



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



# Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

## Μέρος Α΄

Νικόλαος Μπαλατσός

**Ρύθμιση και έλεγχος κατά την μεταφορά των  
πληροφοριών από το DNA στις πρωτεΐνες**

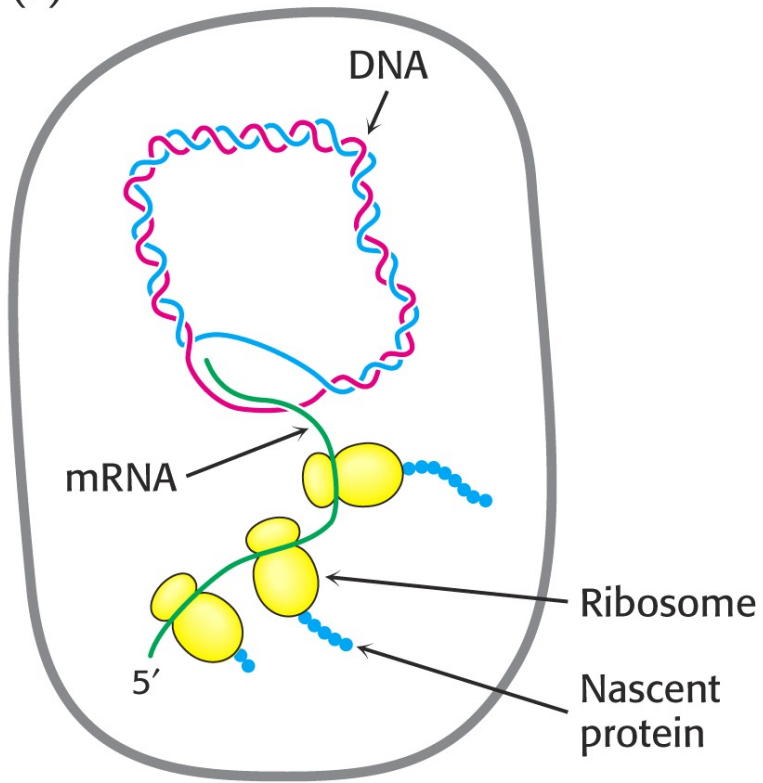
**Υπεύθυνος και απαραίτητος για:**

**Προσαρμογή  
Ποικιλότητα  
Διαφοροποίηση  
Ανάπτυξη  
Οικονομία ενέργειας**

**Σημαντικές διαφορές μεταξύ προκαρυωτικών και  
ευκαρυωτικών οργανισμών**

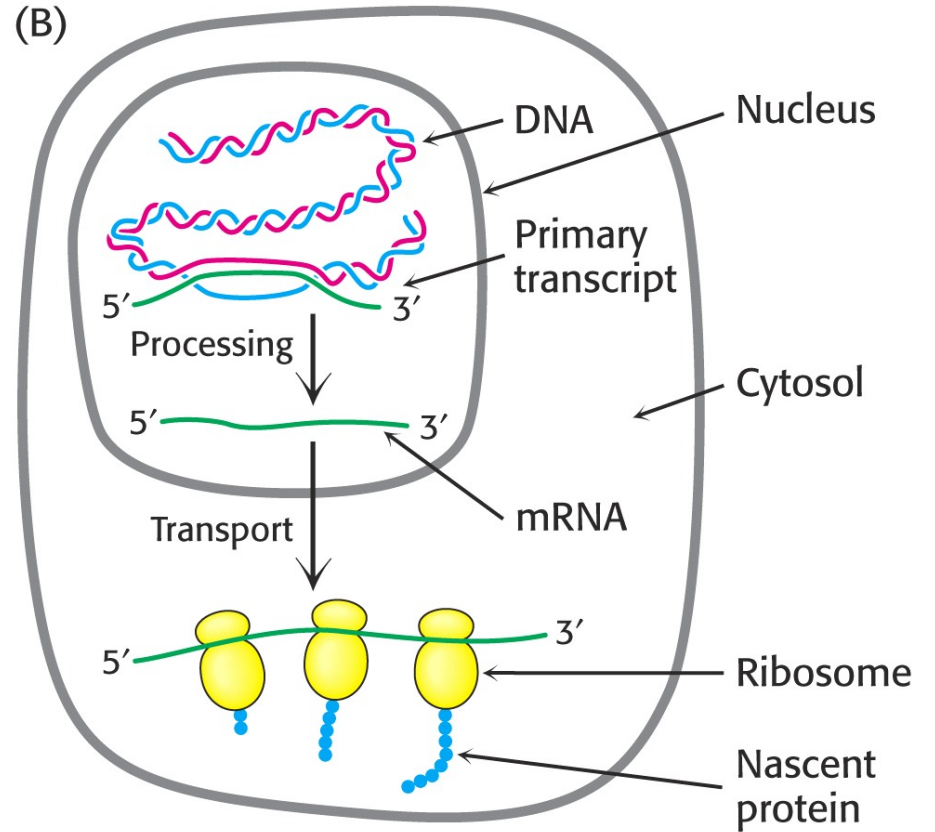
**Συνθήκες ανάπτυξης  
Μορφολογικές διαφορές**

(A)



PROKARYOTE

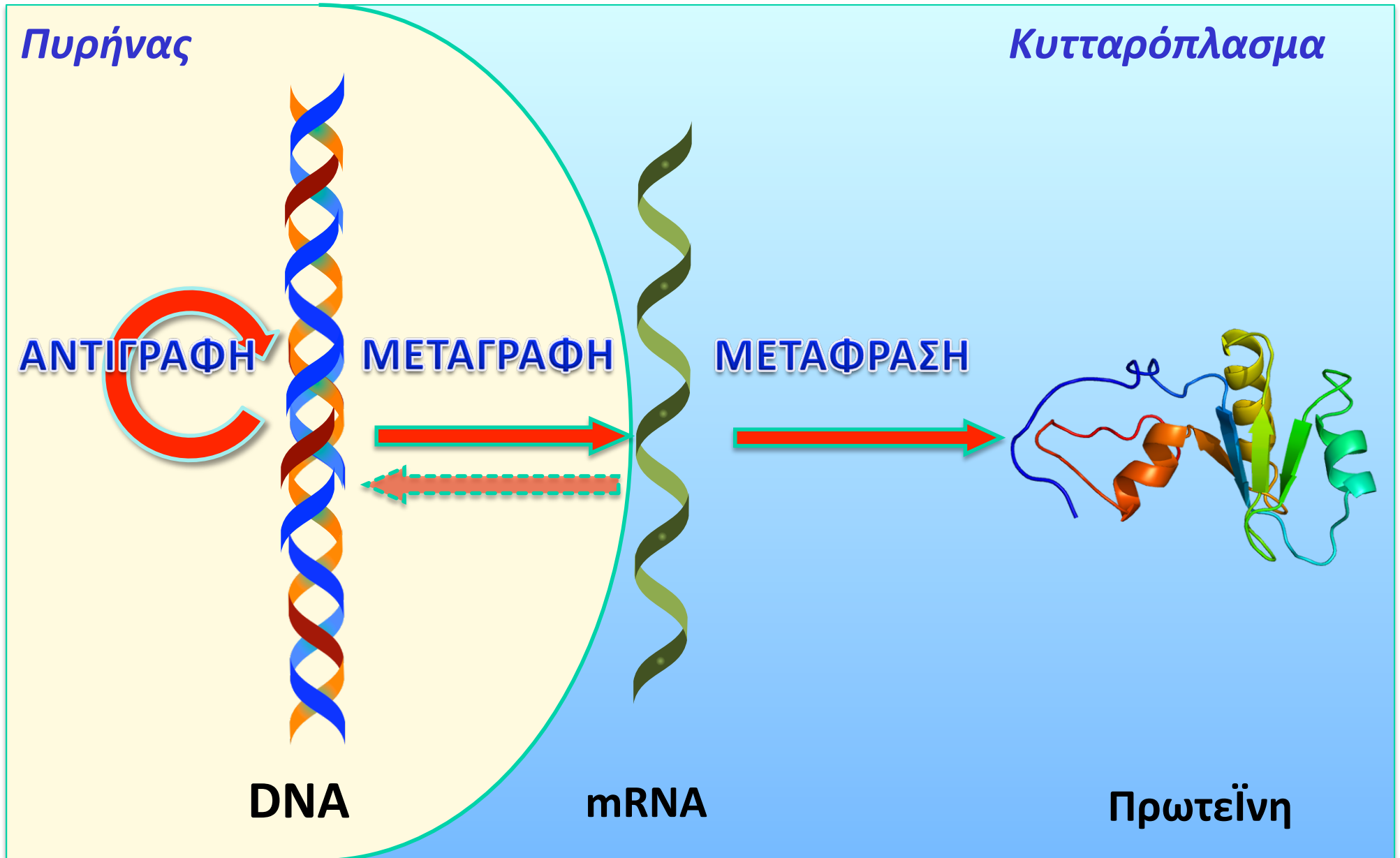
(B)



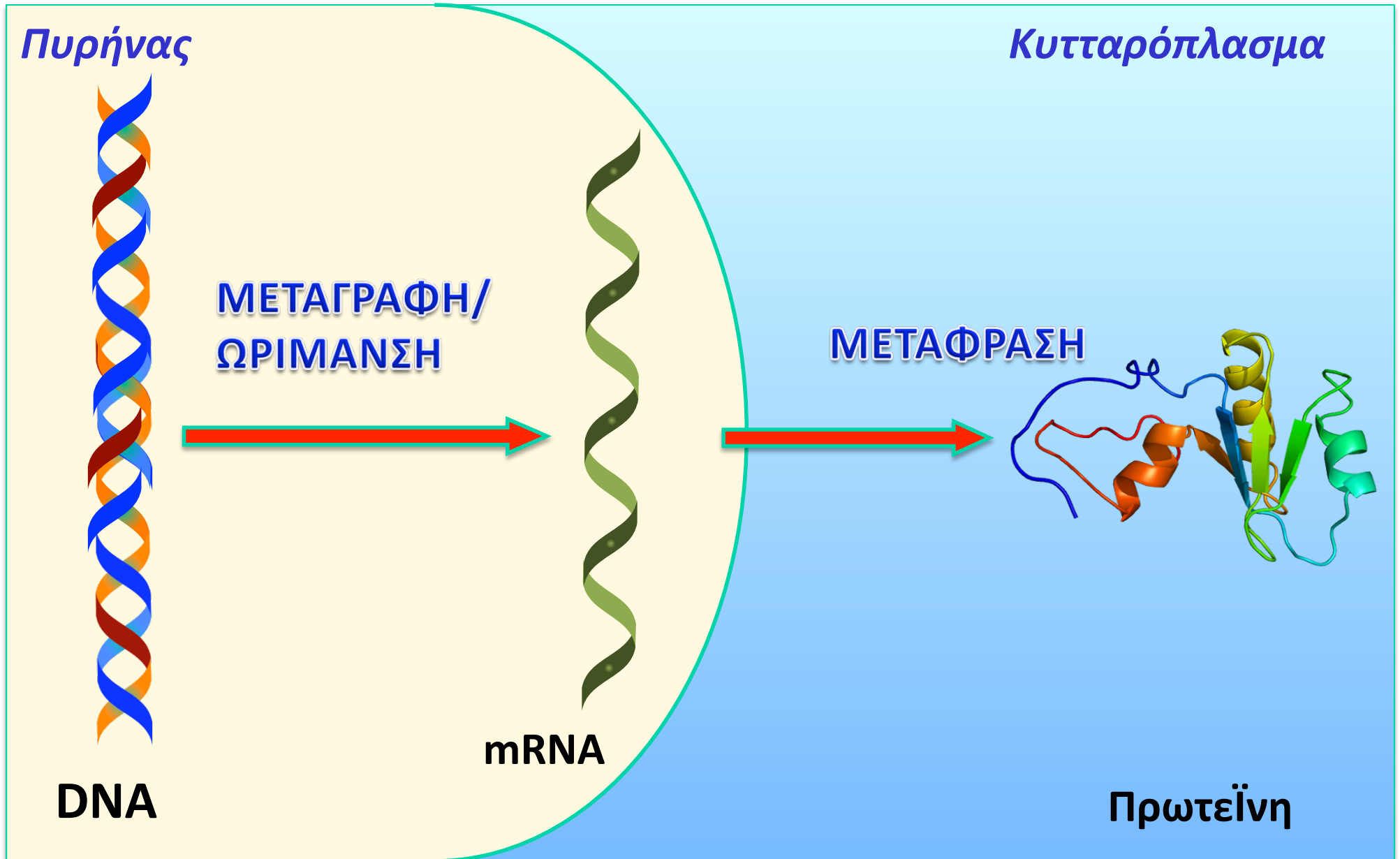
EUKARYOTE



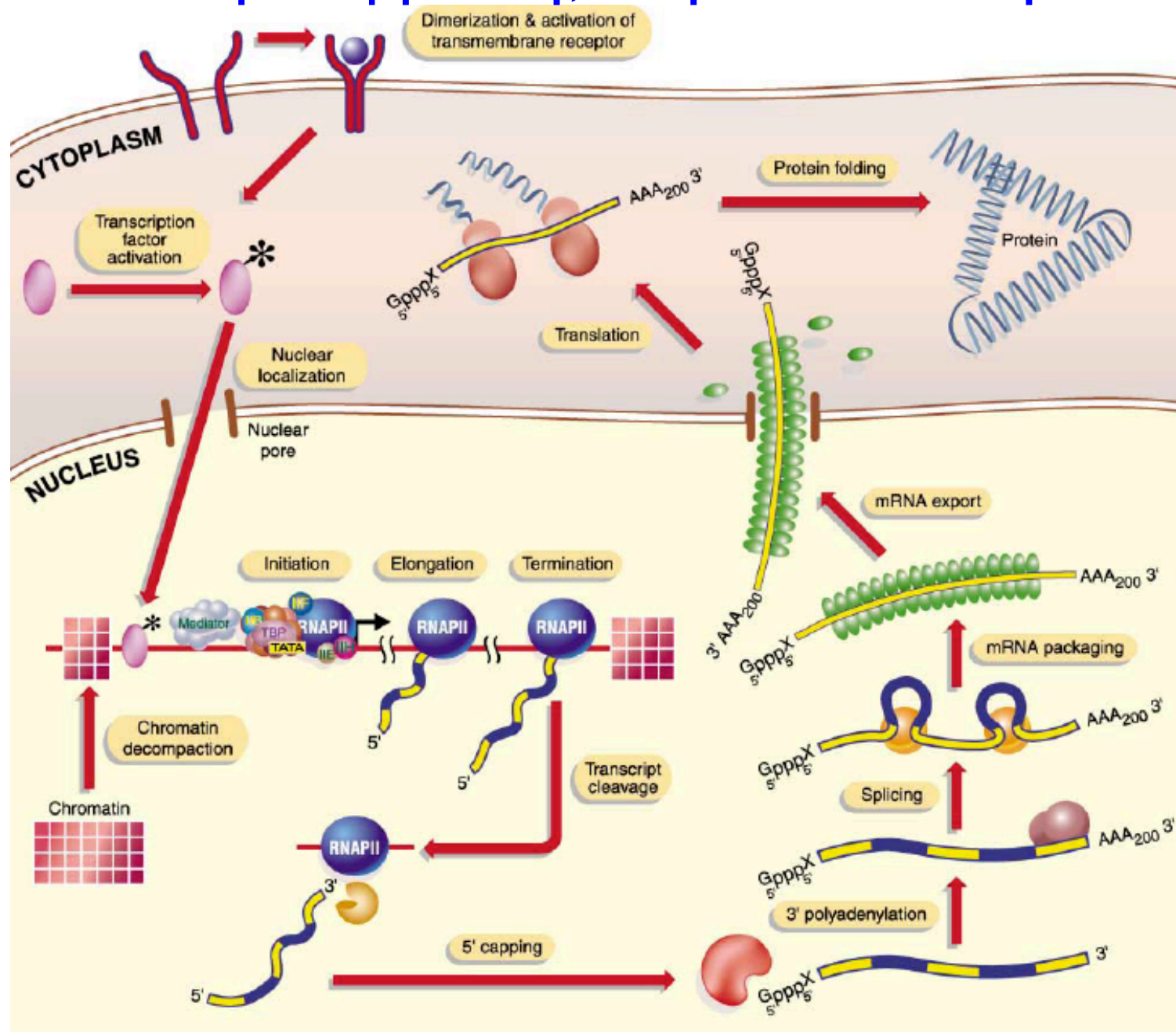
# Το κεντρικό δόγμα



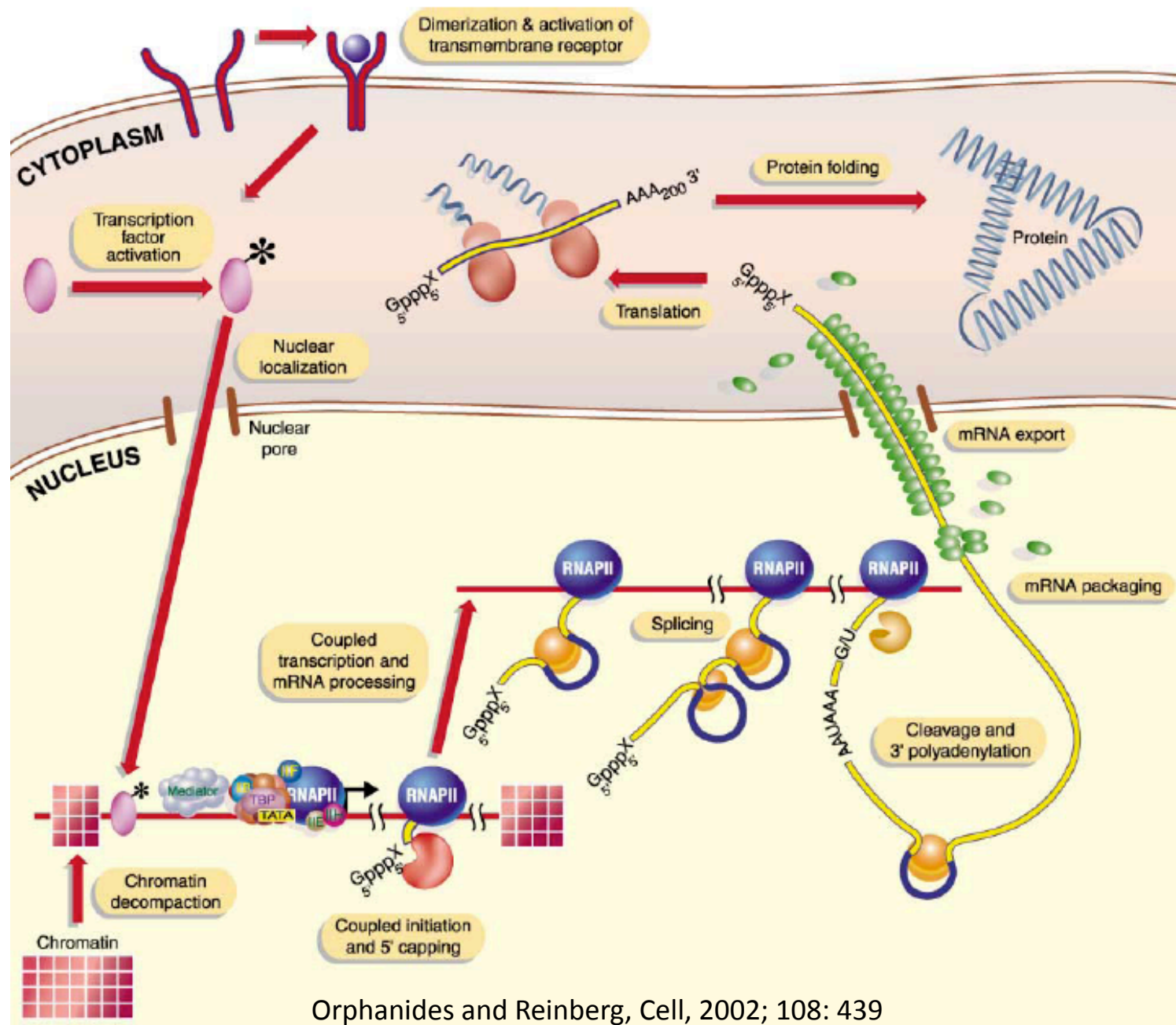
# Γονιδιακή έκφραση



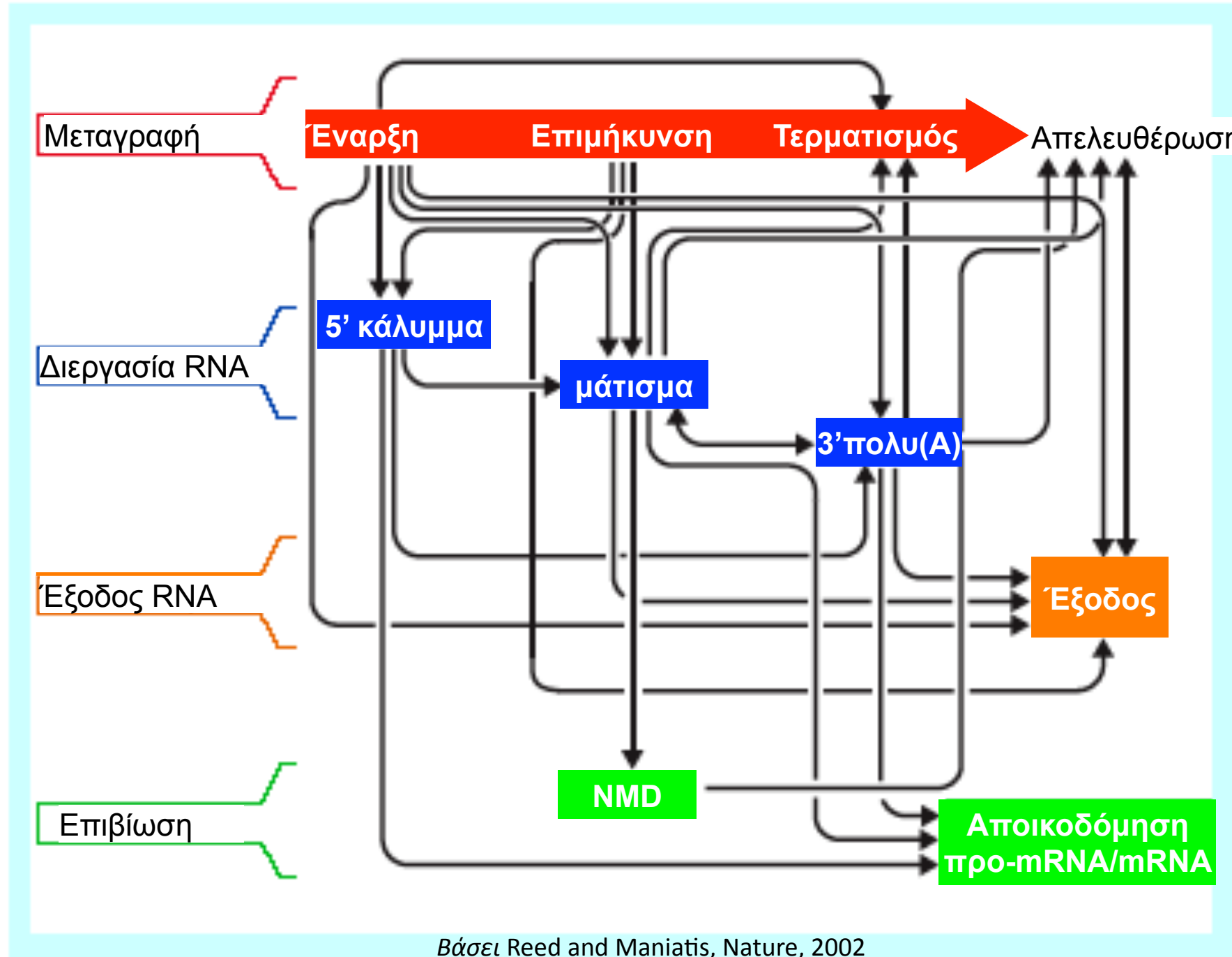
# Γονιδιακή έκφραση, παραδοσιακή άποψη



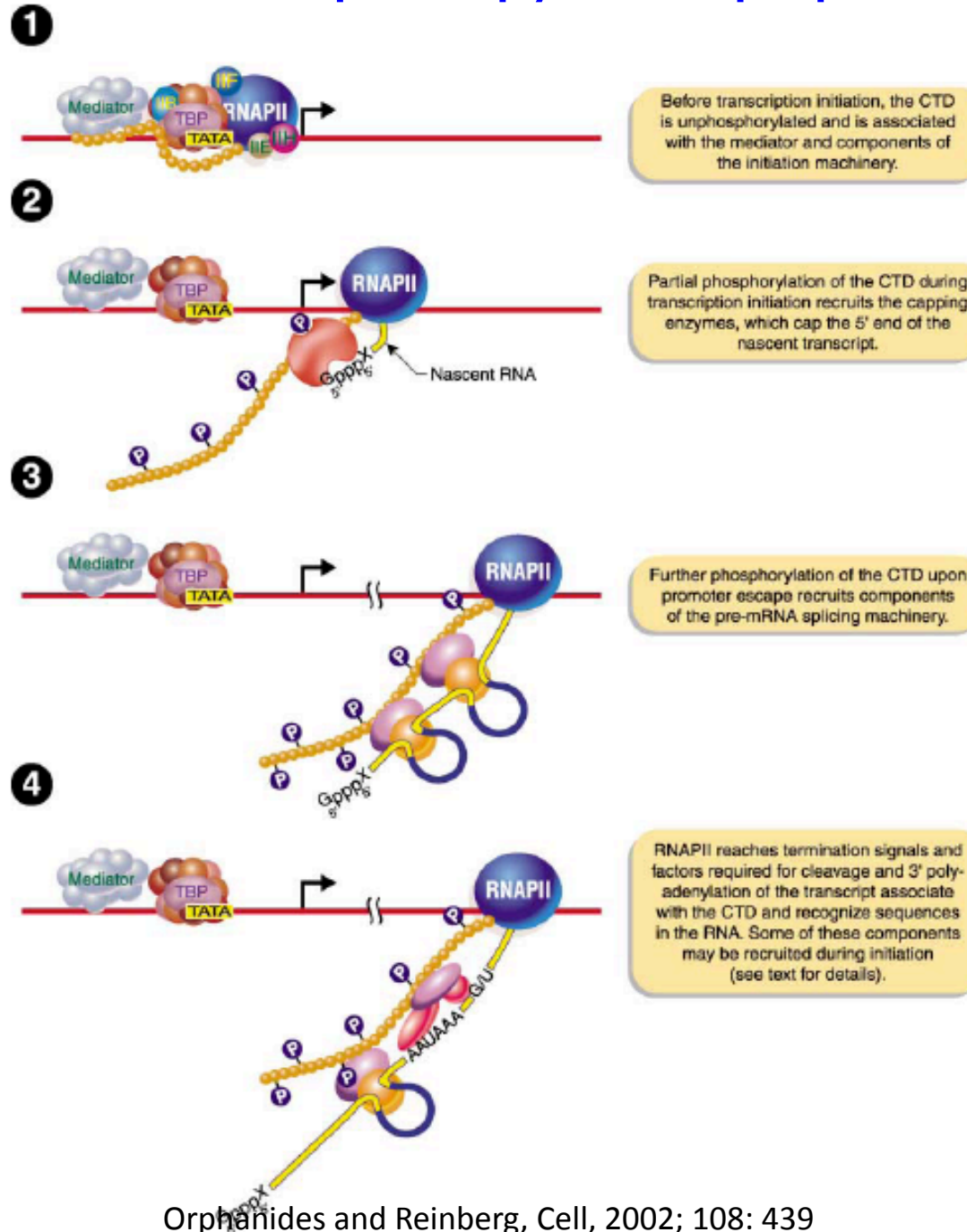
# Γονιδιακή έκφραση, σύγχρονη άποψη



# Οι διεργασίες της γονιδιακής έκφρασης είναι συζευγμένες



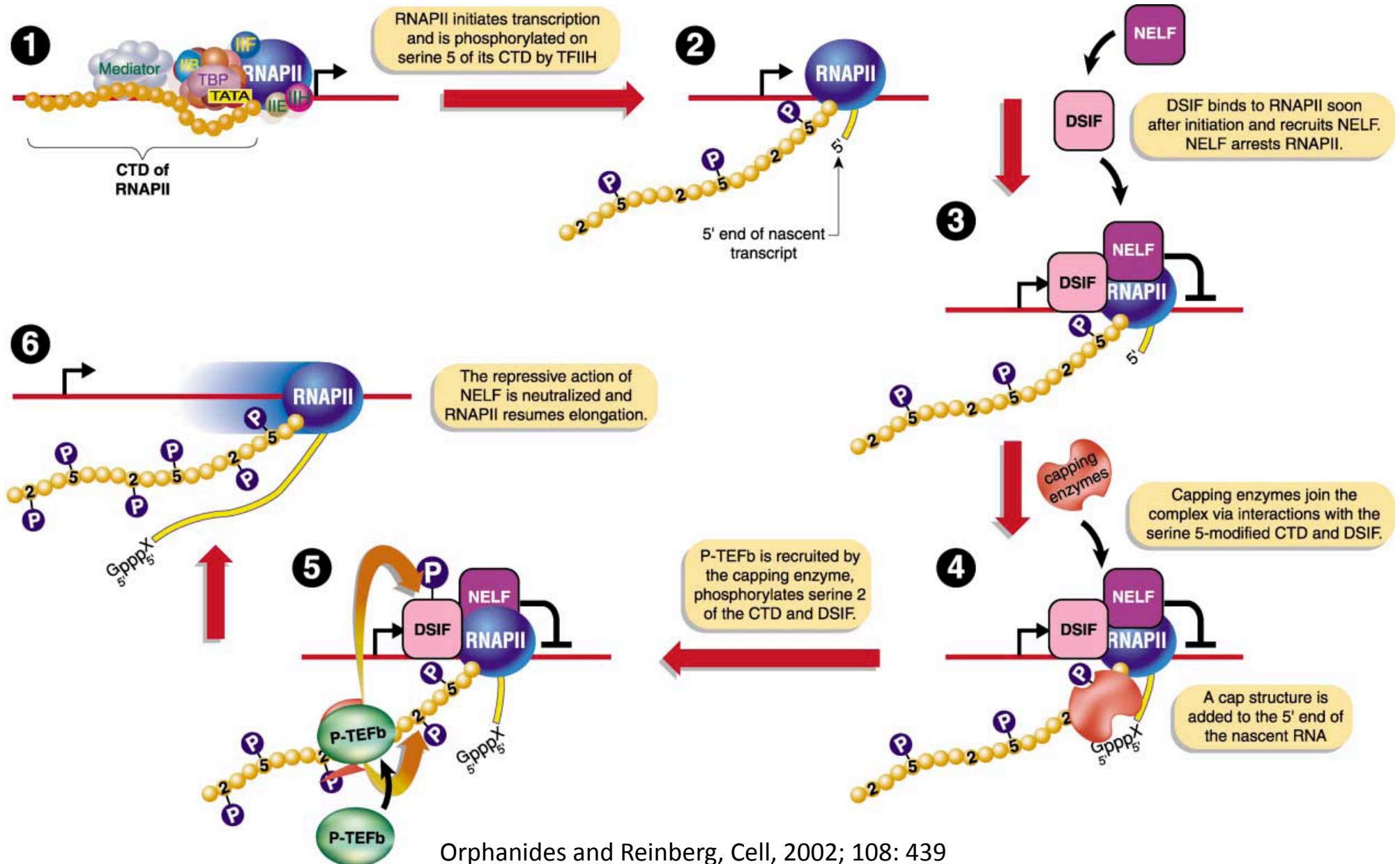
# Το καρβόξυ-τελικό άκρο της πολυμεράσης II του RNA





# 5'-κάλυμμα και έναρξη μεταγραφής

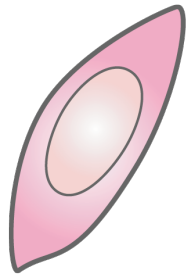
Η σύζευξη της προσθήκης της καλύπτρας με τα πρώτα στάδια της έναρξης της μεταγραφής



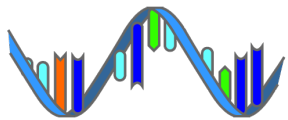
# Γονιδιακή έκφραση μικροσυστοιχίες

Φθορίζων cDNA από μυϊκά κύτταρα δίνει σήμα στο γονίδιο της μυοσίνης

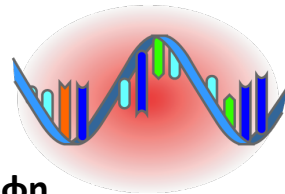
Μυϊκό κύτταρο



mRNA μυοσίνης

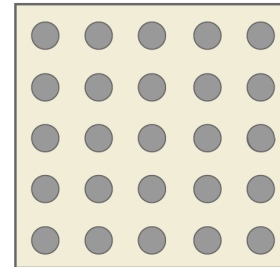


Φθορίζων cDNA

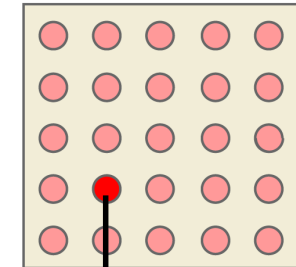


+ αντίστροφη  
μεταγραφάση

Μικροσυστοιχία DNA



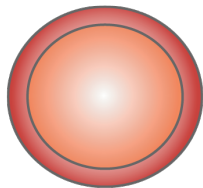
Διαβασμένη «Scanned»  
μικροσυστοιχία



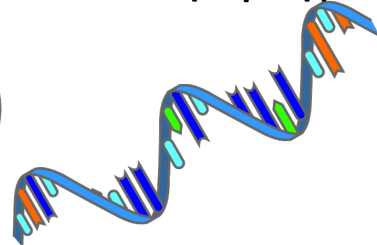
Myosin

Φθορίζων cDNA από λεμφοκύτταρα δίνει σήμα στο γονίδιο της ανοσοσφαιρίνης

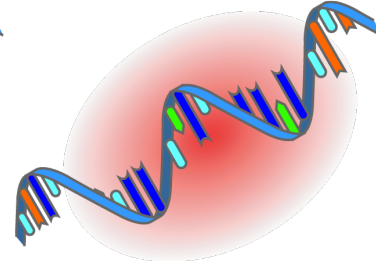
Λεμφοκύτταρο



mRNA  
ανοσοσφαιρίνης

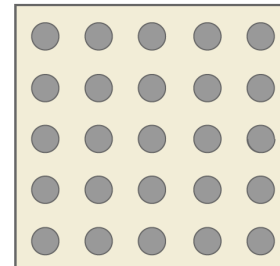


Φθορίζων cDNA

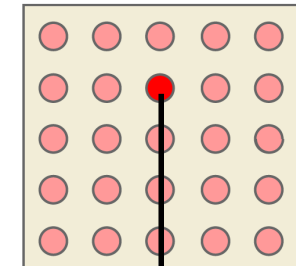


+ αντίστροφη  
μεταγραφάση

Μικροσυστοιχία DNA



Διαβασμένη «Scanned»  
μικροσυστοιχία

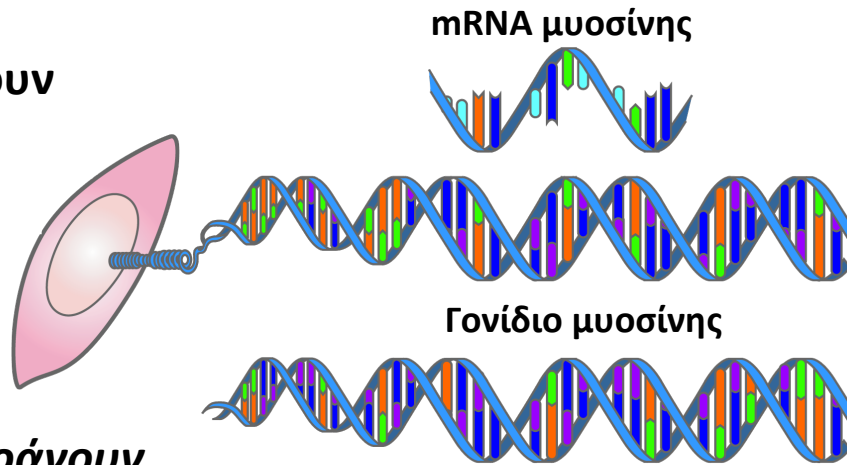


Immunoglobulin



# Η γονιδιακή έκφραση αλλάζει με τον τύπο κυττάρων

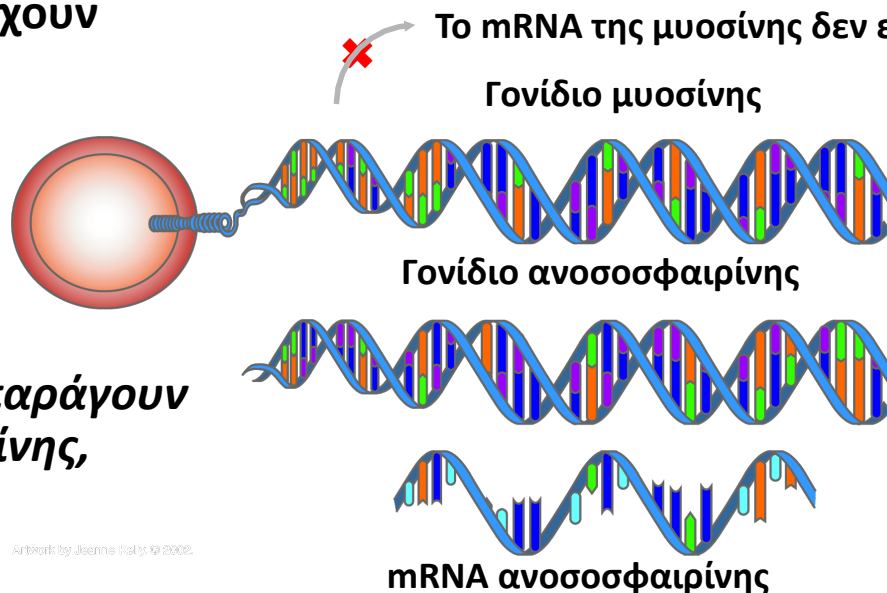
Τα μυϊκά κύτταρα έχουν και τα δύο γονίδια, όμως . . .



Τα μυϊκά κύτταρα παράγουν mRNA μυοσίνης, αλλά όχι ανοσοσφαιρίνης

Γονίδιο ανοσοσφαιρίνης  
Καμμία έκφραση γονιδίου ανοσοσφαιρίνης

Τα λεμφοκύτταρα έχουν και τα δύο γονίδια, όμως...



Το mRNA της μυοσίνης δεν εκφράζεται  
Γονίδιο μυοσίνης

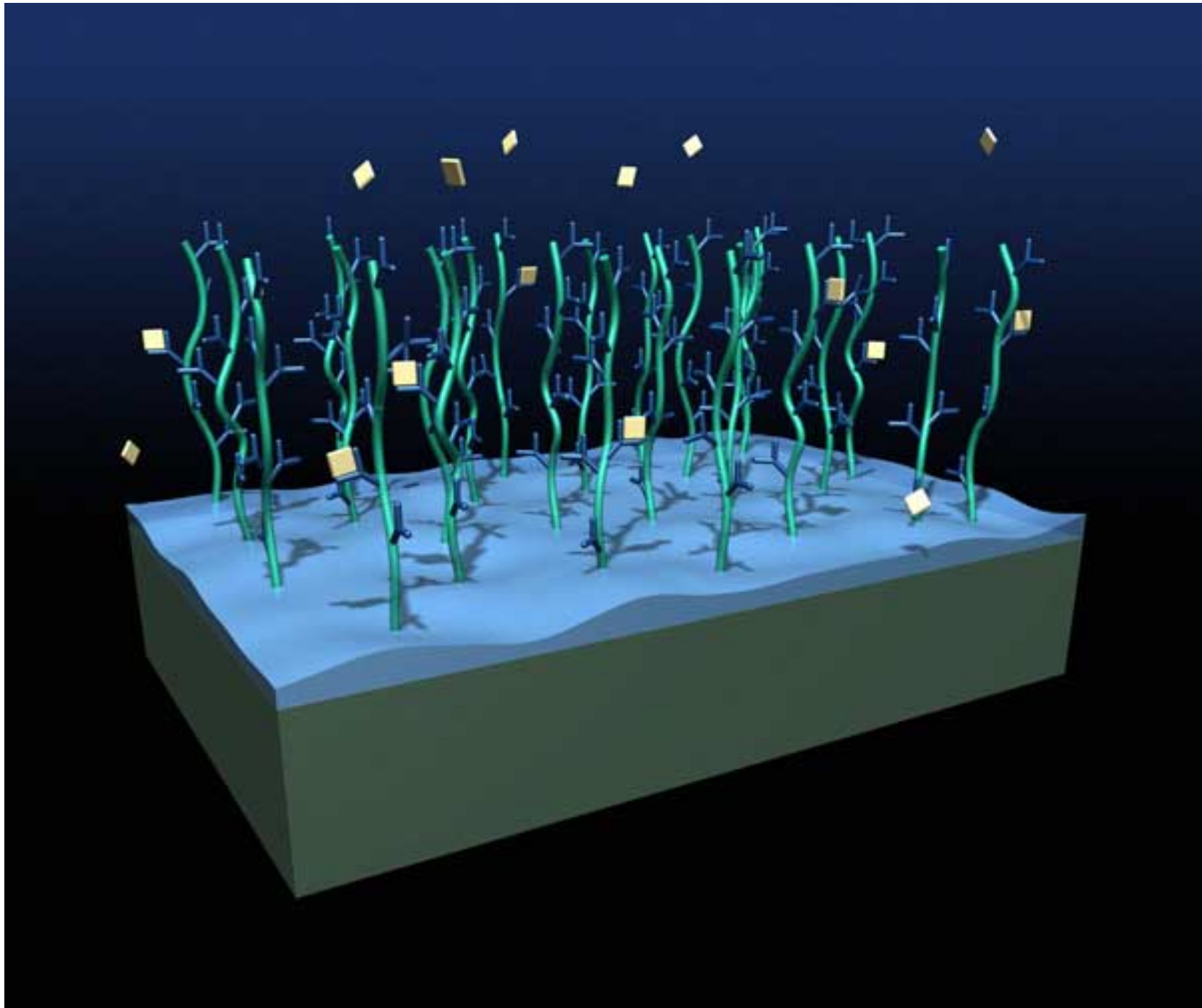
Τα λεμφοκύτταρα παράγουν mRNA ανοσοσφαιρίνης, αλλά όχι μυοσίνης

Artworks by Jusemme Waty © 2008.

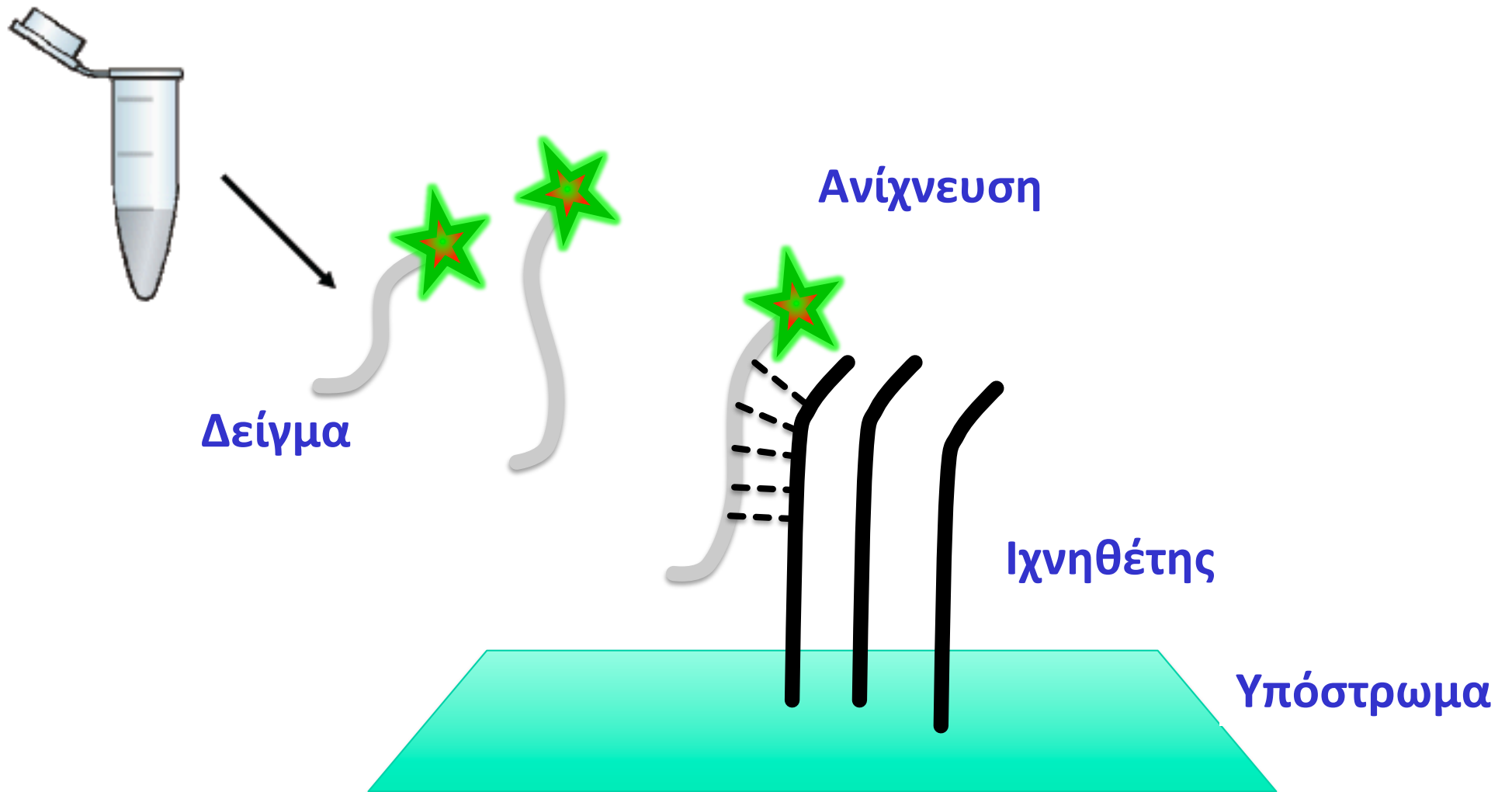
## 2 ακόμα βασικά χαρακτηριστικά:

❖ **Ενεργοποιητές:** DNA αλληλουχίες οι οποίες παρ'όλο που δεν έχουν ρόλο εκκινητή και μπορεί να βρίσκονται πολύ μακριά από την αρχή του γονιδίου παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνικών μορίων τα οποία εκφράζονται επιλεκτικά και παίζουν ρόλο στο να είναι προσβάσιμο κάποιο γονίδιο παρά στο να καθοδηγούν την RNA πολυμεράση

❖ **Τροποποίηση βάσεων του DNA:** 70% των C είναι μεθυλιωμένο, ανάλογα με το τύπο του κυττάρου. Η κατανομή των μεθυλιωμένων βάσεων δεν είναι ομοιόμορφη και δεν συναντάται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (π.χ. Στην *Drosophila* το DNA δεν μεθυλιώνεται καθόλου)



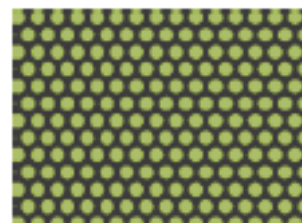
# Μικροσυτοιχίες



# Μικροστοιχίες

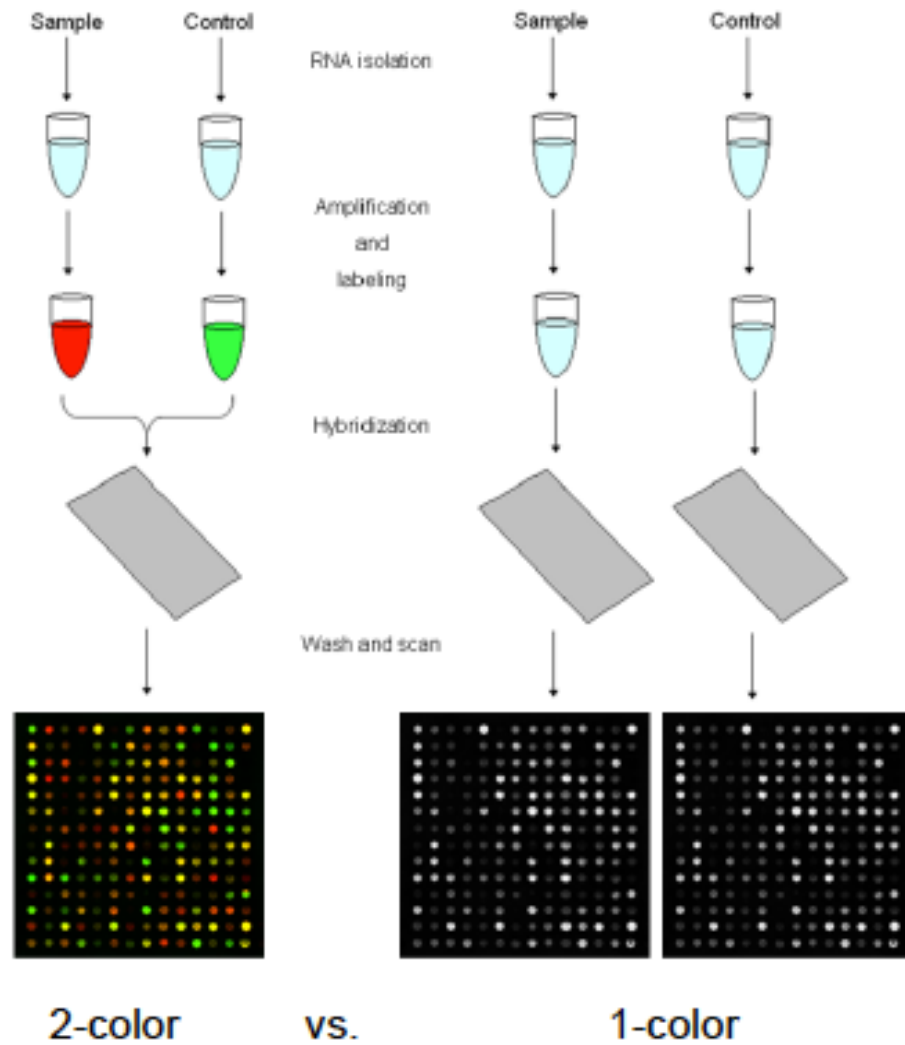


65 μm features



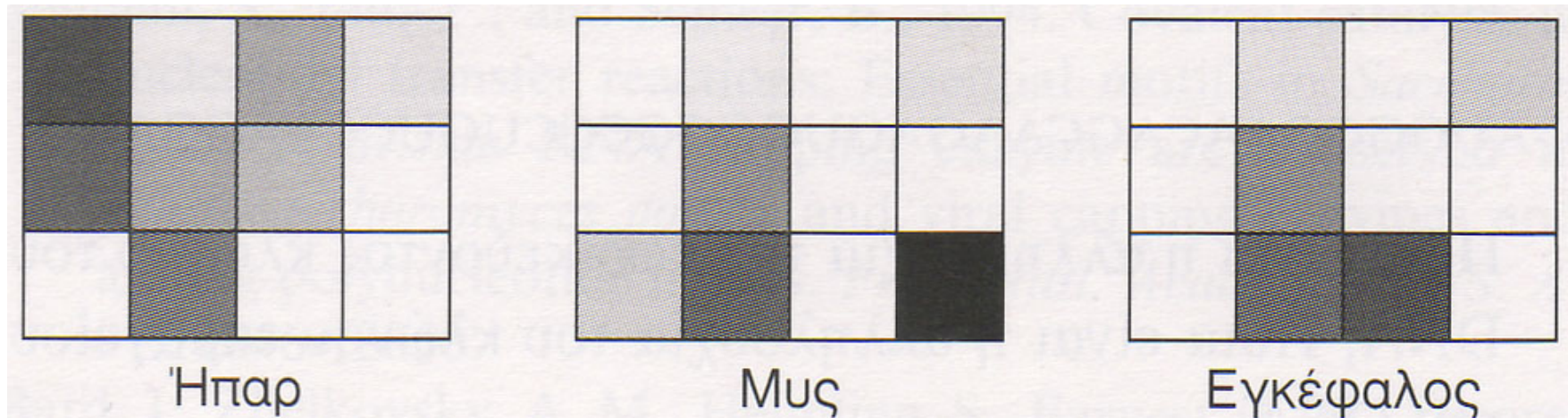
30 μm features

# Μικροσυστοιχίες



# Γονιδιακή έκφραση

## Μεταγραφή: Άσκηση ερμηνείας δεδομένων



Απομόνωση πυρήνων από ήπαρ, μυες, εγκέφαλο.

Επώασή τους με  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-UTP}$  για σύνθεση RNA, παρουσία αναστολέα έναρξης.

Απομόνωση σημασμένου RNA, υβριδοποίηση σε αλληλουχίες DNA σε μικροσυστοιχίες, όπως φαίνεται στην εικόνα. Κάθε τετράγωνο αντιστοιχεί σε μιά αλληλουχία DNA.

Η ένταση της σκίασης δηλώνει την ποσότητα του RNA που προσκολλάται.

α) γιατί διαφέρει η ένταση της υβριδοποίησης;

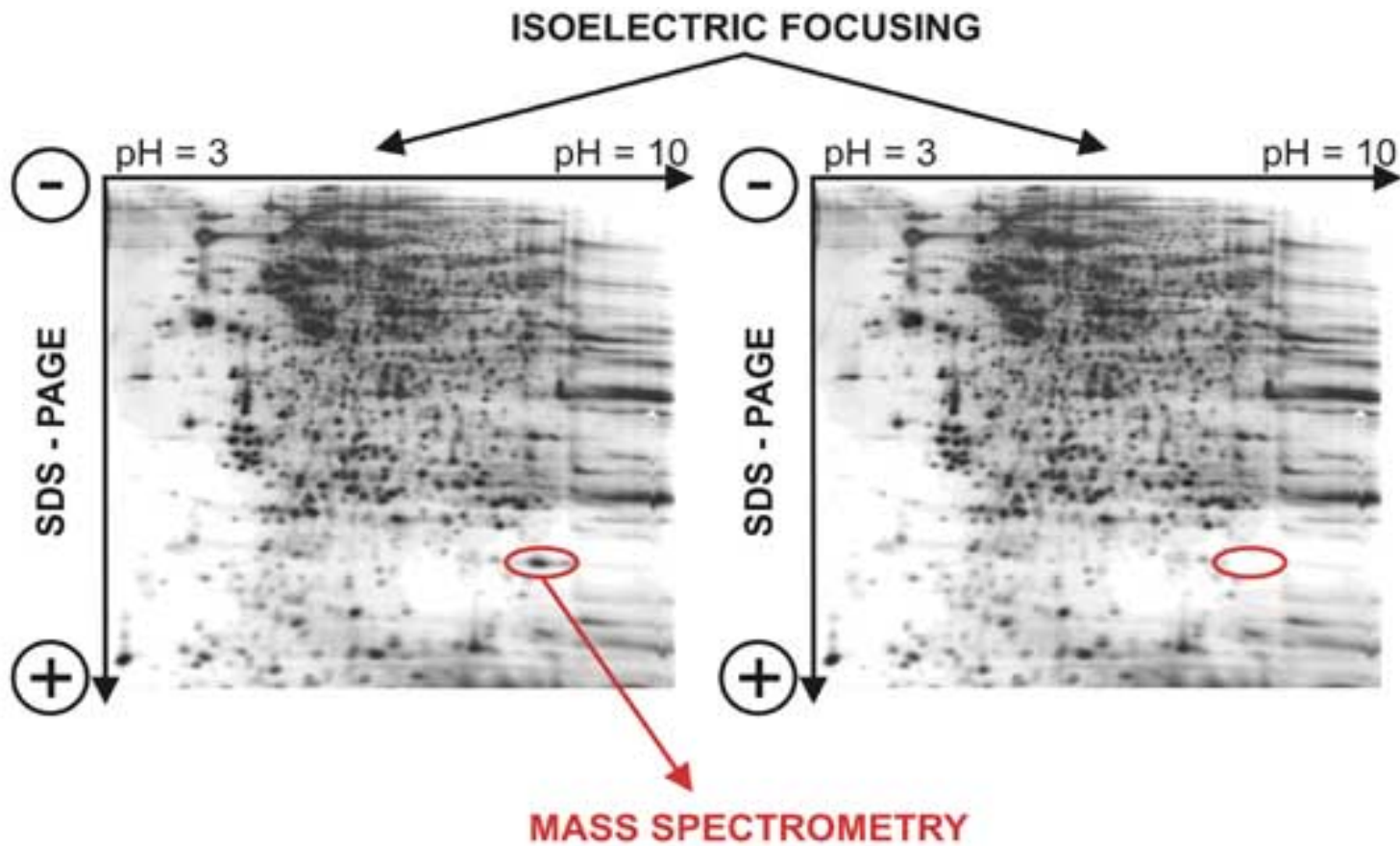
β) είναι η προηγούμενη παρατήρηση σημαντική;

γ) μερικά γονίδια εκφράζονται σε όλους τους ιστούς. Ποιά μπορεί να είναι φύση αυτών;

δ) Για ποιό λόγο προστίθεται ο αναστολέας έναρξης της μεταγραφής στο μίγμα αντίδρασης;



# Γονιδιακή έκφραση πρωτεΐνες

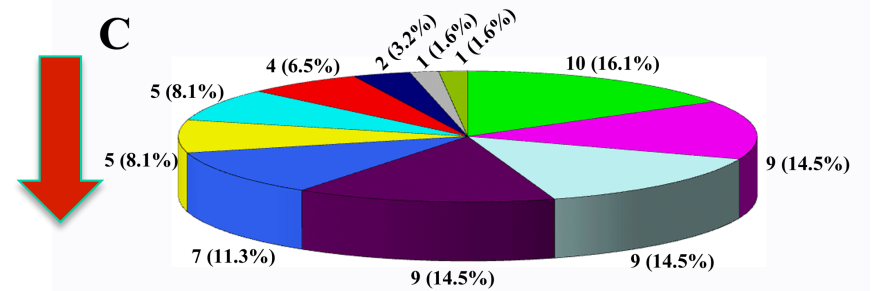
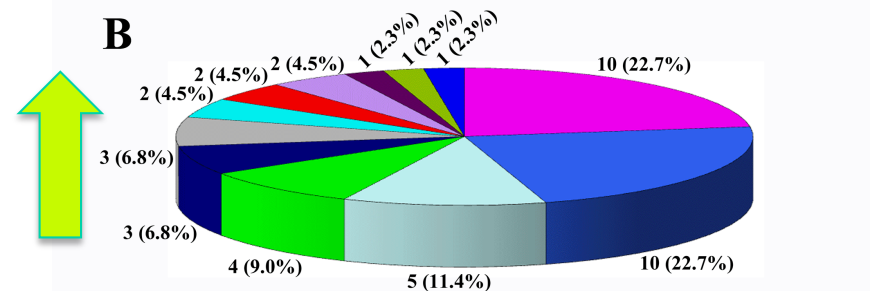
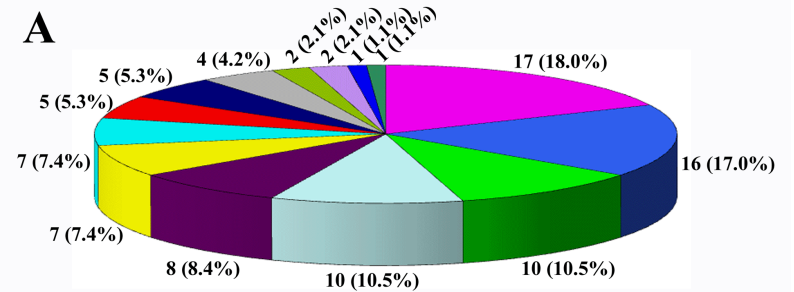
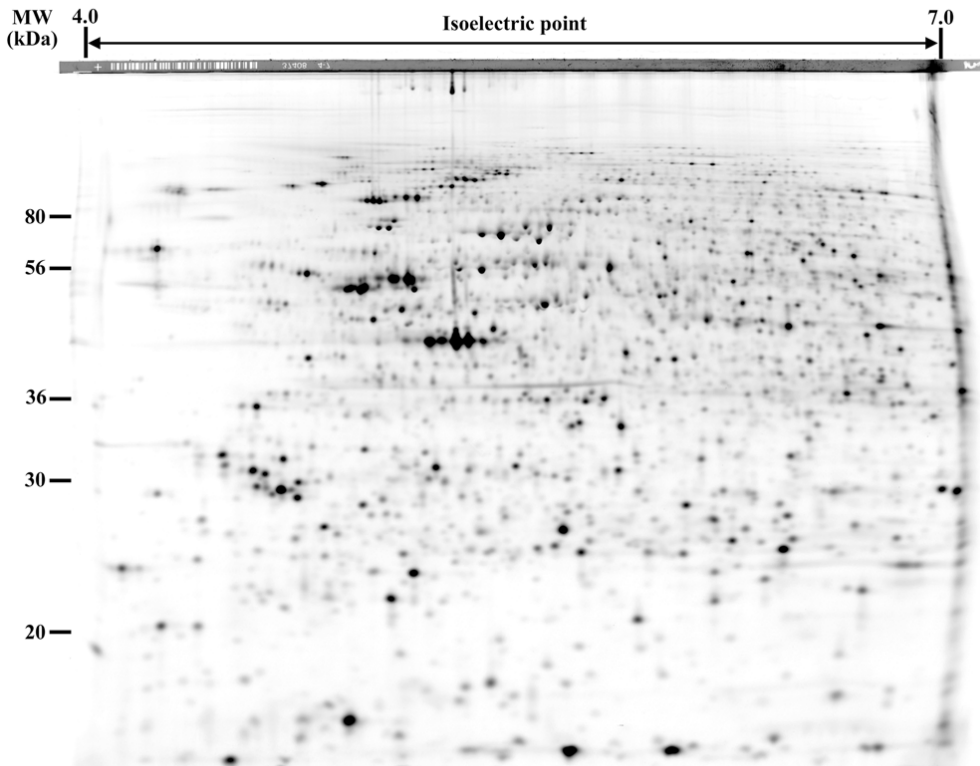


<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/en/proteomics.htm>

Based on [http://research.lunenfeld.ca/techTransfer/download\\_box/seminars/2008-01-31.pdf](http://research.lunenfeld.ca/techTransfer/download_box/seminars/2008-01-31.pdf)



# Κατατομή (προφίλ) γονιδιακής έκφρασης



- Metabolism
- Apoptosis
- DNA replication
- Cytoskeleton
- Proteolysis
- Calcium-binding
- Protein synthesis
- RNA synthesis
- ADP reductase
- Transport
- Signal transduction
- Cell cycle
- Chaperone
- Extracellular matrix

Yamada M et al. <http://www.omicsonline.com/ArchiveJPB/2009/January/03/JPB2.1.php?>

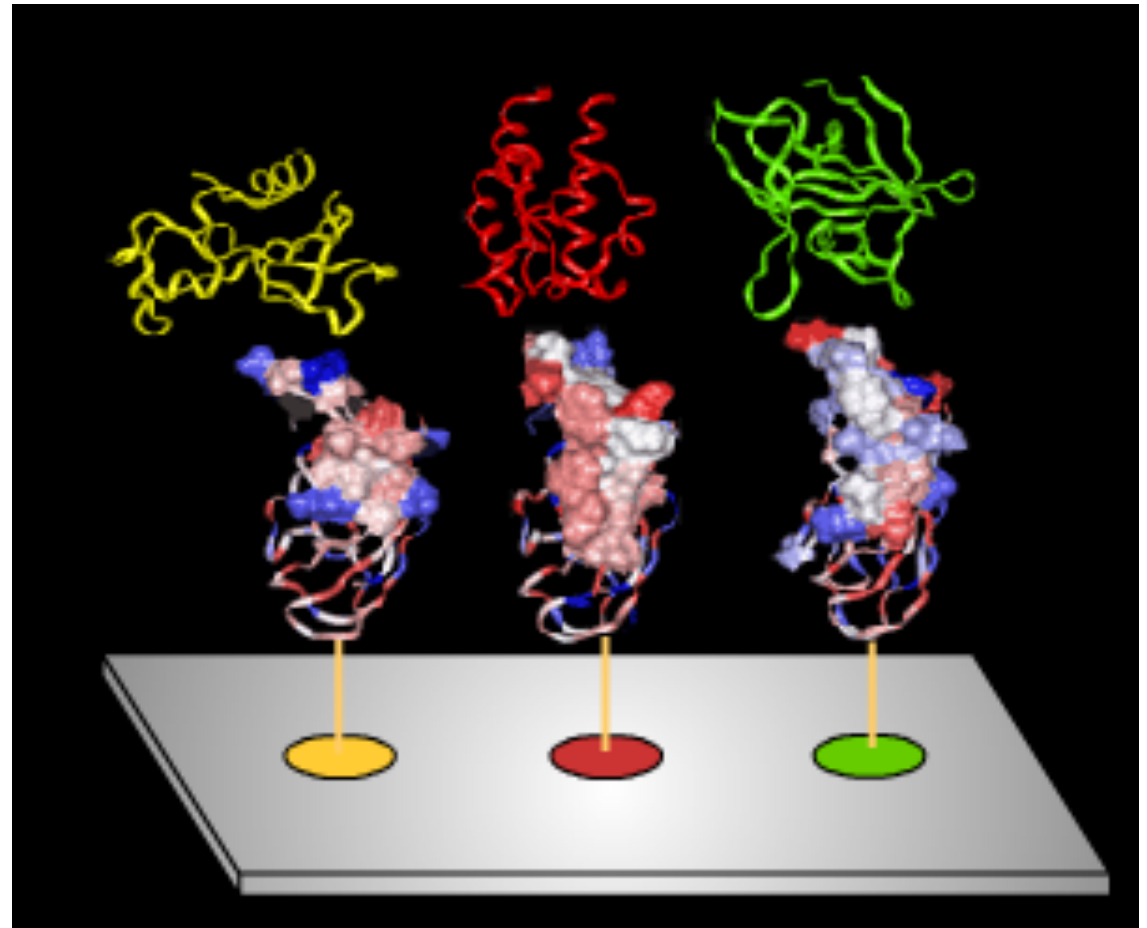
email1=

Based on [http://research.lunenfeld.ca/techTransfer/download\\_low/seminars/2008-09-11.pdf](http://research.lunenfeld.ca/techTransfer/download_low/seminars/2008-09-11.pdf)

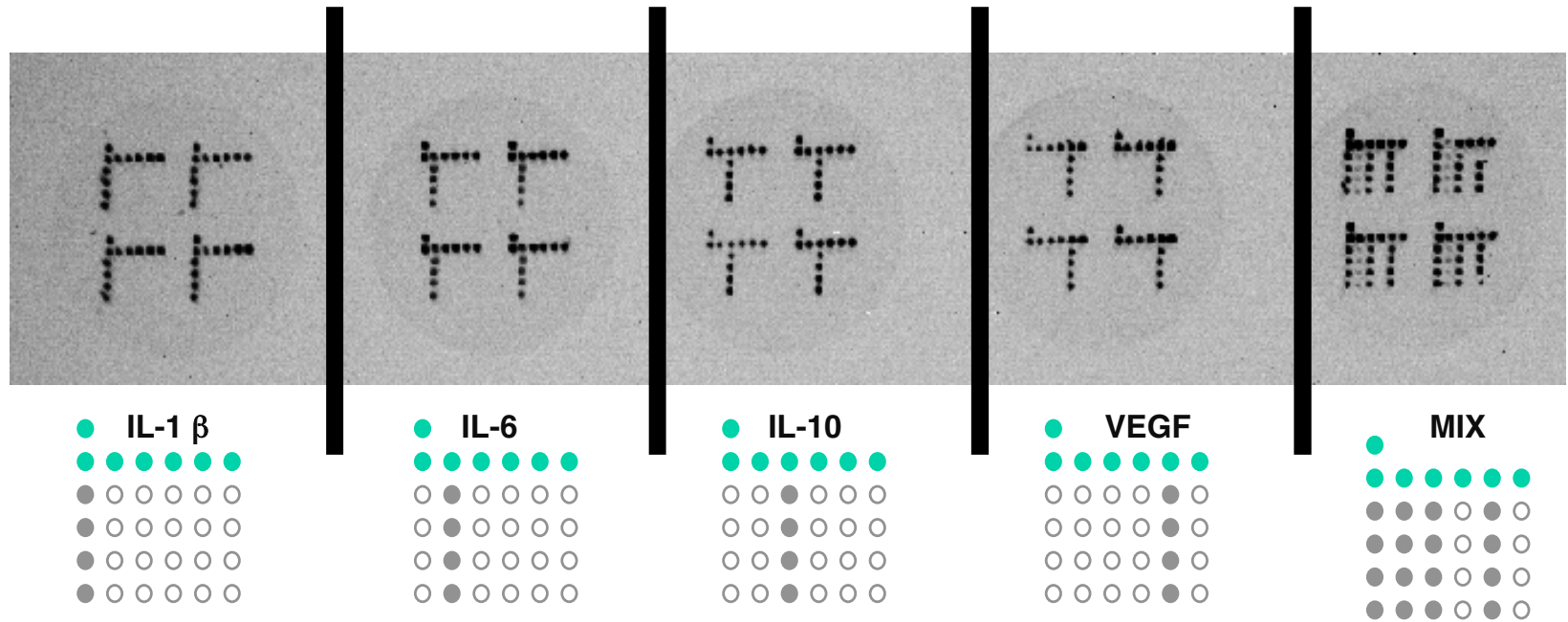
# Μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών

Σάρωση για:

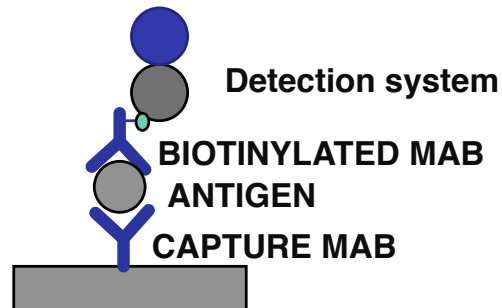
- μικρά μόρια στόχους
- μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις
- Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών
- Αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών
- Ενζυμικές δοκιμές
- Χαρτογράφηση επιτόπων



# Cytokine Specific Microarray ELISA



● marker protein  
● cytokine



# Mass Spectrometry for Proteomic Pattern Generation

- Serum analysis by SELDI-TOF mass spectrometry after extraction of lower molecular weight proteins
- Data analyzed by a “pattern recognition” algorithm

# Serum Fingerprint by Mass Spectrometry

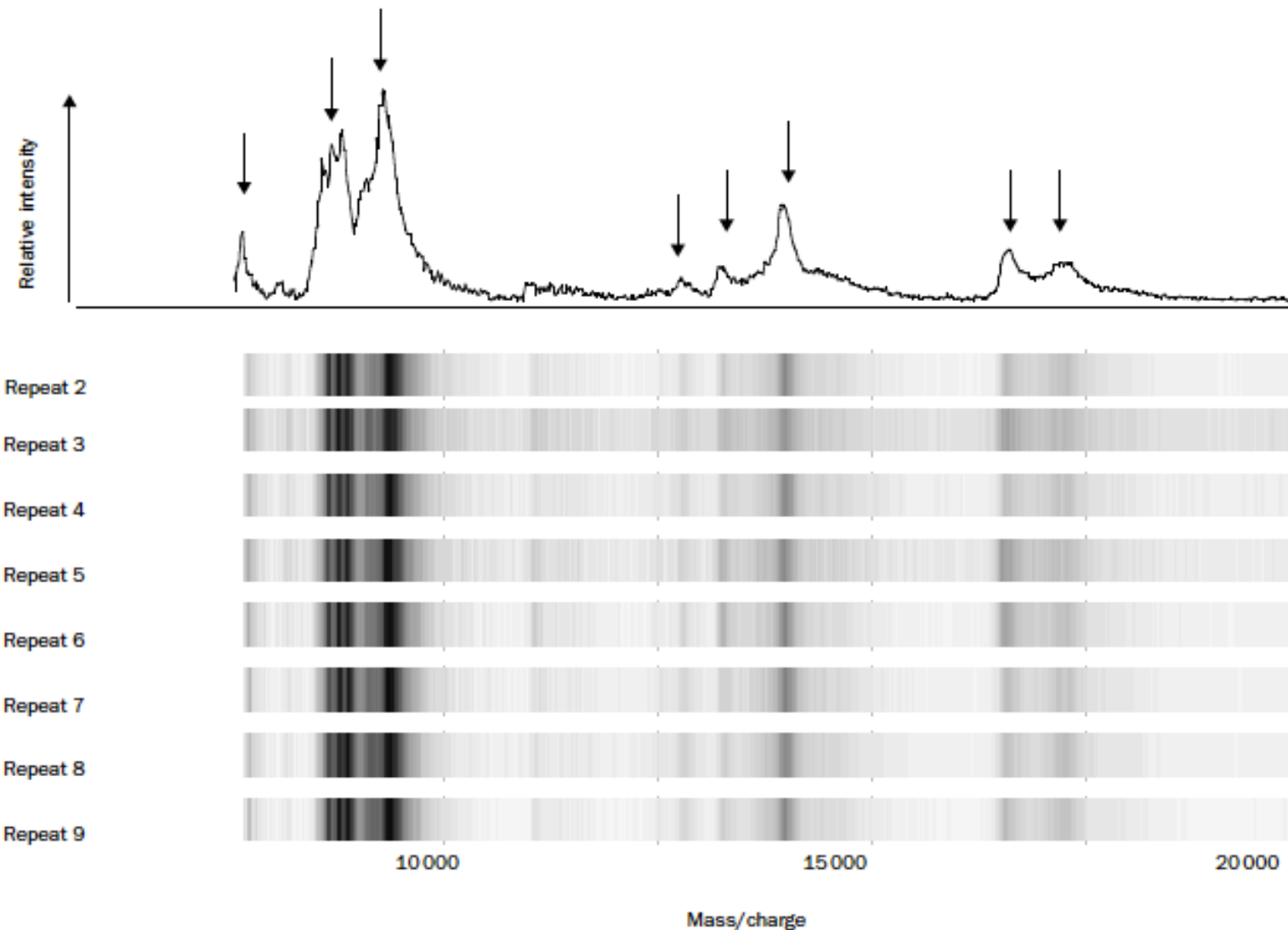


Figure 2: **Example of between-chip reproducibility of mass spectra**

Serum from an unaffected female control was individually applied to a single bait surface region on 100 separate C18 chips and analysed by SELDI-TOF. Nine randomly obtained spectra from the 100 used in the analysis are shown. The eight proteins with the highest consistent amplitudes (arrows), were used as a surrogate for reproducibility by calculation of the coefficient of variance of the normalised peak amplitudes for each of the eight.

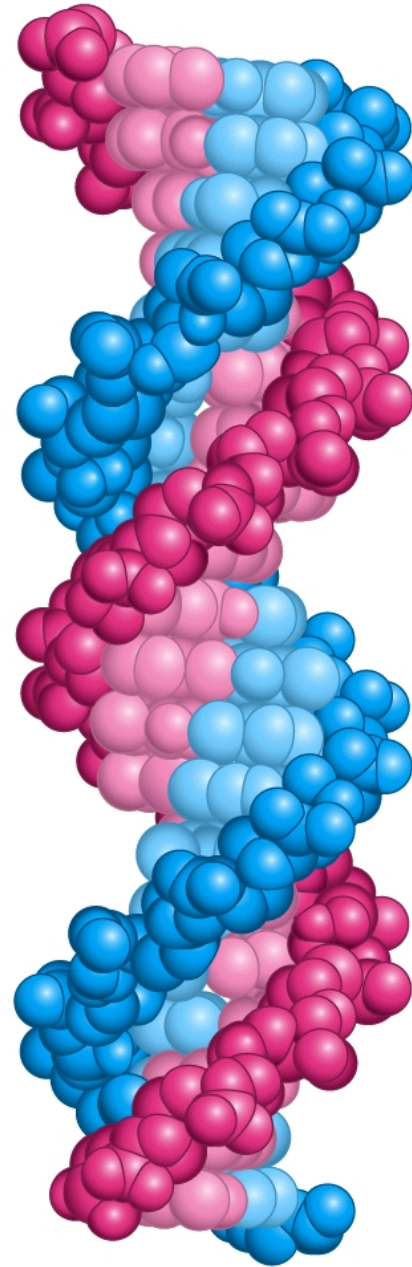
Petricoin III EF, et al. *Lancet* 2002;359:572-577

**Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η δομή της  
χρωματίνης μειώνει δραματικά το μέγεθος του  
γονιδιώματος**

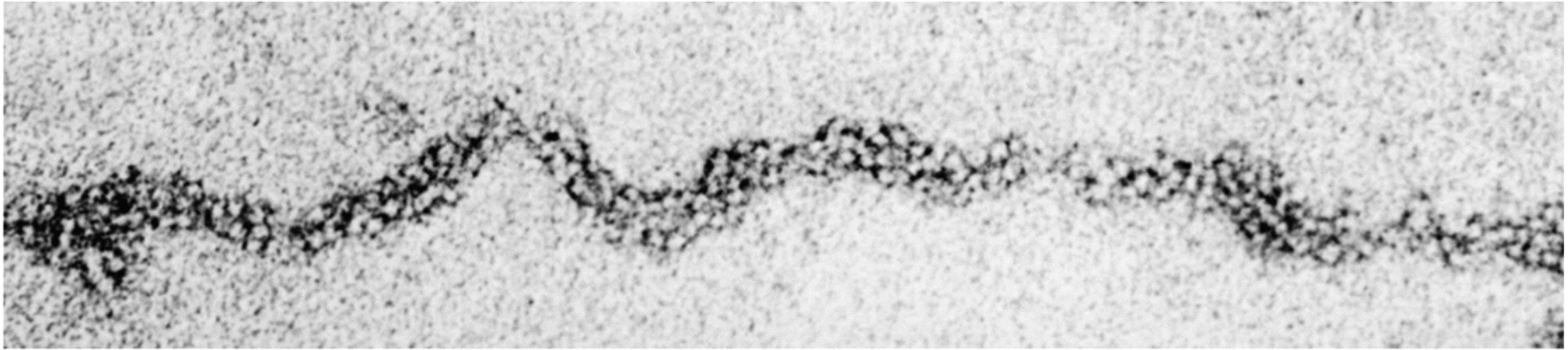
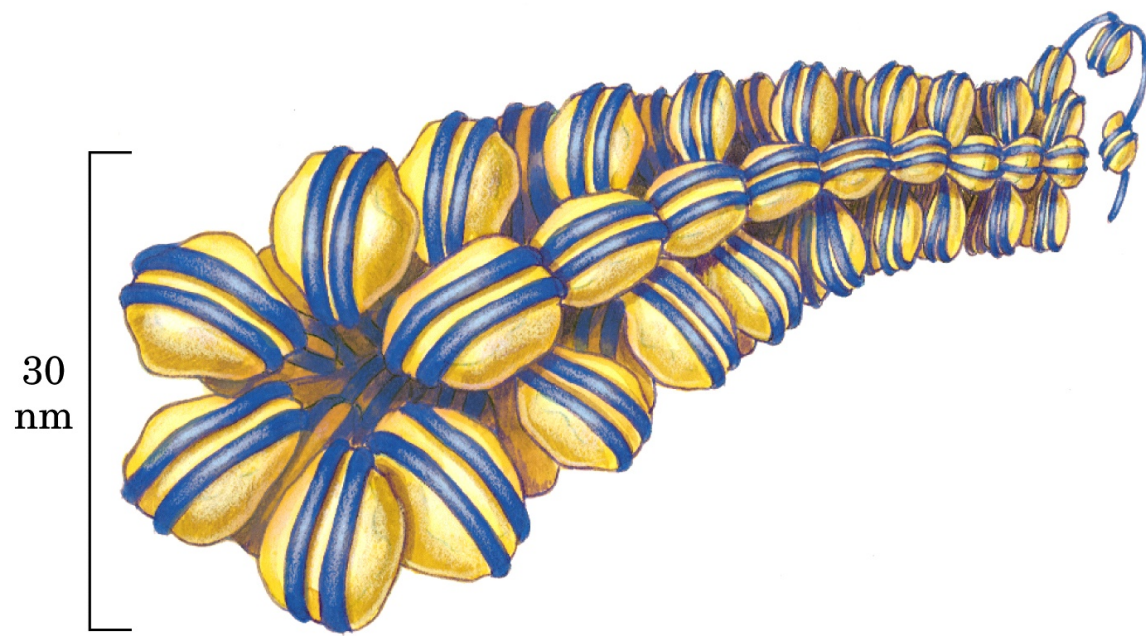
**Στον άνθρωπο μόνο το 2% του DNA κωδικοποιεί  
πρωτεΐνες**

(A)

34Å







**(b)**



**Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η δομή της  
χρωματίνης μειώνει δραματικά το μέγεθος του  
γονιδιώματος**

**Στον άνθρωπο μόνο το 2% του DNA κωδικοποιεί  
πρωτεΐνες**

# Παίζει ρόλο η δομή της χρωματίνης στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης;

- ✓ Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς απαιτεί την ανακατάταξη της χρωματίνης (**chromatin remodeling**)
- ✓ Το “πακετάρισμα του DNA” σε χρωματίνη δεν είναι ομοιόμορφο και αυτό γιατί σε περιοχές οι οποίες πρέπει να μεταγραφούν τα νουκλεοσώματα έχουν πιο χαλαρή οργάνωση, είναι ευαίσθητα σε επεξεργασία με DNase I, ενώ οι ιστόνες είναι ακετυλιωμένες και η H1 «υπο-αντιπροσωπεύεται»
- ✓ Όλες οι υπερευαίσθητες περιοχές του DNA παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τον τύπο του κυττάρου και παίζουν μεγάλο ρόλο στην πορεία της διαφοροποίησης

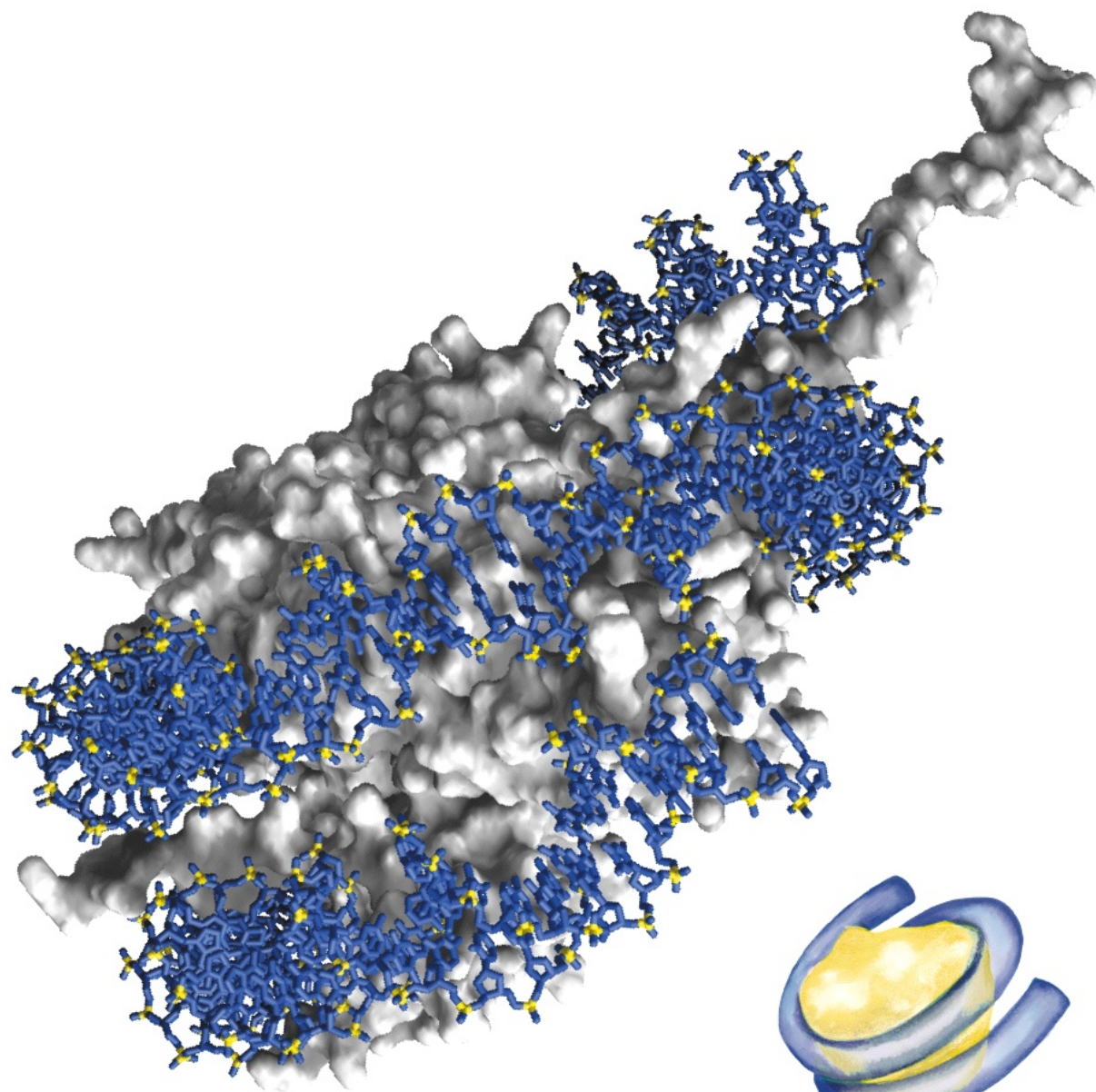
## Παράδειγμα:

Γονίδια σφαιρινών σε πρόδρομα ερυθροκύτταρα από έμβρυα 20h δεν επηρεάζονται από την δράση DNase I

Όταν αρχίζει η σύνθεση αιμοσφαιρίνης μετά από 35h τότε οι περιοχές γύρω από τα γονίδια αυτά είναι προσβάσιμες από την νουκλεάση, γεγονός που υποδηλώνει την ανακατάταξη της χρωματίνης στα κύτταρα, όταν αρχίζουν να διαφοροποιούνται

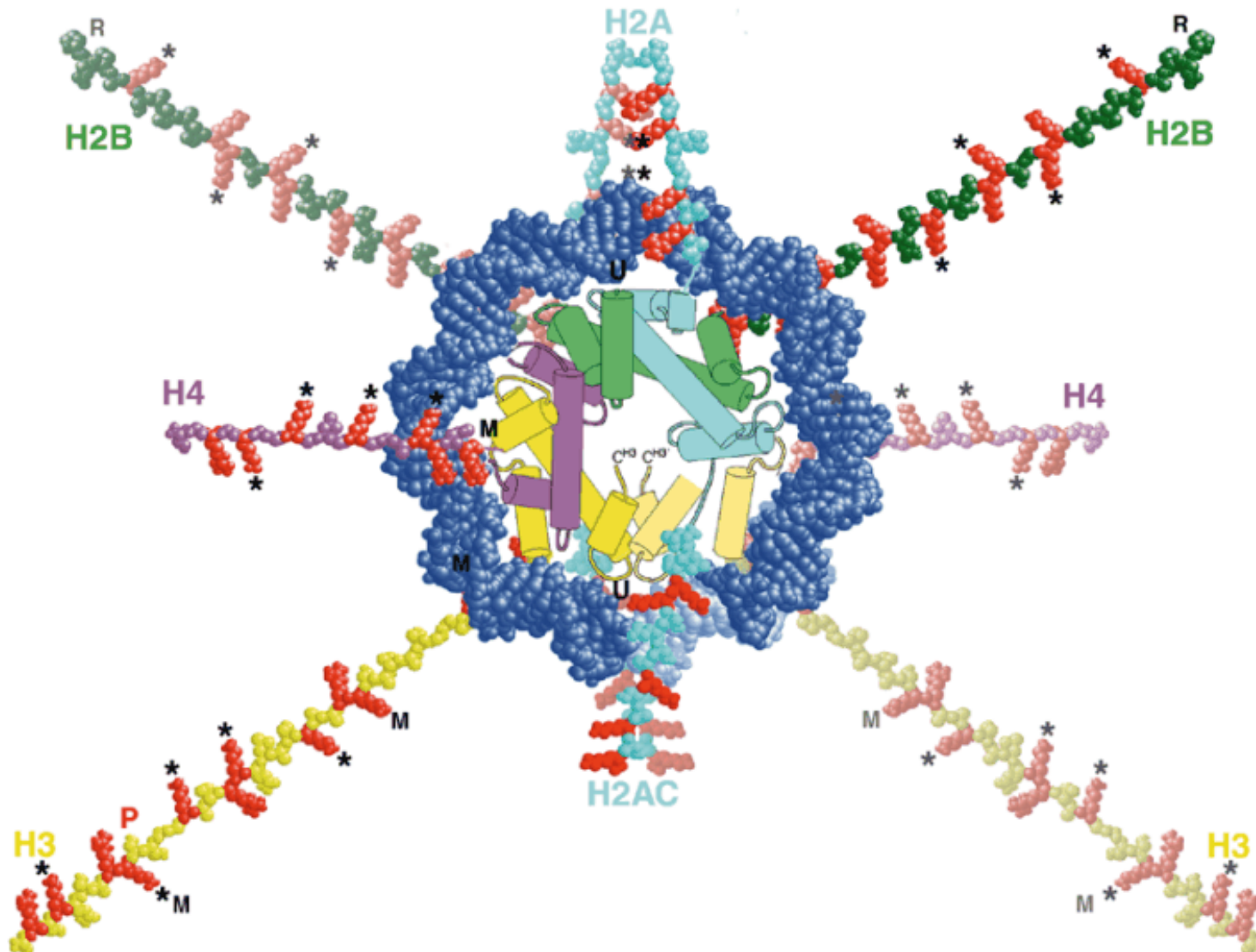
Αντίθετα σε ιστούς όπως ο εγκέφαλος που δεν παράγουν αιμοσφαιρίνη οι περιοχές γύρω από τα γονίδια αυτά παραμένουν ανθεκτικά στην δράση της νουκλεάσης

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ:** Η δομή της χρωματίνης είναι εντελώς διαφορετική όταν συγκρίνουμε ενεργά με μή ενεργά γονίδια

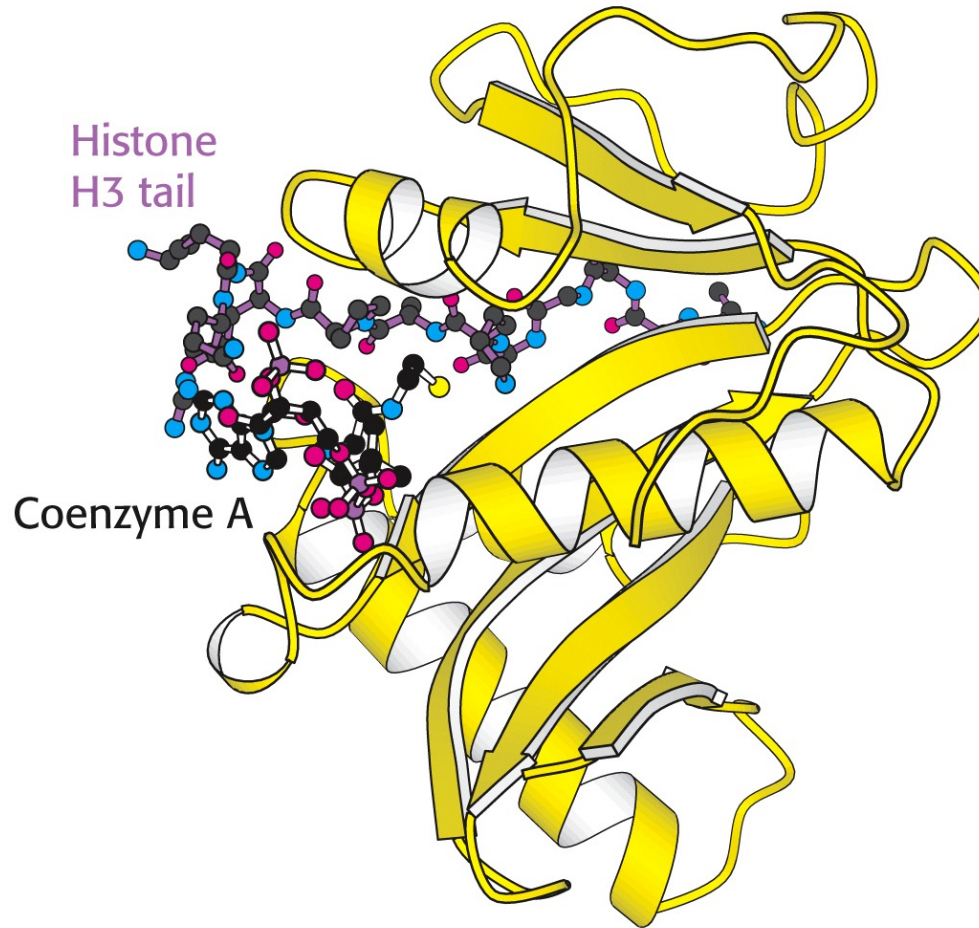


**(c)**

# Nucleosome, DNA and Histones



# Η δομή της χρωματίνης ρυθμίζεται μέσω ομοιοπολικών τροποποιήσεων στα άκρα των ιστονών



Ειδικά ένζυμα τα οποία ονομάζονται ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HAT) έχουν την ικανότητα να ακετυλιώνουν τις ιστόνες σε συγκεκριμένες λυσίνες



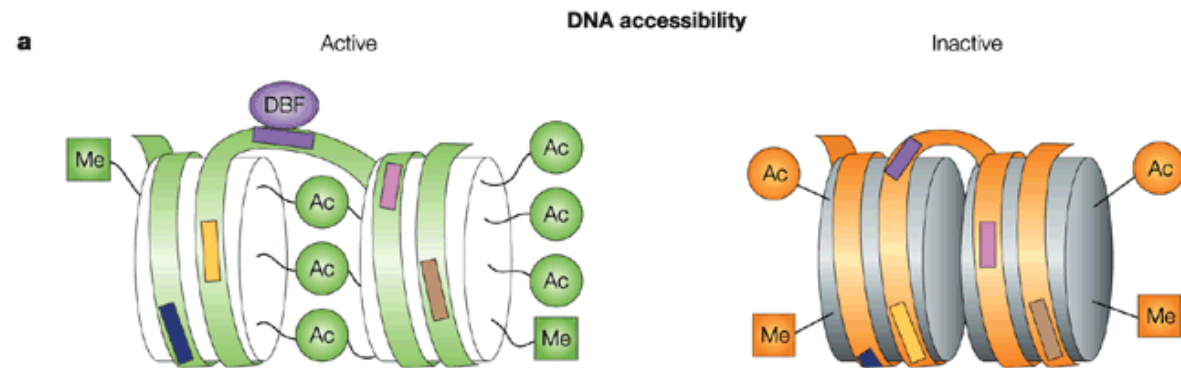
## Ποιό το αποτέλεσμα της ακετυλίωσης;

Λιγότερα φορτία, άρα λιγότερη επαφή των ιστονών με το DNA, άρα περισσότερες περιοχές του DNA προσβάσιμες για αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες, την RNA πολυμεράση και μεταγραφή

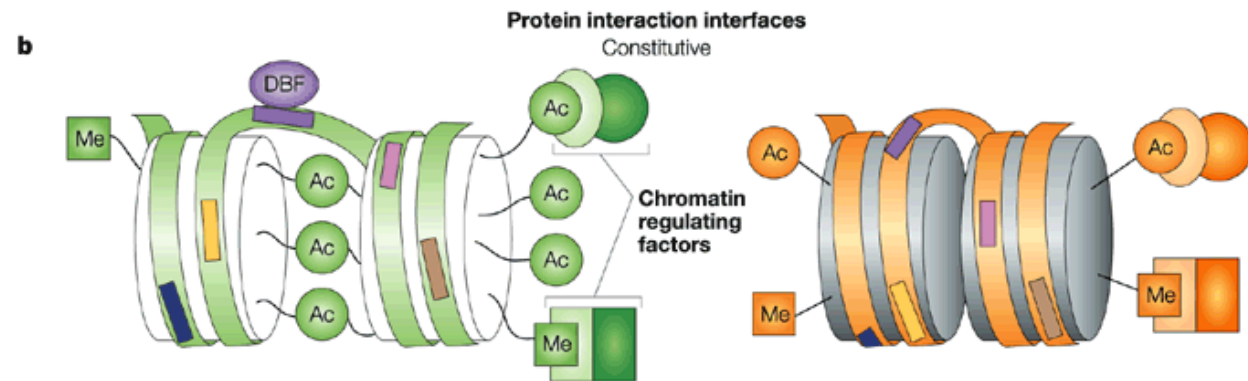


# Κώδικας ιστονών: προσβασιμότητα DNA, αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών

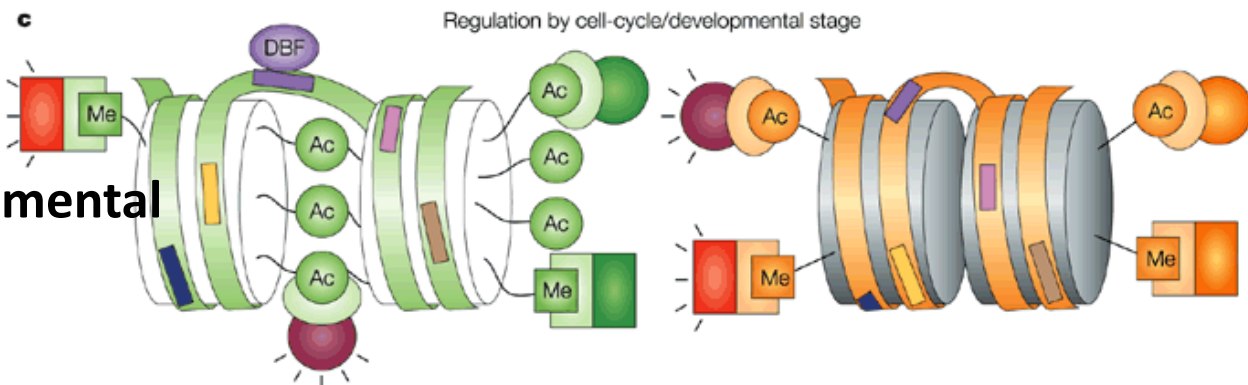
## DNA accessibility



## Protein interaction interfaces

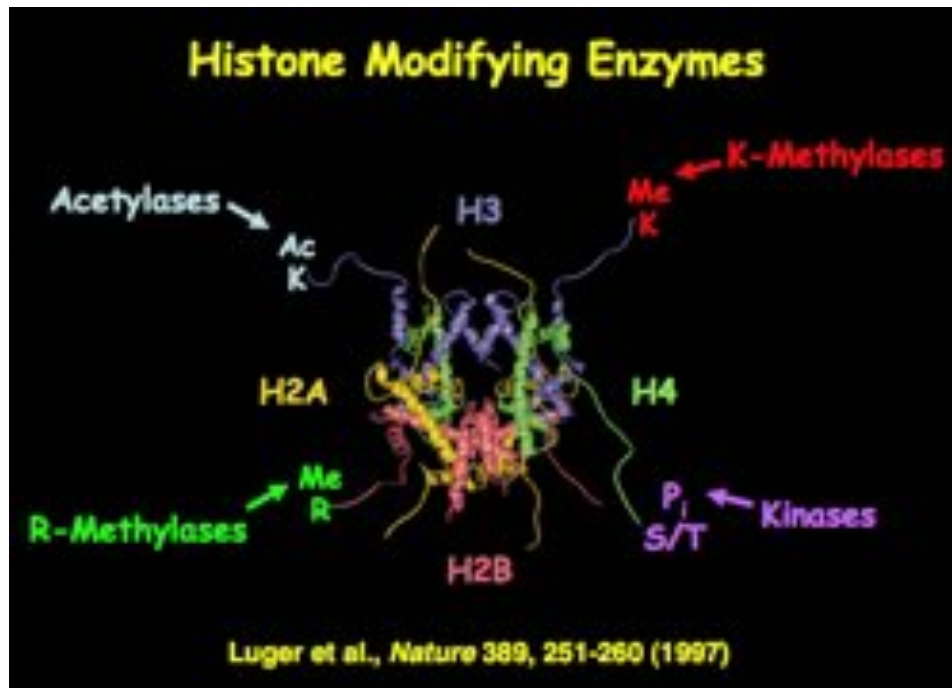


## Regulation of cell-cycle / developmental stage





# Κώδικας Ιστονών

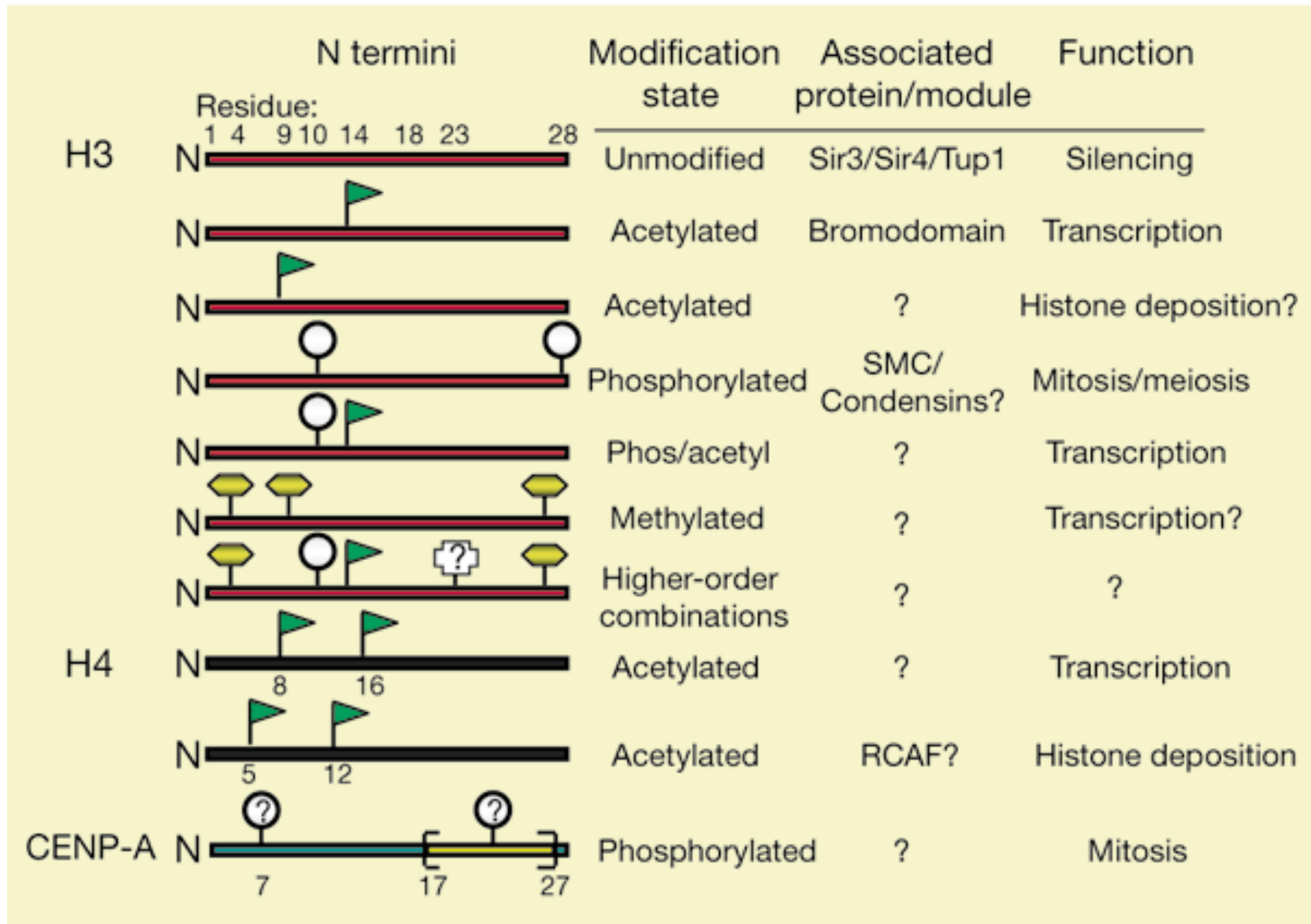


Ενζυμα που συμμετέχουν στην διαμόρφωση των ιστονών:

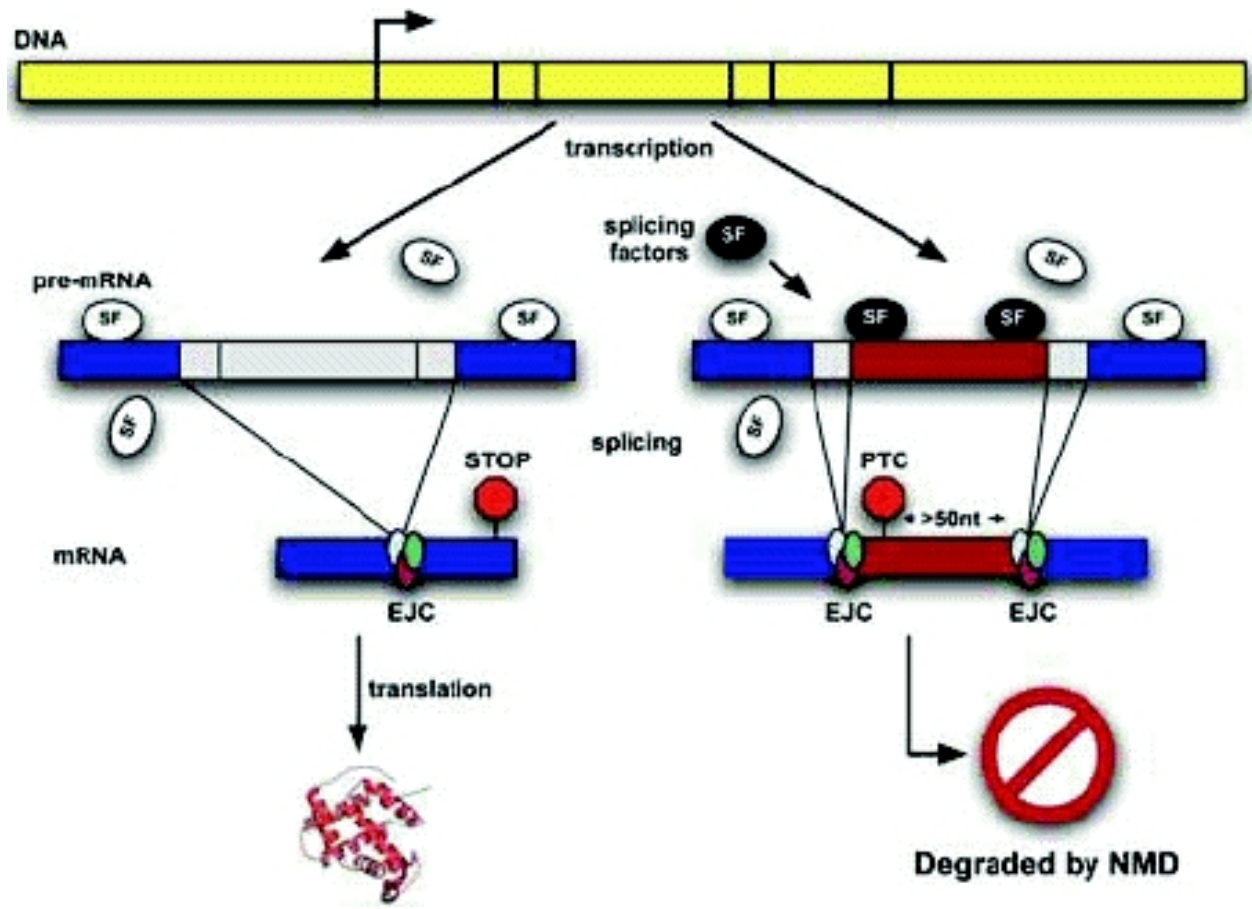
- Ακετυλάσες HATs και Από-ακετυλάσες HDACs
- Μεθυλάτρανφερασες HMTs και Από-μεθυλάσες HDMs
- Φωσφορυλάσες
- Κινάσες

Εικ.2: Τροποποιητικά ένζυμα

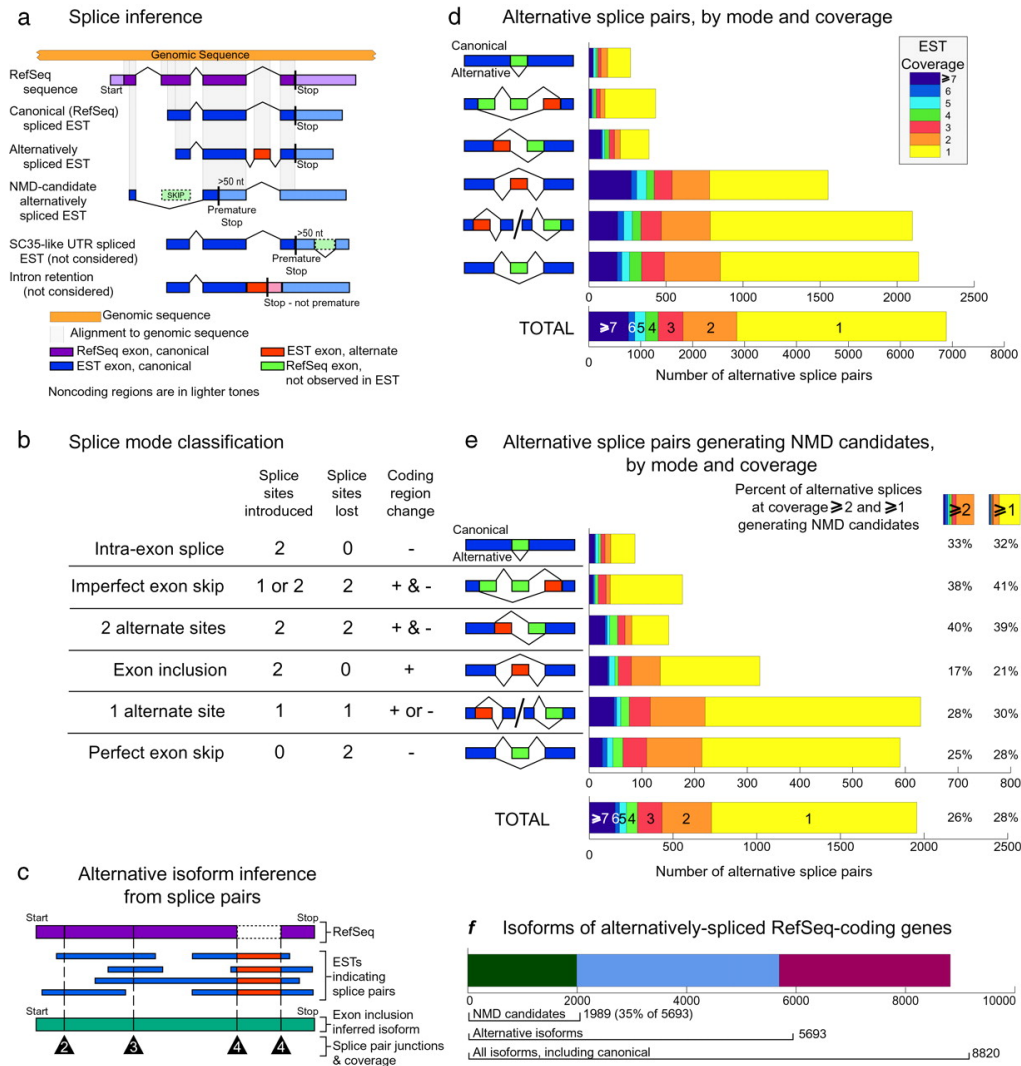
# Η γλώσσα των ομοιοπολικών τροποποιήσεων των ιστονών



Strahl BD and Allis CD *Nature* **403**, 41-45(6 January 2000)



# Alternative splice detection and classification.



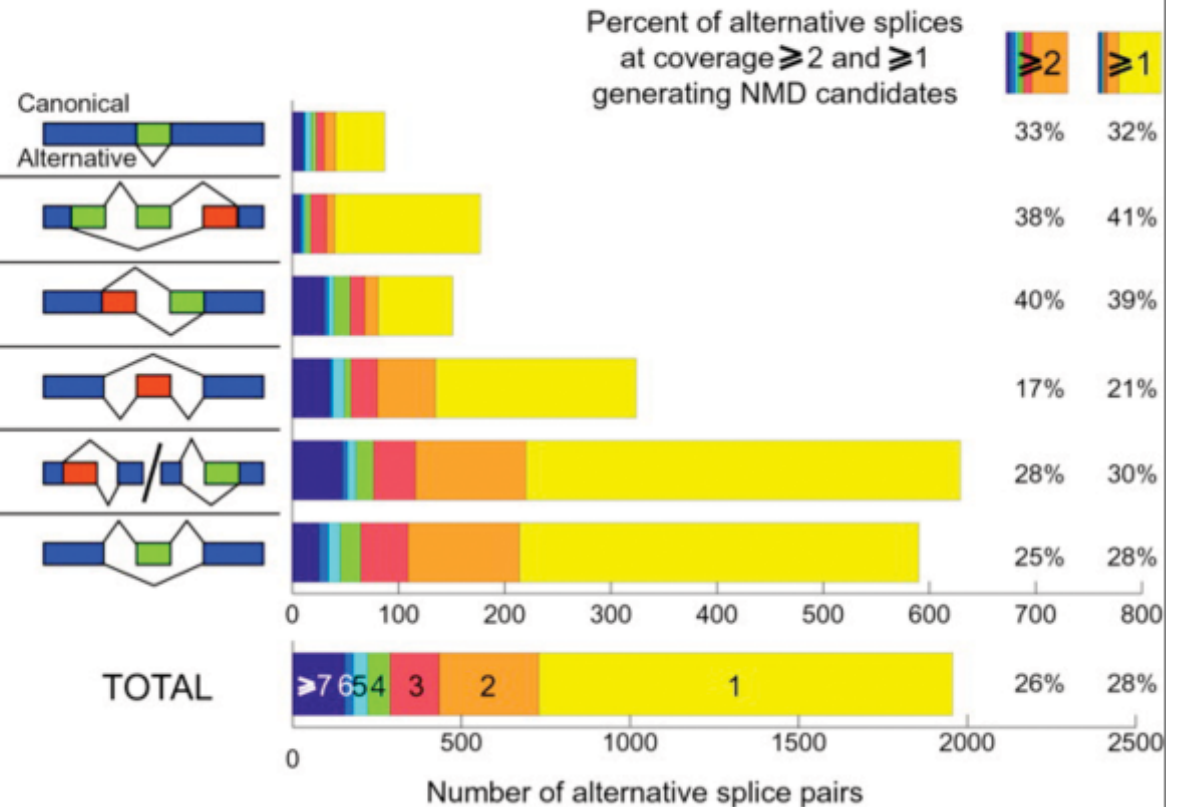
Lewis B P et al. PNAS 2003;100:189-192

# Alternative splicing and NMD.

## Splice mode classification

|                     | Splice sites introduced | Splice sites lost | Coding region change | Diagram |
|---------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|---------|
| Intra-exon splice   | 2                       | 0                 | -                    |         |
| Imperfect exon skip | 1 or 2                  | 2                 | + & -                |         |
| 2 alternate sites   | 2                       | 2                 | + & -                |         |
| Exon inclusion      | 2                       | 0                 | +                    |         |
| 1 alternate site    | 1                       | 1                 | + or -               |         |
| Perfect exon skip   | 0                       | 2                 | -                    |         |

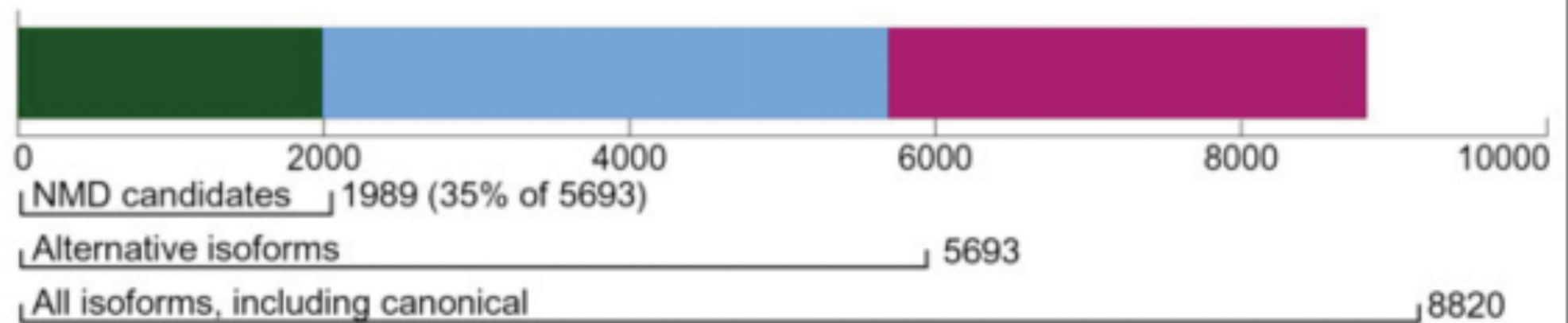
## e Alternative splice pairs generating NMD candidates, by mode and coverage



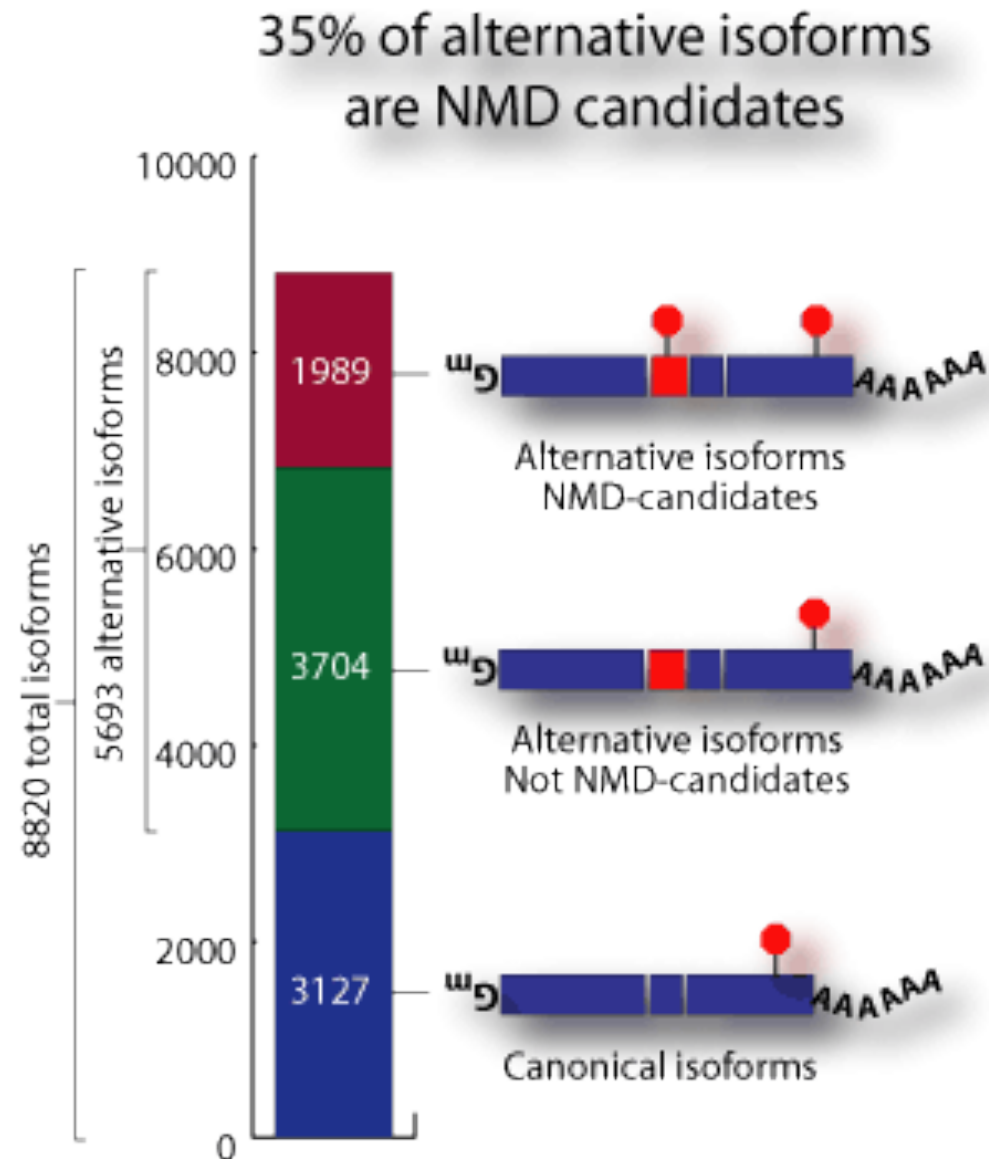
## Alternative isoform inference

# Isoforms of alternatively spliced RefSeq-coding genes

**f** Isoforms of alternatively-spliced RefSeq-coding genes

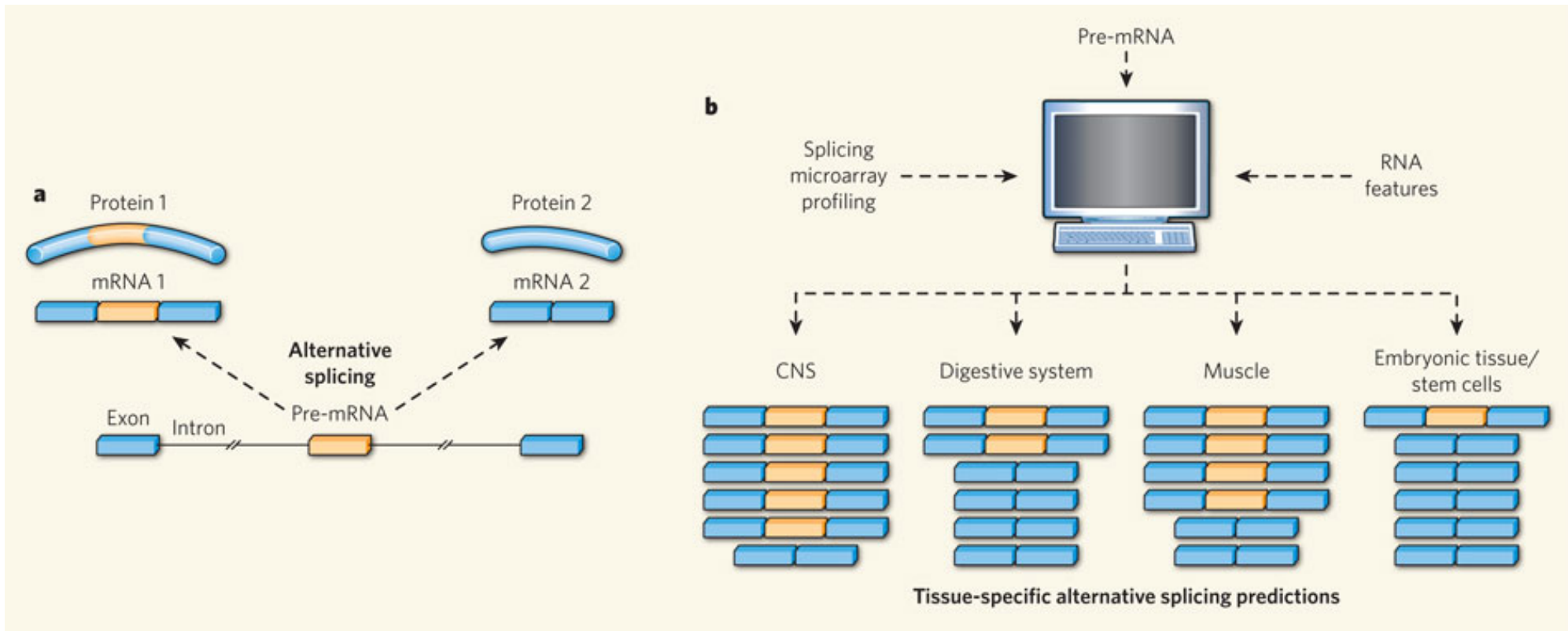


# Alternative splicing and NMD





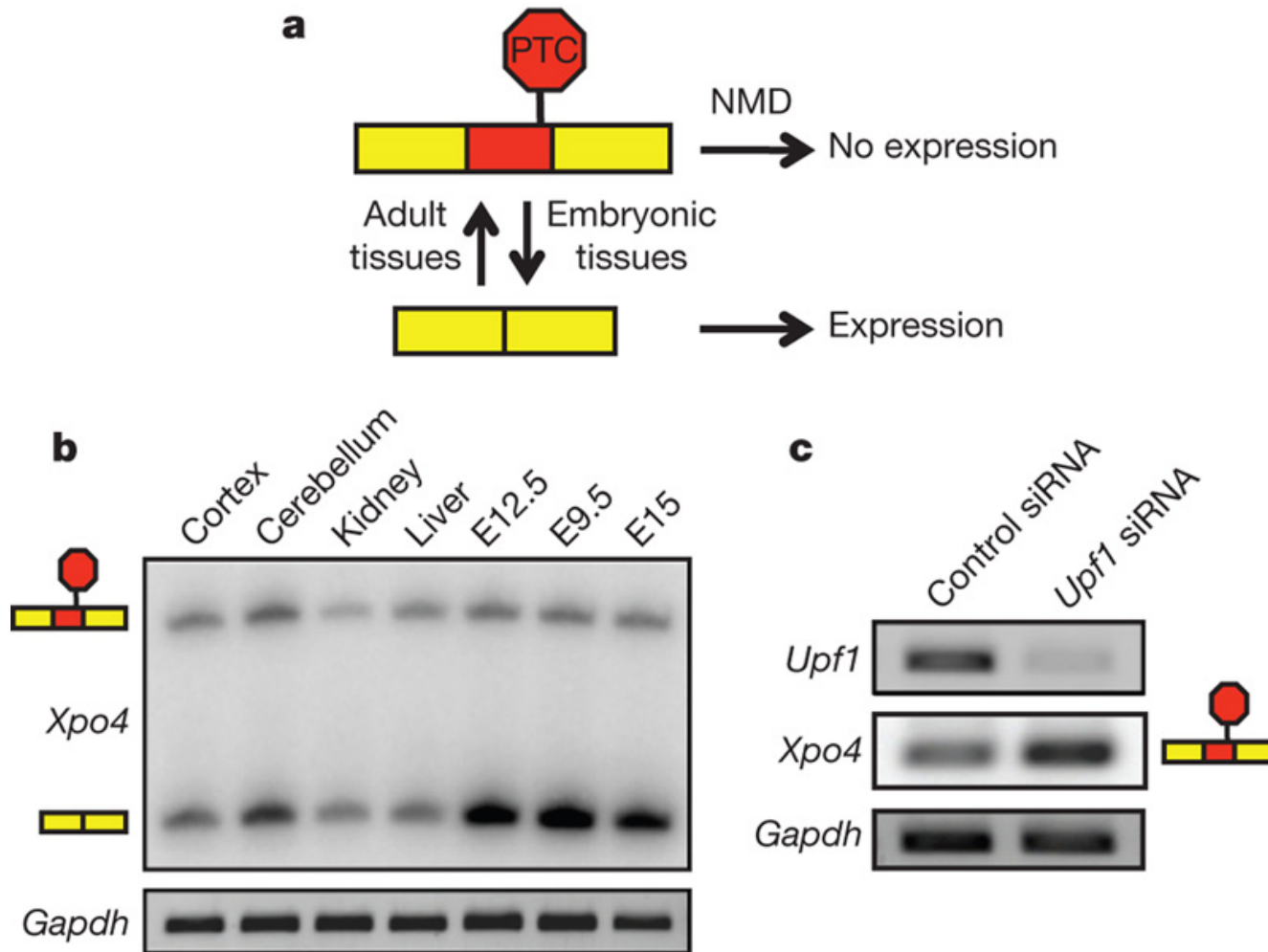
# Cracking the splicing code



Tejedor RJ and Valcarcel J. *Nature* **465**, 45-46 (2010)

Y Barash *et al.* *Nature* **465**, 53-59 (2010) doi:10.1038/nature09000

# The splicing code predicts a mechanism for developmental regulation.



An alternative exon introduces a PTC in adults – inducing NMD-, but skipped in embryos

# NMD and Muscular Dystrophy

## Muscular dystrophy (MD)

A group of genetic disorders  
major symptom is muscle wasting.

## Major forms of MD

### *Duchenne muscular dystrophy*

symptoms in early childhood and

quickly become debilitating

### *Becker muscular dystrophy*

later onset and less severe.

## Mutations in dystrophin gene

A group of genetic disorders  
major symptom is muscle wasting

# Muscular Dystrophies

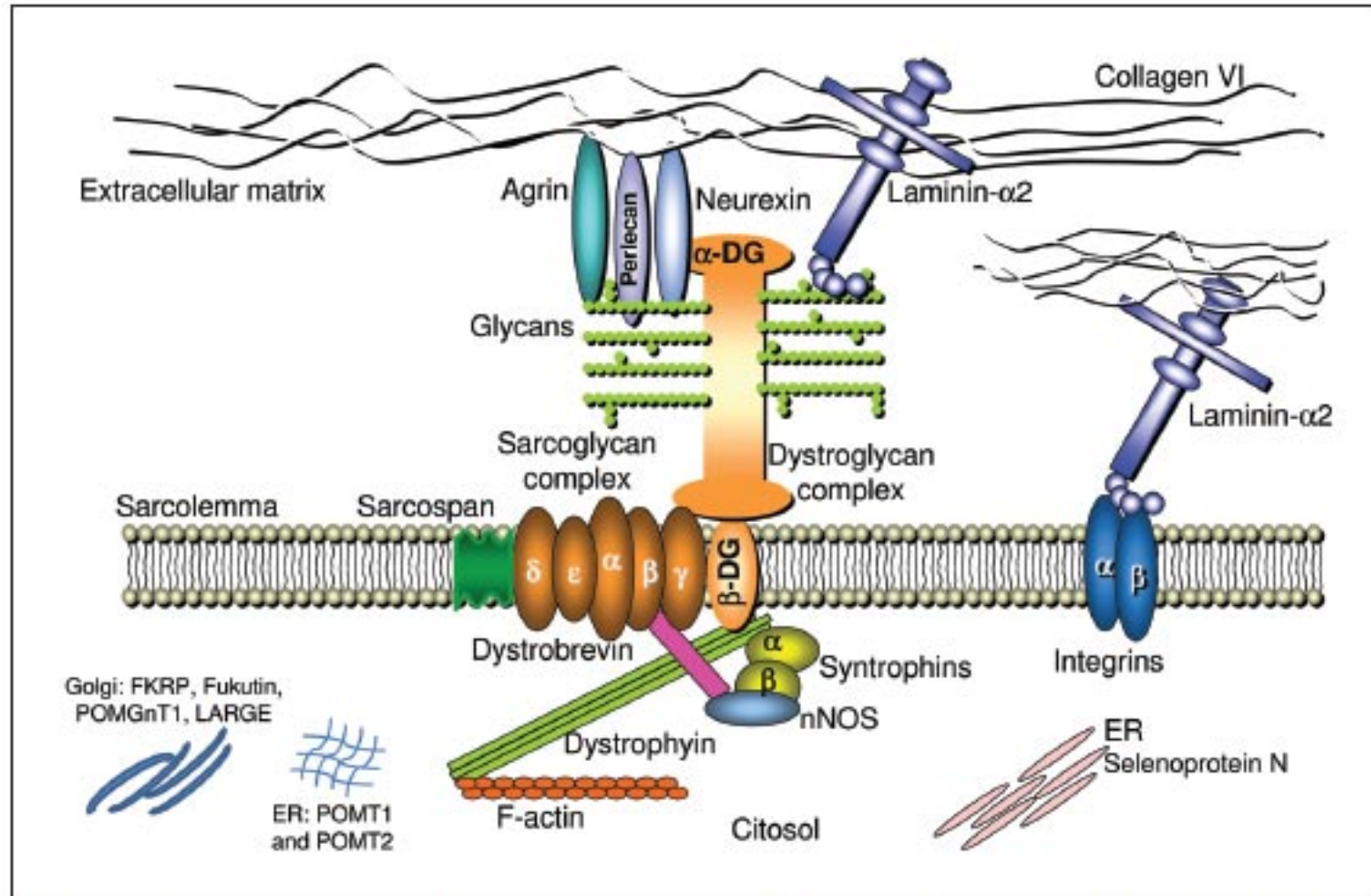
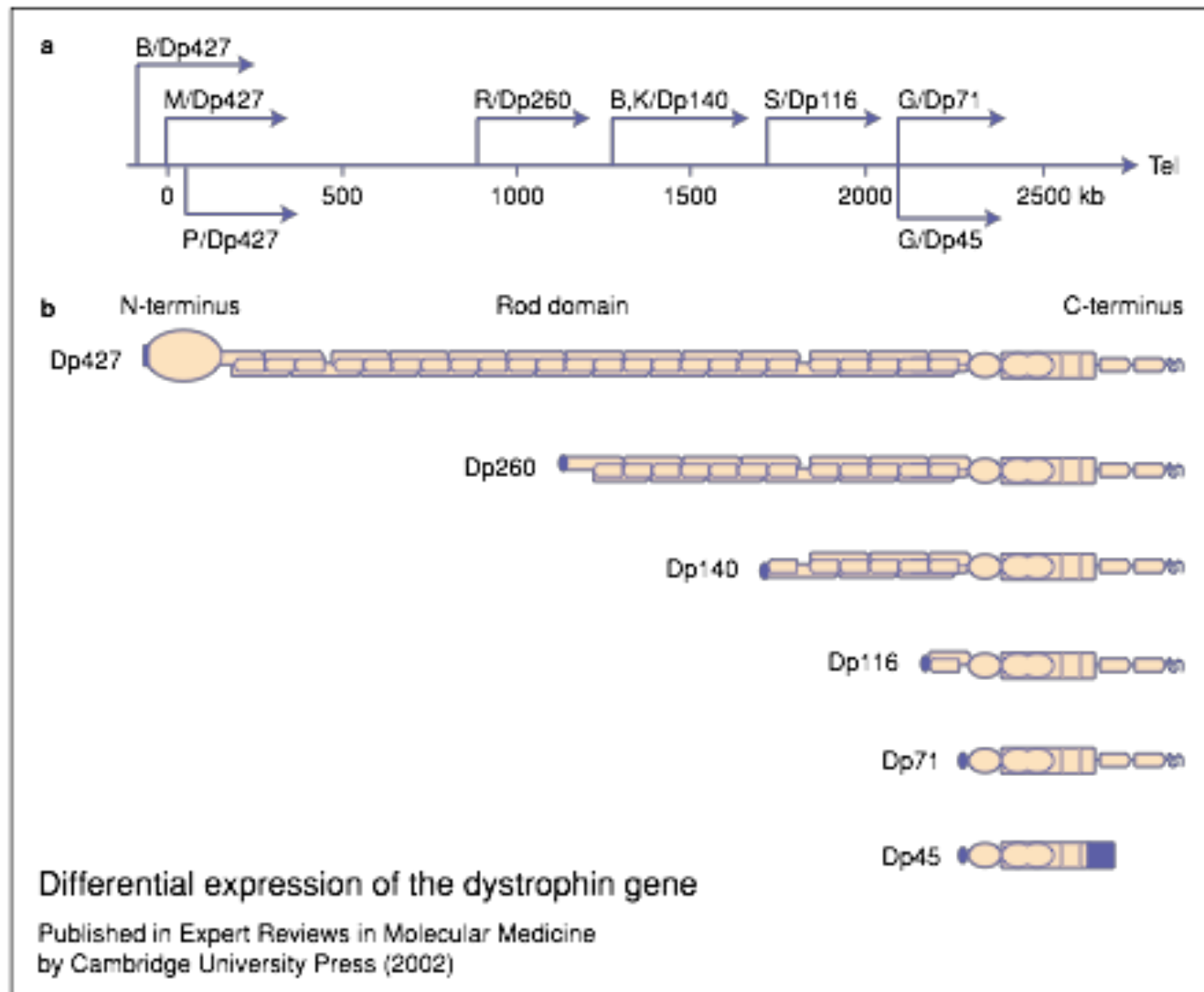
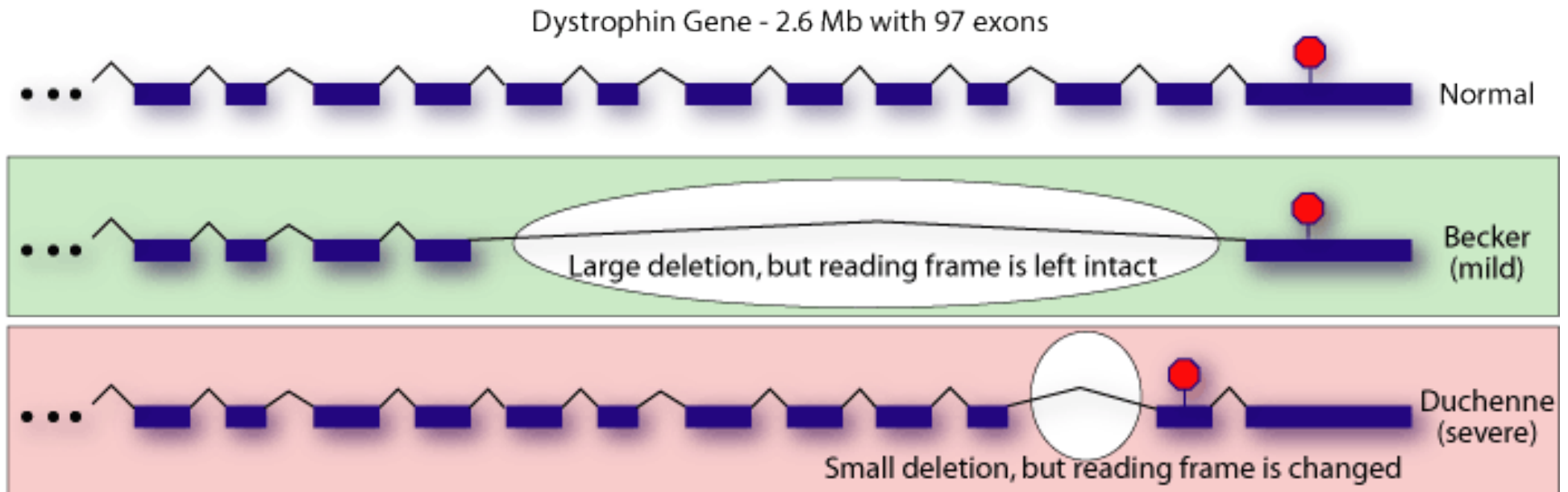


Fig 1. Schematic representation of the main proteins involved in congenital muscular dystrophies, their localization and interactions: laminin alpha-2, integrin alpha-7, collagen VI, alpha-dystroglycan, glycosyltransferases POMT1, POMT2, POGnT1, fukutin, FKRP and LARGE, and selenoprotein-N. Reproduced with adaptation from Fig.1 of Lisi & Cohn<sup>6</sup>. Abbreviations: see text; ER: endoplasmic reticulum.

# Differential expression of the dystrophin gene



# NMD and Muscular Dystrophy

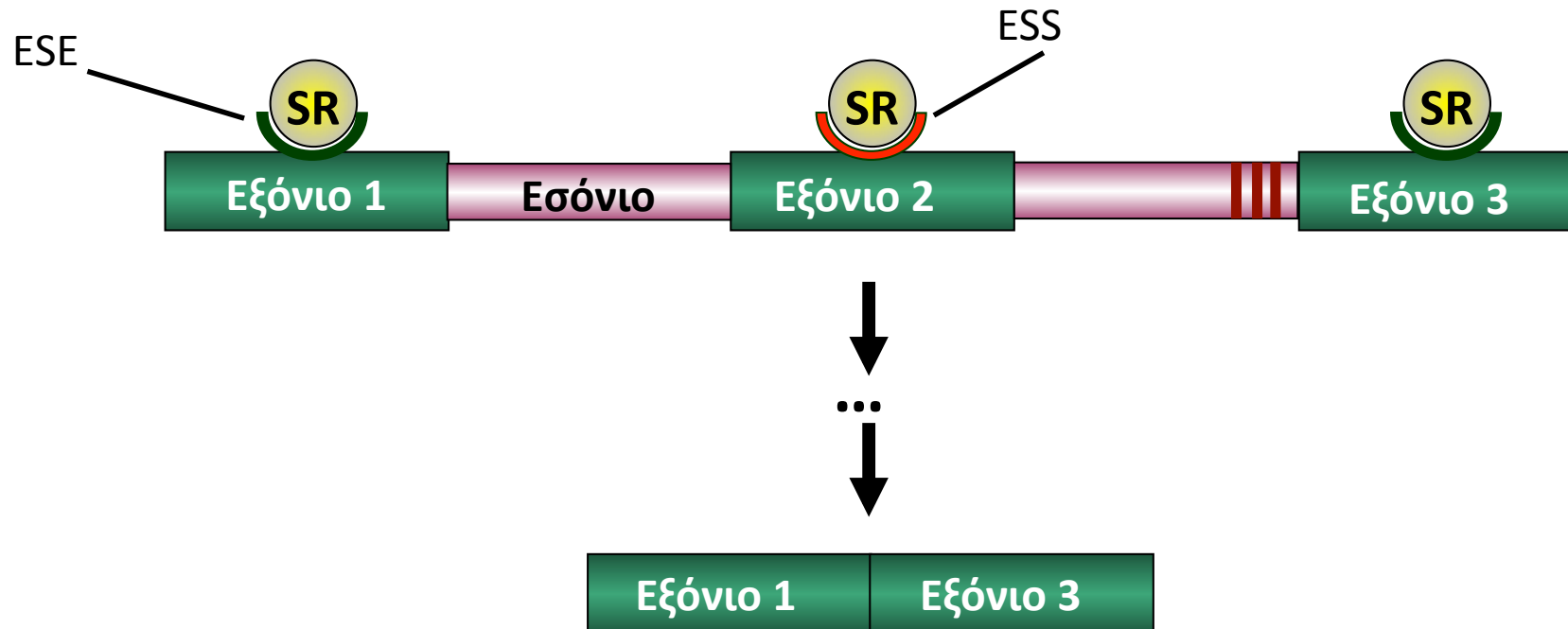


Both forms of MD are caused by mutations in the dystrophin gene

The dystrophin protein plays an important structural role as part of a large complex in muscle fiber membranes.

When dystrophin is missing or non-functional, the entire complex is compromised, leading to degeneration of muscle tissue. When the ability to regenerate the muscle is exhausted, muscle wasting occurs.

# Άλλοι παράγοντες ματίσματος και παράλειψη εξονίου



ESE: Εξονικός ενισχυτής ματίσματος (Exonic splicing enhancer)

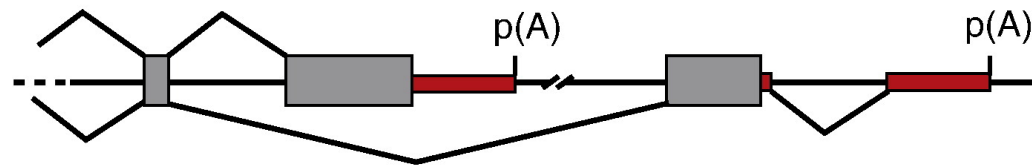
ESS: Εξονικός καταστολέας ματίσματος (Exonic splicing suppressor)



# Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση (και το εναλλακτικό μάτισμα)

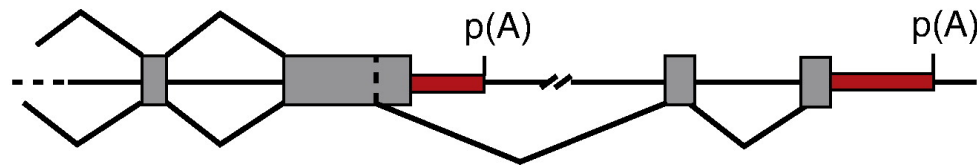
*Skipped – exon associated*

**A** Calcitonin/CGRP



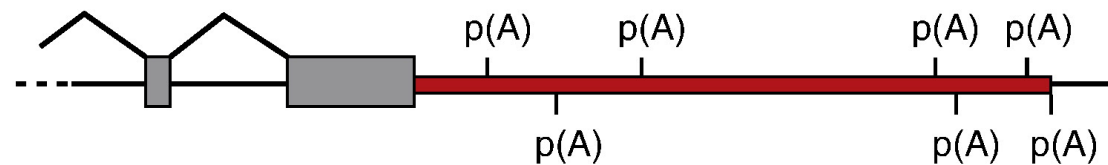
*Composite exons associated*

**B** Immunoglobulin  $\mu$  heavy chain



*Single terminal exons  
with two or more p(A) sites  
(tandem UTRs)*

**C** Dihydrofolate reductase

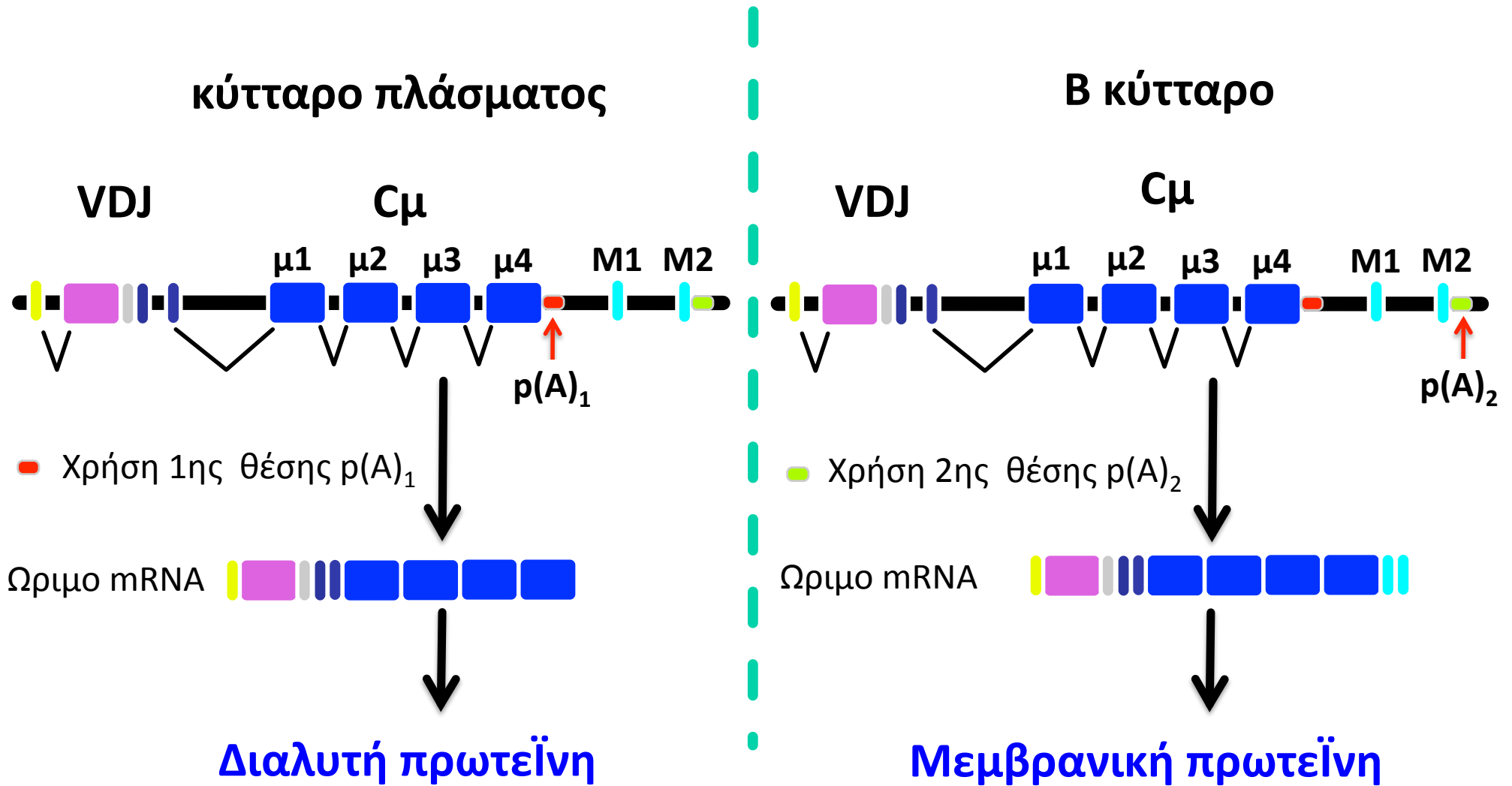


■ Coding regions  
■ 3' Untranslated regions

**p(A):** θέσεις πολυαδενυλίωσης

# Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση II

## Η μεμβρανική και η διαλυτή μορφή της IgM



**Ο μηχανισμός αφορά στα ~25% των ανθρώπινων γονιδίων**