



Μάθημα: «Κυτταρική Βιολογία»

Εργαστηριακή άσκηση:

«Απομόνωση και μελέτη πολυταινικών χρωμοσωμάτων από το έντομο *Drosophila virilis*»

Επικ. Καθ. Δ.Ι. Στραβοπόδης
Αναπλ. Καθ. Θ. Κατσώρχης
Δρ. Θ.Δ. Βελέντζας

A. Θεωρητικό μέρος

A₁. Χρωμοσώματα

Το DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι συνδεδεμένο με βασικές πρωτεΐνες (ιστόνες) με όξινες πρωτεΐνες και ελάχιστες ποσότητες RNA. Το DNA περιελίσσεται και πακετάρεται αρχικά γύρω από το οκταμερές των ιστονών και σχηματίζεται το νουκλεόσωμα, ακολουθεί συσπείρωση με τη μορφή σωληνοειδούς (solenoid), διαδοχικό πακετάρισμα σε θηλιές (loops) και τελική συμπύκνωση σε χρωμοσώματα. Τα χρωμοσώματα χρησιμεύουν για την αποθήκευση, έκφραση και ροή της γενετικής πληροφορίας των οργανισμών. Τα χρωμοσώματα δεν αποτελούν μια στατική κατάσταση, αλλά μία δυναμική που αλλάζει μορφή ανάλογα με τις διάφορες φάσεις που μπορεί να βρεθεί ένα κύτταρο κατά τη διάρκεια της ζωής του. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι χαρακτηριστικός και ο ίδιος για όλα τα σωματικά κύτταρα ενός είδους οργανισμού. Ο μικρότερος αριθμός χρωμοσωμάτων που έχει παρατηρηθεί (σε ένα σκουλήκι) είναι 2, ενώ ο συνηθισμένος αριθμός χρωμοσωμάτων στα σωματικά κύτταρα των οργανισμών είναι από 10 μέχρι 100, π.χ. ο άνθρωπος έχει 46, το άλογο 66, ο δάκος της ελιάς (Δίπτερο) 12 κ.λ.π. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων δεν έχει σχέση με την εξελικτική κλίμακα των οργανισμών.

Τα χρωμοσώματα έχουν γραμμική οργάνωση. Στα στάδια που είναι συσπειρωμένα ώστε να γίνονται ορατά σε χρωμοσώματα σε καθορισμένη θέση εμφανίζουν περισφίξεις. Μια περίσφιξη είναι ο οργανωτής πυρηνίσκου που σχετίζεται με τη δημιουργία των πυρηνίσκων στην τελόφαση. Η άλλη υπάρχει σε όλα τα χρωμοσώματα και σχετίζεται με την κίνηση τους κατά την μίτωση. Στη περίσφιξη αυτή υπάρχει ένα κοκκίο, το κεντρομερίδιο, όπου γίνεται η προσκόλληση στην άτρακτο κατά την μίτωση. Εκεί έχουν βρεθεί τελευταία ορισμένες κατηγορίες επαναλαμβανόμενου DNA.

Το DNA του ευκαρυωτικού γονιδιώματος μπορεί να διαιρεθεί σύμφωνα με την κινητική του συμπεριφορά κατά τη διάρκεια των πειραμάτων επανασύνδεσης σε τρεις κατηγορίες.

- α) Ταχείας επανασύνδεσης: δορυφορικό DNA (Satellite DNA)
- β) Ενδιάμεσης επανασύνδεσης
- γ) Αργής επανασύνδεσης

Αυτές είναι αλληλουχίες που επαναλαμβάνονται αντίστοιχα, πάρα πολλές, πολλές ή λίγες (μάλλον μία μόνο) φορές στο γονιδίωμα. Οι περισφίξεις βοηθούν στον προσδιορισμό των διαφόρων τύπων χρωμοσωμάτων. Το σχήμα του συσπειρωμένου χρωμοσώματος είναι συνήθως επίμηκες, η δε θέση του κεντρομεριδίου προσδιορίζει τη μορφολογική κατηγορία που ανήκει.

Σ' ένα κύτταρο αν κάθε τύπος χρωμοσώματος (μορφολογικά οριζόμενος από σχήμα, μέγεθος και χρώση) αντιπροσωπεύεται μία φορά, τότε το κύτταρο αυτό ονομάζεται απλοειδές (n), αν όμως αντιπροσωπεύεται δύο φορές τότε ονομάζεται διπλοειδές ($2n$). Τα χρωμοσώματα των διπλοειδών κυττάρων που είναι μορφολογικά όμοια στο σχήμα, μέγεθος και χρώση, ονομάζονται ομόλογα και είναι λειτουργικά τα ίδια, επειδή φέρουν τα ίδια γονίδια.

Η παραπάνω περιγραφή χρωμοσώματος αφορά το τυπικό χρωμόσωμα που οι βασικές του πρωτεΐνες (ιστόνες) είναι οι γνωστές πέντε κατηγορίες (H_1 , $H_{2\alpha}$, $H_{2\beta}$, H_3 , H_4). Υπάρχουν όμως χρωμοσώματα με μικρές ή μεγάλες αποκλίσεις από αυτές που περιγράψαμε. Τέτοιες αποκλίσεις έχουν βρεθεί στα εμπύρηννα ερυθροκύτταρα, όπου το ποσό της ιστόνης του τύπου H_1 είναι ελαττωμένο και μία νέα ιστόνη, η H_5 (F_2C) εμφανίζεται. Πάντως η H_5 είναι παρόμοια σε μέγεθος και δομή με την H_1 και το ποσό των $H_1 + H_5$ των εμπύρηννων ερυθροκυττάρων είναι περίπου το ίδιο με της H_1 μόνης σε άλλους ιστούς. Μάλλον θα πρέπει να θεωρηθεί ότι η H_5 παίζει σχεδόν τον ίδιο δομικό ρόλο με την H_1 .

Μία άλλη απόκλιση της περιεκτικότητας των χρωμοσωμάτων σε ιστόνες από την τυπική τους μορφή, έχει παρατηρηθεί κατά την ανάπτυξη των σπερματοζωαρίων ψαριών. Στην πέστροφας (όπως και σε άλλα ψάρια) σε κάποιο στάδιο της ανάπτυξης του σπερματοκυττάρου της γίνεται αντικατάσταση των ιστονών από ένα άλλο είδος πρωτεϊνών, τις πρωταμίνες. Οι πρωταμίνες είναι πολύ βασικές πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, με μεγάλη περιεκτικότητα σε αργινίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να θεωρηθούν σαν μία τάξη των ιστονών λόγω της βασικότητάς τους και του ότι αντικαθιστούν τις ιστόνες στο μέσο της σπερματογένεσης.

Μια άλλη δομική διαφορά από τα τυπικά χρωμοσώματα είναι τα ψηκτροειδή χρωμοσώματα, τα οποία εμφανίζονται επιμηκυμένα με σκοτεινές και φωτεινές περιοχές, οι οποίες πιθανόν ν' αντιστοιχούν σε πυκνότερες και αραιότερες περιελίξεις (έλικες).

Σε ορισμένα είδη αμφιβίων, η μίτωση των χρωμοσωμάτων του ωοκυττάρου τους επιδεικνύει ενδιαφέρον, διότι κατά την διάρκεια της αρχής της πρόφασης τα ωοκύτταρα συγκεντρώνουν μεγάλες ποσότητες λεκιθοσφαιριδίων και αναπτύσσονται εναρμονισμένα. Σ' αυτά το χρόνο τα χρωμοσώματα δημιουργούν ένα αριθμό θηλιών (loops) και ονομάζονται ψηκτροειδή (lambrush) χρωμοσώματα. Κάθε ζευγάρι ομόλογων χρωμοσωμάτων έχει χαρακτηριστικούς σχηματισμούς θηλιών. Σε ολοκληρωμένα ψηκτροειδή χρωμοσώματα υπάρχουν αρκετές χιλιάδες θηλιών. Οι θηλιές δεν είναι ξεχωριστές δομές που άπτονται των χρωμοσωμάτων, αλλά ειδικευμένες περιοχές μιας συνεχούς δομής καθ' όλο το μήκος του χρωμοσώματος. Η επίδραση της DNase γρήγορα τεμαχίζει τα χρωμοσώματα. Αυτό είναι σημαντικό εύρημα διότι αποδεικνύει ότι όλο το μήκος του χρωμοσώματος περιέχει DNA. Τα ψηκτροειδή χρωμοσώματα στη βάση των θηλιών είναι υπερσυσπειρωμένα ενώ το τμήμα του χρωμοσώματος που σχηματίζει τη θηλιά δεν είναι. Αυτοραδιογραφία με προδρόμους σύνθεσης RNA δείχνει ότι στα σημεία των θηλιών γίνεται έντονη σύνθεση RNA.

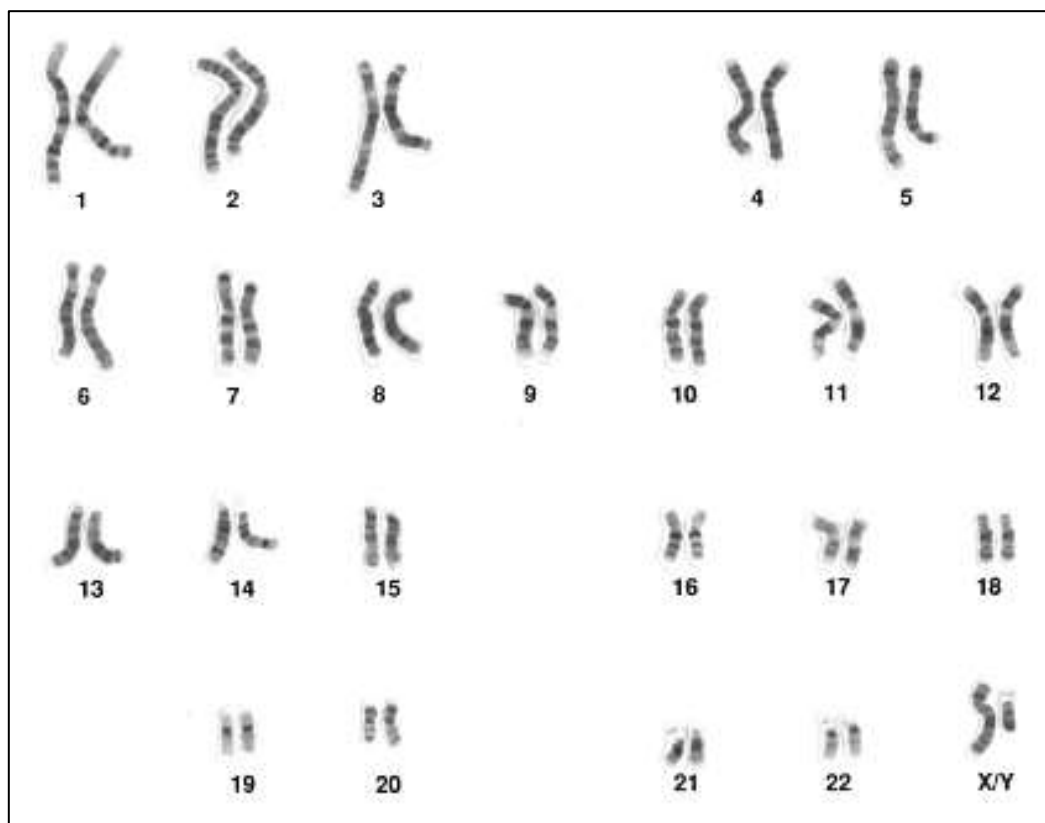
Τέλος σε ορισμένα είδη εμφανίζεται μια ιδιαίτερη κατασκευή, τα γιγαντιαία χρωμοσώματα, τα οποία έχουν πολύ μεγάλο μήκος (από αυτό έχουν πάρει και το όνομα τους) και σχηματίζονται με ενδομίτωση, δηλαδή γίνεται διαδοχικός διπλασιασμός, αλλά χωρίς να γίνεται διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων. Έτσι μακροσκοπικά ούτε ο αριθμός των χρωμοσωμάτων αλλάζει, ούτε γίνεται διαίρεση του πυρήνα ή του κυττάρου. Το φαινόμενο λέγεται ενδοπολυπλοειδισμός και οι πυρήνες με τα γιγαντιαία χρωμοσώματα ενδοπολυπλοειδείς. Τα γιγαντιαία χρωμοσώματα μπορεί να είναι και πάνω από 100 φορές μακρύτερα και πολύ παχύτερα από τ' αντίστοιχα των τυπικών κυττάρων που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Το μεγάλο μήκος τους αντιστοιχεί σε λιγότερη συσπείρωση απ' αυτή που παρατηρείται κατά τη μίτωση. Μάλιστα υπάρχουν διαδοχικές εναλλασσόμενες περιοχές με μικρή και μεγάλη συσπείρωση. Οι χρωματίδες που αποτελούν το γιγαντιαίο χρωμόσωμα είναι παράλληλες και εντελώς αντίστοιχα συνδεδεμένες και οι αντίστοιχες περιοχές συσπειρώσεως σχηματίζουν ορατούς δίσκους χρώσεως (χρωμομερίδια). Γι' αυτό και τα γιγαντιαία χρωμοσώματα λέγονται και πολυταινικά. Η πολυταινία δεν πρέπει να συγχέεται με τον πολυπλοειδισμό, στον οποίο ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι πολλαπλάσιος του βασικού. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται σε ατελή μίτωση στην οποία οι χρωματίδες διαχωρίζονται αλλά χωρίς να επακολουθήσει διαίρεση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Πολυπλοειδισμός συμβαίνει σε είδη όλων των ομάδων των φυτών, ενώ στα ζώα είναι σπάνιος.

Τα γιγαντιαία χρωμοσώματα βρίσκονται στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων ορισμένων δίπτερων εντόμων (γένος *Drosophila*, *Chironomus*, κ.λπ.) και μάλιστα όταν αυτά βρίσκονται στο στάδιο της προνύμφης. Υπάρχουν όμως και σε κύτταρα άλλων ιστών, όπως στο έντερο, στα νεφρικά σωληνάκια κ.λπ. Οι ιστοί που έχουν γιγαντιαία χρωμοσώματα αυξάνονται επειδή μεγαλώνει το μέγεθος και όχι ο αριθμός των κυττάρων τους. Στα κύτταρα αυτά το κάθε γιγαντιαίο χρωμόσωμα συνάπτεται με το ομόλογο του, έτσι που ο διπλοειδής αυτός πυρήνας να μοιάζει με απλοειδή. Σε πολλά είδη τα κεντρομερίδια όλων των χρωμοσωμάτων βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο κι έχουν τη μορφή μιας συμπαγούς μάζας που λέγεται χρωμόκεντρο.

Ένα γιγαντιαίο χρωμόσωμα εμφανίζει με κατάλληλη χρώση χρωματικά και αχρωματικά τμήματα. Τα πρώτα φαίνονται σαν δίσκοι (ζώνες) ποικίλου πάχους και τ' άλλα σαν ενδιάμεσες περιοχές. Οι χρωματικοί δίσκοι είναι τα χρωμομερίδια και έχουν DNA και ιστόνες σε μεγάλο ποσοστό, ενώ στις ενδιάμεσες περιοχές η περιεκτικότητα σε τέτοια υλικά είναι μικρή. Σε διάφορες θέσεις των γιγαντιαίων χρωμοσωμάτων παρατηρούνται παροδικές διογκώσεις - "φούσκες" (Puffs). Αυτές, όπως έδειξε ο Beerman, διαφέρουν από ιστό σε ιστό, ενώ τα χρωμομερίδια παραμένουν σταθερά. Αυτό συμβαίνει γιατί τα χρωμομερίδια αντιστοιχούν στην ύπαρξη γονιδίων ενώ οι διογκώσεις σε μεγάλη ενεργότητα που είναι συνάρτηση της διαφοροποίησης. Οι περιοχές αυτές (φούσκες) είναι θέσεις έντονης σύνθεσης RNA (mRNA). Ενδείξεις γι' αυτό έχουν δοθεί με πειράματα αυτοραδιογραφίας μετά από ενσωμάτωση ³H-ουριδίνης και από την κατασταλτική πάνω στις φούσκες επίδραση της ακτινομυκίνης D.

A₂. Καρυότυπος

Τα χρωμοσώματα ενός οργανισμού γνωρίζουμε ότι παίρνουν το μεγαλύτερο τους μέγεθος στο στάδιο της μετάφασης - ανάφασης. Εάν λοιπόν έχουμε ένα ιστό του οποίου τα κύτταρα διαιρούνται και τους προσθέσουμε το αντιδραστήριο κολχικίνη, η κυτταρική διαίρεση θα σταματήσει στο στάδιο της μετάφασης. Το αντιδραστήριο κολχικίνη έχει τη δυνατότητα σ' ένα πληθυσμό κυττάρων που διαιρείται, με ασύγχρονο κατά βάση τρόπο, να επιτρέπει στα κύτταρα να εισέρχονται στην διαίρεση κανονικά αλλά να μην προχωρούν στα υπόλοιπα στάδια της διαίρεσης τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να έχουμε πολλά κύτταρα στο στάδιο της μετάφασης. Στα κύτταρα αυτά έχουμε τη δυνατότητα σπάζοντας τις μεμβράνες με κάποιο τρόπο (ομογενοποίηση) ν' απομονώσουμε τα χρωμοσώματα. Τα χρωμοσώματα αυτά μπορούμε να τα χρωματίσουμε και να τα φωτογραφίσουμε. Στην συνέχεια κόβουμε κάθε ένα χρωμόσωμα από τη φωτογραφία, κατόπιν ταιριάζουμε τα ομολογά τους, τα τοποθετούμε σύμφωνα με το μέγεθος τους και τα αριθμούμε. Έτσι το μεγαλύτερο ζευγάρι ομόλογων χρωμοσωμάτων παίρνει τον αριθμό 1 και το μικρότερο για τον άνθρωπο παίρνει τον αριθμό 22 ανάλογα με το μέγεθος. Δεν αριθμούμε τα φυλετικά χρωμοσώματα που συμβολίζονται με Χ και Ψ γιατί διαφέρουν ως προς το μέγεθος τους και γι' αυτό τοποθετούνται στα αντίστοιχα σε μέγεθος χρωμοσώματα. Τελειώνοντας αυτή την επεξεργασία των χρωμοσωμάτων ενός οργανισμού τότε λέμε ότι έχουμε απεικονίσει τον καρυότυπό του. Μελετώντας τον καρυότυπο ενός ατόμου μπορούμε να διαπιστώσουμε ορισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως είναι για παράδειγμα τα γνωστά μας σύνδρομα.



Καρυότυπος αρσενικού ατόμου ανθρώπου μετά από χρώση με Giemsa

Β. Πειραματικό μέρος

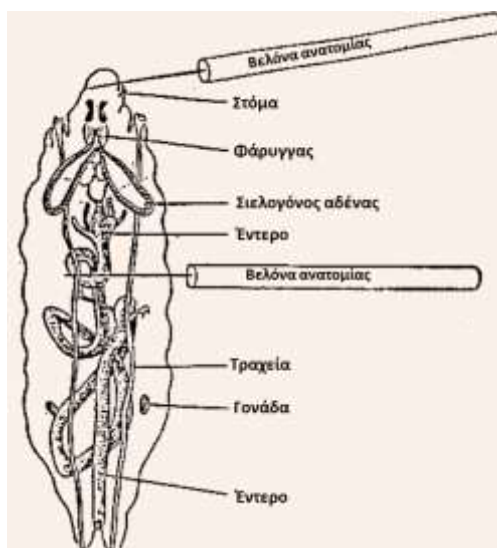
Στην άσκηση αυτή θα απομονώσουμε και θα παρατηρήσουμε γιγαντιαία χρωμοσώματα από τη λάρβα (προνύμφη) της *Drosophila virilis*. Από το μπουκάλι καλλιέργειας της *Drosophila virilis* επιλέγουμε μία λάρβα (**Εικ. 1**) μεγάλου μεγέθους (συνήθως από αυτές που κυκλοφορούν στα τοιχώματα του μπουκαλιού) και την τοποθετούμε σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία έχουμε ήδη προσθέσει μια σταγόνα ισότονου διαλύματος (διάλυμα Ringer's).

Σ' αυτό το σημείο τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο με την λάρβα κάτω από το στερεομικροσκόπιο (ολόκληρη η διαδικασία θα γίνει με την βοήθεια του στερεοσκοπίου). Όλα τα εσωτερικά όργανα της λάρβας είναι σχεδόν λευκά και φαίνονται καλύτερα σε μαύρο φόντο, που φροντίζουμε να υπάρχει στο στερεοσκόπιο, αναγνωρίζουμε το μπροστινό μέρος (κεφαλή) και το οπίσθιο μέρος (**Εικ. 1**).



Εικόνα 1. Λάρβες του δίπτερου εντόμου *Drosophila virilis*

Για τον διαχωρισμό των σιελογόνων αδένων χρησιμοποιούνται βελόνες ανατομίας. Τοποθετούμε τη μία στο μέσο του σώματος της λάρβας, και την άλλη στην βάση της κεφαλής (**Εικ. 2**). Στη συνέχεια τραβούμε ελαφρά τη βελόνα που είναι τοποθετημένη στη βάση της κεφαλής ώστε να σπάσει η λάρβα στην ένωση κεφαλής-σώματος, με αποτέλεσμα να ελευθερωθούν τα εσωτερικά όργανα και μαζί τους οι σιελογόνοι αδένες που μας ενδιαφέρουν (**Εικ. 3**).



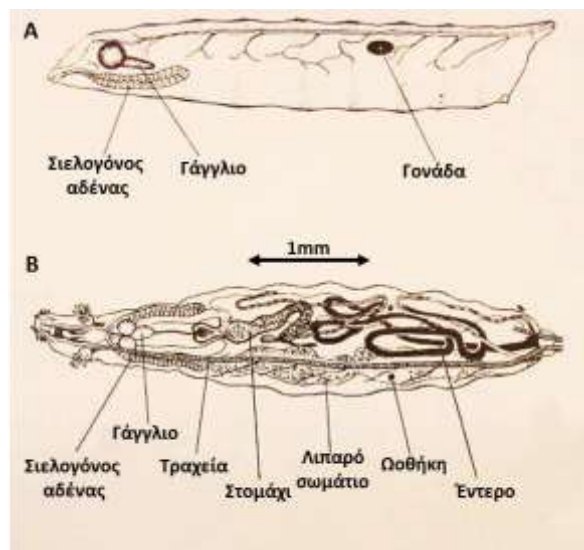
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση των οργάνων της λάρβας του εντόμου *Drosophila*

Τρόπος απομόνωσης των σιελογόνων αδένων

Η αναγνώριση των σιελογόνων αδένων γίνεται βάσει δύο κυρίως χαρακτηριστικών σε σχέση με τα υπόλοιπα όργανα και από τα κομμάτια λίπους που θα παρατηρήσουμε στο μικροσκόπιο:

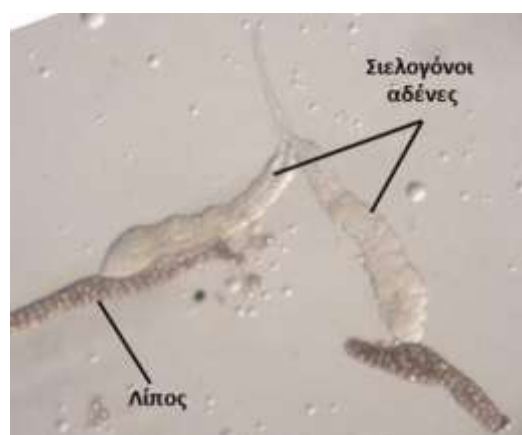
Σε κάθε λάρβα υπάρχουν δύο σιελογόνοι αδένες σε σχήμα ροπαλού. Στο άκρο κάθε τέτοιου ροπαλού υπάρχει ένας μίσχος-αγωγός, οι δύο αυτοί μίσχοι - αγωγοί ενώνονται μεταξύ τους σ' έναν και αυτός είναι ενωμένος στη βάση της κεφαλής (Εικ. 4).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό είναι ότι σε μαύρο φόντο το χρώμα τους εμφανίζεται γκριζωπό. Οι σιελογόνοι αδένες αποτελούνται από μεγάλα κύτταρα με κοκκώδη εμφάνιση. Συνήθως στα πίσω άκρα τους είναι ενωμένοι εξωτερικά με κομμάτια λίπους, τα οποία είναι εντελώς λευκά και η υφή τους είναι μικροκυψελλοειδής ενώ το σχήμα τους είναι ακαθόριστο (Εικ. 4).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των οργάνων της λάρβας του εντόμου *Drosophila* σε πλάγια (A) και σε ραχιαία (B) όψη

Σύγχυση των σιελογόνων αδένων είναι δυνατόν να γίνει και με κομμάτια εντέρου που πιθανόν να έχουμε κόψει κατά την ανατομία. Σ' αυτή την περίπτωση θα πρέπει να προσέξουμε το σχήμα. Το έντερο είναι ισοπαχές και ενώ πιθανόν να μοιάζουν στο χρώμα, διαφέρουν χαρακτηριστικά στην υφή, δηλ. οι σιελογόνοι αδένες αποτελούνται από μεγάλα κύτταρα με κοκκώδη εμφάνιση σε αντίθεση με το έντερο, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται διαφορετικά.

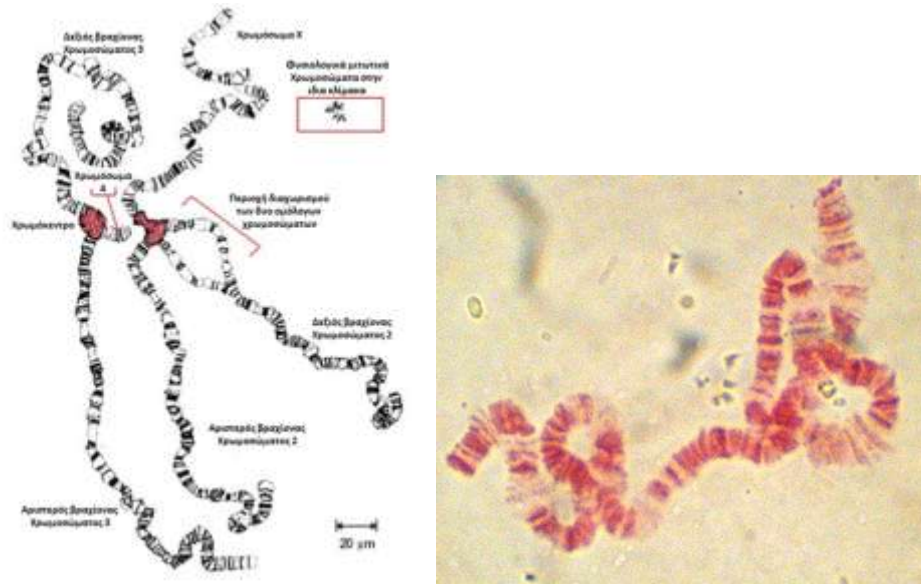


Εικόνα 4. Απομονωμένοι σιελογόνοι αδένες

Αφού λοιπόν απομονώσουμε τους αδένες από τα υπόλοιπα όργανα και από τα κομμάτια λίπους, με την βοήθεια των δύο ανατομικών βελονών τους μεταφέρουμε σε καθαρή αντικειμενοφόρο στην οποία έχουμε τοποθετήσει διάλυμα Ringer's. Μόλις συγκεντρώσουμε 3-4 ζευγάρια σιελογόνων αδένων αφαιρούμε το ισότονο διάλυμα Ringer's με διηθητικό χαρτί (με μεγάλη προσοχή για να μην προσροφηθούν και οι σιελογόνοι αδένες) και προσθέτουμε μια σταγόνα διαλύματος αλκοόλης-οξικού οξέος σε αναλογία (1:1) για ελάχιστο χρόνο (το στερεωτικό εξατμίζεται εύκολα). Στη συνέχεια προσθέτουμε δύο σταγόνες χρωστικής ορσεΐνης (2g ορσεΐνης σε 100ml γαλακτικού/οξικού 1:1).

Στο σημείο της αντικειμενοφόρου που έχουν τοποθετηθεί οι σιελογόνοι αδένες και στην κάτω επιφάνεια της σχηματίζουμε ένα μικρό κύκλο με μολύβι που να περιλαμβάνει μέσα το παρασκεύασμα. Μετά από 12 περίπου λεπτά μπορούμε να δούμε το παρασκεύασμα αφού τοποθετήσουμε μία καλυπτρίδα. Για να γίνει αυτό τοποθετούμε το παρασκεύασμα πάνω σε διηθητικό χαρτί και πιέζουμε δυνατά την καλυπτρίδα με τον αντίχειρα προσέχοντας να μην μετακινηθούν οι σιελογόνοι αδένες πάνω στην αντικειμενοφόρο. Με τον τρόπο αυτό σπάζουν οι σιελογόνοι αδένες και οι μεμβράνες των κυττάρων τους με αποτέλεσμα να ελευθερώνονται τα γιγαντιαία χρωμοσώματα.

Το παρασκεύασμα αυτό όπως είναι το παρατηρούμε στο φωτονικό μικροσκόπιο και σε όλες τις δυνατές μεγεθύνσεις. Εάν έχουμε φτιάξει καλό παρασκεύασμα θα πρέπει να δούμε στο μικροσκόπιο τα γιγαντιαία χρωμοσώματα και να αναγνωρίσουμε την περιοχή του κεντρομεριδίου και τα χρωμομερή πολύ καλά. (Εικ. 5).



Εικόνα 5. Τα τέσσερα γιγαντιαία χρωμοσώματα του Δίπτερου *D. melanogaster* όπου απεικονίζονται οι αριστεροί και δεξιοί βραχίονες κάθε χρωμοσώματος (εκτός τους 4ου). Στη δεξιά εικόνα απεικονίζονται τα πολυταινικά χρωμοσώματα όπως εμφανίζονται μετά την πειραματική διαδικασία (x 1.000).

Βιβλιογραφία

Gardner, E.J., Mertens, T.R., (1970). Genetics laboratory investigations. Burgess publishing. Minneapolis minn 55415.
 Κατσώρης-Ισιδωρίδου (1981). Histochemistry 72, 21-31.
 Κιόρτση Β. (1972). Ζωολογία.
 Μαργαρίτης, Λ.Χ. και Συνεργάτες (2004). Κυτταρική Βιολογία, Δ΄ Έκδοση, Αθήνα, Εκδόσεις Λίτσας.
 Wald, Hopkins, Albershein, Dowling, Dephardt (1968). Twenty-six afternoons of biology, an introductory laboratory manual. Addison-wesler publishing company.