

Σημειακές μεταλλάξεις

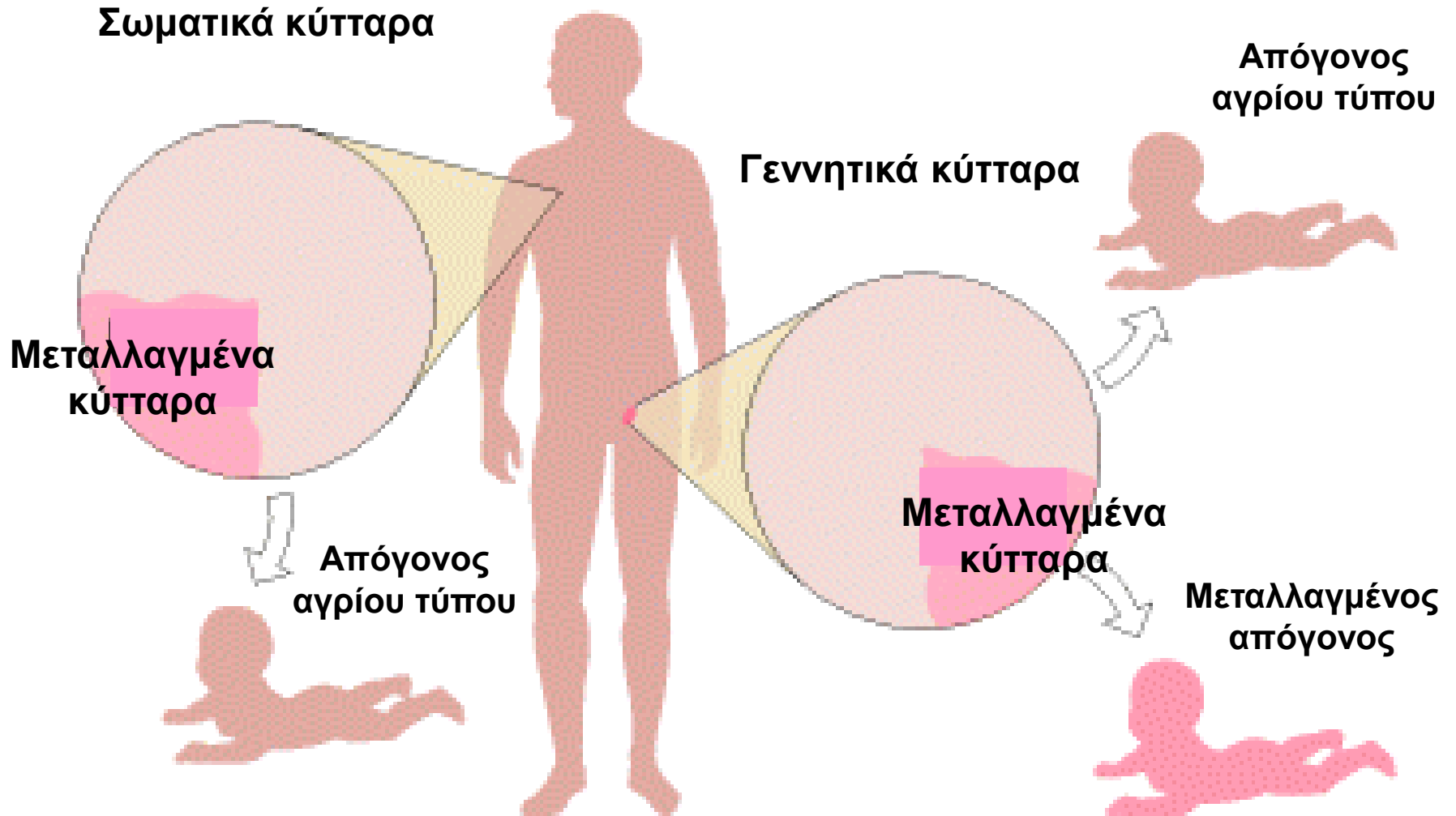
Κατεύθυνση μετάλλαξης



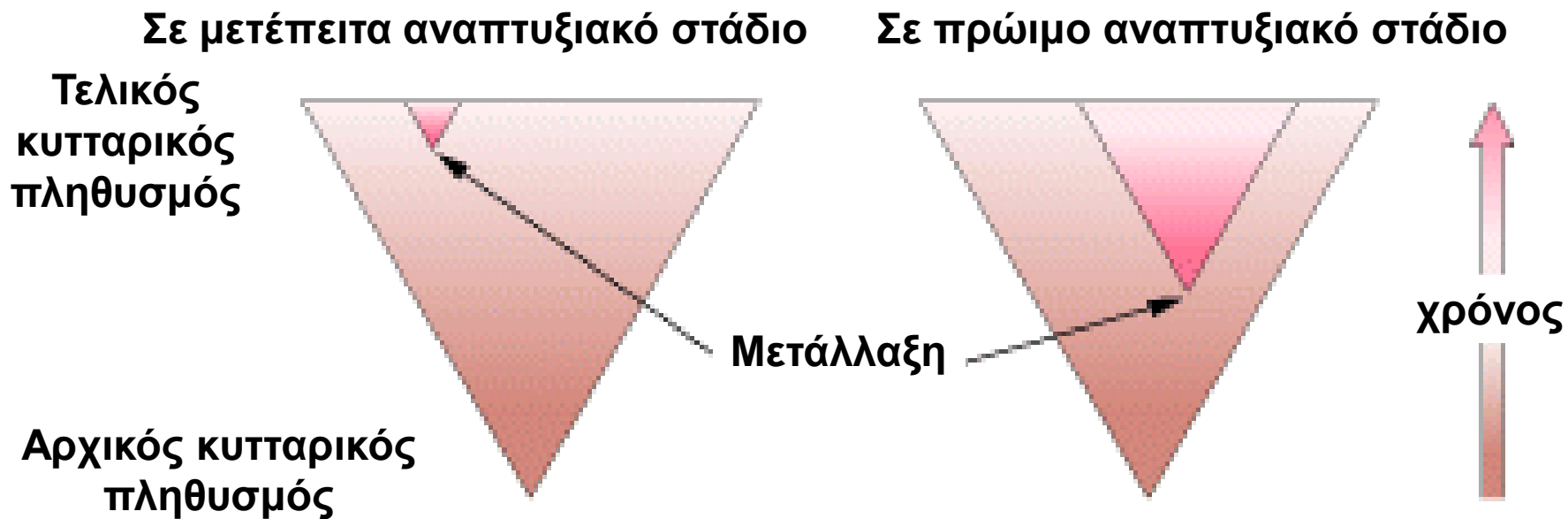
Πώς δημιουργούνται;

- Φυσικές μεταλλάξεις: κυρίως από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA
- Τεχνητές μεταλλάξεις: επίδραση ακτινοβολίας, χημικών ουσιών, *in vitro* μεταλλαξιγένεση

Μεταλλάξεις σε σωματικά – γεννητικά κύτταρα



Σωματική μεταλλαγή και αναπτυξιακό στάδιο



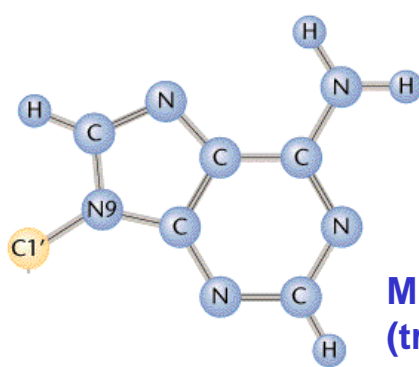
Τύποι μεταλλάξεων και εκτίμηση της συχνότητάς τους

	Συχνότητα (κατά προσέγγιση)	Παραδείγματα
Εσφαλμένος διαχωρισμός χρωσωμάτων	10^{-2} /κυτταρική διαίρεση	Ανευπλοειδία
Χρωμοσωμική ανακατάταξη	6×10^{-4} /κυτταρική διαίρεση	Μετάθεση
Μετάλλαξη ζεύγους βάσεων	10^{-10} / ζεύγος βάσεων / κυτταρική διαίρεση	Σημειακές μεταλλάξεις

Φυσικές μεταλλάξεις

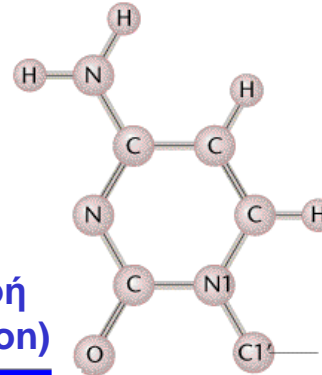
- Αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων (**μετάπτωση**, **μεταστροφή**)

Αδενίνη
(πουρίνη)



Μεταστροφή
(transversion)

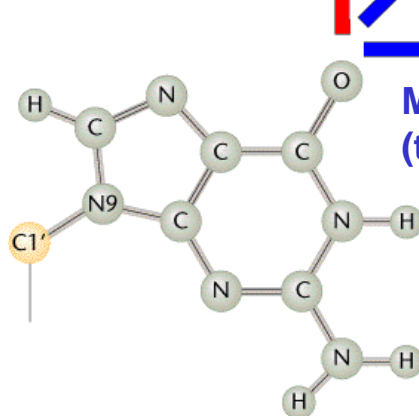
Κυτοσίνη
(πυριμιδίνη)



Μετάπτωση
(transition)

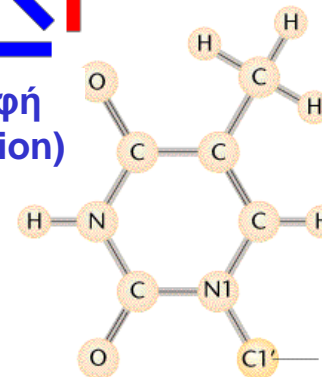
Μετάπτωση
(transition)

Γουανίνη
(πουρίνη)



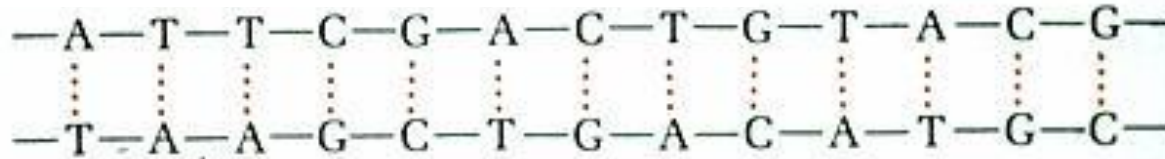
Μεταστροφή
(transversion)

Θυμίνη
(πυριμιδίνη)

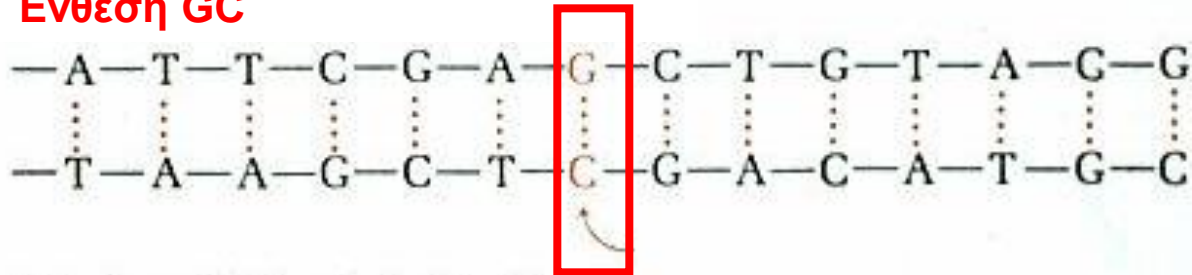


• Προσθήκη - έλλειψη ενός ζεύγους βάσεων

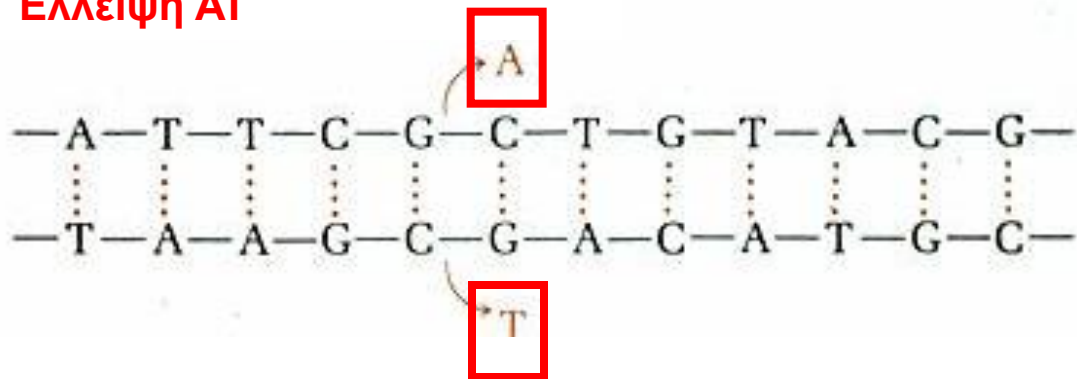
Αλληλόμορφο αγρίου τύπου



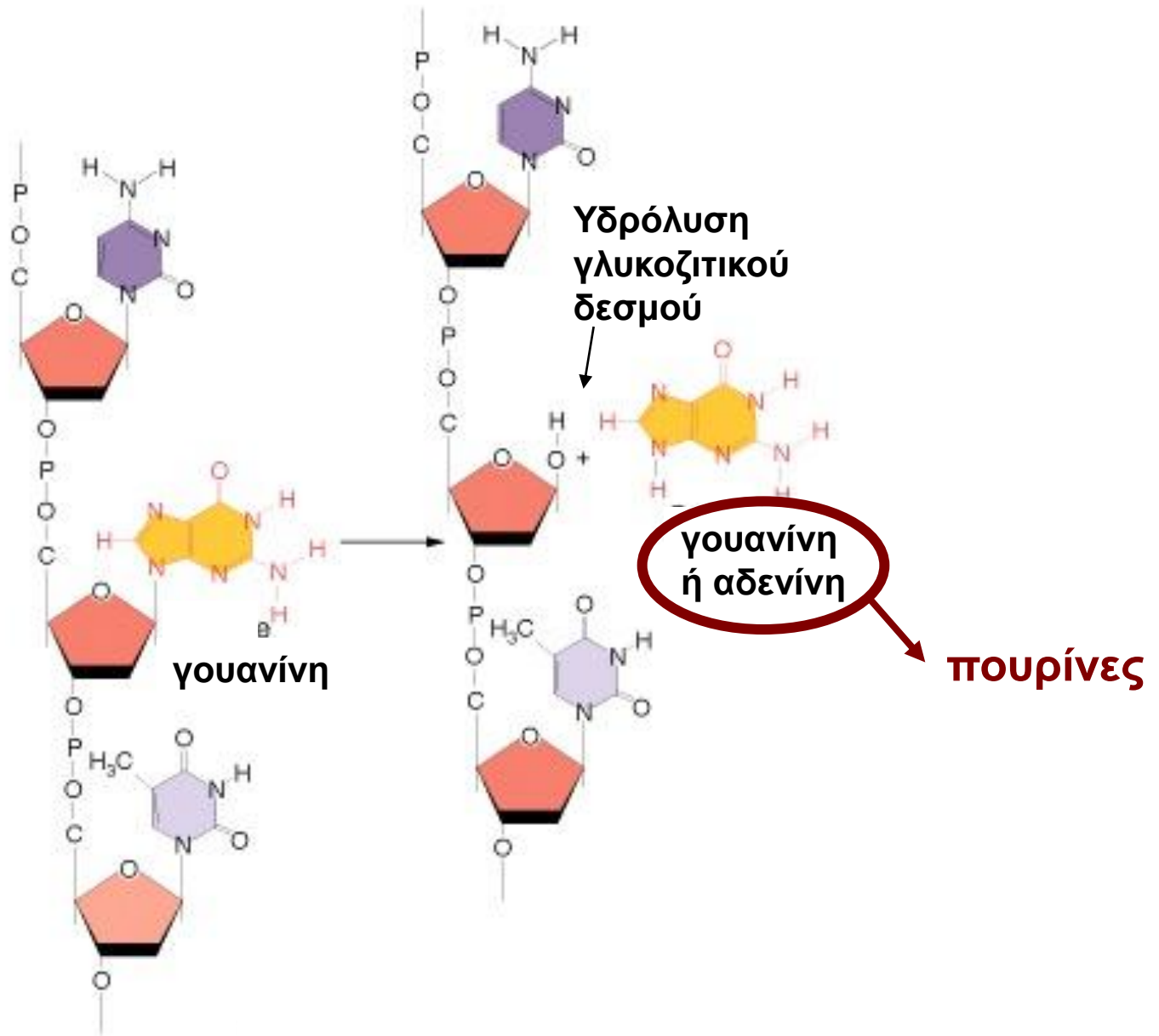
Ένθεση GC



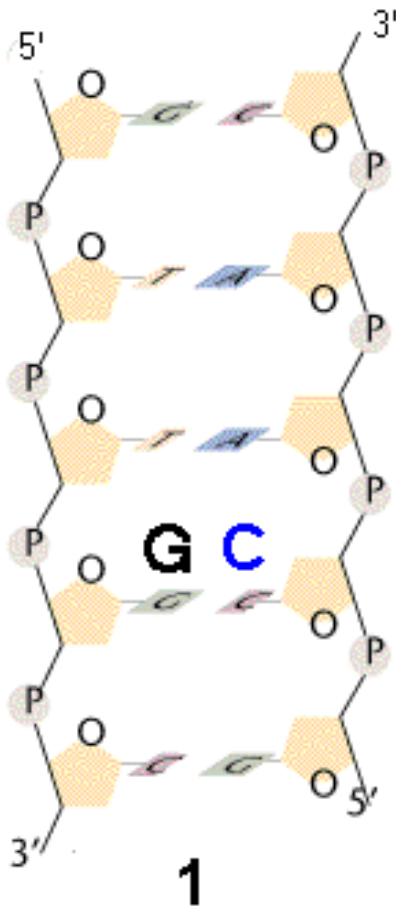
Έλλειψη AT



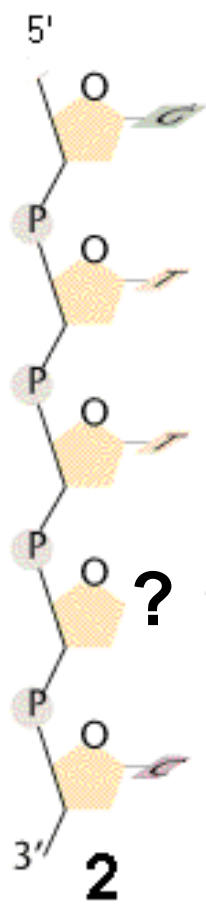
• Αποπουρίνωση



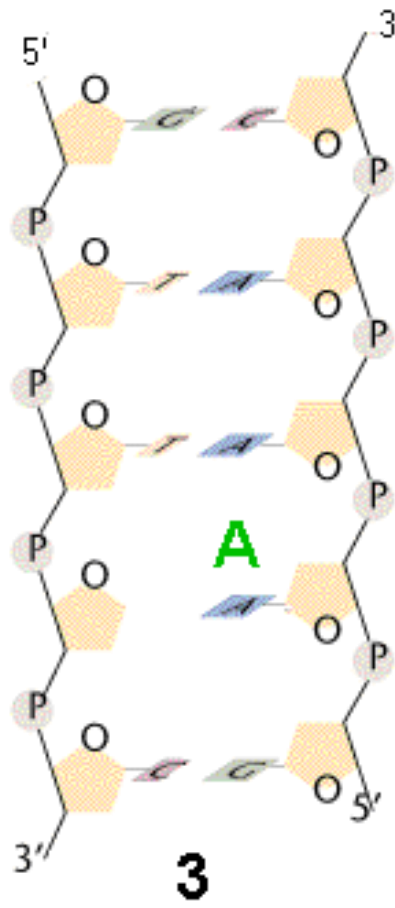
Το αποτέλεσμα της αποπουρίνωσης μπορεί να είναι η μεταστροφή



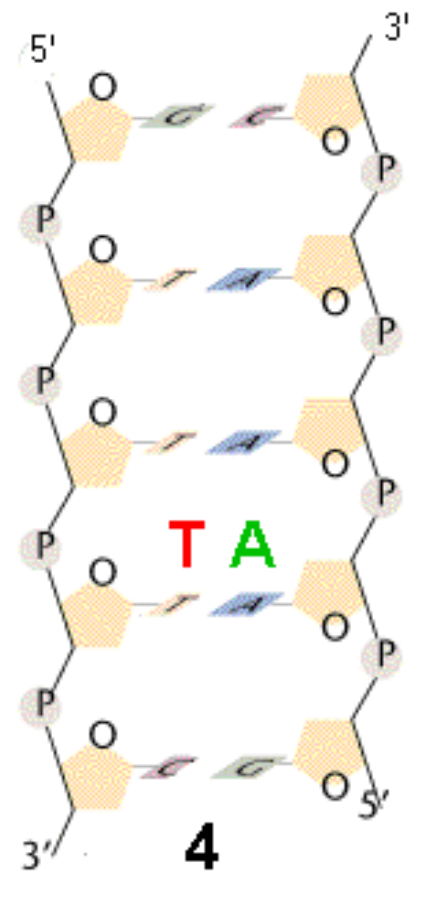
αρχικό μόριο



αποπουρίνωση

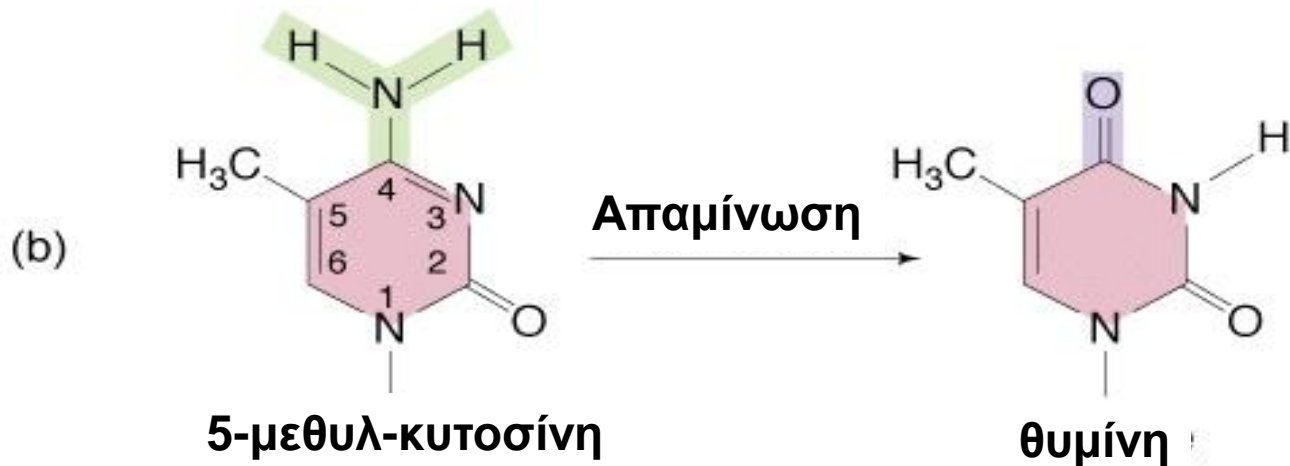
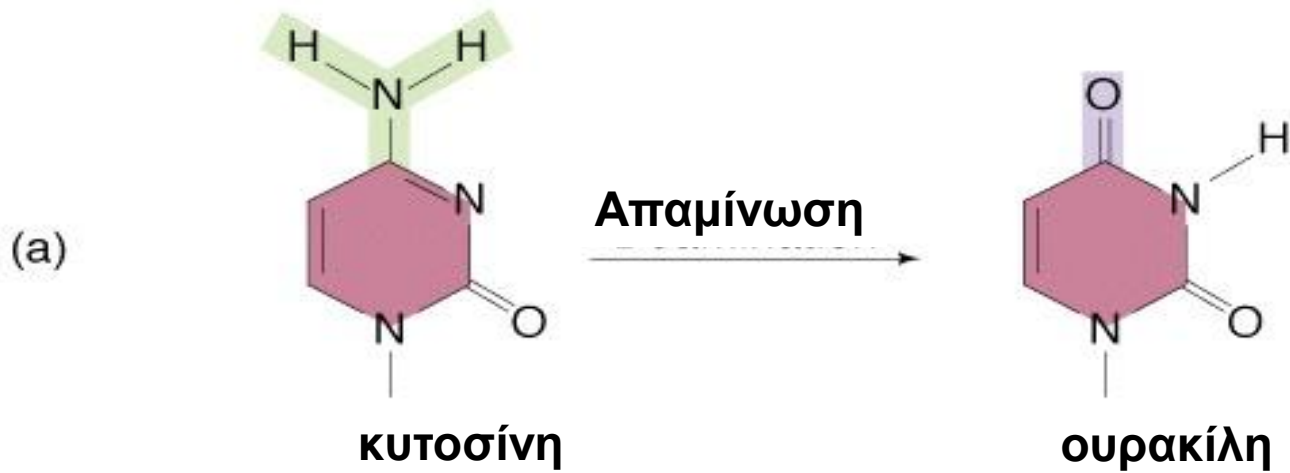


κατά την αντιγραφή
η πολυμεράση
ενσωματώνει μία
τυχαία βάση στην
νεοσυντιθέμενη
αλυσίδα π.χ. A



η αντιγραφή αυτής
της αλυσίδας,
οδηγεί σε
αντικατάσταση του
ζεύγους GC σε AT

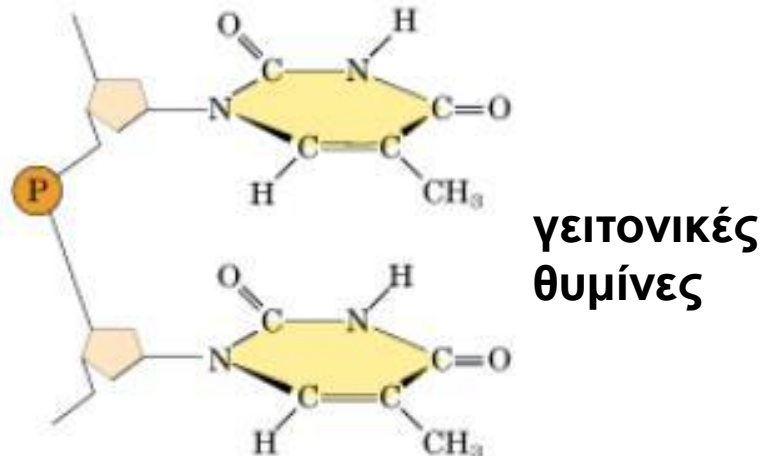
• Απαμίνωση κυτοσίνης, μεθυλ-κυτοσίνης



Ποιο είναι το αποτέλεσμα της απαμίνωσης?

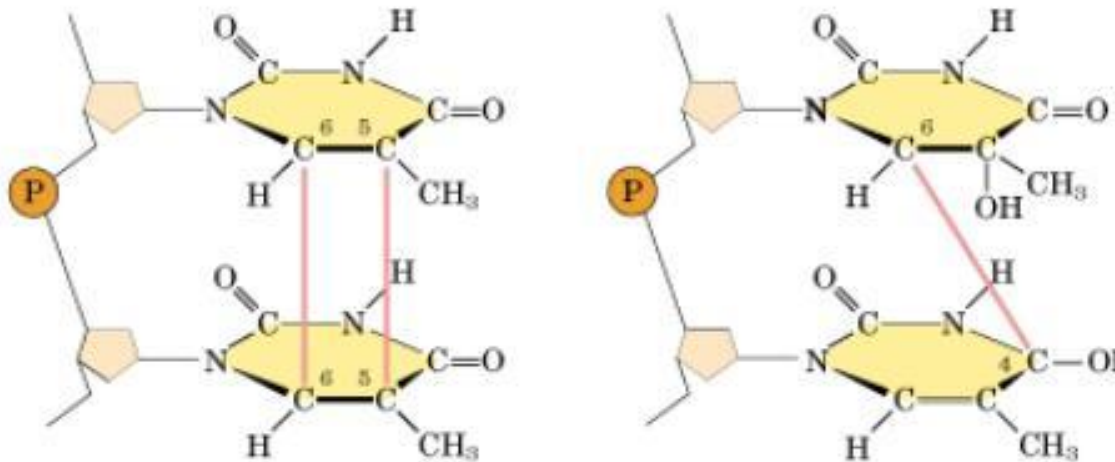
Τεχνητές μεταλλάξεις

- Από έκθεση σε ακτινοβολία π.χ. ακτίνες Χ, ακτίνες γ, UV)



U.V

U.V

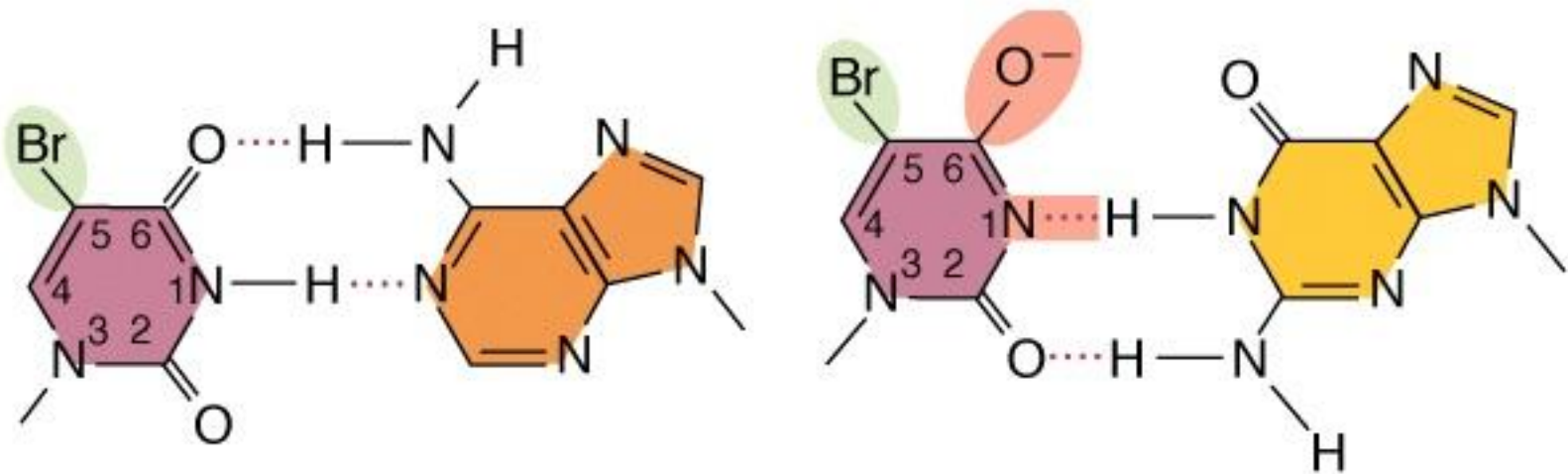


Διαταραχή της δομής
της έλικας & εξέλιξης
της αντιγραφής

- Από χημικές ουσίες

1. Χημικά ανάλογα των βάσεων που μπορούν να ενσωματωθούν στο DNA

5-βρωμο-ουρακίλη



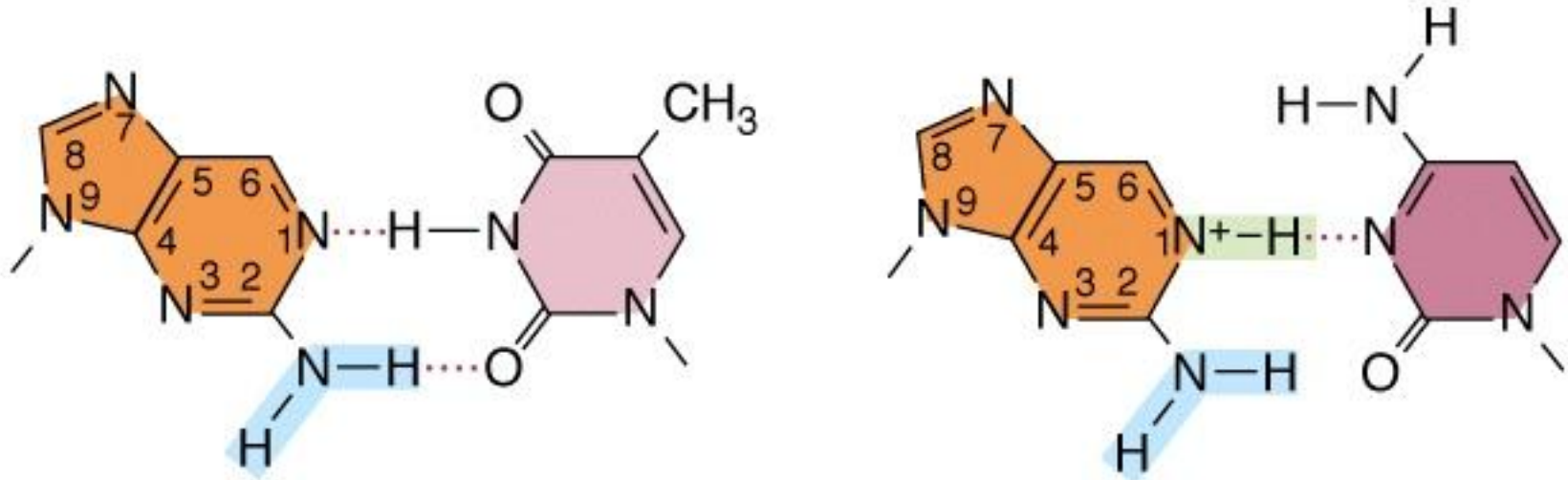
Κέτο- μορφή
ανάλογο της θυμίνης



Ενολική μορφή
ανάλογο της κυτοσίνης

↓
Μετατροπή μεταξύ δύο ισομερών μορφών που διαφέρουν μεταξύ τους στην θέση των πρωτονίων

2-αμινο-πουρίνη



Κέτο- μορφή
ανάλογο της αδενίνης

ταυτομερίωση

ίμινο μορφή
ανάλογο της γουανίνης

Ποιο θα είναι το αποτέλεσμα;

2. Χημικά που τροποποιούν τις βάσεις

π.χ. αλκυλιωτικά (αλκυλίωση)

HNO_2 (απαμίνωση)

υδροξυλαμίνη (υδροξυλίωση της κυτοσίνης που συμπεριφέρεται σαν θυμίνη)



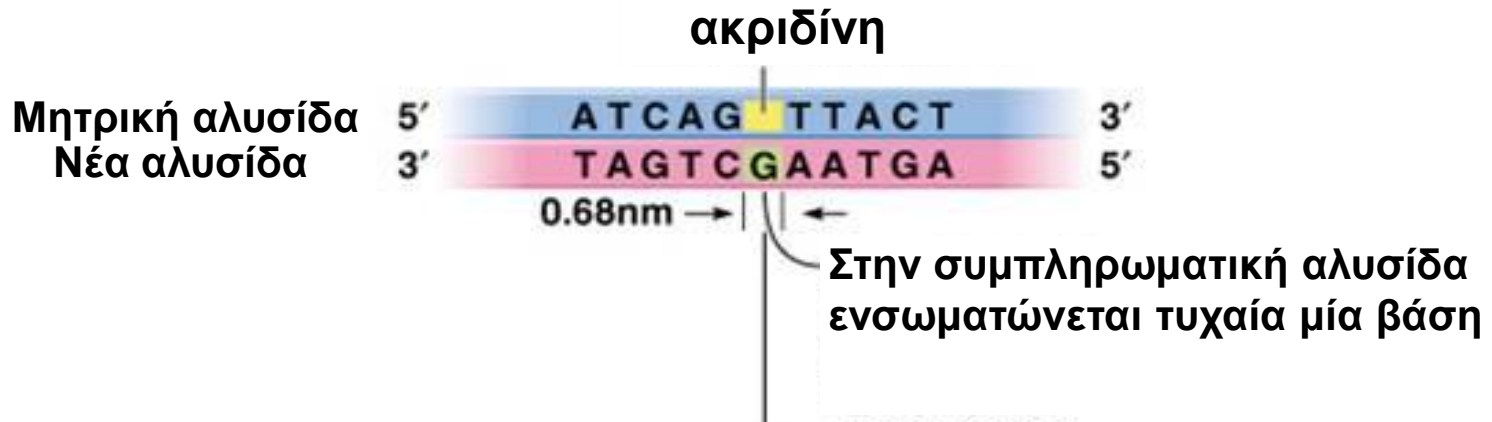
Τροποποιημένες ιδιότητες ζευγαρώματος



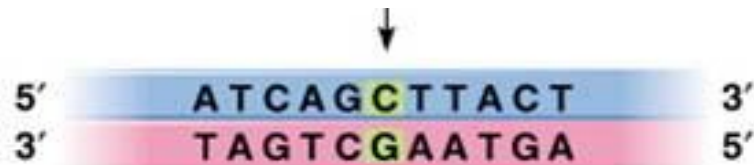
μεταλλάξεις

3. Χημικά που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων

Π.χ. προφλαβίνη, ακριδίνη (μόρια με 3 δακτυλίους με μέγεθος παρόμοιο με αυτό των βάσεων)



Επόμενη αντιγραφή της νέας αλυσίδας



Αποτέλεσμα: ένθεση ενός ζεύγους βάσεων

Επιπτώσεις μεταλλάξεων

Που έχει συμβεί η μετάλλαξη;

- Σε περιοχή του DNA χωρίς γονίδιο
- Σε ρυθμιστικά στοιχεία
- Σε κωδική περιοχή



- Στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

Αλληλουχία αγρίου τύπου

- UGUAC AUG UAU ACG UCU CAA UGA UCCA
Met Tyr Ser Thr Gln STOP

Έλλειψη **A**

- UGUAC AUG UAU CGU CUC AAU GAU CCA
Met Tyr **Arg Leu Asn Asp Pro**

ACG

- UGUAC AUG UAU UCU CAA UGA UCCA
Met Tyr Thr Gln STOP

Προσθήκη

A

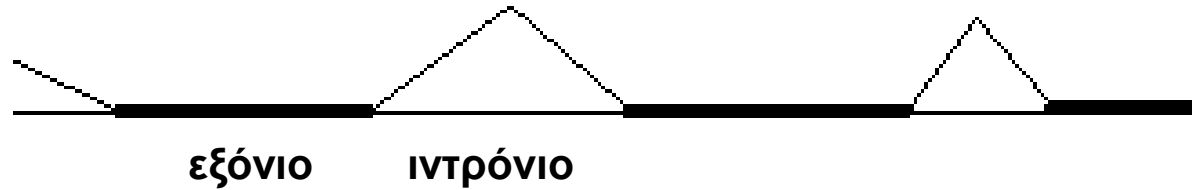
- UGUAC AUG UAU **ACG** AUC UCA AUG AUC
Met Tyr **Ser Ile Ser Met Ile**

Σημειακές μεταλλαγές

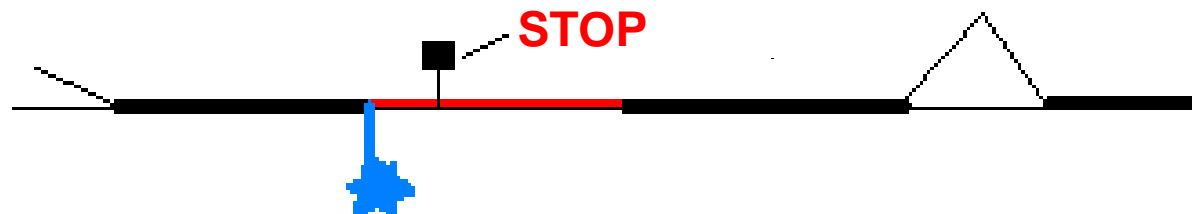
- UGUAC AUG UAU ACG UCU CAG UGA UCCA
Met Tyr Ser Thr Gln STOP
- UGUAC AUG UAU ACG CCU CAA UGA UCCA
Met Tyr Ser **Pro** Gln STOP
- UGUAC AUG UAA ACG UCU CAA UGA UCCA
Met **STOP**

- Στις συντηρημένες θέσεις για splicing

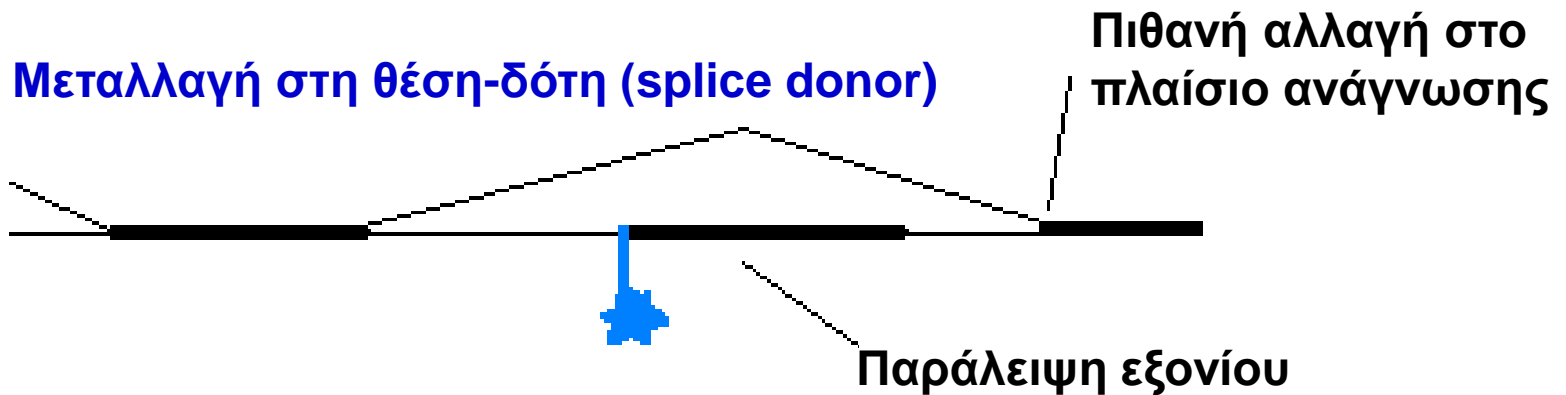
Γονίδιο αγρίου τύπου



Μεταλλαγή στη θέση-δότη (splice donor)



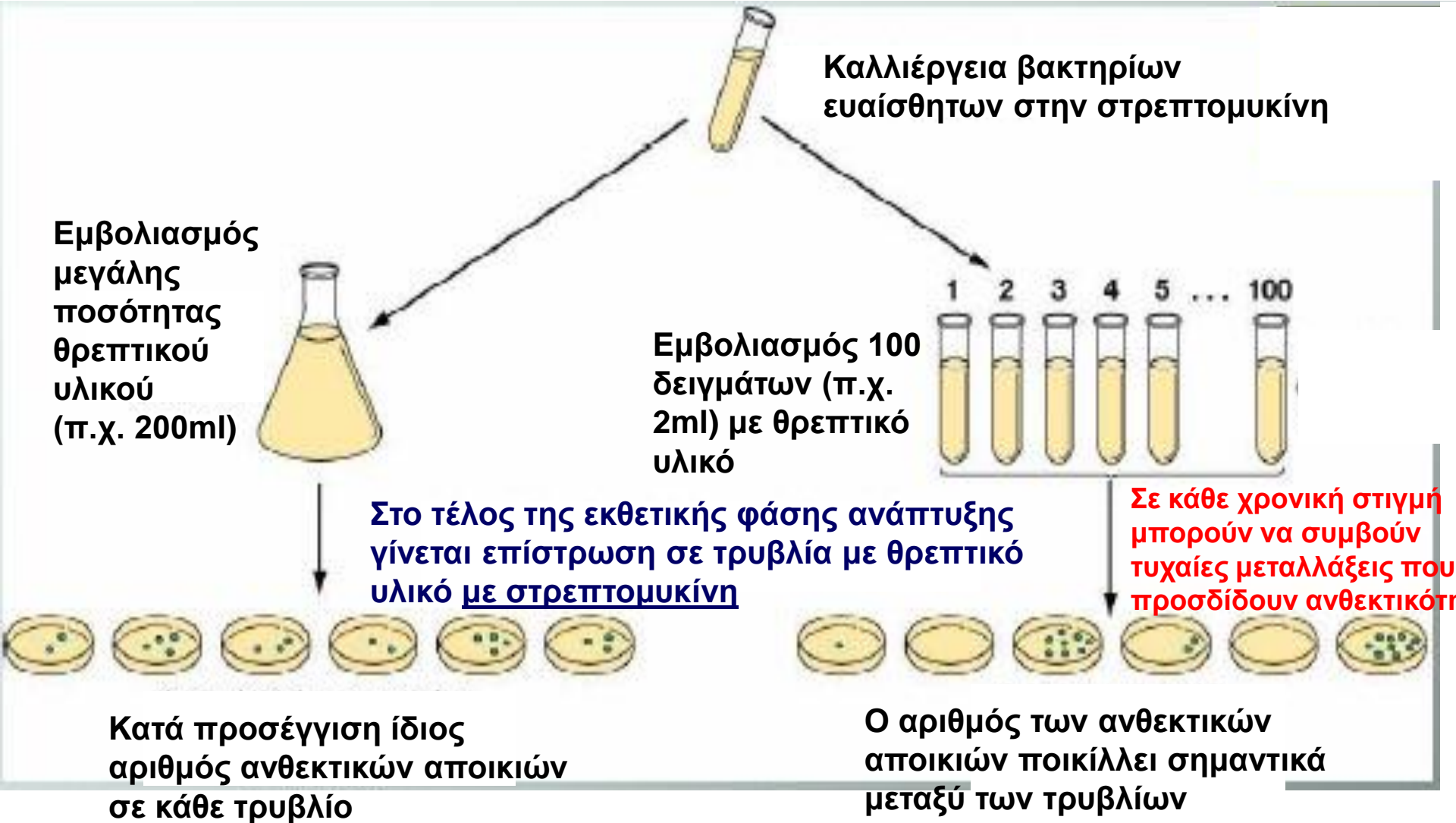
Μεταλλαγή στη θέση-δότη (splice donor)

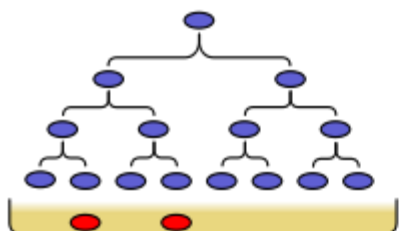
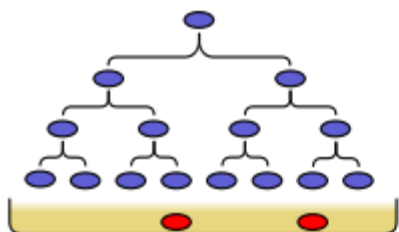
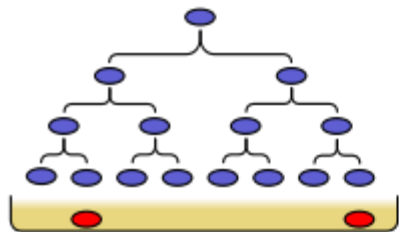
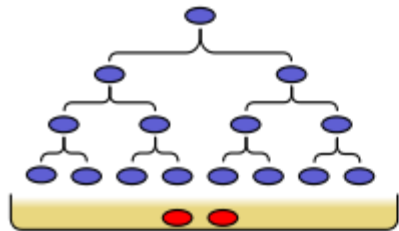


Είναι η μετάλλαξη τυχαίο φαινόμενο;

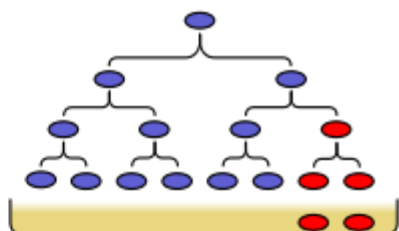
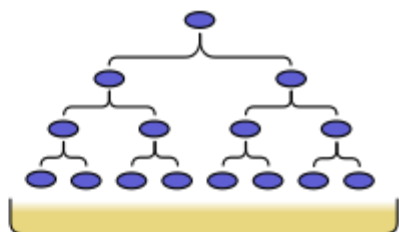
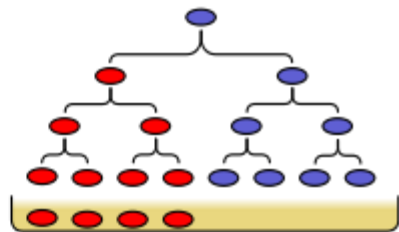
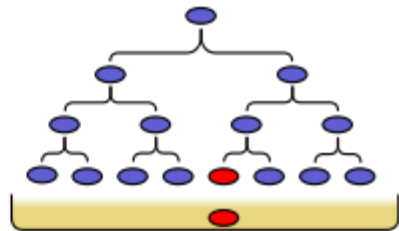
Πείραμα Luria & Delbruck

Επιλογή κάποιου σπάνιου τυχαίου μεταλλάγματος ή ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντίδραση στον παράγοντα επιλογής (προσαρμογή);





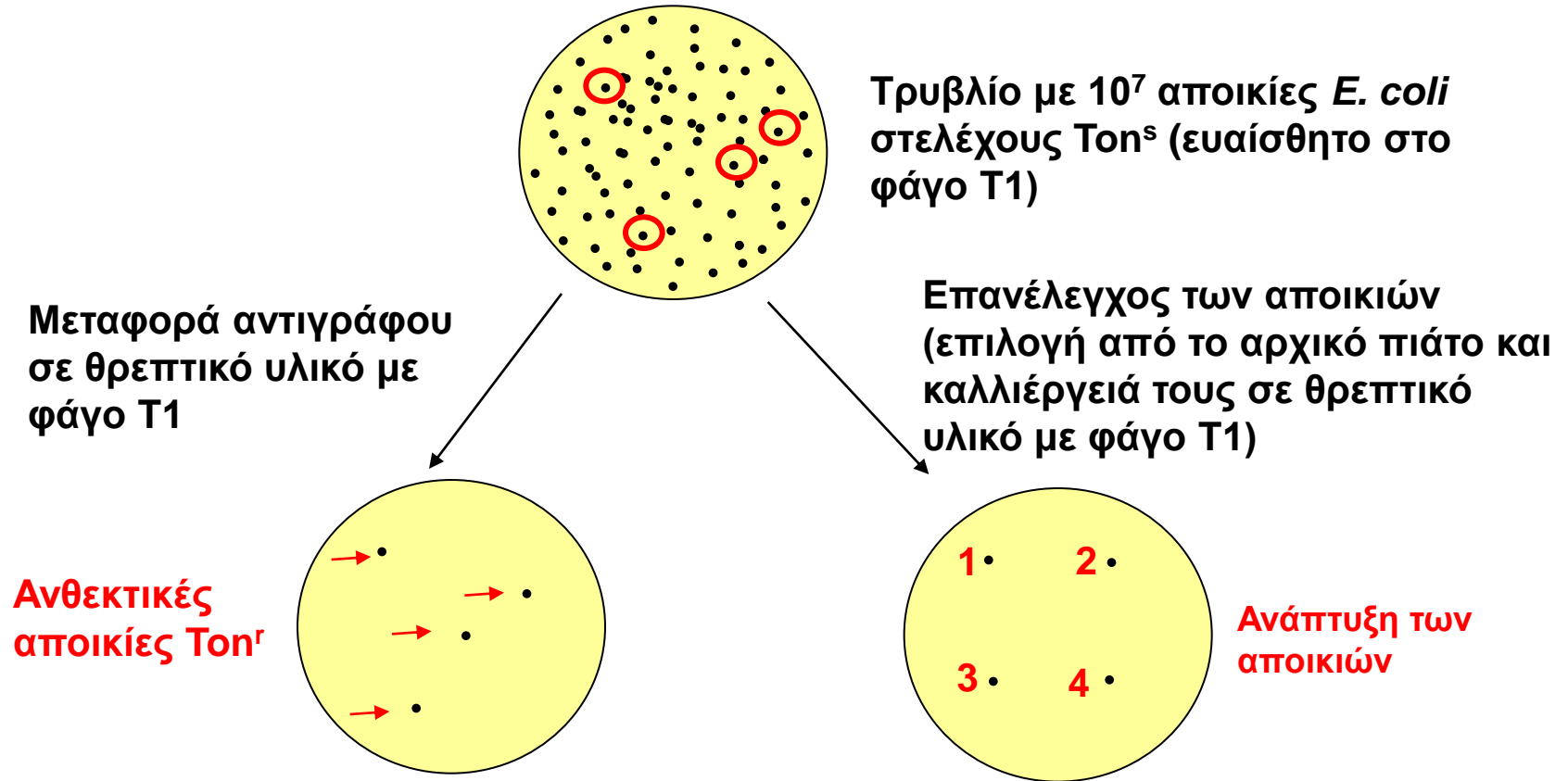
Επαγόμενη μεταλλαγή



Τυχαία μεταλλαγή

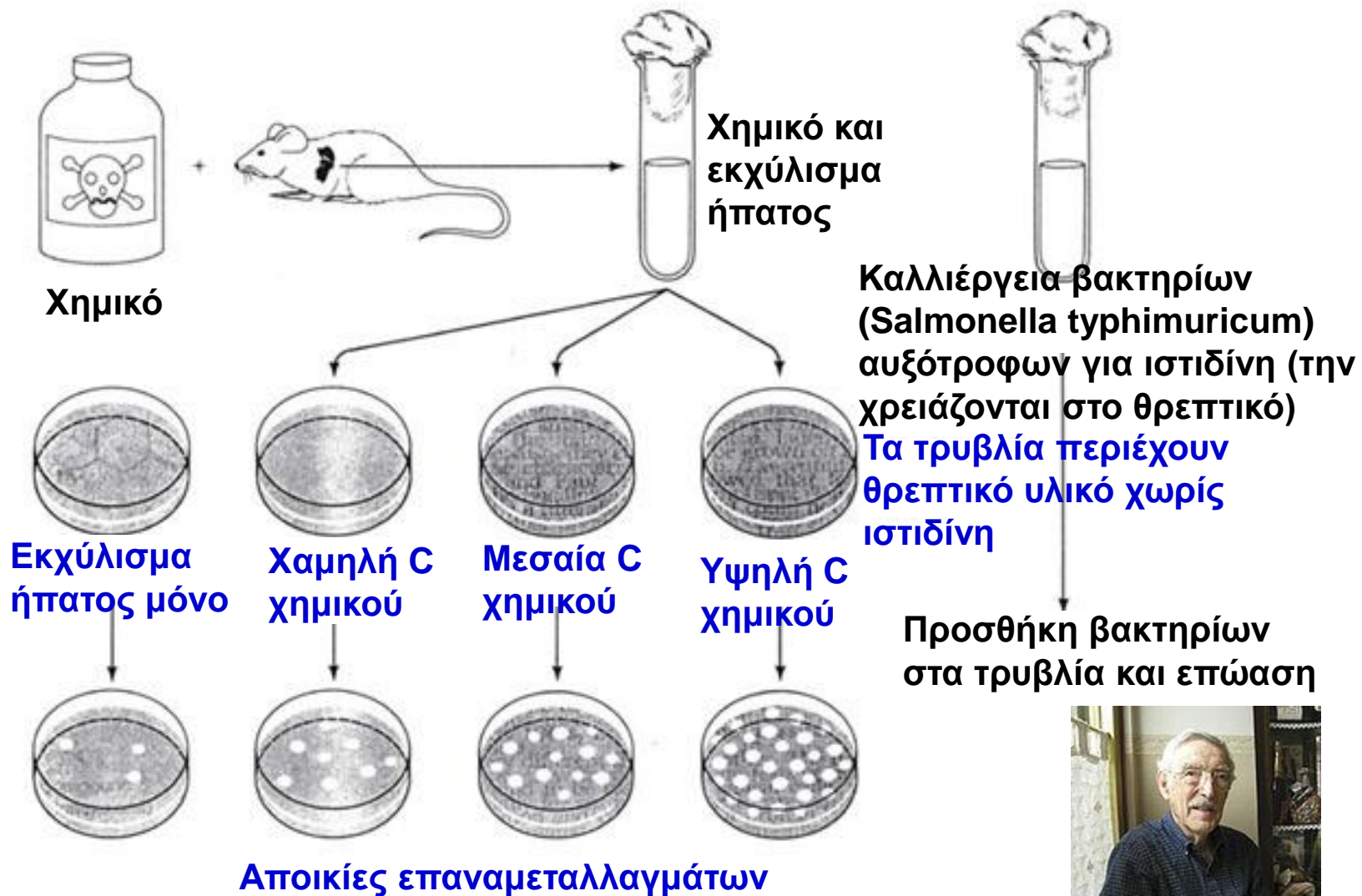
Πώς μπορεί να προσδιοριστεί η ύπαρξη μεταλλαγμάτων σε έναν πληθυσμό πριν από την εφαρμογή της επιλογής;

Πείραμα Lederberg & Lederberg



Άρα η μετάλλαξη έγινε πριν εφαρμοστεί κάποια επιλογή υπέρ του μεταλλάγματος

• Η δοκιμή του Ames (προσδιορισμός παραγόντων μεταλλαξιγένεσης)



Bruce Ames



ΑΣΚΗΣΕΙΣ

Πόσοι είναι οι βαθμοί ελευθερίας σε μία δοκιμή χ^2 που εφαρμόζουμε στα αποτελέσματα της διασταύρωσης τριυβριδισμού $AaBbCc \times aabbcc$;

Σ-Λ

Όταν εφαρμόζουμε τη δοκιμή χ^2 στα αποτελέσματα μιας διασταύρωσης όπου θέλουμε να ελέγξουμε αν δύο γενετικοί τόποι είναι συνδεδεμένοι ή όχι, θεωρούμε ως μηδενική υπόθεση ότι οι τόποι είναι πράγματι συνδεδεμένοι.

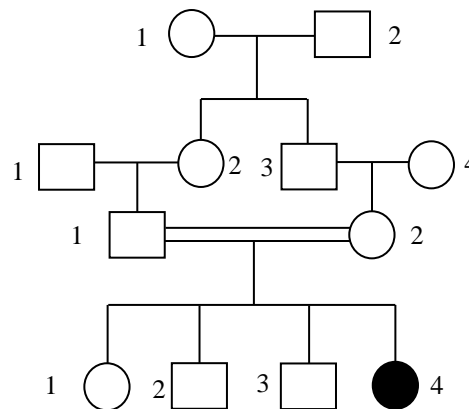
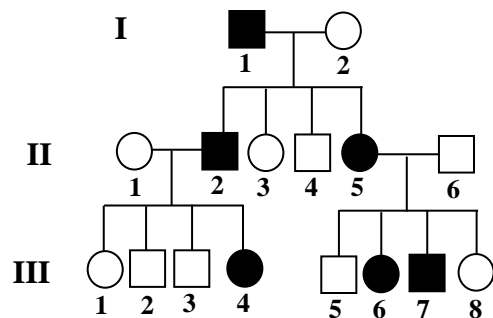
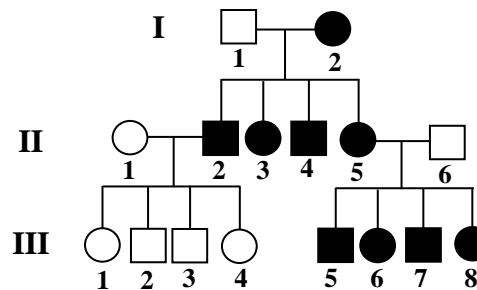
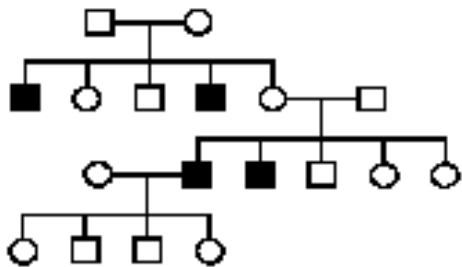
Τι εννοούμε όταν λέμε ότι ένας γενετικός δείκτης είναι πολυμορφικός; Δώστε ένα παράδειγμα. Σε τι εξυπηρετεί ο πολυμορφισμός ενός γενετικού δείκτη στη χαρτογράφιση;

Σε ένα άτομο με σύνδρομο Klinefelter πώς θα μπορούσαμε να διαπιστώσουμε αν το επιπλέον χρωμόσωμα είναι μητρικής ή πατρικής προέλευσης με χρήση πολυμορφικών γενετικών δεικτών;

Στην παρακάτω διασταύρωση και εφόσον τα γονίδια A, B, Γ, Δ και E χαρτογραφούνται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, τι ποσοστό των απογόνων θα μοιάζει φαινοτυπικά με έναν από τους δύο γονείς;

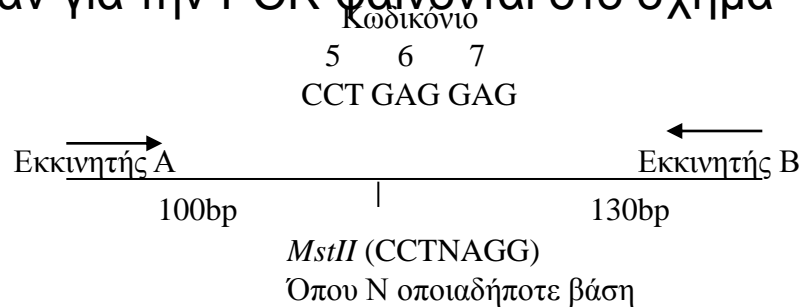
P: $A/a \ B/\beta \ \Gamma/\gamma \ \Delta/\delta \ E/\epsilon$ x $a/a \ B/\beta \ \gamma/\gamma \ \Delta/\delta \ \epsilon/\epsilon$

Προσδιορίστε τον πιθανότερο τρόπο κληρονόμησης των νοσημάτων στα παρακάτω γενεαλογικά δένδρα και αιτιολογήστε την απάντησή σας.



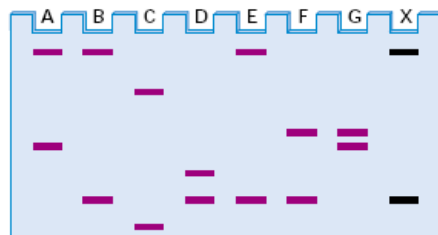
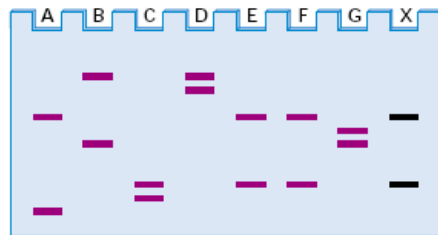
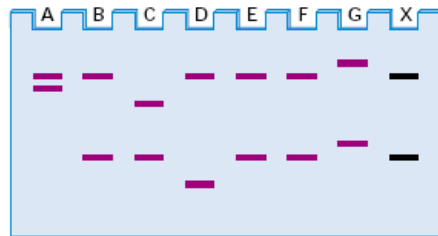
Ο γενετικός τύπος των ομάδων αίματος ABO χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 9 του ανθρώπου. Μια γυναίκα με ομάδα αίματος O μένει έγκυος από το σύζυγό της που έχει ομάδα AB αλλά στη συνέχεια αποβάλλει. Η κυτταρογενετική ανάλυση στο έμβρυο έδειξε ότι αυτό είχε τρισωμία 9 ενώ η ανάλυση αίματος ότι έχει ομάδα αίματος A. Με βάση τα παραπάνω, μπορείτε να βρείτε σε ποιον γονέα και σε ποιο στάδιο έλαβε χώρα ο μη διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων; Εξηγήστε την απάντησή σας.

Η μέθοδος της PCR-RFLP εφαρμόστηκε για την ανίχνευση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Η μετάλλαξη για τη νόσο τροποποιεί το κωδικόνιο 6 του γονιδίου της β-σφαιρίνης από GAG σε GTG, απαλείφοντας έτσι μία θέση *MstII* που φυσιολογικά υπάρχει εκεί. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR φαίνονται στο σχήμα



Ποια είναι τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της PCR-RFLP για ένα άτομο AA (ομόζυγο φυσιολογικό), AS (ετερόζυγο φορέας) και SS (ομόζυγο προσβεβλημένο) μετά από πέψη με *MstII*; Ποιο είναι το αναμενόμενο αποτέλεσμα για ένα άτομο ομόζυγο για την αιμοσφαιρίνη C (κωδικόνιο 6: AAG) και για ένα άτομο ετερόζυγο για β-θαλασσαιμία λόγω μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης στο κωδικόνιο 6 (έλλειψη μιας βάσης στο κωδικόνιο 6):

Σε τόπο εγκλήματος λήφθηκε υλικό από τα νύχια του θύματος και από αυτό απομονώθηκε DNA στο οποίο εφαρμόστηκε PCR για την ενίσχυση τριών μικροδορυφόρων. Το πρότυπο που προέκυψε συγκρίθηκε με αυτό επτά υπόπτων και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απεικονίζονται παρακάτω (A-G: δείγματα υπόπτων, X: δείγμα δράστη). A) Γιατί επιλέχθηκε η ενίσχυση μικροδορυφόρων και όχι άλλων γενετικών τόπων; B) Γιατί στην εικόνα εμφανίζονται δύο ζώνες στα δείγματα; Θα μπορούσε να υπάρχει μόνο μία; Γ) Μπορείτε να εντοπίσετε τον δράστη; Αιτιολογήστε



ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

- Αλληλουχίες του γονιδιώματος που έχουν την δυνατότητα να μεταπηδούν και να εισέρχονται σε άλλα σημεία του γονιδιώματος

- Ανακαλύφθηκαν από την Barbara McClintock στο καλαμπόκι (1940's, βραβείο Nobel 1983)



“for her discovery of mobile genetic elements”

- Για κάποια η ένθεση γίνεται σε εξειδικευμένες θέσεις, για άλλα σε τυχαίες θέσεις.

- Υπάρχουν λειτουργικά και μη (τα περισσότερα) μεταθετά στοιχεία

- Έχουν ταυτοποιηθεί σε βακτήρια, φυτά, Drosophila, άνθρωπο κ.λπ.

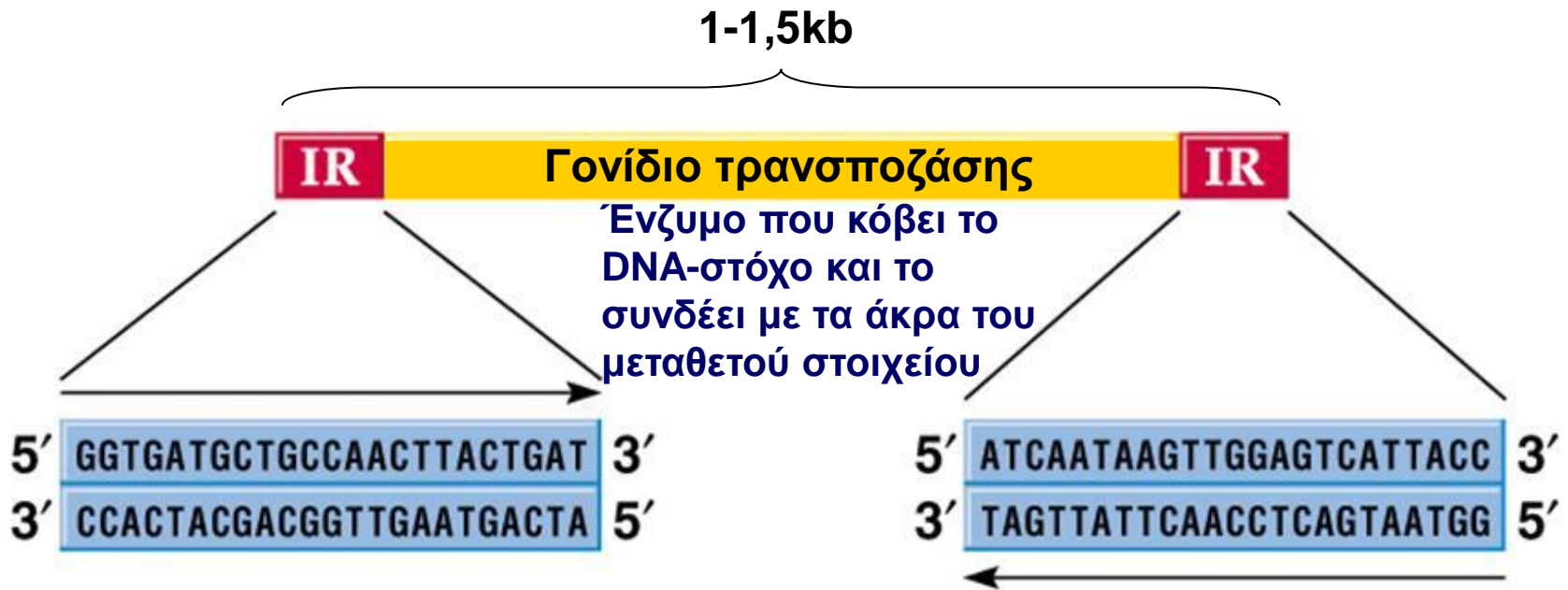
- Μετακινούνται μόνο οι συγκεκριμένες αλληλουχίες αλλά μπορεί να συμπαρασύρουν και γειτονικές αλληλουχίες

- Μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις

Μεταθετά στοιχεία στους προκαρυωτικούς

Αλληλουχίες ένθεσης (Insertion sequences = IS)

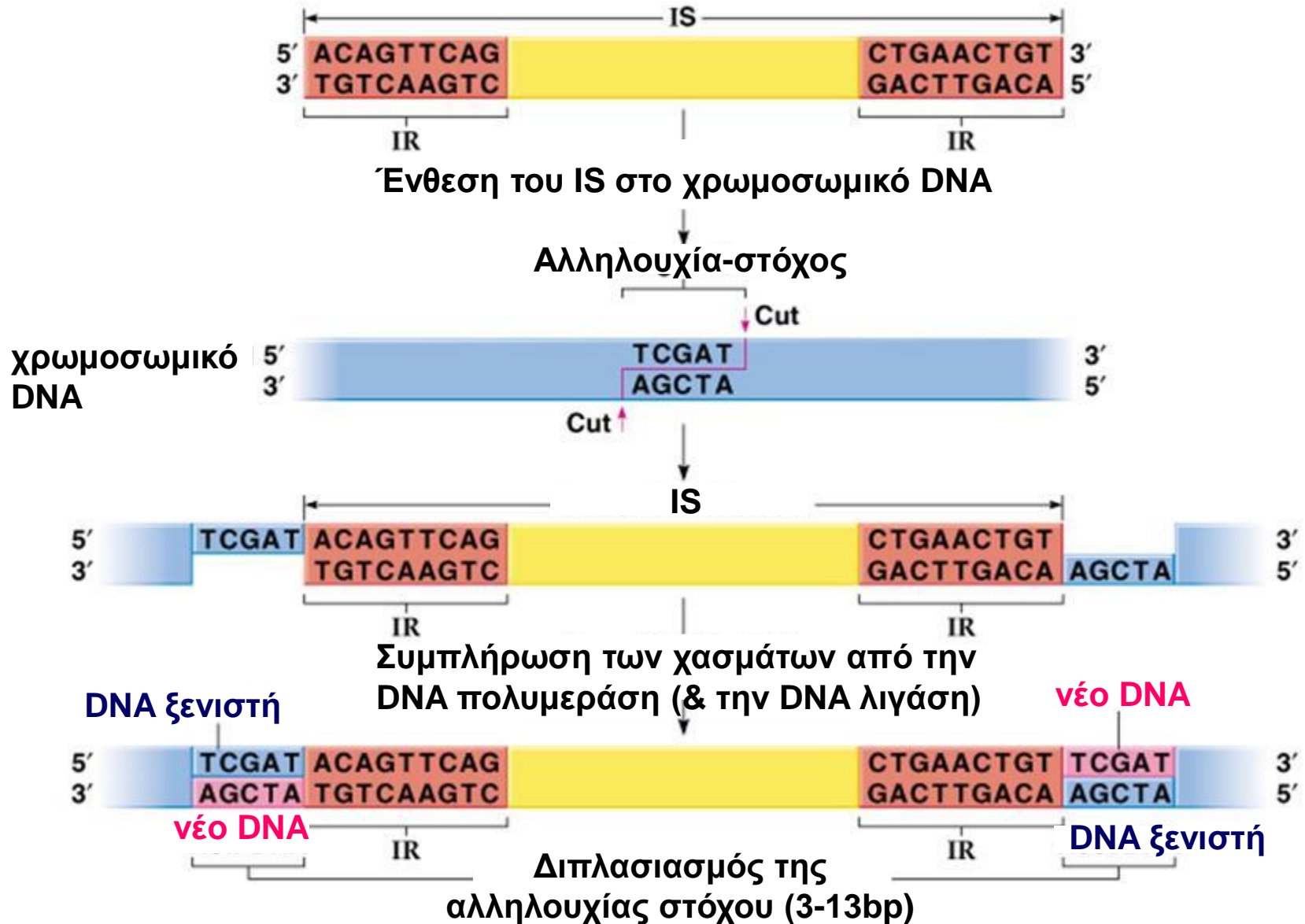
- Αποτελούν μέρος του βακτηριακού χρωμοσώματος, ~ 10/γονιδίωμα
- Είναι αυτόνομα
- Εισάγονται σε τυχαίες ή μη θέσεις



IR: inverted repeats (ανάστροφες επαναλήψεις), 8 - 40bp
(αναγνωρίζονται από την τρανσποζάση)

Συμβολισμός: IR + αριθμός, π.χ. IS1, IS2

Μετά την μετάθεση, το DNA του ξενιστή διπλασιάζεται στο σημείο της ένθεσης (direct repeats = ομόροπες επαναλήψεις)

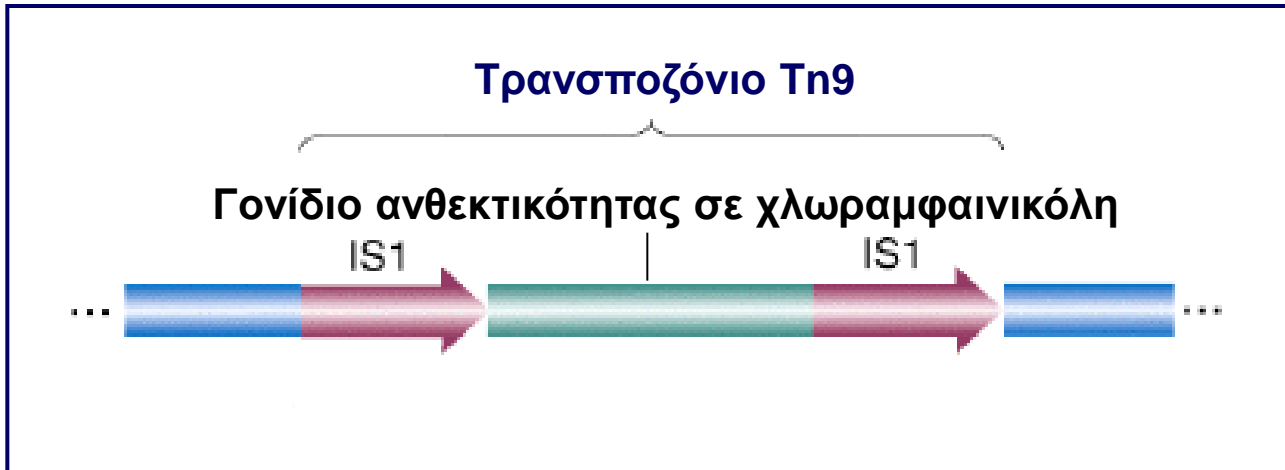


Insertion sequence	Normal occurrence in <i>E. coli</i>	Length (bp)	Inverted repeat* (bp)
IS1	5–8 copies on chromosome	768	18/23
IS2	5 copies on chromosome; 1 on F	1327	32/41
IS3	5 copies on chromosome; 2 on F	1400	32/38
IS4	1 or 2 copies on chromosome	1400	16/18
IS5	Unknown	1250	Short
γ - δ (TN1000)	1 or more copies on chromosome; 1 on F	5700	35
pSC101 segment	On plasmid pSC101	200	30/36

* Fraction of base pairs; for example, 18 of 23 bp, and so forth.

Source: M. P. Calos and J. H. Miller, *Cell* 20, 1980, 579–595.

Σύνθετα τρανσποζόνια



Transposon	Marker	Length (bp)	Inverted repeat
Tn1	Ampicillin	4,957	38
Tn2	Ampicillin		
Tn3	Ampicillin		
Tn4	Ampicillin, streptomycin, sulfanilamide	20,500	Short
Tn5	Kanamycin	5,400	1500
Tn6	Kanamycin	4,200	Not detectable with electron microscopy
Tn7	Trimethoprim, streptomycin	14,000	Not detectable with electron microscopy
Tn9	Chloramphenicol	2,638	18/23*
Tn10	Tetracycline	9,300	1400

* 18 of 23 base pairs.

Source: M. P. Calks and J. H. Miller, *Cell* 20, 1980, 579–595.

Πώς γίνεται η μετάθεση;

1. Μέσω αντιγραφής (replicative transposition)

Αντιγραφή του μεταθετού στοιχείου → Εισαγωγή σε νέα θέση

→ Αύξηση του αριθμού των μεταθετών στοιχείων

Απαραίτητα ένζυμα: τρανσποζάση, ρεζολβάση

2. Χωρίς αντιγραφή (non-replicative transposition)

Πρόκληση δίκλωνου ρήγματος στο σημείο εκτομής → επιδιόρθωση

→ αριθμού μεταθετών στοιχείων = σταθερός

Απαραίτητο ένζυμο: τρανσποζάση

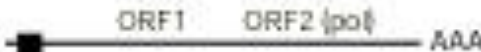

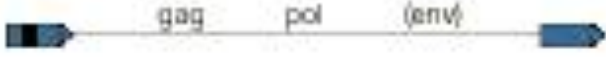



Μεταθετά στοιχεία στους ευκαρυωτικούς

Στο καλαμπόκι → στοιχεία ελέγχου

Στη *Drosophila* → P, copia, FB

Στη ζύμη → Ty (transposon yeast), ~40 / γονιδίωμα

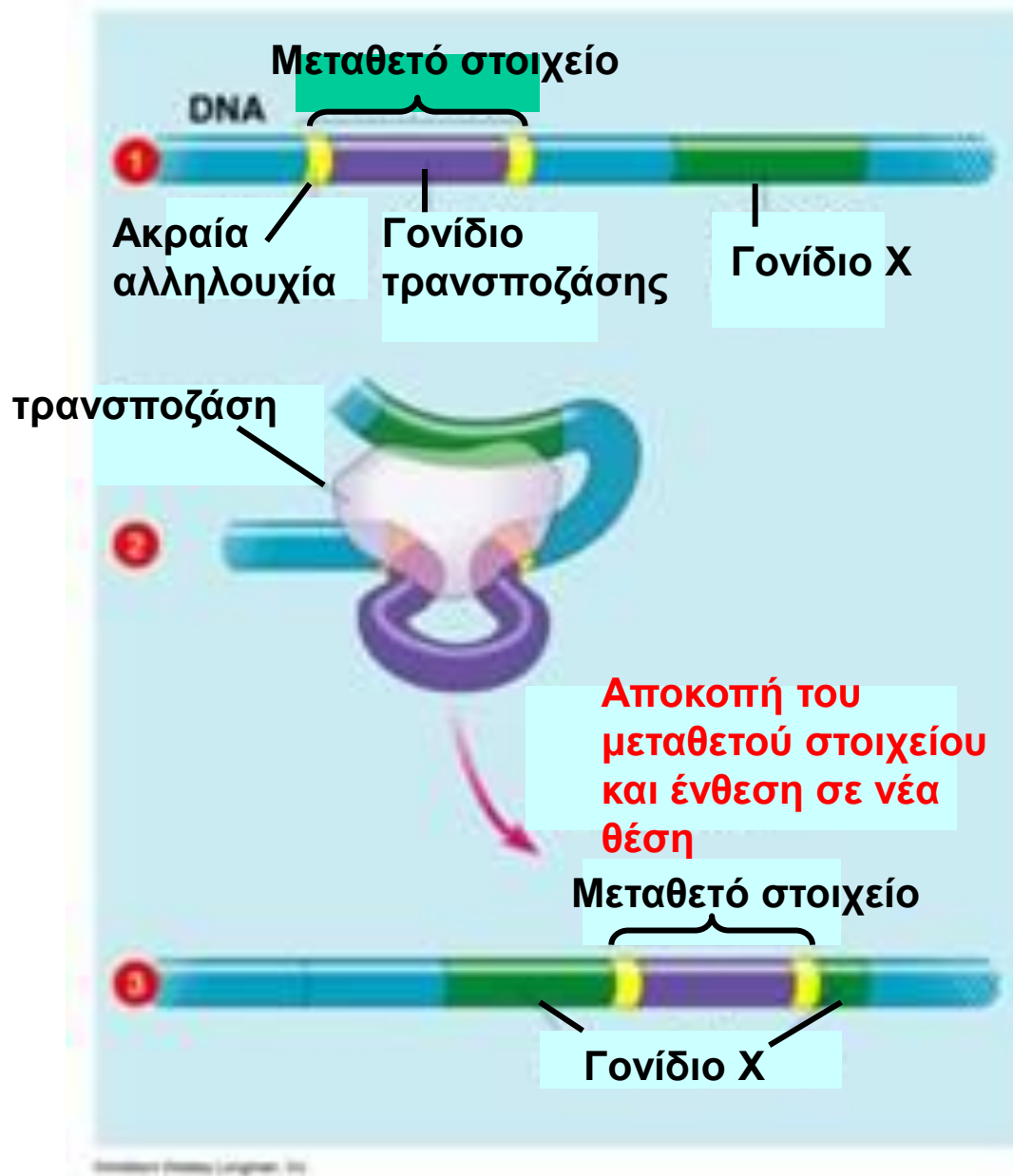
Στον άνθρωπο

			Μήκος	Αριθμός αντιγράφων	% του γονιδιώματος
LINEs	Autonomous		6-8 kb	850,000	21%
SINEs	Non-autonomous		100-300 bp	1,500,000	13%
Retrovirus-like elements	Autonomous		6-11 kb	450,000	8%
	Non-autonomous		1.5-3 kb		
DNA transposon fossils	Autonomous		2-3 kb	300,000	3%
	Non-autonomous		80-3,000 bp		

Πώς γίνεται η μετάθεση;

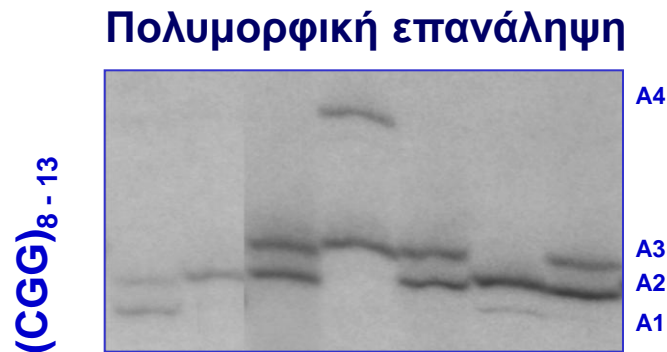
- 1. Μέσω αντιγραφής (replicative transposition)**
- 2. Χωρίς αντιγραφή (non-replicative transposition)**
- 3. Μέσω RNA κυρίως (ρετρο-τρανσποζόνια)
κωδικοποιούν αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase)**

Πρόκληση μεταλλάξεων από μεταθετά στοιχεία



Μεταλλαγές από επεκτάσεις τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων

- Οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις είναι πολύ συχνές στο γονιδίωμα
- Πολλές είναι πολυμορφικές



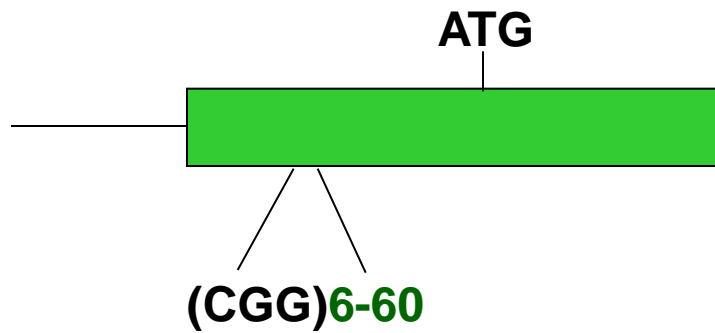
- Μερικές σχετίζονται με ασθένειες
επεκτάσεις σε μη κωδικές περιοχές

επεκτάσεις σε κωδικές περιοχές
πολυ-γλουταμίνες
πολυ-αλανίνες

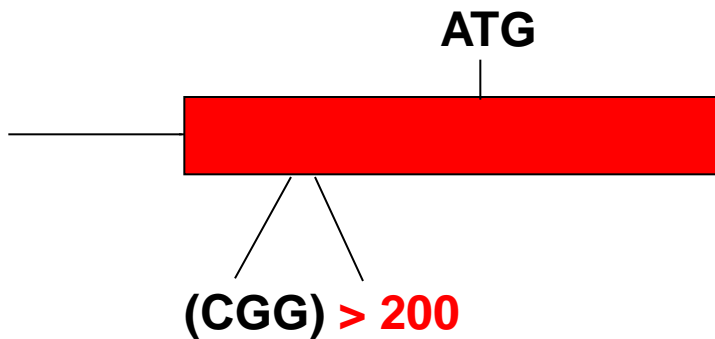
Τρινουκλεοτιδικές επεκτάσεις σε μη κωδικές περιοχές

- Σύνδρομο εύθραυστου X (fragile X) (διανοητική καθυστέρηση)

Γονίδιο FMR1 (χρωμόσωμα X)



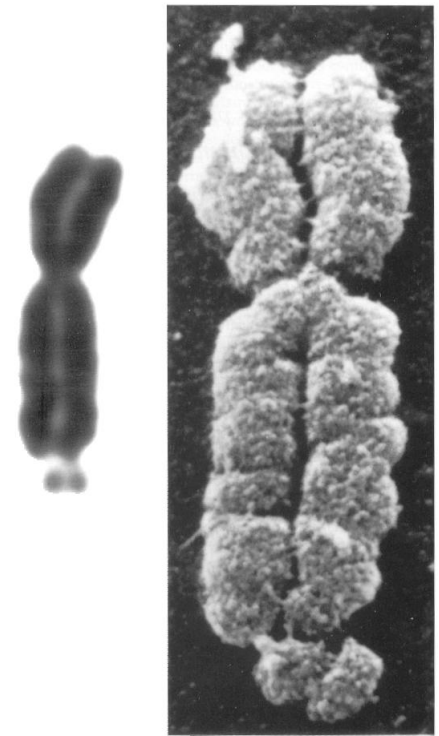
Φυσιολογικό
αλληλόμορφο



Μεταλλαγμένο
αλληλόμορφο

+
Υπερμεθυλίωση
↓
Μεταγραφική καταστολή

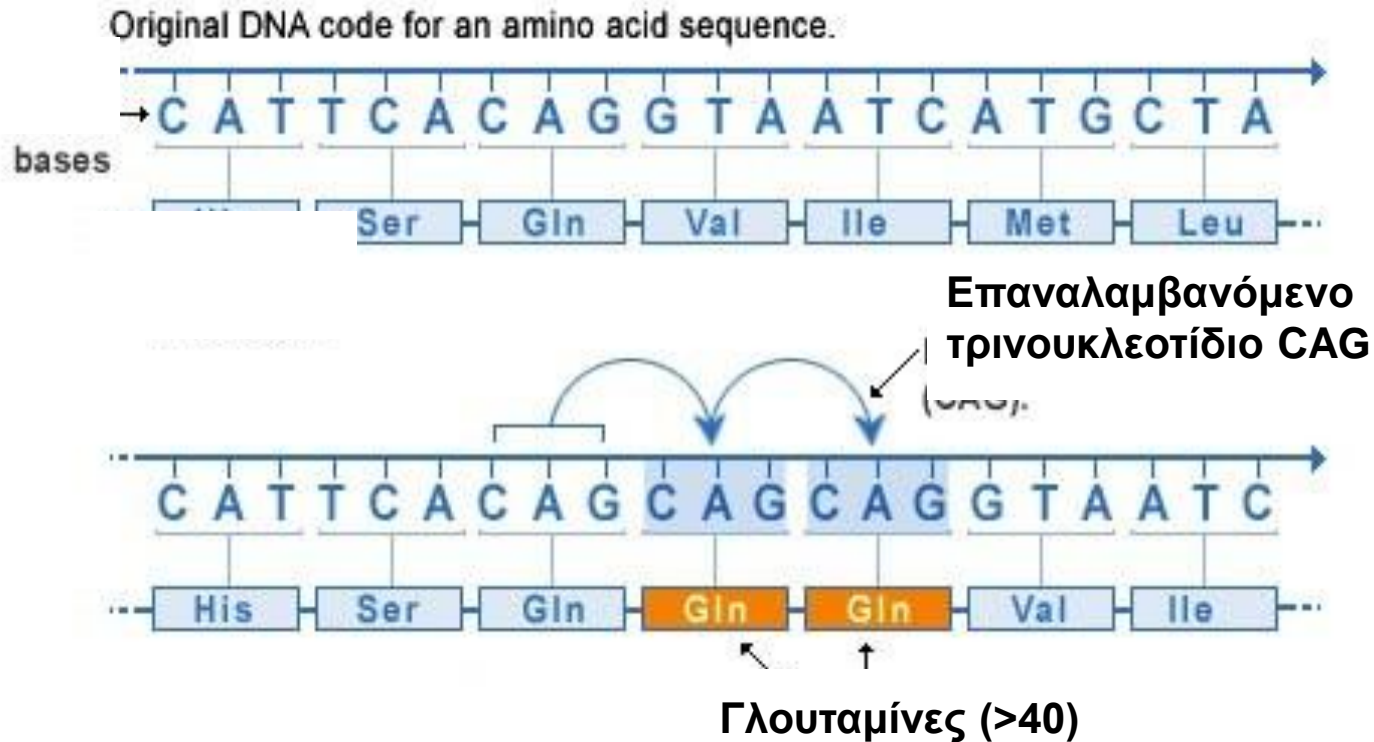
Εύθραυστη θέση



Τρινουκλεοτιδικές επεκτάσεις σε κωδικές περιοχές

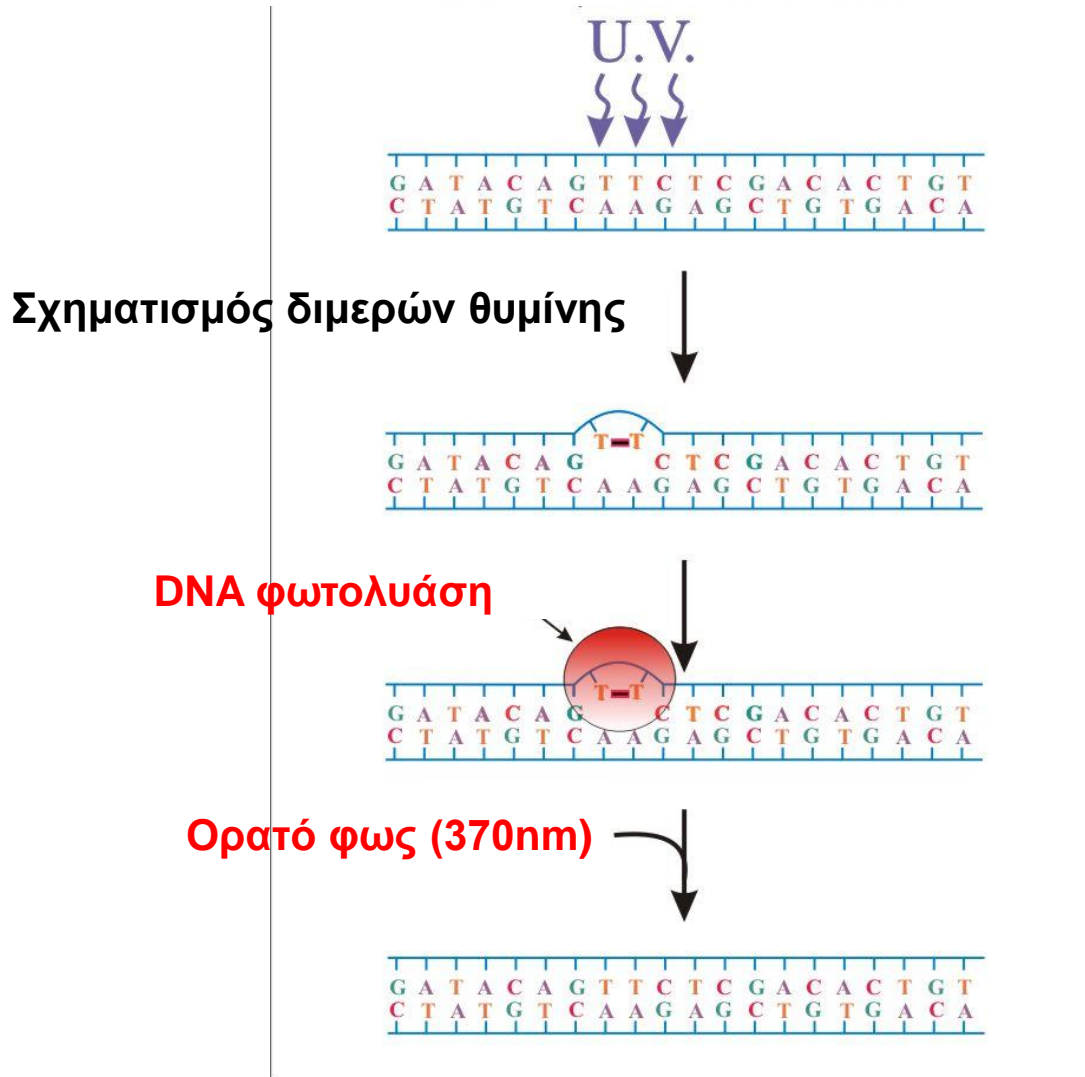
- Huntington (προοδευτικός νευροεκφυλισμός) - επεκρατής

Το κανονικό αλληλόμορφο κωδικοποιεί για μία αμινοξική αλληλουχία



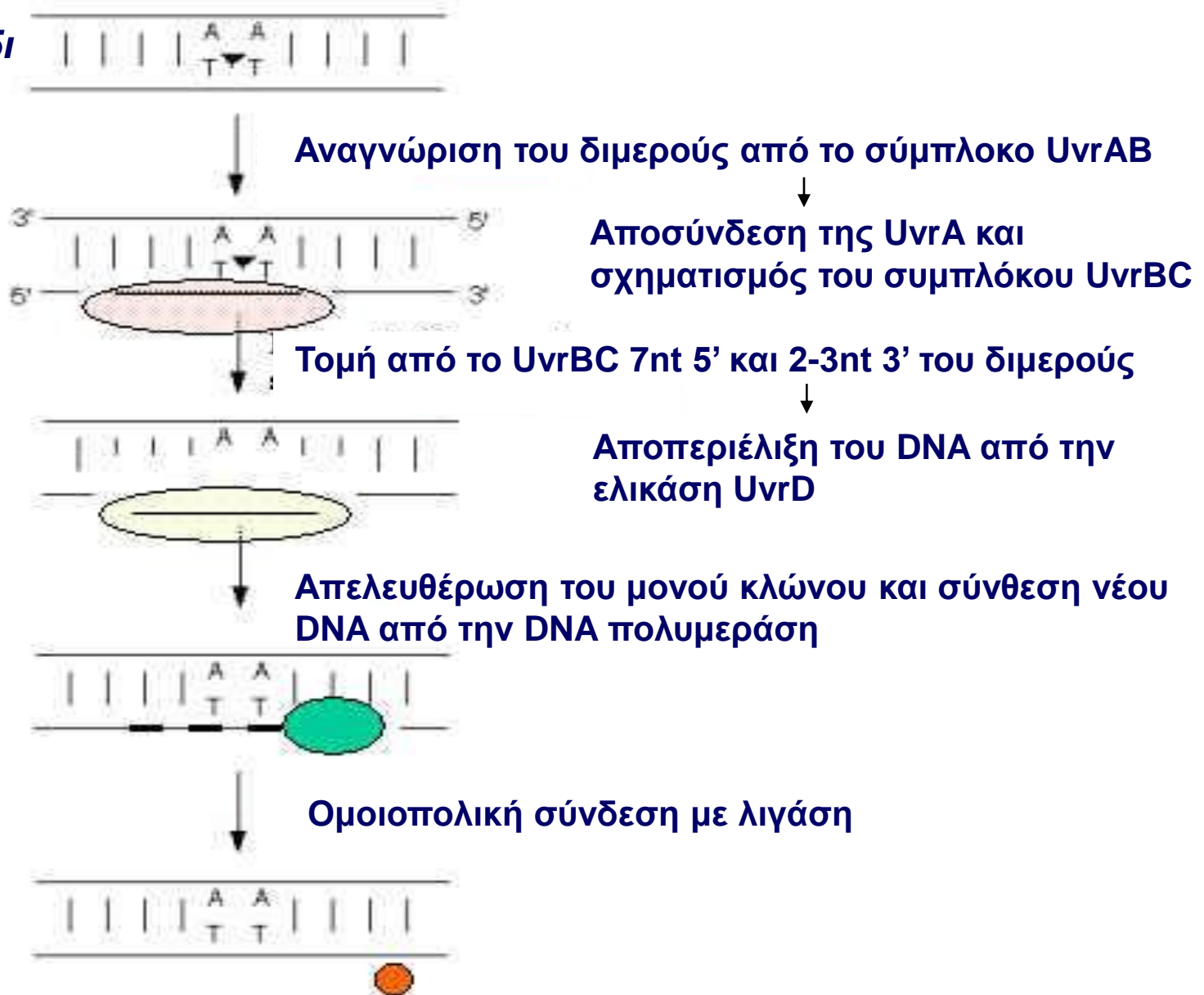
Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

1. Επιδιόρθωση διμερών θυμίνης με φωτοενεργοποίηση

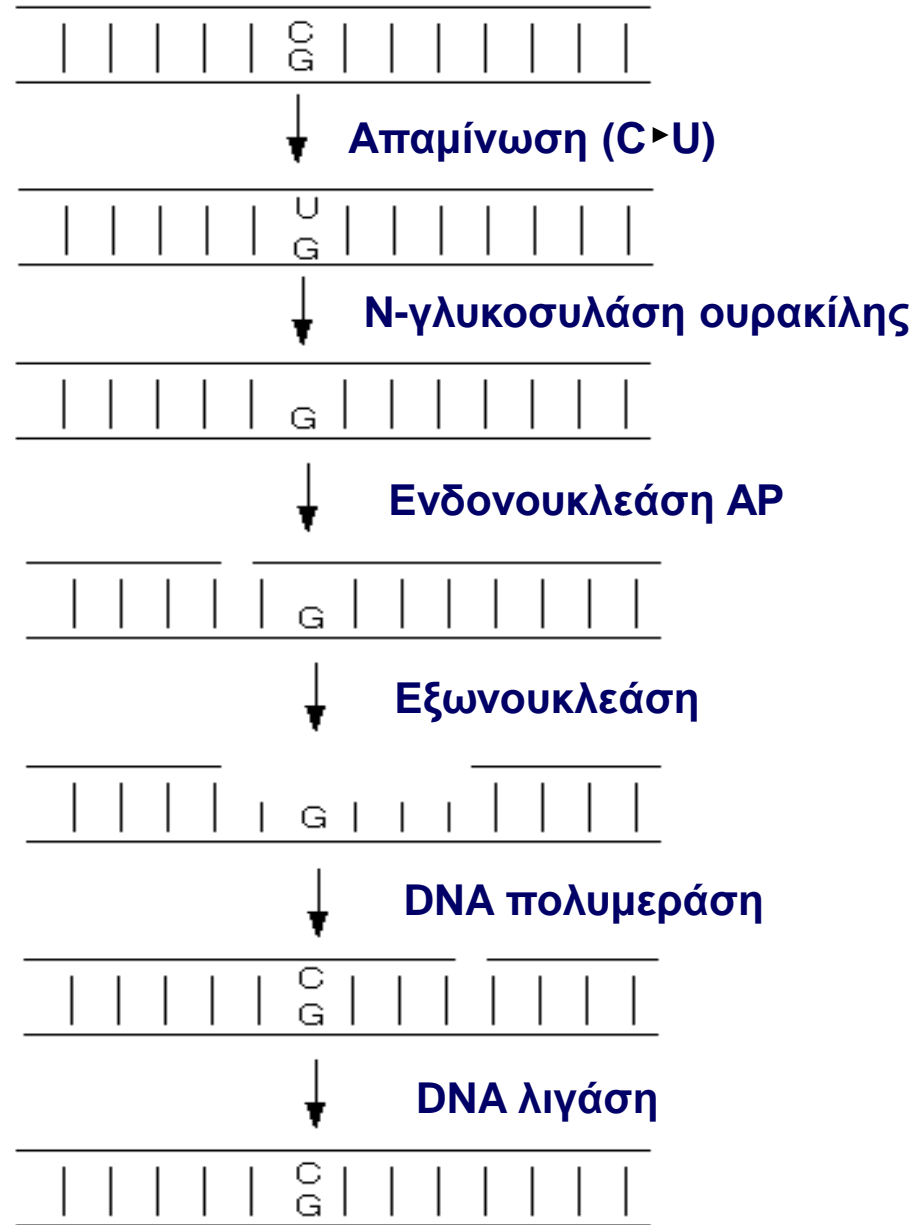


2. Επιδιόρθωση διμερών θυμίνης με εκτομή (Excision repair)

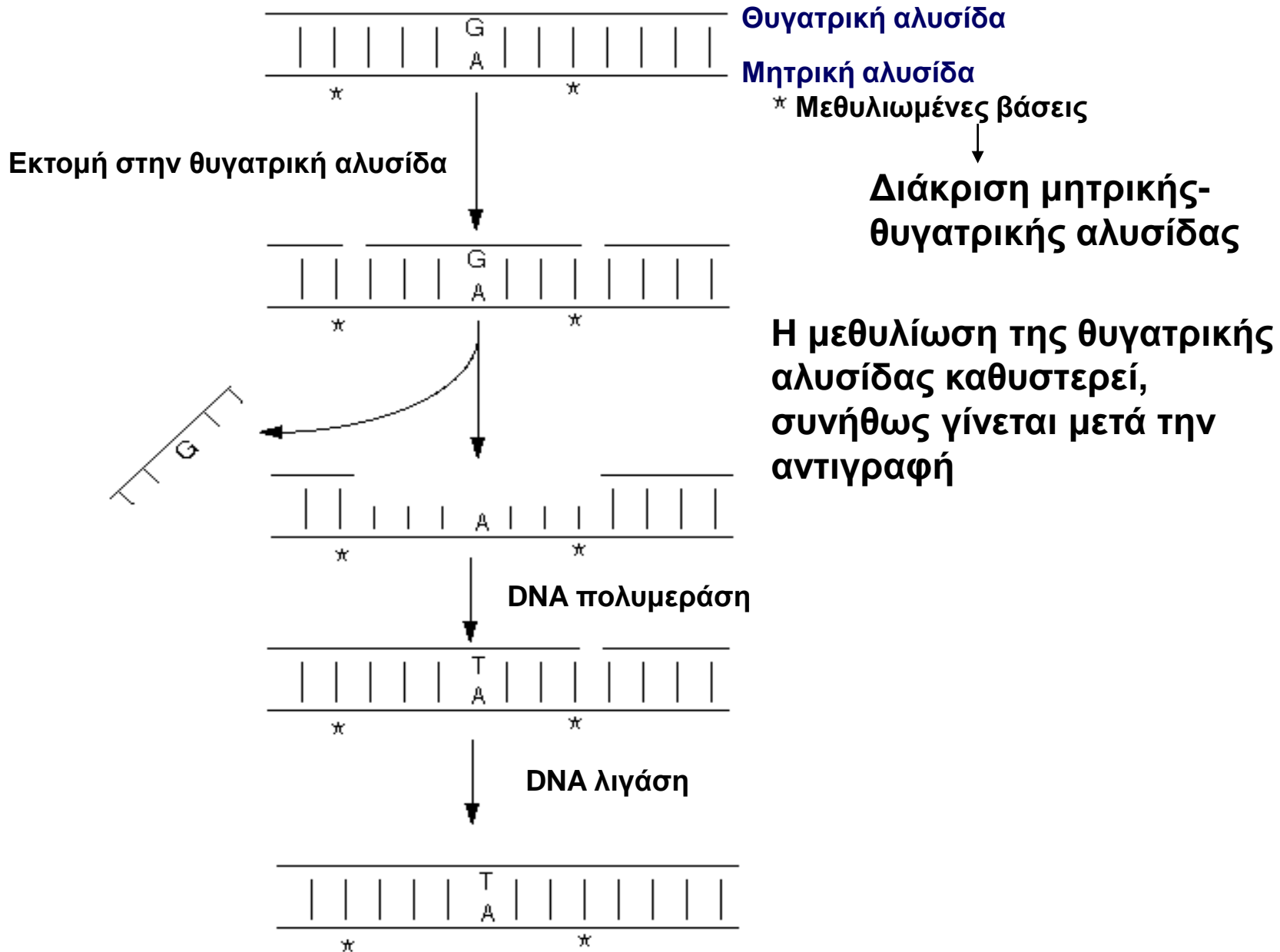
- Και στο σκοτάδι
- *E. coli*



3. Επιδιόρθωση αταίριαστου ζεύγους βάσεων με εκτομή ενός μόνο νουκλεοτιδίου, π.χ. μετά από απαμίνωση



4. Επιδιόρθωση αταίριαστου ζεύγους βάσεων με εκτομή μικρού τμήματος DNA



5. Επιδιόρθωση SOS

Ενεργοποιείται από αναστολή της αντιγραφής

Λειτουργεί όταν τα άλλα συστήματα επιδιόρθωσης δεν επαρκούν

Σκοπός: επιβίωση κυττάρου έστω και με λάθη «change or die»