



# ΕΙΔΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

## Ενότητα 7<sup>η</sup>: Εφαρμογές λειτουργικής γονιδιωματικής

Τριανταφυλλίδης Α  
Τμήμα Βιολογίας

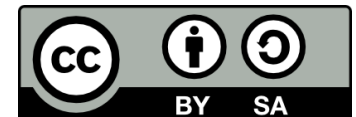


Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



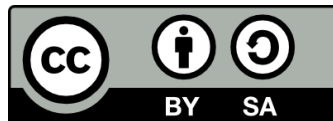
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

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 για την παραχώρηση του δικαιώματος χρήσης των εξής εικόνων της παρούσης παρουσίασης:

Εικόνες: 1, 7

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

- Ανάλυση mRNA στη γονιδιωματική
- Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs
- Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS
- Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική



# Αλληλούχιση DNA (και RNA ακολουθιών)

- Για την αλληλούχιση γονιδίων (ή ESTs ή ακολουθιών RNA) χρησιμοποιείται ο αυτόματος αναλυτής αλληλούχησης.
- Οι περισσότερες έρευνες που γίνονται στους οργανισμούς (με εξαίρεση τα είδη-μοντέλα) είναι για κυρίως περιγραφικές... αποτελούν βασικό βήμα για την καλύτερη κατανόηση του γονιδιώματος και του μεταγραφώματος των οργανισμών.
- Στη συνέχεια ... εστίαση σε συγκεκριμένα γονίδια με πολυμορφισμούς ή δημιουργία μικροσυστοιχιών για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική

## Προβληματισμοί

- Ζύμη: Περίπου το 70% του γονιδιώματος κωδικοποιεί για πρωτεΐνες και συναντάται ένα γονίδιο ανά 2 Kb
- Άνθρωπος: μόνο το 5% του DNA κωδικοποιεί και υπάρχει 1 γονίδιο ανά 60 με 80 Kb
- Πολλά γονίδια εκφράζονται σε επίπεδα κάτω από 50 μόρια/κύτταρο
- Ένα τυπικό κύτταρο θηλαστικού έχει 300.000 παράγωγα 20.000 διαφορετικών mRNAs. Το 90% αυτών βρίσκεται σε ποσότητα κάτω από 100 αντίγραφα/κύτταρο
- Οι συστοιχίες DNA δεν ανιχνεύουν mRNAs κάτω από 50 μόρια ανά κύτταρο. Επιτρέπουν μια ημι-ποσοτική-συγκριτική ανάλυση επιπέδων γονιδιακής έκφρασης.



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 1

**Κλασική ABI Αλληλούχιση:** Αν χρησιμοποιηθούν μηχανήματα πρώτης γενιάς για πλήρη αλληλούχιση cDNA βιβλιοθήκης, πολλά από τα cDNAs αντιστοιχούν στα ίδια γονιδιακά αντίγραφα.

Έχουν αλληλουχηθεί πάνω από 4 εκ. ESTs από διάφορους κυτταρικούς τύπους του ανθρώπου.

Π.χ. Χιλιάδες ESTs προέρχονται από το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη αλβουμίνη.

**Αποτελεί Μη οικονομική λύση**





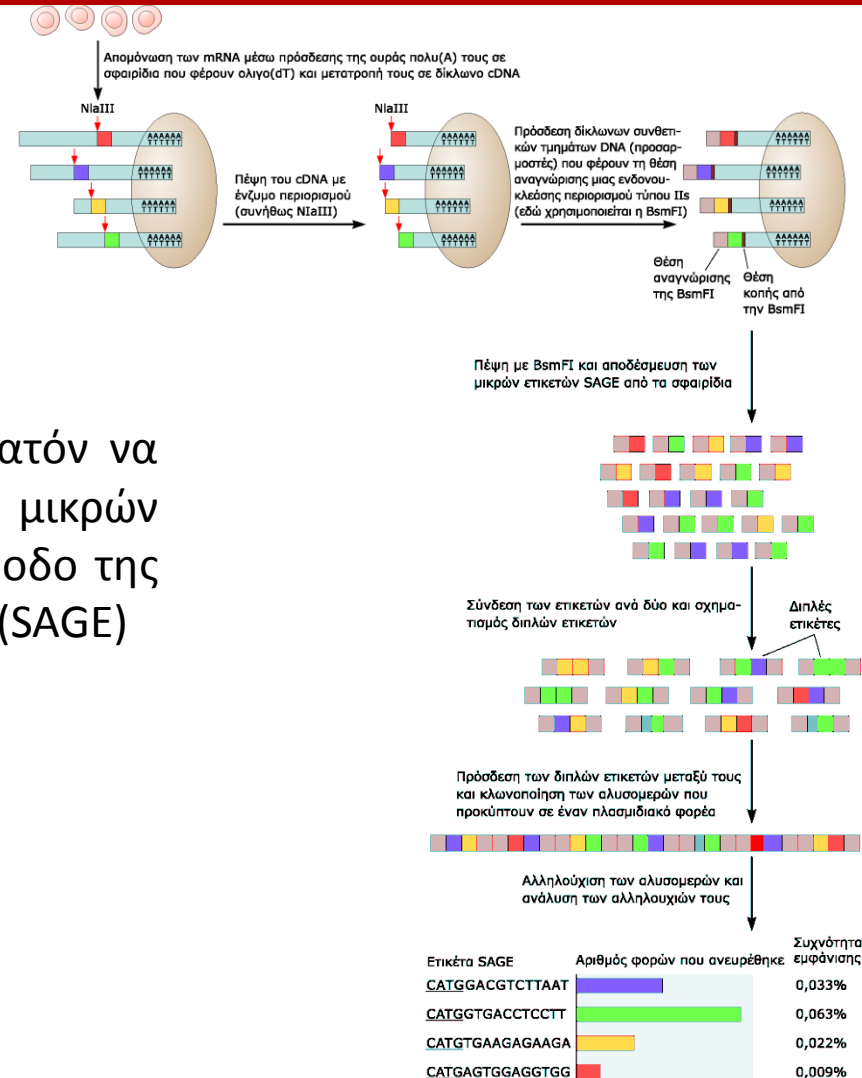
# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 2 (1/2)

## Σειριακή ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης (SAGE-serial analysis of gene expression)

- Τα μετάγραφα διαφορετικών γονιδίων διαφέρουν στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο τους
- Συνθέτονται μόνο τμήματα cDNA 15 bp από τα 3' άκρα των mRNA και ενώνονται σε κομμάτι 600 bp που μετά αλληλουχείται
- Κάθε κομμάτι 600 bp αντιστοιχεί σε 40 μόρια γονιδίων (15 X 40)
- Η ανάλυση της αλληλουχίας χιλιάδων τέτοιων τμημάτων επιτρέπει μια ποσοτική ανάλυση των mRNAs που βρίσκονται στο κύτταρο που εξετάζεται



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 2 (2/2)



**Εικόνα 1:** Τα επίπεδα των mRNA είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με την καταμέτρηση μικρών τμημάτων της αλληλουχίας τους, κατά τη μέθοδο της σειριακής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης (SAGE)



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 3

## Μαζική παράλληλη αλληλούχιση περιοχών σημαίων MPSS (massive parallel signature sequence)

Η τεχνική αυτή ενισχύει με PCR ειδικές περιοχές-σημαίες 20 bp έως και 1 εκ. κλώνων από μια cDNA βιβλιοθήκη

- Τα τμήματα δρουν ως σημαία ταυτοποίησης διαφορετικών μορίων mRNA,
  - συνδέονται σε νάιλον σφαιρίδια και
  - τοποθετούνται σε αυτόματο αναλυτή που τα αλληλουχεί ταυτόχρονα χρησιμοποιώντας ειδικούς φθορίζοντες ανιχνευτές
- ☞ Η ευαισθησία της τεχνικής είναι πολλή μεγάλη, χωρίς να είναι ιδιαίτερα δαπανηρή

Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου:

[http://zlgc.seu.edu.cn/jpkc/2010jpkc/jykc2/Content/jxzy/genetics/chapt10/art\\_library/color\\_art\\_library/10\\_28.jpg](http://zlgc.seu.edu.cn/jpkc/2010jpkc/jykc2/Content/jxzy/genetics/chapt10/art_library/color_art_library/10_28.jpg)



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 4 (1/7)

- Η χρήση των NGS αναλύσεων επιτρέπουν την ανάλυση του μεταγραφώματος - τι και ποια γονίδια εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς, στάδιο ζωής ή και είδος
- Οι περισσότερες έρευνες που γίνονται στους οργανισμούς είναι για την ώρα κυρίως περιγραφικές, αλλά αποτελούν βασικό βήμα για την καλύτερη κατανόηση του μεταγραφώματος των οργανισμών
- Στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εστίαση σε συγκεκριμένα γονίδια με πολυμορφισμούς ή για τη δημιουργία μικροσυστοιχιών για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 4 (2/7)

➤ RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics

Wang Z., Gerstein M., Snyder M., Nat Rev Genet. 2009 January ; 10(1): 57–63

<http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n1/full/nrg2484.html>

## Πλεονεκτήματα αυτών των εφαρμογών

- είναι απόλυτα ποσοτικές
- μπορούν να ανακαλύψουν τις ισομορφές ενός γονιδίου ακόμα και διαφορετικά αλληλόμορφα
- είναι σχετικά φθηνότερες
- δεν χρειάζεται προηγούμενη γνώση του γονιδιώματος ενός οργανισμού
- μπορούν να ανακαλύψουν/ταυτοποιήσουν και άγνωστα μέχρι στιγμής γονίδια



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 4 (3/7)

## Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing

Vera J.C. *et al.* , Molecular Ecology (2008) 17, 1636–1647

Glanville fritillary butterfly: *Melitaea cinxia*

Δείγμα = γενετικά ανόμοια ομάδα προνυμφών, νυμφών, ώριμων ατόμων

Πραγματοποιήθηκε 454 Αλληλούχιση του μεταγραφώματος (cDNA) και έδωσε 608.053 ESTs (~110 bp = >9000 γονίδια)

Μικροσυστοιχίες σχεδιάστηκαν και όταν ελέγχθησαν βρέθηκαν σημαντικές βιολογικές διαφορές μεταξύ ατόμων στην έκφραση των γονιδίων



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 4 (4/7)

## Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans

Η πρώτη ολοκληρωμένη ανάλυση της συσχέτισης της έκφρασης του συνολικού mRNA και microRNA από λεμφικά κύτταρα σε 462 άτομα του 1000 Genomes project. Ανακαλύφθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ πληθυσμών αλλά και μεγάλη ετερογένεια στην έκφραση των γονιδίων στο σύνολο τους.

Nature 501, 506–511 (26 September 2013)

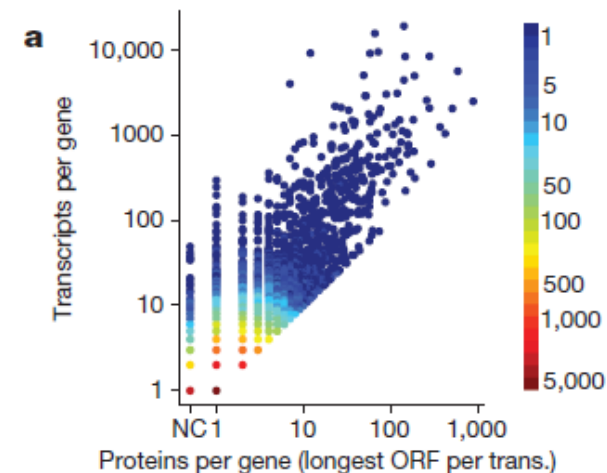


# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 4 (5/7)

## Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome

Nature 512, 393–399 (28 August 2014)

Αναλύθηκαν 29 ιστοί, 24 κυτταρικές σειρές και 21 διαφορετικά άτομα που είχαν τοποθετηθεί σε δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες. Παράχθηκαν > 300.000 διαφορετικά μεταγράφα για 17564 γονίδια (14.692 από αυτά πρωτεϊνικά).



**Εικόνα 2:** Συσχέτιση του αριθμού γονιδίων (χρώμα) με αριθμό πρωτεϊνών (άξονας Χ) και αριθμό μεταγράφων (άξονας Υ). Το 90% των γονιδίων παράγουν το πολύ 10 μεταγράφα και 5 πρωτεϊνικές ισομορφές. Μόλις το 1% των γονιδίων έχουν τόσο πολύπλοκο πρότυπο ματίσματος, πολυαδενυλίωσης και χρήσης διαφορετικών προμότορων. Τα γονίδια *Dscam* και *para* παράγουν ως και 10,000 μοναδικές πρωτεΐνες και δεν περιλαμβάνονται στο γράφημα.





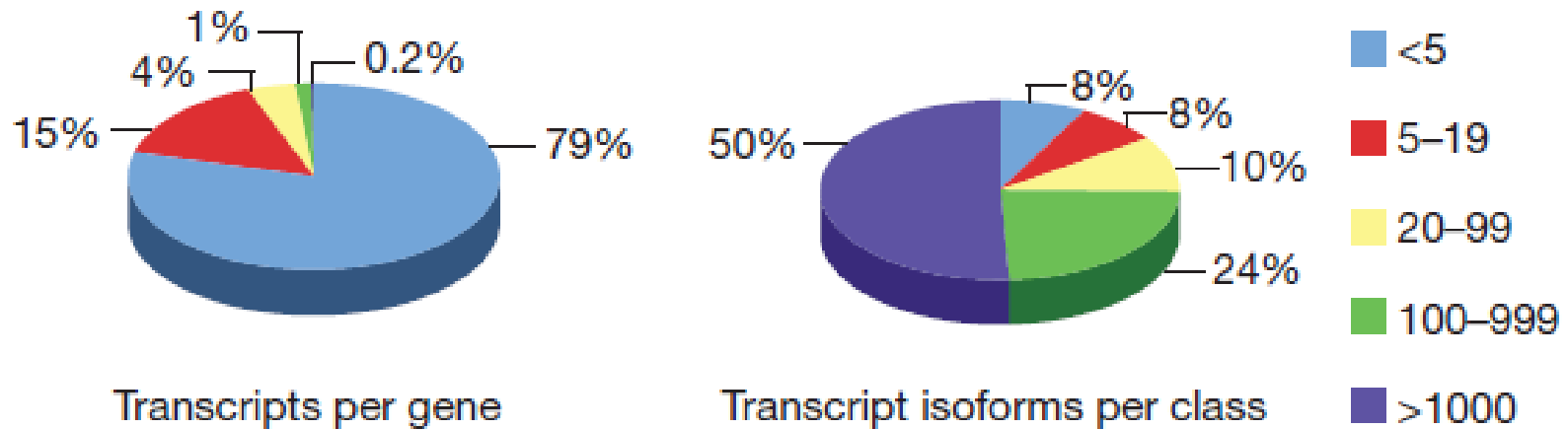
# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 4 (6/7)

## Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome

Nature 512, 393–399 (28 August 2014)

**Εικόνα 3:** Ένας μικρός αριθμός γονιδίων (47, 0,2%) του εγκεφάλου φάνηκε να μπορεί να παράγει χιλιάδες διαφορετικά μετάγραφα με βάση διαφορετικούς προμότορες και διαφορετικό μάτισμα

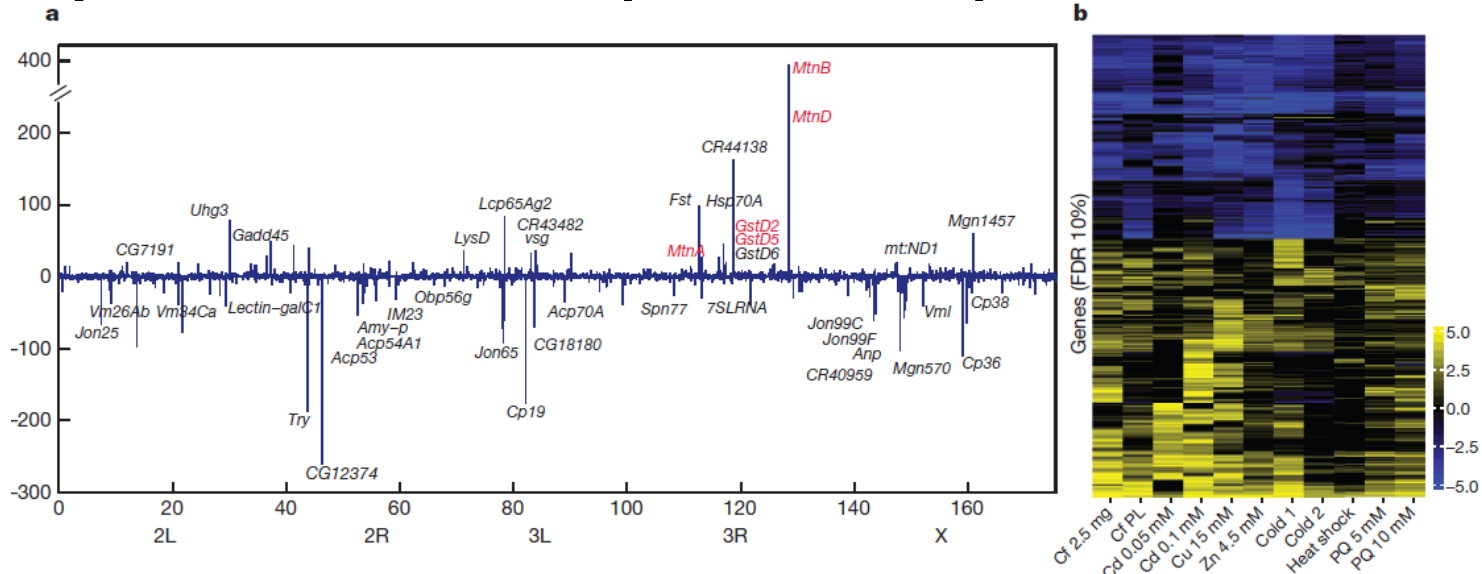
**a**



# Ανάλυση RNA στη γονιδιωματική 4 (7/7)

## Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome

57 γονίδια  
(5.259  
μετάγραφα)  
εκφράστηκαν  
μόνο σε ακραίες  
συνθήκες.



**Εικόνα 4: Περιβαλλοντικές επιδράσεις στο μεταγράφημα της Δροσόφιλας..**  
Επιδράσανε σε ενήλικα άτομα με καφεΐνη (Cf), Cd, Cu, Zn, κρύο, ζέστη και το ζιζνιοκτόνο paraquat (PQ). A), Γονίδια που υπέρ ή υπό εκφράζονται μετά την επίδραση με Cd. Αναφέρονται μόνο αυτά στα οποία υπήρχε > 20% αλλαγή στην έκφραση. Με κόκκινο χρώμα είναι γονίδια που άλλαξε η έκφραση τους σε προνύμφες. B), Το σύνολο των γονιδιών με εικοσαπλάσια αλλαγή στην έκφραση.



# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (1/9)

Η ανάλυση μπορεί να γίνει με ολιγονουκλεοτιδικές συστοιχίες ή με φασματογράφο μαζών (GoldenGate-Illumina).

Η συστοιχία οπτικών ινών αναλύει → 1.000.000 SNPs την ημέρα

[http://res.illumina.com/documents/products/workflows/workflow\\_goldengate\\_assay.pdf](http://res.illumina.com/documents/products/workflows/workflow_goldengate_assay.pdf)



# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (2/9)

- Ταυτοποίηση χιλιάδων νέων γενετικών δεικτών (όπως SNPs και INDELS) σε ευρύ επίπεδο και η ανίχνευση πολυμορφισμού σε όλη την έκταση του γονιδιώματος
- Εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την εξελικτική ιστορία των ειδών, τις πληθυσμιακές αυξήσεις ή συρρικνώσεις, τη μετανάστευση και την ανάμιξη πληθυσμών
- Είναι πια δυνατό να μελετηθούν διαφορές σε επίπεδο γονιδίων μεταξύ πληθυσμών με διαφορετικούς φαινοτύπους και να ανιχνευθούν μεταλλάξεις με προσαρμοστικό πλεονέκτημα και φαινόμενα επιλογής



# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (3/9)

**Chips για μελέτη ασθενειών**

**Complement Factor H Polymorphism in Age-Related  
Macular Degeneration**

Klein et al. Science 2005

Έλεγχος για ύπαρξη σύνδεσης σε > 100.000 SNPs με την ασθένεια (Έλεγχος 50.000 SNPs ανά chip).

Ταυτοποιήθηκαν 2 SNP

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1512523>



# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (4/9)

## Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery

**Genome-wide association study** : μετα-ανάλυση >100.000 ατόμων Ευρωπαϊκής και Ασιατικής καταγωγής (29.880 περιπτώσεις ρευματοειδούς αρθρίτιδας και 73.758 μάρτυρες, αξιολογώντας ~10 εκατομμύρια SNPs. Ανακαλύφθηκαν 42 καινούριοι γενετικοί τόποι επικινδυνότητας, φτάνοντας συνολικά τους 101 τόπους.

Χρησιμοποιήθηκε μια *in silico* μέθοδος για την ταυτοποίηση 98 υποψήφιων γονιδίων σε αυτούς τους 101 τόπους επικινδυνότητας. Αυτά τα γονίδια είναι στόχοι θεραπείας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

<http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature12873.html>



# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (5/9)

**Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci**  
**GWAS** σε 36.989 ασθενείς και 113.075 μάρτυρες. Ταυτοποιήθηκαν 108 (66% καινούριοι) τόποι. Οι συσχετισμοί εμπλουτίστηκαν με γονίδια που εκφράζονται στον εγκέφαλο, σε ιστούς που έχουν σημαντικούς ρόλους στην ανοσία, τη χρήση πάνω από 1000 γονιδιωματικών δεδομένων, >500 K SNPs

<http://www.nature.com/nature/journal/v511/n7510/full/nature13595.html>

Nature 511, 421–427 (24 July 2014)



# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (6/9)

## Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types

Αν και μερικά καρκινικά γονίδια είναι μεταλλαγμένα σε μεγάλο ποσοστό καρκίνων ενός συγκεκριμένου τύπου (>20%), τα περισσότερα είναι μεταλλαγμένοι με ενδιάμεσες συχνότητες (2–20%). Αναλύθηκαν σωματικές μεταλλάξεις σημείου σε εξομικές ακολουθίες από 4.742 ανθρώπινους καρκίνους και οι αντίστοιχες από κανονικούς ιστούς σε 21 καρκινικούς τύπους. Βρέθηκε ότι η **GWAS** μπορεί να ταυτοποιήσει σχεδόν όλα τα γνωστά καρκινικά γονίδια σε όλους τους τύπους καρκίνου. Ταυτοποιήθηκαν επίσης 33 γονίδια τα οποία δεν ήταν προηγουμένως γνωστά ότι μεταλλάσσονται σημαντικά στον καρκίνο.

<http://www.nature.com/nature/journal/v505/n7484/full/nature12912.html>





# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (7/9)

## Chips για μελέτη ασθενειών- Το μέλλον

- Νέα arrays ελέγχουν 900.000 SNPs και 950.000 Copy Number Variations (CNVs) !!!
- Δημιουργία ειδικών arrays ανά ασθένεια (καρκίνο, αρτηριοσκλήρωση, αρθρίτιδα κλπ με ~500 γονίδια με ελάχιστες απαιτήσεις σε αρχικό RNA (20 κύτταρα)
- Arrays για microRNAs σχετικών με καρκίνο
- Προβληματίζει ακόμα η επαναληπτικότητα



# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (8/9)

## Genome-Wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds

The Bovine HapMap Consortium, <http://www.sciencemag.org/content/324/5926/528.full>

- Μελέτη 37.470 SNPs σε 497 βοοειδή από 19 γεωγραφικά και γενετικά διακριτές φυλές
- Τα δεδομένα δείχνουν ότι παρατηρήθηκε μια πρόσφατη μείωση των πληθυσμών πιθανών λόγω φαινομένων στενωπού

## Genome-wide SNP and haplotype analysis reveal a rich history underlying dog domestication *Nature* 464, 898-902(8 April 2010)

[http://www.nature.com/nature/journal/v464/n7290/fig\\_tab/nature08837\\_F1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v464/n7290/fig_tab/nature08837_F1.html)

- Μελέτη 48.000 SNPs σε 912 σκυλιά από 85 ράτσες
- Υπήρξε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ γενετικών και φαινοτυπικών δεδομένων



# Ανάλυση πολυμορφισμού SNPs (9/9)

## Εφαρμογές σε ράτσες σκυλιών - χαρακτηριστικά

Χαρακτηριστικά όπως η γυριστή ουρά, τα πεσμένα αυτιά και η κοινωνικότητα συσχετιζόμενα με συγκεκριμένα SNPs που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες θέσεις στα χρωμοσώματα του σκύλου (*Vaysse et al., 2011*)

<http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002316>



# Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS (1/8)

- **Μελέτη επιγενετικών φαινομένων**, δηλ. τροποποιήσεων σε χαρακτηριστικά που δε σχετίζονται με άμεσες κληρονομήσιμες μεταλλάξεις στο DNA, αλλά με άλλου είδους γενετικές τροποποιήσεις (όπως μεθυλίωση του DNA, ή τροποποίηση των ιστονικών πρωτεϊνών).
- Με νέες NGS μεθοδολογίες (BS-seq και Me-DIP) ταυτοποιούνται περιοχές DNA που έχουν μεθυλιωθεί και δημιουργούνται χάρτες μεθυλίωσης.
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα για συγκεκριμένες πρωτεΐνες που πακετάρουν το DNA ή που συνδέονται σε αυτό ως μεταγραφικοί παράγοντες και στη συνέχεια, αλληλουχούνται αποκλειστικά αυτές οι περιοχές (CHIP-seq).

[http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large\\_fig/fig25\\_08.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large_fig/fig25_08.html)



# Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS (2/8)

## Μελέτη επιγενετικών φαινομένων

Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome Ziller *et al.* 2013 Nature 500

- Μελέτη μεθυλίωσης των CpGs
- Ανάλυση 42 συνόλων δεδομένων αλληλούχισης ολόκληρων γονιδιωμάτων σε 30 διαφορετικά ανθρώπινα κύτταρα ή ιστούς
- Δυναμική ρύθμιση μόνο για το 21,8% των αυτοσωματικών CpGs

<http://www.nature.com/nature/journal/v500/n7463/full/nature12433.html>



# Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS (3/8)

Αντισώματα για συγκεκριμένες πρωτεΐνες που πακετάρουν το DNA ή που συνδέονται σε αυτό ως μεταγραφικοί παράγοντες και στη συνέχεια, αλληλουχούνται αποκλειστικά αυτές οι περιοχές (CHIP-seq).



# Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS (4/8)

## ENCODE/modENCODE

Όλες οι παραπάνω μεθοδολογίες NGS έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρο στο πλαίσιο των προγραμμάτων ENCODE και modENCODE, όπου γίνεται προσπάθεια να ταυτοποιηθούν όλα τα ρυθμιστικά στοιχεία της έκφρασης με βάση αναλύσεις του μεταγραφώματος, της οργάνωσης της χρωματίνης και των θέσεων σύνδεσης χιλιάδων ρυθμιστικών παραγόντων.

1600 νέα datasets, 3300 συνολικά

<http://www.nature.com/nature/journal/v512/n7515/full/512374a.html>

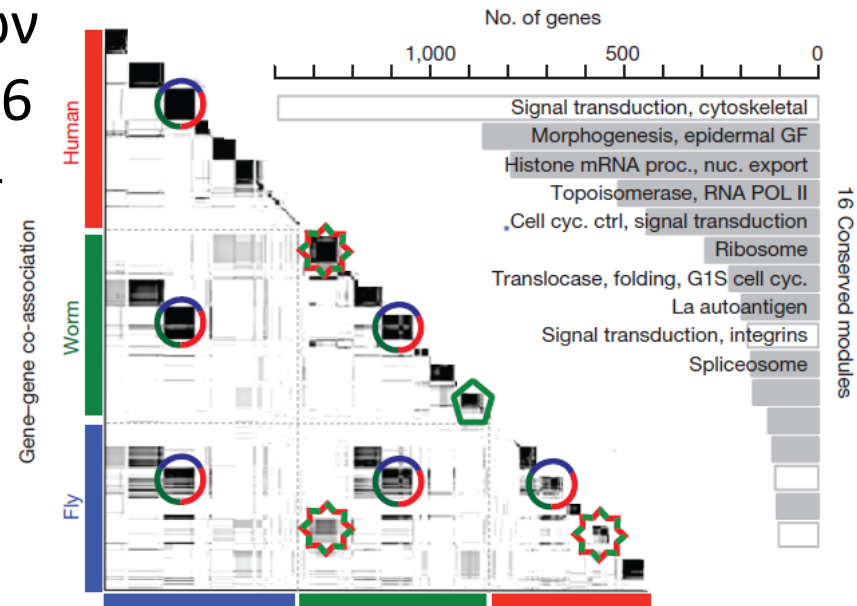


# Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS (5/8)

## Εικόνα 5: ENCODE/modENCODE

Η ανάλυση του μεταγραφώματος (Gerstein et al. 2014, RNA seq data) των τριών ειδών αποκάλυψε την ύπαρξη 16 ομάδων (ενδοειδικές ή ακόμα και δια-ειδικές) γονιδίων που παρουσιάζουν συσχέτιση στην έκφραση τους και σχετίζονται με την ανάπτυξη.

Οι ερευνητές δημιούργησαν ένα μοντέλο που μπορεί να προβλέψει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων με βάση στοιχεία της χρωματίνης στην περιοχή του προμότορα.





# Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS (6/8)

**Barcoding-metagenomics – Ανάλυση Βιοποικιλότητας**  
**Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity** Fonseca *et al.* 2010

- Μεταγενετική ανάλυση
- Αλληλούχιση με 454 Roche FLX
- Εκτίμηση μειοβενθικού πλούτου
- Χρήση 18S μικρής πυρηνικής υπομονάδας (nSSU)
- Προέκυψαν 305.702 αλληλουχίες
- Η πλειοψηφία των δειγμάτων ανήκει στα Νηματώδη

[http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n7/fig\\_tab/ncomms1095\\_F2.html](http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n7/fig_tab/ncomms1095_F2.html)



# Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS (7/8)

## Ανάλυση Βιοποικιλότητας

**Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms** Ekblom and Galindo 2011

- Αλληλούχιση γονιδιώματων οργανισμών που δεν αποτελούν μοντέλα
- Εφαρμογή των NGS τεχνολογιών σε μελέτες οικολογικές και πληθυσμιακής γενετικής
- Η ροή εργασίας που ακολουθείται από τη συλλογή του δείγματος έως την εφαρμογή των NGS τεχνολογιών στη μοριακή οικολογία φαίνεται στον παρακάτω σύνδεσμο:  
[http://www.nature.com/hdy/journal/v107/n1/fig\\_tab/hdy2010152f1.html](http://www.nature.com/hdy/journal/v107/n1/fig_tab/hdy2010152f1.html)



# Άλλες εφαρμογές των μηχανημάτων NGS (8/8)

Η χρήση ενός μηχανήματος NGS, έστω και μια φορά, κοστίζει τουλάχιστον 10.000-20.000 ευρώ ποσό που δεν είναι και μικρό.

Πριν από την επιλογή της ερευνητικής προσέγγισης πρέπει να ληφθούν υπόψη τα κόστη αλλά και οι ικανότητες ανάλυσης των δεδομένων.

Ο όγκος των δεδομένων που παράγονται από τις νέες τεχνολογίες αποτελεί πραγματική πρόκληση όσον αφορά την αποθήκευση τους και την ανάλυση τους. Επίσης το ποια γονιδιωματική πλατφόρμα θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το βιολογικό ερώτημα και τις προδιαγραφές κάθε μηχανήματος.

**Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το πιο βασικό προαπαιτούμενο για την επιτυχία του κάθε πειράματος είναι ο σωστός σχεδιασμός του.**



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (1/12)

Η Πρωτεωμική χρησιμοποιεί τεχνολογίες υψηλής ανάλυσης για:

- Περιγραφή μοριακών & βιοχημικών μονοπατιών σε ένα κύτταρο
- Καταγραφή & κατανόηση των αλληλεπιδράσεων του συνόλου των πρωτεϊνών ενός οργανισμού σε συγκεκριμένες κυτταρικές φάσεις και συνθήκες
- Τα ερωτήματα για τη λειτουργία των πρωτεϊνών και των αντιστοίχων γονιδίων πληθαίνουν. Σε *E. coli*, *S. cerevisiae* αλλά και στον άνθρωπο δεν γνωρίζουμε τη λειτουργία χιλιάδων γονιδίων



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (2/12)

Η ανάλυση του πρωτεώματος αποτελεί μεγαλύτερη πρόκληση από την ανάλυση του γονιδιώματος για δύο λόγους:

- τα επίπεδα έκφρασης μιας πρωτεΐνης σε ένα κύτταρο παρουσιάζουν μια τεράστια γκάμα: από ένα μόριο μέχρι  $10^6$  αντίγραφα ανά κύτταρο. Εφόσον δεν υπάρχει κάτι αντίστοιχο σε PCR για πρωτεΐνες τα εργαλεία πρωτεϊνικής ανάλυσης θα πρέπει να είναι ικανά να λειτουργήσουν σε επίπεδα διαφορών μεγέθους 6 τάξεων
- οι πρωτεΐνες (σε πολύπλοκα μίγματα) έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που πρέπει να αναλυθούν



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (3/12)

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που πρέπει να αναλυθούν είναι τα εξής:

- το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη,
- τα επίπεδα έκφρασής της σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ή ως απόκριση σε αλλαγές της φυσιολογίας),
- πιθανές τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση),
- αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες-μακρομόρια-μικρομόρια,
- εντοπισμός μέσα στο κύτταρο,
- τρόποι ενεργοποίησης,
- χρόνος ημίσειας ζωής,
- τρισδιάστατη δομή,
- σχέση δομής-λειτουργίας.



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (4/12)

## Η αναγνώριση-ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε πολύπλοκα μίγματα (1)

Όταν είναι πλήρως αλληλουχημένο το γονιδίωμα ενός οργανισμού:

- Απομονώνονται κύτταρα ενός τύπου
- Ακολουθεί λύση των κυττάρων
- Απομονώνονται οι πρωτεΐνες και πρωτεολύονται με τρυψίνη σε μικρότερα πεπτίδια
- Τα πεπτίδια κλασματώνονται σε στήλες ανάστροφης φάσης με βάση την υδροφοβικότητά τους και το μοριακό τους βάρος
- Ομάδες πεπτιδίων από τη στήλη προωθούνται και αναλύονται από τον φασματογράφο μαζών
- Τα πεπτίδια μπορούν να κοπούν σε μικρότερα και να ληφθούν περισσότερες πληροφορίες για την μάζα των υπο-πεπτιδίων από έναν φασματογράφο MS/MS



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (5/12)

## Η αναγνώριση-ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε πολύπλοκα μίγματα (2)

### Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2-dimensional gel electrophoresis, 2DGE)

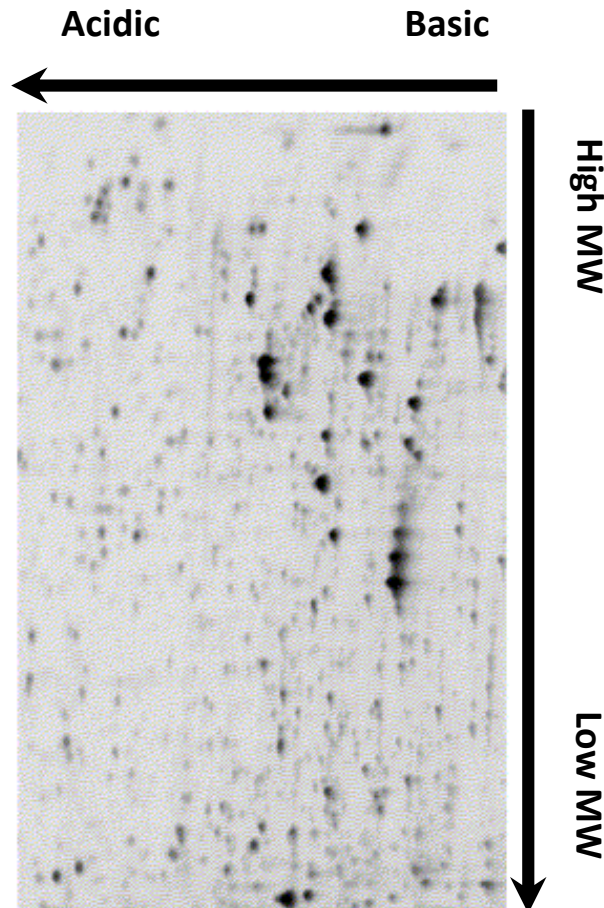
- Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται αρχικά στην πρώτη διάσταση σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο και στη συνέχεια σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος
- Οι πηκτές χρωματίζονται με Coomassie Blue και οι πρωτεΐνες εμφανίζονται σαν κηλίδες σε συγκεκριμένες θέσεις - Οι θέσεις αυτές μπορεί να είναι από 200-10.000
- Οι πρωτεΐνες που ενδιαφέρουν, εκλούονται από την πηκτή, κόβονται με τρυψίνη και ακολουθεί η ανάλυση τους από τον φασματογράφο μαζών





# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (6/12)

## ● Εικόνα 6: Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση



Μειονέκτημα: χαμηλή ευαισθησία για πρωτεΐνες σε χαμηλή C



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (7/12)

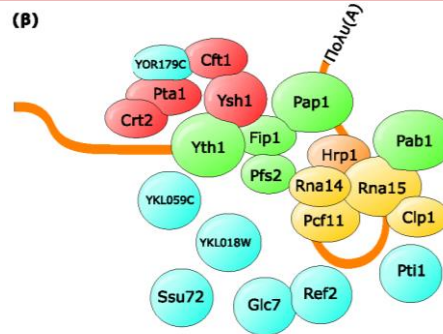
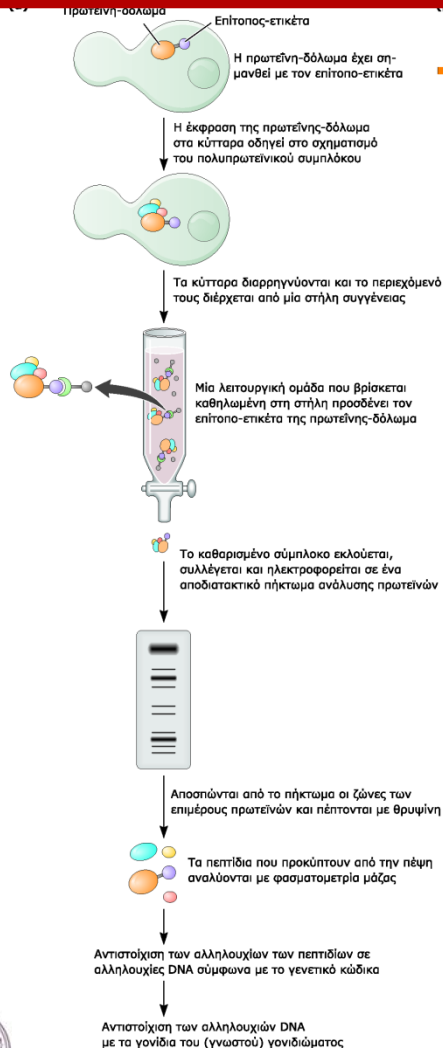
## Η αναγνώριση-ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε πολύπλοκα μίγματα (3)

### Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-high performance liquid chromatography)

- Διαχωρισμός της υγρής φάσης (πρωτεΐνες) από μια στήλη κάτω από συνθήκες υψηλής πίεσης
- Πλεονεκτήματα της HPLC
  - 1) ταχύτητα
  - 2) ευαισθησία &
  - 3) ευκολία αυτοματοποίησης & σύνδεσης με MS



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (8/12)



**Εικόνα 7:** Η χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων στο πλαίσιο της ανάλυσης με φασματομετρία μάζας.



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (9/12)

- Σε κάθε κύτταρο ζύμης υπάρχουν θεωρητικά 6.000 πρωτεΐνες και 35.000 πεπτίδια που προκύπτουν από πέψη με τρυψίνη
- Τα περισσότερα από αυτά τα πεπτίδια έχουν χαρακτηριστικές τιμές μάζας που τοποθετούνται σε βάση δεδομένων
- Με σύγκριση, με ΗΥ, των τιμών μαζών που συλλέχθηκαν από το φασματογράφο μαζών με τη βάση δεδομένων είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν εκατοντάδες πρωτεϊνών



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (10/12)

## Πρωτεωμική ανάλυση του *M. genitalium*

Ποια γονίδια εκφράζονται στην αυξητική και τη στατική φάση;

- Με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης 2DGE βρέθηκαν 427 θέσεις πρωτεϊνών (από 480 γονίδια) σε κύτταρα σε αυξητική φάση
- Ανάλυση 201 πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας πέψη με τρυψίνη, τον φασματογράφο μαζών και σύγκριση με γνωστές πρωτεΐνες
- Ανακαλύφθηκαν 158 γνωστές πρωτεΐνες (το 33% του πρωτεώματος) και 17 άγνωστες
- Οι υπόλοιπες θέσεις αντιστοιχούσαν σε σπασμένα κομμάτια από άλλες πρωτεΐνες, ισομορφές της ίδιας πρωτεΐνης ή μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις
- Στη στατική φάση υπήρχε μείωση 42% στον αριθμό των πρωτεϊνών που παράγονται
- Κάποιες νέες πρωτεΐνες εμφανίστηκαν, ενώ κάποιες άλλες μείωσαν πολύ τα επίπεδα τους

**Το μεγάλο μειονέκτημα είναι η ευαισθησία**



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (11/12)

**A complete mass-spectrometric map of the yeast proteome applied to quantitative trait analysis** Nature (2013).494, 266-270

- Ακολουθείται μια στρατηγική βασισμένη στην πεπτιδική σύνθεση υψηλής απόδοσης και τη φασματομετρία μάζας για να δημιουργηθεί ένας σχεδόν πλήρης χάρτης αναφοράς (97% από τις προβλεπόμενες πρωτεΐνες) του πρωτεώματος του *Saccharomyces cerevisiae*
- Πρωτεϊνικές μετρήσεις σε 78 στελέχη
- Υπάρχει μια πολύπλοκη σχέση μεταξύ ανεξάρτητων γενετικών τόπων, που επηρεάζουν τα επίπεδα των πρωτεϊνών

**Variation and genetic control of protein abundance in humans** Nature 499, 79–82 (04 July 2013)

- Χρησιμοποιήθηκε φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών 5.953 γονιδίων σε λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές από 95 διαφορετικά άτομα



# Η χρήση των πλατφόρμων υψηλής ανάλυσης στην πρωτεωμική (12/12)

## ΠΡΩΤΟ ΠΡΟΣΧΕΔΙΟ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Ανάλυση 30 διαφορετικών ιστών από ενήλικες και έμβρυα

Ταυτοποίηση 293.000 μοναδικών πρωτεϊνών που αντιστοιχούν στο 84% των αναγνωρισμένων γονιδίων (συμπεριλαμβανομένων και πρωτεϊνών που αντιστοιχούν σε ~2500 γονίδια που δεν είχαν αναγνωρισθεί μέχρι τώρα)

~50% πεπτιδίων δεν είχαν καταχωρηθεί

Πεπτίδια από 2.350 γονίδια είναι house keeping με έκφραση σε όλους τους ιστούς και σε υψηλά επίπεδα (>75% της συνολικής πρωτεΐνης)

Ταυτοποίηση και πρωτεϊνικών παραγώγων από 149 υποτιθέμενα ψευδογονίδια καθώς και από 9 ncRNAs

Επιτρέπει την αναθεώρηση χιλιάδων καταχωρήσεων σχετικά με νέες θέσεις έναρξης μεταγραφής, νέα κωδικά εξόνια

Kim et al. 2014 Nature 509, 575-581,

<http://www.nature.com/nature/journal/v509/n7502/abs/nature13302.html>



# Άσκηση

**18.17** Όταν κύτταρα εκτίθενται σε μικρής διάρκειας υψηλή θερμοκρασία (θερμικό σοκ), τροποποιούν το σύνολο των γονιδίων που μεταγράφουν, στα πλαίσια μίας προστατευτικής απόκρισης.

**α.** Ποια βήματα θα ακολουθούσατε για να χαρακτηρίσετε τις μεταβολές στο μεταγράφημα του ζυμομύκητα μετά από ένα θερμικό σοκ;

**β.** Έστω ότι οι αναλύσεις του μεταγραφώματος οδηγούν στην ταυτοποίηση μίας ομάδας γονιδίων, των οποίων τα επίπεδα μεταγράφων αυξάνονται μετά από ένα θερμικό σοκ. Πώς θα μπορούσατε πειραματικά να προσδιορίσετε ποια από αυτά τα γονίδια είναι απαραίτητα στην προστατευτική απόκριση μετά το θερμικό σοκ;





# Άσκηση - Λύση

## 18.17

**α.** Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε είτε μικροσυστοιχία όπου θα συγκριθεί η έκφραση σε κανονικά και κύτταρα ύστερα από θερμικό σοκ, είτε να κάνετε ανάλυση RNA-seq σε NGS μηχανήμα

**β.** Χρειάζεται να κάνετε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση ώστε να προκαλέσετε knock out σε ένα-ένα τα γονίδια και να δείτε ποιο είναι απαραίτητο για την επιβίωση



# Διευθύνσεις στο Διαδίκτυο με πληροφορίες για αλληλουχίες και γονιδιώματα

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

NCBI - Περιλαμβάνει εικόνες χρωμοσωμάτων, χάρτες και γονίδια με συνδέσεις για άλλες πληροφορίες στο NCBI

<http://www.genome.gov>

National Human Genome Research Institute

Περιλαμβάνει πληροφορίες για τους οργανισμούς στους οποίους γίνεται αλληλούχηση των γονιδιωμάτων τους

<http://www.ensembl.org>

EBI/Sanger Center - Πρόσβαση σε αλληλουχίες DNA και πρωτεϊνών

<http://genome.ucsc.edu>

Πανεπιστήμιο της Σαντα Κρουζ- Περιλαμβάνει πληροφορίες για το ανθρώπινο γονιδίωμα

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>

Μεντελική Κληρονόμηση στον άνθρωπο

Περιλαμβάνονται πληροφορίες για ανθρώπινα γονίδια και ασθένειες

<http://www.youtube.com/playlist?list=PLF09DBAA3E24C5068>



As for the future, your  
task is not to foresee, but to enable it.”

*Antoine de Saint-Exupéry*  
*The Wisdom of the Sands*



# Σημείωμα χρήσης έργων τρίτων

**Εικόνα 2:** <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature12962.html>, by Brown JB et al., CC-BY-NC-SA-3.0, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>.

**Εικόνα 3:** <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature12962.html>, by Brown JB et al., CC-BY-NC-SA-3.0, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>.

**Εικόνα 4:** <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature12962.html>, by Brown JB et al., CC-BY-NC-SA-3.0, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>.

**Εικόνα 5:** <http://www.nature.com/nature/journal/v512/n7515/full/nature13424.html>, by Gerstein et al. 2014, CC-BY-NC-SA-3.0, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>.



# Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τριανταφυλλίδης Αλέξανδρος. «Ειδικά Θέματα Γενετικής. Εφαρμογές λειτουργικής γονιδιωματικής». Έκδοση: 1.0. Θεσσαλονίκη 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: [http://opencourses.auth.gr/eclass\\_courses](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 2014-2015



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

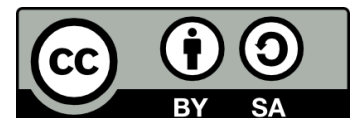


ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

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
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

