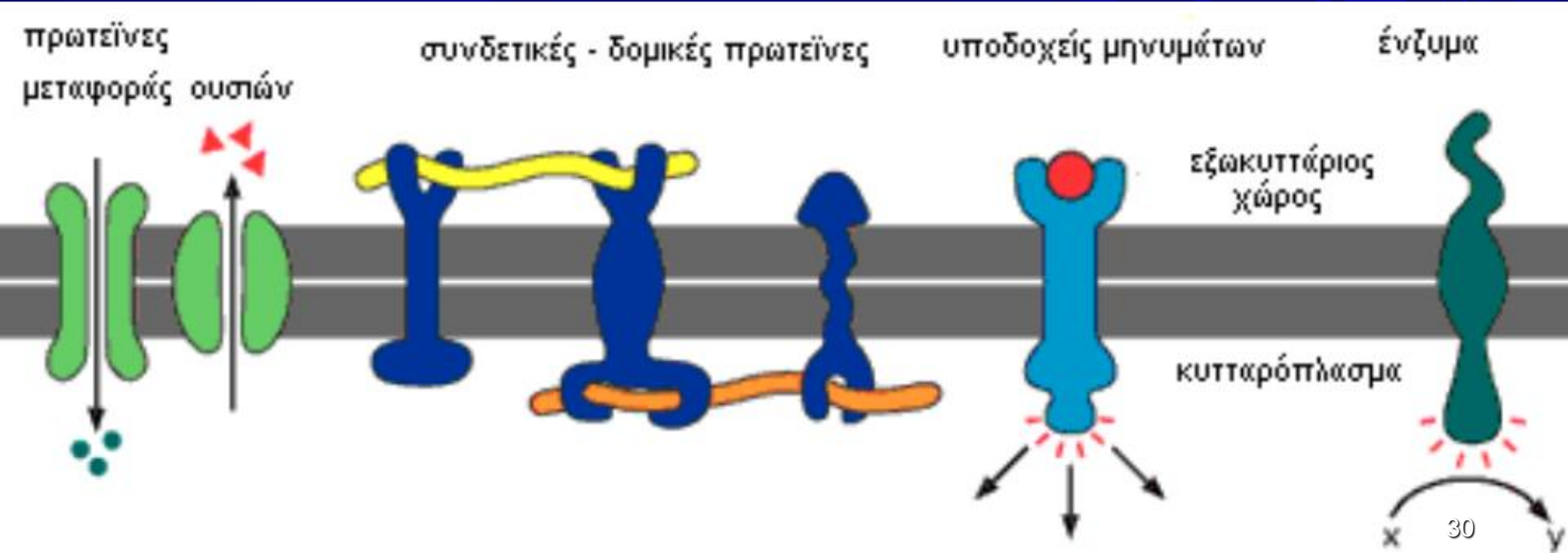
2. Ένζυμα

3. Μεταφορείς ουσιών

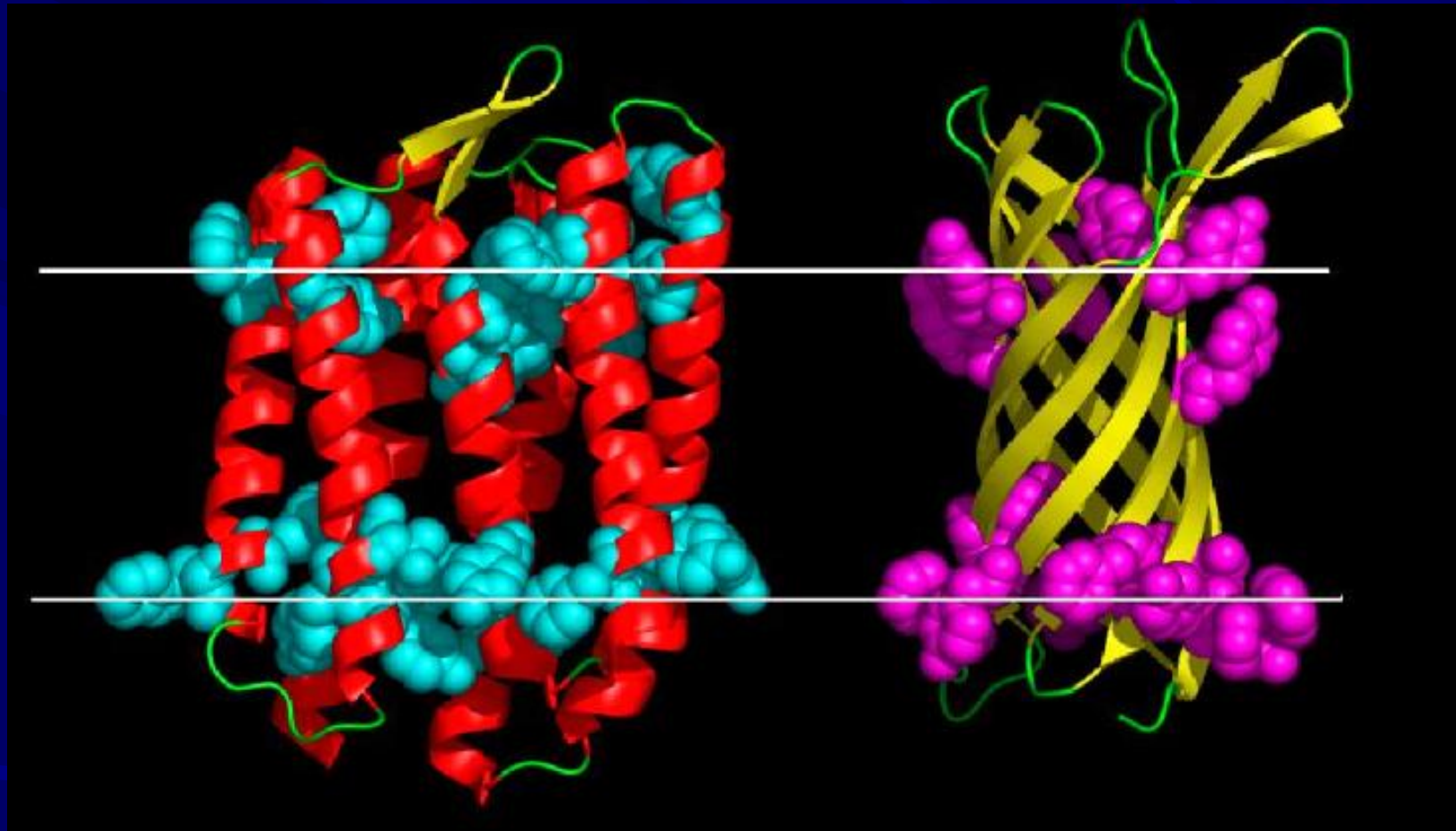
1. Επικοινωνία

2. Συγκόλληση (κυτταρική)

3. Μετατροπείς ενέργειας



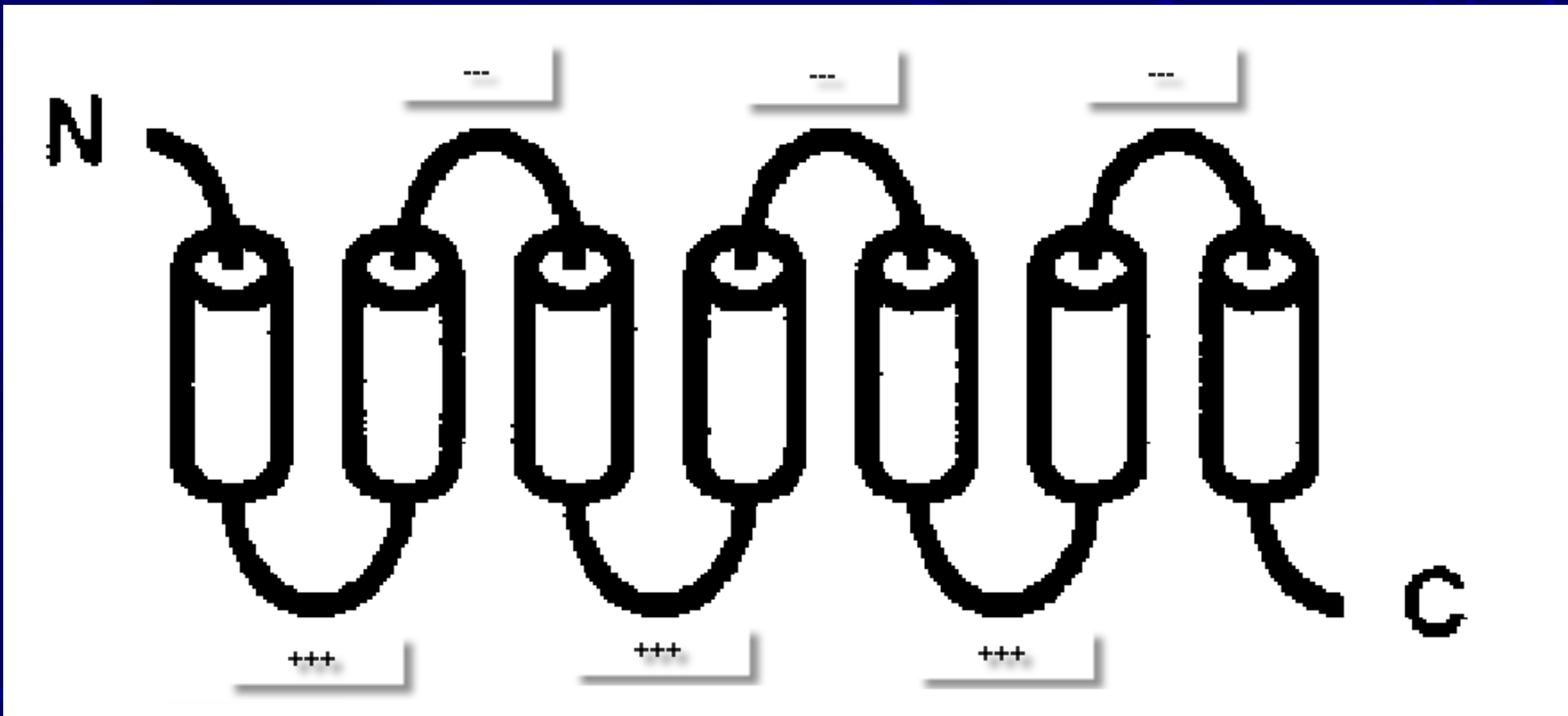
Οι δύο κύριες δομικές κατηγορίες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών



α -helical membrane proteins **β -barrel** membrane proteins

α-helical membrane proteins

- Υδρόφοβα κατάλοιπα (15-35)
- Σχετικά μικρές γωνίες ως προς την μεμβράνη
- “Positive-inside” rule



List

Save

0 saved buffers

Load #

Delete #

Comment #

Move Cursor With Mouse OR Arrow Keys.

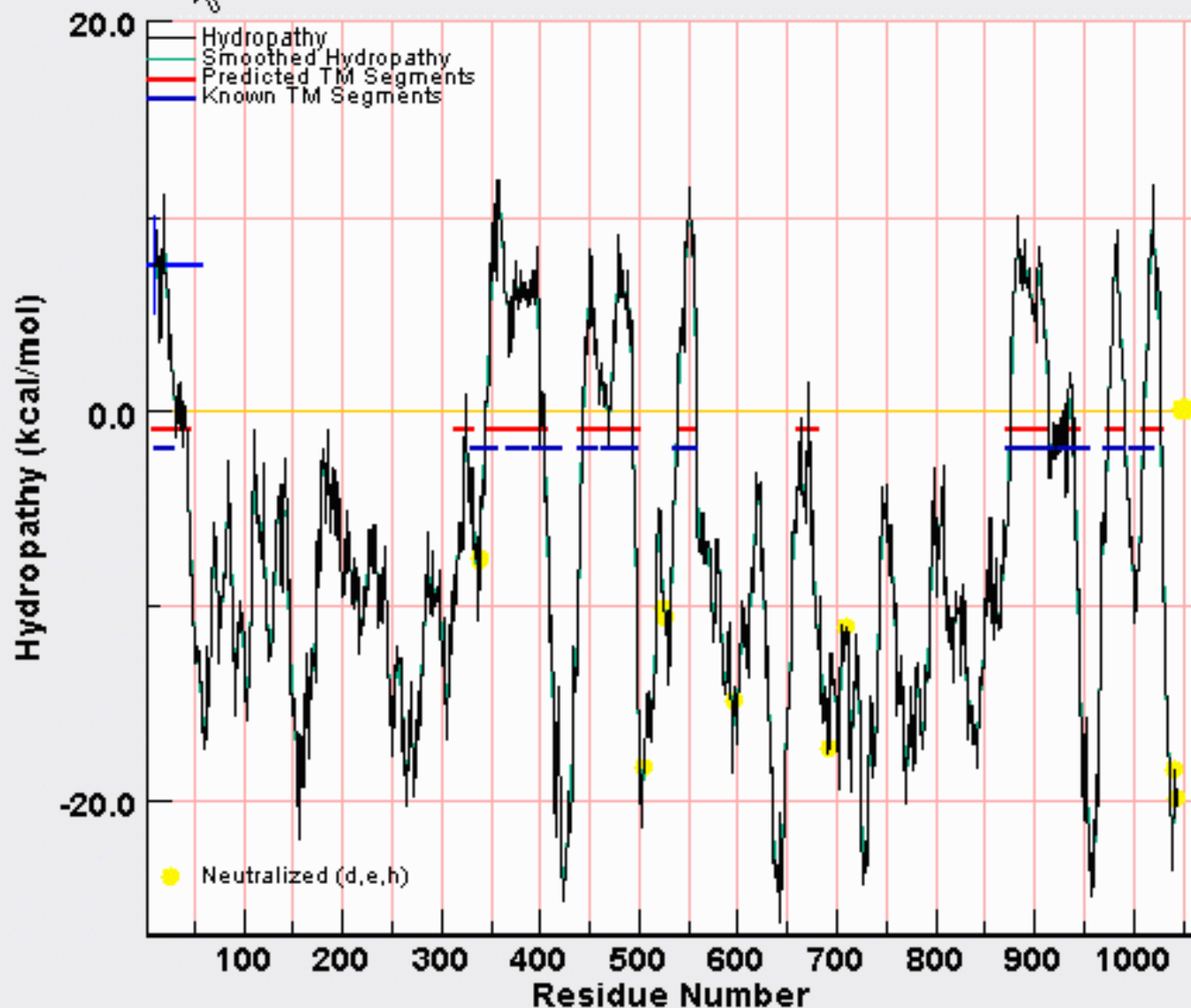
Cursor is at :

101

MPEX Hydropathy Plot

Sequence Description: AcrB multidrug transporter (E. coli)

Loaded from buffer: 0



Scale: WW Octanol

Residue at Cursor: 101

Partitioning: bilayer to water

 ΔG for Window: 7.49

Send Cursor To

Select Wimley-White Scale:

 Interfacial (IF) Octanol (Oct) Oct-IF

Select Mode:

 Locate Scan

Set Window Length

19

Residues in Window:

MPNFFIDRPIFAWVIAIII

Send To Totalizer

Set Salt Bridges

Change Charge

101

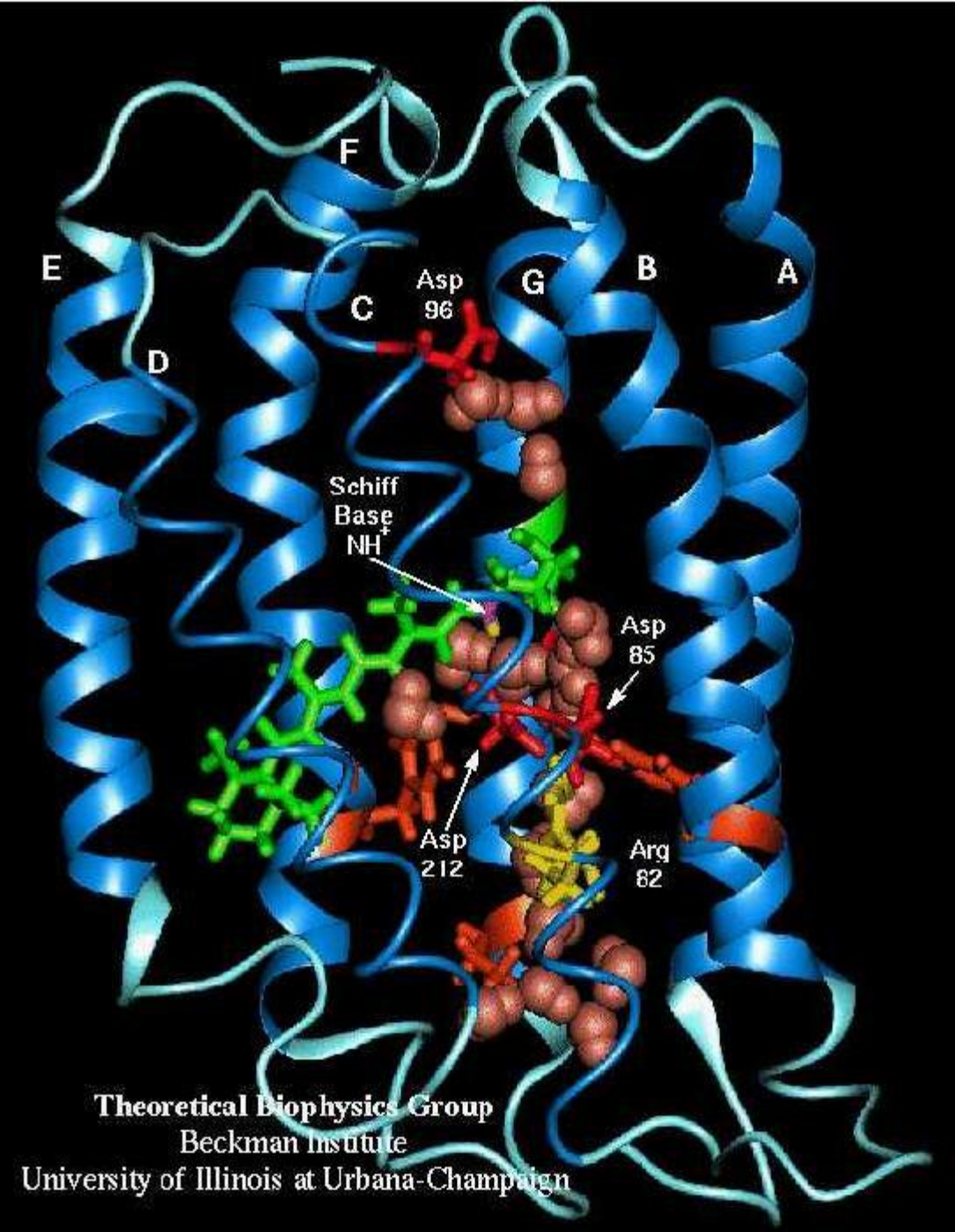
Change Residue To

Restore Changed Residues

34

Απομόνωση μεμβρανικών πρωτεϊνών

- Υπερβολικά δύσκολη
- Απομόνωση σε διάλυμα σημαίνει αποδιάταξη
- Τα απορρυπαντικά καταστρέφουν και μεμβράνη που δίνει μορφή στην πρωτεΐνη
- Απομονώθηκε
 - Βακτηριοροδοψίνη
 - Κέντρο αντίδρασης Φωτοσυνθεσης



- ❖ Μεμβρανικός μεταφορέας που αντλεί H^+ έξω από το κύτταρο.
- ❖ Η ενέργεια λαμβάνεται από την ηλιακή ακτινοβολία
- ❖ Όταν η ρετιναλη απορροφά φωτόνιο και αλλάζει διαμόρφωση προκαλώντας αλλαγή διαμόρφωσης της πρωτεΐνης.
- ❖ Αυτή η αλλαγή μεταφέρει ένα H^+ από τη ρετιναλη προς το εξωτερικό του κυττάρου
- ❖ Όταν τα H^+ εισέρχονται, παράγεται ATP από την ATP συνθεση

Κυτταρικός φλοιός

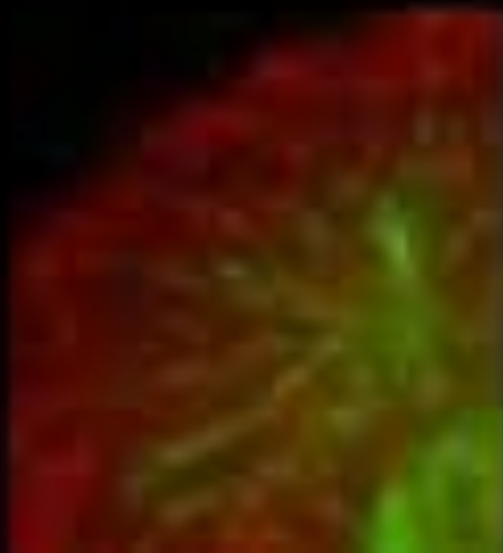
- Προσφέρει στήριξη στη μεμβράνη
- Spectrin, ειδικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

MT Actin DNA

MT Actin DNA



5 μ m



1 μ m

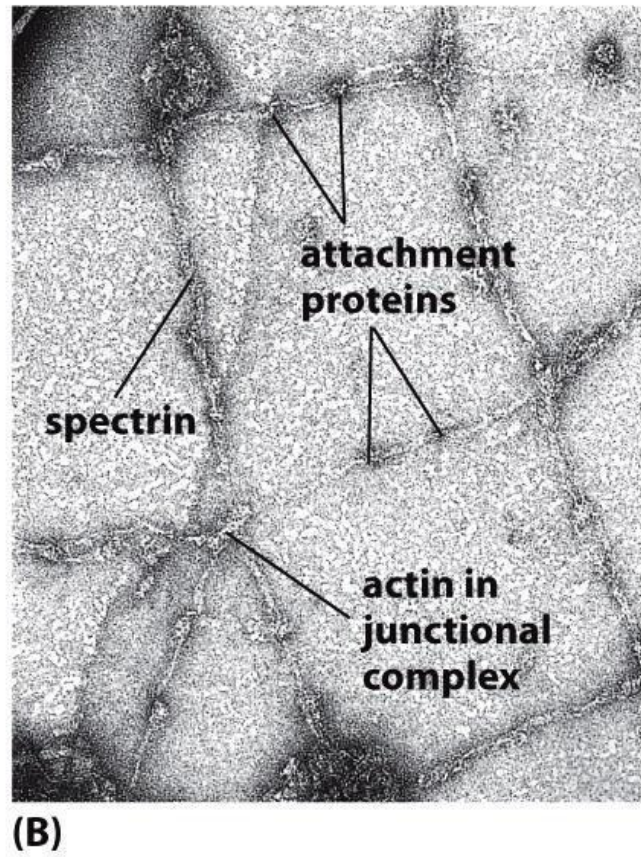
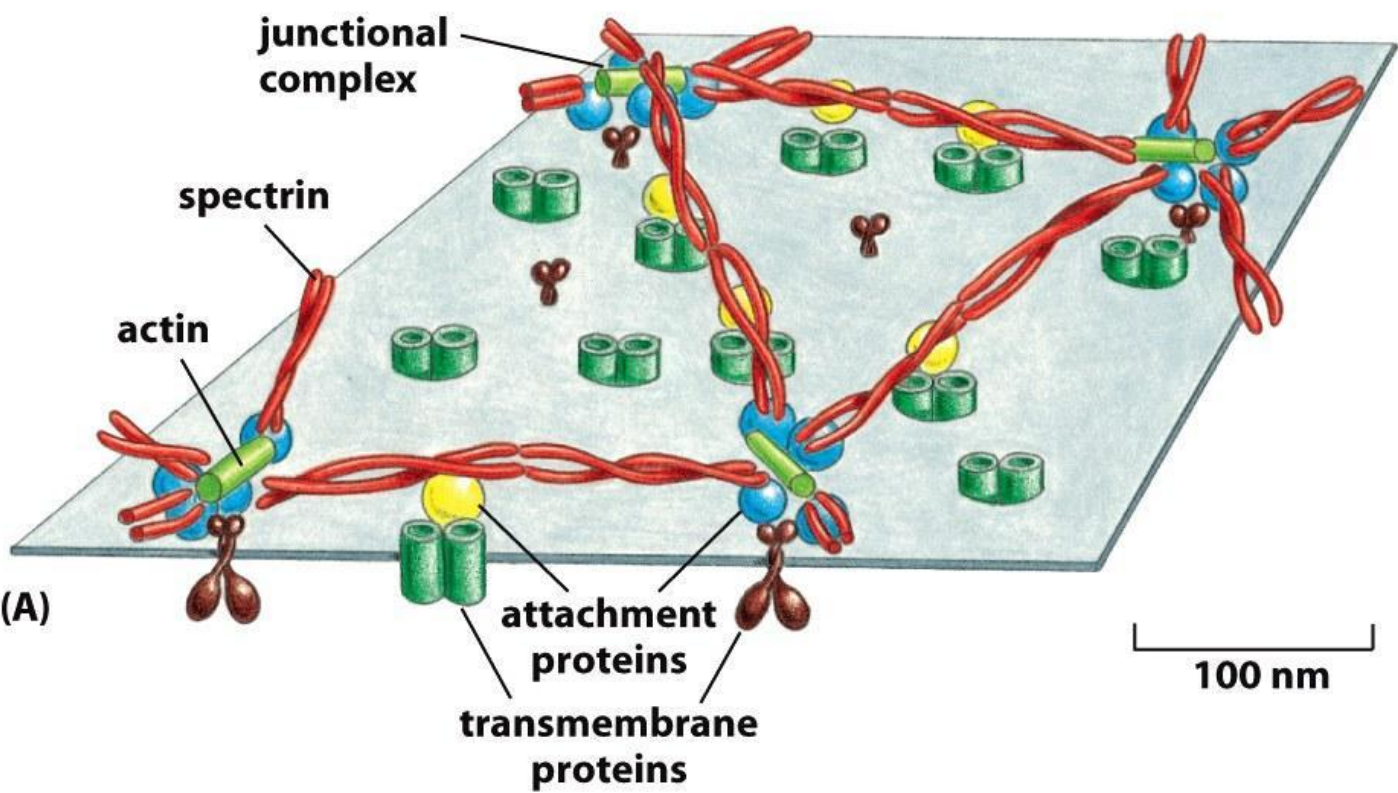
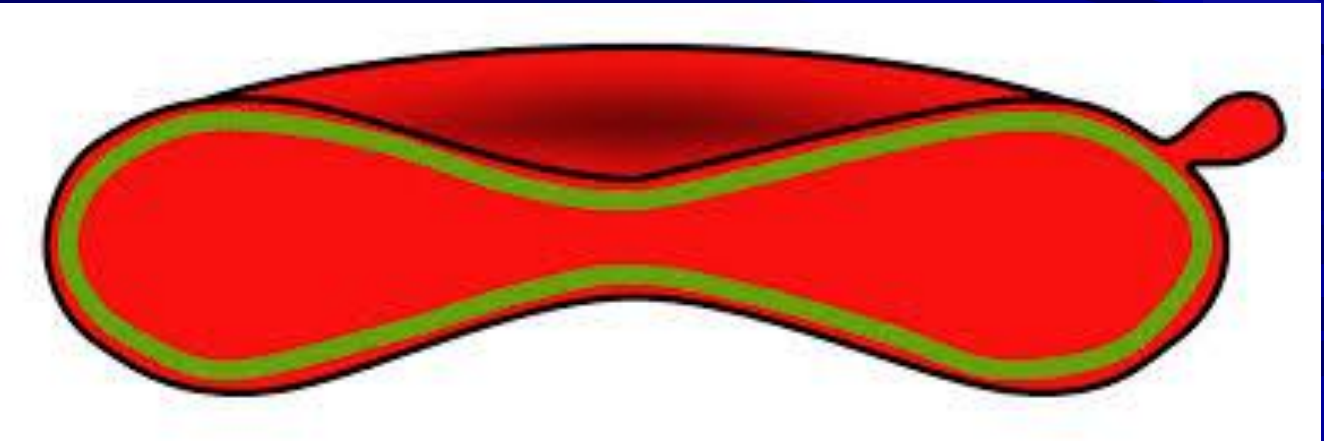
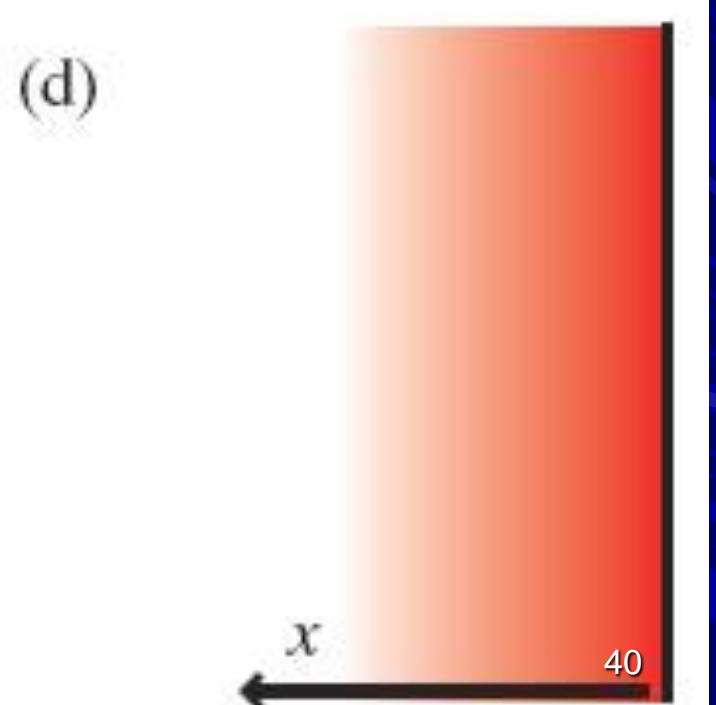
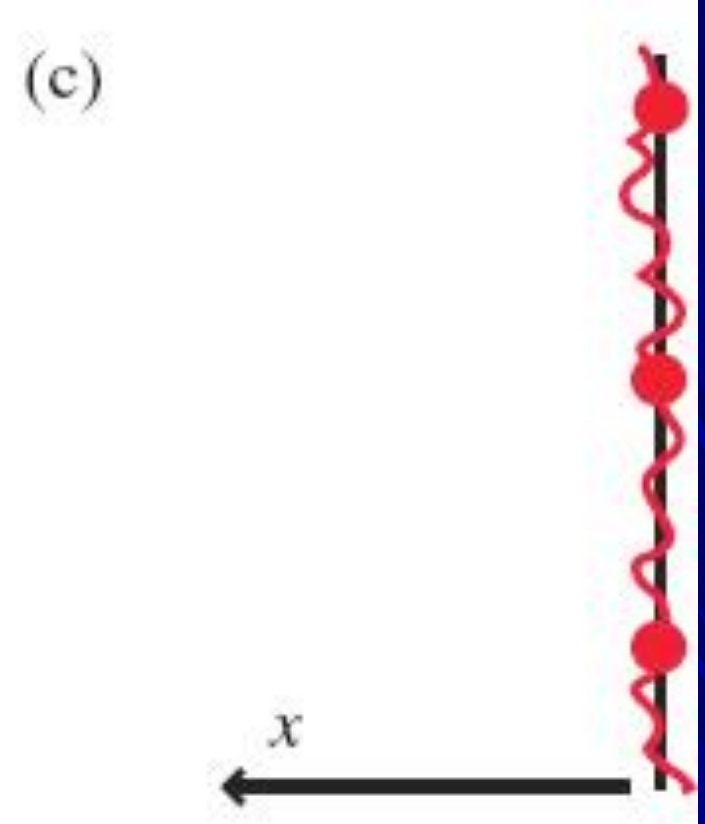
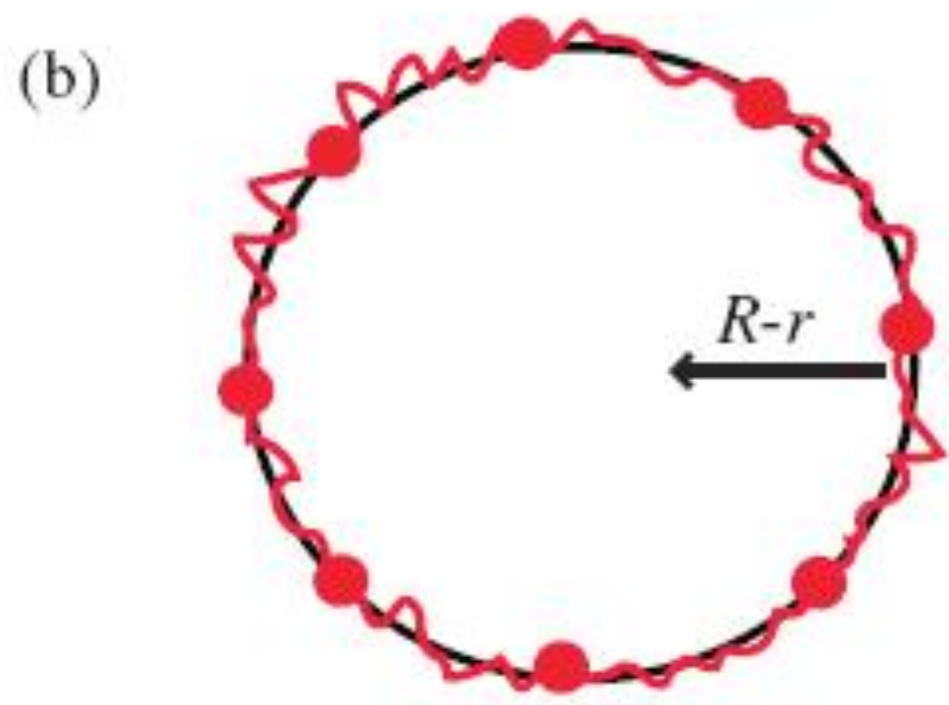
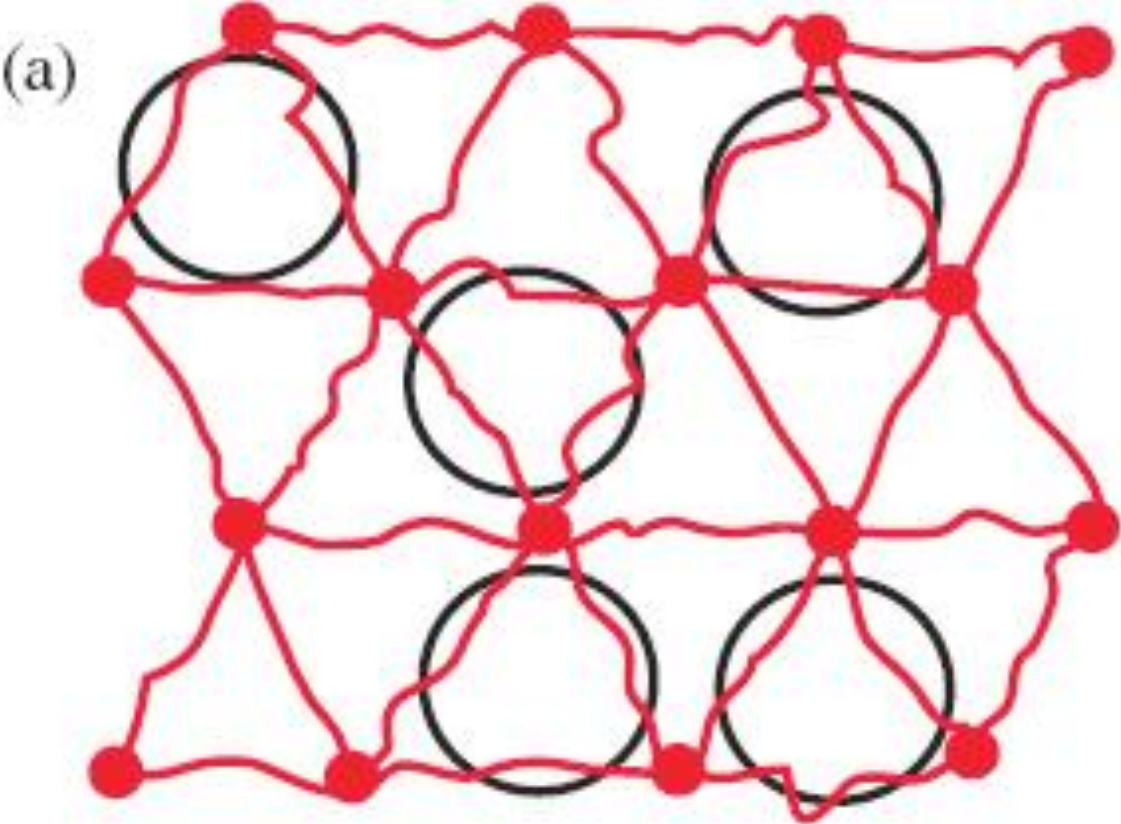
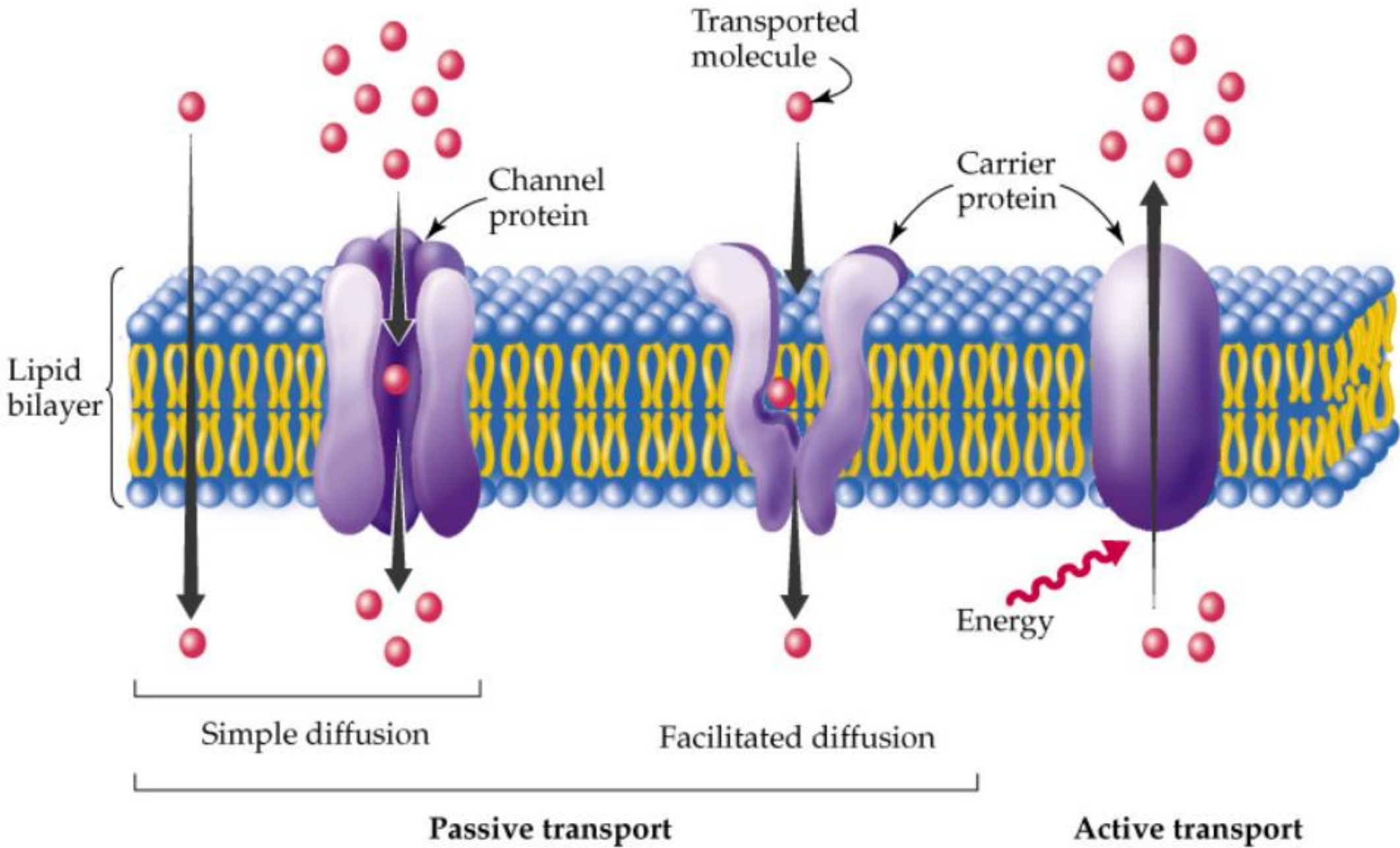


Figure 11-31 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)





HIGHER CONCENTRATION OF SOLUTES

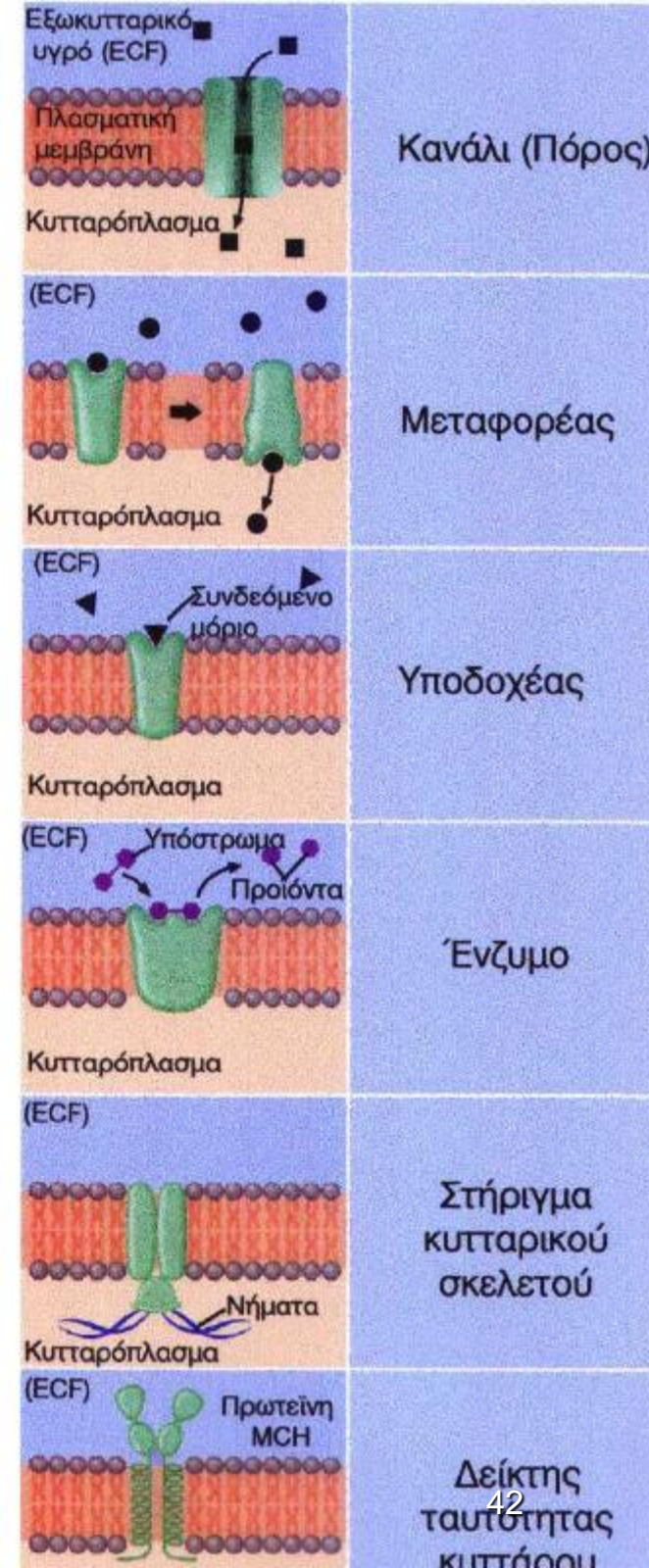


LOWER CONCENTRATION OF SOLUTES

Λειτουργίες

Με την κυτταρική μεμβράνη το κύτταρο εξασφαλίζει:

- (α) την επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον
- (β) τον έλεγχο του είδους των ουσιών που εισέρχονται και εξέρχονται από το κύτταρο.



**ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΟΥΣΙΩΝ
ΜΕΣΩ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ**

**ΠΑΘΗΤΙΚΗ
ΜΕΤΑΦΟΡΑ**

**ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ
ΜΕΤΑΦΟΡΑ**

ΔΙΑΧΥΣΗ
Μεταφορά άλλων
ουσιών

ΩΣΜΩΣΗ
Μεταφορά νερού

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ
πρόσληψη ουσιών

ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ
αποβολή ουσιών

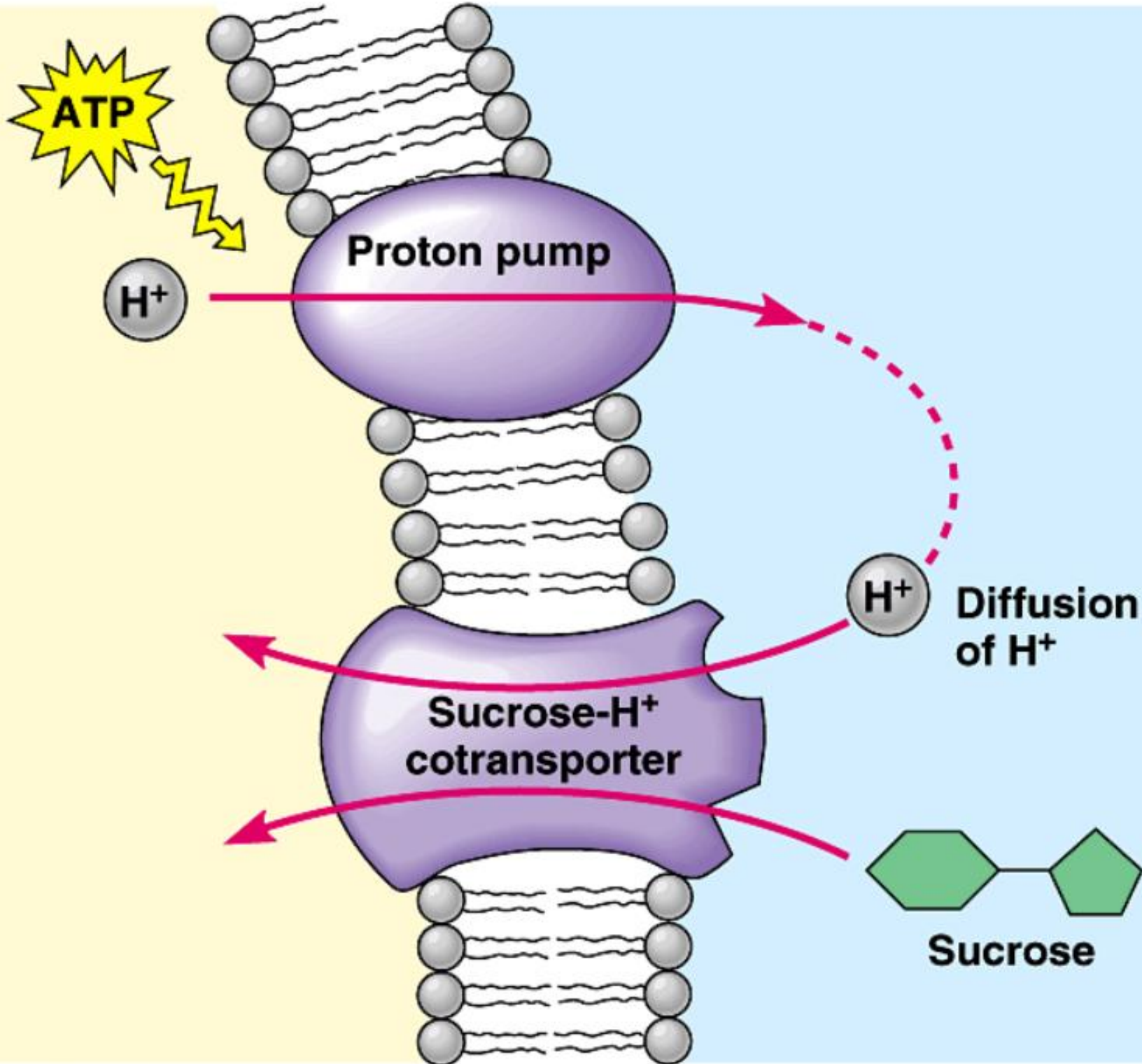
**ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ
ΜΕΤΑΦΟΡΑ**

**ΑΠΛΗ
ΔΙΑΧΥΣΗ**

**ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ
ΔΙΑΧΥΣΗ**

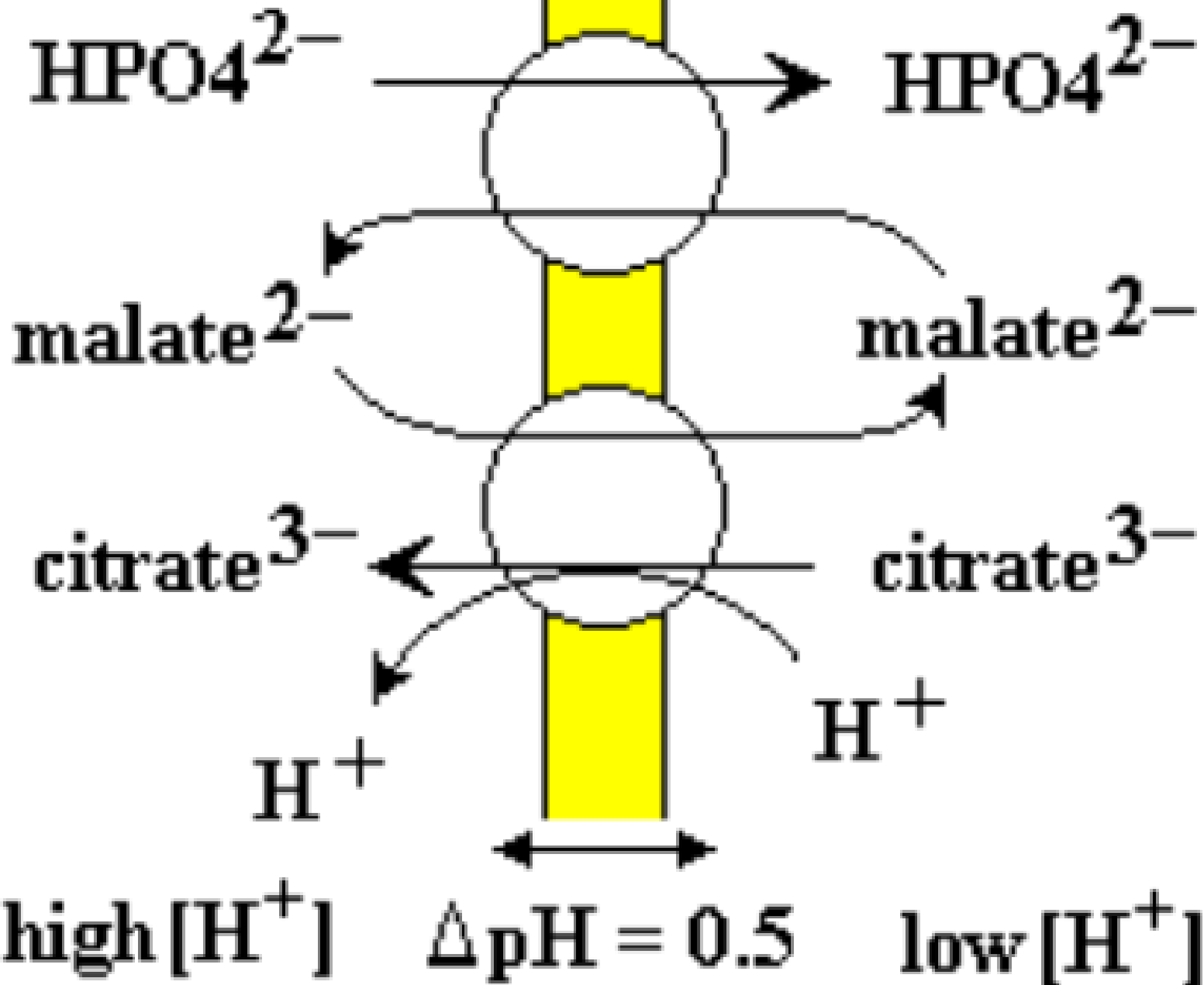
ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ
πρόσληψη στερεών
ουσιών

ΠΙΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ
πρόσληψη υγρών
ουσιών



Cytoplasm

Mitochondrial matrix



EXTRACELLULAR SPACE

ECM proteins

Cell Bound Ligands

Soluble Ligands

integrin

α

β

Na-K ATPase

α

β

ADDUCIN

talin

ADDUCIN

ankyrin

fodrin

fodrin

vinculin

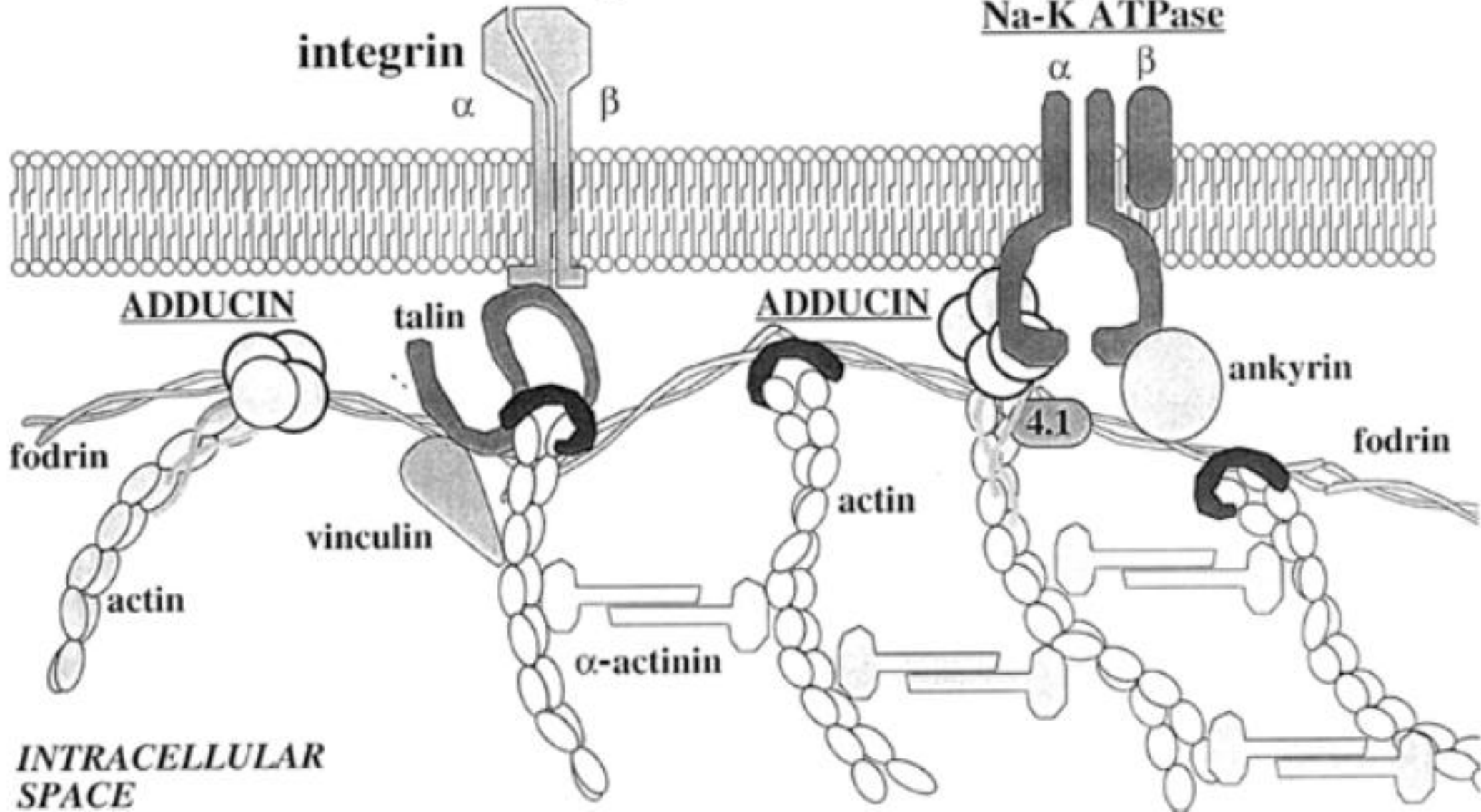
actin

4.1

actin

α -actinin

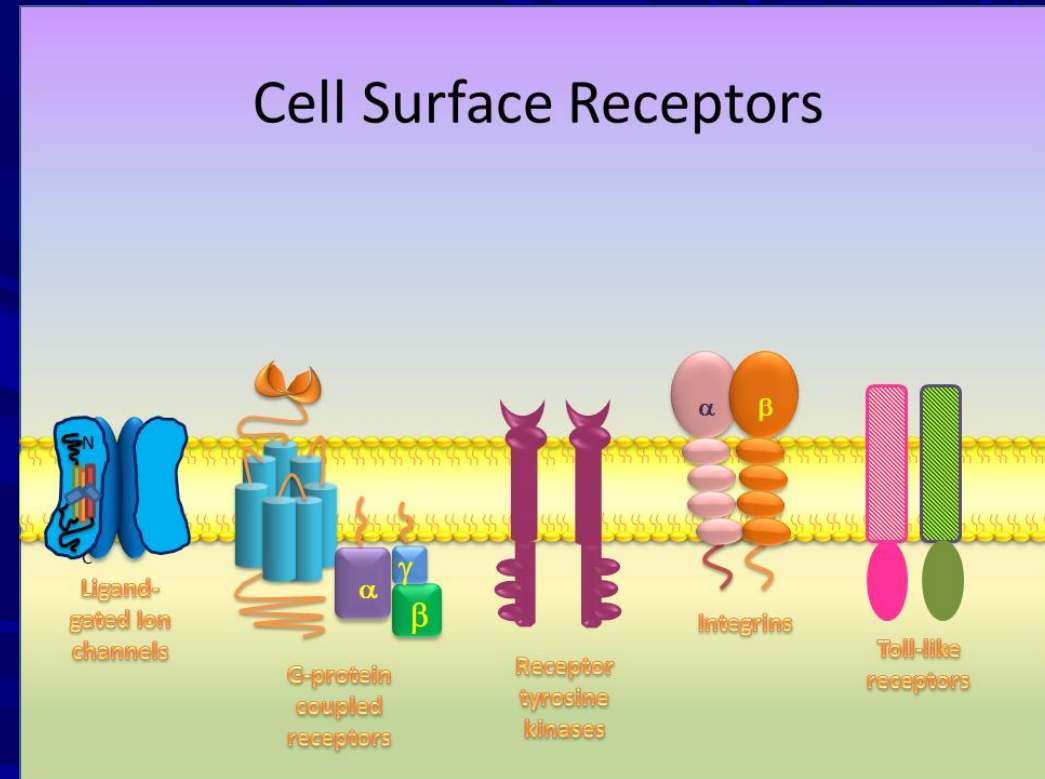
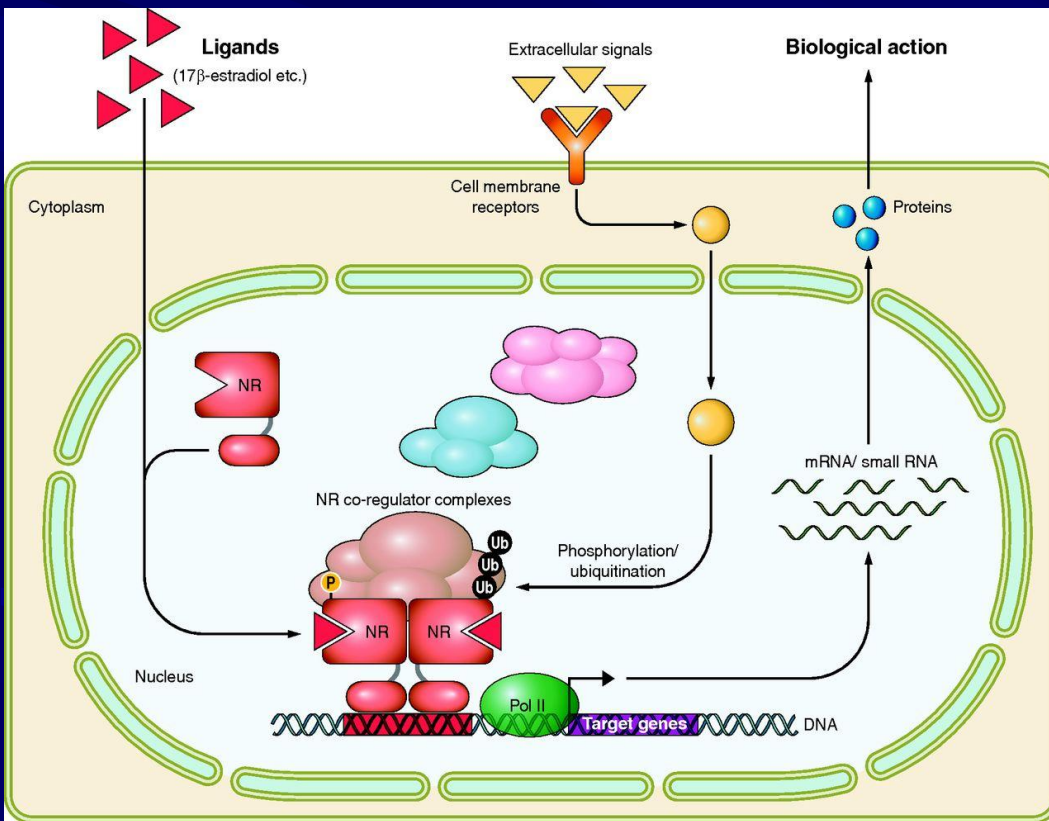
INTRACELLULAR SPACE



ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

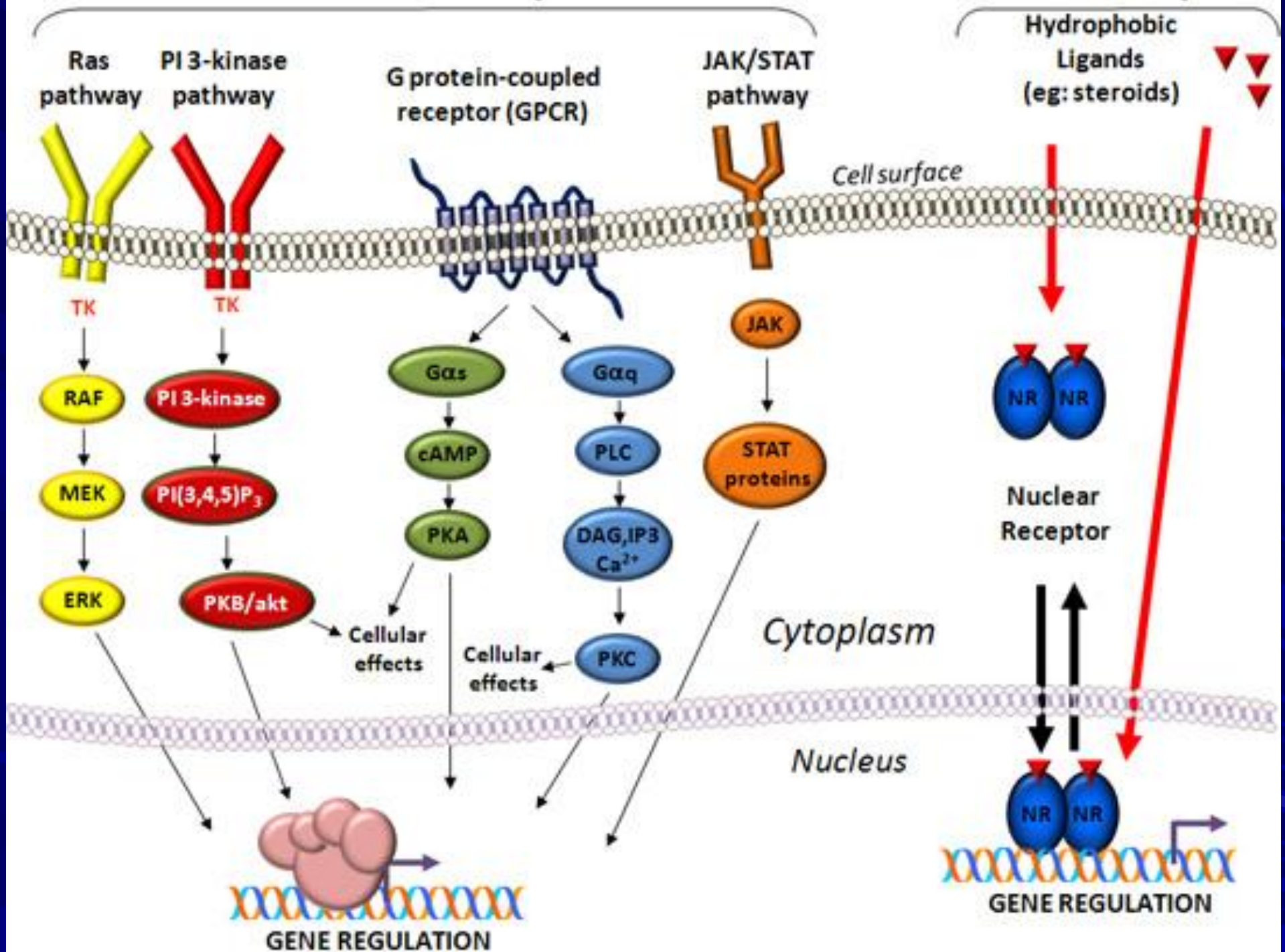
πυρηνικοί

μεμβρανικοί



Cell surface Receptors

Nuclear Receptors



Οικογένειες μεμβρανικών υποδοχέων

- Single-spanning (Tyrosine-kinase Receptors)
- Multi-spanning (Ligand-gated anion channels, GPCRs)

Receptor Tyrosine Kinases



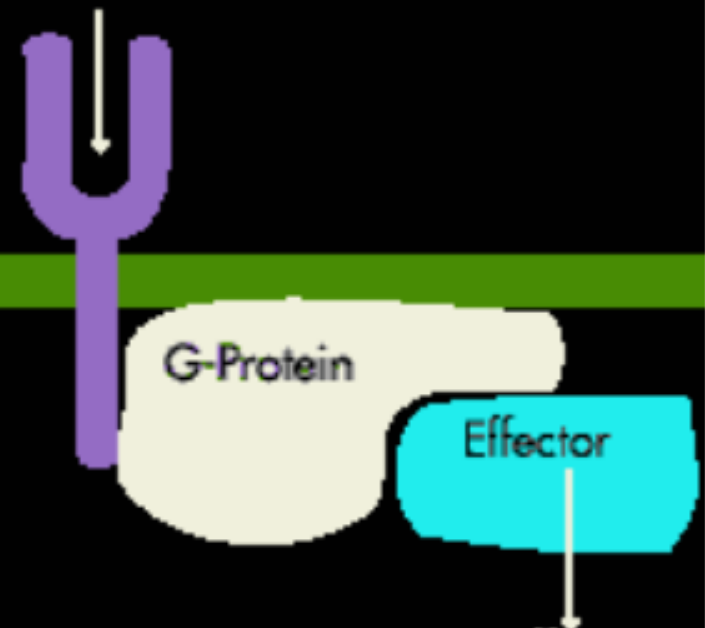
TK is activated by ligand presence above a certain concentration

Ligand Gated Ion Channel



The Ligand causes the ion channel to open, it is the flow of ions which is 'seen' inside the cell. The ligand causes a change of conformation

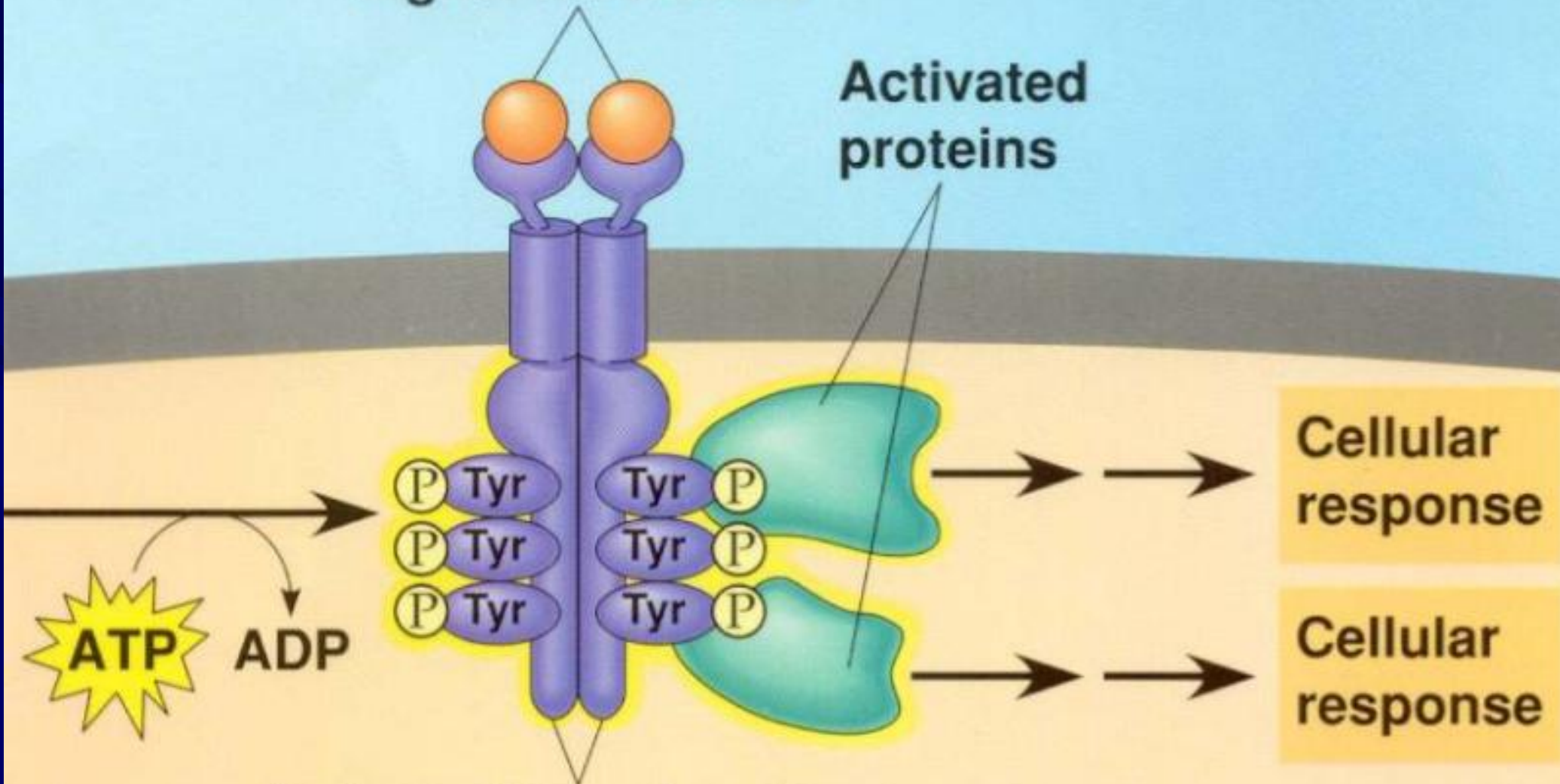
G-Protein Coupled Receptor (GPR/GPCR)



Separate Receptor proteins, effectors etc. When the ligand is bound the conformation of the receptor changes, the G-protein is a 'mediator' between the receptor and effector

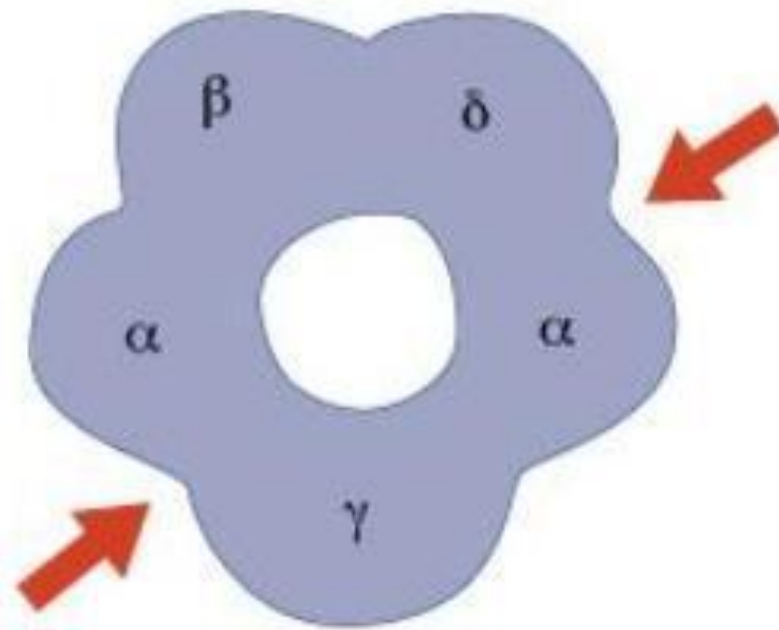
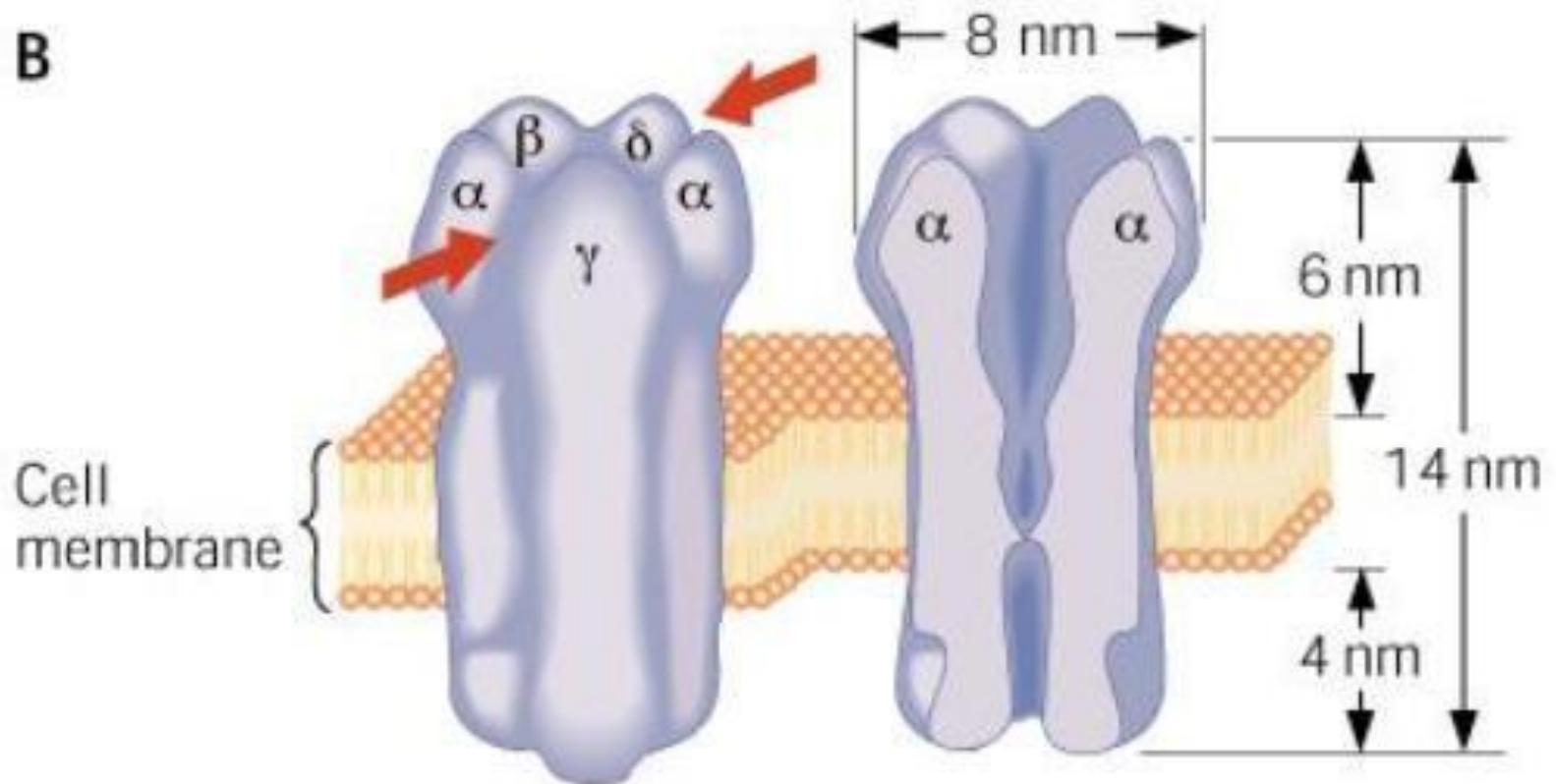
Signal molecules

Activated proteins



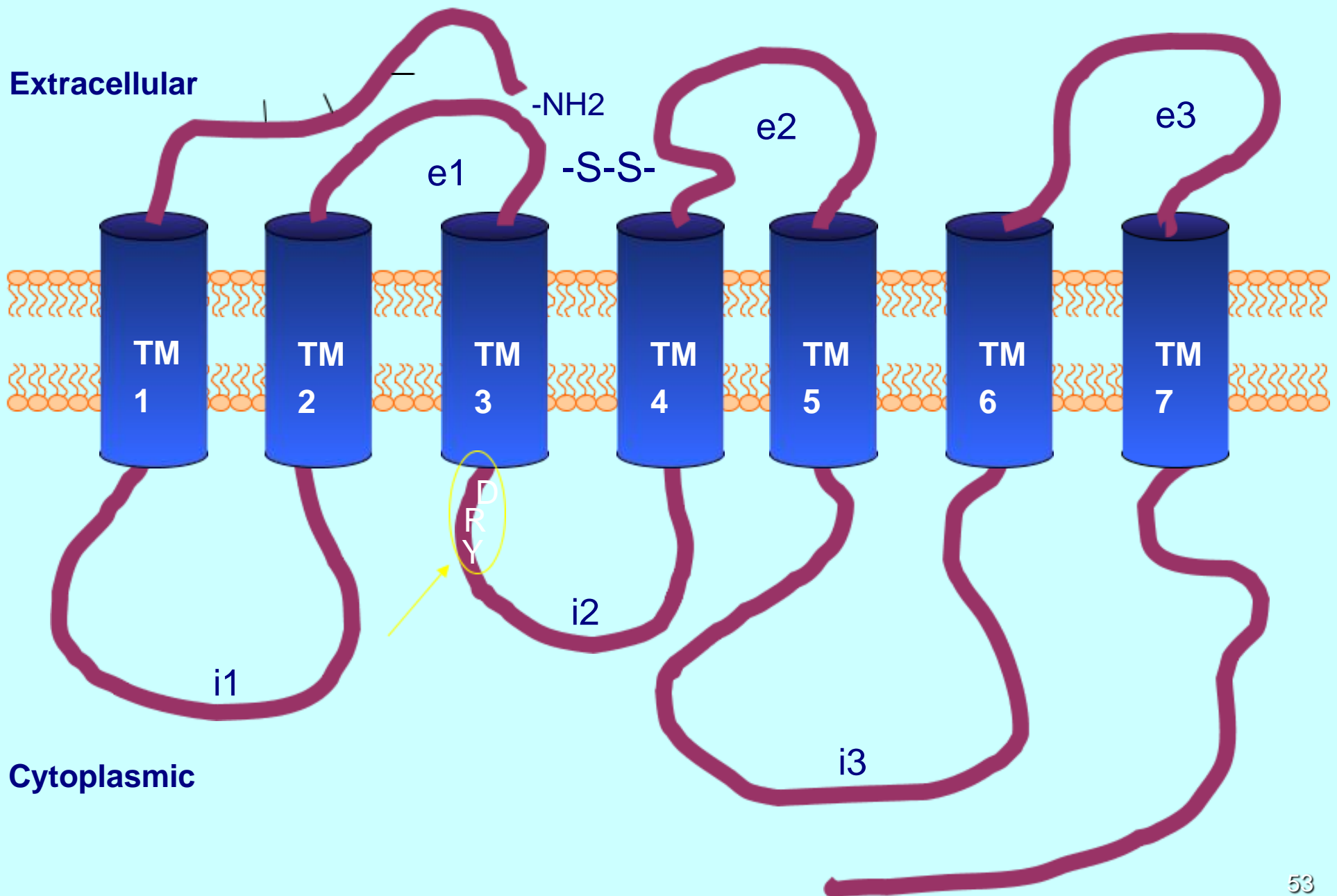
Activated tyrosine-kinase receptor (phosphorylated dimer)

(b) Activated system

A**B**



G-protein coupled receptors





GPCR classes or superfamilies

Class A: Rhodopsin-like

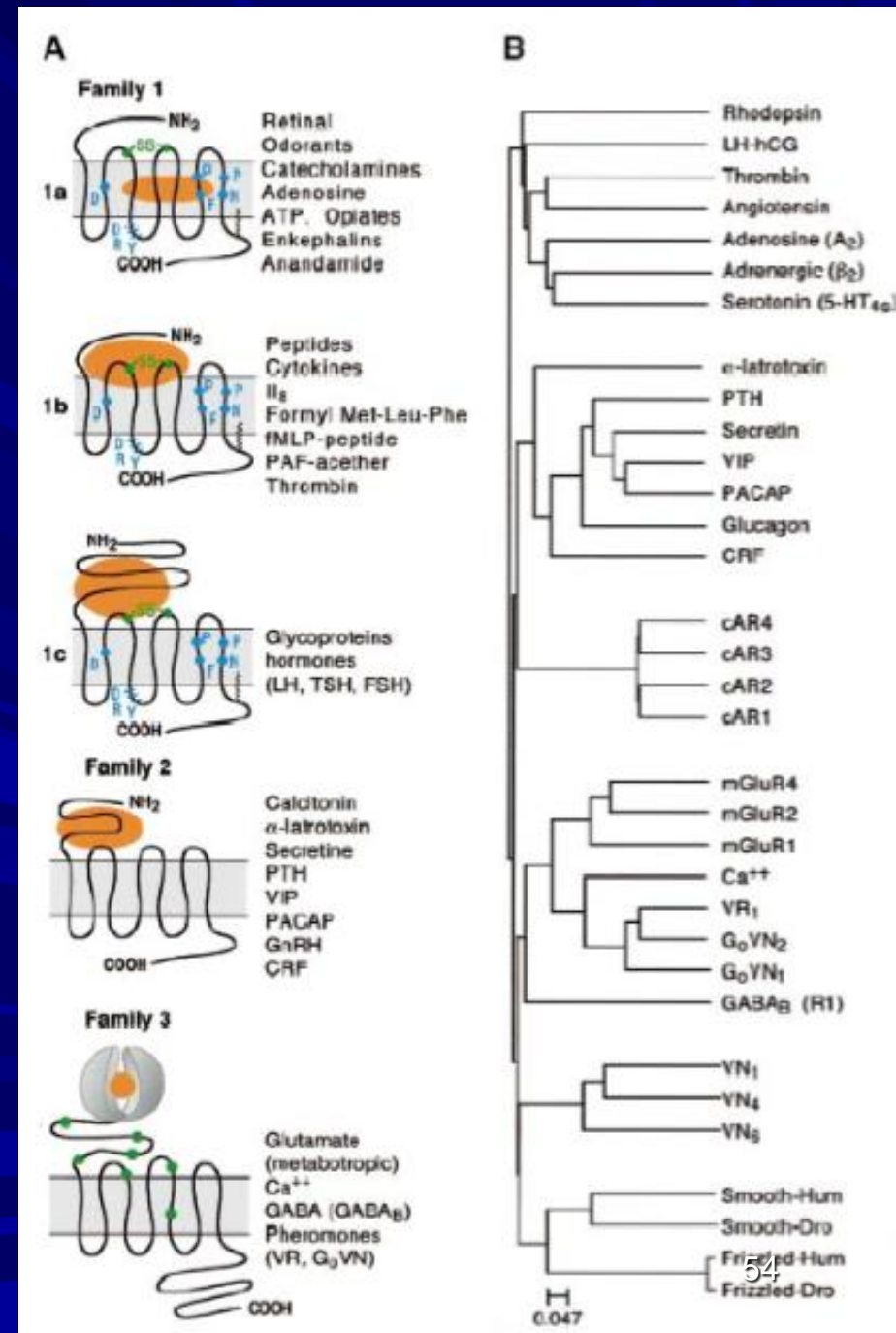
- Largest family
- Conserved DRY motif (i2)
- Conserved cysteines □ -S-S-

Class B: Secretin-like

- Large N-terminal domain
- Several well conserved cysteine residues
- High Mr hormone ligands

Class C: Metabotropic glutamate

- Long N-terminal domain
- N-terminus sufficient for ligand binding





GPCR classes or superfamilies (2)

Class D: fungal pheromone

Class E: cAMP receptors

Class F: Frizzled /Smoothened

Competitive antagonist

Allosteric or noncompetitive antagonist

Agonist

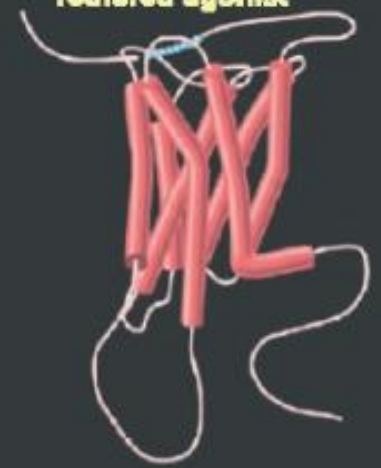
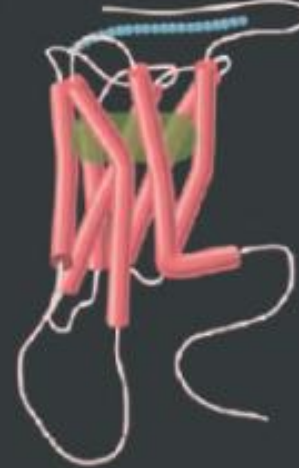
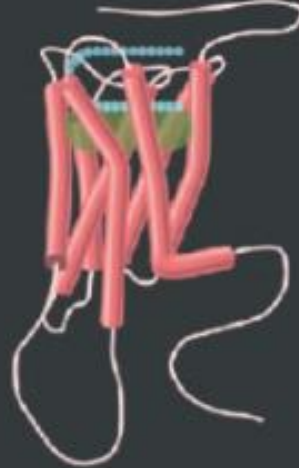
Opsin

Biogenic amine

Neuropeptide (Family A, B)

Substance P (NK1)

Protease-activated
Tethered agonist



Glycoprotein hormone (Family A)

Glutamate (Family C)

Frizzled (F/S family)



GPCR classes or superfamilies



families based on ligand specificity

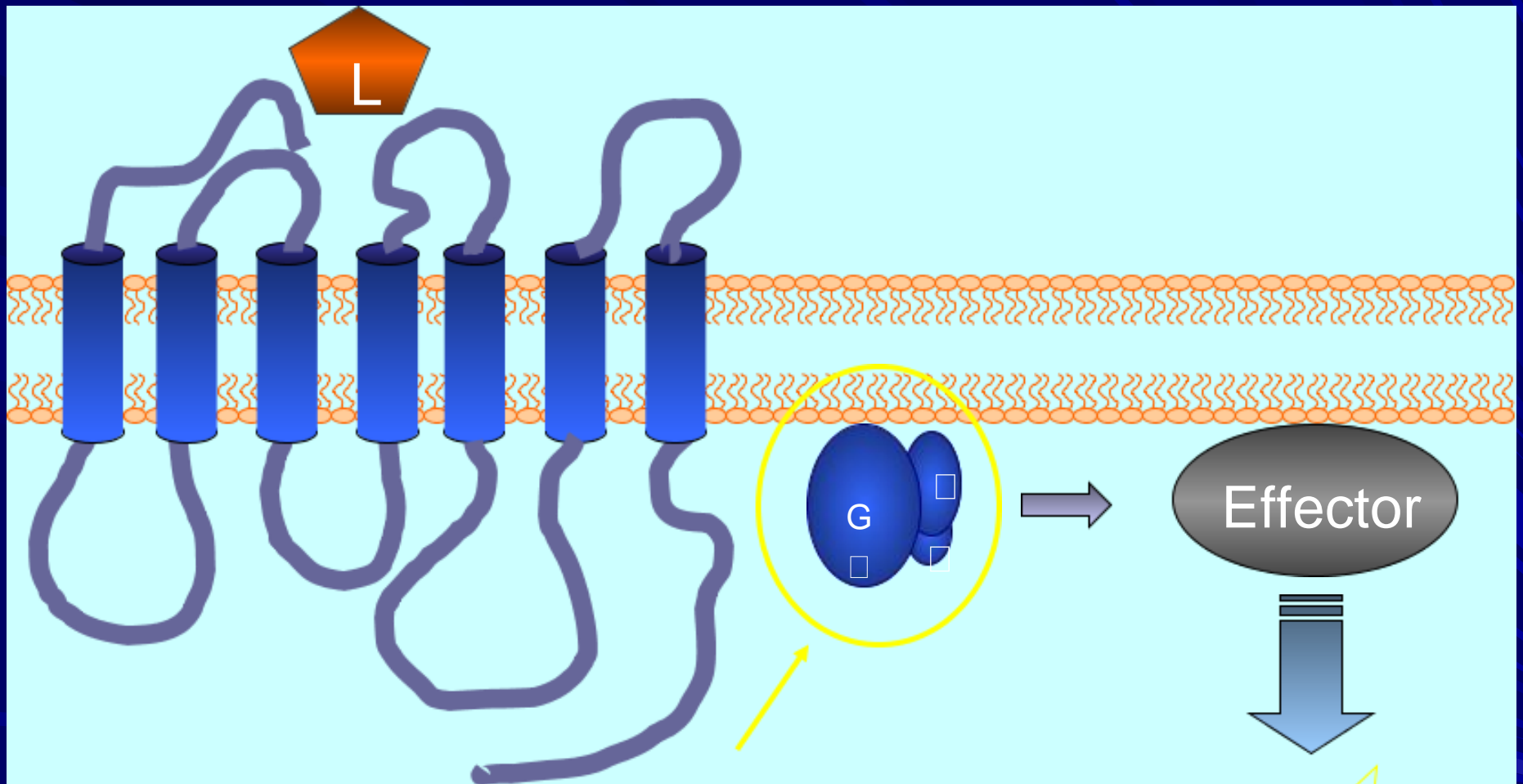
Each superfamily is further subdivided into families based on their ligand specificity, with some families combined into larger groups based on closely related ligands.

For example, the superfamily A GPCRs include groups such as **amine binders, peptide binders, prostanoid receptors and olfactory (odorant) receptors.**

The **amine binding group** for instance is formed by seven (7) **families** (acetylcholine receptor, adrenoceptor, dopamine receptor, histamine receptor, serotonin receptor, octopamine receptor and trace amine receptor)



G-proteins

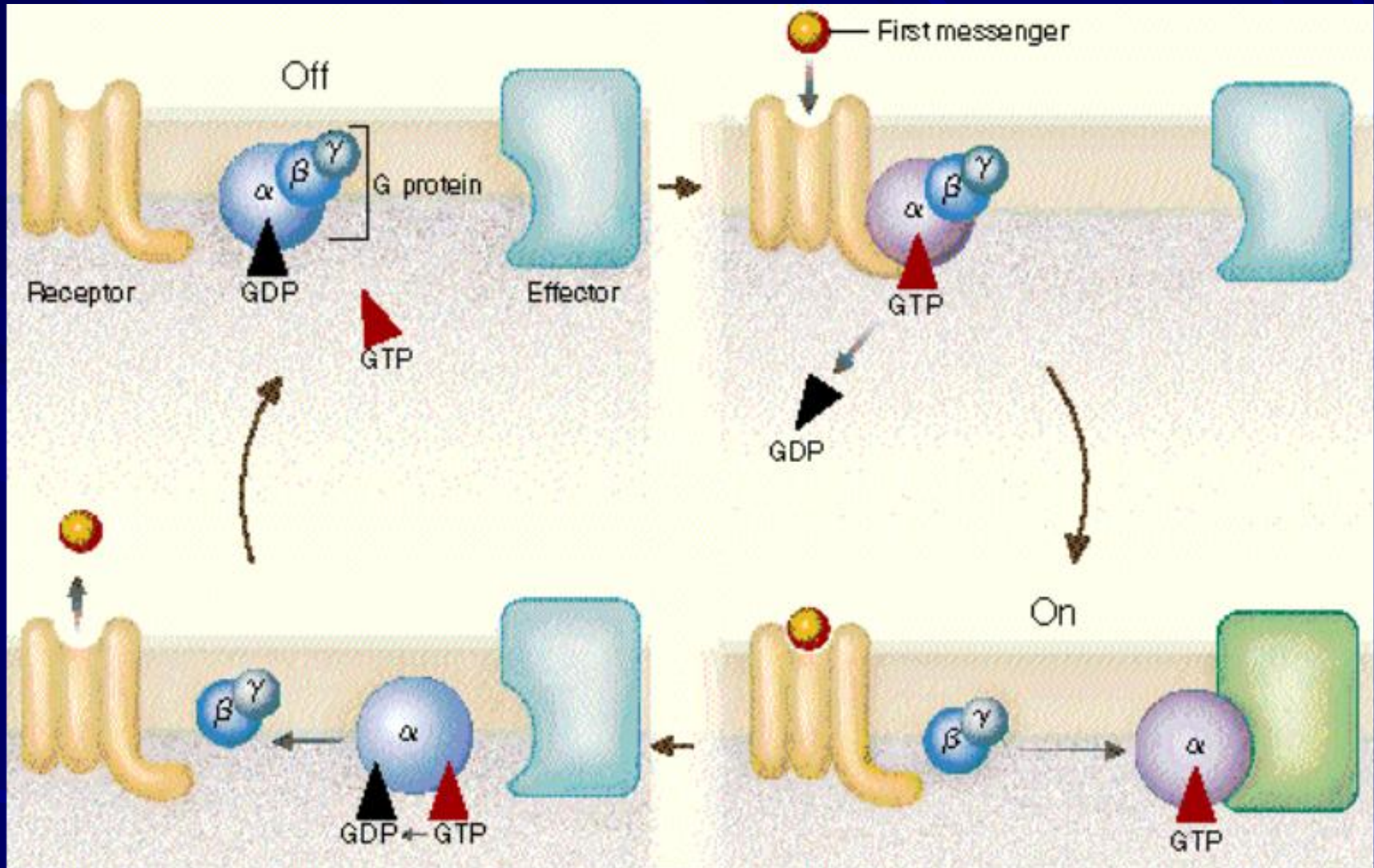


Signal

<https://www.youtube.com/watch?v=xT0mAQ4726s>



GPCR signalling



<https://www.youtube.com/watch?v=0nA2xhNiAow>

<https://www.youtube.com/watch?v=A3AUhMCE9n0>

Ασθένειες & GPCR

DISEASE

OVERACTIVE KNOWN GPCRs

Schizophrenia

5HT_{2A}, D₄

Depression

5HT_{2A}

Hyperthyroidism

Thyrotropin

Hypertension

Angiotensin AT_{1A}

Asthma

Adenosine A₁

Melanoma

MC-1

Retinitis Pigmentosa

Rhodopsin

β-barrel membrane proteins

- Σχετικά «κοντά» διαμεμβρανικά τμήματα (7-20)
- Εναλλαγή υδρόφοβων-πολικών κατάλοιπων
- Σχετικά μεγάλες γωνίες ως προς την μεμβράνη
- Άρτιος αριθμός από β-strands
- N-, και C-terminal, πάντα στον περιπλασματικό χώρο

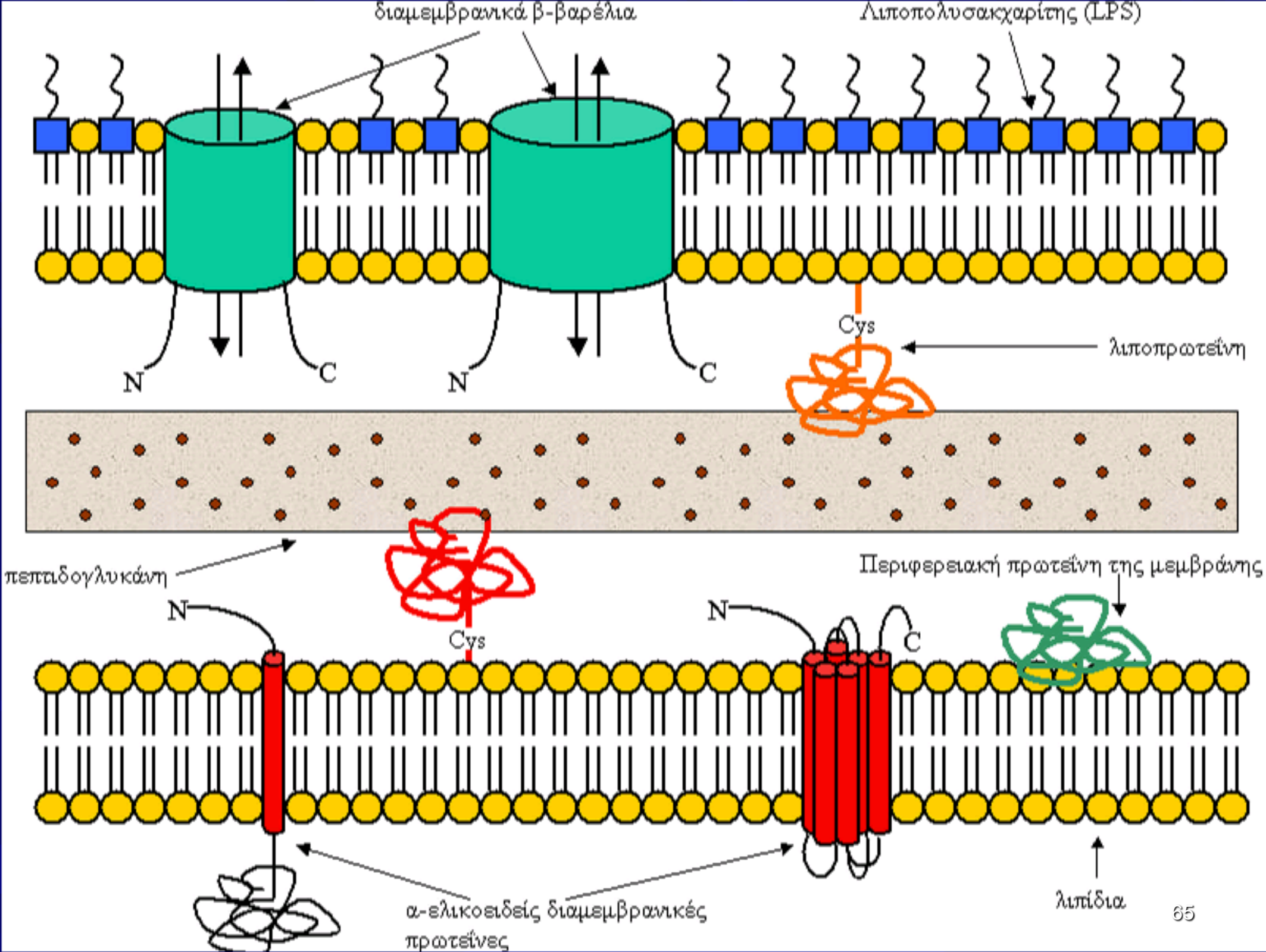
Harvard Cell Animation.mp4

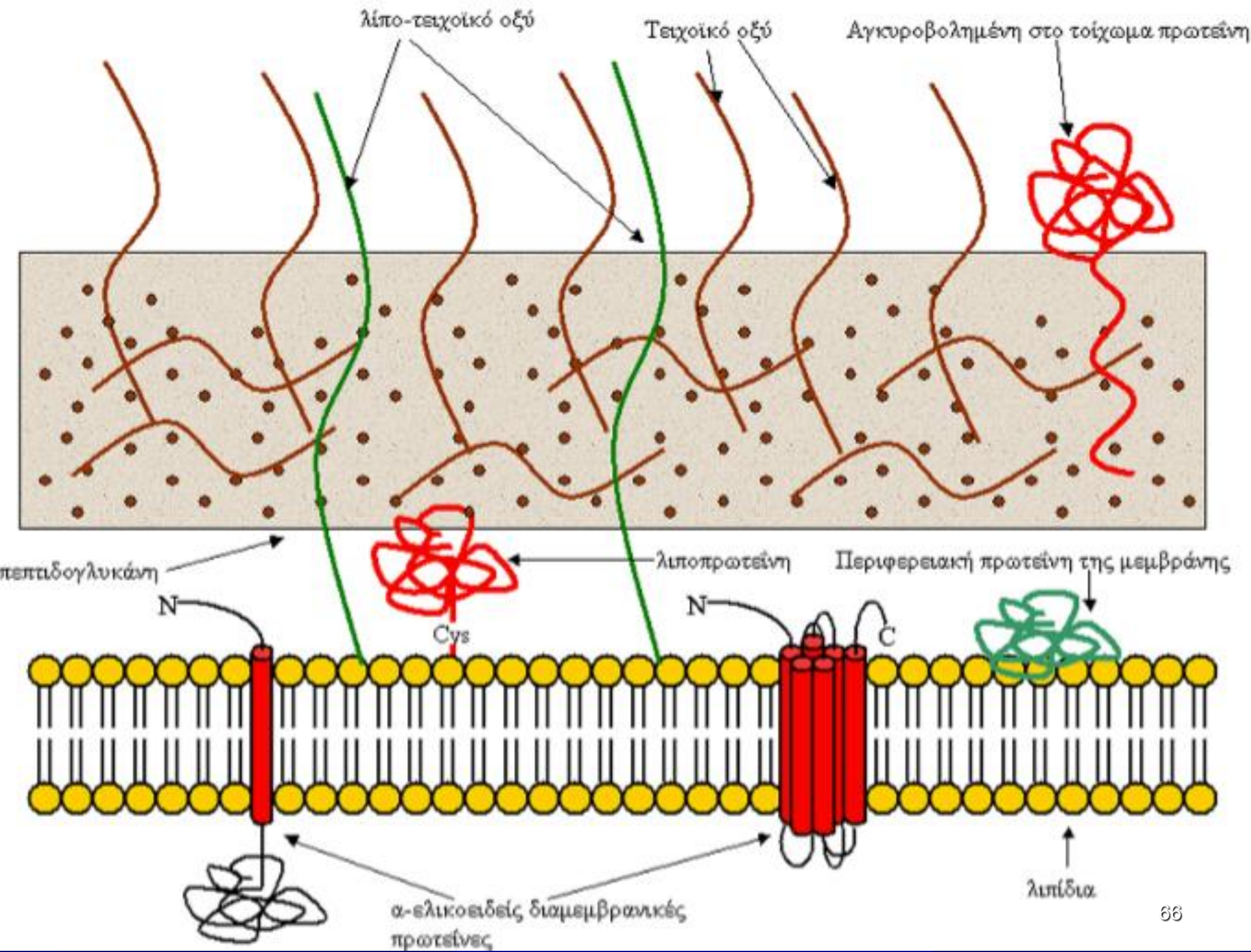
!!!!!!!

<https://www.youtube.com/watch?v=FzcTgrxMzZk>

ΔΙΑΚΙΝΗΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΚΑΙ ΠΡΟΣ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

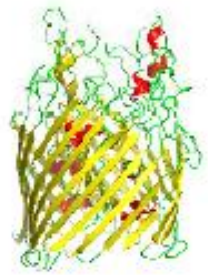
Π Λ Θ Η Τ Ι Κ Α	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΚΙΝΗΣΗΣ	ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ	Παραδείγματα ουσιών
	ΑΠΛΗ ΔΙΑΧΥΣΗ	Προς μικρότερες συγκεντρώσεις της ουσίας	Διαβάθμιση στη συγκέντρωση της ουσίας	Νερό, λιποδιαλυτές ουσίες, και αέρια
	ΑΠΛΗ ΔΙΑΧΥΣΗ μέσω ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΝΑΛΙΩΝ	Προς μικρότερες συγκεντρώσεις της ουσίας	Διαβάθμιση στη συγκέντρωση της ουσίας. Πρωτεϊνικό Κανάλι.	Ιόντα π.χ. Ca^{++} , Cl^-
	ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΔΙΑΧΥΣΗ	Προς μικρότερες συγκεντρώσεις της ουσίας	Διαβάθμιση στη συγκέντρωση της ουσίας. Πρωτεϊνικός μεταφορέας.	Σάκχαρα, αμινοξέα και μερικά ιόντα
	ΩΣΜΩΣΗ	Προς μικρότερες συγκεντρώσεις του νερού	Διαβάθμιση στην οσμωτική συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας	Νερό
Ε Ν Ε Ρ Γ Η Τ Ι Κ Α	ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ	Προς μεγαλύτερη συγκέντρωση της ουσίας	Πρωτεϊνικές αντλίες Ενέργεια	Σάκχαρα, αμινοξέα, ιόντα
	ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ (Ένδοκύττωση)	Προς το εσωτερικό του κυττάρου	Ψευδοπόδια Ενέργεια	Μικροοργανισμοί μακρομόρια
	ΠΙΝΟΚΥΤΤΩΣΗ (Ένδοκύττωση)	Προς το εσωτερικό του κυττάρου	Ψευδοπόδια Ενέργεια	Μακρομόρια
	ΕΞΩΚΥΤΤΩΣΗ	Προς το εξωτερικό του κυττάρου	Κυστίδια Ενέργεια	Μεγαλομόρια



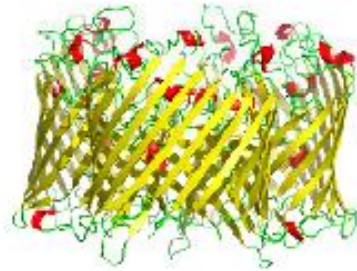


ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΙΟ ΛΕΠΤΗ (~25-30Å)
2. ΣΤΗΝ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΠΛΕΥΡΑ ΠΕΡΙΕΧΕΙ LPS, ΕΝΩ ΑΠΟ ΜΕΣΑ, ΦΟΣΦΑΤΙΔΥΛΟΑΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗ ΚΑΙ ΦΟΣΦΑΤΙΔΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΗ
3. ΕΙΔΙΚΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟ *Mycobacterium*, ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΠΑΧΟΥΣ ~90Å
4. (MYCOLIC ACID)



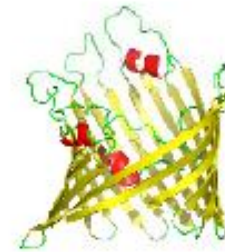
FepA (1FEP)



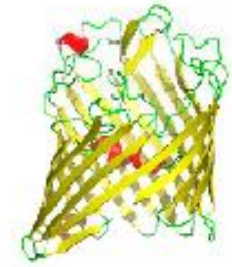
Sucroporin (1A0S)



Omp32 (1E54)



Porin (2POR)



OmpF (2OMF)



OmpX (1QJ8)



OmpA (1QJP)



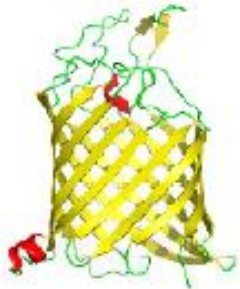
OmpT (1I78)



OpcA (1K24)



OmpLA (1QD5)



Tsx (1TLY)



FADL (1T1L)



NspA (1P4T)



NalP (1UYN)



PagP (1MM4)

Lipopolysaccharide

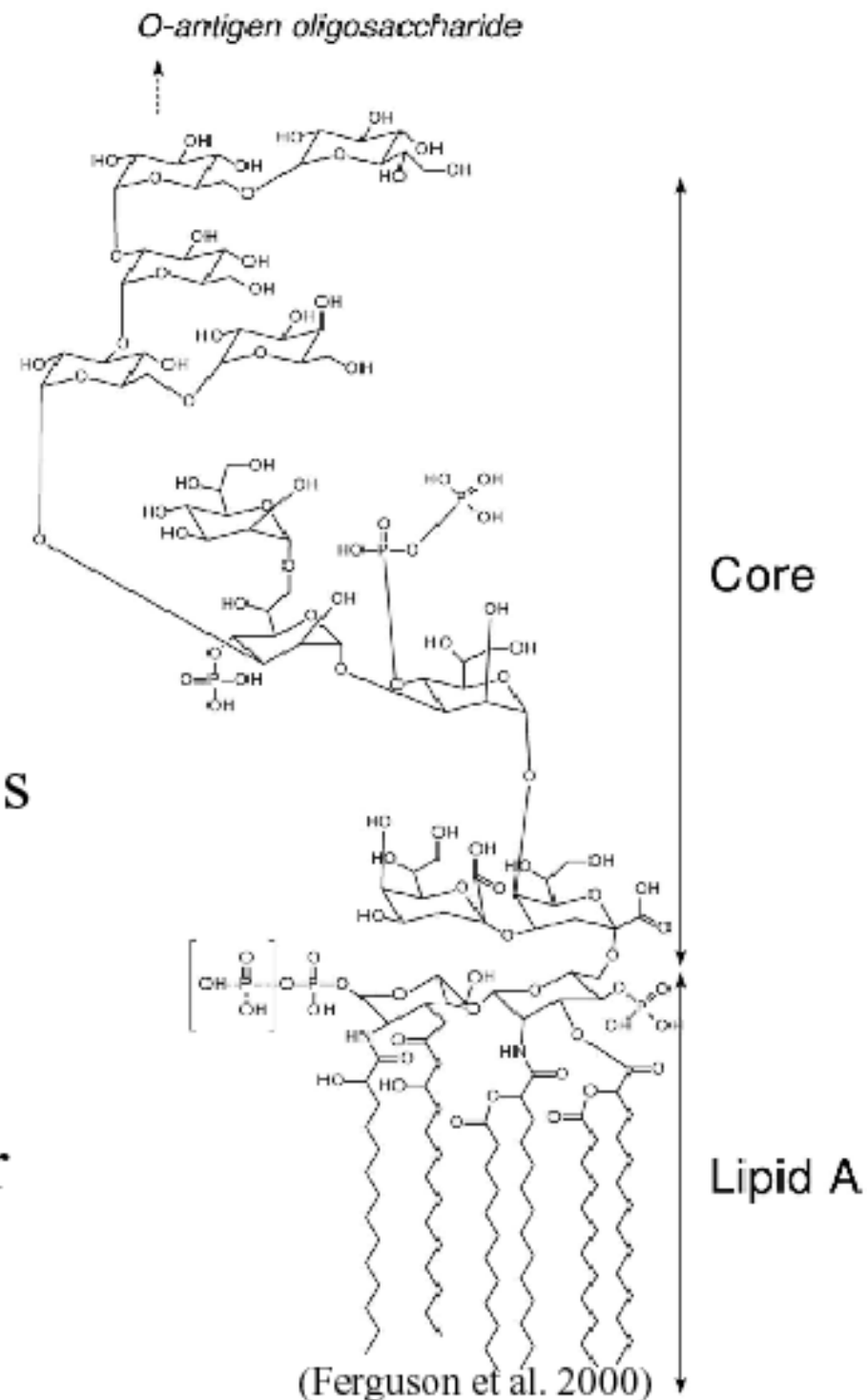
Protection against hydrophobic compounds

Host-parasite interactions

Negative charged phosphate groups
Complexes Mg^{2+} and Ca^{2+}

Densely packed, low fluidity

Impenetrable, low diffusion barrier



Iron uptake

Iron bound in ferrichrome

Binding at FhuA

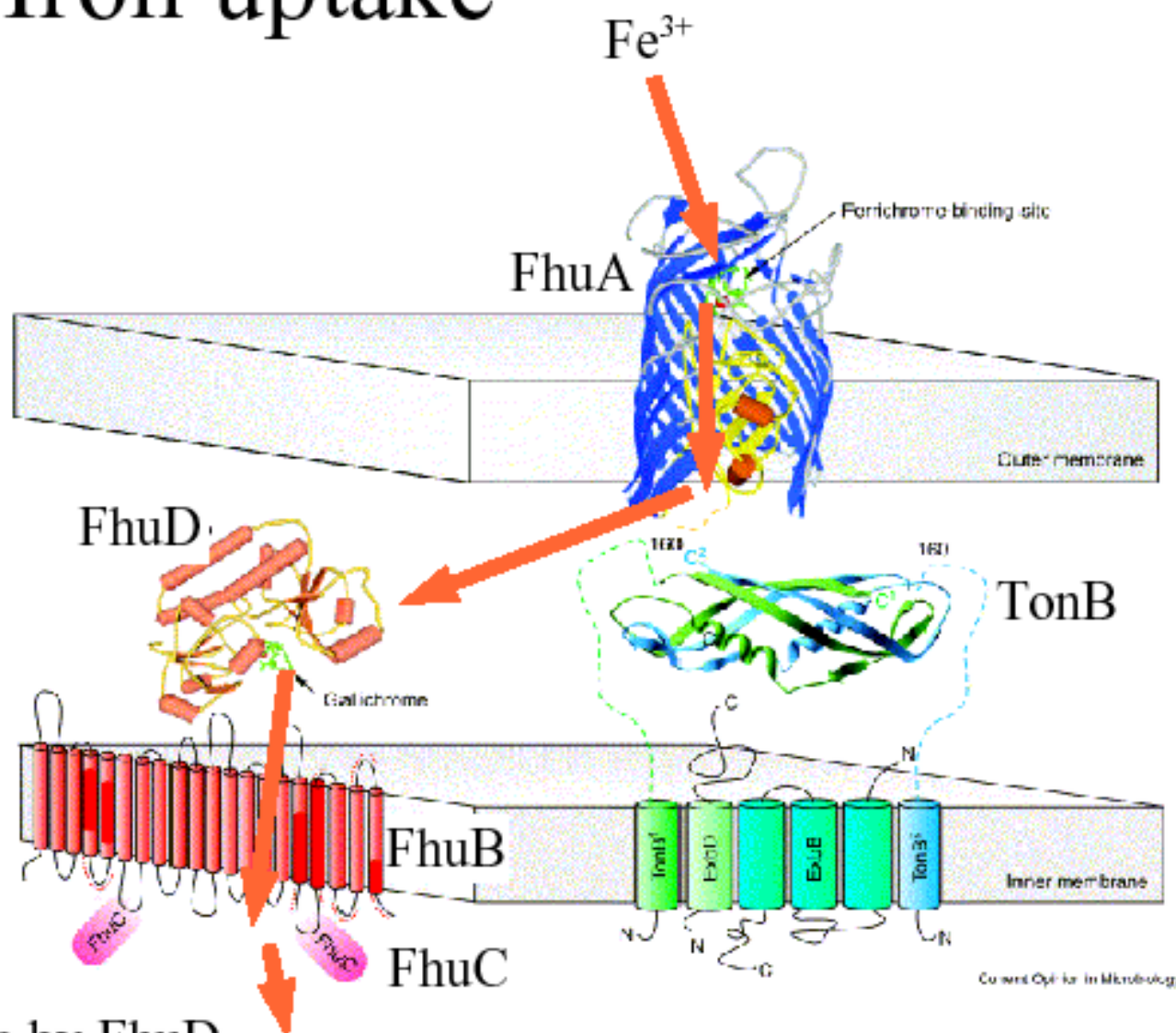
Signal of iron binding
Conformational change

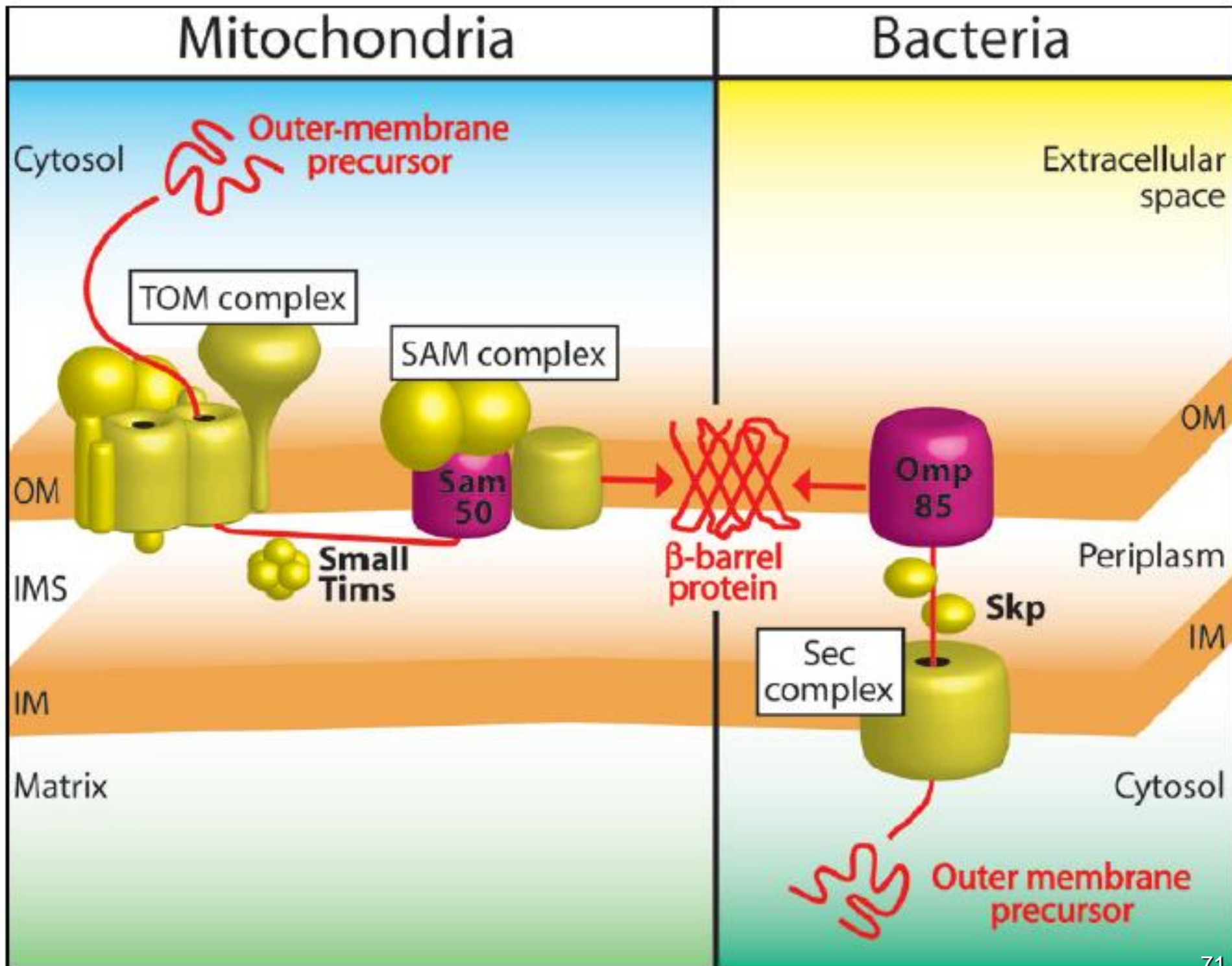
TonB binding

Channel opening
proton motive force
ExbD/ExbB complex

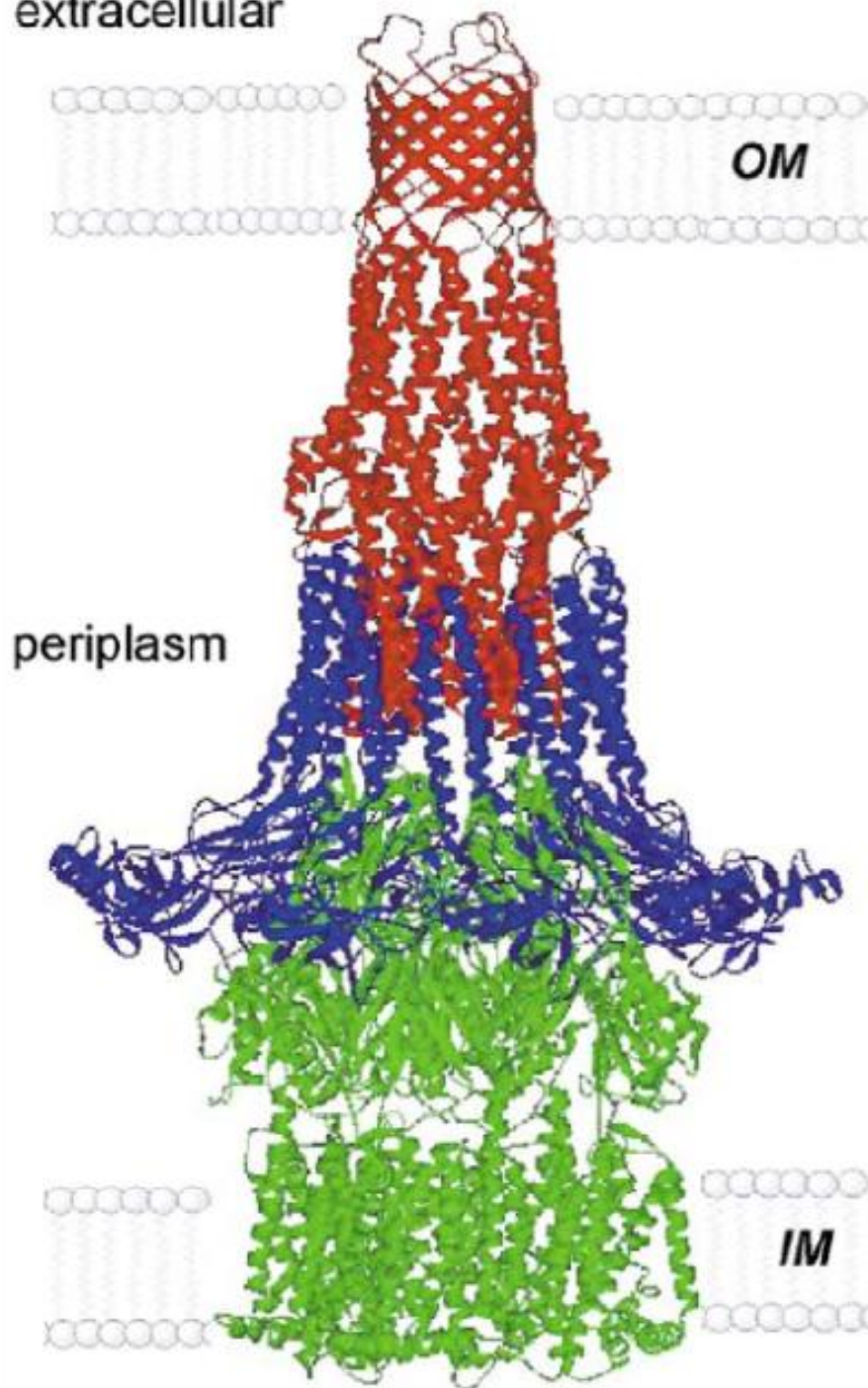
Complexation of ferrichrome by FhuD

Transport over the inner membrane, FhuB
with energy from the ATPase FhuC





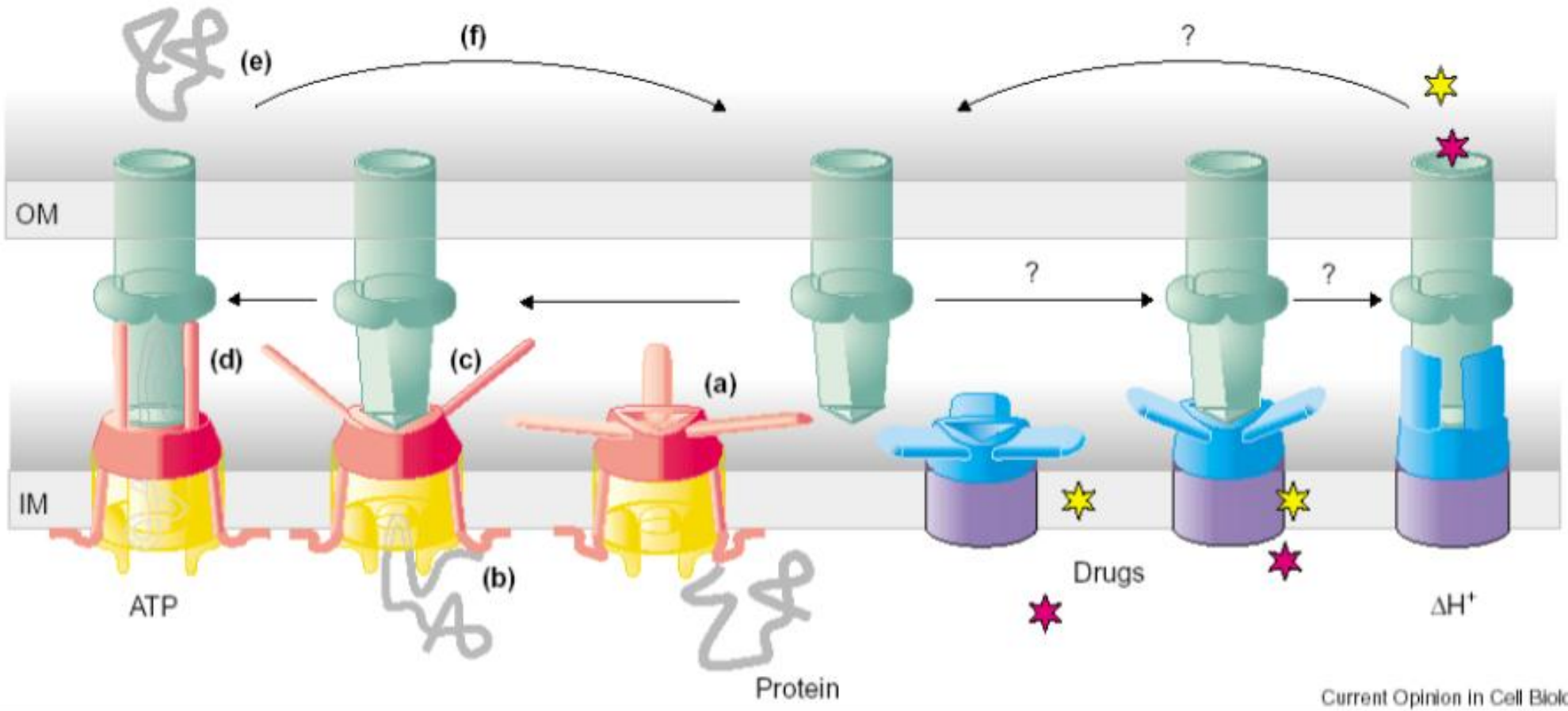
extracellular



cytosol

Protein export

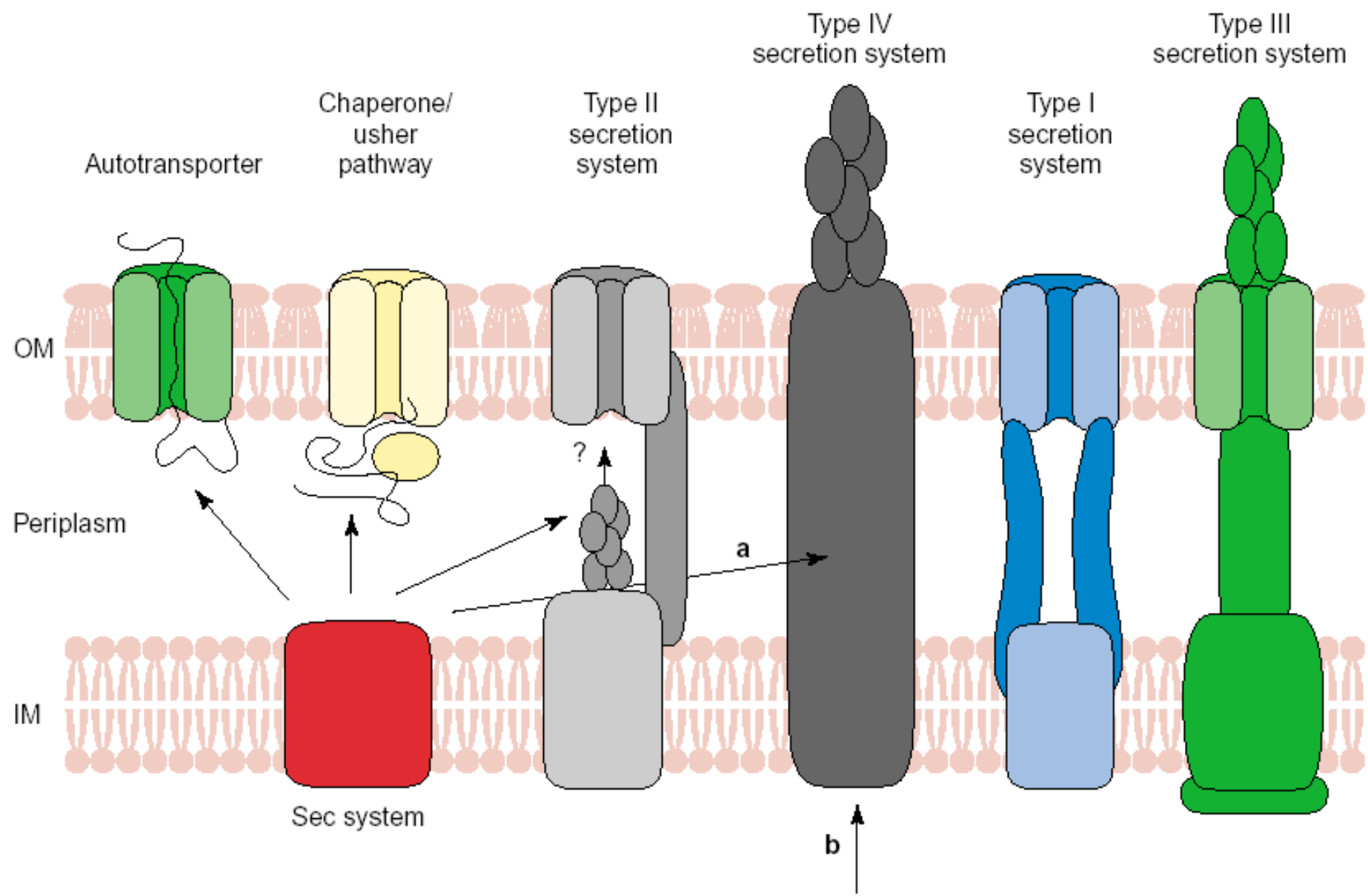
Drug efflux



Current Opinion In Cell Biology

Sec-dependent secretion

Sec-independent secretion



TRENDS in Microbiology

Γιατί είναι σημαντική η πρόγνωση διαμεμβρανικών τμημάτων;

- Τα άσχημα νέα
 - Παρά την πρόοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι πολύ δύσκολο να κρυσταλλωθούν.
- Τα καλά νέα
 - Είναι κοινώς αποδεκτό ότι η πρόγνωση διαμεμβρανικών τμημάτων είναι ακριβέστερη και ευκολότερη από την πρόγνωση δευτεροταγούς δομής στις σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες.