

Kromosomi

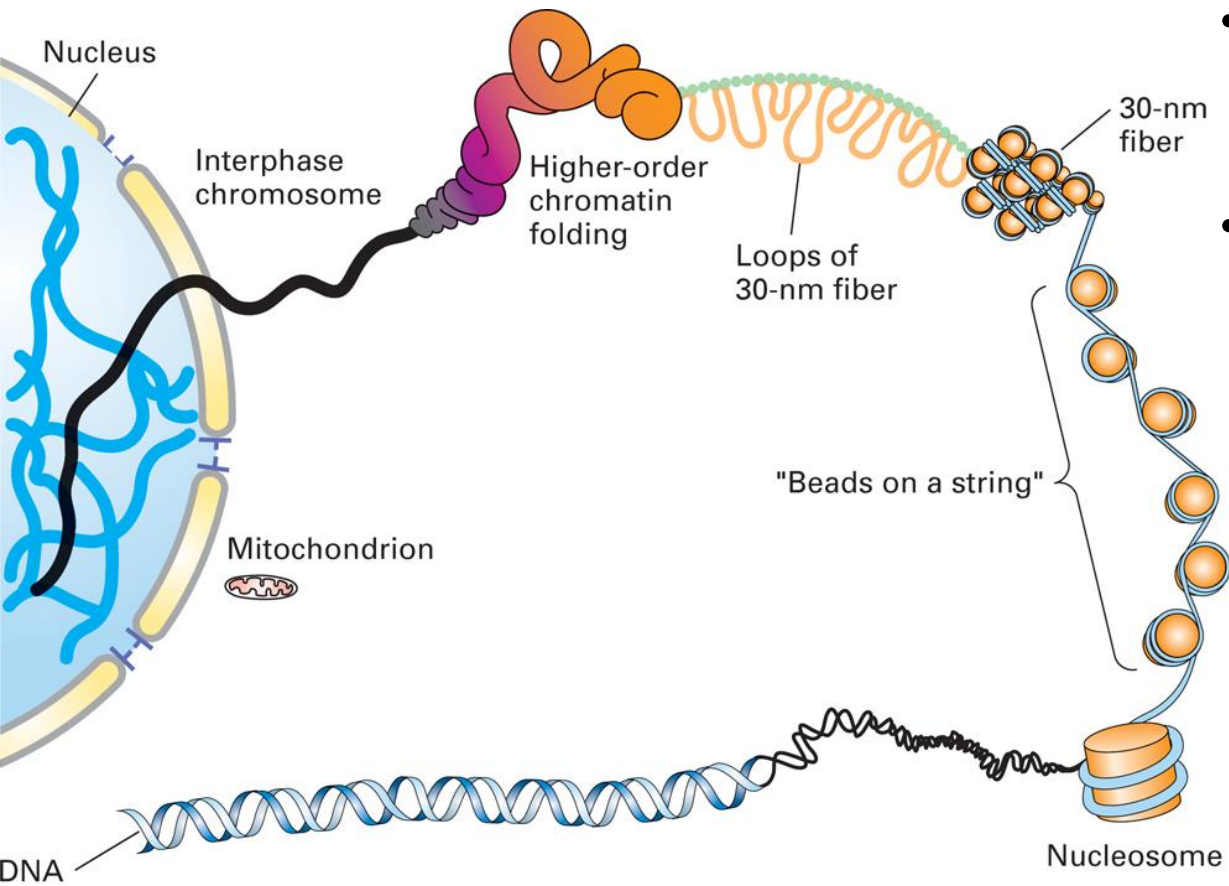
Boris Rogelj

Boris.Rogelj@ijs.si

Pregled predavanja

- Struktura kromosomov
- Replikacija kromosomov
- Citogenetika
- Ploidnost in celični cikel
- Mitoza
- Mejoza
- Kromosomske napake

Od genov do kromosomov



- Vsak kromosom je dolga dvovijačna DNA (do 280 Mb)
- Histoni in nehistonski proteini jo organizirajo v naraščujoče nivoje kompleksnega zvijanja.

Major Types of DNA Sequence

Single-copy genes	Simple-sequence DNA
Gene families	Transposable DNA elements
Tandemly repeated genes	Spacer DNA
Introns	

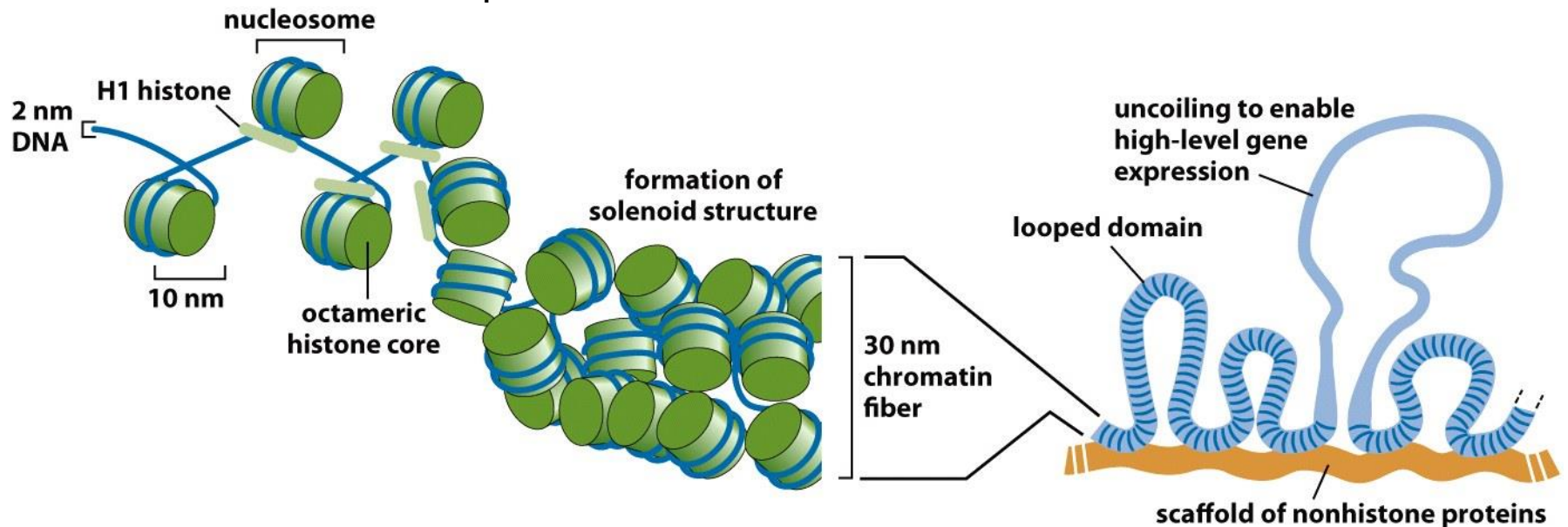
Osnovna vloga kromosomov

- Dve osnovni vlogi:
 - Prenos genetske informacije
 - Izražanje genetske informacije
- Poglavitna slika kromosoma izhaja iz strukture v metafazi celičnega cikla.
 - Najbolj kompaktna struktura.
 - Ni izražanja genov.
 - Kromatidi sta združeni s centromerami.
- V interfazi je struktura precej bolj razvita.
- Pri podvojevanju in delitvi so pomembni trije strukturni elementi:
 - Centromera - najbolj opazna v metafazi. Veže se na fibrile delitvenega vretena.
 - Začetki replikacije – posebna zaporedja.
 - Telomere – zaporedja na koncih kromosomov, ki ščitijo DNA in omogočajo podvojevanje.



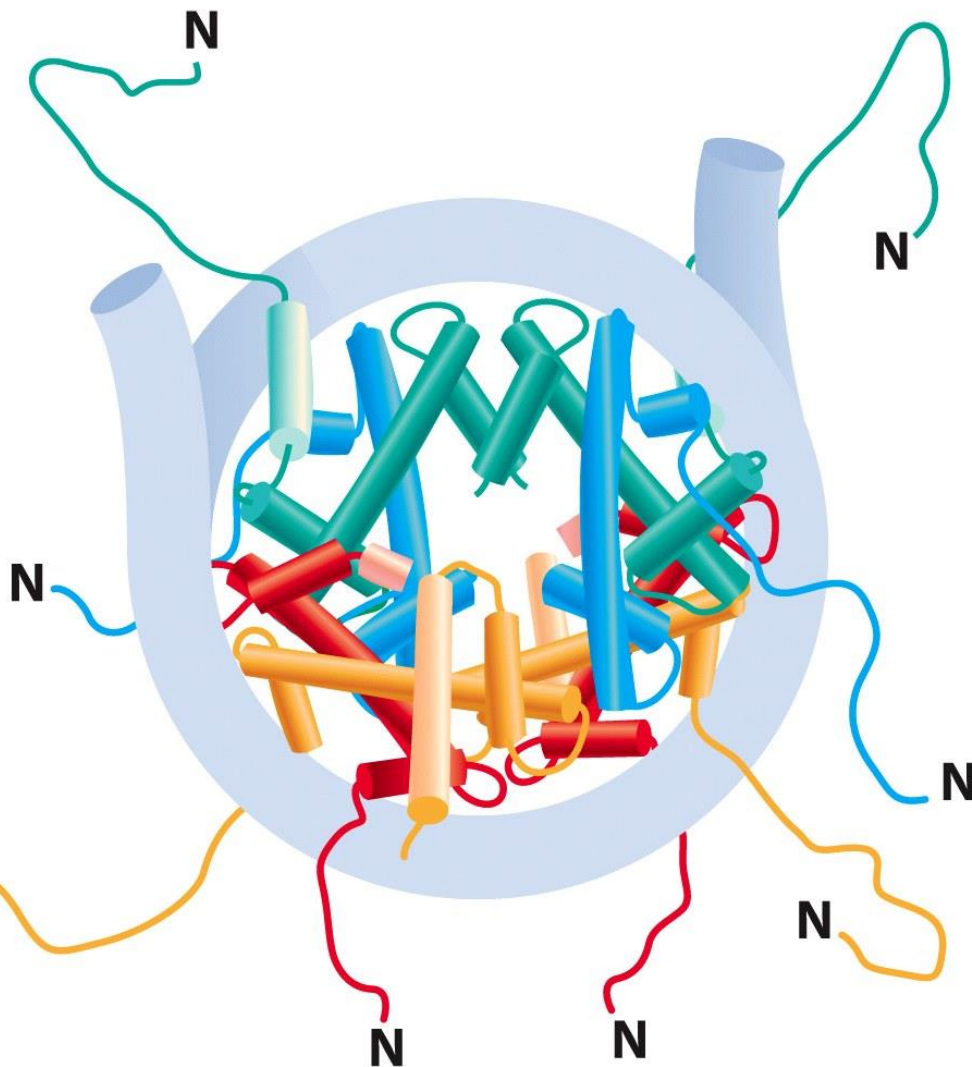
Hierarhično zvijanje v kromosomih

- Struktura kromosoma je zelo organizirana.
- Več nivojev zvijanja in povečevanja kompaktnosti pred mitozo.
- Zvijanje omogočajo različni proteini.
- Zvijanje in superzvijanje omogočita tvorbo kromatina.
- Celo v interfazi, ko je kromosom najbolj razvit, obstajata dva nivoja zvijanja.
 - 2 nm → 10 nm → 30 nm
 - 30 nm kromatinski fibril tvori zanke (50-200 kb) vezane na ogrodje ne-histonskih proteinov.



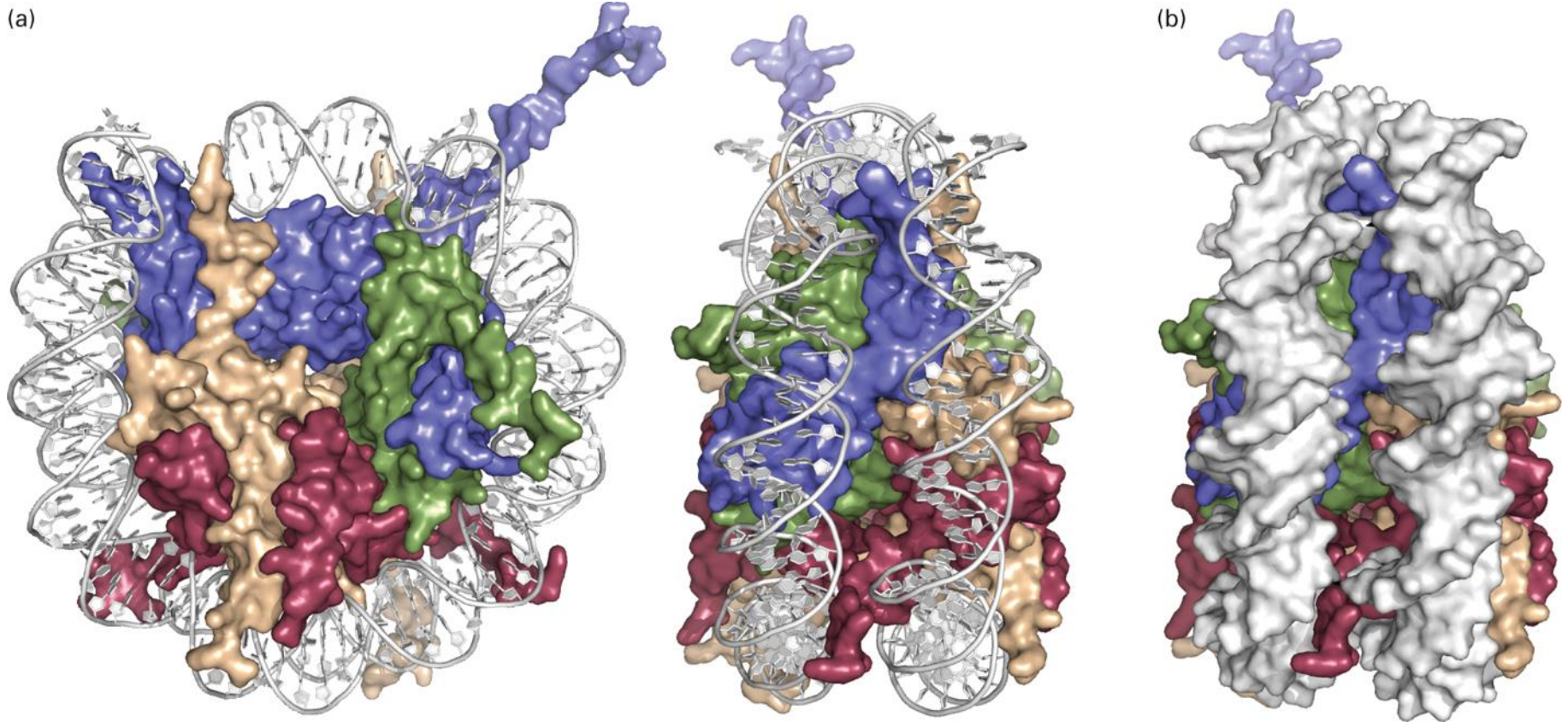
Nukleosom

- Osnovna enota pakiranja DNA.
- 147bp dvovijačne DNA se navije za skoraj dva obrata.
- Histonski oktamer 2x(H2A, H2B, H3 in H4).
- Med nukelosomi je vezavna DNA dolžine 8-114 bp.
- Dolžina vezavne DNA je odvisna od pozicije v genomu.

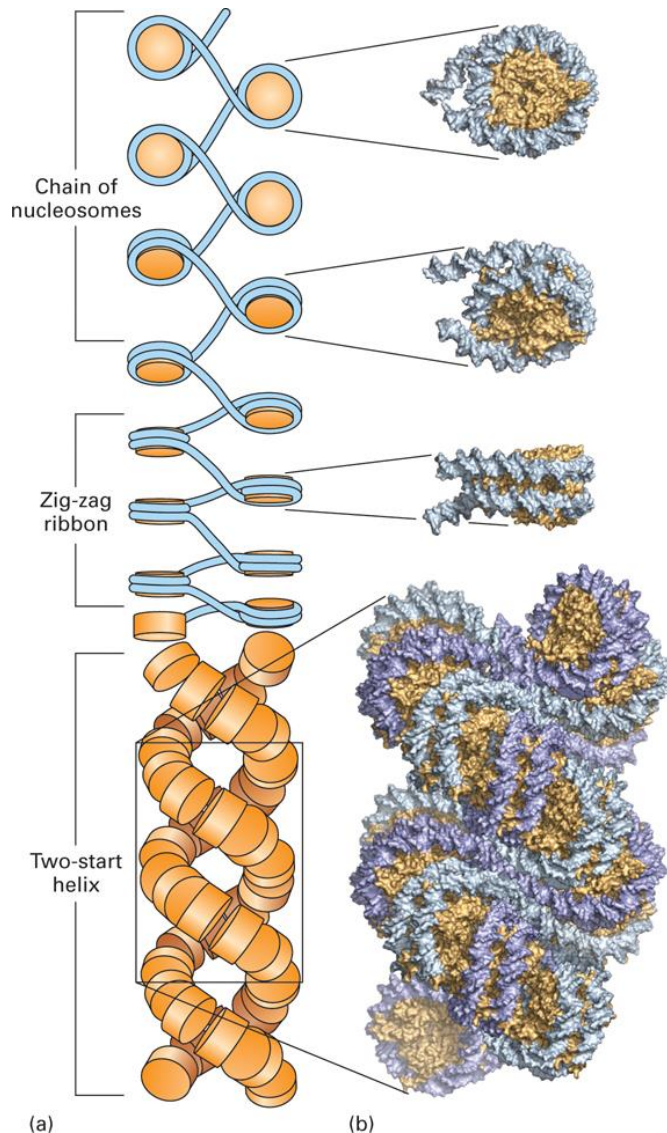


Struktura nukleosoma

- Podenoti: **H2A**, **H2B**, **H3** in **H4**.
- N terminalni deli niso prikazani.



Struktura 30 nm fibrila



- Zvijanje nukelosomske ogrlice v cik-cak trak.
- Nalaganej kovancev.
- Zvijanje traka v helikalno strukturo.
- Heliks je levo sučni (nasprotno od DNA).
- Vsebuje tudi H1, vendar njegova struktura ni prikazana v 30nm fibrilu.
- Dominantna oblika v kromosomskih regijah, ki se ne prepisujejo.

Prerez skozi 30nm fibril

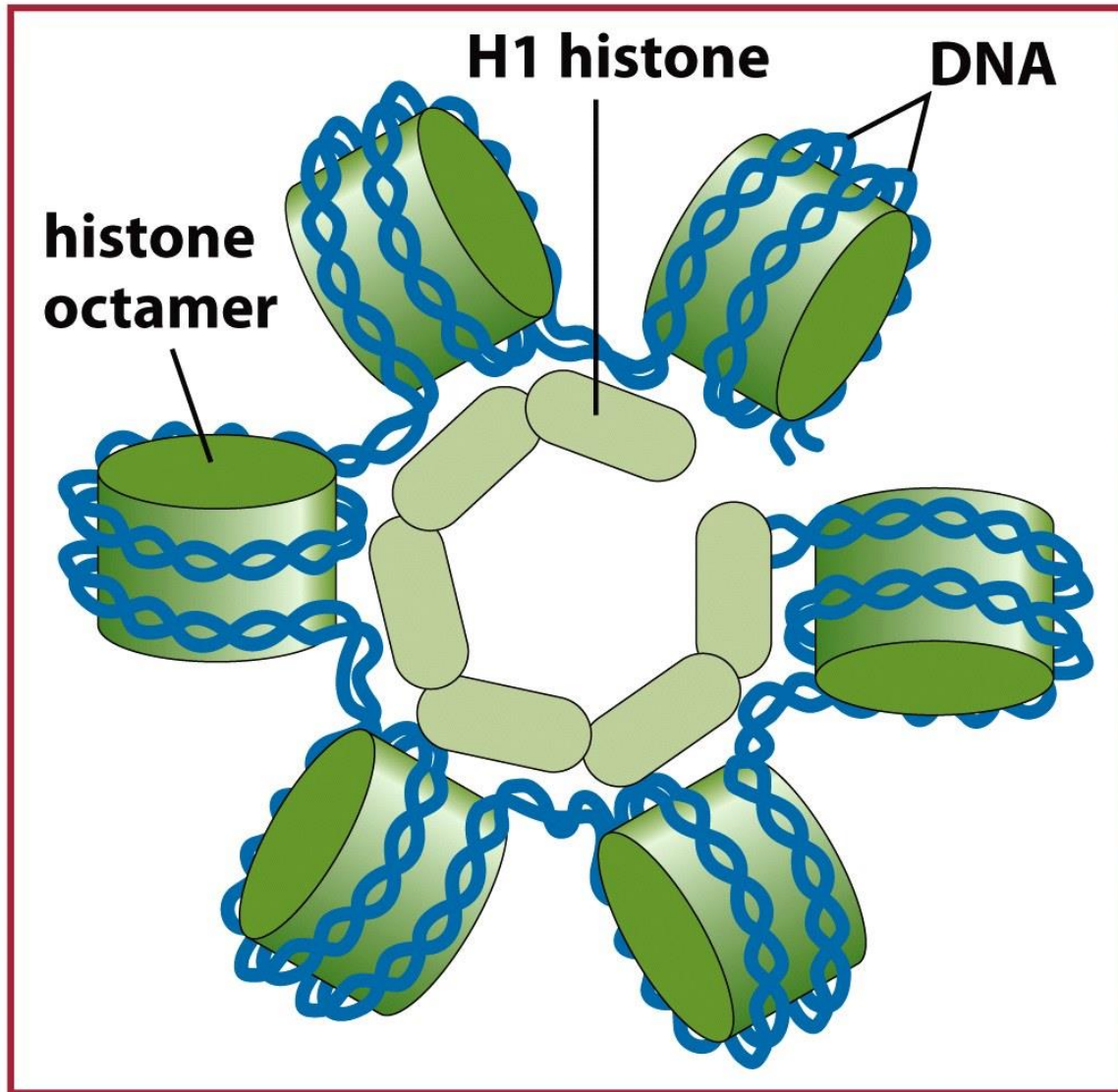
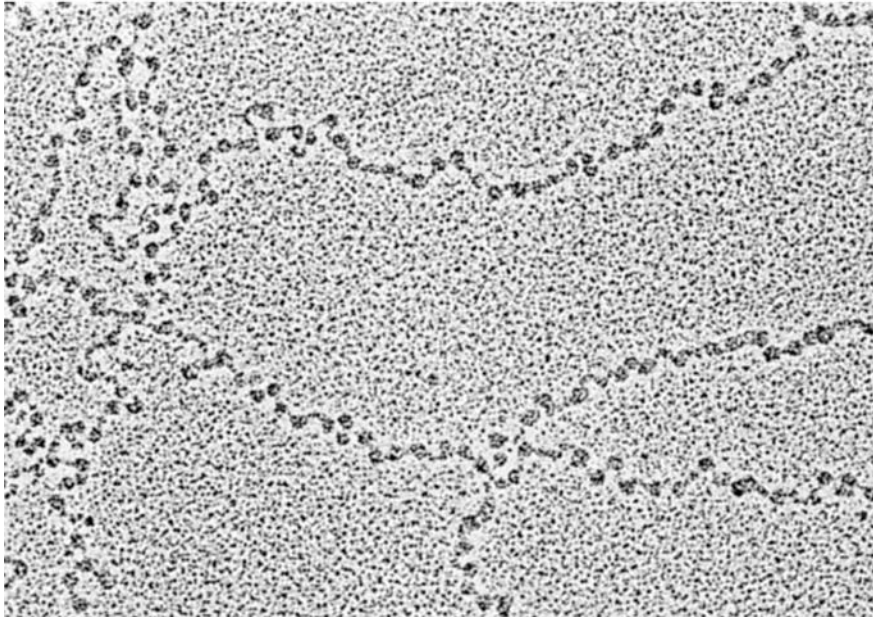


Figure 2.8d Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

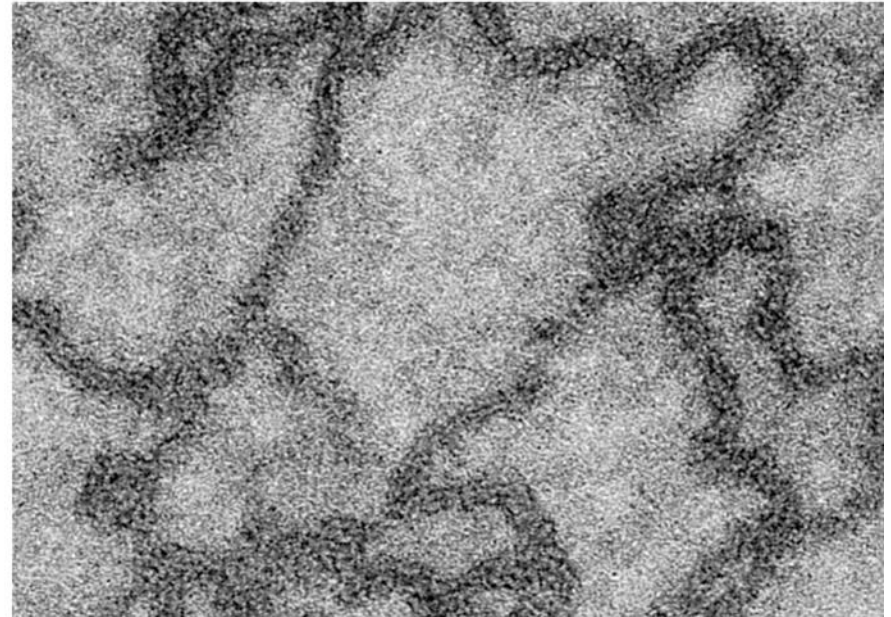
Struktura kromatina

- a) Struktura ogrlice (10 nm) v pufru z nizko ionsko močjo.
- b) Struktura 30 nm fibrila v pufru s fiziološko ionsko močjo (0,15 KCl).

(a)



(b)

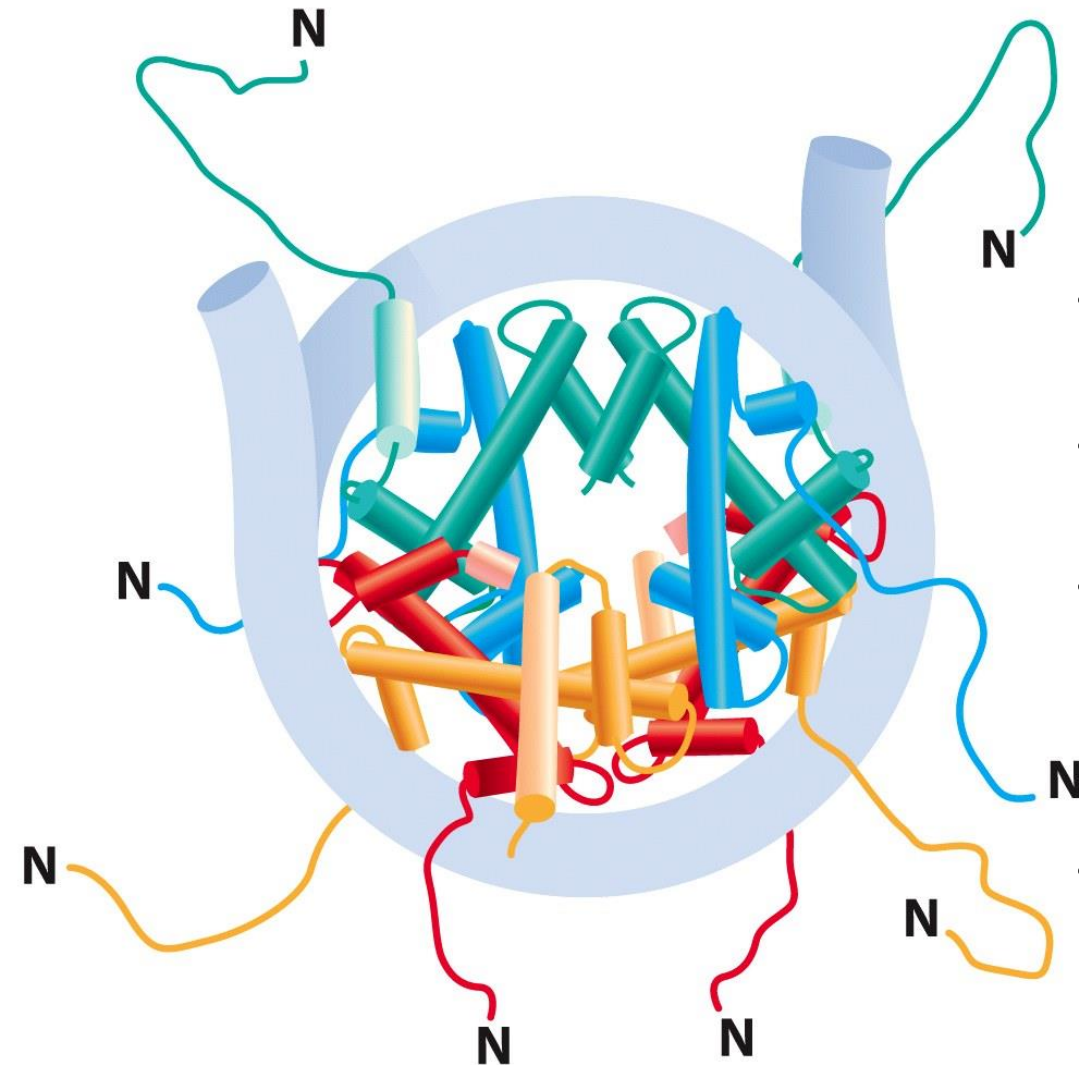


Ohranjenost strukture kromatina

- Struktura kromatina je podoben pri vseh evkariontih.
- A.k. zaporedje histonov je zelo ohranjeno (razen H1).
- Variante histonov so zelo podobne glavnim histonom. Razlike so pomembne pri spremembi stabilnosti nukleosoma ali tvorbi kompleksnih struktur.
 - **H2AX**, posebna oblika H2A, zamenja H2A v naključnih nukleosomih. Pomembna je pri popravljanju pretrgane dvoverižne DNA. Pri poškodbi DNA se H2AX fosforilira in veže proteine, ki sodelujejo pri popravljanju.
 - **H2AZ**, nahaja se v aktivnem kromatinu. Lahko da sodeluje pri omejevanju širjenja heterokromatina. Največ ga je v aktivnih promotroskih in regulatronih regijah.
 - **Macro-H2A**, nahaja se v nukleosomih inaktiviranega X kromosoma.
 - **CENP-A** zamenja H3 v centromerih. Sodeluje pri vezavi mikrotubulov delitvenega vretena.

Post translacijske modifikacije histonov

- Histonski repi:
 - Vsi imajo 19-39ak dolg N-terminus, ki je izven nukleosoma.
 - Pri H2A in B tudi C-terminus.
- Pomembni za tvorbo 30nm fibrila.
 - Npr. Δ H4K16 ne tvori fibrile.
- Histoni imajo specifično kombinacijo modifikacij.
- Skupine dodajajo:
 - Histon acetil transferaze (HAT)
 - Histon metil transferaze (HMT)
 - Histon kinaze
- Skupine odstranijo:
 - Histon deacetilaze (HDAC)
 - Histon demetilaze
 - Histon fosforilaze



Post translacijske modifikacije histonov

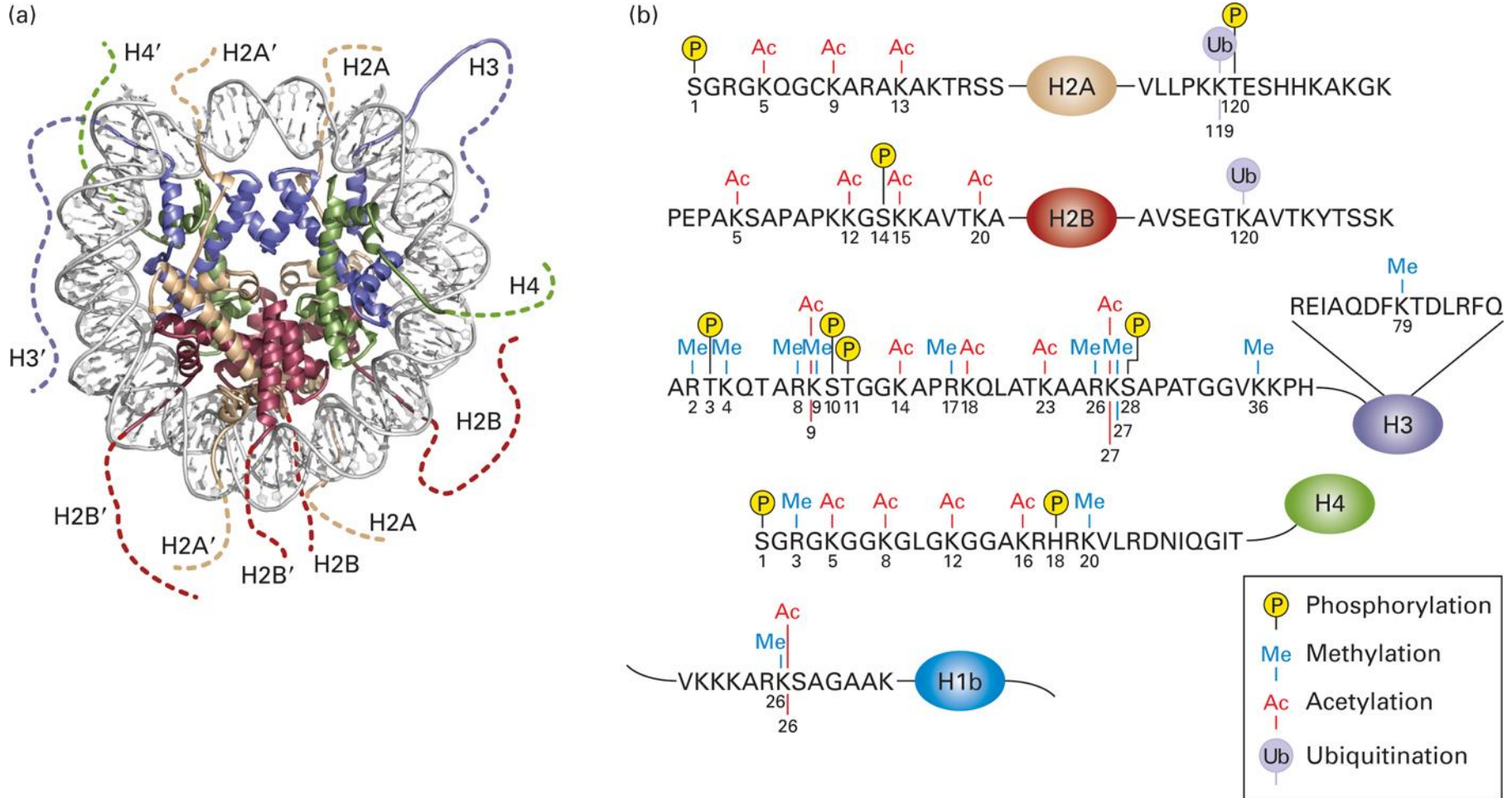


Figure 6.31 Molecular Cell Biology 7th ed.

Nomenklatura histonskih modifikacij

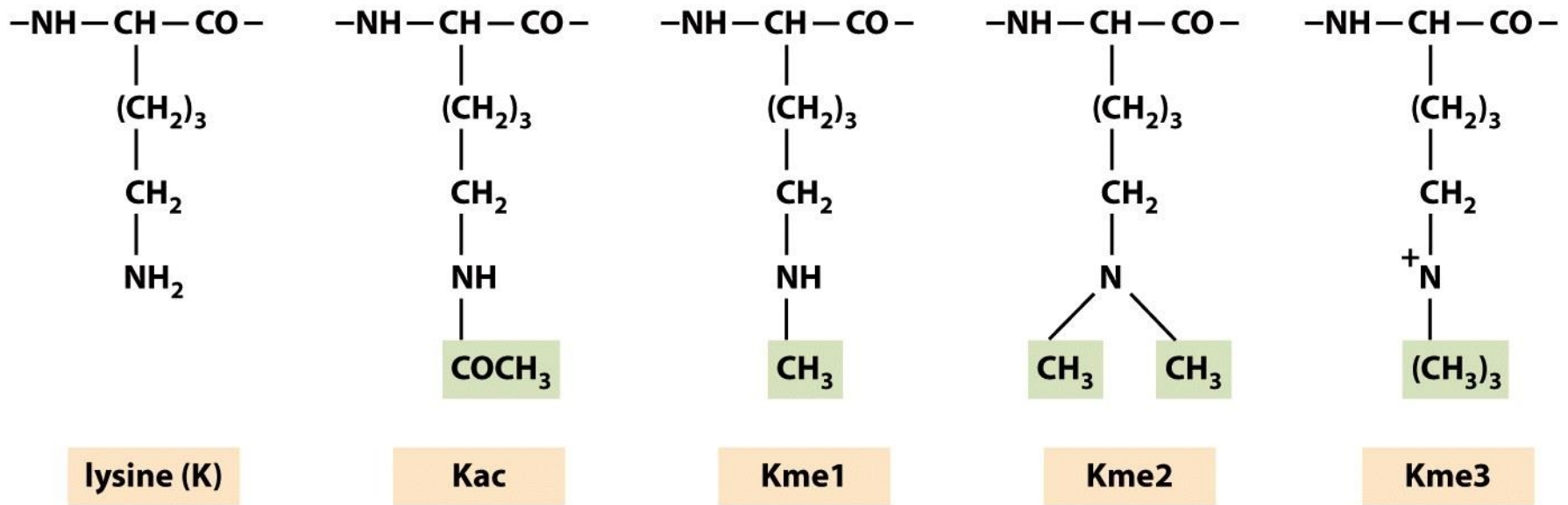
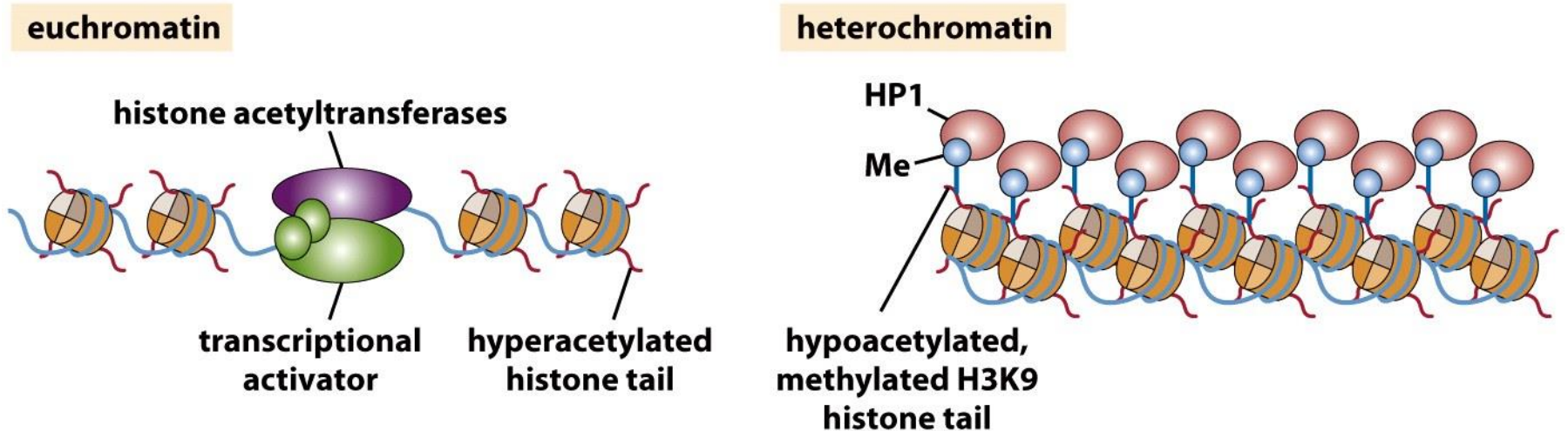


Figure 11.8a Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

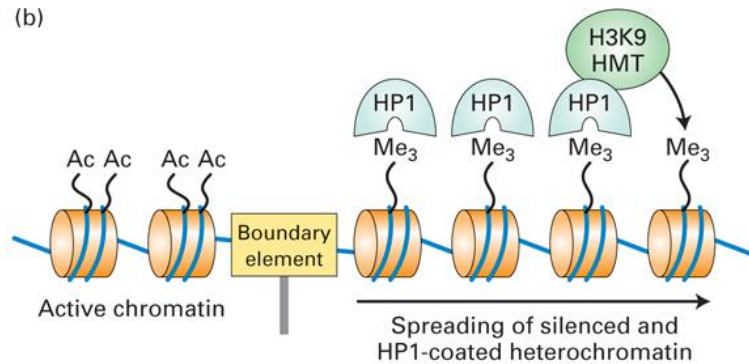
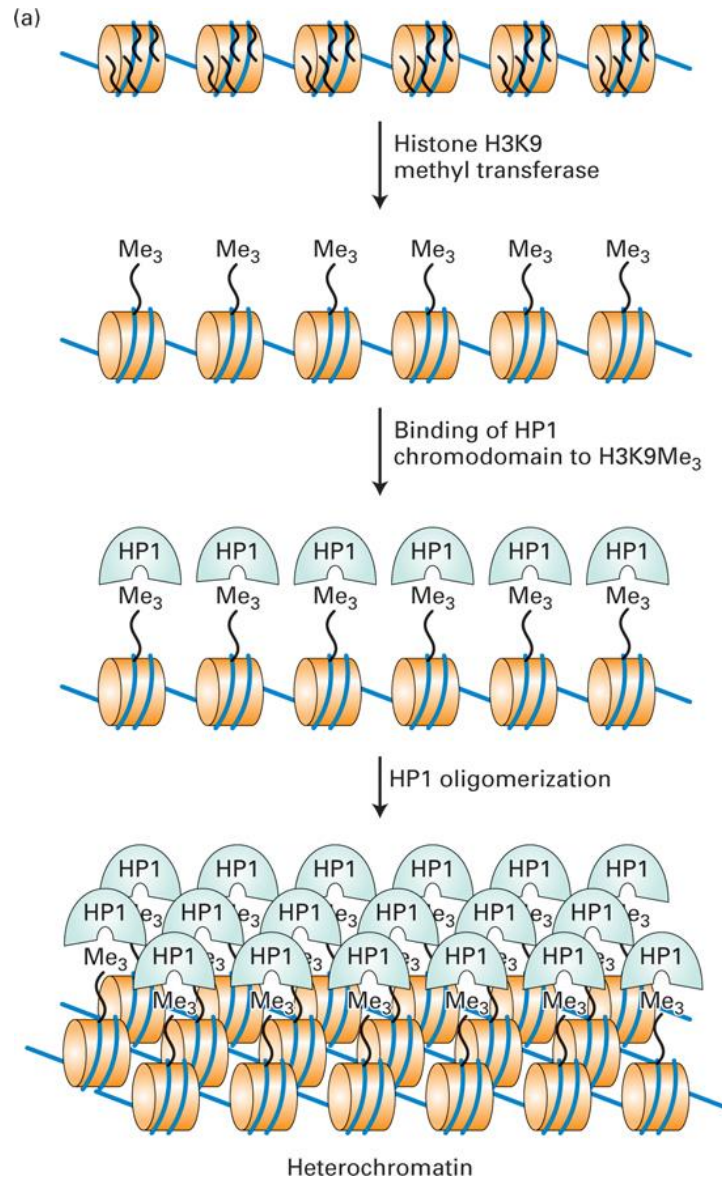
- Označeno s tipom histona, aminokislino ter pozicijo a.k.
 - Npr. H3K9 je lizin 9 na histonu 3
- Oznake za modifikacije
 - ac – acetilacija
 - me – metilacija (1, 2 ali 3)
 - ph – fosforilacija
 - ub – ubikvitinacija
 - su – sumoilacija

Heterokromatin in evkromatin

- **Evkromatin** – odprti kromatin. Aktivni deli kromosoma. Deli kromosoma so popolnoma razviti.
- **Heterokromatin** – nukleosomi so zelo zapakirani. Na njih je vezan protein HP1 (“heterochromatin protein 1”).
 - **Konstitutivni heterokromatin** – nesprmenjen skozi celični cikel. Ima malo genov in dosti DNA ponovitev.
 - **Fakultativni heterokromatin** - reverzibilen v celičnem ciklu. Pomen pri regulaciji izražanja genov.

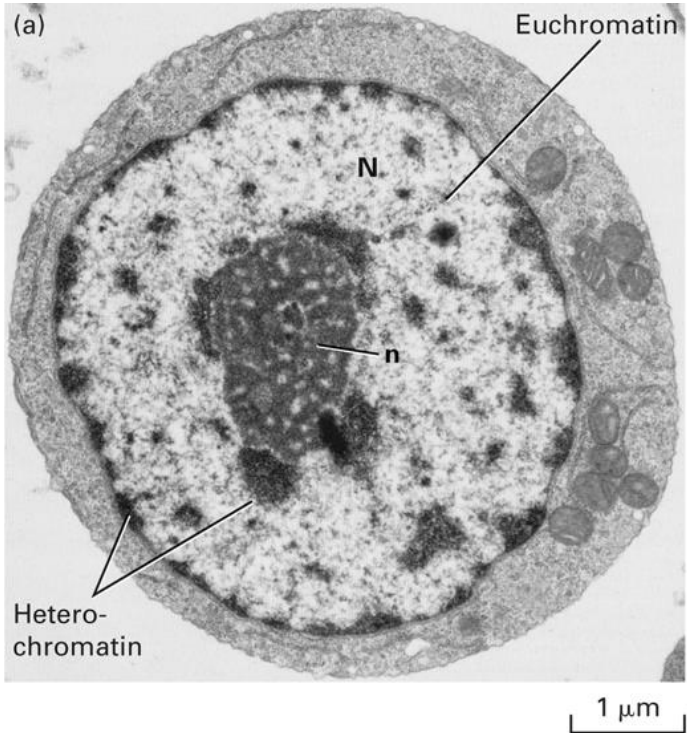


Model tvorbe heterokromatina



- HP1 se veže na H3K9me₃ in H3K27me₃.
- Kondenzacija heterokromatina se širi, ker HP1 veže HMT, ki metilira H3K9 pri sosednih nukleosomih.
- Širjenje heterokromatina se nadaljuje do mejnega elementa.
- Mejni elementi so zaporedja, kjer se vežejo nekateri nehistsonski proteini, ki ustavijo širjenje heterokromatina.

Heterokromatin in evkromatin



- Kromatin v matični celici kostnega mozga.
- Heterokromatin je temno obarvan.
 - Pogosto je vezan na nukleolus ali jedrno membrano.
 - V njemu so centromere, telomere in neaktivne regije.
- Eukromatin je svetel in vsebuje transkripcijsko aktivne regije.
- Histonski kod.
 - Konformacija kromatina je določena s specifično kombinacijo modifikacij histonov.
 - Močna korelacije, vendar ne popolna.

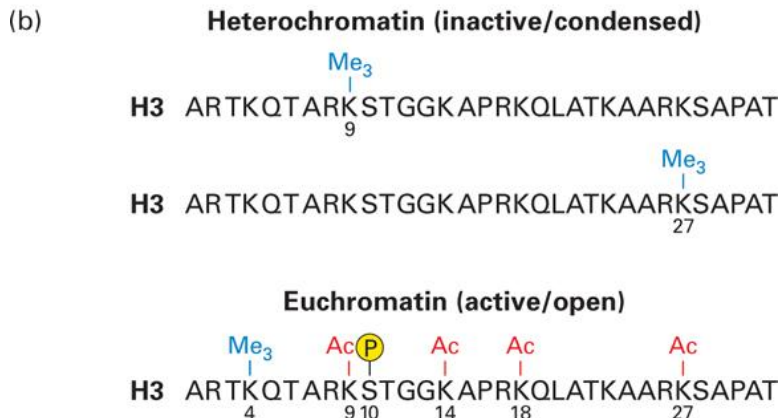


Figure 6.33 *Molecular Cell Biology 7th ed.*

Histonske modifikacije pri različnih kromatinih

TABLE 11.2 CHARACTERISTIC HISTONE MODIFICATIONS IN DIFFERENT TYPES OF CHROMATIN

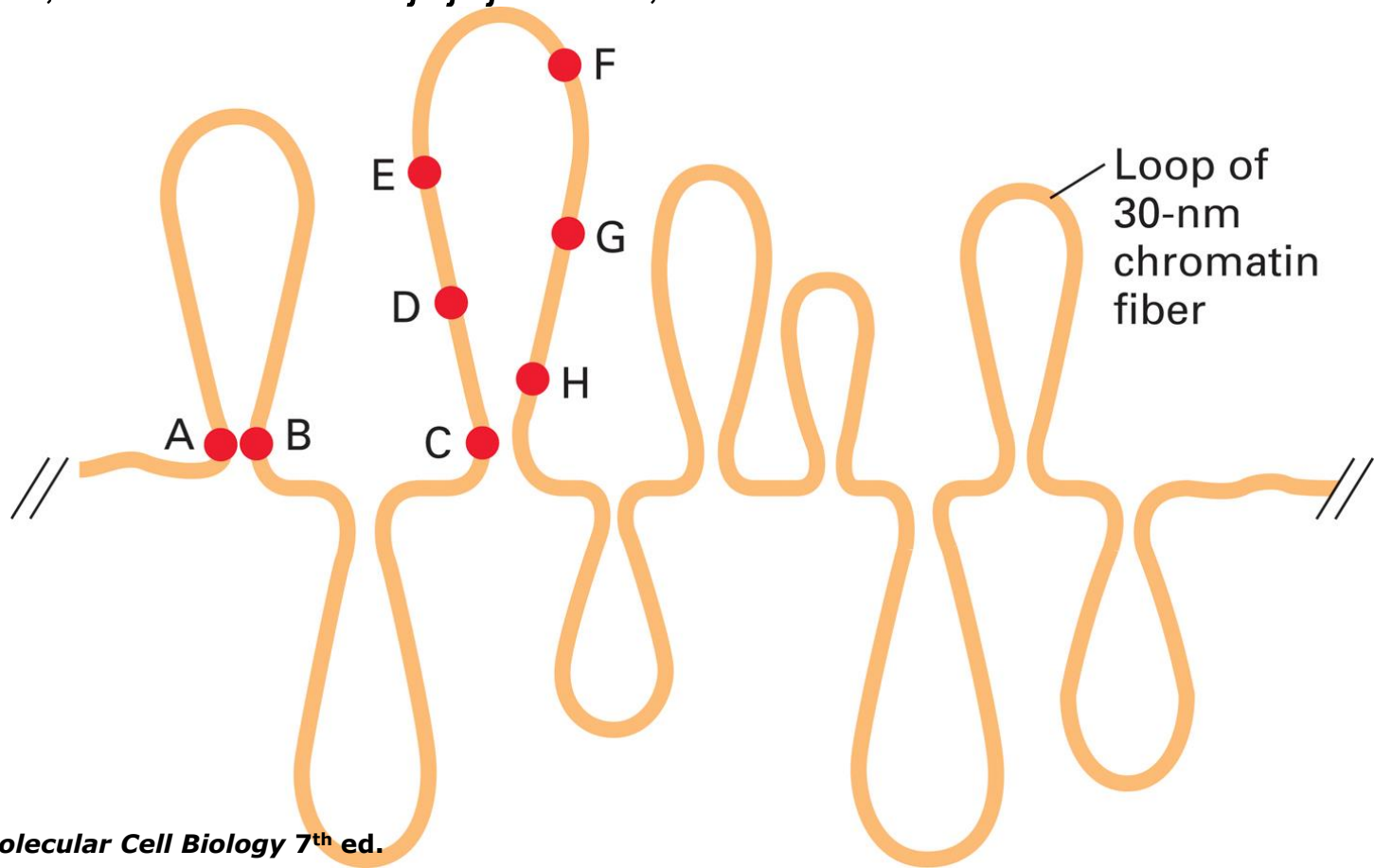
Amino acid	Constitutive heterochromatin	Facultative heterochromatin	Euchromatin
H3K4			trimethylated ^a ; monomethylated ^b
H3K9	trimethylated	dimethylated	acetylated
H3K27		trimethylated	
H4R3			methylated
H4K5			acetylated
H4K12	acetylated	acetylated	
H4K20	trimethylated		monomethylated

Within each category of chromatin there are sub-varieties and variant patterns of modification, but those shown are the most frequent modifications in each broad category of chromatin.

See Box 11.2 for nomenclature of amino acids in histones. Blank boxes signify that there is no clear pattern. ^aAt promoters. ^bAt enhancers.

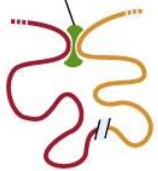
Določanje kromatinskih zank z metodo FISH

- Z uporabo večih FISH prob na enem daljšem zaporedju DNA lahko pri interfaznem kromosomu določimo oddaljenost izbranih mest.
- A je blizu B, čeprav ju lahko loči dolgo zaporedje.
- D, E in F se oddaljujejo od C, a se G in H bližata.

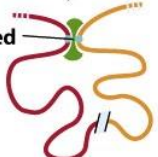


Ugotovitev konformacije kromosoma

DNA-binding proteins



treat living cells or cell nuclei with formaldehyde



crosslink formed

extract and fragment chromatin; digest with restriction enzyme



DNA ligation



remove crosslinks by heat treatment and proteolysis



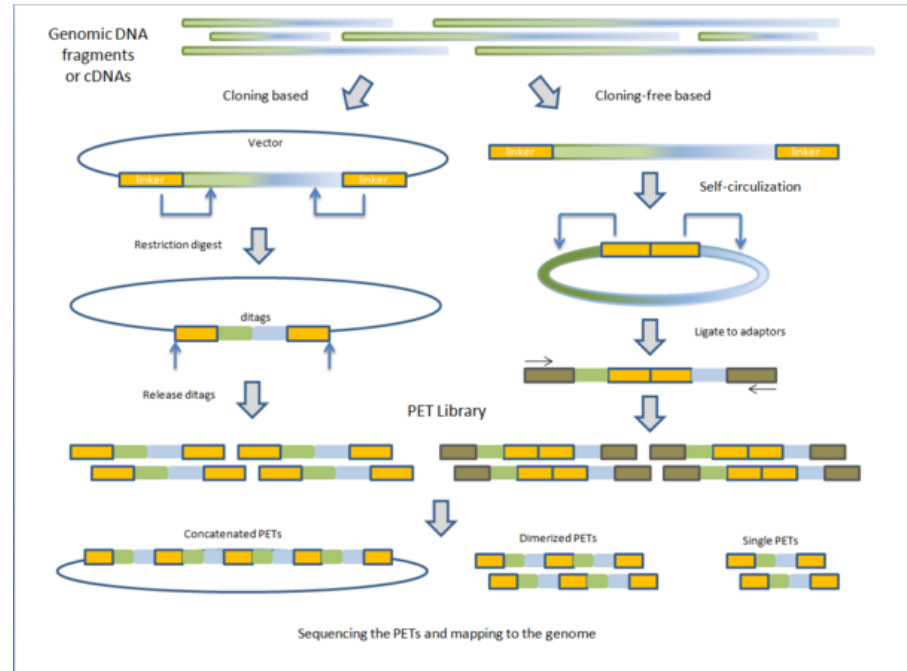
inverse PCR with primers from bait sequence



interactor sequences

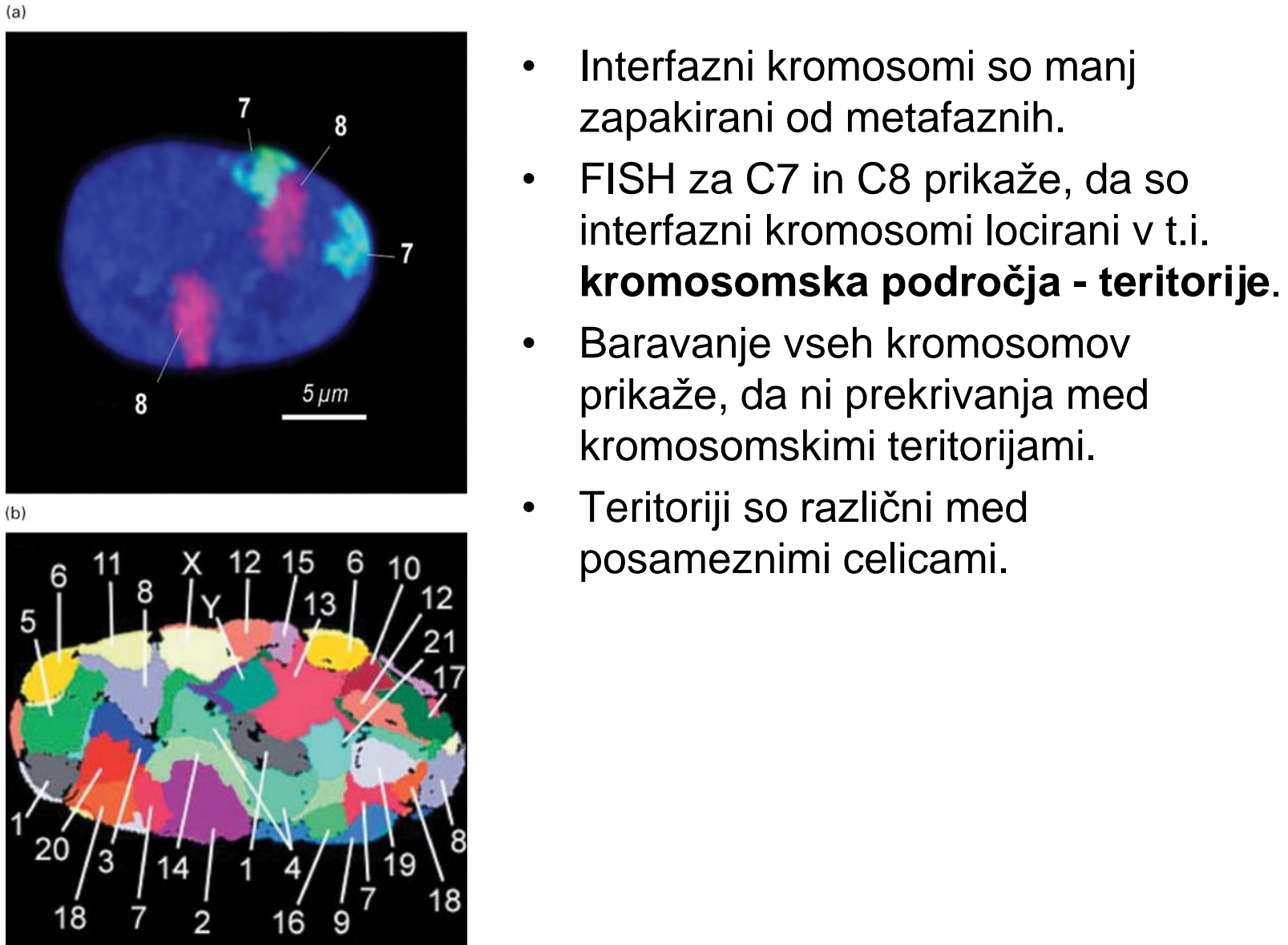
identify interactor sequences on microarrays or by sequencing

- **ChIP** metoda določa vezavo DNA vezavnih proteinov na DNA.
- Variacije: ChIP-chip, ChIP-PET, ChIP-seq, ...



- **Chromosome confirmation capture (3C)**
- Določitev zaporedij, ki so v bližini določenega zaporedja v interfaznem jedru.

Razporeditev kromosomov v interfazi



Metafazni kromosom

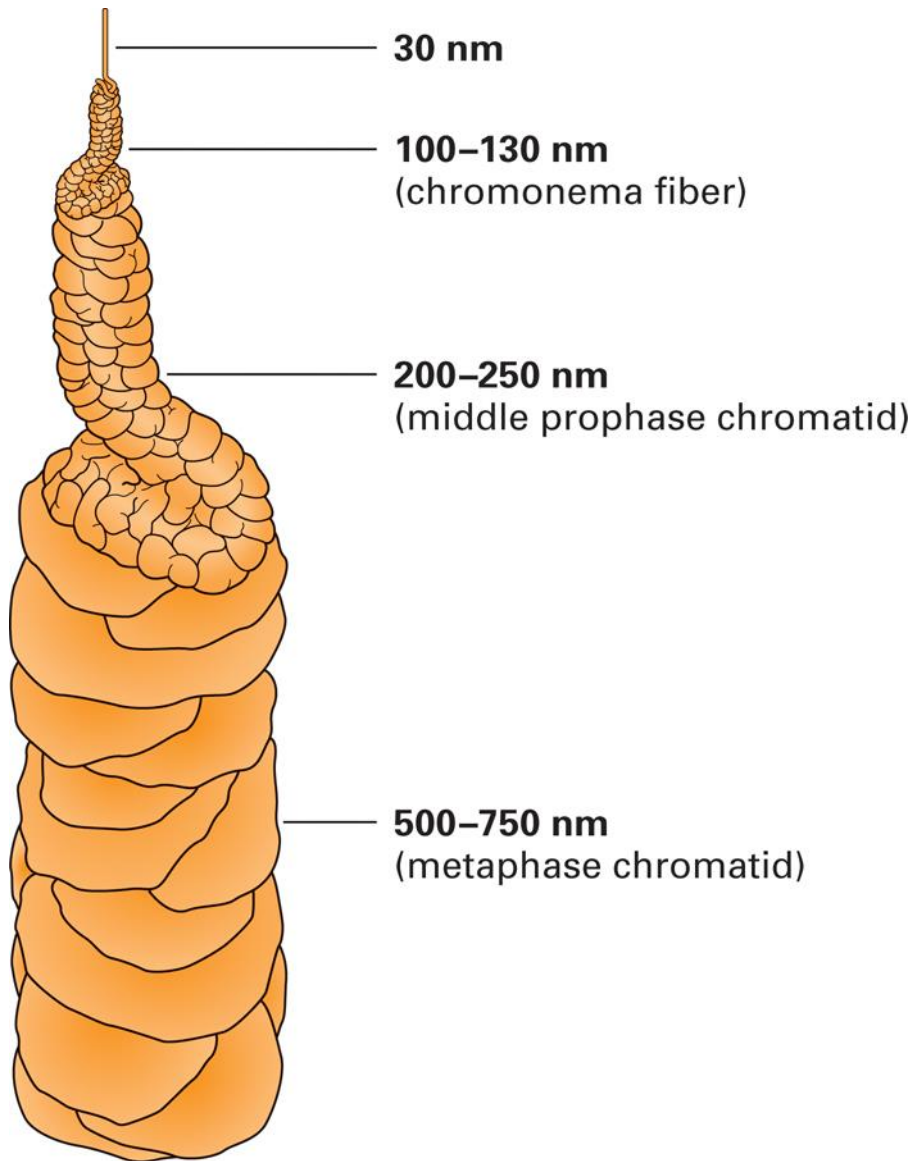
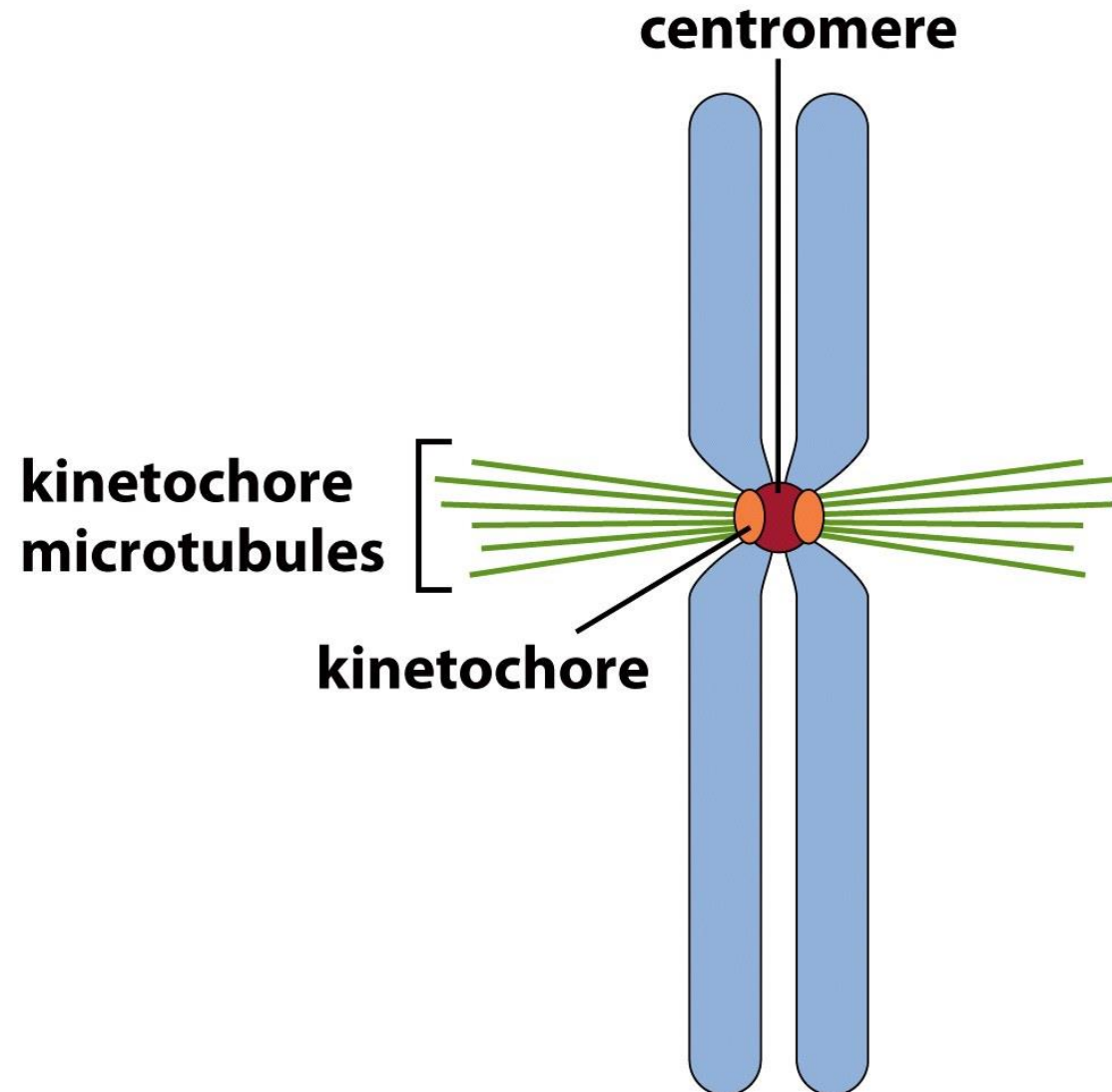


Figure 6.38 *Molecular Cell Biology* 7th ed.

Centromere

- Kromosomi imajo eno centromero, pri kateri sta združeni sestrski kromatidi.
- Pri metafazi je centromera vidna kot primarna zožitev, ki loči dolgi in kratki roki kromosoma.
- So bistvene pri vezavi kromosoma na delitveno vreteno in segragacijo kromosomov ob celični delitvi.
- Acentrični fragmenti – kromosomi brez centromerov (nenormalni). Ne vežejo se na delitveno vreteno ter nepravilno segregirajo.
- V pozni profazi se na centromerah tvori velik multiproteinski kompleks **kinetohor**. Na vsako kromatido se veže eden.
- Niti delitvenega vretena se na posameznem kromosomu pritrdijo na kinetohor.
- Dvokromatidni (materinski) kromosom se razdeli na dva enokromatidna (hčerinska) kromosoma in niti delitvenega vretena ju potegnejo proti nasprotnim polom.

Združenje kinetohore in centromere

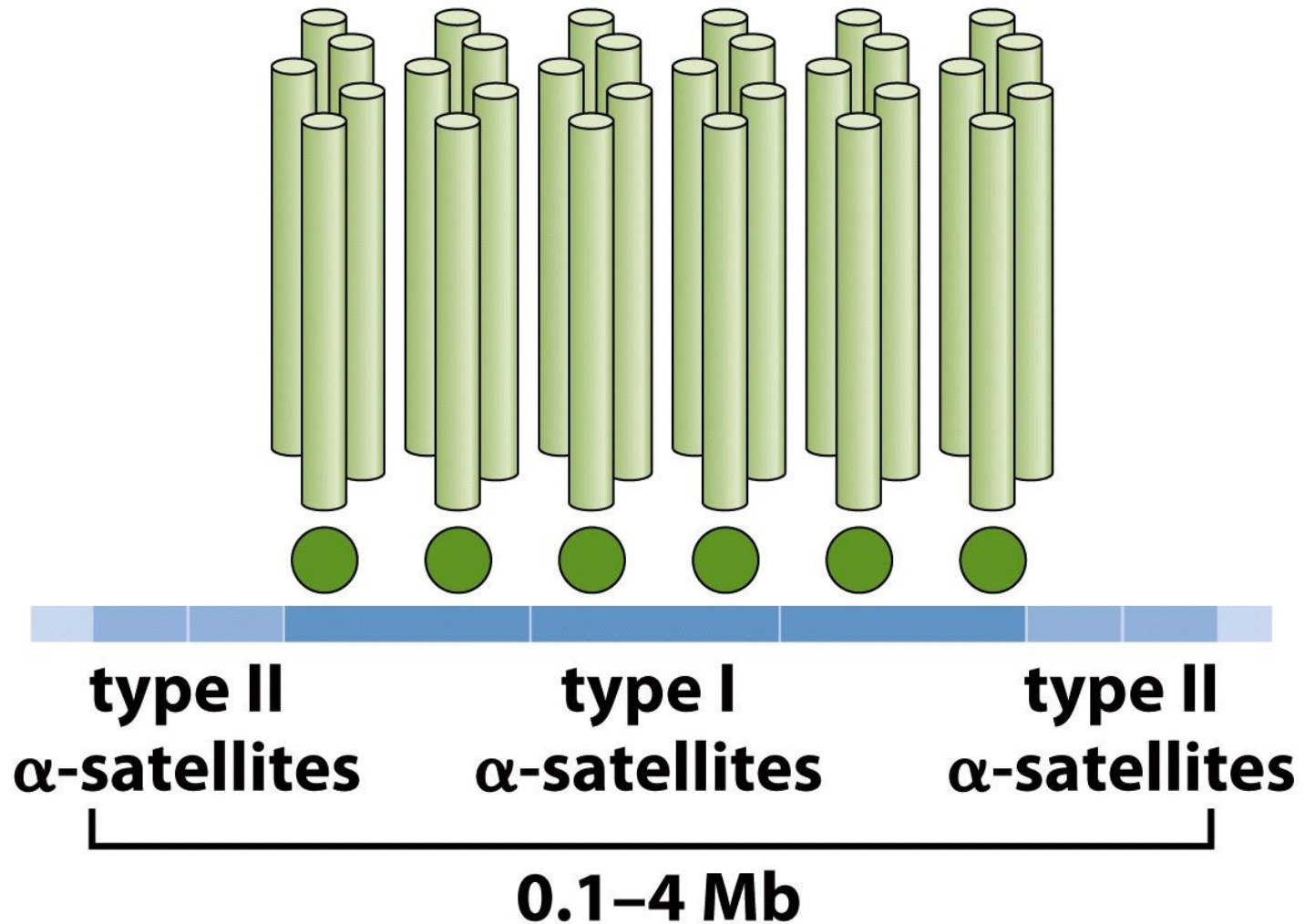


- Človeške centromere imajo več mest za vezavo mikrotubulov, ki so razširjeni v regiji 0,1-4Mb.
- Prisotne so ponovitve α -satelitnega zaporedja (171bp).
- Vezavna mesta za CENP-A in CENP-B

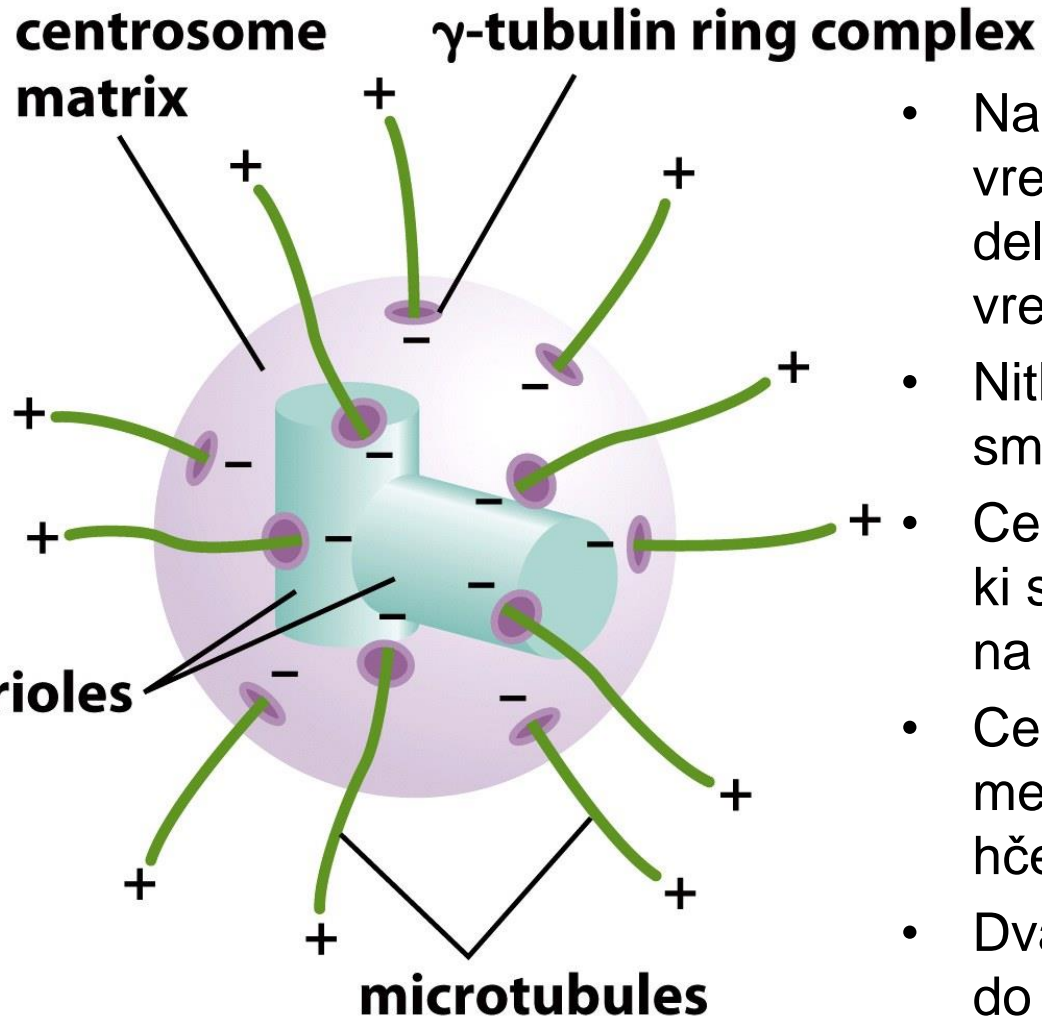
Organizacija centromere

H. sapiens

regional centromere

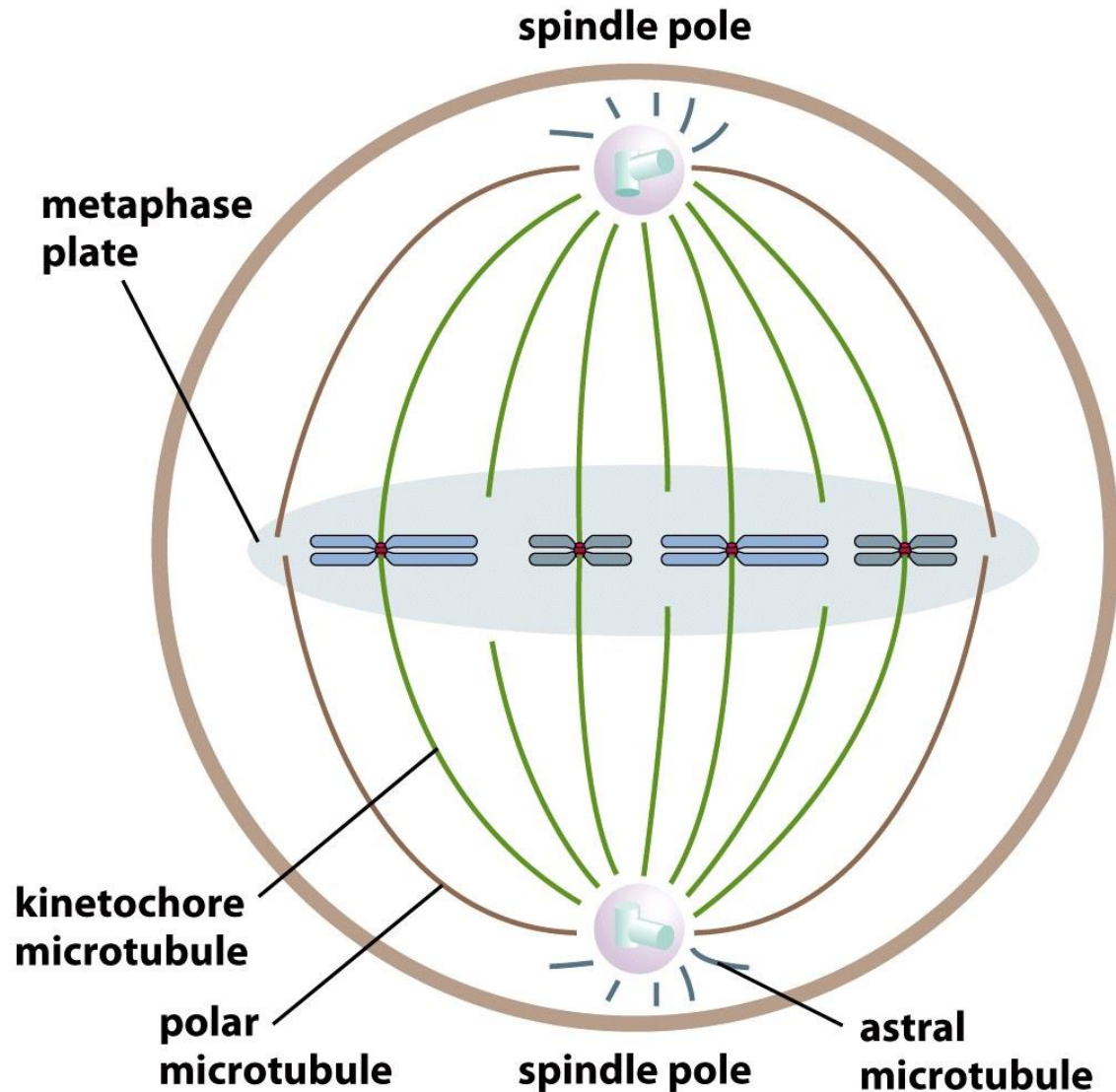


Struktura centrosoma



- Na vsakem polu delitvenega vretena se nahaja centrosom, ki deluje pri rasti nitk delitvenega vretena.
- Nitke so polarne in rastejo v eno smer.
- Centrosom vsebuje dve centrioli, ki sta pravkotno usmerjena ena na drugo.
- Centrioli se ločita v fazi G_1 in med fazo S vsaka tvori novo hčerinsko centriolo.
- Dva nova centrosoma sta skupaj do začetka faze M. Nato se ločita in vsak potuje na svoj pol delitvenega vretena.

Struktura mitotičnega vretena



- Pri tvorbi delitvenega vretena sodelujejo trije tipi nitk.
 1. Polarne nitke, ki se tvorijo v profazi, se širijo od polov do ekvatorja.
 2. Kinetohorne nitke se tvorijo v prometafazi in vežejo kinetohore s polom.
 3. Astralne nitke, ki se tvorijo okoli centrosoma in so vsmerjene proti periferiji celice.

Mesta začetka replikacije

- Pomembni za replikacijo kromosoma.
- DNA zaporedja s cis-aktivacijsko vlogo, na katere se vežejo proteini, ki vodijo v iniciacijo replikacije, kot so proteini ORC kompleksa (“origin of replication complex”).
- Pri sesalcih ta zaporedja še niso popolnoma definirana, čeprav ima vsak kromosom več takih zaporedij.
- Znana sesalska mesta začetka replikacije so pogosto dolga več kb. Mesta vezave ORC niso definirana.
- Razporeditev mest začetka replikacije je določena s hitrostjo napredovanja replikacijske verige ter z razporeditvijo kromatinskih zank.

Telomere

- Telomere so heterokromatinski kompleksi DNA in proteinov na koncih kromosomov.
- Nukelosomi telomerov imajo modificirane histone, ki omogočajo sintezo konstitutivnega kromatina.



- Telomerna zaporedja DNA so relativno dolga zaporedja tandemskih ponovitev.
- So evolutivno ohranjena.
- Vsi vretenčarji imajo ponovitev heksanukleotida TTAGGG.

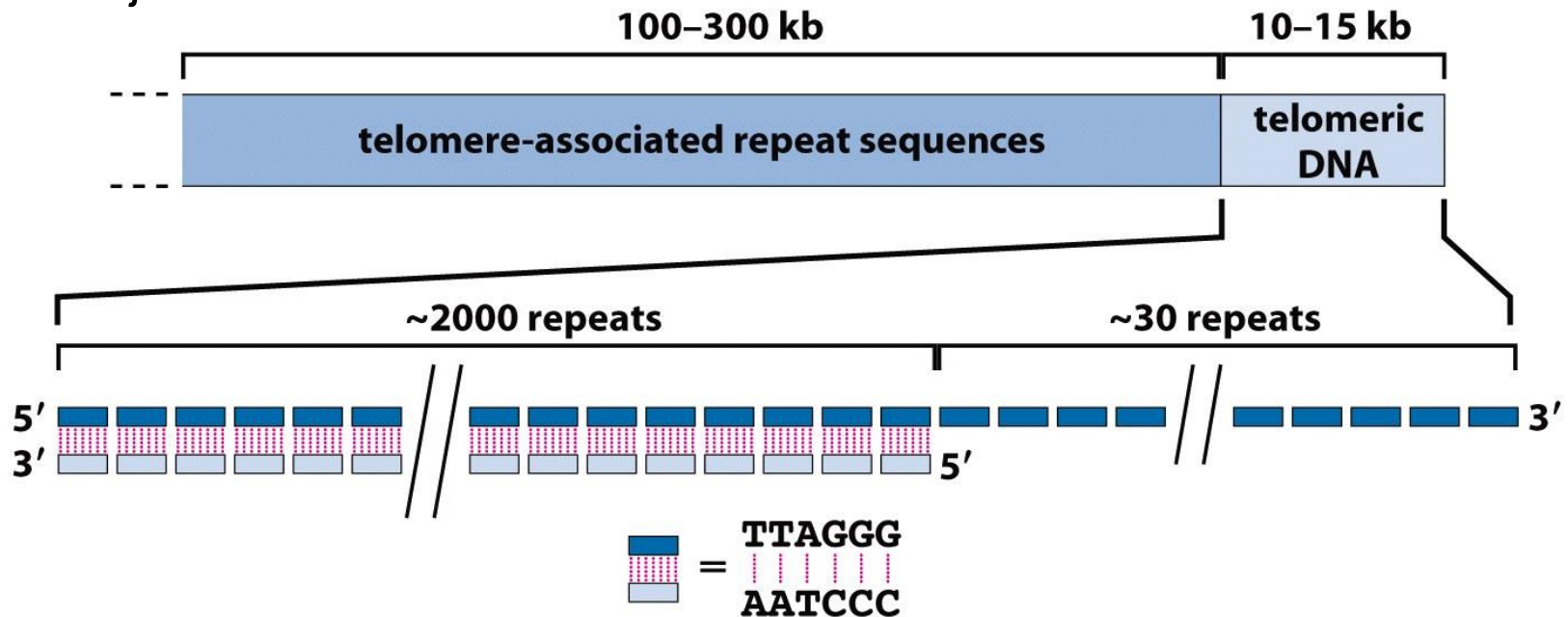
Evolutivna ohranjenost telomerne ponovitve

TABLE 2.2 EVOLUTIONARY CONSERVATION OF TELOMERIC REPEAT SEQUENCES	
Occurrence	Consensus telomere repeat sequence ^a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TG ₁₋₃
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	TTACAG ₁₋₈
<i>Neurospora crassa</i>	TTAGGG
<i>Paramecium</i>	TTGGGG
<i>Trypanosoma</i>	TAGGGG
<i>Chlamydomonas</i>	TTTTAGGG
<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG
Nematodes	TTAGGC
Vertebrates	TTAGGG

^aIn the direction toward the end of the chromosome. Note: although telomere function is conserved throughout eukaryotes and telomeric repeat sequences are generally strongly conserved, the telomeres of arthropods, such as *Drosophila*, are radically different in structure, being composed of long DNA repeats that are unrelated to the TG-rich oligonucleotide repeats found in other eukaryotes.

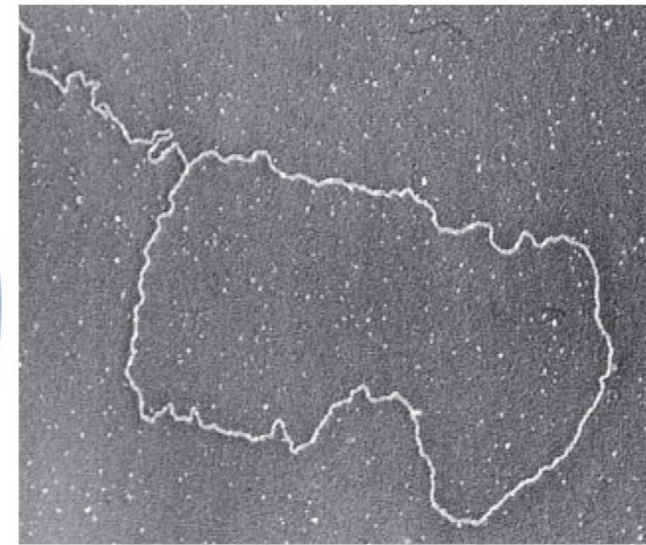
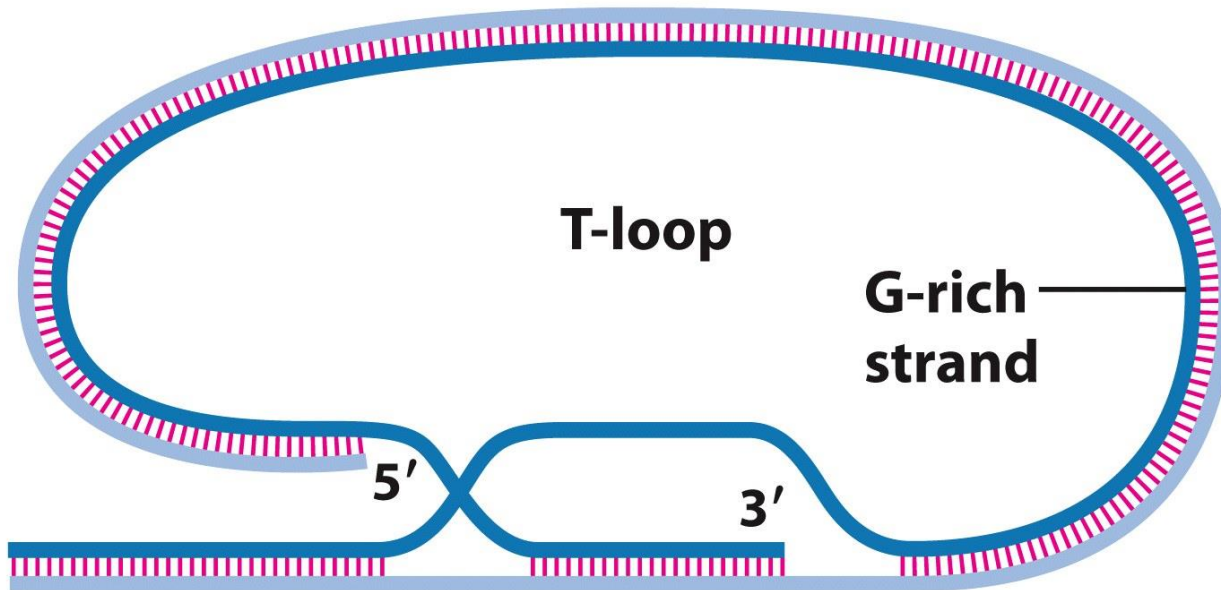
Struktura telomera

- Na koncih človeških kromosomov so zaporedja 1700-2500 kopij tandemskih ponovitev TTAGGG.
- G bogata veriga se nadaljuje še za približno 30 ponovitev.
- Na ponovitveno zaporedje se veže kompleks shelterin (ali **telosom**), ki vsebuje proteine TRF1 in TRF2 (vežeta se na dvovertično ponovitev) ter POT1 (veže enoverižno ponovitev).
- Pred telomerno DNA je 100-300kb ponovitev, ki še nimajo znane funkcije.



T-zanka

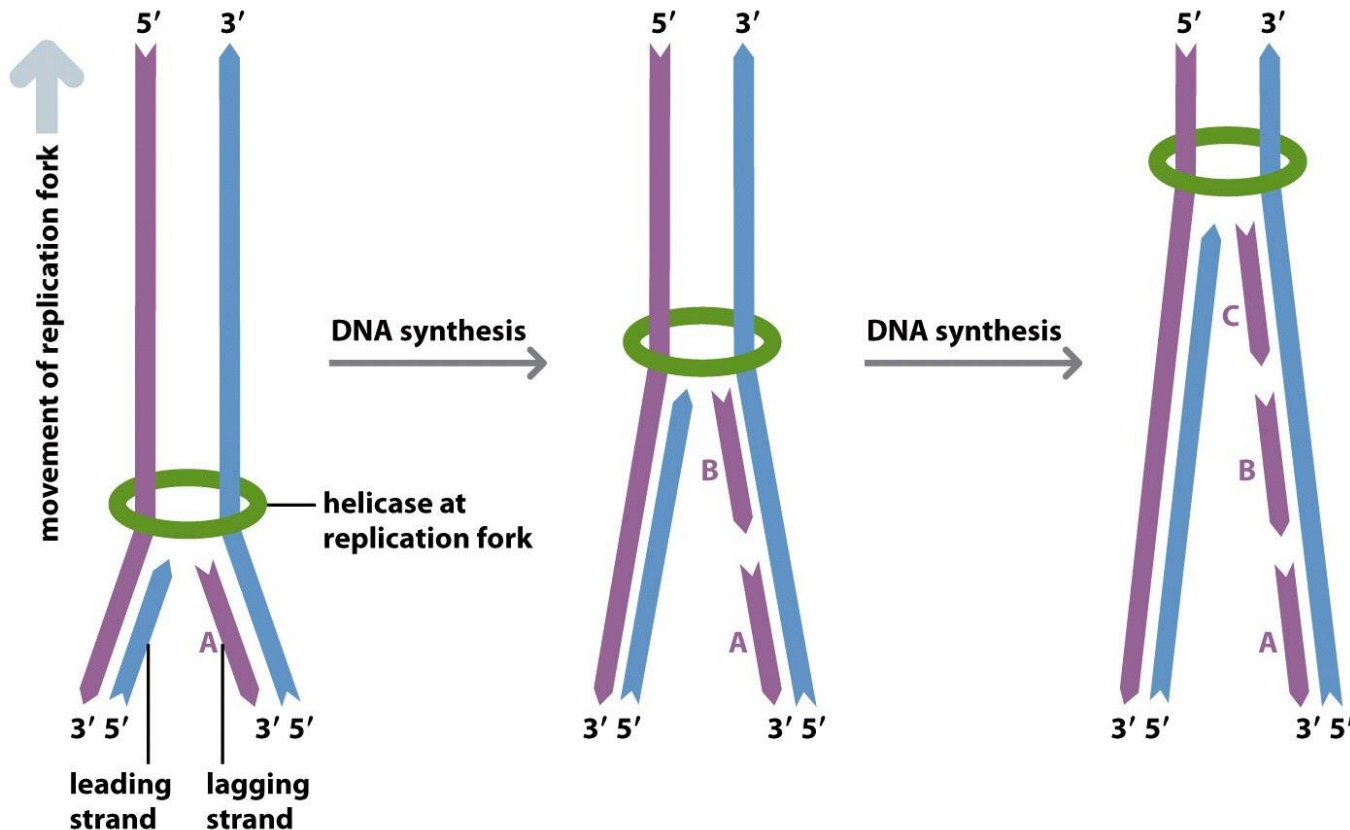
- Enoverižni konec G-bogate verige se lahko veže na komplementarno C-bogato zaporedje pred koncem kromosoma.
- Verjetno imajo zaščitno funkcijo pred naravnimi mehanizmi popravljanja dvojne prekinitve DNA.



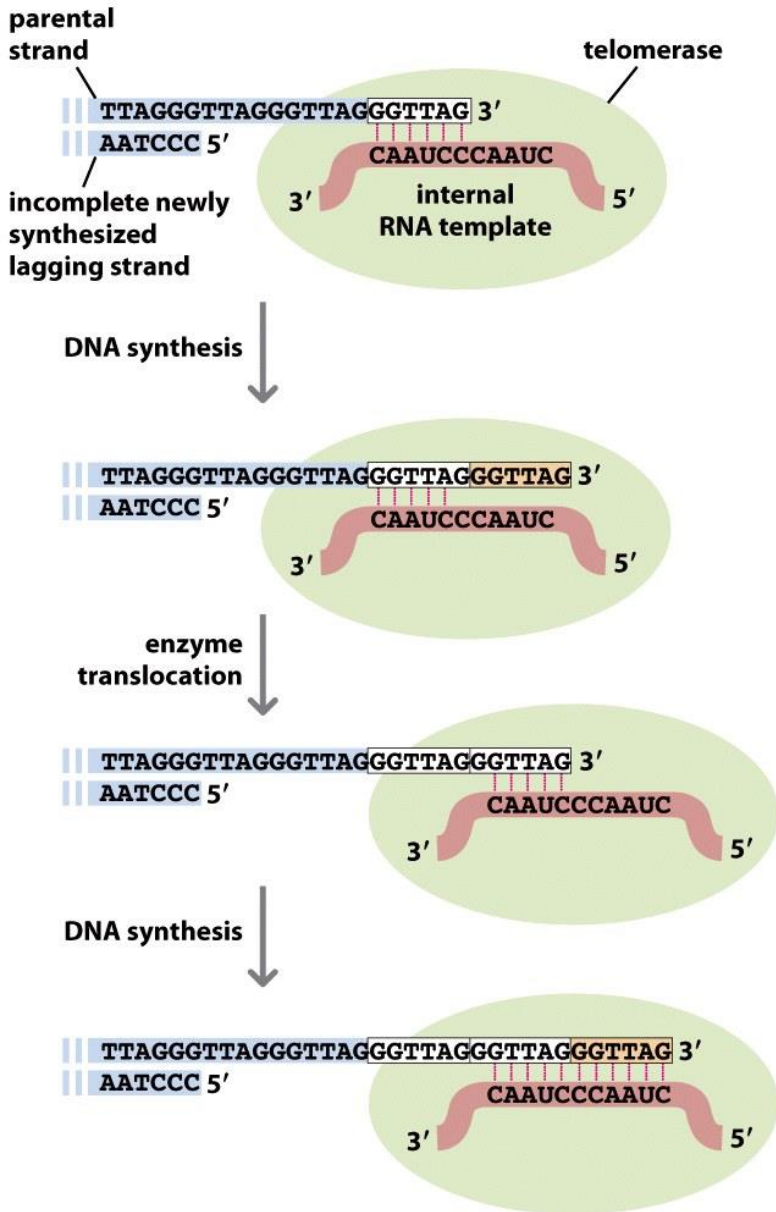
1 μm

Problem replikacije koncev kromosomov

- Sinteza DNA poteka 5'→3'. Vodilna raste v smeri sinteze 5'→3'. Zaostajajoča veriga se sintetizira v koščkih (Okazakijevi fragmenti).
- RNA polimeraza tvori RNA začetnik za katerim se začne sinteza zaostajajoče verige.
- Na koncih linearnih kromosomov to ni mogoče.



Replikacija telomerne DNA

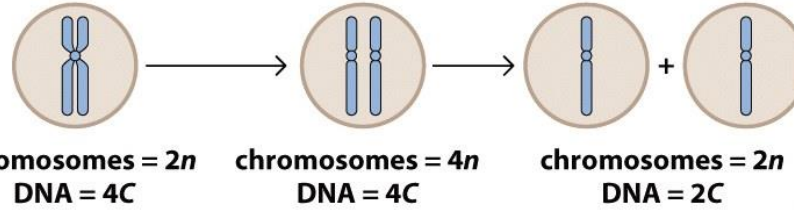


- 3' konec starševske DNA se podaljša z uporabo telomeraz.
- RNA komponenta telomeraze, TERC, vsebuje na 5' koncu skoraj popolno tandemsko ponovitev. CUAACCCUAAC, ki je matrica za sintezo novih telomernih ponovitev na starševski verigi.
- S podaljšanjem vodilne verige se tvori template za zaostajajočo verigo, ki jo zapolni DNA polimeraza.
- Ker zaostajajoča veriga ne more zapolniti zaporedja do konca, ostane 3' G-bogat podaljšek.

Mitoza

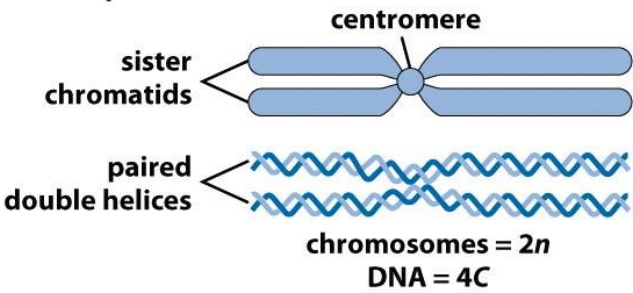
Celični cikel

M phase: sister chromatids separate to give two chromosomes that are distributed into two daughter cells



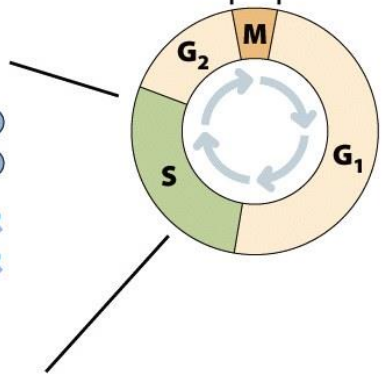
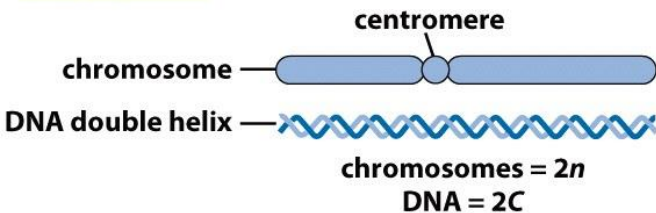
- Faza M – delitev kromosomov in celice.
- Interfaza: G_1 , S, G_2 .
- Faza S – replikacija DNA.
- G_1 in G_2 sta vmesni fazi.

late S phase: two DNA double helices per chromosome

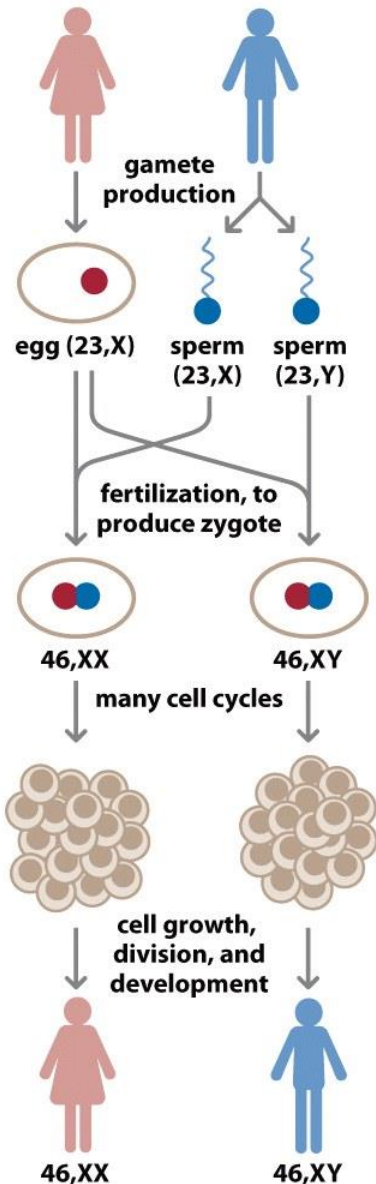


↑ DNA replication

early S phase: one DNA double helix per chromosome

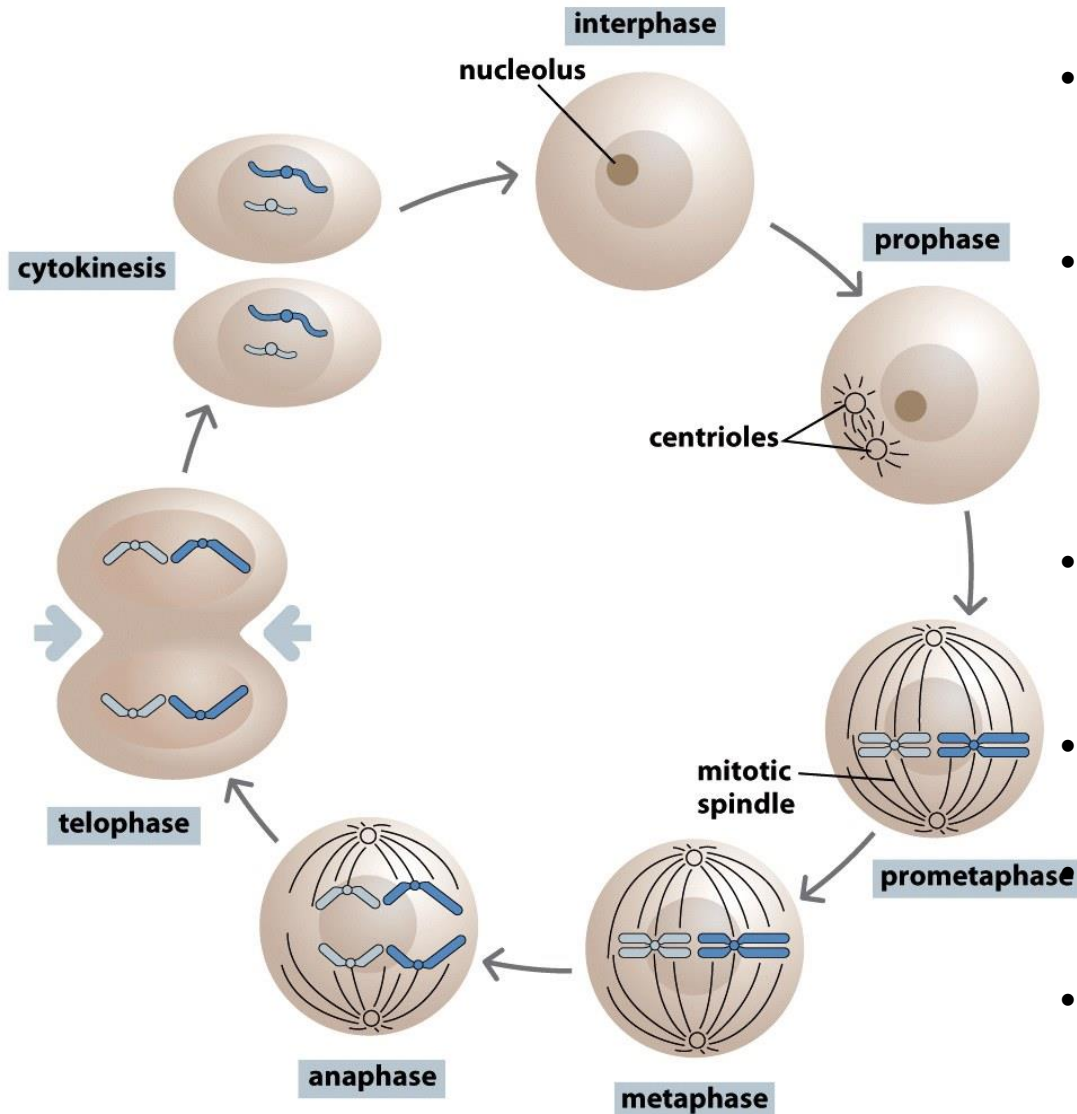


Kromosomski vidik življenjskega cikla



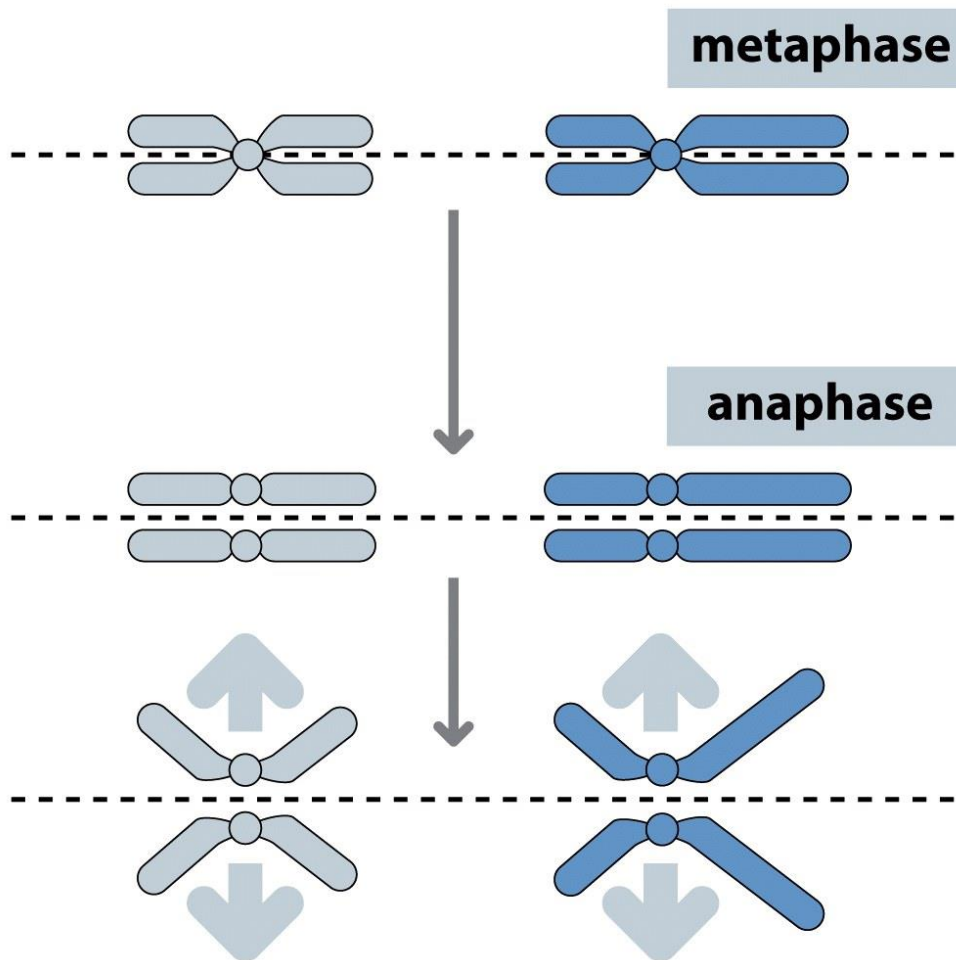
- Haploidna jajčna celica in spermij nastaneta iz diploidnih prekurzorskih celic.
- Jajčne celice imajo 23,X kromosome.
- Spermiji imajo 23,X ali 23,Y.
- Po oploditvi ima diploidni zigot 46,XX ali 46,XY.
- Vse potomske celice (razen gametov potomcev) imajo enako število kromosomov.

Mitoza in citokineza



- Interfaza – podvojeni kromosomi so še vedno razpršeni v jedru.
- Profaza – centrioli se ločita in migrirata na nasprotna konca v celici.
- Prometafaza – jedrna membrana razpade, močno zapakirani kromosomi se s centromeri vežejo na mikrotubulne nitke delitvenega vretena.
- Metafaza – kromosomi so poravnani po sredini delitvenega vretena.
- Anafaza – sestrške kromatide se ločijo in potujejo proti polom.
- Telofaza – začneta se oblikovati jedra.
- Citokineza – Filamenti na plazemski membrani se zožijo in razdelijo celici.

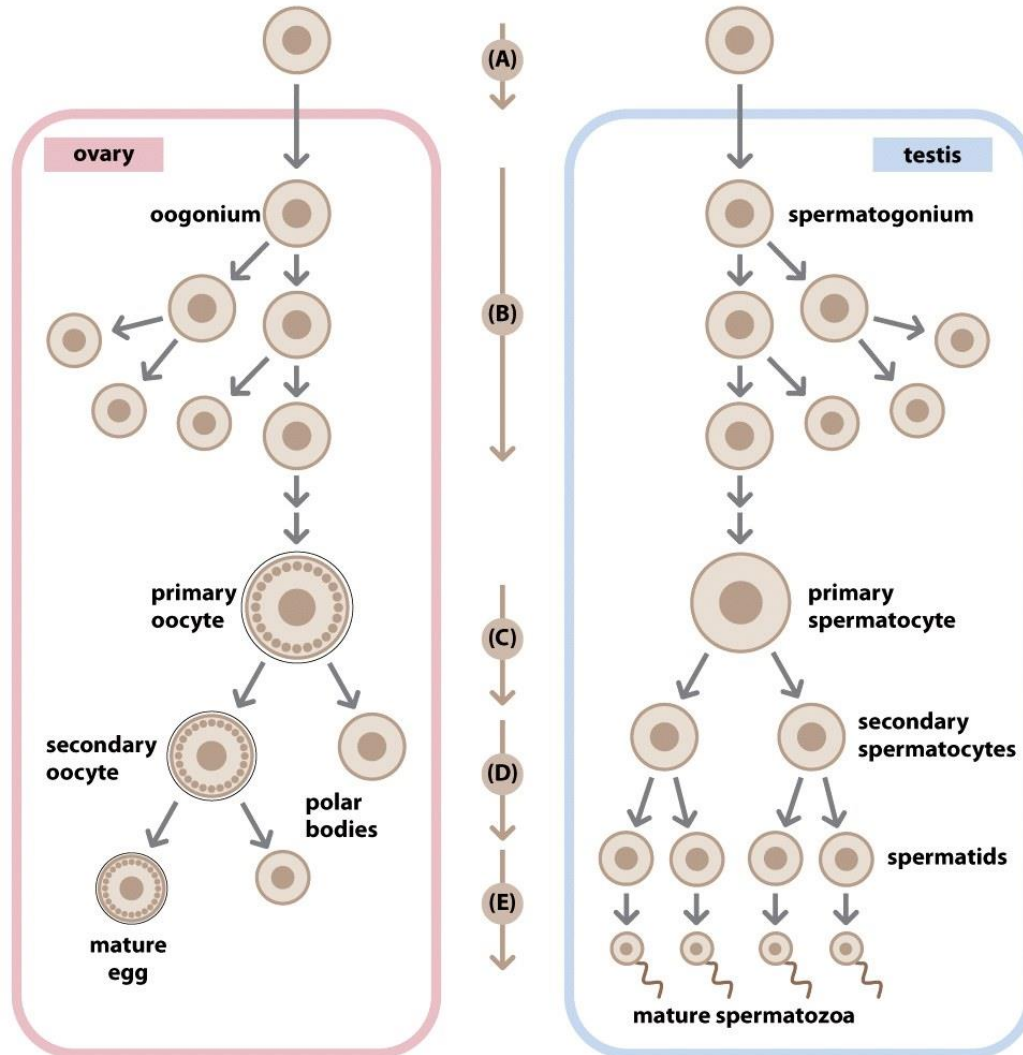
Tranzicija iz metafaze v anafazo



- Metafazni kromosomi se poravnajo v ekvatorijalnem delu.
- Sestrski kromatidi sta čvrsto povezani s **kohezinskimi kompleksi** pri centromerah .
- Kohezninski kompleksi razpadejo ob prehodu v anafazo.
- Mikrotubulske nitke povlečejo kromatide proti nasprotujočim polom.

Mejoza

Gametogeneza



- Diploidne prvotne (ang. primordial) zarode celice migrirajo v gonade embrijev. Sledi več ciklov mitoze za tvorbo oogonijev in spermatogonijev.
- Sledijo dodatne mitotske delitve do primarnih oocitov in spermatocitov.
- Mejoza I. Po duplikacij DNA so celice tetraploidne. Pride do prve delitve, ki je pri ženskah asimetrična.
- Mejoza II. Diploidni sekundarni oociti in spermatociti se ponovno delijo. Pri ženskah je delitev ponovno asimetrična.
- Spermatide dozoriijo v spermije.

Mešanje materinskih in očetovskih kromosomov

- Naključni nabor 5 od 8.388.608 (2^{23}) možnih kombinacij kromosomov v gametih.

diploid primary spermatocytes

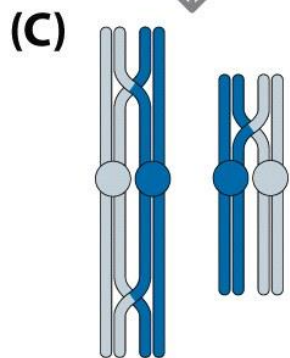
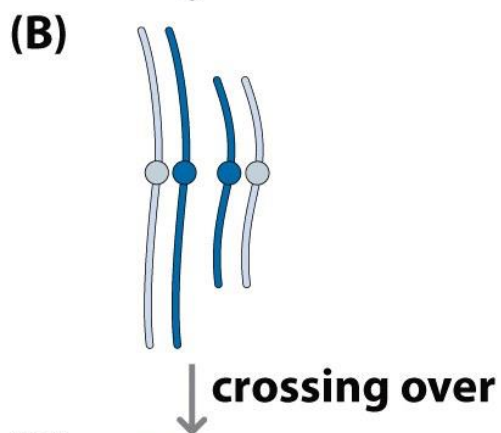
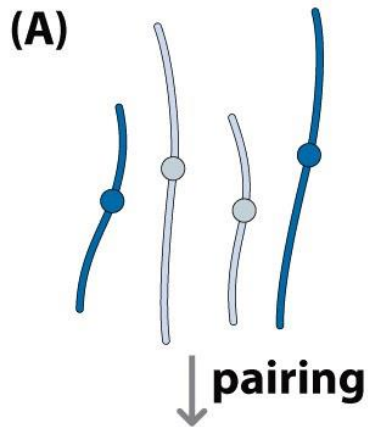
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	maternal
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Y	paternal

↓
meiosis

haploid sperm cells

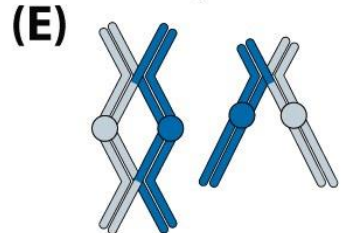
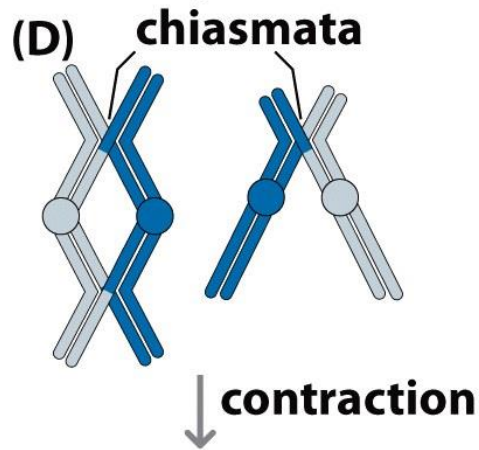
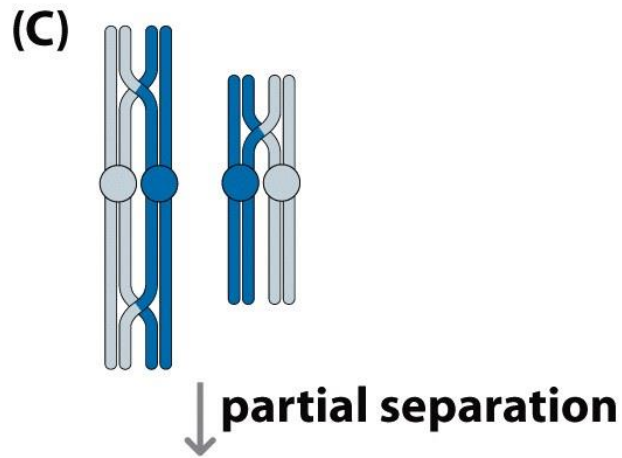
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Y	sperm 1
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	sperm 2
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Y	sperm 3
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	sperm 4
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	sperm 5

Profaza mejoze I



- A. Leptoten. Podvojeni homologni kromosomi se začnejo kondenzirati.
- B. Zigoten. Podvojeni homologni materinski in očetovski kromosomi se združijo in tvorijo **bivalente**, ki vsebujejo štiri kromatide.
- C. Pahiten. Čas rekombinacije. Pride do prekinitve in ponovne vezave materinskih in očetovskih kromatid. Rekombinacija lahko zajame vse štiri kromatide.

Profaza mejoze I

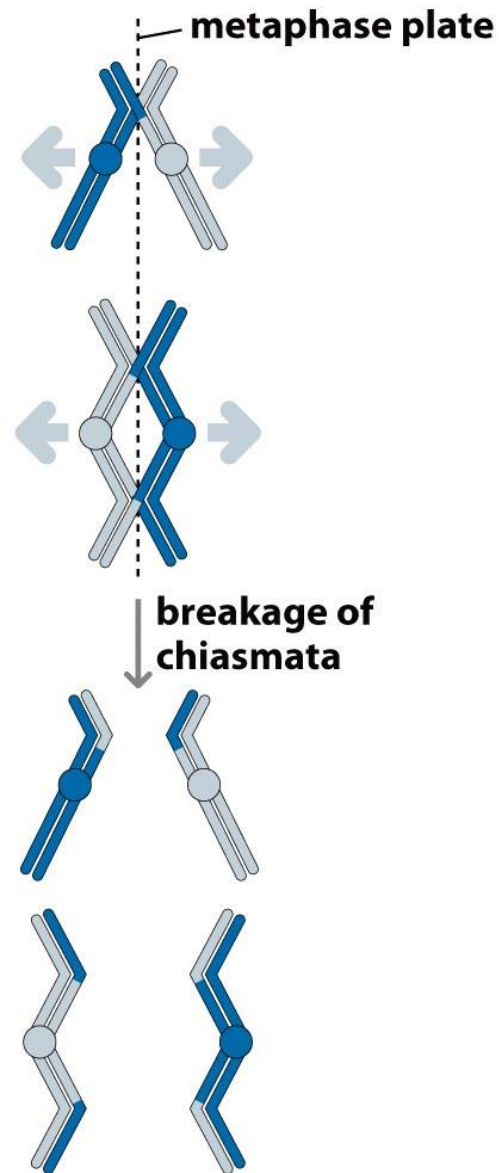


D. Diploten. Homologni kromosomi se ločijo, razen pri **hiazmah** - mestih kjer poteka rekombiacija. Pri moški mejozi je povprečno 55 hiazem, pri ženskah 80.

E. Diakineza. Nadaljevanje ločevanja in prehod v metafazo I.

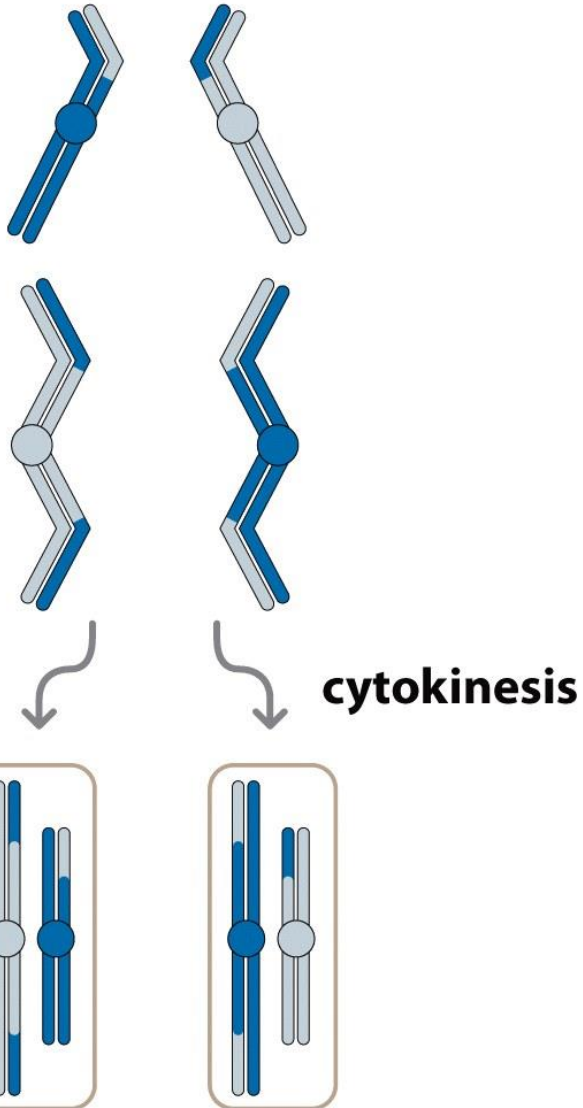
Metafaza I – Anafaza I

- A. Metafaza I. Bivalenti se poravnajo v metafazni ravnini v centru delitvenega vretena. Krčenje nitk vretena vleče kromosome proti polom.
- B. Anafaza I. Hiazme razpadejo.



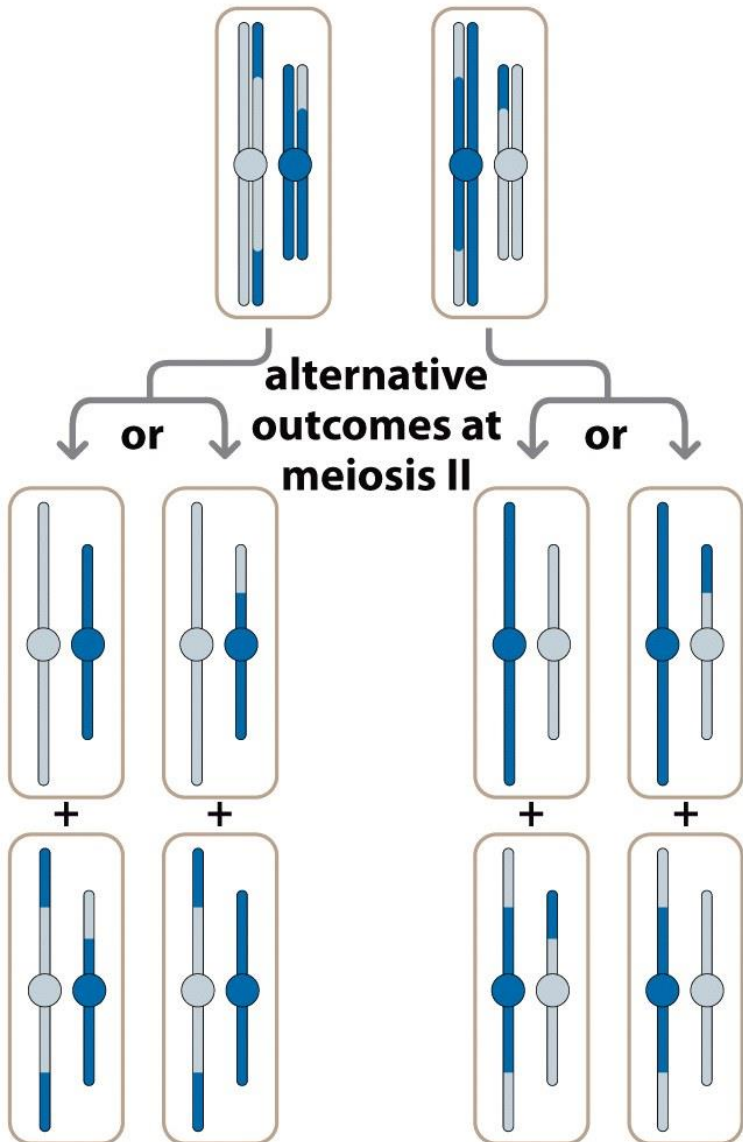
Citokineza I

- C. Citokineza I. Kromosomska kompleta se razdelita v dva sekundarna spermatocita pri moških. Kromatidi delita centromero, vendar zaradi rekombinacije nista več identični.



Mejoza II

- Podobna mitozii, samo da se deli 23 kromosomov (dve kromatidi).
- V anafazi se delijo kromatide, ki so zaradi rekombinacij različne.
- Rekombinacija (v profazi I) in naključna izbira homologov (v anafazi I) zagotavljata skoraj neomejeno število genetsko različnih gametov.



Parjenje X-Y

- Pri mejozi I pri moških je težava z združevanjem X in Y, ker sta zelo različna.
- Vseno pride do njunega združevanja v profazi I, kar zagotovi, da v anafazi I vsaka hčerinska celica dobi eden kromosom (X ali Y).
- Združujeta se s kratkim homolognim regijam na koncih.
- Ker sta regiji prisotni na obeh kromosomih so znane kot **psevdoavtosomne regije**.

Primerjava mitoze in mejoze

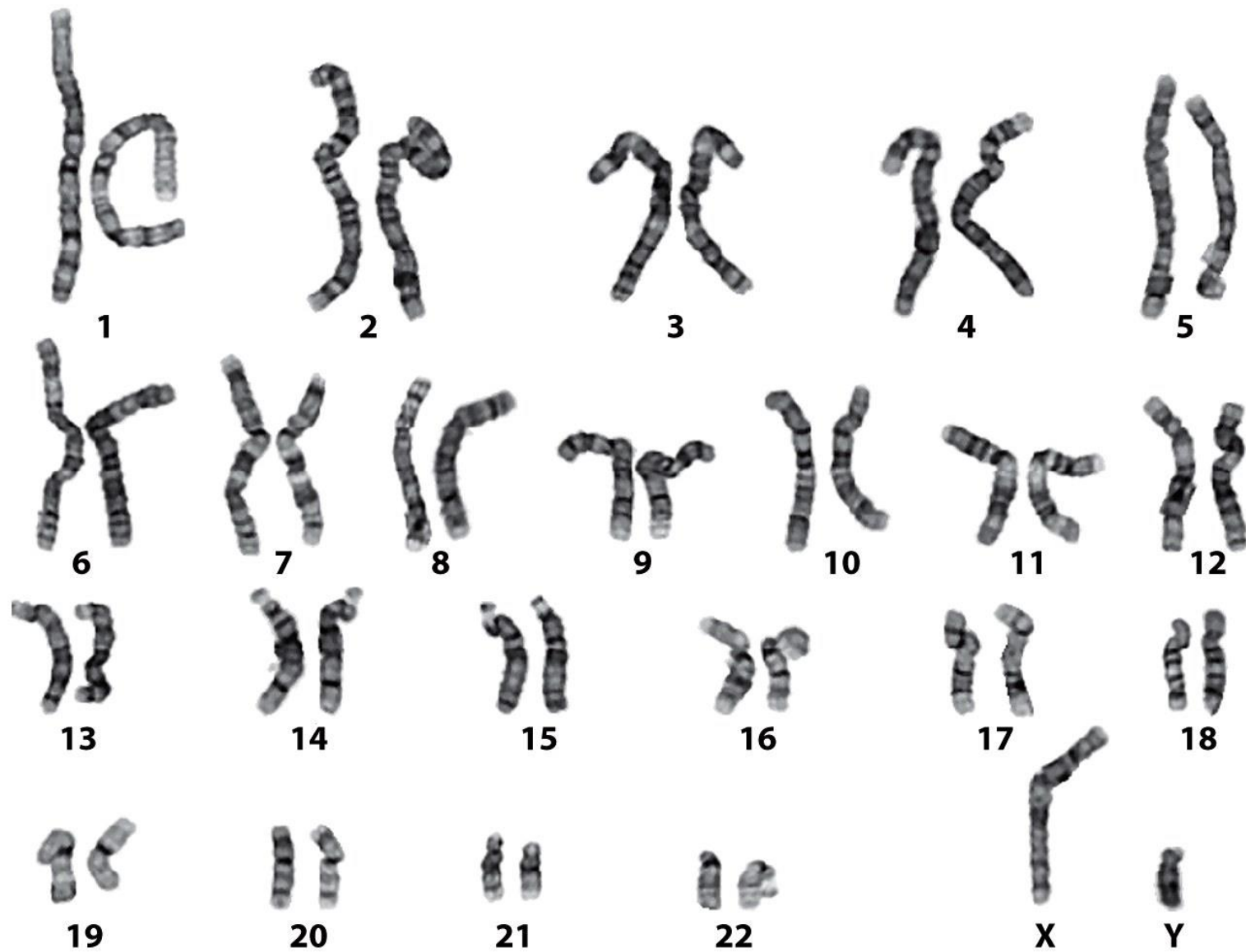
TABLE 2.1 COMPARISON OF MITOSIS AND MEIOSIS		
Characteristic	Mitosis	Meiosis
Location	all tissues	specialized germ line cells in testis and ovary
Products	diploid somatic cells	haploid sperm and eggs
DNA replication and cell division	normally one round of replication per cell division	only one round of replication per two cell divisions
Duration of prophase	short (~30 min in human cells)	can take decades to complete
Pairing of maternal and paternal homologs	no	yes, during meiosis I
Recombination	rare and abnormal	during each meiosis; normally occurs at least once in each chromosome arm after pairing of maternal and paternal homologs
Relationship between daughter cells	genetically identical	genetically different as a result of independent assortment of homologs and recombination

Table 2.1 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

Citogenetika

- Kromosome analiziramo v stopnji delečih se celic.
- V T limfcitih iz krvi lahko z lektini ponovno sprožimo celični cikel.
- Fibroblasti iz biopsij kože so alternativni vir celic.

Prometafazni kromosomi



Kromosomske skupine

TABLE 2.3 HUMAN CHROMOSOME GROUPS		
Group	Chromosomes ^a	Description
A	1–3	largest; 1 and 3 are metacentric ^b but 2 is submetacentric ^c
B	4, 5	large; submetacentric with two arms very different in size
C	6–12, X	of medium size; submetacentric
D	13–15	of medium size; acrocentric ^d with satellites ^e
E	16–18	small; 16 is metacentric but 17 and 18 are submetacentric
F	19, 20	small; metacentric
G	21, 22, Y	small; acrocentric, with satellites on 21 and 22 but not on Y

^aAutosomes are numbered from largest to smallest, except that chromosome 21 is slightly smaller than chromosome 22. ^bA *metacentric* chromosome has its centromere at or near the middle.

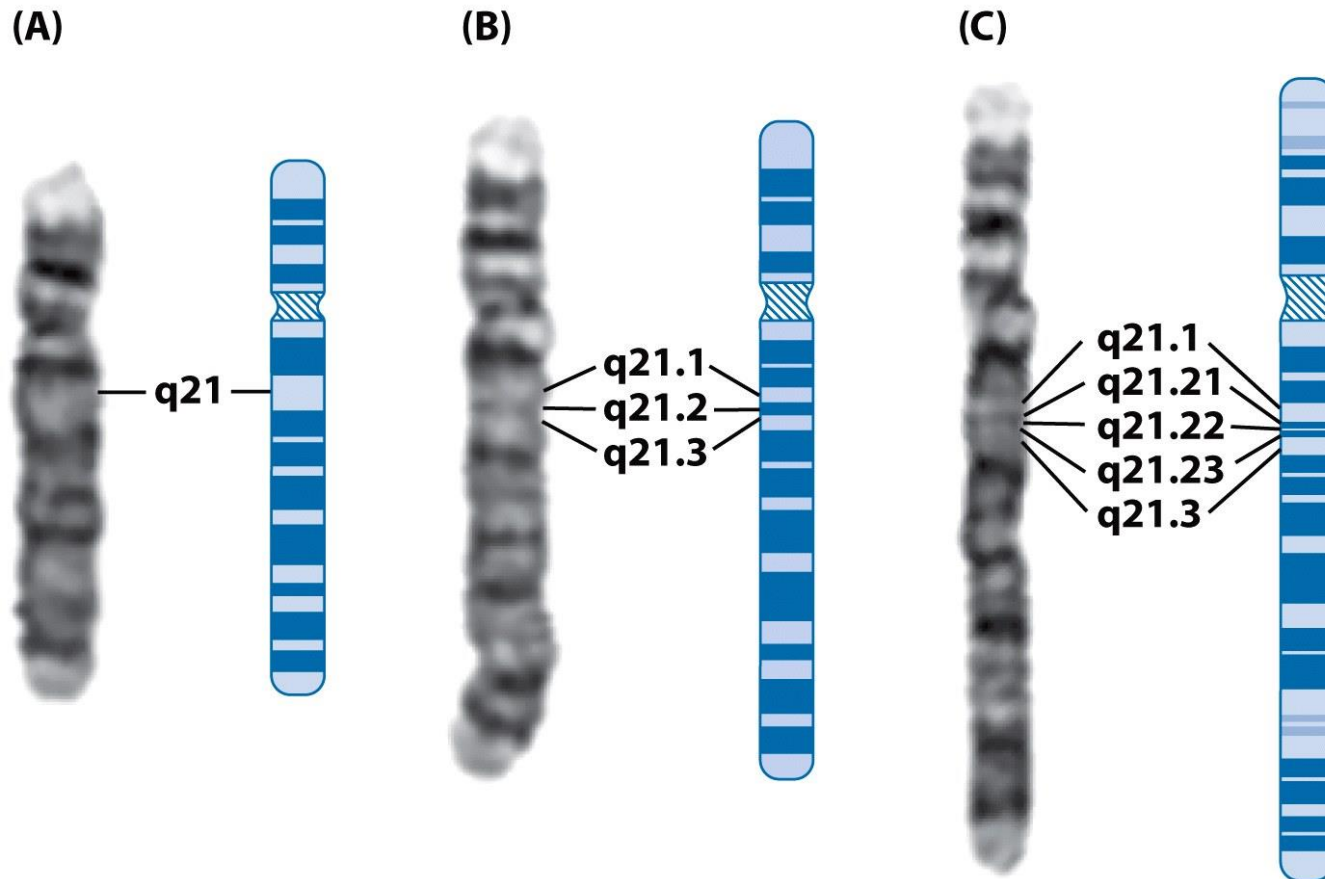
^cA *submetacentric* chromosome has its centromere placed so that the two arms are of clearly unequal length. ^dAn *acrocentric* chromosome has its centromere at or near one end. ^eA satellite, in this context, is a small segment separated by a non-centromeric constriction from the rest of a chromosome; these occur on the short arms of most acrocentric human chromosomes.

Kromosomski pasovi

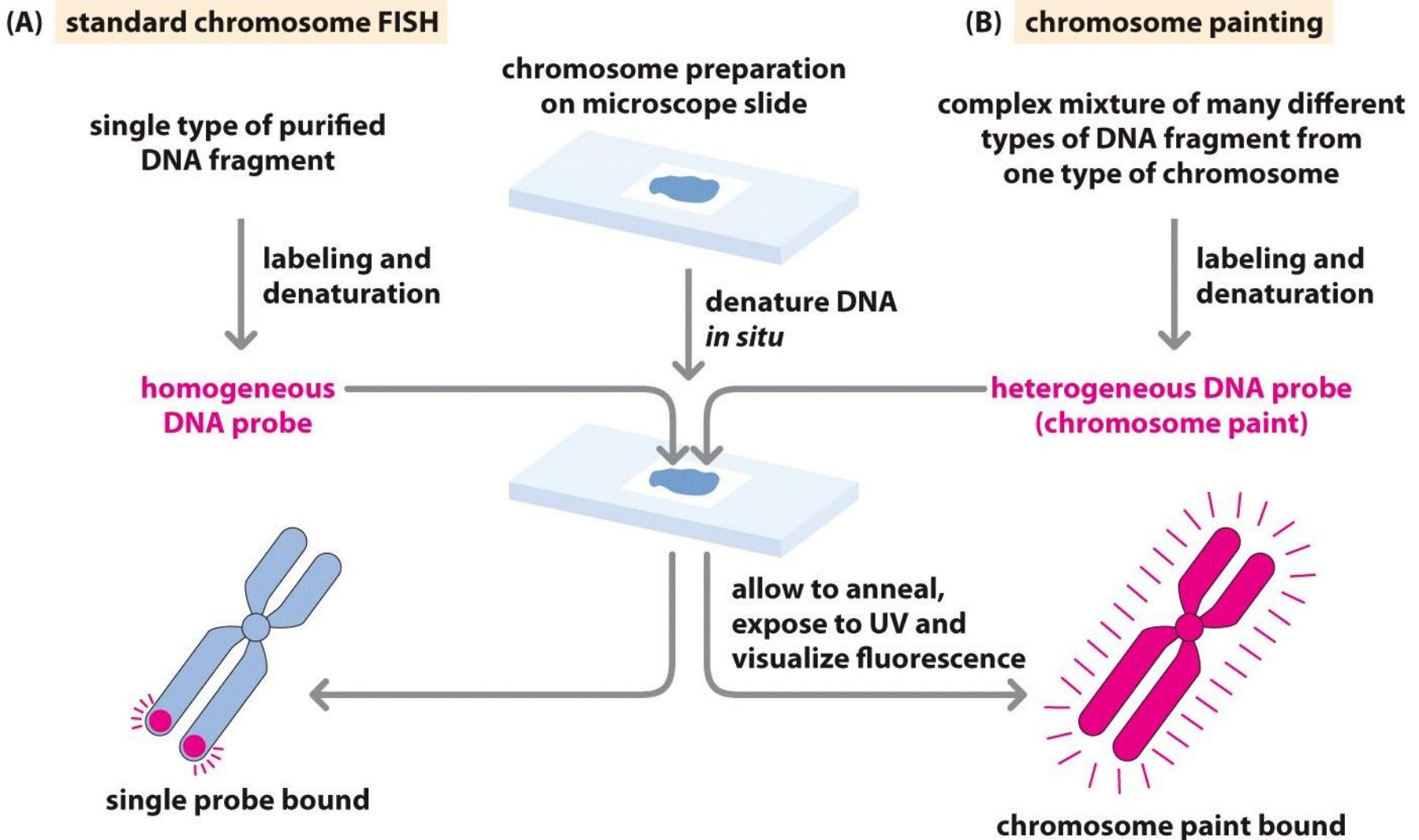
- Vse metodolgija barvanja zahtevajo, da se kromosom denaturira ali encimsko razgradi pred barvanjem.
- Metode:
 - G pasovi. Kontrolirana razgradnja s tripsinom. Sledi barvanje s Giemsa. Temni pasobi so G pasovi.
 - Q pasovi. Barvanje AT bogatih regij z ultraviolično fluorescenčno barvo (DAPI, Hoechst 33258). Q pasovi podobni G pasovom.
 - R pasovi. Nasprotno G pasovom. Vežava na GC bogate regije.
 - T pasovi. Podskupina R, ki je v bližini telomerov.
 - C pasovi. Barva se konstitutivni kromatin pri centromerah.

Različna ločljivost kromosomskih pasov

- Ločljivost pasov se lahko poveča, če se uporabijo prometafazni kromosomi.



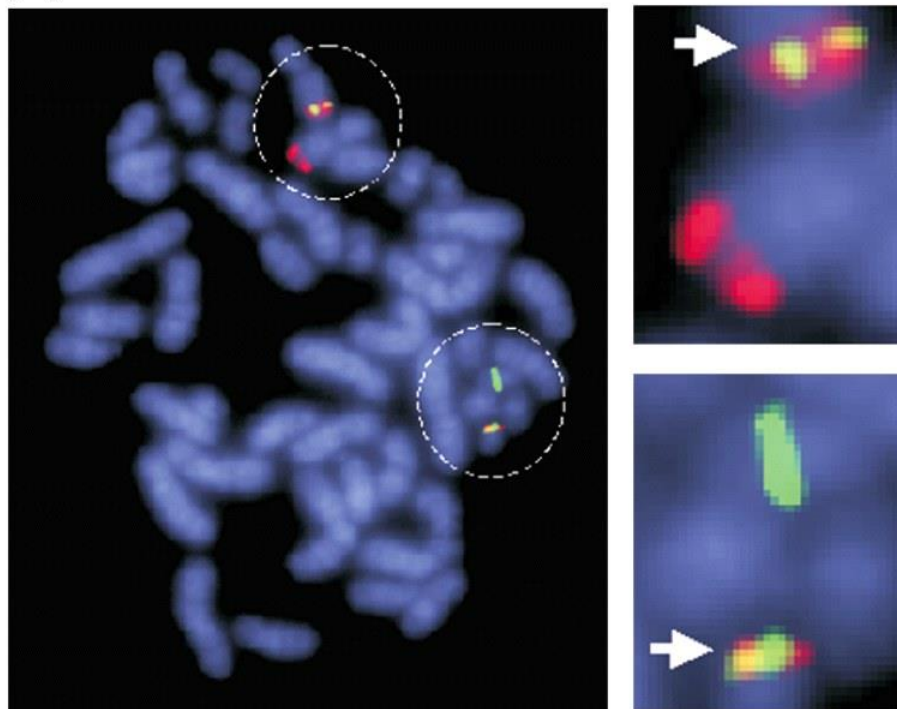
Kromosomsko barvanje in FISH



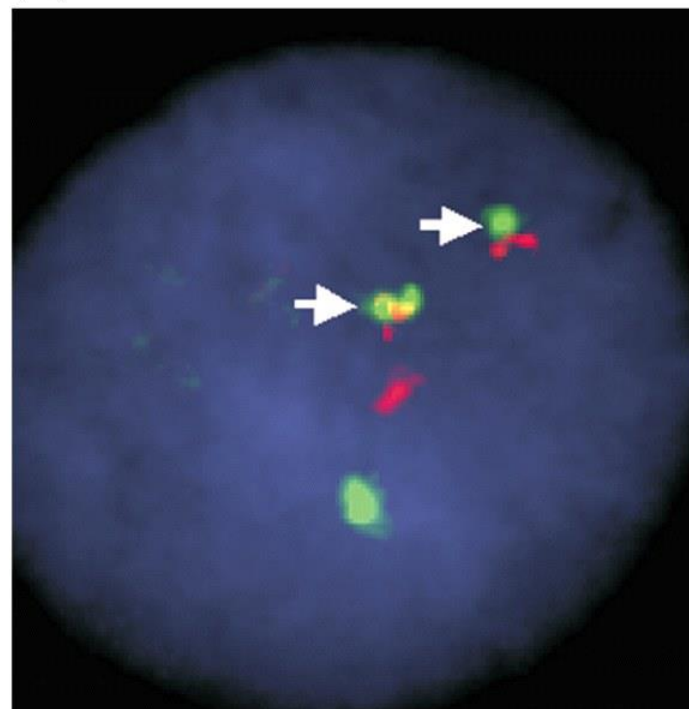
Dvobarvni FISH za detekcijo prerazporeditve

- *BCR-ABL1* prerazporeditev = kronična mieloidna levkemija (CML).
- Recipročna traslokacija $t(9;22)$, kjer pride do prekinitve onkogenega *ABL1* na 9q34 in *BCR* gena na 22q11.
- Na mestih fuzije sta obe barvi.
- Metafazni (A) in interfazni (B) FISH

(A)

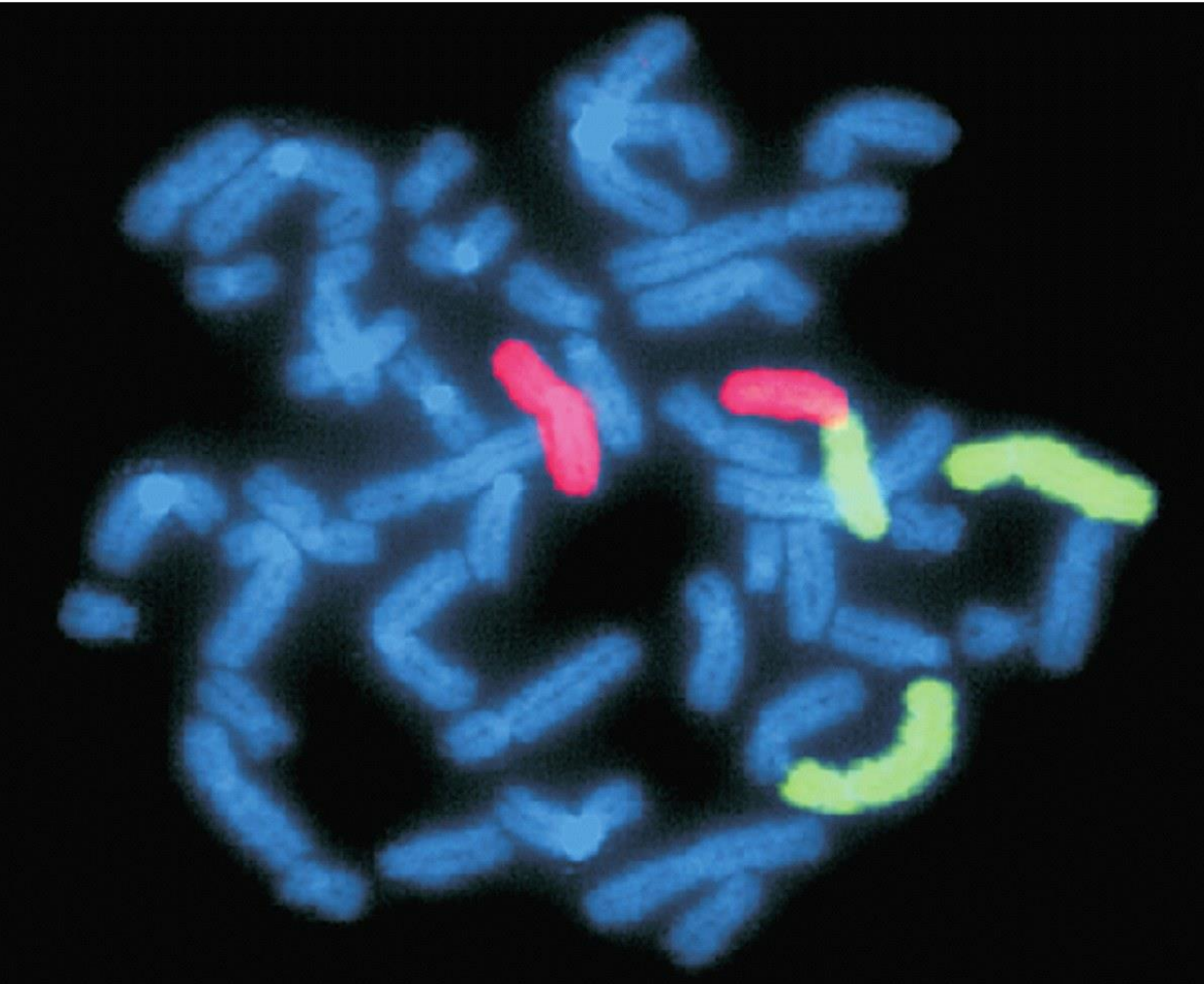


(B)



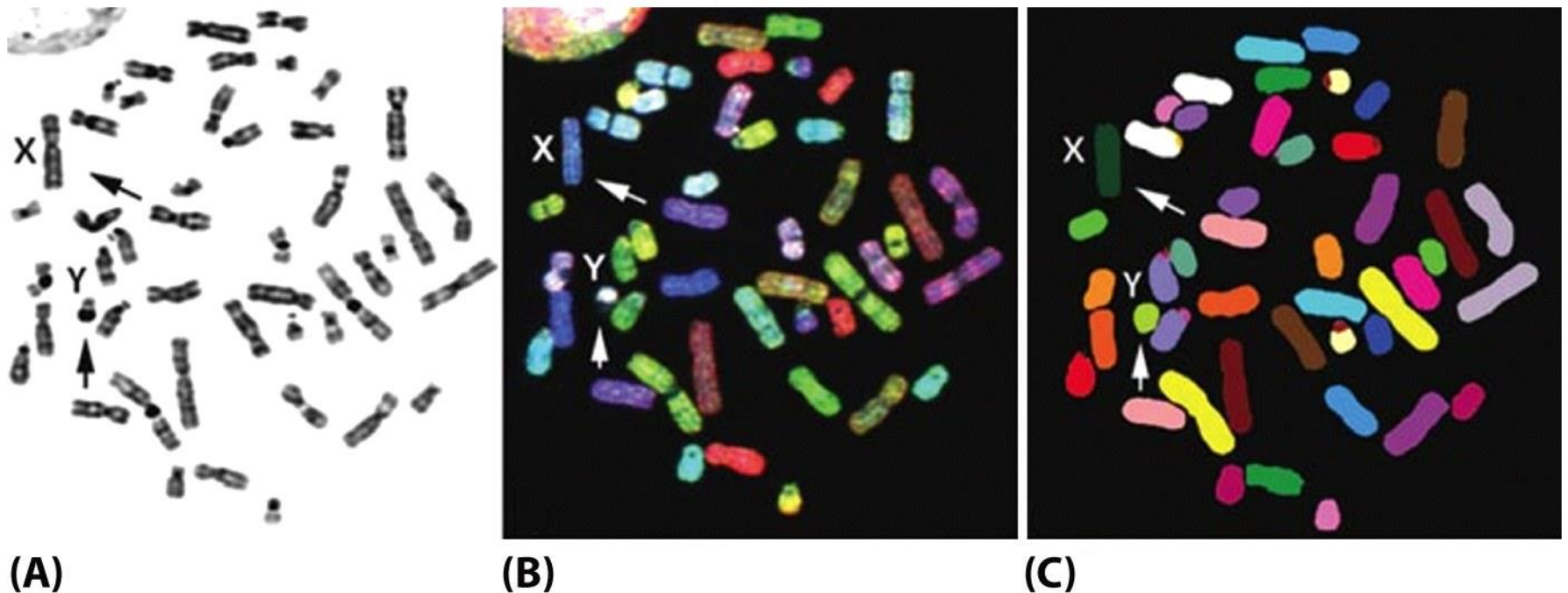
Ugotavljanje prerazporeditve z barvanjem

- V tem primeru so s kariotipizacijo krvi ugotovila napako na X.
- Dodatno zaporedje prisotno na p ročici.
- S kromosomskim barvanjem se vidi, da je vir dodatnega zaporedja C4 (zelen).



Kariotipizacija z metodo SKY

- Različno obarvane sode, ki so specifične za vsak kromosom.
- Digitalna obdelava slike omogoče označevanje posameznih kromosomov s psevdobarvam.



Kromosomske napake

Kromosomske napake

- Vidne spremembe na kromosomih. Definicija odvisna od metode. Standardne citogenetske metode ločijo do 4Mb. S FISH se lahko vidijo manjše spremembe.
- Alt. definicija: Napake pri določenih kromosomskih mehanizmih, kot so napake pri popravljanju, rekombinaciji ali segregaciji.
- Glede na distribucijo poznamo **konstitucionalne** napake, ki so prisotne v vseh celicah v telesu, ter **somatske** napake prisotne samo v določenih celicah ali tkivih.
- Delijo se tudi na **numerične** napake (spremenjeno število kromosomov) ali **strukturne** napake.
- ~15 % nosečnosti abortira spontano - pri ~1/2 so kromosomske napake.

TABLE 2.4 NOMENCLATURE OF CHROMOSOME ABNORMALITIES		
Type of abnormality	Examples	Explanation/notes
NUMERICAL		
Triploidy	69,XXX, 69,XXY, 69,XYY	a type of polyploidy
Trisomy	47,XX,+21	gain of a chromosome is indicated by +
Monosomy	45,X	a type of aneuploidy; loss of an autosome is indicated by –
Mosaicism	47,XXX/46,XX	a type of mixoploidy
STRUCTURAL		
Deletion	46,XY,del(4)(p16.3)	terminal deletion (breakpoint at 4p16.3)
	46,XX,del(5)(q13q33)	interstitial deletion (5q13–q33)
Inversion	46,XY,inv(11)(p11p15)	paracentric inversion (breakpoints on same arm)
Duplication	46,XX,dup(1)(q22q25)	duplication of region spanning 1q22 to 1q25
Insertion	46,XX,ins(2)(p13q21q31)	a rearrangement of one copy of chromosome 2 by insertion of segment 2q21–q31 into a breakpoint at 2p13
Ring chromosome	46,XY,r(7)(p22q36)	joining of broken ends at 7p22 and 7q36
Marker	47,XX,+mar	indicates a cell that contains a marker chromosome (an extra unidentified chromosome)
Reciprocal translocation	46,XX,t(2;6)(q35;p21.3)	a balanced reciprocal translocation with breakpoints at 2q35 and 6p21.3
Robertsonian translocation (gives rise to one derivative chromosome)	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	a balanced carrier of a 14;21 Robertsonian translocation. q10 is not really a chromosome band, but indicates the centromere; der is used when one chromosome from a translocation is present
	46,XX,der(14;21)(q10;q10),+21	an individual with Down syndrome possessing one normal chromosome 14, a Robertsonian translocation 14;21 chromosome, and two normal copies of chromosome 21

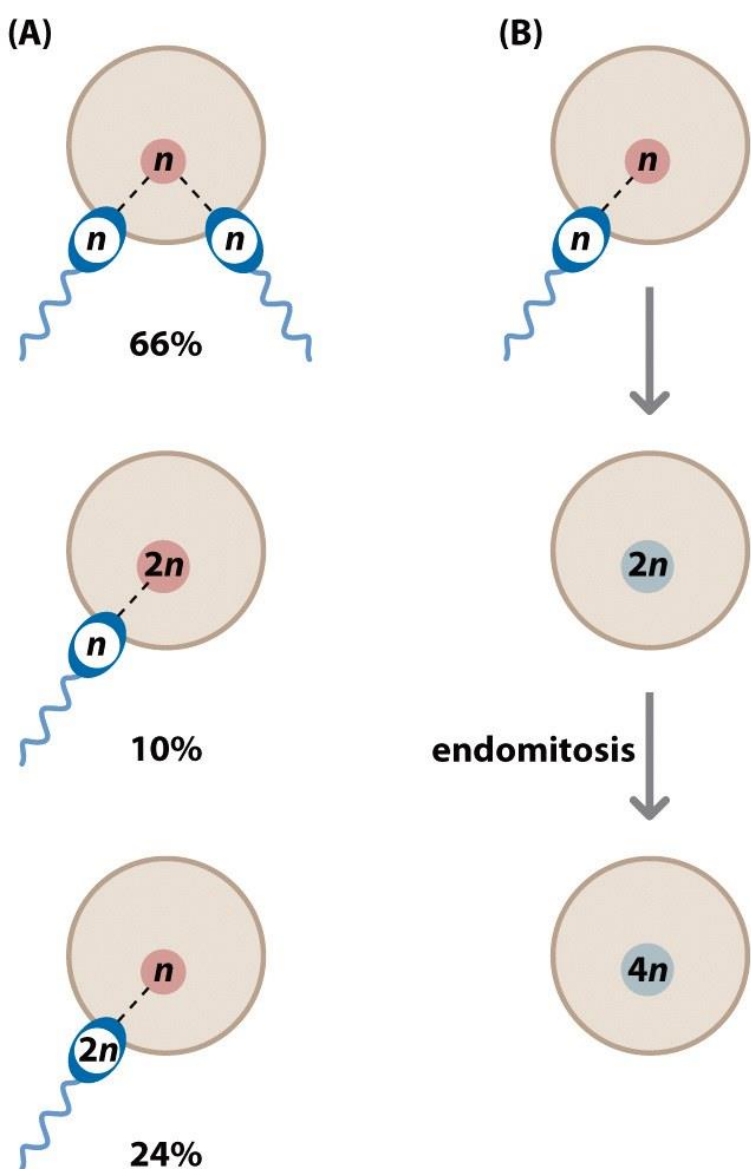
This is a short nomenclature; a more complicated nomenclature is defined by the ISCN that allows complete description of any chromosome abnormality; see Shaffer LG, Tommerup N (eds) (2005) ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger.

Table 2.4 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

Napake v številu kromosomov

- Možni so trije tip numeričnih napak.
 1. **Poliploidija.** Povečanje celotnega seta kromosomov ($3n$, $4n$).
 2. **Aneuploidija.** Eden ali več kromosomov manjka ali ima več kot dve kopiji.
 3. **Miksoploidija.** Dve ali več genetsko različnih celičnih linij znotraj osebka.
 - Če celice izvirajo iz iste zigote potem govorimo o **mozaicizmu**.
 - Če izvirajo iz različnih zigotov govorimo o **himerizmu**.
 - **Aneuploidni mozaicizem** je relativno pogost. Nastane zaradi nondisjunkcije v eni zgodnji celici.
 - **Poliploidni mozaicizem.** Verjetno nastane pri fuziji polarnega telesca z eno od celic zigota.

Poliploidija



- 1-3 % vseh ugotovljenih zanositev pripelje do **triploidnega** embrija.
- Najbolj pogosta je **dispermija**, ko dva spermija oplodita eno jajčno celico.
- Bolj redke so oploditve z diploidnimi gameti.
- **Tetraploidnost** je še bolj redka in zmeraj smrtna.
- Nastane, ko pride do **endomitoze** – podvojitve DNA brez delitve celice zigota.

TABLE 2.5 CLINICAL CONSEQUENCES OF NUMERICAL CHROMOSOME ABNORMALITIES	
Abnormality	Clinical consequences
POLYPLOIDY	
Triploidy (69,XXX or 69,XYY)	1–3% of all conceptions; almost never born live and do not survive long
ANEUPLOIDY (AUTOSOMES)	
Nullisomy (lacking a pair of homologs)	lethal at pre-implantation stage
Monosomy (one chromosome missing)	lethal during embryonic development
Trisomy (one extra chromosome)	usually lethal during embryonic or fetal ^a stages, but individuals with trisomy 13 (Patau syndrome) and trisomy 18 (Edwards syndrome) may survive to term; those with trisomy 21 (Down syndrome) may survive beyond age 40
ANEUPLOIDY (SEX CHROMOSOMES)	
Additional sex chromosomes	individuals with 47,XXX, 47,XXY, or 47,XYY all experience relatively minor problems and a normal lifespan
Lacking a sex chromosome	although 45,Y is never viable, in 45,X (Turner syndrome), about 99% of cases abort spontaneously; survivors are of normal intelligence but are infertile and show minor physical diagnostic characteristics

^aIn humans, the embryonic period spans fertilization through to the end of the eighth week of development. Fetal development then begins and lasts until birth.

Aneuploidija

Trisomija ($2N + 1$)

Najbolj pogosta — trisomija 21 (Downov sindrom)

1:750 živih rojstev

Manj pogoste

Trisomija 18 (Edwardov sindrom, 1:10.000)

Trisomija 13 (Patauov sindrom, 1:20.000)

Zakaj se trisomija 21 bolje prenese v primerjavi z drugim trisomijam?

Majhen kromosom → manj genov → manjši vpliv

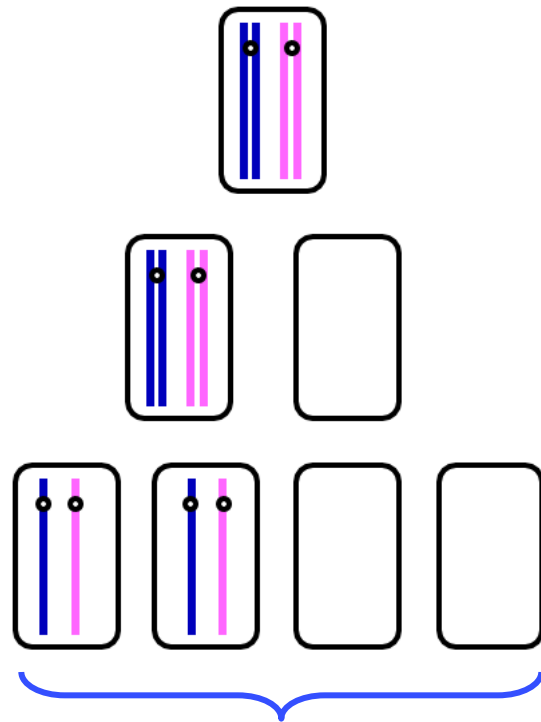
Hierarhija tolerance aneuploidij

- Aneuploidija seks kromosomov > aneuploidija avtosomov
- Trisomija avtosomov > monosomija avtosomov

Aneuploidija

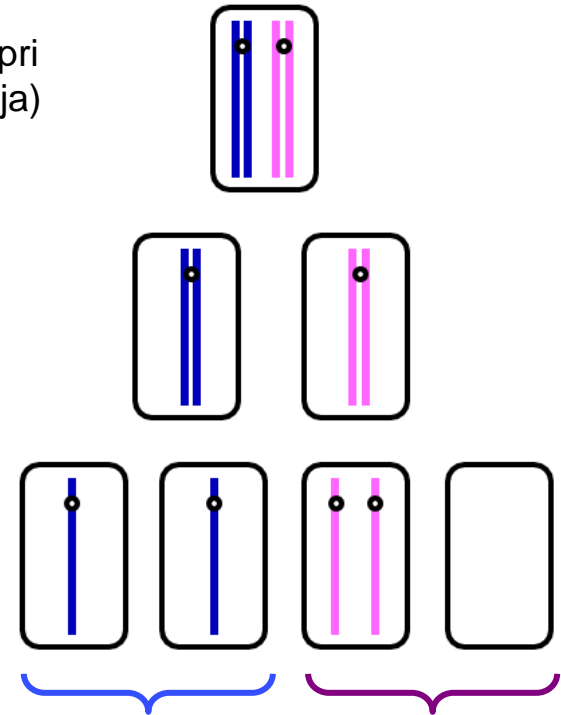
Glavni vzrok aneuploidije – nondisjunkcija pri mejozi.

Nondisjunkcija v mejozi I



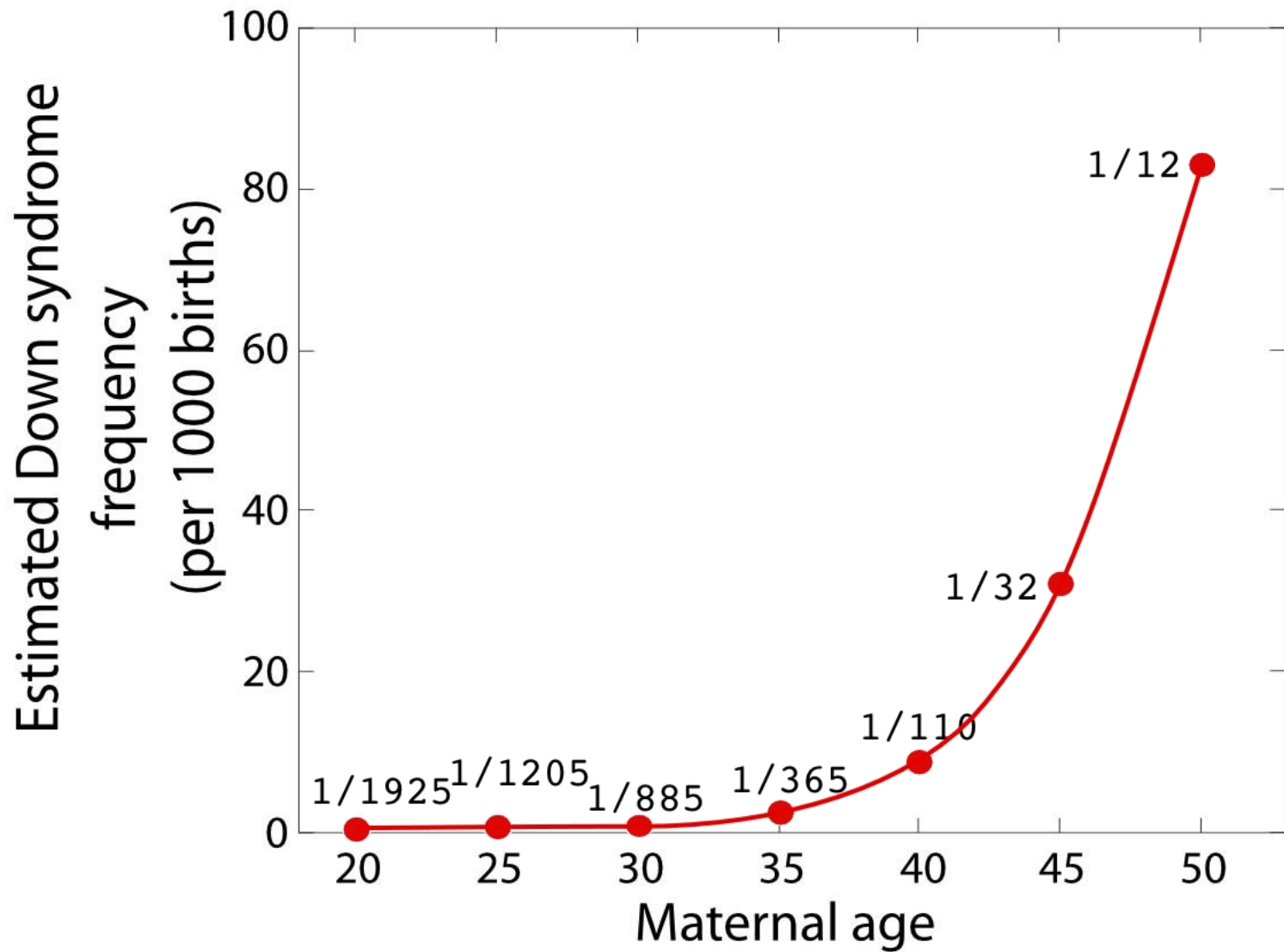
Vse štiri so defektivne

Nondisjunkcija v mejozi II



2 normalni 2 defektivni

Anevploidija in starost matere



Aneuploidija in starost matere

Zakaj pride do povečanja ND pri staranju ?

Pomembno je vedeti

- Pri človeku oociti začnejo mejozo pred rojstvom.
- Vse do ovulacije so ustvaljene v profazi I mejoze.

- Napake pri checkpoint pri starejših oocitah?
- Manj močno delitveno vreteno?
- Najprej se uporabijo “dobri” oociti?

Downov sindrom

ZWK99024 KEY



- Trisomija 21
- 1:1.250 rojstev



Downov sindrom



Kratke, široke roke

Kratki prsti

Groba koža

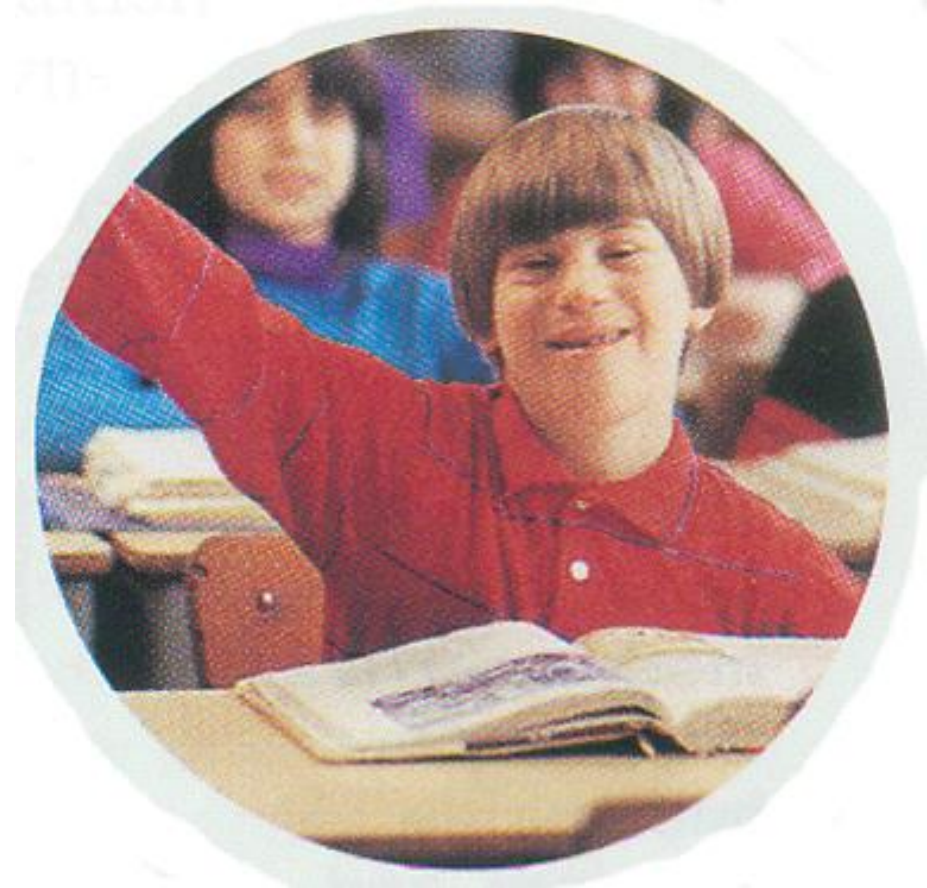
Impotenca pri moških

Mentalno zaostali

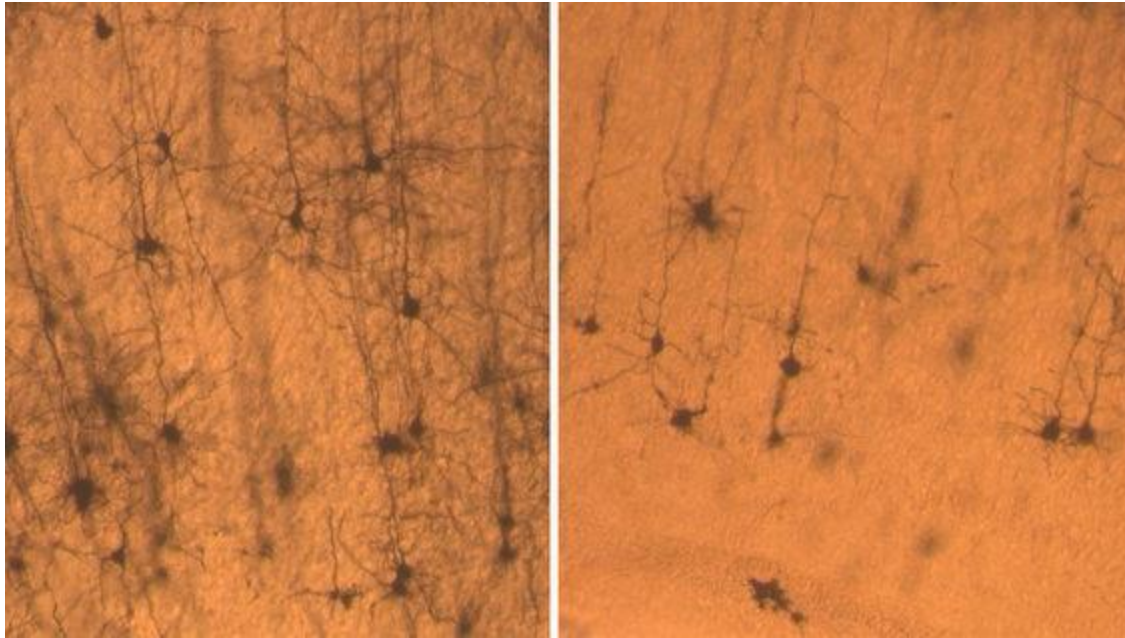
Majhen okrogel obraz

Štrleč jezik

Krajša življenska doba



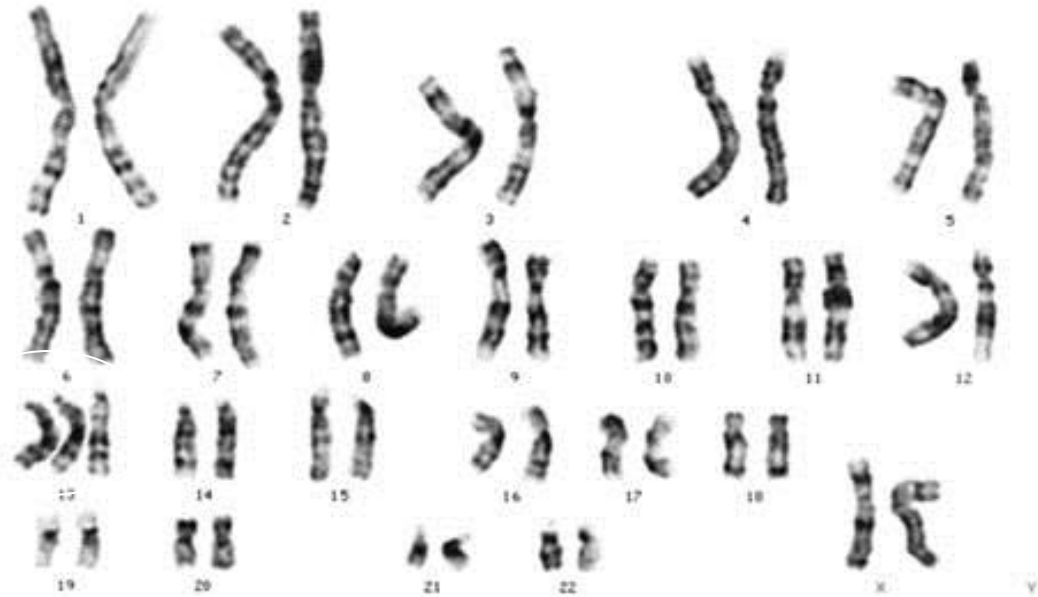
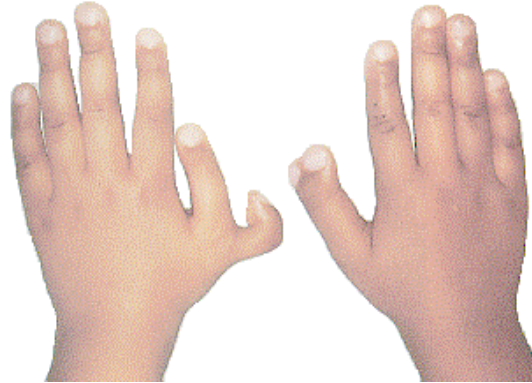
Molekularne osnove Downovega sindroma



- Dodatni C21 vpliva na učenje in spomin, ker zmanjša izražanje SNX27.
- Nevroni normalne miške so daljši in bolj razvejani od nevronov mišk, katerim manjka SNX27.
- Pri Downovem sindromu v možganih človeka pride do zmanjšanja SNX27 (“sorting nexin 27”).
- SNX27 drži GluR na površini nevronov.
- Na C21 je miR-155, ki vpliva na SNX27. Pri Downovem sindromu je izražanje miR-155 povečano, kar zmanjša izražanje SNX27.
- Zdravljenje? Ob povečanju izražanja SNX27 (vnos z virusom) Downove miške izboljšajo kognitivne funkcije.
- Virusi ne funkcionirajo pri človeku. Male molekule?

Pataujev sindrom

- Trisomija C13
- 1:14.000 rojstev
- Majhna glava in majhne ali manjkajoče oči
- Mentalna zaostalost
- Poškodbe srca
- Dodatni prsti
- Nenormalni spolni organi
- Zajčja usnica
- Večina umre nekaj tednov po rojstvu



Edwardsov sindrom

- 47, +18
- 1:4.400 rojstev
- XX=80%; XY=20%



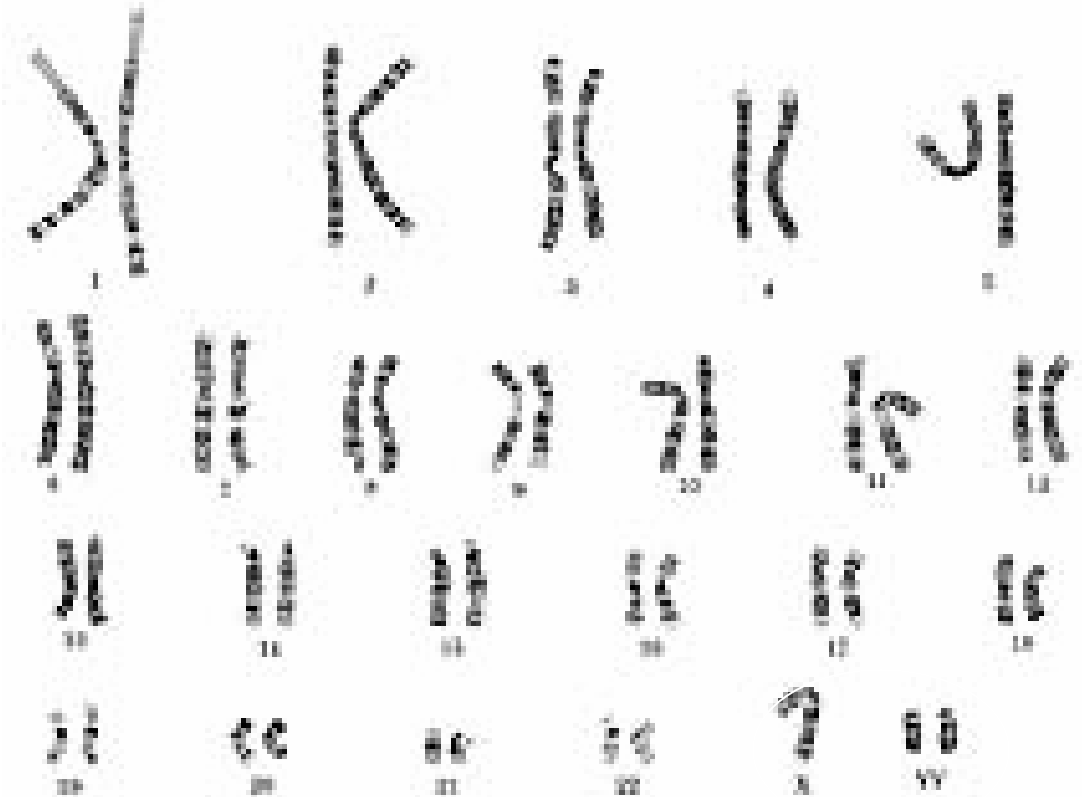
Edwardsov sindrom

- Majhna glava
- Mentalna zaostalost
- Poškodbe notranjih organov
- 90 % umre pred 5 mescem starosti



Jacobov sindrom, 47,XYY

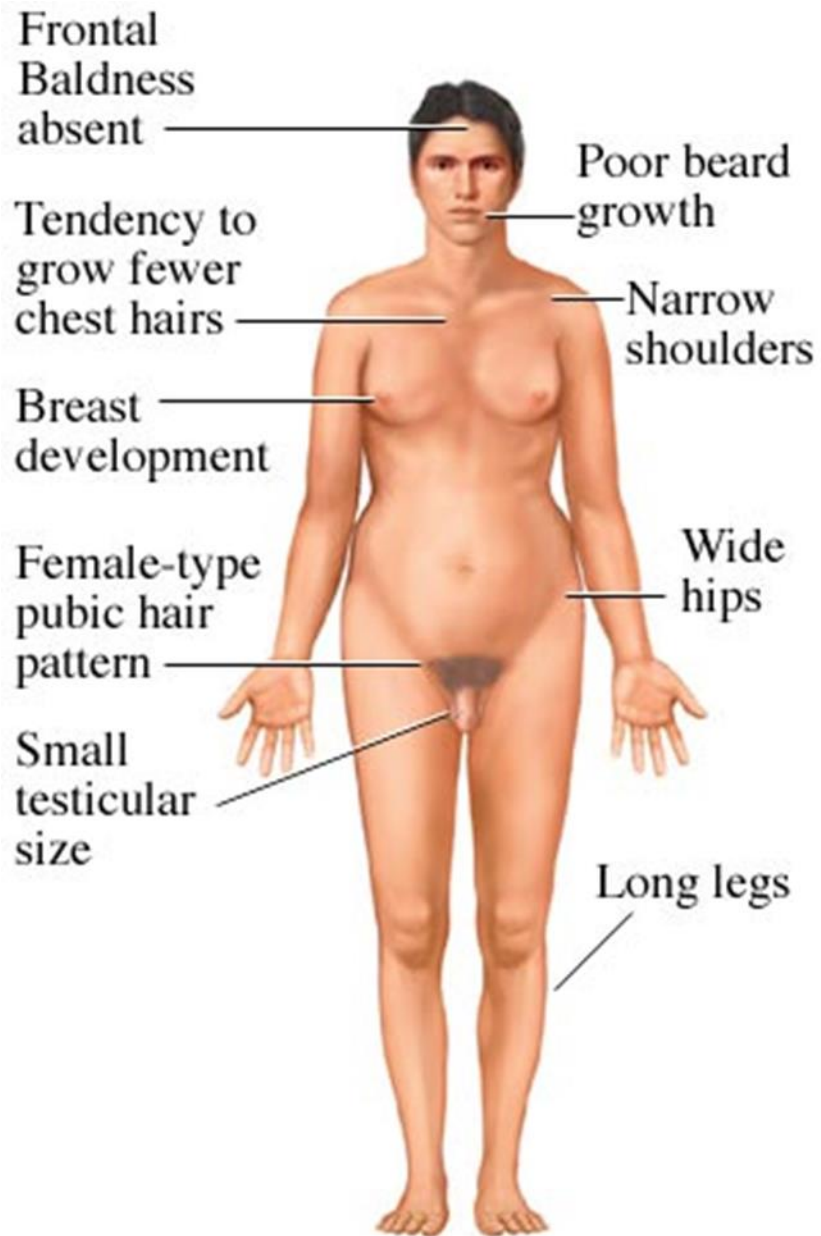
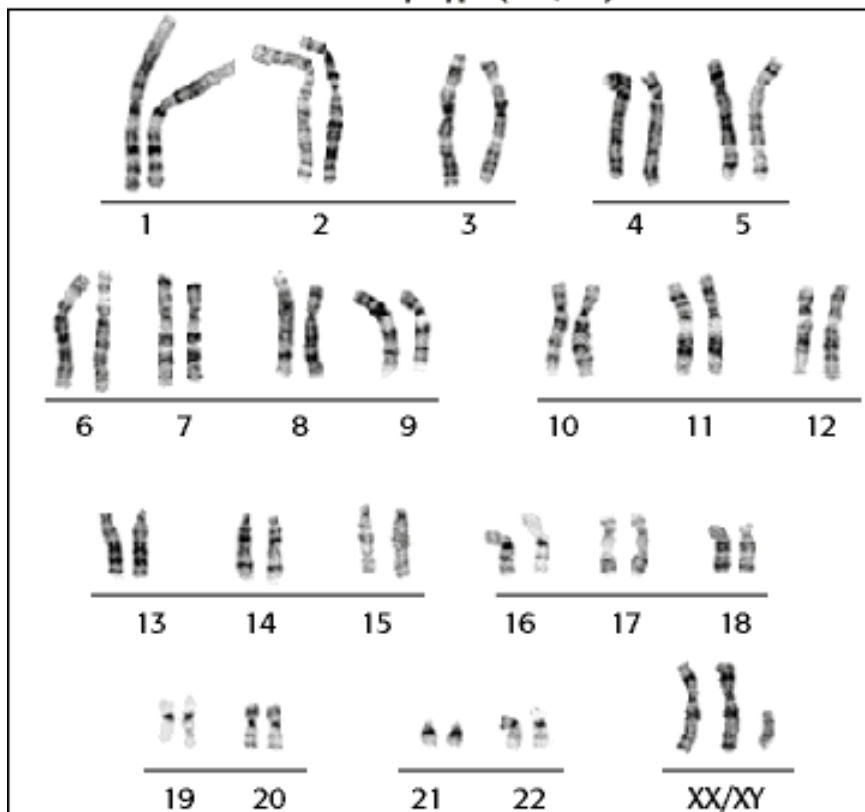
- 1:1000 rojstev
- Ni nenavadnega videza ali vedenja
- Plodni
- Fizično in mentalno normalni
- Povečan tetosteron
- Možno bolj agresiven
- Normalna življenska doba



Klinefelterjev sindrom, 47 XXY

- 47,XXY, moški
- 1:500-1000 rojstev

Human Karyotype (XXY, 47)



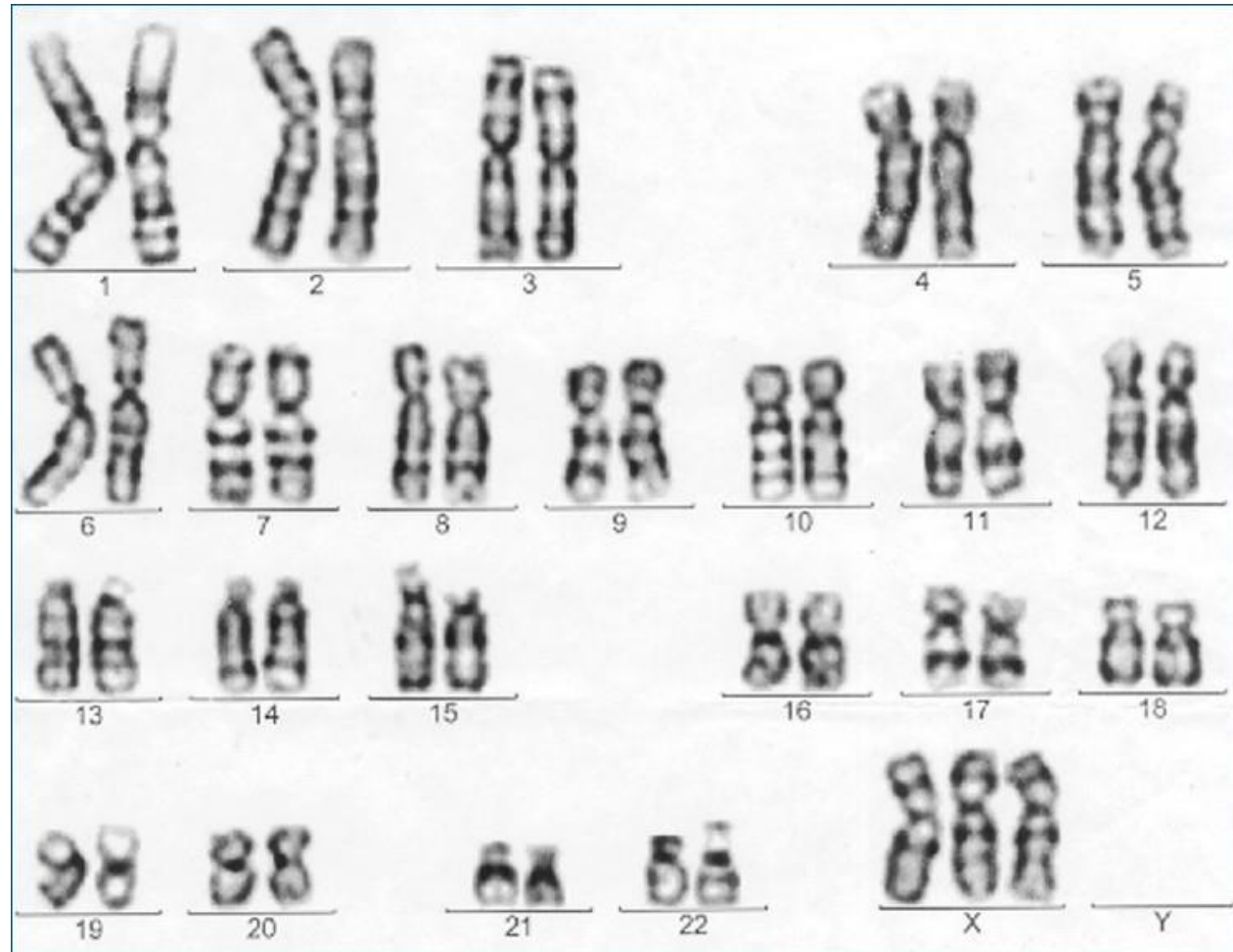
Klinefelterjev sindrom

- Slaba brada
- Daljši prsti in roke
- Sterilen
- Nežna koža
- Zmanjšane umske sposobnosti
- Normalna življenska doba



Trisomija X ali 47,XXX super ženska

1:1000 rojstev





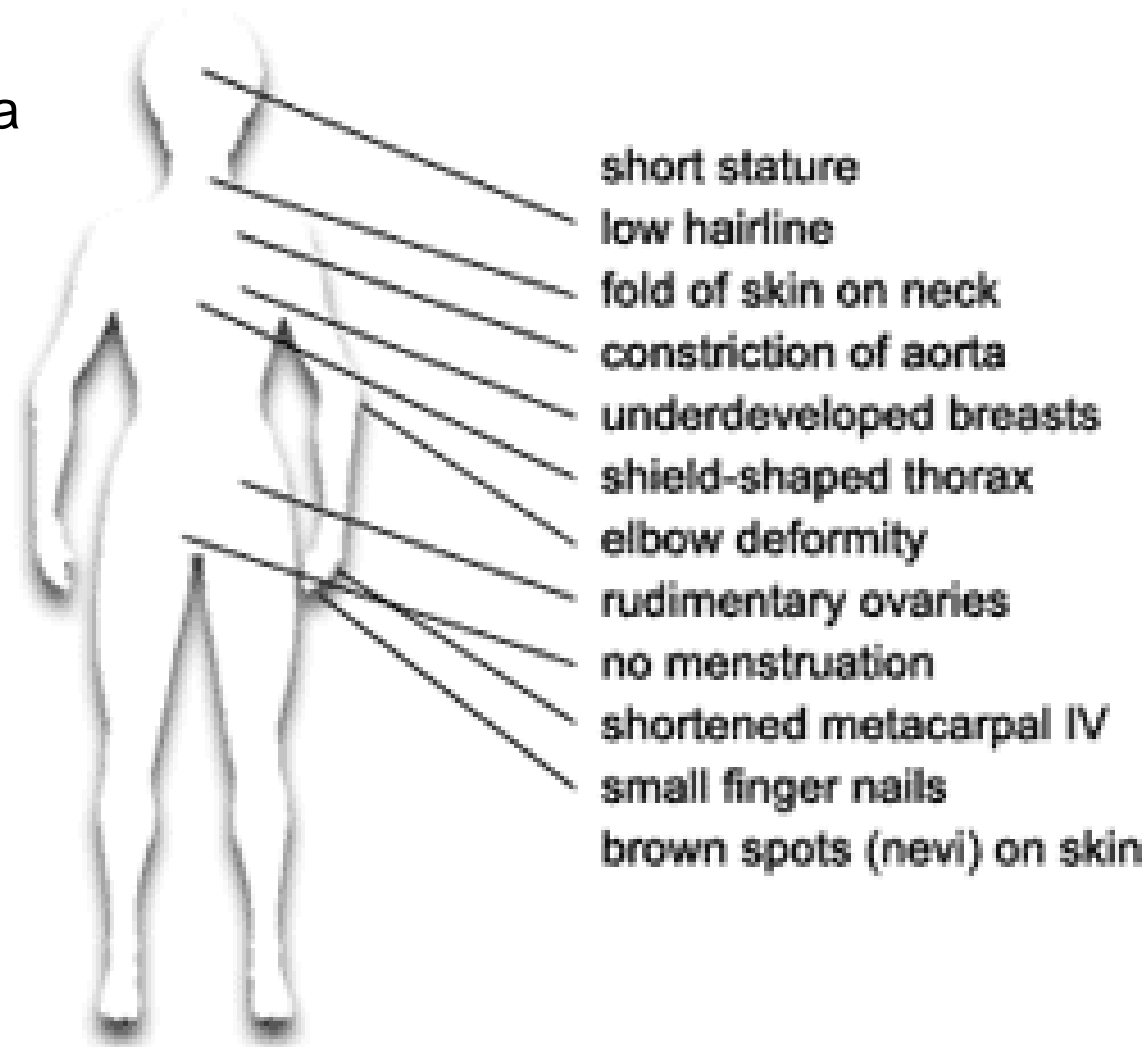
Sindrom trojnega X

- Najbolj pogosto ni opaznih simptomov ali medicinskih problemov.
- Lahko so bolj visoke.
- Spolni razvoj je pri večini normalen.
- Redki simptomi sindroma XXX:
 - Visoka postava
 - Vedenjske težave
 - Nespretnost, slaba koordinacija
 - Široko postavljene oči
 - Amenoreja
 - Majhna glava, dolga glava, manjša spodnja vilica, visoko čelo
 - Majhne roke ali stopala
 - Zmanjšan mišični tonus, umska zaostalost, neplodnost

Turnerjev sindrom

- X monosomija
- 96-98 % ne preživijo rojstva
- Amenoreja
- Ni razvoja prsi
- Ni bokov
- Široka ramena in vrat

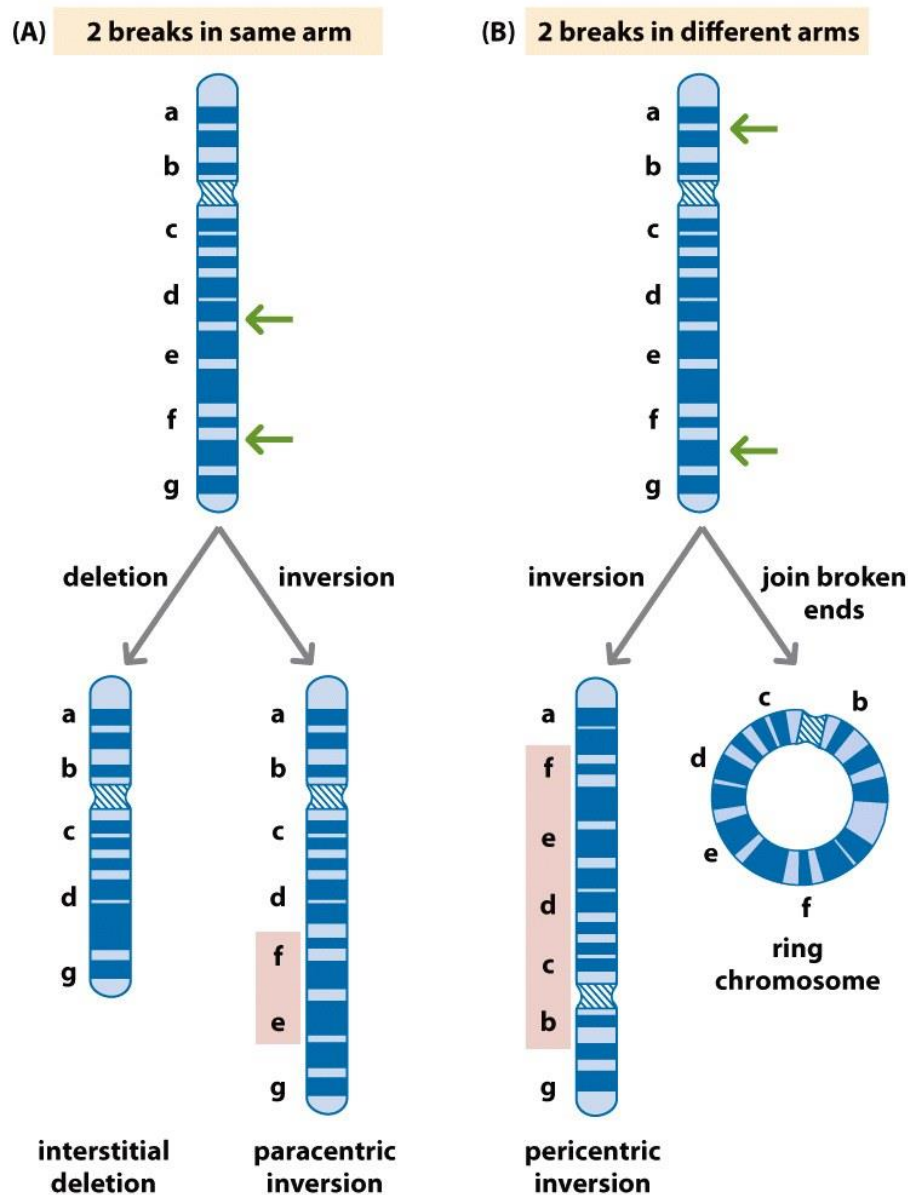
Common Symptoms of Turner Syndrome



Strukturne okvare kromosomov

- Kromosomske prekinitve nastanejo zaradi
 - poškodb DNA (npr. sevanje ali kemikalije)
 - Napake pri rekombinaciji
- Kromosomske prekinitve v fazi G_2 vplivajo samo na eno kromatido – **kromatidne prekinitve**.
- Kromosomske prekinitve v fazi G_1 vplivajo na obe kromatide.
- Celični sistemi prepoznavajo in popravljajo prekinjene kromosome.
 - Spajanje prekinjenih mest.
 - Dodajanje telomer na prekinjen konec kromosoma.
- Ko celični sistemi prepoznajo prekinitev
 1. Če popravilo ni mogoče, se celica vsmeri v apoptozo.
 2. Popravilo je lahko pravilno.
 3. Popravilo je lahko napačno – pride do strukturnih napak.
- Okvare nastanejo, če rekombinacija poteče med napačno sparjenimi kromosomi.

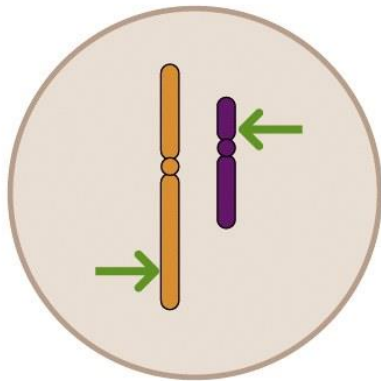
Okvare po napačnem popravilu 2x prekinitve



- A. Napačno popravilo dveh prekinitev v eni ročici lahko pripelje do
- Intersticialne delecije**, kjer se vmesni fragment izgubi.
 - Paracentrične inverzije**, kjer se vmesni fragment pripne nazaj vendar v napačni smeri.
- B. Napačno popravilo prekinitev na obeh ročicah
- Pericentrična inverzija**, kjer pride tudi do obračanje centromere.
 - Kromosomski prstan**, nastane če se združita dva pretrgana konca. Prstan je stabilna struktura ker vsebuje centromero. Odrezani konci kromosoma se izgubijo.

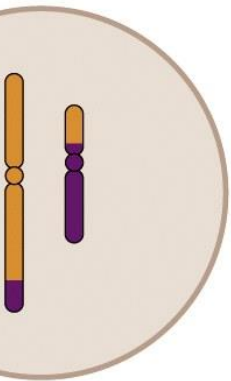
Recipročna translokacija

reciprocal translocation

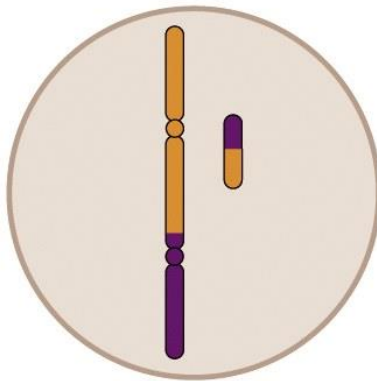


acentric
fragments
exchanged

centric and
acentric fragments
exchanged



stable in
mitosis



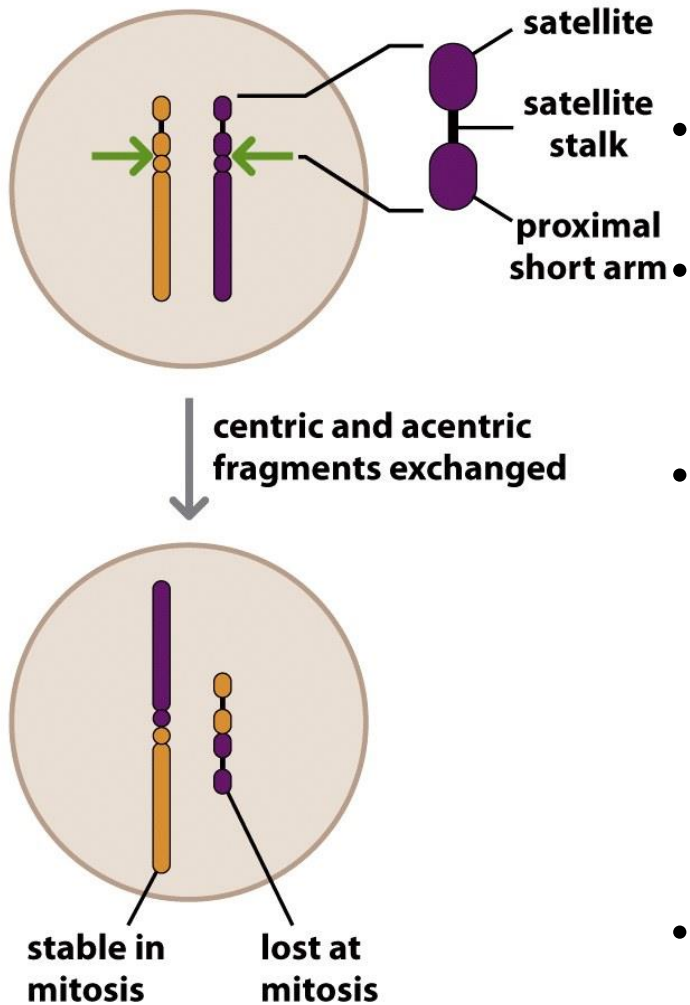
unstable in
mitosis

- Recipročna translokacija je izmenjava fragmentov med dvema kromosomoma.
- Če se zamenjata acentrična fragmenta, sta končna kromosoma stabilna pri mitozi.
- Če se zamenjata centričen in acentričen fragment, se tvorita acentričen in dicentričen kromosom, ki nista stabilna.

Robertsonova translokacija

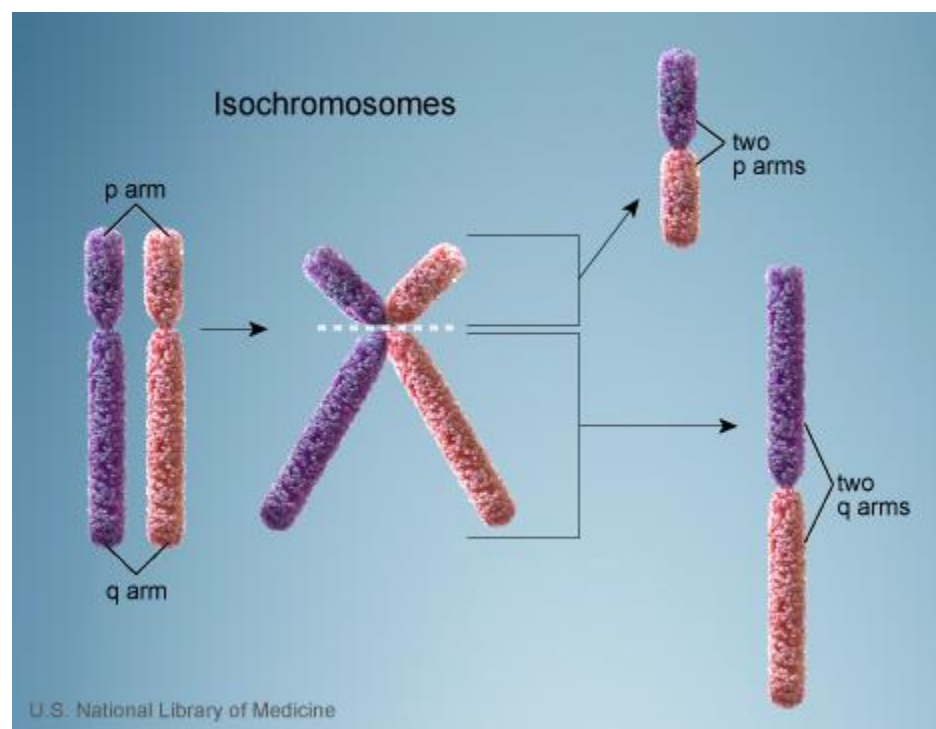
- Posebna oblika recipročne translokacije.
- Pride do izmenjave centričnega in acentričnega fragmenta, ki tvorita acentrični in dicentrični kromosom.
- Dicentrični kromosom je stabilen v mitozu. Dve centromeri sta blizu in delujeta kot ena. Dogaja se samo ob prekinitvah v p ročicah akrocentričnih kromosomov 13, 14, 15, 21 in 22.
- p ročica vsebuje tri regije:
 - Proksimalno heterokromatsko regijo, ki vsebuje ponovitve nekodirajoče DNA.
 - Distalno heterokromatsko regijo, ki se ji reče **kromosomski satelit**.
 - **Stebelce satelita**, ki je evkromatinsko in vsebuje tandemske rRNA gene.
- Acentrični kromosom se izgubi med mitozo. Ni fenotipskega efekta, ker so rRNA geni še na drugih kromosomih.

Robertsonian translocation



Kompleksne translokacije

- **Insercije** potrebujejo vsaj tri prekinitve. Dve prekinitvi sta potrebni za pridobivanje insercijskega fragmenta in ena za tvorbo mest insercije.
- **Isokromosom** se tvori ob napaki pri delitvi kromosoma. Kromosom se deli navpično. Pride do tvorbe simetričnih kromosomov z dvema p ali q ročicami. Znan pri oblikah Turnerjevega sindroma $i(Xq)$ in Downovega sindroma $i(21q)$

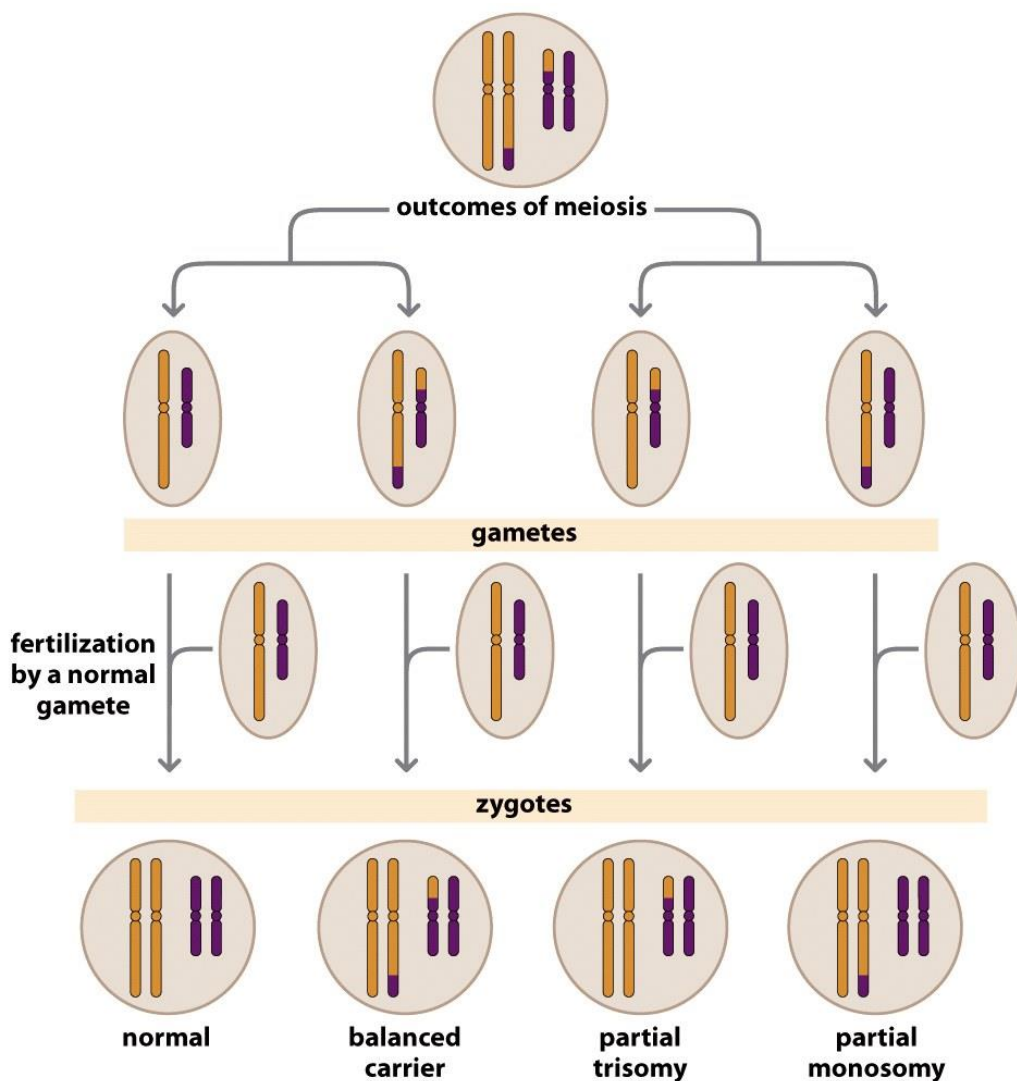


Uravnoteženost strukturnih napak

- Strukturne napake so uravnotežene, če se genetskegi zapis ne izgubi ali pridobi, in neuravnotežene, če izgubi ali pridobi.
- Uravnoteženost strukturnih napak se določa s citogenetskimi analizam.
- Popolnoma uravnotežena napaka najmanj verjetno pripelje do fenotipskih posledic, raze če:
 - Prekinitev ni na pomembnem genu ali regulatornih regijah tega gena.
 - Se pomemben gen prenes v heterokromatinsko okolje.
 - Translokacija med avtosomom in CX lahko pripelje do utišanja genov avtosoma z X inaktivacijo.
- Robertsonove translokacije so uravnotežene.
- Neuravnotežene napake lahko nastanejo zaradi delecije ali duplikacije.
- Lahko nastanejo tudi posredno po mejozi nosilca uravnotežene napake.

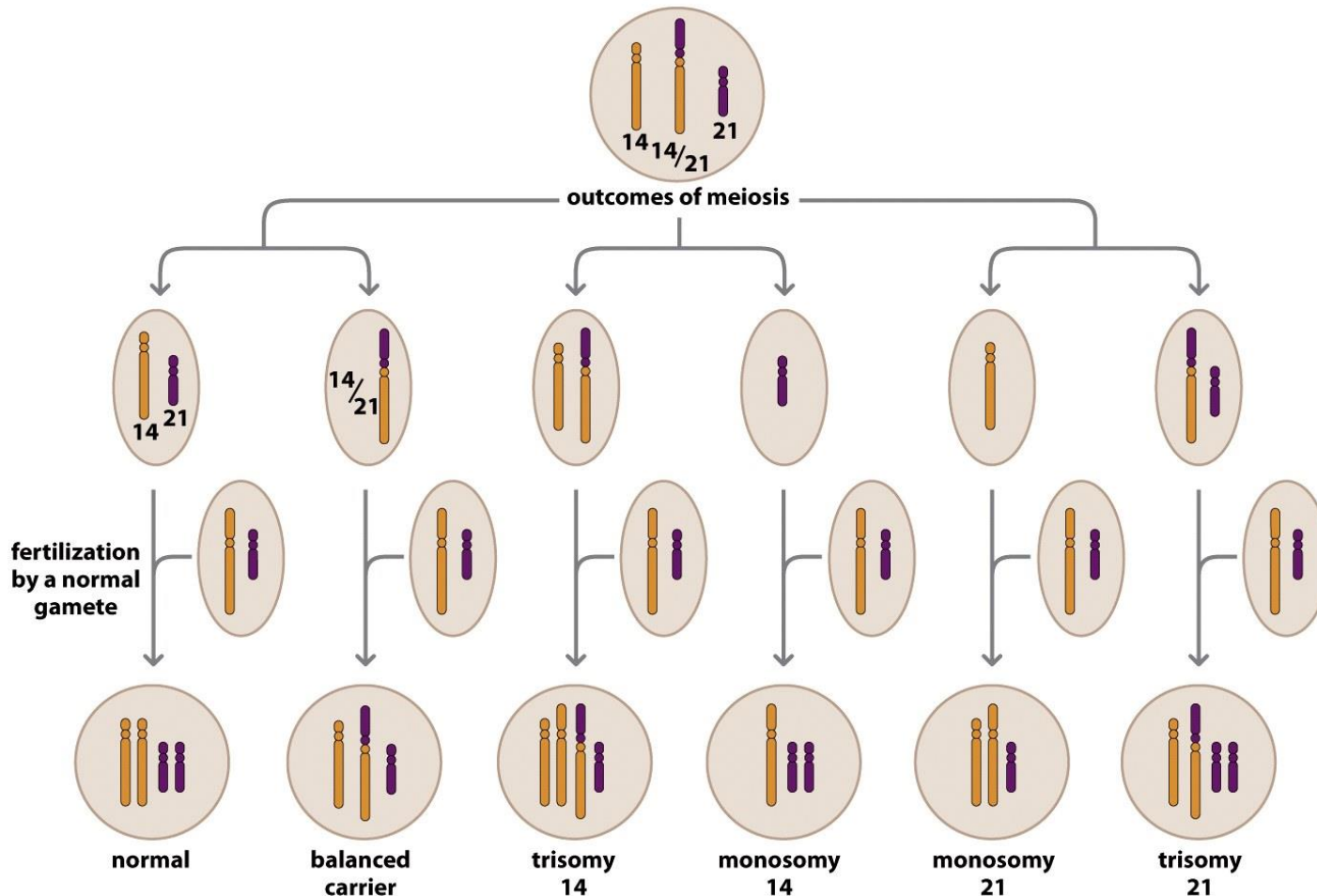
Mejoza nosilca recipročne translokacije

- Nosilec recipročne translokacije lahko proizvede gamete za:
 - popolnoma normalnega otroka.
 - Fenotipično normalnega uravnoveženega nosilca.
 - Neuravnovežene kariotipe, ki vsebujejo delno trisomijo oz. monosomijo.
- Če so neuravnoveženi segmenti veliki, pride to spontanega abortiranja fetusa.
- Če so majhni, se rodi otrok z genetskimi okvarami.



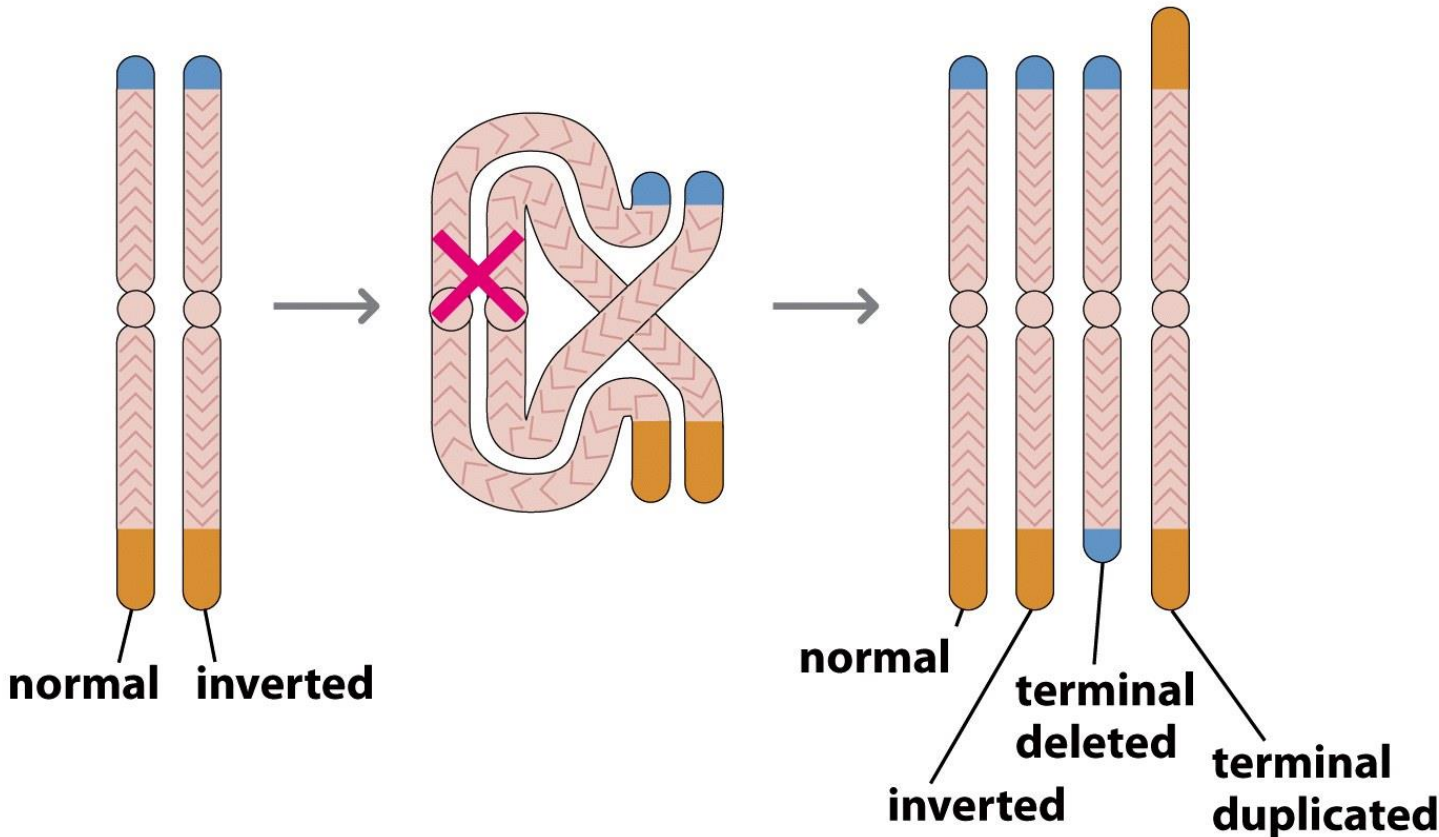
Mejoza pri nosilcu Robertsonove translokacije

- Nosilec Robertsonove translokacije lahko proizvede gamete za:
 - popolnoma normalnega otroka.
 - Fenotipično normalnega uravnoveženega nosilca.
 - Neuravnovežene kariotipe, ki vsebujejo popolno trisomijo oz. monosomijo.

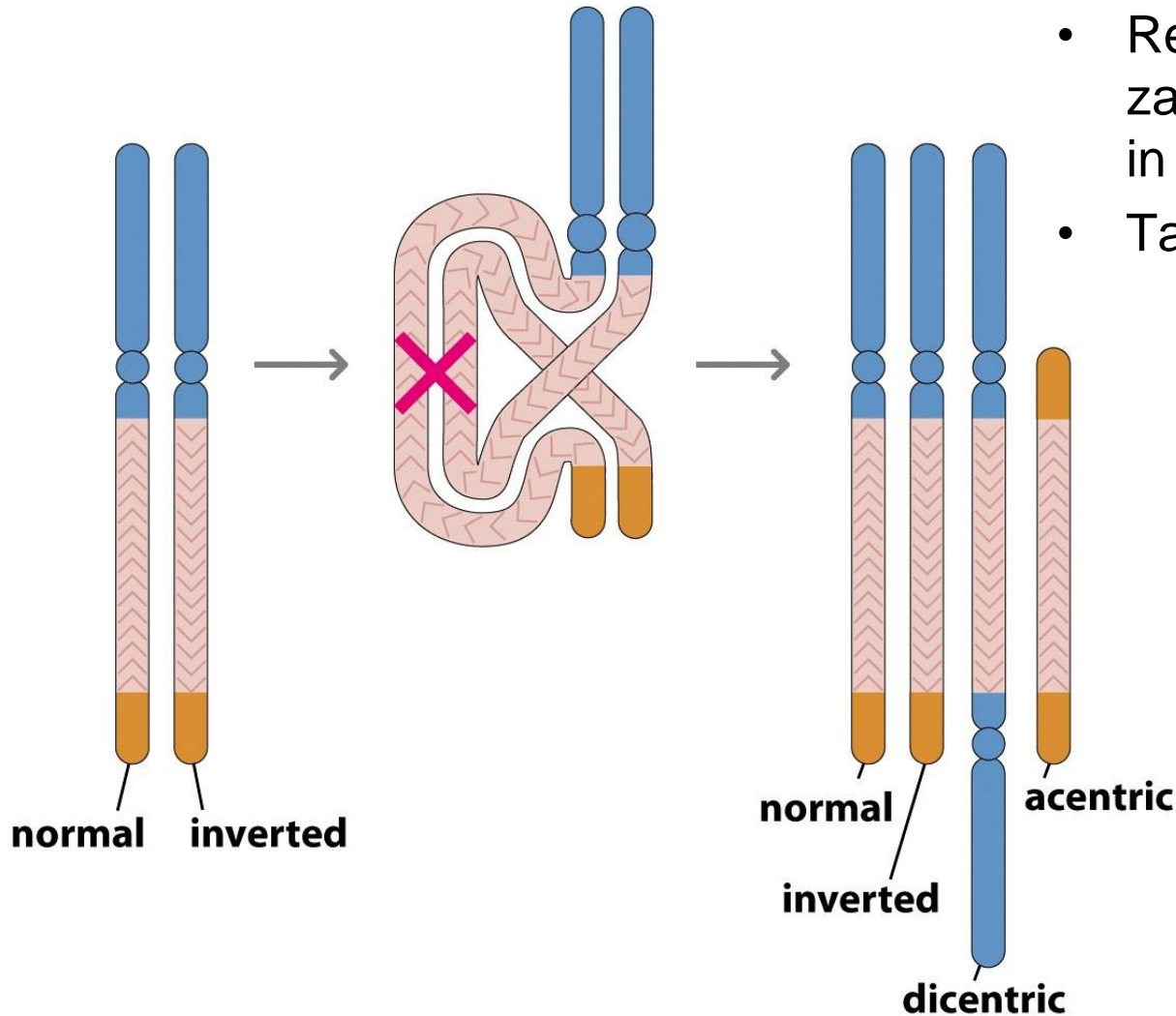


Mejoza pri nosilcu pericentrične inverzije

- Nosilec pericentrične inverzije ima lahko potomce s podvojenimi ali izgubljenimi segmenti kromosoma.
- Ko pride do parjenja med mejozo, obrnjen in normalen homolog tvorita zanko.
- Če pride do rekombinacije znotraj zanke, nastanejo delcije oz. duplikacije.



Mejoza pri nosilcu paracentrične inverzije



- Paracentrične inverzije tvorijo podobne zanke.
- Rekombinacija znotraj teh zank vodi do tvorbe acentrični in dicentričnih kromosomov.
- Taki kromosomi ne obstanejo.

Napačen starševski vir kromosoma

- Nekateri redke okvare prikažejo, da mora imeti kromosom tudi pravilen starševski vir.
- Redki zarodki 46,XX, kjer sta oba haploidna genoma od enega starša (uniparental diploidy), se nikoli ne razvijejo.
- Tudi če ima zarodek dva kromosoma od istega starša (uniparental disomy), lahko pride do napak v razvoju.
- Starševski vir kromosoma je pomemben, ker se nekateri geni različno izražajo v odvisnosti od katerega starša izvirajo.

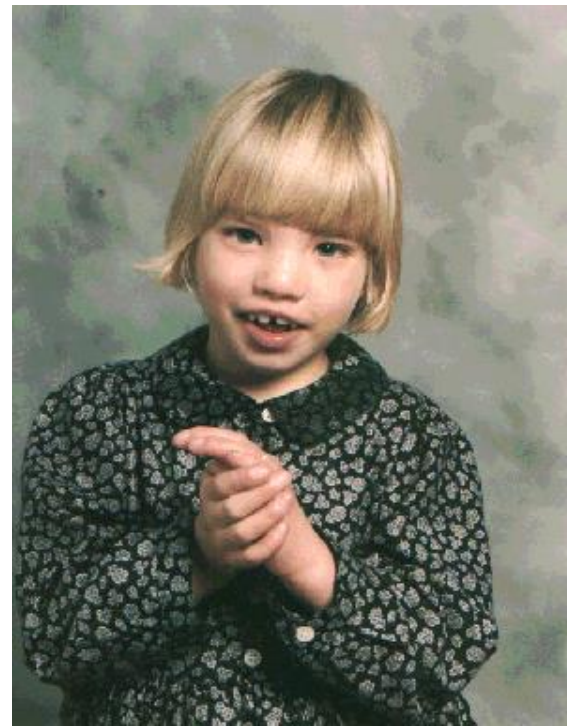
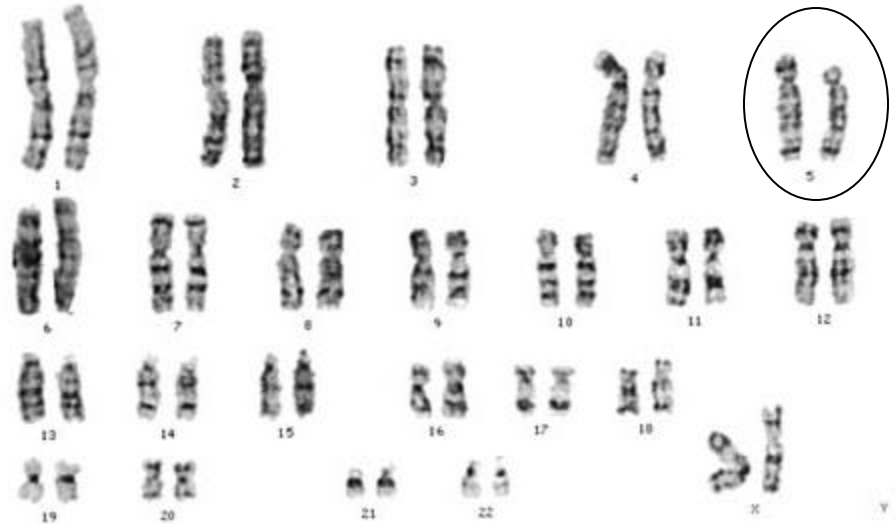
Wolf Hirshhornov sindrom

- Delecija 4p
- Zelo redka. Majhni otroci, mikroencefalija, deformiran obraz.
- Srčne, renalne in genitalne deformacije.
- Večina je mrtvorojenih ali umrejo v otroštvu.



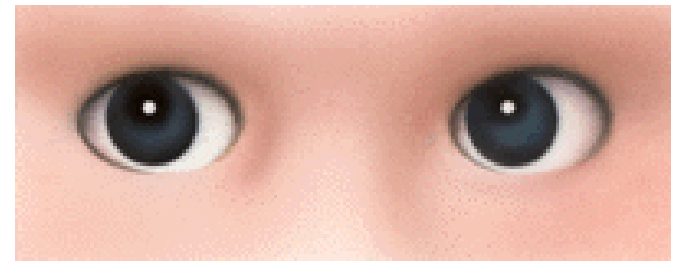
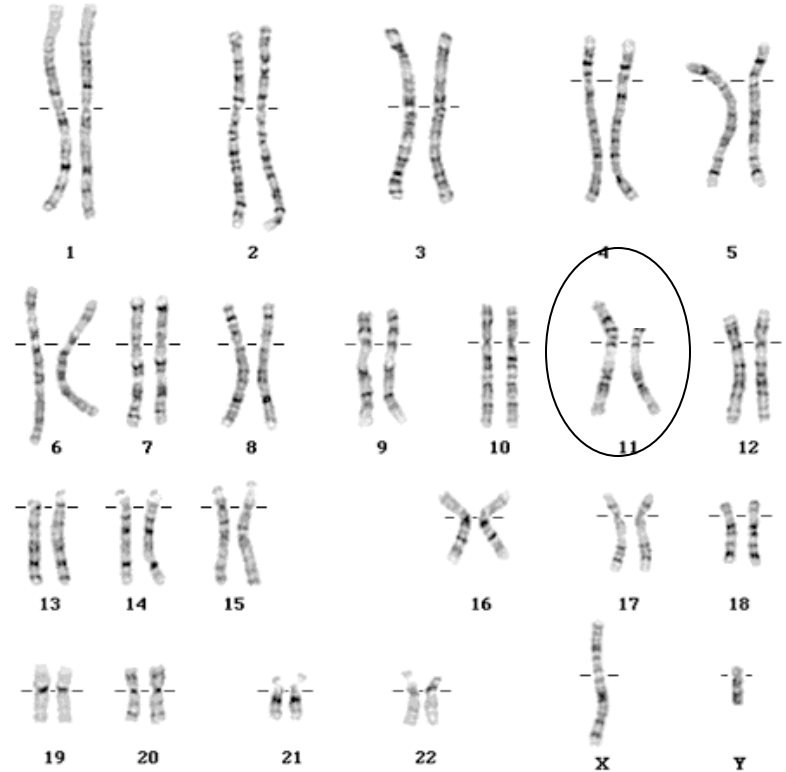
Cri-Du-Chat sindrom

- Delecija 5p.
- 1:50.000 rojstev.
- Oglašajo se kot mačji krik.
- Mentalna zaostalost.
- Okrogel obraz.
- Majhna glava in čeljust.



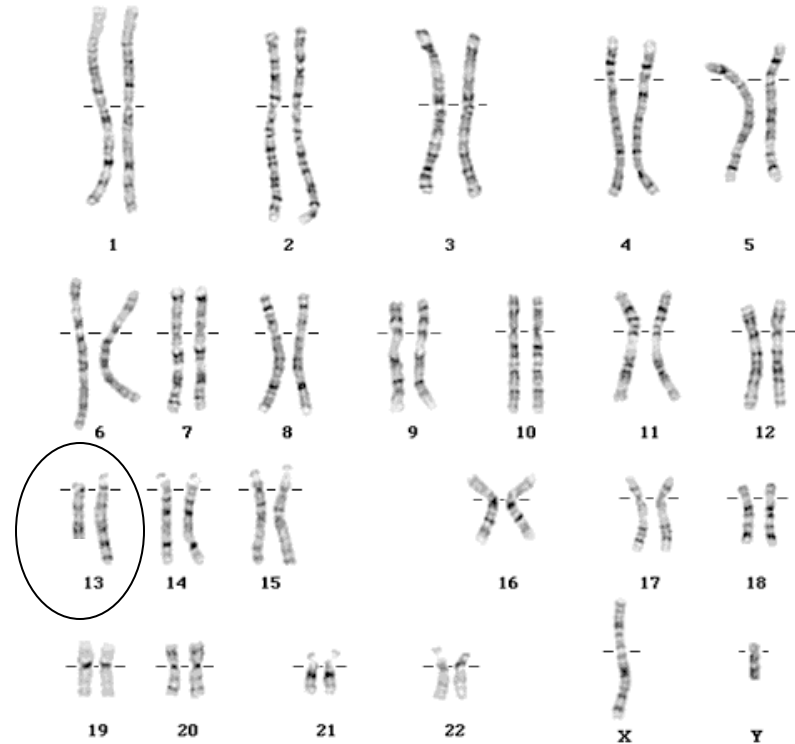
Aniridia/Wilms Tumor sindrom

- 1:50.000.000 rojstev.
- Delecija 11p.
- Mentalna in rastna zaostalost.
- Pomanjkanje šarenice.
- Rak na ledvicah.
- Kratka življenska doba.



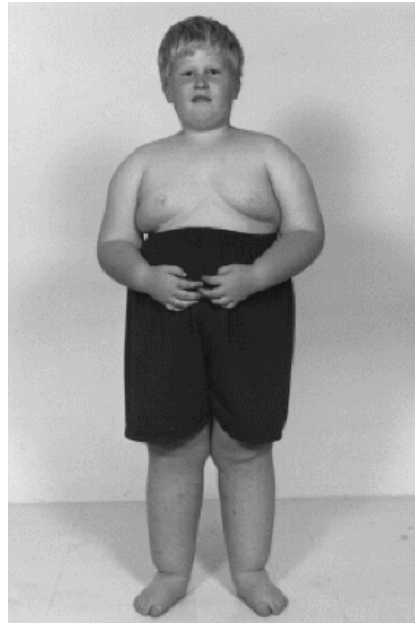
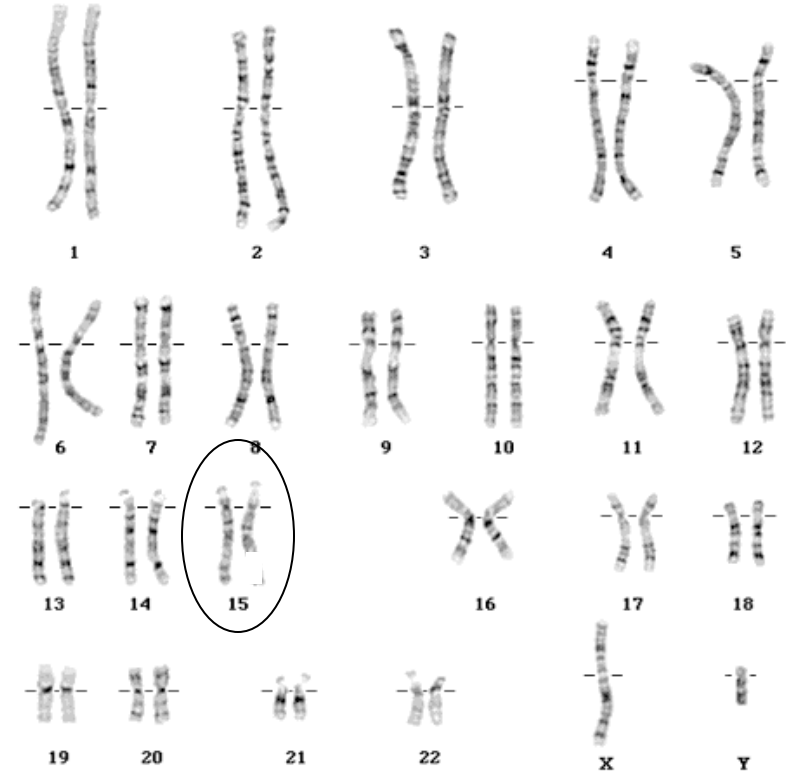
Sindrom delecije 13q

- Delecija 13q.
- 1:500.000 rojstev.
- Mentalna zaostalost.
- Deformiran obraz.
- Brez palcev.
- Bolezni srca.
- Kratka življenska doba.



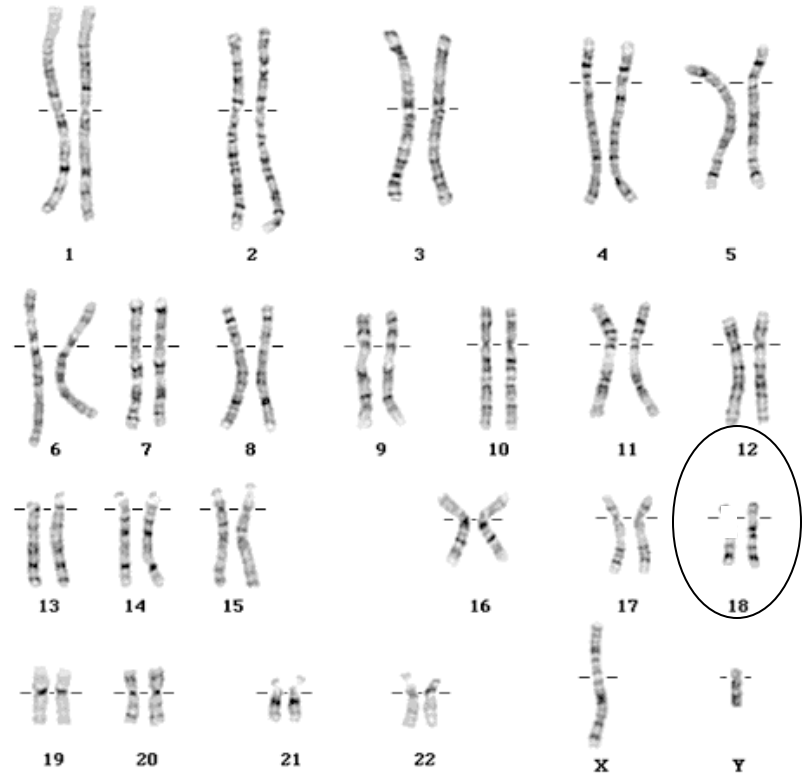
Prader-Willijev sindrom

- Delcija 15q.
- 1:5.000.000 rojstev.
- XY=97%, XX=3%
- Mentalna zaostalost.
- Težave z dihanjem.
- Debelost.
- Kratka življenska doba.



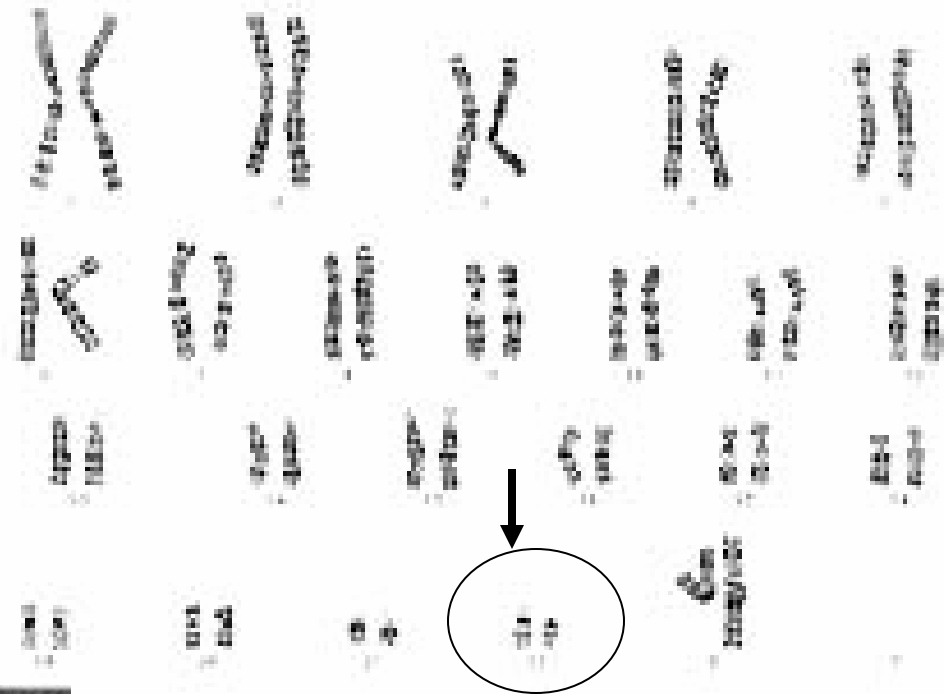
Sindrom delecije 18q

- Delecija 18q.
- 1:10.000.000 rojstev.
- Mentalno zaostali.
- Bolezni srca.
- Deformirane roke in noge.
- Velike oči in ušesa.
- Normalna življenska doba.



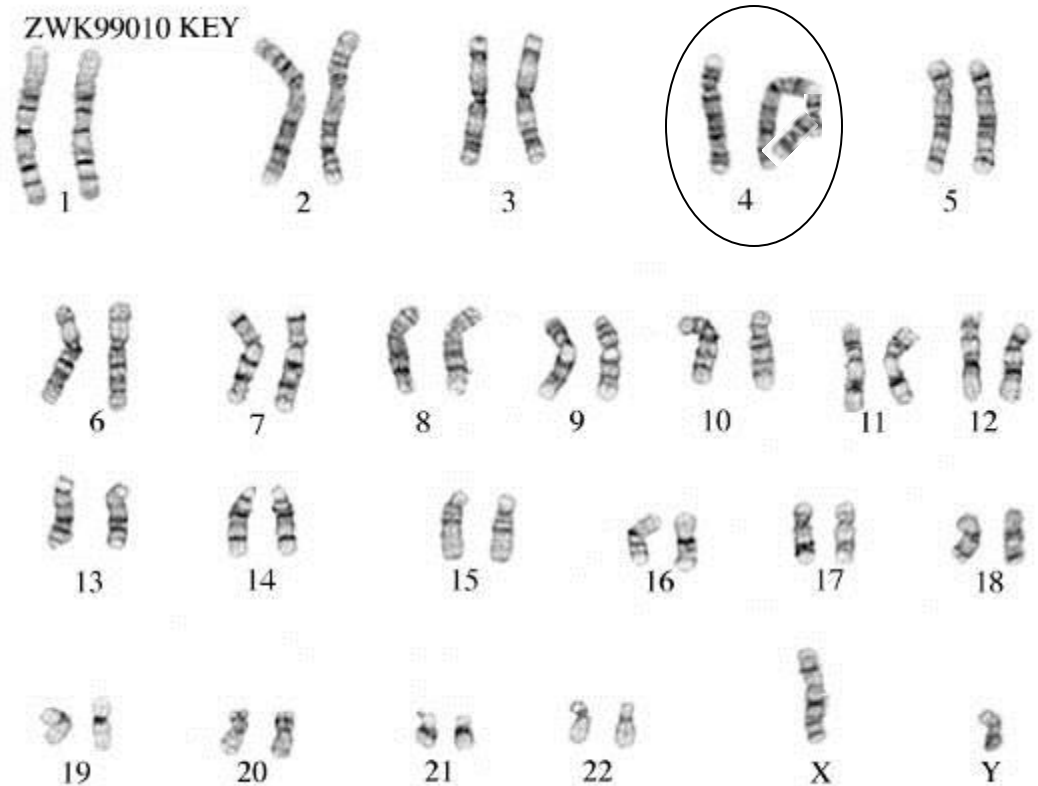
Sindrom mačjih oči

- Delna trisomija ali tetrasomija C22 ali inverzija C22.
- 1:1.000.000 rojstev.
- Zraščeni prsti na rokah in nogah.
- Mentalna zaostalost.
- Majhna čeljust.
- Težave s srcem.
- Normalna življenska doba.



Sindrom C4 prstana

- Delecija koncev C4 in tvorba prstana.
- 1:10.000.000 rojstev.
- Simptomi odvisni od velikosti delecij.
- Psihomotorična zaostalost.
- Kraniofacialne, skeletne, genitourinarne in kožne anomalije.

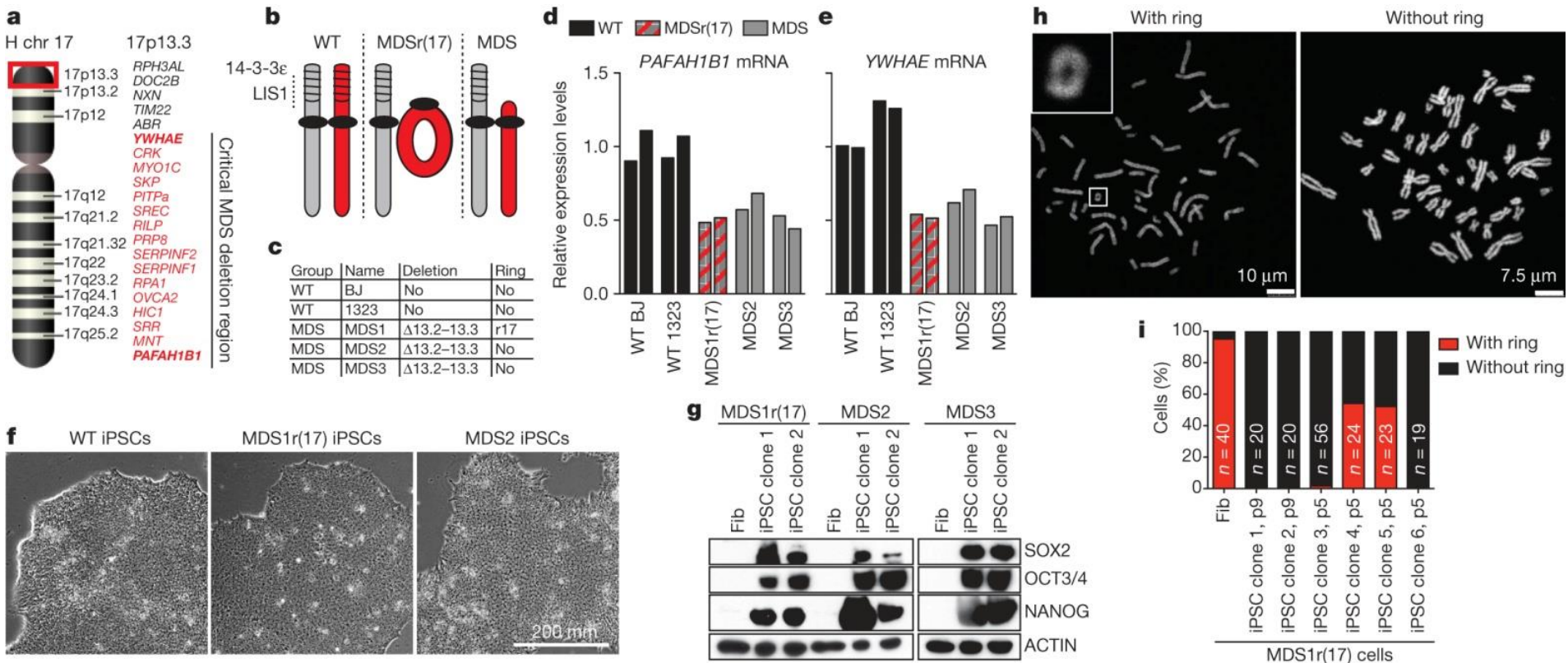


Cell-autonomous correction of ring chromosomes in human induced pluripotent stem cells

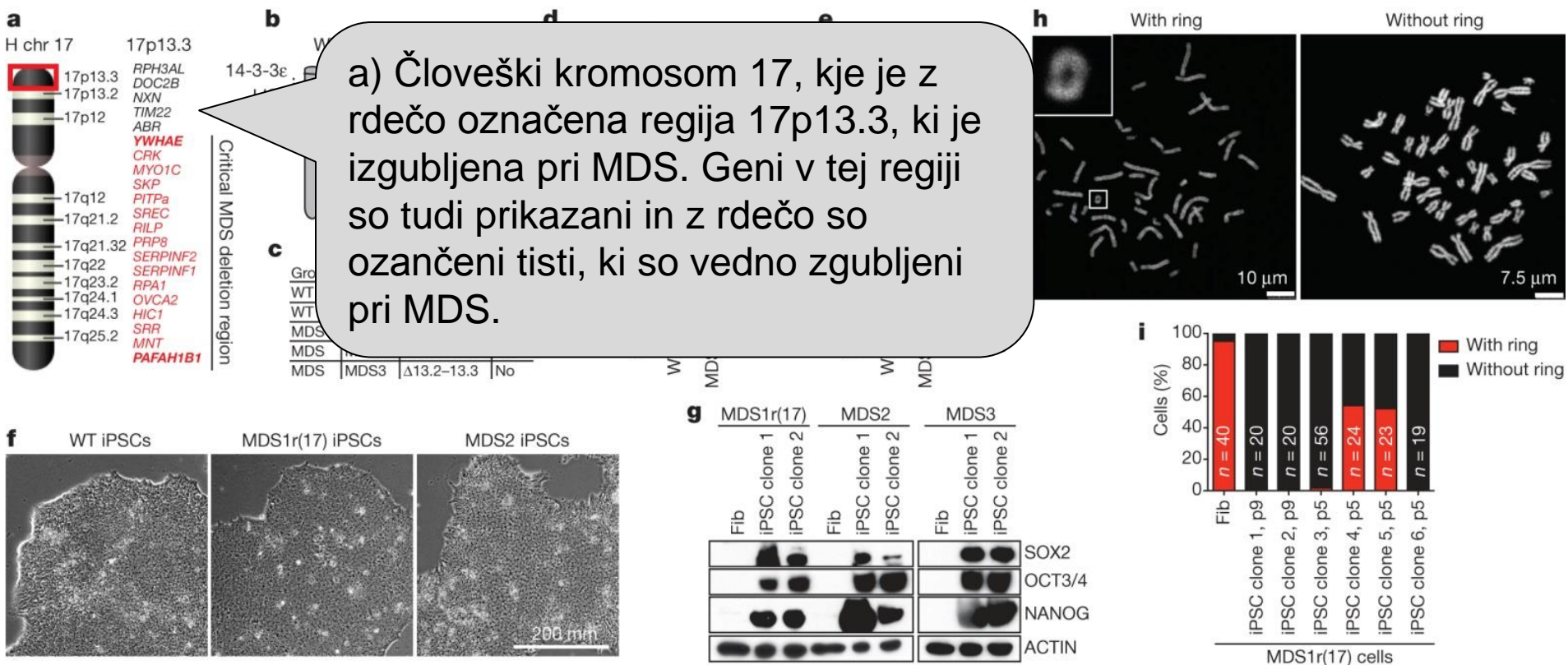
Marina Bershteyn^{1,2*}, Yohei Hayashi^{3,4*}, Guillaume Desachy⁵, Edward C. Hsiao⁶, Salma Sami^{3,4}, Kathryn M. Tsang⁵, Lauren A. Weiss⁵, Arnold R. Kriegstein², Shinya Yamanaka^{3,4,7,8} & Anthony Wynshaw-Boris^{1,9}

- Kromosomski prstani so nestabilni med celično delitvijo, kar vodi v neprekinjeno proizvodnjo anevploidnih hčerinskih celic, ki imajo nizko viabilnost in visoko stopnjo celične smrti.
- Reprogramirane celice izgubijo kromosomski prstan in podvojijo normalni homologni kromosom kompenzacijsko z mehanizmom **enostarševske disomije - izodisomije** (UPD - uniparental disomy).
- Kariotipsko normalne iPSC, ki vsebujejo izodisomijo popravljenega kromosoma, boljše rastejo in s časom zamenjajo anevploidno populacijo. To omogoča hitro in učinkovito izolacijo pacientovih iPSC, ki ne vsebujejo kromosomske napake.
- Prstan kromosoma 17 povzroča Miller Dieker-jev sindrom (MDS).

Z reprogramiranjem fibroblastov z r(17) dobimo več iPSC klonov, ki ne vsebujejo kromosomskih prstanov

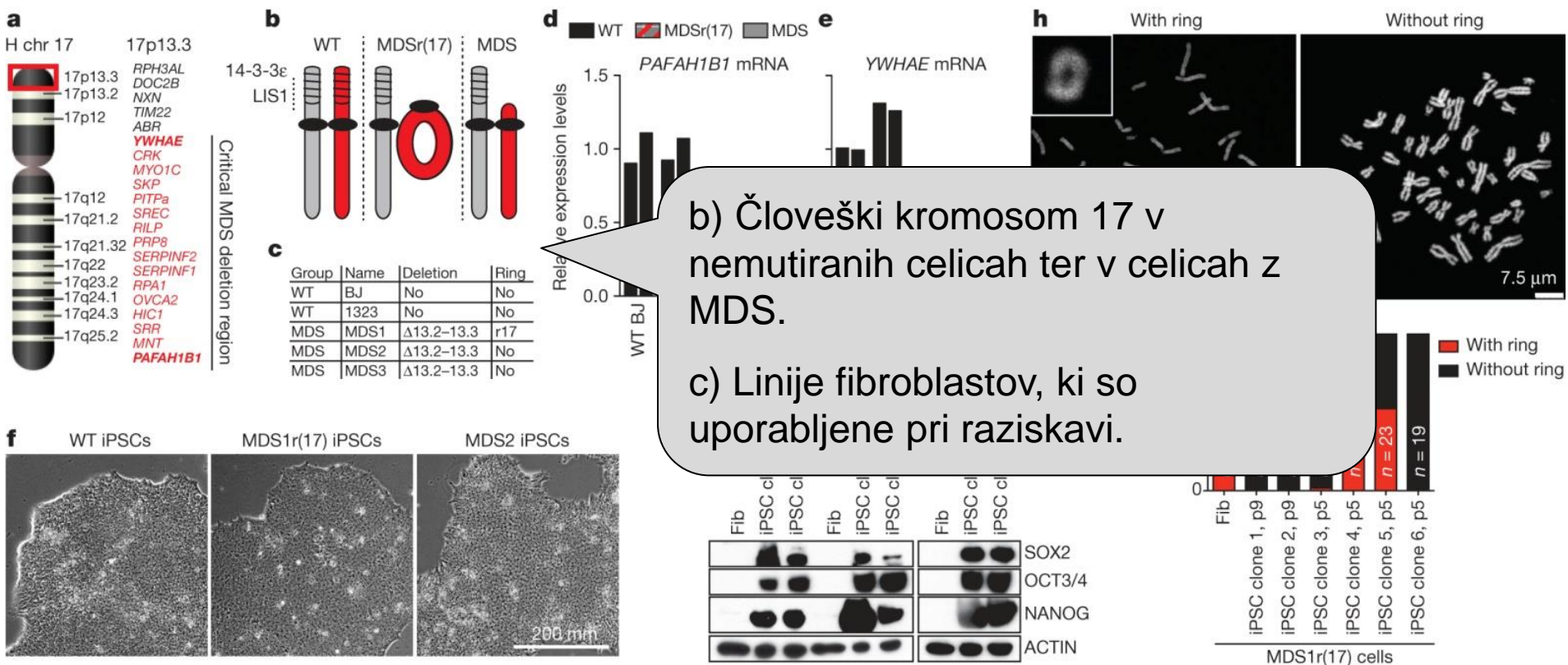


Z reprogramiranjem fibroblastov z r(17) dobimo več iPSC klonov, ki ne vsebujejo kromosomskih prstanov

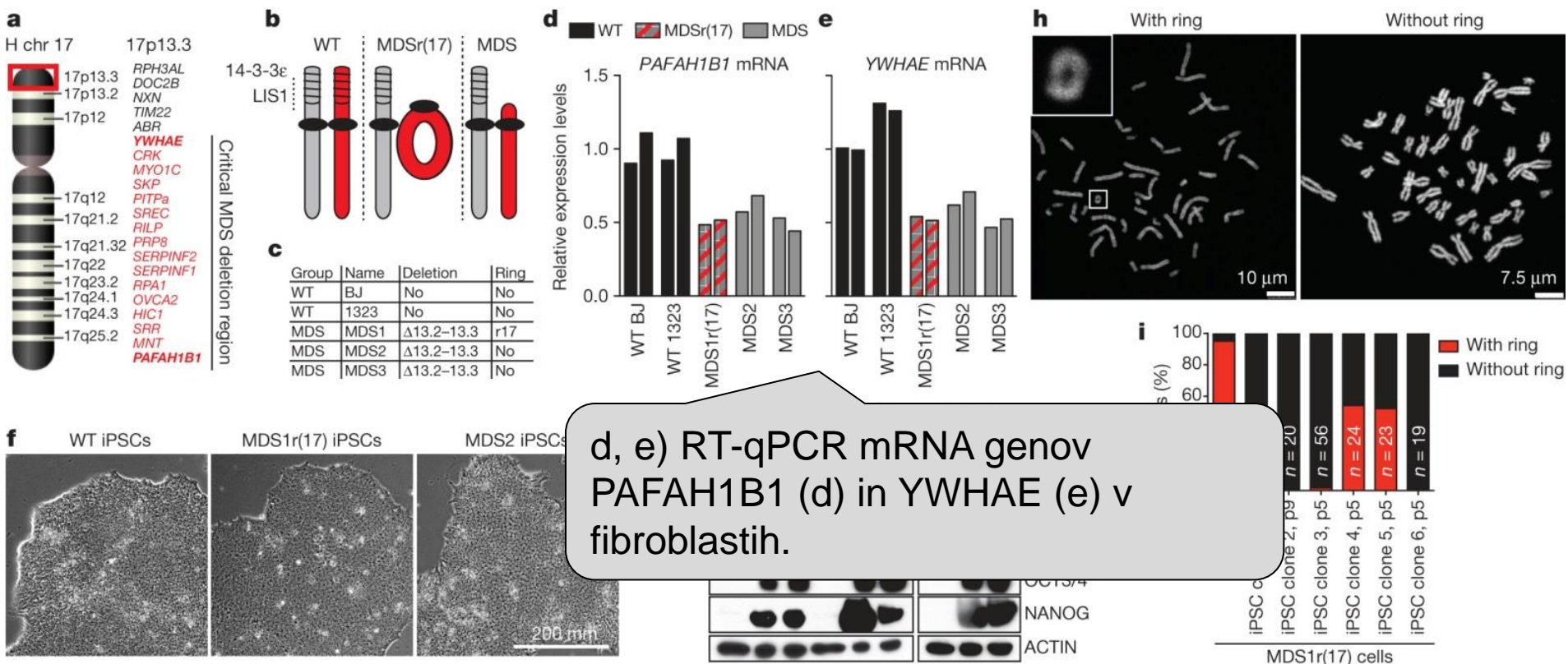


a) Človeški kromosom 17, kje je z rdečo označena regija 17p13.3, ki je izgubljena pri MDS. Geni v tej regiji so tudi prikazani in z rdečo so ozančeni tisti, ki so vedno zgubljeni pri MDS.

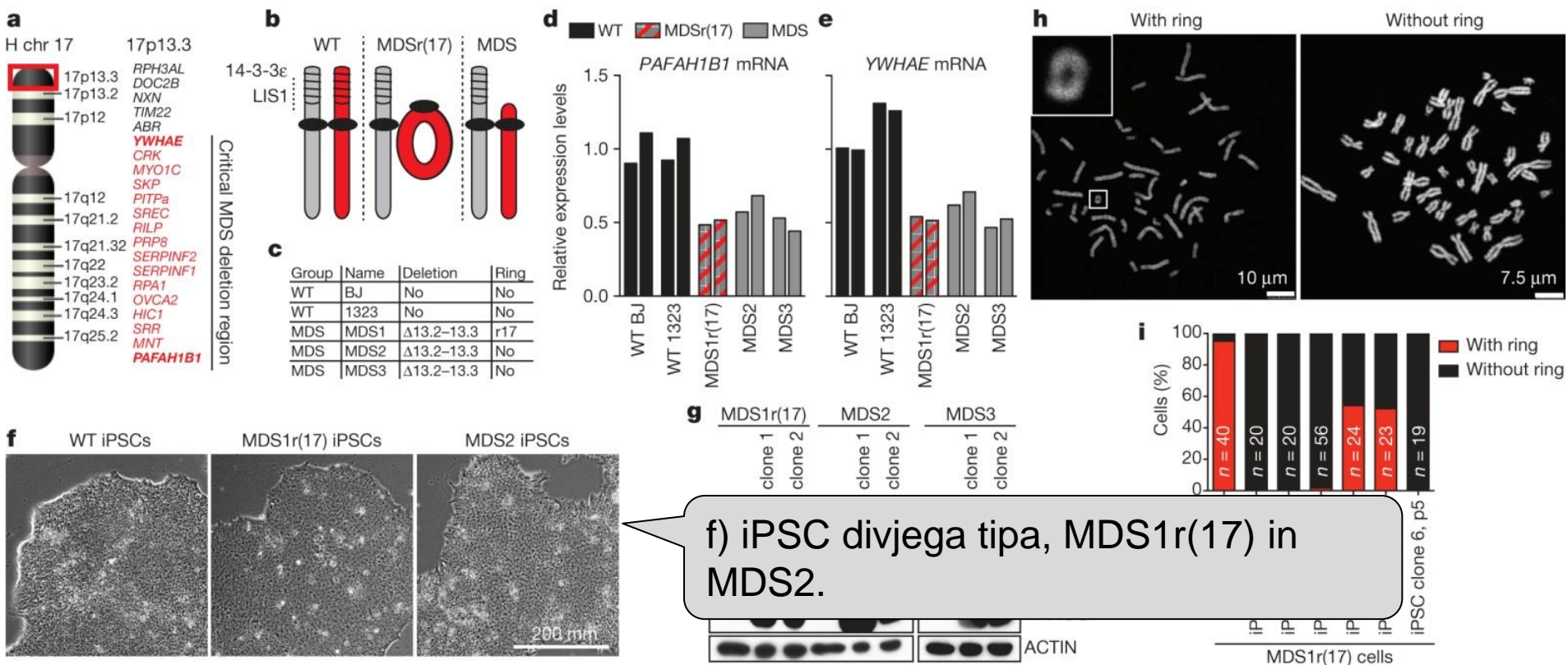
Z reprogramiranjem fibroblastov z r(17) dobimo več iPSC klonov, ki ne vsebujejo kromosomskih prstanov



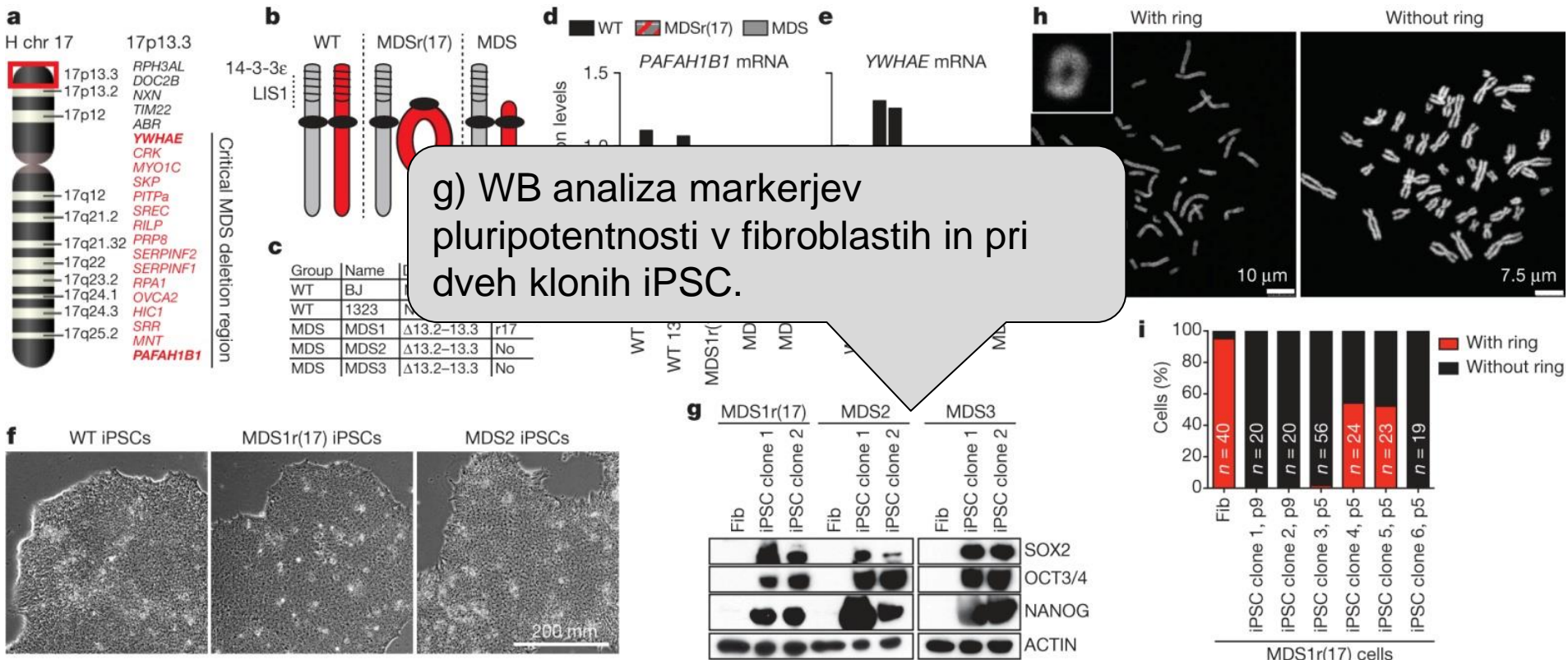
Z reprogramiranjem fibroblastov z r(17) dobimo več iPSC klonov, ki ne vsebujejo kromosomskih prstanov



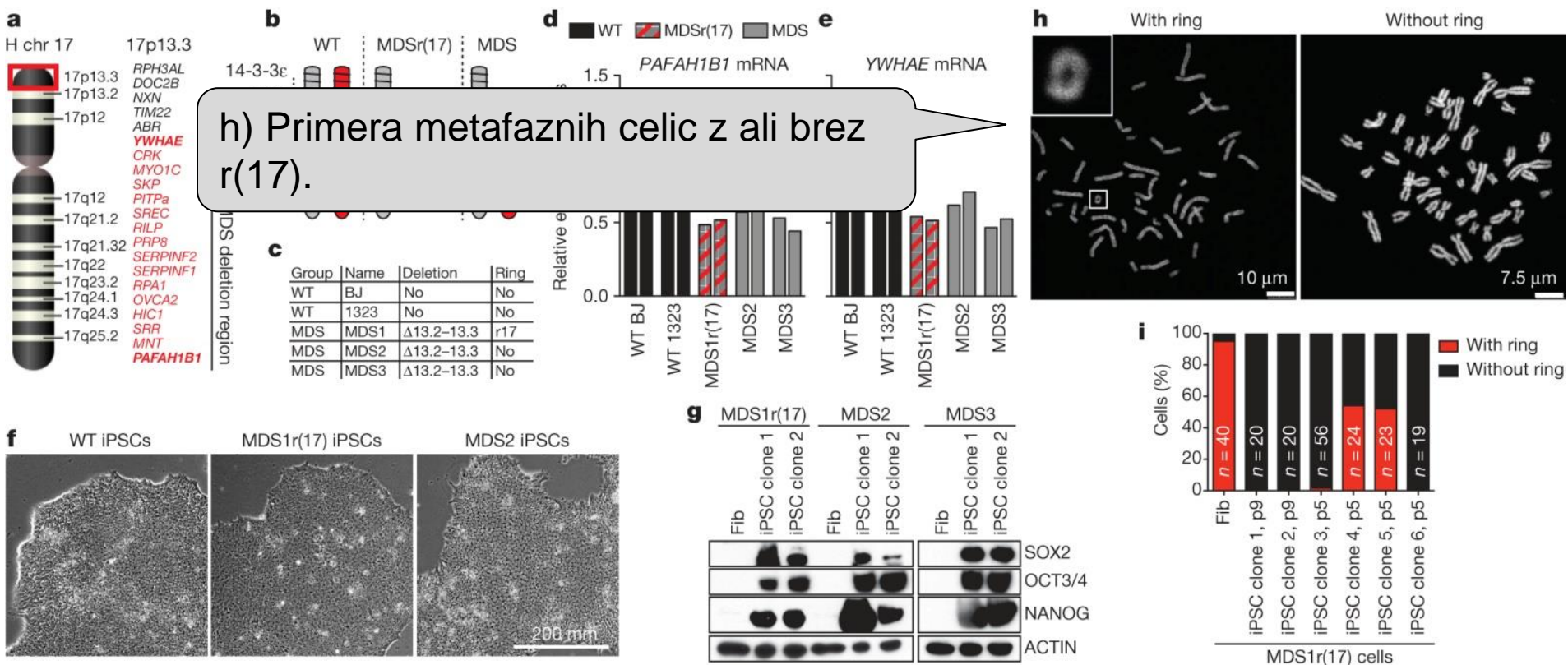
Z reprogramiranjem fibroblastov z r(17) dobimo več iPSC klonov, ki ne vsebujejo kromosomskih prstanov



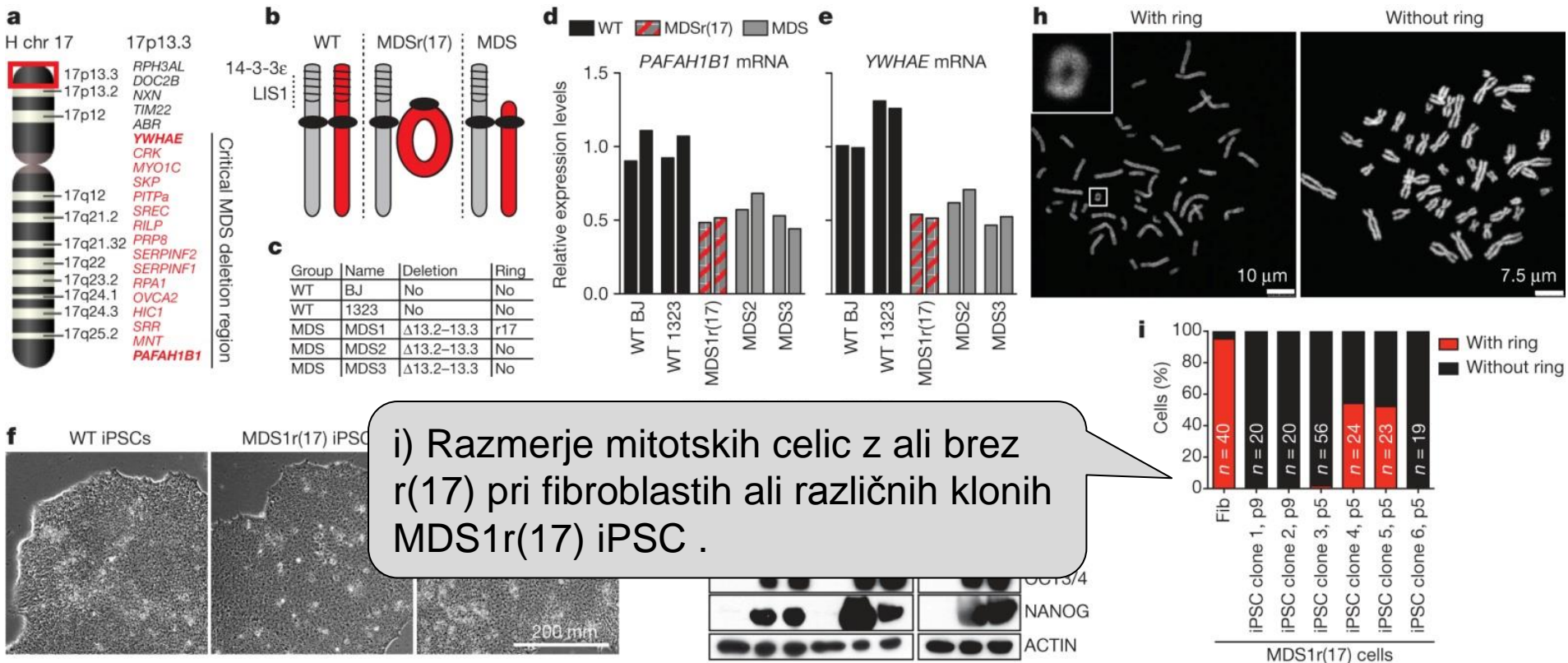
Z reprogramiranjem fibroblastov z r(17) dobimo več iPSC klonov, ki ne vsebujejo kromosomskih prstanov



Z reprogramiranjem fibroblastov z r(17) dobimo več iPSC klonov, ki ne vsebujejo kromosomskih prstanov

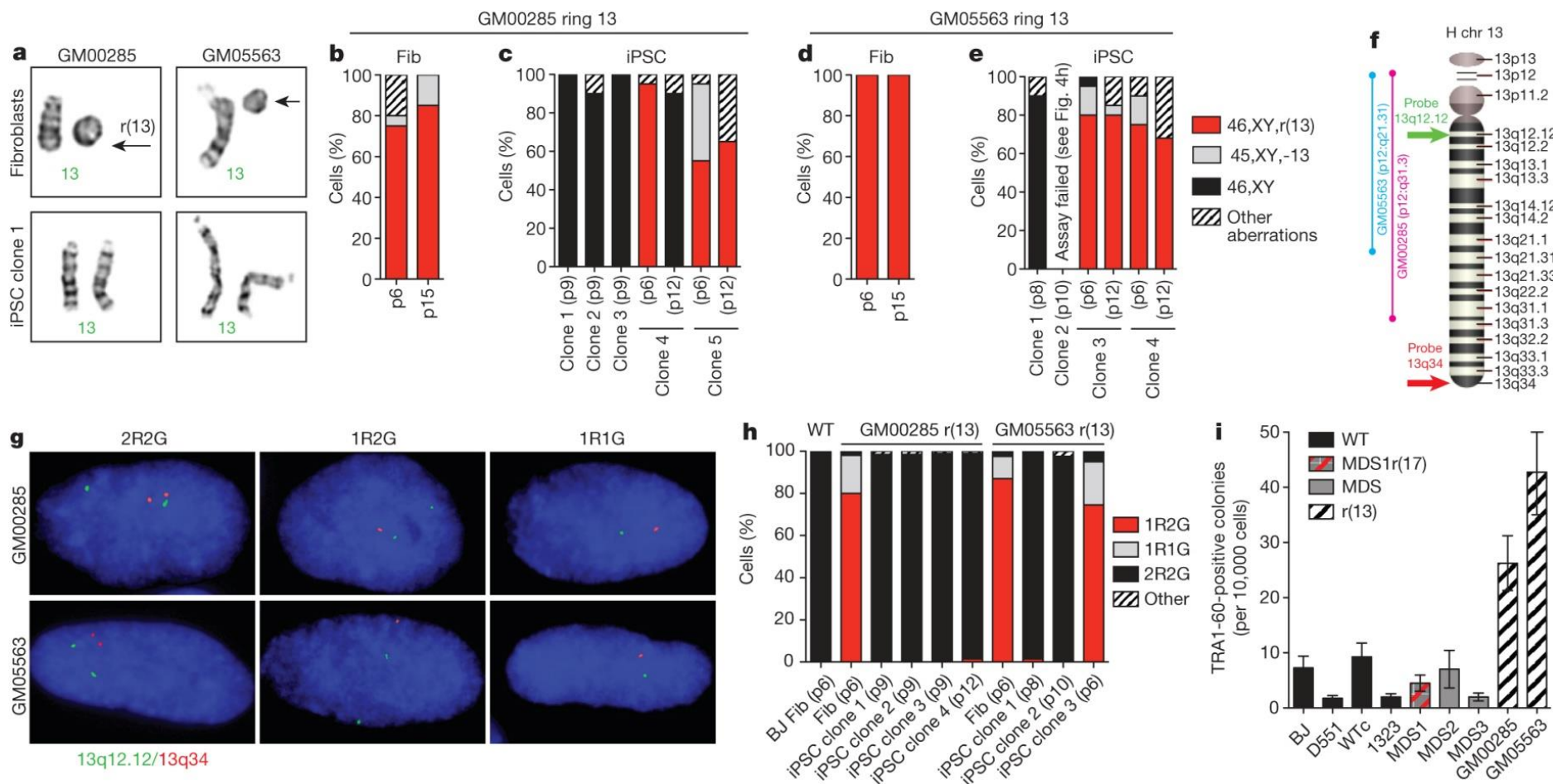


Z reprogramiranjem fibroblastov z r(17) dobimo več iPSC klonov, ki ne vsebujejo kromosomskih prstanov

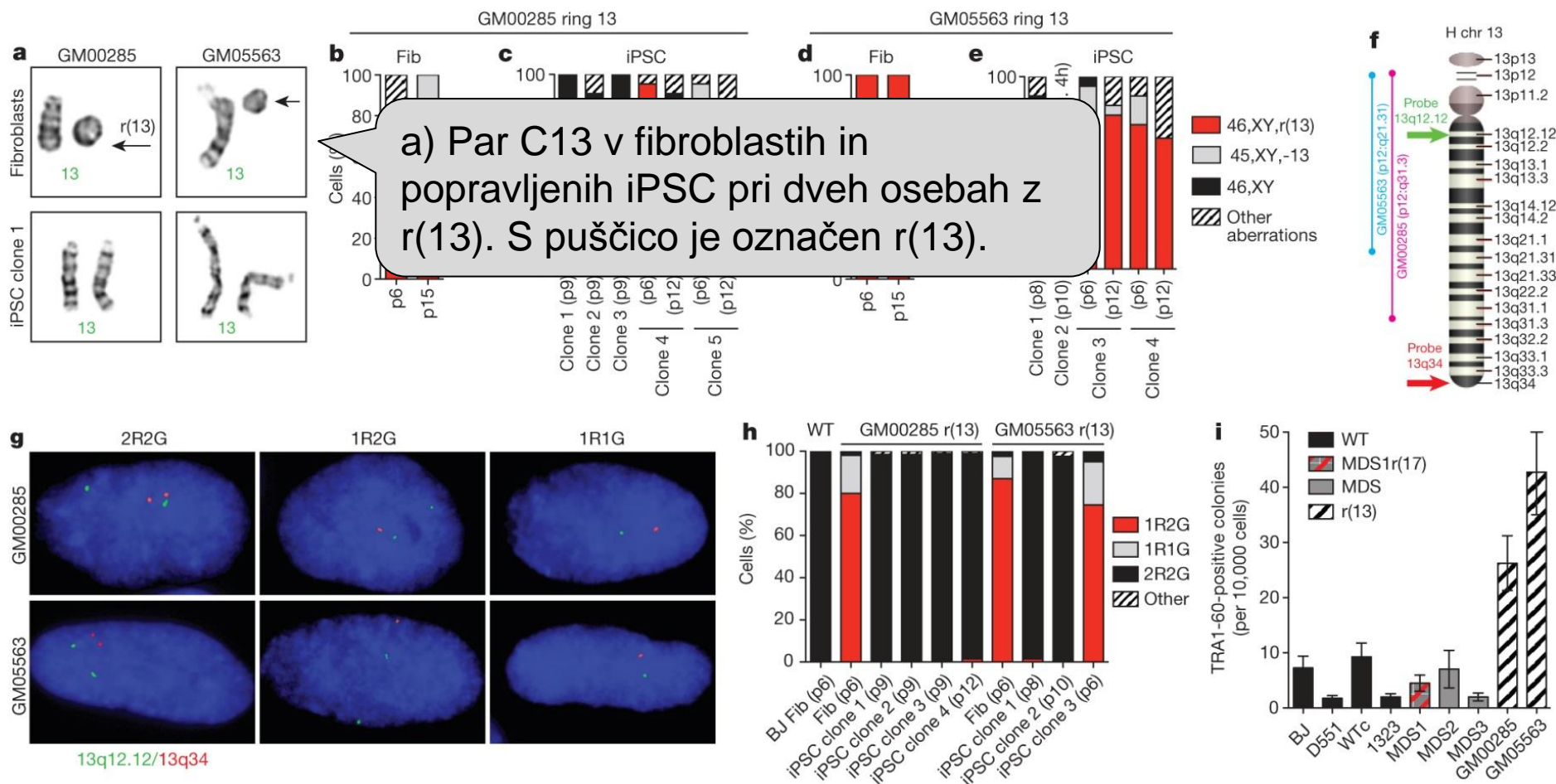


i) Razmerje mitotskih celic z ali brez r(17) pri fibroblastih ali različnih klonih MDS1r(17) iPSC .

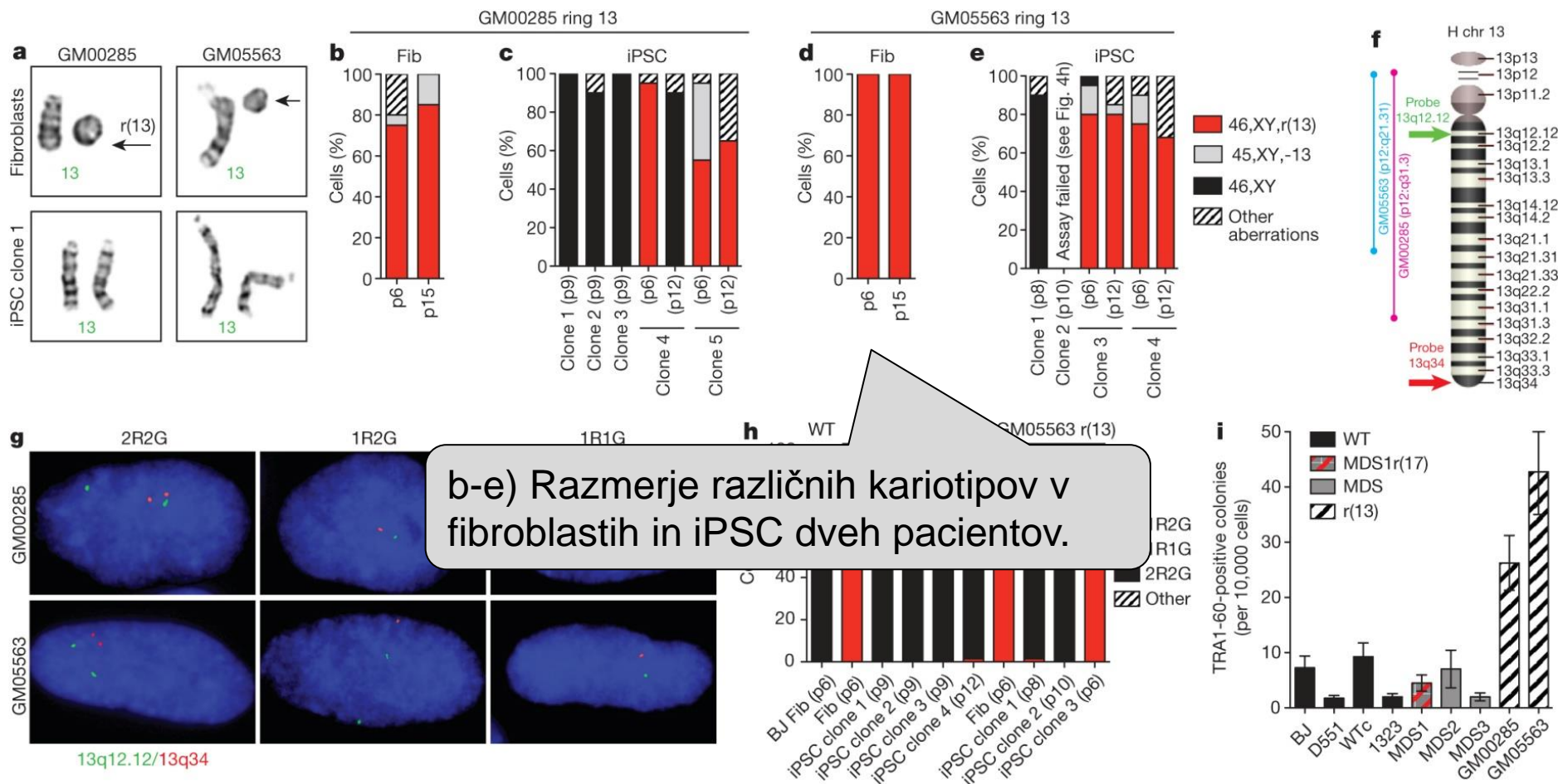
Pridobivanje klonov iPSC z normalnim kariotipom iz fibroblastov z r(13).



Pridobivanje klonov iPSC z normalnim kariotipom iz fibroblastov z r(13).

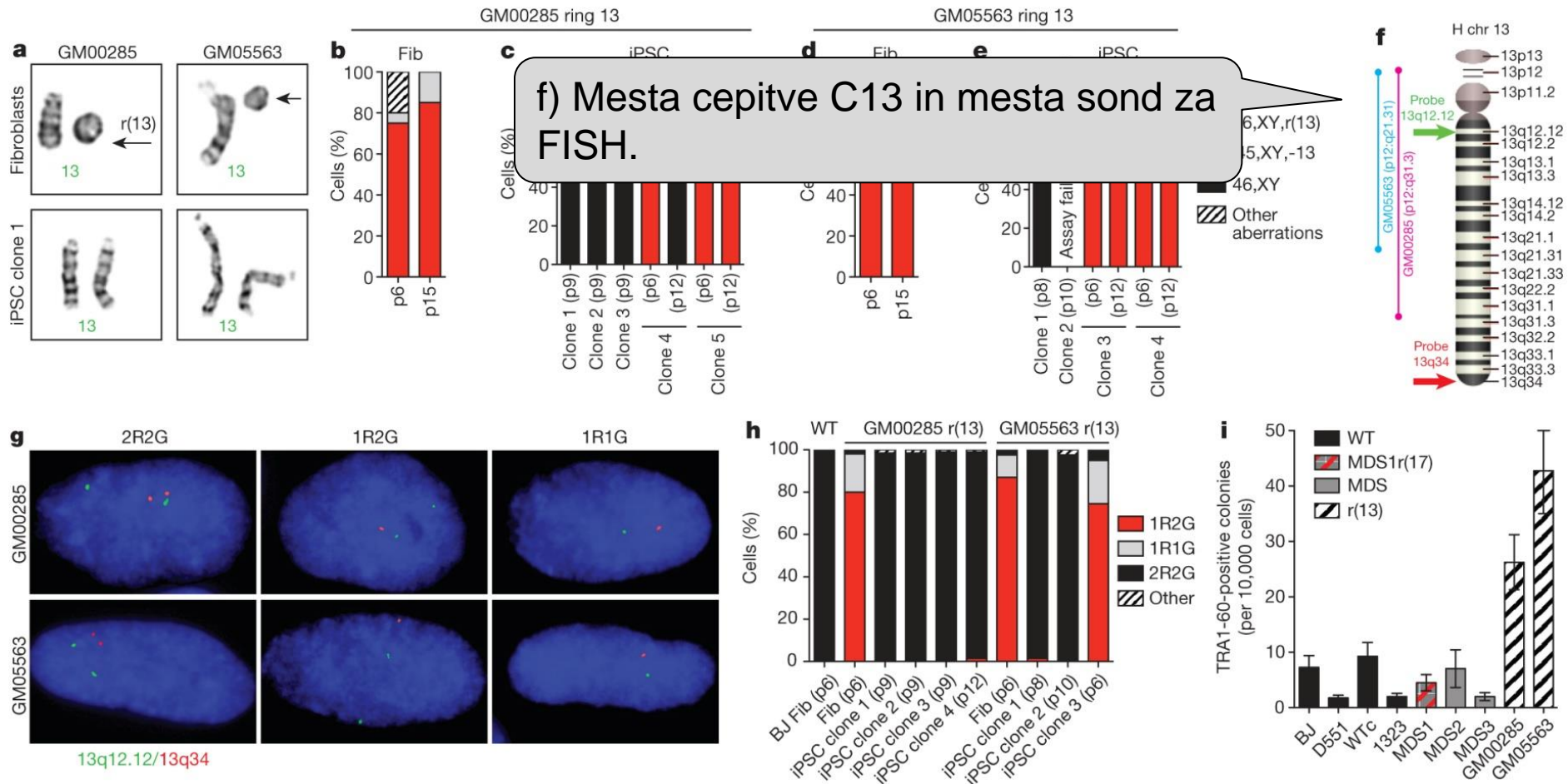


Pridobivanje klonov iPSC z normalnim kariotipom iz fibroblastov z r(13).

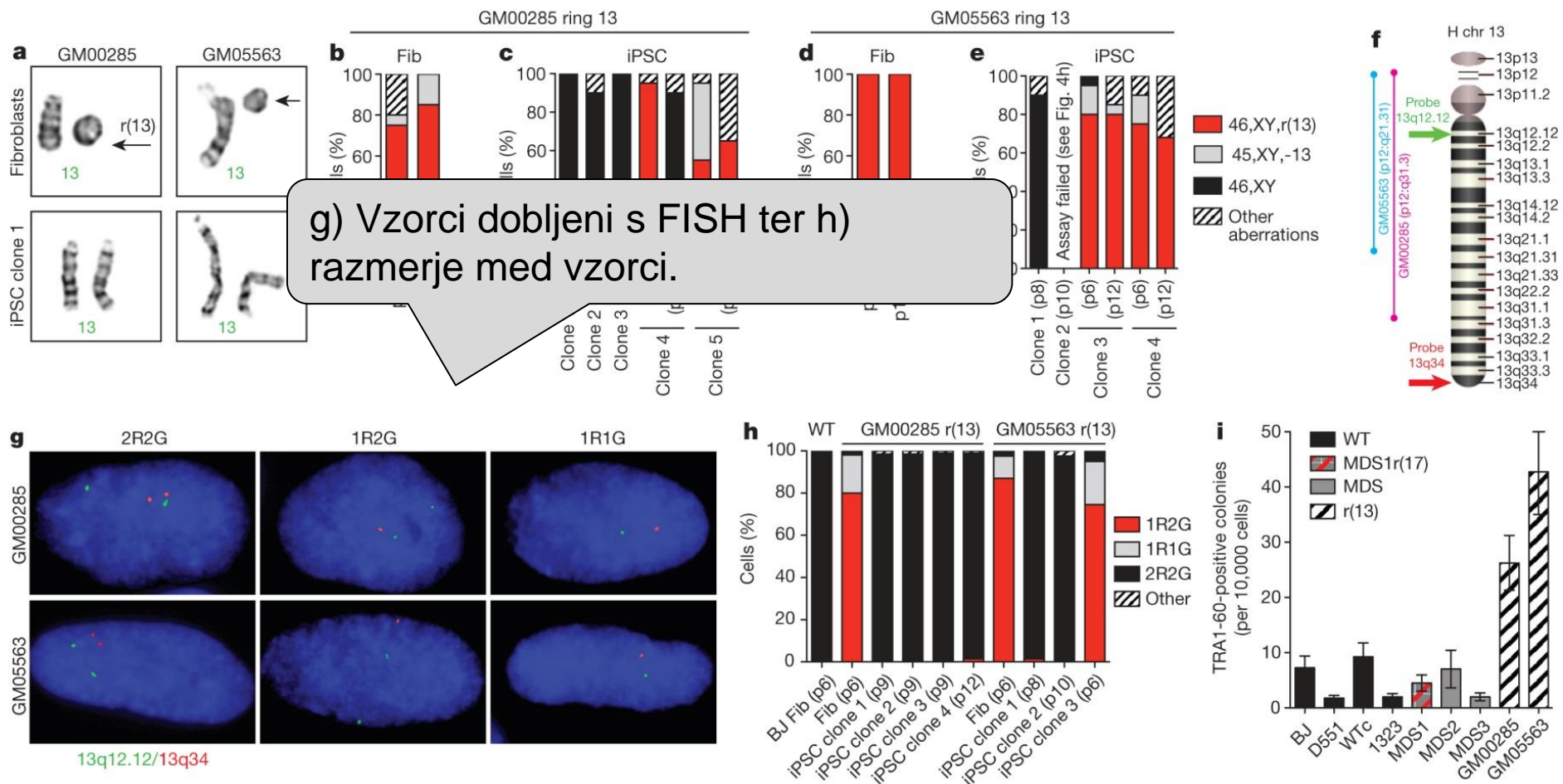


b-e) Razmerje različnih kariotipov v fibroblastih in iPSC dveh pacientov.

Pridobivanje klonov iPSC z normalnim kariotipom iz fibroblastov z r(13).



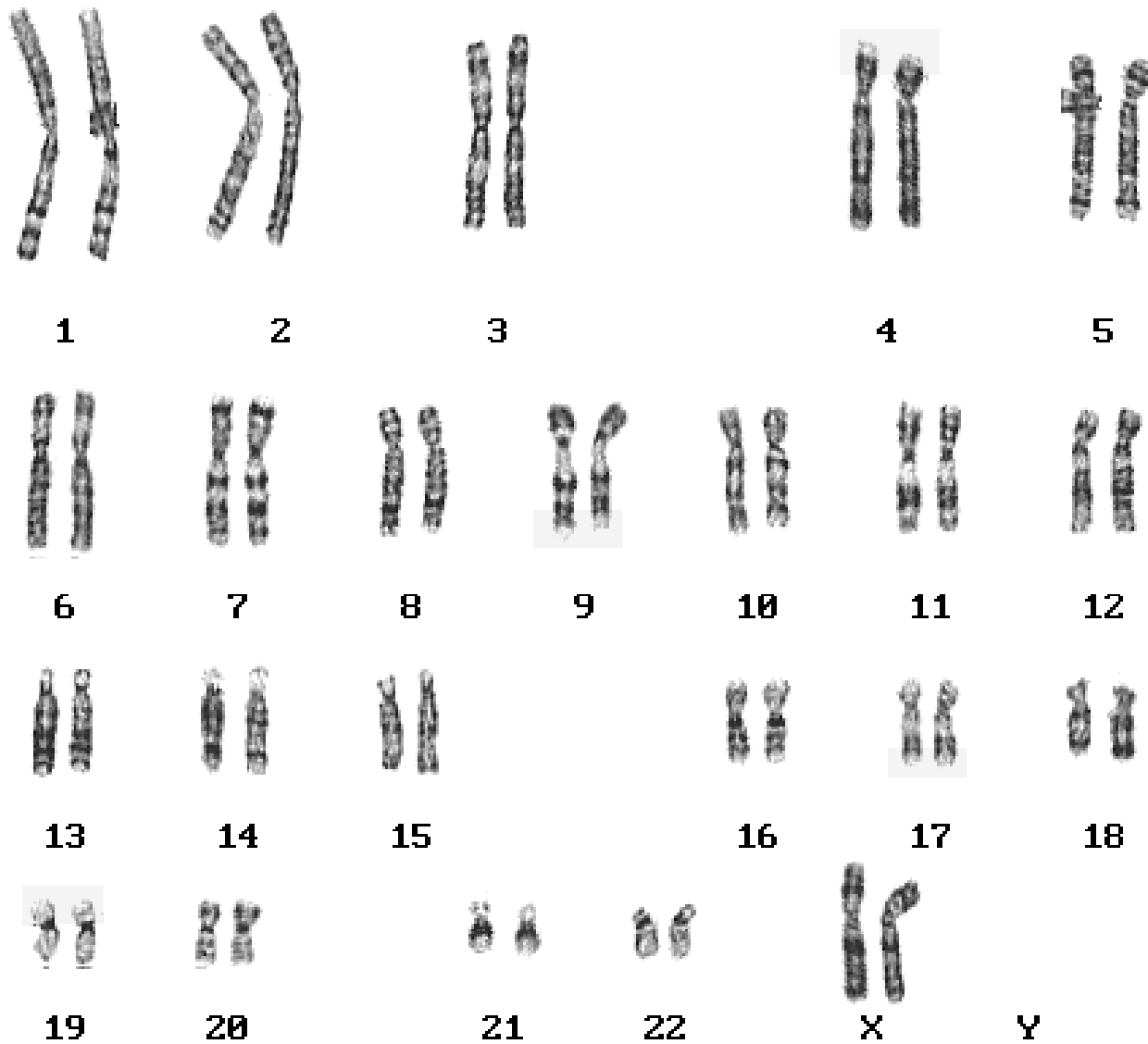
Pridobivanje klonov iPSC z normalnim kariotipom iz fibroblastov z r(13).



Dodatna literatura

- Strachan in Read, Human Molecular Genetics, 4. izdaja, poglavje 2 in 11
- Popravilo kromosomskega prstana. Bershteyn M, Nature 2014

46,XX – ženski kariotip



Karyotype: 46,XX

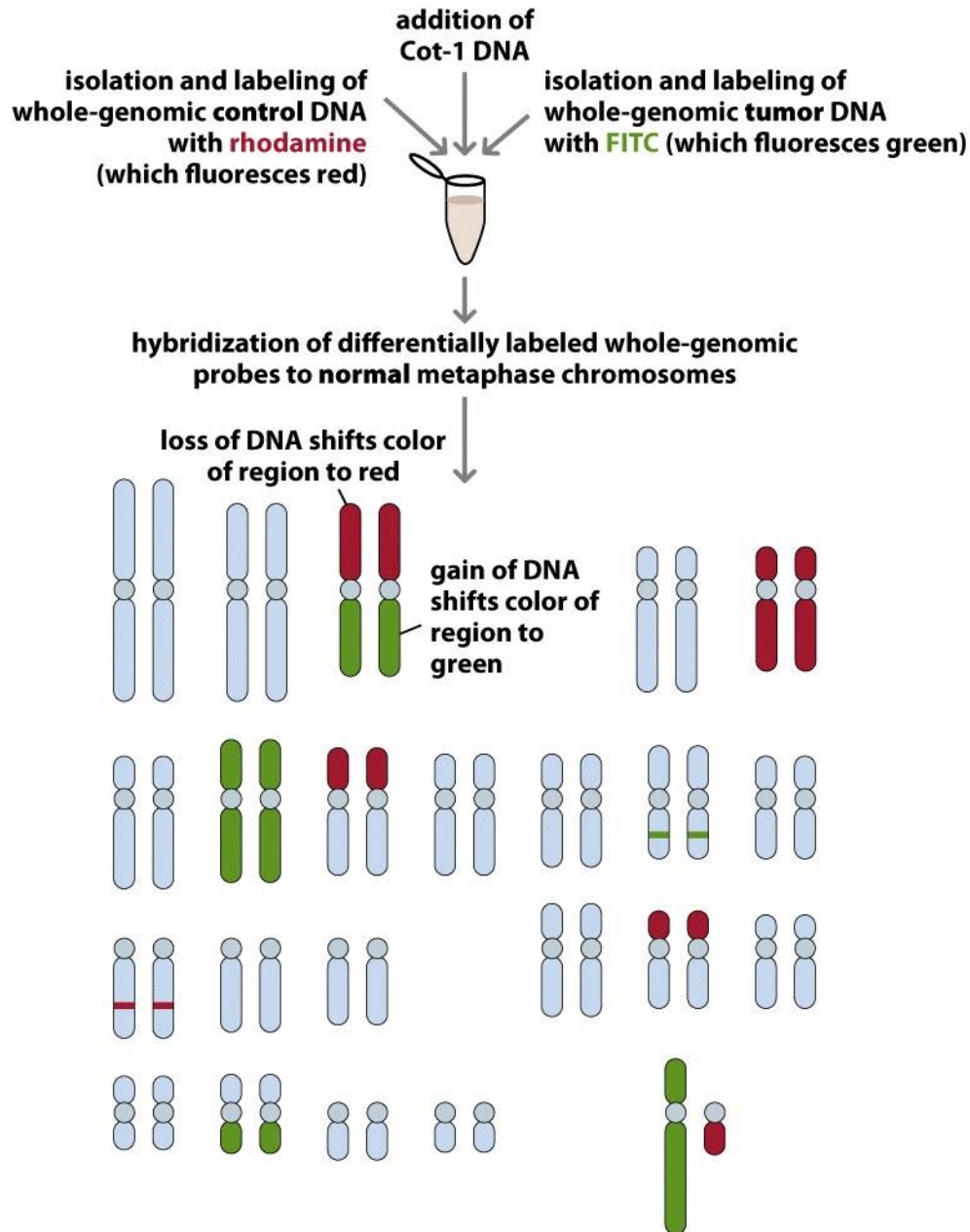


Figure 2.20 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)