

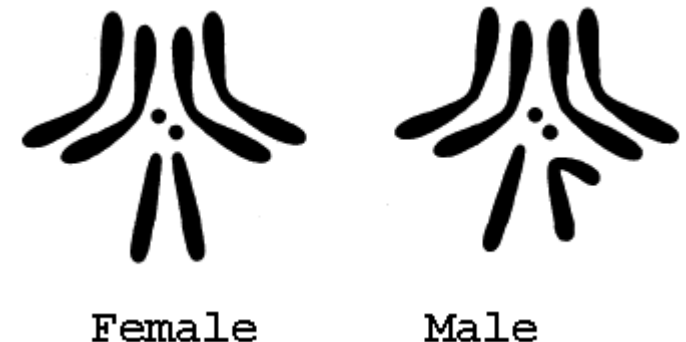
Chromozomová teorie dědičnosti

KBI / GENE

Mgr. Zbyněk Houdek

Proč octomilka a T.H. Morgan?

- *Drosophila melanogaster* – ideální objekt pro genetický výzkum :
 - Rychlý reprodukční cyklus a snadný chov v laboratorních podmínkách.
 - Její karyotyp obsahuje pouze 4 páry ch., z čehož 1 pár jsou pohlavní ch. (XX nebo XY). Ch. X a Y se od sebe i od autozomů liší.
 - Morgan svými pokusy zjistil, že každý ch. octomilky obsahuje rozdílnou skupinu genů.
 - Také se domníval, že jednotlivé geny jsou na ch. uspořádány lineárně na určitých místech (lokusech).
 - Přenos GI závisí na přesunu ch. během reprodukce.

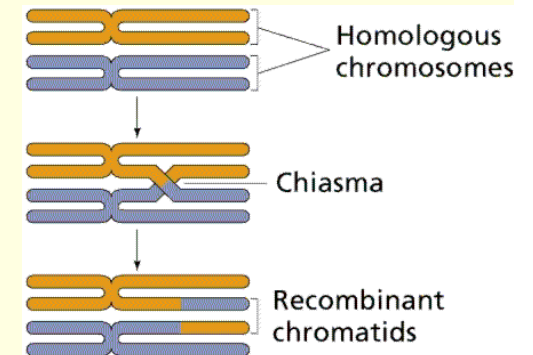


Chromozomová mapa a A. H. Sturtevant

- Sturtevant založil svou metodu mapování ch. právě na principu, že geny uložené na 1 ch. by měly během meiózy putovat společně (vazba genů).
- Genetici věděli, že tato vazba není absolutní.
- Tyto experimentální znalosti vedli k vytvoření teorie rekombinace.
 - Při tomto ději se 2 homologické ch. překříží (chiasma) = crossing-over a výměna částí takto překřížených ch.



© Copyright California Institute of Technology. All rights reserved. Commercial use or modification of this material is prohibited.



Crossing-over



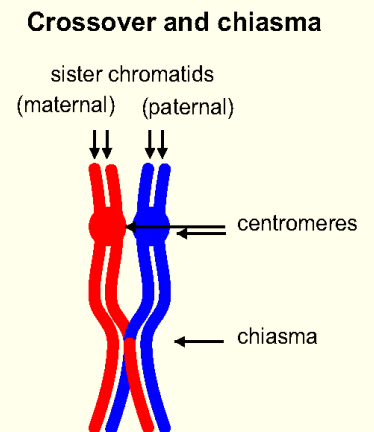
Courtesy of Cold Spring Harbor Laboratory Archives. Noncommercial, educational use only.

- Teorii, že genetická rekombinace souvisí s fyzickou výměnou mezi ch. potvrdili až v r. 1931 H. Creightonová a B. McClintocková, které studovaly homologické ch. kukuřice (barva a charakter zrna).
- Crossing-over můžeme pozorovat během pozdní profáze I. meiózy (chiazmata jsou viditelná pod mikroskopem).
- Dlouhé ch. obsahují více chiazmat a jejich počet je tedy zhruba úměrný jejich délce.
- Bylo však zjištěno, že k samotnému c.-o. dochází již dříve, tedy už během časně a střední profáze. Dříve než jsou chiazmata viditelná.



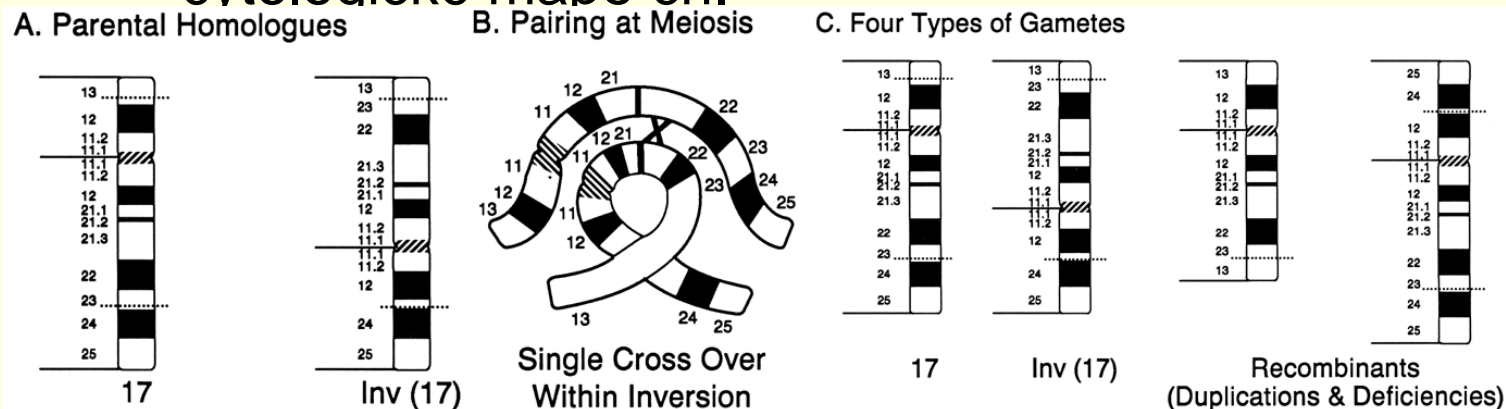
Chromozomové mapování

- C.-o. během profáze I. meiózy má 2 pozorovatelné následky:
 - Rekombinaci mezi g. na opačných str. od místa c.-o. (můžeme pozorovat až v následné generaci, kdy se geny na rekombinovaných ch. exprimují).
 - Chiazmata v pozdní profázi (možno pozorovat pod mikroskopem). Tvorba ch. mapy spočívá ve zjištění počtu c.-o. (počet chiazmat nebo rekombinovaných ch.).
- Sturtevant správně předpokádal, že mezi vzdálenými body by mělo být více výměn a naopak.
- Statisticky správná definice: vzdálenost mezi 2 body na g. mapě ch. se rovná průměrnému počtu výměn mezi nimi.



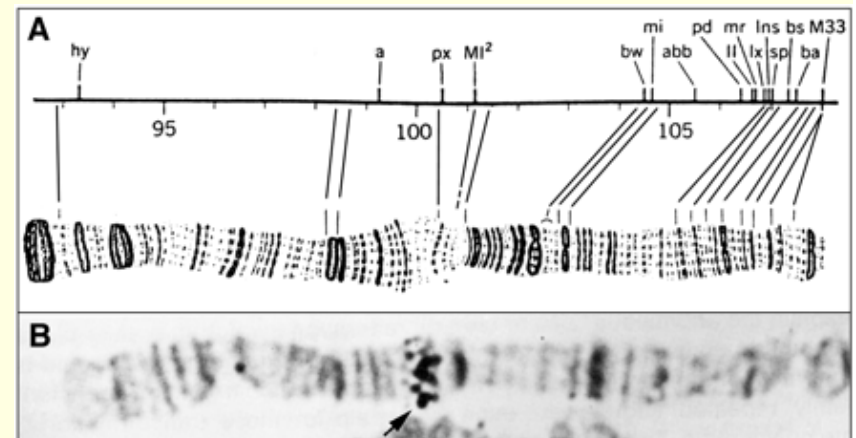
Cytogenetické x rekombinační mapování

- Rekombinační mapování – pouze relativní poloha g. na základě četnosti c.-o. jako měřítko vzdálenosti.
- Cytogenetické mapování – založeno na fenotypovém projevu ch. přestaveb (delece a duplikace), které se dají pozorovat a vztáhnout jejich fenotypový účinek na určitou oblast ch.
 - Pokud jde tyto fenotypové projevy přičíst lokalizovaným genům na rekombinační mapě, pak lze jejich mapovou pozici spojit s určitým místem na cytologické mapě ch.



Genetická x fyzická vzdálenost

- Předpoklad: dlouhé ch. = pravděpodobnost většího počtu c.-o. je většinou správný.
- Výjimečně existují však oblasti ch., kde je menší sklon ke c.-o., pak vzdálenosti na genetické mapě neodpovídají fyzickým na cytologické mapě ch.
 - Výjimečná místa: blízko konců ch. a v blízkosti centromery (kondenzace těchto částí ch. na genetické mapě).
- Přes tyto odlišnosti jsou genetické a cytologické mapy ch. kolineární – konkrétní lokusy genů mají stejné pořadí.

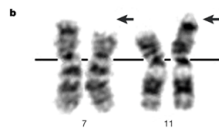
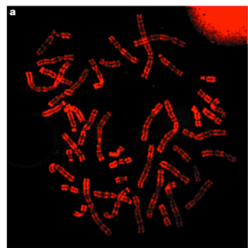


Cytogenetika

- Studiem chromosomů a karyotypů se zabývá vědní disciplína, která se nazývá cytogenetika.
- Zabývá se i zpracováním chromosomových preparátů během mitózy (prometafáze).
- Akumulace metafázních buněk je možné dosáhnout působením alkaloidu kolchicinu (výtažek z ocúnu), jeho syntetických derivátů (Colcemid) a dalších podobných látek (Velban).
- Přímá preparace chromosomů je založena na působení kolchicinu *in vivo*, nebo *in vitro*.

Cytogenetické barvicí metody

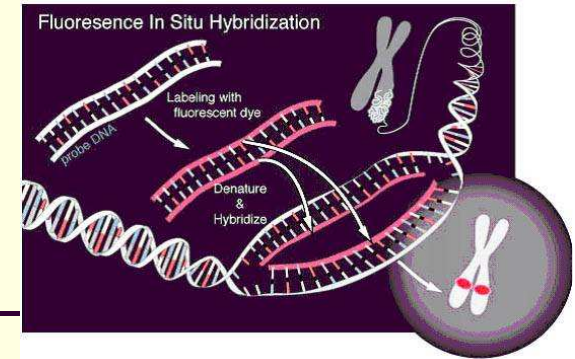
- Barvení se provádí během mitózy dělicích se bb. – časté je dělení u embryí, tkáňové kultury nebo u kořenové špičky rostlin.
- Zastavení dělení v metafázi různými chemickými látkami (nejlépe viditelné) → hypotonický roztok (rozvolnění ch.) → fixace a barvení.
- Barvení pomocí chinakrinu (quinacrine) – ch. mají světlé a tmavé příčné pruhy – fluorescenční barvivo.
- Pruhování pomocí Giemsova barviva – světlé a tmavé pruhy.
- Fluorescenční hybridizace in situ (FISH) – malování ch. – pomocí této techniky lze ch. obarvit pomocí hybridizace vhodných DNA fragmentů s fluorescenčním barvivem.



Nature Reviews | Genetics



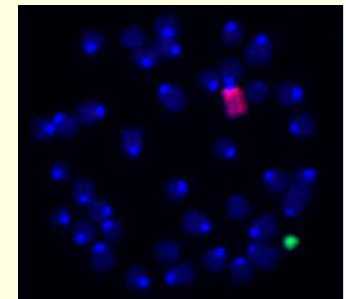
Hybridizace *in situ*



- Slouží k určení polohy sekvence NK v bb. nebo ch. *in situ* = na místě.
- U DNA v ch. jsou sondy značené fluorescenčními barvivy (FISH=fluorescenční hybridizace *in situ*), dříve radioizotopy a pak jsou hybridizovány celé ch., které byly před přidáním sondy krátce vystaveny vysokému pH (oddělení řetězců).
- Můžeme zjistit i kde se nachází daná RNA → vývoj embrya (sledování změn v expresi jednotlivých g. v různých bb.).
- Vizualizace navázaných sond se provádí fluorescenční mikroskopií.
- Použitím sekvenčně specifických sond označených různými fluoreskujícími látkami lze např. na 1 ch. pozorovat polohy několika g. současně.

red is specific for chromosome X

green is specific for chromosome 21



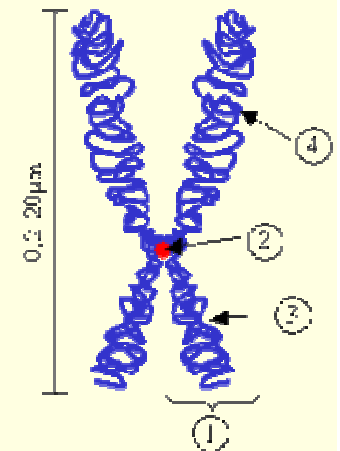
Lidský karyotyp



- Diploidní lidská b. obsahuje 46 chromozomů – 44 autozomů a 2 pohlavní ch. (gonozomy: ženy XX, muži XY - 1960 – Denverská konference).
- V metafázi se skládají ze 2 identických sesterských chromatid.
- Chromozomy obarvíme, vyfotografujeme a fotografie rozstříháme a jednotlivé ch. rozdělíme na základě velikosti, tvaru a rozložení pruhů - karyotyp.
- Největší ch. označujeme č. 1 a nejmenší 21, pak následuje z historických důvodů ještě 2. nejmenší ch. 22. Ch. X náleží mezi středně velké ch. a ch. Y je velikostně srovnatelný s ch. 22.

Chromozomální idiogram

- Každý ch. je rozdělen centromerou na krátké (p) a dlouhé raménko (q). Jednotlivá raménka ch. jsou charakteristická pořadím světlých a tmavých pruhů (číslováme arabsky směrem od centromery).
- Např. na ch. 5 máme nejbližše centromere pruh 5p11, dále 5p11, 5p12 atd.
- Základní pruhy se dále dělí na subpruhy, které se oddělují desetinnou tečkou – 5p13.1.
- Idiogram je grafické znázornění distribuce pruhů na ch.



Hlavní zásady klasifikace lidských chromozomů:

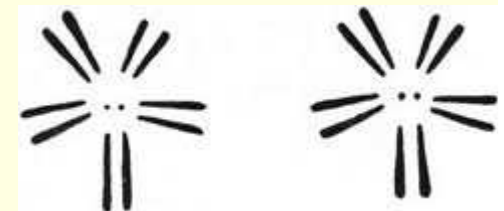
- 1960 – Denverská konference – člověk má 23 párů chromozomů:
 - č. 1 až 22 = autozomy
 - č. 23 = gonozomy
- 1963 – Londýnská konference – rozdělení chromozomů do 7 skupin dle morfometriky:
 - A –chromozomy č. 1-3
 - B –chromozomy č. 4 a 5
 - C –chromozomy č. 6-12, X
 - D –chromozomy č. 13-15
 - E –chromozomy č. 16-18
 - F –chromozomy č. 19 a 20
 - G –chromozomy č. 21, 22 a Y
- 1967 – konference v Chicagu – rozdělení aberací.
- 1971 – konference v Paříži– zásady pro identifikaci naproužkovaných chromozomů.

Rekombinace a evoluce

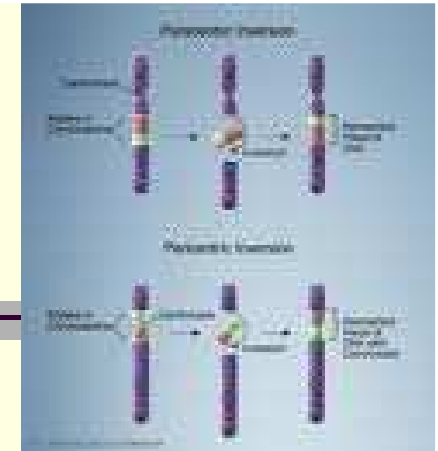
- Rekombinace je součástí pohlavního rozmnožování a díky ní dochází k vytvoření nových kombinací alel.
- Tyto nové kombinace alel mohou přinést organismu prospěch v přežívání nebo reprodukci organismu.
- Meiotická rekombinace je tedy způsob přerozdělování genetické variability k umocnění působnosti evolučních změn.
- Z hlediska evoluce můžeme říci, že rekombinace vytváří předpoklady pro to, aby se příznivé alely různých genů dostaly společně do téhož org.

Změny ve struktuře chromozomů

- Značná variabilita počtu ch. u velmi příbuzných druhů – např. *Drosophila melanogaster* – 4 páry ch. (3 p. autozomů a 1 p. gonozomů), u blízkého druhu *Drosophila virilis* – 6 p. ch (5 p. autozomů a 1 p. gonozomů).
- Je to důsledek přestaveb některých chromozomových segmentů během evolučního vývoje genomu.
- Časté jsou také strukturní nebo početní změny v rámci 1 druhu – chromozomové mutace.



Inverze



- Znamená převrácení úseku ch., tak že dojde nejprve ke 2 zlomům a následně se vzniklý úsek převrátí o 180° a opět se spojí do původního ch. (změna pořadí g.).
 - Laboratorně ji lze provést ozářením X paprsky.
 - Nebo vzniká přirozeným procesem způsobeným transpozomy.
 - Chybné znovuspojení ch. fragmentů, které vznikají v interfázním jádře při mechanických zlomech a následném spojení propletených ch. vláken.
- Inverze může být pericentrická (zahrnuje centromeru) nebo paracentrická (probíhá mimo centromeru).

Translokace

- Zahrnuje přemístění nebo výměnu ch. segmentu mezi různými ch. (přesun genů do jiných vazbových skupin).
 - Reciproká translokace – dokonalá výměna translokovaných segmentů různých ch. bez ztráty gen. materiálu.
 - Robertsonská t. – dochází ke spojení nehomologických ch. (např. fúze 2 akrocentrických ch. → metacentrický ch. a oba ch. ztrácejí svá krátká ramena (časté při evoluci karyotypu – takto vznikl ch. 2 u člověka).

Delece a duplikace

- Delece (deficience) – ztráta části chromozomu.
- Velké delece je možné zachytit pod mikroskopem (hypoploidie), ale malé ne.
- U člověka: delece krátkých ramen chromozomu 5 – syndrom cri-du-chat (46,XX nebo XY,del(5)(p14 – č. pruhu na krátkém raménku p).
 - Postižené děti – mentální retardace a další vývojové vady – anomální tvar hrtanu → slabý pláč, podobný kočičímu hlasu.
- Duplikace – přítomnost nadbytečného ch. segmentu (hyperploidie) na nějakém ch. nebo jako nový samostatný ch. (volná duplikace) → fenotypové abnormality.

Pohlavní chromozomy

- U některých druhů živočichů (hlavně hmyzu) mají samice o 1 ch. více než samci a nazýváme ho X:
 - Samice XX
 - Samci X0.
 - V průběhu meiózy se oba ch. X u samičky párují a rozcházejí → vajíčka s 1X ch. U samců se ch. X pohybuje nezávisle na ch. a začleňuje se jen do ½ spermií.
 - Při spojení vajíčka (X) a spermie (X nebo 0) → zygota XX - samička a X0 - sameček.
- U mnoha jiných živočišných druhů včetně čl. mají samci i samice stejný počet ch., ale u samců je přítomen zvláštní ch. Y.

Chromozom Y

- Výrazně odlišná morfologie.
- U člověka je samozřejmě mnohem menší než ch. X a jeho centromera je umístěna blíže k 1 konci.
- Ch. X a Y obsahují jen malé množství stejného genetického materiálu (malé segmenty v blízkosti konců obou ch.).
- Během meiózy u samců se ch. X a Y rozcházejí → gamety (spermie s X a spermie s Y, jejichž četnost je zhruba stejná).
- Samice XX tvoří v meióze jen vajíčka nesoucí ch. X.
- Zajímavé je, že u člověka dochází při oplození ke vzniku větší pravděpodobnosti zygoty XY (1,3 : 1), ale tento poměr se vyrovnává, protože mužská embrya mají menší životaschopnost.

