

POLYTENNÍ CHROMOZOMY V JÁDRECH BUNĚK SLINNÝCH ŽLÁZ LARVY DROZOFILY

(*Izolace slinných žláz larvy octomilky. Rychlé barvení chromozomů laktopropionovým orceinem.*

Struktura chromozomů - chromatin a jeho typy. Pozorování chromatinových disků.)

ÚVOD

Chromozomy jsou útvary, ve kterých je v živých buňkách lokalizovaná genetická informace. Tyto útvary, tělíška, jsou barvitelné cytologickými barvivy (chromo-soma) a po nabarvení jsou nejlépe pozorovatelné ve světelném mikroskopu v dělicím se jádře (v M-fázi buněčného cyklu). Eukaryotní chromozomy jsou lineární, obvykle se v buňkách vyskytují ve dvou kopiích. Chromozomy mají různý tvar a velikost, jejich počet je ale druhově konstantní. Např. u rostlin byl nejmenší počet chromozomů zaznamenán u řasy *Spirogyra cylindrica* nebo byliny *Haplopappus gracilis* ($2n = 4$), největší počet chromozomů má kapradina kapradina *Ophioglossum reticulatum* ($2n = 1260$); obdobně u živočichů byl nejmenší počet chromozomů zaznamenán u mravence *Myrmecia pilosula* (samice $2n = 2$) a naopak největší u motýla *Agrodiaetus shahrami* ($2n = 268$).

Eukaryotní chromozom se obvykle skládá z jedné nebo dvou *chromatid*, které jsou navzájem spojeny za pomoci proteinu *kohesin*. Na chromatidách se nachází specifická zúžená oblast, primární konstriktce, na níž je lokalizovaná *centromera*. Na některých chromozomech může být přítomna jedna i více sekundárních konstriktcí, v této oblasti leží tzv. *organizátor jadérka* (re-syntetizuje se zde jadérko). Oblast za sekundární konstriktcí se označuje jako *satelit*.

Chromozom je tvořen deoxyribonukleovou kyselinou (*DNA*), na kterou jsou navázány *proteiny* histonové a nehistonové povahy. Interfázní chromozomy mají charakter dlouhých, tenkých a stočených vláken, která vyplňují jádro buňky. Tato struktura je označována jako *chromatin* a může vykazovat rozdílnou hustotu, kondenzovanost. Podle intenzity barvení acetobarvivy, v závislosti na stupni kondenzace a intenzity transkripce, rozlišujeme dva typy chromatinu: *euchromatin* (je transkripčně aktivní, vykazuje malou kondenzaci a je špatně barvitelný) a *heterochromatin* (je transkripčně neaktivní nebo málo aktivní, kondenzovaný a silně barvitelný). *Heterochromatin* se vyskytuje jako *konstitutivní (obligátní)*, tj. je transkripčně trvale inaktivní (zůstává v kondenzovaném stavu po celý BC), vyskytuje se hlavně v centromerách a telomerách. Naopak *fakultativní (příležitostný) heterochromatin* může být v závislosti na podmínkách, v souvislosti s regulací exprese genetické informace nebo vyrovnáním genové dávky, rozvolněn a stát se geneticky aktivním a zpětně inaktivním.

V důsledku rozvolnění chromatinu jsou jeho jednotlivé typy v eukaryotních jádrech špatně pozorovatelné.

Netypické chromozomy

Polytenní chromozomy (také mnohovláknové, gigantické, obří) nacházíme v různých tkáních larev některého dvoukřídlého hmyzu (slinné žlázy, buňky středního epitelu a malphigických trubic), rovněž i u rostlin (v endospermu kukuřice, v antipodách máku, oměje, pšenice, řechy, v chalázních haustoriích kokrhele, v chalázní části endospermu hrachoru). Tyto chromozomy jsou výsledkem procesu endoreduplikace, kdy dochází ke zmožení počtu sesterský chromatid chromozomů, které ale nejsou odděleny a vytvářejí svazky vláken. U drozofily jsou chromozomy buněk slinných žláz tvořeny přibližně 500 chromatidami, které jsou k sobě těsně přiloženy. Navíc se k sobě přiřkládají homologní chromozomy (tzv. somatické párování), a jejich počet se jeví jako haploidní (poloviční). Ve slinných žlázách nedochází k dělení, takže tyto chromozomy jsou v *interfázi*, a jsou v *despiralizovaném* stavu. Polytenní chromozomy jsou zpravidla 50 – 200 krát delší než normální chromozomy v metafázi mitózy, každý měří 200 až 600 μm a dosahuje šířky až 25 μm . U *Drosophila melanogaster* je celková délka polytenních chromozomů 1 180 μm , oproti 7,5 μm v mitóze.

Při barvení acetobarvivy každý polytenní chromozom pozorovaný ve světelném mikroskopu vykazuje lineární řadu střídajících se pruhů (*disků*) a mezipruhů tmavší a světlejší barvy, což je způsobeno rozdílným barvením heterochromatinu a euchromatinu. Poloha a počet disků jsou pro určitý chromozom druhově specifické. V průběhu exprese genetické informace, v místech, kde probíhá syntéza RNA, ztrácejí polytenní chromozomy diskovité uspořádání za vzniku vychlípenin - *pufu* (puff, Balbianiho prsteneček). Tato místa jsou méně barvitelná. Oblasti vzniku těchto vychlípenin jsou obecně specifické pro každou tkáň nebo pletivo a stádium vývoje organismu.

Využití polytenních chromozomů:

- snadné vizuální sledování změn chromozomů při vzniku tzv. chromozomových aberací (delece, inserce, duplikace, inverze...)
- lokalizace genů, mapování lokusů genů
- identifikace jednotlivých úseků polytenních chromozomů (taxonomie druhů)

(Porovnáváme standardní a změněné jedince.)

Štětkovité chromozomy (*lampbrush*) jsou další atypické chromozomy, vyskytující se v oocytech některých živočichů. Jedná se o homologní chromozomy, které se k sobě přiřkládají v průběhu profáze prvního meiotického dělení, a některé jejich části se despiralizují (dekondenzují) a vyklenou (vznikají párovité postranní smyčky). V takto vytvořených smyčkách dochází k intenzivní expresi genetické informace, syntéze RNA. Smyčky pak na konci profáze mizí.

PROVEDENÍ

Materiál

larvy *Drosophila melanogaster* na konci 3. instaru (tj. těsně před zakuklením, kdy vylézají na stěnu kultivační nádoby), pocházející z kultury s nadbytkem potravy a uchovávané při nižší teplotě (18 °C).

nebo larvy bedlobytek, patentky

Laboratorní přístroje a pomůcky

mikroskop , binokulární lupa, podložní a krycí skla, žiletka, lihový kahan, zápalky, filtrační papír, buničitá vata, tmavý papír, pinzeta, preparační jehly

Chemikálie a roztoky

barvivo *laktopropionový orcein* (příprava viz protokol Mitóza), fyziologický (Schenův)¹ roztok

Pracovní postup

1. Larvu položíme na podložní sklo do kapky fyziologického roztoku. Jednou preparační jehlou přidržíme larvu za ústní část (tmavé chitinové háčky), druhou asi uprostřed těla. Tahem jehel oddělíme hlavovou část se slinnými žlázami a následně je pod binokulární lupou vypreparujeme.
2. Z podložního skla odstraníme nežádoucí části (zbytek larvy, tukovou tkáň) a slinné žlázy ihned zakápneme laktopropionovým orceinem (buňky nesmí vyschnout). Barvivo necháme působit 5-10 min, v případě potřeby můžeme lehce zahřát nad plamenem lihového kahanu.
3. Přiložíme krycí sklíčko a preparát pozorujeme pod mikroskopem při malém zvětšení. Zakreslíme tvar buněk a jádra.
4. Preparát poté vyjmeme z mikroskopu a buňky slinné žlázy jemně roztlačíme (přílišný tlak vede k rozvolnění chromozomů!). Preparát opatrně zahřejeme nad plamenem lihového kahanu (barvivo nesmí vařit, teplotu podložního skla kontrolujeme nad hřbetem ruky).
5. Přebytečné barvivo odstraníme překrytím preparátu proužkem filtračního papíru.
6. Pozorujeme pod mikroskopem při větším zvětšení.

ÚKOL:

1. Zakreslete buňky slinných žláz s polytenními chromozomy při malém zvětšení mikroskopu.
2. Zakreslete zvětšený vybraný úsek polytenního chromozomu s jednotlivými disky, případně pufy, a označte heterochromatinové a euchromatinové části chromozomu.
3. Zakreslete schéma rozložených polytenních chromozomů a popište jednotlivá ramena.
4. Zjistěte počet chromozomů u *D. melanogaster* ($n = \dots$, $2n = \dots$).

¹ Příprava fyziologického (Schenova) roztoku

7g NaCl, 0,42g KCl, 0,25g CaCl₂ rozpustit v 1l destilované vody

ZÁVĚR

Zhodnoťte úspěšnost izolace slinných žláz a jejich zbarvení. Uveďte, zda jste pozorovali chromocentrum a jednotlivá ramena chromozomů, případně tvorbu pufů.

Obr: Porovnání karyotypu (a) a uspořádání polytenních chromozomů (b,c) u samice drozofily
/a,b - © Robert Saunders, <http://robertsaunders.org.uk/flies-and-bikes/> (7.9.2018), c - © Dana Šafářová/

