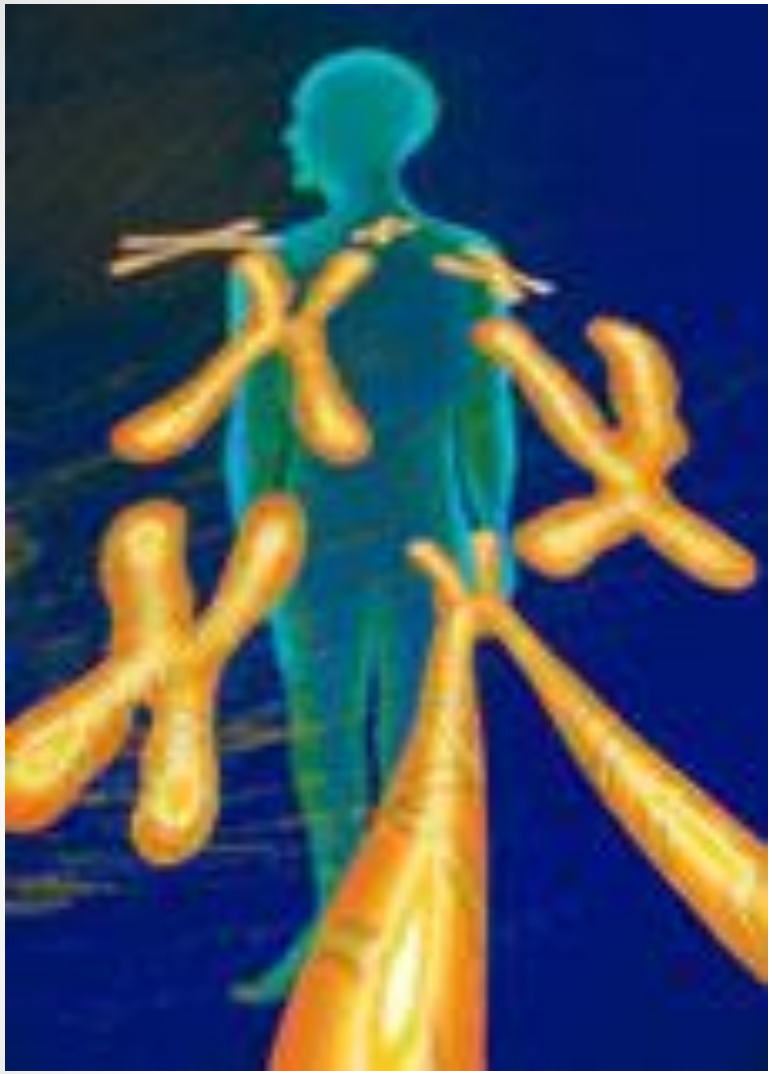
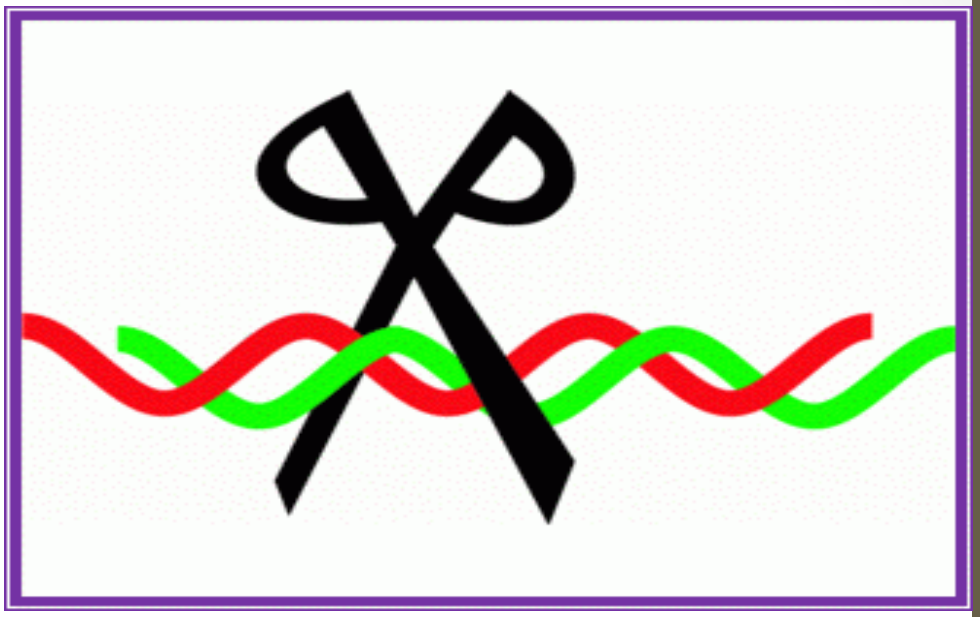
გენეტიკურ დარღვევათა დიაგნოსტიკასა და მკურნალობაში გამოყენებული მოლეკულურ-გენეტიკური ტექნოლოგიები

ნანა დვალიშვილი

Applied Biosciences and Biotechnology 2019 - 2nd International School/Conference
April 1-5, 2019, Tbilisi, Georgia

Tbilisi State University (TSU), Caucasus International University (CIU)



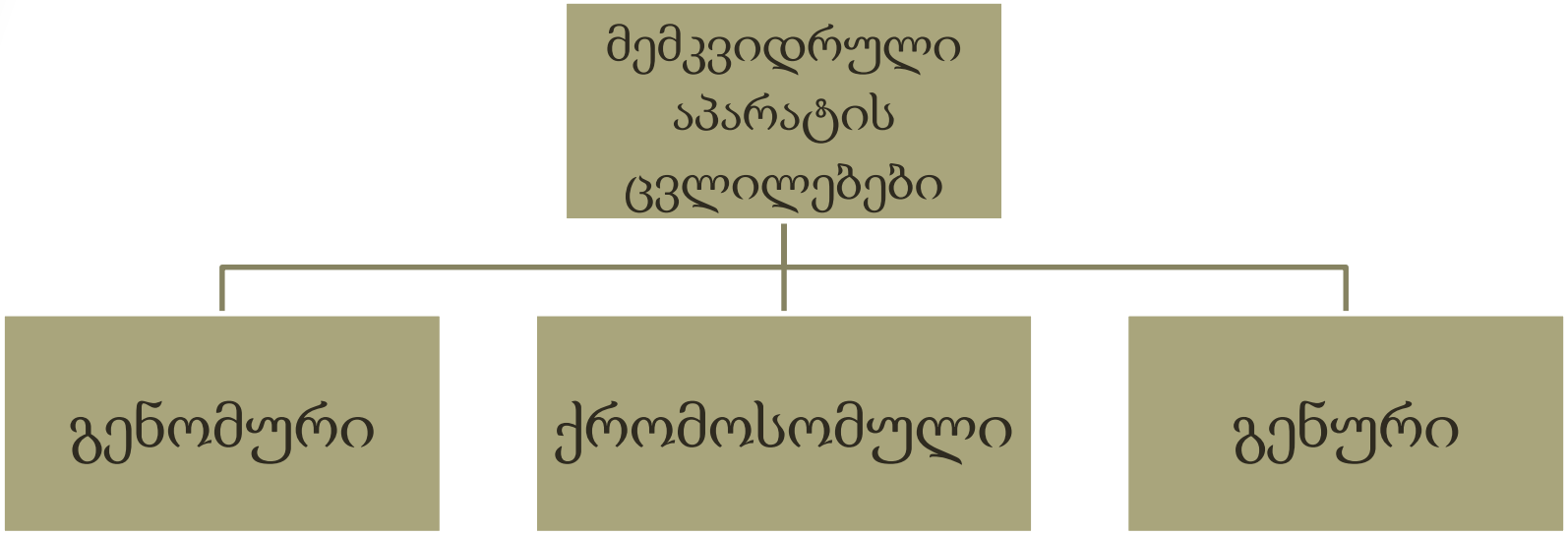


სამედიცინო გენეტიკის მიზნები:

- გენეტიკურ დაავადებათა გამომწვევი დარღვევების იდენტიფიკაცია
- ჯანმრთელობაზე მათი ზეგავლენის შესწავლა
- დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის მეთოდების შემუშავება და სრულყოფა ამ ინფორმაციაზე დაყრდნობით

ტრადიციული და უახლესი ტექნო-ლოგიების გამოყენებით ტარდება

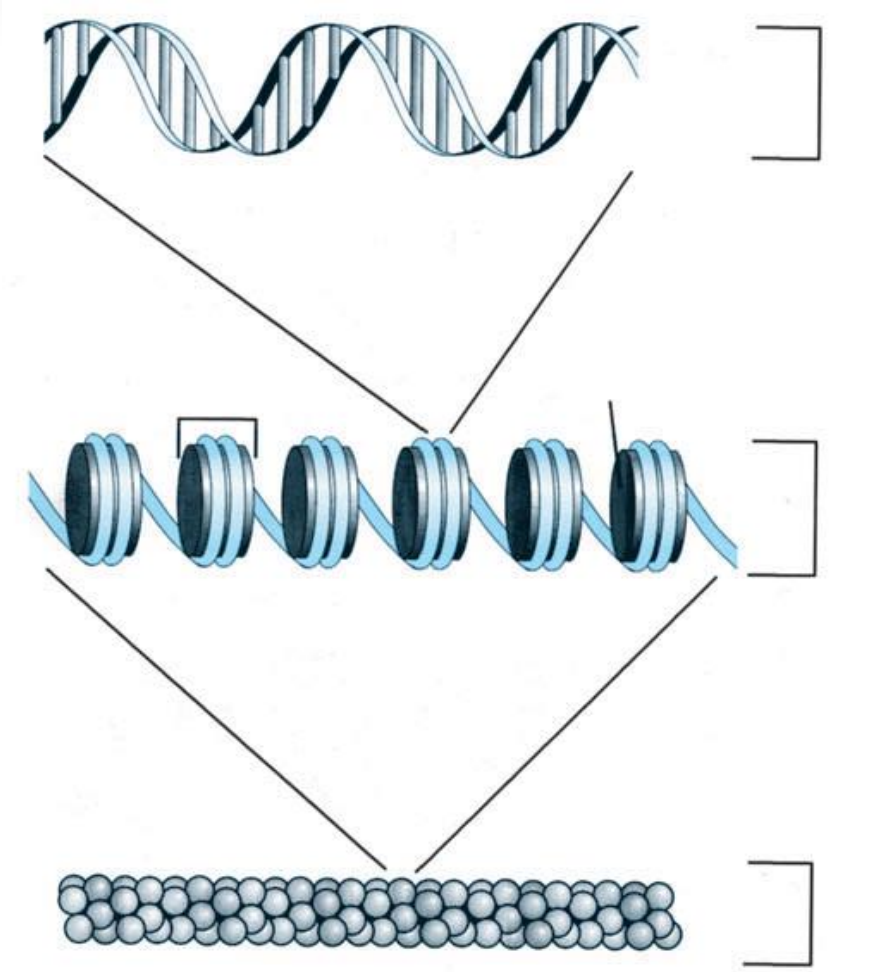
- გენომის კვლევა გენომური მუტაციების გამოვლენის მიზნით
- ინდივიდუალური ქრომოსომების კვლევა მათი სტრუქტურის დაზიანების გამოვლენის მიზნით
- ნორმალური და დაზიანებული გენების დეტალური ანალიზი
- გენთა ექსპრესიის კვლევა ნორმასა და პათოლოგიაში

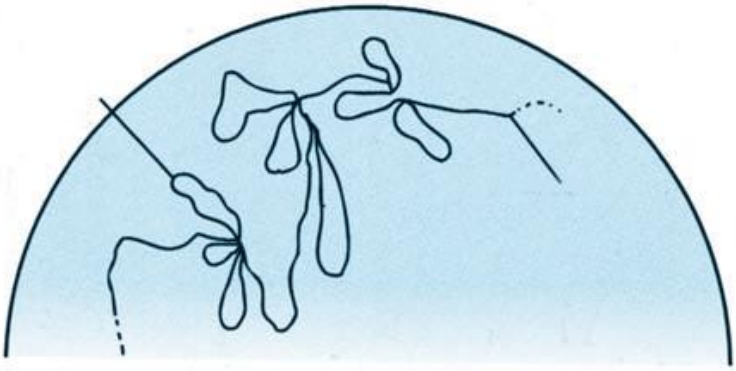

მემკვიდრული აპარატის ცვლილებები
გენომური
ქრომოსომული
გენური

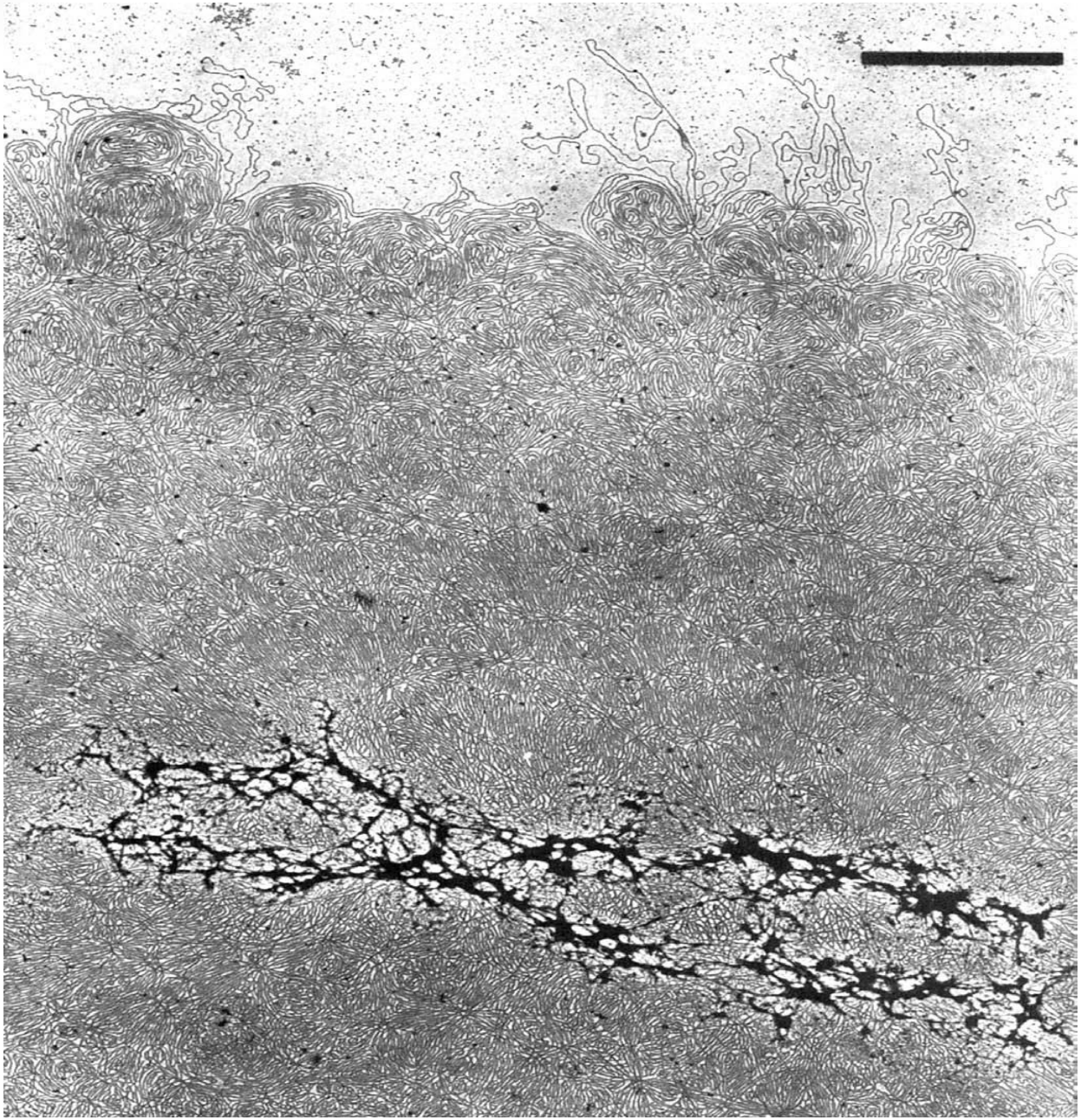
ადამიანის ქრომოსომათა კომპლექტი

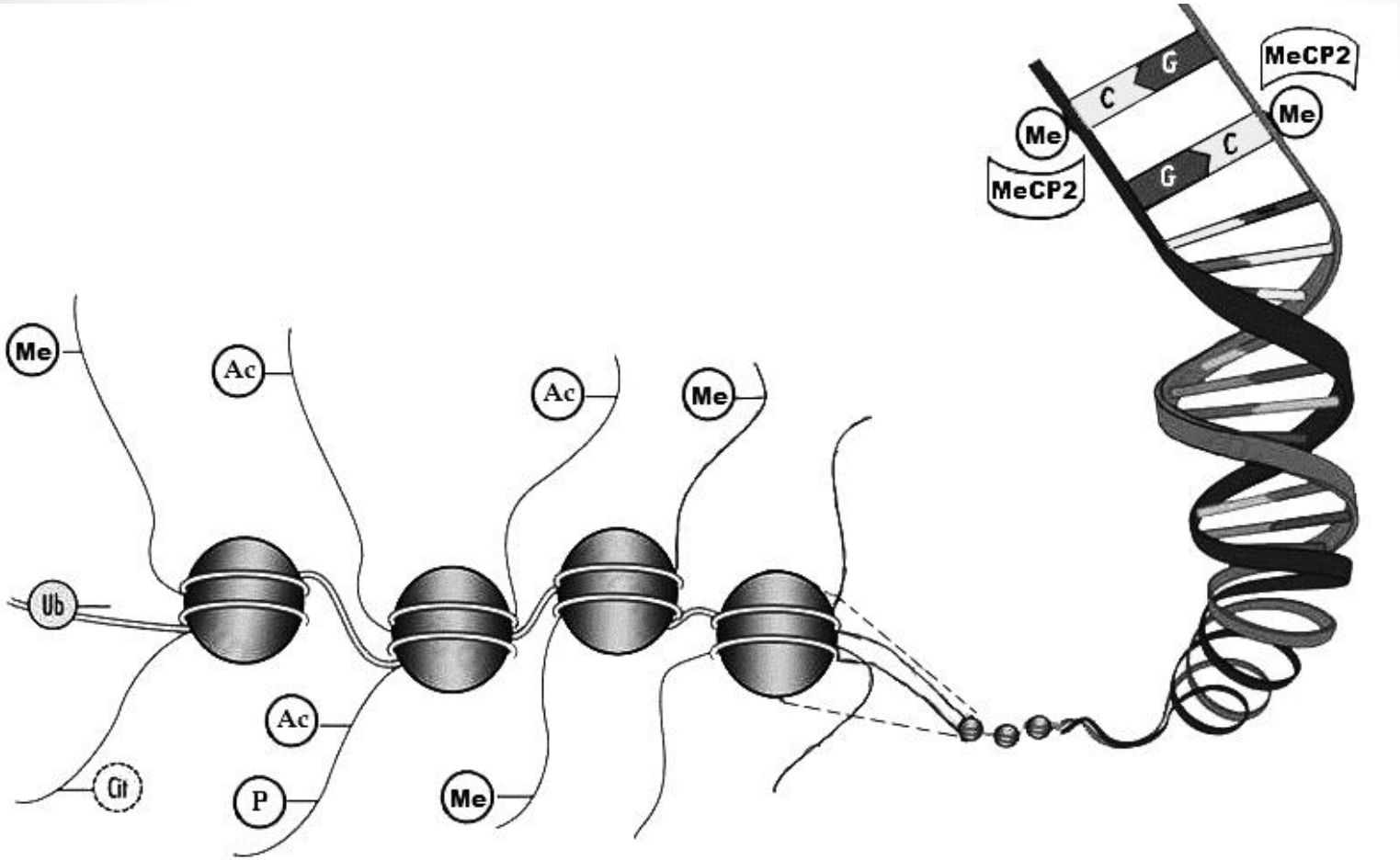
სასქესო ქრომოსომები

Image courtesy Indigo Instruments (www.indigo.com)



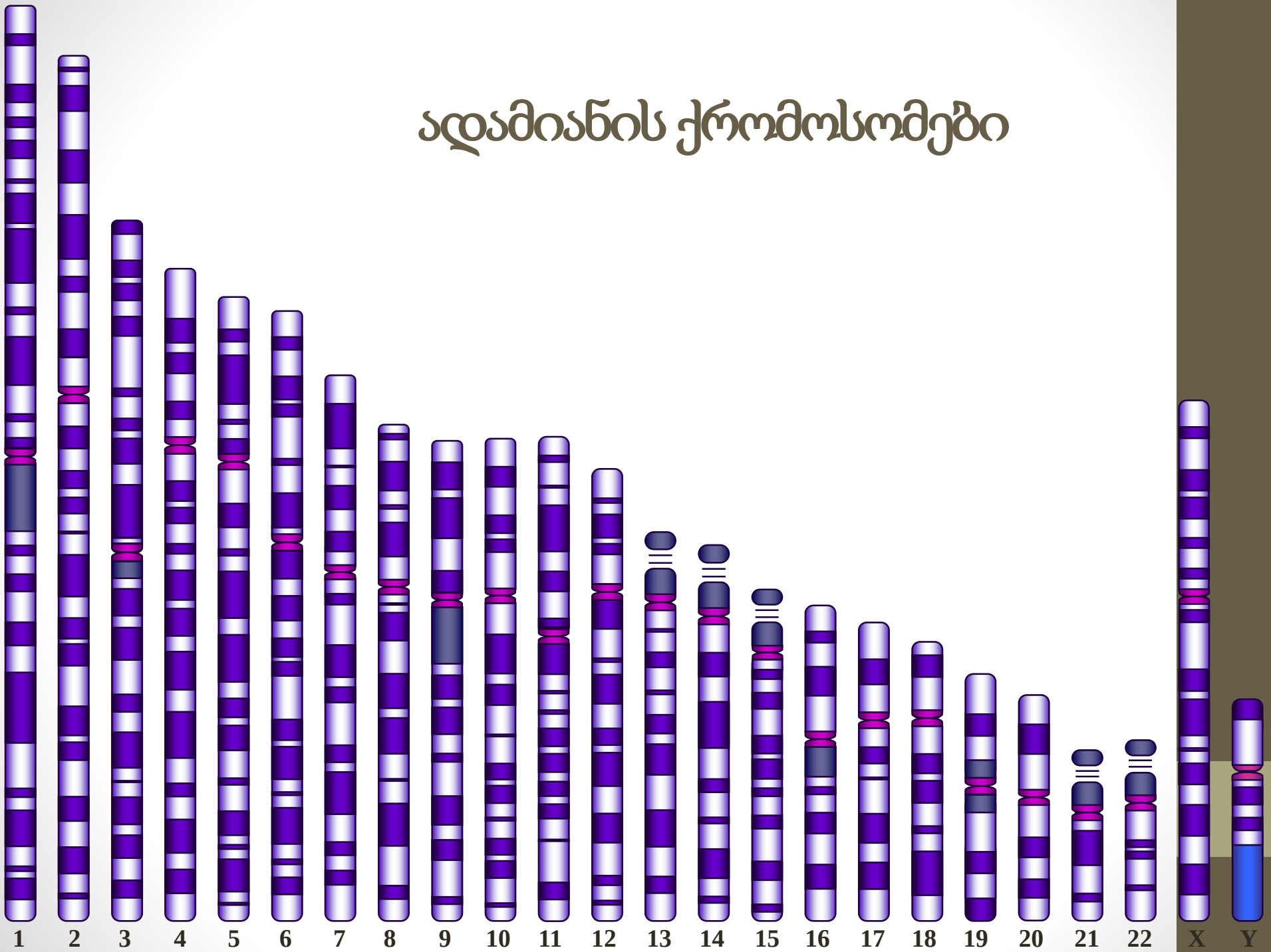




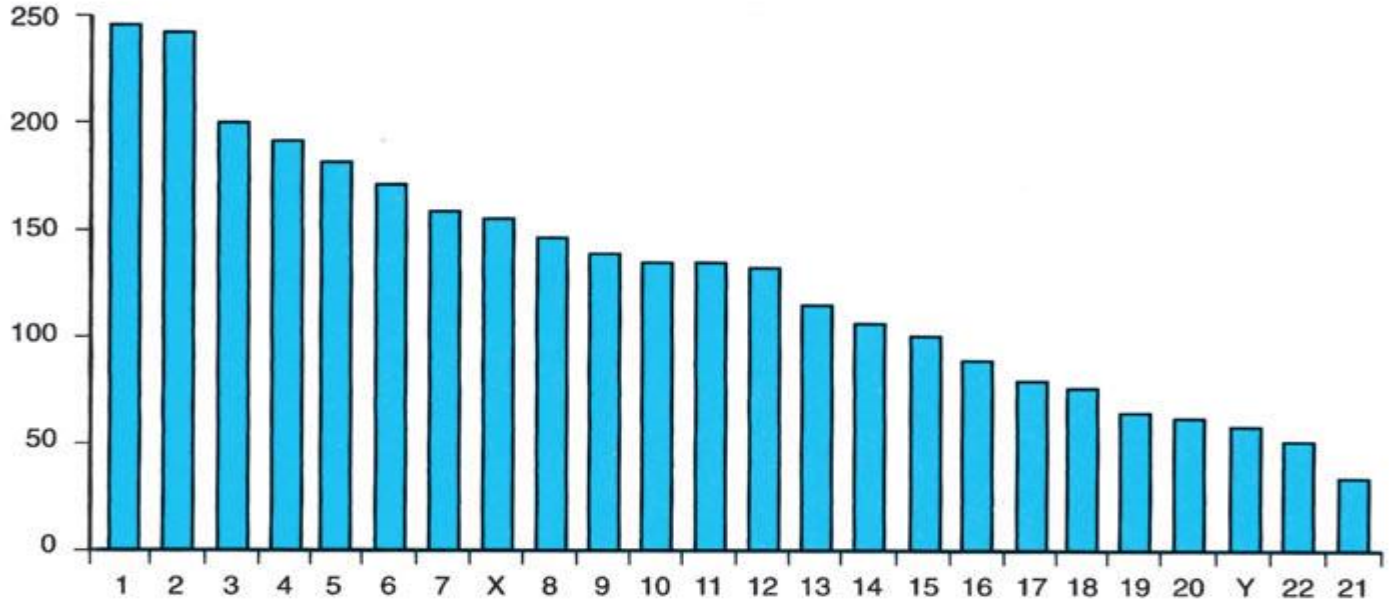


ჰისტონების და დნმ-ის კოვალენტური მოდიფიცირება. **Ac** – აცეტილირება; **Cit**– ციტრულინაცია (დეამინაცია); **Me** – მეთილირება; **MeCP2** – მეთილ-**CpG**-ბმული ცილა; **P** – ფოსფორილირება; **Ub** – უბიქვიტინიზაცია

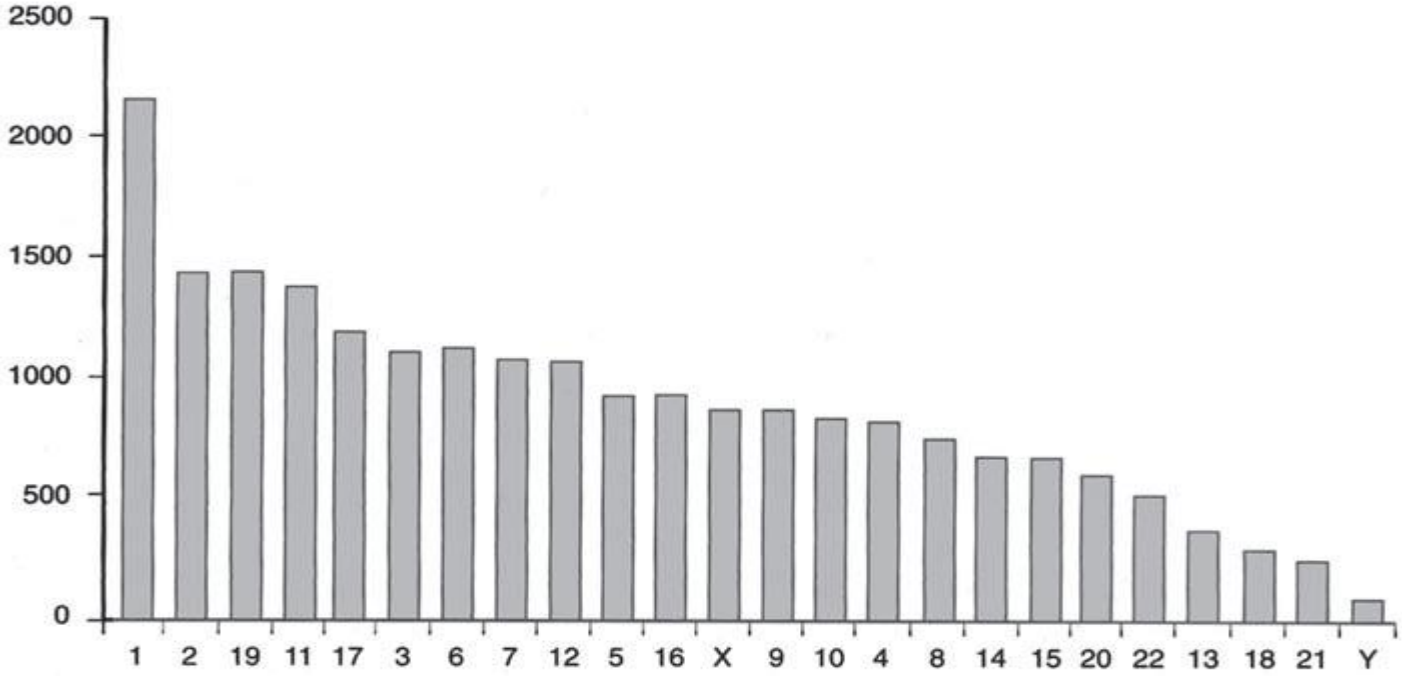
ადამიანის ქრომოსომები



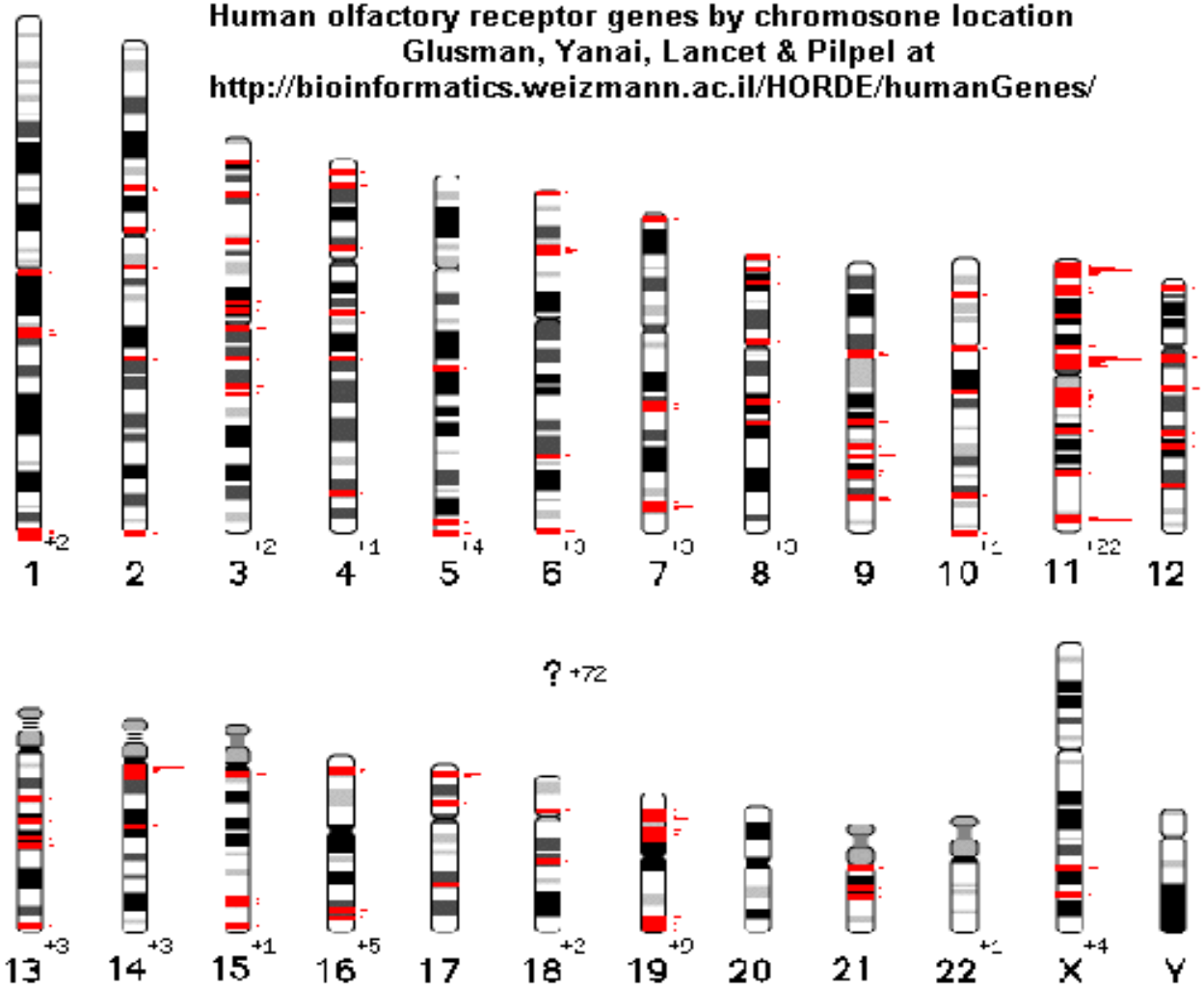
A


250
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 X 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 Y 22 21

B

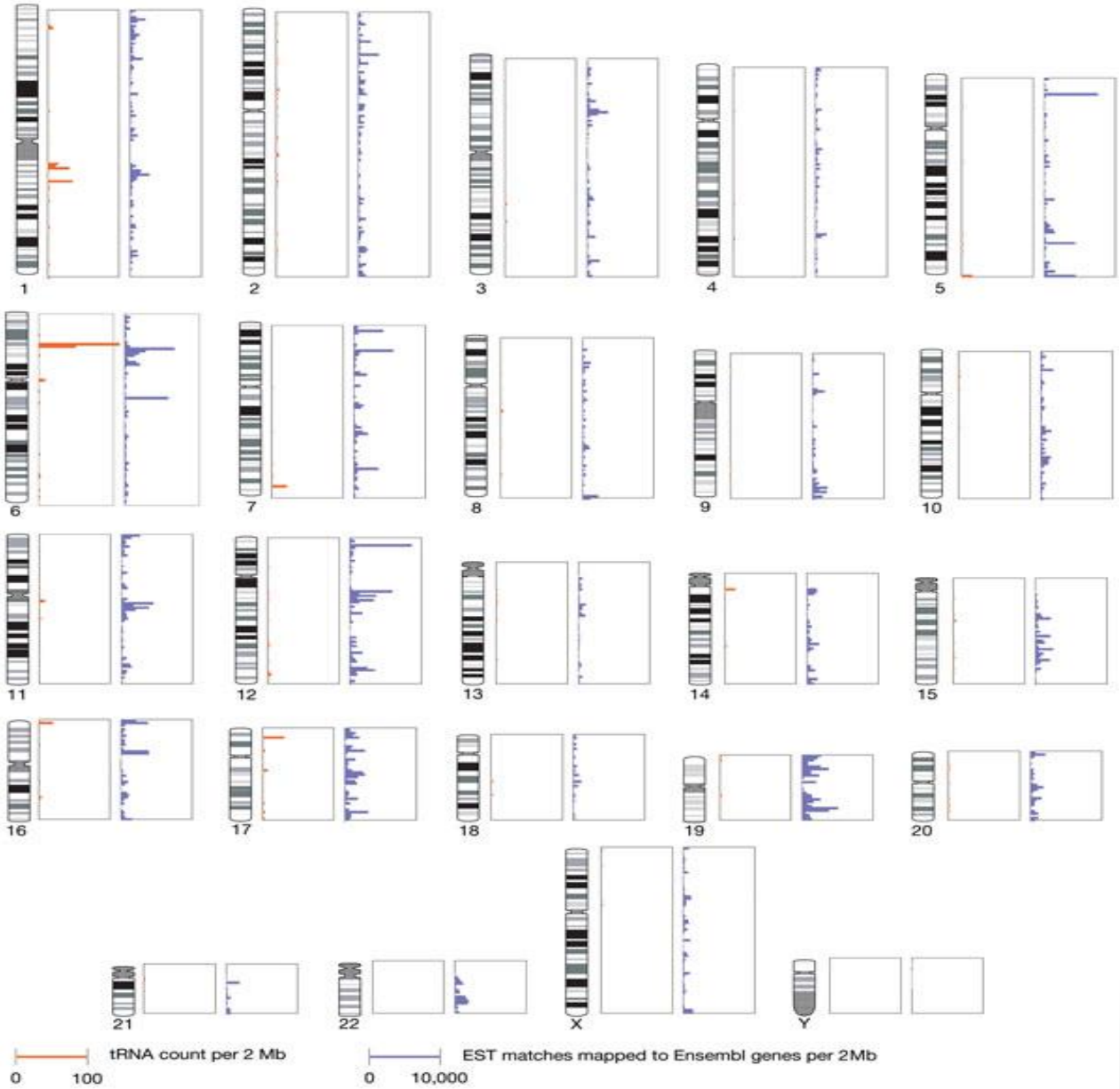

2500
2000
1500
1000
500
0
1 2 19 11 17 3 6 7 12 5 16 X 9 10 4 8 14 15 20 22 13 18 21 Y

Human olfactory receptor genes by chromosone location
Glusman, Yanai, Lancet & Pilpel at
http://bioinformatics.weizmann.ac.il/HORDE/humanGenes/



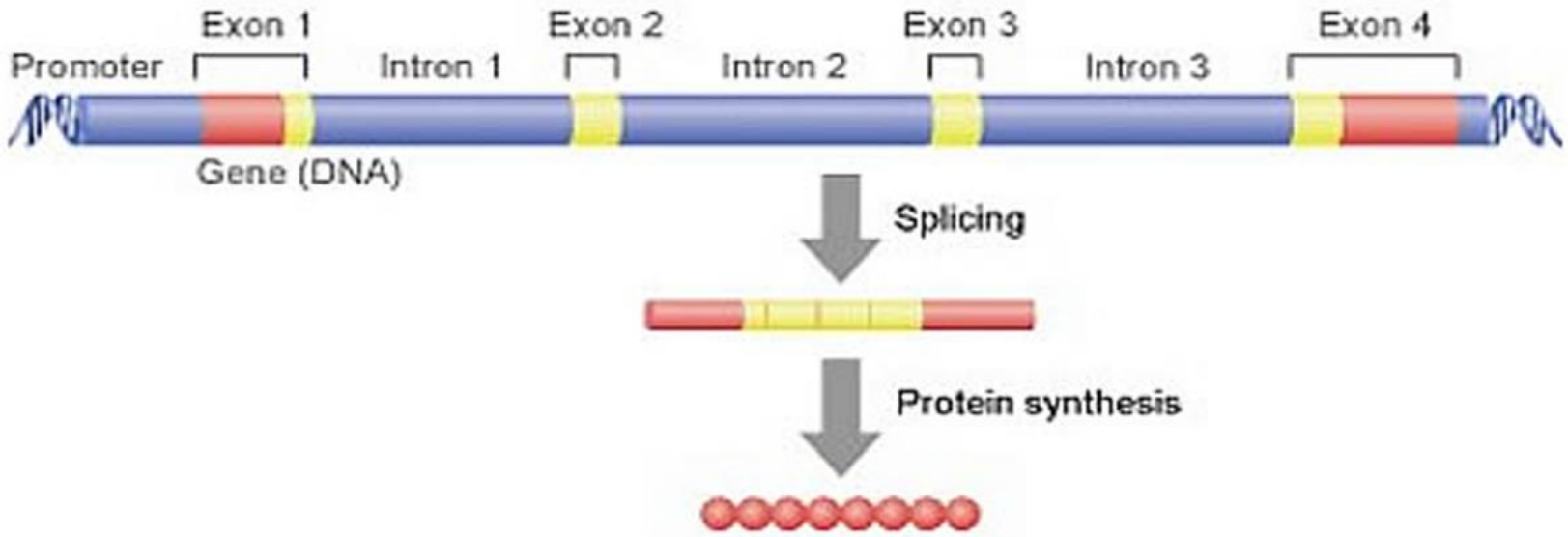
CLICK ON GRAPH TO JUMP TO ORIGINAL SOURCE

სატრანსპორტო რნმ-ს გენების განაწილება ადამიანის ქრომოსომებში



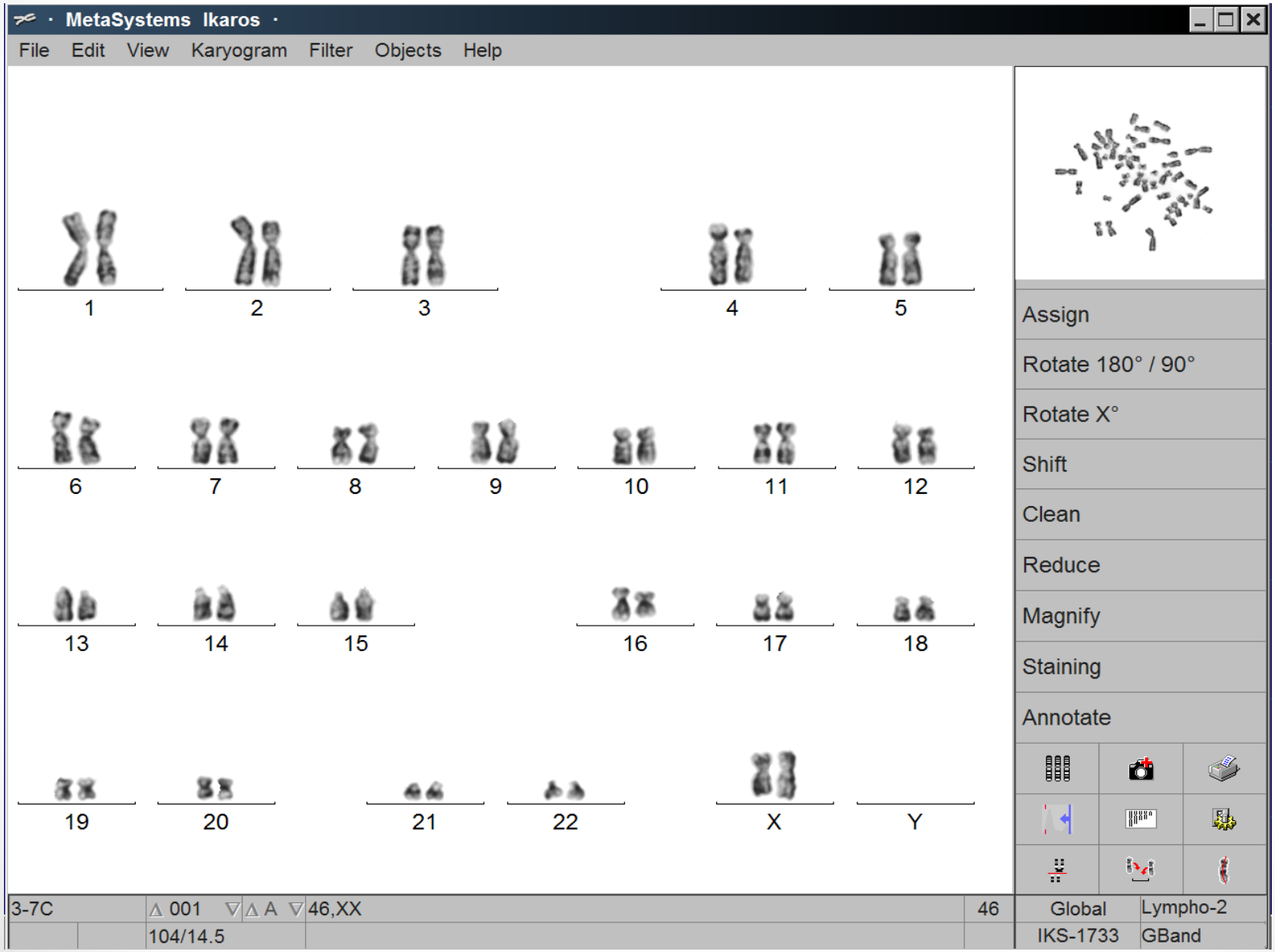
რა კომპონენტები შედის გენში?

გენები შეიცავს…….
ეგზონებს: მაკოდირებელ უბნებს
ინტრონებს: არამაკოდირებელ უბნებს, რომლებიც სპლაისინგით ამოიჭრება.

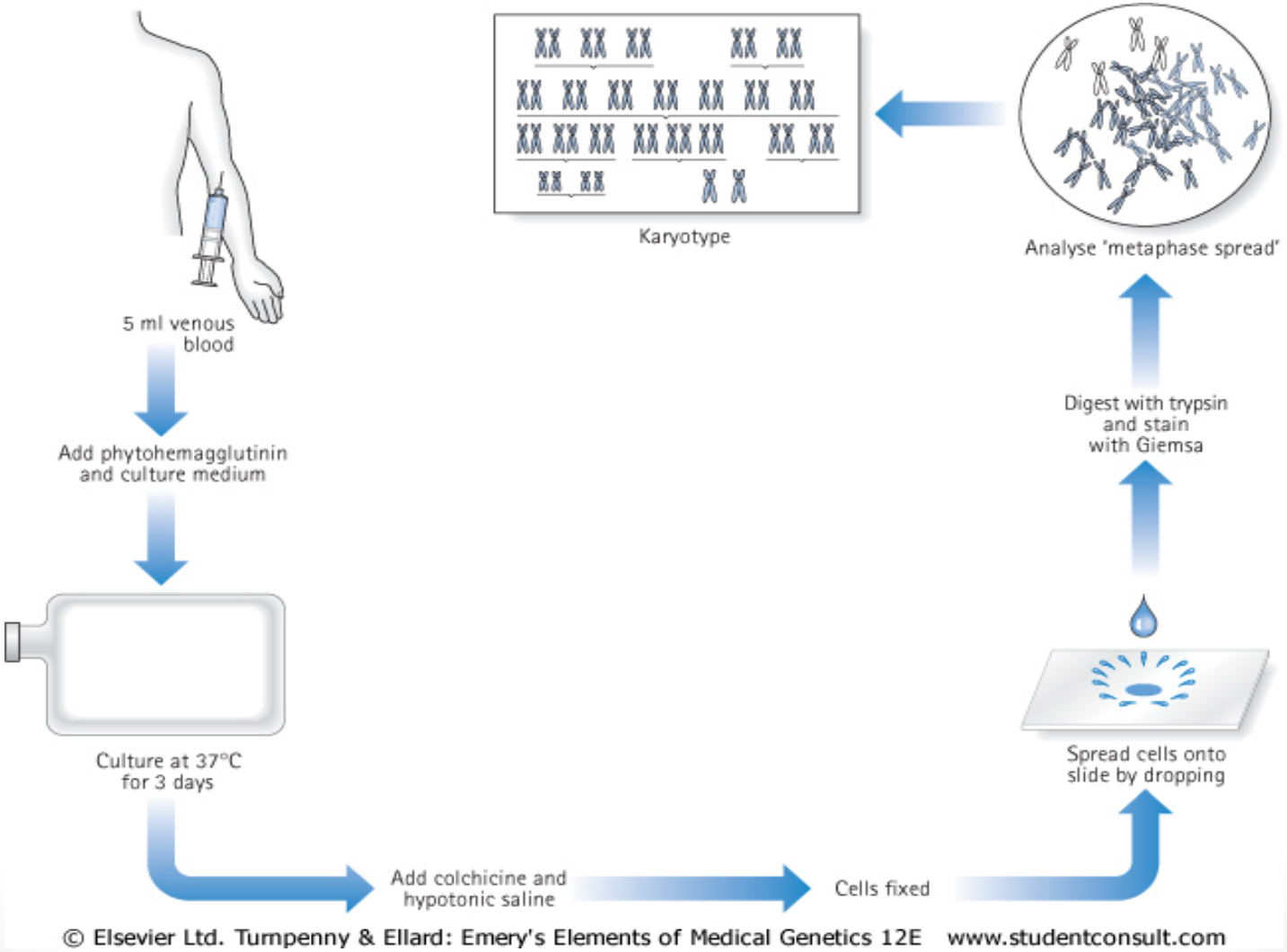


ტრადიციული ციტოგენეტიკური კვლევა - კარიოტიპირება ბენდირების მეთოდების გამოყენებით

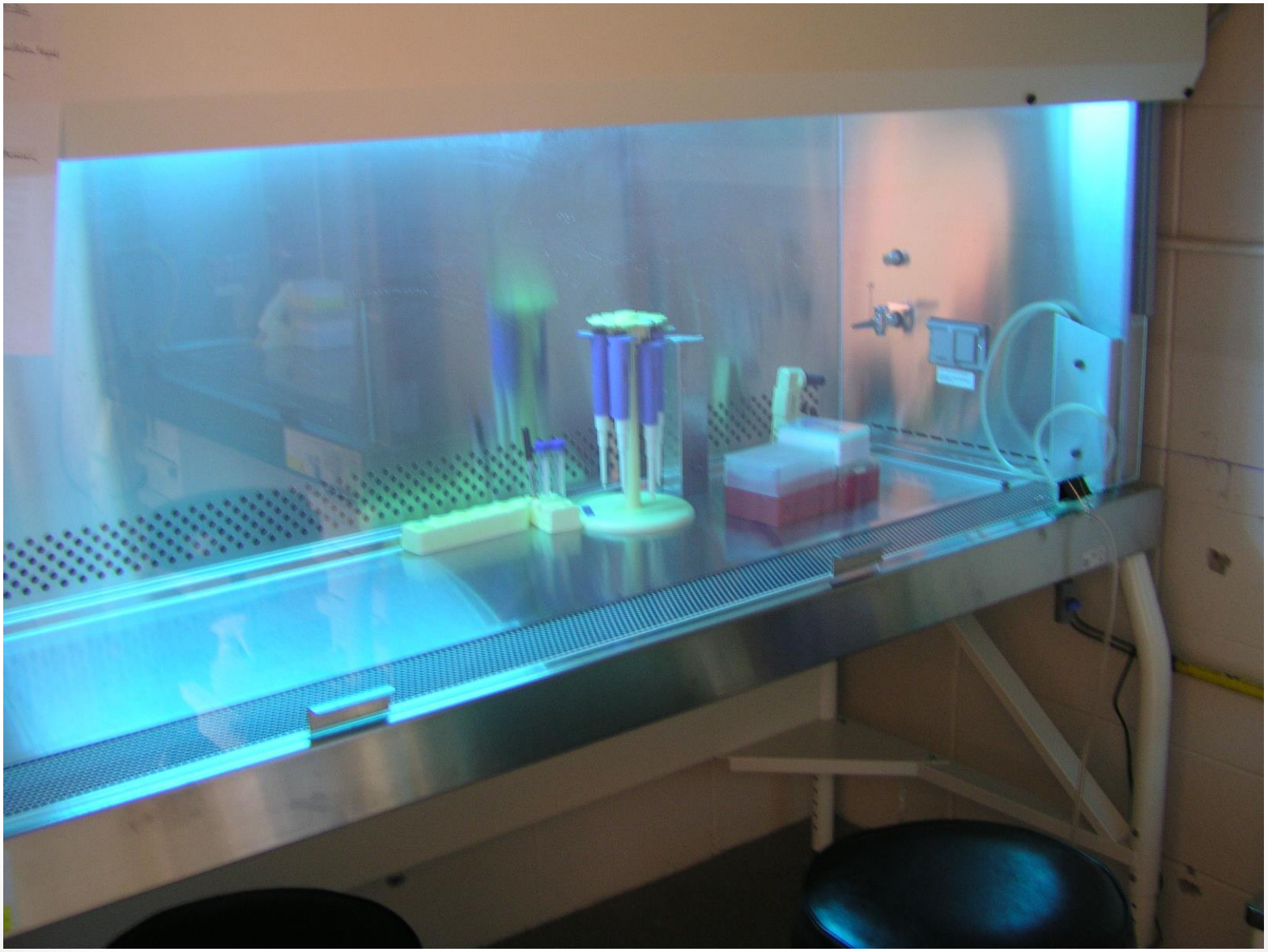
ადამიანის (ქალის) ქრომოსომების დიპლოიდური ნაკრები



მეტაფაზური ქრომოსომების მომზადება საანალიზოდ



ლამინარული ბოქსი (სტერილური გარემო უჯრედული კულტურებისთვის)



კლინიკურ ციტოგენეტიკაში ყველაზე ხშირად გამოიყენება:

- G- ბენდირება – მუქად იღებება ჰეტეროქრომატინული უბნები
- Q- ბენდირება – პრეპარატი ქუანაკრინით მუშავდება. მუქად იღებება
- ჰეტეროქრომატინული უბნები (ფლუორესცენტული მიკროსკოპი)
- R - ბენდირება – მუქად იღებება ეუქრომატინული უბნები (საპირისპირო
- სურათი)
- **მეტაფაზის** სტადიაზე ქრომოსომებზე 450-მდე ზოლი იკვეთება
- **პრომეტაფაზური ბენდირებით** 850-მდე ზოლი იდენტიფიცირდება (მოსახერხებელია სტრუქტურული დარღვევების საიდენტი-ფიკაციოდ)

კლინიკურ ციტოგენეტიკაში გამოყენებული სპეციფიკური მეთოდები:

C- ბენდირება

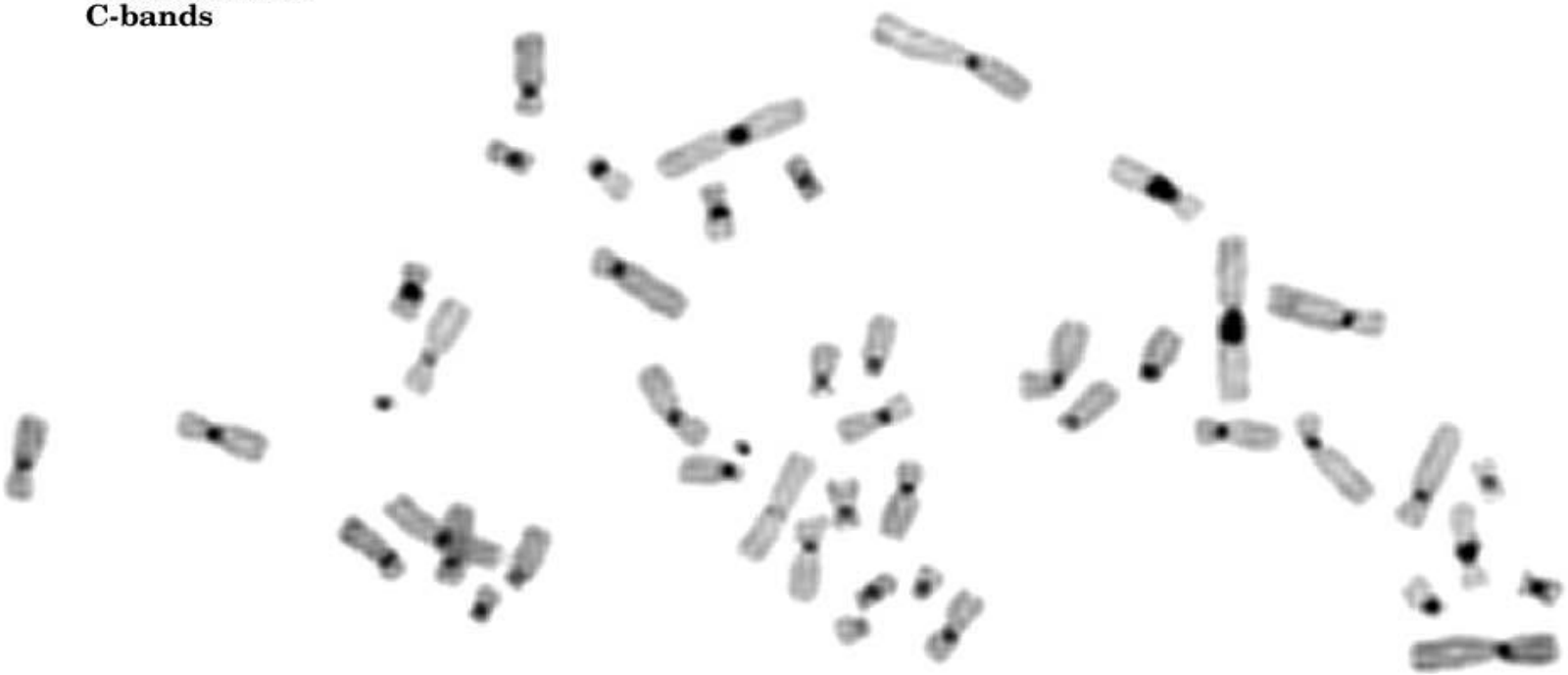
- მუქად იღებება ცენტრომერის მიმდებარე კონსტიტუციური ჰეტეროქრომატინული უბნები - 171 ნუკლეოტიდის მომცველი გრძელი ინერტული უბნები

- ვლინდება დიდი ბლოკები 1- ლ, მე-9, მე-16 და Y ქრომოსომებზე - მოკლე (5-ნუკლეოტიდიანი) უკიდურესად გრძელი მწკრივები

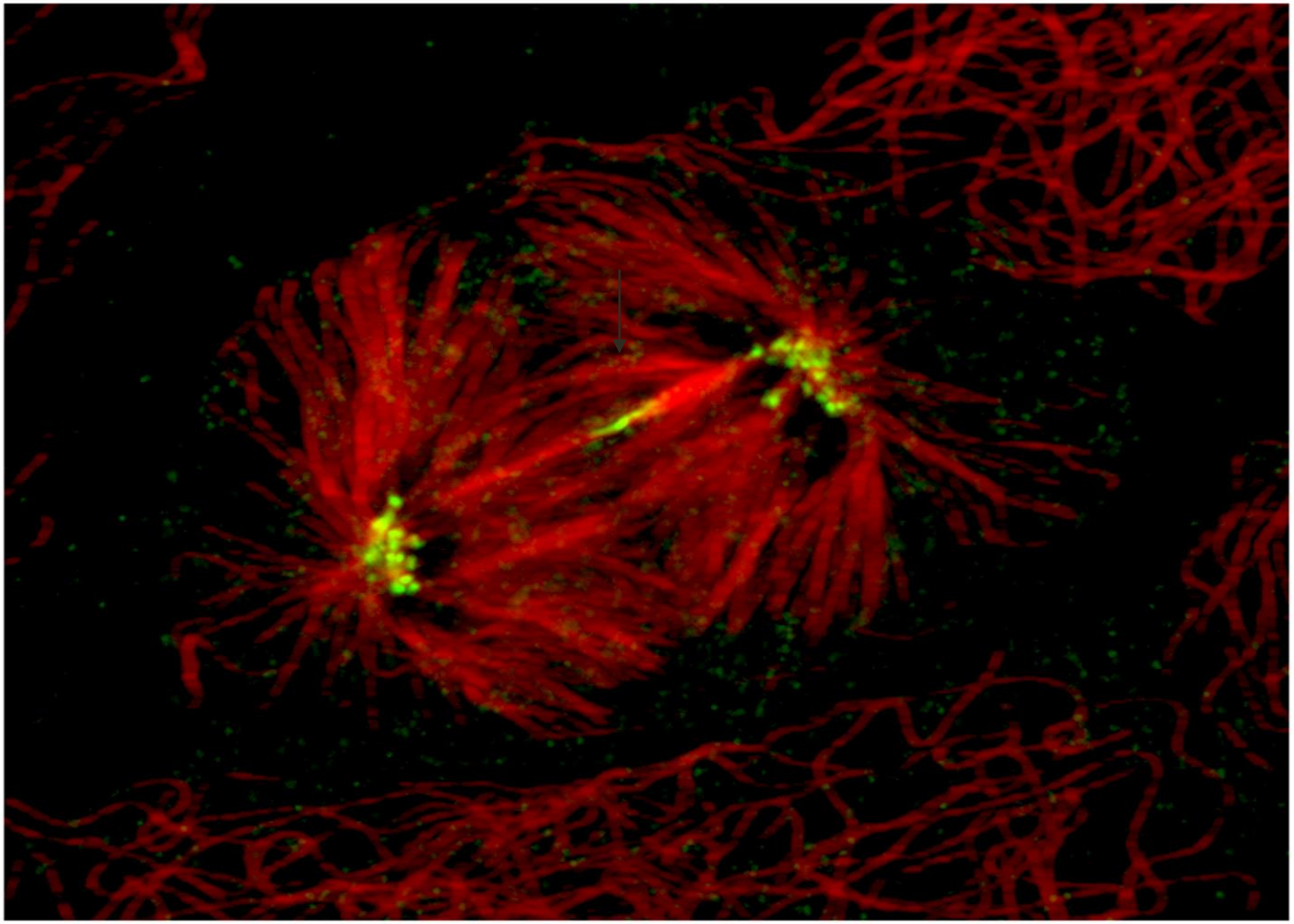
ფრაგილური საიტების დეტექცია დნმ-ის სინთეზის ინჰიბიტორებით

- ფრაგილური X სინდრომი (ციტოგენეტიკური მარკერი Xq27.3)

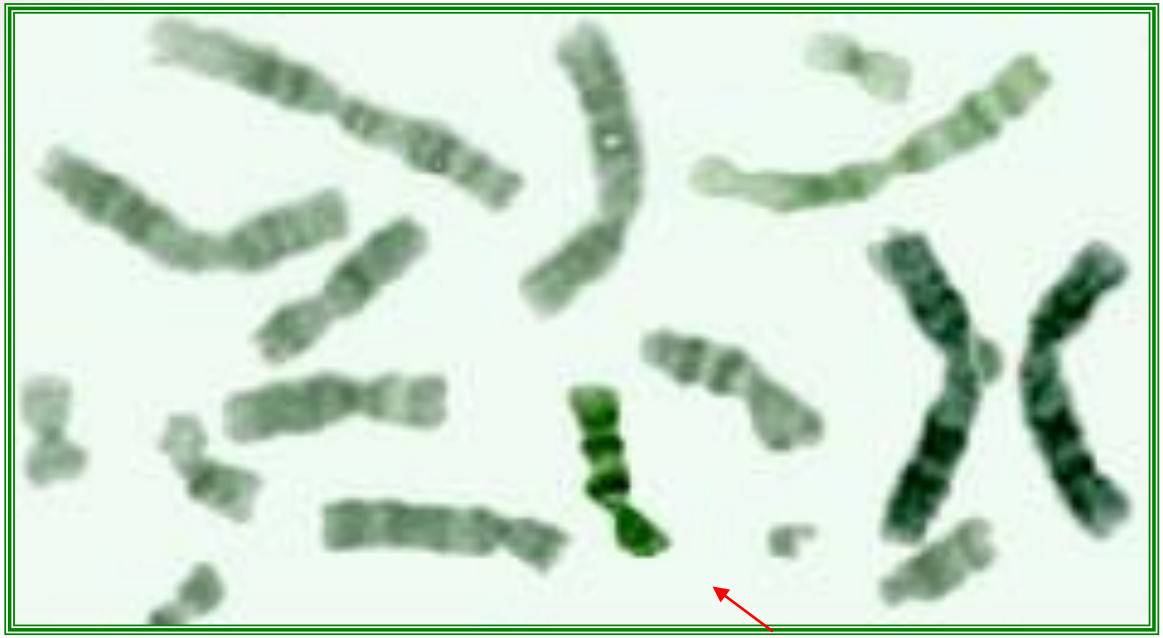
Human female
C-bands

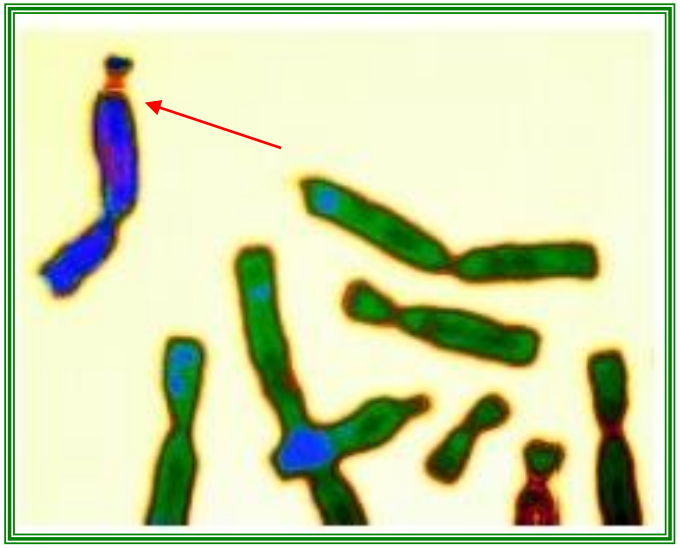


მეიოზი: „ჩამორჩენილი“ ქრომოსომა



ფრაგილური X-ქრომოსომის სინდრომი





ფრაგილური X-ქრომოსომის სინდრომი

- დღესდღეობით ფრაგილური X სინდრომის დიაგნოსტიკაში იყენებენ *CGG განმეორებადობების ექსპანსიის* გამოსავლენ მოლეკულურ-გენეტიკურ მეთოდებს *FMR1* გენში.

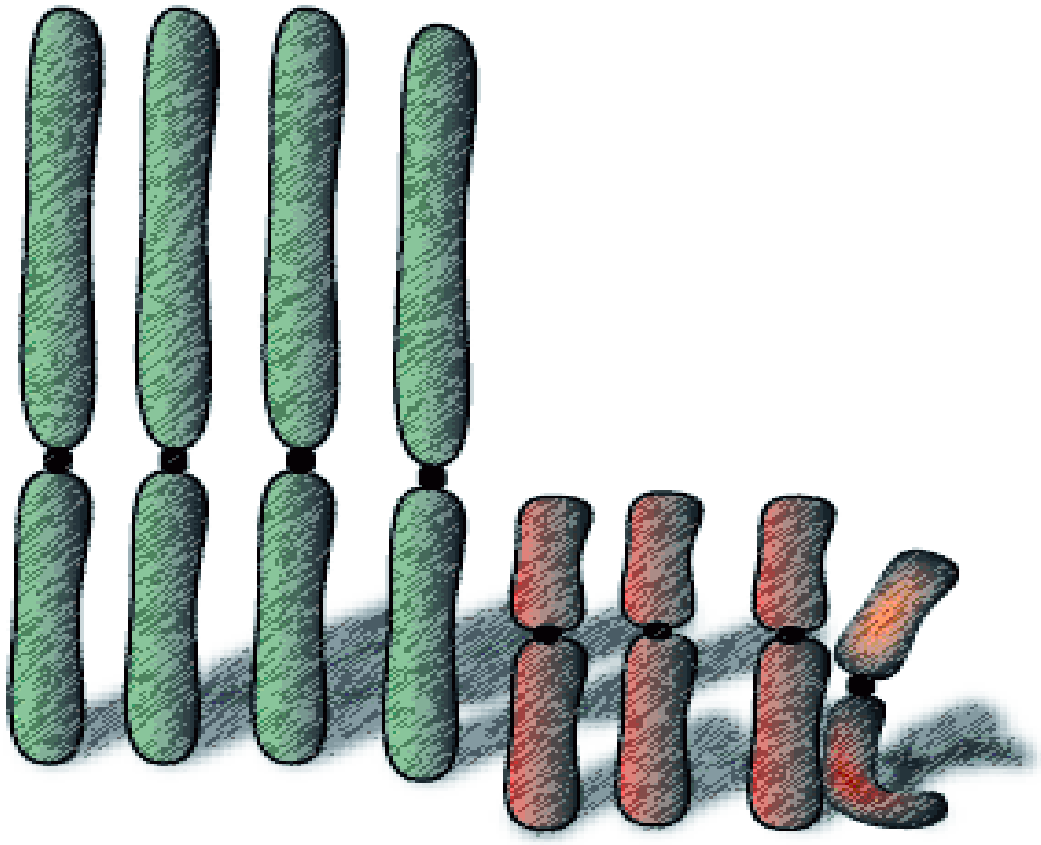
- ვაჟებში გონებრივი ჩამორჩენილობის მეორე ყველაზე ხშირი მიზეზი (დაუნის სინდრომის შემდეგ) – 1 : 4000 ვაჟი.

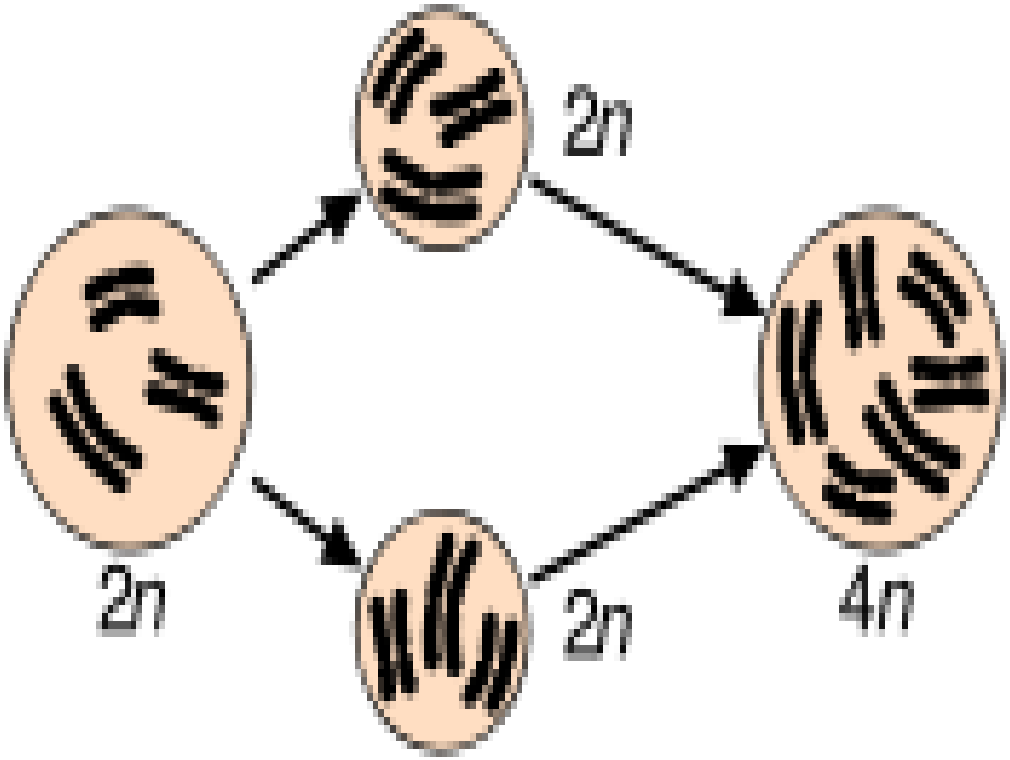
- ნორმაში *CGG*-ის 60-მდე განმეორება გვხვდება, დაავადების მძიმე ფორმებში - ასობით და ათასობით. ეს იწვევს პრომოტორში ციტოზინის ჭარბ მეთილირებას. შედეგად, ქრომატინი კონდენსირებულია, რეპლიკაცია შეფერხებული.

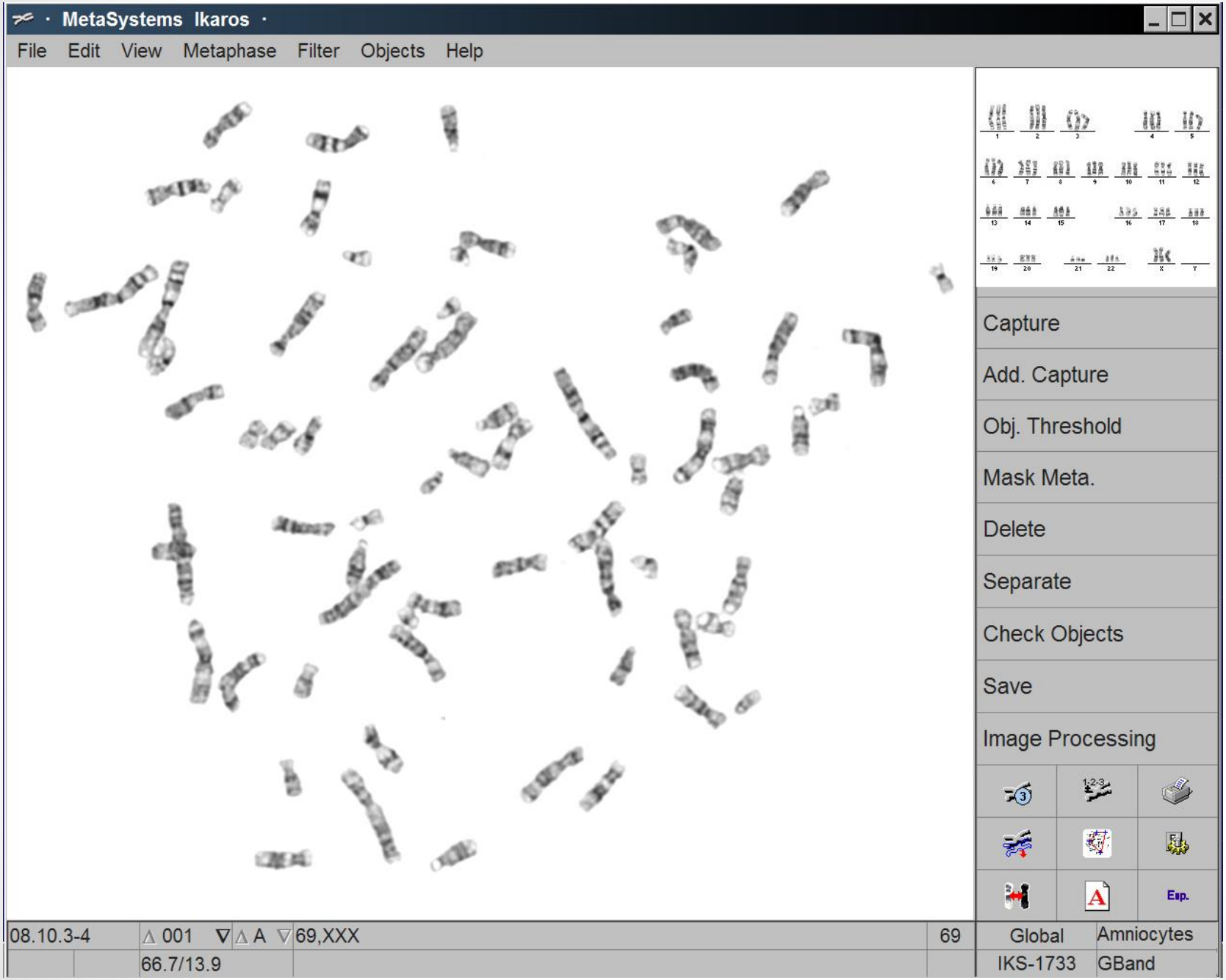
- **ექსპანსია არ ხდება სპერმატოგენეზში, მხოლოდ ოოგენეზში.**
- **ექსპანსია შეიძლება იყოს მოზაიკური ხასიათის.**

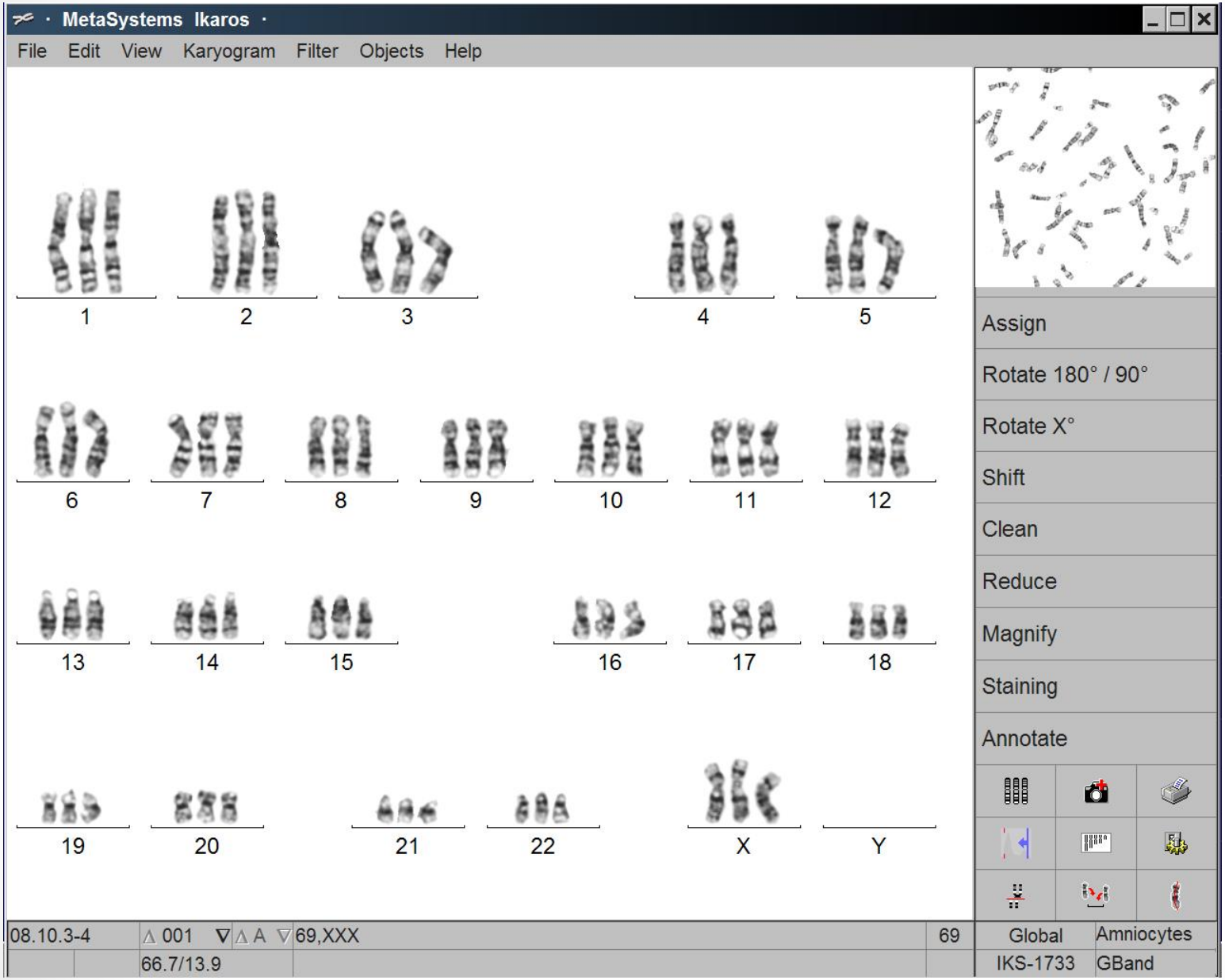
კარიოტიპირებით დგინდება გენომური მუტაციების არსებობა-არარსებობა

- პლოიდობის დარღვევა




2n
2n
2n
4n

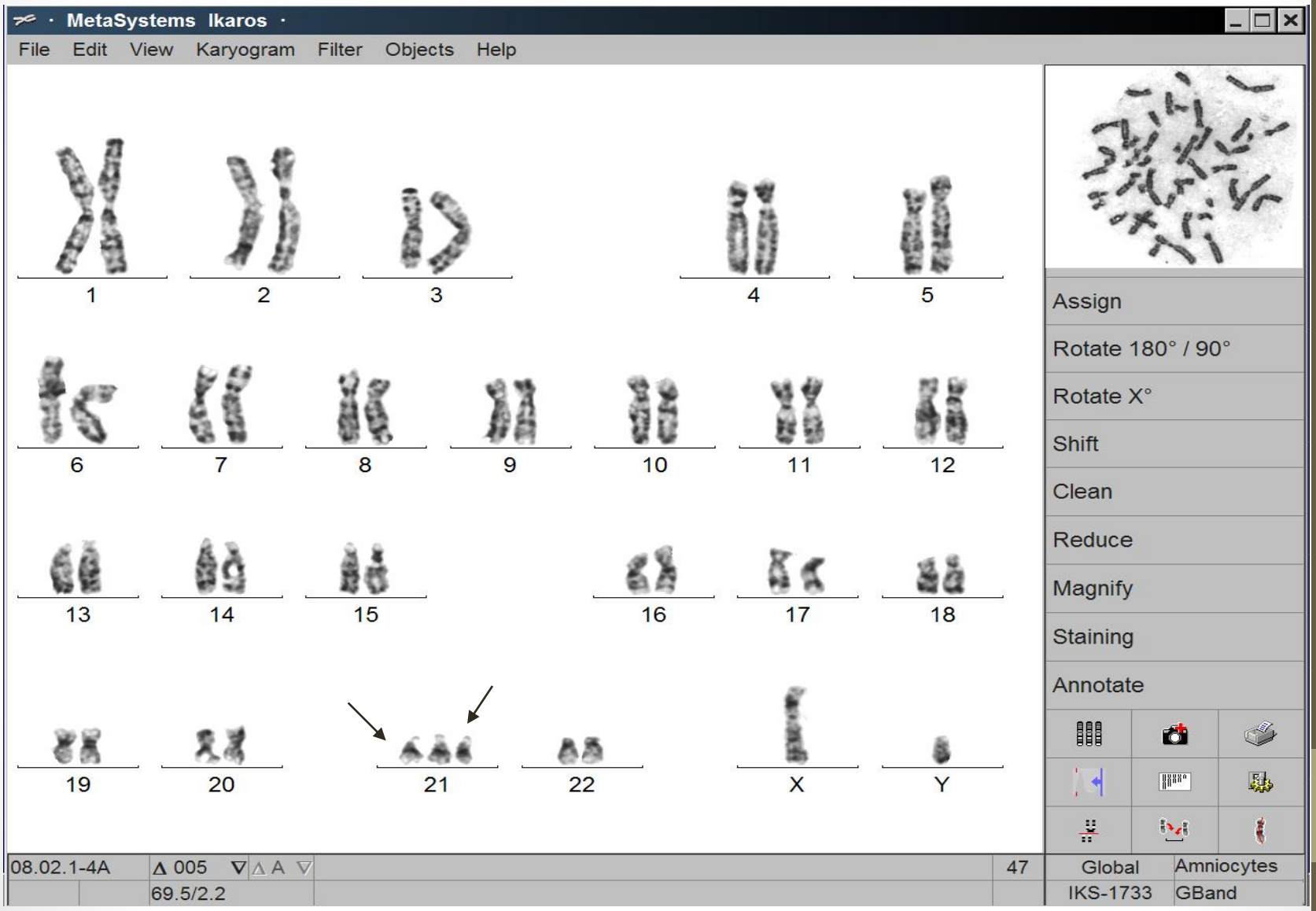

MetaSystems Ikaros
File
Edit
View
Metaphase
Filter
Objects
Help
Capture
Add. Capture
Obj. Threshold
Mask Meta.
Delete
Separate
Check Objects
Save
Image Processing
Exp.
08.10.3-4
001
A
69,XXX
69
Global
Amniocytes
66.7/13.9
IKS-1733
GBand


MetaSystems Ikaros
File
Edit
View
Karyogram
Filter
Objects
Help
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
X
Y
Assign
Rotate 180° / 90°
Rotate X°
Shift
Clean
Reduce
Magnify
Staining
Annotate
08.10.3-4
001
A
69,XXX
69
Global
Amniocytes
66.7/13.9
IKS-1733
GBand

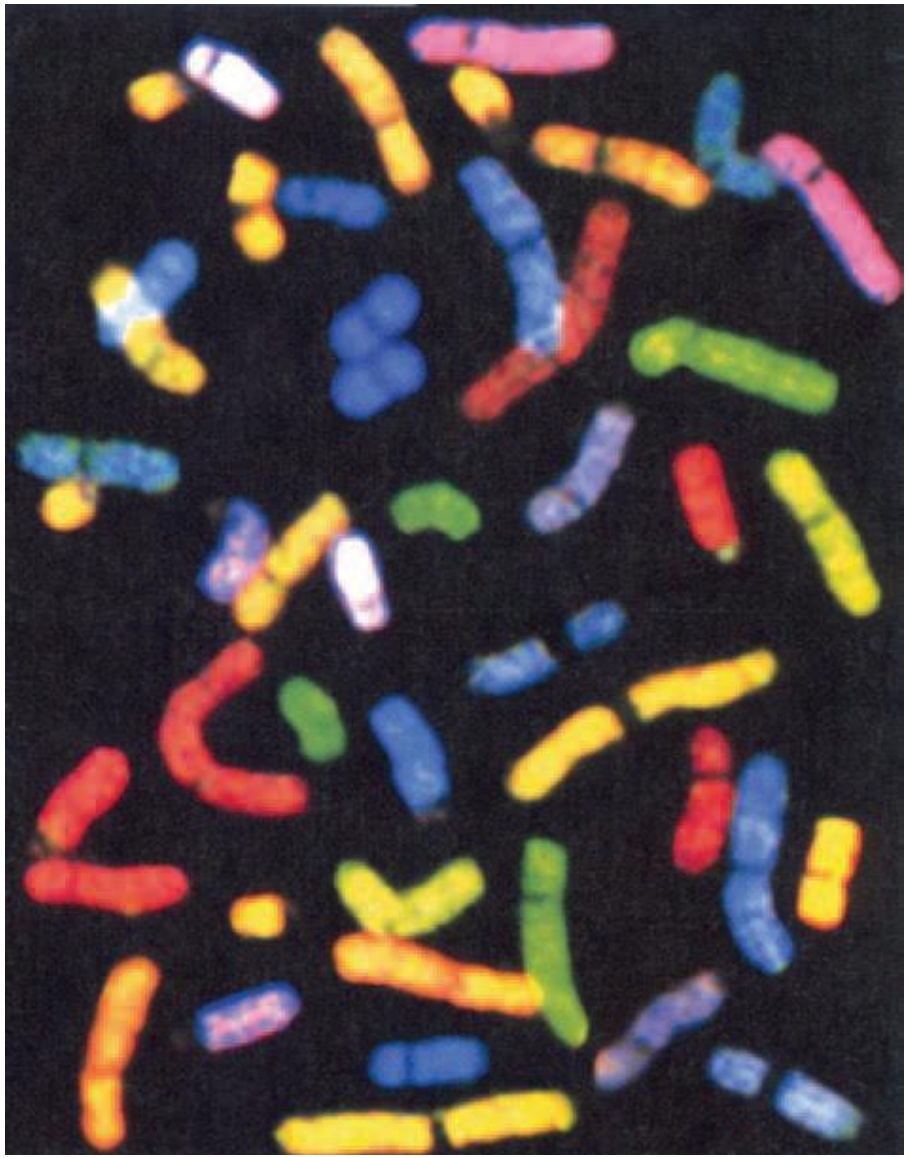
გენომური მუტაციებით გამოწვეული სპონტანური აბორტების სიხშირე

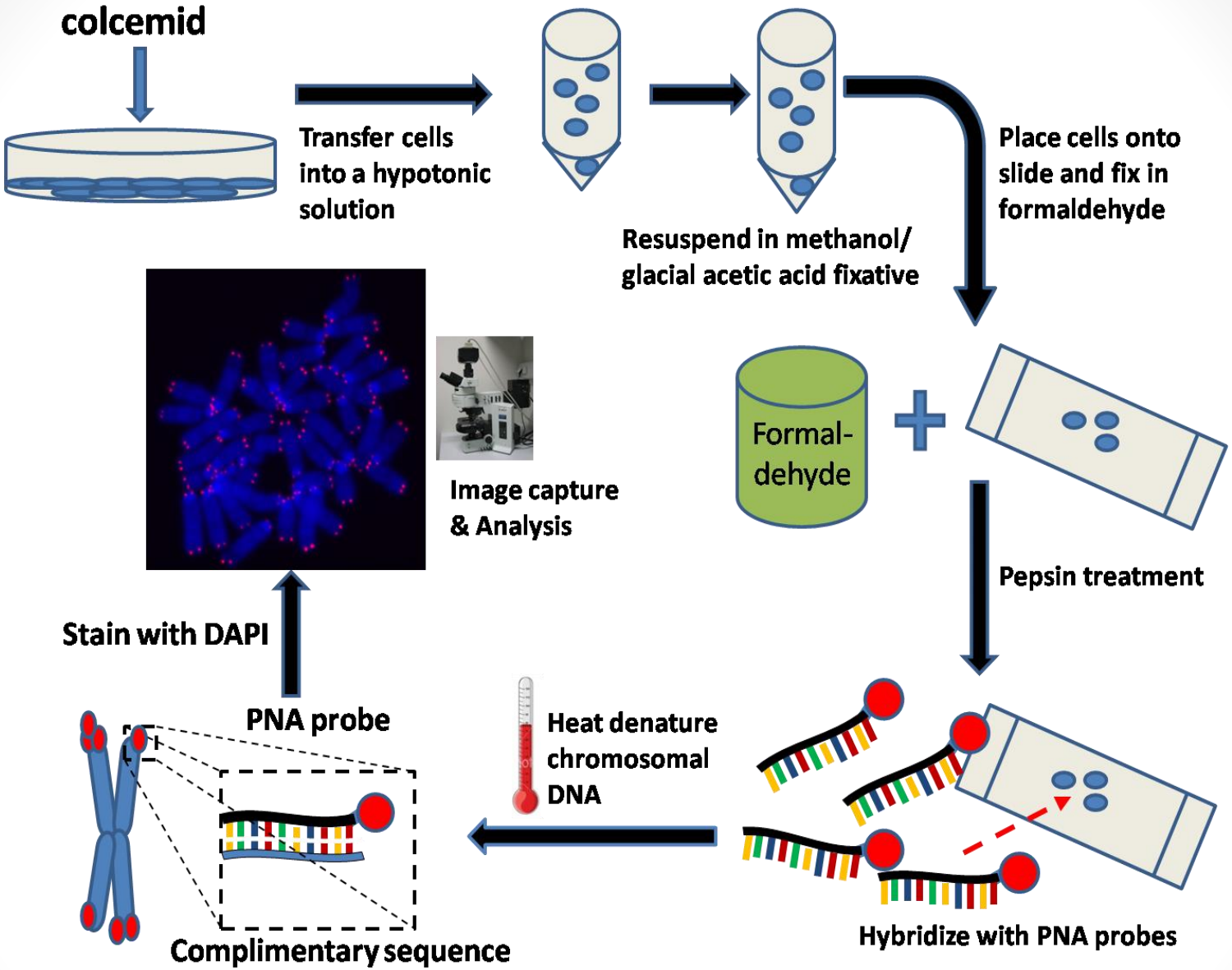
დარღვევები	პროცენტული სიხშირე
ტრიპლოიდია	10%
ტეტრაპლოიდია	5%
ტრისომია	30%
მონოსომია (45 X)	10%
სხვა	5%
ჯამურად	60%

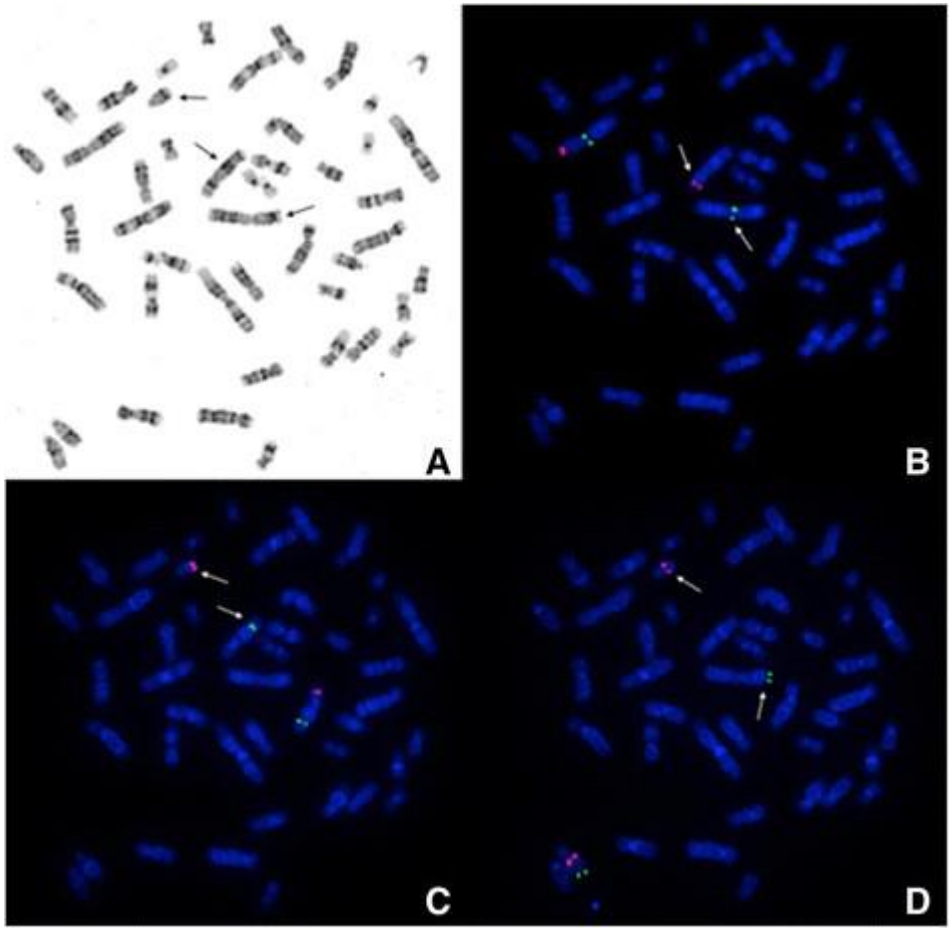
ადამიანის 15-კვირიანი ნაყოფი 21-ე ქრომოსომის ტრისომიით



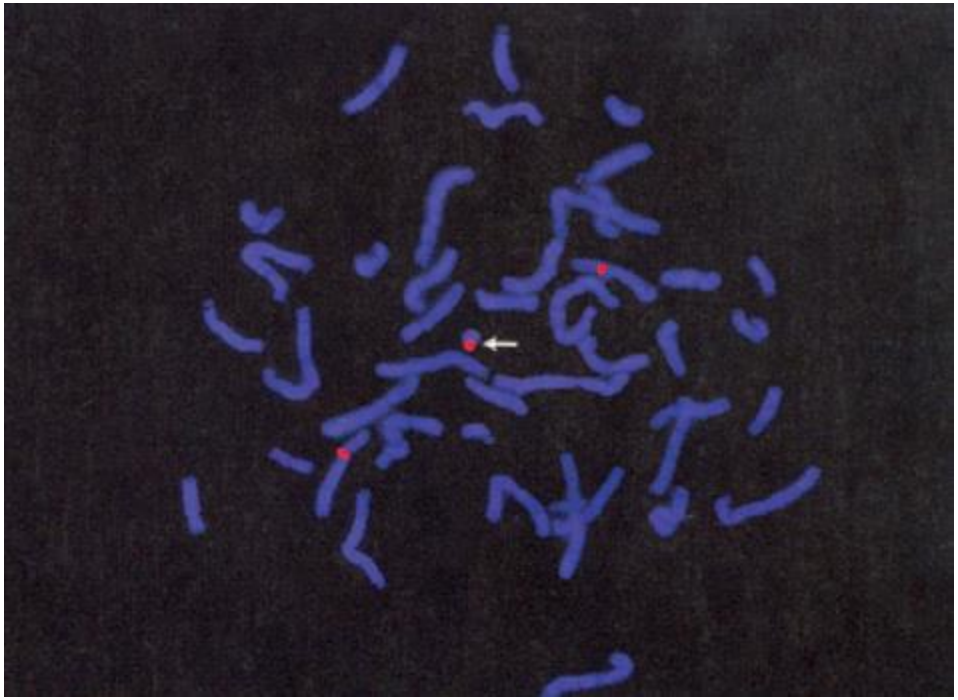
ქრომოსომათა სტრუქტურული დარღვევების გამოსაკვლევად იყენებენ **სპექტრული კარიოტიპირებას**. 24 ინდივიდუალური ქრომოსომა მონიშნულია სხვადასხვა ფერის ფლუოროსცენტული საღებავით

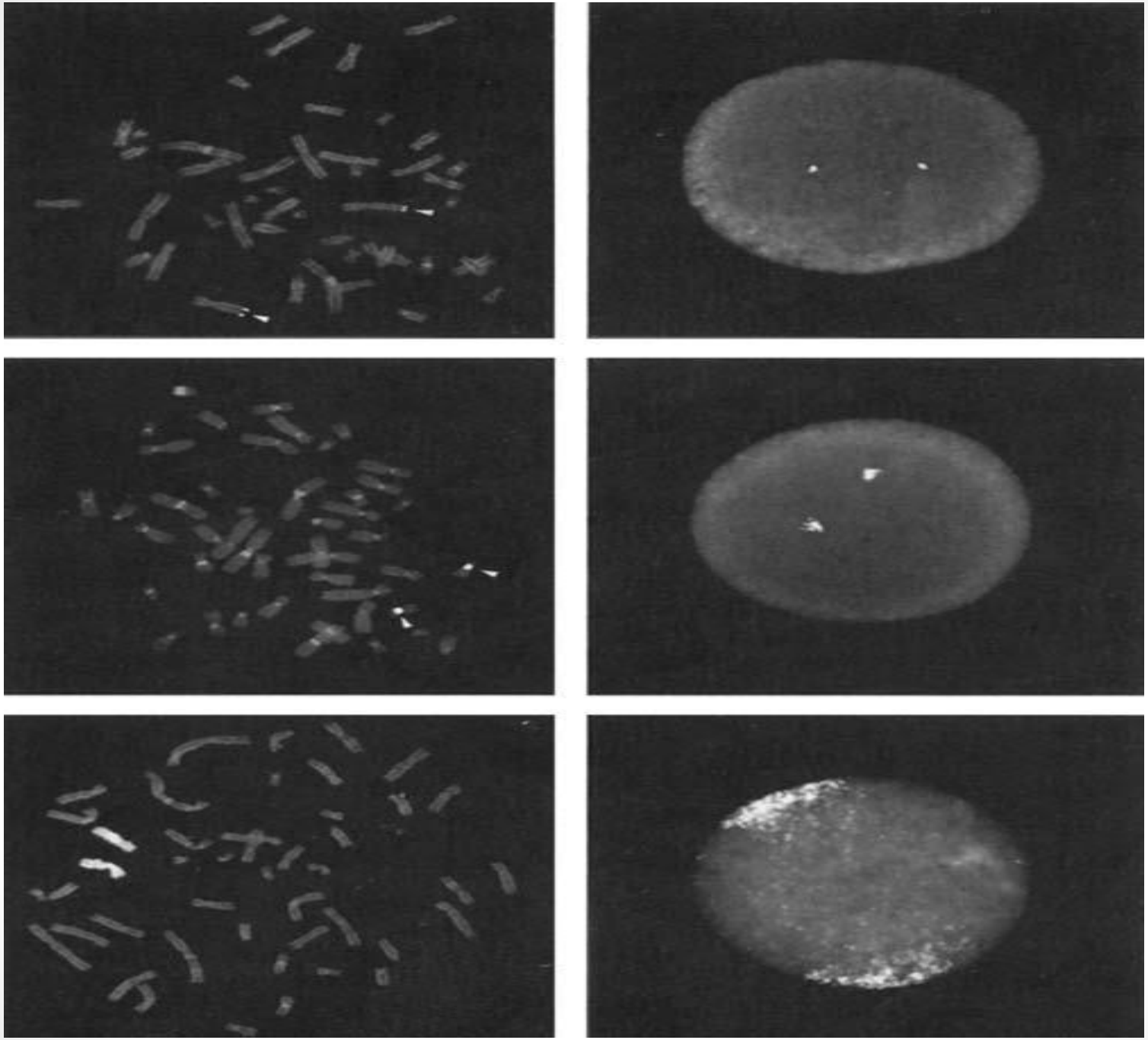



colcemid
Transfer cells into a hypotonic solution
Resuspend in methanol/ glacial acetic acid fixative
Place cells onto slide and fix in formaldehyde
Formal-dehyde
Pepsin treatment
Hybridize with PNA probes
Heat denature chromosomal DNA
PNA probe
Complimentary sequence
Stain with DAPI
Image capture & Analysis

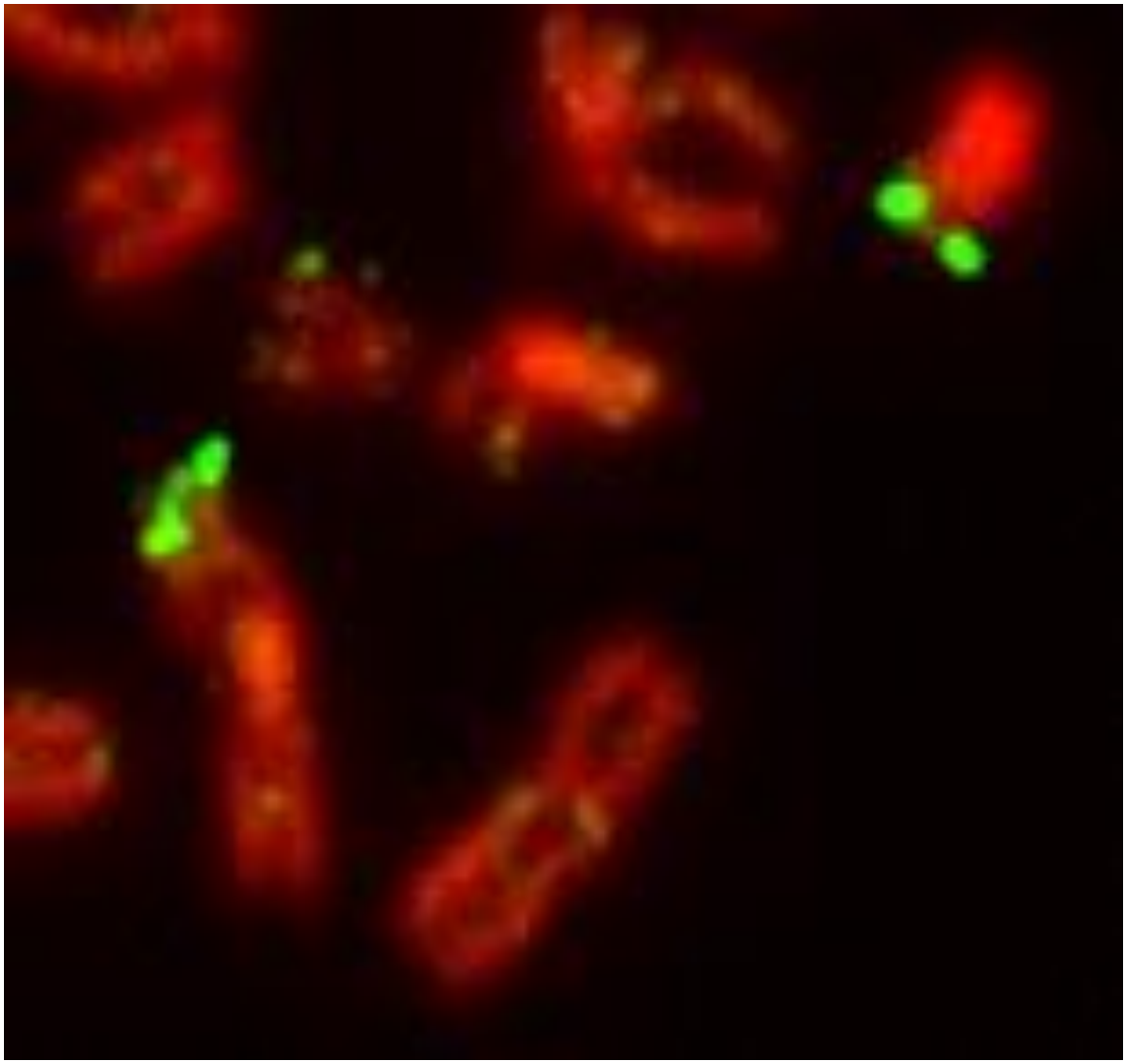

A
B
C
D

ფლუორესცენტული *in situ* ჰიბრიდიზაცია: მონიშნულია სპეციფიკური უბნები.

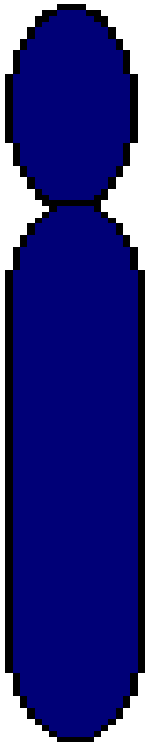


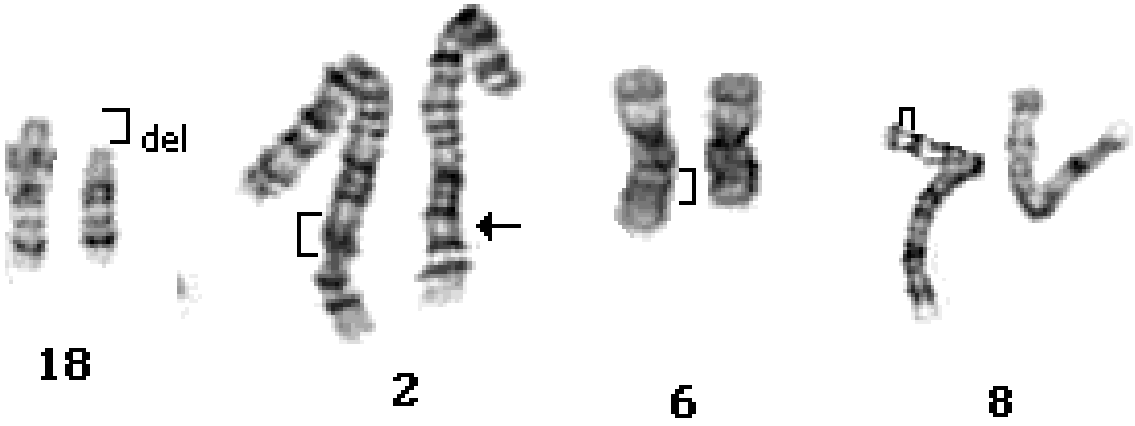


ფსევდოაუტოსომური უბნები X და Y ქრომოსომებზე



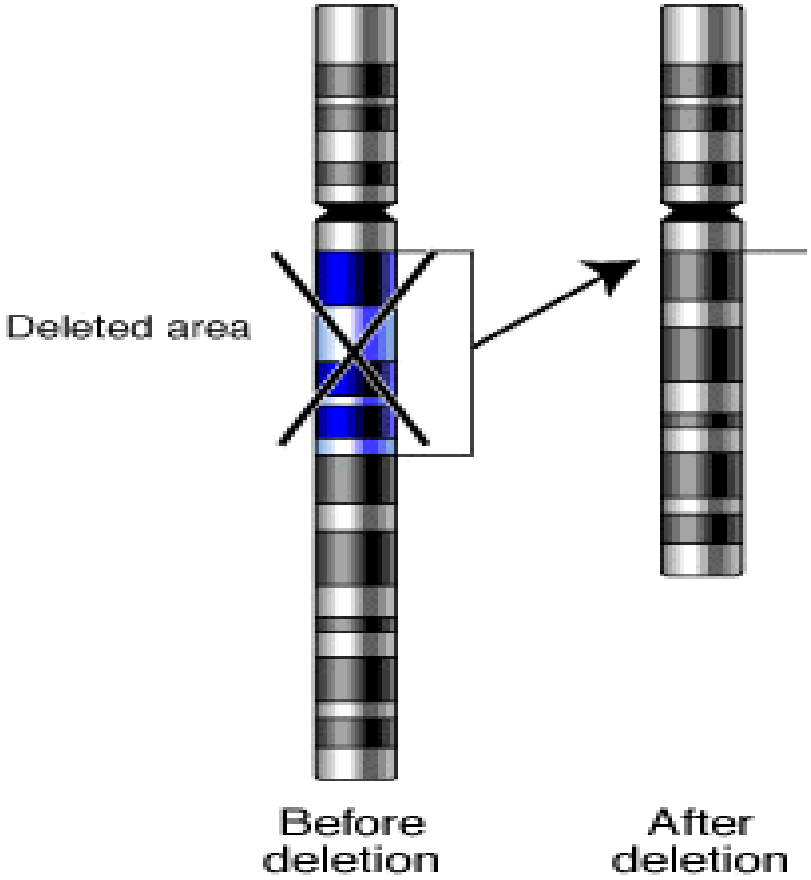
დელეციები



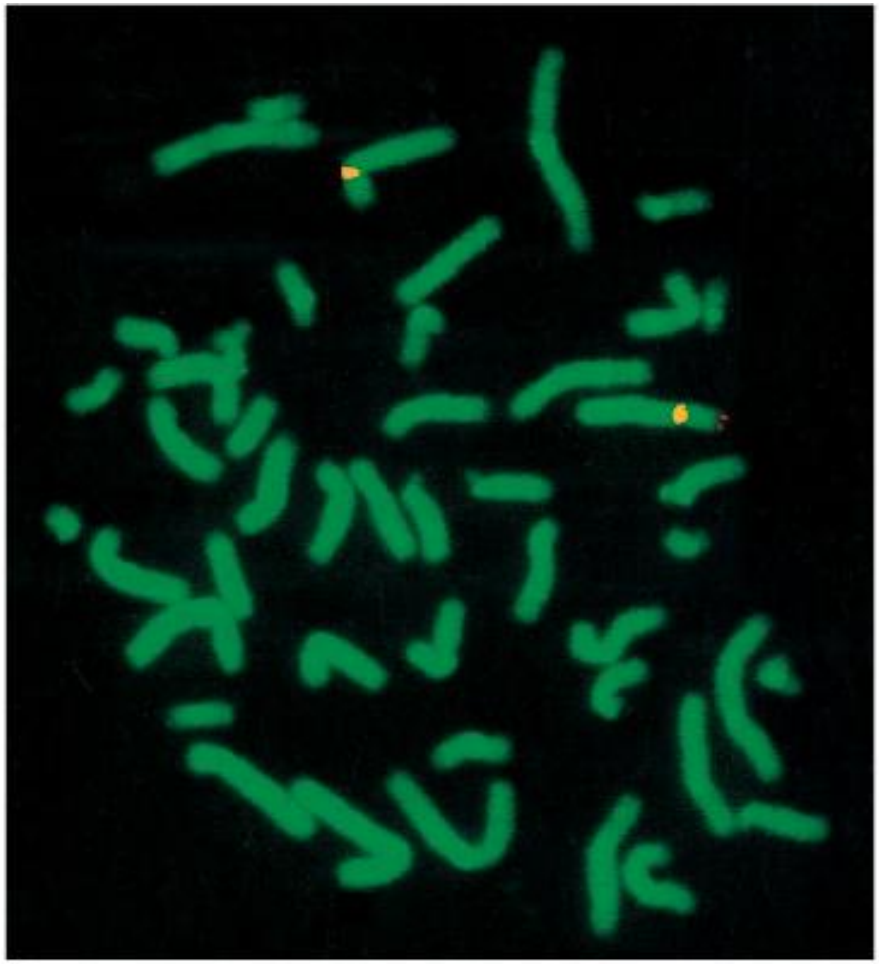


დელეცია - ქრომოსომის უბნის დაკარგვა

ინსტერსტიციალური დელეცია



FISH მეთოდით გამოვლინდა, რომ მე-4 ქრომოსომის მოკლე მხარს აქვს დელეცირებული უბანი (ვოლფ-ჰირშჰორნის სინდრომი)

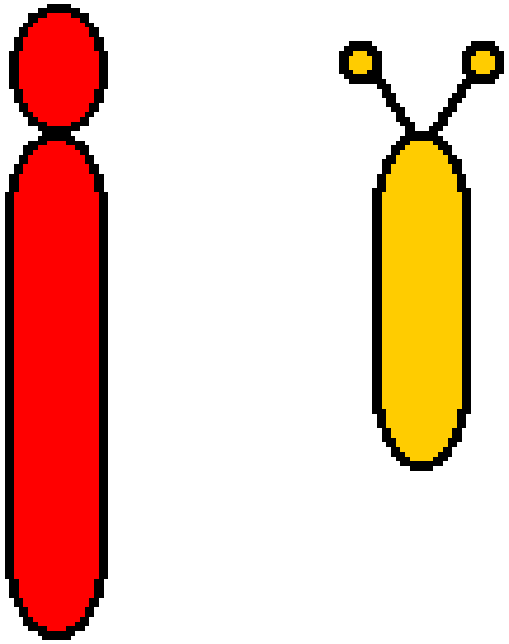


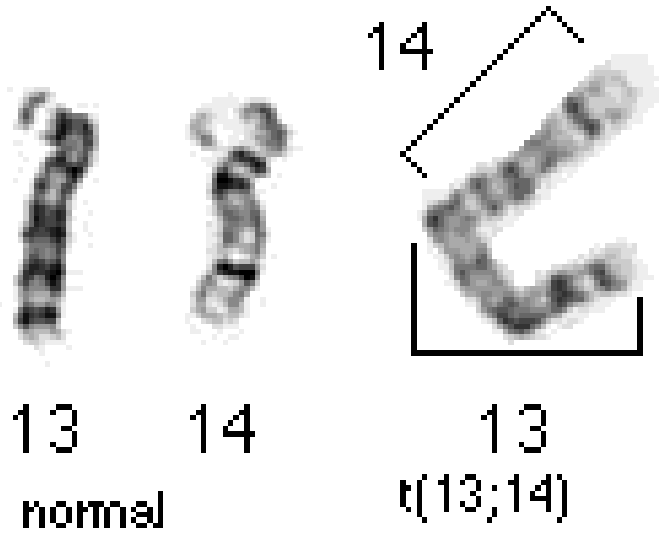
© Elsevier Ltd. Turnpenny & Ellard: Emery's Elements of Medical Genetics 12E www.studentconsult.com

ვოლფ-ჰირშჰორნის სინდრომი

© Elsevier Ltd. Turnpenny & Ellard: Emery's Elements of Medical Genetics 12E www.studentconsult.com

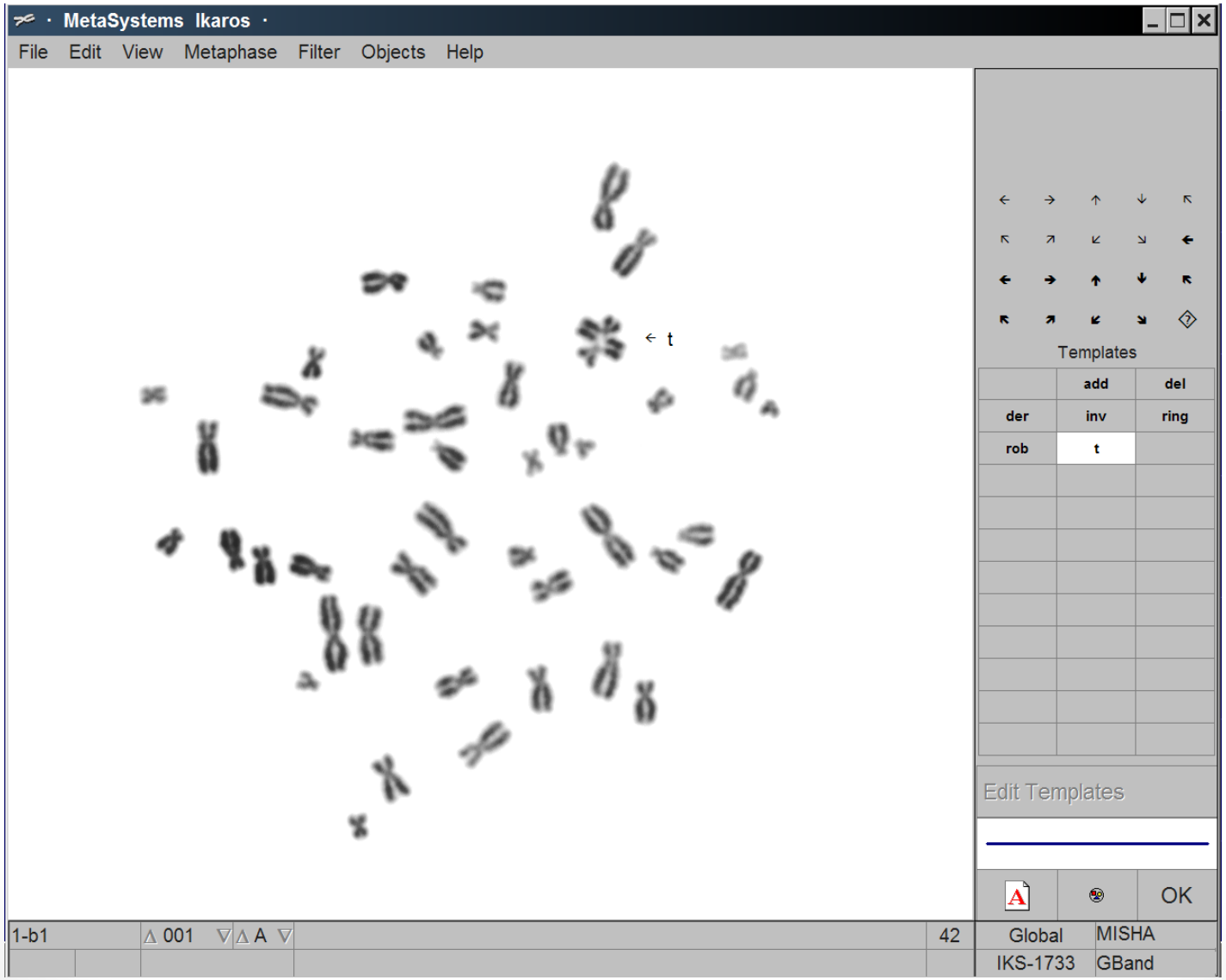
ტრანსლოკაციები

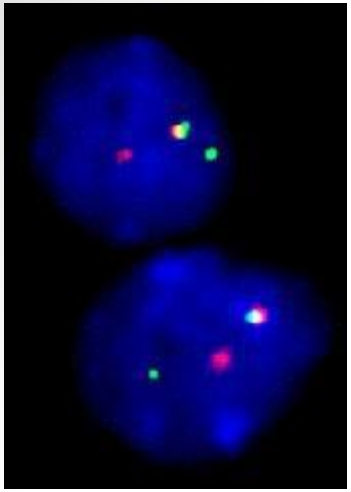


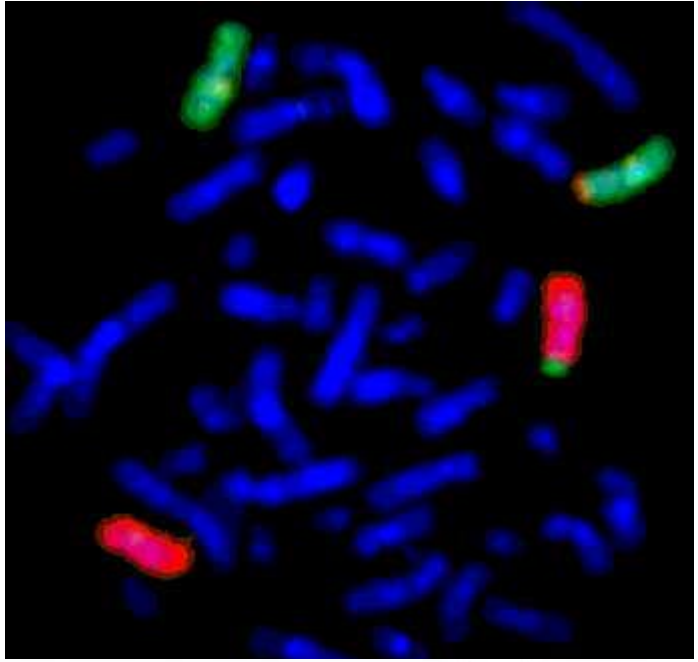


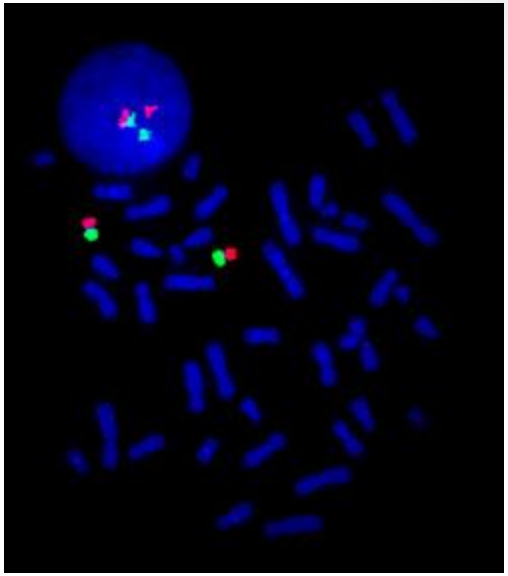
ტრანსლოკაცია - ქრომოსომის უბნიების გადატანა (გაცვლა) ერთი ქრომოსომიდან სხვაზე

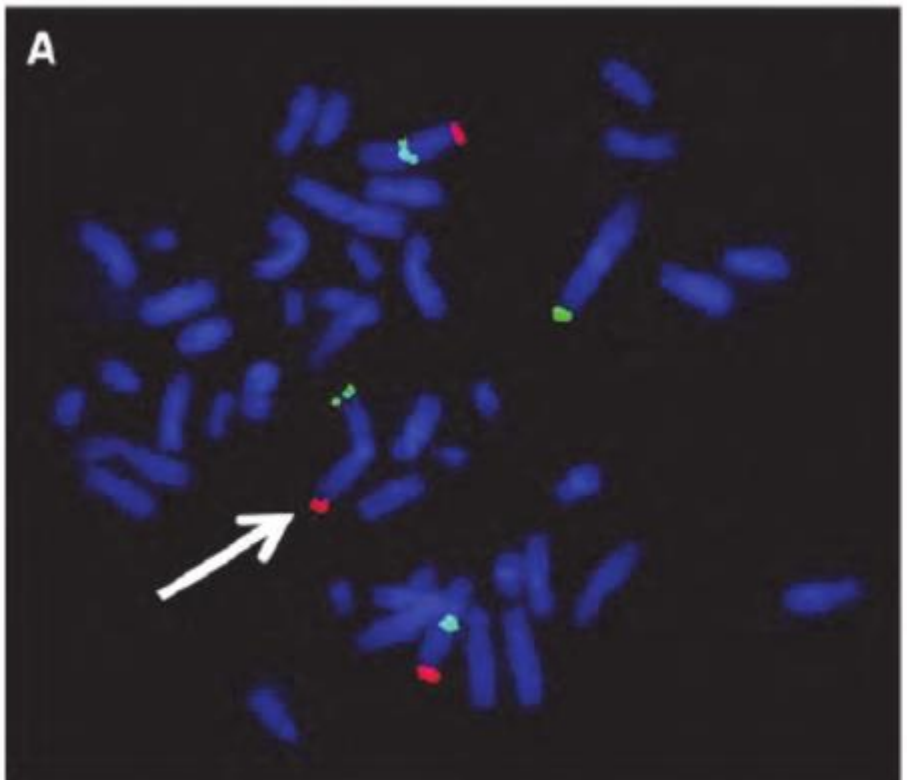
ტრანსლოკაცია - პრეპარატი დამზადებულია რუტინული მეთოდით

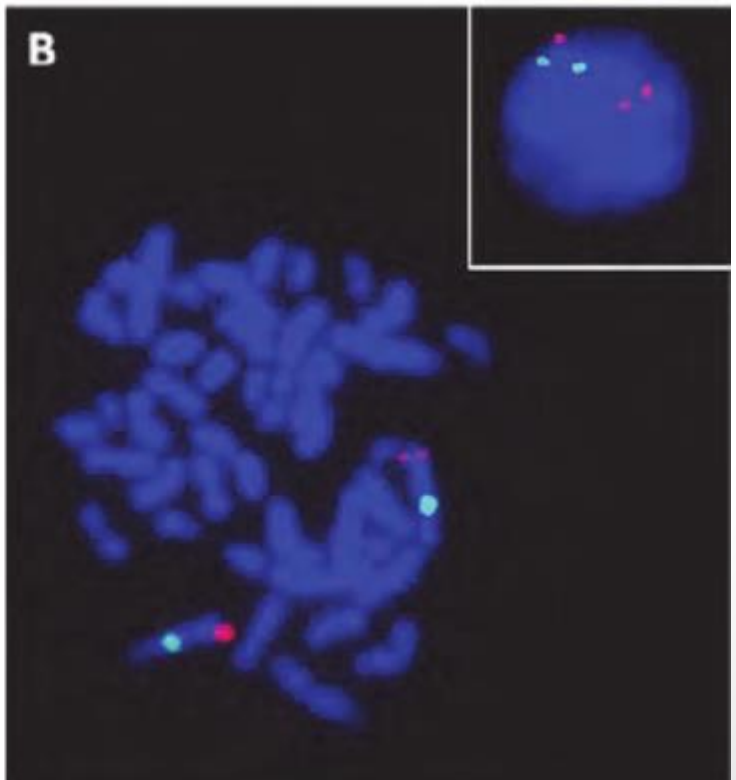




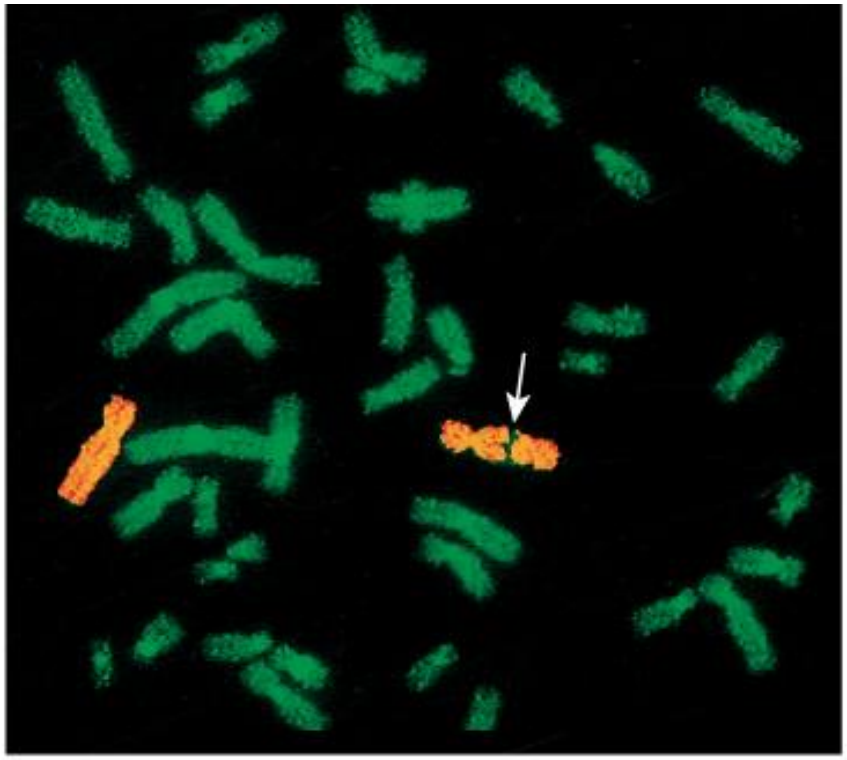





A

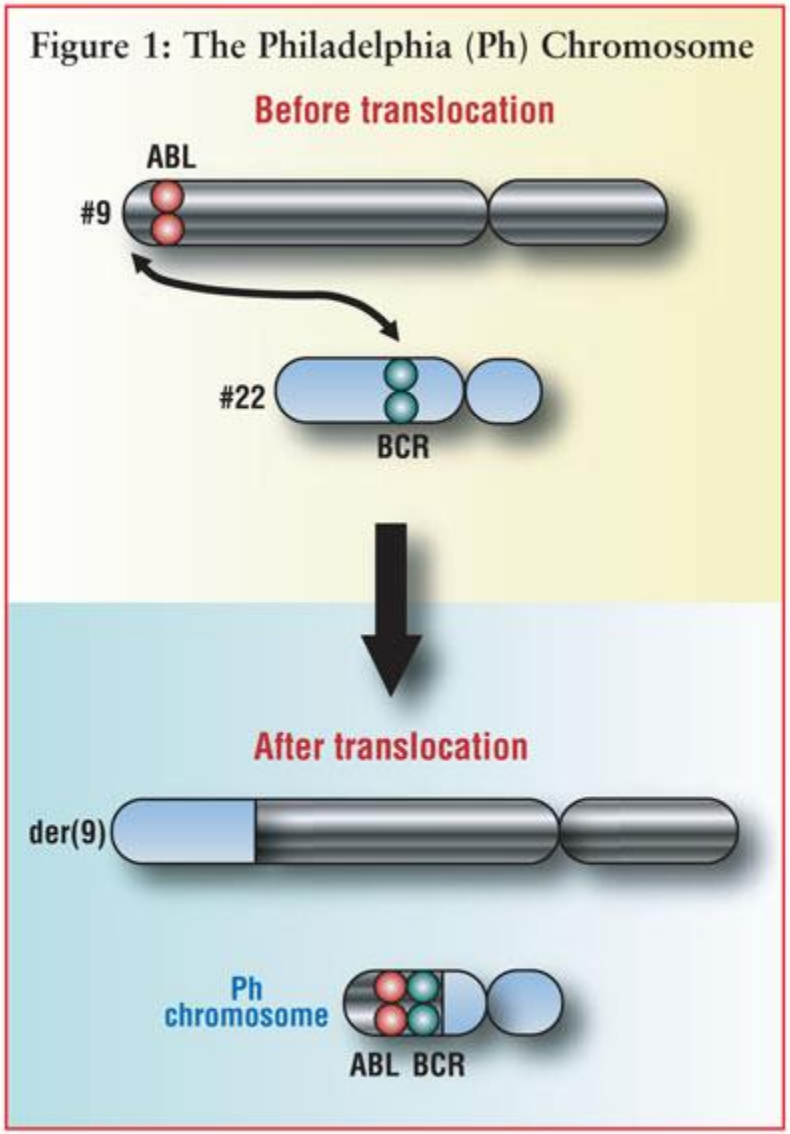

B

მე-5 ქრომოსომის გრძელი მხარი შეიცავს ინსერცირებულ უბანს (ნაჩვენებია ისრით).

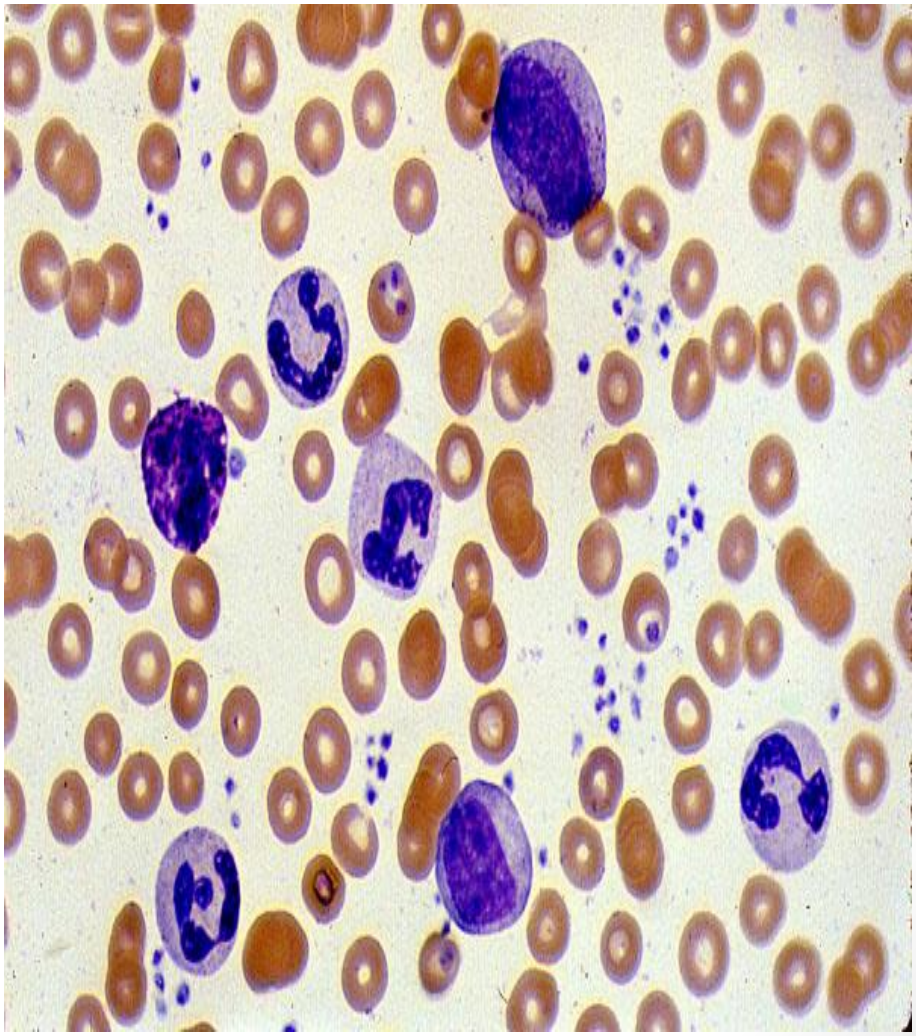


© Elsevier Ltd. Turnpenny & Ellard: Emery's Elements of Medical Genetics 12E www.studentconsult.com

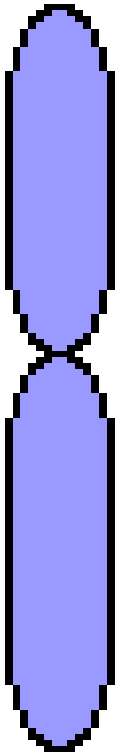
რეციპროკული ტრანსლოკაცია (უბნების მიმოცვლა) - ქრონიკული მიელოგენური ლეიკემიის გამომწვევი დარღვევა

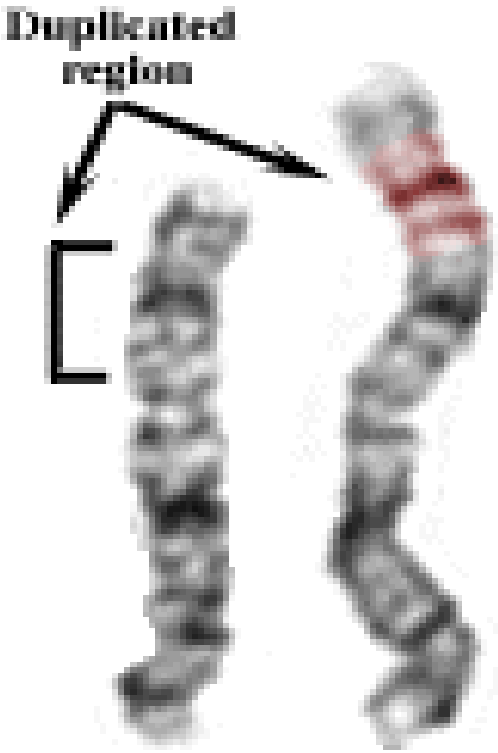


When chromosomes 9 and 22 exchange portions of their genetic material, this translocation results in the formation of der(9), an elongated chromosome 9, and the Ph chromosome, which contains the hybrid BCR-ABL gene.



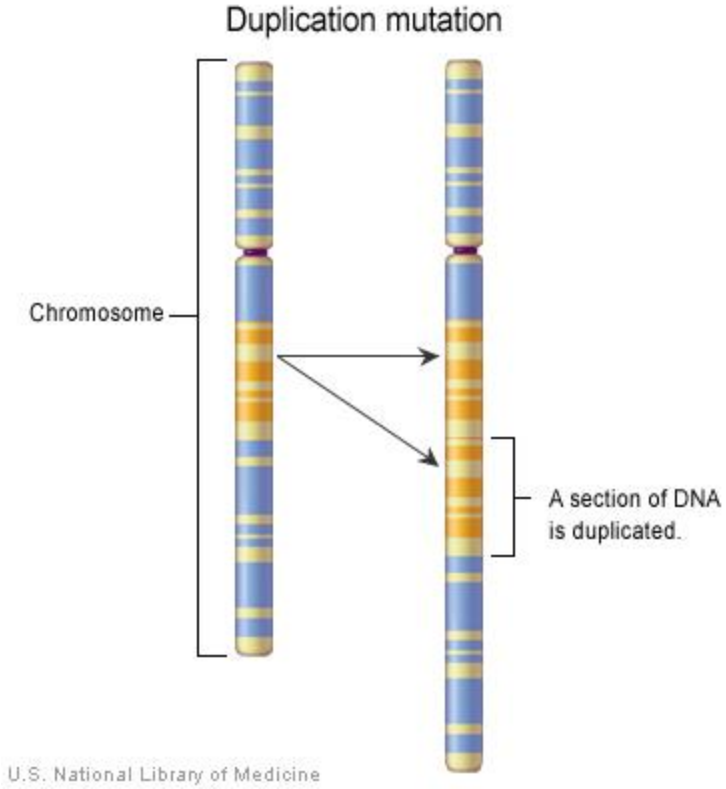
დუპლიკაცია

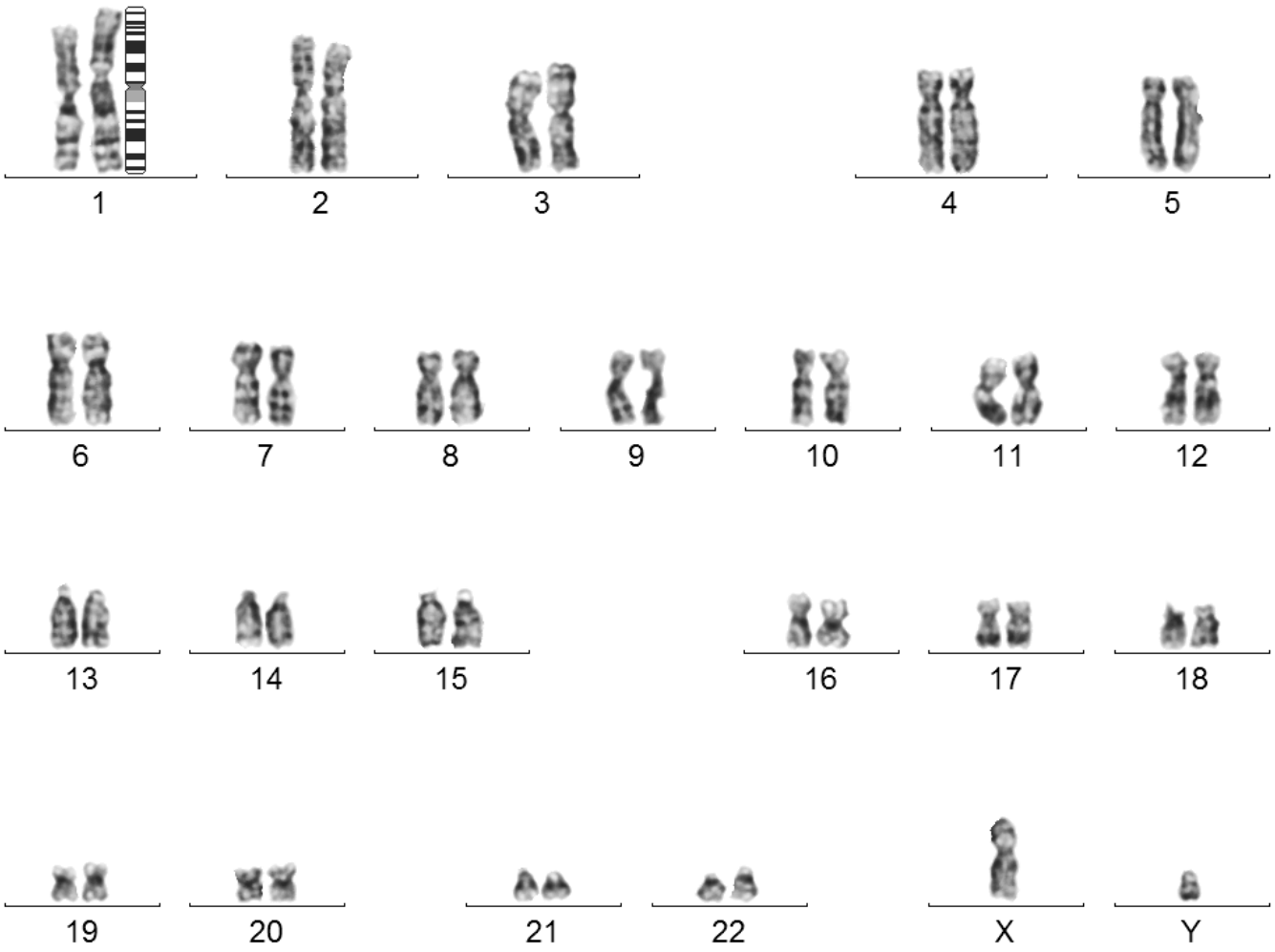




ქრომოსომის გარკვეული უბნის გაორმაგება
(რამდენიმე ასლის წარმოქმნა)

დუპლიკაცია


Duplication mutation
Chromosome
A section of DNA is duplicated.
U.S. National Library of Medicine


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

n	l	l [µm]	p:q
1	114	**7.4 µm**	**57:57**
1	128	**8.3 µm**	**55:73**
2	108	7.0 µm	46:62
2	101	6.5 µm	36:65
3	80	5.2 µm	37:43
3	86	5.5 µm	39:47
4	81	5.2 µm	24:57
4	83	5.4 µm	25:58
5	76	4.9 µm	21:55
5	76	4.9 µm	23:53
6	74	4.8 µm	26:48
6	74	4.8 µm	28:46
7	67	4.3 µm	25:42
7	64	4.1 µm	26:38
X	66	4.3 µm	27:39
8	59	3.8 µm	20:39
8	61	3.9 µm	21:40
9	60	3.9 µm	25:35
9	61	3.9 µm	22:39
10	61	3.9 µm	21:40
10	60	3.9 µm	18:42
11	54	3.5 µm	27:27
11	59	3.8 µm	27:32
12	59	3.8 µm	25:34
12	58	3.7 µm	19:39
13	51	3.3 µm	8:43
13	47	3.0 µm	33:14
14	47	3.0 µm	7:40
14	45	2.9 µm	33:12
15	48	3.1 µm	30:18
15	48	3.1 µm	12:36
16	45	2.9 µm	19:26
16	40	2.6 µm	19:21
17	41	2.6 µm	15:26
17	38	2.5 µm	12:26
18	38	2.5 µm	16:22
18	36	2.3 µm	11:25
19	29	1.9 µm	12:17
19	32	2.1 µm	14:18
20	28	1.8 µm	13:15
20	32	2.1 µm	15:17
21	27	1.7 µm	0:27
21	25	1.6 µm	0:25
22	24	1.5 µm	0:24
22	29	1.9 µm	17:12
Y	26	1.7 µm	10:16

Microscope Magnification: 100 Ч

2003 წელს საზეიმოდ გამოცხადდა, რომ დასრულდა ‘ადამიანის გენომის პროექტის’ პირველი ეტაპი:

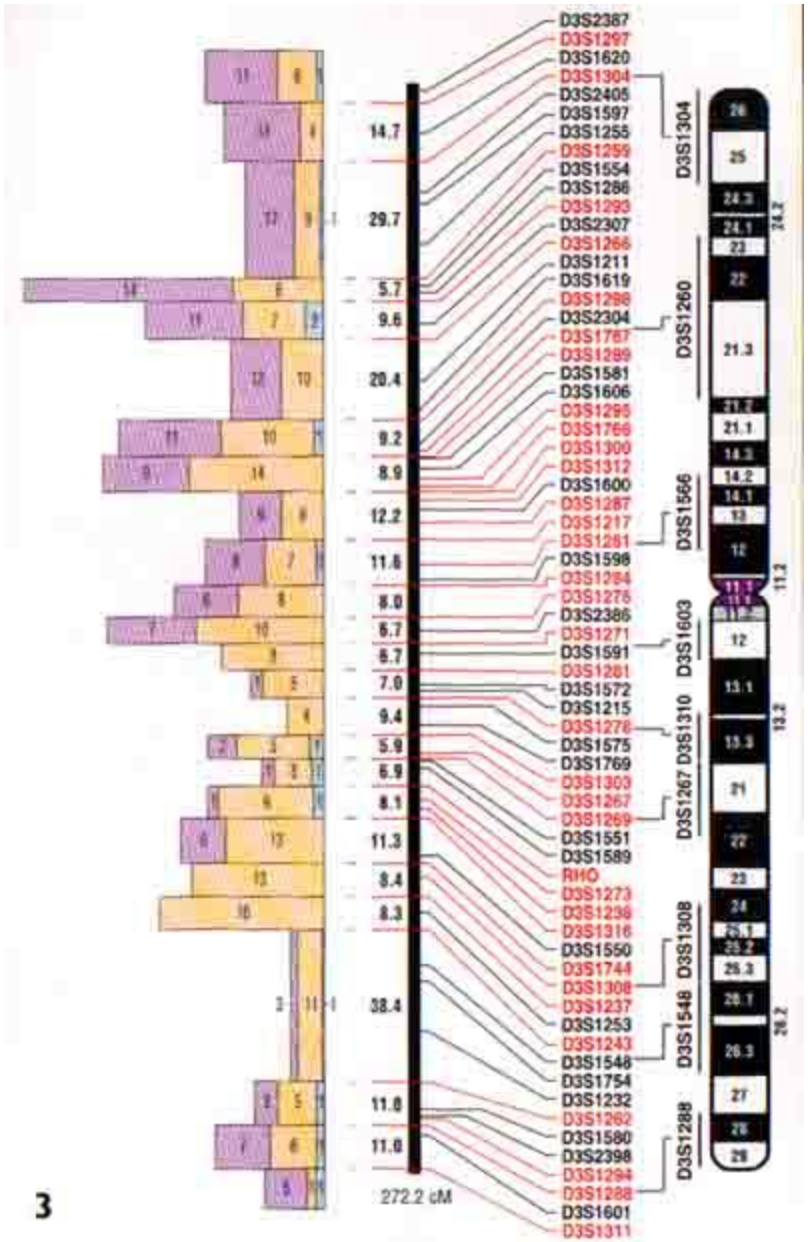
გაიშიფრა ‘ადამიანის ცხოვრების წიგნი’.

President Clinton and geneticists J. Craig Venter (left) and Francis Collins (right) celebrate

ადამიანის გენომის სეკვენირება

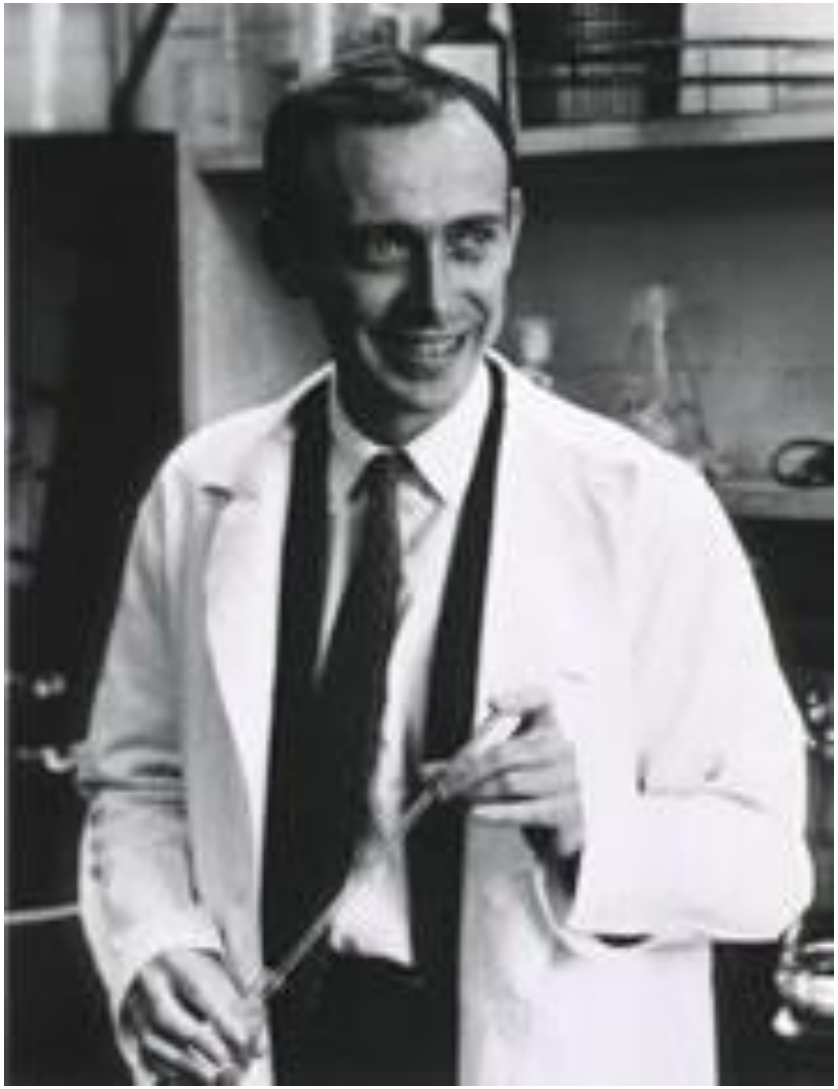
- პირველ ეტაპზე **გაიშიფრა** მოხალისეთაგან შერჩეული 10 პირის **გენომი**.
- განსაზღვრულ იქნა **ინდივიდუალური ქრომოსომების ნუკლეოტიდური შენება.**
-

ადამიანის გენომის პროექტი
ადამიანის მე–3 ქრომოსომის რუკა



1 June 2007 | Nature | doi:10.1038/news070528-10 News

ჯეიმს უოტსონის **გენომი სეკვენირებულია** (ღირებულება - 800 000-მდე დოლარი; დღეს 1000 დოლარად არის ხელმისაწვდომი)



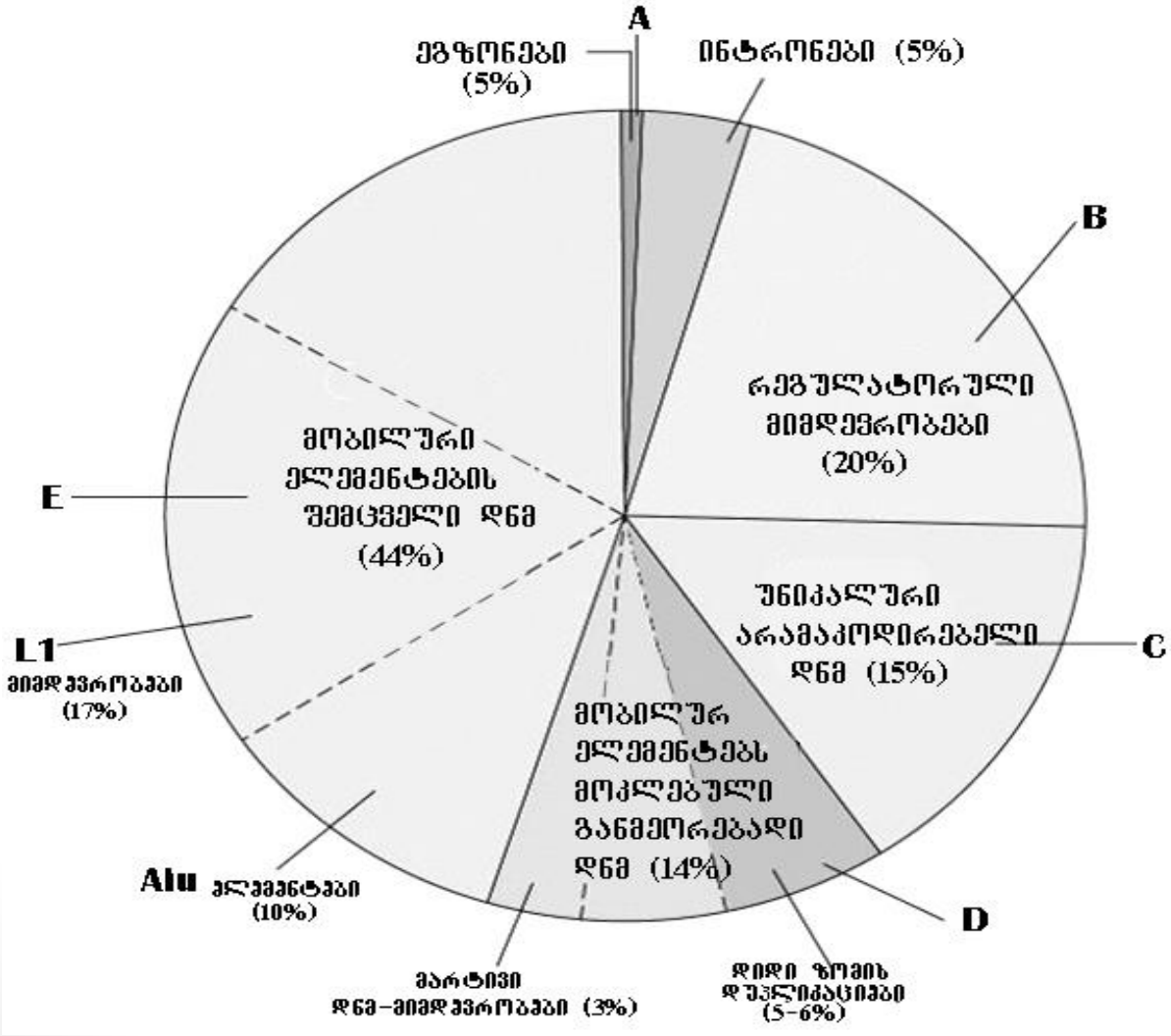
რა გვამცნო ადამიანის გენომის პროექტმა?

- ადამიანის გენომი მხოლოდ 25000-30000 გენს შეიცავს....
- ...სავარაუდო რაოდენობის მხოლოდ 1/3-1/4-ს
- ...მათი რიცხვი მხოლოდ 2-ჯერ-3-ჯერ აღემატება მწერებისა და ჭიების გენების რიცხვს!

რა გვამცნო ადამიანის გენომის პროექტმა?

- ადამიანებს ერთნაირი აღმოგვაჩნდა გენომის 99.9 %....
- ...არ დადასტურდა პირდაპირი კავშირი გენომის ზომასა და ორგანიზაციის სირთულეს შორის...
- ...აღმოჩნდა, რომ ადამიანის გენების უმეტესობას ერთზე მეტი ცილოვანი პროდუქტის წარმოება შეუძლია (მაგ., ალტერნატიული სპლაისინგის გზით)...

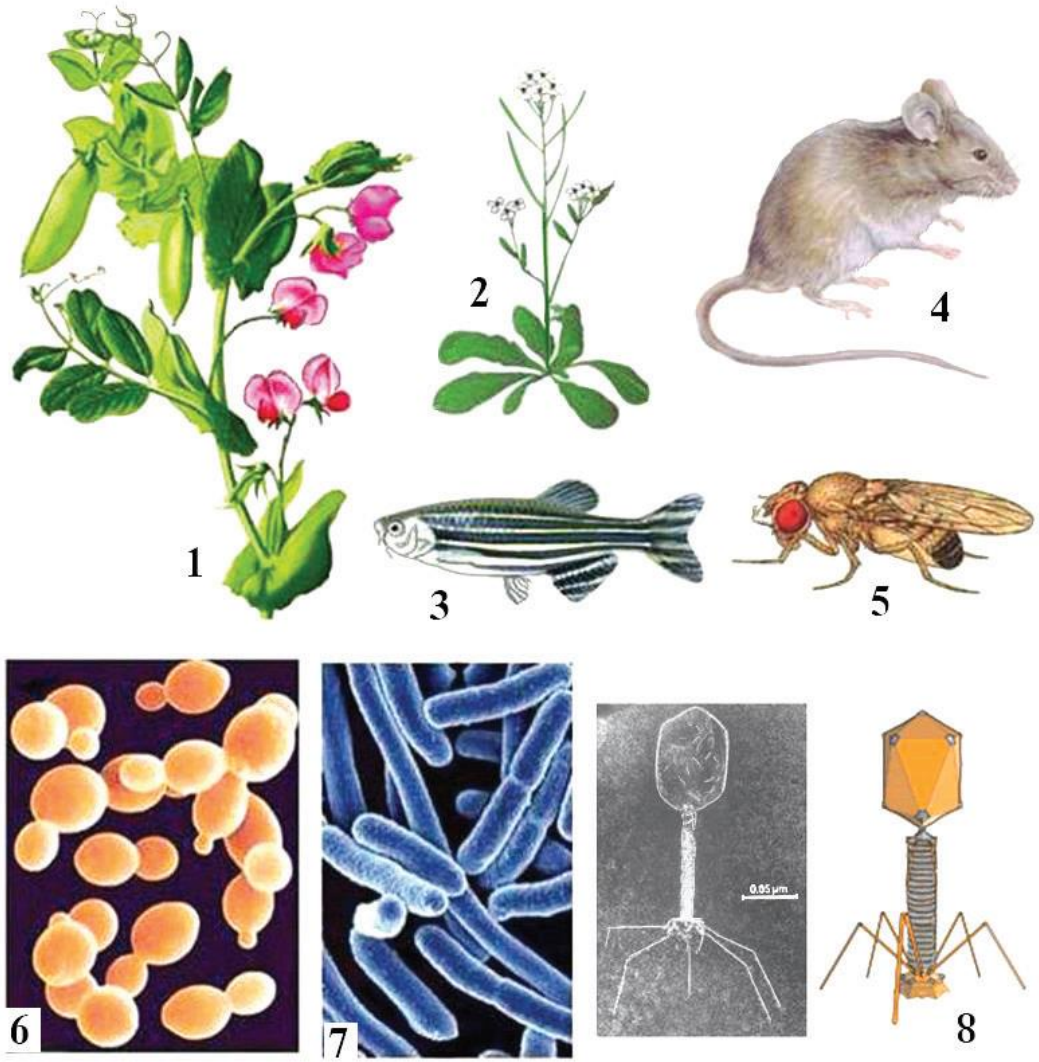
რა გვამცნო ადამიანის გენომის პროექტმა?



ორგანიზმებს შორის მსგავსება

- ბევრი გენი საზიარო აღმოგვაჩნდა სხვა ორგანიზმებთან.
- ადამიანის გენომის 50%-ზე მეტი გვხვდება სხვა ორგანიზმებშიც...

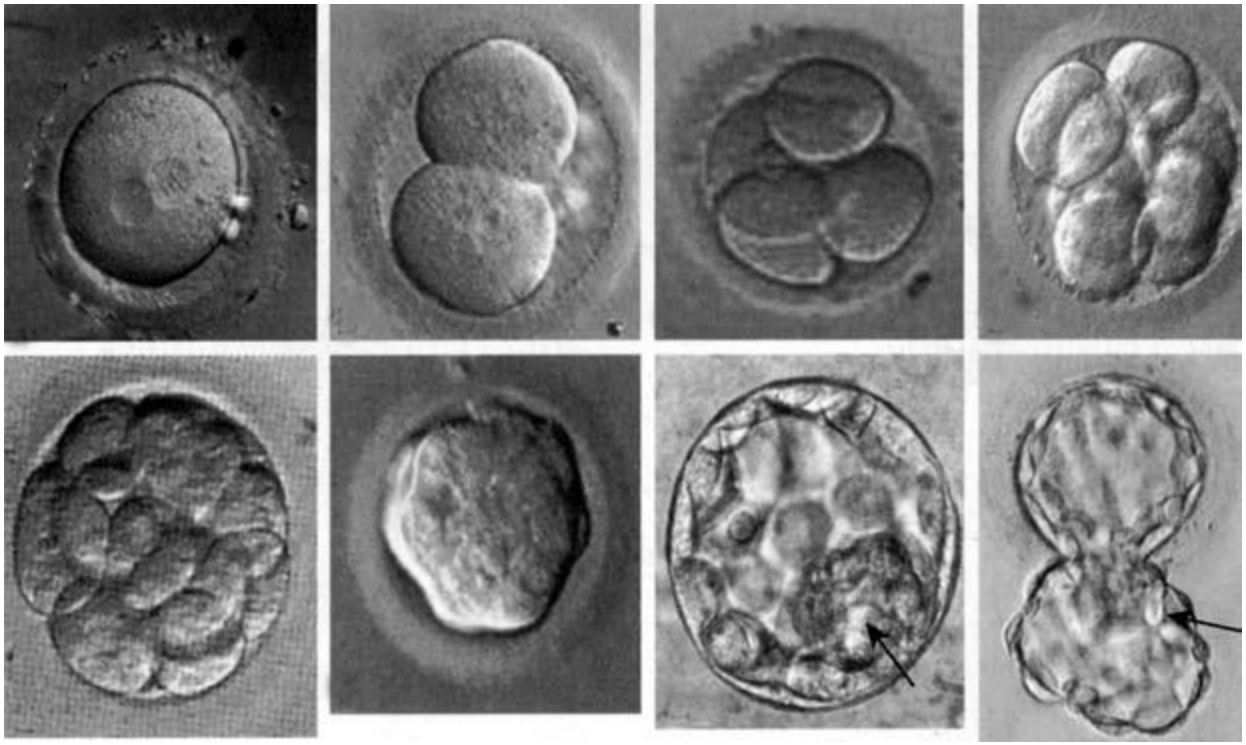
მოდელური ობიექტები ადამიანის ჯანმრთელობის სამსახურში



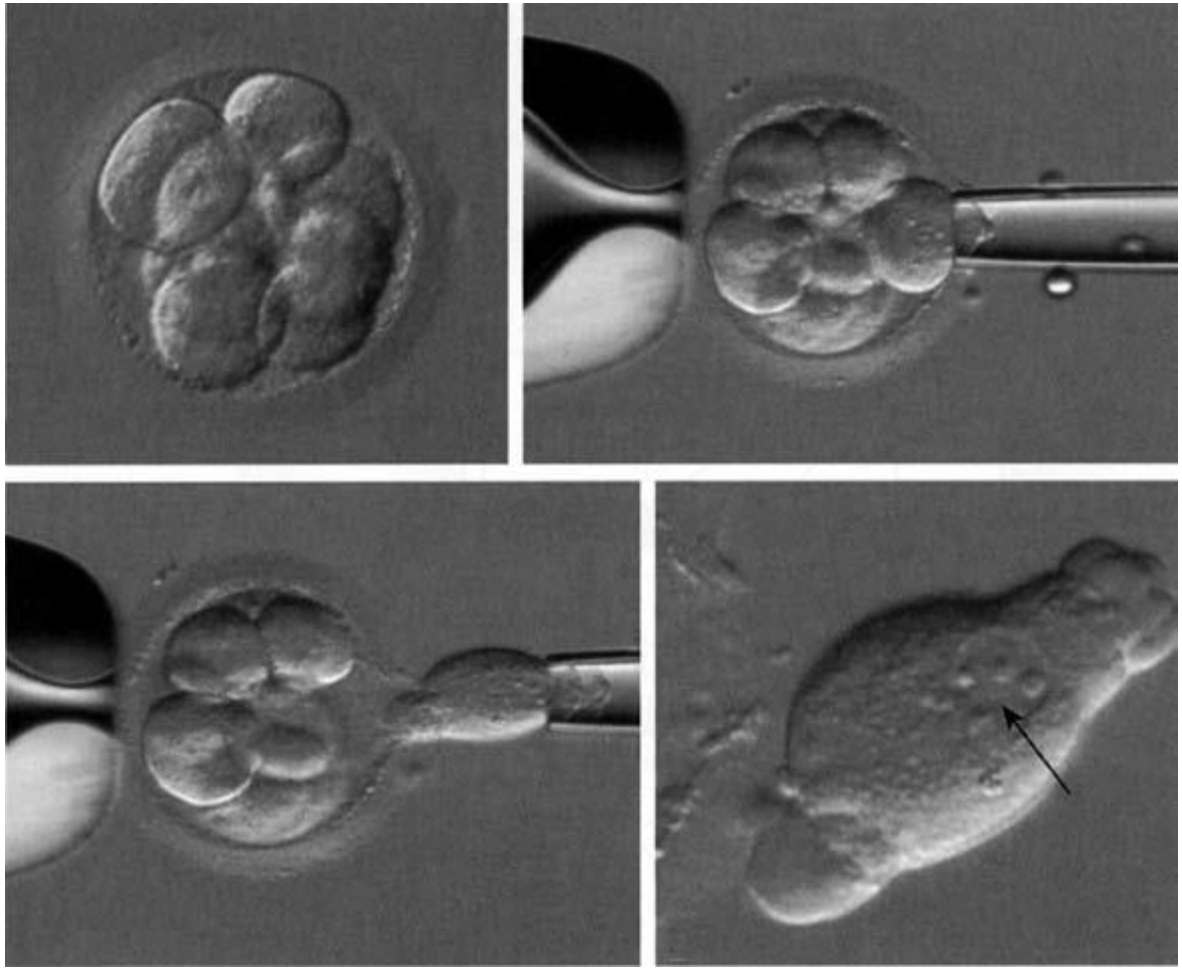
ცილა ლეპტინის დეფიციტი

თაგვი (მარცხნივ) ცილა ლეპტინის დეფიციტით

კვერცხუჯრედი ორი პრონუკლეუსითა და პოლარული სხეულით; ორუჯრედიანი ემბრიონი განაყოფიერების 1-ელ დღეს; ოთხუჯრედიანი ემბრიონი მე-2 დღეს; რვაუჯრედიანი ემბრიონი მე-3 დღეს; 16-უჯრედიანი ემბრიონი მე-3 დღის ბოლოს, ამას შემდგომ მოსდევს კომპაქტიზაცია და ამ პერიოდიდან ემბრიონი უკვე მორულაა (მე-4 დღე); გამოსახულია ბლასტოცისტის ფორმირება მე-5 დღეს, ისრით ნაჩვენებია შიდაუჯრედული მასა. ემბრიონის გამოსვლა ზონა პელლუციდადან



მანიპულირება ემბრიონულ უჯრედებზე

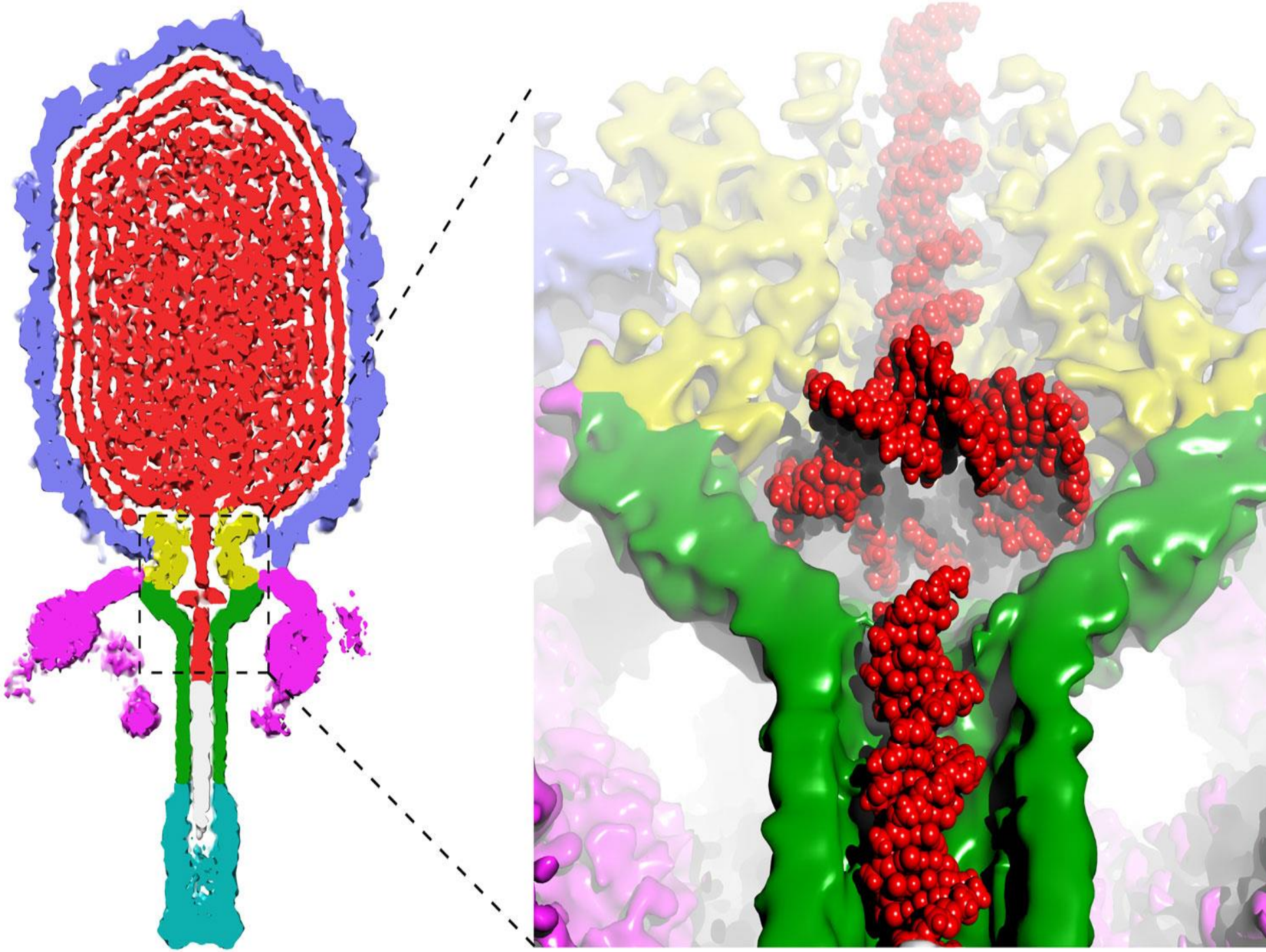


რეკომბინანტული დნმ ტექნოლოგია

ინ ვიტრო
რეკომბინაცია

გენეტიკური
ინჟინერია

გენეტიკური
„ქირურგია“



გენის კლონირების სტრატეგია:-

კლონი არის ერთი, **საერთო წარმომავლობის** ორგანიზმების, უჯრედების, მოლეკულების ჯგუფი. კლონი და კოლონია ფაქტობრივად სინონიმებია.

Generation of DNA fragments

↓ რესტრიქტაზით დაჭრა

Insertion into a cloning vector

↓ ჩლუნგი ან კოჰეზური ბოლოების ლიგაცია

Introducing into host cells

↓ ტრანსფორმაცია, ტრანსფექცია, ტრანსდუქცია

Selection for screening

ჰიბრიდიზაცია, პჯრ, იმუნო-ქიმიური მეთოდები

უჯრედული დნმ-ის გამოყოფა და პურიფიკაცია:-

ნუკლეინის მჟავების პურიფიკაცია 3 ეტაპისაგან შედგება….

1) უჯრედის დაშლა დნმ-ის მოპოვების მიზნით

2) ნუკლეინის მჟავას გამოცალკევება სხვა უჯრედული კომპონენტებისაგან

3) ნუკლეინის მჟავას მიღება სუფთა სახით.

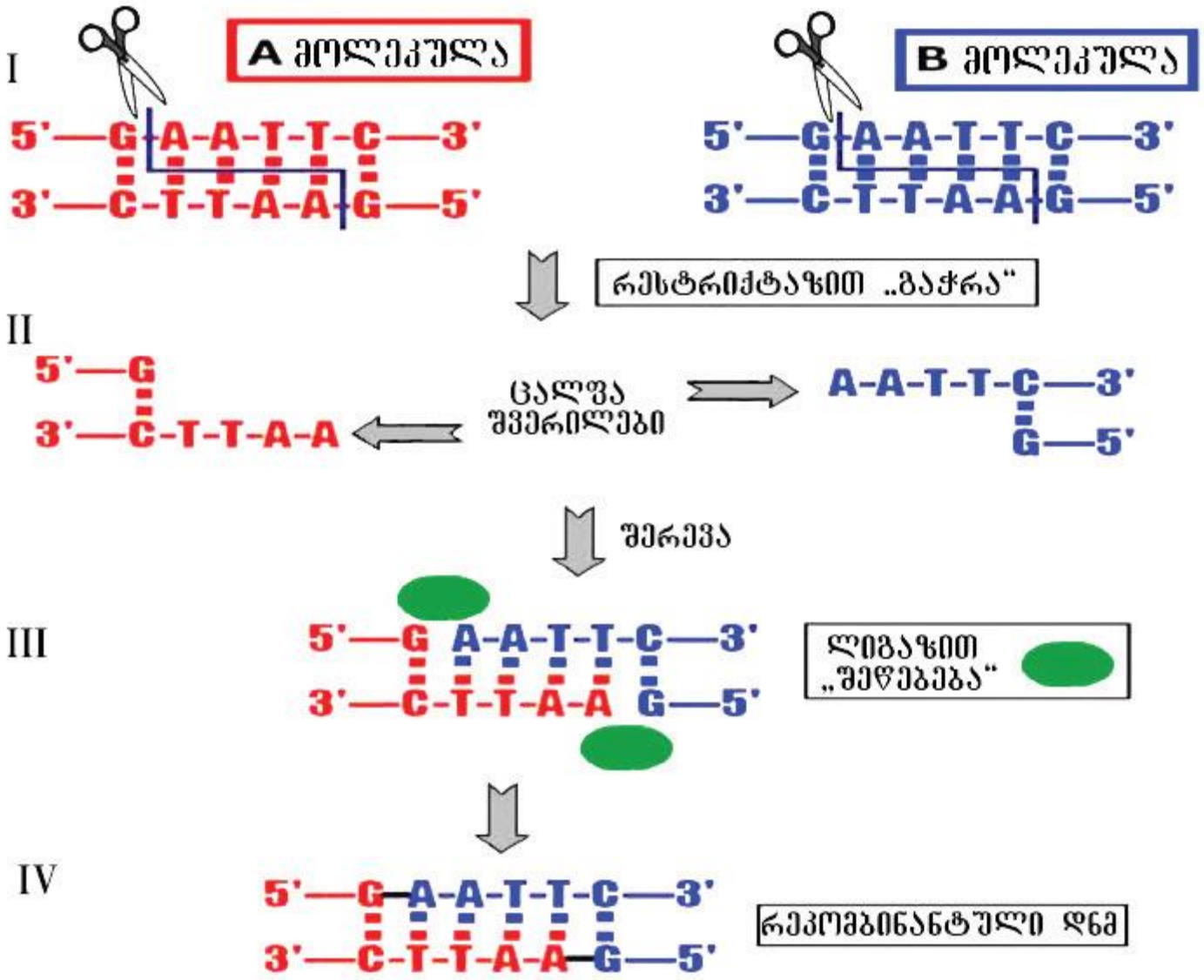
უჯრედული დნმ-ის პურიფიკაცია:-

- 1-ლი ნაბიჯი → უჯრედის გახსნა და დნმ-ის გამონთავისუფლება.
- მეთოდი ძალზე ნატიფია: არ უნდა დაზიანდეს ნატივური დნმ.
- უჯრედის გახსნა სხვადასხვა მეთოდით შეიძლება...

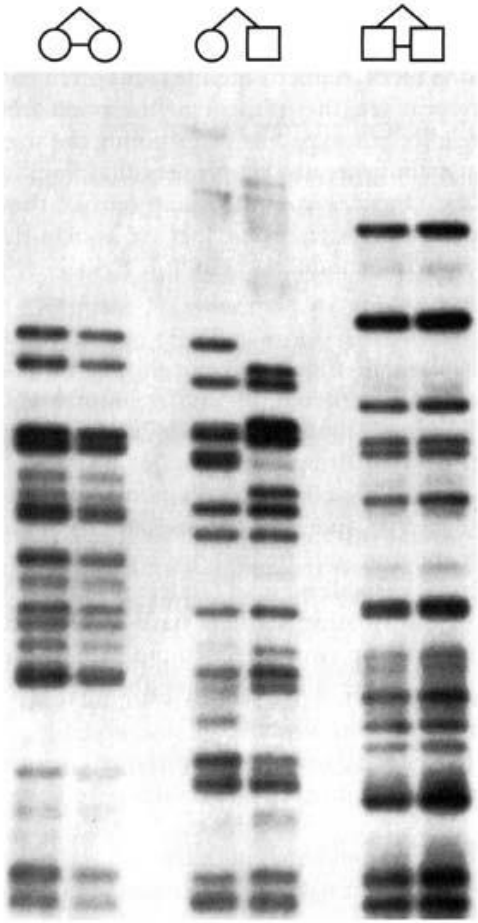
გენეტიკური ინჟინერიის ფუნდამენტური ტექნოლოგიები

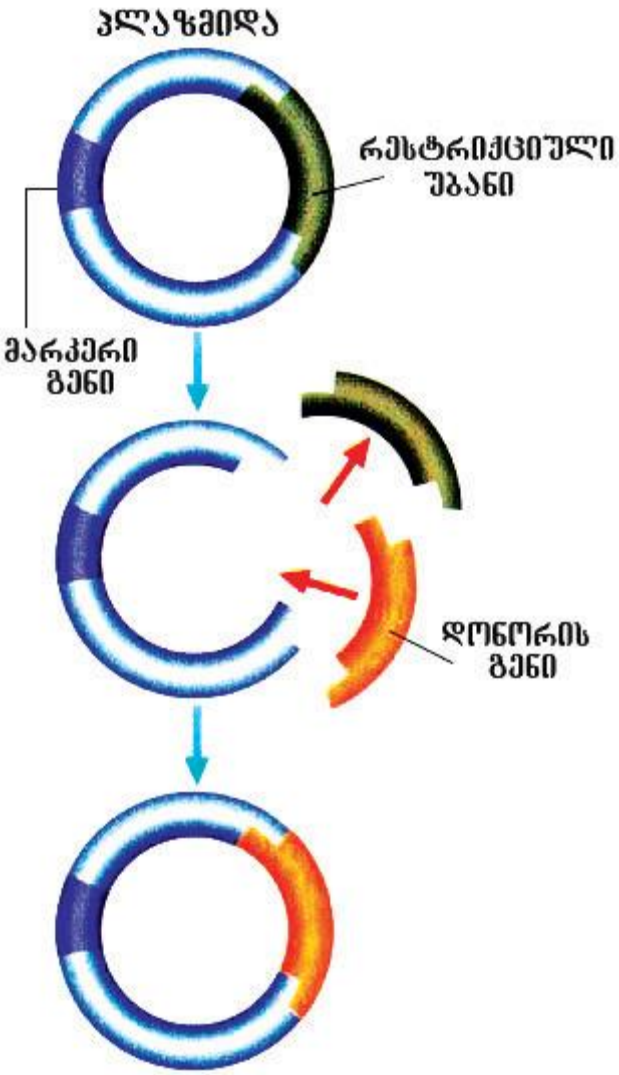
- რეკომბინანტული დნმ-ის ტექნოლოგიაში და გენებით მანიპულირების მიზნით მრავალრიცხოვანი მეთოდები გამოიყენება.
- ყველაზე ხშირად იყენებენ შემდეგ მეთოდებს:

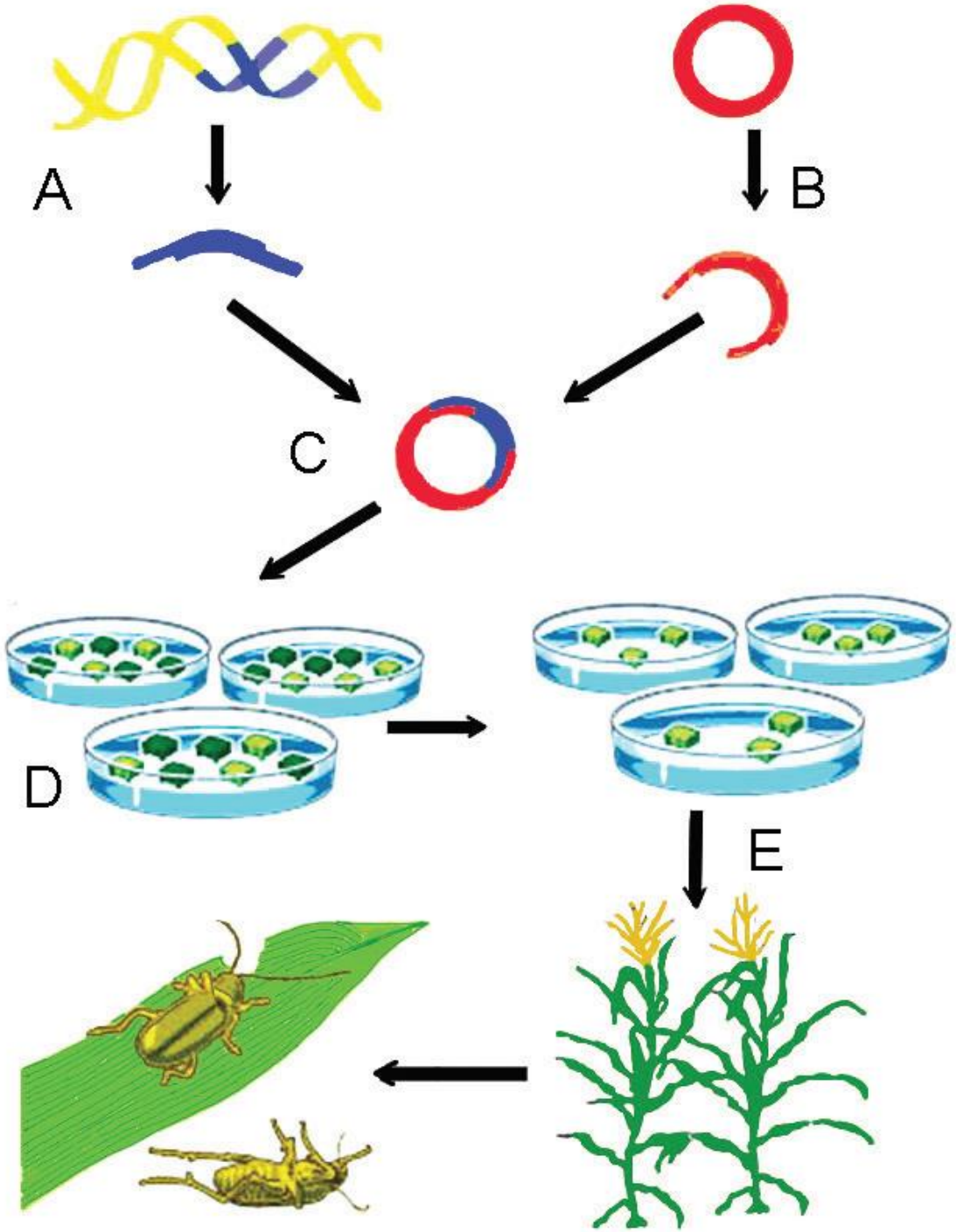
1. ნუკლეინის მჟავების გამოყოფა და პურიფიკაცია
2. ნუკლეინის მჟავების ბლოტინგი
3. დნმ-ის სეკვენირება
4. გენის ტრანსფერი
5. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია
6. გენების ბიბლიოთეკის შექმნა


I
A მოლეკულა
B მოლეკულა
5'—G-A-A-T-T-C—3'
3'—C-T-T-A-A-G—5'
5'—G-A-A-T-T-C—3'
3'—C-T-T-A-A-G—5'
რესტრიქტაზით „გაჭრა“
II
5'—G
3'—C-T-T-A-A
ცალფა
შვერილები
A-A-T-T-C—3'
G—5'
შერევა
III
5'—G A-A-T-T-C—3'
3'—C-T-T-A-A G—5'
ლიგაზით
„შეწებება“
IV
5'—G-A-A-T-T-C—3'
3'—C-T-T-A-A-G—5'
რეკომბინანტული დნმ

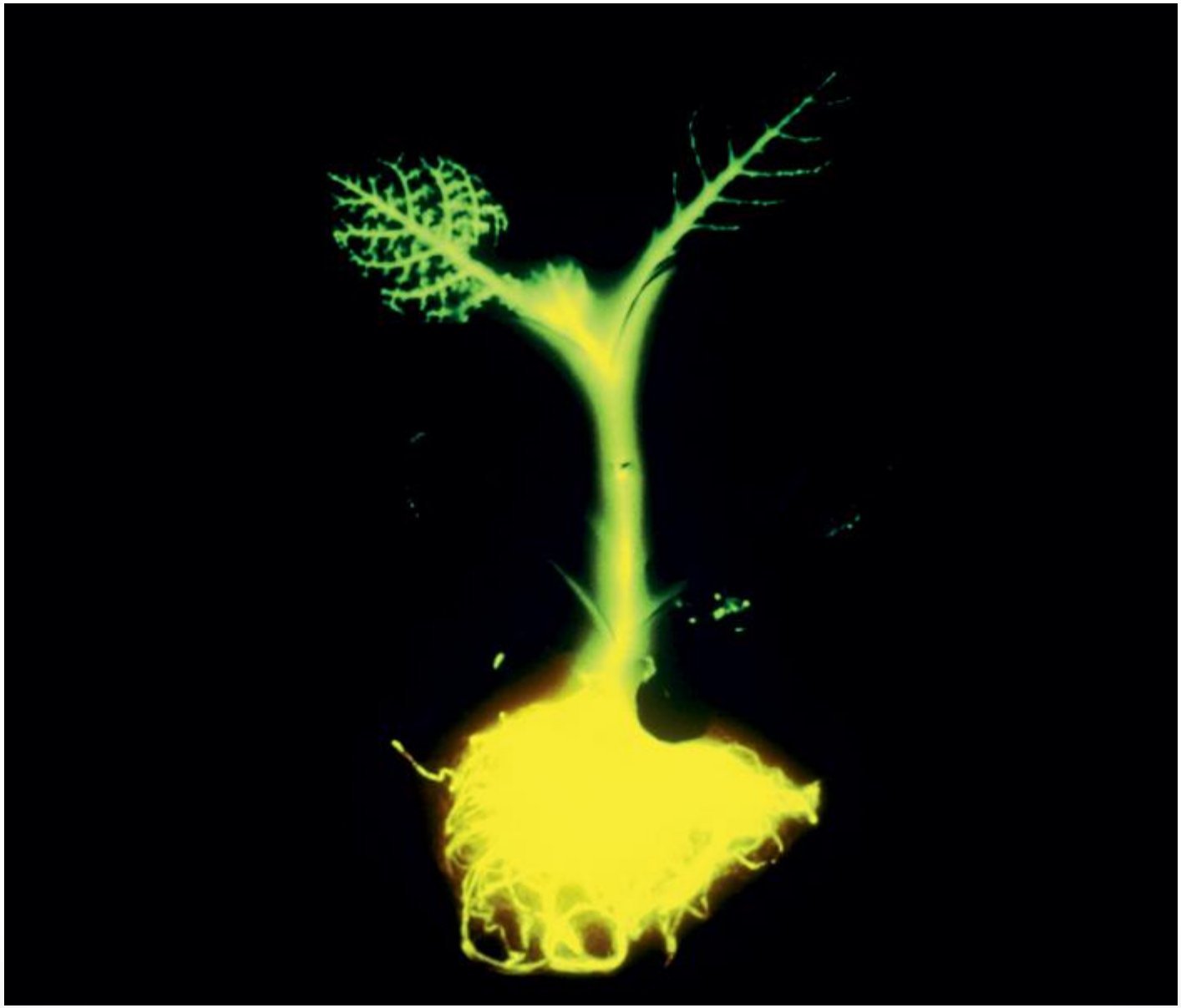
ტყუპების პირველ წყვილს და მესამე წყვილს აქვს იდენტური თითის ანაბეჭდები, რაც მათ მონოზიგოტურობაზე მიუთითებს. შუაში გამოსახულ ნიმუშებს აქვს აშკარად განსხვავებული თითის ანაბეჭდები, რაც ტყუპების დიზიგოტურობაზე მიანიშნებს.

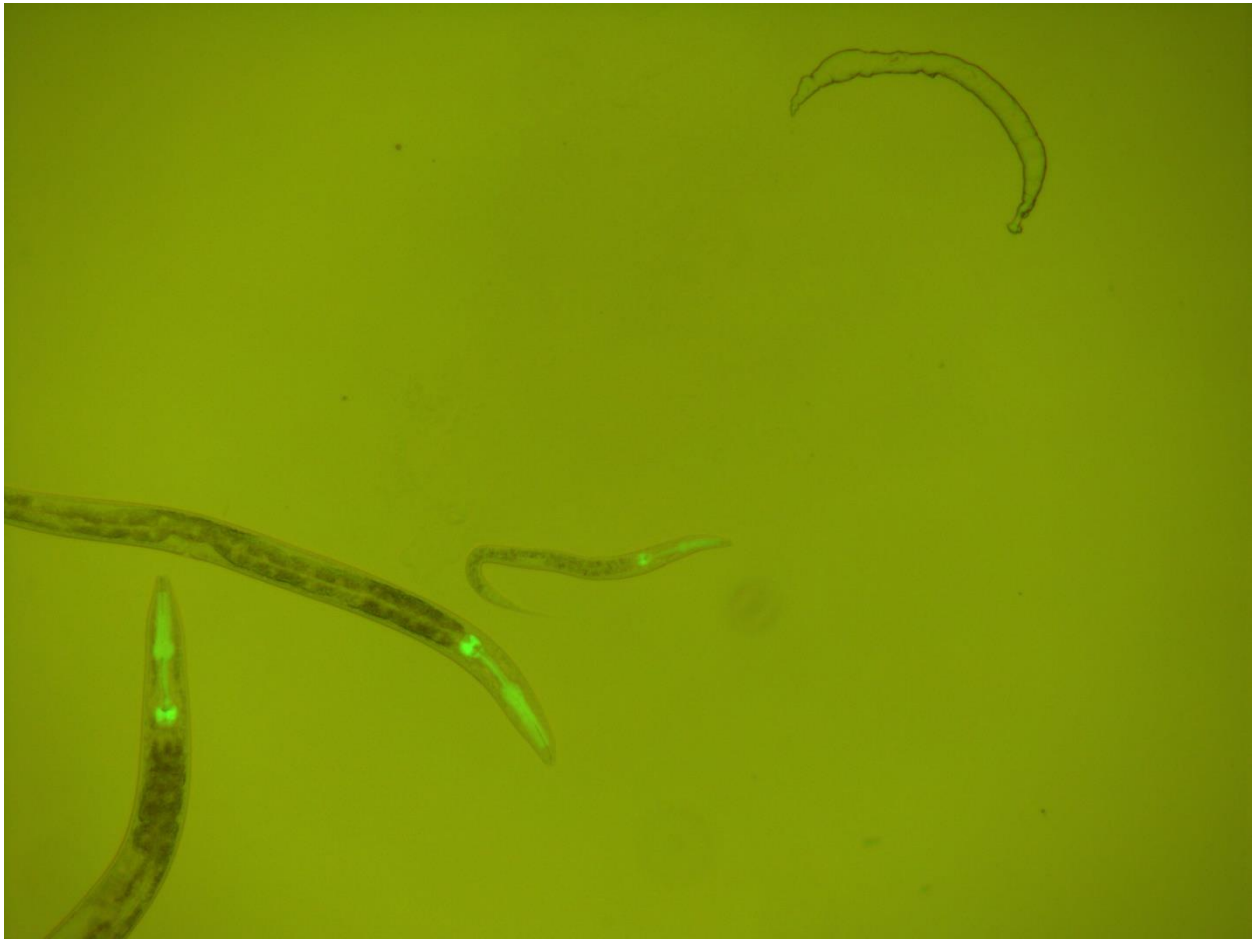


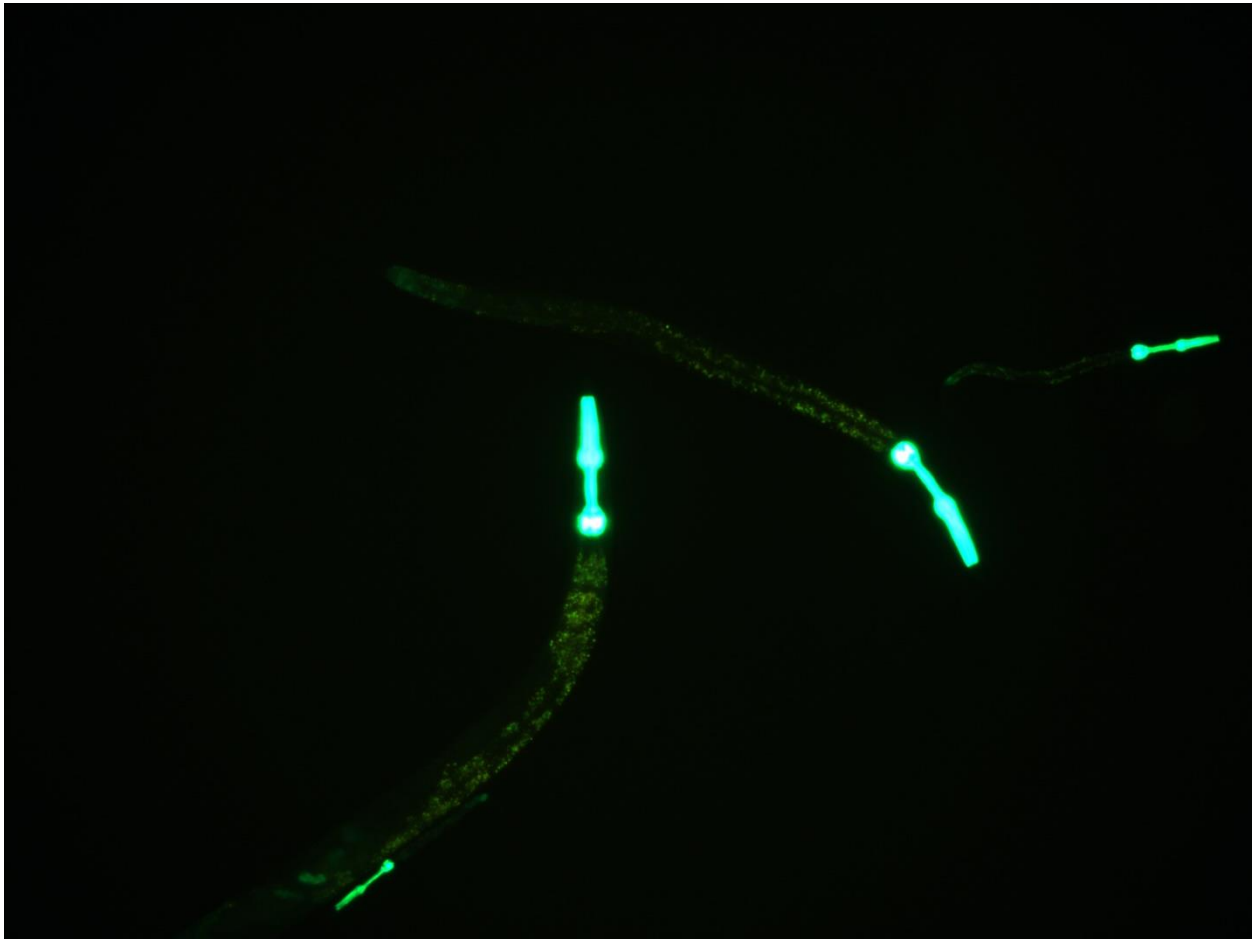

პლაზმიდა
რესტრიქციული
შბანი
მარკერი
გენი
დონორის
გენი


A
B
C
D
E

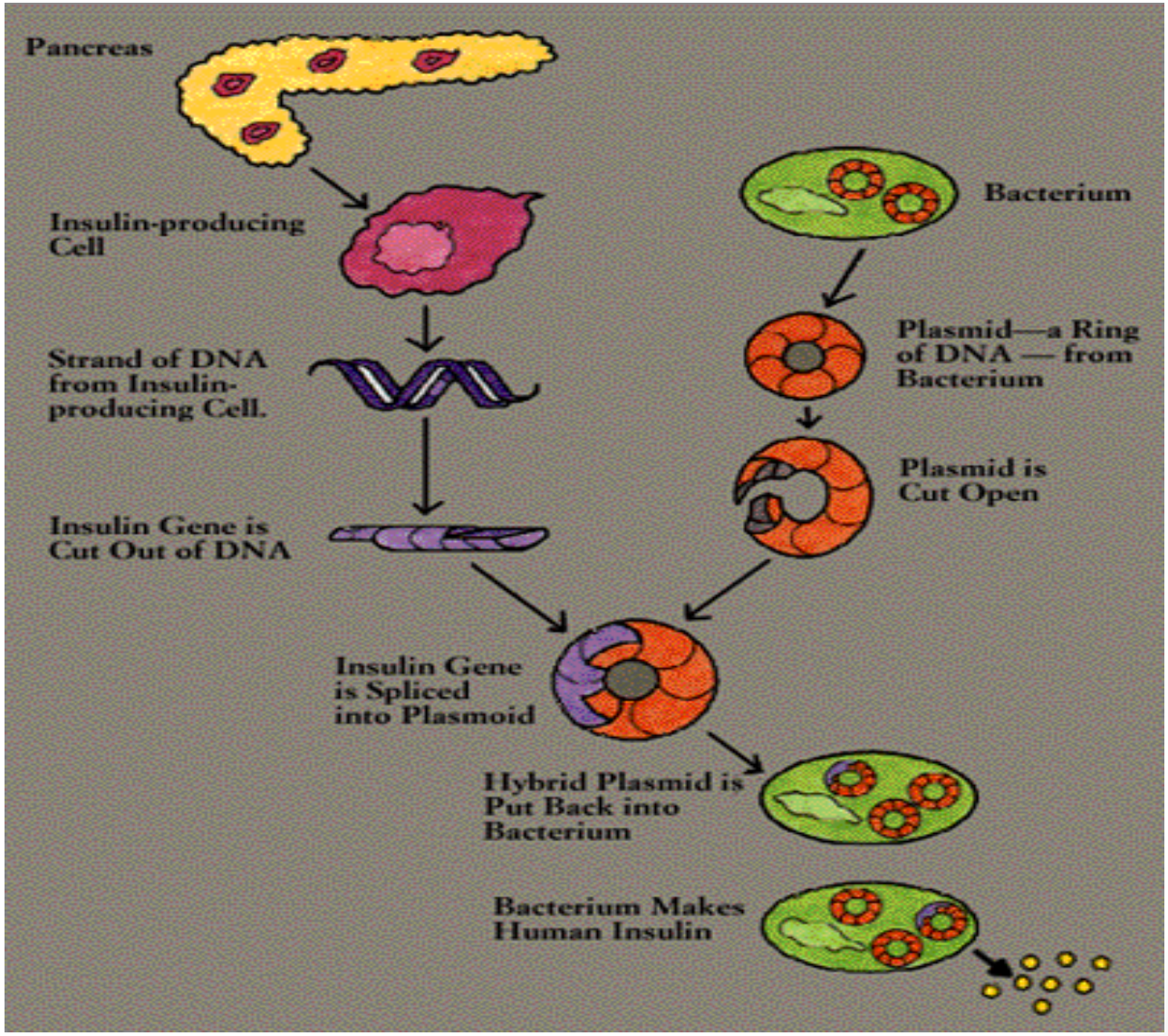
ტრანსგენური მცენარე



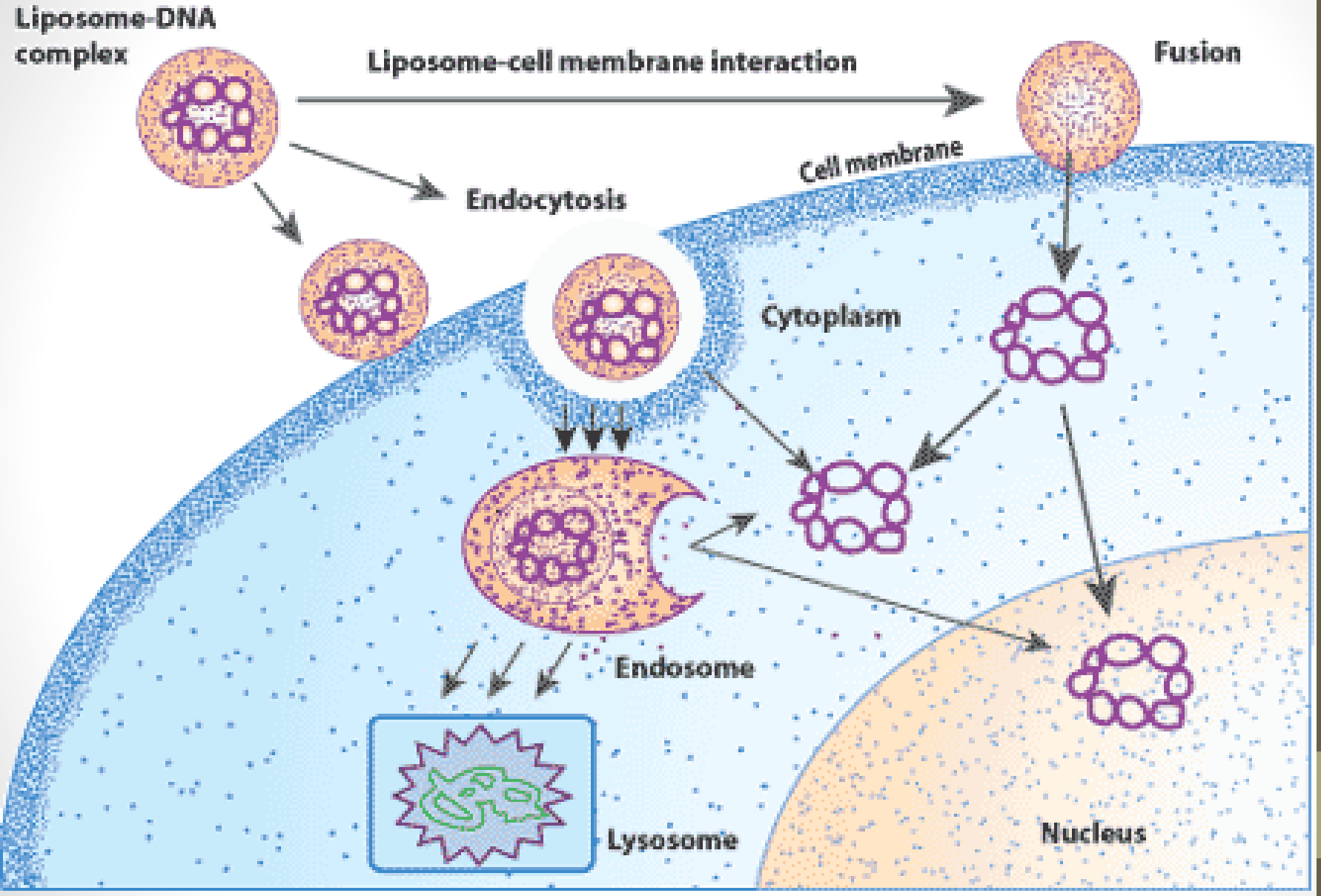


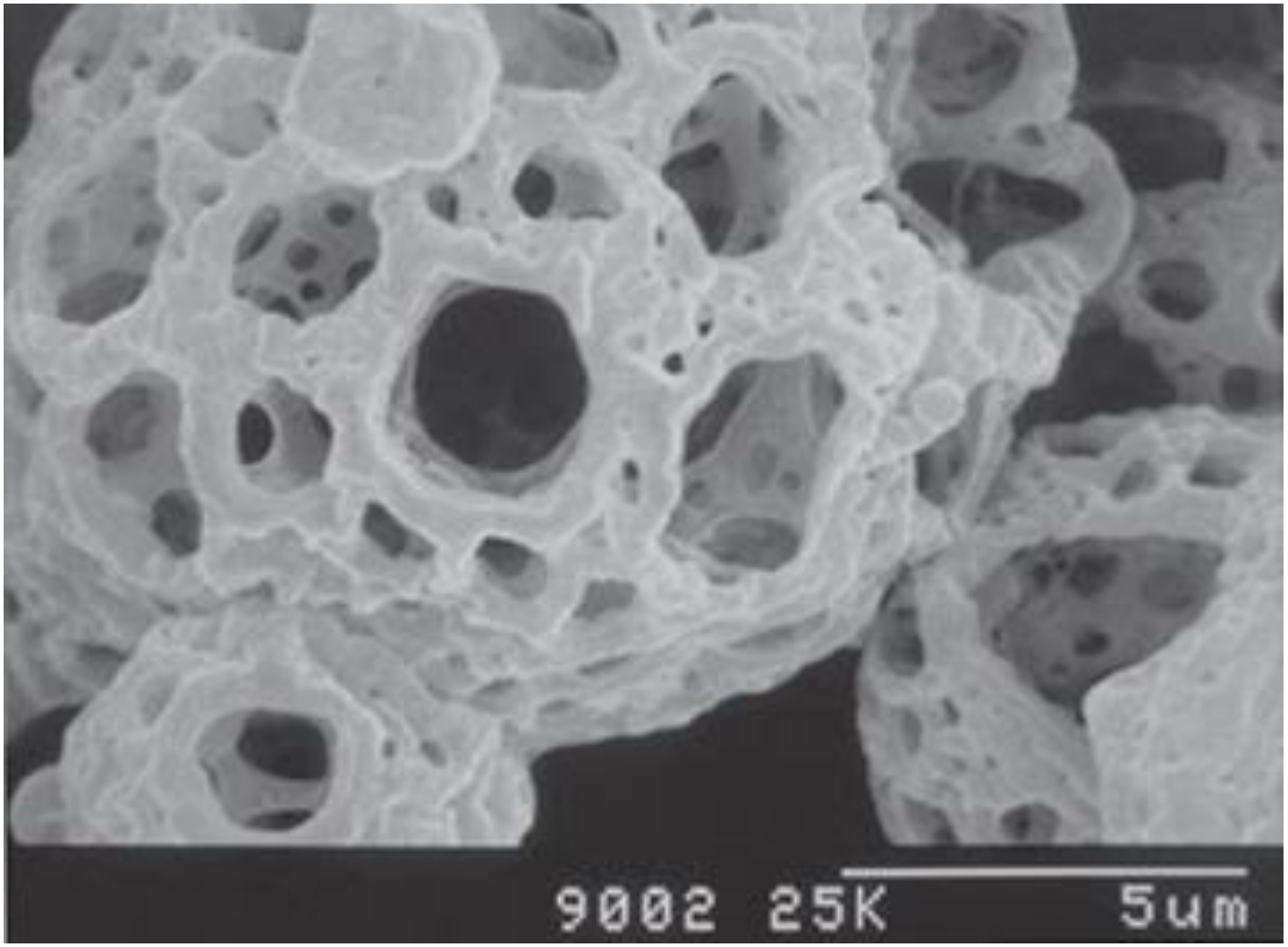


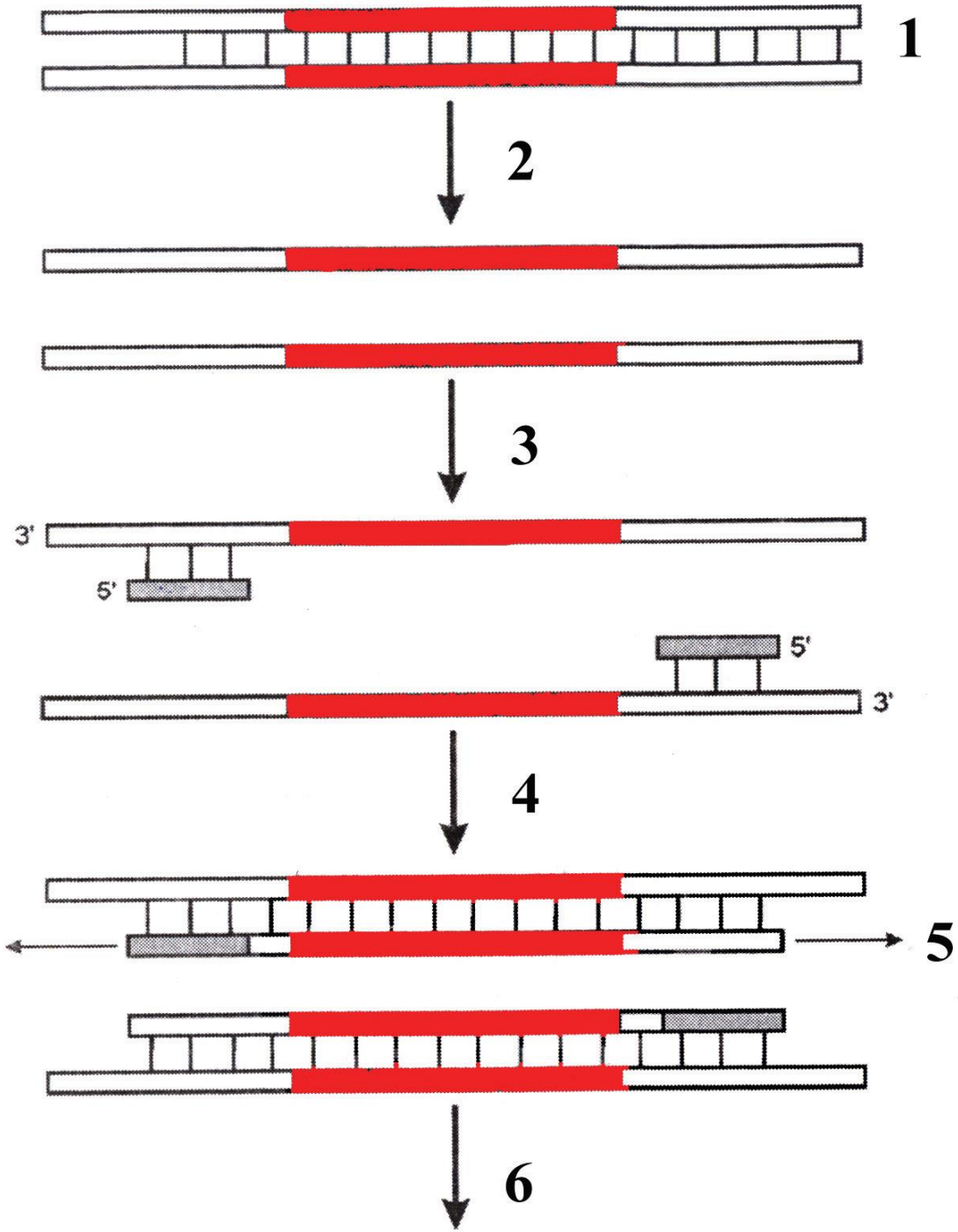
ინსულინის წარმოება გენეტიკური ინჟინერიის მეთოდებით

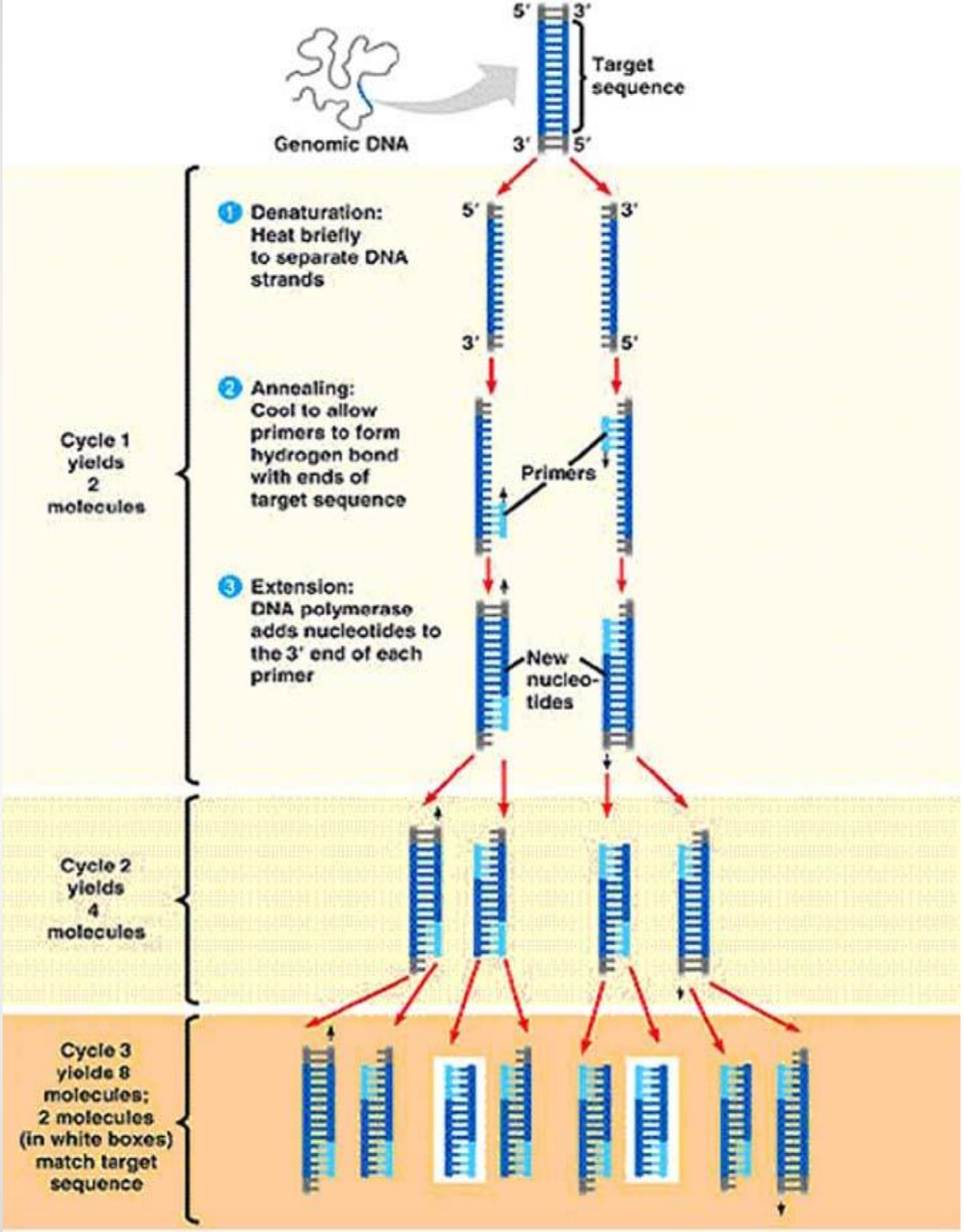


გენის გადატანა ლიპოსომის მეშვეობით:-

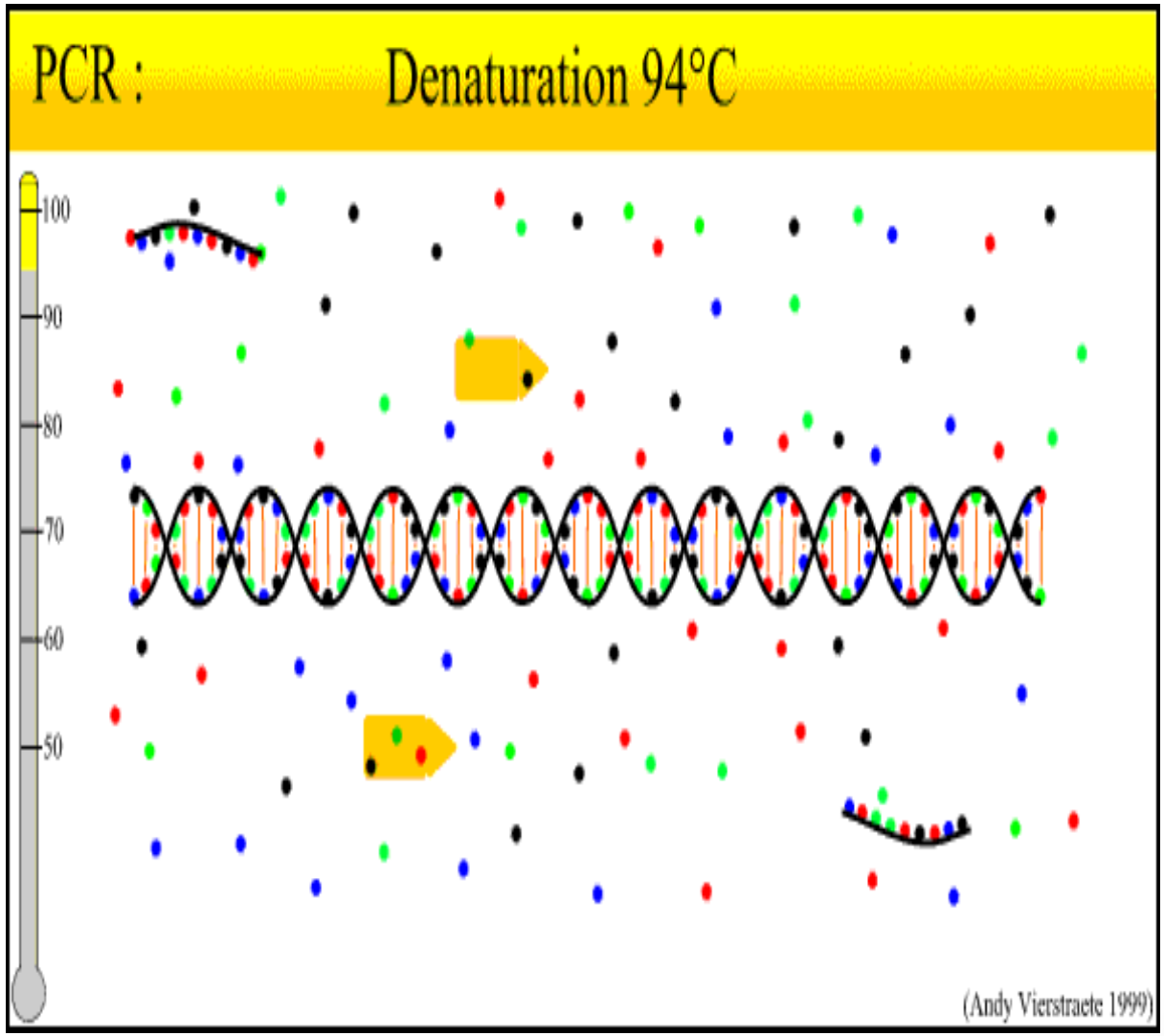


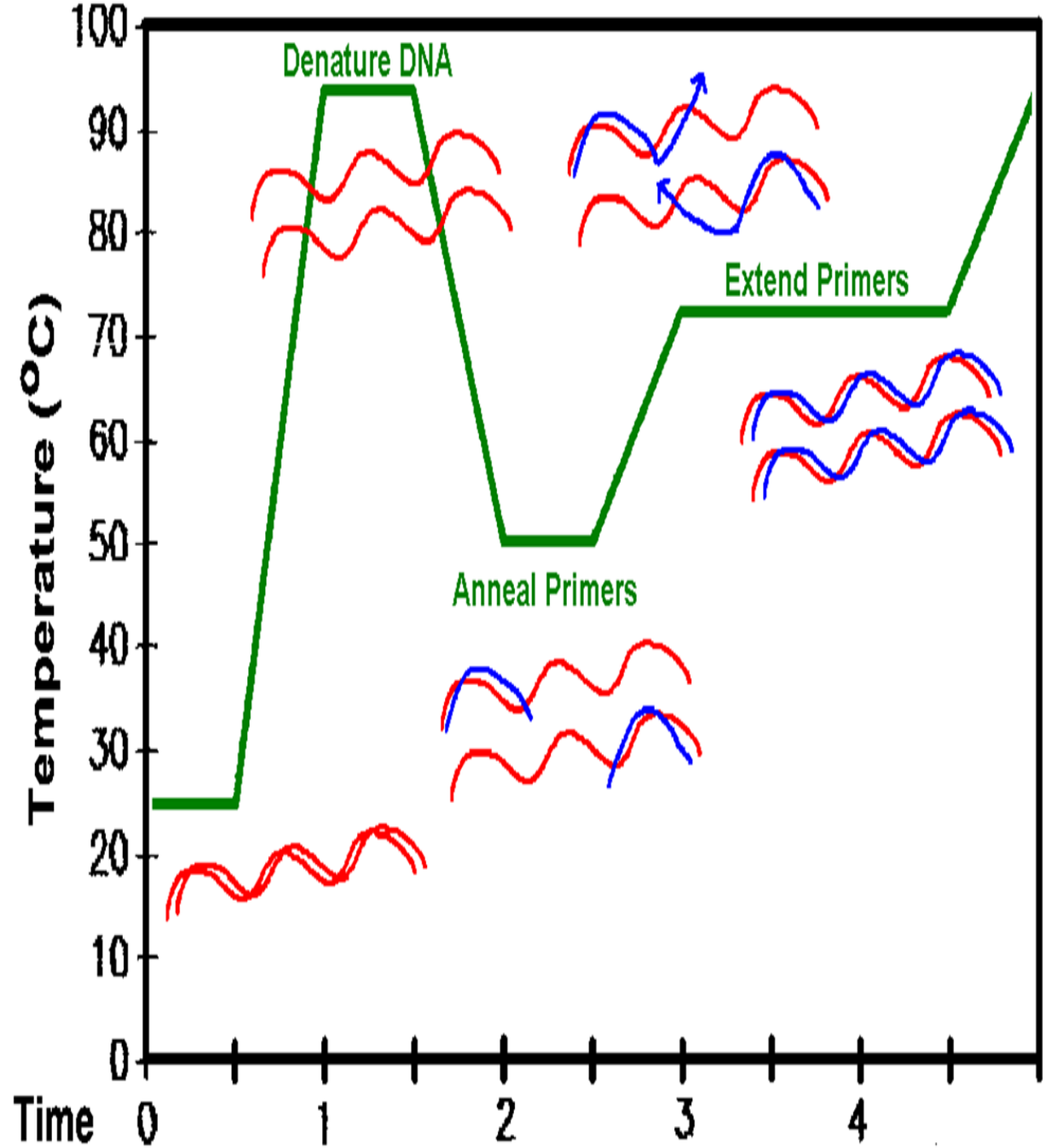

9002 25K
5um


1
2
3
3'
5'
5'
3'
4
5
6


Genomic DNA
5'
3'
Target sequence
3'
5'
1 Denaturation: Heat briefly to separate DNA strands
5'
3'
3'
5'
2 Annealing: Cool to allow primers to form hydrogen bond with ends of target sequence
Primers
3 Extension: DNA polymerase adds nucleotides to the 3' end of each primer
New nucleo-tides
Cycle 1 yields 2 molecules
Cycle 2 yields 4 molecules
Cycle 3 yields 8 molecules; 2 molecules (in white boxes) match target sequence

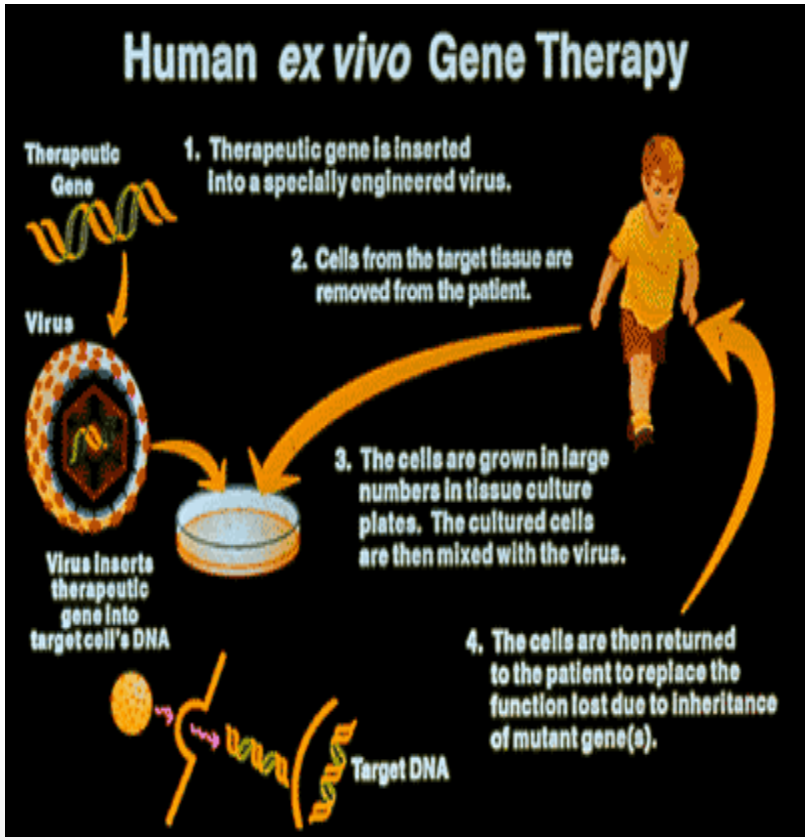
PCR მეთოდი


PCR :
Denaturation 94°C
100
90
80
70
60
50
(Andy Vierstraete 1999)

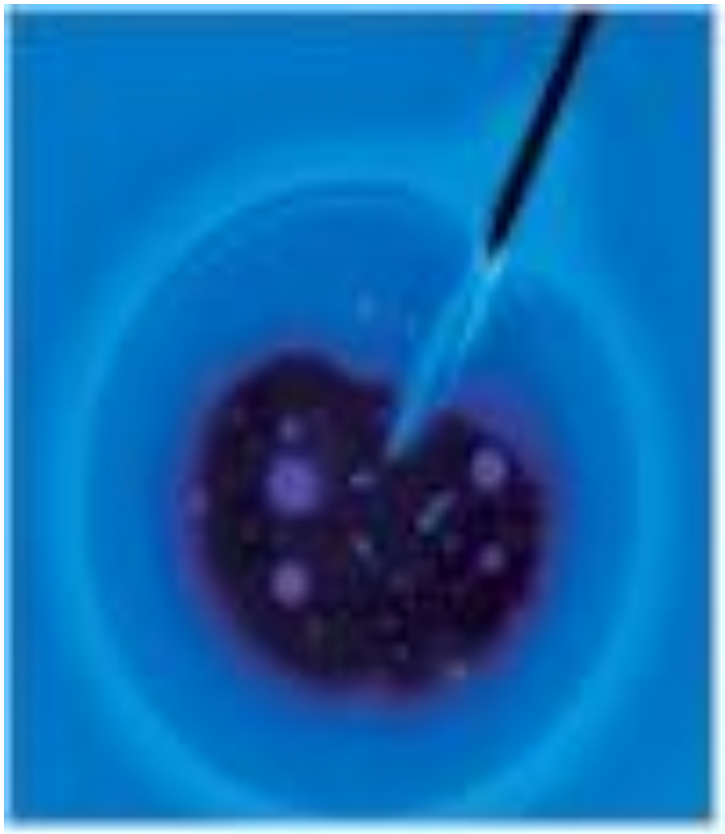

Denature DNA
Extend Primers
Anneal Primers
Temperature (°C)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Time
0
1
2
3
4

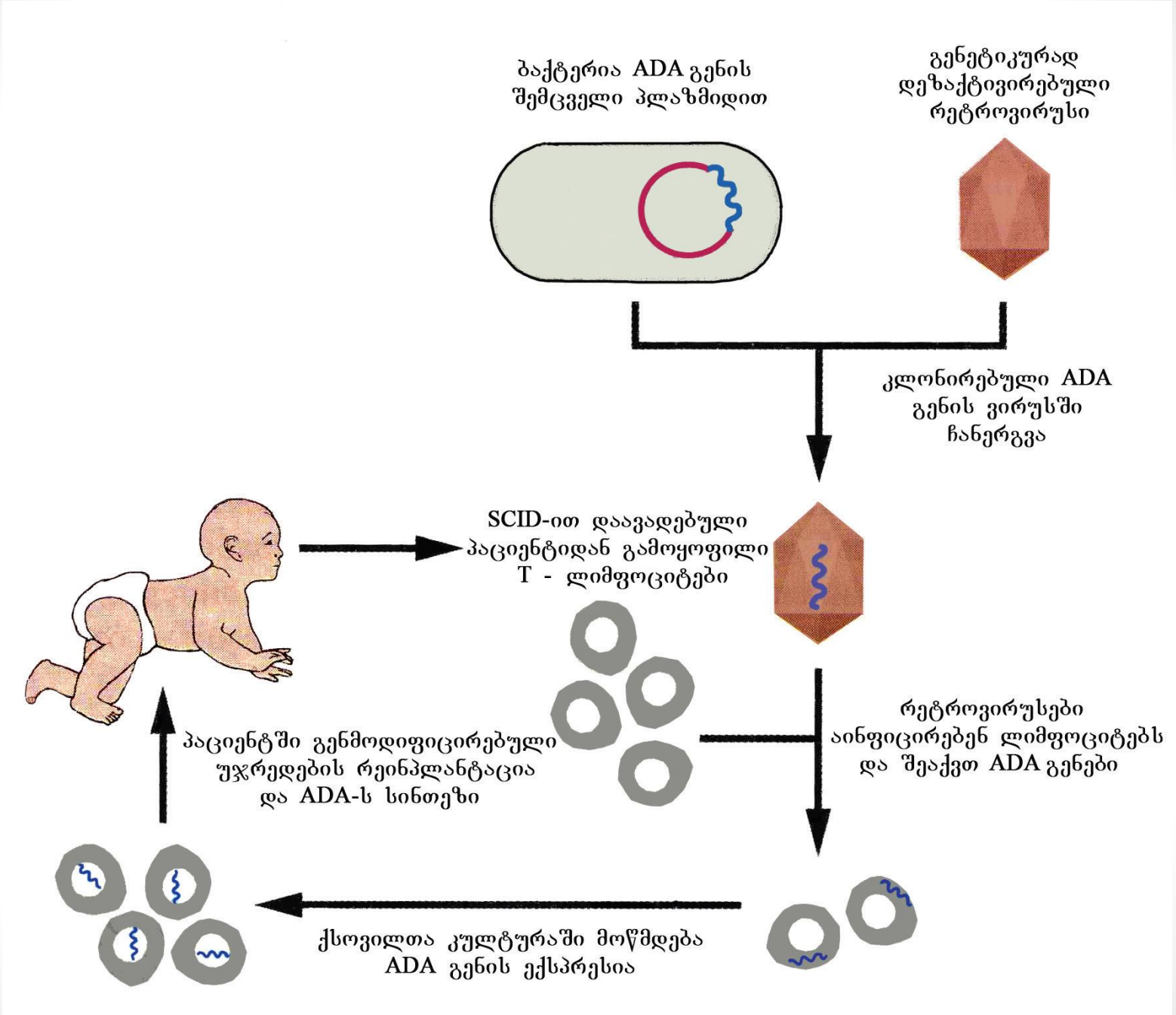
გენური თერაპია

- ვირუსული ვექტორების გამოყენებით



- ღერო უჯრედების გამოყენებით




ბაქტერია ADA გენის
შემცველი პლაზმიდით
გენეტიკურად
დეზაქტივირებული
რეტროვირუსი
კლონირებული ADA
გენის ვირუსში
ჩანერგვა
SCID-ით დაავადებული
პაციენტიდან გამოყოფილი
T - ლიმფოციტები
რეტროვირუსები
აინფიცირებენ ლიმფოციტებს
და შეაქვთ ADA გენები
ქსოვილთა კულტურაში მოწმდება
ADA გენის ექსპრესია
პაციენტში გენმოდიფიცირებული
უჯრედების რეინპლანტაცია
და ADA-ს სინთეზი

ადამიანის კლონირება იკრძალება!

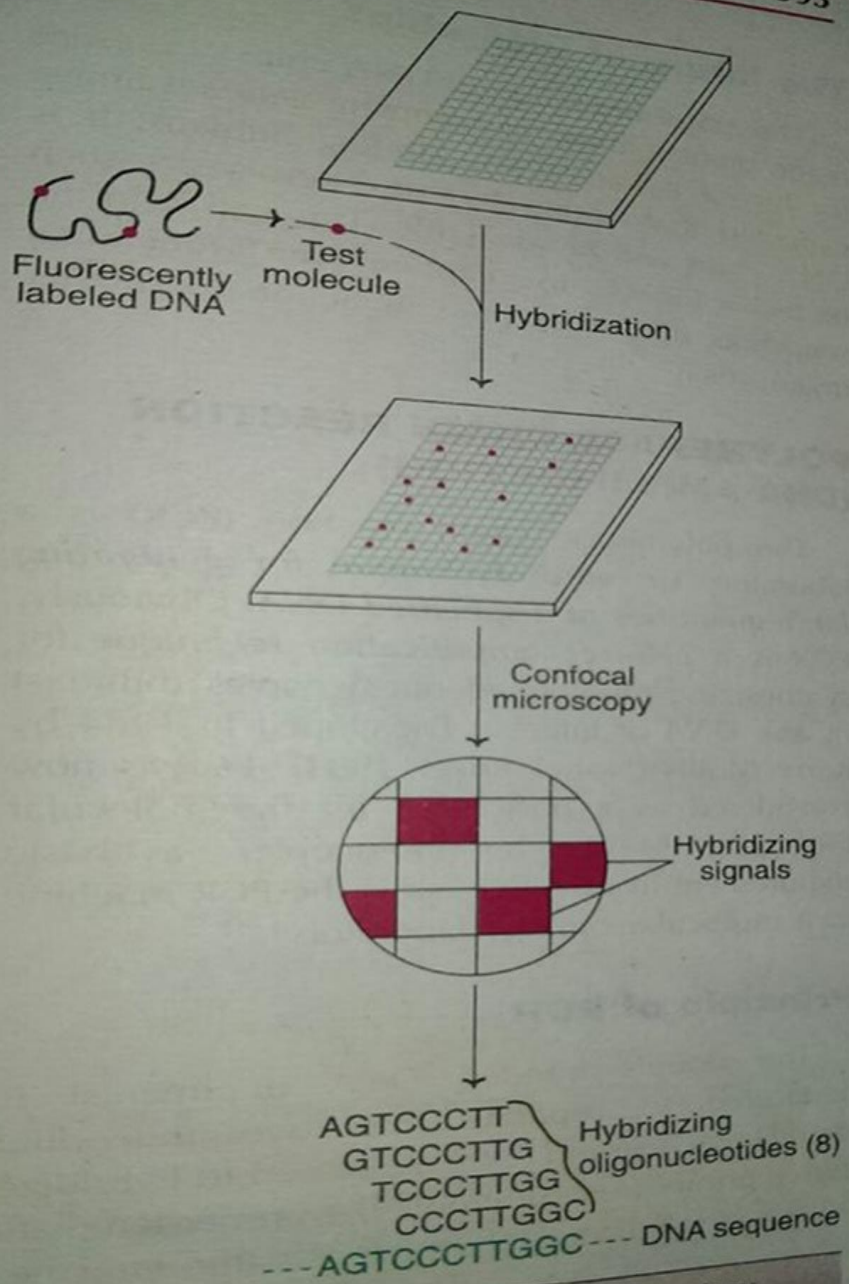
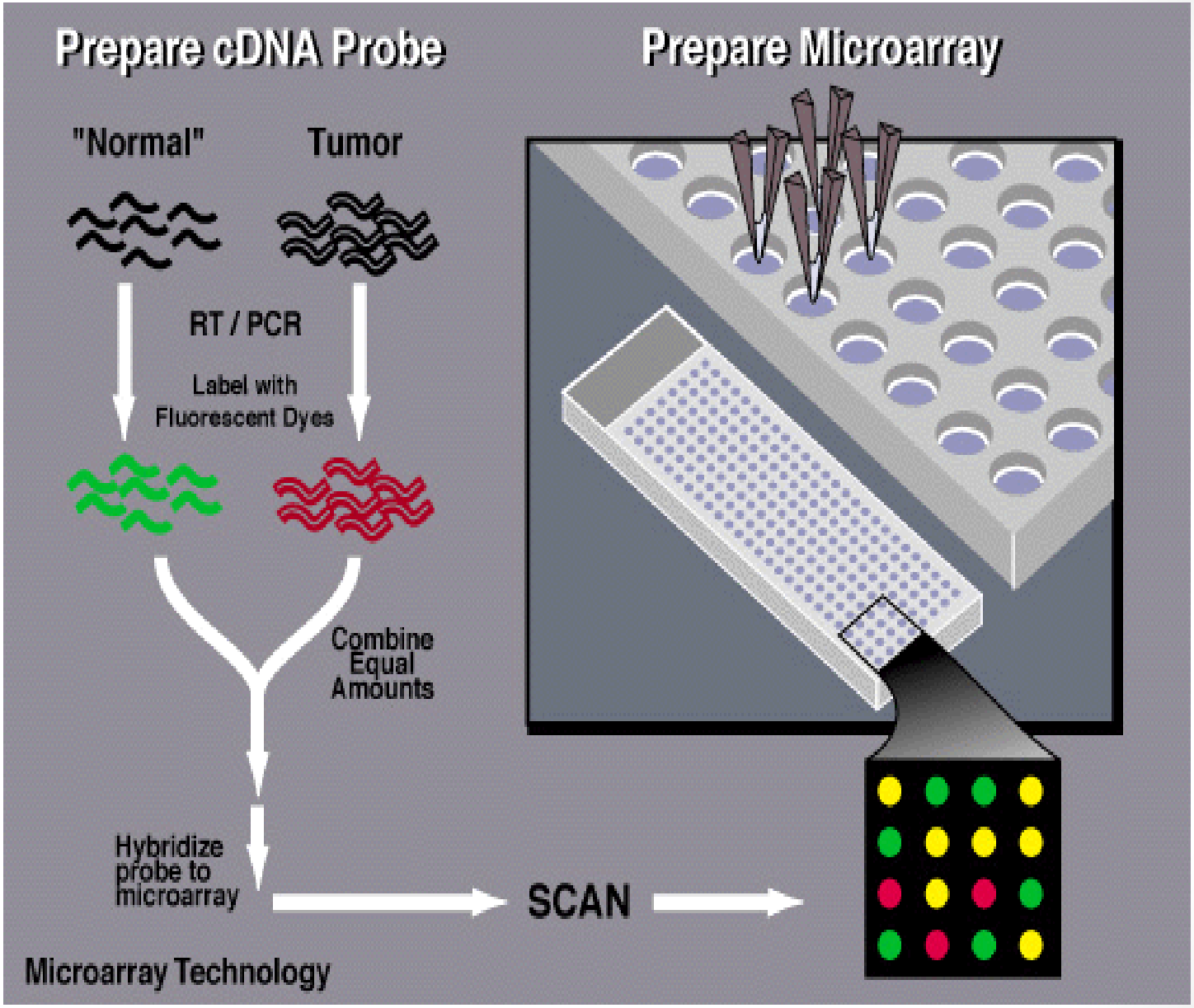
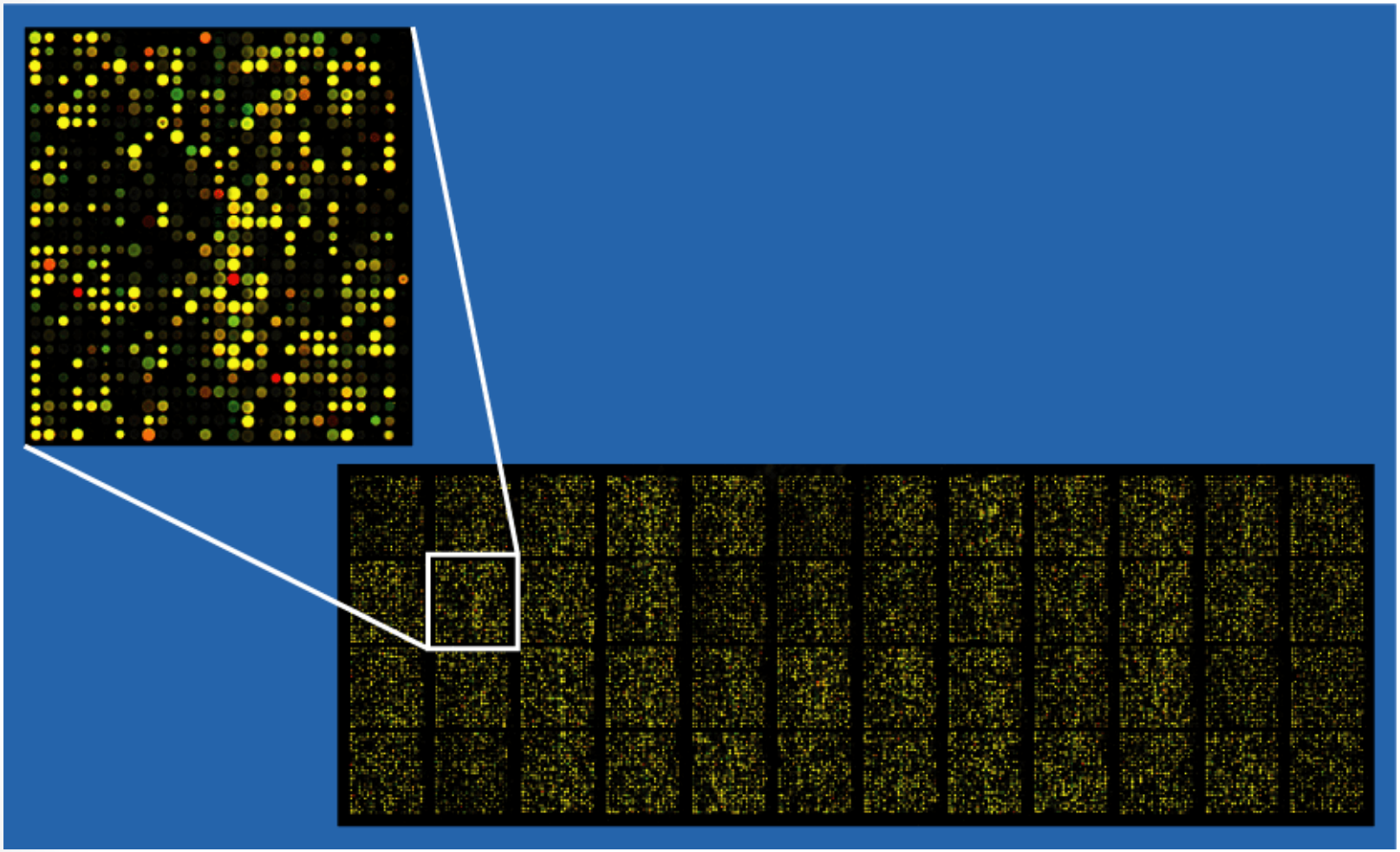
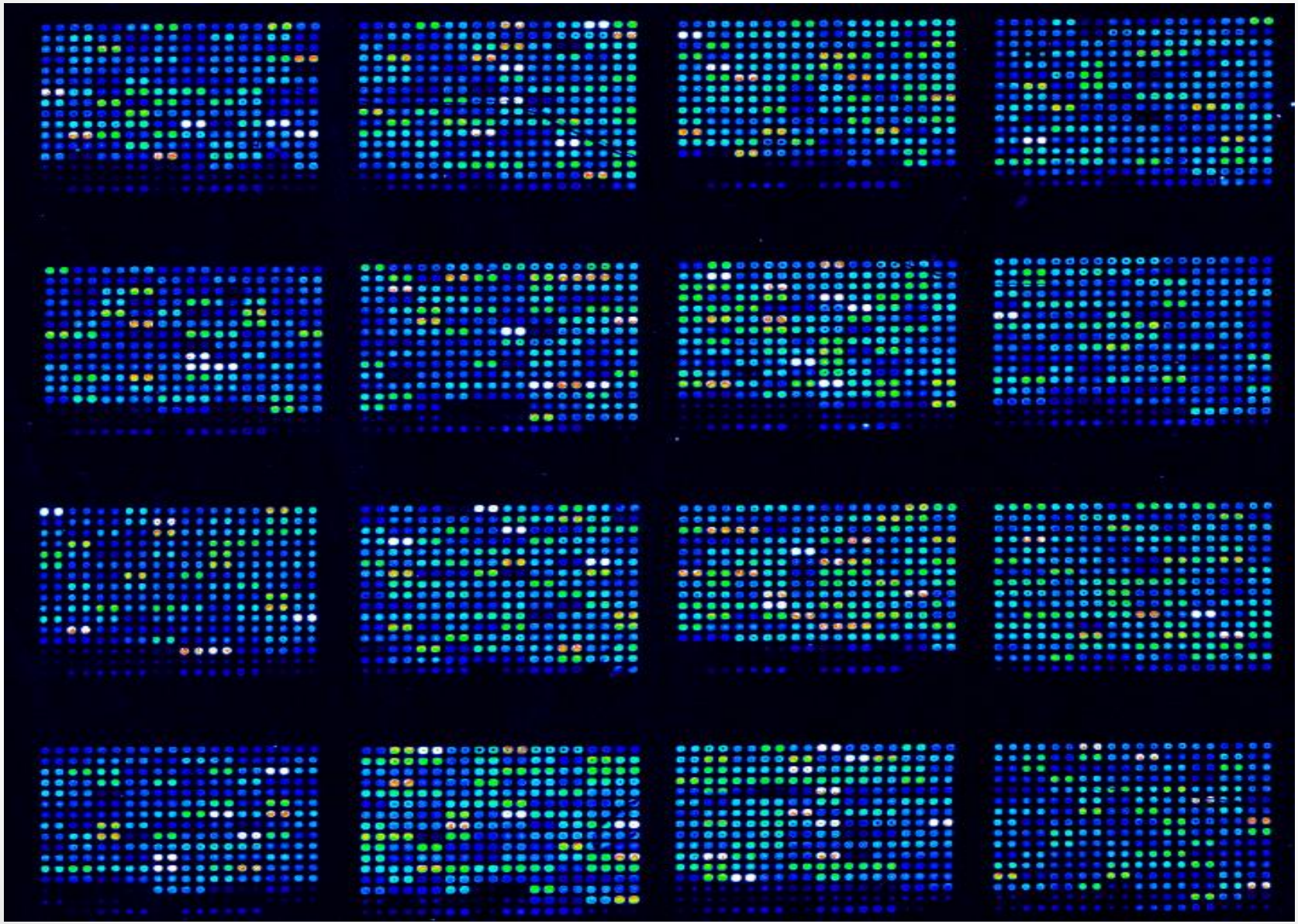


Fig. 27.14 : *Microarray (or chip) technology in DNA sequencing.*

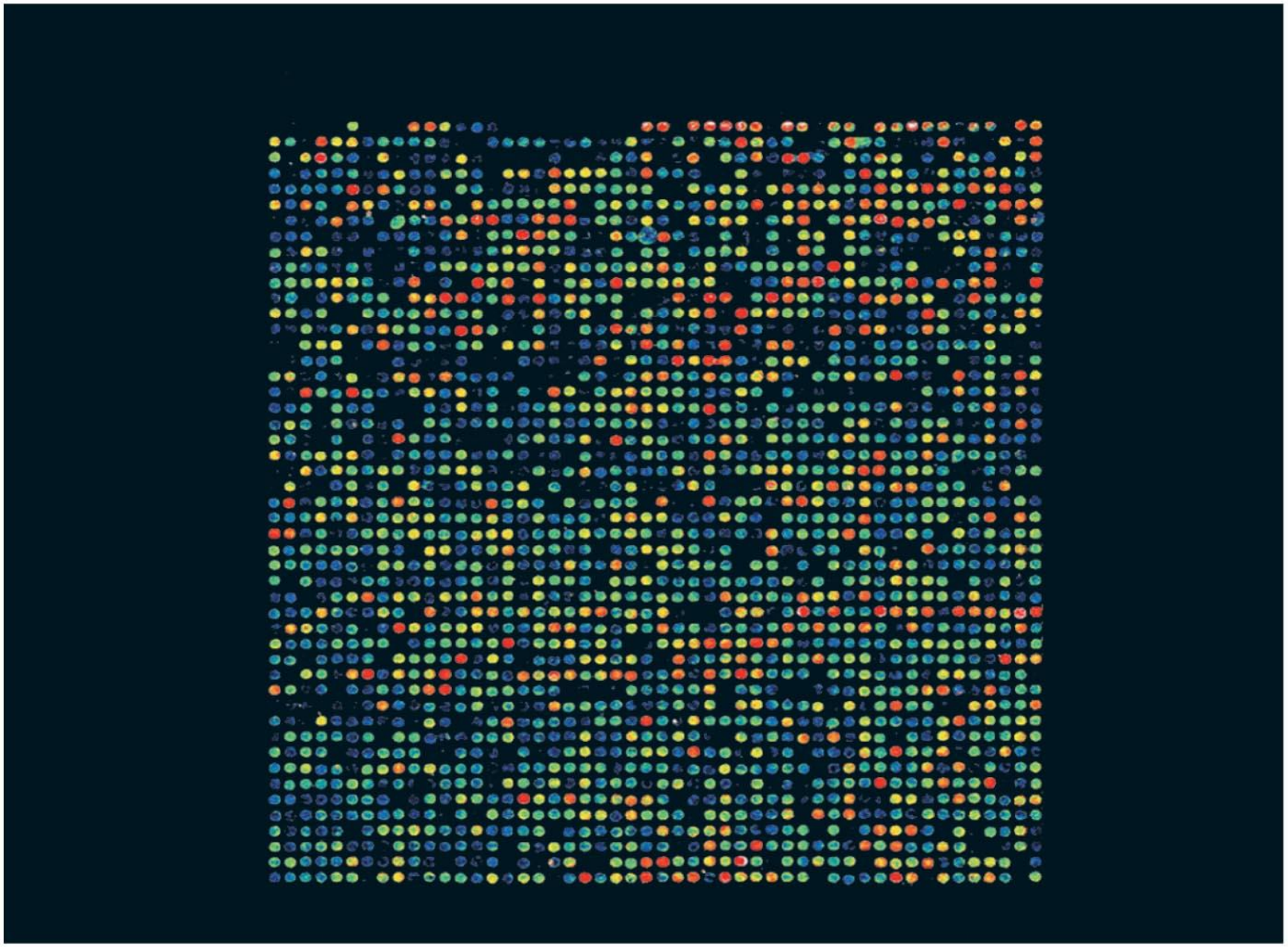
მიკრომასივების ტექნოლოგია


Prepare cDNA Probe
Prepare Microarray
"Normal"
Tumor
RT / PCR
Label with
Fluorescent Dyes
Combine
Equal
Amounts
Hybridize
probe to
microarray
SCAN
Microarray Technology



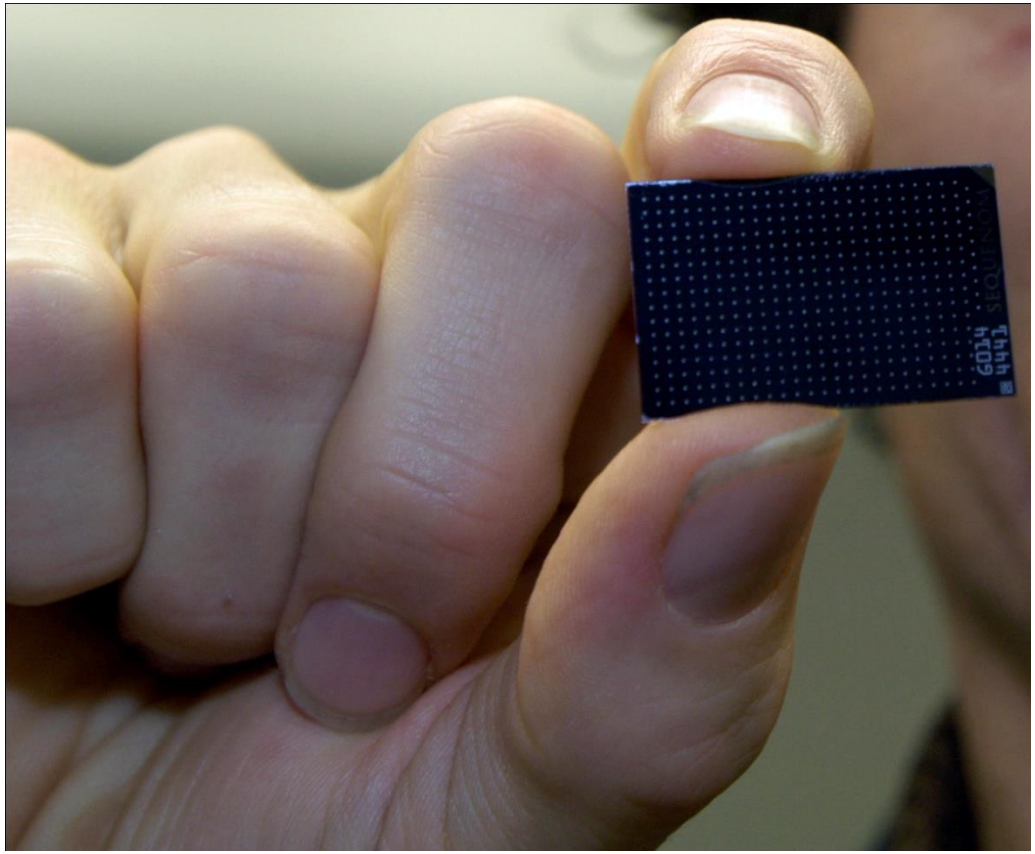


მიკრომატრიცა



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

მკურნალობა ჩვენზე მორგებული „თარგით“: დნმ-ჩიპით შევიტყობთ გენების აქტივობის ხასიათს საკვლევ ქსოვილებში.



გმადლობთ ყურადღებისთვის !