



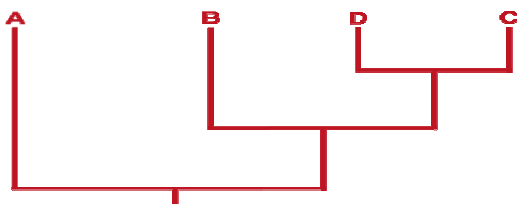
TreeTOPS – ένα εισαγωγικό παιχνίδι για τα φυλογενετικά δέντρα

Η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων παίζει ρόλο “κλειδί” στην κατανόηση των εξελικτικών διαδικασιών. Οι παραδοσιακές μέθοδοι συστηματικής κατάταξης προσπαθούσαν να διαφωτίσουν τις εξελικτικές σχέσεις κλασικών ταξινομικών βαθμίδων όπως είναι τα Φύλα, τα Είδη ή οι Οικογένειες και βασίζονταν σε μορφολογικές παρατηρήσεις και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των οργανισμών. Η σημαντική πρόοδος που συντελείται τα τελευταία χρόνια στον κλάδο της Μοριακής Βιολογίας, έχει φέρει επανάσταση στις φυλογενετικές μελέτες τόσο των οργανισμών, όσο και των μορίων τους. Τεχνικές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η RFLP (restriction fragment length polymorphism) και, πιο πρόσφατα, η αλληλούχηση πλήρων γονιδιωμάτων (whole genome sequencing), μαζί με την αύξηση του αριθμού και του είδους των βιολογικών βάσεων δεδομένων, έχουν διευρύνει σημαντικά το πεδίο των φυλογενετικών μελετών και έχουν επιτρέψει τους επιστήμονες να κατασκευάσουν φυλογενετικά δέντρα βασισμένα στη μοριακή σύσταση των οργανισμών. Μέσω αυτών των εξελίξεων, τα μοριακά δεδομένα έχουν πλέον καταστεί η πρωταρχική πηγή πληροφοριών για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.

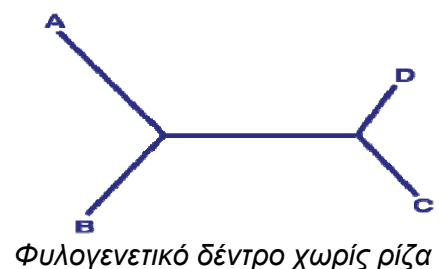
Υπάρχουν πολυάριθμα παραδείγματα σχετικά με το πως η χρήση μοριακών δεδομένων στη φυλογενετική ανάλυση έχει βοηθήσει τη μελέτη της εξέλιξης των οργανισμών. Για παράδειγμα, μέχρι τη δεκαετία του 1970, οι Μύκητες ταξινομούνταν ως ένα Υποβασίλειο των Φυτών. Μέσω της ανάλυσης μοριακών δεδομένων προέκυψε ότι οι Μύκητες είναι ουσιαστικά περισσότερο συγγενικοί με τα ζώα από ότι με τα φυτά. Αυτό οδήγησε σε ριζική ανακατάταξη στην ταξινόμησή τους, οπότε και δημιουργήθηκε ξεχωριστό Βασίλειο, αυτό των Μυκήτων. Επιπλέον, τα μοριακά δεδομένα αλληλουχιών έχουν επιτρέψει στους επιστήμονες να εφαρμόσουν συστήματα ταξινομικής κατάταξης για ιούς, γονίδια και πρωτεΐνες, παρέχοντας έτσι σημαντική γνώση σχετική με ολόκληρο το φάσμα των βιολογικών και ιατρικών επιστημών από την εξέλιξη, την πρωτεομική ως και την ιατρική. Μέσω της χρήσης μοριακών δεδομένων για την αποτίμηση της εξελικτικής συγγένειας βιολογικών μονάδων, η ταυτοποίηση ταξινομικών κοινών προγόνων μεταξύ οργανισμών έχει καταστεί πιο ακριβής. Η πρόοδος αυτή δεν παρέχει μόνο ζωτικής σημασίας στοιχεία για τις εξελικτικές σχέσεις των οργανισμών, αλλά μπορεί να βοηθήσει στην εξεύρεση νέων οργανισμών-μοντέλων ή οργανισμών που είναι οι πιο κοντινοί σύγχρονοι συγγενείς παλαιότερων οργανισμών.

Στα φυλογενετικά δέντρα, ο βαθμός της εξελικτικής σχέσης μεταξύ των χρησιμοποιούμενων μονάδων εκφράζεται ως «συνάρτηση της θέσης κάθε μονάδας ενδιαφέροντος (π.χ. είδος, πληθυσμός, γονίδιο) ως προς την άλλη». Οι μονάδες που είναι περισσότερο συγγενικές μεταξύ τους τοποθετούνται πιο κοντά, ενώ οι μονάδες που είναι λιγότερο συγγενικές μεταξύ τους τοποθετούνται σε διαφορετικούς κλάδους του φυλογενετικού δέντρου. Στο παρακάτω κείμενο συγκρίνονται δύο από τους πιο κοινούς τύπους φυλογενετικών δέντρων και παρουσιάζεται η ορολογία που χρησιμοποιείται στη φυλογενετική ανάλυση.

Φυλογενετικά δέντρα με ρίζα και χωρίς ρίζα



Φυλογενετικό δέντρο με ρίζα



Φυλογενετικό δέντρο χωρίς ρίζα

τοποθέτηση των διαφορετικών “απογόνων” στο δέντρο, δικαιολογούνται μέσω των εξηγήσεων που παρέχουν οι παίχτες για τη δομή του δέντρου σε μια άλλη ομάδα παιχτών ή στον εκπαιδευτικό.

Συμβουλή

Όταν αποφασίζετε για τις “ιεραρχήσεις” και “ομαδοποιήσεις” των βιολογικών μονάδων μέσα στο δέντρο, θυμηθείτε ότι η εξέλιξη στο γενετικό επίπεδο πραγματοποιείται μέσω μικρών αλλαγών όπως είναι οι προσθήκες, οι ελλείψεις, οι διπλασιασμοί, οι αναστροφές και οι αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων ή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

Στήσιμο παιχνιδιού

Οι μαθητές χωρίζονται σε 3 ομάδες των 8 (7) παιχτών: κάθε παίχτης λαμβάνει τυχαία μια από τις “κάρτες απογόνων”. Η “κάρτα κοινού προγόνου” τοποθετείται στη βάση του πίνακα ως σημείο εκκίνησης του φυλογενετικού δέντρου.

Παίζοντας

- 1) “Η κάρτα κοινού προγόνου” τοποθετείται στον πίνακα. Αφού ομαδοποιηθούν, οι παίχτες τοποθετούν τις “κάρτες απογόνων” στον πίνακα με βάση τη δομή που κάθε ομάδα έχει αποφασίσει.
- 2) Οι παίχτες σχεδιάζουν ένα δενδρόγραμμα συνδέοντας τις διαφορετικές κάρτες.
- 3) Όταν ολοκληρωθεί η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου, οι παίχτες εξηγούν τις αποφάσεις τους σχετικά με τη δομή του φυλογενετικού δέντρου σε παίχτες άλλων ομάδων που παίζουν παράλληλα το παιχνίδι ή στον εκπαιδευτικό.
- 4) Μπορεί να γίνει και βαθμολόγηση των δέντρων. Για κάθε νουκλεοτίδιο που αλλάζει, η διαγωνιζόμενη ομάδα χρεώνεται 1 πόντο. Κερδίζει η ομάδα που θα έχει τους λιγότερους πόντους.

Προσαρμογή: Μιχάλης Φιλιόγλου (συνεργάτης του ΕΚΦΕ Αιγάλεω) micfiloglou@hotmail.com από το κείμενο της δραστηριότητας TreeTOPS του ELLS-EMBL υπό την επιμέλεια της Κιούπη Βασιλικής (Βιολόγου-Υπεύθυνης ΤΠΕ ΑΑΕ Πειραιά)

TreeTOPS - Example game

Common Ancestor



EMBL
European Learning
Laboratory for the Life Sciences

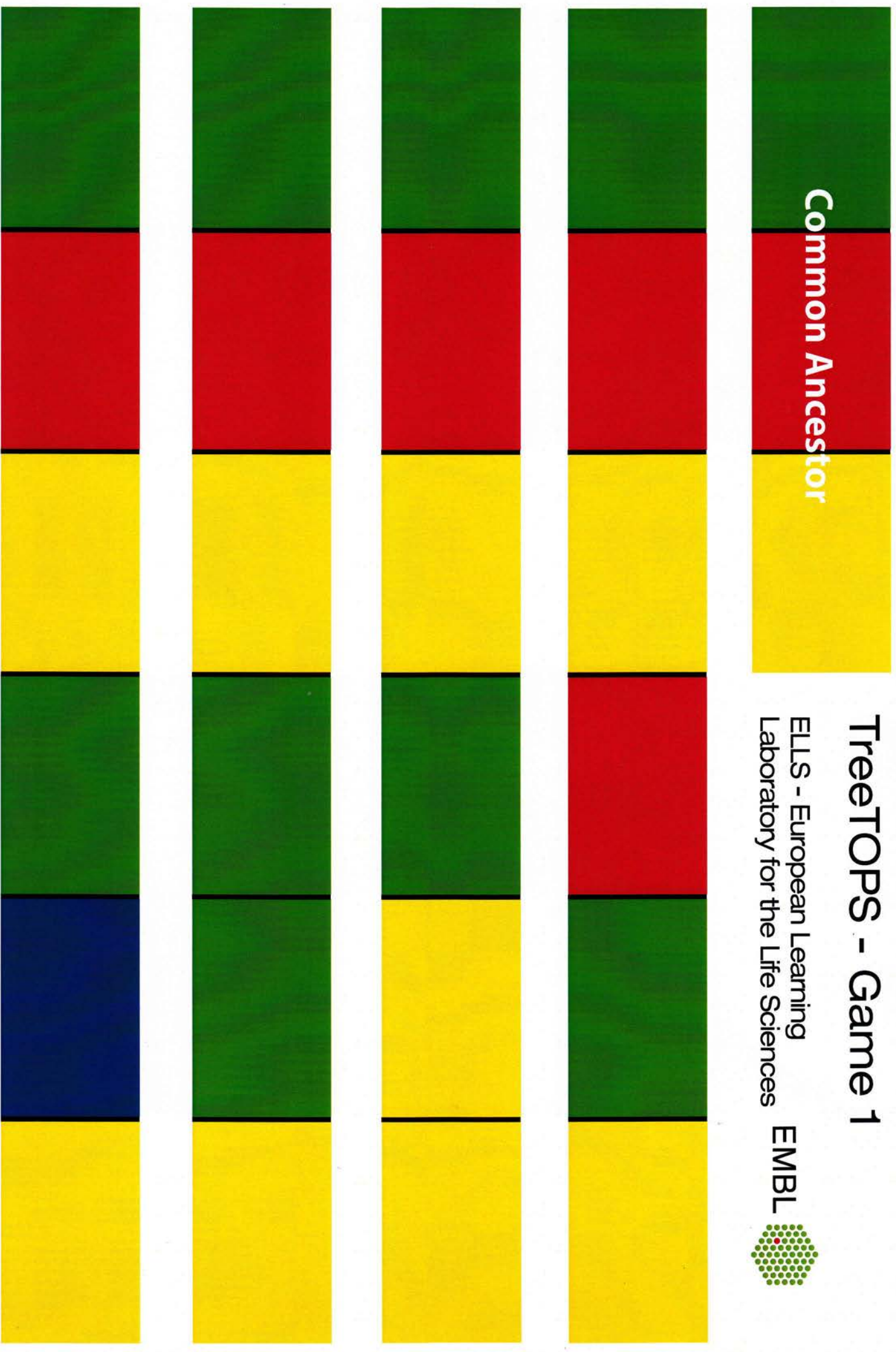


Common Ancestor

TreeTOPS - Game 1

ELLS - European Learning
Laboratory for the Life Sciences

EMBL



TreeTOPS - Game 1

ELLS - European Learning
Laboratory for the Life Sciences



EMBL

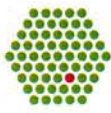


TreeTOPS - Game 2

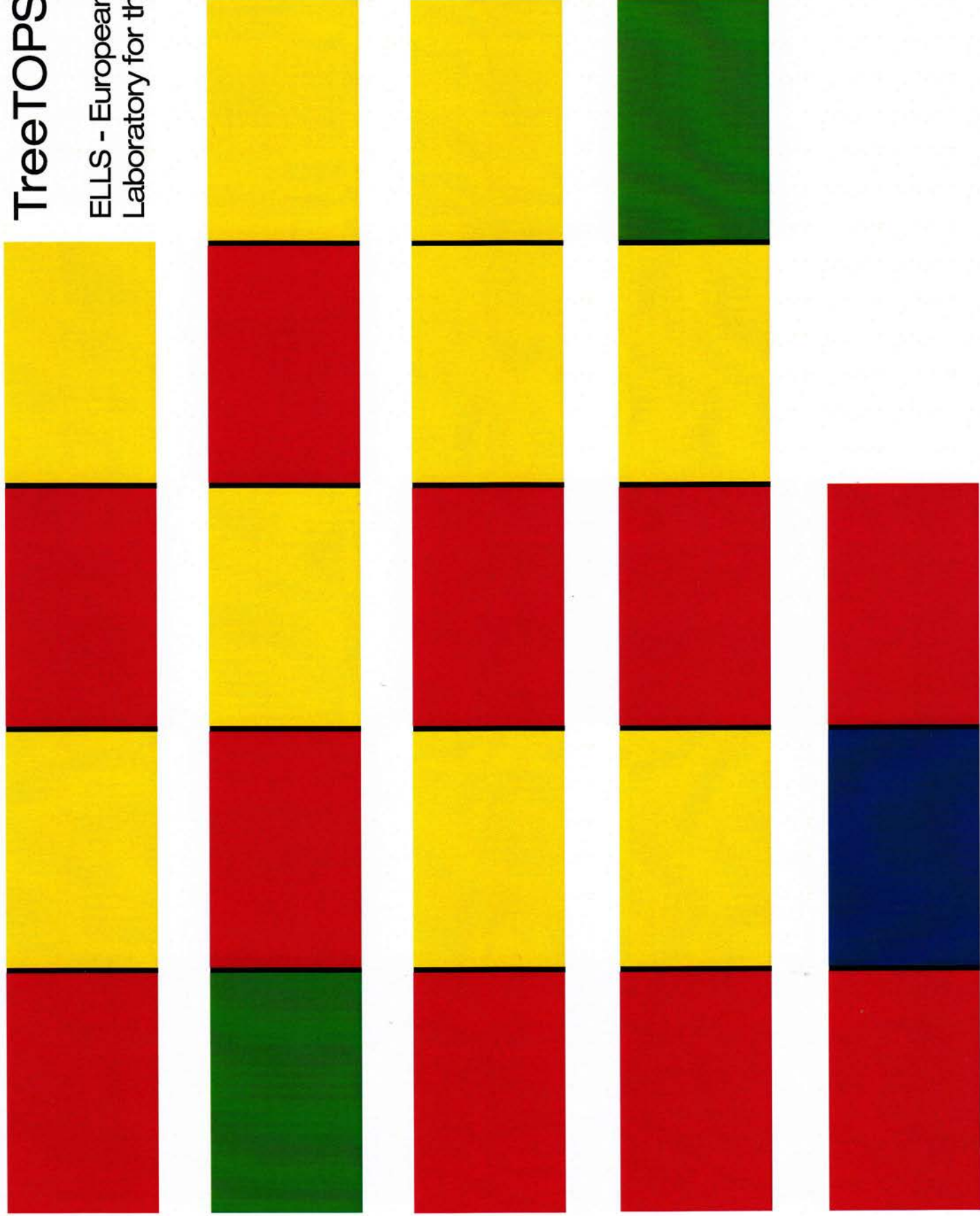


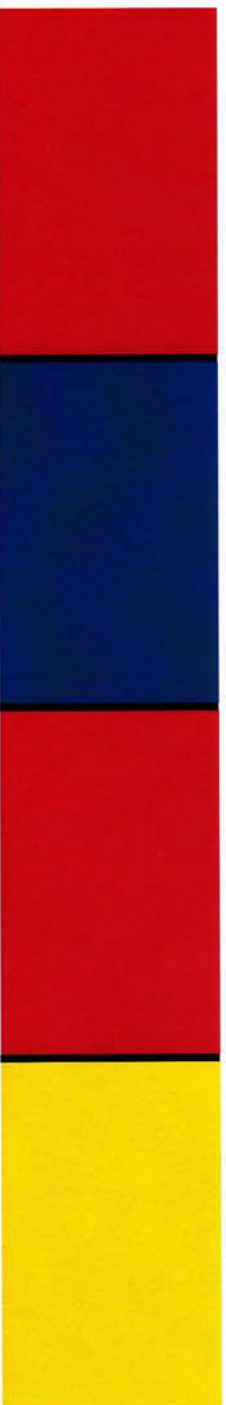
TreeTOPS - Game 2

ELLS - European Learning
Laboratory for the Life Sciences



EMBL





TreeTOPS - Game 2



TreeTOPS - Game 3

ELLS - European Learning
Laboratory for the Life Sciences

EMBL

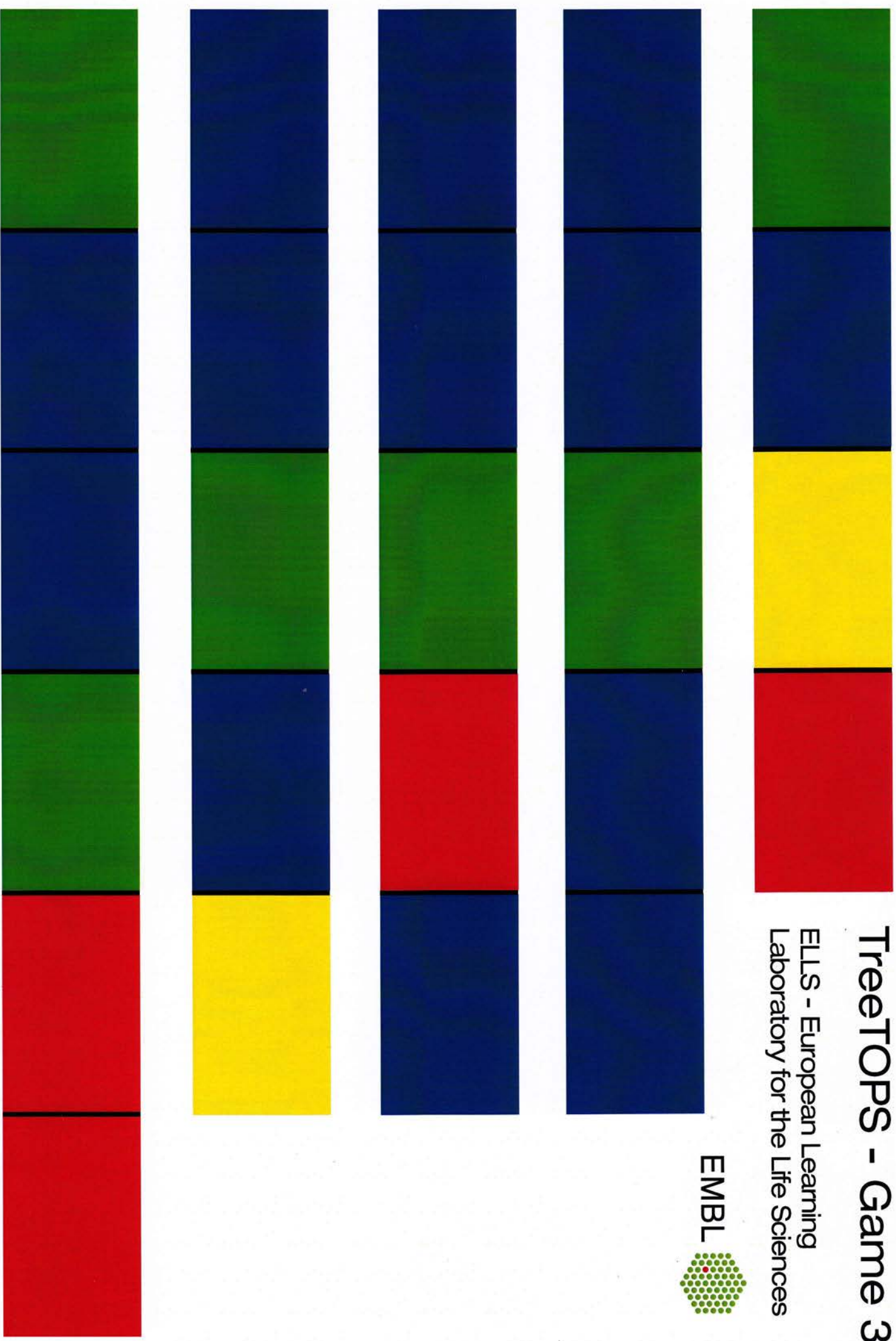


Common Ancestor



TreeTOPS - Game 3

ELLS - European Learning
Laboratory for the Life Sciences



Τι είναι το DNA barcoding?

Το DNA barcoding είναι μια μοριακή μέθοδος για τον προσδιορισμό του είδους σε ζωντανούς οργανισμούς. Η βάση αυτής της μεθόδου είναι να εντοπιστούν « DNA barcodes» δηλαδή γονίδια-δείκτες (marker genes) μήκους περίπου 300-600 νουκλεοτιδίων. Παρόμοια με τα βιομηχανικά barcodes που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων προϊόντων σε ένα κατάστημα, τα DNA barcodes χρησιμοποιούνται για να γίνει διάκριση μεταξύ των ειδών σε μια ομάδα ζωντανών οργανισμών.

Που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διδασκαλία της Βιολογίας?

Στην Γ' Λυκείου, Θετική κατεύθυνση

Στην διευκρίνιση της έννοιας του γονιδίου στην «Έκφραση της γενετικής πληροφορίας/η ροή της γενετικής πληροφορίας».

Στην «τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA», γονιδιωματική βιβλιοθήκη και PCR.

Στις «μεταλλάξεις», ιδιαίτερα στον προγεννητικό έλεγχο.

Στην «γονιδιακή θεραπεία» και το «πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος».

Στην Γ' Λυκείου, Γενική Παιδεία

Στο τρίτο κεφάλαιο της «Εξέλιξης»

3.1 Προετοιμασία αλληλουχιών

Έχετε λάβει μια πρόσθια και μια αντίστροφη αλληλουχία από φυτικό barcode. Πριν αναζητήσετε το barcode σας στο Ευρωπαϊκό Αρχείο Νουκλεοτιδίων (ENA <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/sequence/search>), οι αλληλουχίες της πρόσθιας και αντίστροφης ανάγνωσης πρέπει να συναρμολογηθούν σε μια και μόνο συναινετική αλληλουχία (consensus sequence) που ονομάζεται contig.

Η συναρμολόγηση της αλληλουχίας contig του DNA barcode περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Μετατροπή της αντίστροφης αλληλουχίας στην αντίστροφη συμπληρωματική της
2. Ευθυγράμμιση της πρόσθιας και της αντίστροφης αλληλουχίας
3. Επεξεργασία και συναρμολόγηση της αλληλουχίας συναίνεσης (consensus sequence)

Για να λάβετε την αλληλουχία contig, ακολουθήστε τις οδηγίες στα παρακάτω πεδία. Σε περίπτωση που θα θέλατε περισσότερη καθοδήγηση, παρακαλούμε επισκεφτείτε τη σελίδα "Sequence preparation tutorial".

Αντίστροφη συμπληρωματική αλληλουχία

Για να μπορέσετε να ευθυγραμμίσετε την πρόσθια και την αντίστροφη αλληλουχία, οι δύο αυτές αλληλουχίες θα πρέπει να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη μετατροπή της αντίστροφης αλληλουχίας στην αντίστροφη συμπληρωματική της (δηλαδή τη μετατροπή της 3'-5' σε προσανατολισμό 5'-3').

• **Προχωρήστε όπως περιγράφεται παρακάτω:**

1. Ανοίξτε το αρχείο .seq της αντίστροφης αλληλουχίας σας, χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα επεξεργασίας κειμένου όπως το NotePad για Windows ή το TextEdit για Mac. Το αρχείο .seq περιέχει την αλληλουχία σε FASTA format.
2. Αντιγράψτε ολόκληρη την αλληλουχία συμπεριλαμβανομένου και του συμβόλου ">" και την περιγραφική ονομασία της (Ctrl + C).
3. Επικολλήστε όλες τις πληροφορίες στο πεδίο εισαγωγής του EMBOSS Seqret που θα βρείτε στην ιστοσελίδα http://www.ebi.ac.uk/Tools/sfc/emboss_seqret/ (Ctrl + V). Εναλλακτικά, χρησιμοποιήστε την επιλογή upload για να ανεβάσετε το αρχείο .seq.
4. Στο "Βήμα 1 επιβεβαιώστε ότι η επιλογή "DNA" έχει τεθεί. Στο "Βήμα 2 επιλέξτε "FASTA format" ως input και output format. Για να λάβετε την αντίστροφη συμπληρωματική αλληλουχία, κάντε κλικ στο "More options" και επιλέξτε "Yes" στην επιλογή "Reverse".
5. Κάντε κλικ στο "Submit".
6. Ανοίξτε ένα νέο έγγραφο επεξεργασίας κειμένου στον υπολογιστή σας.
7. Μόλις έχετε διαθέσιμη την αντίστροφη αλληλουχία σας στο πεδίο "Tool Output" του EMBOSS Seqret, αντιγράψτε ολόκληρη την αλληλουχία και επικολλήστε την στο νέο αρχείο κειμένου που δημιουργήσατε (Ctrl + C και Ctrl + V). Για άλλη μια φορά συμπεριλάβετε το σύμβολο ">" και την περιγραφική ονομασία όταν αντιγράψετε την αλληλουχία.
8. Κρατήστε το σύμβολο ">" στην αρχή της αλληλουχίας, αλλά αντικαταστήστε την περιγραφική ονομασία με την "SampleID_RP_RevComp". Αποθηκεύστε το νέο αρχείο κειμένου ως "SampleID_RP_RevComp" στην επιφάνεια εργασίας σας. Προχωρήστε στο πεδίο "Ευθυγράμμιση" για να ευθυγραμμίσετε τις αλληλουχίες σας.

Η αντίστροφη αλληλουχία, της οποίας λήφθηκε η αντίστροφη συμπληρωματική (reverse complement), μπορεί πλέον να ευθυγραμμιστεί με την πρόσθια αλληλουχία. Η ευθυγράμμιση θα αποκαλύψει την αλληλουχία συναίνεσης (consensus sequence), όπως και όσα νουκλεοτίδια δεν ταιριάζουν στις δύο αλληλουχίες ή λείπουν από κάποια αλληλουχία (πρόσθια ή αντίστροφη). Οι νουκλεοτιδικές θέσεις που παρουσιάζουν διαφορές (mismatches) ή κενά (gaps) μπορούν έπειτα να διασταυρωθούν με την πληροφορία που μας δίνει το χρωματογράφημα (> πεδίο "Χρωματογράφημα") της πρόσθιας και της αντίστροφης αλληλουχίας και έτσι να συναρμολογηθεί μια αλληλουχία συναίνεσης για το barcode που διαθέτετε.

Προχωρήστε όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Ανοίξτε το αρχείο .seq της πρόσθιας αλληλουχίας σας. Αντιγράψτε και επικολλήστε ολόκληρη την αλληλουχία με το σύμβολο ">" και την περιγραφική ονομασία (Ctrl + C και Ctrl + V) στο πρώτο πεδίο εισαγωγής του EMBOSS Needle που θα βρείτε στην ιστοσελίδα http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.
2. Ανοίξτε το αρχείο "SampleID_RP_RevComp". Αντιγράψτε και επικολλήστε ολόκληρη την αλληλουχία με το σύμβολο ">" και την περιγραφική ονομασία (Ctrl + C) στο δεύτερο πεδίο εισαγωγής του EMBOSS Needle που θα βρείτε παρακάτω. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήστε την επιλογή upload για να ανεβάσετε την πρόσθια και την επεξεργασμένη αντίστροφη αλληλουχία.
3. Διατηρήστε τις ρυθμίσεις που είχατε κάνει στο "Βήμα 2" και κάντε κλικ στο "Submit".
4. Μόλις η ευθυγράμμιση είναι διαθέσιμη, κάντε κλικ στο "View alignment file" και πηγαίστε πιο κάτω για να μελετήσετε την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών.

Ένα παράδειγμα του πως να ερμηνεύσετε το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης μπορείτε να βρείτε στη σελίδα tutorial page (> “Alignment” tab > 4.).

Προαιρετικά βήματα

5. Ανοίξτε το χρωματογράφημα της πρόσθιας και αντίστροφης αλληλουχίας μέσω των αρχείων .ab1 χρησιμοποιώντας κάποιον κατάλληλο chromatogram viewer. Για ευκολότερη ανάλυση, μετατρέψτε την αντίστροφη αλληλουχία στην αντίστροφη συμπληρωματική της (Chromas Lite: “Edit” > “Reverse+Complement”; 4Peaks: “Edit” > “Flip sequence”).

6. Ετοιμάστε ένα αρχείο στο οποίο θα αποθηκεύσετε την αλληλουχία contig σε FASTA format. Ανοίξτε ένα νέο αρχείο κειμένου στο υπολογιστή σας και αντιγράψτε ολόκληρη την πρόσθια αλληλουχία από το αρχείο .seq στο νέο αρχείο (Ctrl + C και Ctrl + V). Κρατήστε το σύμβολο “>” στην αρχή της αλληλουχίας, αλλά αντικαταστήστε την περιγραφική ονομασία με την “SampleID_Contig”. Αποθηκεύστε το αρχείο σας ως “SampleID_Contig” στην επιφάνεια εργασίας.

7. Ελέγξτε την αλληλουχία για κενά και νουκλεοτίδια που δεν ταιριάζουν. Για κάθε κενό ή διαφορά που βρίσκετε πηγαίnete στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα της πρόσθιας και αντίστροφης αλληλουχίας (μπορείτε να χρησιμοποιήσετε την αναζήτηση – search – και να βρείτε τη θέση που επιθυμείτε μέσα την αλληλουχία). Συγκρίνετε στα δύο χρωματογραφήματα τις κορυφές στις συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές θέσεις και αποφασίστε αν η πρόσθια ή η αντίστροφη αλληλουχία είναι πιο αξιόπιστη. Μπορείτε, επίσης, να εντοπίσετε την ταυτότητα κάθε “άγνωστου” νουκλεοτιδίου. Στο αρχείο “SampleID_Contig” επεξεργαστείτε την αλληλουχία σας με βάση την ανάλυση που κάνατε (θυμηθείτε ότι έχετε αντιγράψει την πρόσθια αλληλουχία).

8. Μόλις έχετε ολοκληρώσει όλη την απαραίτητη επεξεργασία, θα έχετε συναρμολογήσει την αλληλουχία contig του barcode του δείγματός σας. Επιβεβαιώστε ότι αποθηκεύσατε το αρχείο!

Μπορείτε πλέον να κάνετε αναζήτηση του barcode σας στη βάση δεδομένων (ENA). Για να το κάνετε αυτό, προχωρήστε στη σελίδα “Αναζήτηση στη Βάση δεδομένων” (“Database search”).

3.2 Αναζήτηση στη βάση δεδομένων

Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες που δίνονται παρακάτω για να ταυτοποιήσετε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που ταιριάζουν με το barcode σας στη βάση δεδομένων ENA.

1. Αντιγράψτε ολόκληρη την αλληλουχία contig από το αρχείο κειμένου “SampleID_Contig”, συμπεριλαμβανομένου του συμβόλου “>” και της περιγραφικής ονομασίας, στο πεδίο αναζήτησης της ENA που θα βρείτε στην ιστοσελίδα <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/sequence/search> (Ctrl + C και Ctrl + V). Εναλλακτικά, χρησιμοποιήστε τη λειτουργία upload για να “ανεβάσετε” το αρχείο κειμένου σας.
2. Στο πεδίο “Search against” επιλέξτε “Assembled and annotated sequences” και “Limit sequence by” > “Data class” > “Standard sequences (STD)”.
3. Ξεκινήστε την αναζήτηση κάνοντας κλικ στο “Submit” (μπορεί να χρειαστεί να ψάξετε στα αριστερά της σελίδας για να βρείτε το κουμπί “Submit”). Η αλληλουχία που

καταθέσατε θα συγκριθεί με όλες τις γνωστές αλληλουχίες που περιέχονται στη βάση δεδομένων και τα βέλτιστα αποτελέσματα θα εμφανιστούν.

4. Στον πίνακα “Summary table” θα δείτε τα πρώτα 50 αποτελέσματα της αναζήτησής σας.

Κάντε κλικ εδώ για να δείτε τους ορισμούς της στήλης των αποτελεσμάτων σας. Λόγω προεπιλογής, τα αποτελέσματα της αναζήτησης είναι ταξινομημένα ανάλογα με ανάλογα με τη βαθμολογία τους (“Score”), το αποτέλεσμα με το μέγιστο score βρίσκεται στην κορυφή. Τα αποτελέσματα μπορούν να ταξινομηθούν με βάση άλλες παραμέτρους στη στήλη των αποτελεσμάτων, κάνοντας κλικ στα βέλη up/down. Παρόλα αυτά, για τους σκοπούς της ταυτοποίησης του βέλτιστου αποτελέσματος, καλό θα ήταν να διατηρήσετε την ταξινόμηση των αποτελεσμάτων ανάλογα με το Score τους.

5. Για να εντοπίσετε το βέλτιστο αποτέλεσμα, προχωρήστε όπως περιγράφεται παρακάτω: ταξινομήστε τα αποτελέσματά σας ανάλογα με Score τους (αυτό με το μεγαλύτερο στην κορυφή), αν αυτό δεν έχει ήδη γίνει. Το αποτέλεσμα με το μεγαλύτερο Score και τη μικρότερη τιμή E-value είναι το βέλτιστο. Σε περίπτωση που υπάρχουν πολλαπλές αλληλουχίες που εμφανίζουν το συνδυασμό μεγαλύτερου Score και μικρότερης E-value, επιλέξτε αυτό με το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας (% identity).

Σε περίπτωση που υπάρχουν δύο ή περισσότερα αποτελέσματα με όμοια Score/E-value/% identity, η βάση δεδομένων δε μπορεί να διακρίνει μεταξύ των εγγραφών (π.χ. λόγω ανακρίβειών στην αλληλουχία που εισάγατε) ή μπορεί να μη διαθέτει εγγραφή για το είδος σας. Αν η τελευταία περίπτωση είναι αυτή που συμβαίνει, καταγράψτε όλα τα αποτελέσματα με τις υψηλότερες τιμές. Μπορεί να είστε σε θέση να ταυτοποιήσετε το δείγμα σας σε επίπεδο γένους.

6. Μπορείτε να ταυτοποιήσετε το καλύτερο αποτέλεσμα που επιστρέφει η βάση δεδομένων για την αλληλουχία σας; Σε ποιόν οργανισμό ανήκει; Μπορείτε να ταυτοποιήσετε το δείγμα σας σε επίπεδο γένους, ή ακόμη και σε επίπεδο είδους;