

## POHLAVNÍ CHROMATINOVÝ ZNAK U ČLOVĚKA - SEX CHROMATIN

*(Barvení a pozorování Barrova tělíska v jádrech buněk ústní sliznice. Procentuální zastoupení pohlavního chromatinu v buňkách žen a mužů. Fluorescenční barvení Y chromozomu.)*

### ÚVOD

Pohlavní rozmnožování s sebou nese i nutnost geneticky odlišit samce a samice. U některých druhů organismů je tento problém vyřešen přítomností pohlavních chromozómů. V případě savců došlo k vytvoření chromozómů X a Y, kdy samice nesou ve svých buňkách dva X chromozomy (označují se proto jako *homogametické* pohlaví) a samci dva různé chromozomy, jak chromozom X a Y (*heterogametické* pohlaví). Aby byla zajištěna stejná exprese genů nacházejících se na X chromozomu u obou pohlaví, vyvinul se postupně mechanismus, který „nadbytečný“ chromozom u samic inaktivuje, dochází k tzv. vyrovnání genové dávky.

Existenci inaktivovaných chromozómů X u člověka pozoroval Muray L. Barr (1949), když prokázal existenci heterochromatinizovaných center v jádrech buněk bukalního stěru, tzv. pohlavního chromatinu neboli Barrových tělísek. Skutečnost, že pokud se v jádrech savců vyskytuje více než jeden chromozom X, dochází k jejich inaktivaci, poprvé popsala Mary Lyon v roce 1961 u myši a na její počest je tento jev také označován jako lyonizace.

V časném stádiu embryonálního vývoje (u člověka přibližně 16. den od vzniku zygoty, u myši 3,5-5,5tý den) dochází v každé buňce k inaktivaci nadbytečného chromozomu X; tento proces je náhodný a jeho výsledek je, s výjimkou tvorby pohlavních buněk trvalý, proces je zachován ve všech buňkách vzniklých dělením původní mateřské buňky. Následkem toho je jedinec samičího pohlaví mozaikou dvou typů buněk - buněk s aktivním X pocházejícím od otce, a z buněk s aktivním X pocházejícím od matky. V rozdílných souborech buněk se uplatňuje soubor alel vždy pouze jednoho z obou chromozómů X (proto u jednovaječných dvojčat jsou si více podobné páry jedinců samčího pohlaví než samičího). Pokud jsou homogametičtí (samice XX) jedinci zároveň heterozygoty pro geny lokalizované na chromozomu X, jsou pak i *genetickou mozaikou*. Nese-li dvojice chromozómů X heterozygotní výbavu alel (Aa), potom budou určité soubory buněk v závislosti na inaktivaci chromozomu X fenotypově vyjadřovat funkci jedné (A) nebo druhé alely (a). Příkladem takto podmíněného projevu u heterozygotních žen je deficit produkce enzymu glukóza-6-fosfátdehydrogenázy projevující se zvýšenou vnímavostí krvinek k oxidativnímu stresu – projev X-vázaného favismu anebo anhidrotická ektodermální dysplazie, mozaikovitě chybění potních žláz; nebo skvrnitá srst u samic myši nebo 'tříbarevná' srst u koček.

Inaktivace chromozomů X je řízena pomocí X-inaktivačního centra (XIC), které je lokalizováno na chromozomu X, a jeho transkripčního (cis) produktu – XIST RNA transkriptu. Molekula XIST chromozom X „obtáčí“ a iniciuje jeho inaktivaci prostřednictvím epigenetické úpravy, metylace. Chromozom je kondenzován za vzniku fakultativního heterochromatinu, přítomné geny (s výjimkou X-inaktivačního centra) nejsou během života exprimovány. Reaktivace umlčeného X chromozomu je za normálních podmínek možná pouze při tvorbě vajíček v zárodečných buňkách.

Inaktivovaný chromozom X je u člověka snadno pozorovatelný jako tzv. pohlavní chromatin (označovaný jako Barrovo tělísko nebo X-pohlavní chromatin) prostřednictvím barvení buněk bukální sliznice pomocí cytologických barviv jako jsou karmín, orcein nebo Schiffovo reagens. Barrovo tělísko má velikost asi 1  $\mu\text{m}$ , je většinou pravidelně plankonvexního tvaru s ostrým ohraničením a je zpravidla uloženo při vnitřní straně jaderné membrány. Barrovo tělísko obvykle nelze prokázat ve všech buňkách u homogametického pohlaví, ale u jejich podstatné části - např. u žen v 30 - 40 % buněk ústní sliznice (údaje se dosti liší, někdy 20 až 70 %). U mužů se Barrovo tělísko nevyskytuje, vzácně může být pozorováno u 0,3 % buněk.

V jádrech somatických buněk mužského pohlaví lze dobře identifikovat fluorescenčními metodami, i pohlavní chromozom Y, jako tzv. *Y-chromatin*. Po obarvení preparátů chinakrinem, derivátem fluorochromu akridinu, chromozom Y silně září v jádře jako malý bod (0,5  $\mu\text{m}$ ). Y-chromatin je tvořen materiálem delšího heterochromatinového raménka Y chromozomu, které přetrvává v interfázním jádře, absorbuje více fluorochromu a v důsledku toho intenzivně září. Lze ho prokázat ve 20 - 50 % jader epitelových buněk bukální sliznice normálních mužů, kdežto u normálních žen je možno nalézt podobná (imitující) fluoreskující tělíška nejvýš u 5 % jader. Velikost Y chromozomu, a následně i jeho heterochromatinová část, může být co do velikosti u jednotlivých jedinců značně variabilní, proto u některých z nich, je-li příliš krátká, není možné Y-chromatin touto metodou prokázat.

#### *Využití barvení pohlavního chromatinu*

- orientační určení pohlaví jedince, orientační určování pohlaví lidského embrya (z plodové vody)
- diagnostika různých typů abnormalit (patologických karyotypů) u člověka

## **PROVEDENÍ**

### Materiál

buňky epitelu vlastní bukální sliznice

### Laboratorní přístroje a pomůcky

školní mikroskop, fluorescenční mikroskop (excitační filtr 490 nm, bariérový filtr 540 nm; Olympus BX-60, hranol WB), sterilní dřevěná špachtle, mikroskopické potřeby, diamant na sklo, lihový kahan + zápalky, proužky filtračního papíru, barvicí nádobka Hellendahl, Petriho miska, alobal, Pasteurova pipeta, kádinka, minutky

### Chemikálie a roztoky

laktopropionový orcein (příprava viz protokol Mitóza), 5% roztok chinakrin dihydrochloridu, 96% etanol, diethylether, 0,1 M HCl, destilovaná voda, fosfátový pufr<sup>1</sup>

### Pracovní postup

#### **A. Barvení X-chromatinu laktopropionovým orceinem**

1. Sterilní špejlí provedeme stěr buněk epitelu z obou stran vnitřní strany bukální sliznice (po odstranění odumřelých buněk).
2. Výtěr nanese ve formě roztěru na podložní sklo, přikápneme kapku laktopropionového orceinu, promícháme preparační jehlou a necháme barvit 5 min, přičemž barvivo lehce zahřejeme nad plamenem lihového kahanu (barvivo nesmí vařit!).
3. Na preparát přiložíme krycí sklíčko a jemným tlakem provedeme roztlak.
4. Zbytek barviva odstraníme proužkem filtračního papíru.
5. Pod mikroskopem při větším zvětšení (obj. 40x a 100x-imerse) vyhledáme interfázni jádra, vyhodnotíme s ohledem na zastoupení sex chromatinu<sup>2</sup>. Dáváme pozor na jádra v mitóze a na jádra degenerovaná (shluky chromatinu), která do hodnocení preparátu nezapočítáváme. Barrova tělíška jsou obvykle dobře vidět na pozadí málo zrnité nukleoplasmu.

#### **B. Fluorescenční barvení Y-chromatinu**

1. Špejlí provedeme stěr buněk epitelu z obou stran vnitřní strany bukální sliznice.
2. Výtěr nanese ve formě roztěru na diamantem označené podložní sklo a fixujeme 5 min v kapce fixační směsi (etanol:éter v poměru 1:1).

---

<sup>1</sup> Fosfátový pufr

89,5 ml 0,1 M kyseliny citronové  
160,5 ml 0,2 M hydrogenufosforečnan sodný  
- doplnit redestilovanou vodou na 500 ml (pH 6,8)

<sup>2</sup> Jako X-pozitivní jádro považujeme jen to, ve kterém najdeme při okraji kondenzovaný X chromatin. V klinické praxi se výsledek vyjadřuje jen jako pozitivní nebo negativní. Hodnotí se 100 - 500 jader.

3. Preparát necháme oschnout a macerujeme v 0,1 M HCl 5 min, poté pečlivě opláchneme destilovanou vodou.
4. Preparát převrstvíme kapkou 5% roztoku chinakrin dihydrochloridu. Barvíme 10 min ve tmě.
5. Opláchneme destilovanou vodou.
6. Stabilizujeme 5 min v roztoku fosfátového pufru (pH 6,8).
7. Mokrý preparát překryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu.

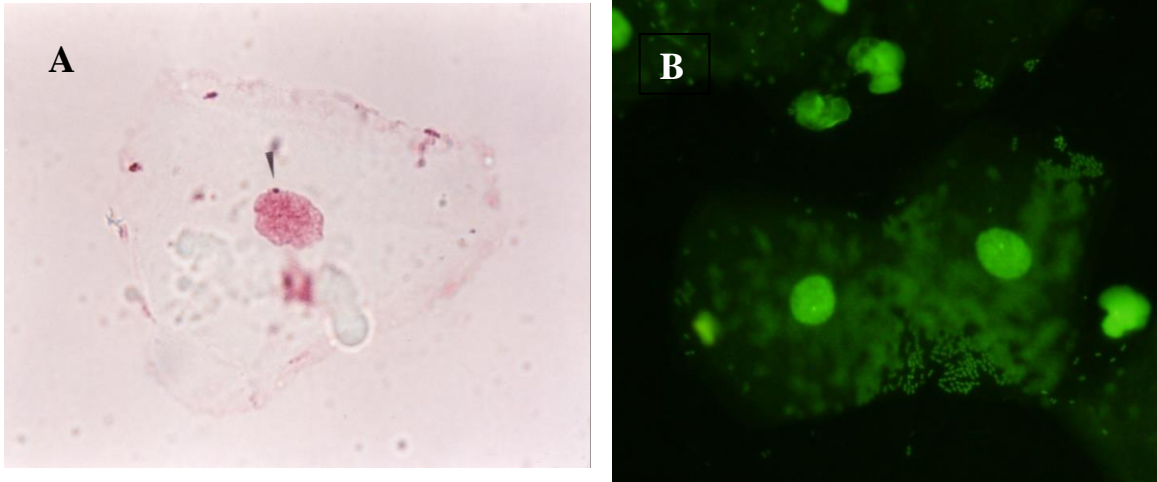
## ÚKOLY

1. Zakreslete buňky bukalní sliznice barvené laktopropionovým orceinem, ve vašem preparátu a v preparátu vašeho spolužáka opačného pohlaví, s různým uložením Barrova tělíska.
2. Schematicky zakreslete buněčné jádro s pohlavním X- a Y-chromatinem v různých fyziologických a patologických genotypech člověka, jednotlivé genotypy pojmenujte.
3. V 10-ti zorných polích spočítejte buňky s Barrovým tělískem a bez Barrova tělíska, vyhodnoťte procentuální výskyt pohlavního chromatinu ve vašem preparátu a v preparátu spolužáka opačného pohlaví. Pozorování porovnejte.
4. Zakreslete buňku s Y-chromatinem.

## ZÁVĚR

Uveďte procentuální zastoupení Barrova tělíska ve vašem preparátu. Vyhodnoťte, jaké jste chromozómové konstituce (s ohledem na pohlavní chromozómy).

**Obr. 1: X-chromatin (A)** v buňkách bukální sliznice ženy ( $2n=46,XX$ ); **Y-chromatin (B)** v buňkách bukální sliznice muže ( $2n=46,XY$ ) (foto D. Šafářová).



**Obr. 2: Fenotypový projev inaktivace X chromozomu**

– želvovinové (A), třibarevné (B) zbarvení koček (geny pro červené a černé zbarvení jsou lokalizovány na chromozomu X, bílá barva je podmíněna somaticky)

(A)



(B)

