



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Ενότητα 3^η: Ένζυμα Μοριακής βιολογίας– ΕΝΔ Περιορισμού - Χαρτογράφηση

Δροσοπούλου Ε.
Σκούρας Ζ.

Τμήμα Βιολογίας



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



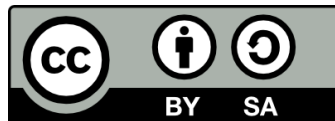
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Άδεια χρήσης εικόνων

Ευχαριστούμε θερμά τις Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Μπάσδρα για την παραχώρηση του δικαιώματος χρήσης των εξής εικόνων της παρούσης παρουσίασης:

Εικόνες: 1, 2

Οι εικόνες αυτές προέρχονται από το βιβλίο Peter Russell, iGenetics: Μια μεντελική προσέγγιση, 1η έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.



Περιεχόμενα ενότητας

- Γενετική Μηχανική
- Κλωνοποίηση DNA
- Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής
- Ένζυμα
 - Νουκλεάσες
 - Πολυμεράσες
 - Τροποποιητικά
 - Ενδονουκλεάσες περιορισμού
 - Λιγάσες
- Ανάλυση μεγέθους τμημάτων DNA
- Χαρτογράφηση με ένζυμα περιορισμού
- Ασκήσεις



Γενετική Μηχανική (1/2)

- **Γενετική Μηχανική**: σύνολο τεχνικών και μεθοδολογιών που επιτρέπουν τον άμεσο χειρισμό του γενετικού υλικού, την ανάλυση των γονιδίων καθώς και τη μεταφορά τους από έναν οργανισμό σε άλλον
- **Δεκαετία 1970**: Ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA



Γενετική Μηχανική (2/2)

Τομείς που χρησιμοποιείται η γενετική μηχανική:

- ✓ Ανάλυση δομής και λειτουργίας γονιδίων
- ✓ Ανάλυση ολόκληρων γονιδιωμάτων
- ✓ Προ- και μεταγεννητική διάγνωση ασθενειών
- ✓ Γενετική ταυτοποίηση ατόμων - Ιατροδικαστική
- ✓ Αρχαιογενετική
- ✓ Μοριακή οικολογία
- ✓ Δημιουργία διαγενετικών οργανισμών
- ✓ Οικονομική παραγωγή βιολογικών προϊόντων μεγάλης αξίας-Βιοτεχνολογία
- ✓ Γονιδιακή θεραπεία...



Κλωνοποίηση DNA (1/2)

Βασικό σχήμα κλωνοποίησης τμήματος DNA:

- Κατασκευή ανασυνδυασμένου μορίου (Σύνδεση Φορέα με τμήμα DNA)
- Μεταφορά ανασυνδυασμένου μορίου στο κύτταρο δέκτη (βακτήριο)
- Διαίρεση κυττάρου δέκτη-Πολλαπλασιασμός ανασυνδυασμένου DNA
- Σχηματισμός βακτηριακών αποικιών σε στερεό θρεπτικό υλικό- Κάθε αποικία αποτελεί έναν κλώνο

Ανασυνδυασμένο μόριο DNA = μη φυσική ένωση δύο τμημάτων DNA

≠ το φαινόμενο του φυσικού ανασυνδυασμού

<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/plasmid.php>



Κλωνοποίηση DNA (2/2)

Απομόνωση γονιδίου με κλωνοποίηση

- ✓ Φορείς κλωνοποίησης + Μίγμα διαφορετικών τμημάτων DNA → Ανασυνδυασμένα μόρια
 - Κάθε ανασυνδυασμένο μόριο φέρει ένα διαφορετικό τμήμα DNA
- ✓ Εισαγωγή ανασυνδυασμένων μορίων σε βακτήρια
 - Κάθε βακτήριο φέρει ένα διαφορετικό ανασυνδυασμένο μόριο DNA
- ✓ Επίστρωση των βακτηρίων σε καλλιέργεια-Ανάπτυξη αποικιών
 - Κάθε αποικία αποτελεί κλώνο ενός **διαφορετικού ανασυνδυασμένου μορίου DNA**



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (1/21)

Εργαλεία τεχνολογίας: συσκευές ηλεκτροφόρησης, φυγόκεντροι, υπερφυγόκεντροι, φασματογράφοι, μικροσκόπια, ηλεκτρονικά μικροσκόπια, υπολογιστές, προγράμματα κ.α.

Εργαλεία βιολογικά: ένζυμα, φορείς, ξενιστές, αντιβιοτικά, μόρια δείκτες, RNAs, κ.α.



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (2/21)

Ένζυμα

- **Νουκλεάσες:** κόψιμο, κόντεμα
- **Λιγάσες:** σύνδεση DNA μορίων
- **Πολυμεράσες:** πολυμερισμός DNA, RNA
- **Τροποποιητικά ένζυμα:** πρόσθεση ή αφαίρεση χημικών ομάδων
- **Τοποϊσομεράσες:** υπερελίκωση κυκλικών μορίων



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (3/21)

Ένζυμα - Νουκλεάσες

- ☞ Εξωνουκλεάσες: κόβουν νουκλεοτίδια στα άκρα μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας – Πραγματοποιείται μια αντίδραση υδρόλυσης που σπάει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς είτε στο 5' είτε στο 3' άκρο
- ☞ Ενδονουκλεάσες: σπάνε τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς εντός μιας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας - Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτελούν οι ενδονουκλεάσες περιορισμού

<http://www.motifolio.com/6111119.html>



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (4/21)

Ένζυμα - Πολυμεράσες

- ☞ Πολυμεράση: Ένζυμο που συνθέτει πολυμερή από νουκλεϊκά οξέα – Υπάρχουν οι DNA και οι RNA πολυμεράσες που συνθέτουν DNA και RNA αντίστοιχα
- ☞ Ως πολυμεράση χαρακτηρίζεται και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, που χρησιμοποιεί ως μήτρα ένα RNA μόριο για να συνθέσει DNA



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (5/21)

Ένζυμα - Τροποποιητικά

- ☞ Αλκαλική φωσφατάση: υδρολυτικό ένζυμο, που απομακρύνει φωσφορικές ομάδες από πολλούς τύπους μορίων (νουκλεοτίδια, πρωτεΐνες, αλκαλοειδή), μια διαδικασία που καλείται αποφωσφορυλίωση
- ☞ Πολυνουκλεοτιδική κινάση: ένζυμο που καταλύει τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP στο ελεύθερο υδροξύλιο του 5' άκρου είτε του DNA είτε του RNA
- ☞ Τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανφεράση: καταλύει την πρόσθεση νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο ενός DNA μορίου – Αντίθετα με τις DNA πολυμεράσες δεν απαιτεί μήτρα



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (6/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

Βραβείο Nobel 1978 - Arber, Smith, Nathans

Ενδονουκλεάσες περιορισμού: βακτηριακά ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων (4-8) και τέμνουν το DNA

- Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού βρέθηκαν σε βακτήρια
- Η φυσιολογική λειτουργία τους είναι η προστασία του βακτηριακού DNA
- Όταν εισάγεται φαγικό DNA σε ένα βακτήριο οι ΕΠ το πέπτουν
- Το βακτηριακό DNA δεν καταστρέφεται γιατί οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων αυτών είναι μεθυλιωμένες, καθιστώντας δύσκολη τη δέσμευση των ΕΠ σε αυτές τις θέσεις



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (7/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

- **Τύπου I:** τέμνουν το DNA σε απόσταση 1000-5000 νουκλεοτιδίων από τη θέση αναγνώρισης
- **Τύπου II:** τέμνουν το DNA στη θέση αναγνώρισης
- **Τύπου III:** τέμνουν το DNA σε απόσταση 25 περίπου νουκλεοτιδίων από τη θέση αναγνώρισης

Η πέψη αφήνει σε κάθε άκρη της αλυσίδας 3'-OH και 5'-PO₄



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (8/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

Ονοματολογία

■ *EcoRI*

■ *E* = *Escherichia*

■ *co* = *coli*

■ *R* = στέλεχος RY12

■ *I* = ρωμαϊκός αριθμός

όνομα γένους

όνομα είδους

στέλεχος

τη σειρά απομόνωσης

■ *HindIII*

□ *Haemophilus influenzae*, ορότυπος d 3^ο ένζυμο



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (9/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

- Θέση αναγνώρισης
 - Συνήθως 4, 6, ή 8 bp
 - Πολλές θέσεις αναγνώρισης είναι παλινδρομικές
OTTO / HANNAH / REGAL LAGER
A MAN A PLAN A CANAL PANAMA

**Αναγνωρίζουν την ίδια ακολουθία με κατεύθυνση
5'--->3' σε κάθε κλώνο**



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (10/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

Η αλληλουχία είναι συμμετρική

Σημείο
τομής ↓

GAATTC

CTTAAG

↑ Σημείο
τομής



Πέψη με *EcoRI*

G

CTTAA

+

AATTC

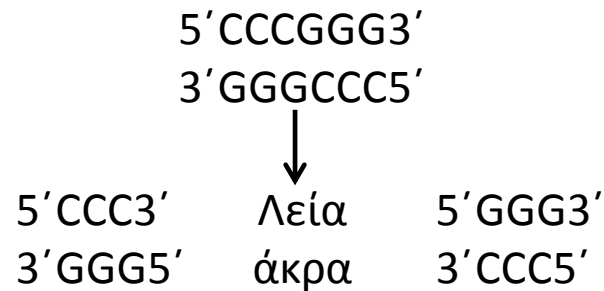
G



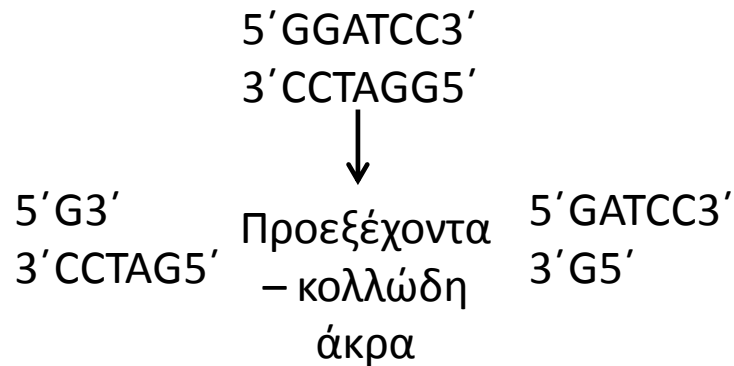
Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (11/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

Πέψη με *Sma*I



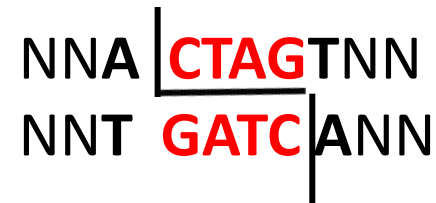
Πέψη με *Bam*HI



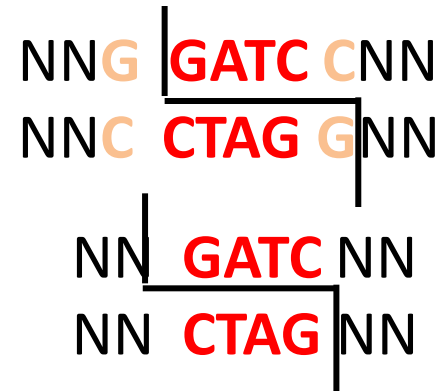
Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (12/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

- Ισοσχιζομερή: *BcuI*
SpeI



- Συμβατά άκρα: *BamHI*
Sau3AI



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (13/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

- Οποιαδήποτε τμήματα DNA που έχουν πεπτεί με την ίδια ενδονουκλεάση περιορισμού και συμβατά κολλώδη άκρα μπορούν να προσκολληθούν με το ζευγάρι των συμπληρωματικών βάσεων



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (14/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

Η ένωση όμως δεν είναι σταθερή

- Τα μόρια DNA συγκρατούνται μόνο με ζευγάρωμα βάσεων
- Οι εγκοπές πρέπει να επιδιορθωθούν



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (15/21)

Ένζυμα - Λιγάσες

- ☞ Πραγματοποιούν σύνδεση τμημάτων DNA
 - **T4 DNA λιγάση**
 - Επιδιορθώνει εγκοπές στους κλώνους του DNA (επανασχηματίζει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς)
 - Χρησιμοποιεί ενέργεια από το ATP
 - Δρα σε «κολλώδη» και «τυφλά» άκρα



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (16/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

- Κάθε τμήμα DNA κόβεται σε περιορισμένα, καθορισμένα και επαναλήψιμα μικρότερα τμήματα



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (17/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού

Σε μια αλληλουχία συγκεκριμένου μεγέθους αναμένεται περισσότερες θέσεις κοπής για ένζυμα που αναγνωρίζουν 4 ή 6 νουκλεοτίδια?

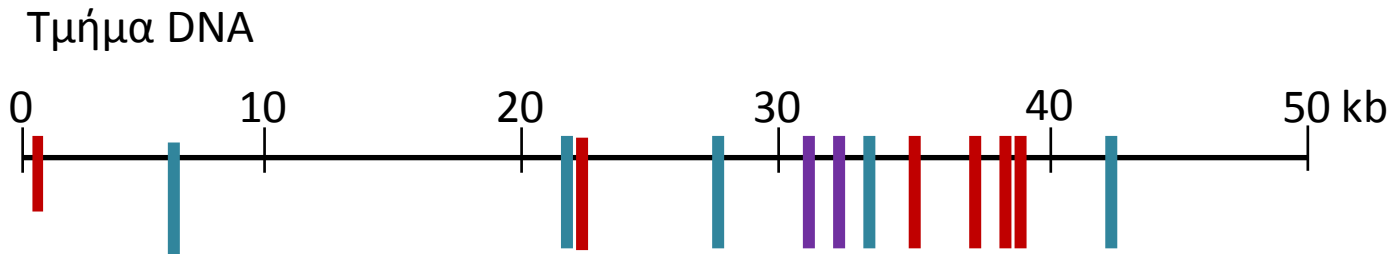
Αναμενόμενη συχνότητα:
 $1/256$ και $1/4096$

Σε μια αλληλουχία μεγάλου μεγέθους μία ενδονουκλεάση περιορισμού αναμένεται να δώσει τμήματα όμοιου μεγέθους?



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (18/21)

Ένζυμα - Ενδονουκλεάσες περιορισμού



 *Bgl*III – 6 θέσεις αναγνώρισης

 *Bam*HI – 5 θέσεις αναγνώρισης

 *Sal*I – 6 θέσεις αναγνώρισης

Η κατανομή των θέσεων αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού στα μόρια DNA ΔΕΝ είναι κανονική



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (19/21)

Ανάλυση μεγέθους τμημάτων DNA

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

- Το DNA φορτώνεται σε υποδοχές «πηγαδάκια» που υπάρχουν στην πηκτή
- Εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα
- Το DNA διαθέτει αρνητικό φορτίο, οπότε μετακινείται προς τον θετικό πόλο
- Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος των μορίων

$D=a-b(\log M)$ D =απόσταση, M =μάζα

Τύποι πηκτών: Αγαρόζη-πολυακρυλαμίδιο



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (20/21)

Ανάλυση τμημάτων DNA

☞ **Βρωμιούχο αιθίδιο:** ευαισθησία 10 ng/ζώνη

Χρώση της πηκτής με εμφάνιση της σε βρωμιούχο αιθίδιο για 15΄

☞ **Αυτοραδιογραφία:** ευαισθησία 2 ng/ζώνη

Έκθεση του αυτοραδιογραφικού φιλμ σε ακτινοβολία για 12-100 ώρες και εμφάνιση



Βασικά “Εργαλεία” Γενετικής Μηχανικής (21/21)

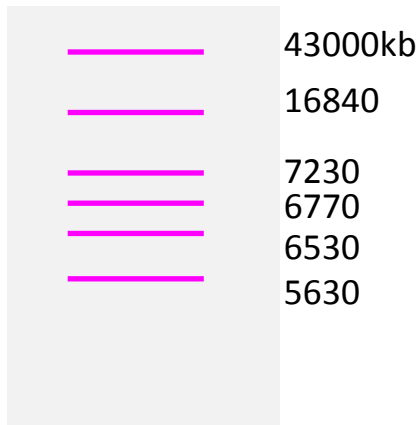
Ανάλυση τμημάτων DNA

Εκτίμηση μεγέθους τμημάτων DNA

✓ Χρησιμοποιούνται μάρτυρες μοριακών βαρών

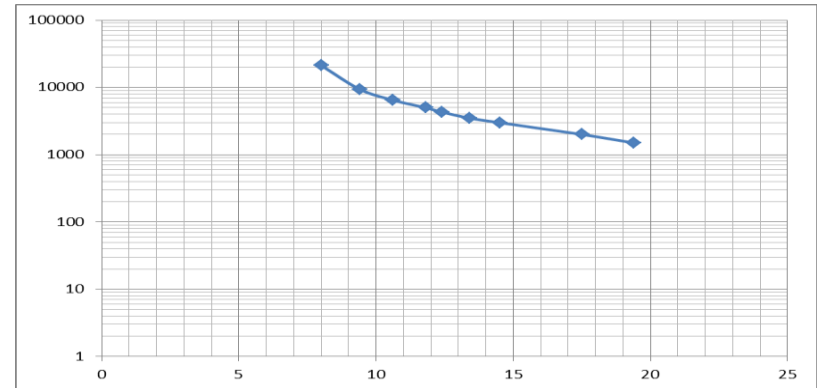
☞ **Αδρή εκτίμηση με το μάτι**

*Bam*HI



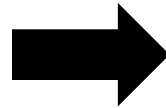
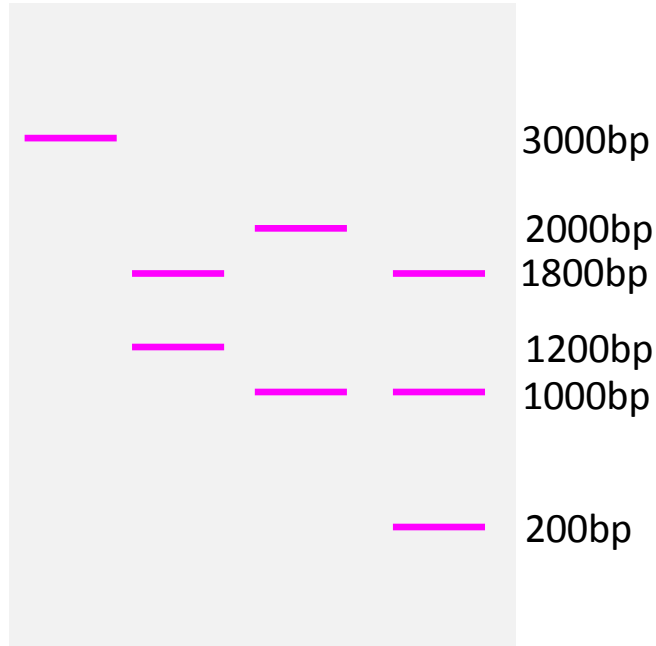
☞ **Ακριβής εκτίμηση με γραφική παράσταση**

Κατασκευάζεται διάγραμμα του μήκους της μετακίνησης του DNA (x) στην πηκτή και του μεγέθους του DNA σε bp (y)



Χαρτογράφηση με ένζυμα περιορισμού (1/4)

Χωρίς
ένζυμο *EcoRI* *SmaI* *EcoRI*
/ *SmaI*



Χρήση
ενζύμου
EcoRI



Χρήση
ενζύμου
SmaI



Χρήση
ενζύμων
EcoRI / *SmaI*



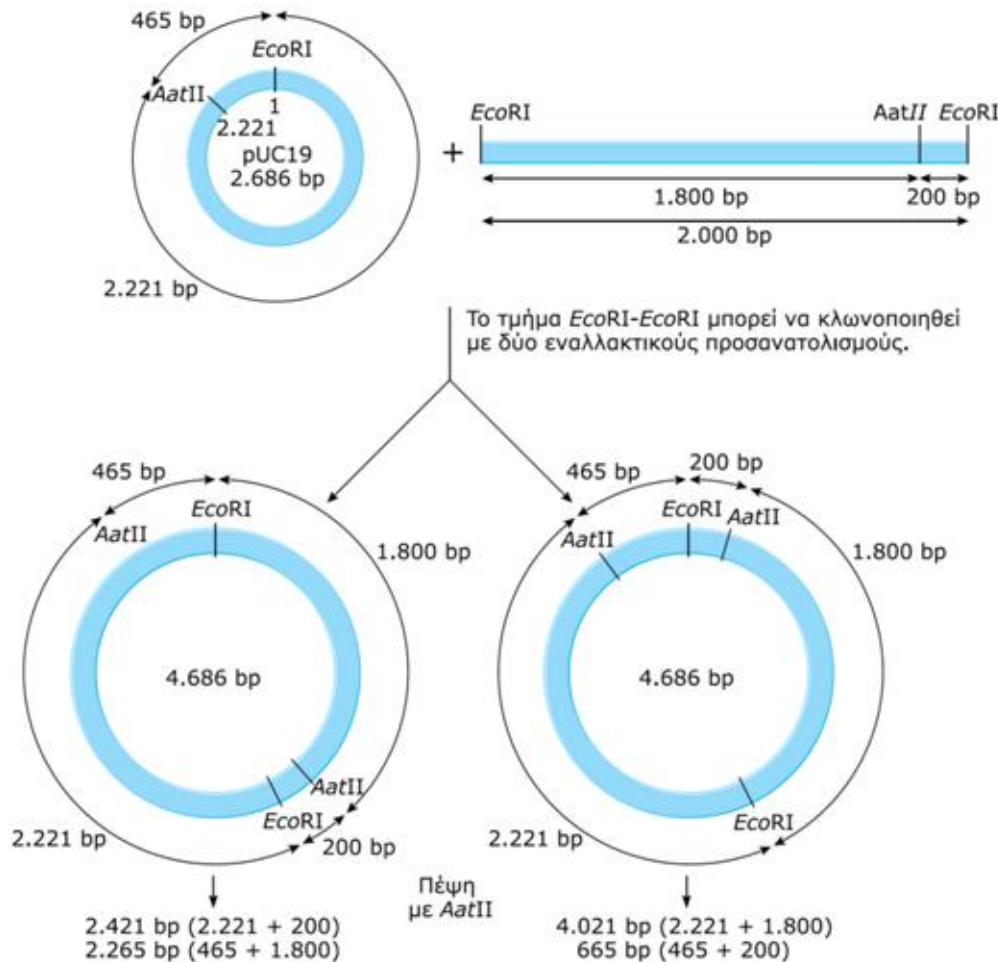
↑
200bp

Ο χάρτης ενζύμων περιορισμού είναι ένας χάρτης που δείχνει τη σειρά & την απόσταση θέσεων Ε.Π. σε ένα τμήμα DNA

Κάθε κομμάτι DNA έχει μοναδικό χάρτη θέσεων Ε.Π.



Χαρτογράφηση με ένζυμα περιορισμού (2/4)



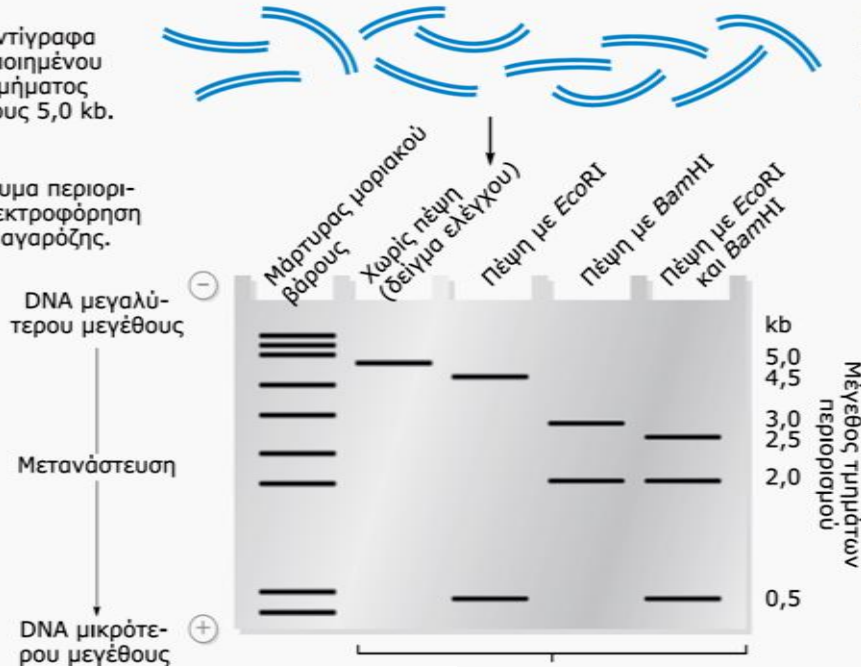
Εικόνα 1: Παράδειγμα χαρτογράφησης περιορισμού με σκοπό τον προσδιορισμό του προσανατολισμού ενός τμήματος DNA που έχει κλωνοποιηθεί σε κάποιο πλασμίδιο.



Χαρτογράφηση με ένζυμα περιορισμού (3/4)

1 Πολλαπλά αντίγραφα ενός κλωνοποιημένου γραμμικού τμήματος DNA, μεγέθους 5,0 kb.

2 Πέψη με ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 2α): Χαρτογράφηση περιορισμού

3 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Στον κάθετο άξονα της γραφικής παράστασης αναφέρεται ο δεκαδικός λογάριθμος του μοριακού βάρους σε kb των τμημάτων του μάρτυρα, ενώ στον οριζόντιο άξονα αναφέρεται η απόσταση σε mm που διήνυσαν.

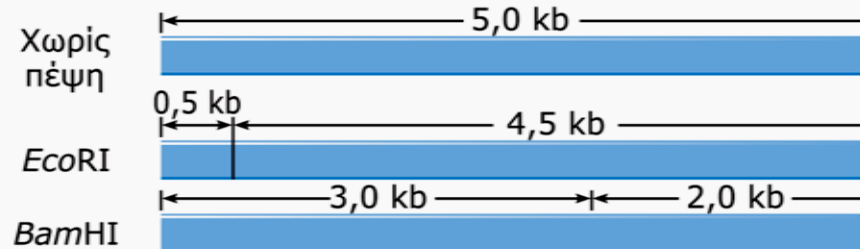


Χαρτογράφηση με ένζυμα περιορισμού (4/4)

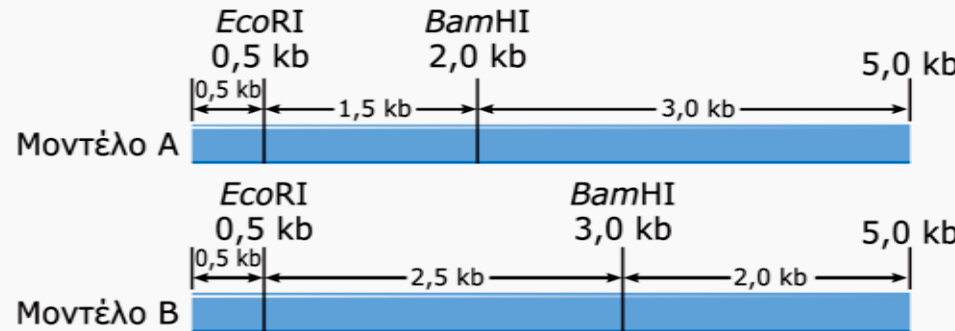
5 Αποτελέσματα

Χωρίς πέψη	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI + BamHI</i>
5,0 kb	4,5 kb 0,5 kb	3,0 kb 2,0 kb	2,5 kb 2,0 kb 0,5 kb

6 Ερμηνεία



7 Κατασκευή μοντέλων



Προβλεπόμενα μεγέθη τμημάτων μετά από διπλή πέψη με *EcoRI* και *BamHI*.

3,0, 1,5 και 0,5 kb

2,5, 2,0 και 0,5 kb

8 Συμπέρασμα

Τα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι σωστό είναι το μοντέλο Β.

Εικόνα 2β): Χαρτογράφηση περιορισμού



Άσκηση 1

A) Ένα γραμμικό κομμάτι DNA κόβεται ξεχωριστά με τα ένζυμα περιορισμού *HindIII* & *SmaI* και μετά και με τα δύο ένζυμα μαζί. Τα προκύπτοντα κομμάτια είναι:

<i>HindIII</i>	2,5 kb	5,0 kb	
<i>SmaI</i>	2,0 kb	5,5 kb	
<i>HindIII</i> + <i>SmaI</i>	3,0 kb	2,5 kb	2,0 kb

Σχεδιάστε τον περιοριστικό χάρτη

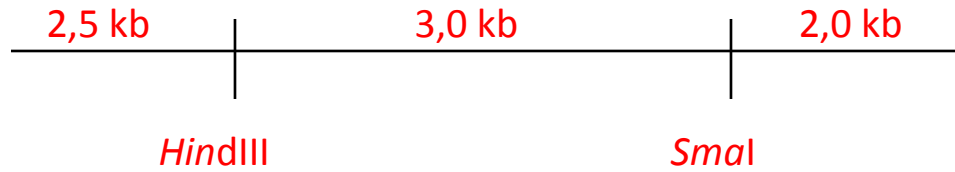
B) Τα προκύπτοντα τμήματα κόβονται με το ένζυμο *EcoRI*, με αποτέλεσμα την απώλεια της μπάντας 3,0 kb και την εμφάνιση μιας ζώνης 1,5 kb. Σχεδιάστε τη θέση κοπής για το ένζυμο *EcoRI* πάνω στο χάρτη.



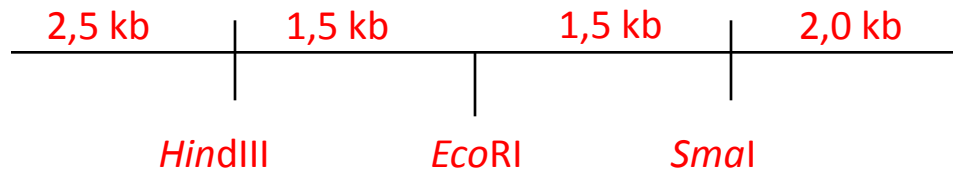
Άσκηση 1

(Λύση)

A)



B)



Άσκηση 2

Ένα κομμάτι DNA κόβεται με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* *HindIII* *BamHI*. Τα αποτελέσματα των πέψεων αναλύονται σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης κ φαίνονται στον παρακάτω πίνακα

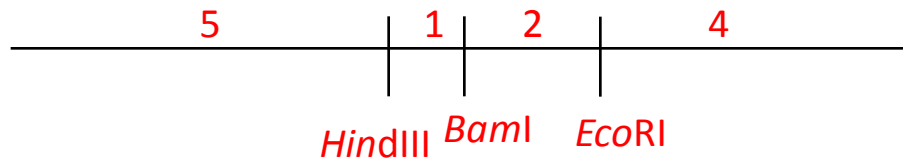
<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>	<i>HindIII</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>	<i>HindIII</i> <i>BamHI</i>
8	5	7	6	6	6
4	4	5	6	4	5
	3			2	1

Σχεδιάστε τον περιοριστικό χάρτη αυτού του μορίου DNA



Άσκηση 2

(Λύση)



Άσκηση 3

Ένα γραμμικό κομμάτι DNA κόβεται ξεχωριστά με τα ένζυμα περιορισμού *HindIII* & *EcoRI* και μετά και με τα δύο ένζυμα μαζί. Τα προκύπτοντα κομμάτια είναι:

HindIII 3,9 6,0 12,9

EcoRI 2,9 4,5 7,4 8,0

HindIII + *EcoRI* 1,0 2,0 2,9 3,5 6,0 7,4

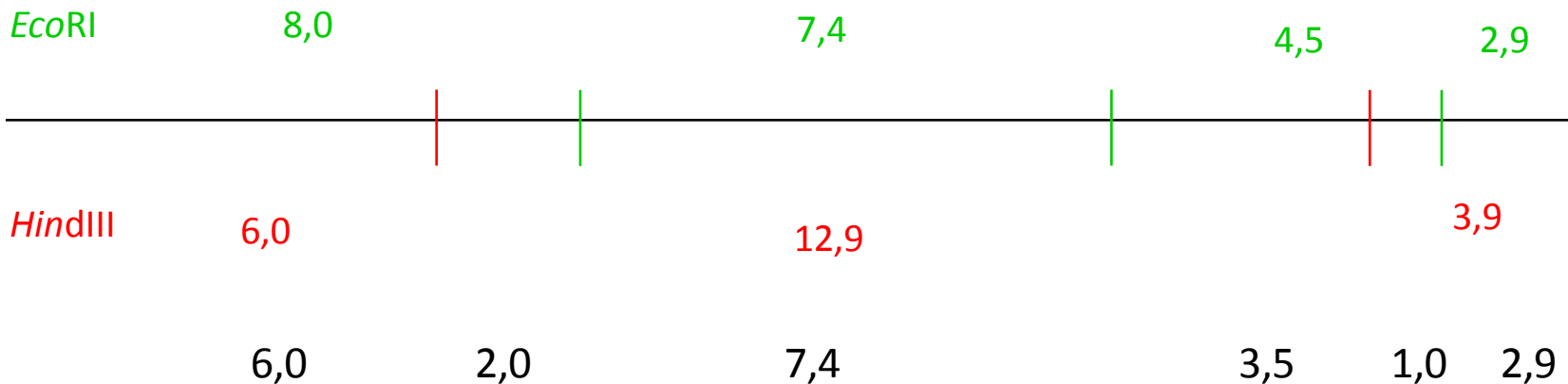
Σχεδιάστε τον περιοριστικό χάρτη.



Άσκηση 3

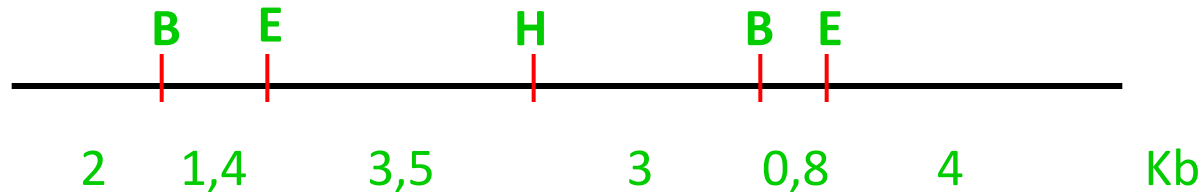
(Λύση)

<i>Hind</i> III	6,0	12,9	3,9			
<i>Hind</i> III + <i>Eco</i> RI	6,0	2,0	3,5	7,4	1,0	2,9
<i>Eco</i> RI	2,9	7,4	4,5	8,0		
<i>Hind</i> III + <i>Eco</i> RI	2,9	7,4	3,5	1,0	6,0	2,0



Άσκηση 4

Έστω ότι κλωνοποιείτε ένα τμήμα μεγέθους 14,7 kb με θέσεις κοπής για τα ένζυμα *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III. Επισημαίνετε το 5' άκρο με ραδιενέργεια.



A) Τι ζώνες θα παίρνατε και ποιες θα βλέπατε ύστερα από ολική πέψη, ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία με καθένα από τα ένζυμα ξεχωριστά?

B) Τι ζώνες θα παίρνατε και ποιες θα βλέπατε ύστερα από μερική πέψη, ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία με καθένα από τα ένζυμα ξεχωριστά?



Άσκηση 4

(Λύση)

- ολική πέψη B: 2* 7,9 4,8 E: 3,4* 7,3 4 H: 6,9* 7,8
- μερική πέψη B: 2* 7,9 9,9* 4,8 12,7 14,7*
E: 3,4* 7,3 10,7* 4 11,3 14,7*
H: 6,9* 7,8 14,7*



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Δροσοπούλου Ελένη.
«Γενετική Μηχανική. Ένζυμα – ΕΝΔ Περιορισμού - Χαρτογράφηση». Έκδοση:
1.0. Θεσσαλονίκη 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
http://opencourses.auth.gr/eclass_courses.



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά - Παρόμοια Διανομή [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Μηνούδη Στυλιανή
Θεσσαλονίκη, Χειμερινό εξάμηνο 2013-2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

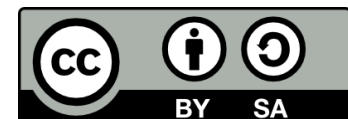


ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

