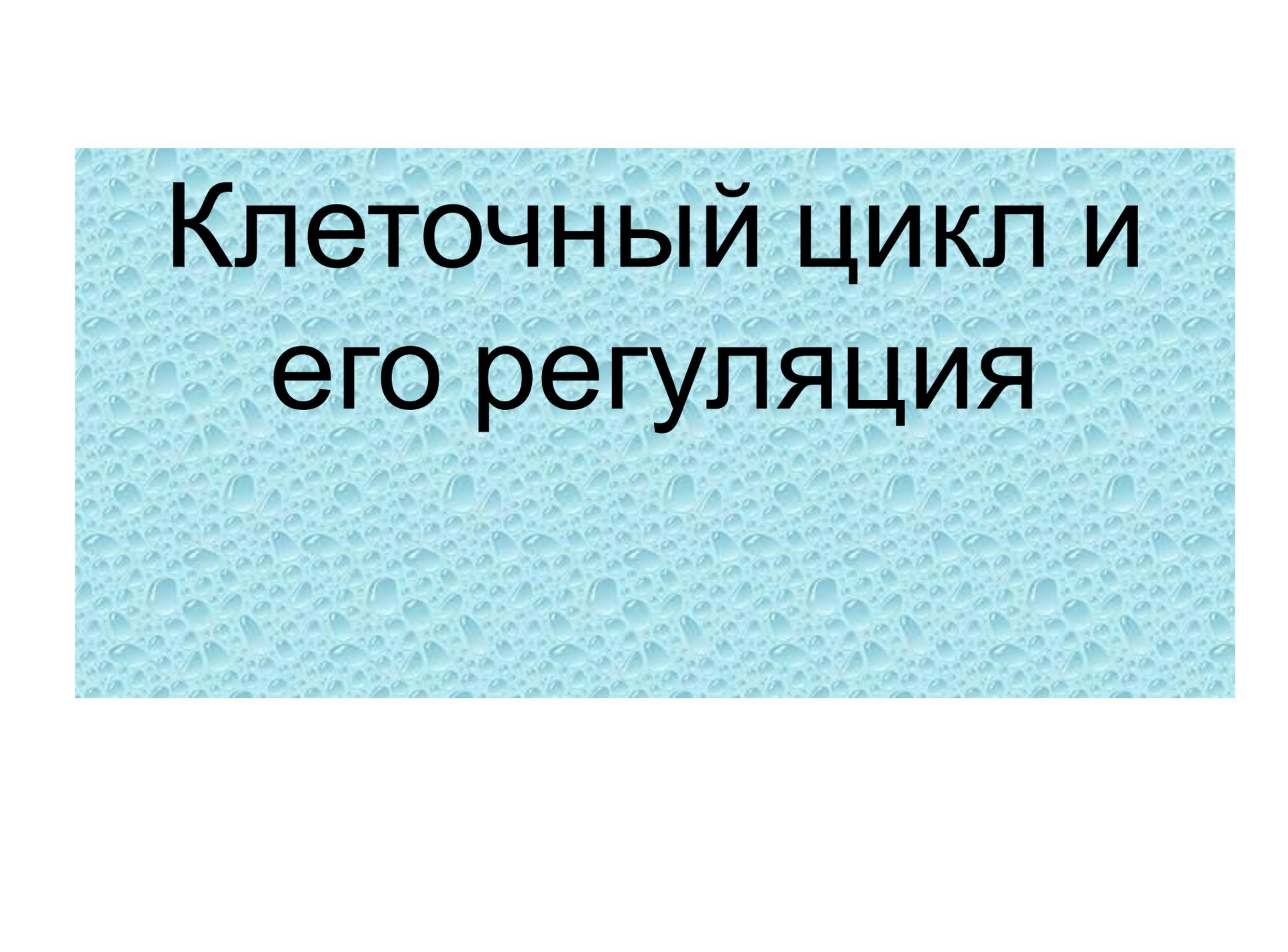


Лекция 3.

Клеточный цикл. Апоптоз. Раковая трансформация клеток. Хромосомы.

План лекции.

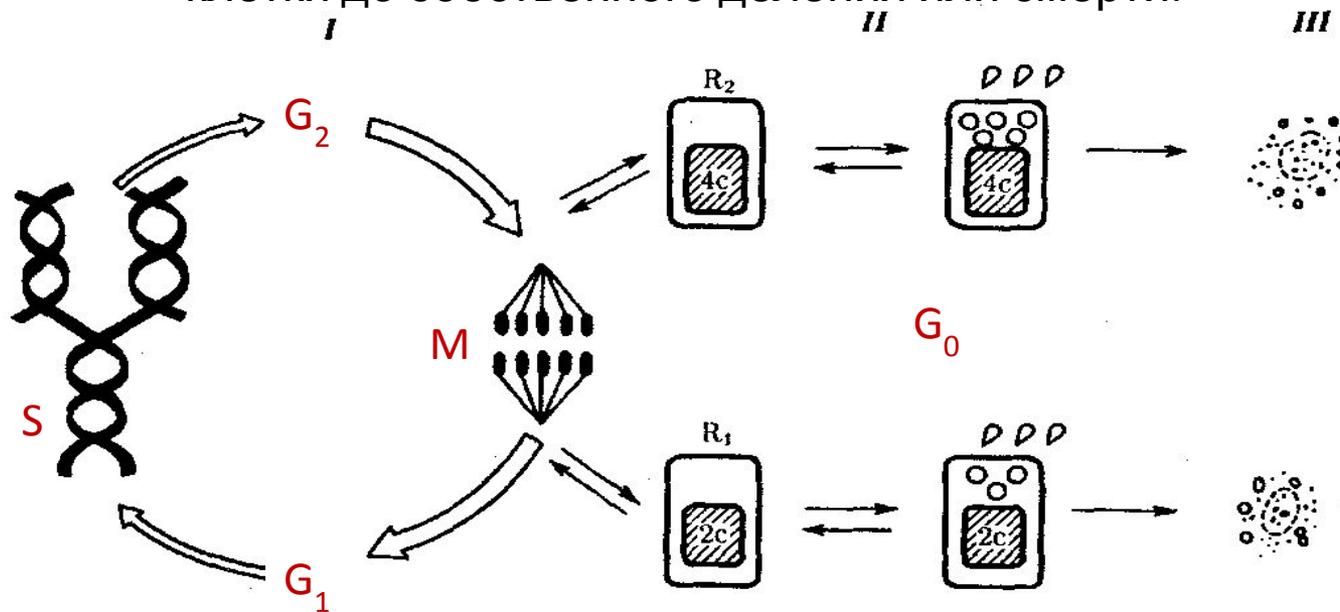
1. Митотический и жизненный цикл клетки.
Регуляция клеточного цикла.
2. Апоптоз – запрограммированная клеточная гибель.
3. Клеточный цикл и рак.
4. Хромосомы и их изменения в клеточном цикле.
5. Цитогенетический метод – метод изучения хромосом.



Клеточный цикл и его регуляция

Митотический цикл клетки (клеточный цикл) – это совокупность процессов, происходящих в клетке от одного ее деления до другого.

Иногда говорят о **жизненном цикле клетки** - периоде существования клетки от момента ее образования вследствие деления материнской клетки до собственного деления или смерти.



I – митотический цикл, II- дифференцировка и выполнение специальных функций и III – гибель клетки (путем некроза или апоптоза).

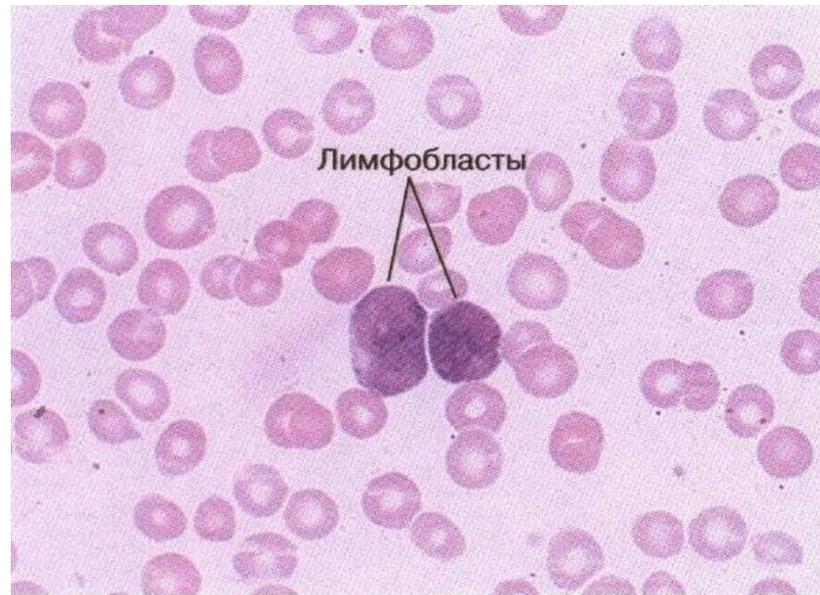
M – митоз, G₁ – постмитотический (пресинтетический) период, G₂ – постсинтетический (премитотический) период, S – синтетический период, G₀ - период покоя и дифференцировки.

Пример перехода клетки из G_0 периода к делению – реакция бласттрансформации лимфоцитов.

Была описана в 1902 г. А.А. Максимовым, выдающимся русским гистологом.

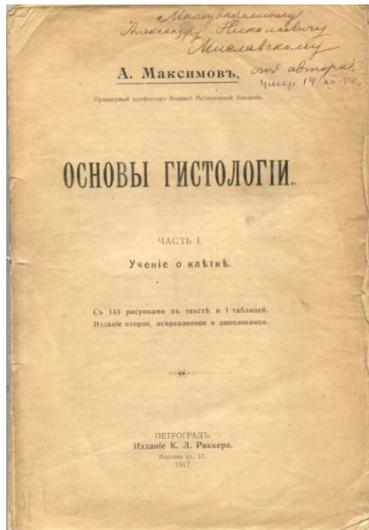
Под действием различных веществ (**митогенов**) лимфоцит растет и начинает делиться, давая 16 – 32 или даже 64 клетки-потомка.

Митогенами служат различные вещества, например, ФГА – фитогемагглютинин. ФГА трансформируют в бласты (незрелые клетки, способные делиться) до 70-80% Т-лимфоцитов.



Отрывок взят из:

http://www.spletnik.ru/blogs/kruto/87576_emigratciya-umov



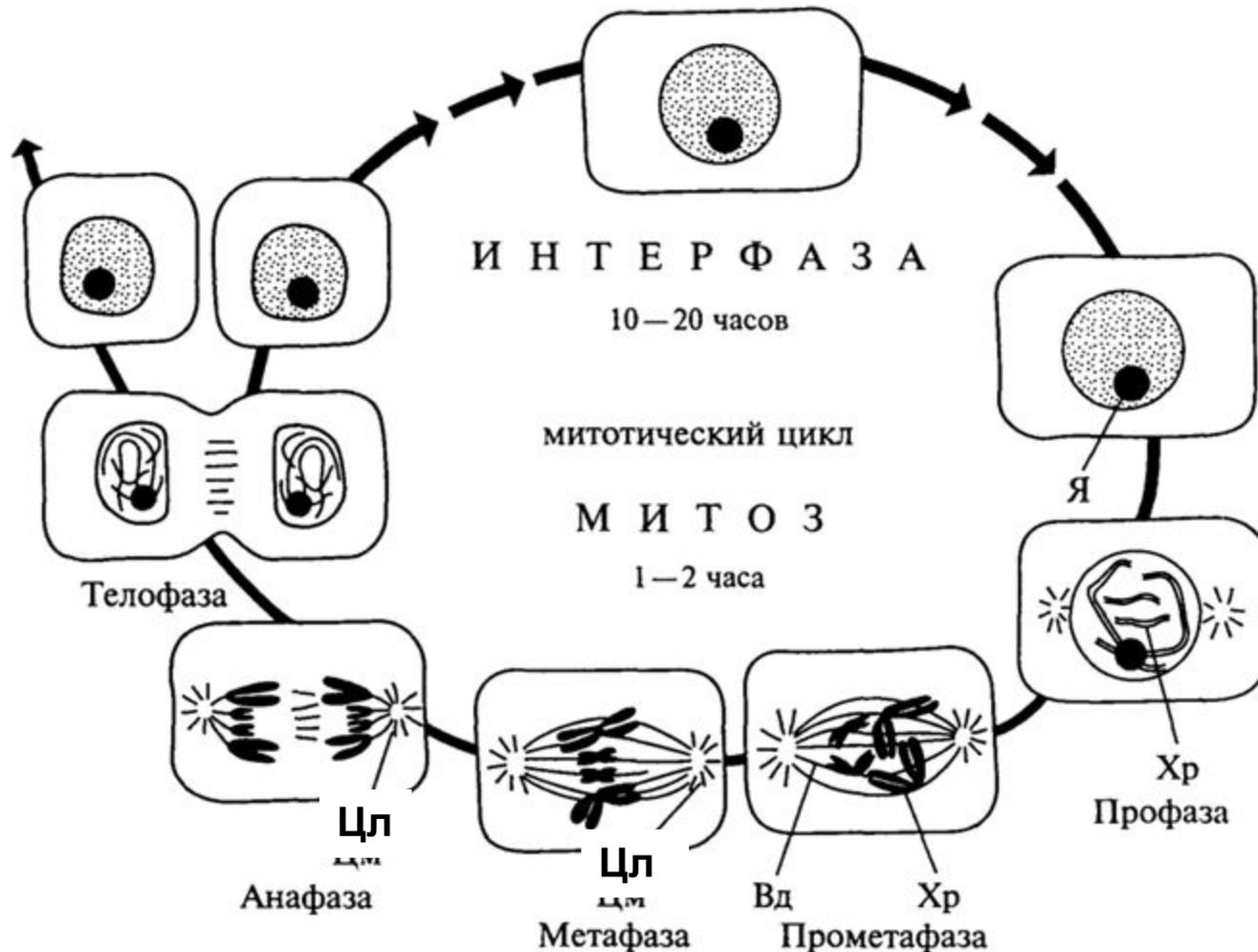
Чтобы по-настоящему оценить масштаб возможностей, упущенных Россией, нужно вспомнить о тех, кто состоялся за рубежом вместо того, чтобы реализовывать свои таланты на родине.

Первая российская эмиграция была огромным общественным явлением. Полное число эмигрировавших тогда составляло около двух миллионов человек. Среди них были сотни более или менее известных ученых. Точный список этих людей полностью не составлен даже в вышедшей в 1997 году фундаментальной «Золотой книге эмиграции». Среди высланных из СССР учёных был известный гистолог Александр Александрович Максимов (1874–1928 гг.). Уроженец Санкт-Петербурга, он является автором теории происхождения крови из одной лимфоцитоподобной клетки (унитарная теория кроветворения). Окончив в 1896 г. с отличием Военно-медицинскую академию, работал на кафедре патологической анатомии до 1899 г. С 1900 по 1902 гг. Максимов стажировался в Германии во Фрейбургском университете.

Термин «стволовая клетка» Максимов ввел в 1908 году, для характеристики способа стремительного самообновления клеток крови. Он появился со своей теорией кроветворения в Германии на форуме гематологов. Как раз данный год следует оправданно считать возникновением исследований стволовых клеток!

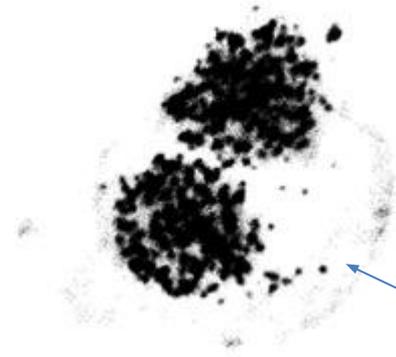
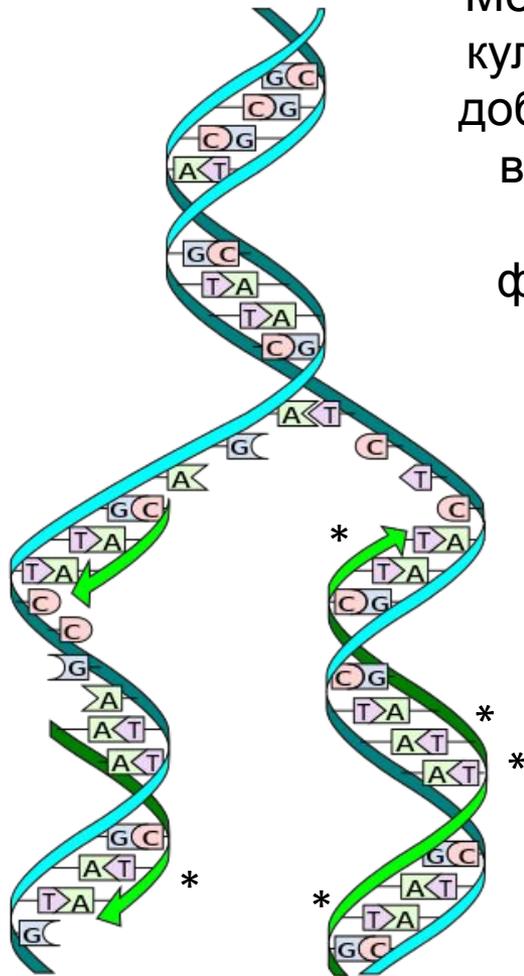
Вернувшись в Петербург, стал профессором, возглавив кафедру гистологии и эмбриологии Военно-медицинской академии. После эмиграции, обосновавшись в США, с 1922 по 1928 гг. Александр Александрович был профессором анатомии медицинского факультета Чикагского университета. В 1927 г. им разработана классическая сводка по соединительным кроветворным тканям.

Вернемся к митотическому циклу. Во время митоза хромосомы хорошо видны, но события интерфазы долго оставались загадкой.



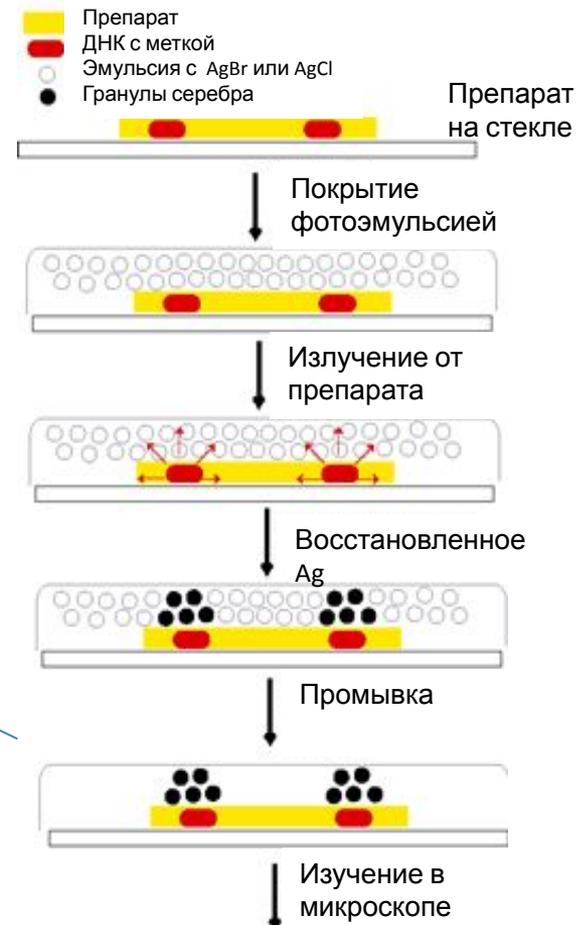
Исследование митотического цикла с помощью меченого тритием тимидина (метод авторадиографии)

Метод авторадиографии: В культуру делящихся клеток добавлялся ^3H -тимидин. Он включался в ДНК при ее синтезе, а потом на фотоэмульсии оставлял «автограф»



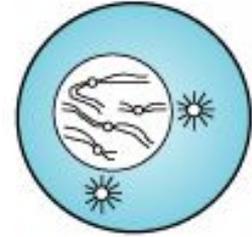
Так было выяснено, что ДНК удваивается в S-периоде интерфазы

Авторадиография

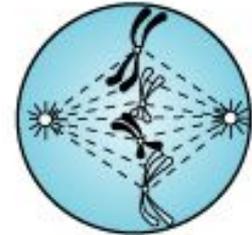


Фазы митоза

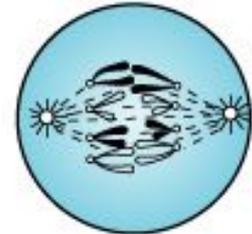
Профаза – хромосомы начинают конденсацию, ядрышки и мембрана ядра исчезают, центриолы расходятся к полюсам



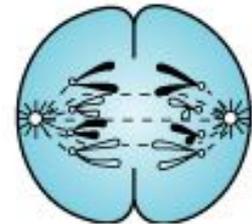
Метафаза – максимально конденсированные хромосомы выстраиваются по экватору клетки, к центромерам хромосом прикрепляется веретено деления



Анафаза – хромосомы расщепляются вдоль на две хроматиды. Хроматиды расходятся к полюсам клетки



Телофаза – хромосомы деконденсируются, образуется ядерная оболочка и ядрышки. Делится цитоплазма (цитокинез, цитотомия).



(Амитоз, прямое деление клетки. Это понятие ещё фигурировало в некоторых учебниках до 1980-х гг. В настоящее время считается, что все явления, относимые к амитозу — результат неверной интерпретации недостаточно качественно приготовленных микроскопических препаратов, или интерпретации как деления клетки явлений, сопровождающих разрушение клеток или иные патологические процессы.)

Нарушения митоза

1. Патология митоза, связанная с повреждением хромосом.

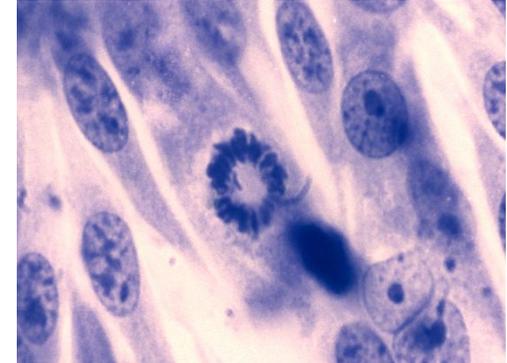
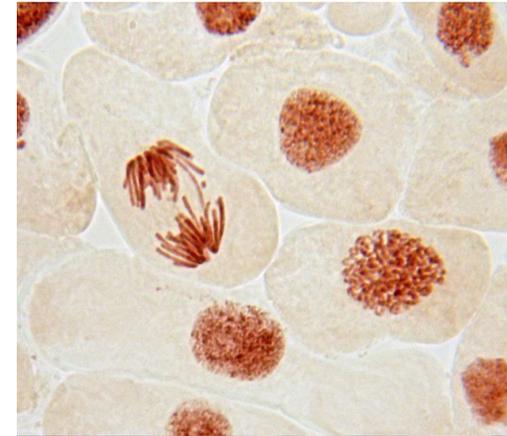
Например, фрагментация хромосом. Слияние фрагментов может приводить к появлению **дицентрических хромосом**, которые в ходе анафазы растягиваются между противоположными полюсами деления, образуя **мост**.

2. Патология митоза, связанная с повреждением митотического аппарата.

Пример: Колхициновый митоз или к-митоз — одна из форм патологии митоза, связанная с повреждением митотического аппарата вследствие воздействия митотических ядов (колхицина и др.) Митоз задерживается на стадии метафазы в связи с разрушением митотического веретена. Может наблюдаться многополюсный митоз или **полая метафаза**.

3. Патология митоза, связанная с нарушением цитотомии:

в результате формируются **двухъядерные клетки**. либо



В зависимости от митотической активности ткани делят на:

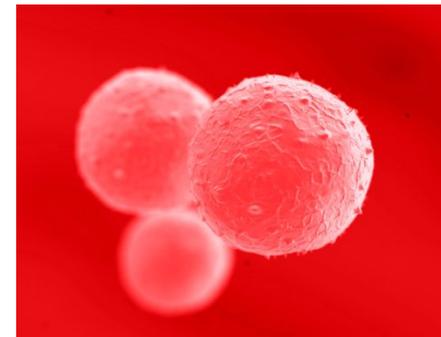
Стабильные ткани — это ткани, в которых клетки не делятся, а выполняют свои функции. Например, нервные клетки, кардиомиоциты. Окончив деление на ранних стадиях развития, эти клетки никогда не вступают в митоз снова.



Растущие ткани — это ткани, в которых клетки обычно не делятся, но могут и вступать в митоз при необходимости. Примером растущих тканей являются ткани почек, желез внутренней секреции, печени.



Обновляющиеся ткани — это ткани, в которых постоянно происходит деление клеток (тканевых стволовых клеток). Примерами обновляющихся тканей являются эпителии, клетки желудочно-кишечного, дыхательного и мочеполового трактов, кожи, костного мозга, половых желез.



Регуляция митотического цикла. Для клеток чрезвычайно важно знать – надо делиться или

нет. Существуют проверочные (контрольные) точки – checkpoints - клеточного цикла.

1. Контрольная точка фазы G_1 . Если в фазе G_1 обнаруживается повреждение ДНК, белок p53 выступает в роли фактора транскрипции и вызывает задержку клеток в G_1 .

2. Контрольная точка S-фазы. Если произошли ошибки в репликации, (что случается) и если они были пропущены репаративными ферментами, клетка не может выйти из S-фазы. Проверка точной репликации ДНК — важнейшая регуляторная точка клетки.

3. Контрольная точка C_2 -фазы. Нереплицированная ДНК блокирует переход клетки от C_2 -фазы к M-фазе.

4. Контрольная точка M-фазы. Причиной остановки цикла в данной точке может быть неправильная сборка веретена деления или неприкрепление кинетохоры какой-либо хроматиды к микротрубочкам веретена деления

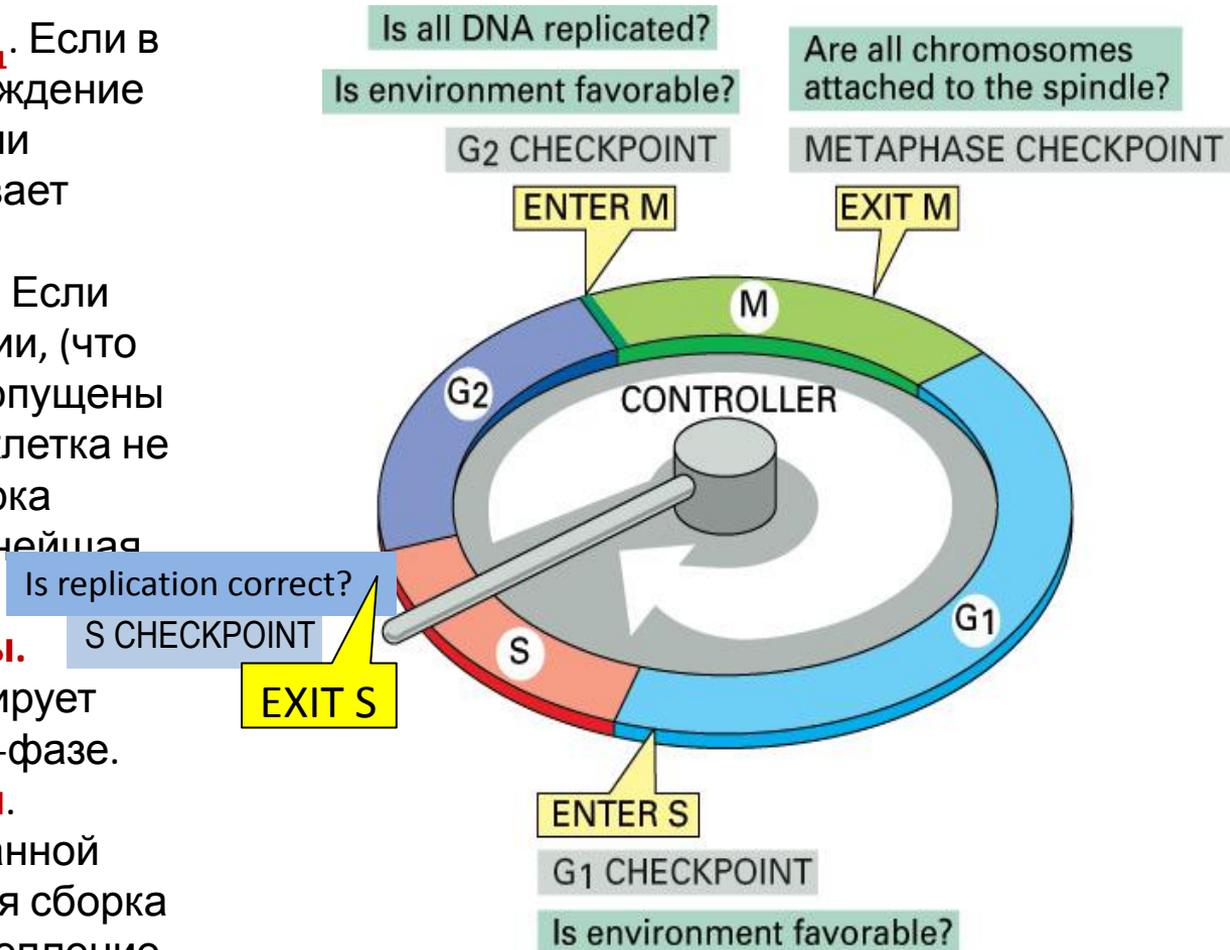
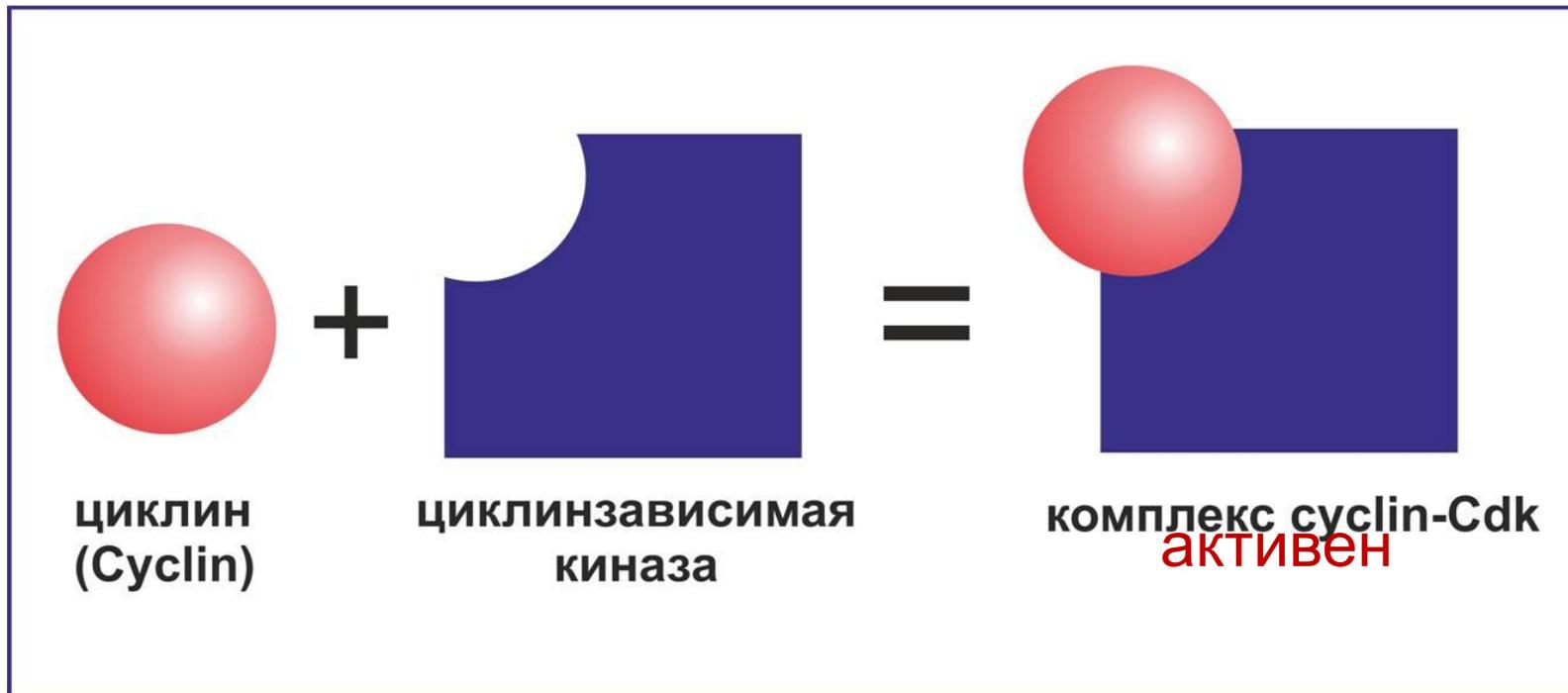


Figure 17–14. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Белки **циклины** и **циклин-зависимые киназы**
(англ. cyclin-dependent kinases, CDK) регулируют
ход митотического цикла

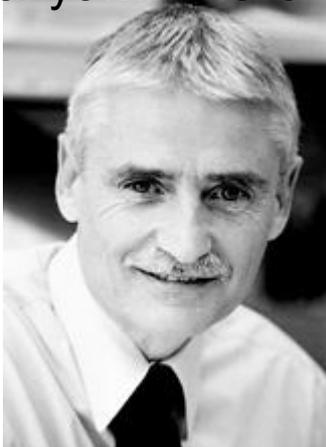


Всего у млекопитающих найдено около 10 различных циклинов и 7 CDK.

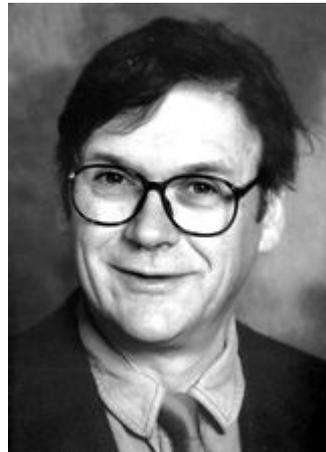
Синтез этих белков включается разными сигналами, например, факторами роста. Факторы роста связываются с рецепторами на мембранах клеток и запускают каскад реакций, приводящих к экспрессии генов циклинов.

Раскрытие тайн регуляции клеточного цикла.

Три нобелевских лауреата обнаружили, что **концентрация CDK в клетке в течение клеточного цикла не меняется, меняется лишь концентрация циклинов**, которые тем самым выполняют роль "коробки передач", определяющей, будет ли система работать на холостом ходу, или же запустит клеточный цикл.



Leland H. Hartwell



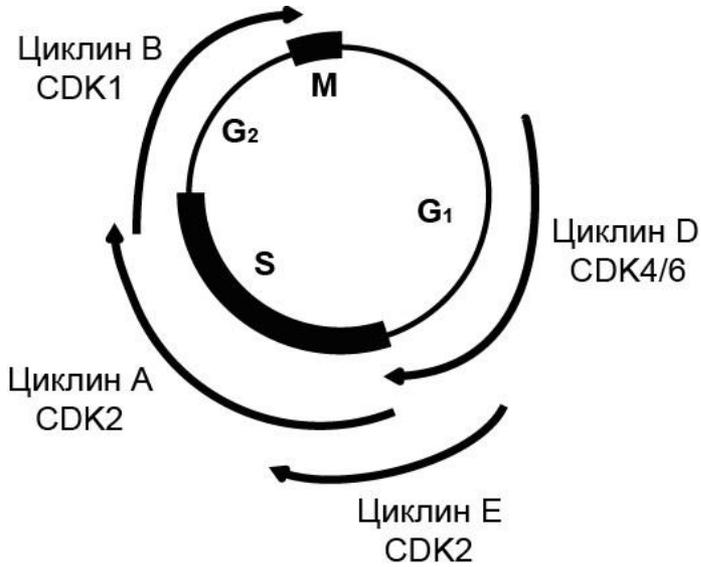
Tim Hunt



Sir Paul M. Nurse

В 2001 году Нобелевской премии в области физиологии и медицины удостоились **Leland H. Hartwell, Tim Hunt** и **Paul M. Nurse** *"for their discoveries of key regulators of the cell cycle"*.

Контрольные точки прохождения клеткой МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА



CDK присутствует в клетке постоянно,
меняется концентрация циклинов.

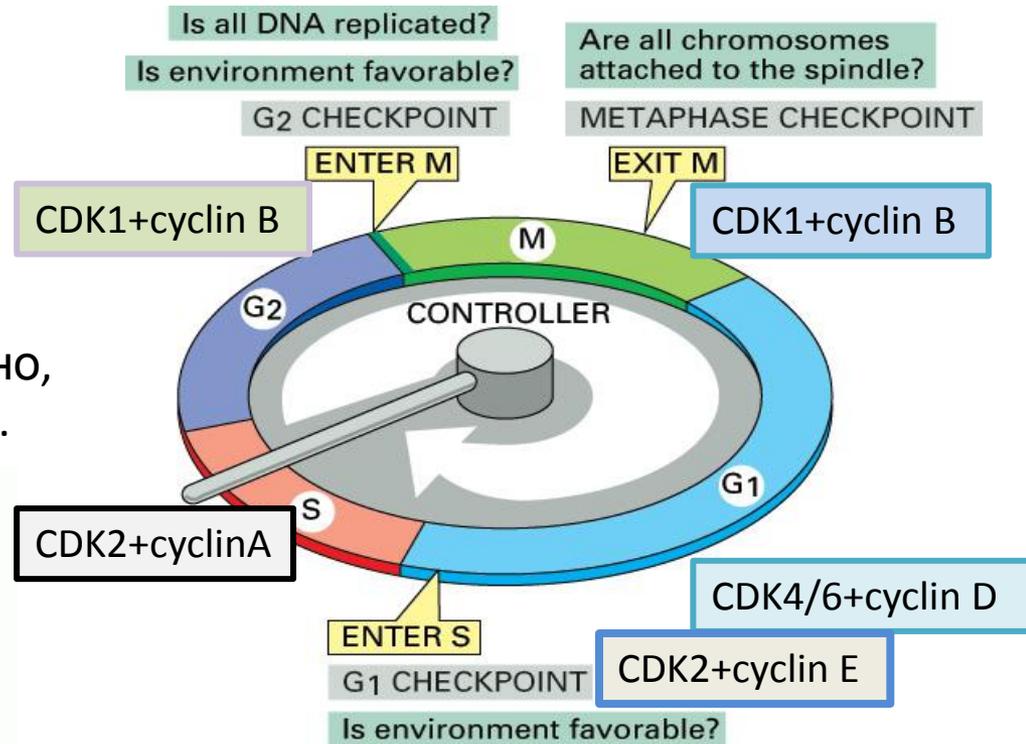
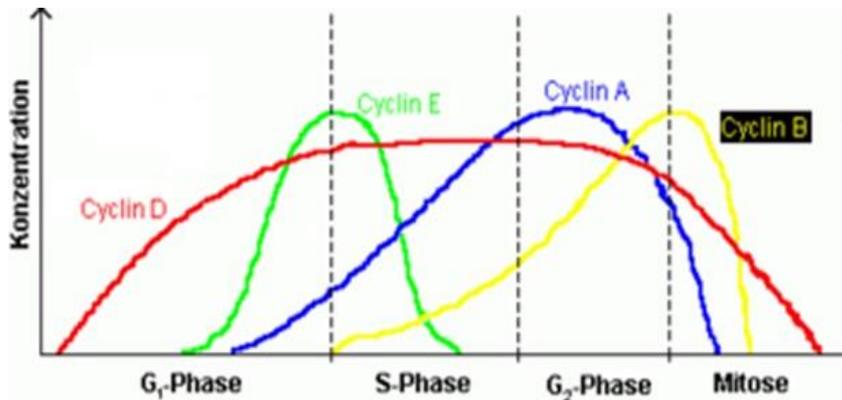
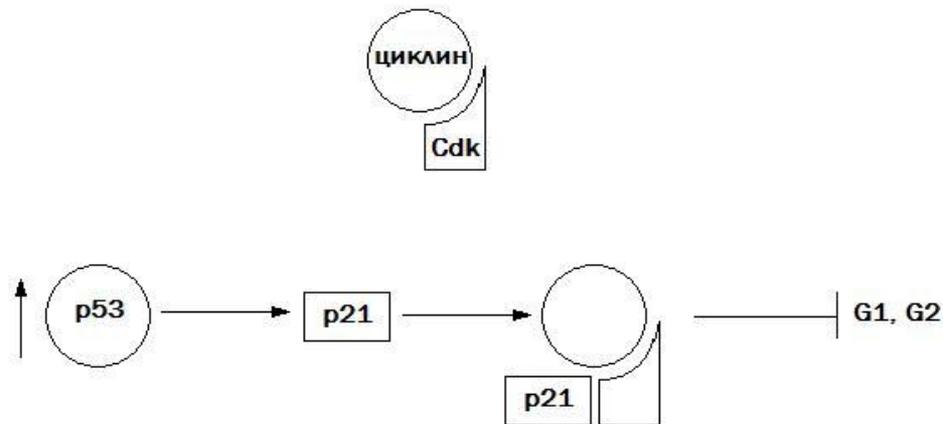


Figure 17-14. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Нарушение регуляции клеточного цикла служит причиной появления большинства солидных опухолей.

Сóлидными (от английского solid – твердый) называют негемопозитические опухоли, то есть опухоли, развившиеся не из клеток кроветворной системы. Сoлидные опухоли могут быть доброкачественными и злокачественными, но чаще, говоря о них, подразумевают именно злокачественные опухоли.

Белок p53 является одним из факторов транскрипции, который инициирует синтез **белка p21**, являющегося ингибитором комплекса CDK-циклин что приводит к остановке клеточного цикла в G1 и G2 периоде.

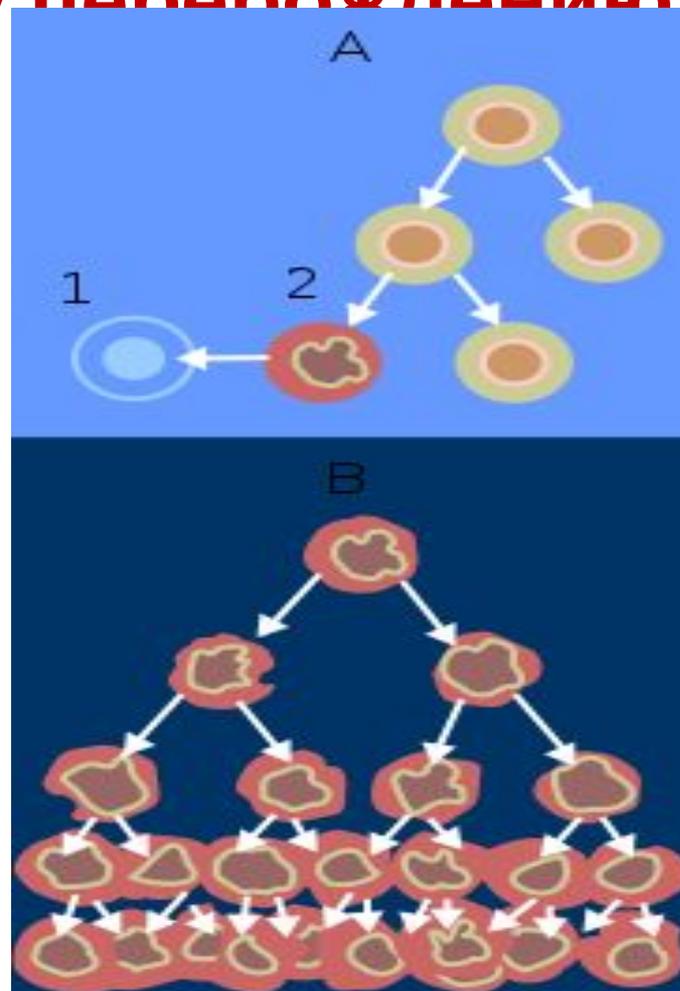


Возрастание синтеза **белка p53** ведет к индукции синтеза **белка p21** – клеточный цикл блокируется.

При мутациях гена p53 блокады клеточного цикла не происходит, клетки все время вступают в митоз, появляются **мутантные клетки**, большая часть из которых нежизнеспособна, другая — дает начало злокачественным клеткам.

Нарушение регуляции клеточного цикла МОЖЕТ ВЕСТИ К ПОЯВЛЕНИЮ нежизнеспособных клеток или к раковому перерождению

А. В норме поврежденные клетки (2) ликвидируются путем **апоптоза** (1).



В. **Раковые клетки** продолжают делиться в нерегулируемом режиме.

The background of the slide is a light blue surface covered with numerous small, glistening water droplets of varying sizes, creating a textured, dewy appearance. The droplets are more prominent in the foreground and become smaller and less distinct towards the background.

Αποπτο3

Апоптоз – (др.-греч. ἀπόπτωσης –
опадание листьев) **это**
запрограммированная клеточная гибель (в
отличие от некроза)

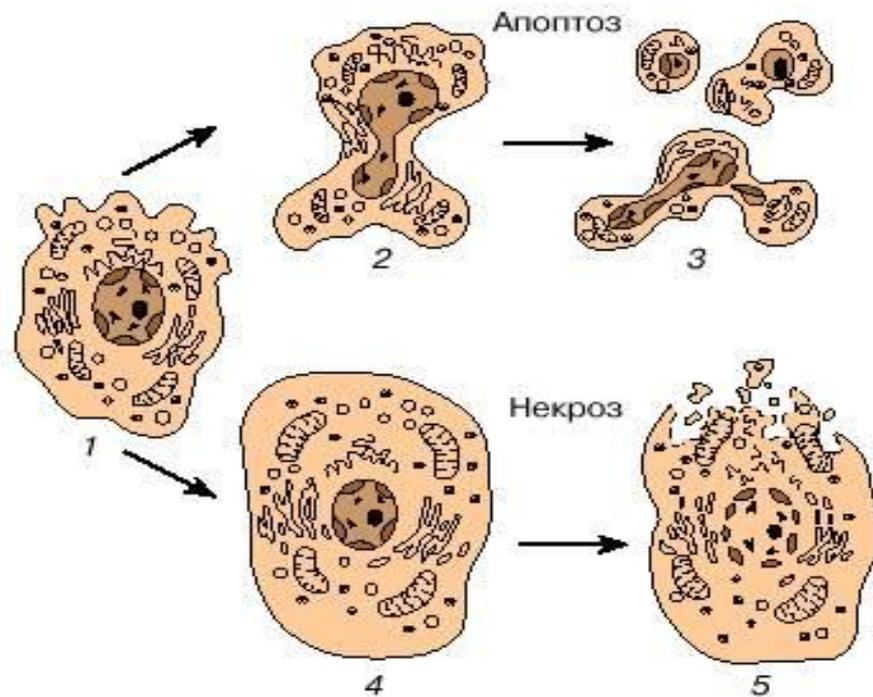


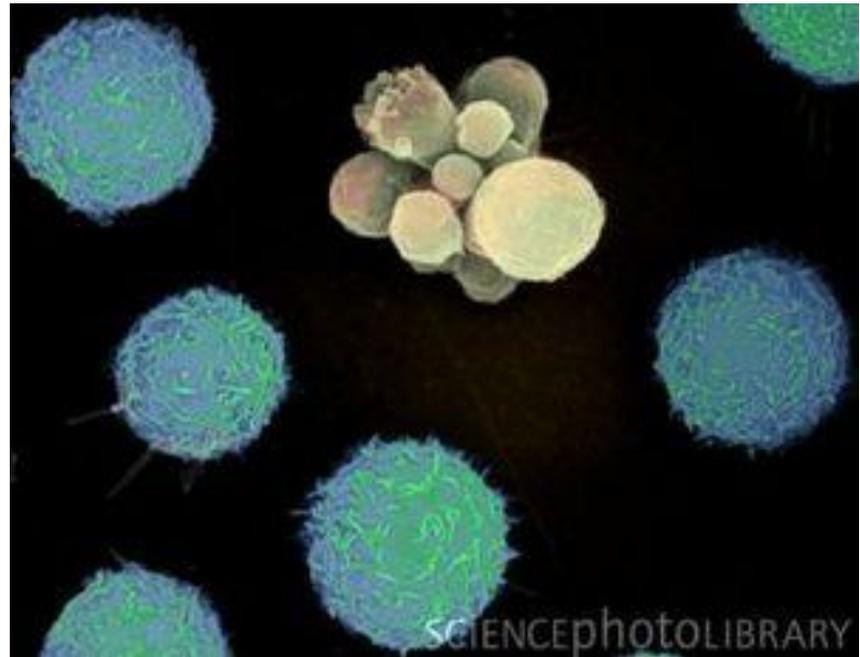
Рис. 1. Изменение ультраструктуры клеток животных при некрозе и апоптозе: 1 – нормальная клетка, 2 – апоптотное сморщивание клетки с образованием пузырьчатых выростов, 3 – фрагментация клетки с образованием апоптотных везикул, 4 – набухание клетки при некрозе, 5 – некротическая дезинтеграция (по: Самуилов, 2001)

Гибель клетки путем апоптоза

Фермент ДНК протеинкиназа узнает двухцепочечные разрывы в ДНК и активирует **белок p53**. Он включает **белок p21**, который ингибирует все комплексы циклинов и CDK. Таким образом, результатом активации p53 является остановка клеточного цикла; при сильном стрессовом сигнале — запуск апоптоза.

p53 называют «хранителем генома».

С. Бреннер, Дж. Салстон и Р. Хорвиц в 2002 году были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытия в области генетической регуляции развития органов и за достижения в исследованиях программируемой клеточной смерти.



Апоптоз лейкоцита. Видны апоптозные тельца

Апоптоз очень важен в многоклеточном организме.

- Первые доказательства наличия генетической программы клеточной смерти были получены при изучении развития нематоды *Caenorhabditis elegans*. Оказалось, что при развитии *C.elegans* образуется всего 1090 клеток, из которых часть нервных клеток в количестве 131 штуки спонтанно погибает путем апоптоза, и в организме остается 959 клеток.
- Апоптоз наблюдается в развитии зародыша (исчезновение хвоста головастика, образование отверстий тела).
- Во взрослом организме также постоянно происходит "спонтанная" гибель клеток. Миллионами погибают клетки крови нейтрофилы, клетки эпидермиса кожи, клетки тонкого кишечника – энтероциты. Погибают фолликулярные клетки яичника после овуляции, погибают клетки молочной железы после лактации. Таких примеров много.



Тироксин (гормон щитовидной железы) вызывает апоптоз клеток хвоста головастиков.

Формирование пальцев (пример апоптоза).



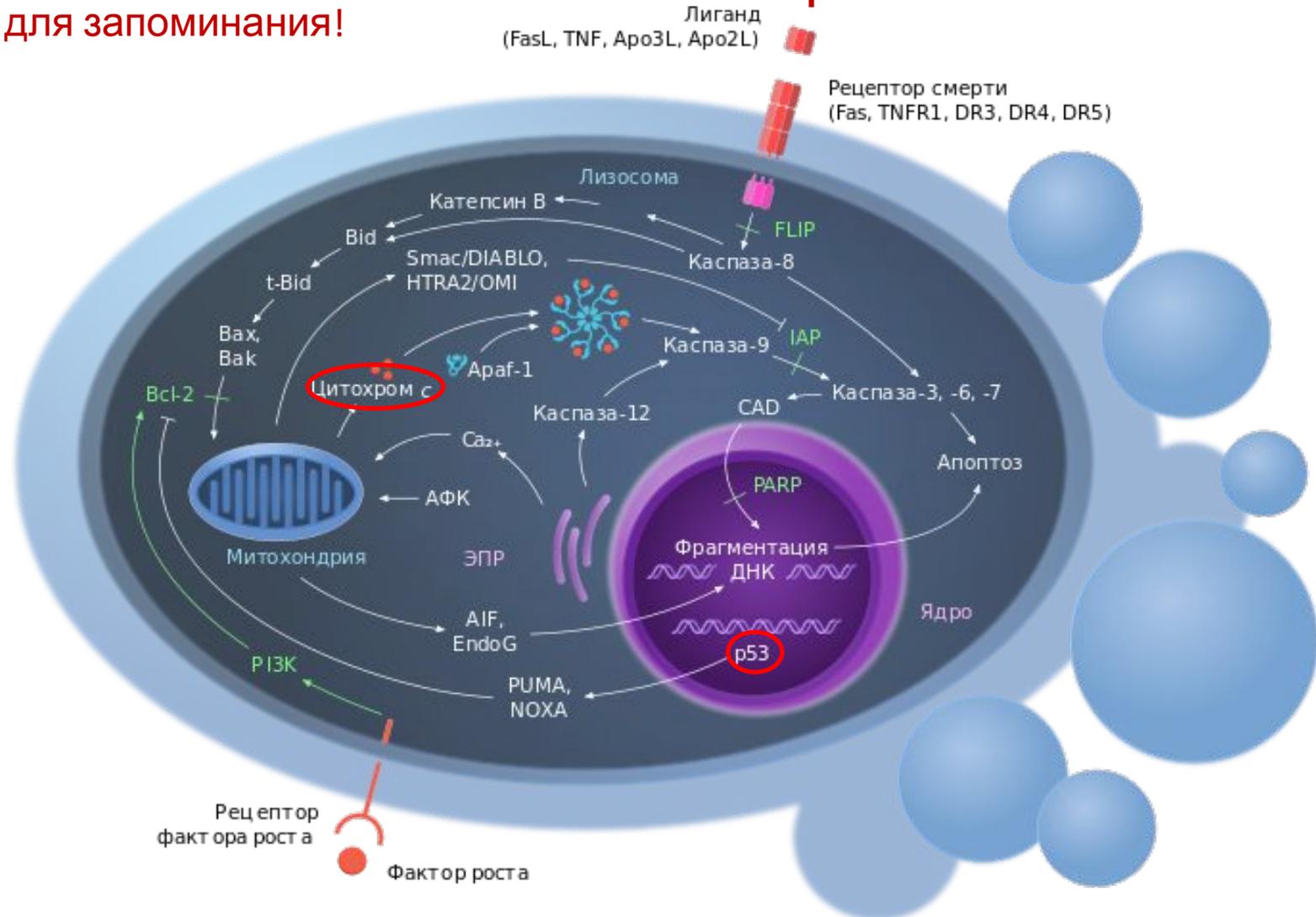
Гистологический срез лапы эмбриона мыши (*Mus musculus*), сделанное на 15-й день развития (эмбриогенез у мышей продолжается в течение 27 дней). Между всеми пальцами заметны рудиментарные скопления клеток, которые погибают путём апоптоза.



Синдактилия у человека как пример нарушения апоптоза.

Обобщённая схема апоптоза млекопитающих

Не для запоминания!



The background of the slide is a dense, repeating pattern of small, realistic water droplets. Each droplet is rendered with soft shading and highlights, giving it a three-dimensional appearance. The droplets are scattered across a light blue, slightly textured surface, creating a fresh and clean aesthetic. The overall color palette is monochromatic, consisting of various shades of light blue and white.

Рак

У всех раковых клеток есть два общих признака:

1. Неконтролируемый рост вследствие нарушения контроля клеточного цикла.
2. Способность к метастазированию, связанная с изменением их клеточной поверхности и взаимодействия с другими клетками.

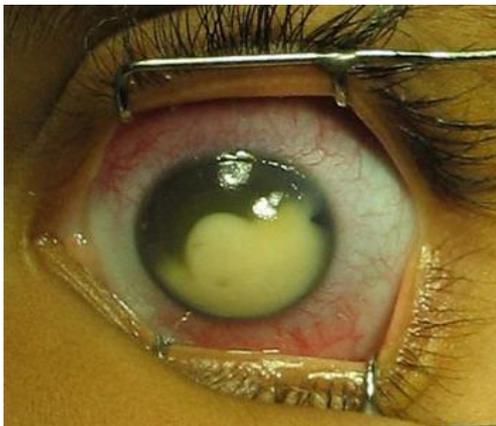
За деление отвечают две основные группы генов:

1. Подавляющие деление клеток (супрессоры опухолей, антионкогены). Для возникновения рака они должны быть выключены. Например, p53 или pRB.
2. Стимулирующих деление клеток (протоонкогены). Мутантные формы протоонкогенов называют онкогенами. Для возникновения рака они должны включаться. Например, c-abl, ras.

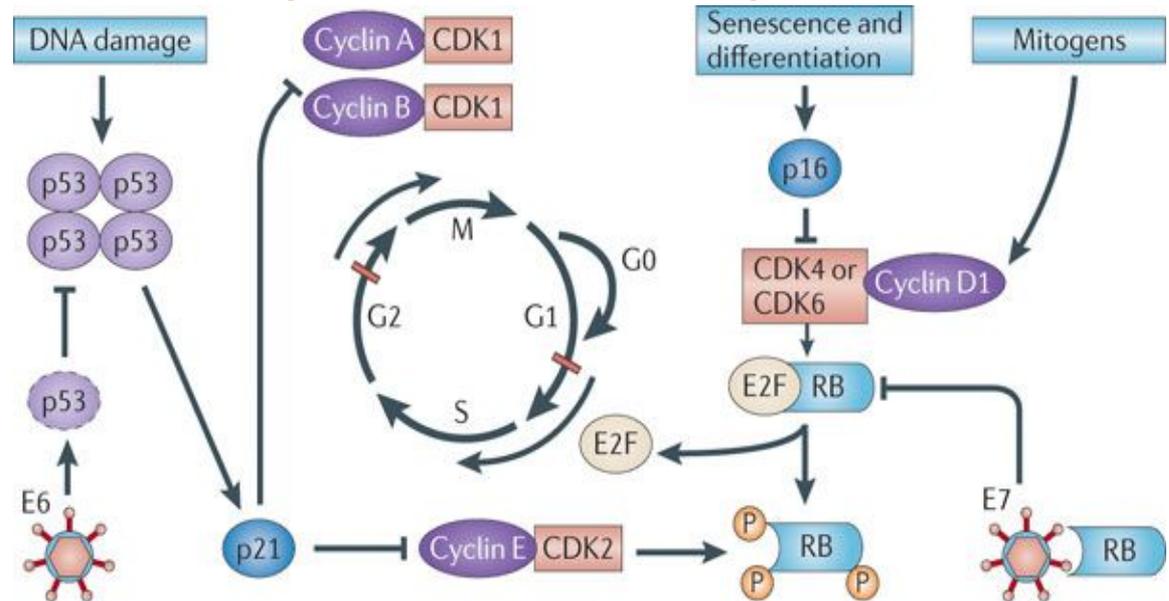
Номенклатура онкогенов и супрессоров опухолей

- ✓ **Онкогены** записывают трёхзначным кодом из строчных латинских букв, который обычно указывает объект, из которого данный онкоген был выделен впервые. Так, название онкогена *ras* указывает на ген, впервые идентифицированный в саркоме крысы (от англ. *ratsarcomes*).
- ✓ Для обозначения **вирусных онкогенов** перед трёхбуквенным названием онкогена вводят строчную букву *v* (от англ. *virus* - вирус) - *v-onc*, а для обозначения **клеточных онкогенов**, образующихся в трансформированных клетках при мутациях, букву *c* (от англ. *cell* - клетка) - *c-onc*.
- ✓ **Гены-супрессоры опухолей**, кодирующие белки, которые ингибируют рост и деление клеток, имеют ещё более разнообразную номенклатуру. Наряду с двух- и трёхбуквенным кодом (ген *rb*) в некоторых случаях указывают размер белкового продукта. Ген *p53* так называют потому, что он кодирует синтез белка с молекулярной массой 53 кД.
- ✓ **Белковые продукты генов** часто обозначают так же, как гены, но с заглавной буквы. Так, ген *ras* кодирует белок Ras, ген *p53* - белок P53.

Пример 1. Развитие ретинобластомы – опухоль сетчатки глаза связано с мутациями в гене *Rb*, супрессоре опухоли.



Почти все случаи заболевания выявляются до 5-летнего возраста. Частота – 1:14000 - 20000



Роль белка *RB* в регуляции клеточного цикла (в норме).

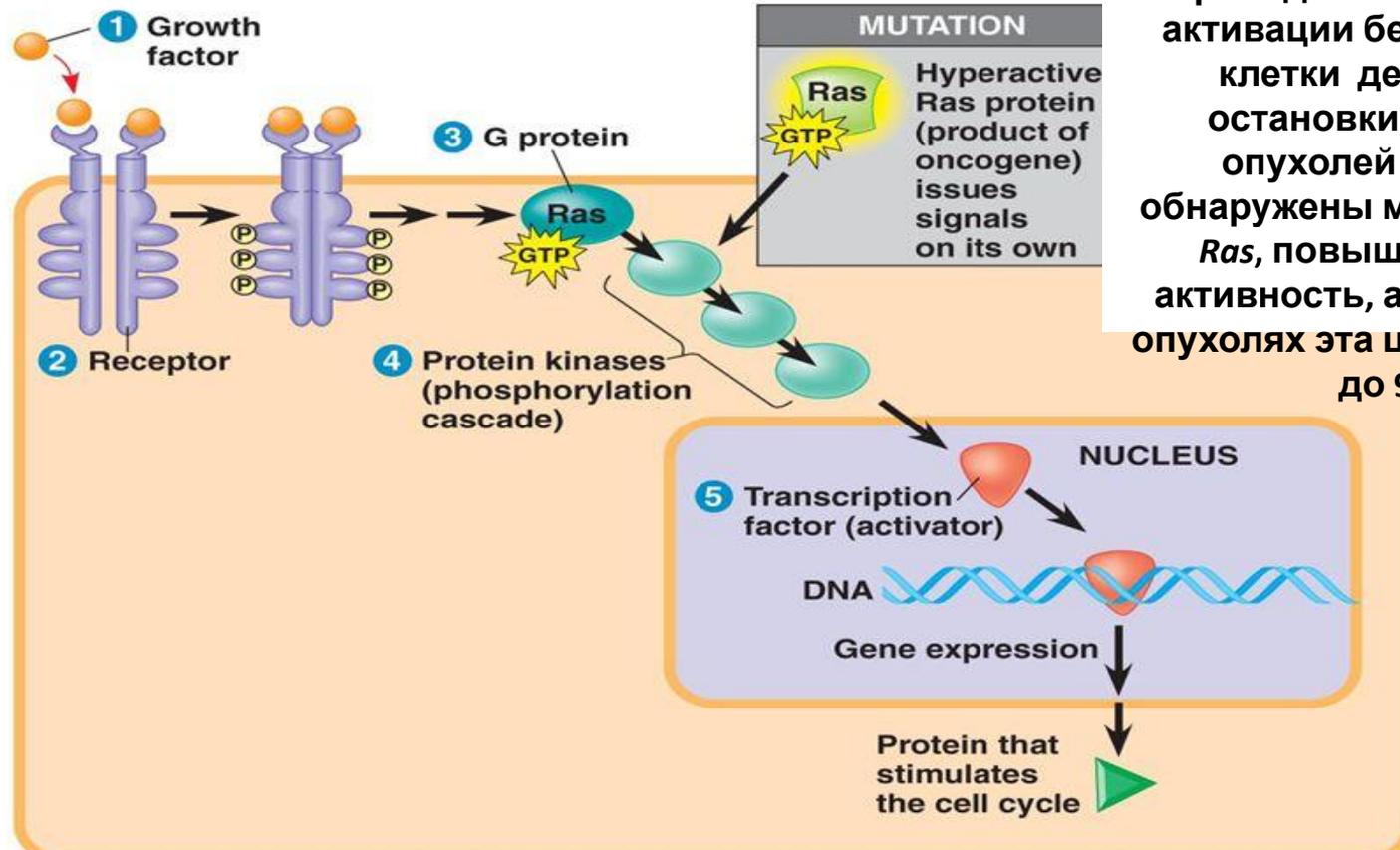
Nature Reviews | Cancer

Ген ретинобластомы *Rb* отвечает за белок pRB (супрессор опухолей), который участвует в регуляции клеточного цикла.

В клетках ретинобластомы обе копии гена дефектны, **белок RB не образуется**. Клеточный цикл **не тормозится**, что ведет к неконтролируемому клеточному росту.

Пример 2. Мутация гена *Ras* (протонкогена), приводит к неконтролируемой пролиферации клеток.

Proto-oncogene



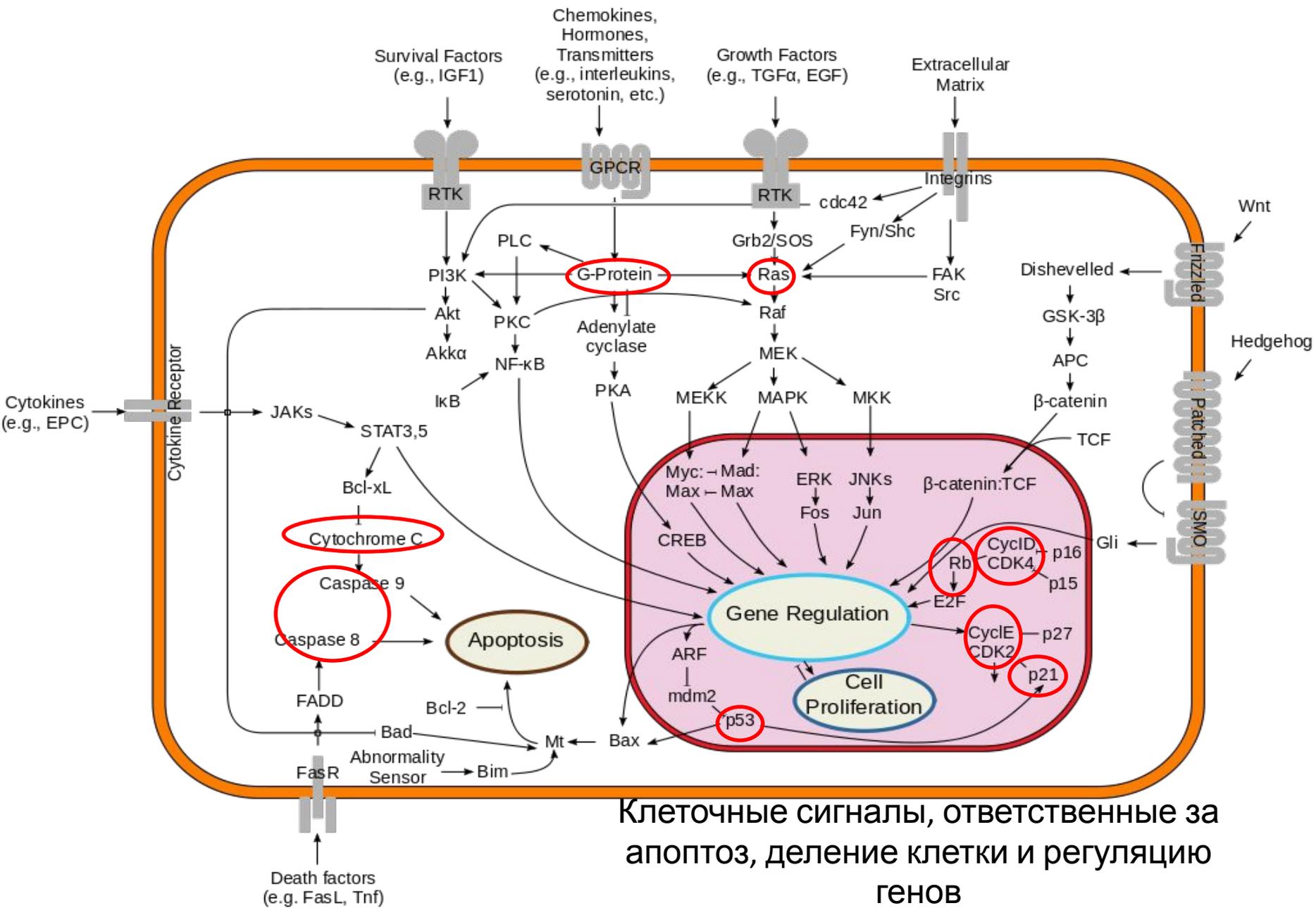
Мутации в гене *Ras* могут приводить к постоянной активации белка Ras, клетки делятся без остановки. В 20—25% опухолей человека обнаружены мутации в гене *Ras*, повышающие его активность, а в некоторых опухолях эта цифра доходит до 90%

Ras — это семейство генов и кодируемых ими белков, связанных с мембраной клетки и участвующими в передаче сигнала, регулирующем размножение клеток.

Пример 3. Хронический миелоидный лейкоз (рак крови) связан с мутацией протонкогена



Хромосомная мутация – транслокация – приводит к переносу протоонкогена *c-abl* внутрь гена *bcr*, в результате образуется активный онкоген *bcr/c-abl*, запускающий развитие лейкоза.



Клеточные сигналы, ответственные за апоптоз, деление клетки и регуляцию генов



**Хроматин.
Хромосомы.
Цитогенетика.**

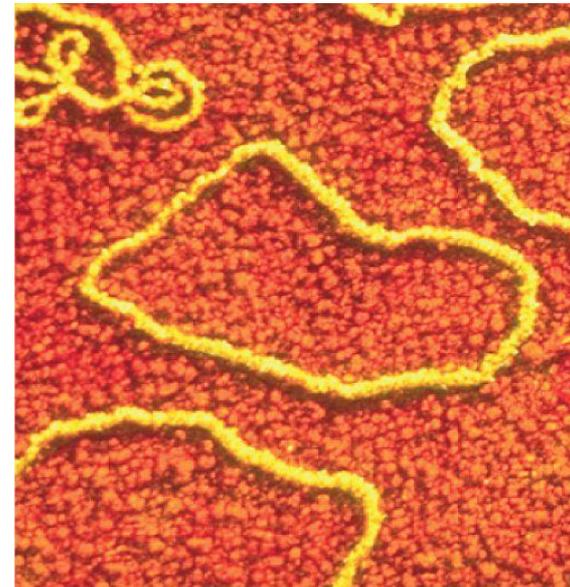
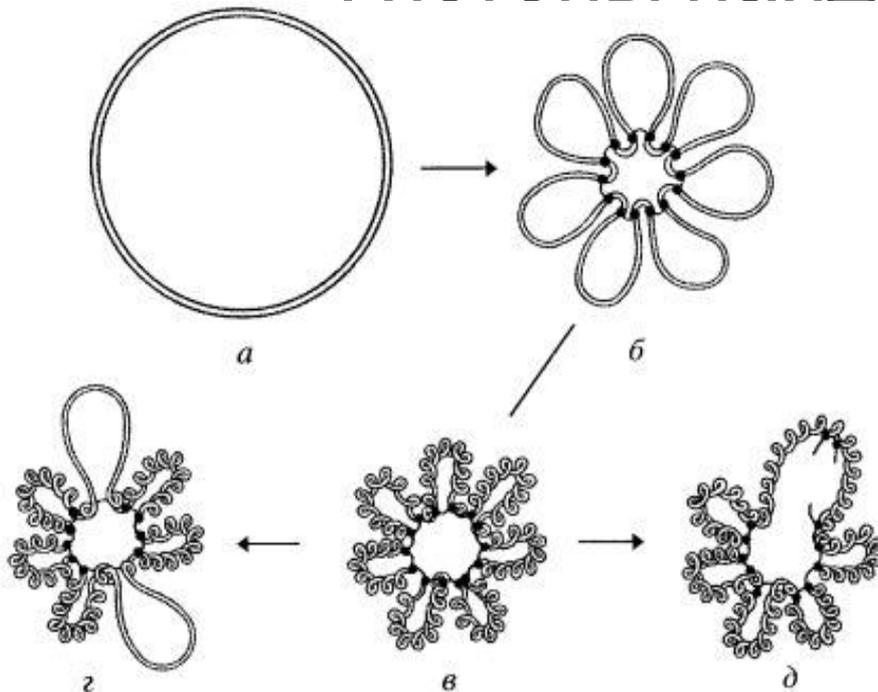
- Хроматин (греч. chroma — цвет, краска и греч. nitos — нить). Это комплекс ДНК с белками.
- Хромосома (греч. chroma — цвет, краска и греч. soma — тело). Структура клетки, образованная сильно конденсированным хроматином.
- Цитогенетика – раздел цитологии, изучающий хромосомы.

Хромосомная теория наследственности

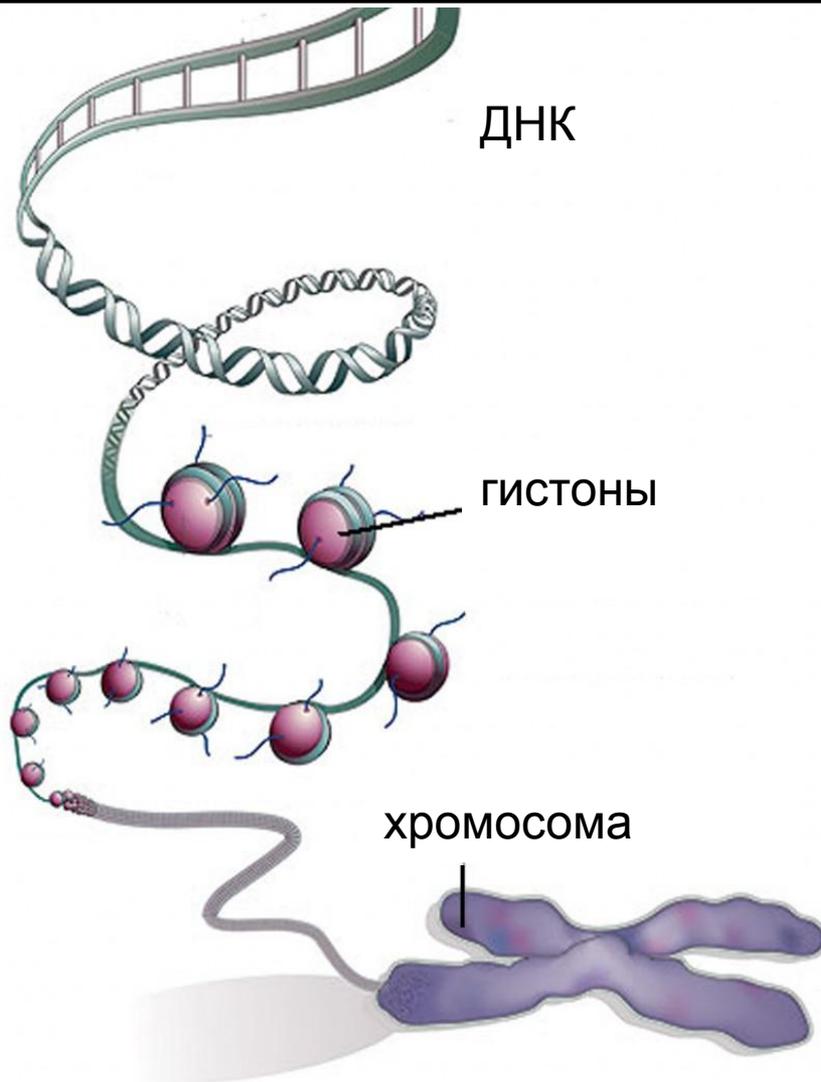
- Гены лежат в хромосомах в линейном порядке
- Каждый ген занимает определенное место – локус
- Гены одной хромосомы образуют группу сцепления
- Сцепление нарушается при кроссинговере
- Частота кроссинговера зависит от расстояния между генами
- Набор хромосом (кариотип) каждого биологического вида уникален

ДНК бактерий тоже иногда называется **бактериальной хромосомой**. Она кольцевая и лишена гистонов. Хотя белки бактериальной хромосомы по составу напоминают гистоны.

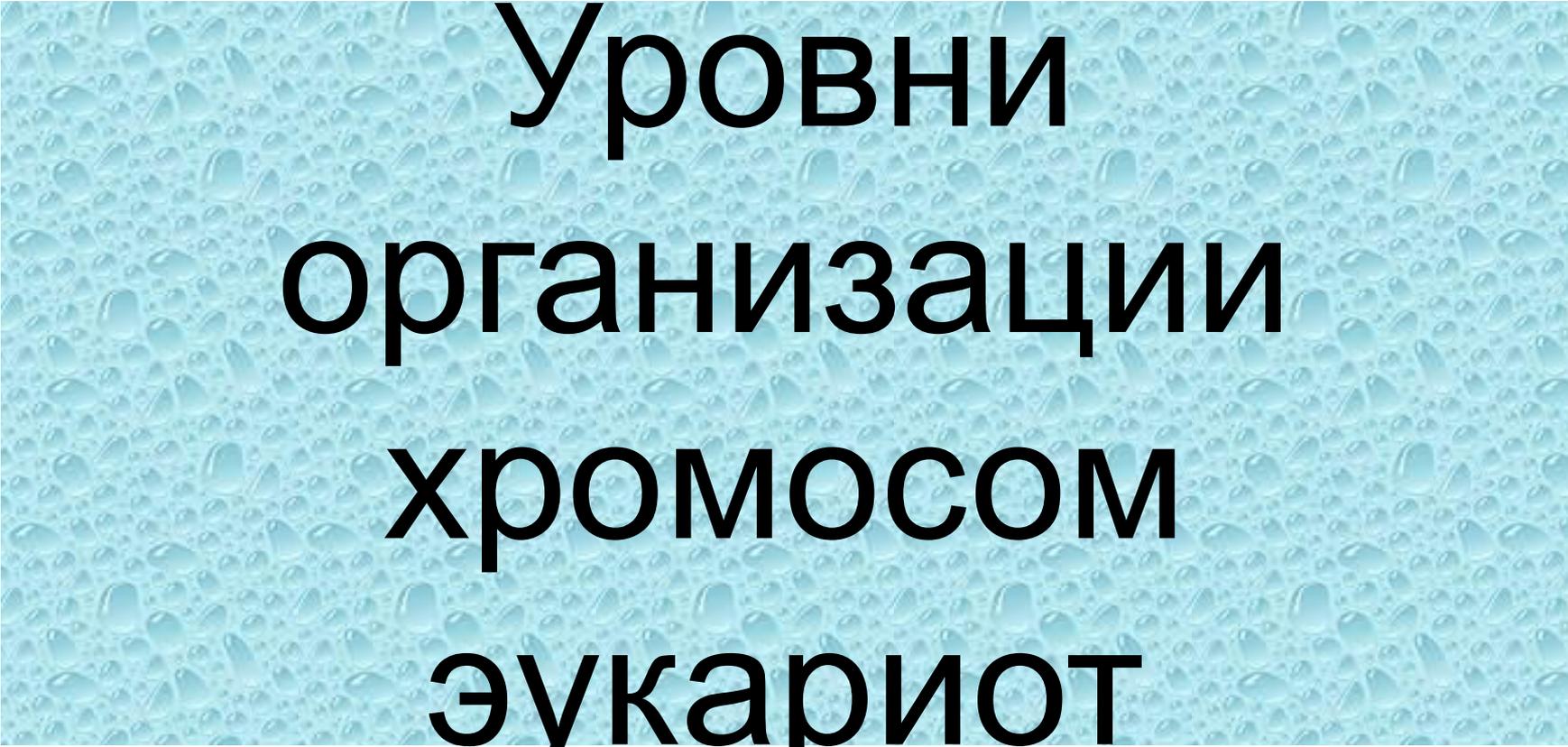
Гистоны найдены у архей.



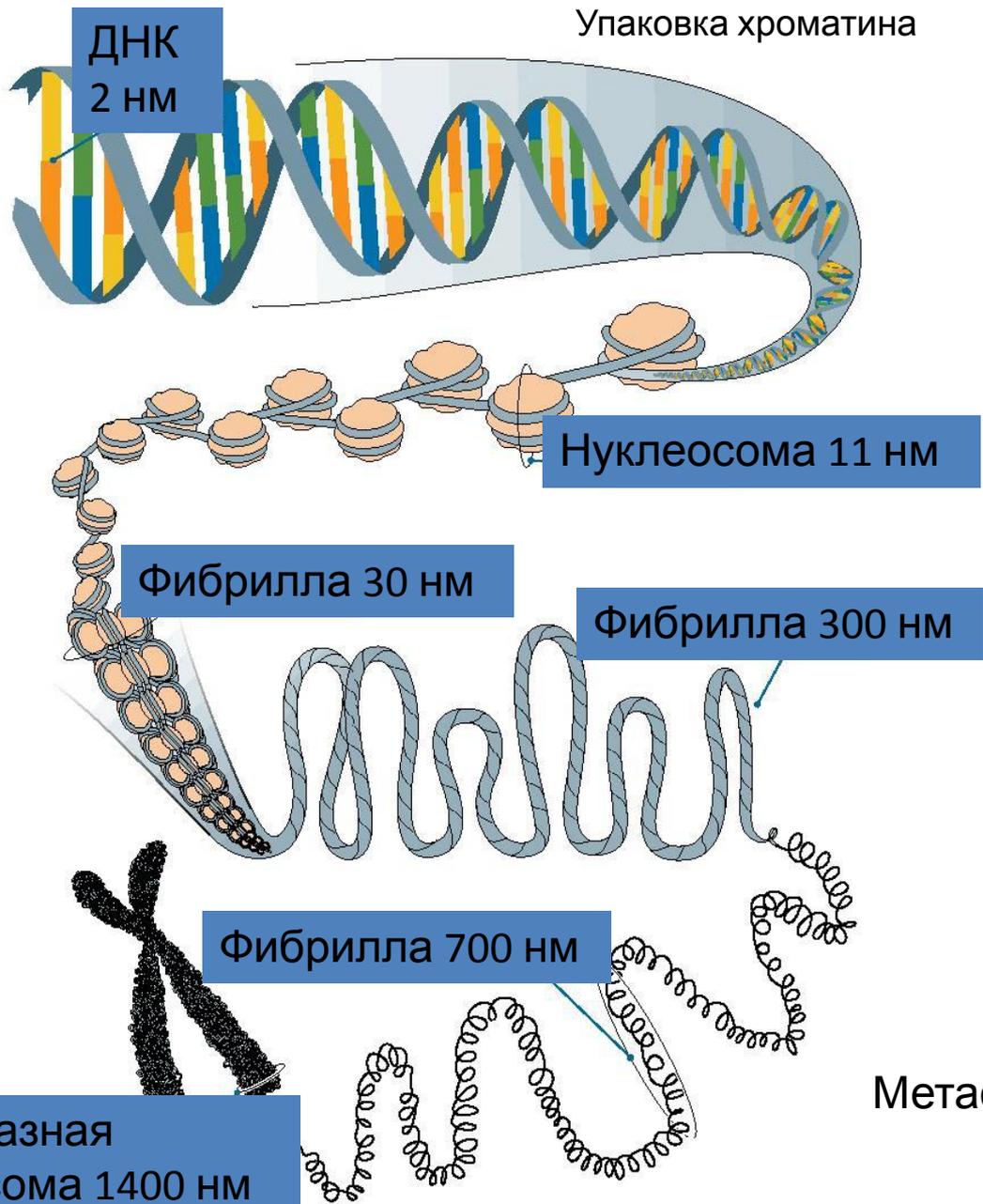
Строение хромосом эукариот



Хромосома (греч. – «окрашенное тело») – комплекс ДНК с белками (ГИСТОНОВЫМИ И НЕГИСТОНОВЫМИ)



Уровни
организации
хромосом
эукариот



а
к
т
и
в
н
а
я

ДНК – 2 нм

Нуклеосома – 11 нм

Фибрилла 30 нм

«Соленоид» - 300 нм

Нить – 700 нм

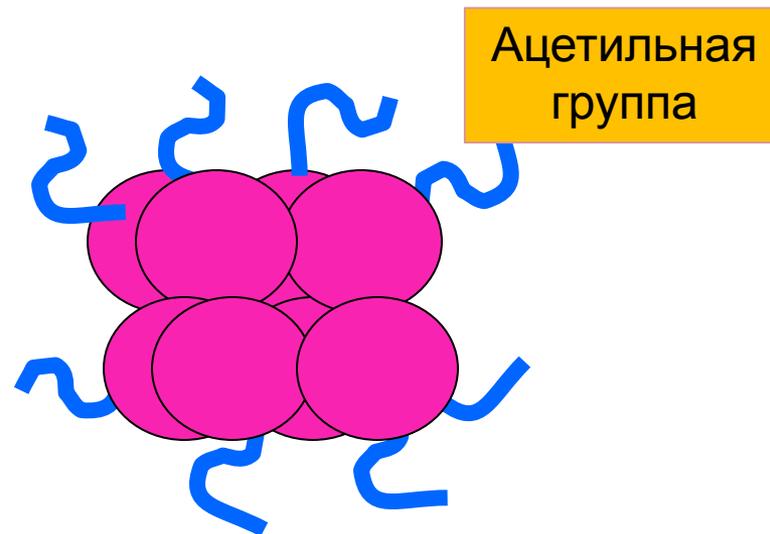
н
е
а
к
т
и
в
н
а
я

Метафазная хромосома – 1400 нм

Метафазная
хромосома 1400 нм

Гистоны играют важную роль как в упаковке, так и регуляции активности хроматина.

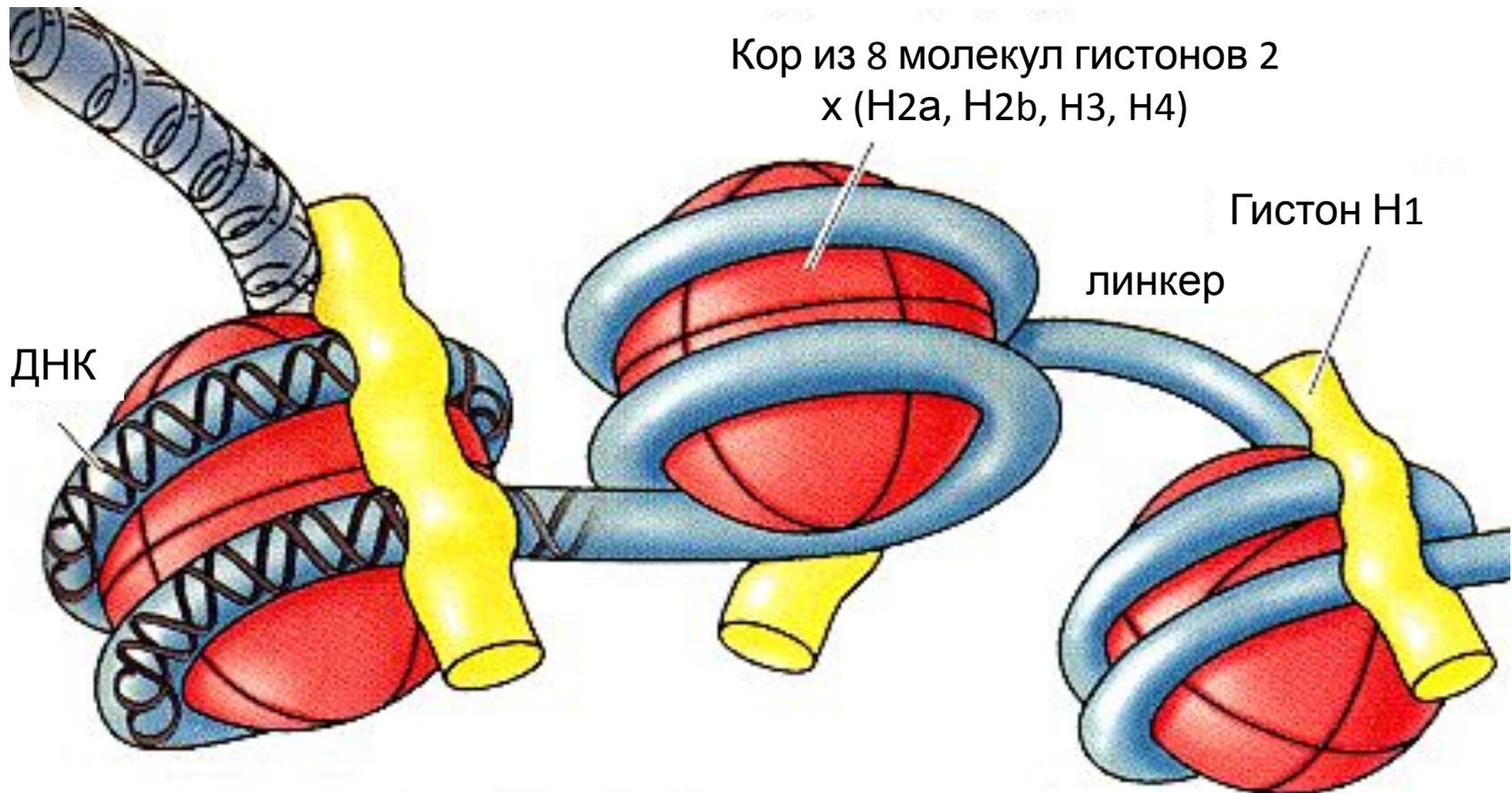
Гистоны – небольшие глобулярные белки, имеющие свободные подвижные цепочки аминокислот, называемые гистоновыми отростками.



Химические модификации этих отростков регулируют активность генов.

Нуклеосома – низший уровень конденсации хроматина

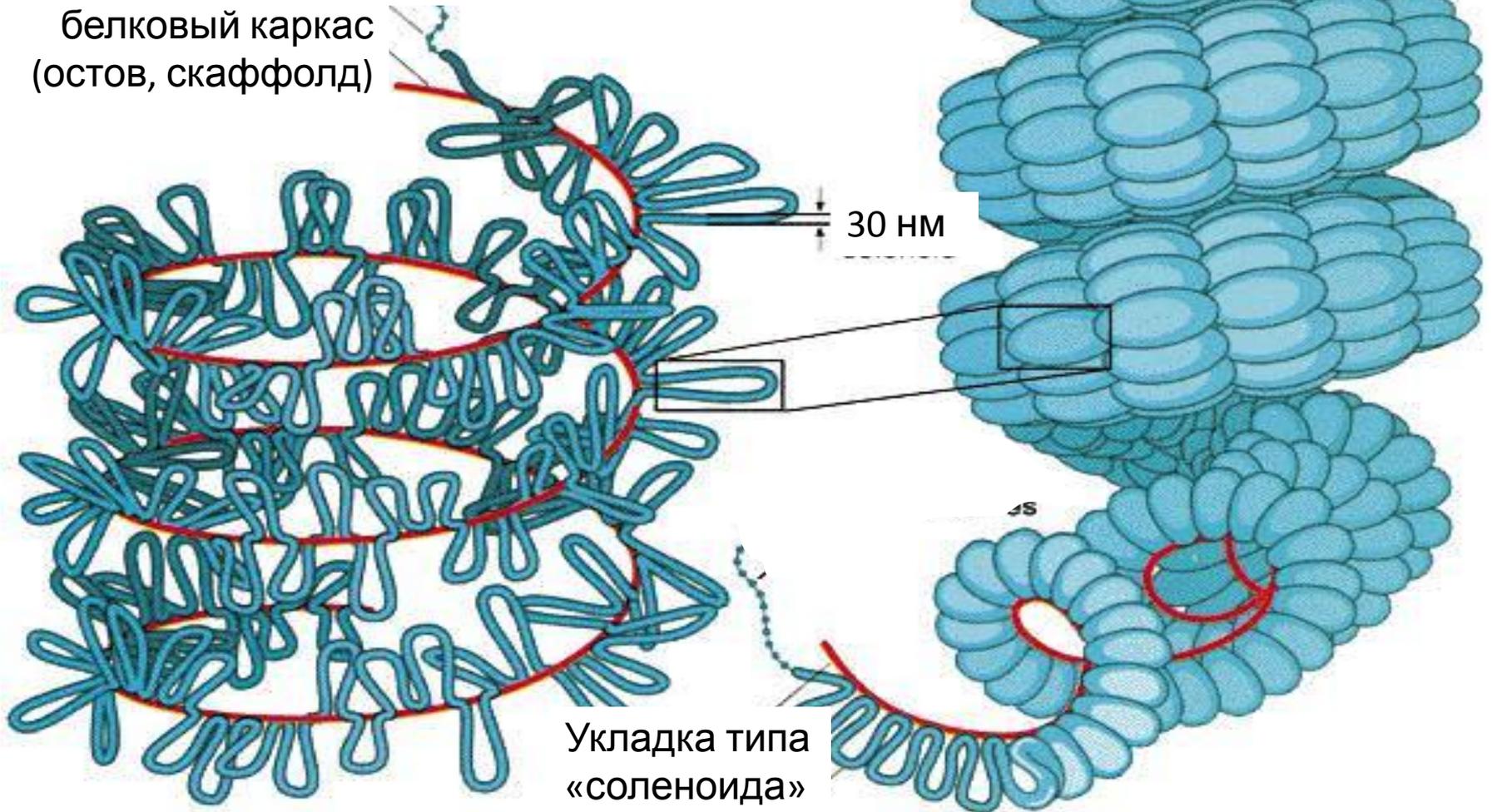
ДНК делает примерно 1,5 витка (147 пар нуклеотидов) вокруг гистонового кора.



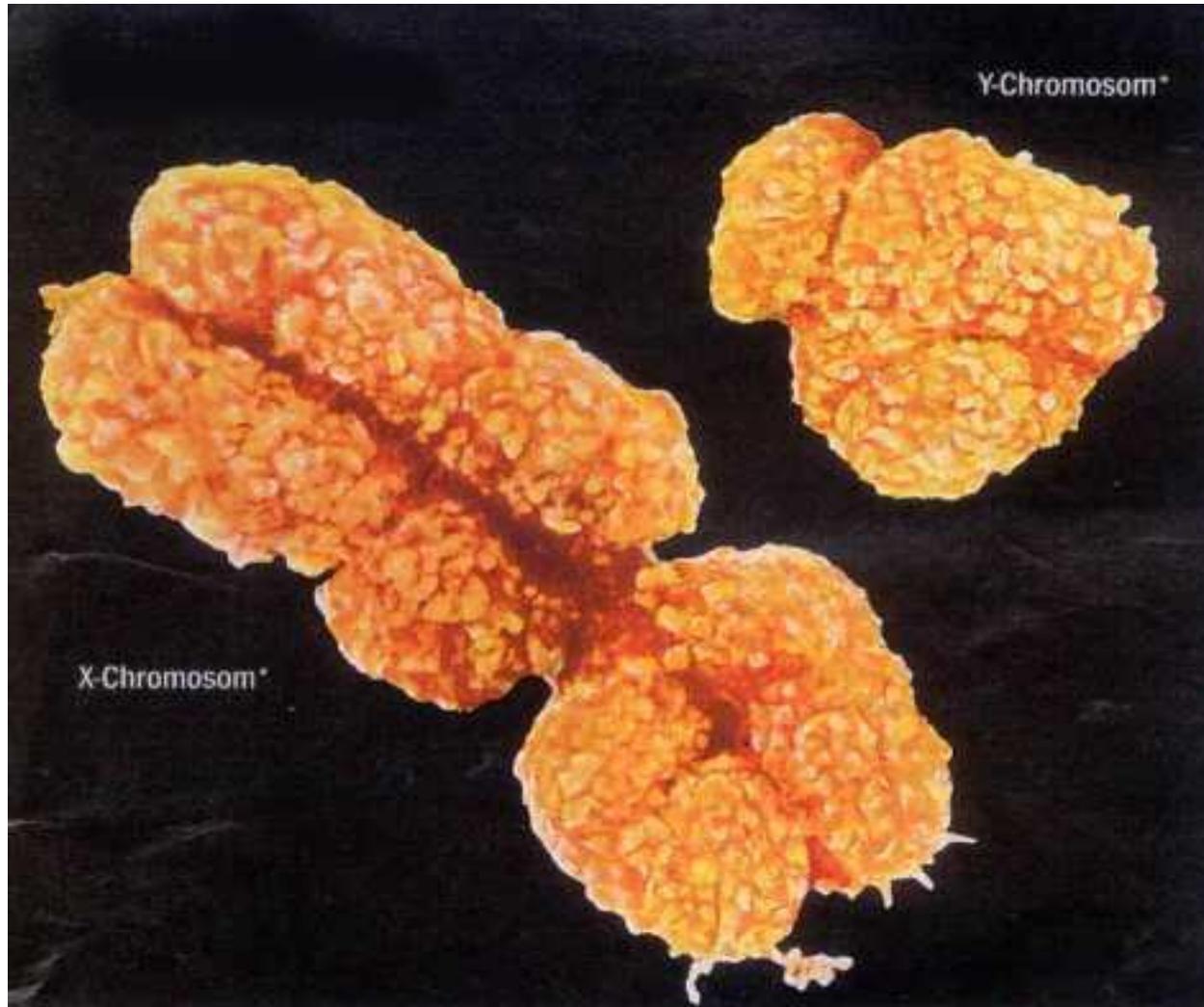
Нуклеосомы плотно упаковываются с помощью негистоновых белков

Нуклеосомы (11 нм)

белковый каркас (остов, скаффолд)

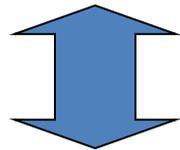


И, наконец, образуются максимально конденсированные метафазные хромосомы

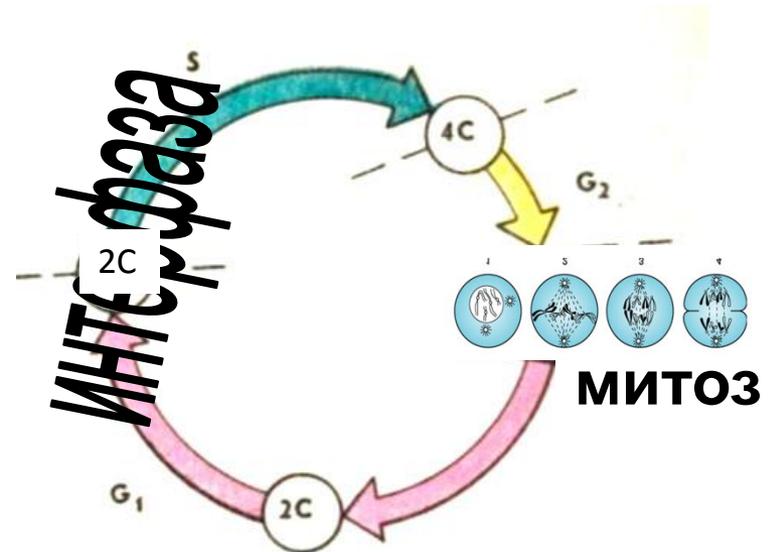


Хромосомы к клетке в зависимости от фазы клеточного цикла бывают:

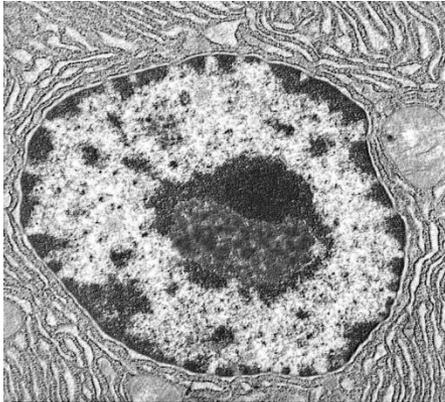
Интерфазные, активные



Митотические, неактивные



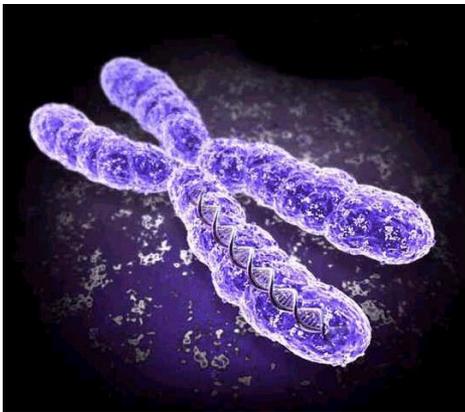
Интерфазные хромосомы – слабо упакованы и
ГОТОВЫ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ (репликации,
транскрипции и др.)



Вид интерфазного
ядра под
микроскопом.
Хромосомы
активны.



Митотические хромосомы – подобны упакованным для переезда вещам



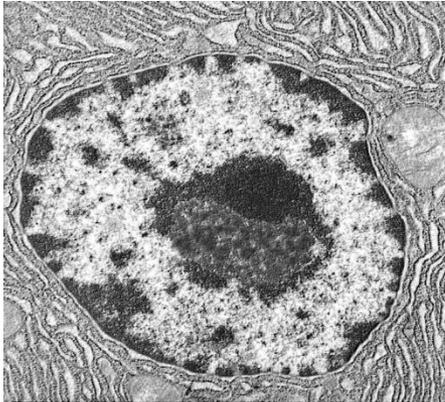
Метафазная
хромосома видна
в микроскоп и
неактивна





Интерфазная хромосома

Интерфазные хромосомы – слабо упакованы и
ГОТОВЫ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ (репликации,
транскрипции и др.)



Вид интерфазного
ядра под
микроскопом.
Хромосомы
активны.



В интерфазе хромосомы расположены в ядре неслучайным образом

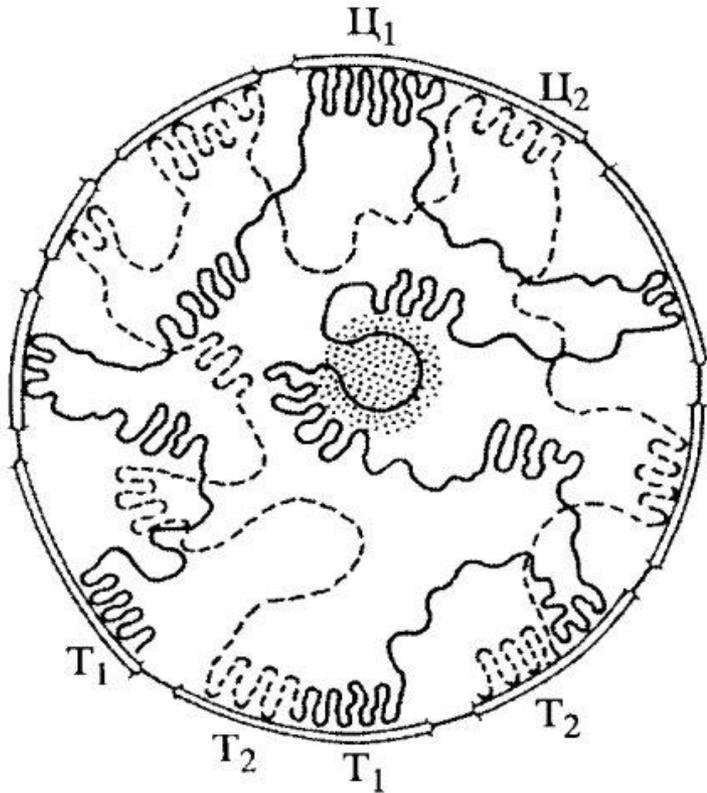
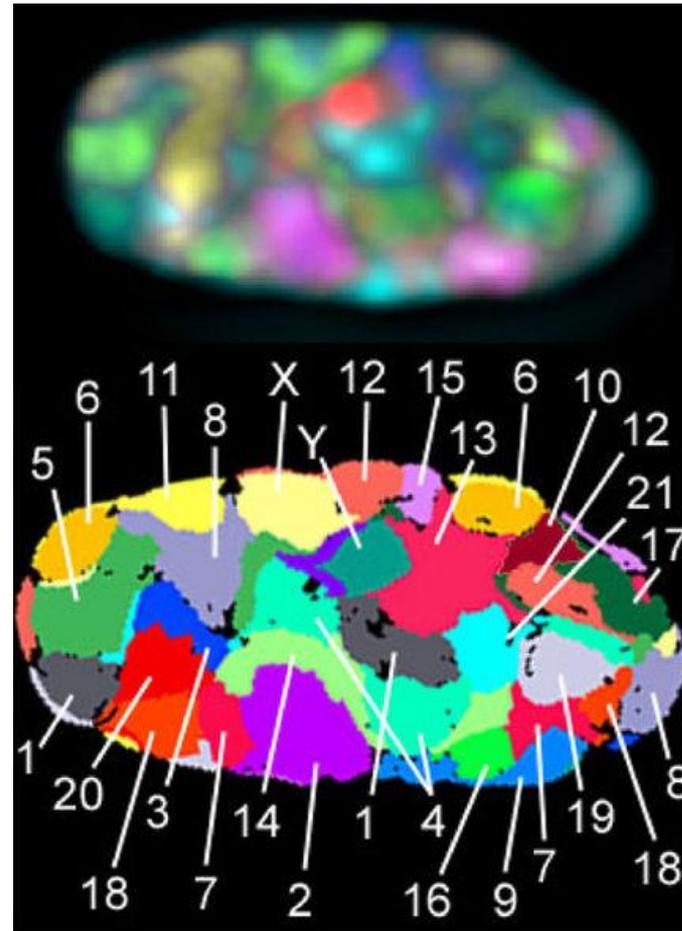


Схема пространственного расположения двух интерфазных хромосом. Ц - центромеры, Т - теломеры.



Хромосомные территории в интерфазном ядре фибробласта человека. FISH - метод

Хроматин – комплекс ДНК и белков (ГИСТОНОВ И НЕ ГИСТОНОВ)

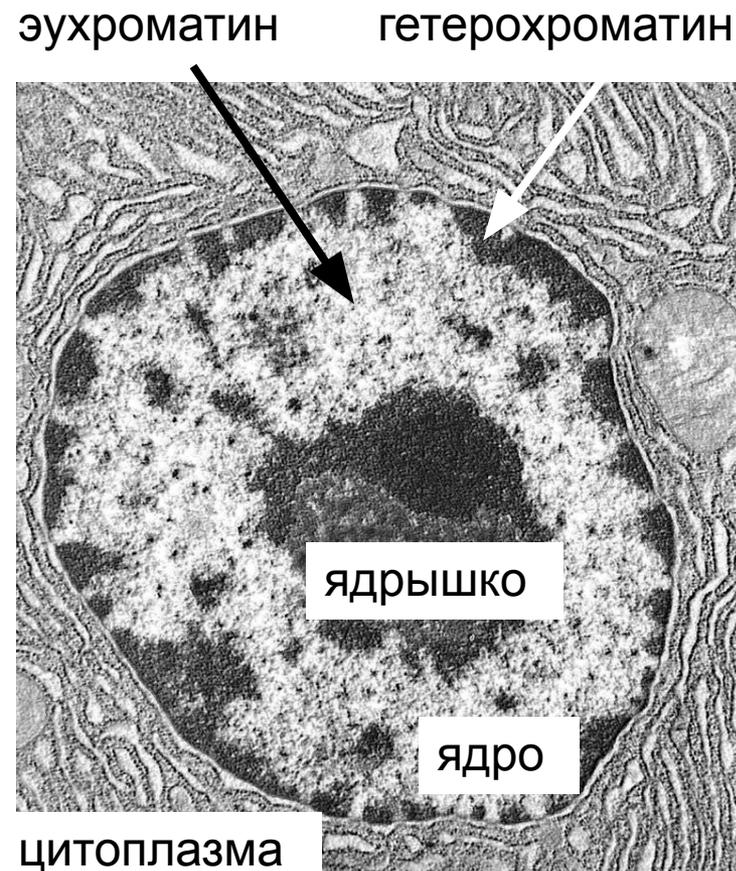
Хроматин

Эухроматин (слабо
конденсированный, активный)

Гетерохроматин
(сильно
конденсированный,
неактивный)

Факультативный
(содержит гены, не
активные в данной
клетке в данное время)

**Конститутивный
(структурный)**
(структурный) не
содержит генов



Конститутивный гетерохроматин не содержит генов и сосредоточен в области

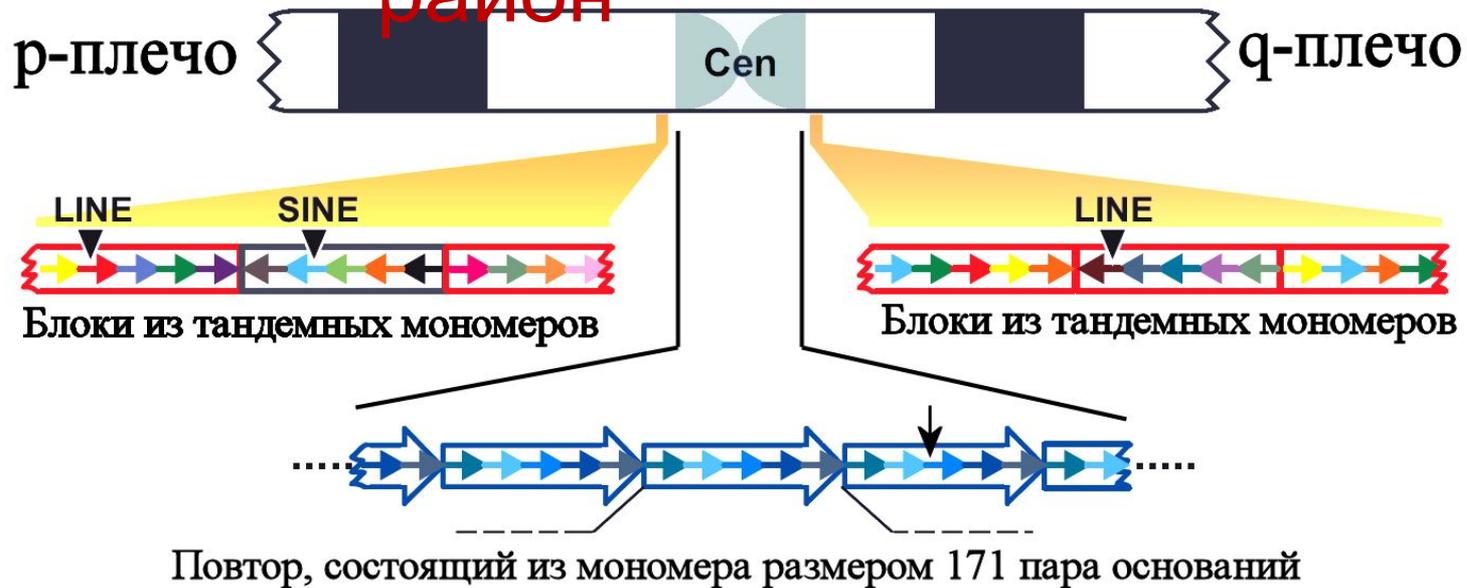


центроммеры и теломеров

Центромера - это структура, обеспечивающая удержание хромосом, правильность выстраивания хромосом в метафазной пластинке и их прикрепление к веретену; участок, ответственный за контроль наступления анафазы

Теломеры – концевые отделы хромосом

Центромерный район

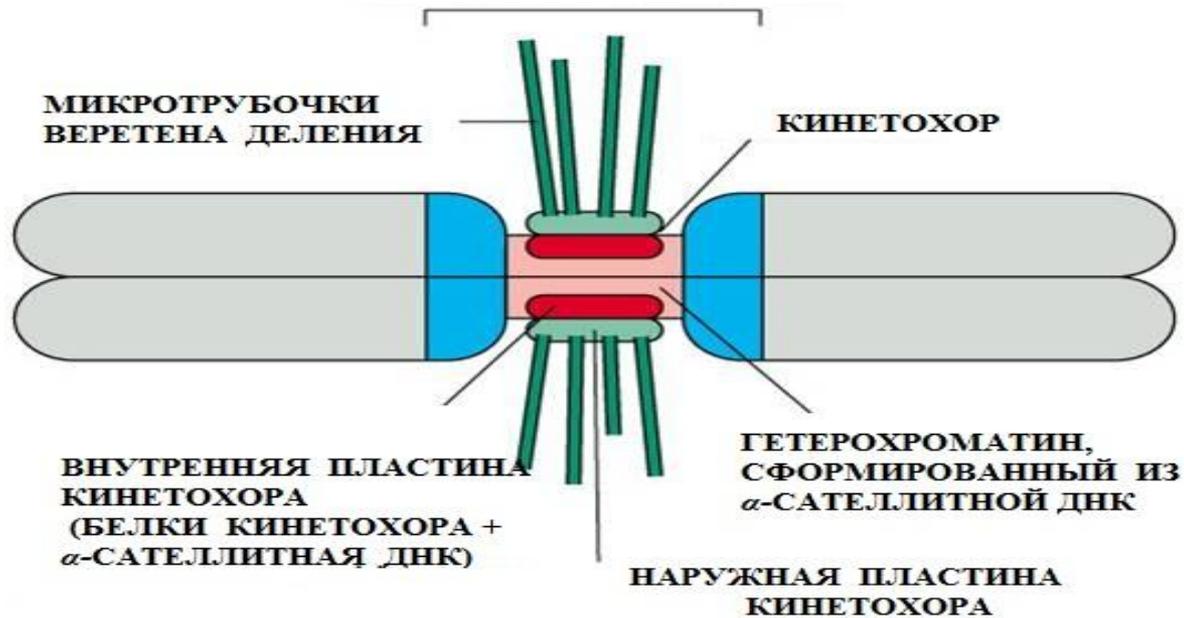


«Центромерная ДНК и ДНК прицентромерного гетерохроматина состоит из альфоидной (альфа-сателлитной) ДНК и ДНК, представляющей собой различные семейства повторов ДНК, легко выявляется с помощью С-бэндинга.» (ISCN,2009)

Строение центromеры

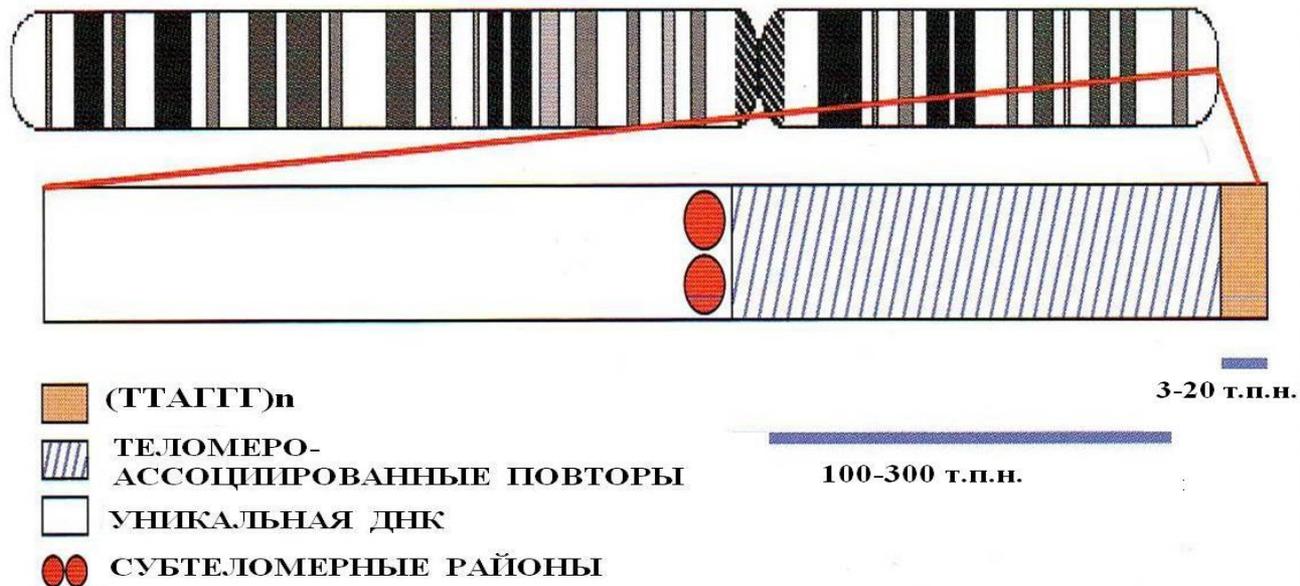


ЦЕНТРОМЕРНЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИН



Строение теломеры

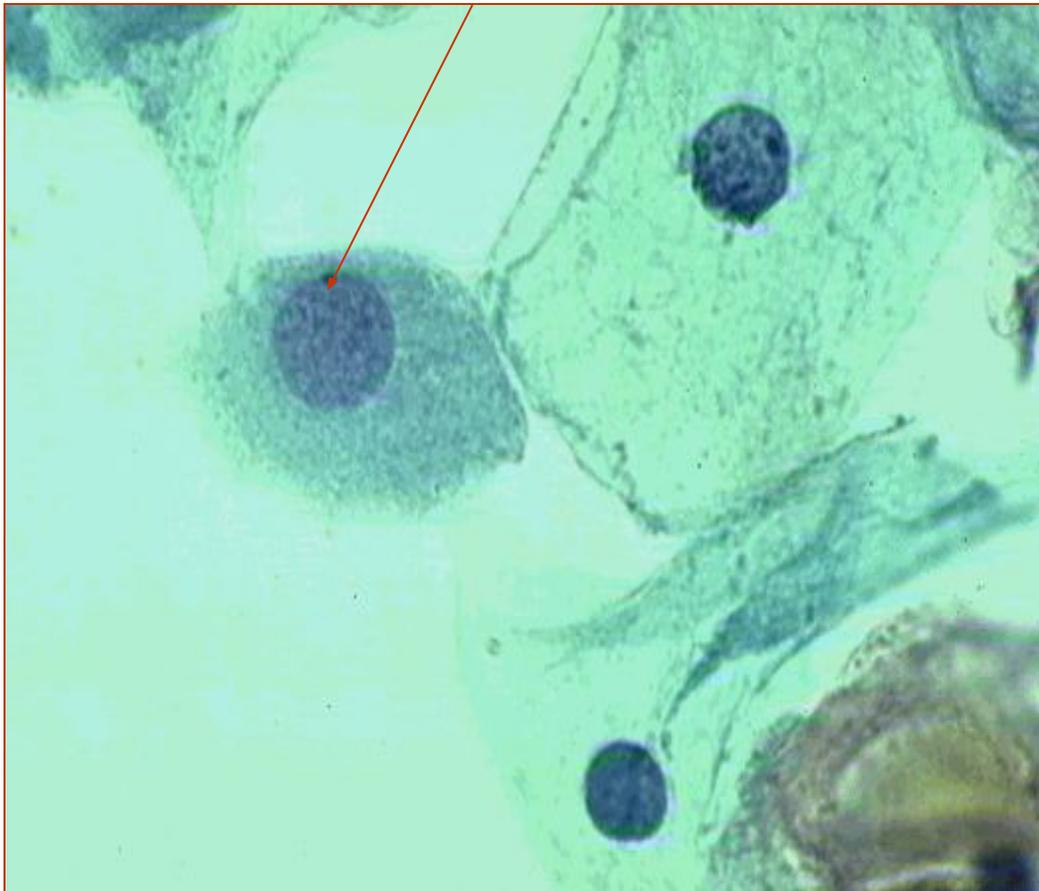
- Теломеры представляют собой в основном двунитевые некодирующие повторы (TTAGGG)_n, заканчивающиеся 3'-однонитевым участком
- Размер двунитевого участка варьирует от 3 до 20 т.п. н., однонитевого – от 100 до 200 пар оснований



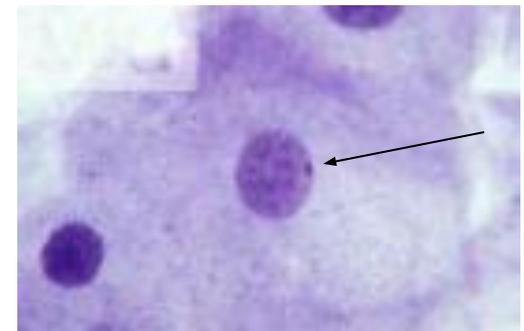
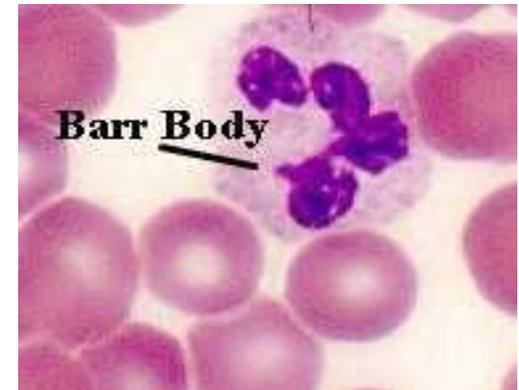
ФАКУЛЬТАТИВНЫЙ

Тельце Барра – пример факультативного гетерохроматина. Его можно видеть в

соматических клетках самок млекопитающих



The Barr body is the condensed, inactive member of a pair of X chromosomes in the cell. The other X is not condensed and is active in transcription.



В выключении X-хромосомы у самок млекопитающих участвует нкРНК

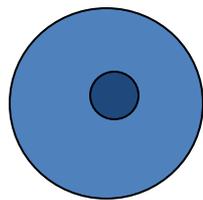
Канадский ученый Барр (1908 – 1995) (и его студент Бертрам) в 1948 году обнаружили в ядрах нервных клеток кошек или X-половой хроматин, позже названный **тельце Барра**.



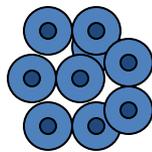
В начале 1960-х годов генетик из Великобритании **Мэри Лайон** выдвинула гипотезу о случайной инактивации X-хромосомы в соматических клетках млекопитающих

Инактивация X-хромосомы у самок млекопитающих

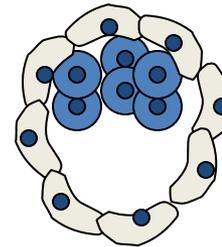
- Это эпигенетический феномен (не определяется генами)
- Начинается на стадии бластулы в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты
 - Происходит под контролем гена **Xist** (X-inactive specific transcript), с которого транскрибируется **длинная нкРНК** (17 000 нуклеотидов).



зигота



морула



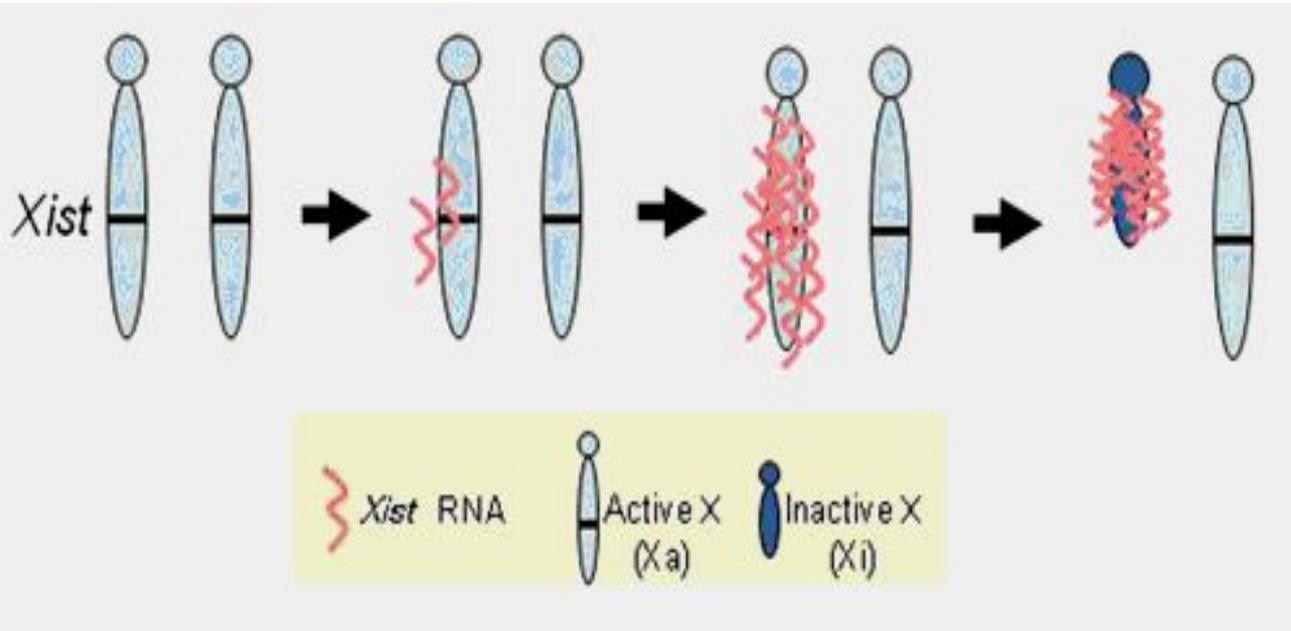
бластоциста



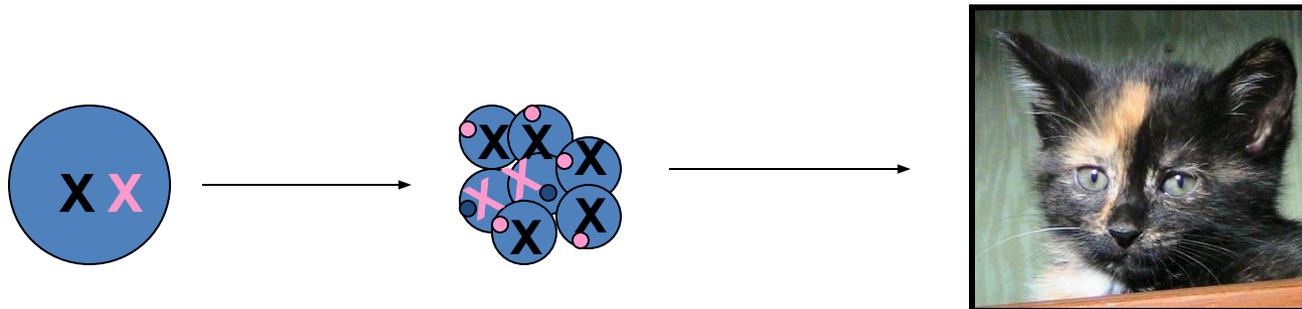
В части клеток активна X от отца, в части от матери

взрослый женский организм - мозаик

Xist РНК окружает ту X хромосому, с которой экспрессируется, и подавляет ее почти всю



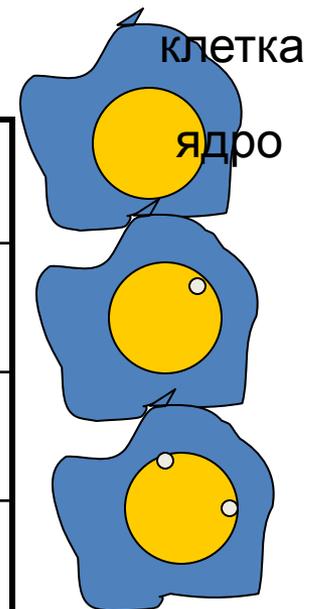
Инактивация – случайный процесс, но раз возникнув, она передается при делении дочерним клеткам.



Исследование X-полового хроматина (тельца Барра).

- У пациента берется соскоб эпителия ротовой полости
- Помещается на предметное стекло
- Окрашивается
- Рассматривается в световой микроскоп
- Дешевый экспресс метод определения числа X хромосом:

ХО или ХУ	Нет тельца Барра
ХХ или ХХУ	1
ХХХ или ХХХУ	2
И так далее	





Митотическая хромосома

Изучение митотических хромосом.



Краткая история цитогенетики

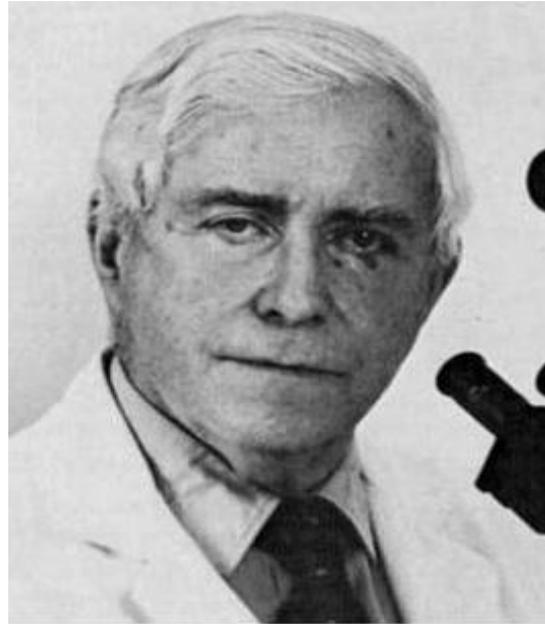
«запоздалое, но счастливое рождение»

- До 50-х годов XX века хромосомы человека исследовались, но их число оставалось неясным.
- 1956 г. Тибо, Леван и др. установили, что у человека 46 хромосом
- 1959 г. Открыты хромосомные причины синдромов Дауна, Клайнфелтера, Шерешевского-Тернера
- 1960 – 63 гг. Описаны синдромы Патау и Эдвардса, Филадельфийская хромосома, синдром кошачьего крика» и др.
- 1968 - 70 гг. Методы дифференциального окрашивания.
- 1980 - 90 годы – появление FISH –метода.
- 2000 и далее – активное внедрение компьютерных методов анализа хромосом

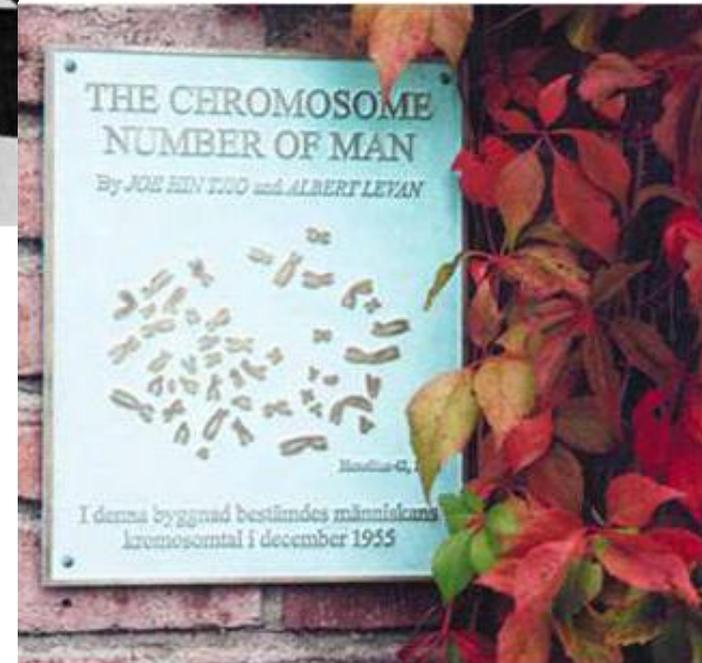
Определение числа хромосом человека (1956 г.)



J-H. Tjio (1919–2001)



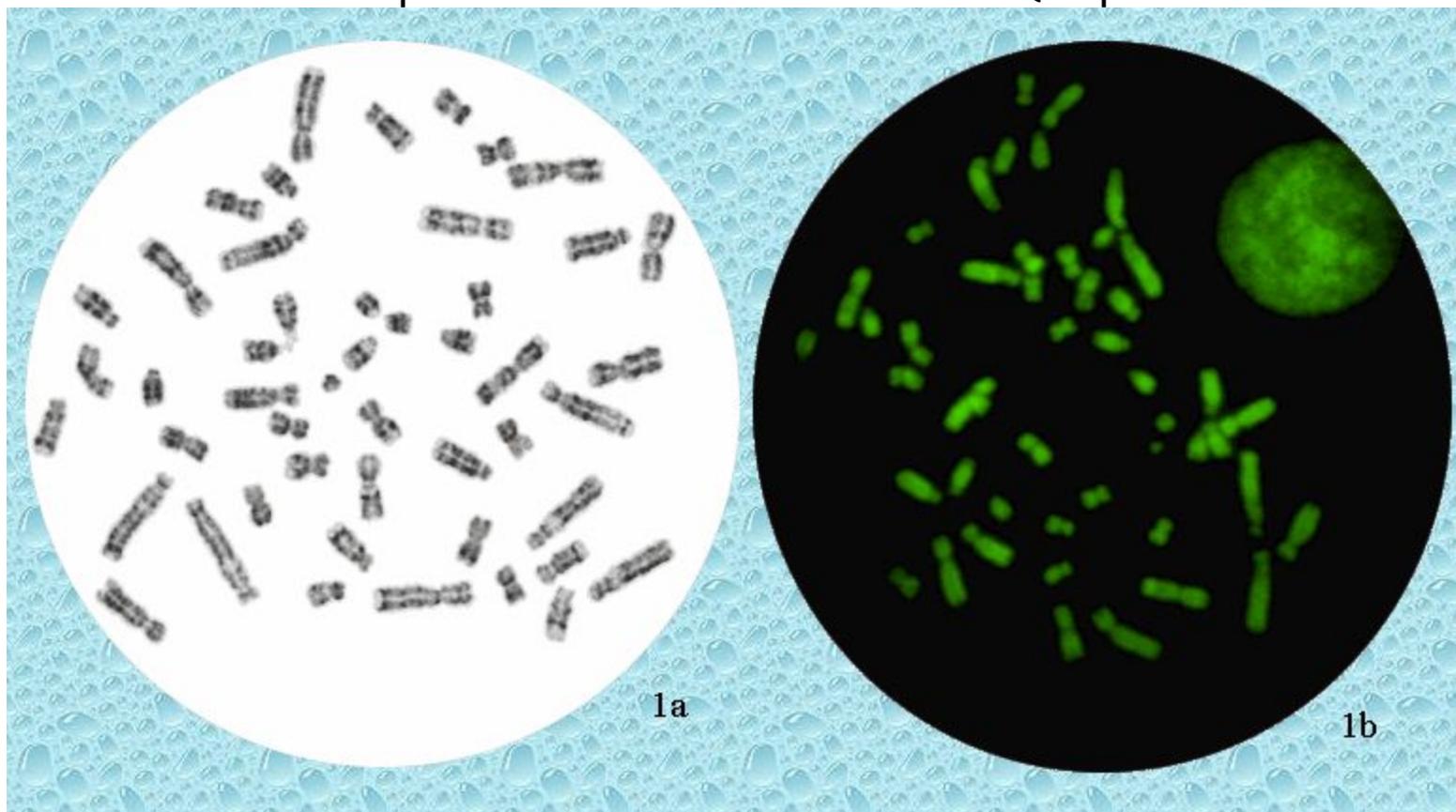
A. Levan (1905–1998).



Т. Касперсон и другие – методы дифференциальной окраски хромосом (1968 – 70гг.)

G-окраска

Q-окраска



FISH- этап – внедрение и широкое использование молекулярно-цитогенетических методов (с 1986 г.)

- 1986 г . - первые молекулярно-цитогенетические эксперименты на хромосомах человека – FISH-метод (*fluorescent in situ hybridization*)



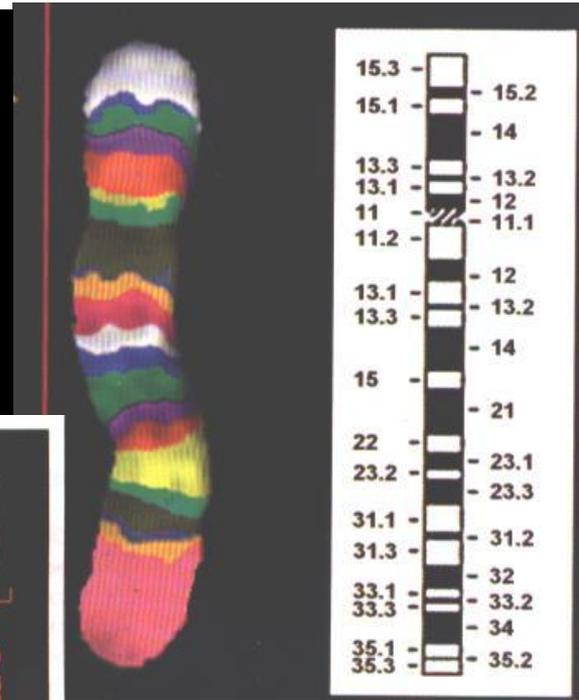
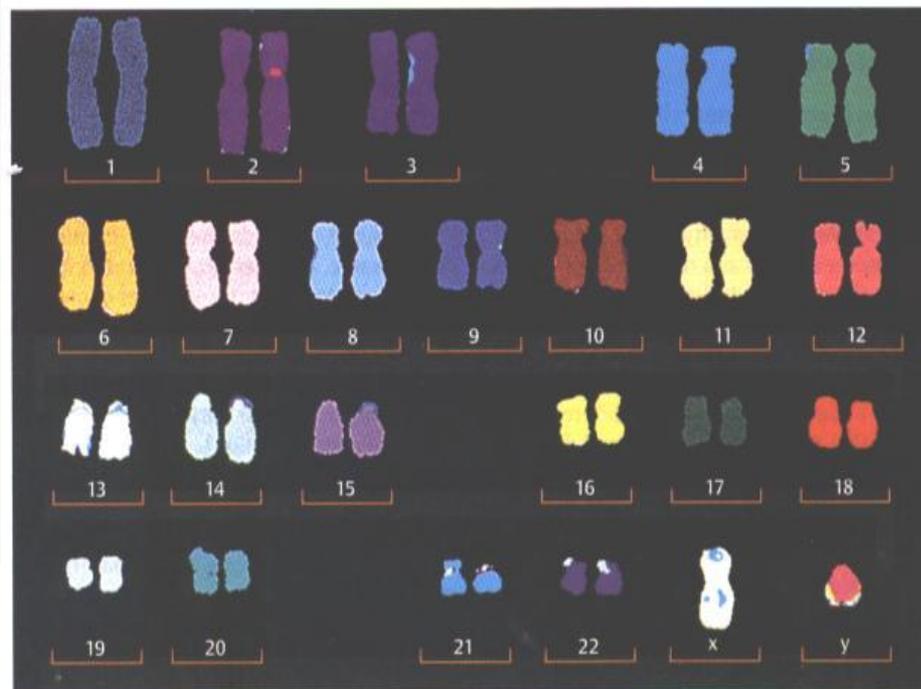
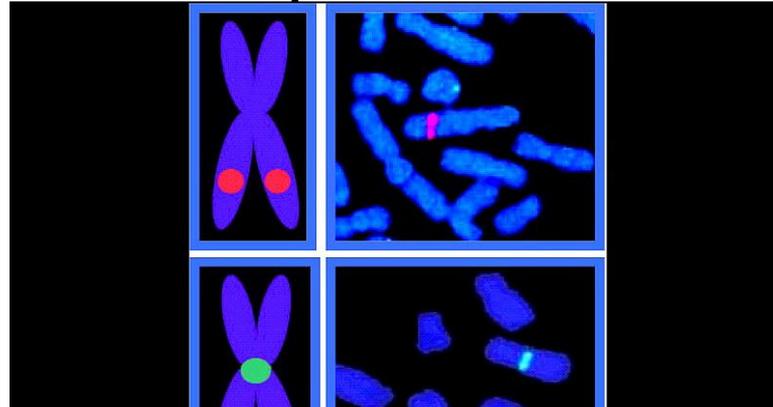
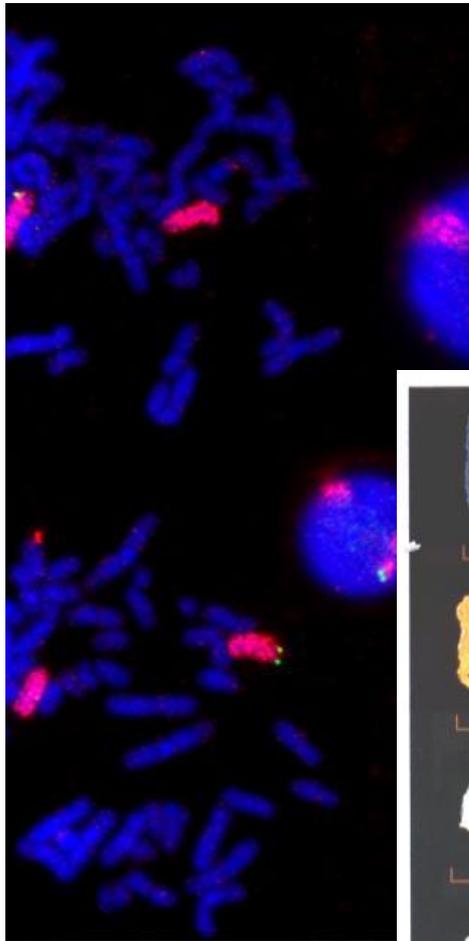
D. Pinkel

- 1992 г. - разработка метода сравнительной геномной гибридизации (CGH)



A. Kallioniemi

Существуют разные варианты FISH метода как для метафазных, так и для интерфазных хромосом.



Отечественные цитогенетики

Г.А. Левитский (1878-1942) - ввел термин «кариотип» в современном его понимании. Автор одного из первых в мире учебников по цитогенетике

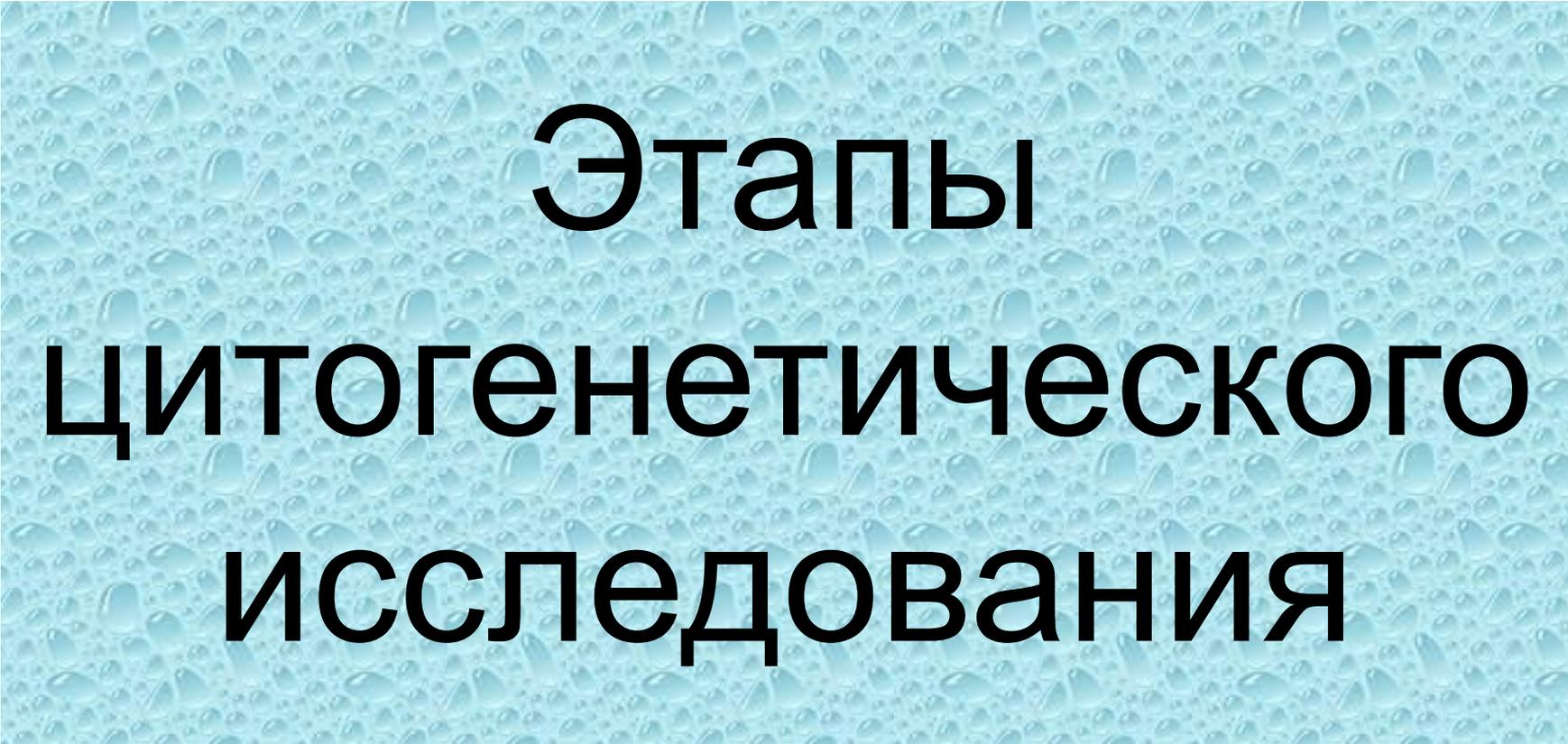
М.С. Навашин (1896—1973) - автор исследований по морфологии клеточного ядра, индивидуальной изменчивости хромосом в эволюционном аспекте, цитологии отдаленных гибридов. Разделил хромосомы на акро-, тело- и метацентрические.

А.Г. Андрус (совместно с М.С. Навашиным) –впервые в мире провели анализ тонкого морфологического строения десяти наиболее крупных хромосом человека. Автор книги «Введение в кариологию человека» (1934 г.)

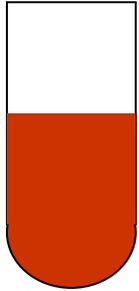
П.И. Живаго (1883-1948) - Основные работы по изучению тонкого строения клеточного ядра. Обнаружил оптическую гетерогенность интерфазных ядер; исследовал строение и функцию ядрышка и показал его большую роль в обменных процессах клетки.

«Если бы эти лаборатории в СССР продолжали работать, то большинство открытий по кариотипу человека, сделанных в течение последних девяти лет, могли бы появиться на двадцать лет раньше».

С. Пенроуз,
Президент III Международного
конгресса по генетике человека,
Чикаго, 1966 г.



Этапы цитогенетического исследования



Кровь (или другой материал: костный мозг, околоплодная жидкость и др.)

Отделение лейкоцитов

Добавление стимулятора митоза – **ФГА** (фитогемагглютинаина)

72 часа при 37С

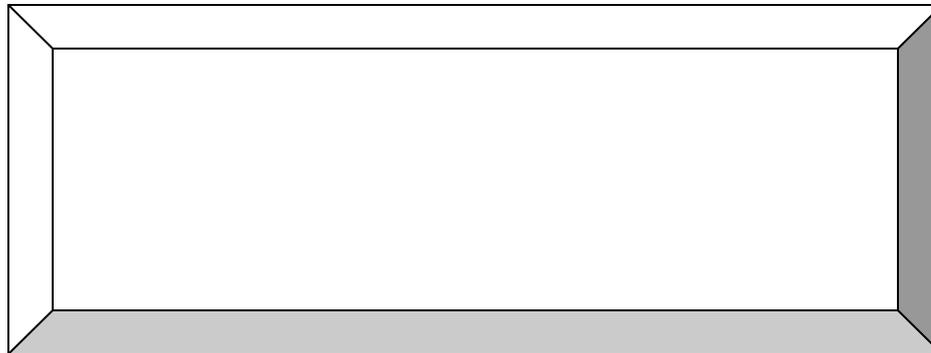
Добавление **колхицина** – блокада микротрубочек веретена деления

Деление лимфоцитов тормозится на стадии метафазы

Добавление **гипотонического раствора** – клетки разбухают.
Фиксация.

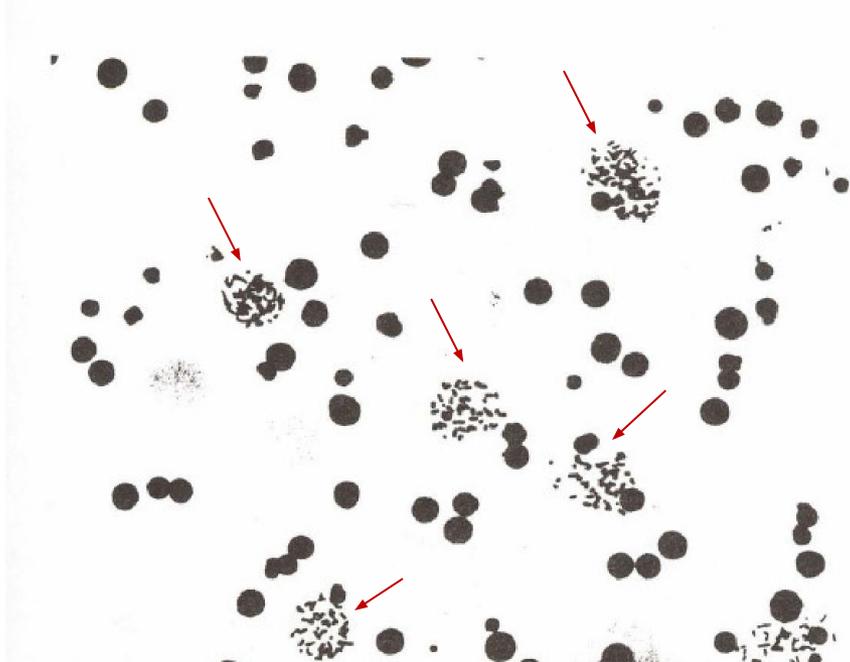


при раскапывании от удара о стекло хромосомы разлетаются в стороны – образуется метафазная пластинка



Затем препарат окрашивают

На стекле хромосомы образуют метафазные пластинки



Увеличение
10x10

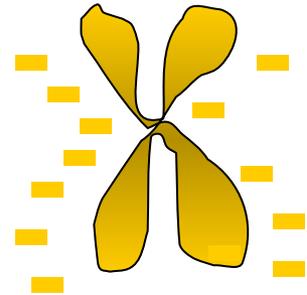
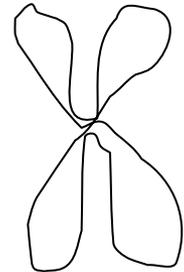
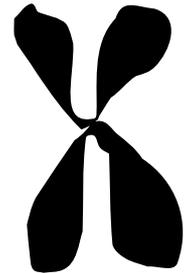


Увеличение
10x100

Сплошное (рутинное)
окрашивание

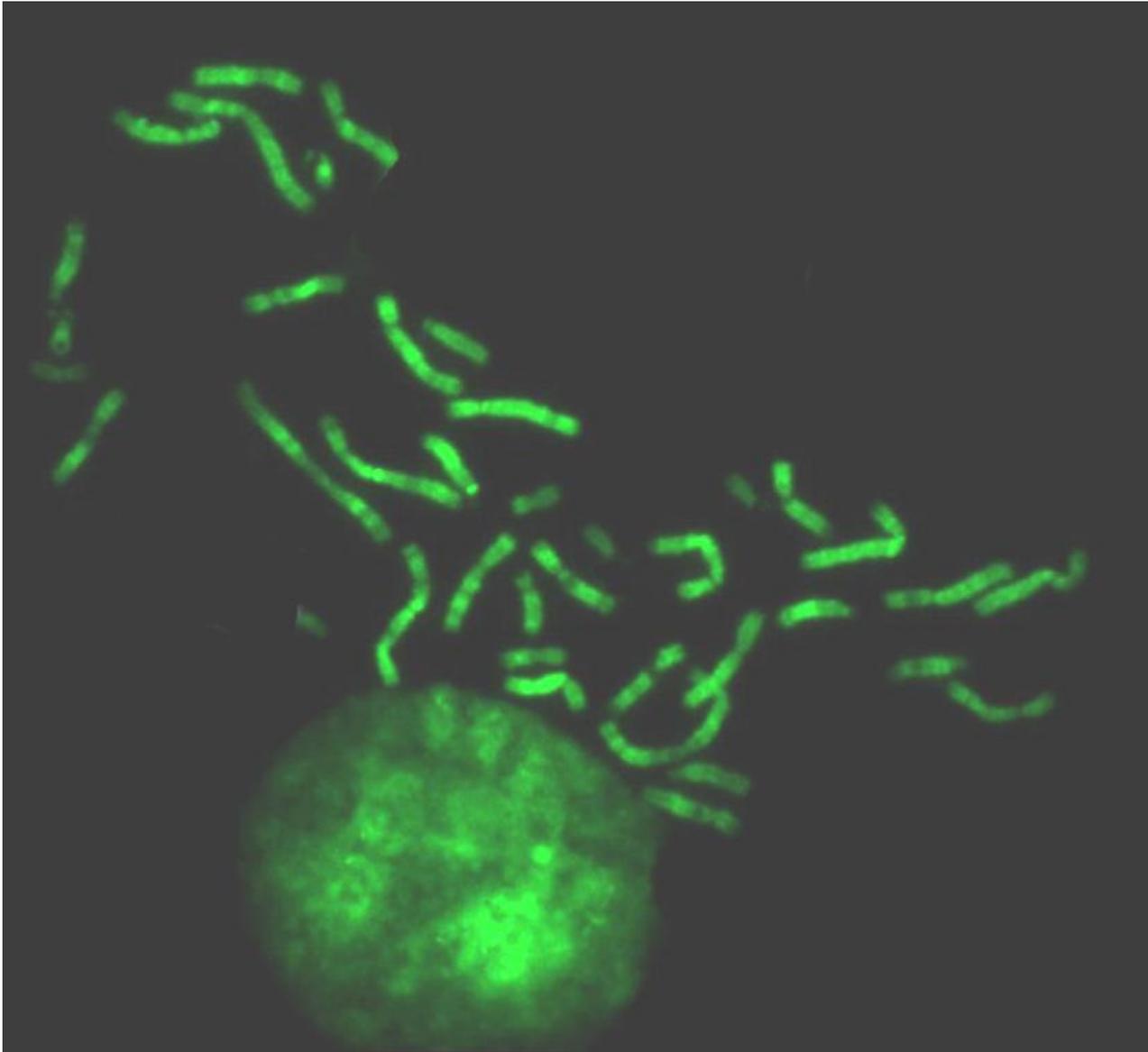
Виды окраски хромосом

- **Рутинная**, появилась в 50-х годах XX века. (Денверская классификация поделила все хромосомы человека на 7 групп по размеру и форме)
- **Дифференциальная**, появилась в конце 60-х годов (G, R, Q и C методы). Парижская конференция закрепила за каждой хромосомой номер, ввела обозначения для мутаций.
- **FISH** – метод (метод флуоресцентной гибридизации in situ), был разработан в 90-х годах и дал еще больше возможностей для диагностики.





G –окраска,
самая
распространенная
окраска,
выявляются
полосы - бэнды



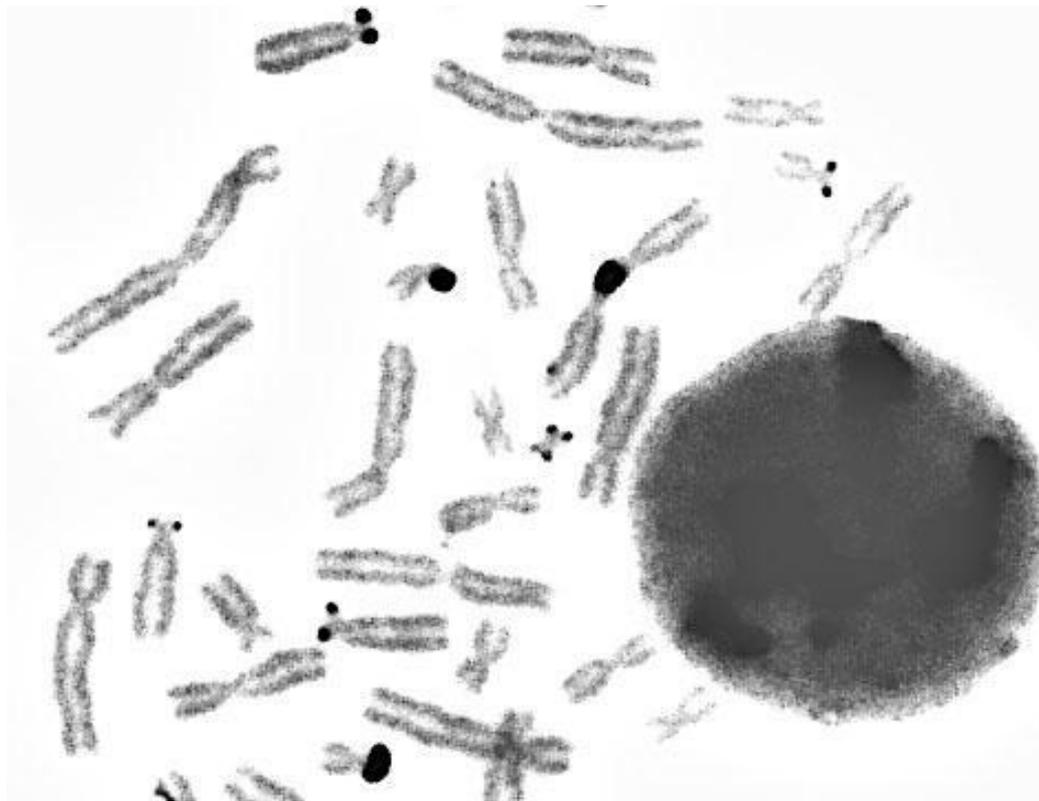
**Q –
окраска**
выявляет те
же бэнды, что
и G окраска.



С –окраска

ВЫЯВЛЯЕТ
КОНСТИТУТИВНЫ
Й
ГЕТЕРОХРОМАТИ
Н

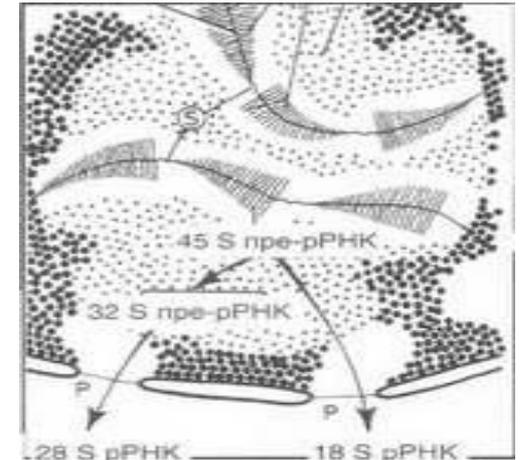
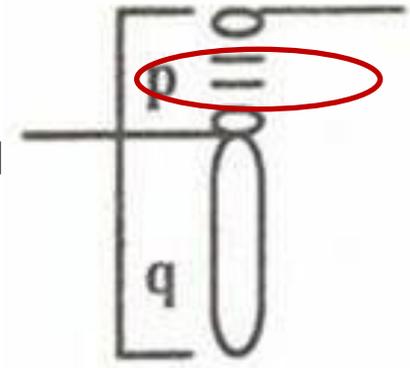
Окраска азотнокислым серебром
выявляет ядрышко-образующие районы
хромосом



Ядрышко-образующие районы хромосом

- Ядрышко-образующие районы хромосом (ЯОР) локализованы в коротких плечах акроцентрических хромосом человека 13, 14, 15, 21 и 22. На препаратах метафазных хромосом активные ЯО-районы выявляются как вторичные перетяжки и окрашиваются азотнокислым серебром

В этих районах расположены гены рибосомной РНК собраны в большие кластеры, содержащие около 40 копий каждого гена. Всего у человека таких кластеров 10. У разных индивидов число копий рибосомных генов варьирует от 300 до 700



FISH -метод – Fluorescent **in situ** hybridization, используются разноцветные красители, а затем компьютер присваивает хромосомам условные цвета

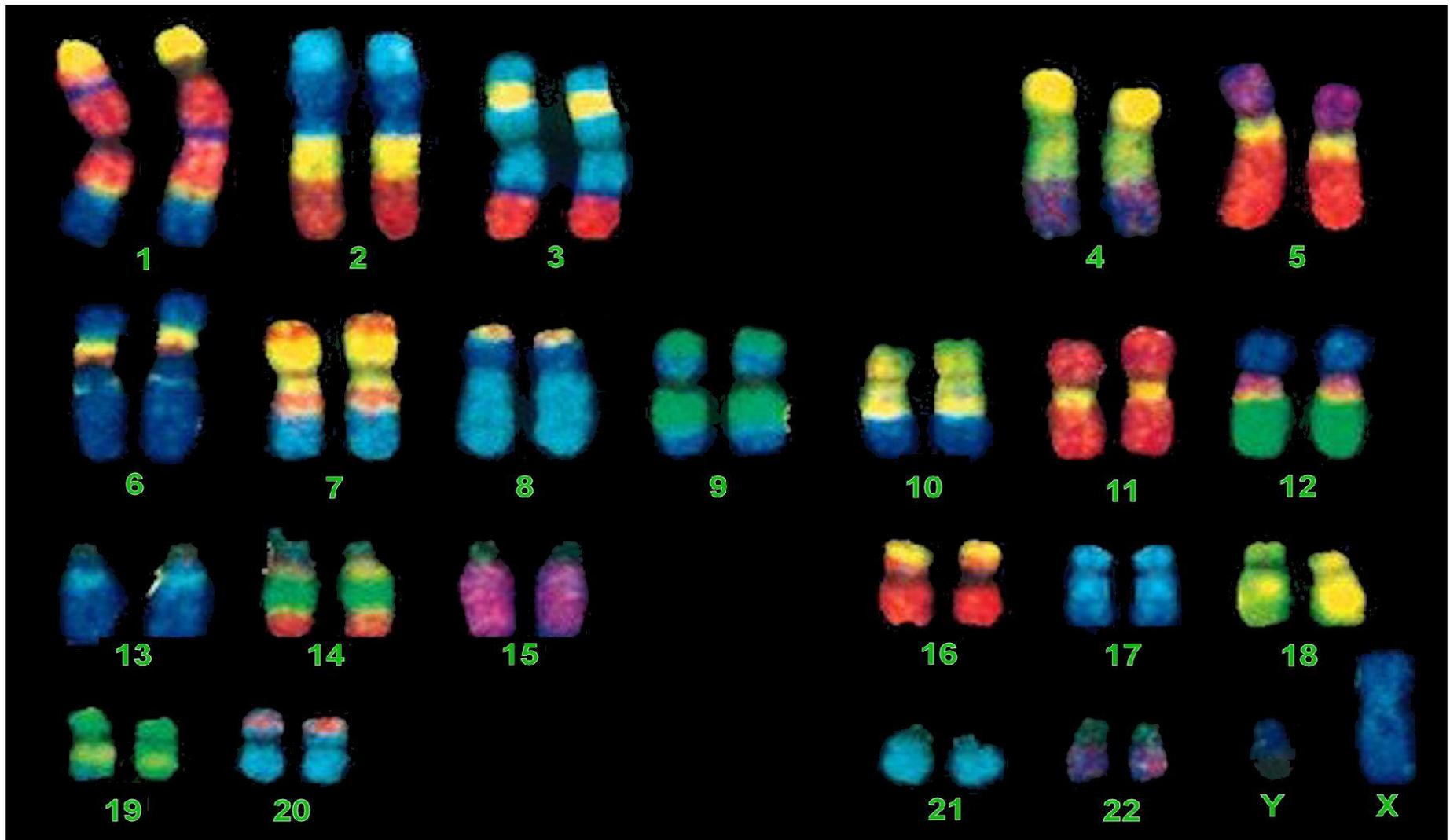
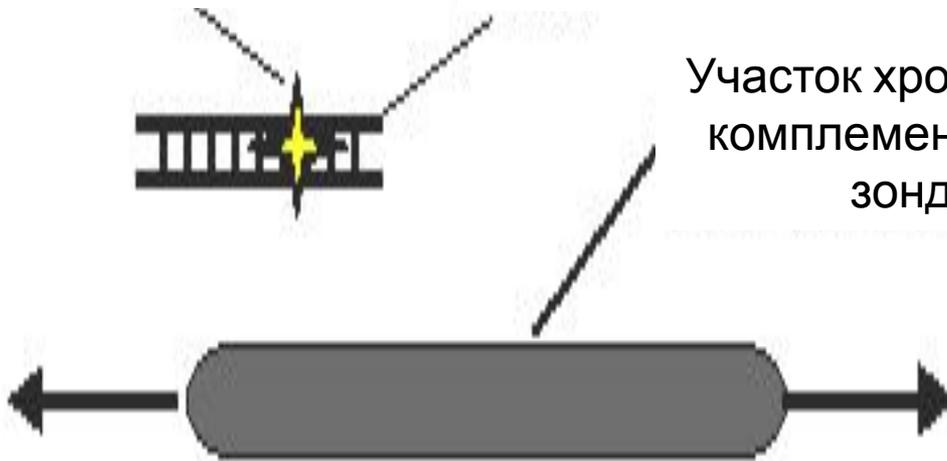


Схема FISH-метода

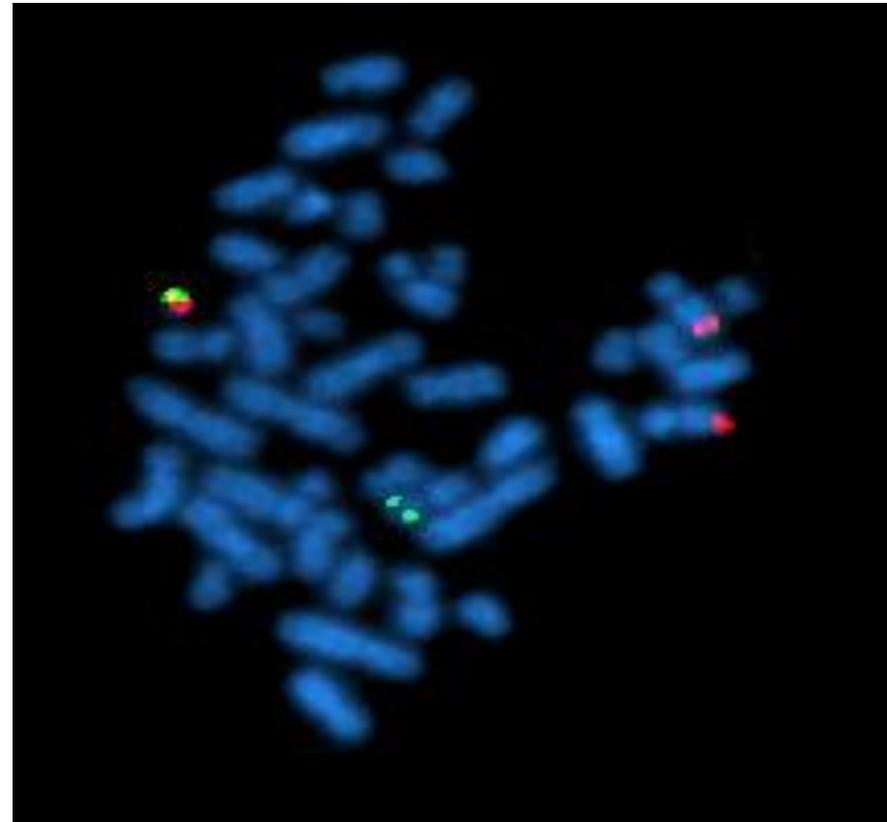
Флуоресцентная
метка

ДНК-зонд

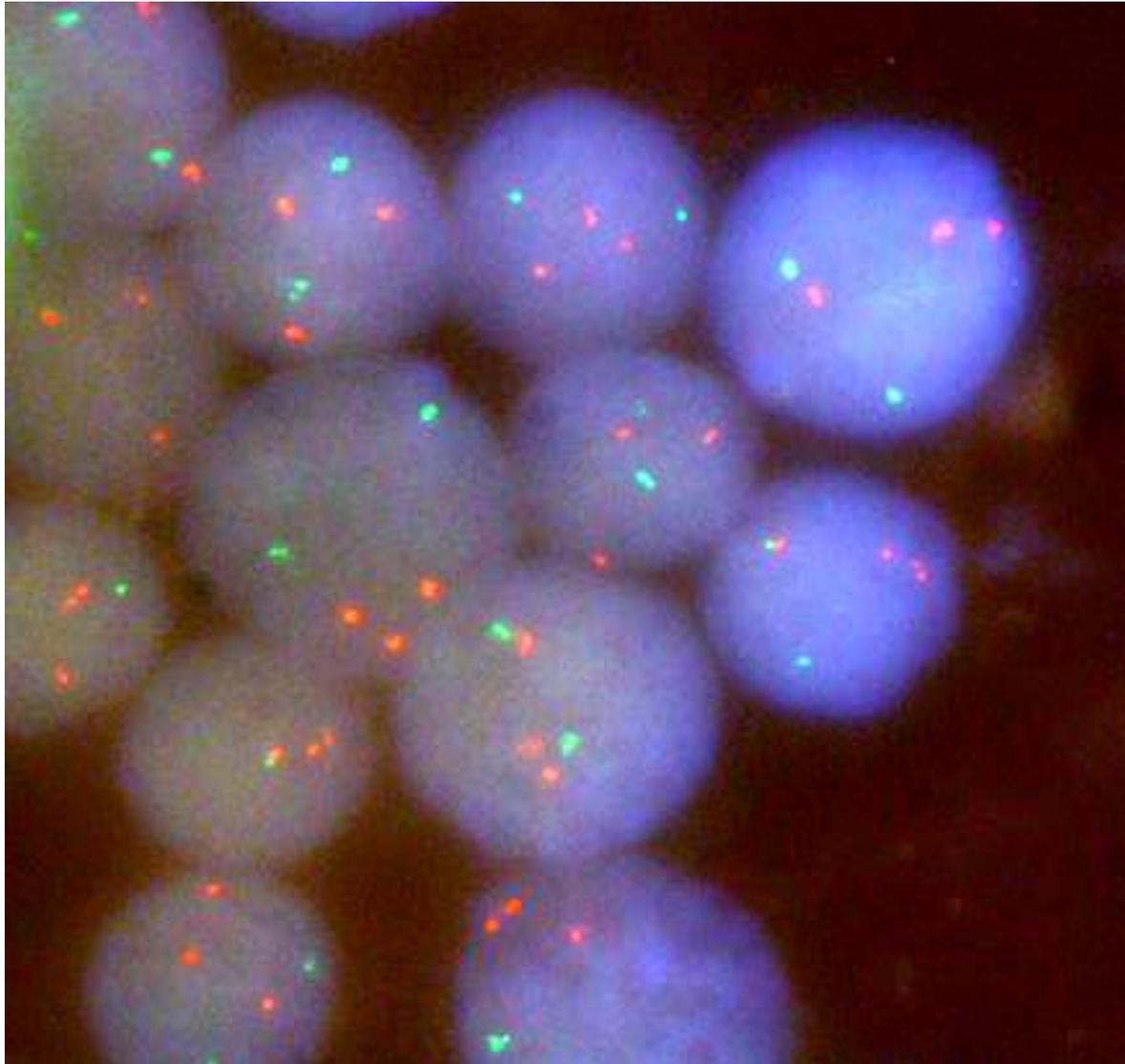
Участок хромосомы,
комплементарный
зонду

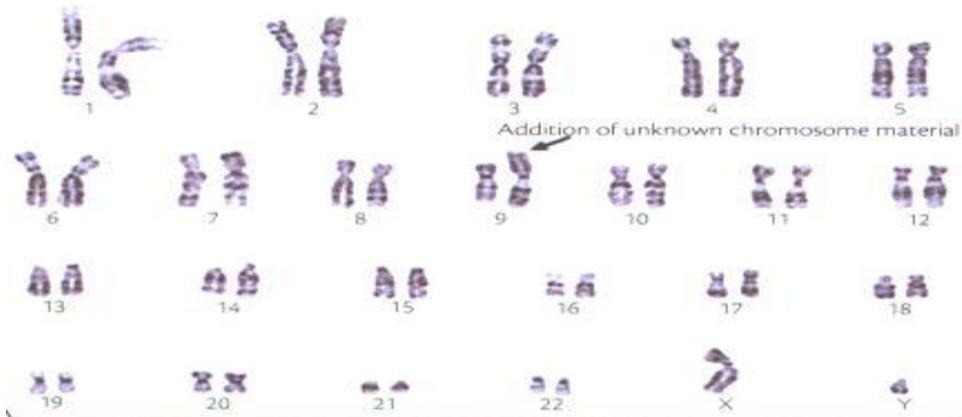


Метафазные хромосомы с меткой,
здесь использовали 2
флуоресцентных красителя

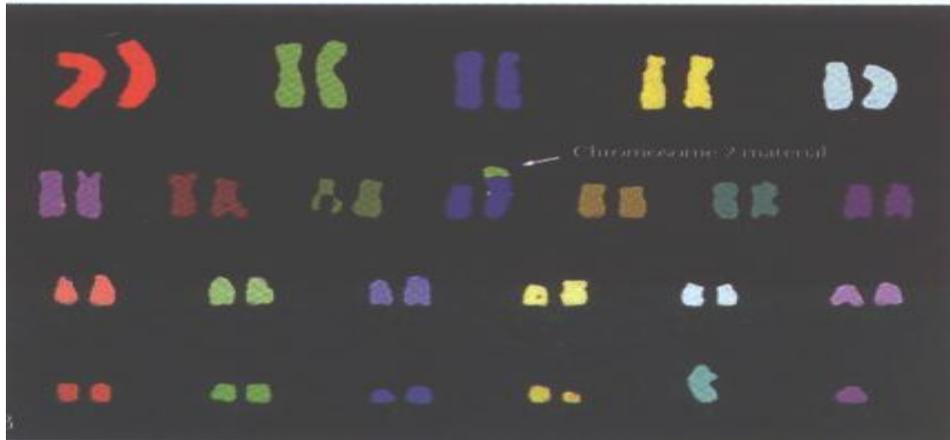


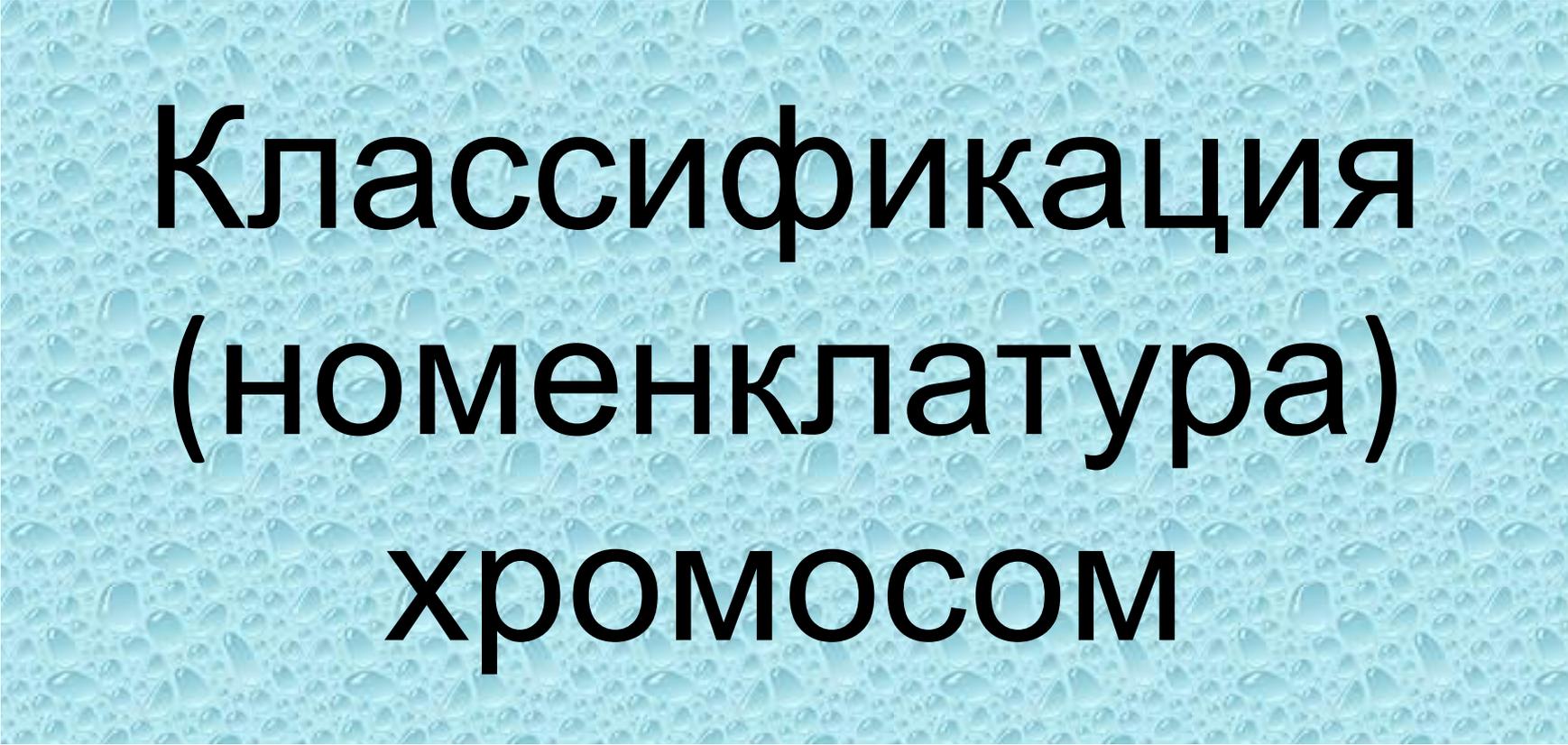
Может использоваться как для делящихся,
так и неделящихся клеток





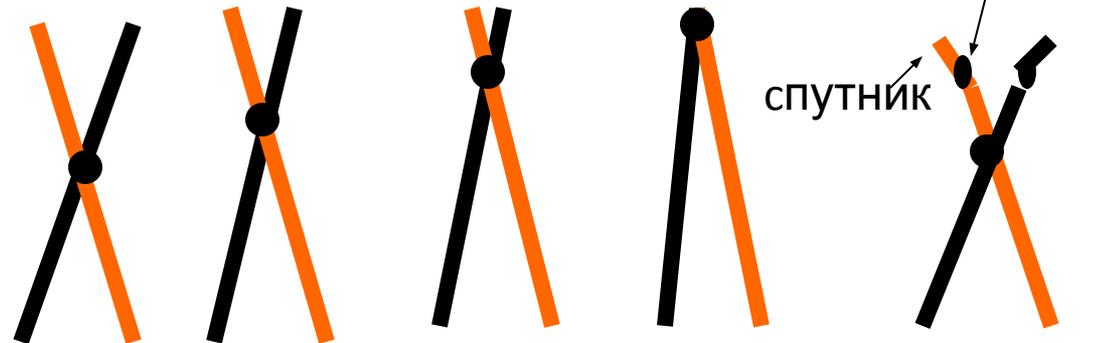
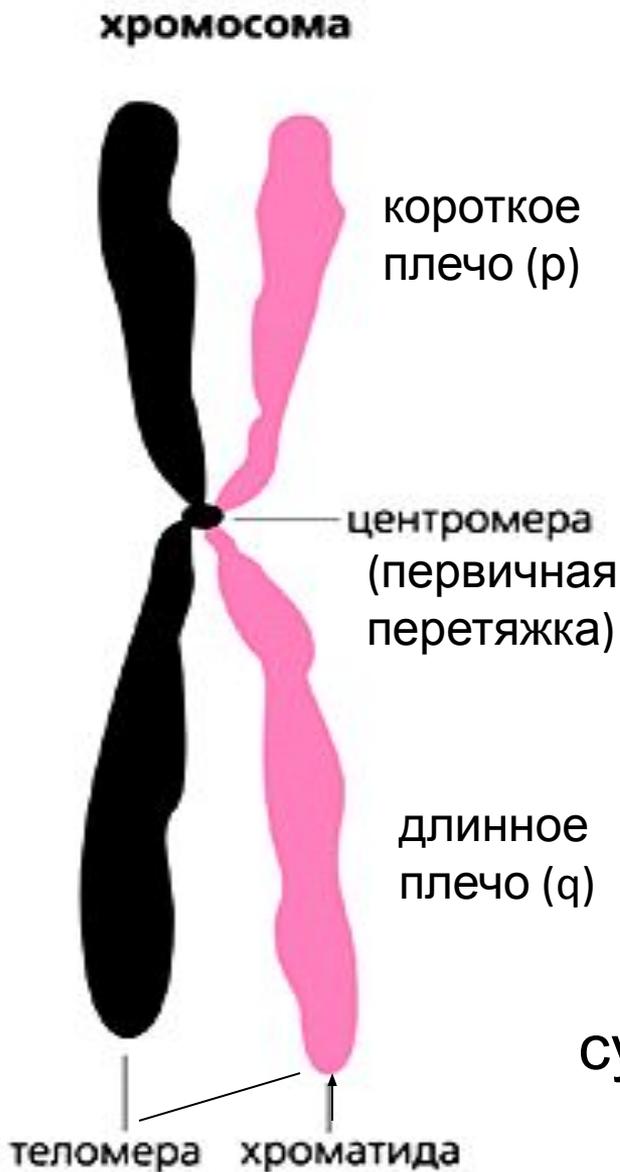
FISH-метод
позволяет лучше
распознавать
хромосомные
перестройки, чем
одноцветная
окраска





**Классификация
(номенклатура)
хромосом**

Виды метафазных хромосом согласно Денверской классификации



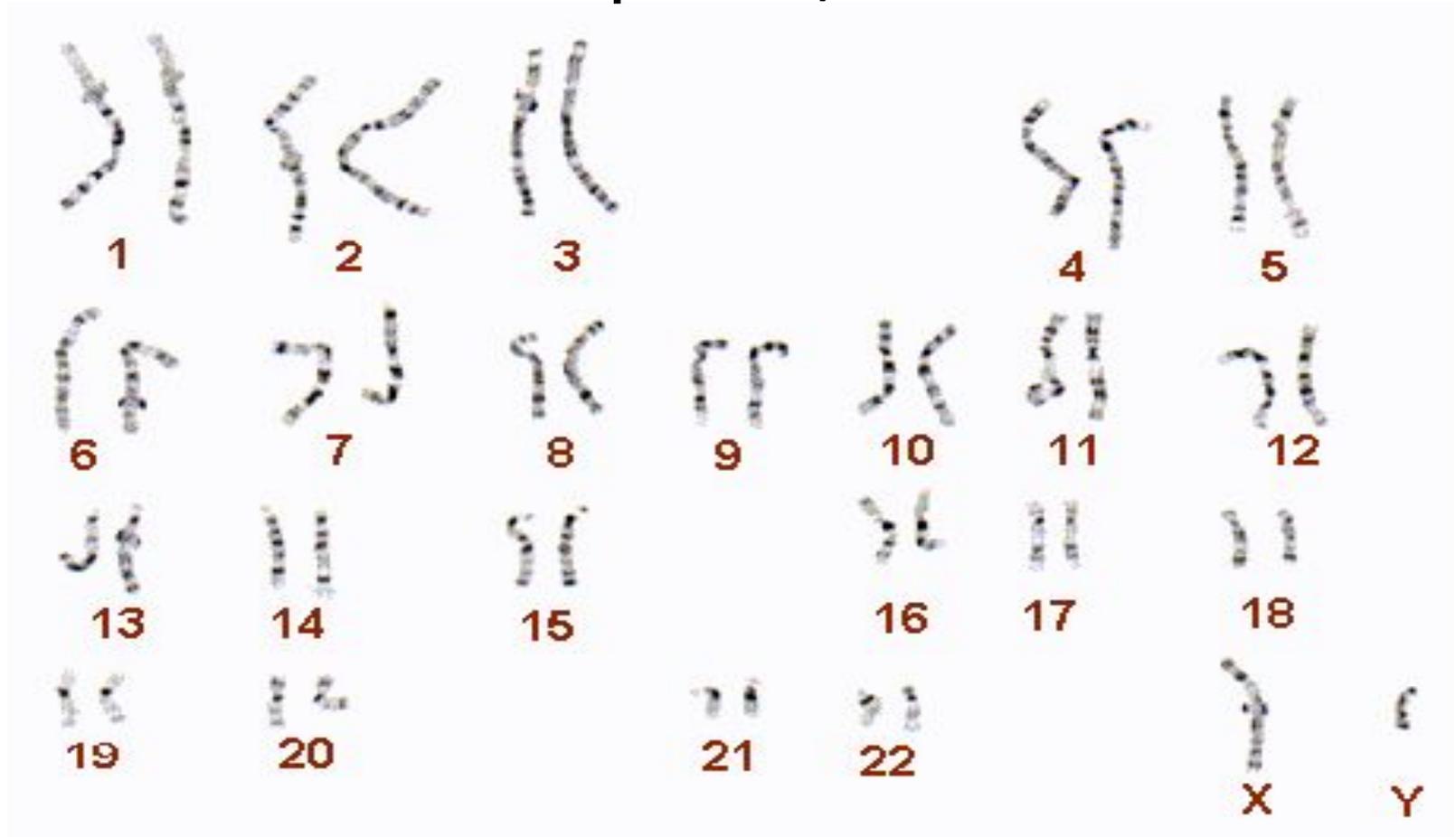
Метацентрическая, субметацентрическая, акроцентрическая, телоцентрическая*, со спутником

*По современным представлениям телоцентрических хромосом не существует. Всегда есть маленькое, но плечо

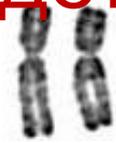
Хромосомы человека по **Денверской классификации** делят на 7 групп

<u>Группа</u>	<u>Хромосомы</u>	<u>Описание</u>
A	1–3	Большие, метацентрические
B	4,5	Большие, субметацентрические
C	6–12, X	Среднего размера; субметацентрические
D	13–15	Среднего размера; акроцентрические, со спутниками
E	16–18	Маленькие; 16 хромосома - метацентрическая, хромосомы 17 и 18 - субметацентрические
F	19,20	Маленькие; метацентрические
G	21,22, Y	Маленькие; акроцентрические, со спутниками Маленькая; акроцентрическая, без спутников

Парижская классификация дополняет
Денверскую и основана на
дифференциальной окраске (чаще всего G-
окраска)



На слабо конденсированных
(прометафазных) хромосомах можно
видеть больше бэндов



300 бэндов



550 бэндов



1



2



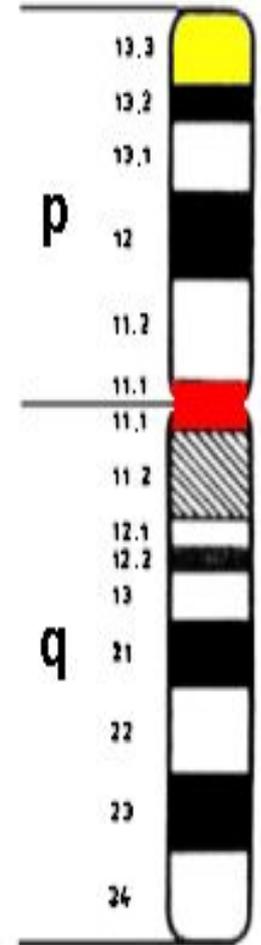
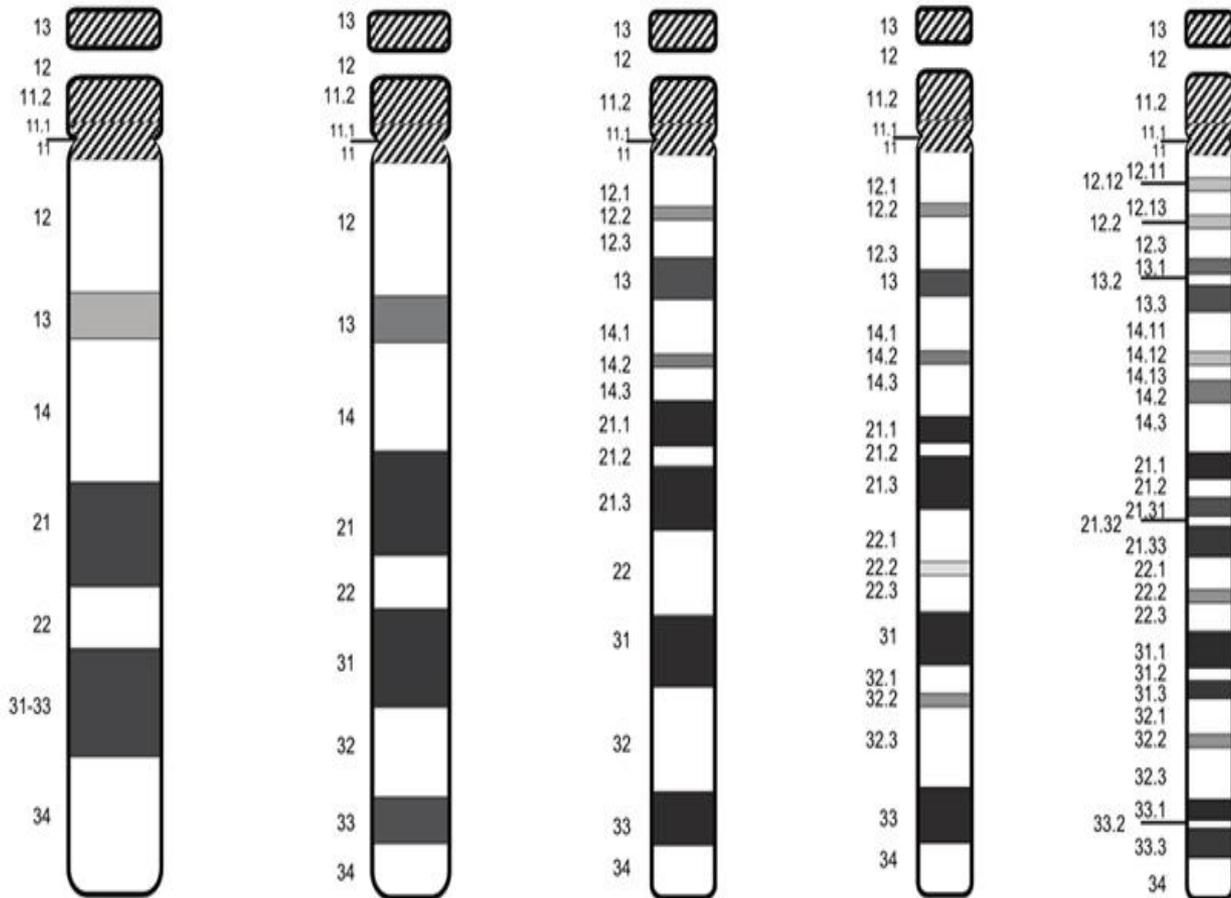
3

700-бэндов

Плечи делят на районы (бэнды) и

суббэнды

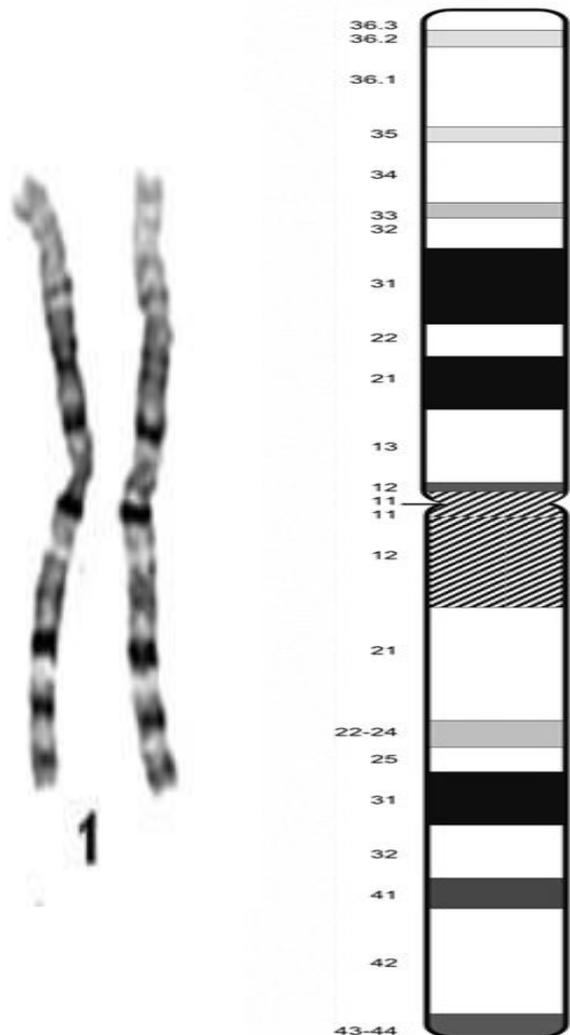
Нумерация бэндов идет от центромеры к теломерам



1p31 - первый бэнд, локализованный в третьем районе короткого плеча

ОМОСОМЫ 1.

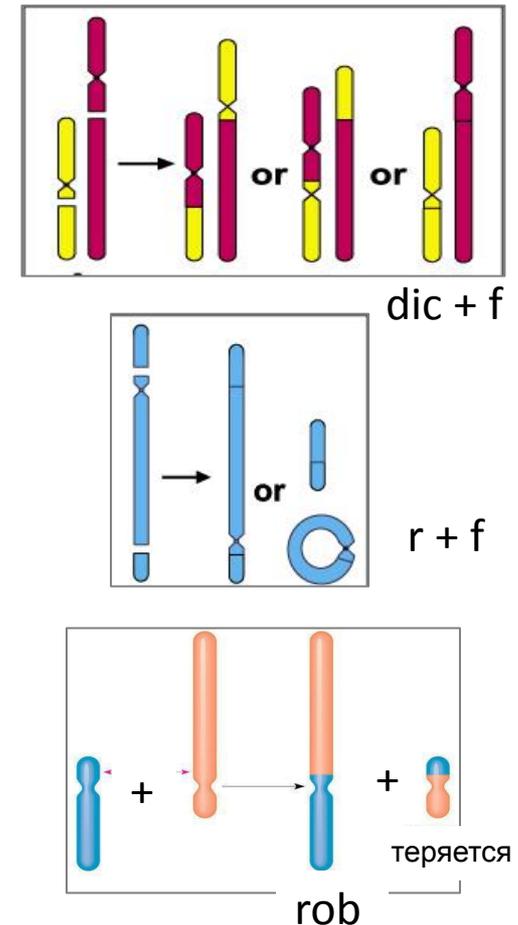
- первая цифра - номер хромосомы, в которой локализован данный бэнд;
- второй символ (p или q) - плечо хромосомы;
- третий символ – номер района, в состав которого входит бэнд;
- четвертый символ – номер бэнда в составе района.



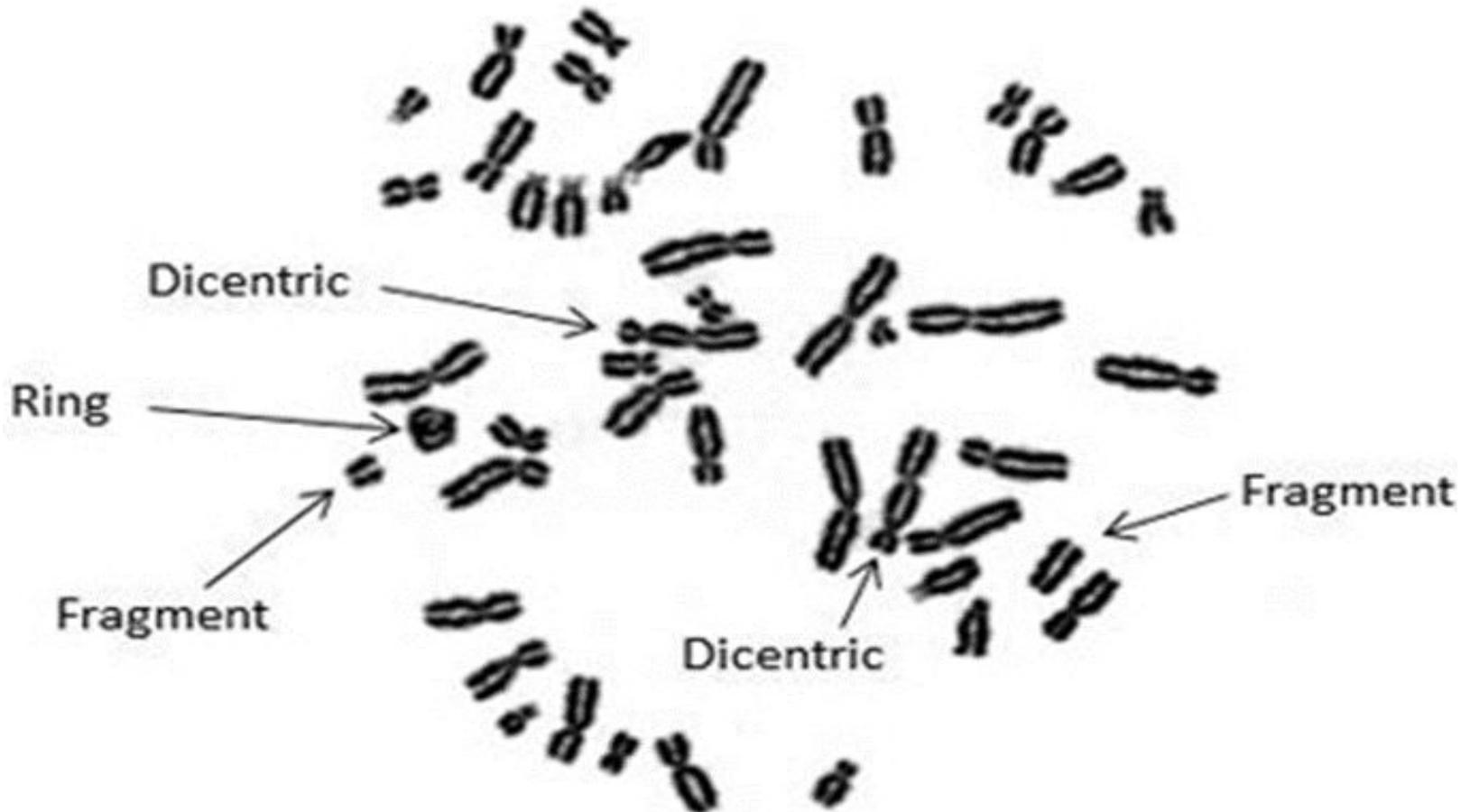
Пример: Ген человека, кодирующий белок p53, называется *TP53*. У человека этот ген расположен на хромосоме 17 (17p13.1).

На Парижской конференции была принята единая запись хромосомных aberrаций

Хромосомная aberrация	Символ
Делеция	del
Дупликация	dup
Изохромосома	i
Инсерция	ins
Инверсия	inv
Транслокация	t
Робертсоновская транслокация	rob
Кольцевая хромосома	r
Лиценрическая хромосома	dic
Фрагмент	f



Метафазная пластинка с кольцевой хромосомой, парными ацентрическими фрагментами и дицентрическими хромосомами.



Трисомия записывается знаком «+»

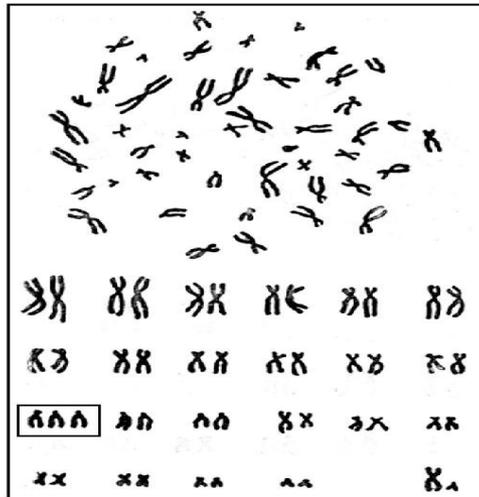


Рис. 66. Кариотип и кариограмма больного с синдромом Патау (трисомия по 13 хр.) 47, XY + 13



Рис. 67. Кариотип и кариограмма больного с синдромом Эдвардса (трисомия по 18 хр.) 47, XY + 18

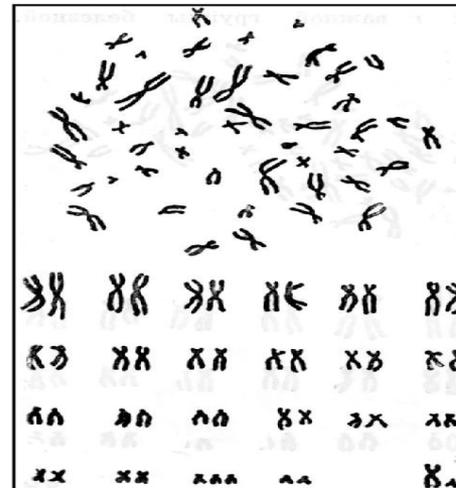


Рис. 68. Фенотип, кариотип и кариограмма больного с синдромом Дауна (трисомия по 21 хр.) 47, XY + 21

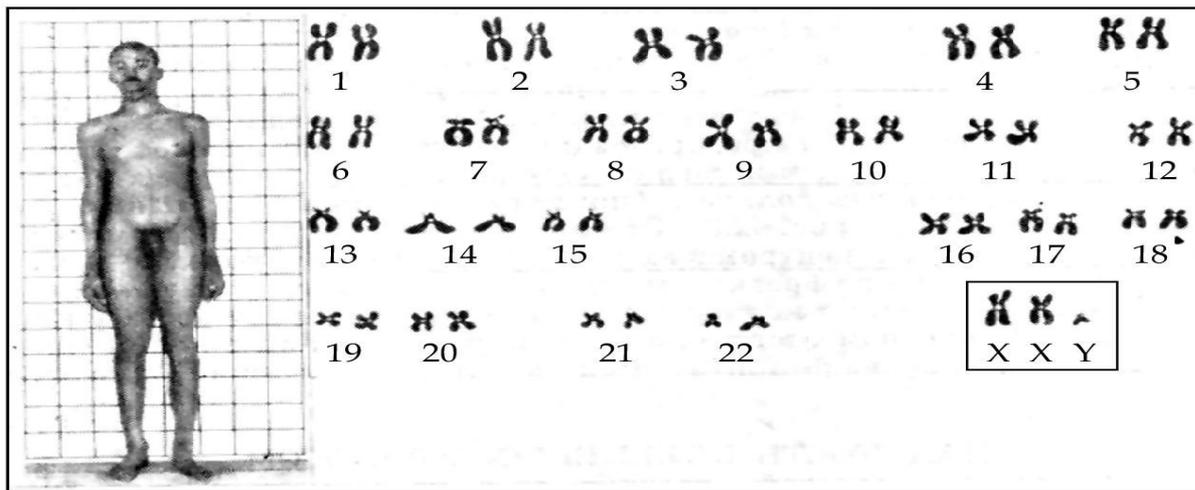


Рис. 71. Фенотип и кариограмма больного с синдромом Клайнфельтера 47, XXY

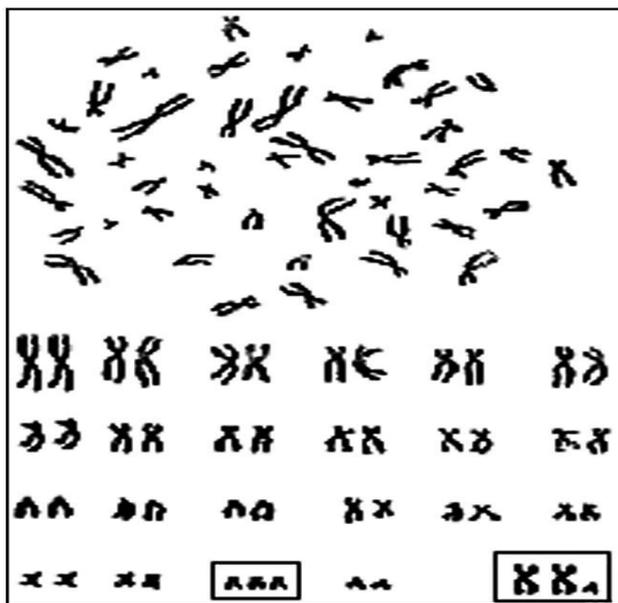


Рис. 72. Кариотип и кариограмма больного с двойной аномалией (синдром Клайнфельтера и синдром Дауна) 48, XXY + 21

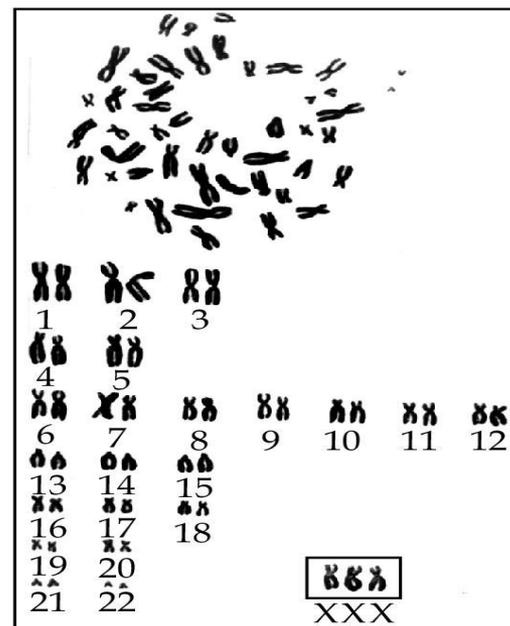


Рис. 73. Кариотип и кариограмма больной с синдромом трисомии X. 47, XXX

Примеры записи хромосомного диагноза

46,XX обычная женщина

46,XY обычный мужчина

69,XXY Мужской триплоидный кариотип

46,XX,del(14)(q23) Женщина с 46 хромосомами и делецией участка 23 на длинном плече хромосомы 14

46,XY,dup(14)(q22q25) Мужчина с 46 хромосомами и дупликацией участка 22 – 25 на длинном плече 14 хромосомы

46,XX,r(7)(p22q36) Женщина с 46 хромосомами и кольцевой хромосомой номер 7.

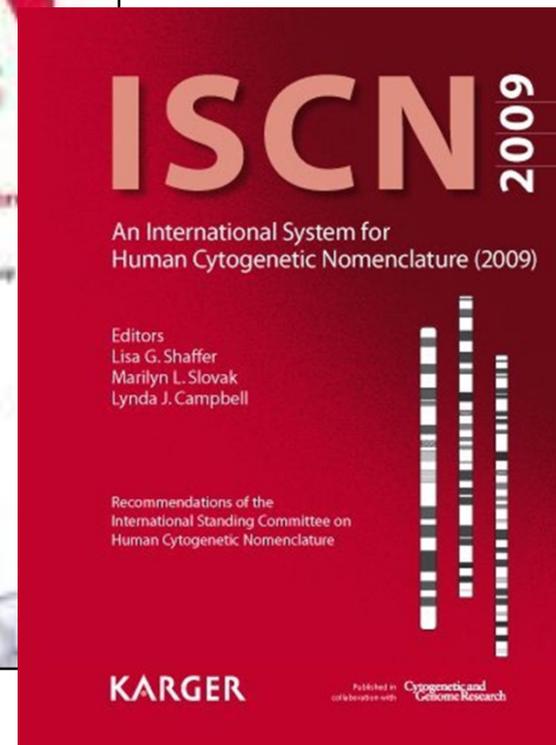
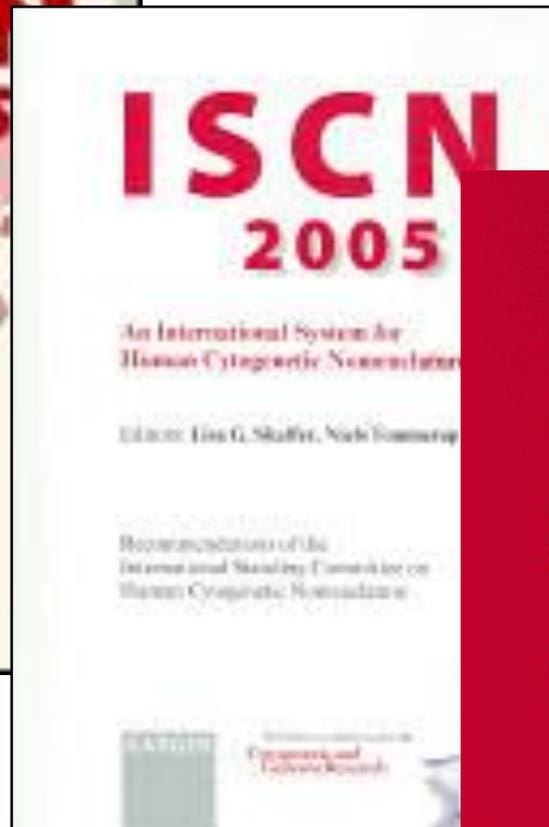
47,XY,+21 Мужчина с 47 хромосомами и лишней хромосомой 21 (синдром Дауна)

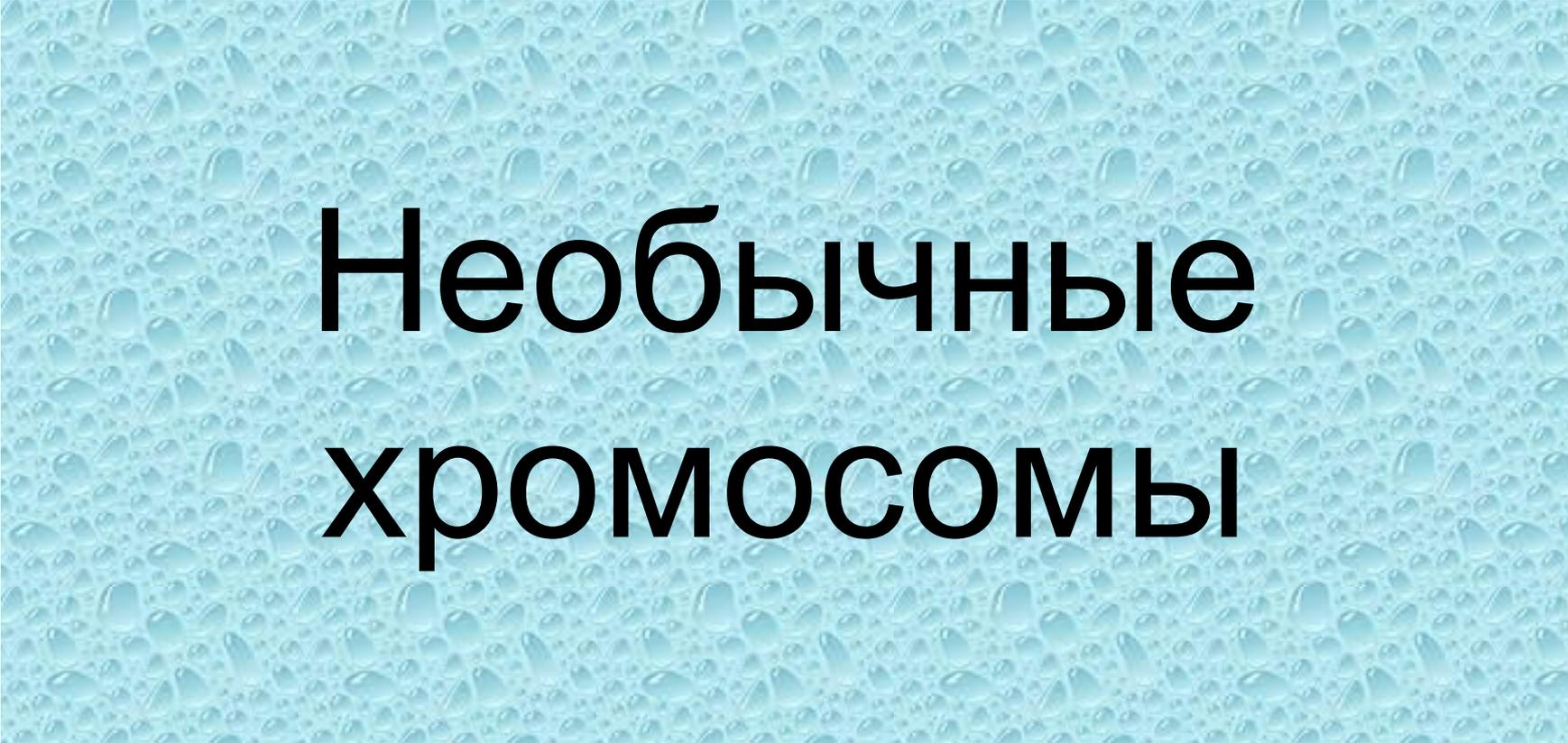
45,XX,-22 Женский кариотип с моносомией 22.

45,X/47,XXX/46,XX Женщина с мозаичным кариотипом

45,XX,rob(13;21)(q10;q10) Женщина с робертсоновской транслокацией хромосом 13 и 21. Соединились прицентромерные районы длинных плечей.

V Международный конгресс по генетике человека (Мехико, 1972г.) оформил официальную номенклатуру хромосом человека - «An International System for Human Cytogenetic Nomenclature». Цитогенетика развивается и сборники регулярно переиздаются.

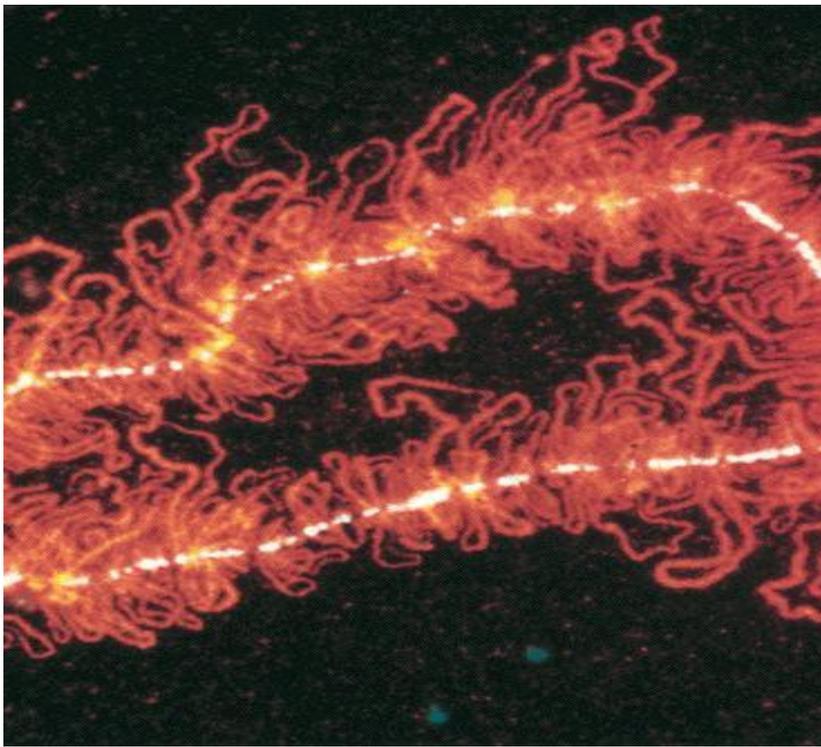




Необычные хромосомы

Необычные виды хромосом

- «ламповые щетки». Впервые хромосомы типа ламповых щёток были описаны В. Флеммингом в 1882 году. Название «хромосомы типа ламповых щёток» было предложено немецким эмбриологом И. Рюккертом (*J.Rückert*) в 1892 году
- политенные хромосомы (в слюнных железах личинок двукрылых)

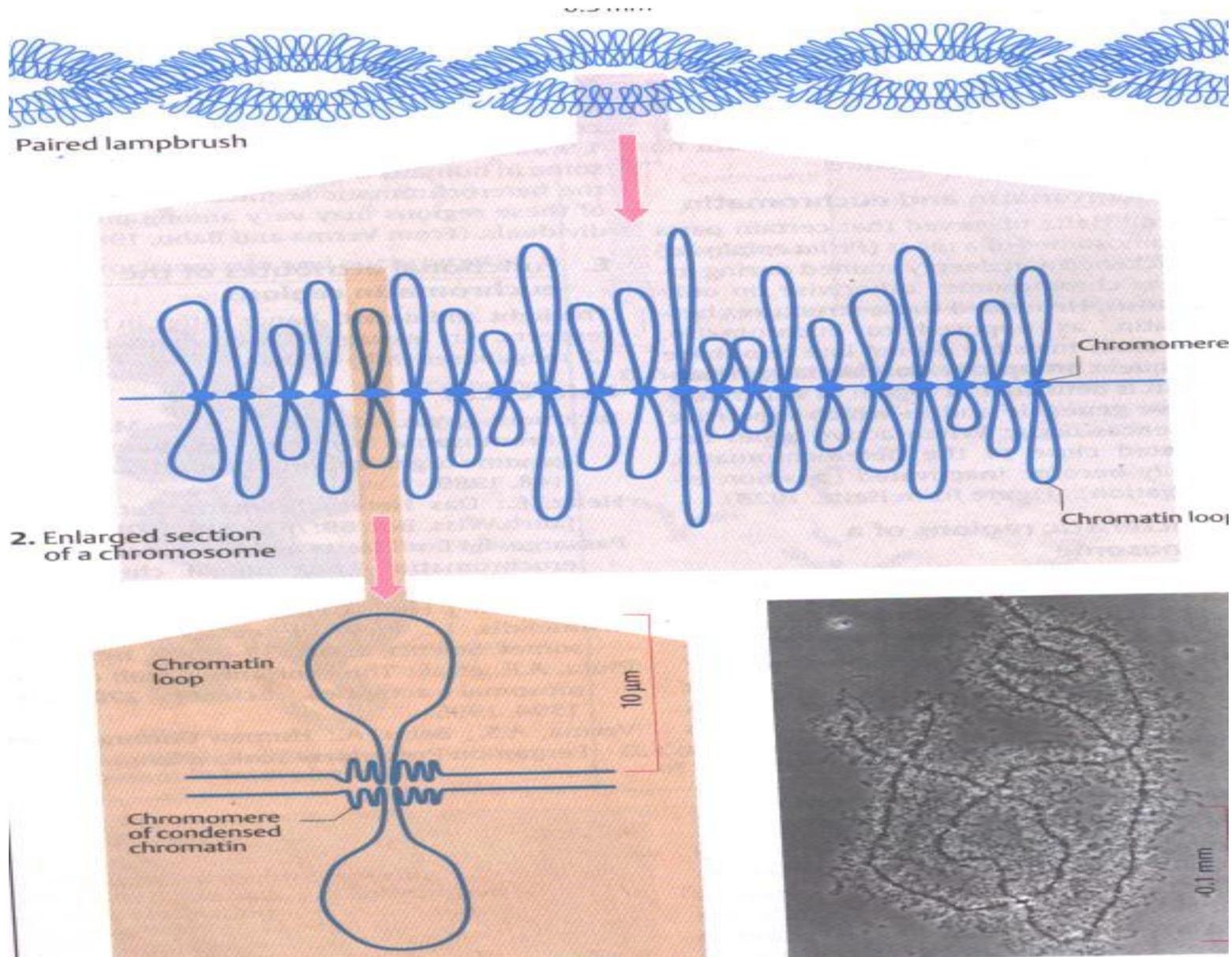


В настоящее время известно 45 видов животных, в развивающихся ооцитах которых можно наблюдать такие хромосомы. Хромосомы типа ламповых щёток не образуются в ооцитах млекопитающих.

Хромосомы типа ламповых щёток в ооцитах амфибий

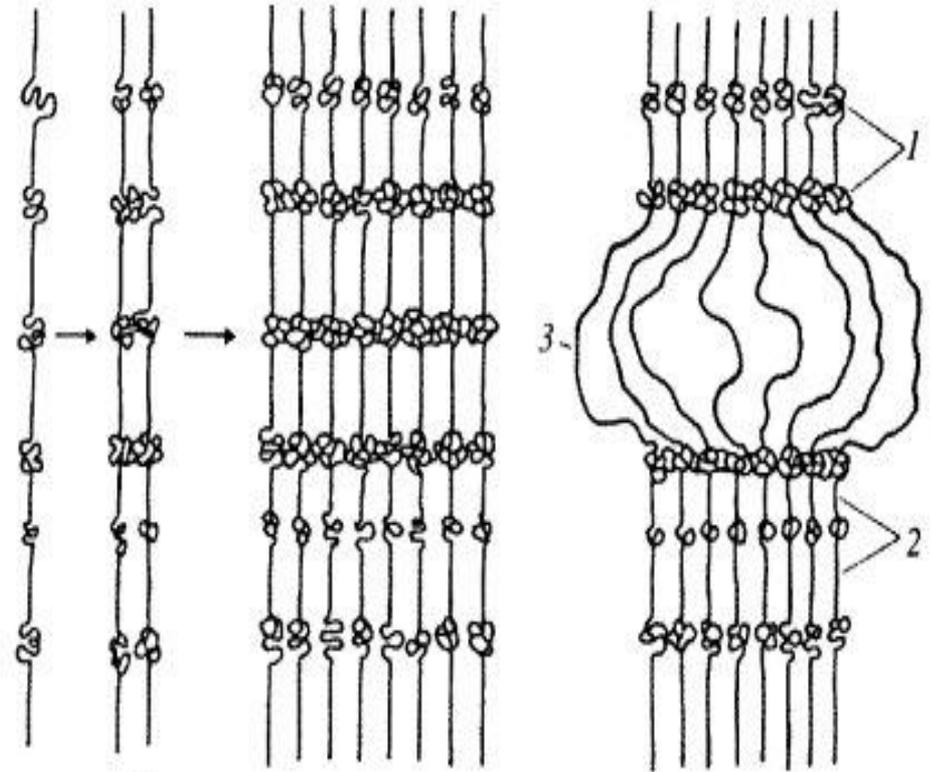
Хромосомы типа ламповых щёток — это гигантская форма хромосом, которая возникает в овогенезе на стадии диплотены профазы I у некоторых животных, в частности, у некоторых земноводных и птиц. Эти хромосомы являются крайне транскрипционно активными и наблюдаются в растущих ооцитах тогда, когда процессы синтеза РНК, приводящие к образованию желтка, наиболее интенсивны.

Схема строения «ламповой щетки»

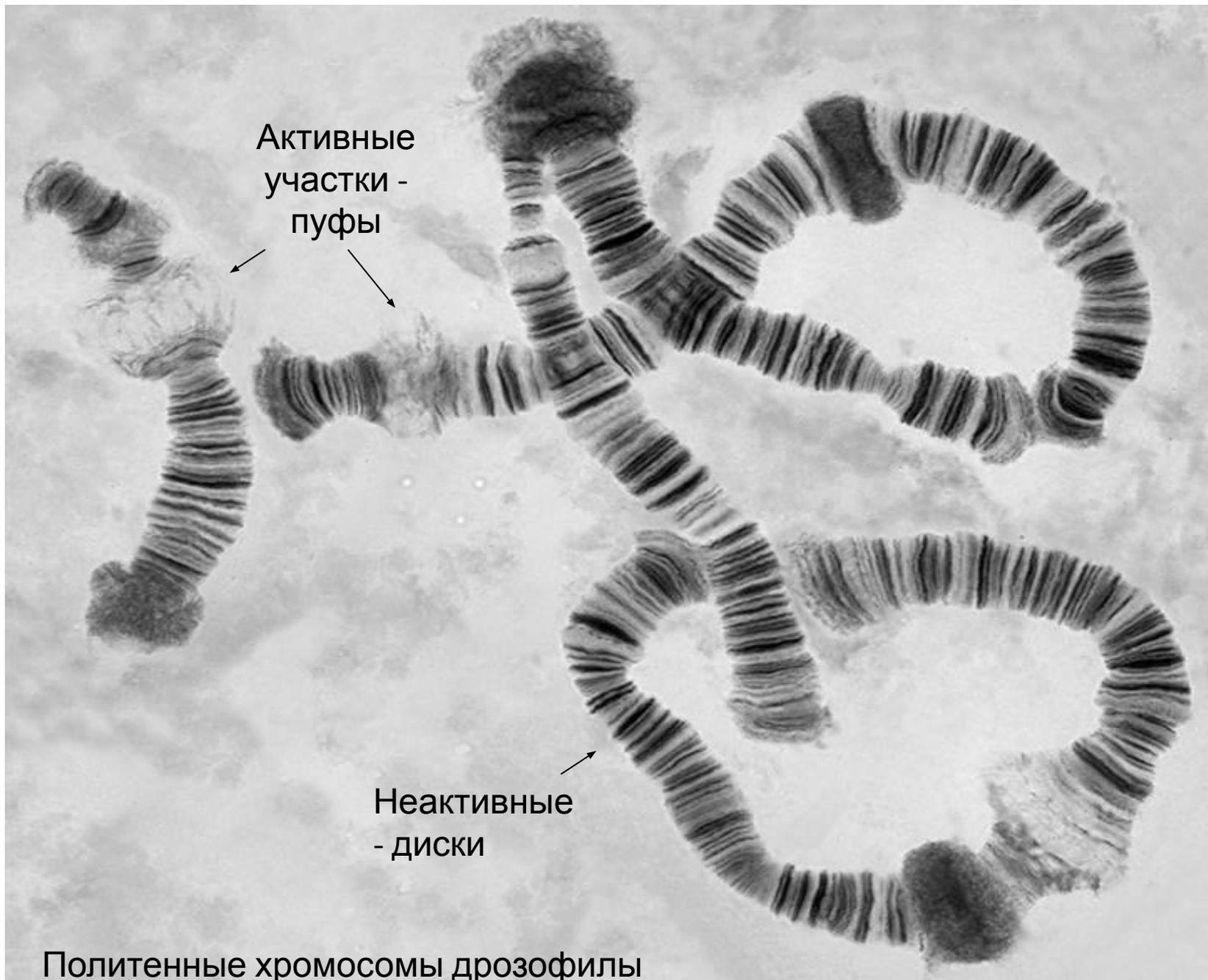


Политенные (многонитчатые) хромосомы личинок двукрылых

- Репликация ДНК не сопровождается делением клетки, что приводит к накоплению вновь построенных нитей ДНК.
- Большое количество копий генов на политенных хромосомах позволяет синтезировать больше нужных личинке белков.



1 — диски; 2 — междисковые участки; 3 — пух, образовавшийся за счет деконденсации хроматина диска





Хромосомные карты

Хромосомные карты делят на

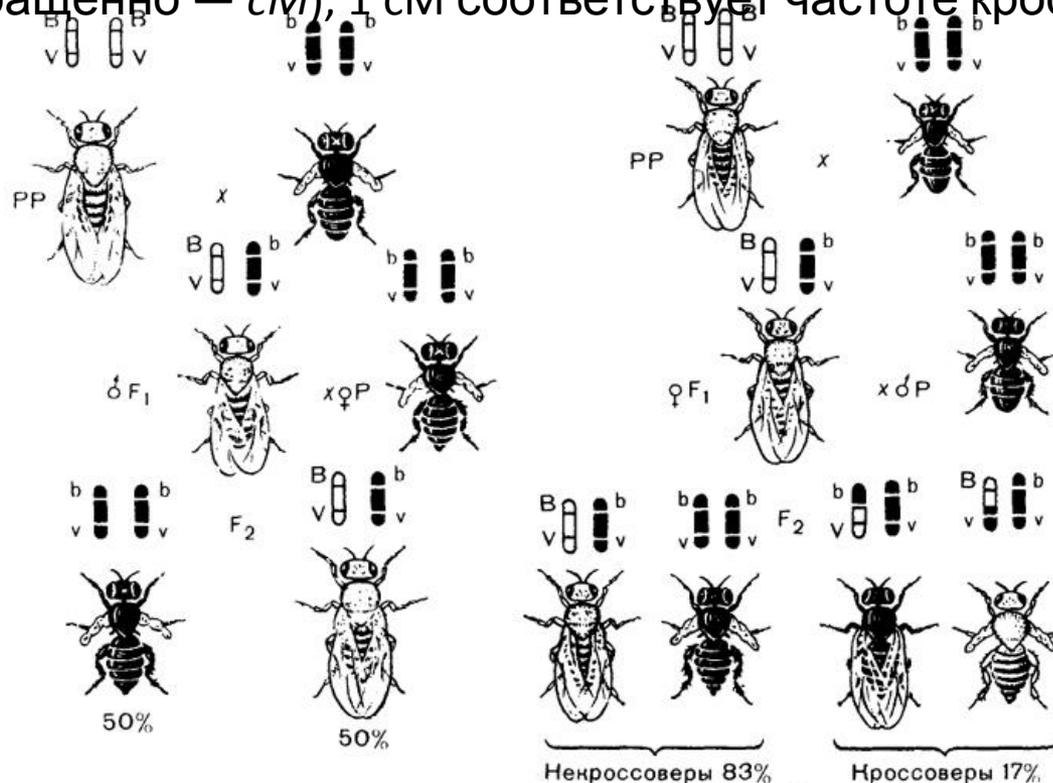
- **Генетические** – показывают, где лежит какой ген
- **Цитологические** – по окраске
- **Физические** – основаны на точном расстоянии в базах, кило, мега- и гига базах (то есть в нуклеотидных парах bases)
- **Рестрикционные** – вид физической карты, на которой указаны расстояния между соседними сайтами расщепления ДНК определенной **рестриктазой (разрезающим ферментом)**
- Карты часто бывают комбинированные
- **1 сМ (сентиморган = морганида)** – единица расстояния между генами, при которой вероятность кроссинговера равна 1%, (соответствует примерно 1 мегабазе)
- Гаплоидный геном человека составляет примерно 3 300 000 000 баз, т.е. 3300 сМ

Основные методы составления генетических (хромосомных) карт

- На основе скрещиваний - **не у человека!** (гибридологический метод) - % кроссоверных потомков – морганида (сантиморган)
- На основе родословных
- Методами генетики соматических клеток
- Методом ДНК зондов (фрагментов ДНК с известной последовательностью)
- Методами секвенирования генома

Первым организмом, для которого была получена генетическая карта, стала чернотельная дрозофила (*Drosophila melanogaster*).

С тех пор генетическое расстояние принято измерять в сантиморганах (или морганидах, сокращённо — *cM*), 1 *cM* соответствует частоте кроссинговера в 1 %

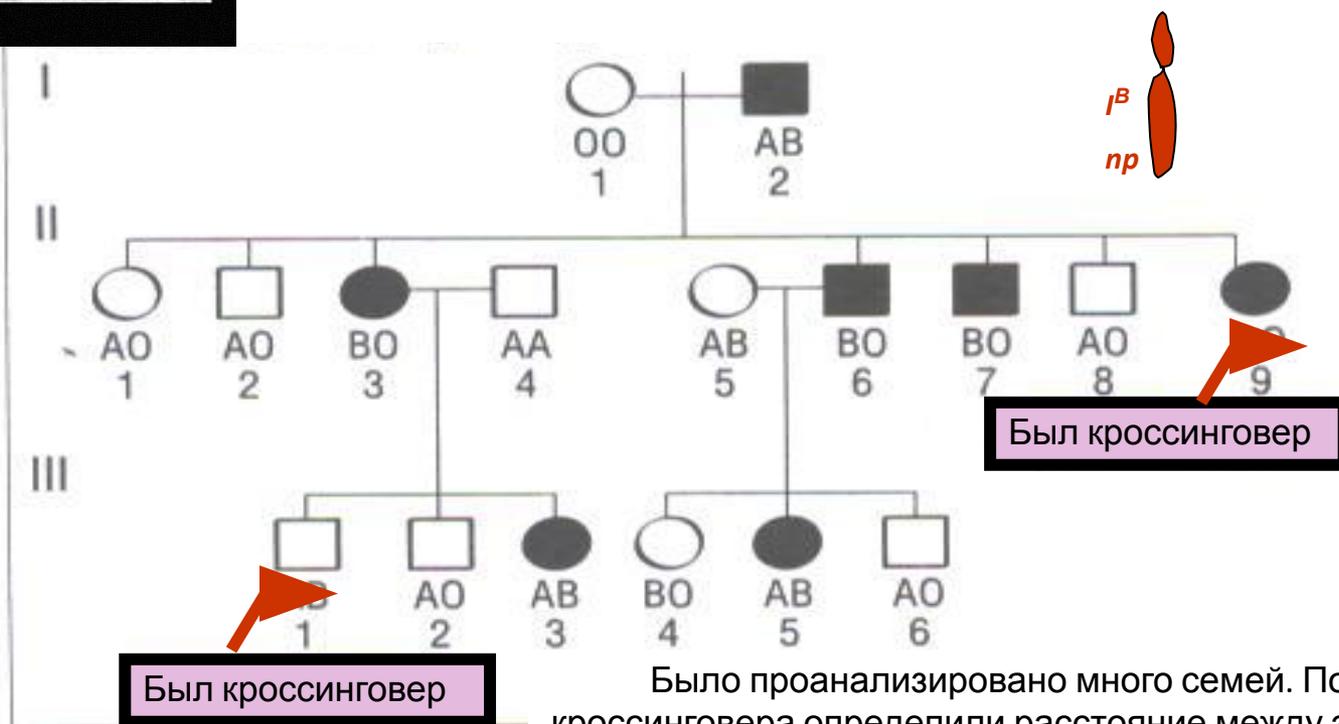


Расстояние генов В и v – 17 морганид

Родословная, показывающая сцепление у человека



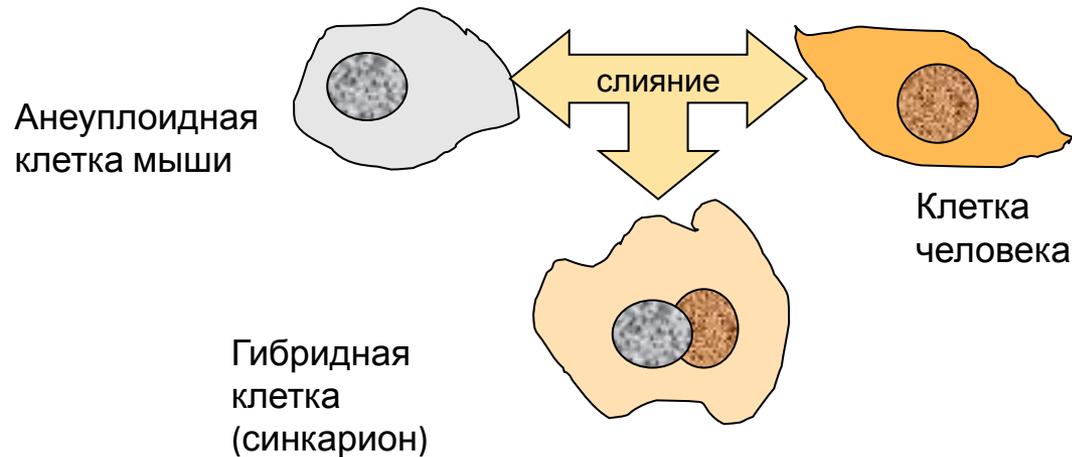
гена синдрома «ногтей-надколенника» *np* (OMIM 161200) с группой крови I^B (хромосома 9q34)



Было проанализировано много семей. По частоте кроссинговера определили расстояние между этими генами в хромосоме 1,5%

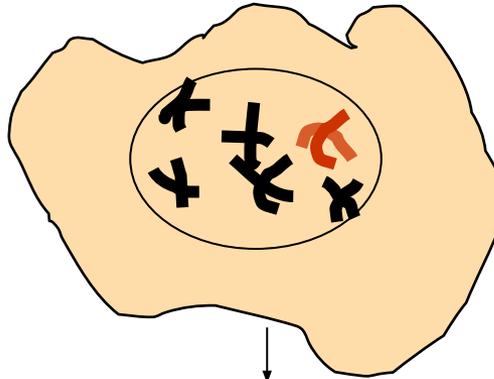
Метод изучения генетики соматических клеток

- Клетки выращивают в культуре.
- Этим методом удалось картировать гены человека.
- Метод своеобразен:

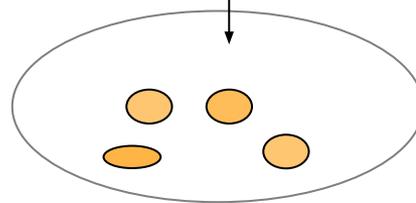


Это один из методов картирования генов

В ходе клеточных делений в гибридной клетке утрачиваются все хромосомы человека, кроме одной (например, № 17)

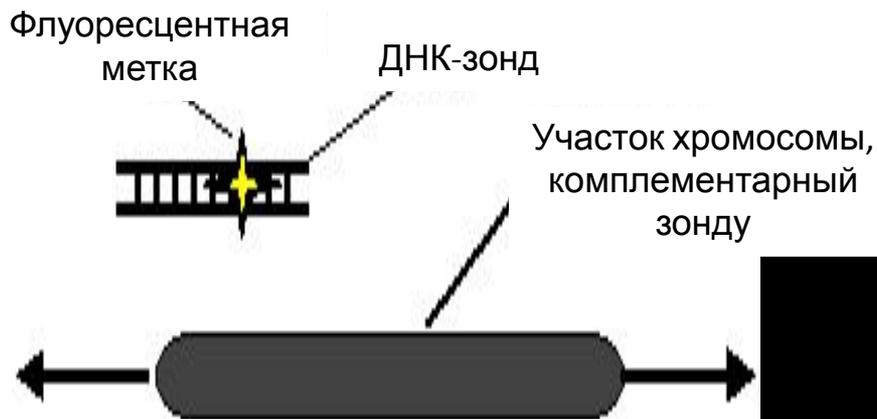


Посев на селективную среду, выжить на которой могут только клетки, имеющие определенный человеческий ген (например, ген A)



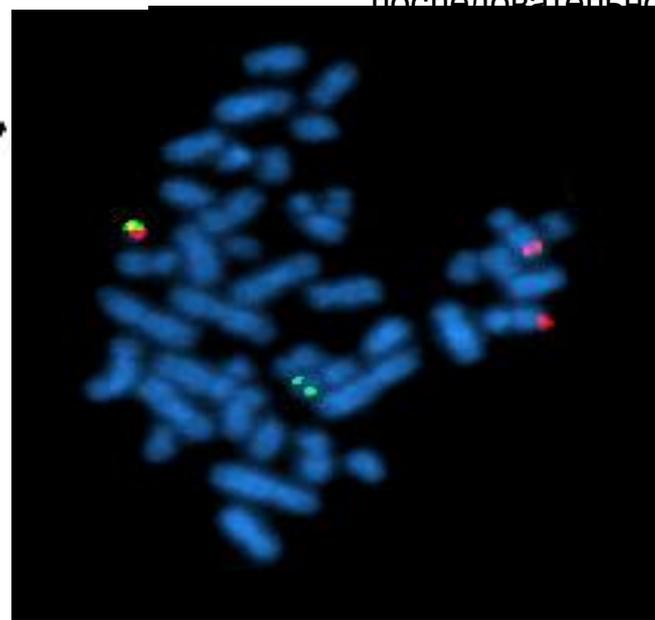
Клетки выжили, значит ген A лежит в хромосоме 17

Картирование FISH-методом с использованием ДНК - зондов

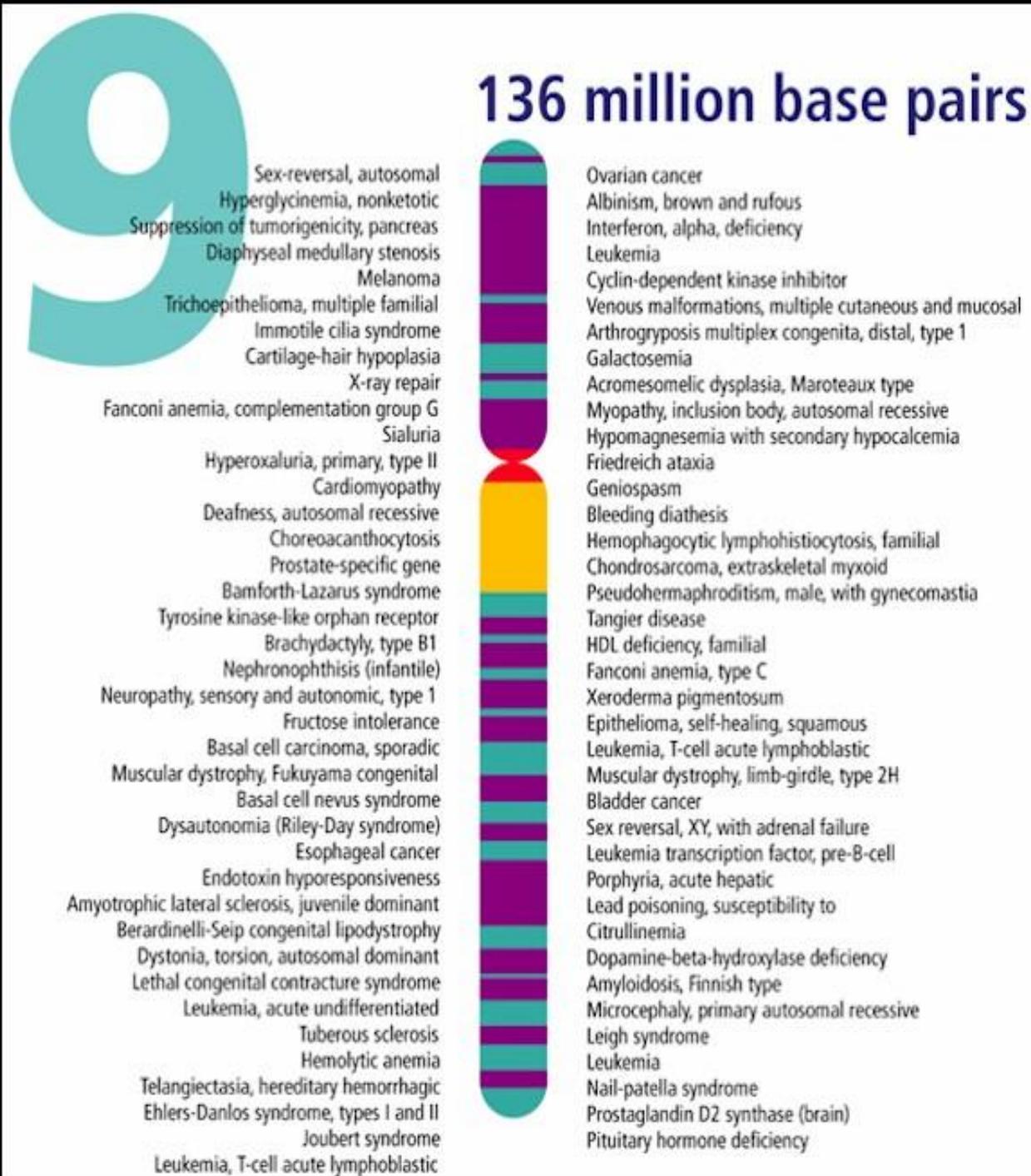


Метафазные хромосомы с меткой

Зонд – фрагмент ДНК, меченный тем или иным образом и использующийся для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК. Позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.



Карта хромосомы 9 – пример комбинированной карты



Все

Спасибо за внимание