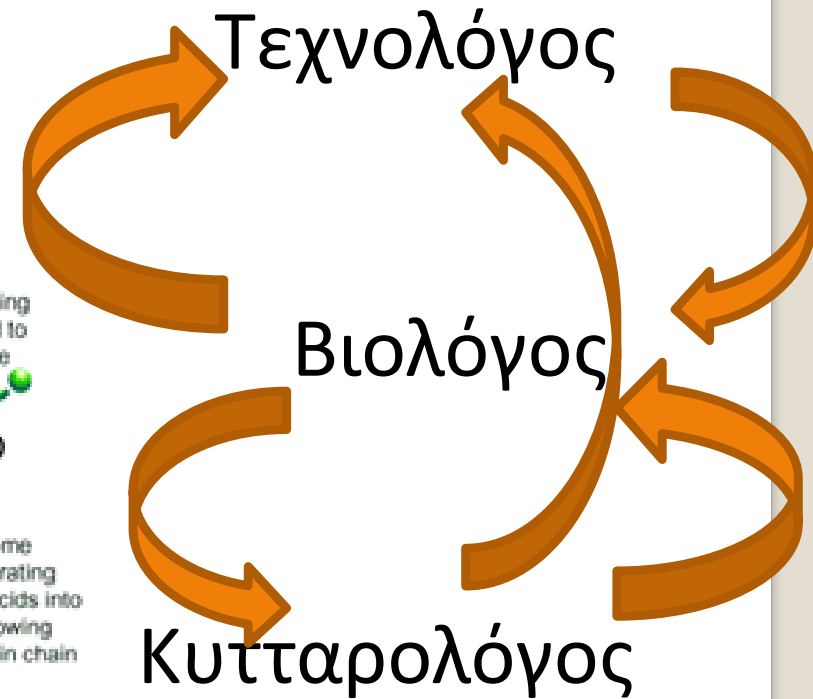
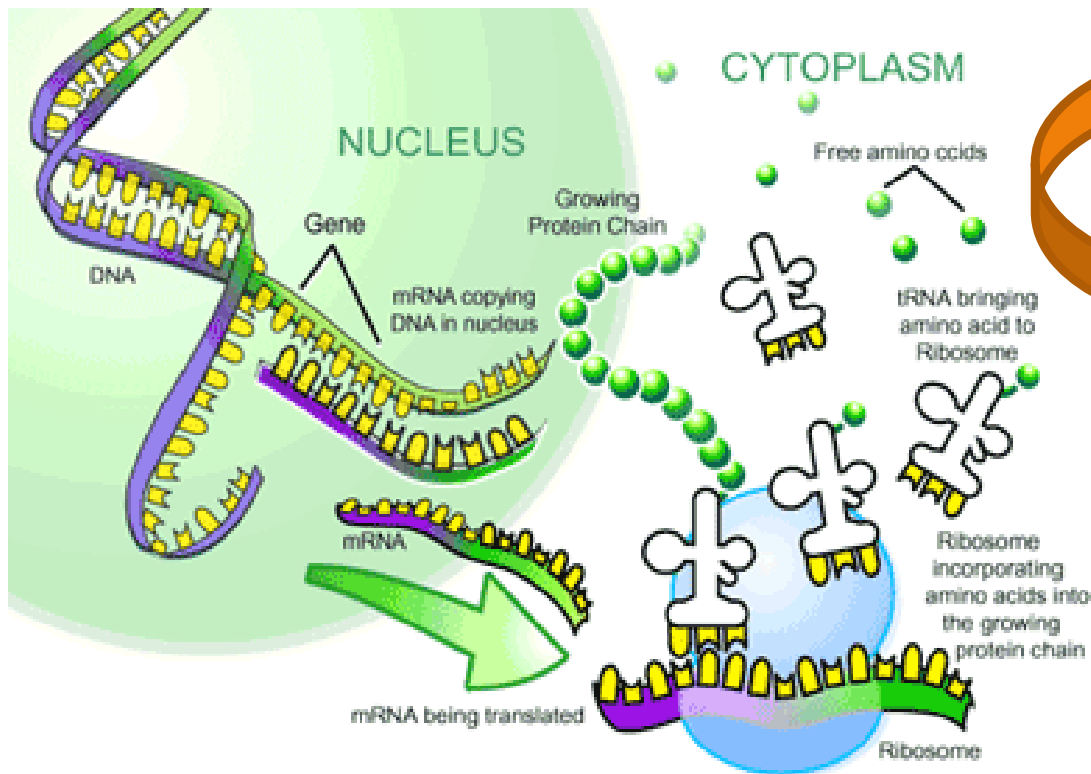


Βασικές Αρχές Μοριακής Βιολογίας

Χριστίνα Κοτταρίδη, Βιολόγος, MSc, PhD
Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας,
ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ

Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα, Α' εξάμηνο
28 Απριλίου 2014

Το Κυτταρολογικό εργαστήριο του σήμερα



Μοριακή Βιολογία

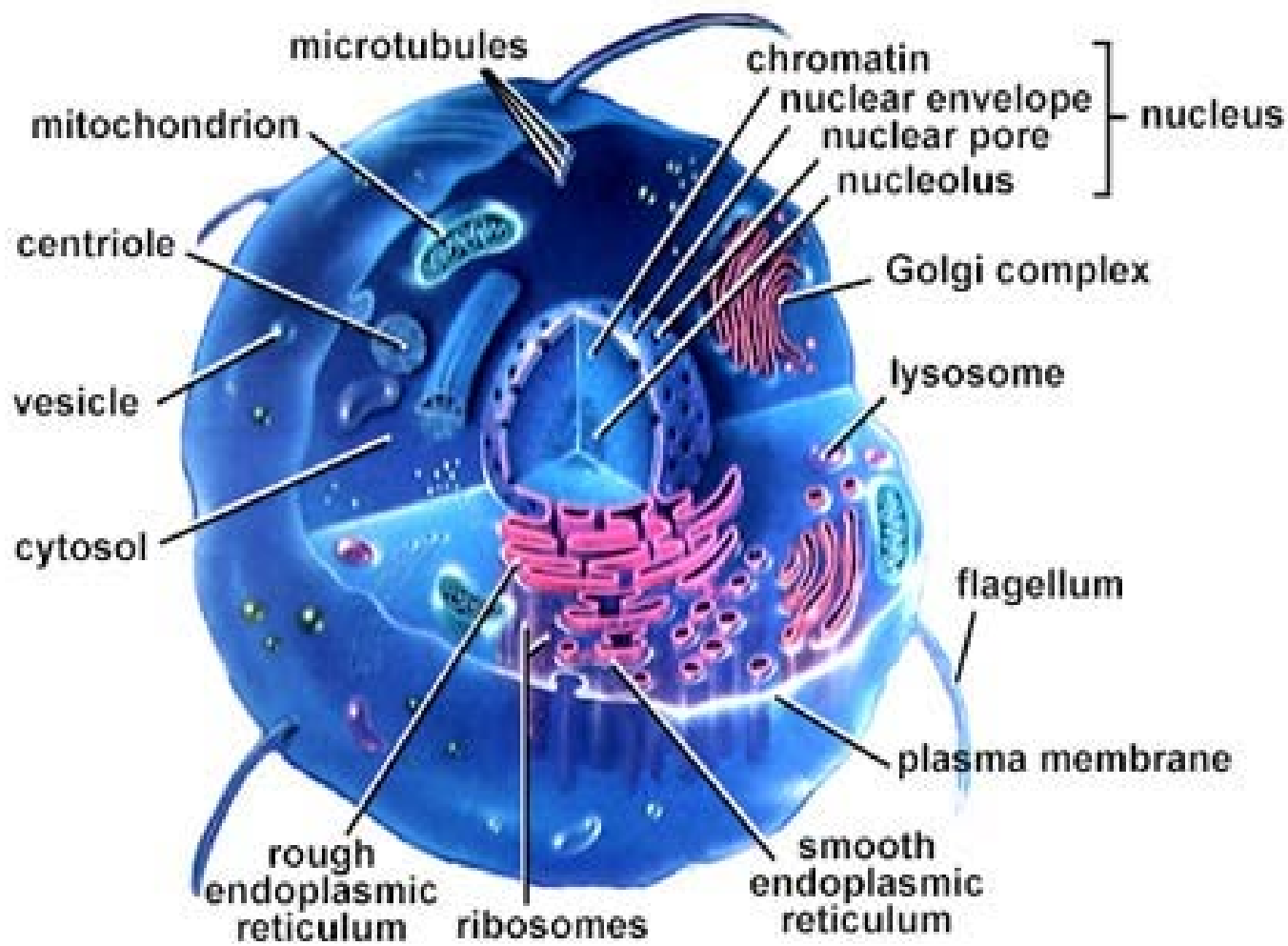
- **Μοριακή Βιολογία:** ο τομέας της βιολογίας που μελετά τη δομή και τη λειτουργία των γονιδίων σε μοριακό επίπεδο
- Η **Μοριακή Βιολογία** μπορεί να αλληπικαλύπτεται με τα πεδία της Γενετικής και της Βιοχημείας
- Η **Μοριακή Βιολογία** επιτρέπει στο εργαστήριο να λαμβάνει πληροφορίες για μελλοντικές καταστάσεις του υπό εξέταση οργανισμού.

Η τράπεζα δεδομένων του γενώματος

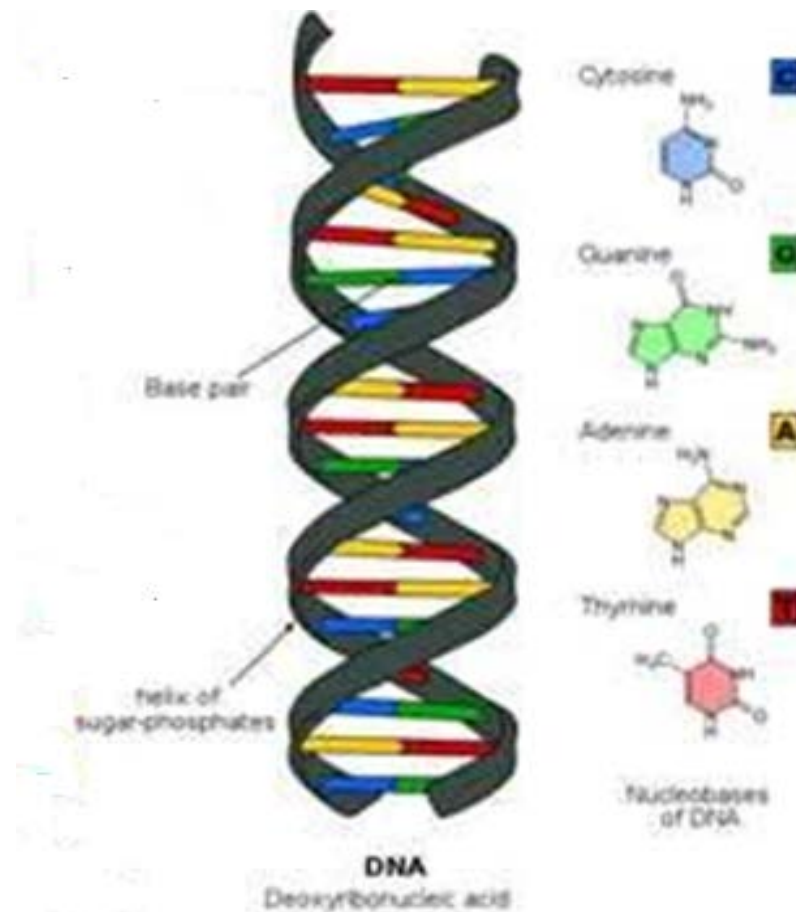
Είναι οργανωμένη σε 6 ομάδες οργανισμών

- Ευκαρυωτικά κύτταρα
- Βακτήρια
- Αρχαία
- Ιούς
- Ιοειδή και τα
- Πλασμίδια.

Ευκαρυωτικό κύτταρο



DNA



Το ανθρώπινο DNA αποτελείται από περίπου 3×10^9 ζεύγη βάσεων

To DNA

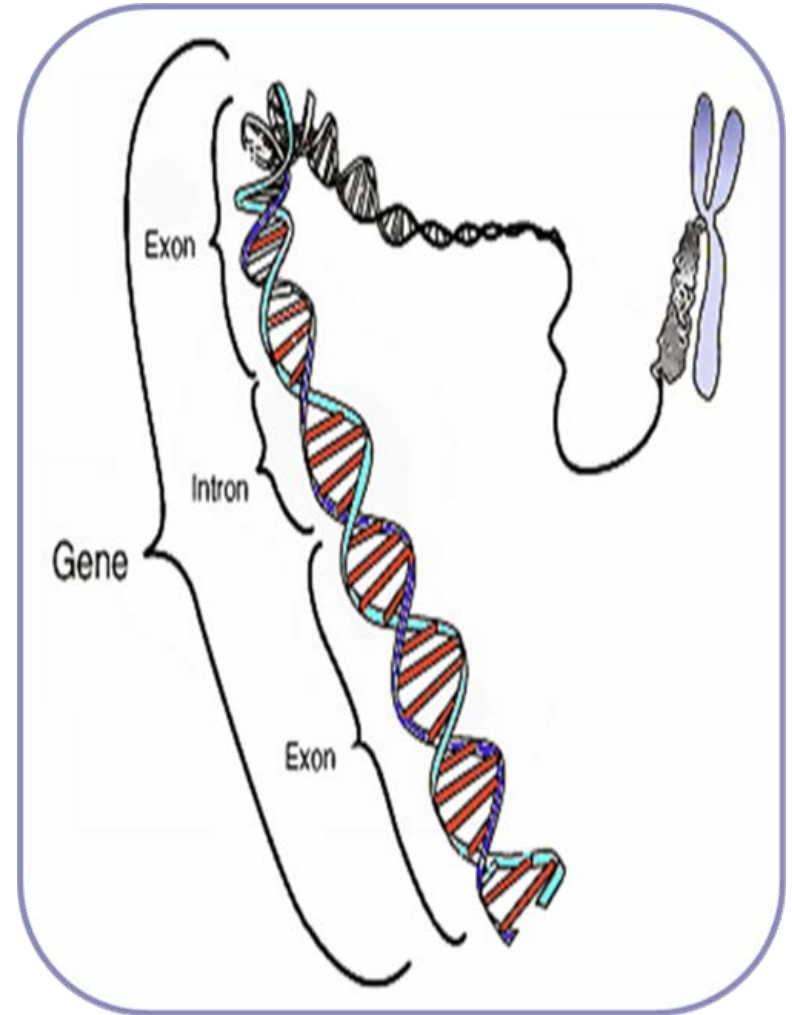
■ Deoxyribonucleic Acid (DNA)

γιγάντιο μόριο που αποτελεί το γενετικό υλικό όλων των κυτταρικών οργανισμών και πολλών ιών.

■ To DNA είναι υπεύθυνο για να διατηρεί, να αντιγράφει και να μεταφέρει μεταξύ των κυττάρων και από γενιά σε γενιά την πληροφορία.

Το γονίδιο

- **Το γονίδιο** τμήμα της αλυσίδας του **DNA**.
- Βασική μονάδα της κληρονομικότητας
- Το κάθε ένα **γονίδιο** έχει του τόπο στο χρωμόσωμα (**locus**).
- **Αλλήλιο** συγκεκριμένη «ποικιλία» της DNA αλληλουχίας σε συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο. Κάθε αλλήλιο κληρονομείται από τον κάθε γονέα.

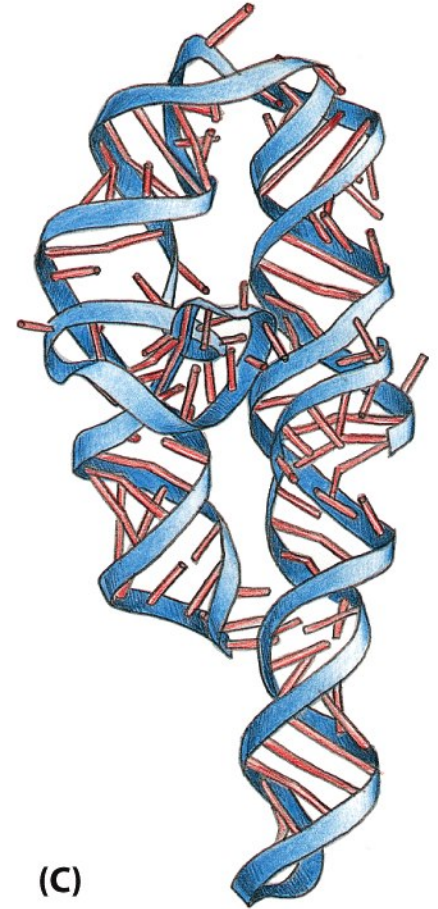
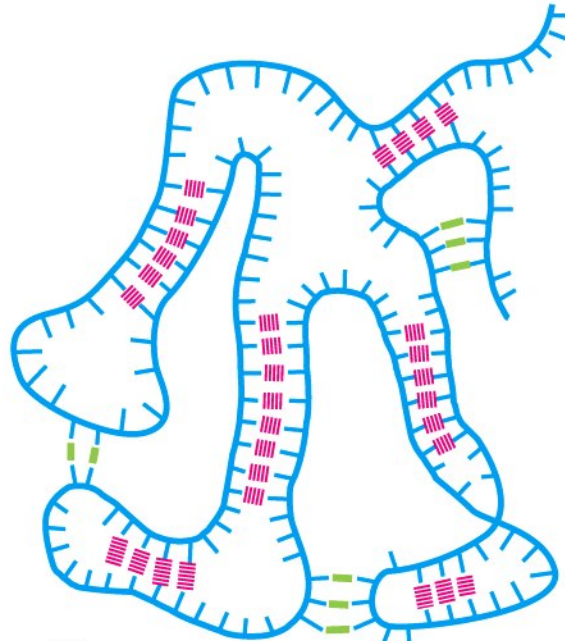
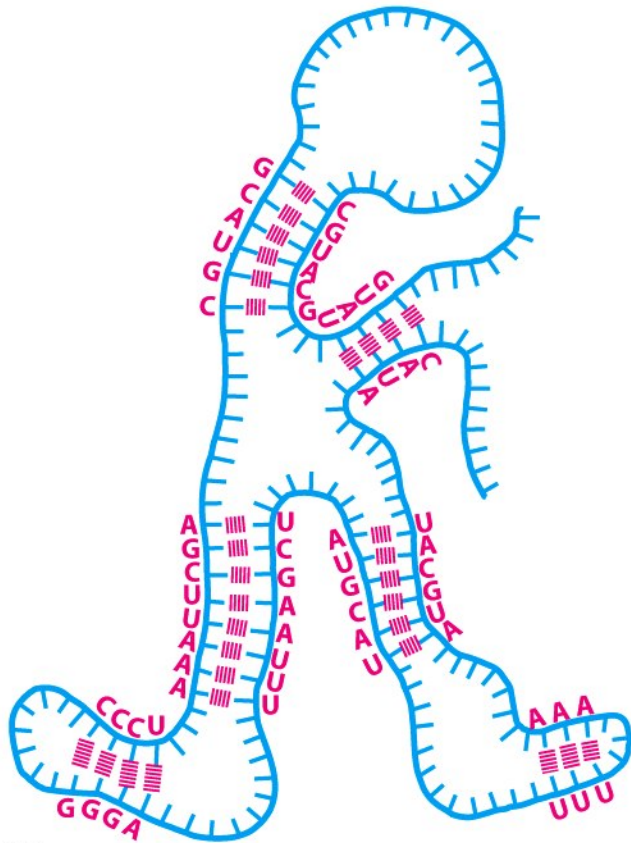


Source: National Human Genome Research Institute.

To RNA

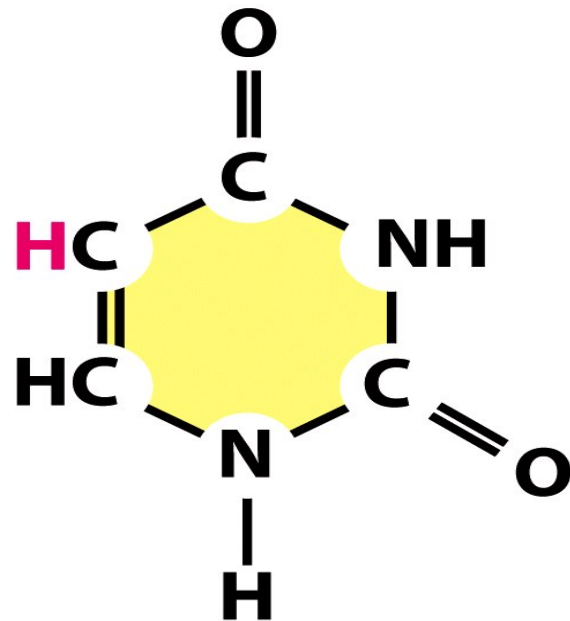
■ Το RNA είναι μονόκλωνο μόριο

Έχει όμως δίκλωνες περιοχές ή δευτεροταγείς δομές



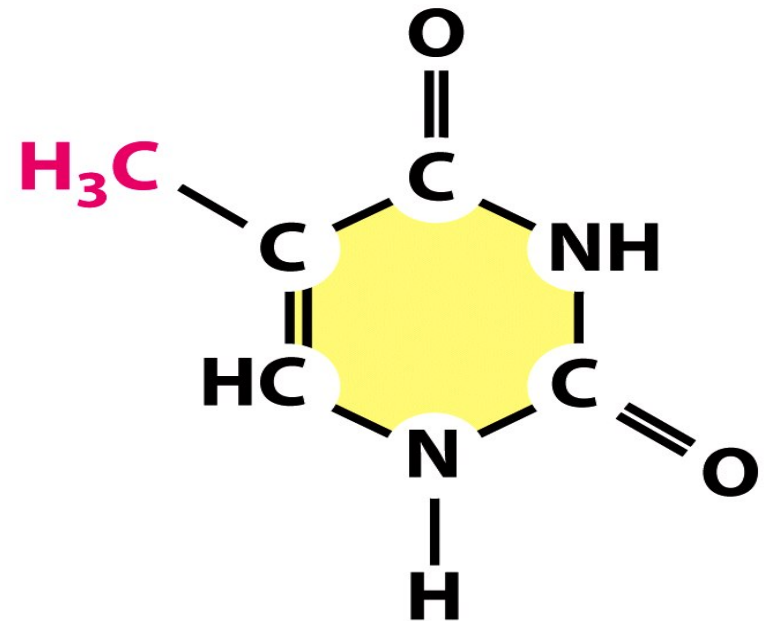
To RNA

- Το **RNA** είναι μονόκλωνο μόριο
Έχει Ουρακίλη αντί για Θυμίνη



uracil

used in RNA



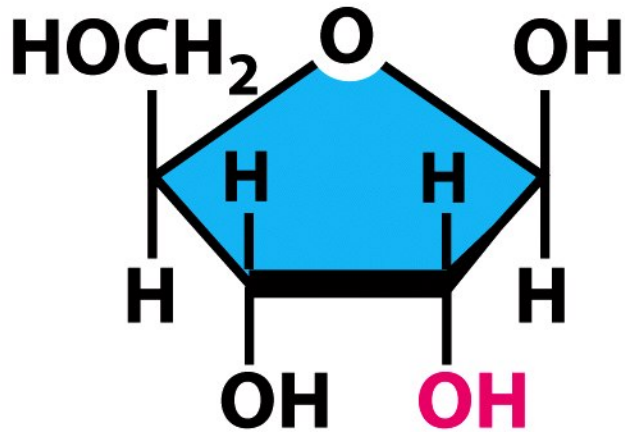
thymine

used in DNA

To RNA

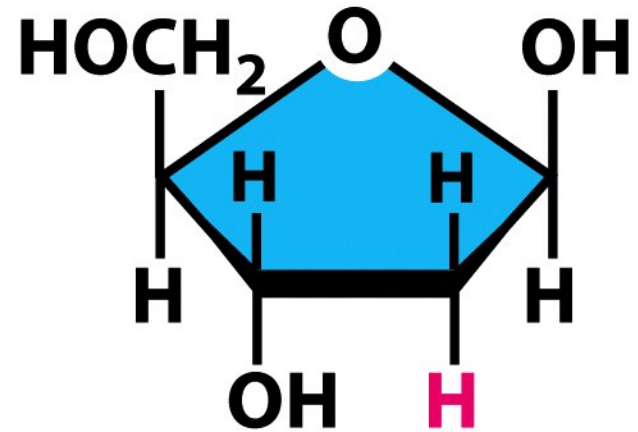
- Το RNA είναι μονόκλωνο μόριο

Έχει το σάκχαρο ριβόζη αντί για δεοξυριβόζη



ribose

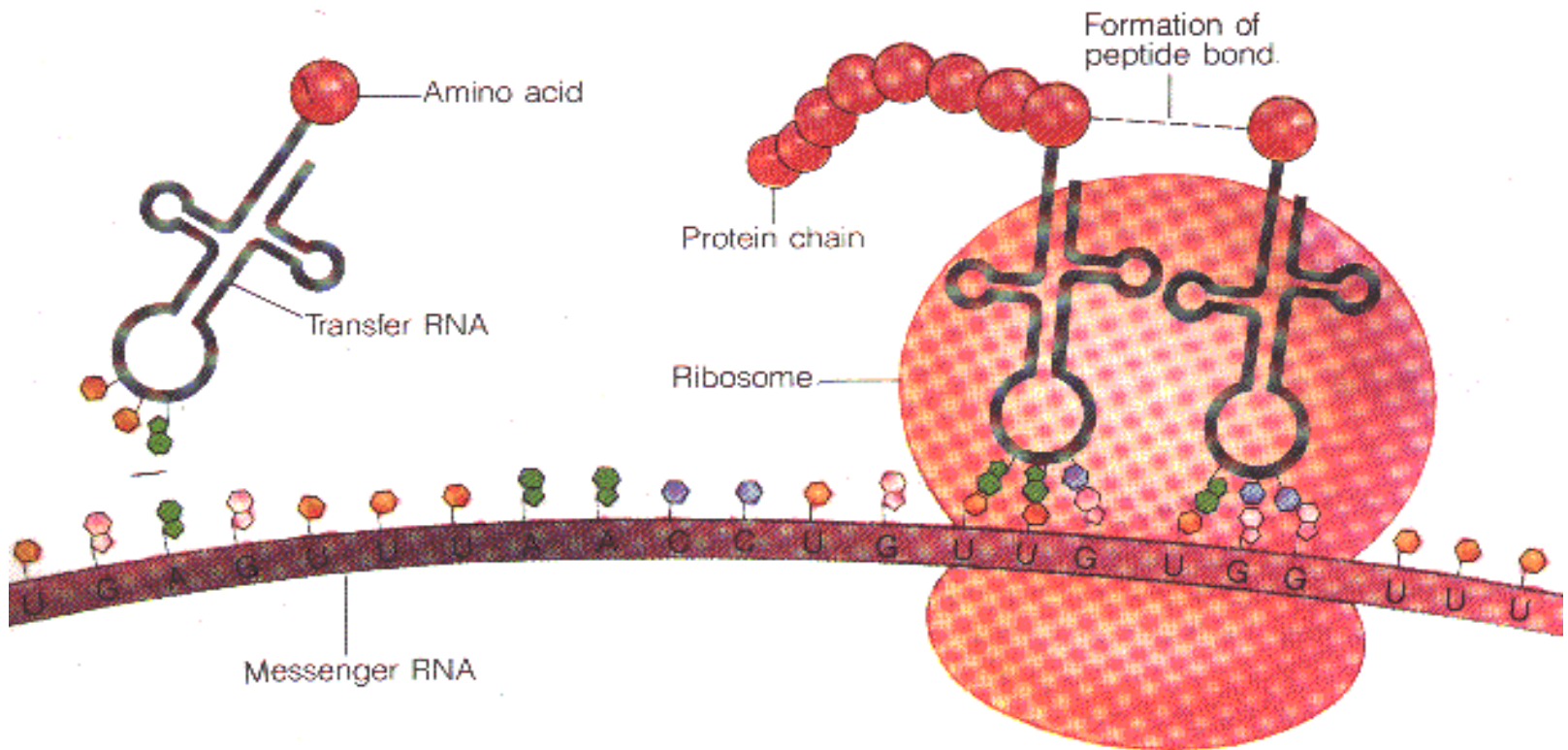
used in ribonucleic acid (RNA)



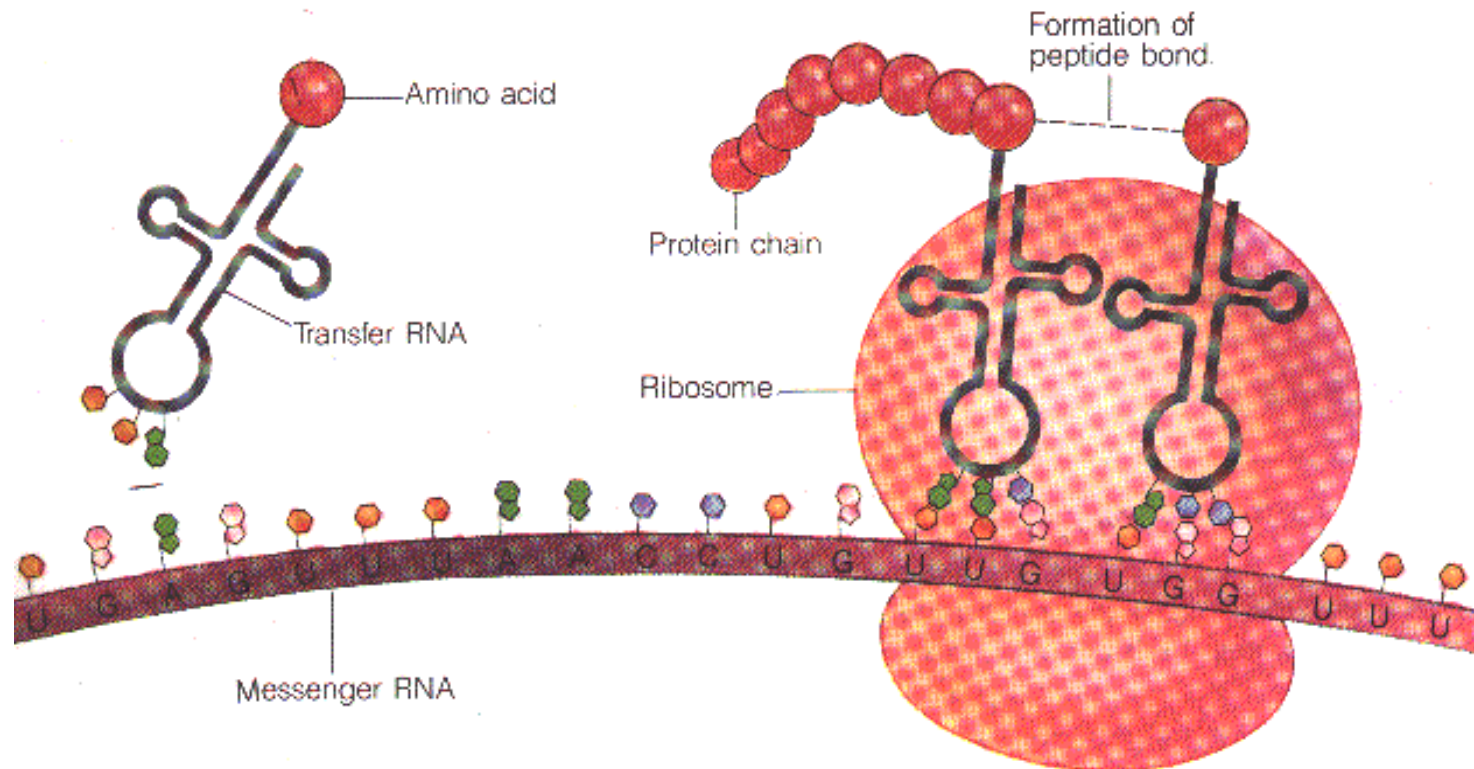
deoxyribose

used in deoxyribonucleic acid (DNA)

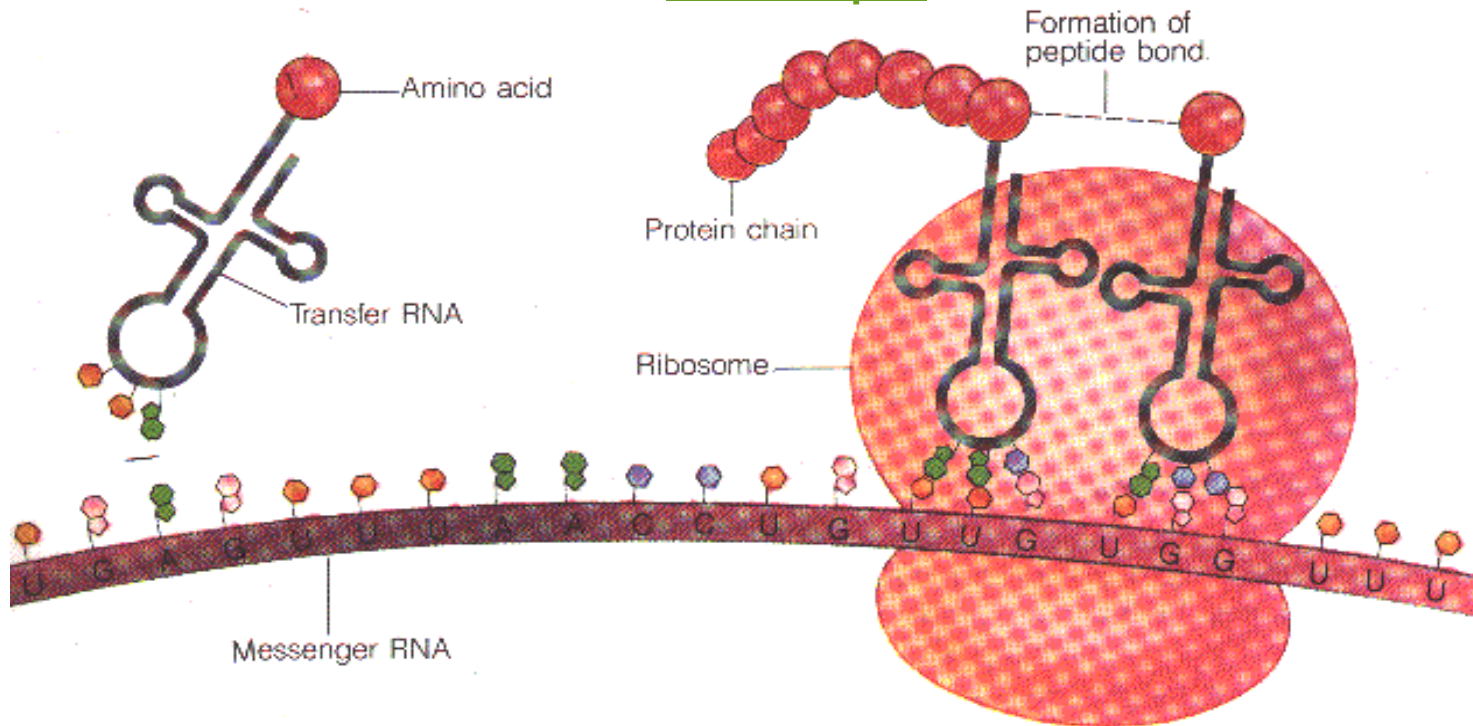
- Αγγελιαφόρο RNA (mRNA), μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA



- Μεταφορικό RNA (tRNA), μεταφέρει ειδικά αμινοξέα σε μια επεκτεινόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσώματα του κυττάρου, με βάση τις οδηγίες του αγγελιαφόρου RNA.

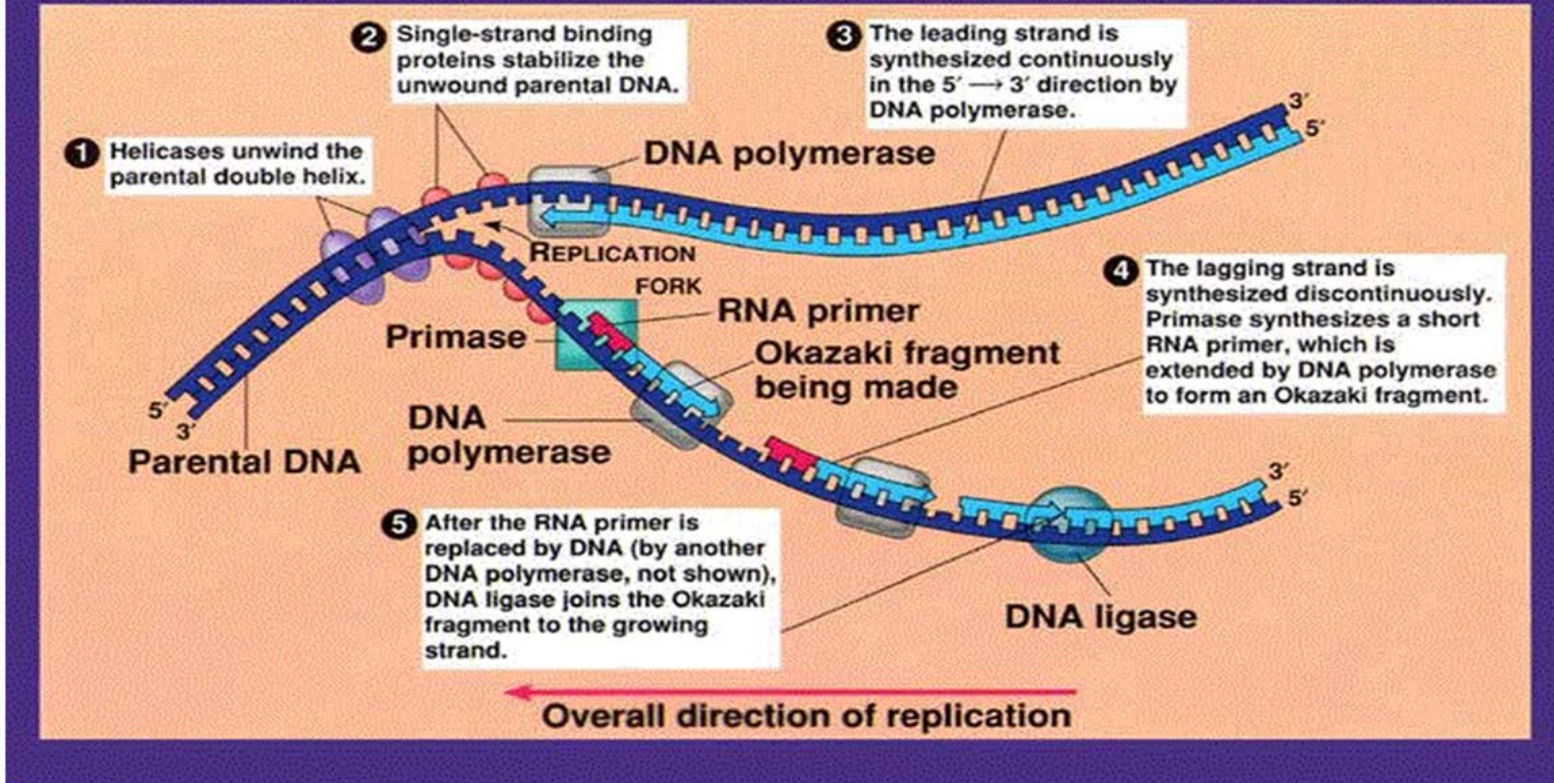


- **Ριβωσωμικό RNA** ή **rRNA** είναι ένας τύπος **RNA** των **ριβωσωμάτων** που καταλύει την **πρωτεΐνοσύνθεση** στο **κύτταρο**.



Το DNA αντιγράφεται

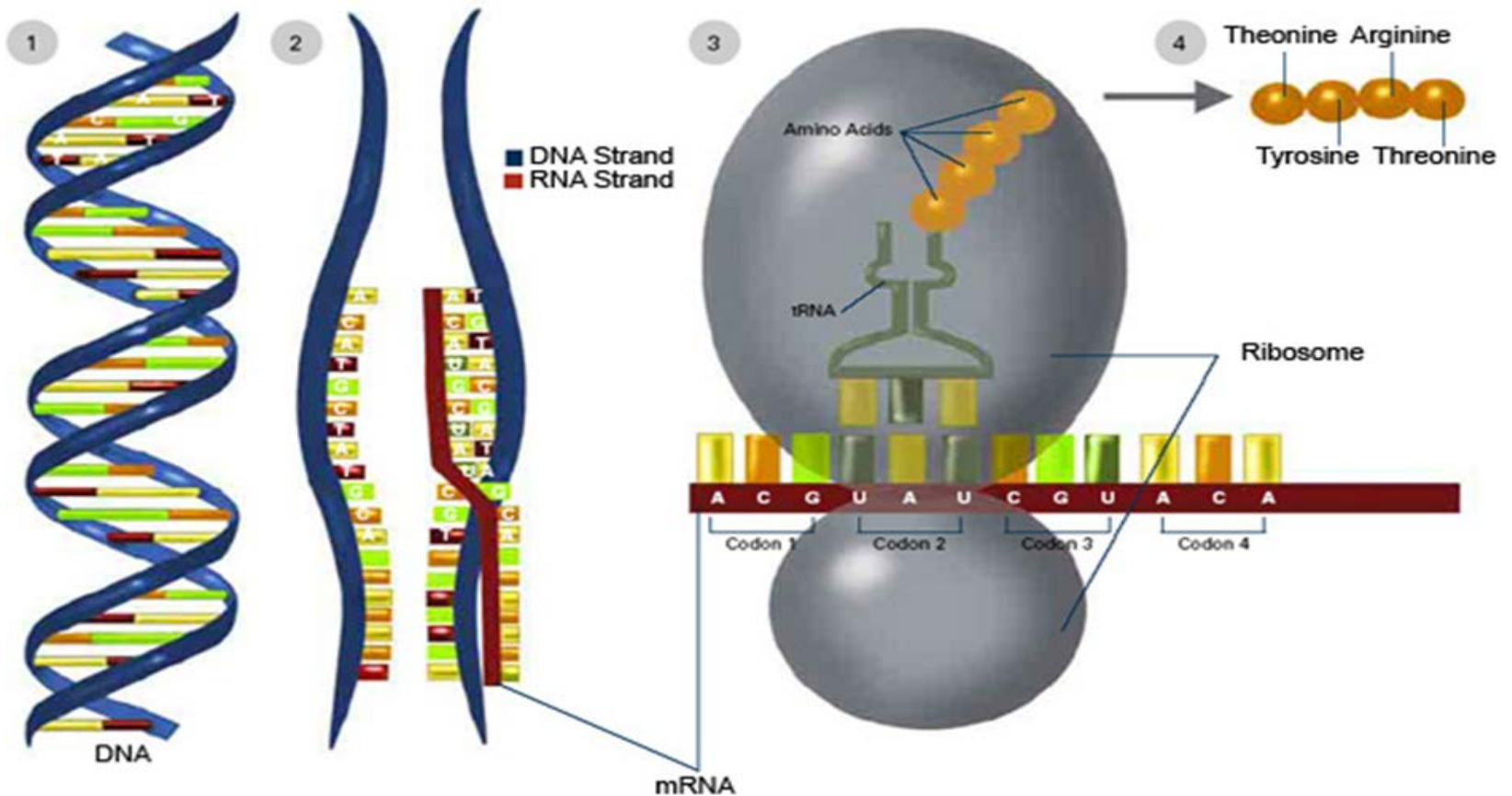
A SUMMARY OF DNA REPLICATION

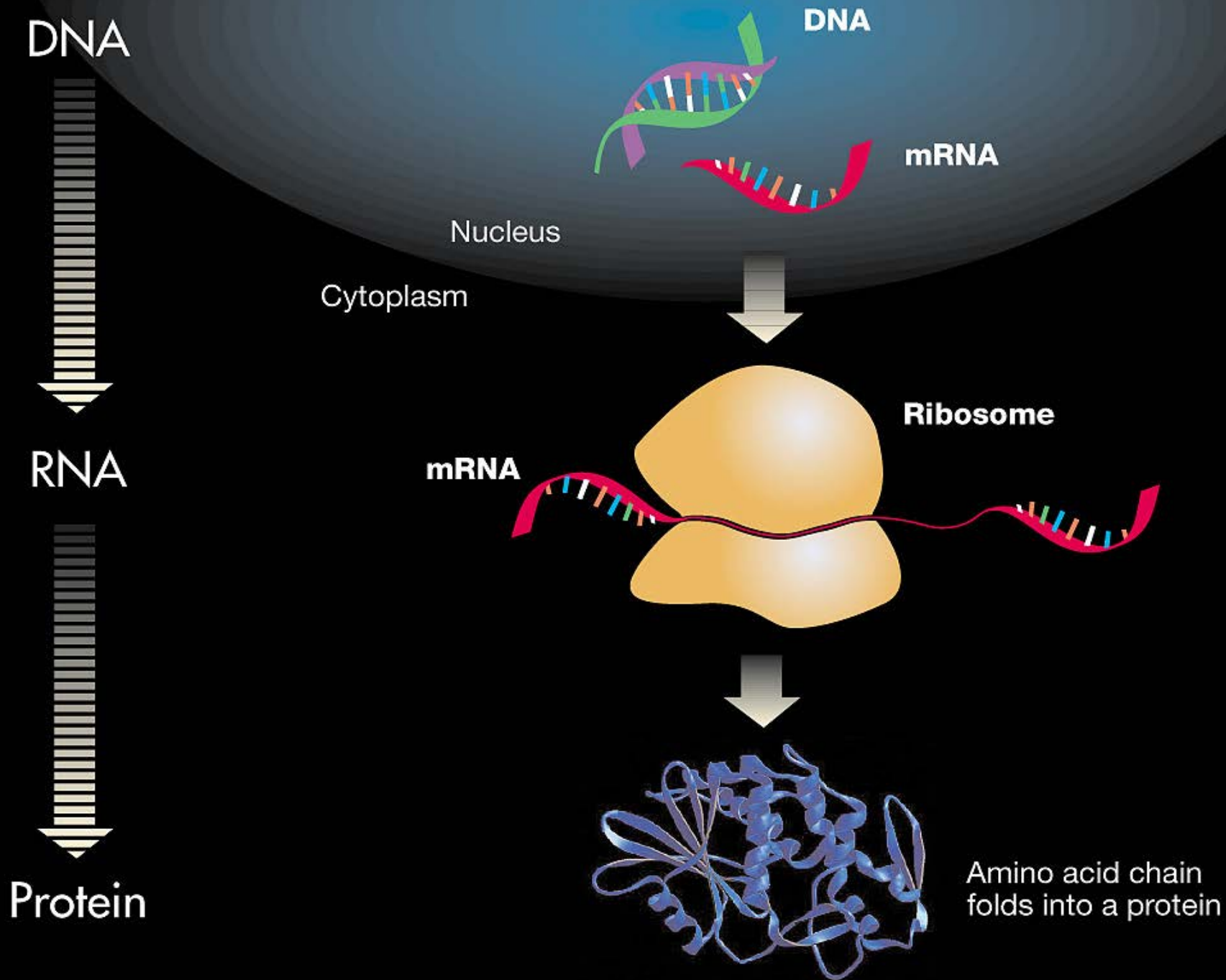


George Rice. Montana State University.

Source: http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/replication.html

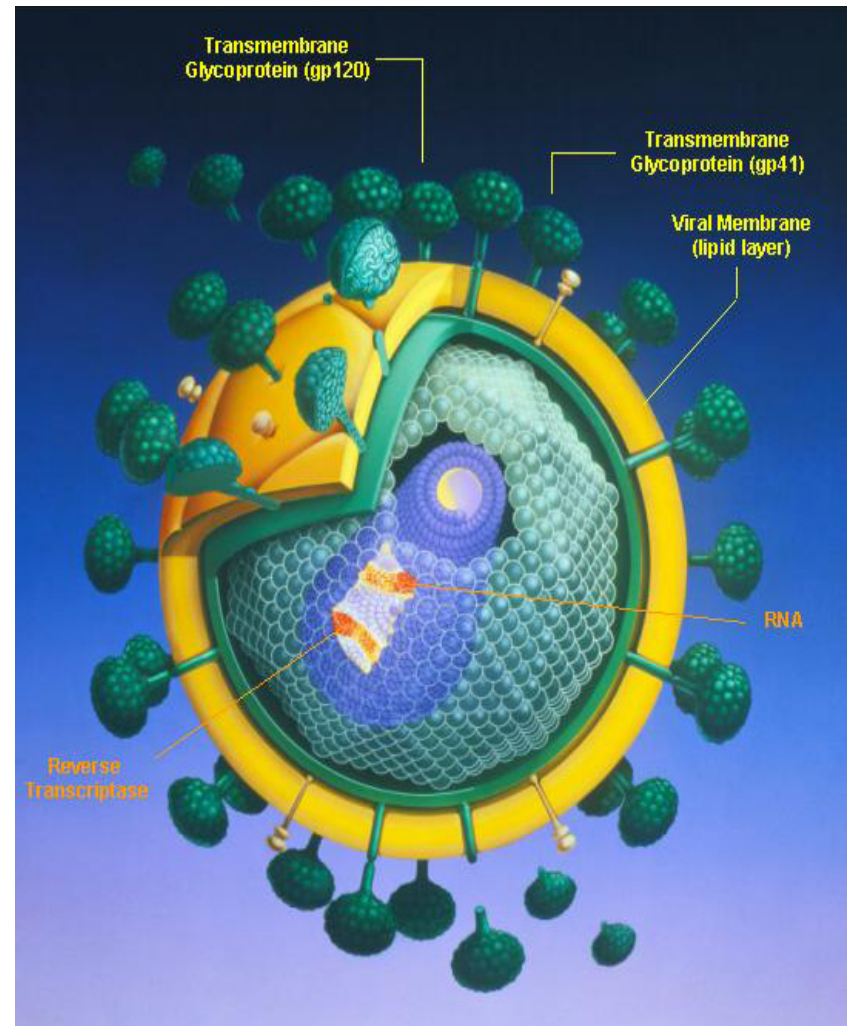
Από το DNA στην πρωτεΐνη



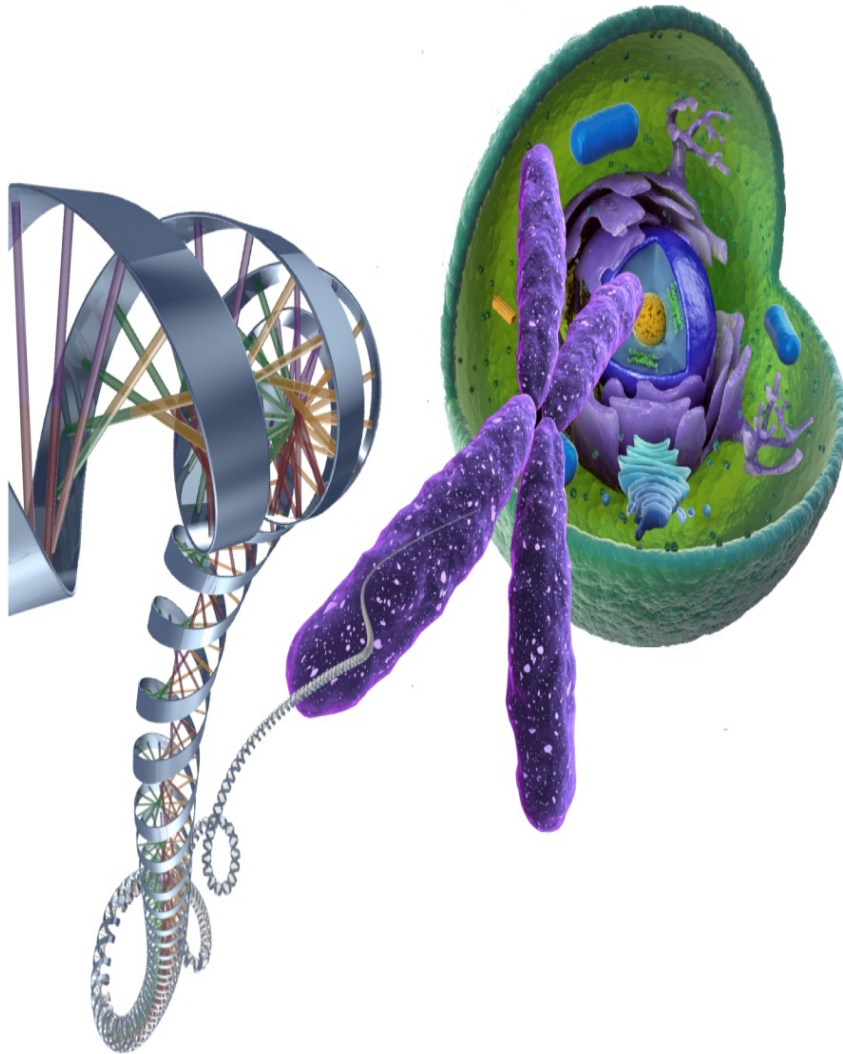


Εργαλεία Μοριακής Βιολογίας

- Εκχύλιση DNA
- Εκχύλιση RNA
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- RT-PCR
- Εφαρμογές κλινικών μικροσυστοιχιών
- PCR πραγματικού χρόνου
- NASBA
- Pyrosequencing



Εκχύλιση γενετικού υλικού

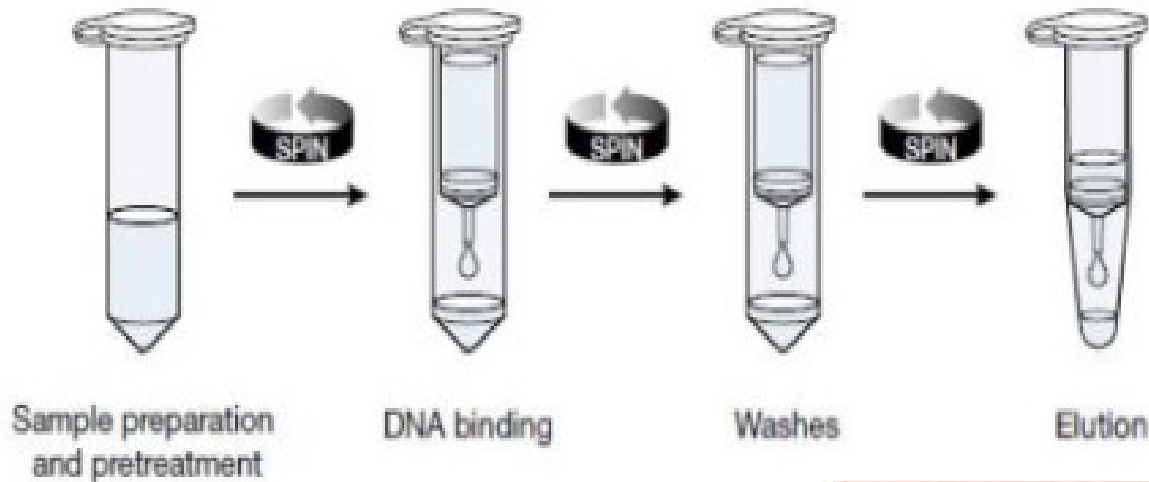


- Σε σχετικά καθαρή μορφή, έξω από τον πυρήνα και την προστασία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης
- PCR
- Αλληλούχιση
- Μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων

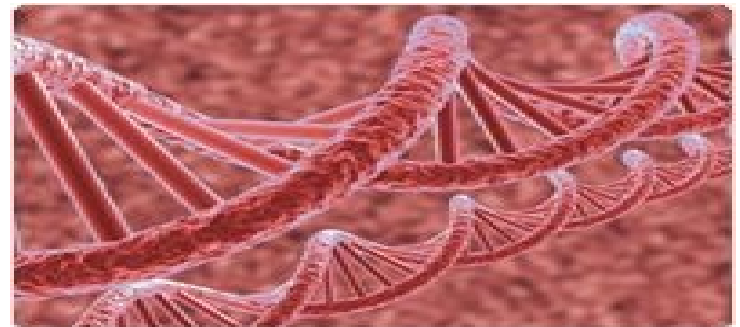
Βασικά βήματα στην εκχύλιση του DNA



- Απομάκρυνση παραφίνης με ξυλόλη σε δείγματα προερχόμενα από εγκλεισμό



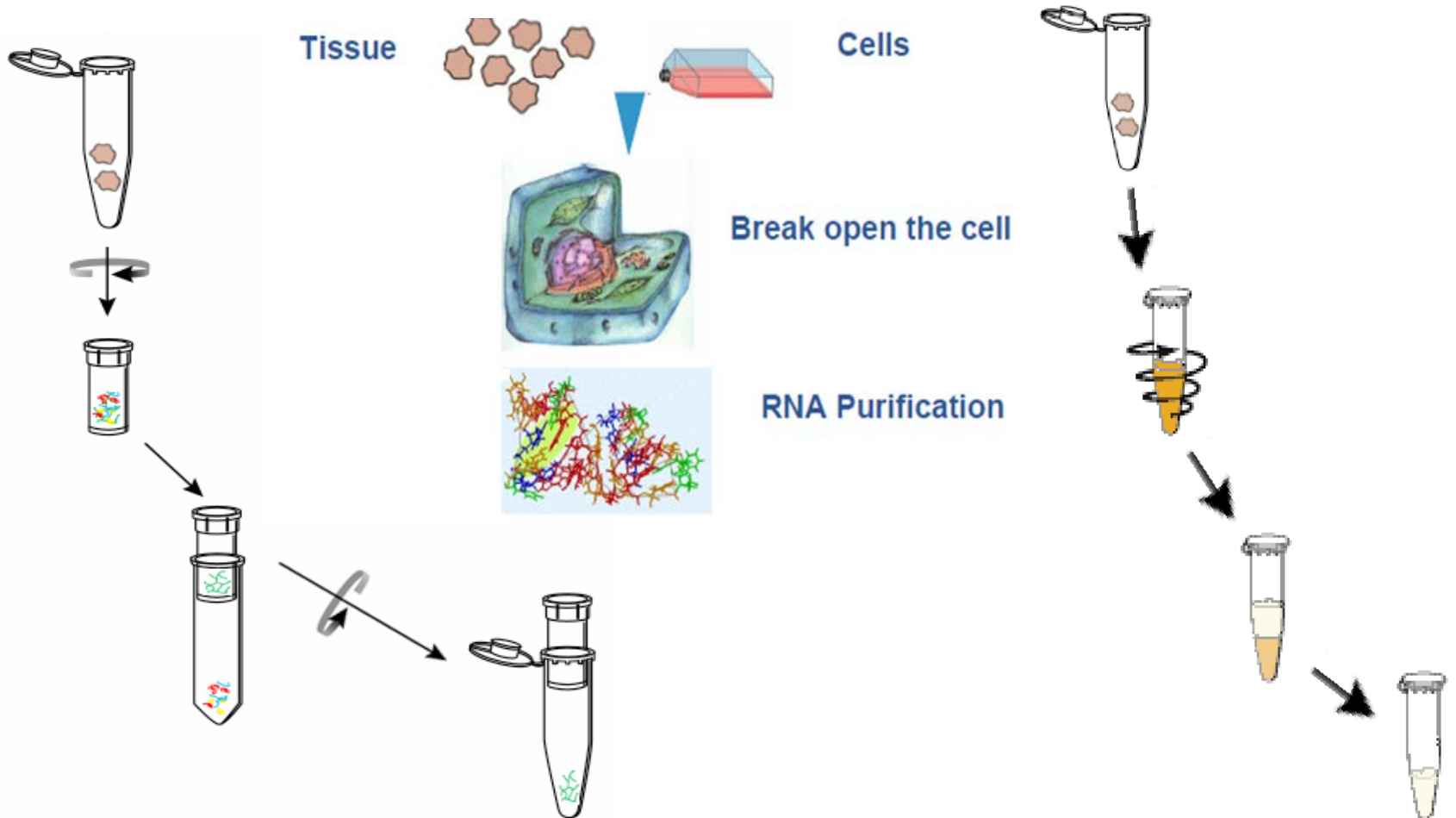
- Λύση λιπιδικών μεμβρανών
- Κατακρήμνιση του DNA με αλκοόλες
- Εκπλύσεις
- Τελική έκλυση



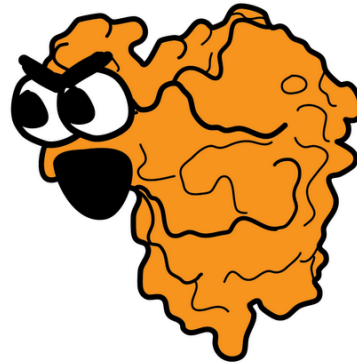
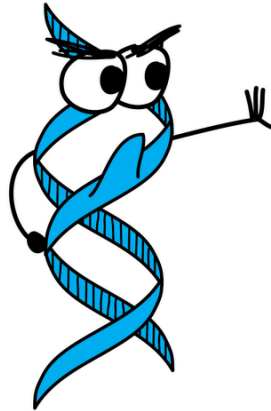
Εκχύλιση RNA

Affinity purification of total RNA

Organic Extraction of total RNA



RNase-Free!



GLOVES ONLY!

Γενετικό υλικό μπορεί να εξαχθεί από....



Pap test
FNA
Σωματικά
υγρά



Τομές παραφίνης

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

- Περιγράφηκε το 1983
- Mullis-βραβείο Nobel το 1993
- Εκλεκτική ενίσχυση DNA/cDNA πληθυσμού-στόχου

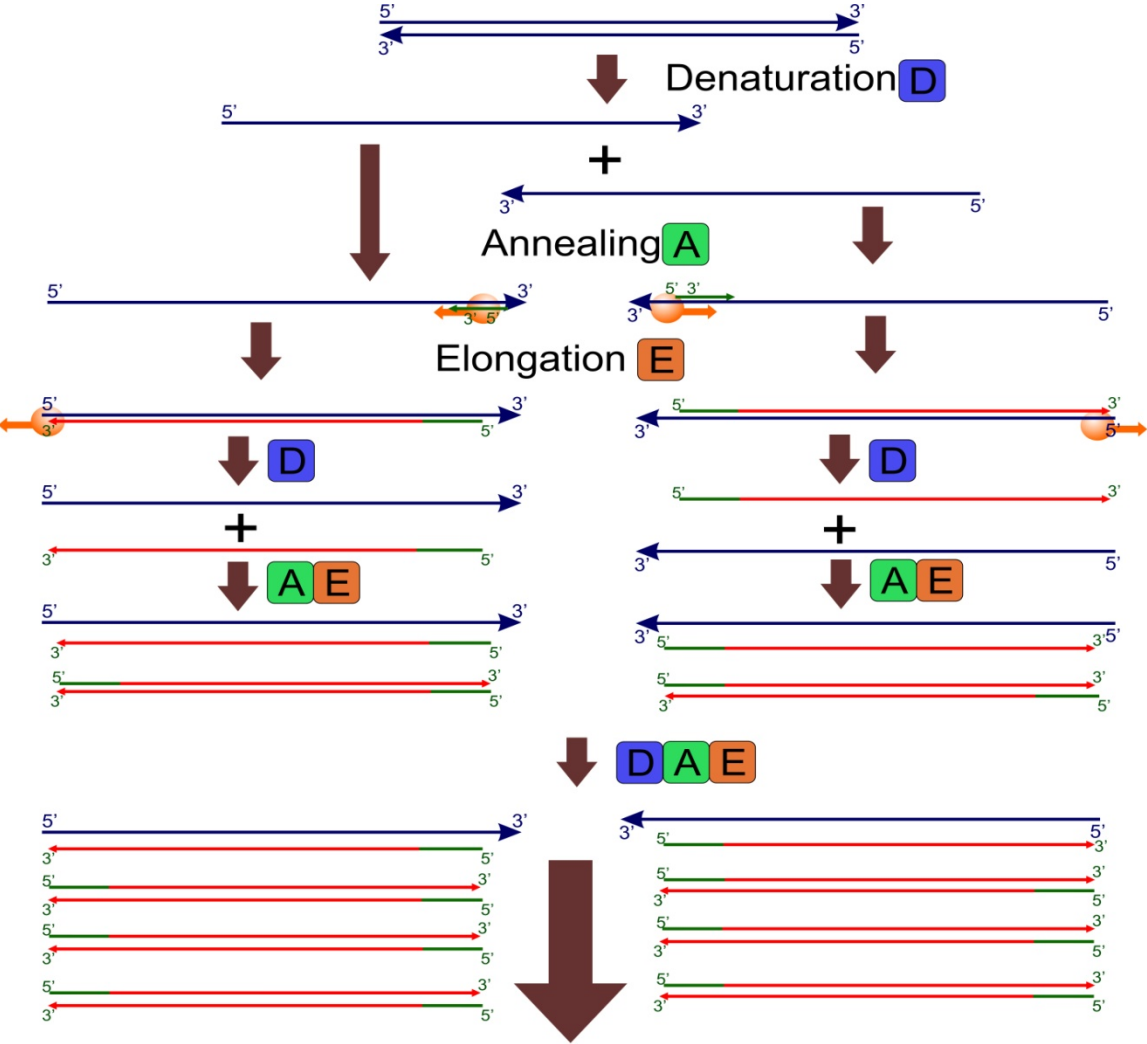




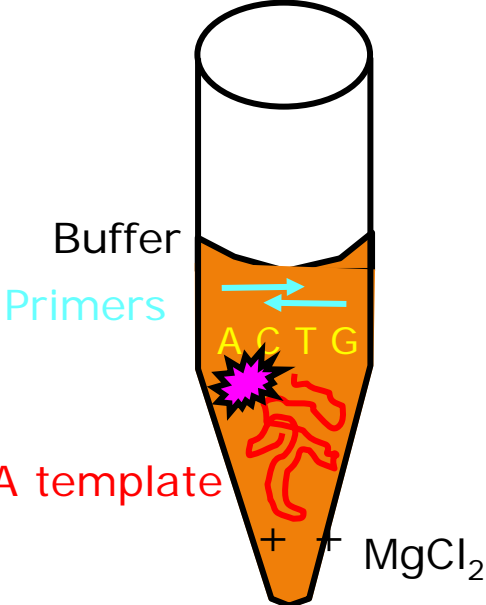
Απαραίτητα:

- Μόριο-στόχο
- Δύο εκκινητικά ολιγονουκλεοτιδικά μόρια
- Μίγμα ελεύθερων νουκλεοτιδίων
- Θερμοσταθερή DNA πολυμεράση
- Θερμικός κυκλοποιητής

PCR



Exponential growth of short product

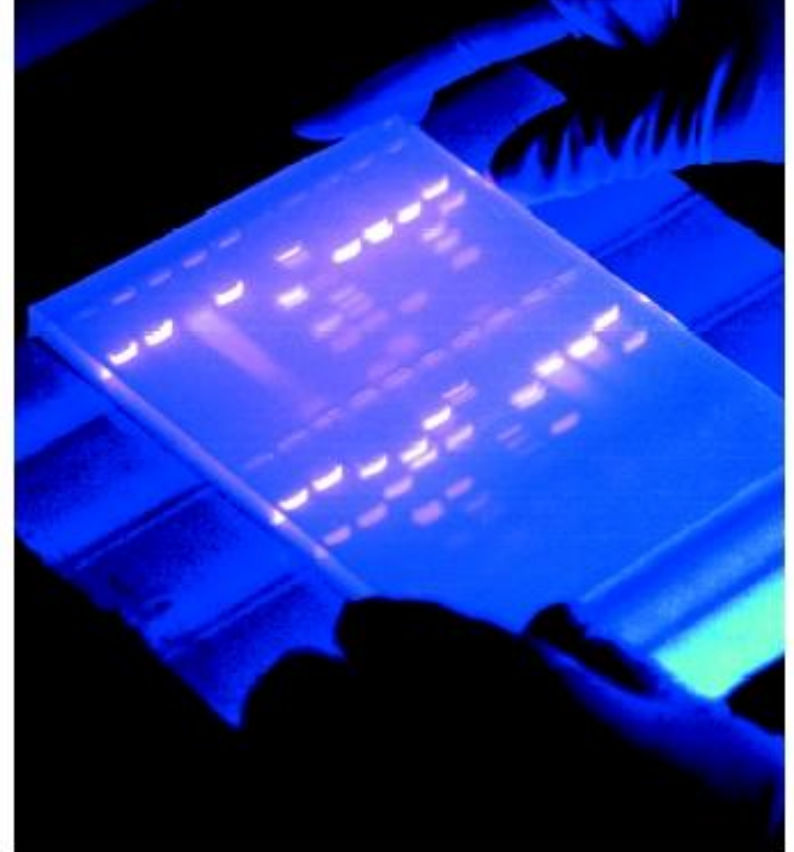
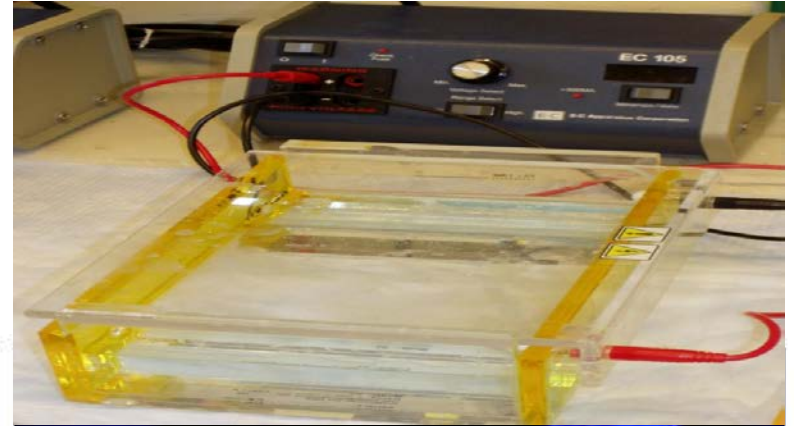
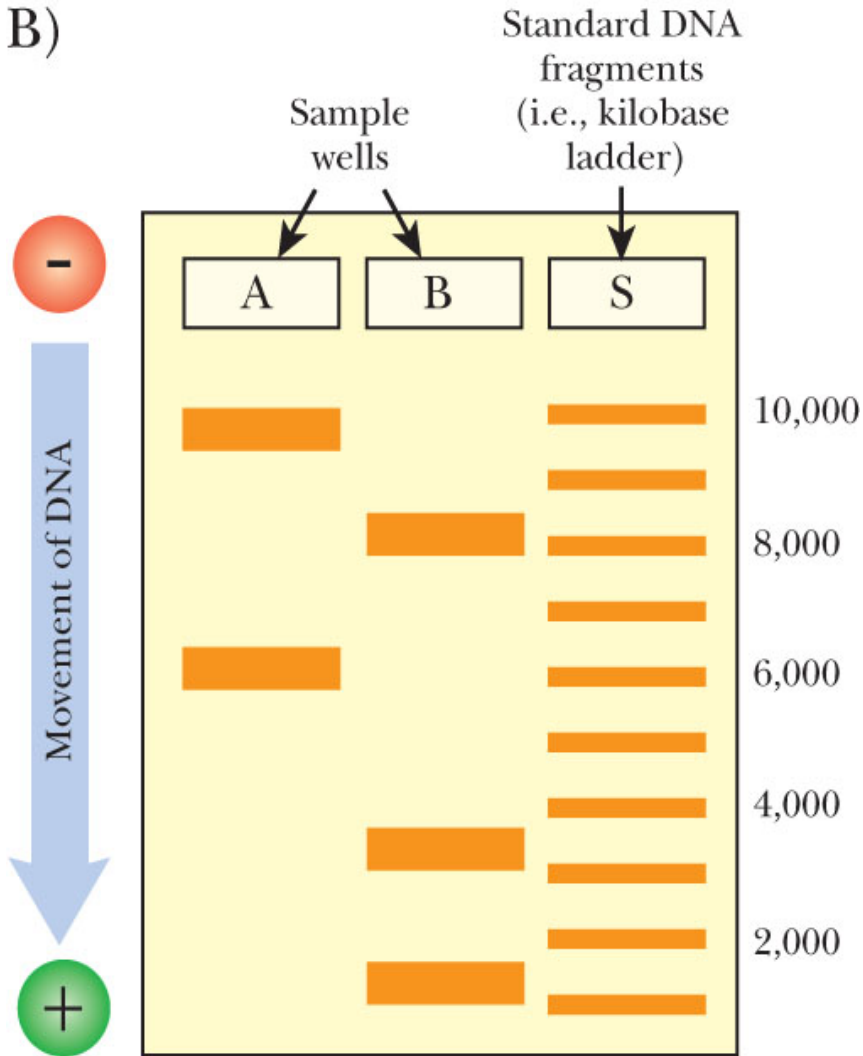


Picture created by Makis Pouliakis

$$n^{36} = 68,719,476,736 \text{ copies in } \sim 2 \text{ hrs}$$

Πήκτωμα Αγαρόζης

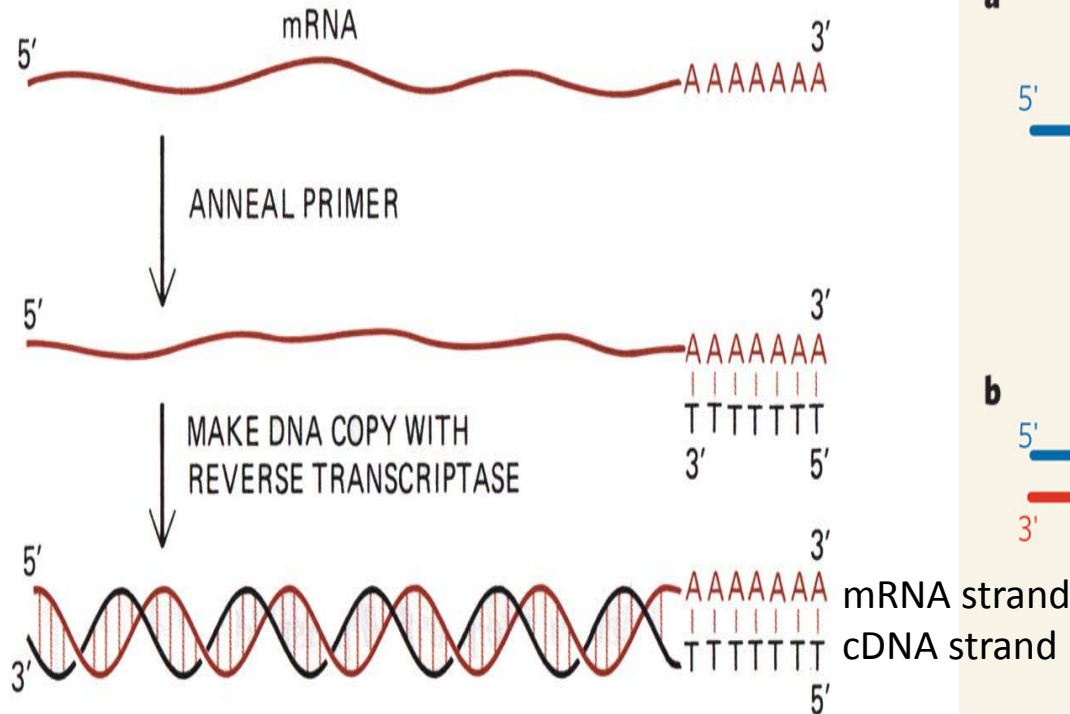
B)



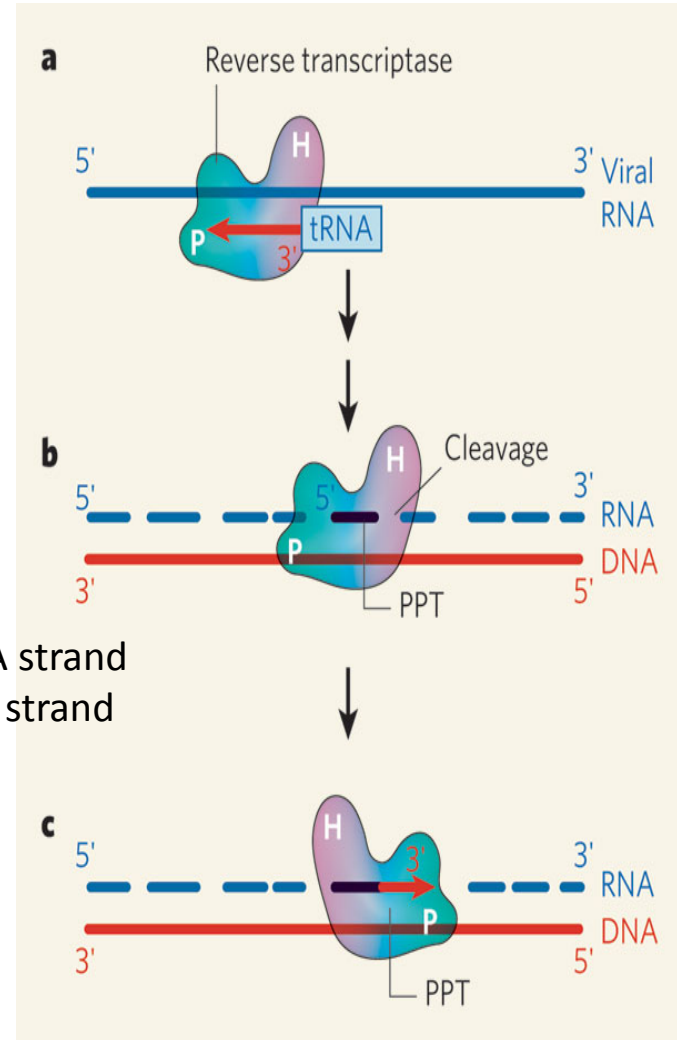
PCR Ανάλυση

- Τυποποίηση HPV
- Τυποποίηση αναπνευστικών ιών
- Τυποποίηση ερπητοϊών
- Κλωνικότητα B, T λεμφοκυττάρων
- Εντοπισμό μεθυλιωμένων περιοχών γονιδίων
- Σε ερευνητικά πρωτόκολλα

Αντίστροφη μεταγραφή-PCR

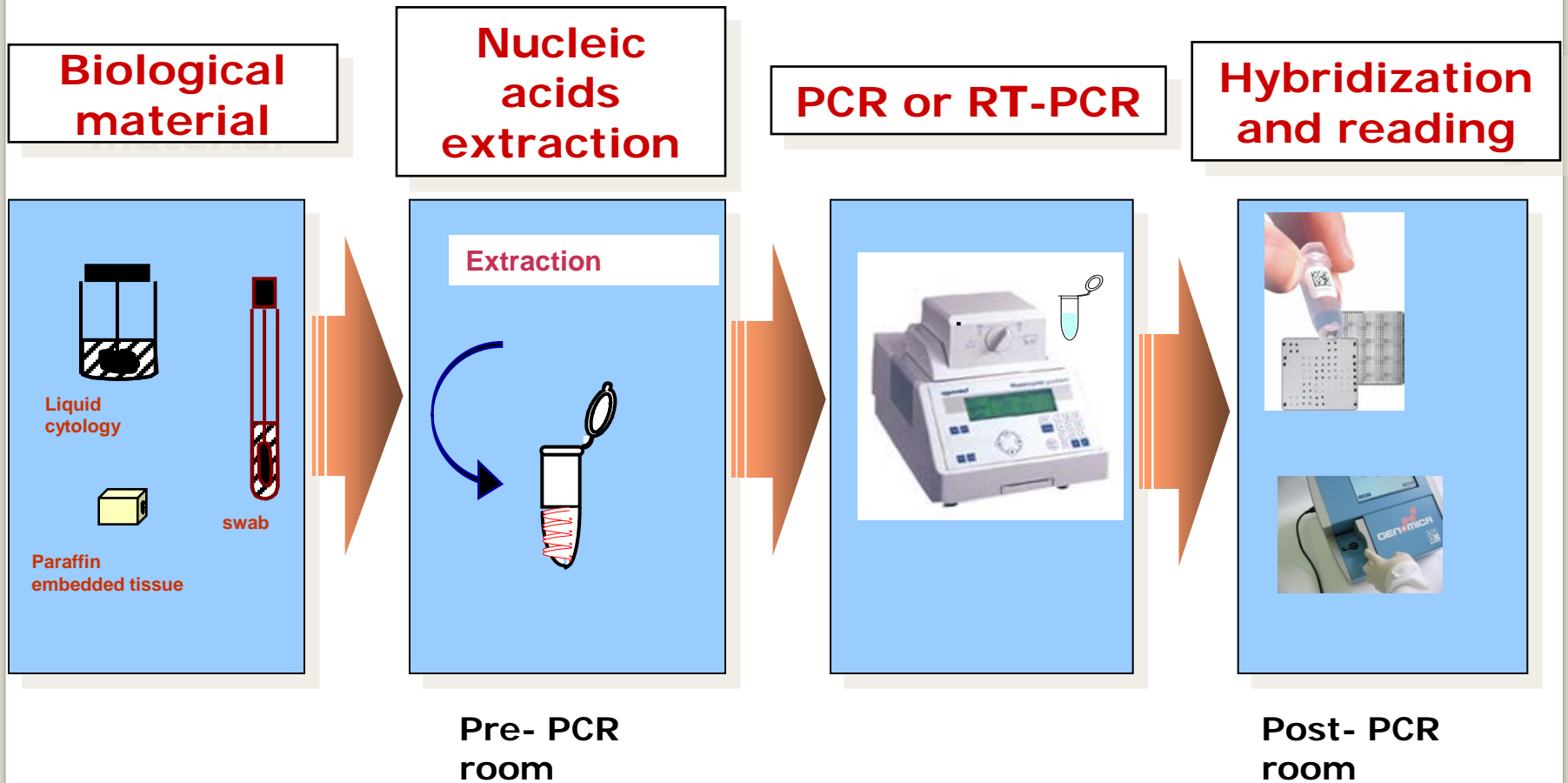


- Παθογόνα με RNA γένωμα
- Έκφραση γονιδίων

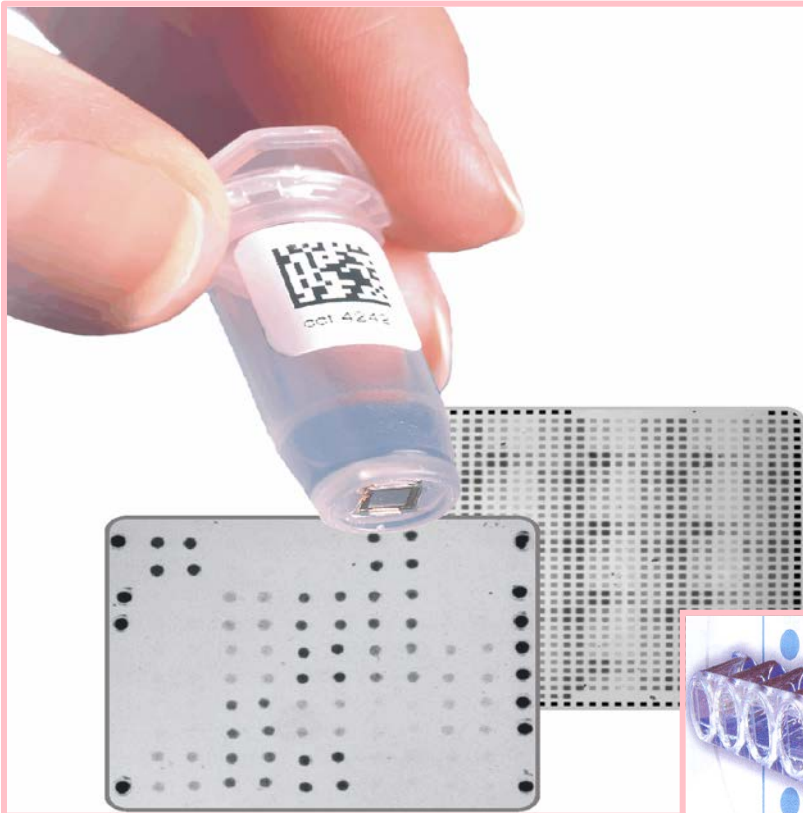


CLINICAL MICROARRAYS

«Με μια ματιά»



Microarrays Technology

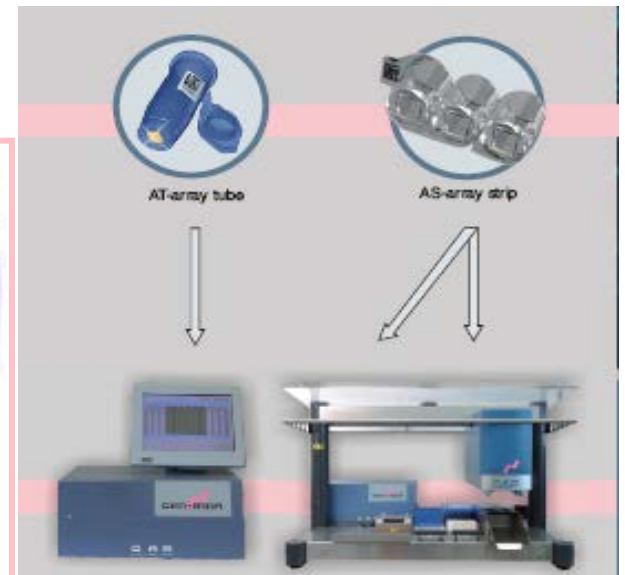
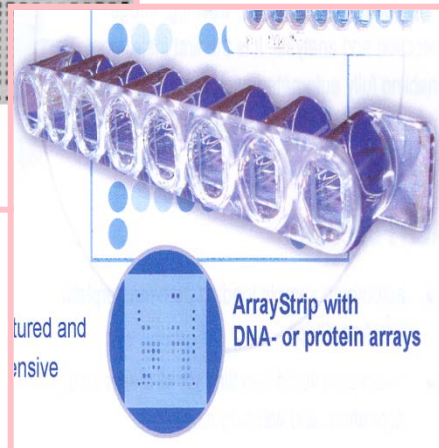


Biochip (3x3mm):

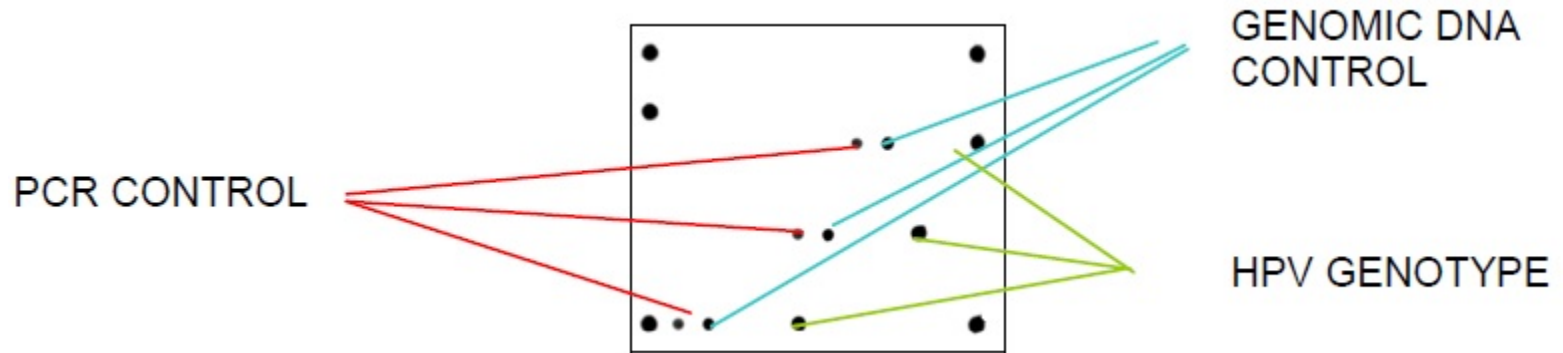
probes in triplicate

Internal control for nucleic acid extraction

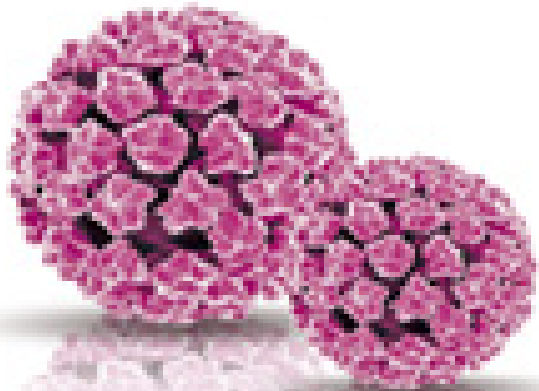
Internal control for PCR inhibition



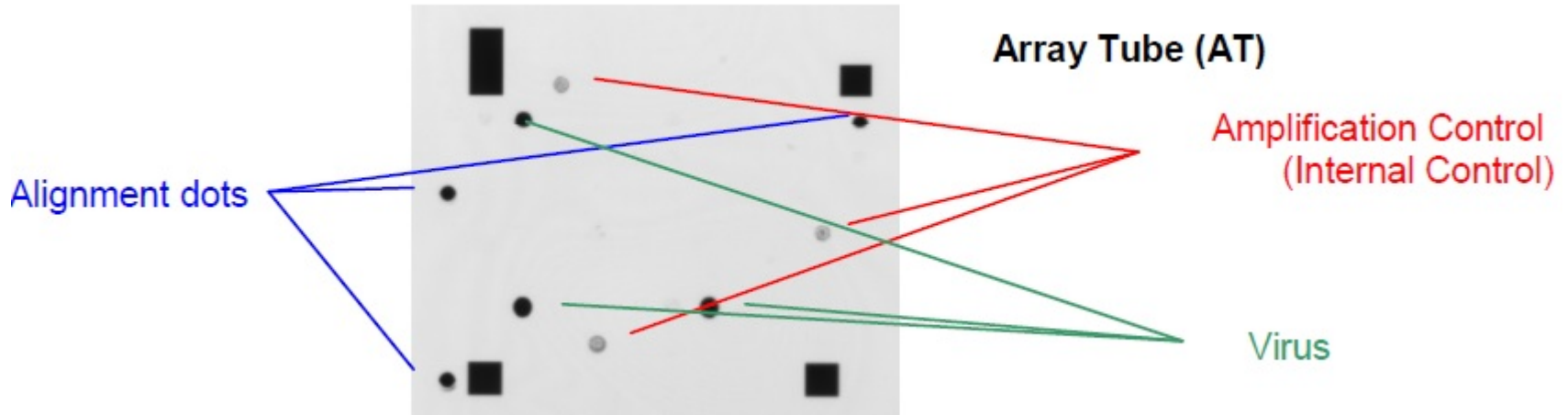
Three Clinical Arrays protocols



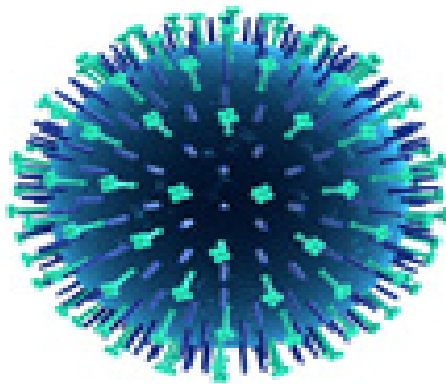
HPV typing



Three Clinical Arrays protocols



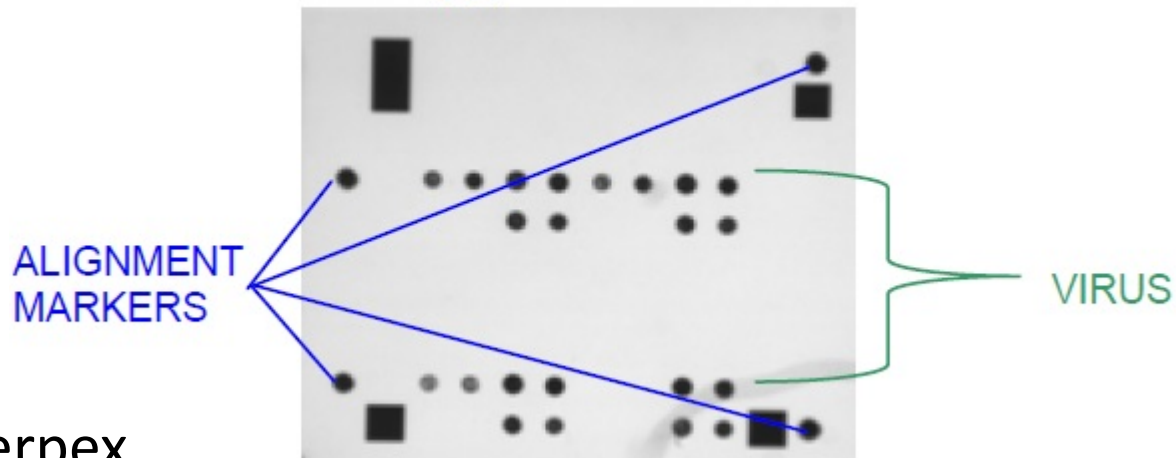
Pneumovir



Adenovirus	Bocavirus
Metapneumovirus A	Coronavirus 229E
Metapneumovirus B	Enterovirus
Parainfluenza 1	Influenza A, subtyping: Seasonal H1N1 Seasonal H3N2 New H1N1
Parainfluenza 2	
Parainfluenza 3	
Parainfluenza 4 subtyping: Parainfluenza 4 A Parainfluenza 4 B	
Rhinovirus	
RSV A	Influenza B
RSV B	Influenza C

Three Clinical Arrays protocols

AT



Enterpex

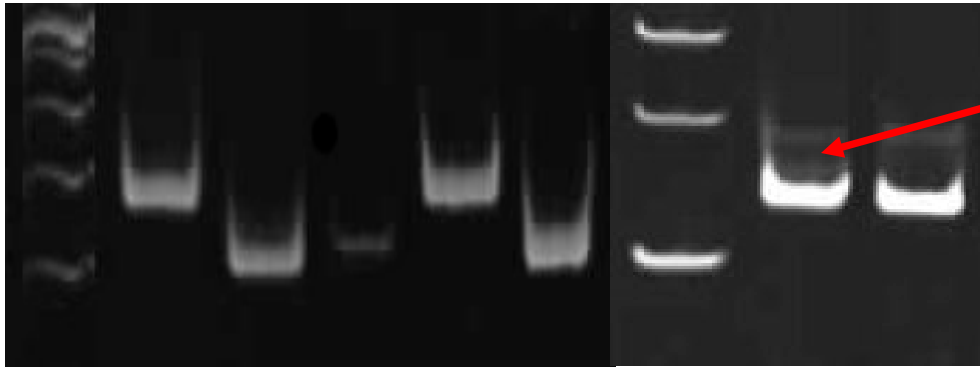


HHV-1	HERPES SIMPLEX VIRUS 1	HSV-1
HHV-2	HERPES SIMPLEX VIRUS 2	HSV-2
HHV-3	VARICELLA ZOSTER VIRUS 3	VZV
HHV-4	EPSTEIN-BARR VIRUS	EBV
HHV-5	CITOMEGALOVIRUS	CMV
HHV-6	HUMAN HERPES VIRUS 6	HHV-6
HHV-7	HUMAN HERPES VIRUS 7	HHV-7
HHV-8	HUMAN HERPES VIRUS 8	HHV-8

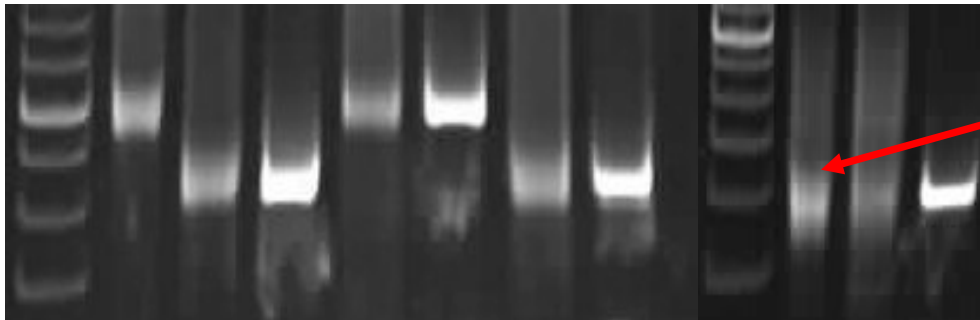
Λεμφώματα

IgH ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

- FNA λεμφαδένων
- Σωματικά υγρά

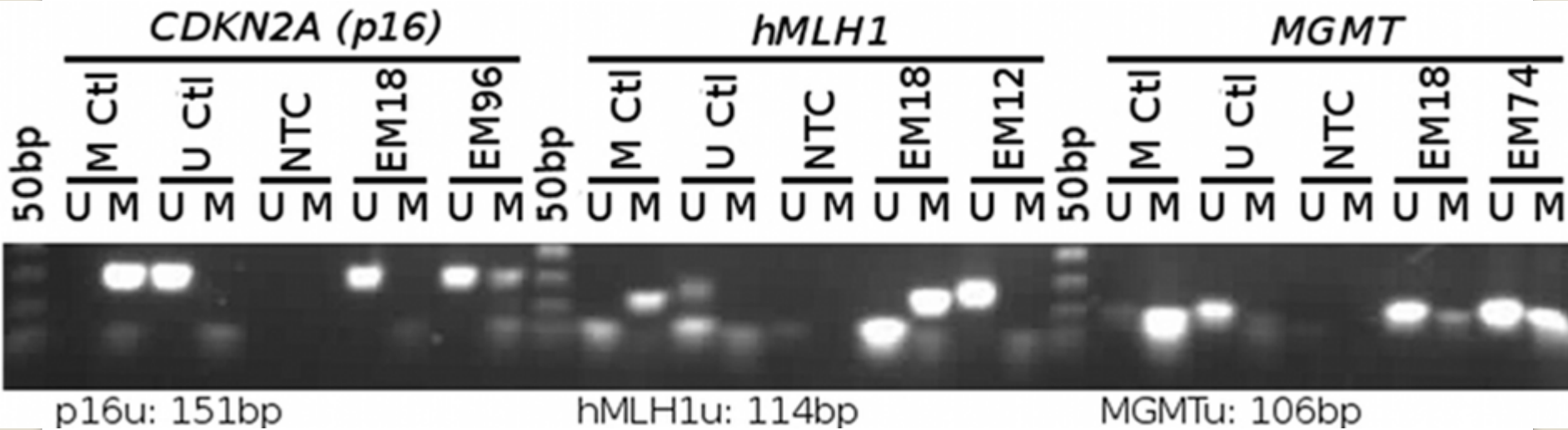


Κλινικό δείγμα με κλωνικά Β λεμφοκύτταρα



Κλινικό δείγμα με φυσιολογικό πληθυσμό Β λεμφοκυττάρων

Methylation Specific PCR



Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδο πολλαπλασιασμού των νουκλεϊκών οξέων/ ταυτοποίησης τροποποιήσεων του γονιδιώματος

όμως.....

- ✓ Απαιτεί ηλεκτροφορητική ανάλυση μετά την αντίδραση
- ✓ Δεν είναι ποσοτική (εκτός από την χρήση ανταγωνιστικής μεθόδου)
- ✓ Υπάρχει κίνδυνος επιμολύνσεων

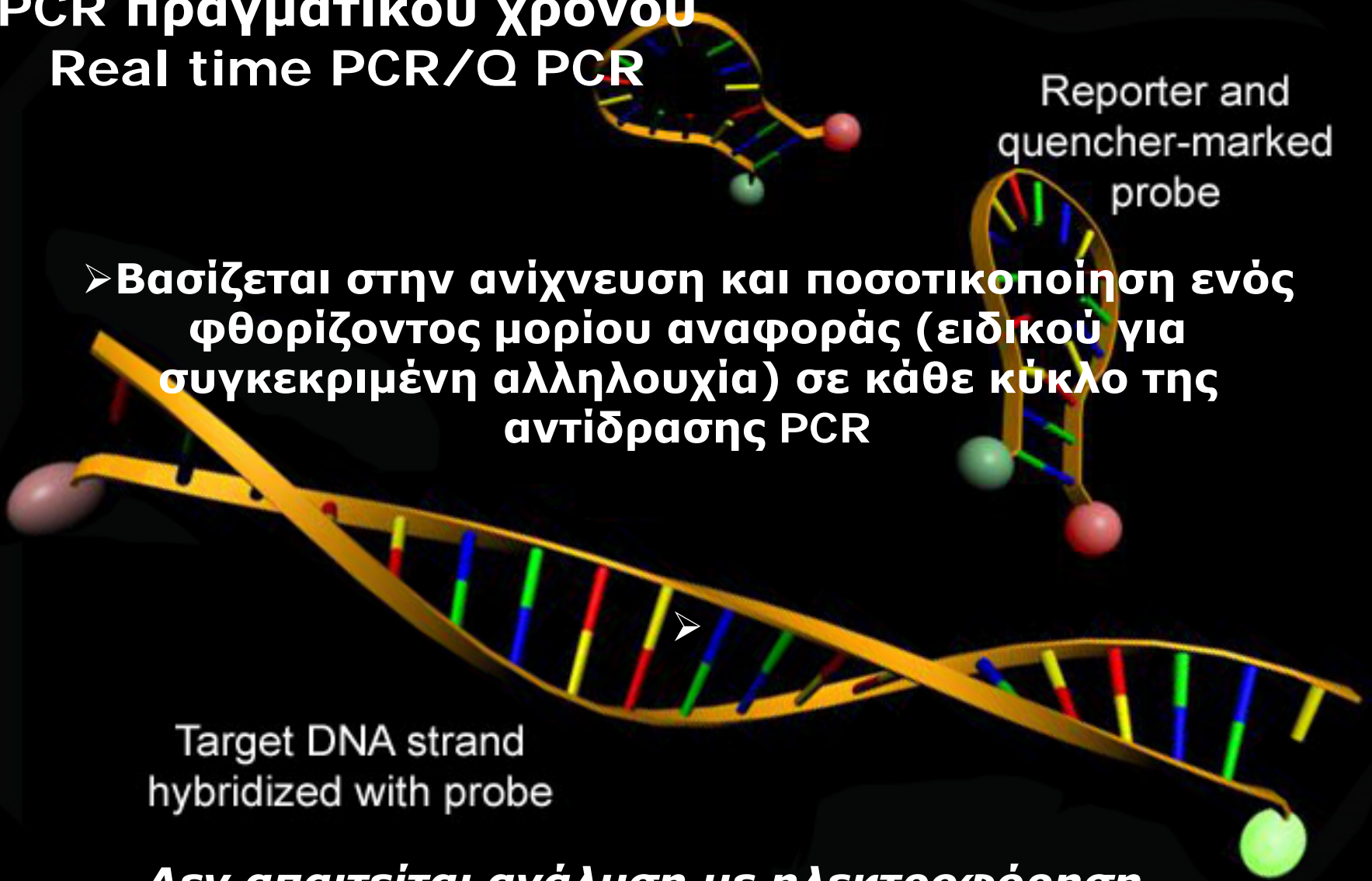
PCR πραγματικού χρόνου Real time PCR/Q PCR

- Βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός φθορίζοντος μορίου αναφοράς (ειδικού για συγκεκριμένη αλληλουχία) σε κάθε κύκλο της αντίδρασης PCR

Reporter and
quencher-marked
probe

Target DNA strand
hybridized with probe

Δεν απαιτείται ανάλυση με ηλεκτροφόρηση



PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

▪ Επιτρέπει

✓ την αδιάλειπτη παρακολούθηση των προϊόντων της PCR κατά την ενίσχυση μέσω της μέτρησης του εκπεμπόμενου φθορισμού των προϊόντων σε κάθε κύκλο (σε πραγματικό χρόνο).

✓ Ταυτοποίηση του κύκλου εισόδου στην εκθετική φάση (κύκλος-κατώφλι) και, της σχετικής ποσοτικοποίησης της μήτρας DNA στην αρχή της αντίδρασης.

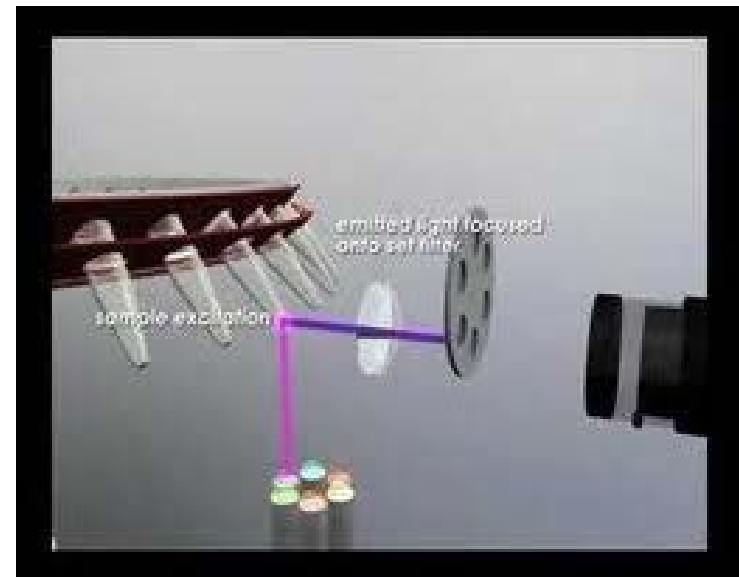
✓ Τα προϊόντα του πολλαπλασιασμού αναλύονται σε πραγματικό χρόνο όπως συντίθενται σε κάθε κύκλο.

PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

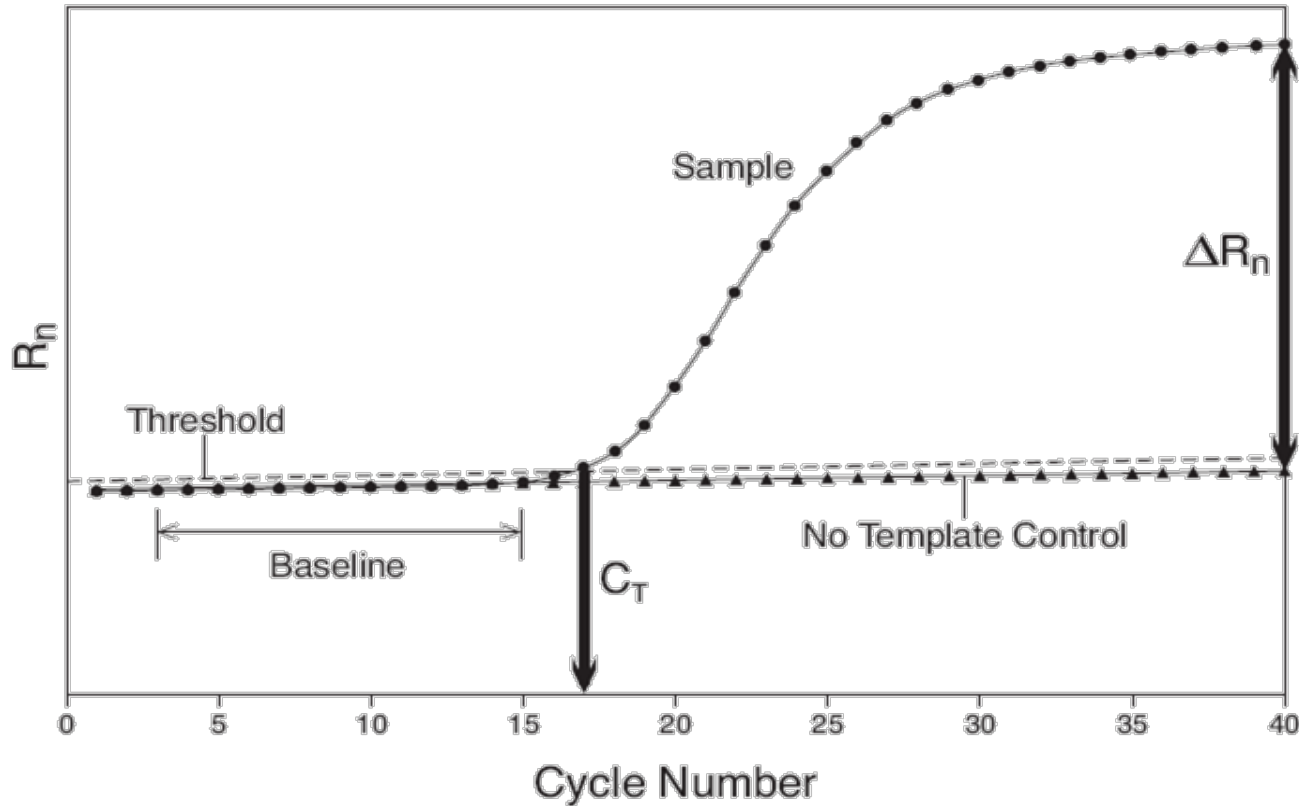
- Απόλυτη ποσοτικοποίηση σύμφωνα

- ✓ Είτε με ένα εσωτερικό μάρτυρα που πολλαπλασιάζεται μαζί με το στόχο, ή

- ✓ Μέσω της χρήσης μιας πρότυπης καμπύλης που σχεδιάζεται μέσω παράλληλου πολλαπλασιασμού μιας σειράς γνωστών συγκεντρώσεων μιας αλληλουχίας αναφοράς.



Η καμπύλη πολλαπλασιασμού



- Η πρώτη σημαντική αύξηση στην ποσότητα του προϊόντος της PCR (C_T – κύκλος - κατώφλι) σχετίζεται με την αρχική ποσότητα της μήτρας (ποσοτικοποίηση)

Χημείες

1. Ιχνηθέτες υδρόλυσης

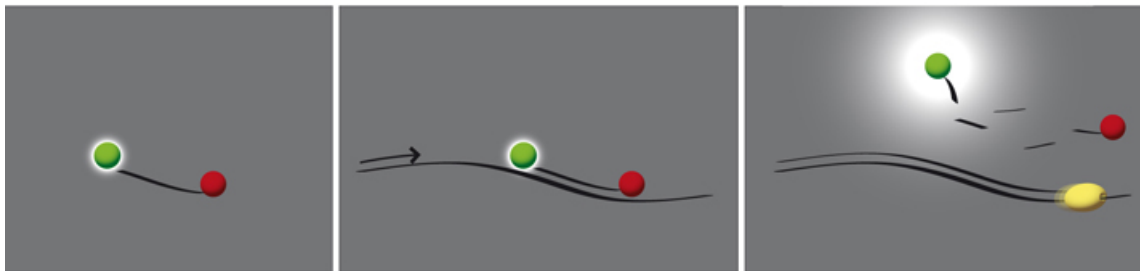
(TaqMan, Beacons, ...)

2. Ιχνηθέτες υβριδοποίησης - FRET

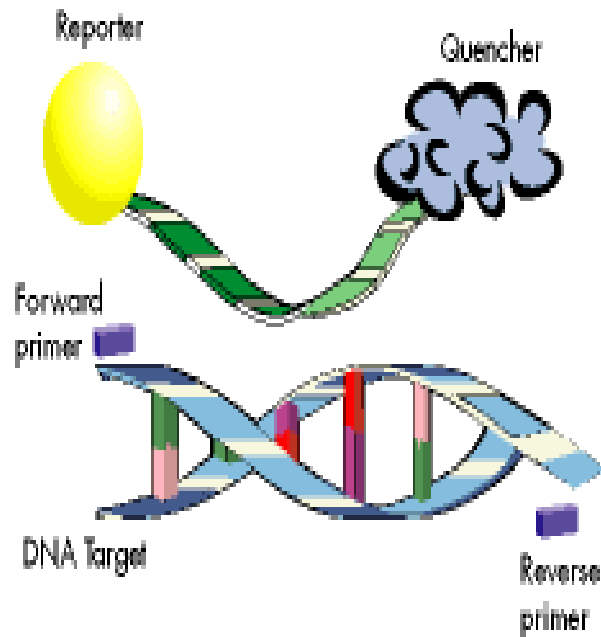
(HybProbes, Simple Probes (Light Cyclor), ...)

3. Φθορίζουσες χρωστικές που δεσμεύονται σε δίκλωνο (ds) DNA

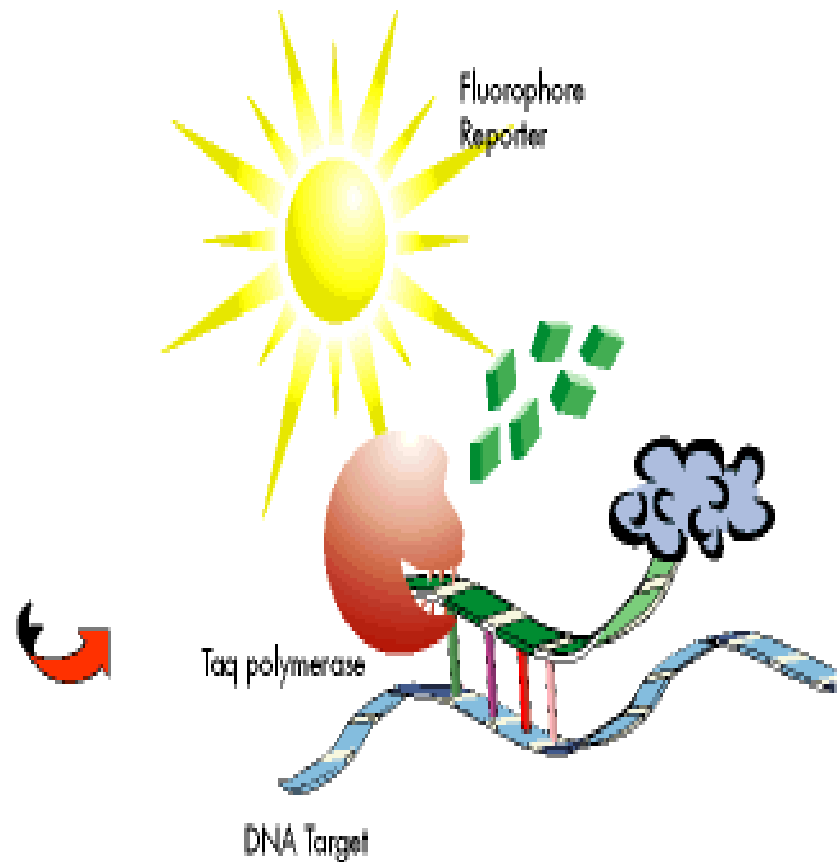
(SYBR Green, Eva Green, LC Green, ...)



Taqman™ probe

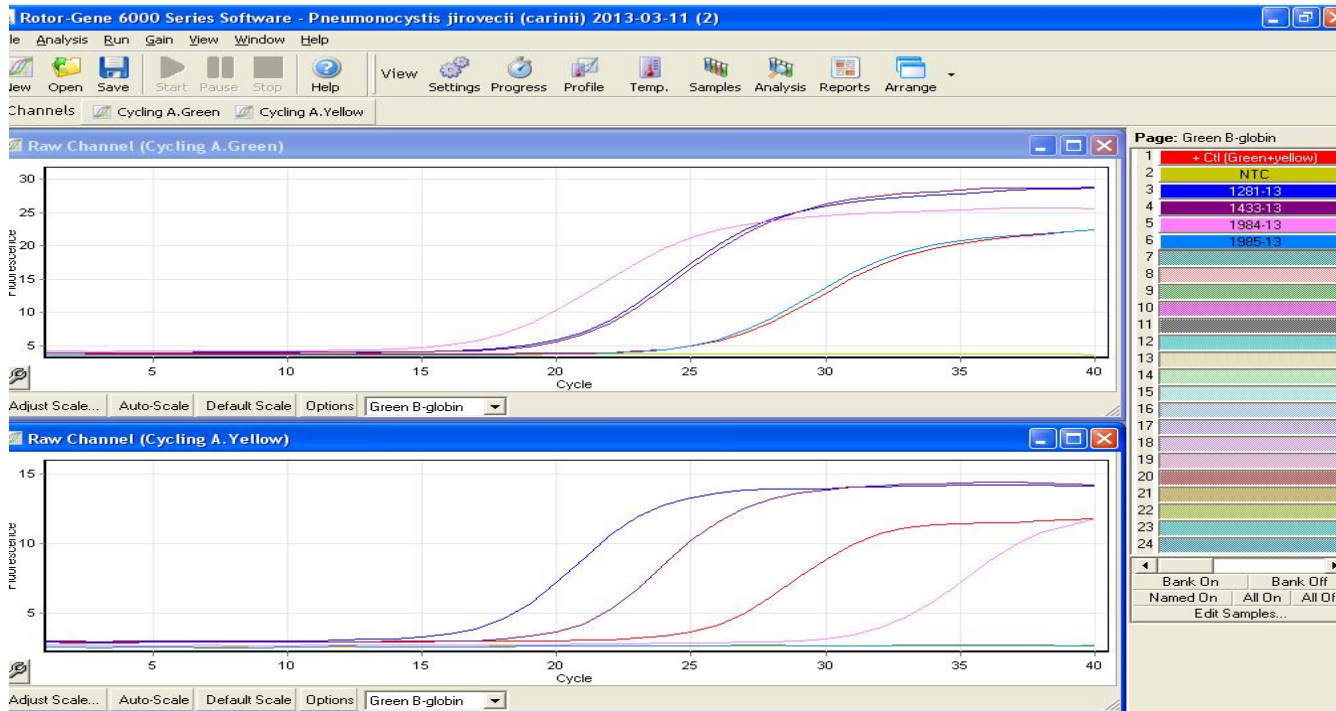


1 Quenching of the fluorescence



2 The Taq polymerase cleaves the Taqman™ probe during each extension cycle. This causes emission of the fluorescence by the free reporter dye.

Real-Time PCR



- Pap test
- Bal
- Pleural fluid
- Sputum
- Lymph node FNA

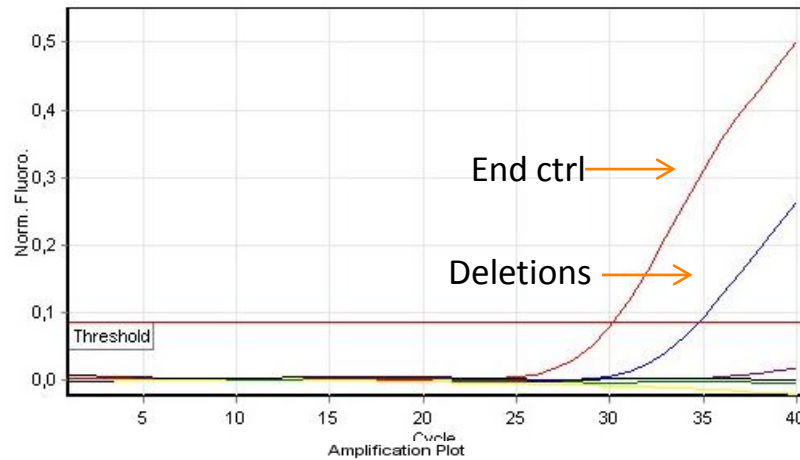
Ανίχνευση

Pneumocystis carinii, Legionella sp., Mycoplasma pn., Chlamydia trachomatis, Chlamidophilla pn., Mycoplasma genitalium, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Mycobacterium tuberculosis, Rotavirus

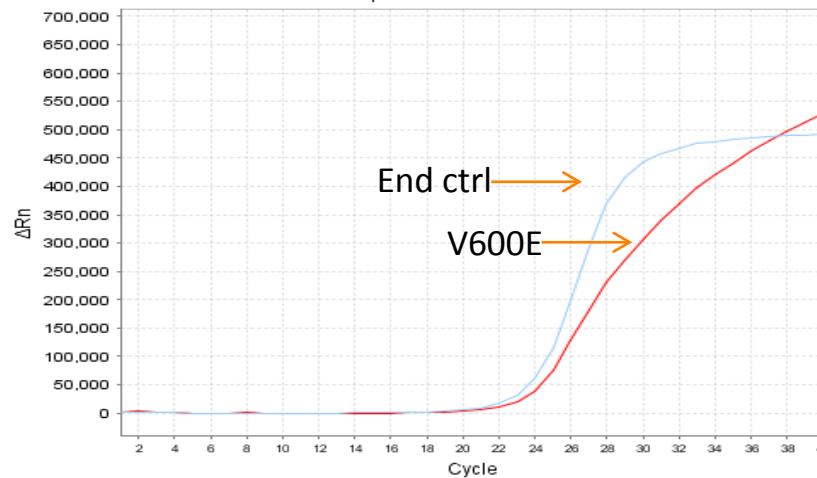
Real-Time PCR

Mutation analysis of *BRAF* and *EGFR* genes

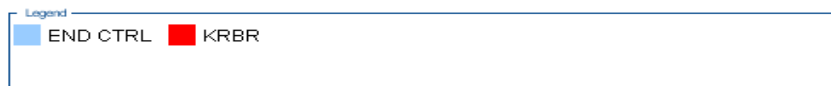
Thyroid FNA
Pleural fluid
Sputum
Colorectal
brushings



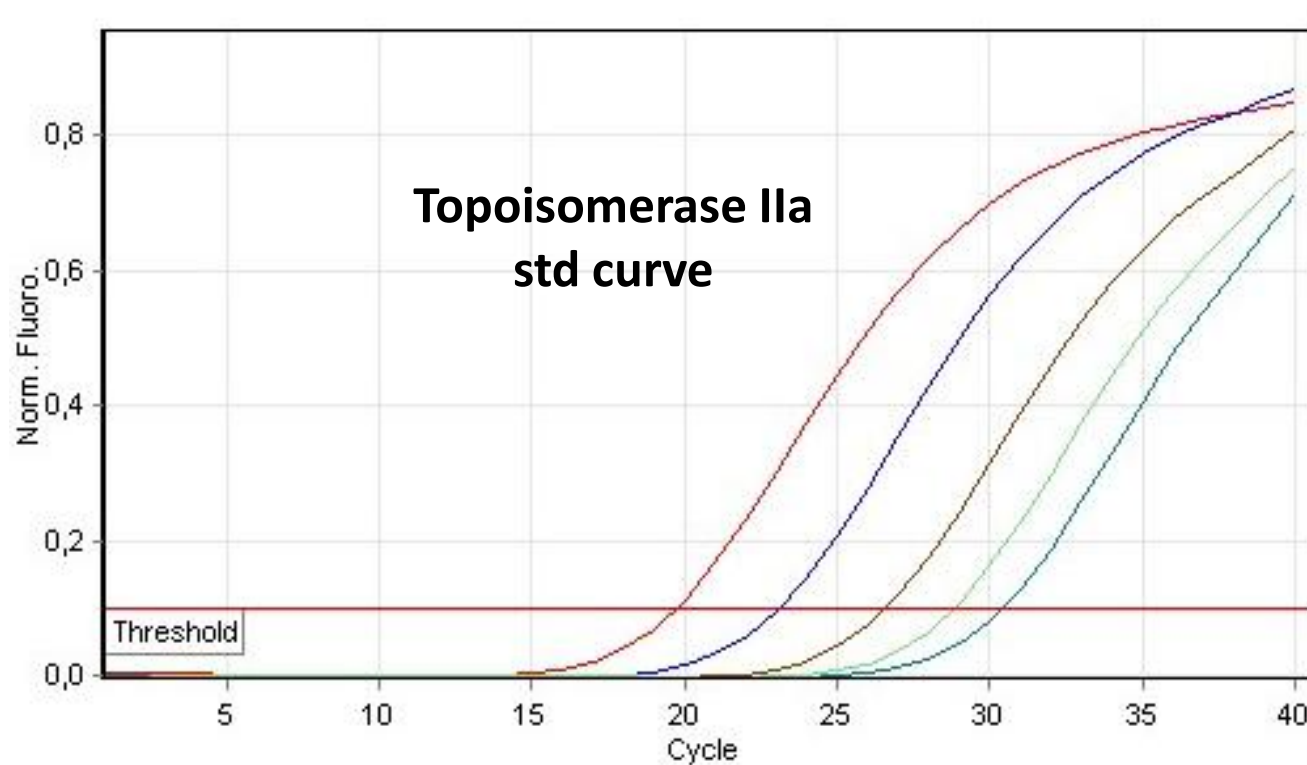
EGFR mutations



BRAF V600E mutation



Gene Expression

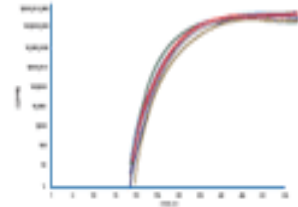


Με την Real time PCR

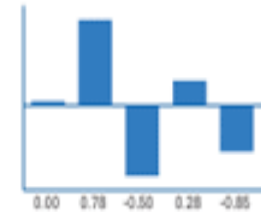
Μειώνεται

- Η ποσότητα της μήτρας που απαιτείται
- Η διάρκεια της ανάλυσης
- Η πιθανότητα επιμόλυνσης
 - Βελτιώνεται η ευαισθησία
 - Η επαναληψιμότητα
 - Ποσοτικοποίηση της αρχικής μήτρας
 - Σχετική
 - Απόλυτη

More sensitive



More Quantitative



Faster—no gel needed



Safer—no ethidium bromide or radioactivity



NucliSens EasyQ[®] HPV (Biomerieux, France)

Clear focus on the key risk factor: Active HPV Oncogenes

HPV DNA Tests

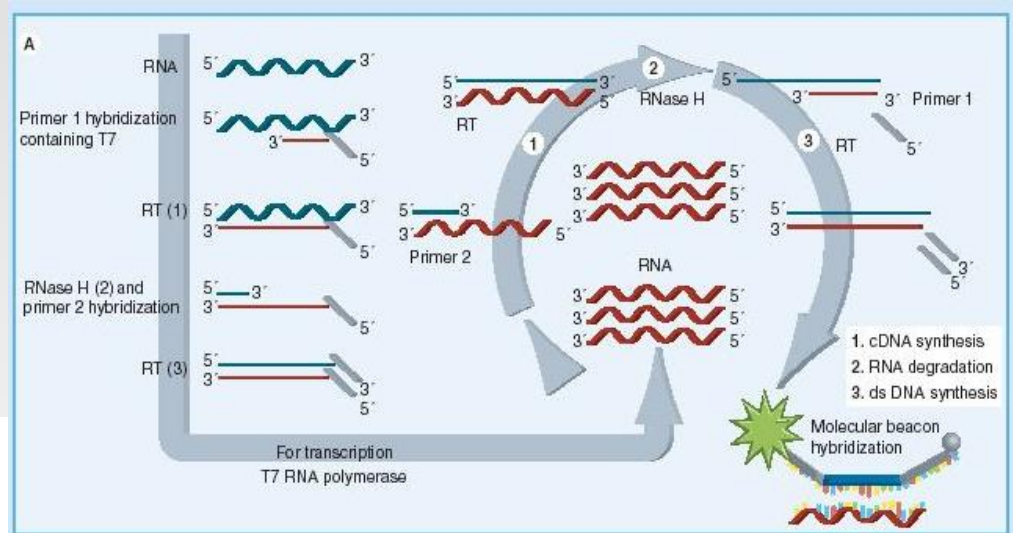
DNA indicates presence of HPV

NucliSENS EasyQ HPV

E6/E7 mRNA indicates activity of HPV oncogenes

E6 E7
E7 E6
E6 E7

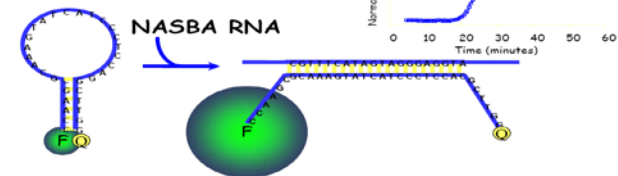
E6/E7 oncoproteins induce cell transformation



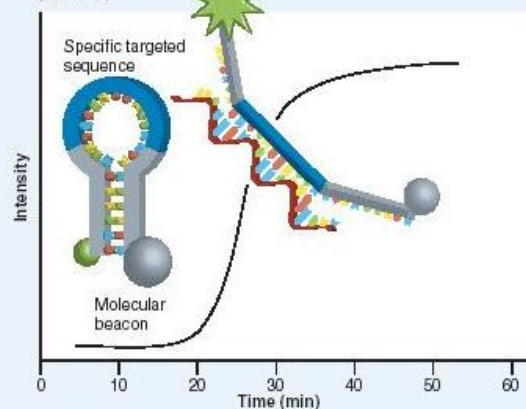
Real-time detection by NASBA

Fluorescence signal

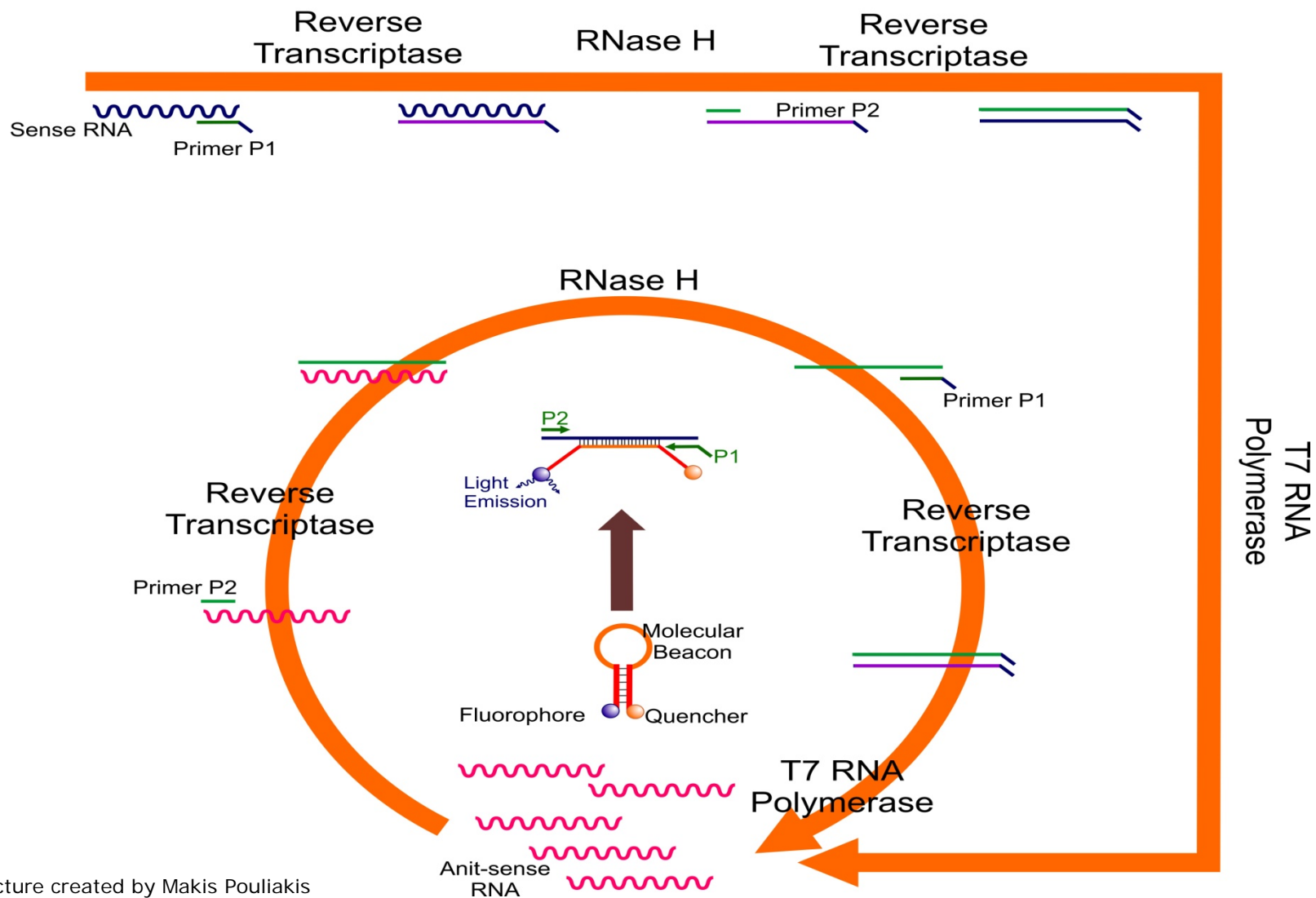
Molecular beacon
DNA probe



B Fluorescent signal
(real time)



NASBA Amplification mechanism



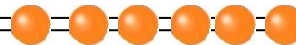
Picture created by Makis Pouliakis

Pyrosequencing

Πυροαλληλούχιση, προσδιορισμός αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού

- ✓ Ανίχνευση μεταλλαγών
- ✓ Ποσοτικοποίηση αλληλίων
- ✓ Μελέτη επιγενετικών μηχανισμών όπως της DNA μεθυλίωσης

PCR primer

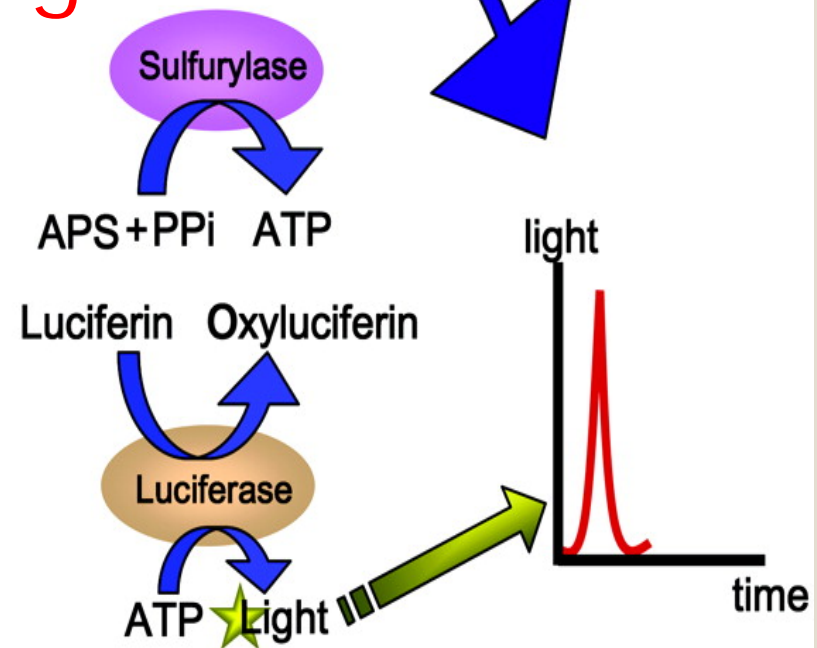
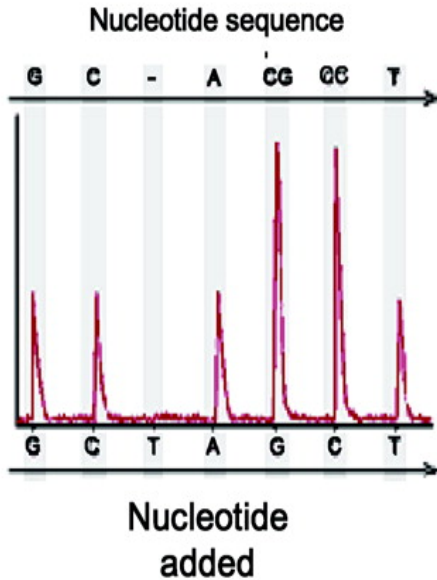
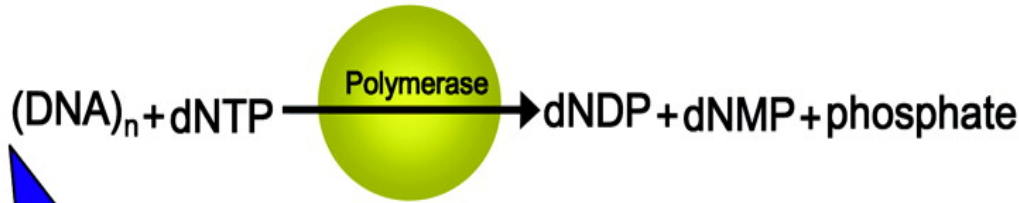


Region of
interest

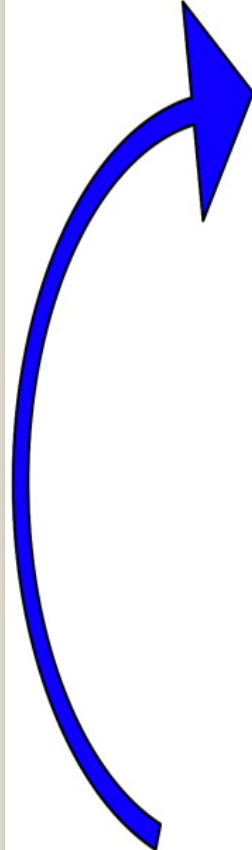


Biotinylated
PCR primer

Pyrosequencing



Nucleotide incorporation generates light seen as a peak in the pyrogram





PyroMark KRAS Assay

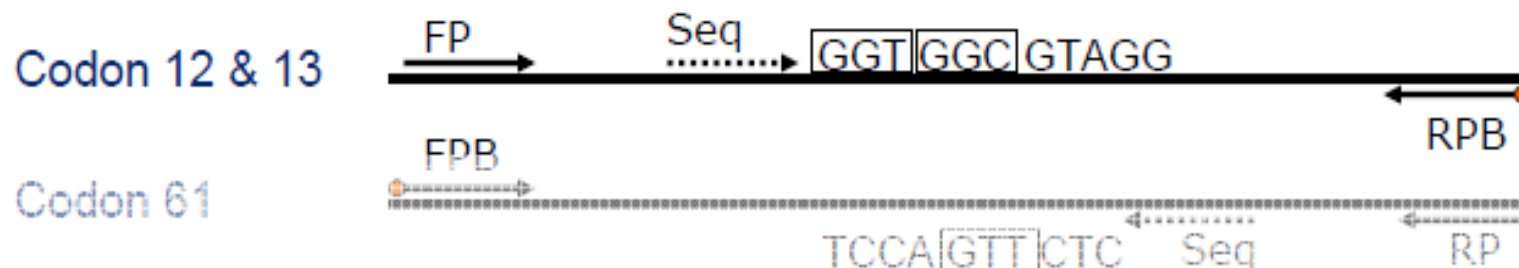
Quantitive results and sequence information



Mutations of importance within codons 12, 13 and 61 of the KRAS gene

- Example of analysis of position 2 in codon 12
Sequence to analyze: GGT GGC GTA GG

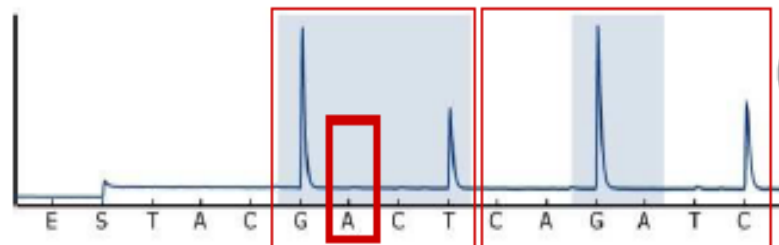
Codons	12	13	61
wt	GGT	GGC	CAA
	TGT	AGC	AAA
	CGT	CGC	GAA
	AGT	TGC	CGA
	GTT	GAC	CCA
	GCT	GTC	CTA
	GAT		CAC
			CAT



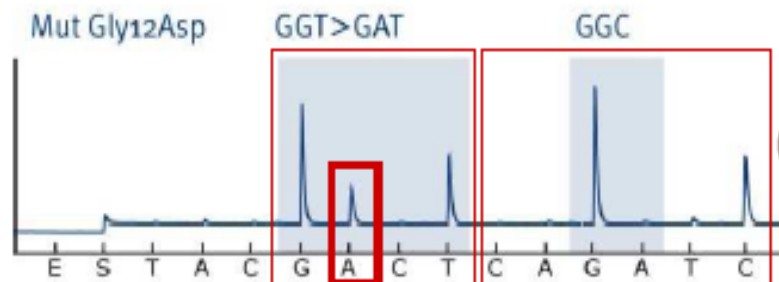


Mutations of importance within codons 12, 13 and 61 of the KRAS gene

- Example of analysis of position 2 in codon 12
- Sequence to analyze: GGT GGC GTA GG
- Normal GGT GGC



Wild type
KRAS



Mutant
KRAS
codon 12

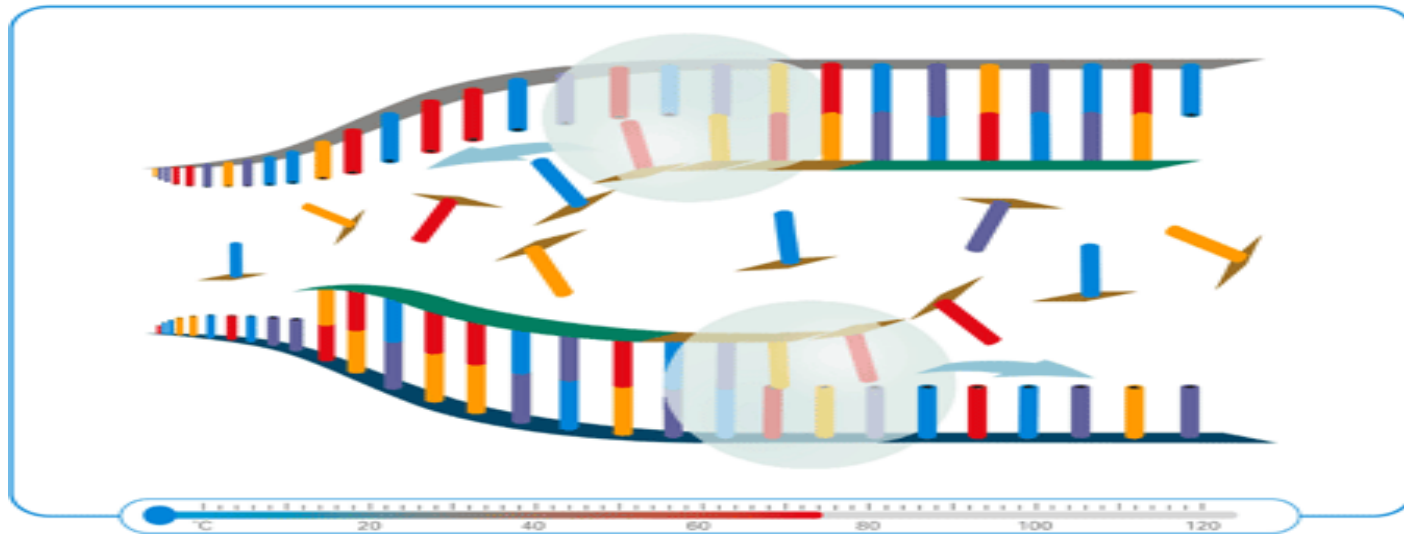
Codon 12 mutation:
GGT > GAT

Codons	12	13	61
wt	GGT	GGC	CAA
	TGT	AGC	AAA
	CGT	CGC	GAA
	AGT	TGC	CGA
	GTT	GAC	CCA
	GCT	GTC	CTA
	GAT		CAC
			CAT

Pyrosequencing technology provides quantitative results and sequence information for sensitive detection of all key KRAS mutations.

Το μέλλον της Μοριακής Βιολογίας

- Προσωποποιημένη Ιατρική
- Στοχευμένη θεραπεία
- Συγκριτική Γενωμική



Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)





Σας ευχαριστώ

web links

<http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>

<http://www.bio-rad.com>

www.roche-applied-science.com

<http://cyclers.gene-quantification.info>

www.biofiredx.com (Idaho technology)

<http://genomics.agilent.com>

<http://www.qiagen.com>

<http://www.lifetechnologies.com>

<http://www.refgenes.org>