

## Dokazovanje variabilnosti

Kariotipizacija, izolacija nukleinskih kislin,  
hibridizacija, PCR v realnem času

Celična biologija z genetiko

1. letnik UŠ LBM, št. leto  
2012/13



## Viri

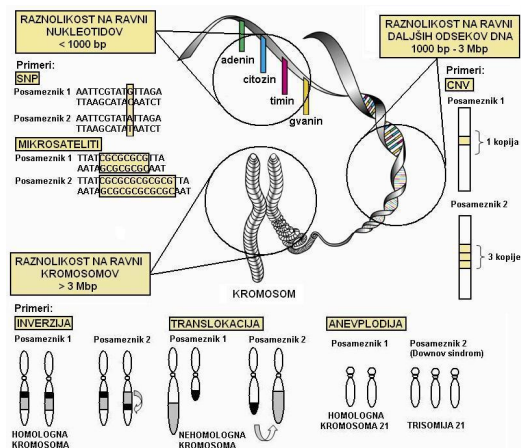
- Human Molecular Genetics, Tom Strachan & Andrew P. Read, BIOS, UK
- Emery's elements of medical genetics, Robert F. Mueller & Ian D. Young, Churchill Livingstone

### Animacije:

- <http://learn.genetics.utah.edu/>
- [http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student\\_view0/chapter16/animations.html](http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student_view0/chapter16/animations.html)



## Genetska raznolikost



## Metode detekcije genetskih različic

Različice	Dolžina	Detekcija
Mikroskopske	> 3 Mbp	S pomočjo mikroskopa (analiza kariotipa)
Submikroskopske	~ 1 kbp - ~ 3 Mbp	Tehnologija mikromrež Primerjalna analiza zaporedij DNA
Kratke	< 1 kbp	Metode, osnovane reakciji PCR, ki jim sledi analiza zaporedja nukleotidov



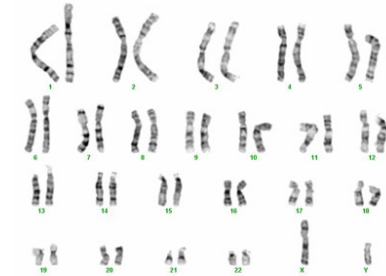
## Vrste genetskih obolenj

- **Kromosomske nepravilnosti**
  - Zaostalost v rasti in duševnem razvoju
  - 15% spontanih splavov, 50% neuspešnih oploditev
- **Monogenska obolenja**
  - Se dedujejo po **Mendlovih zakonih**
  - Poznamo več kot 10 000 obolenj (vendar so redka)
- **Poligena (večfaktorska obolenja)**
  - Mnogo kroničnih obolenj z dobro opisanimi fenotipi, vendar brez dokončne povezave z genotipom – obstaja **nagnjenje** za razvoj bolezni
- **Okvare somatskih (tkivnih) celic**
  - Različne vrste raka
- **Približno 3% rojenih otrok ima signifikantne genetske okvare, ki vodijo v bolezen in/ali zgodnjo smrt**



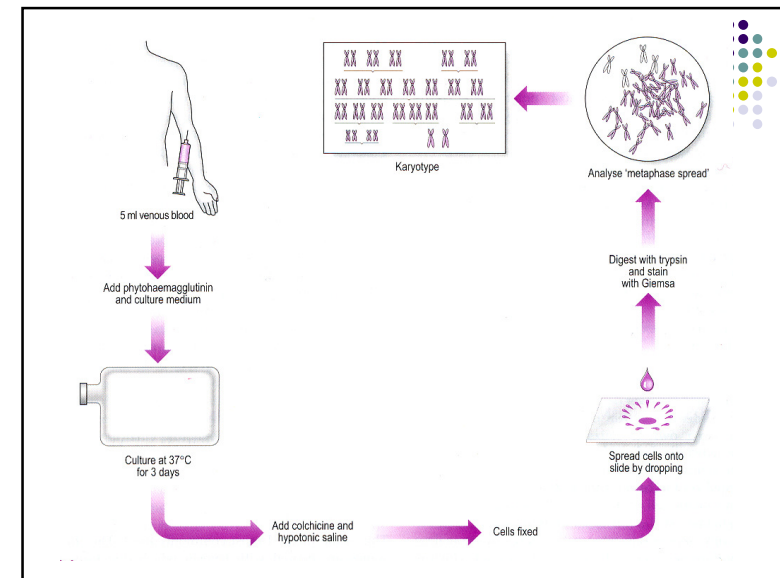
## Ugotavljanje sprememb genoma na ravni kromosomov (I)

- Posameznikov nabor kromosomov = **kariotip**
- **Kariogram** je slika (fotomikrografija) posameznikovih kromosomov, razvrščenih na standarden način:



## Ugotavljanje sprememb genoma na ravni kromosomov (II)

- Najpogosteje se kot vzorec uporabi kri (limfociti v periferni krvi)
- Krvne celice gojimo *in vitro* v sterilnih pogojih in 37°C tri dni (= **celična kultura**) → celice se delijo
- Nato dodamo celični kulturi **kolhicin** (inhibitor nastanka delitvenega vretena) → zaustavitev celične delitve v **metafazi**
- Dodatek hipotonične raztopine za lizacijo eritrocitov
- Celice fiksiramo, damo na objektno steklo in pred mikroskopiranjem pobarvamo = **metafazni razmaz**



## Ugotavljanje sprememb genoma na ravni kromosomov (III)

- Naredimo digitalno sliko mikroskopskega preparata
- S posebno programsko opremo "zložimo" kromosome po vrsti



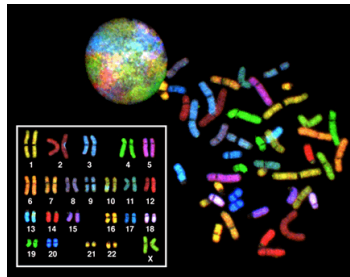
## Analiza kariotipa

- Določitev **število kromosomov** (običajno se analizira genom 10-15 celic)
- Analiza **vzorca prog** (po barvanju po Giemsi, običajno 3-5 metafaznih razmazov)
- Novejši načini barvanja: **FISH** (fluorescence in situ hybridization) = fluorescentne sonde specifične za posamezen kromosom; sonde, ki prepoznajo telomere, centromere; sonde, ki prepoznajo specifična zaporedja, ...



## Novejše metode analize kariotipa – večbarvni FISH

- **SKY** = večbarvna spektralna kariotipizacija (*Spectral Karyotyping* - SKY™)
- **Multipli FISH** (*Multiplex FISH* - M-FISH)



## Kromosomske nepravilnosti

- Starejša kot je oocita (jajčece) = bolj verjetno bo prišlo do **napake v razporeditvi kromosomov med mejozo** (po 35 letu eksponentna rast)
- **Numerične (številčne)** kromosomske nepravilnosti
  - Aneuploidija
  - Poliploidija
- **Strukturne** kromosomske nepravilnosti
  - Translokacije
  - Delecije, inverzije, insercije

<http://www.e-um.si/lessons/844/>



### Primeri kromosomskih nepravilnosti

- Numerične nepravilnosti- non-disjunction
- Strukturne:
  - translokacije
  - delecije
  - Insercije
  - incerzije

Raznolikost zaporedja:

**delecija** [A | C]

**insercija** [A | B | D | C]

**inverzija** [C | B | A]

**sprememba v številu ponovitev** [A | A | A | B | C]

## Numerične kromosomske nepravilnosti (I)

- Vzrok je **nepravilna mejoza** → **gamete nimajo ustreznega števila kromosomov**

Meiosis

1st division

2nd division

Normalne gamete

2nd division nondisjunction

Do napake lahko pride že med prvo delitvijo – mejozo I

**Nepravilna mejoza:**

Ena gameta ima dva homologna kromosoma, druga nobenega

## Numerične kromosomske nepravilnosti (II)

**MONOSOMIJA**

- odsotnost avtosoma = skoraj vedno smrtna
- odsotnost X ali Y = kariotip 45, X = Turnerjev sindrom

**TRISOMIJA**

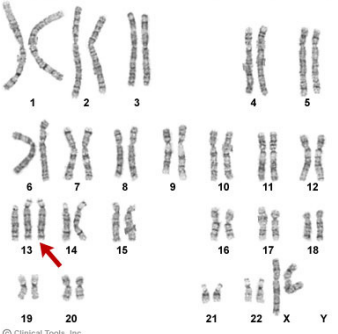
- trisomija 13
- trisomija 18
- trisomija 21

## Monosomija – Turnerjev sindrom

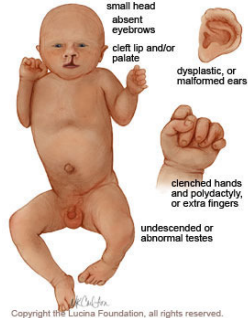
Karyotype From a Female With Turner syndrome (45,X)

- Short stature
- Low hairline
- Shield-shaped thorax
- Widely spaced nipples
- Shortened metacarpal IV
- Small finger nails
- Brown spots (nevi)
- Characteristic facial features
- Fold of skin
- Constriction of aorta
- Poor breast development
- Elbow deformity
- Rudimentary ovaries
- Gonadal streak (underdeveloped gonadal structures)
- No menstruation

## Trisomija 13 – Patau sindrom



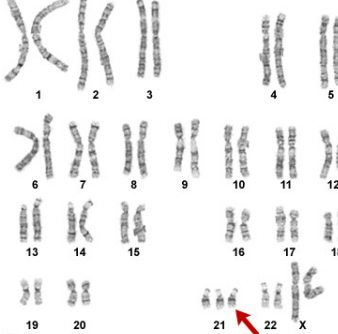
Karyotype from a female with Patau syndrome (47,XX,+13)



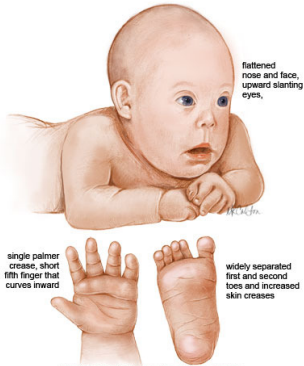
small head  
absent eyebrows  
cleft lip and/or palate  
dysplastic, or malformed ears  
clenched hands and polydactyly, or extra fingers  
undescended or abnormal testes

© Clinical Tools, Inc.  
Copyright the Lucina Foundation, all rights reserved.

## Trisomija 21 – Downov sindrom



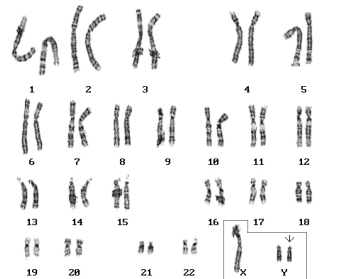
Karyotype From a Female With Down Syndrome (47,XX,+21)



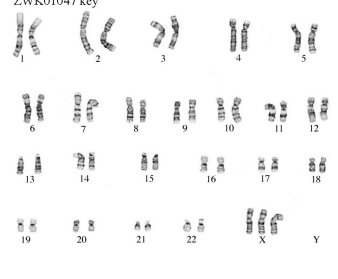
flattened nose and face, upward-slanting eyes  
single palmar crease, short first finger that curves inward  
widely separated first and second toes and increased skin creases

© Clinical Tools, Inc.  
Copyright the Lucina Foundation, all rights reserved.

## Trisomije spolnih kromosomov



Karyotype: 47,XYY



ZWK01047 key

**XYY moški:** Večina bolnikov je fenotipsko normalnih, a so znatno višji kot ostali ljudje in težko se vključujejo v normalno življenje

**XXX ženske:** Se rodijo 1 na 1200 porodov deklic. Deklice so duševno nerazvite, imajo moteno menstruacijo, so pa plodne

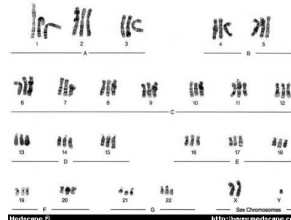
normalna ženska      nenormalna (neplodna) ženska  
normalen moški      nenormalen (neploden) moški

Do napake je prišlo pri ločevanju kromosomov med mejozono-disjunkcijo

Aneuploidije spolnih kromosomov:  
 XXY: Klinefelterjev sindrom  
 XO: Turnerjev sindrom  
 XXX: super ženska  
 XYY: super moški

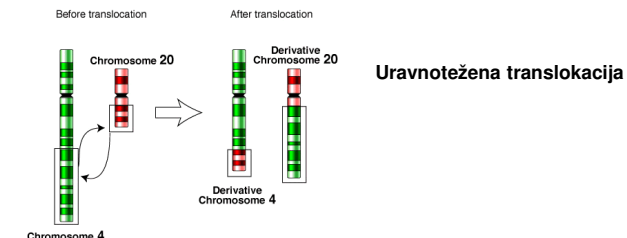
## Poliploidija

- Večkratno ponovljeno število kromosomov
- 69 kromosomov = triploidija, 92 kromosomov = tetraploidija
- Pogosto vzrok za spontani slav
- Le malo rojstev otrok s triploidijo → vsi so umrli kmalu po rojstvu



## Strukturne nepravilnosti kromosomov (I)

- Vzrok so prelomi kromosomov, katerim lahko sledi ponovno (nepravilno) združevanje
- Lahko so **uravnoreženi** (količina DNA ostane enaka) ali **neuravnoreženi** (pridobitev ali izguba DNA)

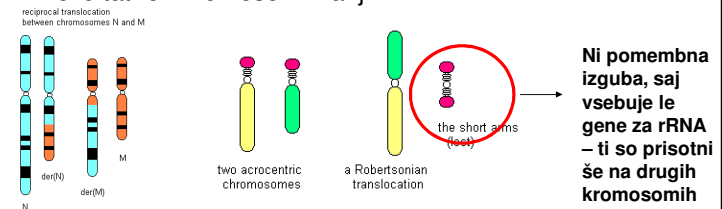


## Strukturne nepravilnosti kromosomov (II)

- **Delecija:** izguba dela kromosoma (če je izguba prevelika, ni združljiva z življenjem)
- **Insercija:** del enega kromosoma se vstavi v drug kromosom (lahko uravnorežena ali ne)
- **Inverzija:** segment kromosoma se zlomi in obrnjeno vstavi nazaj (uravnorežena) – ne predstavlja večjih problemov, razen če so zlomi v pomembnih genih

## Strukturne nepravilnosti kromosomov (III)

- **Translokacija:** prenos enega dela kromosoma na drug kromosom
  - **recipročna:** izmenjava med dvema kromosomoma
  - **Robertsonova translokacija:** zlom dveh akrocetričnih (13, 14, 15, 21 in 22) kromosomov in fuzija dolgih krakov – rezultat: en kromosom manj



## Robertsonove translokacije



- Zelo pogoste, predvsem med kromosomoma 13 in 14 (1 na 1000 posameznikov)
- Problem je **translokacija kromosoma 21** → če je eden izmed staršev nosilec → predispozicija za Downov sindrom

