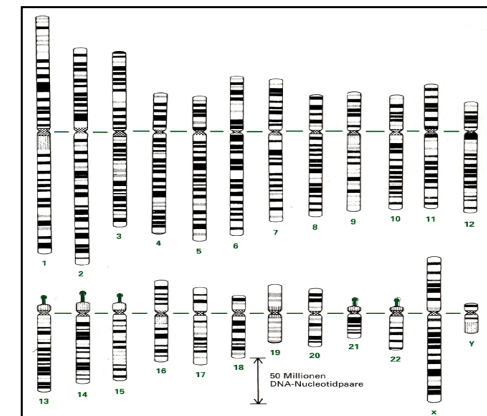
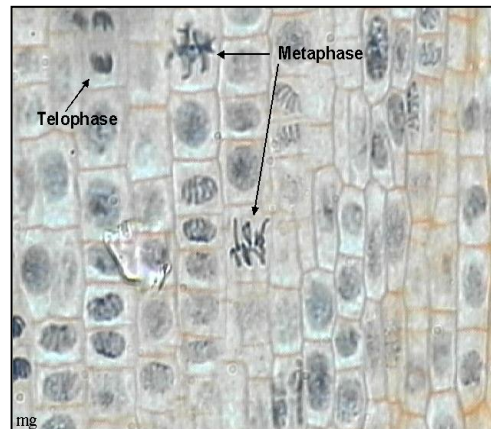
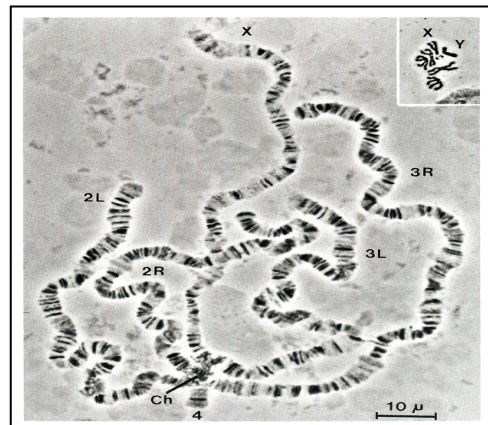


Kurs 2 Grundpraktikum Genetik

Präparation und mikroskopische Auswertung eukaryotischer Chromosomen



PRAXIS FÜR MEDIZINISCHE GENETIK

Dr. med. Albrecht Kobelt - Facharzt für Humangenetik

Flemmingstraße 4, 09116 Chemnitz, Tel. 0371/33322152, E-Mail: a.kobelt@skc.de

Die Praxis

Leistungen

Formulare

Links

Kontakt

Leistungen

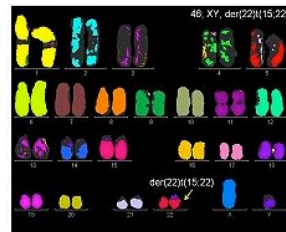
Beratung und Diagnostik

Die Indikationen zur genetischen Beratung und Diagnostik sind vielfältig.

So können bereits klinisch/genetisch gesicherte, vermutlich genetisch bedingte oder unklare Erkrankungen Anlass sein wie:

- » Fehlbildungs/Retardierungssyndrome mit Manifestation im Kindesalter
- » Tumorerkrankungen
- » Unerfüllter Kinderwunsch
- » Verdacht auf teratogene Einflüsse in der Schwangerschaft
- » Neurodegenerative Erkrankungen
- » Beratung nach pränatalmedizinischen Massnahmen

M-FISH Analyse



JGU UNIVERSITÄTsmmedizin.
MAINZ

Institut für Humangenetik

Sie sind hier: Startseite / Krankenversorgung / Zytogenetische Diagnostik

Startseite

Krankenversorgung

Genetische
Beratungsstelle

» Zytogenetische
Diagnostik

Molekulargenetische
Diagnostik

Molekularzytogenetische
Diagnostik

Zytogenetisches Labor

Das zytogenetische Labor ist im Gebäude 706N (Neubau Pathologie), 4.OG untergebracht.

Leitung



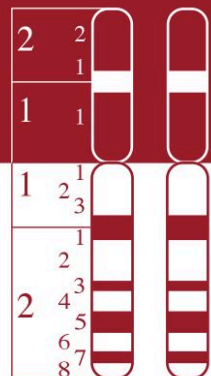
Vera Beyer

Funktionen: Leiterin des Zytogenetischen Labors, Sicherheitsbeauftragte, 1. stellvertretende Qualitätsbeauftragte

Qualifikationen: Diplom-Biologin, Fachhumangenetikerin (GfH)

Tel. 06131 17-5795
Fax 06131 17-5689

vera.beyer@unimedizin-mainz.de



Partnerschaft

Dr. med. Gabriele du Bois
Fachärztin für Humangenetik

Dr. rer. nat. Eva Daumiller
Fachhumangenetikerin (GfH)

Institut für Chromosomendiagnostik und genetische Beratung

Institut

Leistungen

Anforderungsbogen

Elsa-Brandström-Str. 10
71032 Böblingen

Fon 0 70 31-72 18 18
Fax 0 70 31-72 18 15



Zentrum für
Humangenetik
Mannheim

Genetische Beratung

Genetische Diagnostik

Abstammungsgutachten

Home

Beratung

Diagnostik

Molekulargenetik

Zytogenetik

Zytogenetische Diagnostik /
Allgemeine Informationen

Pränatale
Chromosomendiagnostik

Pränataler Schnelltest

Indikationen für eine pränatale
Chromosomendiagnostik

Mögliche Befunde nach
Pränataldiagnostik

Postnatale
Chromosomendiagnostik

Pränatale Chromosomendiagnostik

Die überwiegende Zahl der Kinder wird gesund geboren. Doch bestehen, unabhängig vom Alter der Eltern und der Familiengeschichte, bei ca. 3-5% (Basisrisiko) aller Neugeborenen angeborene Fehlbildungen oder Erkrankungen.

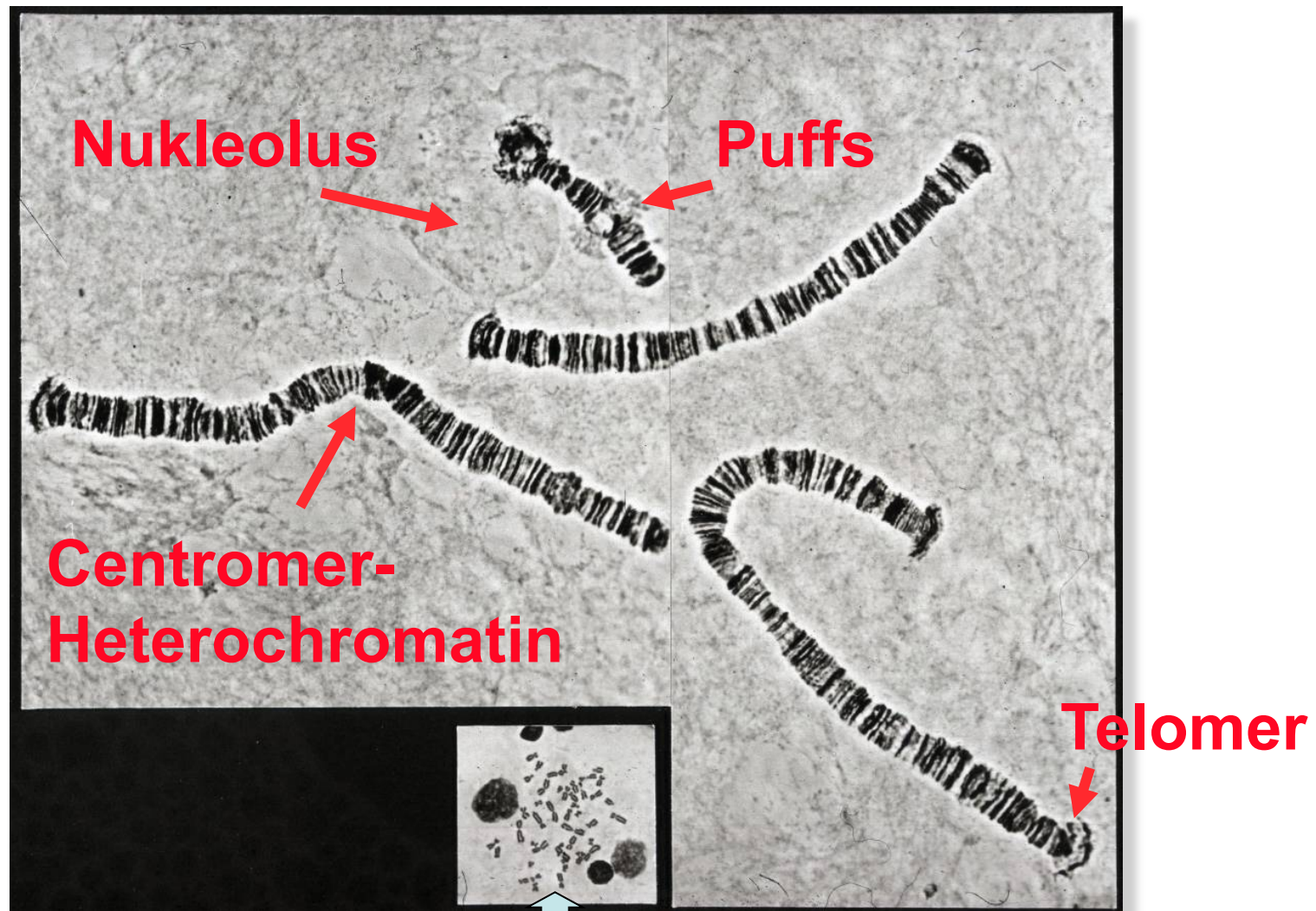
In einigen Fällen wird die Störung durch eine chromosomale Anomalie hervorgerufen. Die häufigste Chromosomenstörung ist die Trisomie 21 (Down-Syndrom), deren Vorliegen nur durch eine invasive Diagnostik (Amniocentese/Chorionzottenbiopsie) ausgeschlossen werden kann. Eine gezielte individuelle Risikoeinschätzung ist durch die Messung der Nackenfalte (Nackentransparenzmessung/NT-Messung), gegebenenfalls in Kombination mit einer Blutuntersuchung (mütterliches Serumscreening) zwischen der 12. und 14. Schwangerschaftswoche möglich.

Pränatale Chromosomendiagnostik

Untersuchungsmaterial
Versand, Kosten
Fruchtwasserpunktion
(Amniocentese)
Chorionzottenbiopsie
(Nabelschnurpunktion,
Cordocentese)



Warum Riesenchromosomen?



Menschliche Metaphasechromosomen in gleicher Vergrößerung

Was soll man sehen?

- **Genaktivität** in der **Interphase**
(Puffs, Nukleolus, RNA-Verteilung)
- Centromer und Heterochromatin
- Somatische Paarung
- **Mutationen** (besonders bei Heterozygotie)

Chironimus? Chironomus!!

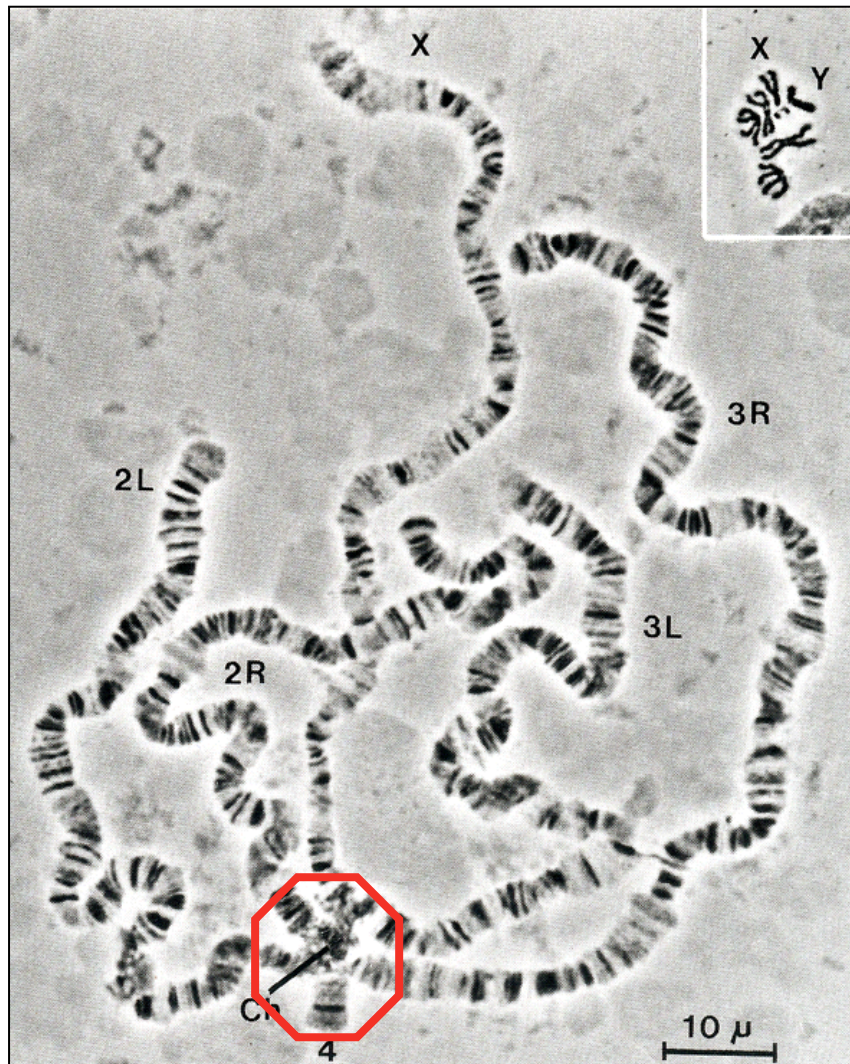


- nicht-stechende Zuckmücken (Nematocera, Diptera)
- weltweit verbreitet
- > 10 000 Spezies!



- rote Mückenlarven (Hämoglobin!)
- im Sediment von Pfützen, Tümpeln, Seen...
- beliebtes Fischfutter

Warum nicht aus *Drosophila*?

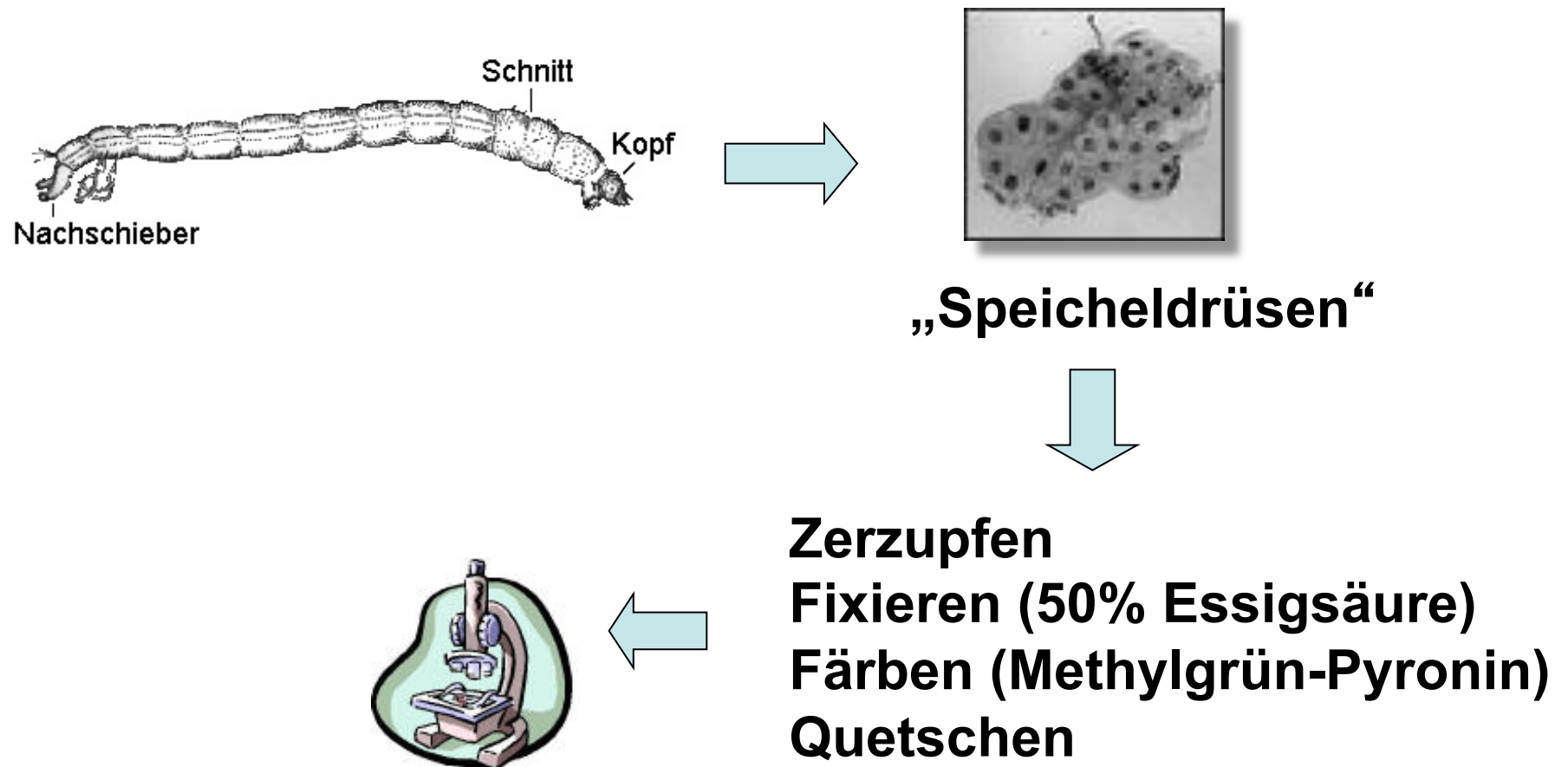


- viel geringerer Polytäniegrad (meist bis 2048x)

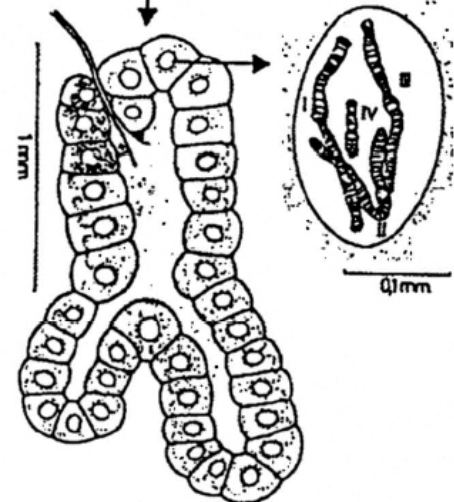
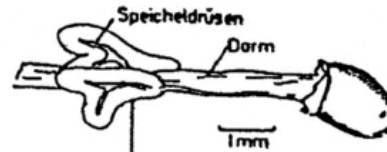
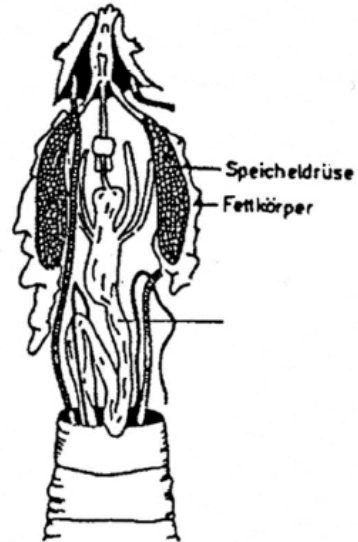
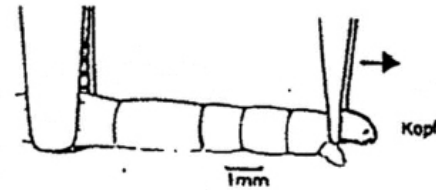
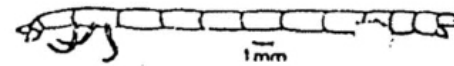
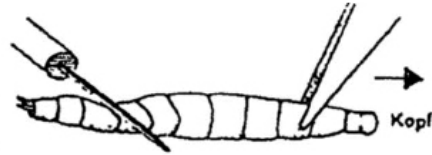
- das konstitutive Hetero-Chromatin der Centromere wird bei der Polytänisierung in Speicheldrüsenzellen von *Drosophila* **nicht** mitrepliziert!

Es verschmilzt zum „**Chromozentrum**“ und ist kaum zu sehen.

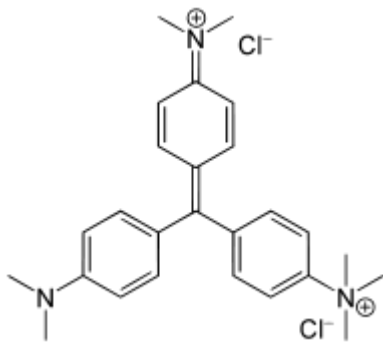
Präparation von polytänen Riesenchromosomen



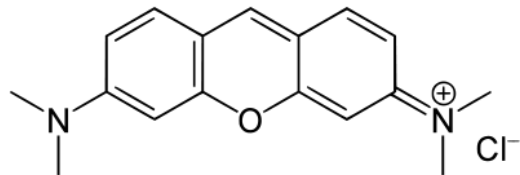
Präparation- Details



Differentielle DNA/RNA-Färbung



**Methylgrün färbt
DNA blau**



**Pyronin färbt
RNA rot**

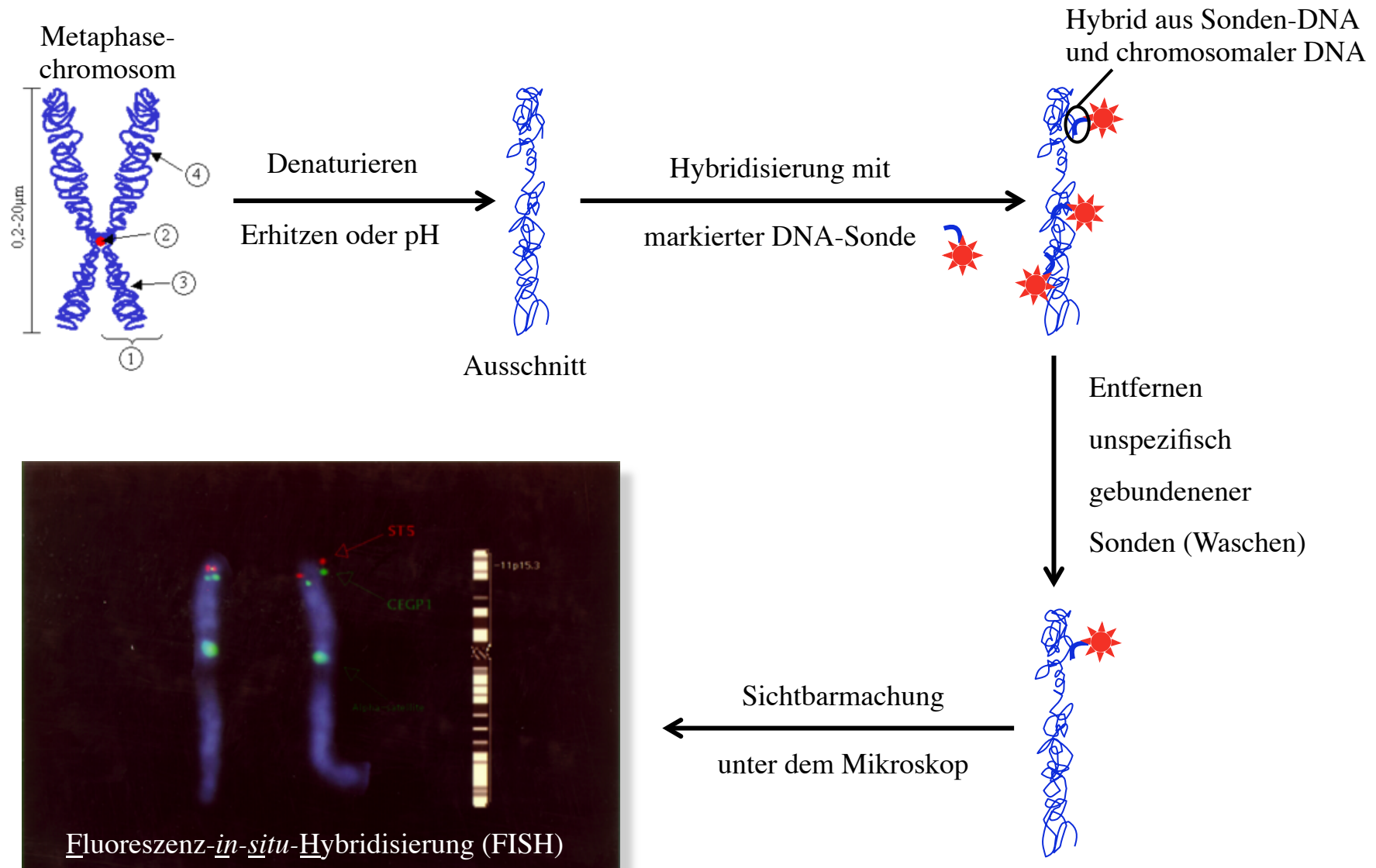
**Technische Säulen
der Molekulargenetik...**



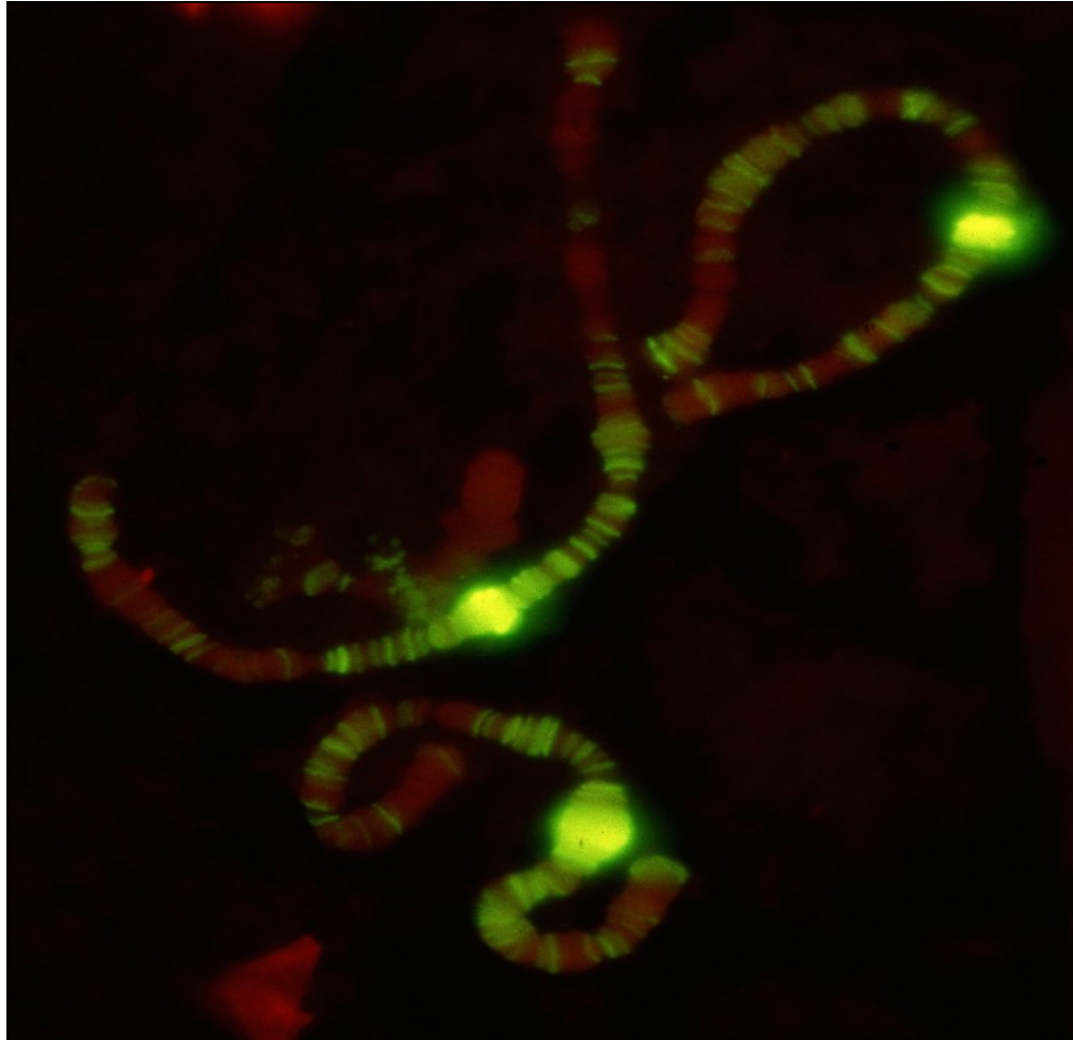
***In situ*-Hybridisierung von DNA-Sequenzen an Chromo- somen zur Genlokalisierung**

(kann erst im BSc Modul 13/14 bzw MSc gemacht werden)

Gen-Kartierung durch *In-situ*-Hybridisierung



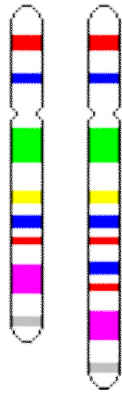
In situ-Hybridisierung an Polytänchromosomen



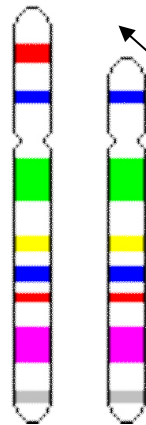
**Repetitive ‚DNA‘
in den
Centromeren und
auf den Chromo-
somenarmen**

➤ **Transposition**

Chromosomen-Mutationen



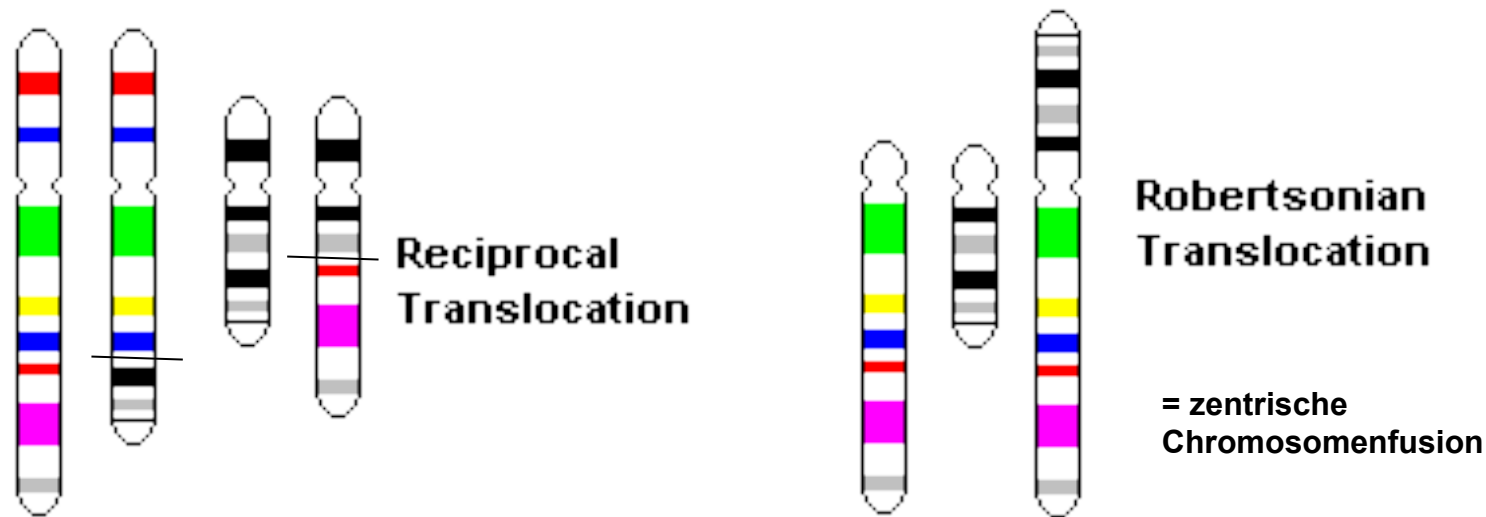
Duplikation (Dp, dup)



Deletion (Df, del)

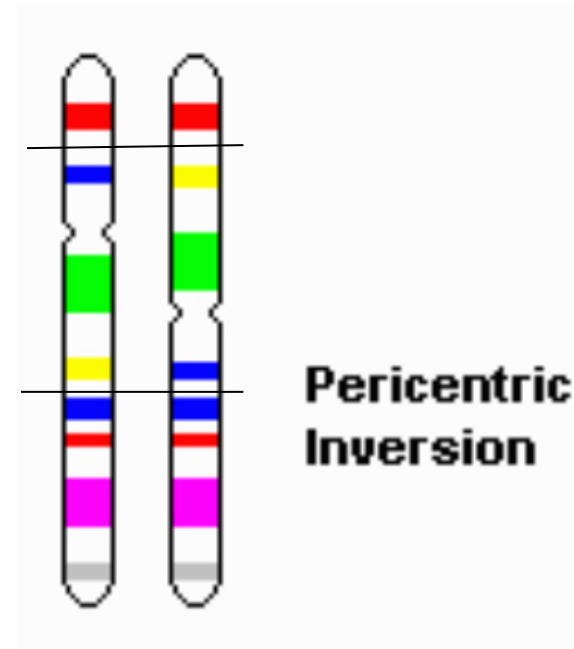
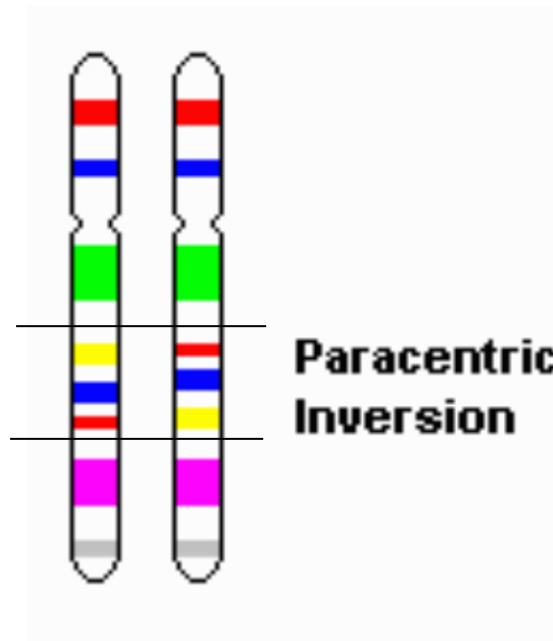
Chromosomen-Mutationen

Translokation (T, t)



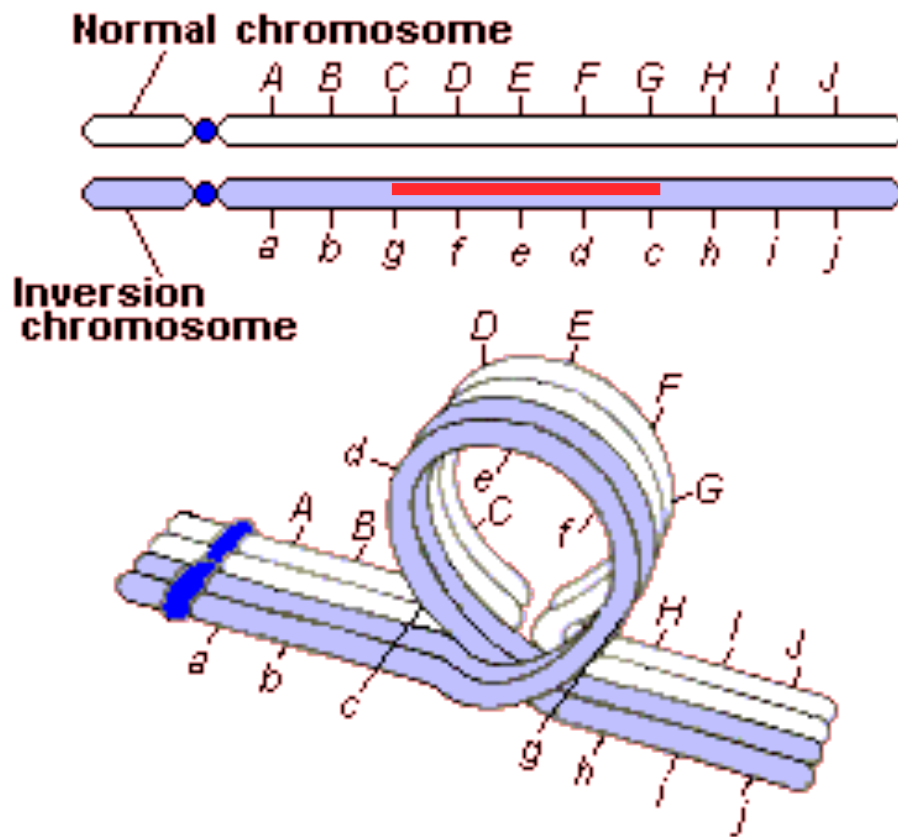
Chromosomen-Mutationen

Inversion (IN, inv)



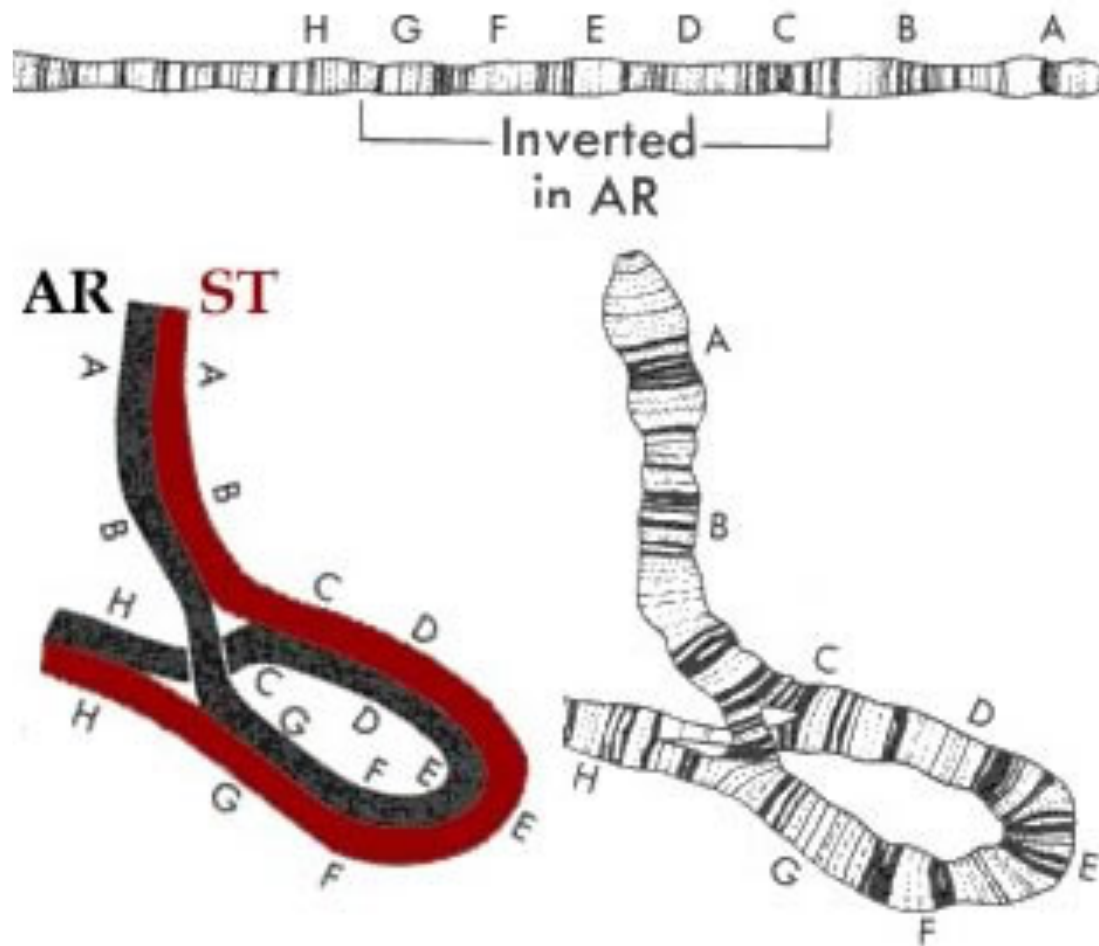
**Centromer innerhalb
der Inversion!**

Chromosomenpaarung bei Inversions-Heterozygotie



Zur Ausbildung der Paarung muss sich das Chromosom mit Inversion in eine Schlaufe legen!

Inversions-Heterozygotie bei *somatischer* Paarung

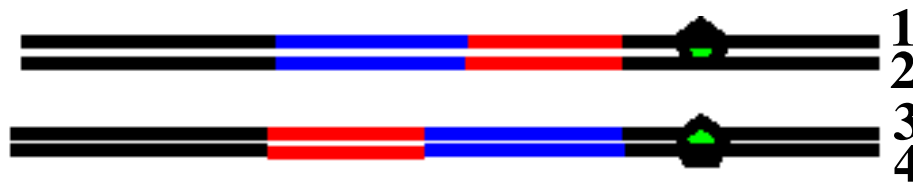


Typische
Inversions-Schleife
am Polytän-
chromosom

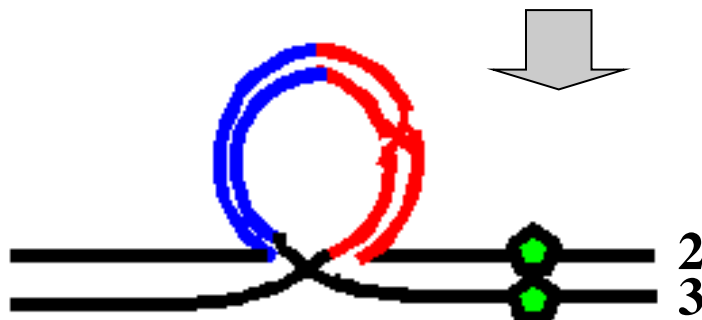
Achtung!

Während der meiotischen Paarung gibt es Probleme, wenn bei inversionsheterozygoten Individuen im Bereich der Inversion ein Crossing-over erfolgt!

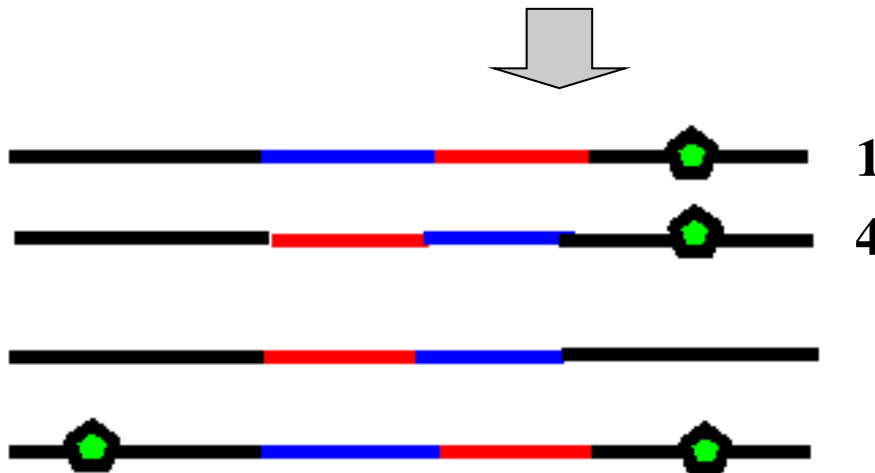
Parazentrische Inversion



Homologe Chromosomen,
Inversion heterozygot



Crossing-over in der Inversion
(z.B Nichtschwesterchromatiden
2 & 3 beteiligt)

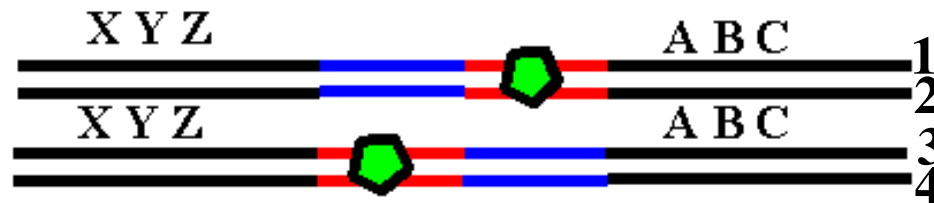


Chromatiden 1 & 4 sind OK!

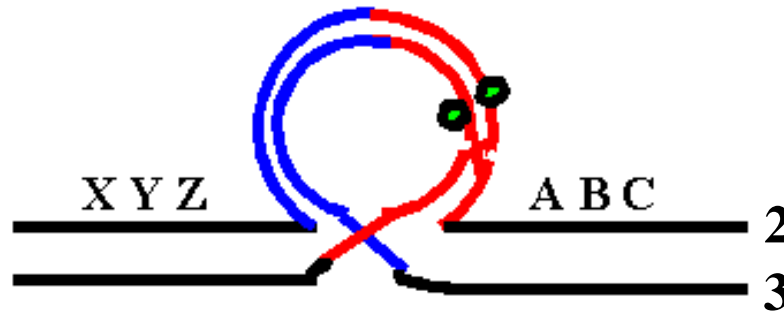
Chromatid ohne Centromer!!!

Di-zentrisches Chromatid!!!

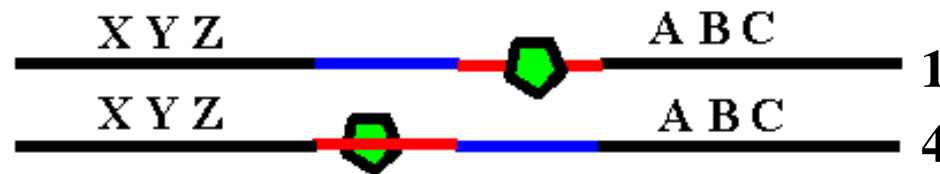
Perizentrische Inversion



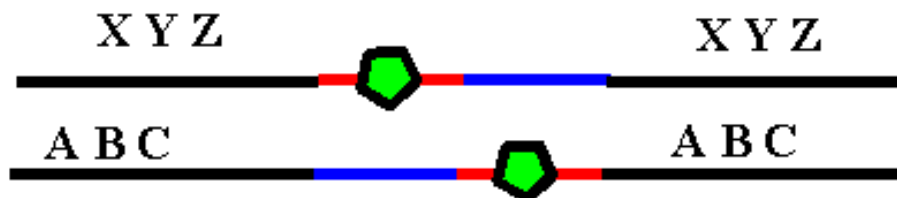
Homologe Chromosomen,
Inversion heterozygot



Crossing-over in der Inversion
(Nichtschwesterchromatiden 2 & 3
beteiligt)

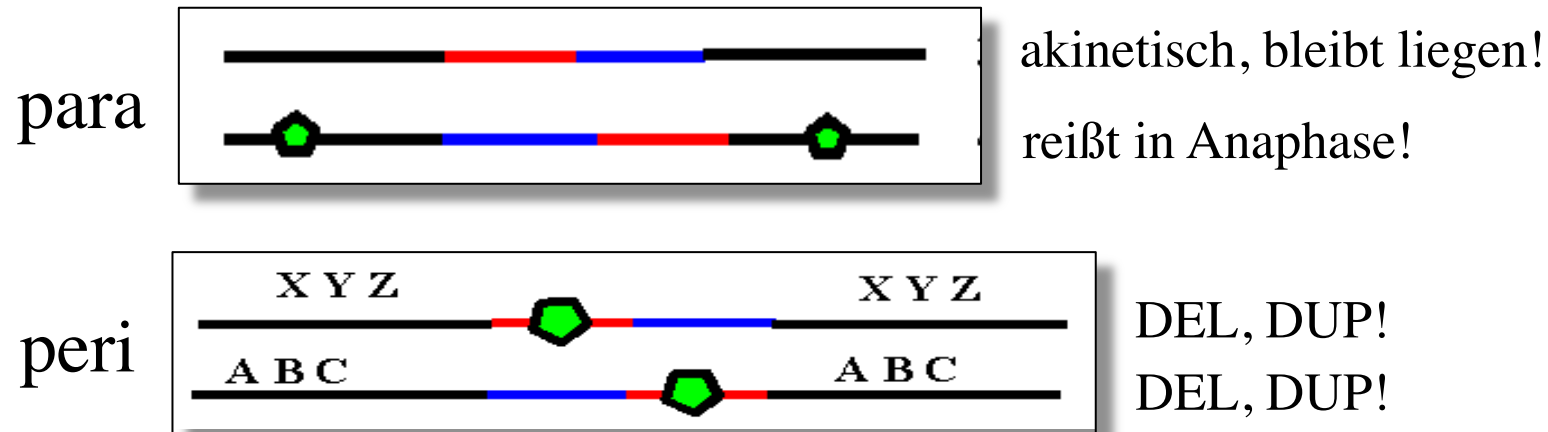


Chromatiden 1 & 4 sind OK!



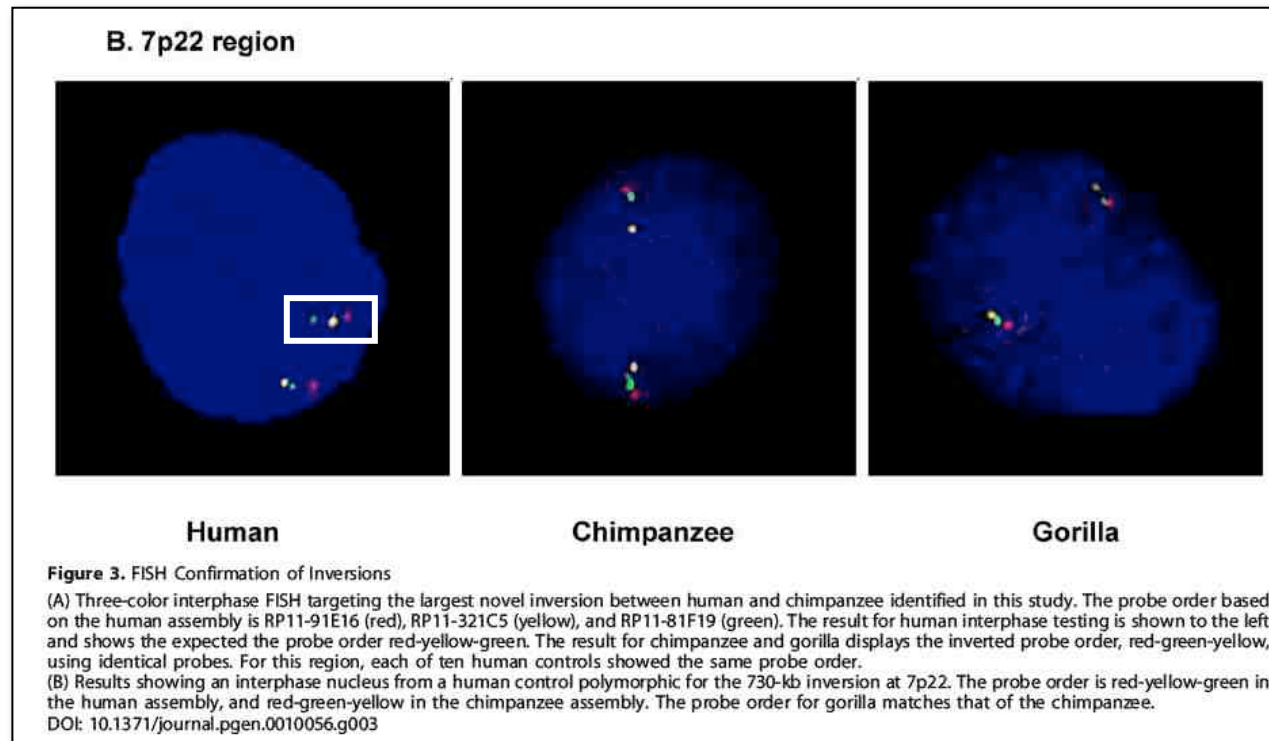
Chromatiden mit
DEL und DUP!!!

Genetische Konsequenzen



- die Hälfte der Meioseprodukte sind defekt!!
- reduzierte Fertilität, Spontan-Aborte

Genetische Diagnose



- Diagnose per in situ-Hybridisierung an Interphase-Kernen mit 3 Sonden

- Standardabfolge:

ROT - GRÜN - GELB

- menschliche Zelle ist heterozygot für die Inversion
- Möglicher Grund für Fertilitätsprobleme

Evolutionäre Konsequenzen

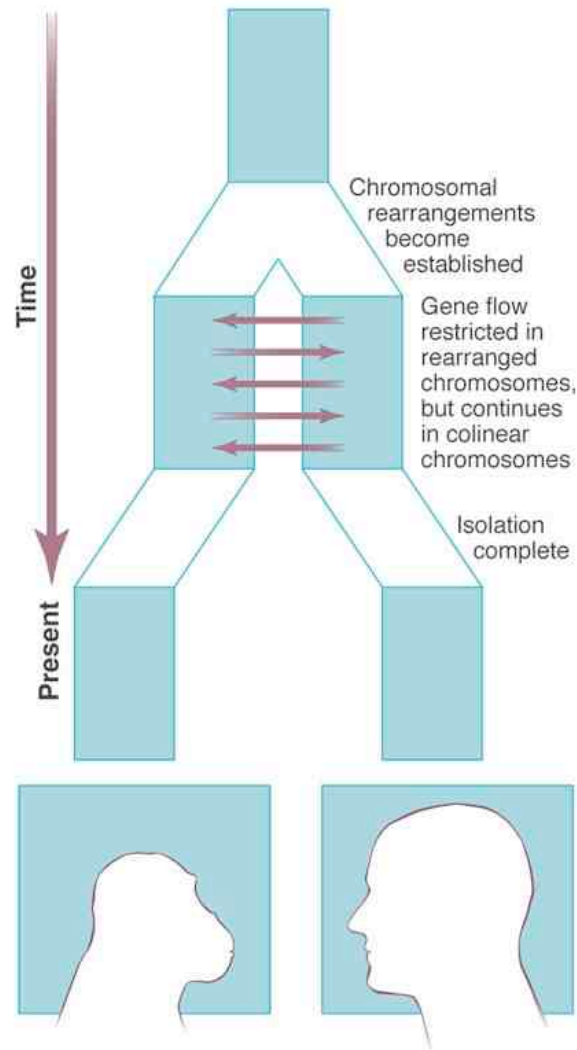
Chromatiden, bei denen Rekombination innerhalb der Inversion stattgefunden hat, führen zu nicht-lebensfähigen Nachkommen bzw. zu **schwersten Behinderungen!**



T. Dobzhansky

- Reduzierte Fitness in Heterozygoten
- Keine ‚Durchmischung‘ von Allelen im Inversionsbereich mehr
- langfristig: genetische Isolation von Populationen = **ARTBILDUNG!!!**

Evolutionäre Konsequenzen



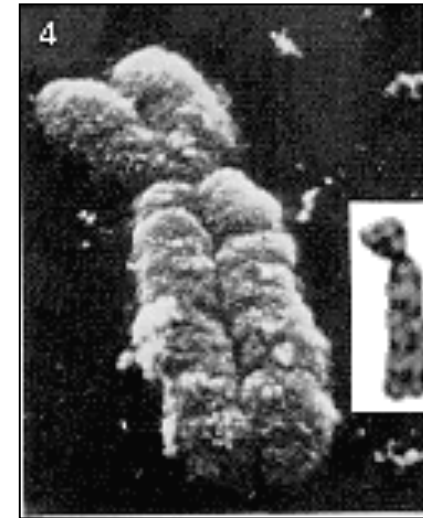
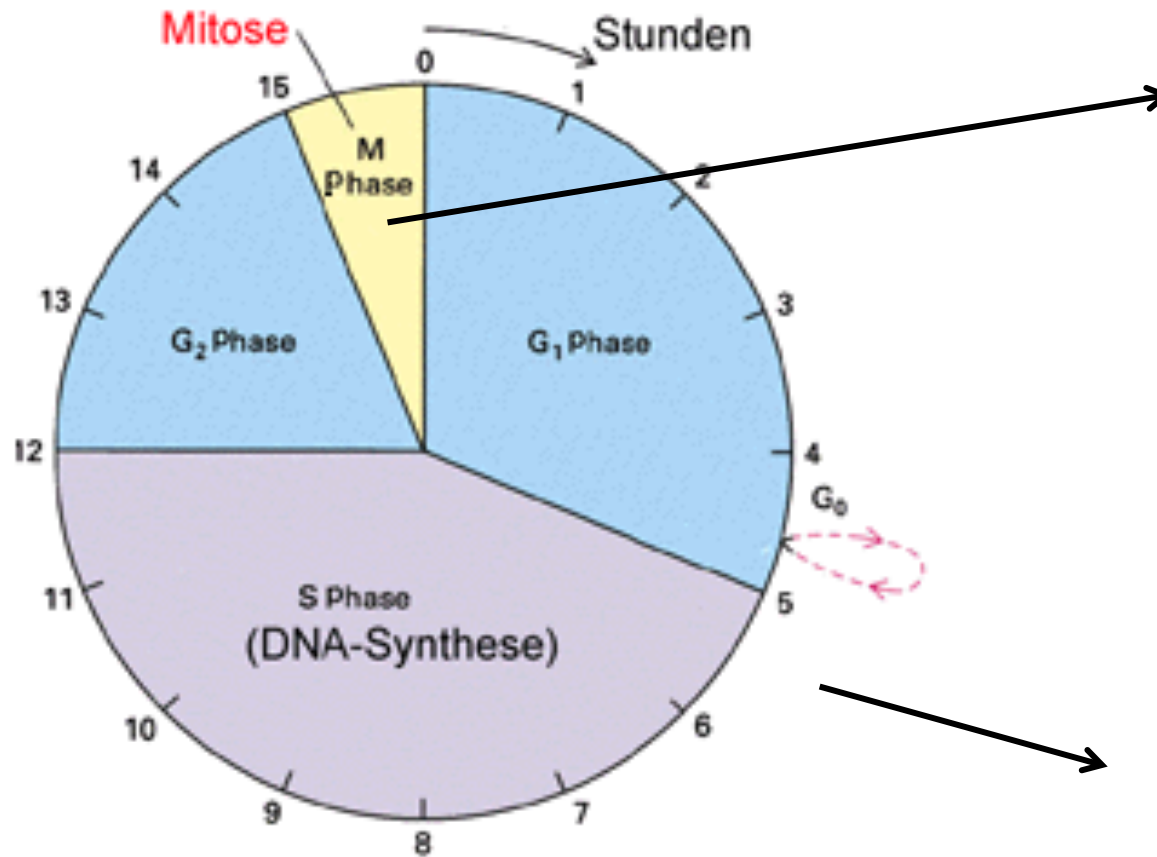
Mensch - Schimpanse:

- Mikroskop: 10 chromosomale Unterschiede (9 Inv.)
 - Genomvergleich:
 - 1576 Inversionen
 - 33 davon > 100 Kb
 - die größte Inv hat 4.3 Mio Bp
 - 29 Inv. betreffen Genregionen!!!
 - 3 Inversionen sind polymorph in der menschlichen Population
- Die Evolution des menschlichen Genoms durch Rearrangements (und natürlich auch andere Mutationen) geht weiter...

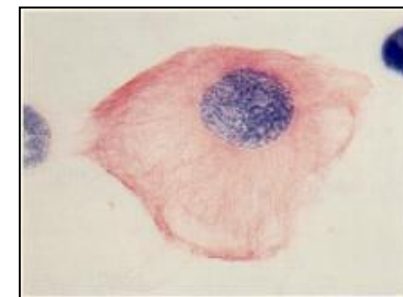
Human origins. Chromosomal rearrangements appear to have triggered the separation of humans from the great apes by providing a barrier to gene flow in rearranged chromosomes. In contrast, gene flow continued for genes on colinear chromosomes.

Chromosomen im Zellzyklus

Zeitablauf eines typischen Zellzyklus

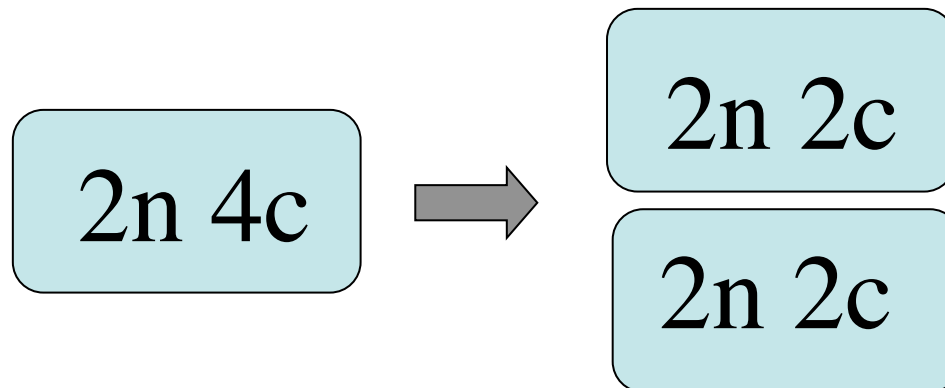
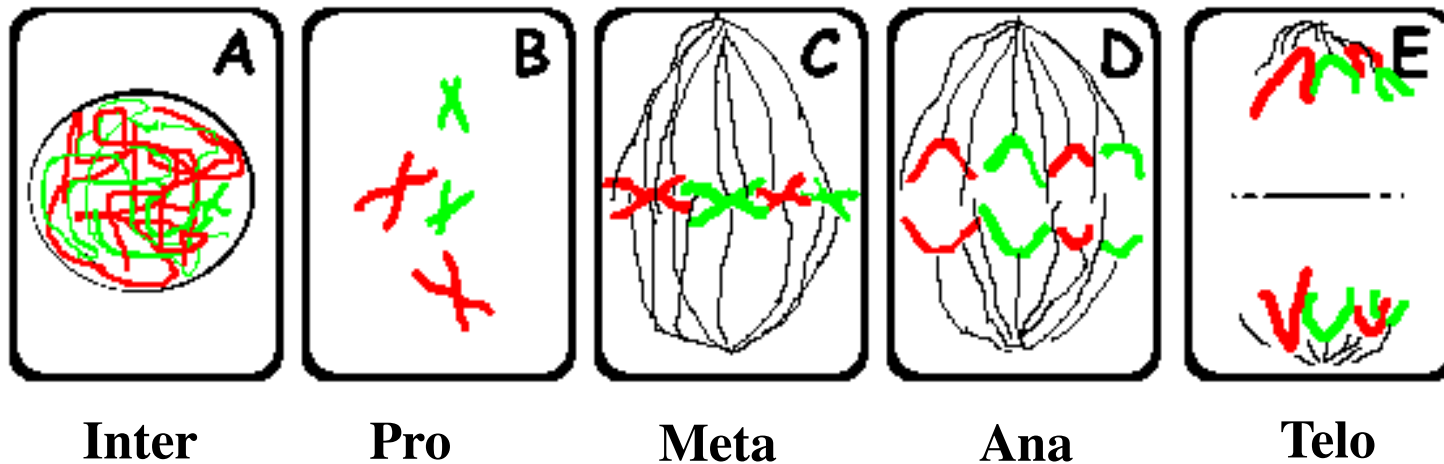


Mitot. Metaphase



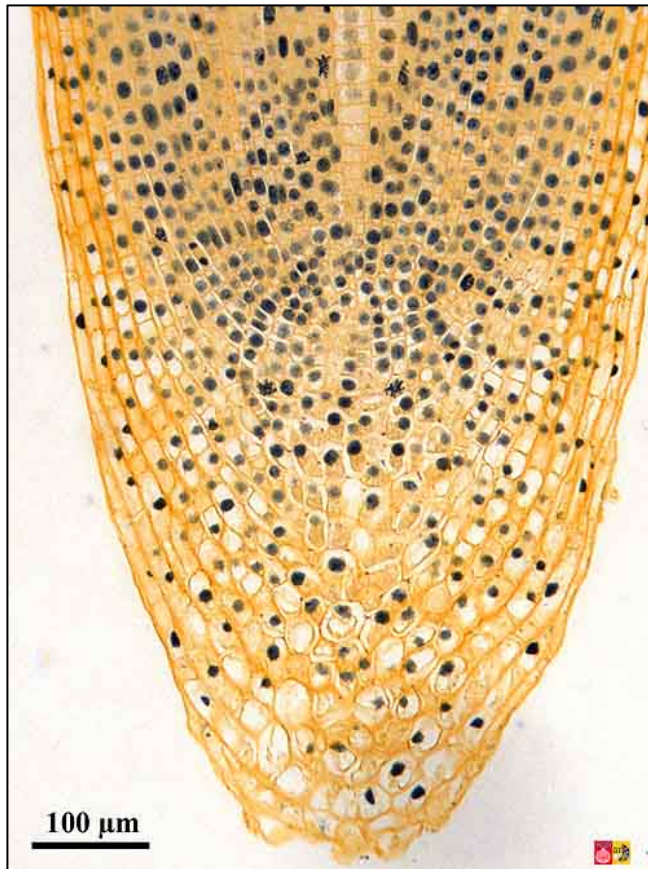
Interphase

Mitose

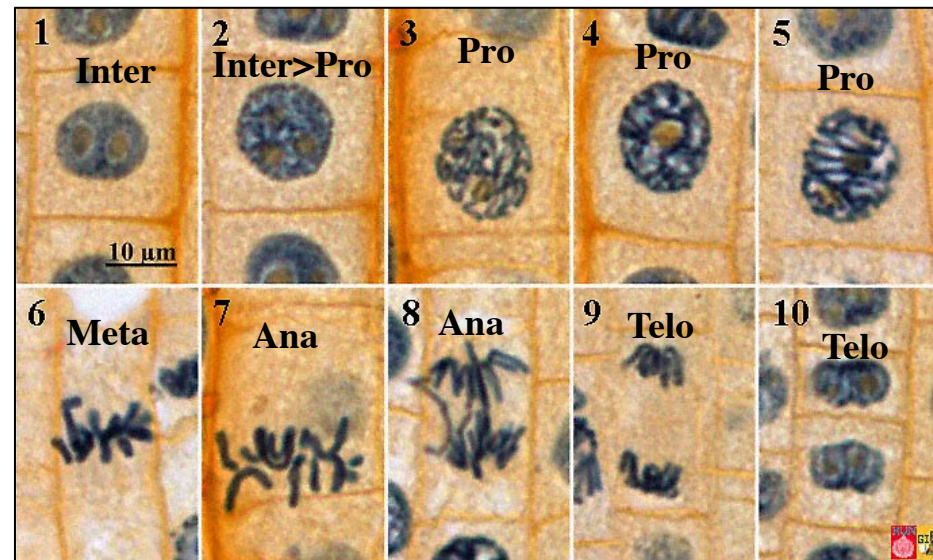




Mitose-Stadien

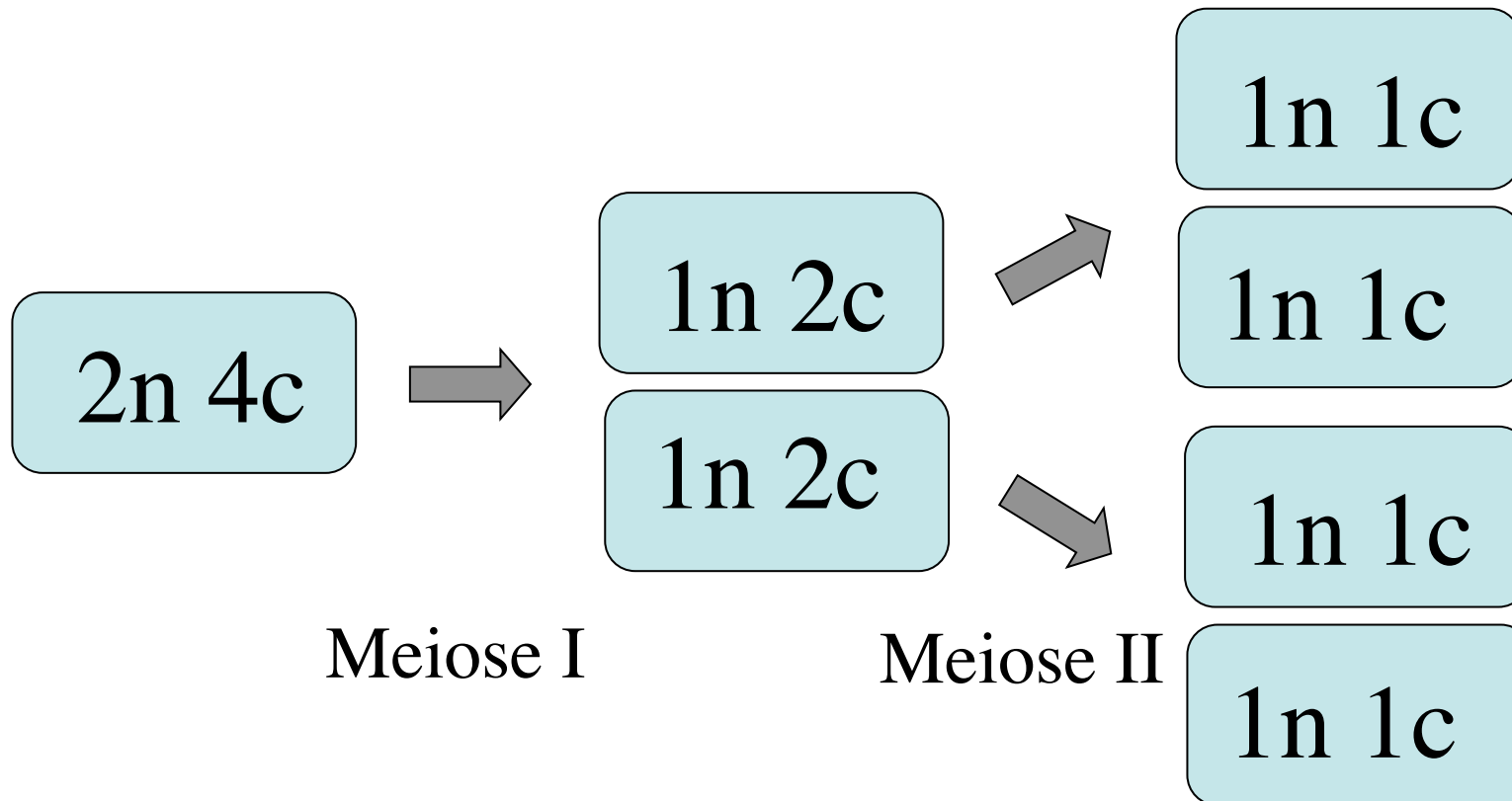


Wurzelspitzenmeristem



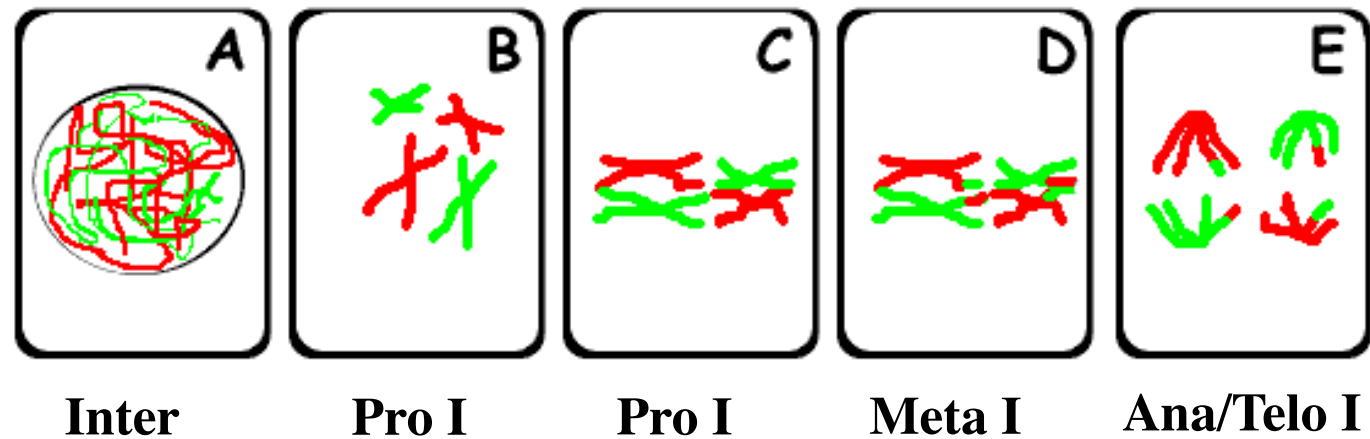
Meiose

meion *gr.* = reduzieren

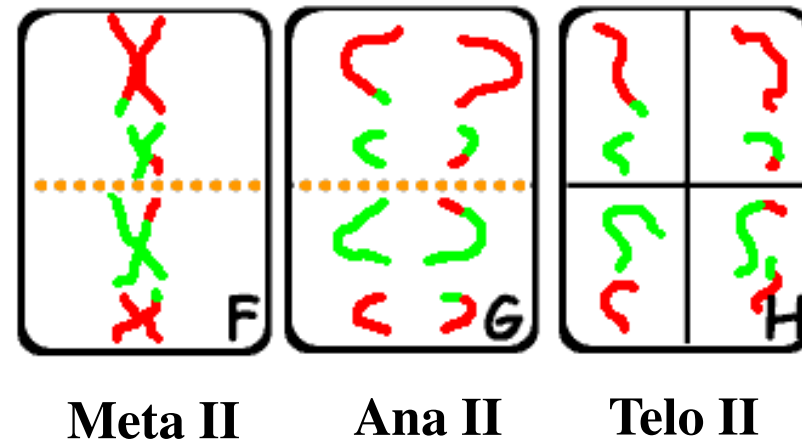


Meiose-Stadien

Meiose I



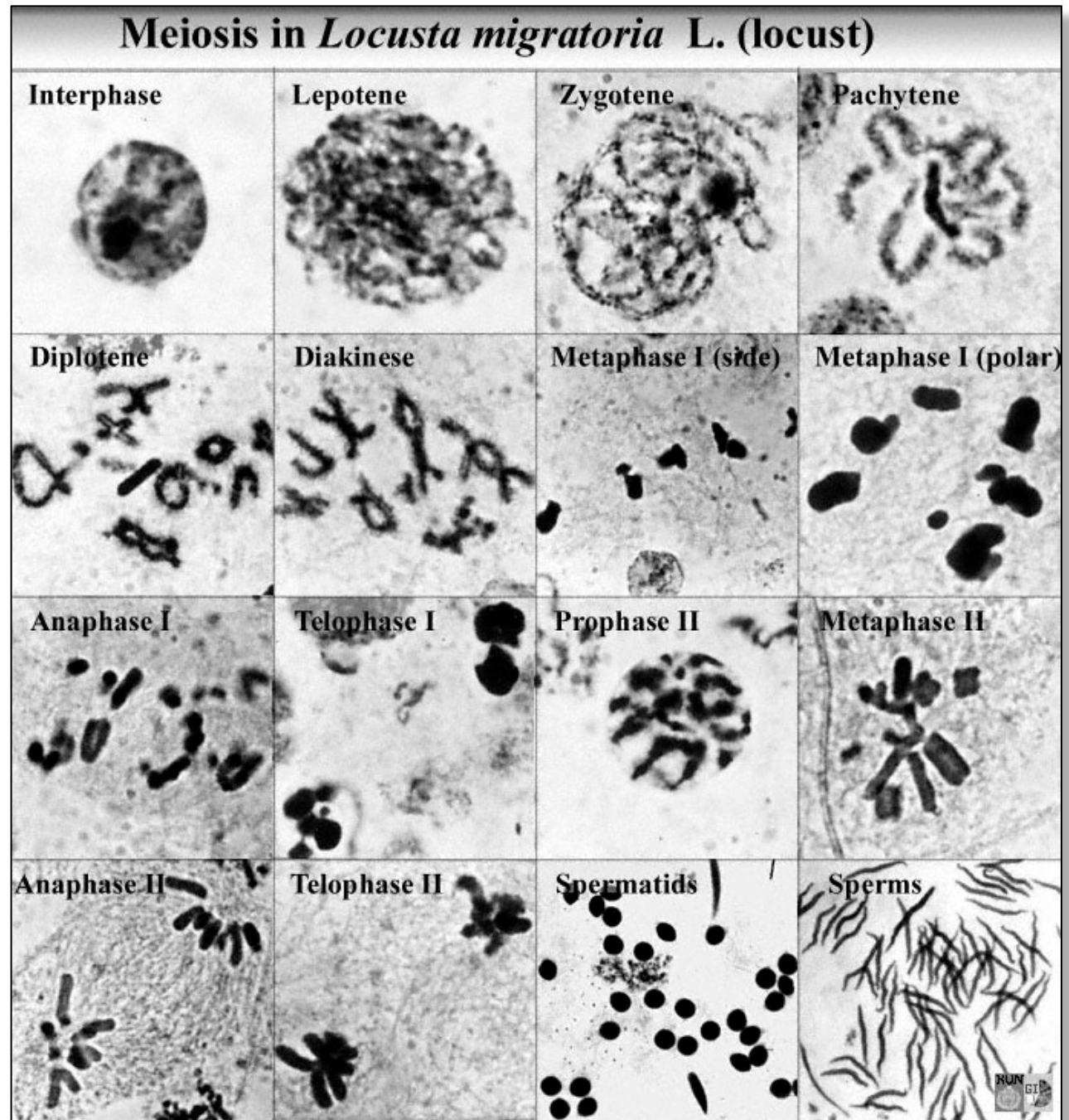
Meiose II



Meiose- Stadien



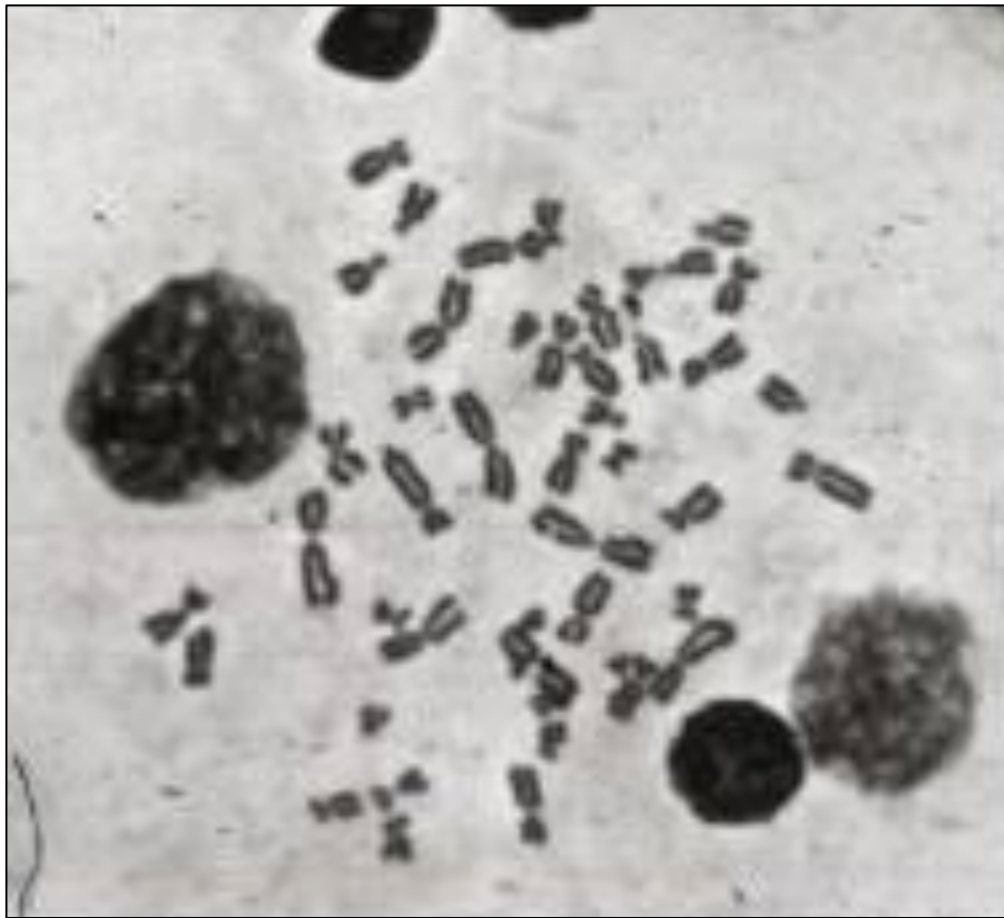
www.vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/meiostage



Zum praktischen Teil:

- Bitte nur die Wurzelspitzen verwenden (ca. 0,5 cm)!
- Möglichst junge Wurzeln (kurze) verwenden, da diese mehr mitotisch aktive Zellen haben als alte (lange) Wurzeln
- Hyazinthen: 10 Min. bei 70°C inkubieren
Küchenzwiebeln: 10 Min. bei 70°C inkubieren

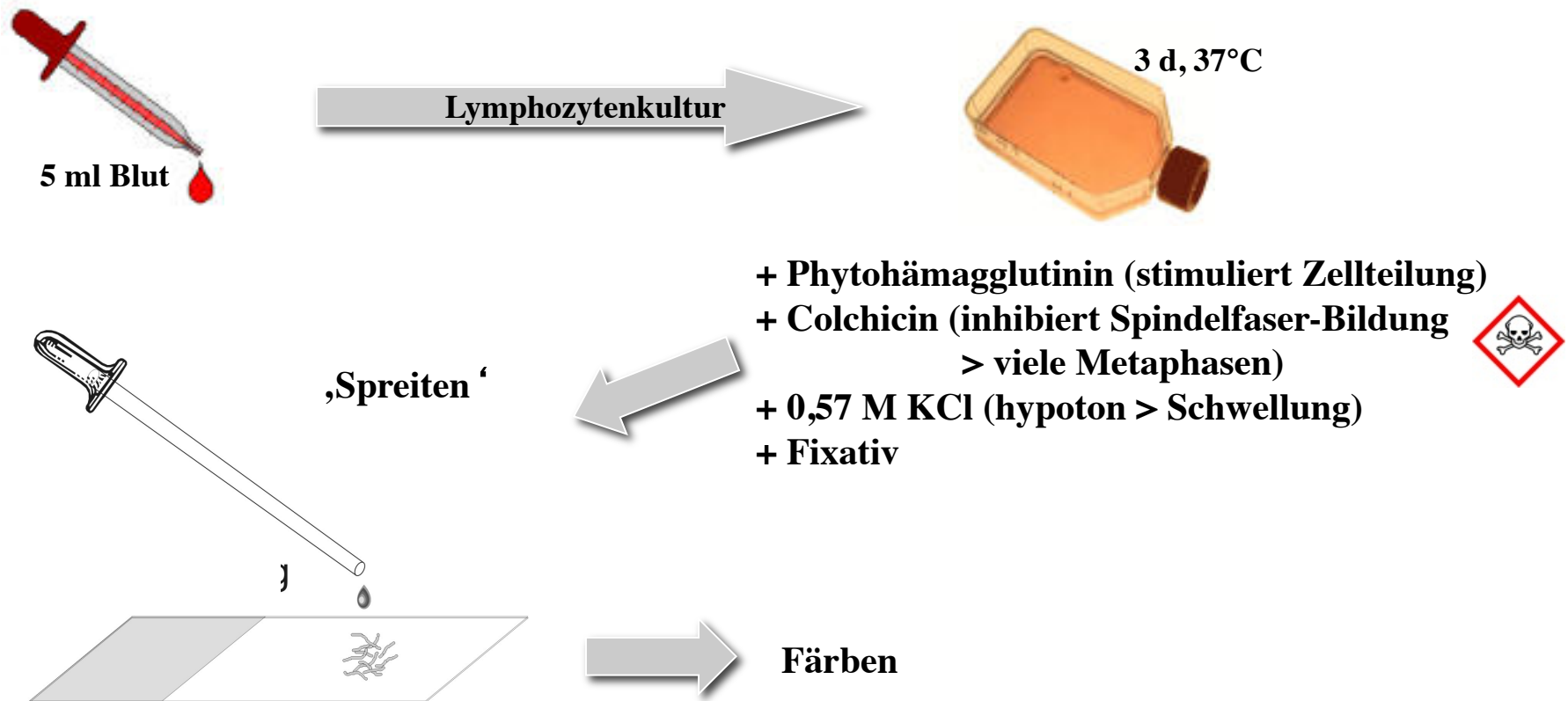
Menschliche Metaphase-Chromosomen



$$2n = 46$$

(Tijo & Levan **1956!**)

Präparation menschlicher Metaphase-Chromosomen



Färbetechniken

Giemsa-Banden

(syn. GTG, G-bands by Trypsin using Giemsa)

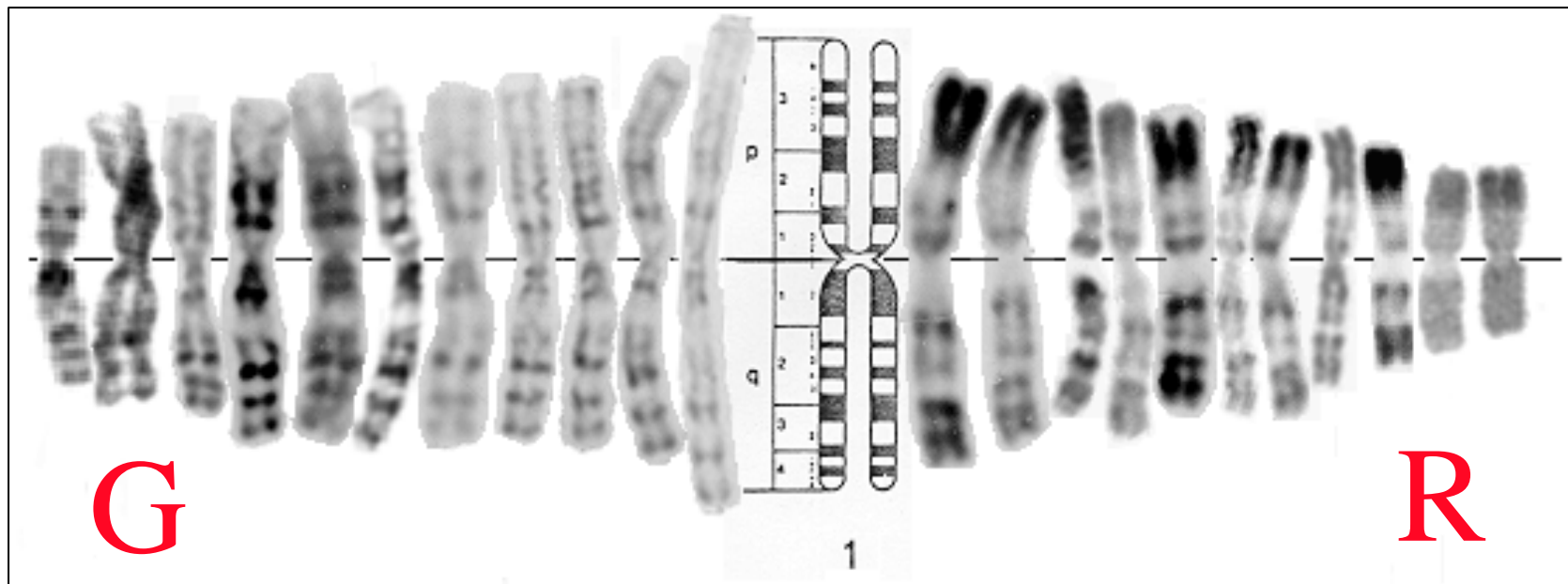
Reverse-Giemsa-Banden

(heisse Pufferlösung anstatt Trypsin)

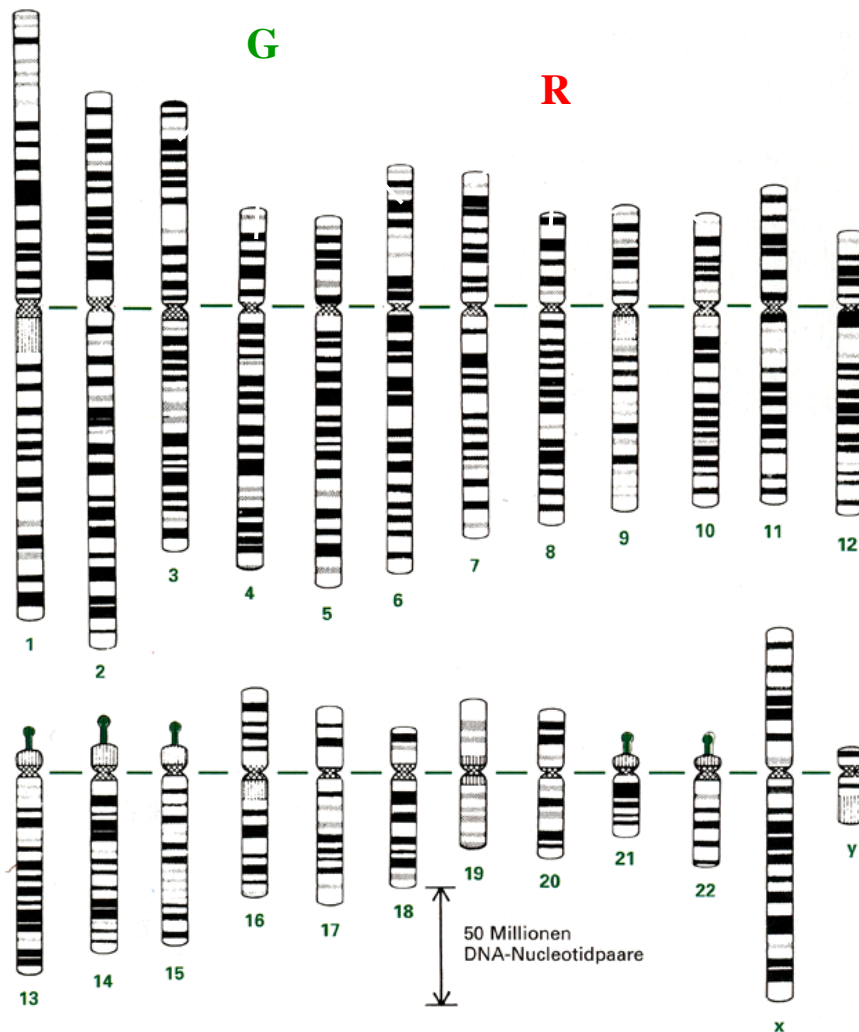
C-Banden (nur Centromere)

Q-Banden (Quinacrin-Fluoreszenz ~ G-Banden)

G- und R-Bandierung



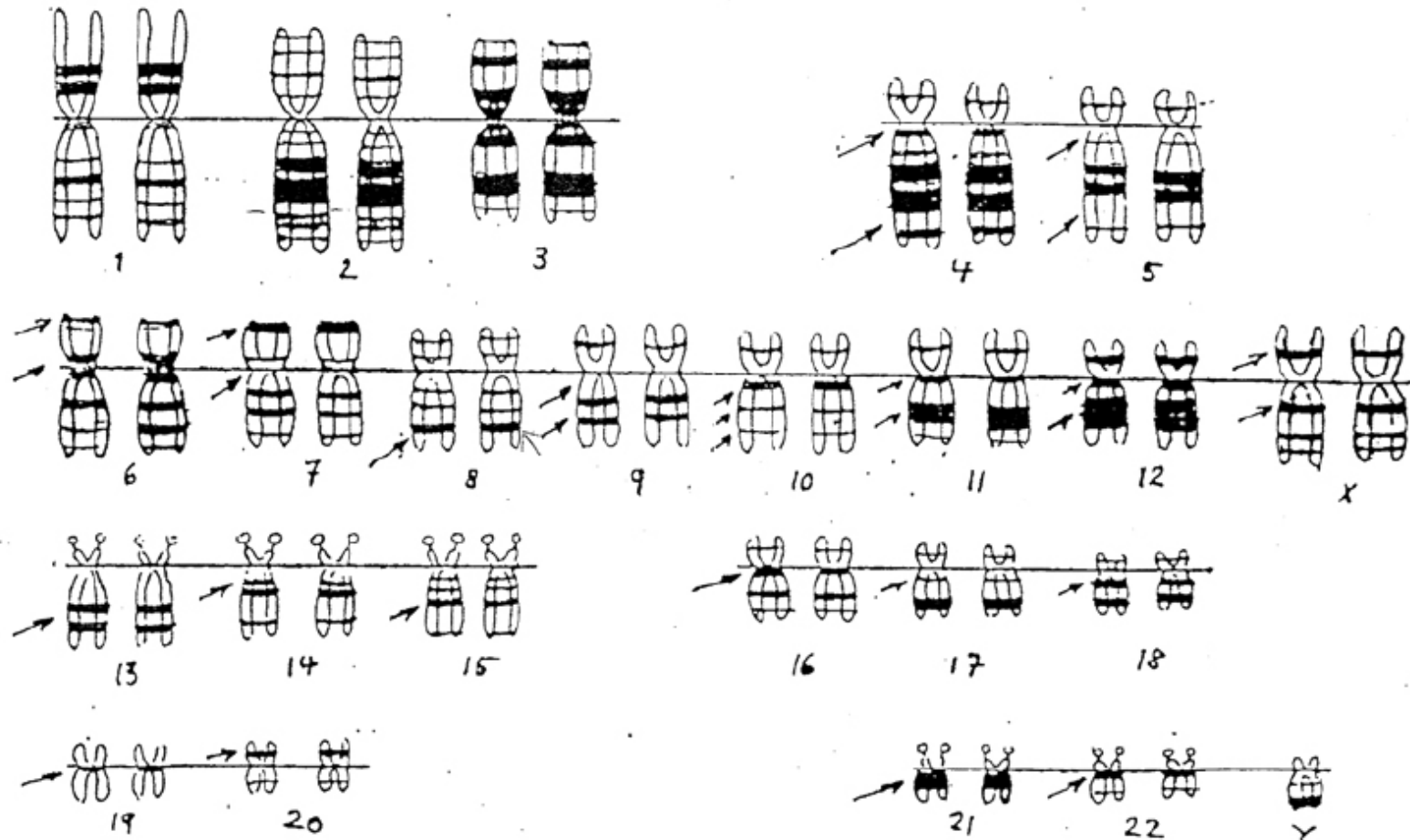
G-Bandierung



- **R**-Banden (revers: nicht gefärbt nach Trypsin-Behandlung):
überdurchschnittlich viele Gene, GC-reich, frühe Replikation, beim Menschen reich an Alu-Sequenzen
- **G**-Banden (Giemsa-gefärbt nach Trypsin-Behandlung): wenige Gene, AT-reich, späte Replikation, beim Menschen reich an LINE-Elementen
- Zahl der Banden pro Karyotyp variiert zwischen 300 und 2000, abhängig vom Kondensationsgrad.

„Giemsa-Spicker“:

Die prägnantesten G-Banden



To do...

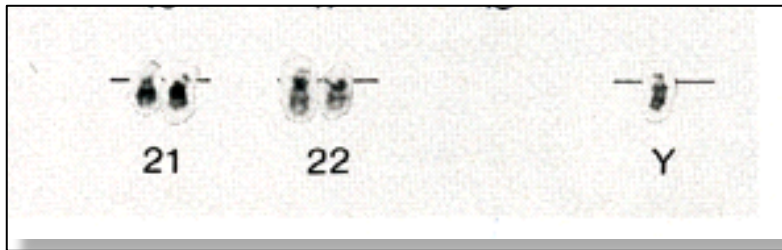


1. Geschlechtsbestimmung durch Karyotypanalyse

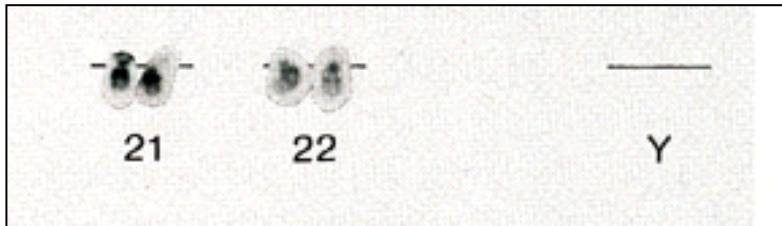


2. Geschlechtsbestimmung durch Barr-Body-Präparation (optional)

Geschlechtsbestimmung durch Karyotypanalyse

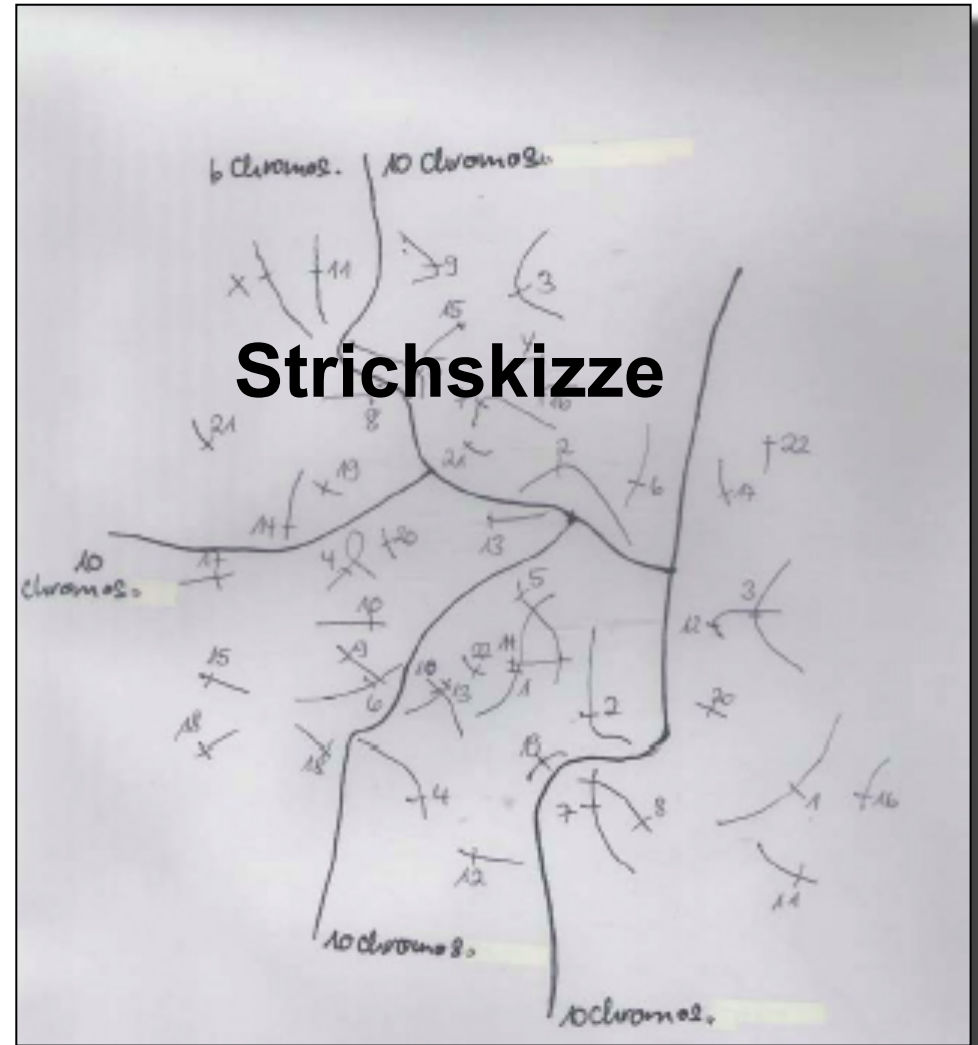


Fünf kleine,
telozentrische Chromosomen

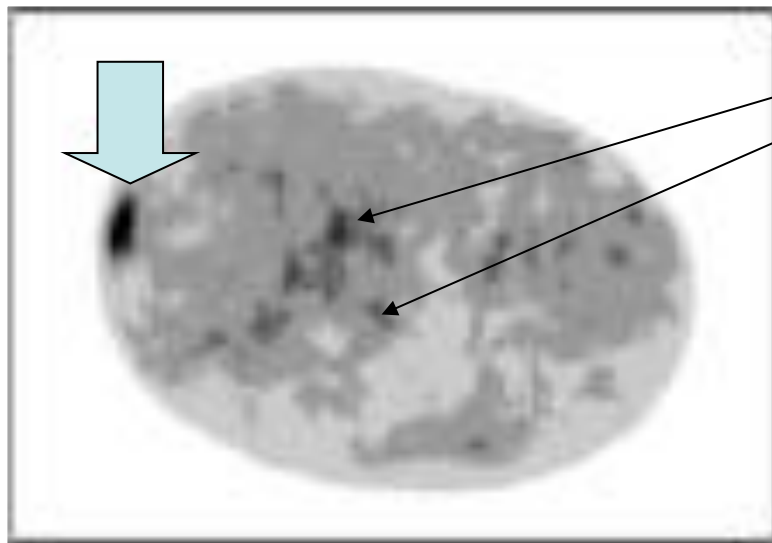


Vier kleine,
telozentrische Chromosomen

Karyotyp-Auswertung

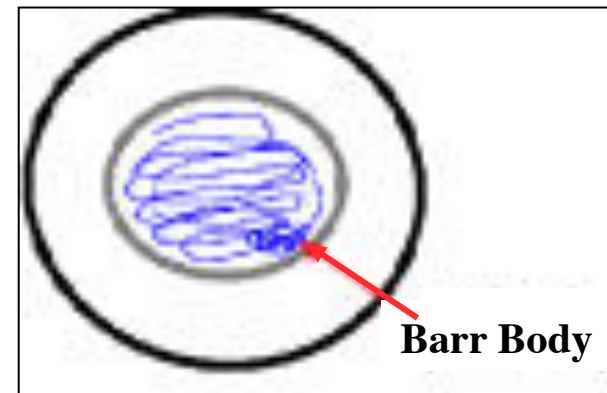


Geschlechtsbestimmung durch Barr-Körperchen



Centromer-Heterochromatin

Nur in ca. 30-70% der Kerne zu sehen!

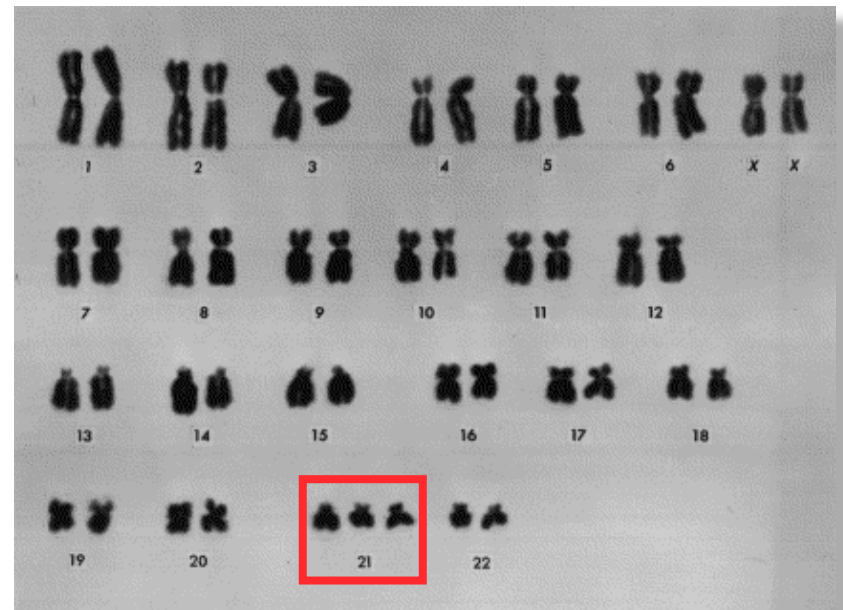
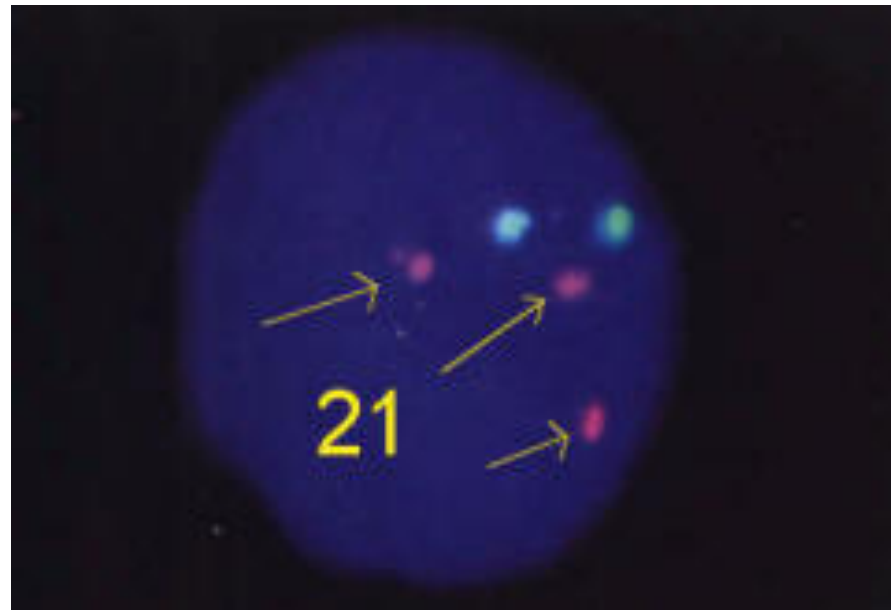


Barr Body

Chromosomen-Aberrationen

- > 600 beschriebene Chromosomenaberrationen
- 20 % aller Zygoten mit Chromosomenstörungen!!
- 0,6 % bei Lebendgeburten
- numerische Aberrationen (**Aneuploidien**):
 - > durch *non-disjunction*, altersabhängig
 - > selten lebensfähig (bis auf Trisomien 13/18/21)
- Struktur-Aberrationen

In situ-Hybridisierung von Chromosom-21-DNA



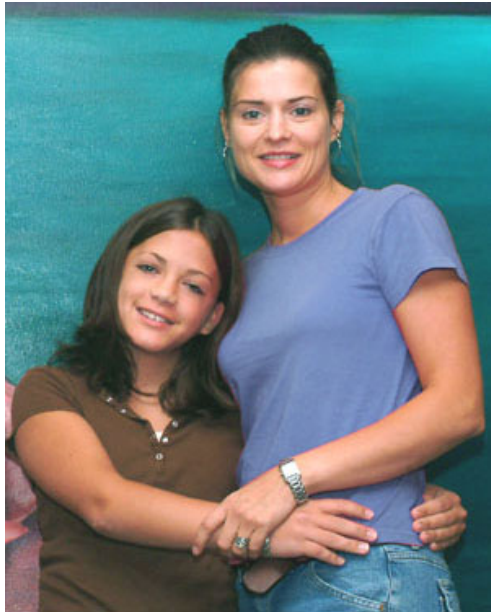
- 1/800 Lebendgeburten
- Non-Disjunction in weiblicher Meiose wohl häufigste Ursache
- Mitotische Non-Disjunction in Ovar ebenfalls wichtig
- Paternales Alter hat geringen (aber nachweisbaren) Effekt

Klinefelter (47, XXY)



- 1/700 Geburten
- Hodenatrophie, Sterilität
- Osteoporose
- Brustwachstum
- Intelligenz unauffällig
(Retardierung bei ≥ 3 X)
- Lebenserwartung normal

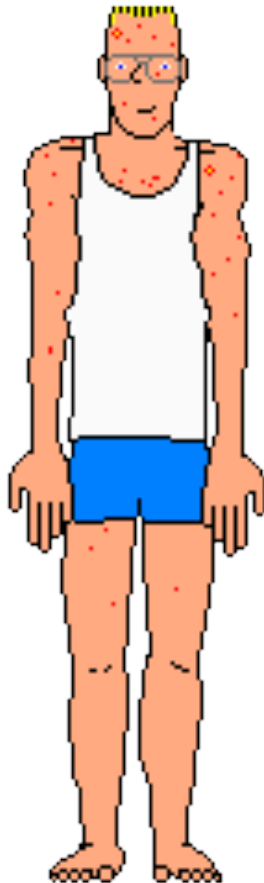
Turner (45, X)



- 1/2500 Geburten
(95% der Föten sterben vorher)
- Kleinwuchs (110-150 cm)
- Thorax-, Hals-Anomalien
- Intelligenz unauffällig
- Gonaden steril
- Lebenserwartung normal

,Supermale' (47, XYY)

1/1000



Your XYY Son

1. Tall is cool.
2. Acne is easy and safe to treat.
3. The IQ range for XYY's is the same as for XY men.
4. Like all boys, he needs a clean-living, effective dad or dad-substitute.
5. Like all boys, he needs to be allowed to find his own worthwhile interests and activities, according to his abilities and talents.
6. Despite decades of bad science and media hype, XYY is at most a minor risk factor for antisocial and criminal misbehavior.
7. If he's "a little different" -- hey, who isn't?
8. **You made the right choice.**

Dreifache Gendosis
von SHOX-Gen in PAR1

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357573>