

Zápis ze schůze výboru genetické společnosti Gregora Mendela, která se konala dne 25.5. 2011 v Brně

Místo konání:

Univerzitní kampus v Brně-Bohunicích, pracovna ředitele Ústavu experimentální biologie PŘF MU, pavilon A17, místnost 431.

Přítomni (bez titulů): Doškař, Knoll, Kočová, Kormuťák, Malachová, Nešvera, Relichová, Slaninová, Šmarda, Vlček, Vojtíšková

Omluveni: Miadoková, Pikálek, Zadražil, Zelený

Program schůze:

1. Informace o činnosti výboru od poslední schůze (listopad 2010)
2. Zhodnocení obsahu minulého čísla IL č. 37 a příprava dalšího čísla
3. Projednání aktuálního stavu přípravy konference GSGM 2011 v Lednici
4. Vyhodnocení předložených návrhů do soutěže mladých pro udělení ceny GSGM
5. Různé

ad 1) + 3) Schůzi zahájil prof. Doškař a omluvil nepřítomné členy výboru.

Činnost výboru v uplynulém období: Pokračovala intenzivní organizační činnost na zajištění konference GSGM v Lednici v září 2011. Jednání výborové schůze se zúčastnili dva zástupci studentského sdružení Biomania (Reichman, Škoda), která se podílí na technickém zajištění konference GSGM.

Byl sestaven program konference zaměřený na aktuální problematiku v oblasti genetiky a molekulární biologie, byli pozváni přední odborníci k plenárním přednáškám (Bártová, Hampl, Hořínová, Kejnovský, Krajčovič, Piršel, Pospíšek, Tomáška, Vyskot).

Veškeré informace o konání konference, programu, registraci on line, byly zveřejněny na internetových stránkách GSGM <http://www.gsgm.cz/> a přímo na stránkách sdružení Biomania:

<http://www.biomania.cz/gsgm2011/> .

Členové GSGM byli individuálně informováni o konání konference elektronicky nebo dopisem s odkazem na internetové stránky GSGM.

Studenti ze sdružení Biomania informovali o aktuálním stavu organizačních příprav konference (25.5. 2011):

- a) Jednání konference se aktivně zúčastní zástupci sponzorujících firem (Eppendorf, Schoeller, Biorad, Scintila s.r.o., Bioconsult, Roche s.r.o., Trigon-plus, Genetica) přednáškou nebo výstavkou se zařazením do programu konference.

- b) Dosud přihlášených účastníků 18; členové výboru byli požádáni, aby vyzvali na svých pracovištích k aktivní účasti na konferenci zejména mladé spolupracovníky a studenty.
- c) Byly připraveny a vytištěny plakáty A4 (Biomania) o konání konference GSGM. Členové výboru zajistí jejich rozeslání na různá pracoviště, zabývající se genetikou a molekulární biologii.
- d) Výbor byl přítomnými zástupci Biomanie seznámen s finanční kalkulací konference.
- e) Doc. Slaninová žádala podrobnější informace o výši konferenčního poplatku, pozastavila se nad znevýhodněním členů GSGM, vzhledem k tomu, že výše poplatku je stejná pro členy i pro nečleny společnosti. Prof. Doškař uvedl, že výše poplatku byla stanovena na základě předběžné kalkulace tak, aby byla finančně co nejvýhodnější pro všechny přihlášené účastníky.
- f) Doc. Slaninová dále upozornila na nejednoznačnou informaci o cenách za ubytování (jedno – dvoulůžkové pokoje, Zámecký hotel nebo Penzion). Informace o ubytování bude upřesněna na internetových stránkách v nejkratším termínu - provedou zástupci Biomanie).
- g) Uzávěrka přihlášek a souhrnů bezpodmínečně do 14. 7. 2011.
- h) Sborník bude obsahovat program konference, souhrny přednášek a plakátových sdělení, informace o lednickém areálu. Sborník bude evidován pod ISBN.
- i) Členové výboru zhodnotili aktuální stav příprav konference s výše uvedenými připomínkami.

Ad 2) Členové výboru velmi kladně zhodnotili obsah a odborné články uveřejněné v posledním čísle IL č 37, stejně tak i kvalitní a nápaditou grafickou úpravu.

Prof. Šmarda informoval o předběžném obsahu připravovaného čísla, které se bude týkat:

- a) životního jubilea Doc. Ing. V. Orla, DrSc.
- b) zhodnocení průběhu konání konference GSGM v září 2011,
- c) uvedení rozšířených referátů z vybraných plenárních přednášek a článek výherce Ceny GSGM, která bude udělena v rámci jednání konference.

Redakční uzávěrka IL č. 38 bude 10. října 2011.

Ad 4) Vyhodnocení předložených návrhů do soutěže mladých pro udělení ceny GSGM s finanční odměnou ve výši 2000 EUR od sponzorující firmy M.G.P. s.r.o. Zlín.

Do soutěže v prodlouženém termínu do 15. dubna 2011 byly podány tři přihlášky doložené publikovanými vědeckými pracemi v posledních třech letech před podáním přihlášky do soutěžního kola. Výbor byl s odborným obsahem všech tří přihlášek seznámen. Bylo konstatováno, že jedna přihláška neodpovídá statutu ceny GSGM (autor nebyl členem GSGM) a z toho důvodu byla přihláška vyřazena. Výbor genetické společnosti dále pečlivě zhodnotil vědecký obsah zbývajících dvou přihlášek a na návrh odborné posuzovatelské

komise ve složení prof. Doškař, prof. Šmarda, prof. Vlček, která kladně zhodnotila dlouhodobý významný vědecký přínos autora v oblasti výzkumu geneticky podmíněných metabolických poruch, udělila cenu GSGM za období 2008 - 2010, doc. O. Šedovi, Ph.D. Členové výboru jednomyslně souhlasili s rozhodnutím komise.

Prof. Doškař zašle písemné oznámení výherci ceny GSGM (doc. O. Šedovi) s informací o povinnosti autora přednést plenární přednášku v rámci konference v Lednici a současně uveřejnit anotaci přednášky ve sborníku konference.

5) *Různé:*

Prof. Knoll upozornil na základě vypracovaného přehledu placení členských příspěvků členů GSGM, že úhrada je velmi liknavá a počet zaplacených příspěvků pro rok 2011 je velmi nízký.

Dr. Kočová informovala výbor o doplnění seznamu elektronických adres členů GSGM a o přihláškách tří nových členů se současným přidělením členských čísel (variabilní symbol pro placení čl. příspěvků): Mráz (115), Šmardová (116), Rothová (117).

Na závěr jednání, prof. Doškař oznámil zahájení příprav voleb nového výboru GSGM.

Prof. Vlček do širší kandidátky navrhuje prof. Tomášku, který s nominací vyslovil souhlas.

Zapsala: M. Vojtíšková

Zpráva o činnosti výboru a aktivitách společnosti GSGM za uplynulé období (2008 - 2011) přednesená na Valném shromáždění konaném dne 15. 9. 2011 v rámci genetické konference v Lednici

Výbor GSGM pracoval v uplynulém volebním období ve složení: předseda – J. Doškař, místopředsedové – J. Relichová, S. Zadražil, D. Vlček, tajemník – J. Fajkus, uvolněn na vlastní žádost z pracovních důvodů na výborové schůzi 25.5. 2010, dále jako tajemník pracovala M. Vojtíšková a M. Kočová, hospodáři za ČR A. Knoll, za SR M. Slaninová, hlavní redaktor IL – J. Šmarda, koredaktoři K. Malachová, E. Miadoková, P. Pikálek, správce webových stránek A. Knoll, organizace soutěže GSGM o Cenu pro mladé věd. pracovníky – M. Vojtíšková, člen výboru K. Zelený, revizoři účtu – J. Nešvera, K. Angelis, E. Čellárová a A. Kormuťák.

Výbor se scházel pravidelně 2x do roka v podzimním (listopad) a v jarním (květen) termínu. Za poslední funkční období se výbor sešel celkem 6x na

pečlivě připravených jednáních a projednal aktuální úkoly, vztahující se k činnosti Společnosti, zabýval se přípravou a schvaloval obsah časopisu GSGM, Informačních listů, jejichž úroveň, zejména odborných příspěvků, se za poslední roky výrazně zkvalitnila (zejména zásluhou redaktora J. Šmardy). V letech 2009-2011 vznikla 4 čísla Informačních listů (34-37) v modernizované grafické úpravě a barevném provedení, což bylo umožněno podporou ze strany sponzorských firem Roche a Eppendorf. Hlavním obsahem uvedených čísel byly přehledné články respektovaných českých a slovenských vědců zaměřené na některou z oblastí moderní genetiky, kratší sdělení popisující činnost na vybraných genetických pracovištích v České republice a na Slovensku a články historické, připomínající výročí významných objevů a mezníků v historii genetiky. Své místo v každém z čísel měly rovněž informace ze současnosti dokumentující aktuální dění v tomto oboru, jako např. oznámení o konání výstav, vědeckých konferencí a přednášek, řešení nových významných projektů, recenze nových učebnic, apod. IL č. 34 byly téměř výhradně věnovány Genetické konferenci, která se konala v roce 2008 v Bratislavě. Obdobně by mělo být hlavní náplní nejbližšího budoucího čísla IL (38) hodnocení genetické konference GSGM uspořádané v září 2011 v Lednici.

Zápisy z jednání výborových schůzí byly uvedeny jako součást IL (č. 34 – 37) a také uveřejněny na webových stránkách společnosti. Dále se výbor zabýval inovací webových stránek a jejich správce A. Knoll se zasloužil o jejich aktivaci a průběžnou aktualizaci informací určených pro členy GSGM (<http://www.gsgm.cz>).

Dalším splněným úkolem výboru, kterého se iniciativně zhostila M. Kočová, bylo doplnění aktuálního seznamu členů ČR o elektronické adresy, aby byl umožněn bezprostřední kontakt s členskou základnou. Elektronických adres členů bylo již úspěšně využito při přípravě konference rozsláním výzvy k účasti na konferenci, informace o registraci, ubytování apod. Výbor předpokládá plné využití elektronických adres pro aktivní kontakt s členskou základnou zejména při přípravě nadcházejících voleb výboru. O elektronické adresy členů bude postupně doplněn také registr členů na Slovensku.

Členská základna pro českou část společnosti se rozrostla na 77 členů, v roce 2011 byli přijati 3 noví členové (M. Mráz, O. Rothová, J. Šmardová), další přihlášky budou projednány v podzimním termínu výborem, jeden člen z důvodu věku ukončil členství. Na Slovensku je v současné době evidováno 51 členů. Celkový počet členů z obou částí (Česko a Slovensko) genetické společnosti uvedených na seznamu (<http://www.gsgm.cz>) je 128 členů k datu konání Genetické konference v roce 2011.

V IL č. 34 (březen 2009) bylo uveřejněno vyhlášení dalšího (v pořadí již čtvrtého) kola soutěže o Cenu GSGM za léta 2008 - 2010 pro mladé vědecké pracovníky. Cena je dotována finančně firmou M.G.P., s.r.o., Zlín. Přes opakované výzvy, uveřejněné v IL, nebyl o soutěž takový zájem, jaký výbor očekával. Na tomto místě je vhodné apelovat zejména na školitele studentů DSP, aby vyzvali své studenty k účasti v soutěži. Statut ceny byl publikován v IL současně s vyhlášením a podrobné informace jsou vyvěšeny na

webových stránkách (<http://www.gsgm.cz>). Bohužel v tomto, již uzavřeném kole soutěže se sešlo velmi málo přihlášek. Důležité je, aby nedocházelo k chybné interpretaci podmínek pro udělení Ceny a to věk do 35 let, členství v GSGM, dodržení termínu podání přihlášek.

V posledním období (od výborové schůze 25. 5. 2010) začala intenzivní příprava Genetické konference 2011. Byl navržen rámcový odborný program, vytipována nosná aktuální témata z oblasti genetiky a navrženi přední odborníci z ČR a SR k zajištění přednášek. V následném období se členové organizačního výboru scházeli častěji pro upřesnění organizačních příprav konference. Zajištění organizace se ujali studenti z PŘF a LF MU ze sdružení Biomania. Zhodnocení Genetické konference 2011 bude předmětem následné výborové schůze (podzim 2011), je třeba již nyní poděkovat všem členům organizačního výboru a studentům sdružení Biomania za aktivní pomoc při její organizaci.

Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2010, jak za českou, tak slovenskou část Společnosti bylo podrobně uvedeno v IL č. 37. Na tomto místě lze konstatovat, že hospodaření Společnosti není ztrátové, zůstatek k 31.12. 2010 byl 11.471,11 Kč pro ČR a 1.220,74 EUR pro SR. Výbor opakovaně v IL uveřejňoval výzvy a připomínal členům jejich základní povinnost, a to zaplacení příspěvku za kalendářní rok nejpozději do února příslušného roku. Příspěvek slouží především k pokrytí nákladů na tisk a distribuci Informačních listů a je třeba zmínit, že jeho výše zůstává již několik let nezměněna (členové 150, studenti a důchodci 50 Kč).

I když z uvedeného přehledu vyplývá, že v uplynulém období došlo k pozitivnímu posunu v činnosti Společnosti, pro nadcházející období, po volbě nového výboru, lze navrhnout směry činnosti, kde současný výbor vidí nemalé rezervy. Základním úkolem pro nadcházející období by mělo být přijímání nových mladších členů, a zejména jejich aktivní zapojení v práci výboru, pořádání studentských konferencí pod záštitou GSGM, zvýšení jejich podílu na publikační aktivitě v IL, aktivní zájem o účast v soutěži o Cenu GSGM pro mladé vědecké pracovníky.

Končí tříleté funkční období stávajícího výboru a výbor zahajuje přípravu nových voleb pro následující období. Volby proběhnou korespondenčně během podzimu t.r.

Výbor GSGM

VYÚČTOVÁNÍ HOSPODAŘENÍ GSGM K 19.8. 2011 ZA ČR

Zůstatek k 31.12.2010		11471,11 Kč
z toho	na účtu KB	9759,11 Kč
	v pokladně	1712,- Kč
<hr/>		
Příjmy v roce 2011		3251,32 Kč
úroky z účtu u KB		1,32 Kč
členské příspěvky:		
z toho	placené na účet KB	2950,- Kč
	placené hotově	300,- Kč
<hr/>		
Výdaje v roce 2011		1296,- Kč
občerstvení jednání komise GSGM		340,- Kč
poplatky bance za vedení účtu a položky		956,- Kč
<hr/>		
Zůstatek k 19.8.2011		13426,43 Kč
z toho	na účtu KB	11754,43 Kč
	v pokladně	1672,00 Kč

VYÚČTOVÁNÍ HOSPODAŘENÍ GSGM K 7.9. 2011 ZA SR

Zůstatek k 31.12.2010		1220,74 EUR
z toho	na účtu Tatra banky	1213,66 EUR
	v hotovosti	7,08 EUR
<hr/>		
Příjmy v roce 2011		
příjmy z členských poplatků		65,00 EUR
<hr/>		
Výdaje v roce 2011		
poplatky bance za vedení účtu		20,72 EUR
<hr/>		
Zůstatek k 7.9. 2011		1265,02 EUR
z toho	na účtu Tatra banky	1222,94 EUR
	v hotovosti	42,08 EUR

Je tomu již 85 let ...

Lískovec u Koryčan, vesnice 2 km severně od Koryčan leží v jihozápadním cípu okresu Kroměříž na úpatí Chřibů v kopcovité a zalesněné krajině Moravy. Asi nikdo ze současných obyvatel si neuvědomuje, že 29. 5. 1926 byl do matriky zapsán **Vítězslav Orel**, který nyní i přes důchodový věk aktivně prožívá svůj život v Brně s manželkou Olgou. Shoda náhod, týkající se zdravotní problematiky



drůbeže, mě před více než 15 lety umožnila osobní seznámení s člověkem výjimečných pracovních, osobních a charakterových vlastností. Člověkem, který se přes svůj zdravotní handicap pomocí počítače a internetu dokázal spojit s celým světem. Člověkem, pro kterého věda a poznání jsou stále živé, což dokumentují stále nové publikace od vědecké genetiky šlechtění zvířat k výzkumu dědičnosti, Mendelovu objevu a významu genetiky v moderním vědeckém poznání. Poděkováním, za tuto šťastnou náhodu, bych si dovilil připomenout životní výročí doc. RTDr. Ing. Vítězslava Orla, DrSc., který kromě úzkých kontaktů s Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno, kde byl v roce 1969 habilitován z plemenářské biologie a genetiky, spolupracoval s prof. MVDr. Bedřichem Klimešem a z pověření Vědecké rady VFU Brno převzal před deseti lety Zlatou medaili univerzity za pomoc při rehabilitaci výuky a výzkumu genetiky na veterinární fakultě z ideologicko-politického odmítání jako reakční vědy. Jubilant pokračuje v duchu odkazu svého učitele doc. Ing. RTDr. Jaroslava Kříženeckého, DrSc. v rozvíjení Mendelova vědeckého odkazu a přiložená citace hodnocení rukopisu, jeho rozsáhlé studie *Science Studies and Mendel's Paradigm*, profesorem Timothy M. Coxem, může být dokladem jeho odborných zásluh (viz níže).

Mirko Treu

Výbor GSGM se připojuje a přeje svému čestnému členovi doc. V. Orlovi hodně zdraví a životního elánu do dalších let.

Dear Professor Orel,

First I must apologise for taking so long to respond properly to your kind message and enclosed paper.

My only excuse is that I have been submerged with work - much of it urgent and uncompromising. But I could wait no longer in getting back to you after reading your fascinating manuscript. It is an ambitious piece and, if I am fit to judge, an impressive synthesis of its own! You have brought to bear contemporary views as to how forces in the philosophy and history of science lead to radical new concepts.

Clearly you have discussed Comenius before: a remarkable pedagogue, scientist and philosophical forerunner of the true age of enlightenment: I greatly enjoyed your earlier references to him - as well as your very unusual book with Roger Wood on the prehistory of genetics in selective breeding (largely of livestock).

Comenius - educationist better than pedagogue, because he knew how to 'draw out' (educere) understanding rather than push knowledge in, as our present day political masters would like - was greatly influenced by the Baconian ideas of utility and progress and had those strong links with the Royal Society of London. You have also expounded the views of Kuhn and showed how retarded scientific developments in Biology were because of the lack of 'paradigms'. Actually, it seems to me that the experiments of the chemists Lavoisier and Priestley in the 18th century broke into Biology very decisively, but I accept the generalization. Of course, Comenius, Lavoisier, Priestley - even Bacon - knew all about dissent from dogma and like Gallileo, were liberated from the anti-intellectualism and suppression of inquiry that came from religious censure in Rome.

Clearly the astonishing achievements of Mendel and their lasting effects required something other than paradigms; and that something that did not come directly from this enlightened background. He was a brilliant experimentalist - a very practical scientist and, in the end, a successful one because he discovered something unassailably tangible that led to predictive science and discovery because it worked in the field.

His discoveries were inspired by observation and insatiable curiosity, Yes - but he had his very own capacity to distill the difficult biological questions into simple principles that could be tested by employing prodigious techniques and powerful analytical thinking. By these means alone he was able to consider unitary factors and then investigate complex interactions between them.

Mendel's gift was not simply in acute observation and courageous persistence; he knew that science had to be predictive and lead to generalizable principles. This required the experimental approach of perturbing and reducing natural processes to get answers. Perhaps I am wrong, but I cannot relate the ultimate success of Mendel directly to Kuhnian paradigms but much more to

Comenius, Newton and others. 'After all', as they said against Fisher's studies, 'Mendel was right' - and experimental work that allows predictive science to develop in its own area is the science that leads to the new 'Paradigm'. Nothing succeeds like practical success!

Your article is beautifully written and a deep pleasure to read: in it you have articulated what previously I and others could never have done nor properly see for themselves. Your historical researches have generated a convincing picture of the intellectual environment which allowed Mendel to become the genius he was. And of course, it is you who has shown us what he really achieved for the scientific world as a unique product of the enlightened intellectual environment of Moravia.

I do not know where you might best submit your article; clearly it deserves the highest place in a authoritative journal where its influence will soon be felt - and you will see the irony of that suggestion, for I am from the University of Cambridge, like Bateson, and not Nägeli!

I again send warmest congratulations and best wishes for a fulfilling and healthy 2008,

Yours sincerely,

Tim Cox

Timothy M. Cox is Professor of Medicine, Honorary Consultant Physician, acting chairman of Department at University of Cambridge, USA

Zásluha doc. Ing. RTDr. Jaroslava Kříženeckého, DrSc. (1896-1964) na vytvoření Mendeliana v Brně

Vítězslav Orel

V roce 1965 jsem vysvětloval při zahájení mezinárodního Mendel memorial symposia v Brně zásluhu Kříženeckého o zřízení Mendelova muzea a pracoviště pro historický výzkum vzniku a vývoje genetiky, které pojmenoval po poradě s profesorem latiny J. Ludvíkovským, Mendelianum (Orel, 1966).

Jaroslav Kříženecký vystudoval v Praze Vysokou školu zemědělskou a začal se věnovat studiu genetiky. Jako asistent Ústavu obecné zootechniky na nově založené Vysoké škole zemědělské v Brně začal ve výuce obecné zootechniky vysvětlovat i základy genetiky. Účast při oslavách stého výročí Mendelova narození v Brně v roce 1922 byla pro něj podnětem pro rozvíjení zájmu o vznik a vývoj genetiky. Po návratu ze studijního pobytu v USA v roce 1930 vypracoval ve spolupráci s J. Bělehrádkem, profesorem biologie na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity, návrh na zřízení Mendelova genetického a eugenického ústavu, jehož pracovníci měli zajišťovat rozvíjení

výuky a výzkumu genetiky na vysokých školách v Brně. Do projektu zahrnuli také zřízení Mendelova muzea, jehož základy byly položeny v areálu Augustiniánského kláštera při oslavách stého výročí Mendelova narození.

O zřízení Mendelova muzea mohl Kříženecký usilovat až po obnovení vysokoškolské výuky po skončení druhé světové války v roce 1945. Při studiu zemědělského inženýrství mě v roce 1948 zaujala jeho výuka základů genetiky populací při šlechtění hospodářských zvířat. S nadšením jsem přijal nabídku studovat genetiku jako pomocná vědecká síla zootechnického ústavu. Tehdy získal v SSSR T. D. Lysenko (1898-1976) s přímou Stalinovou podporou monopolní postavení ve výuce a vývoji biologických věd násilně podřízených politické ideologii. Genetika byla označena za *reakční vědu* a násilně nahrazována naukou tehdy již genetiky překonanou představou dědičnosti získaných vlastností, označovanou jako *lysenkismus*. To se záhy projevilo také v naší zemi. Pracovníci, kteří to nepřijímali, byli zbavováni pracovních míst a pronásledováni. Můj zájem a až obdiv ke genetice se střetl s velkým rozčarováním. Kříženecký na vrcholu své vědecké a pedagogické práce musel opustit místo vysokoškolského učitele a později byl vystaven strádáním ve vězení.

Po skončení studia jsem nastoupil místo v Brně v nově zřízeném Výzkumném ústavu drůbežářského průmyslu. Při každé příležitosti jsem se pokoušel prosazovat využívání nových poznatků vědy při zavádění průmyslové výroby vajec a hlavně kuřecího masa - brojlerů. V publikacích o reprodukci a selekci drůbeže jsem poukazoval na význam genetiky. Výsledky mého výzkumu nacházely uplatnění v praxi, takže jsem získal povolení pro externí spolupráci s tehdy nezaměstnaným Kříženeckým (Orel et al., 1965). Po vydání směrnic o zavádění vědeckých hodnot v roce 1965, byl jsem zařazen do kategorie vědeckých pracovníků s tím, že urychleně předložím z již publikovaných studií kandidátskou disertaci. V té době jsem také externě přednášel technologii drůbežářských výrobků na potravinářské fakultě Vysoké školy technologické (VŠCHT) v Praze, kde mi byla nabídnuta habilitace. Tehdy vyhlásil nově nastoupený tajemník ÚV KSČ A. Novotný *třídní prověrky*, při kterých byli pracovníci vědecké základny zařazováni do čtyř kategorií, označovaných jako A až D. Byl jsem zařazen do kategorie D, což znamenalo pracovat jen manuálně, v mém případě navíc ve výrobě mimo Brno. Současně jsem byl odvolán i z externí výuky na VŠCHT. Vedoucí pracovníci drůbežářského průmyslu poukazovali na moje zásluhy při rozvíjení nových technologií a kádrový pracovník mi záhy sdělil výhodnější zařazení do kategorie C. Mohl jsem pracovat jako technik v Drůbežářských závodech v Uherském Brodu. V prostředí pracovníků ve výrobě jsem v roce 1963 získal povolení pro obhajobu kandidátské disertace na Vysoké škole zemědělské v Nitře. Bylo to spojeno s nabídkou místa vědeckého pracovníka ve výzkumném ústavu Slovenské akademie věd.

V té době mě Kříženecký po návratu z vězení pozval ke spolupráci při přípravě učebnice genetiky v přesvědčení, že v nejbližší době musí dojít k obnovení výuky genetiky. Přijal jsem nabídku pracovat v Brně jako technolog v nově zřízeném Ústavu pro projektování nových drůbežářských závodů a to

mi umožnilo externě spolupracovat s Kříženeckým, který již vyhledával doklady ke zveřejnění stého výročí Mendelova objevu v roce 1965. Když byl v roce 1963 přijat do Moravského muzea s úkolem zřídit Mendelovo muzeum, požádal mě o spolupráci. Tehdy se mi naskytla příležitost externě spolupracovat při výuce a výzkumu genetiky na veterinární fakultě, tehdy podřízené Vysoké škole zemědělské v Brně. V roce 1968 mně byla umožněna i externí výuka genetiky a habilitace na této škole. Nástupem *politické normalizace* po roce 1968 moje externí výuka na této škole skončila.

V době Kříženeckého onemocnění a jeho náhlého úmrtí jsem zajišťoval náročnou přípravu zřízení Mendelova muzea v klášterním areálu od vypracování investičního úkolu až po vybudování muzejní expozice. Ve spolupráci s dr. L. Marvanovou se nám též podařilo v krátké době připravit náročnou expozici o vzniku a vývoji genetiky v hlavní budově muzea a vydat publikace k mezinárodnímu sympoziu v Brně v roce 1965. Zároveň jsem zajišťoval vydání dvou Kříženeckého knižních publikací, věnovaných studiu osobnosti G. Mendela a základů historického výzkumu vzniku a vývoje genetiky (Kříženecký, 1965a). Expozice tehdy významně přispívaly k obnově výuky genetiky na školách různých stupňů a rozdílného zaměření. Ve výkladech návštěvníkům jsme mohli poukazovat na význam genetiky a na škodlivost jejího odmítání. Do počáteční úspěšné činnosti Mendeliana zasáhly důsledky okupace v roce 1968. Tehdejší pracovníci muzeu nadřízeného Krajského národního výboru kritizovali činnost Mendeliana, že pod rouškou historie genetiky propagujeme náboženství. Musel jsem obhajovat existenci Mendeliana jako samostatného muzejního oddělení. Jeho působnost se měla omezit jen na funkci lektora v expozici a dokumentaci vývoje genetiky.

Publikování výsledků historického výzkumu ve spolupráci s genetiky a historiky věd mělo velký ohlas, což vedlo k rozšiřování styků se zahraničními badateli. Tehdy mi americká genetická společnost udělila výroční cenu společnosti spojenou s převzetím medaile a finanční podpory pro výzkum. Podmínkou byla přednáška o výzkumné práci v Mendelianu. Přes doporučení i představitelů genetiky v naší zemi jsem nedostal povolení k výjezdu. V té době jsem již spolupracoval také s genetiky a historiky věd v SSSR. Vedoucí katedry historie a filosofie věd university v Moskvě, profesor V. Kupcov, DrSc., mi navrhl předložit k obhajobě doktorskou disertaci. V krátké době jsem do ruštiny přeloženou práci předložil. Pracovníci moskevské university ještě požadovali písemné povolení nadřízeného politického orgánu, které jsem nedostal. Nově vypracovanou doktorskou disertaci jsem mohl obhájit až v roce 1989 na Karlově univerzitě.

K šíření nových poznatků o Mendelovi a počátečním vývoji genetiky, které vycházely ze studia uchovávaných knižních a archivních dokladů v Brně, přispívali také pracovníci Moravské zemské knihovny zveřejňováním seznamu nových publikací Mendeliana (Kříženecký, 1965b). Jako příklad ohlasu nových informací v zahraničí může být kniha *From biology to biotechnology - progress protagonists and prospects in life science*, vydaná v Brně v roce 1981. Jako vydavatel je uváděno UNESCO, které hradilo

náklad. Mendelianum v Moravském muzeu bylo pověřeno jejím vydáním (Jakubíček a Kubíček, 1982).

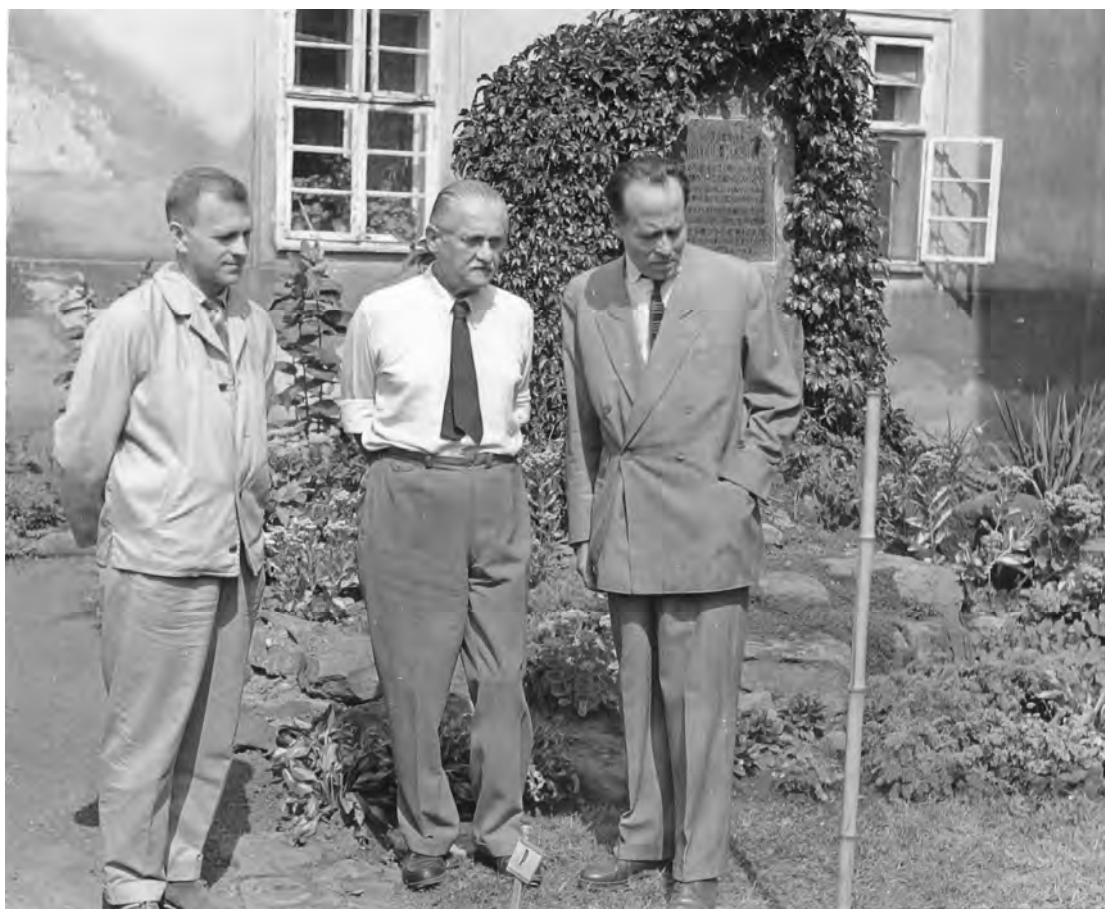
Žádnému badateli se nepodaří splnit všechna svá předsevzetí. Kříženecký od svých 14 let publikoval více než 650 studií, úvah, článků a knižních publikací u nás i v zahraničí. V průběhu 40 let usiloval o rozvíjení Mendelova vědeckého odkazu a na sklonku života se zasloužil o zřízení Mendelova muzea jako součást Mendeliana, pracoviště pro studium a dokumentování historie vzniku a vývoje genetiky. Snažil jsem se pokračovat v práci svého učitele. Ve vědeckých publikacích, zveřejňovaných u nás a v zahraničí i po odchodu do důchodu a zdravotním postižení, jsem se snažil pokračovat ve spolupráci se zahraničními badateli prostřednictvím internetu. Ve zkoumání vzniku vědeckého úkolu dědičnosti v širší historické souvislosti, ještě před Mendelovým příchodem do Brna a jeho řešení v Mendelově objevitelském výzkumu ve výjimečném kulturním prostředí na Moravě. Výsledky nyní přijímají genetické i historické věd. Jako příklad uvádím studie vydané v roce 2010. V novém časopisu v USA je zveřejněna rozsáhlá studie *Science Studies and Mendel's Paradigm* (Orel, 1981). Na mezinárodním Workshopu molekulárních genetiků, uspořádaném v areálu starobrněnského kláštera, ve spolupráci s Mendelovým muzeem, byla přednesena také moje historická studie *The resurrection of Mendel's discovery* (Orel, 2010a). Prokazují v ní také stanovení výzkumného úkolu záhady dědičnosti a zveřejnění první publikace o dědičnosti a vývoji v Brně před Mendelovým příchodem do kláštera. Koncem roku 2010 vyšla ještě podrobnější úvaha o souvislosti Komenského filosofie s Mendelovým výzkumem (Orel, 2010b).

Usiloval jsem též o zvyšování úrovně výuky genetiky u nás, především v Brně. K tomu významně přispívala moje spolupráce s funkcionáři a členy Čs. biologické společnosti a Genetické společnosti, kteří podporovali působnost Mendeliana. Věnovali jsme také pozornost studiu dokladů z období deformace genetiky a jejího obnovování. Nestačil jsem je již vyhodnotit v plném rozsahu. Genetika je nyní ústřední biologickou vědní disciplínou a její význam proniká do dalších přírodovědných a nově i do humanitních oborů pro vysvětlování postavení člověka v přírodě a ve společnosti. V novém demokratickém prostředí se nabízí rozvíjet Mendelův vědecký odkaz ve spolupráci s badateli různých vědních oborů u nás i v zahraničí v mnohem větším rozsahu než bylo možné v uplynulých 25 letech.

Literatura

- Jakubíček, M. a Kubíček, J. (1982) Bibliografia Mendeliana. Brno: Blok, Supplementum 1965-69. Brno: Univerzitní knihovna, 1970., Supplementum 1970-74. Brno: Univerzitní knihovna, 1976., Supplementum 1975-81. Brno: Univerzitní knihovna.
- Kříženecký, J. (1965a) Gregor Johann Mendel 1822-1884, Texte und Quellen zu seinem Wirken und Leben. Halle: Leopoldina Akademie.

- Kříženecký, J. (1965b) *Fundamenta genetica*. The revised edition of Mendel's classic paper with a collection of 27 original papers published during the rediscovery era. Prague, Academia.
- Orel, V., Kříženecký, J., Sajner, J., Musil F. (1965) Zjišťování oplozených, neplodných a neoplozených vajec pro biologickou kontrolu líhnutí. Praha: Ministerstvo potravinářského průmyslu.
- Orel, V. (1966) Opening of the Mendel Memorial attached in the Moravian Museum. Proceedings of a Symposium in Brno in August 4–7. Prague, Academia: 41-44.
- Orel, V. (1981) Gregor Mendel and the Foundation of genetics. In: Kinnon, C., M., Kholodilin, A., Orel, V. From Biology to Biotechnology – progress protagonists and prospects in life sciences, Unesco and Mendelianum of the Moravian Museum. Brno: 46-55.
- Orel, V. (2010a) Science Studies and Mendel's Paradigm. Perspectives on life science historical philosophical social. 18 (2): 226–241.
- Orel, V. (2010b) The resurrection of Mendel's discovery. Proceedings of the Structural and Functional diversity of the Eukaryotic Genome, published in Brno by Bettecken, T., Fajkus, J., Trifonov N.:14-16.



J. Kříženecký v Mendelově pokusné zahrádce v období přípravy expozice muzea a historického výzkumu. Po jeho levé straně je doc. MUDr J. Sajner, který tehdy v Brně začal rozvíjet historický výzkum lékařských věd, po pravé straně V. Orel.

Ohlédnutí za Genetickou konferencí GSGM 2011 v Lednici

Stanislav Zadražil

Ústav genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 44 Praha

Ve dnech 14.-16.9.tr. se konala další (nyní pravidelně v 3-letých intervalech) Genetická konference GSGM, tentokrát v mimořádném prostředí Zámeckého hotelu, součásti Lednicko-Valtického areálu. Výbor společnosti měl šťastnou ruku při výběru autorů plenárních přednášek (9), kteří se většinou s nebývalou noblesou, rutinou a vynikajícím odborným přehledem ujali svého úkolu seznámit účastníky s novinkami z různých oblastí genetiky od kmenových buněk, struktury specifických oblastí genomu a jejich reparací, kancerogeneze, genetické diagnostiky, až po epigenetiku a „historii“ vývoje organelových genomů. Tento výběr byl doplněn vynikající úvodní přednáškou vítěze soutěže o Cenu GSGM 2011, zaměřenou na ekogenomické aspekty metabolického syndromu, s jejímž stručným obsahem se můžeme seznámit na jiném místě tohoto čísla IL, stejně jako s texty nejpilnějších přednášejících konference (ostatní, doufáme, budou následovat v nejbližších číslech IL).

Mimořádná byla i účast v plakátové sekci konference (více než 50 vystavených prací), již tradičně zaměřená na všechny genetické obory, ale s výrazně převládajícími molekulárními přístupy a tématy. Vysoká úroveň těchto prezentací byla oceněna výběrem 2 nejlepších plakátů z Laboratoře vývojové genetiky rostlin Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně a Centra molekulární biologie a genové terapie Interní hematoonkologické kliniky Fakultní nemocnice v Brně. Program byl doplněn i valným shromážděním GSGM, se zprávou o činnosti a s vyhlášením termínu nových voleb výboru (20% účast členů), promítáním „Haškovcových fotografií květin“, úspěšným společenským večerem a závěrečnou exkurzí do MENDELEA - genetická biopracoviště zahradnické fakulty MZLU (se 100letou tradicí). Byl tak věnován i dostatečný prostor odpočinku s možností diskusí a přátelských setkání, což by mělo být součástí každé konference. V průběhu konference měli účastníci možnost seznámit se i s produkcí a aktivitami sponzorujících firem, na výstavce doprovázející program, jejichž zástupci mohli vystoupit s prezentacemi o metodických novinkách (Roche, Genetica).

Zvláštní pozornost a samozřejmě poděkování si zaslouží pracovníci občanského sdružení Biomania, založeného v roce 2007 studenty Přírodovědecké fakulty MU v Brně, kteří se za podpory brněnských členů výboru GSGM, ujali veškerých organizačních záležitostí, které zvládli s nebývalým přehledem a profesionalitou, k plné spokojenosti všech účastníků.

Celý průběh konference byl mimořádně úspěšný a potvrdil skutečnost, že domácí konference vědeckých společností, dobrovolně sdružujících pracovníky a zájemce o daný obor, se nepřežily a stále mají dostatek příznivců ochotných se jich aktivně zúčastňovat. Byli bychom rádi, kdyby se tato aktivita

rozšířila i na zbývající členy GSGM (tvořili pouze 20% všech účastníků), kteří ještě zůstávají stranou. Ještě jednou díky všem, kteří se o úspěch konference zasloužili a nashledanou při příštích setkáních na akcích GSGM.



Současný předseda GSGM prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc. a dřívější dlouholetý předseda GSGM prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc. při slavnostním zahájení Genetické konference v Lednici dne 14.9. 2011.



Pohled do auditoria při jedné z přednášek Genetické konference GSGM v Lednici.



Ing. Karel Zelený předává Cenu GSGM pro rok 2011 doc. Dr. Ondřeji Šedovi, Ph.D.

Ekogenomické aspekty metabolického syndromu

Ondřej Šeda

Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK, Albertov 4, 128 00 Praha 2

METABOLICKÝ SYNDROM – META-KOMPLEXNÍ ONEMOCNĚNÍ

Metabolický syndrom je onemocnění, které se stává díky své vysoké prevalenci jedním z celosvětových zdravotnických problémů 21. století. Celá řada epidemiologických a klinických studií opakovaně potvrzuje empirické pozorování konzistentní korelace mezi určitými antropometrickými parametry (obezita, viscerální ukládání tělesného tuku), metabolickými markery (zvýšená koncentrace triacylglycerolů, hyperinzulinémie, intolerance glukózy, nízké hladiny HDL cholesterolu) a hemodynamickými charakteristikami (hypertenze). Souběh několika z těchto patofyziologických stavů charakterizuje tzv. **metabolický syndrom**. Jelikož inzulinová rezistence byla považována Reavenem, který tento syndrom v osmdesátých letech 20. století popsal, za centrální metabolický defekt (Reaven, 1988), syndrom je někdy označován jako

syndrom inzulínové rezistence a synonym je celá řada (Svačina, 2006). Postupem času byly navrženy další fenotypy coby součásti metabolického syndromu včetně obezity, mikroalbuminurie, hyperurikémie, poruchy koagulace nebo zvýšení sérové gamma-glutamyltransferázy. Po letech koexistence celé řady různých, více či méně překrývajících se definic metabolického syndromu, došlo v roce 2009 k harmonizaci jednotlivých hledisek a byla vytvořena **konsenzuální definice metabolického syndromu** (Alberti et al., 2009).

Pro diagnózu metabolického syndromu je nutná přítomnost alespoň tří z následujících kritérií:

- **abdominální obezita** (obvod pasu větší než prahová hodnota, *specifická zvláště pro jednotlivá pohlaví a etnika*, např. u Evropanů >102 cm u mužů a >88 cm u žen)
- **zvýšená koncentrace triacylglycerolů** (>1,7 mmol/l, případně hypolipidemická léčba)
- **snížená koncentrace HDL-cholesterolu** (<1,0 mmol/l u mužů, <1,3 mmol/l u žen)
- **zvýšený krevní tlak** (> 130 mmHg systolický a/nebo > 85 mm Hg diastolický, případně antihypertenzní léčba)
- **zvýšená glykémie na lačno** (> 5,6 mmol/l případně antidiabetická léčba)

Z pohledu genetika se tedy jedná o celou sadu komplexních (multifaktoriálních) znaků, z nichž každý má víceméně stejně silnou komponentu genetickou i environmentální. Tato charakteristika samozřejmě komplikuje identifikaci genomických determinant tohoto „meta-komplexního“ syndromu. I proto je při analýze genetické architektury metabolického syndromu nezbytná integrativní analýza (Šeda et al., 2005), kdy se doplňují a navzájem validují výsledky studií experimentálních, klinických a populačních. Zcela zásadní je rovněž rozšíření analytického rámce ve smyslu konstrukce matematických a experimentálních modelů zohledňujících interakce genetické složky metabolického syndromu s majoritními faktory vnějšího prostředí, jako jsou dieta či podávané léky. **Následující příklady představují výsledky aplikace takového přístupu v dekonstrukci vybraných ekogenomických aspektů metabolického syndromu jako celku, tak jeho jednotlivých dílčích fenotypů.**

INBREDNÍ KMENY LABORATORNÍHO POTKANA JAKO MODEL METABOLICKÉHO SYNDROMU

Jak již bylo zmíněno výše, detailní analýza genetických faktorů podílejících se na patogenezi metabolického syndromu je provázena řadou komplikací. Kauzální varianty genů je nejen složité odhalit uprostřed spleti interakcí genů a vlivů prostředí, ale problematické je i jejich detailní testování v rámci relevantních biologických a fyziologických pochodů přímo u lidí, a to z důvodů etických a mnohdy i praktických. Různé fáze výzkumu proto musí probíhat za použití modelů na několika „úrovních“: *in silico* (počítačové modely), *in vitro* (např. buněčné kultury) a *in vivo* (modelové organismy), které jsou teprve

následně validovány u člověka. Jedním z experimentálních modelů metabolického syndromu je kmen polydaktylního potkana (PD/Cub, obr. 1). Tento vysoce inbrední kmen ($F > 90$) je na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN chován od roku 1969 (Křen, 1975).



Obr. 1: Potkan kmene PD/Cub.

Spontánně vzniklá mutace genu *Lx* dává vznik syndromu polydaktylie-luxace a tento kmen je intenzivně studován jako model morfogeneze a teratogeneze. V roce 1993 byla u PD/Cub zjištěna zvýšená hladina triacylglycerolů a detailnější zkoumání pak vedlo k ustavení kmene PD/Cub jako modelu metabolického syndromu, neboť kromě dyslipidémie byla u tohoto kmene identifikována hyperinzulinémie, zvýšená hmotnost epididymálního tukového tělesa (marker obesity centrálního typu), zvýšená hladina nenasycených mastných kyselin a výrazná inzulinová rezistence (Šedová *et al.*, 2000). Dále se ukázalo, že PD/Cub má i jedinečný farmakogenetický i farmakogenomický profil v rámci podávání látek modulujících genovou transkripci (Šeda *et al.*, 2002; Šedová *et al.*, 2004).

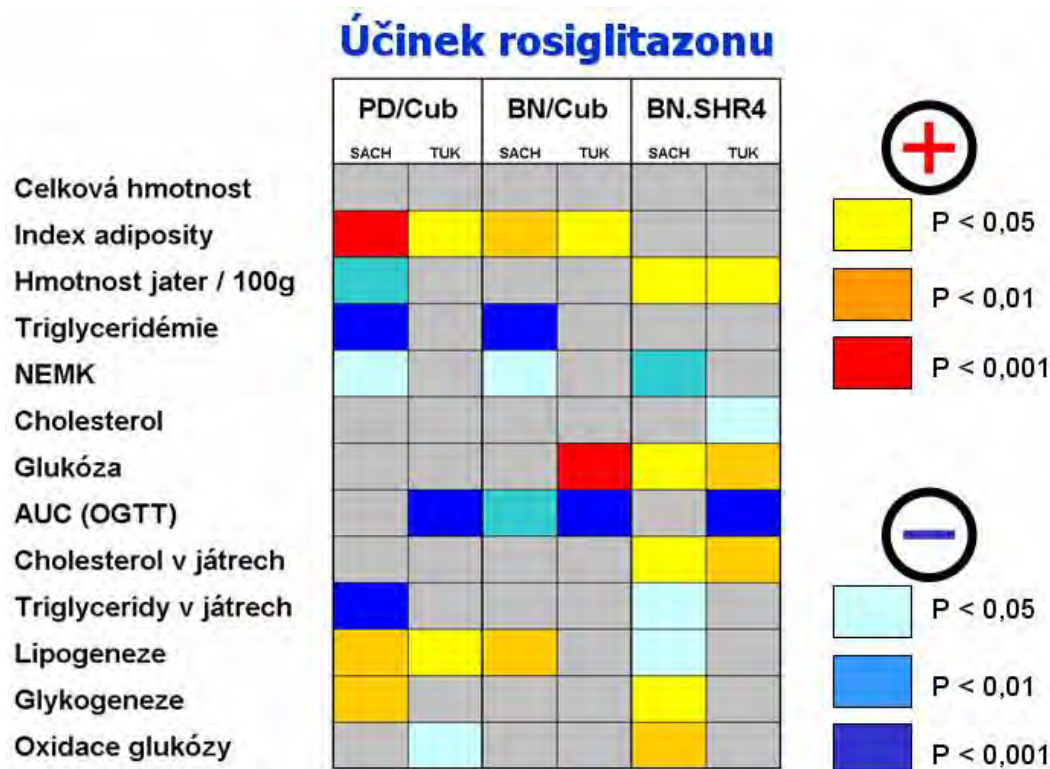
Dalším často využívaným modelem je spontánně hypertenzní kmen potkana (**SHR**), vytvořený japonskými vědci Okamotoem a Aokim (Okamoto a Aoki, 1963) selektivním křížením potkanů kmene Wistar. Tento kmen je nejčastěji využívaným modelem lidské esenciální hypertenze. Hypertenze se u tohoto kmene vyskytuje společně s dalšími atributy metabolického syndromu (Pravenec, 2010). Aitman *et al.* (Aitman *et al.*, 1999) identifikovali u SHR komplexní přestavbu genu *Cd36/Fat* kódujícího receptor/transportér mastných kyselin, který se podílí na transmembránovém přenosu mastných kyselin s dlouhým řetězcem v tukové tkáni, srdečním a příčně pruhovaném svalstvu. SHR nese deleční mutaci tohoto genu, což vede k téměř úplnému chybění exprese normálního proteinu Cd36 (FAT) v membráně adipocytů.

PŘÍKLAD 1. IDENTIFIKACE DIETNĚ MODULOVANÉ NUTRIGENETICKÉ INTERAKCE ROSIGLITAZONU

Jelikož jsou lidé s metabolickým syndromem většinou intenzivně farmakologicky léčeni, testovali jsme **farmakogenetické a nutrigenetické interakce v patogenezi metabolického syndromu**. Thiazolidinediony (TZD), tj agonisté jaderného receptoru PPAR γ , jsou v současné době hojně používány v terapii diabetu 2. typu a inzulinové rezistence (Šeda a Šedová, 2004). Přesný mechanismus jejich účinku však ještě nebyl objasněn. Navíc se ukazuje, že účinek terapie TZD a výskyt nežádoucích účinků (edémy, obezita, hepatotoxicita) je závislý mj. na genetické "dispozici" pacienta (v rámci farmakogenetické interakce). Geneticky definované modely mohou právě v

takových případech významně pomoci k identifikaci těch alel genů, které se zmíněné interakce účastní. Jedním z účinků látek thiazolidinedionové skupiny pozorovaných u experimentálních modelů i klinických studií je úprava citlivosti tkání k účinku inzulínu a zlepšení lipidového profilu, mnohdy na úkor vzrůstající adiposity. Za jeden z možných mechanismů je považována sekundární aktivace transkripce genů, které jsou zapojeny do přesunu substrátů lipidového metabolismu. Jedním z těchto genů je i translokáza mastných kyselin *Cd36/Fat*.

Na základě předchozích studií (Šeda *et al.*, 2002; Šeda *et al.*, 2003) jsme se rozhodli ověřit vliv podávané diety na farmakogenetické interakce pozorované u podávání antidiabetika rosiglitazonu kmenům PD/Cub, BN/Cub (kmen Brown Norway, kontrolní kmen) a BN.SHR4 (kongenní kmen vytvořený vnesením segmentu chromozómu 4 SHR původu včetně mutovaného *Cd36/Fat* na genetické pozadí kmene BN/Cub). Experimentálním i kontrolním skupinám byla podávána 14 dní buď dieta se zvýšeným obsahem tuku a cholesterolu nebo sacharózy. Experimentální skupiny samců všech tří kmenů pak dalších 14 dní dostávali společně s patřičnou dietou rosiglitazon (0,4 mg/100g tělesné hmotnosti). Kromě základních metabolických parametrů jsme hodnotili i inzulínovou senzitivitu periferních tkání a provedli jsme stanovení globální genové exprese pomocí čipů Affymetrix RAE230 v epididymálním (viscerálním) tuku s následnou validací výsledků pomocí real-time PCR. Jak je



Obr. 2: Dietně modulovaná farmakogenetická interakce. Barevná škála znázorňuje kvalitativní efekt rosiglitazonu na daný parametr ve smyslu významného zvýšení (žlutá-červená) nebo snížení (odstíny modré) při konkrétní kombinaci genetického pozadí (kmene) a diety (SACH, vysokosacharózová dieta; TUK, vysokotuková dieta).

zřejmě z obr. 2, účinek rosiglitazonu závisí do určité míry nejen na genotypu, na který působí, ale i na dietě, která je současně podávána. Setkávají se tedy nutrigenetické a farmakogenetické vztahy, kdy jen v případě některých kombinací terapie rosiglitazonem, genetické výbavy jedince a dietním režimu dochází buďto k příznivému, nebo nežádoucímu efektu léčby. Tento vztah jsme pojmenovali pojmem **farmakogenetická interakce modulovaná dietou** a identifikovali jsme i řadu kandidátních transkriptů, které jsou jejím pravděpodobným genetickým substrátem (Šeda *et al.*, 2008a).

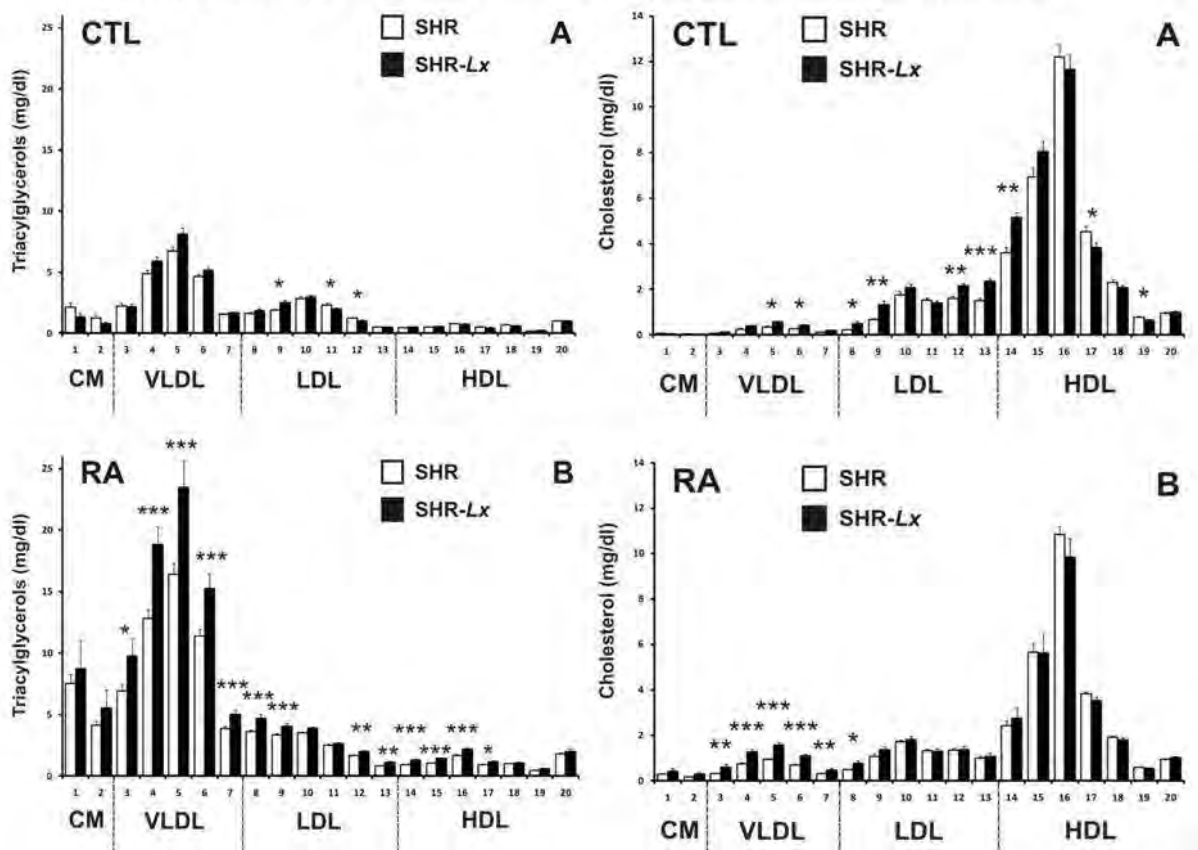
PŘÍKLAD 2. FARMAKOGENETICKÝ NEXUS MEZI METABOLICKÝM SYNDROMEM A SYNDROMEM POLYDAKTYLIE-LUXACE

U člověka je známo několik syndromů, kde se polydaktylie a další morfogenetické poruchy vyskytují současně se složkami metabolického syndromu (Bardet Biedlův syndrom, Smith-Lemli-Opitzův syndrom a další). Ukazuje se, že variace genů, zodpovědných za zmíněná, relativně vzácná onemocnění, mohou mít význam v běžných formách obezity i dalších složek metabolického syndromu (Benzinou *et al.*, 2006). Je tedy možné, že existují společné faktory (ať už se jedná o geny, regulační oblasti, CNV - varianty v počtu kopií, celé metabolické či signální dráhy), které tvoří nexus mezi morfogenezí a metabolickým syndromem. Tuto hypotézu podporují i pozorování, že řada přirozených látek významných z hlediska metabolických dysregulací má i funkci morfogenů, jako např. cholesterol (Gofflot *et al.*, 2003). Kyselina retinová je účinným morfogenem a teratogenem, podávání retinoidů u geneticky disponovaných jedinců pak vede k řadě nežádoucích účinků včetně manifestace prakticky kompletního metabolického syndromu (Rodondi *et al.*, 2002).

U výše zmíněného polydaktylního kmene potkana PD/Cub dochází k souběhu metabolického syndromu se syndromem polydaktylie-luxace. Primárním fenotypovým projevem syndromu polydaktylie-luxace je preaxiální polydaktylie zadních končetin a v závislosti na genetickém pozadí malformace kostí stylopodia, zeugopodia a autopodia. Z dosavadních analýz vyplývá, že predispozice pro syndrom polydaktylie-luxace a metabolický syndrom souvisí s chromosomem 8 potkana. Kandidátním genem syndromu polydaktylie-luxace je gen *Plzf*. Protein Plzf vykazuje strukturu zinkového prstu a patří k transkripčním represorům. Funguje jako negativní regulátor receptoru kyseliny retinové. Naším cílem bylo prověření hypotézy farmakogenetického nexu genu *Plzf* s některými složkami metabolického syndromu. Dospělým samcům kmene spontánně hypertenzního potkana SHR a kongenního kmene SHR.PD-(D8Rat42-D8Arb23)/Cub (SHR-Lx PD5), který nese 1,4 Mb úseku chromosomu 8 dárcevo kmene PD/Cub, byla aplikována kyselina retinová v dávce 15 mg/kg/den po dobu 16 dní. Opakovaně jsme porovnávali metabolický a morfometrický profil za podmínek standardní a vysokosacharózy diety. Zaznamenali jsme významné rozdíly v působení kyseliny retinové mezi kmeny SHR a SHR-Lx PD5. U kmene SHR-Lx PD5 došlo k výraznějšímu zhoršení tolerance glukózy než u kmene SHR. Geneticky podložený rozdíl je zřejmý i na postupném vývoji inzulinémie, kdy spontánně

hypertenzní potkan (SHR) vykazuje konzistentně vyšší inzulinémií na standardní i sacharóze dietě, nicméně tento efekt se ruší díky farmakogenetické interakci RA s diferenciatním segmentem u kmene SHR-Lx PD5. Kmenově specifické účinky jsme pozorovali také ve formě zvýšené citlivosti kmene SHR-Lx PD5 na modifikaci lipidového spektra kyselinou retinovou, především u triacylglycerolů a rovněž v koncentracích cholesterolu a tryacylglycerolů v játrech (obr. 3). Interakce kyseliny retinové s diferenciatním segmentem chromosomu 8 PD/Cub ovlivňuje kromě morfogenetických procesů některé složky metabolického syndromu. Naše výsledky tedy podporují hypotézu propojení metabolických a morfogenetických procesů, což je mj. předpokládáno u několika lidských syndromů, např. Bardet-Biedlova syndromu.

Triglyceridy a cholesterol v 20 lipoproteinových frakcích



Obr. 3: Obsah tryacylglycerolů a cholesterolu ve 20 lipoproteinových frakcích u kmenů SHR (světle) a SHR-Lx PD5 (tmavě) u skupin kontrolních (CTL) a experimentálních, tedy po podání kyseliny all-trans retinové (RA).

PŘÍKLAD 3. POHLAVNĚ SPECIFICKÁ GENETICKÁ DETERMINACE SLOŽEK METABOLICKÉHO SYNDROMU

Jedna z lidských populací využívaných k analýze genetiky komplexních metabolických znaků je z oblasti Saguenay-Lac-St-Jean (SLSJ) v kanadském Quebecu (Hamet *et al.*, 2005). Jedná se o relativní geografický a genetický izolát s výjimečně detailní genealogickou anotací sahající až k původním francouzským imigrantům ze začátku 17. století. V této populaci jsme vybrali 120 rozsáhlých rodin na základě přítomnosti alespoň dvou sourozenců s časnou hypertenzí a dyslipidemií (vysoký celkový cholesterol, případně nízký HDL cholesterol). Celkem je v našem souboru zahrnuto 893 lidí (479 a 414 mužů), kteří dohromady tvoří 1616 sourozeneckých párů. Systematicky jsme analyzovali genetické determinanty hypertenze a dalších aspektů metabolického syndromu v celém souboru 120 rodin. Více než 800 subjektů prodělalo intenzivní fenotypizační protokol, který zahrnoval na 275 metabolických, antropometrických a hemodynamických parametrů. Následně byla celá populace genotypována sadou mikrosatelitních markerů s průměrnou hustotou nižší než 1 marker na 10 cM. Pomocí programu SOLAR jsme provedli vazebnou analýzu, která odhalila 46 lokusů, u nichž byla překročena celogenomová hladina významnosti. Tu jsme určili pomocí permutační analýzy (100.000 permutací). Nejvýznamnější shluky (clusters) QTL jsme našli na chromozómech 1 a 3. Tyto oblasti genomu byly následně podrobeny detailní analýze denzity LOD skóre a pomocí nové metody „Layered founders“ bylo možné do značné míry rozlišit předky – zakladatele pro skupiny rodin odlišně přispívajících ke konkrétnímu LOD skóre. Tento způsob by mohl přispět k rychlejší identifikaci geneticky distinktních „subsyndromů“ hypertenze a metabolického syndromu (Hamet *et al.*, 2005).

Při kombinované vazebné a asociační analýze složek metabolického syndromu jsme podrobili 539 antropometrických, biochemických a hemodynamických znaků pohlavně-specifické celogenomové analýze s použitím genetické informace více než 58000 jednonukleotidových polymorfismů (SNP) (Šeda *et al.*, 2008b). Identifikovali jsme tak 20 SNP a haplotypů, které představují **dosud nejrozsáhlejší soubor pohlavně specifických genetických determinant složek metabolického syndromu**. Je třeba zdůraznit, že tyto genetické varianty by nebylo možné identifikovat za použití tradiční metody „adjustace“ vazebné a asociační analýzy na pohlaví.

Závěrem lze konstatovat, že komplexní metabolické znaky vyžadují komplexní, integrativní analytické přístupy genetické analýzy. Geneticky definované modely a kvalitně fenotypově a genotypově dokumentované lidské soubory jsou již v současnosti zásadními nástroji pro rekonstrukci částí genetické architektury multifaktoriálních znaků a velmi pravděpodobně si tuto pozici udrží i v budoucnu při rozvoji komparativní genomiky, farmakogenetiky, nutrigenetiky a snad i prediktivní genetiky.

Literatura

- Aitman, T.J., Glazier, A.M., Wallace, C.A., Cooper, L.D., Norsworthy, P.J., Wahid, F.N., Al-Majali, K.M., Trembling, P.M., Mann, C.J., Shoulders, C.C., et al. (1999) Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 21: 76-83.
- Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., Smith, S.C. (2009) Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation* 120: 1640-1645.
- Benzinou, M., Walley, A., Lobbens, S., Charles, M.A., Jouret, B., Fumeron, F., Balkau, B., Meyre, D., Froguel, P. (2006) Bardet-Biedl syndrome gene variants are associated with both childhood and adult common obesity in French Caucasians. *Diabetes* 55: 2876-2882.
- Gofflot, F., Hars, C., Illien, F., Chevy, F., Wolf, C., Picard, J.J., Roux, C. (2003) Molecular mechanisms underlying limb anomalies associated with cholesterol deficiency during gestation: implications of Hedgehog signaling. *Hum Mol Genet* 12:1187-1198.
- Hamet, P., Merlo, E., Seda, O., Broeckel, U., Tremblay, J., Kaldunski, M., Gaudet, D., Bouchard, G., Deslauriers, B., Gagnon, F., et al. (2005) Quantitative founder-effect analysis of French Canadian families identifies specific loci contributing to metabolic phenotypes of hypertension. *Am J Hum Genet* 76: 815-832.
- Křen, V. (1975) Genetics of the polydactyly-luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ Carol Med Monogr.* 1-103.
- Okamoto, K. and Aoki, K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27: 282-293.
- Pravenec, M. (2010). Use of rat genomics for investigating the metabolic syndrome. *Methods Mol Biol* 597: 415-426.
- Reaven, G.M. (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607.
- Rodondi, N., Darioli, R., Ramelet, A.A., Hohl, D., Lenain, V., Perdrix, J., Wietlisbach, V., Riesen, W.F., Walther, T., Medinger, L., et al. (2002) High risk for hyperlipidemia and the metabolic syndrome after an episode of hypertriglyceridemia during 13-cis retinoic acid therapy for acne: a pharmacogenetic study. *Ann Intern Med* 136: 582-589.
- Svačina, S. (2006) *Metabolický syndrom*.: Triton.
- Šeda, O., Kazdová, L., Křenová, D., Křen, V. (2002) Rosiglitazone improves insulin resistance, lipid profile and promotes adiposity in a genetic model of metabolic syndrome X. *Folia Biol (Praha)* 48: 237-241.
- Šeda, O., Kazdová, L., Křenová, D., Křen, V. (2003) Rosiglitazone fails to improve hypertriglyceridemia and glucose tolerance in CD36-deficient BN.SHR4 congenic rat strain. *Physiol Genomics* 12: 73-78.
- Šeda, O., and Šedová, L. (2004) PPARs: molecular targets in the pharmacogenomics era. *Prague Med Rep* 105: 223-236.

- Šeda, O., Šedová, L., Oliyarnyk, O., Kazdová, L., Křenová, D., Corbeil, G., Hamet, P., Tremblay, J., Křen, V. (2008) Pharmacogenomics of metabolic effects of rosiglitazone. *Pharmacogenomics* 9: 141-155.
- Šeda, O., Tremblay, J., Šedová, L., Hamet, P. (2005) Integrating genomics and transcriptomics with geo-ethnicity and the environment for the resolution of complex cardiovascular diseases. *Curr Opin Mol Ther* 7: 583-587.
- Šeda, O., Tremblay, J., Gaudet, D., Brunelle, P.L., Gurau, A., Merlo, E., Pilote, L., Orlov, S.N., Boulva, F., Petrovich, M., et al. (2008) Systematic, genome-wide, sex-specific linkage of cardiovascular traits in French Canadians. *Hypertension* 51: 1156-1162.
- Šedová, L., Kazdová, L., Šeda, O., Křenová, D., Křen, V. (2000) Rat inbred PD/cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance. *Folia Biol (Praha)* 46: 99-106.
- Šedová, L., Šeda, O., Křenová, D., Křen, V., Kazdová, L. (2004) Isotretinoin and fenofibrate induce adiposity with distinct effect on metabolic profile in a rat model of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 719-725.



Doc. MUDr. Ondřej Šeda, PhD. pracuje jako docent Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.



Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc. při své přednášce na Genetické konferenci GSGM v Lednici 15. 9. 2011.

Mutace p53 – krok na cestě k nádoru

Jana Šmardová

Ústav patologie, Fakultní nemocnice Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno

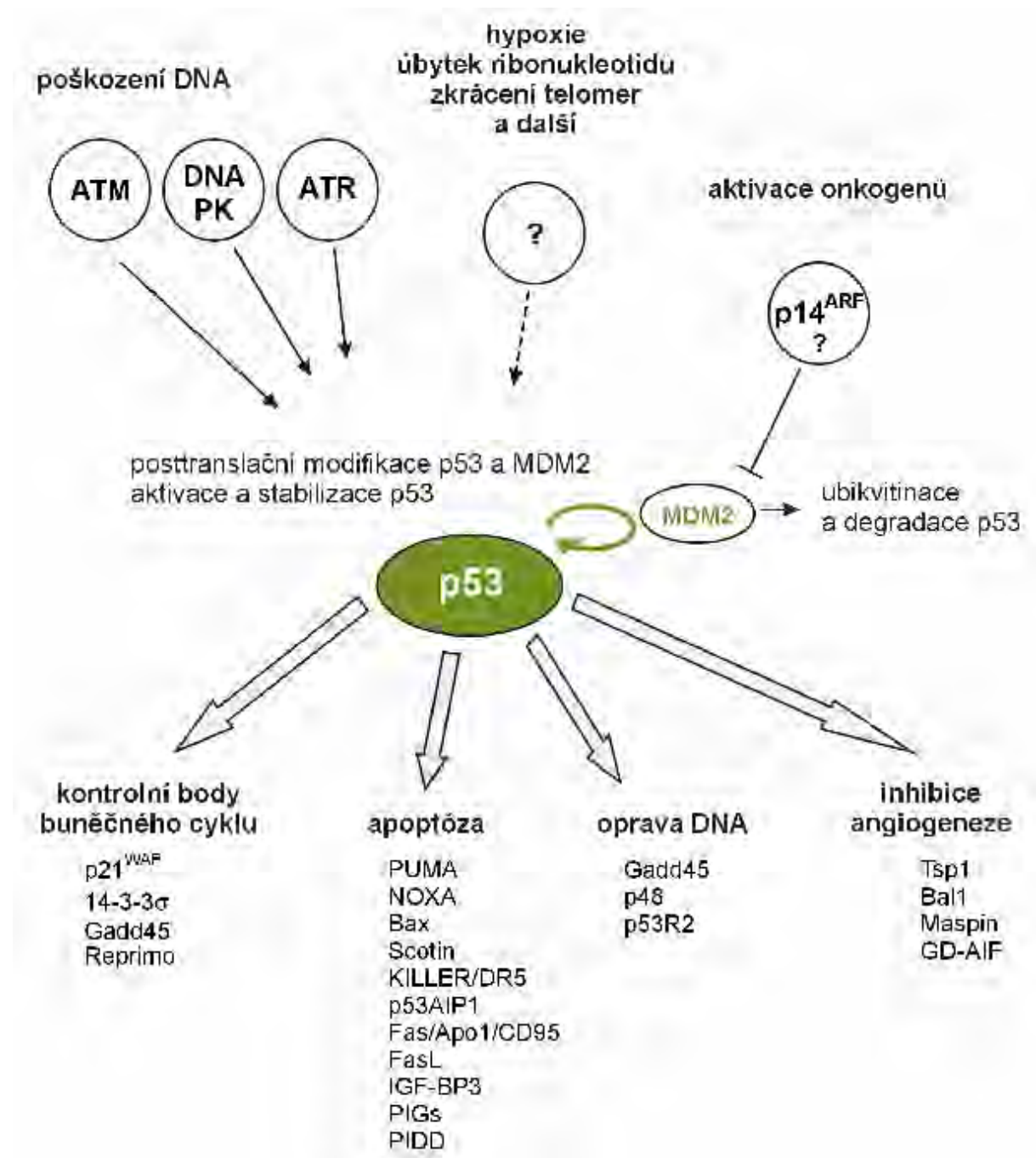
Motto:

Bože, dej mi odvahu změnit věci, které změnit mohu, vyrovnanost, abych se smířil s věcmi, které změnit nemohu, a moudrost, abych je od sebe dokázal rozpoznat.

Úvod

Nádorový supresor p53 patří k „evergreenům“ molekulární onkologie. Byl objeven v roce 1979 (Lane and Crawford 1979, Linzer a Levine, 1979) a v roce 2003 se stal molekulou roku. Ještě před tím, v roce 1996 se začal zvolna stávat také „mou“ molekulou. V roce 1996 jsem na Masarykově onkologickém ústavu v Brně začala do laboratoře zavádět funkční analýzu separovaných alel v kvasinkách (FASAY), metodu k detekci mutací p53 (Ishioaka et al. 1993, Flaman et al. 1995). p53 je transkripční faktor (právě FASAY je založena na měření transaktivačních schopností p53), který prostřednictvím svých cílových genů zprostředkovává adekvátní reakci buňky na nejrůznější typy stresu. Při poškození DNA, hladovění, nedostatku kyslíku, kritickém zkrácení telomer či vlivem nefyziologicky vysoké exprese některých onkogenů je p53 v buňce stabilizován a aktivuje transkripci svých cílových genů. Může způsobit zastavení buněčného cyklu, indukovat mechanismy opravující DNA, vyvolat senescenci nebo apoptózu. Podílí se na udržování

genetické stability a na represi angiogeneze (obr. 1). Molekula p53 mi tak dokořán otevřela dveře do celé široké oblasti biologie nádorů.

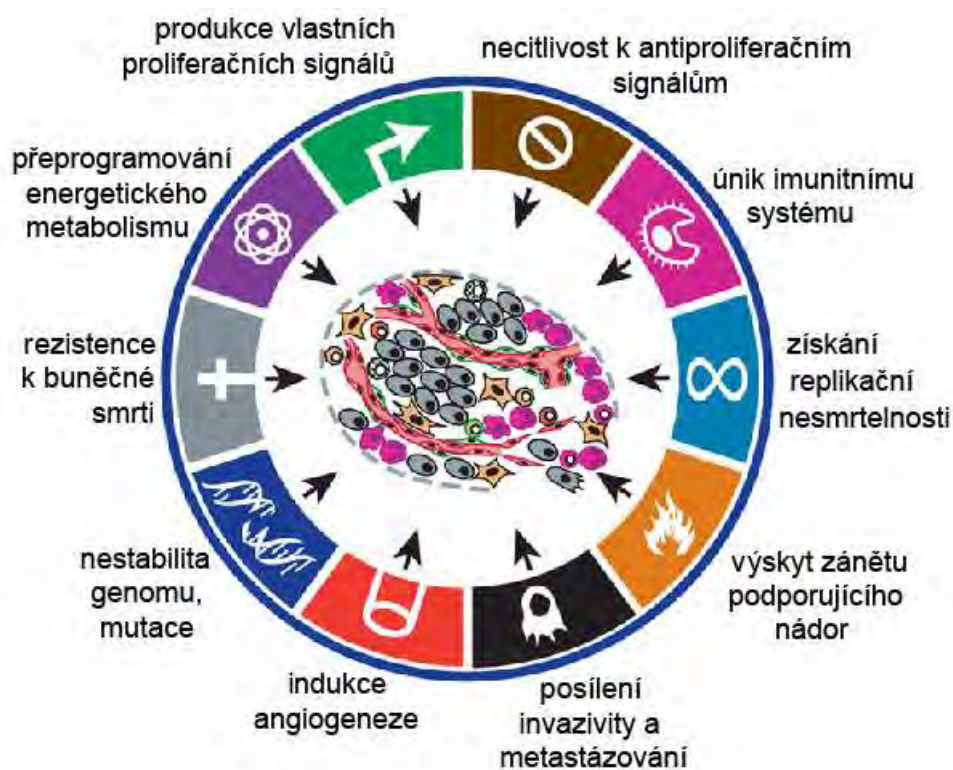


Obr. 1: Funkce proteinu p53. Buněčný stres indukuje signály, které posttranslačně modifikují protein p53 a jeho negativní regulátor MDM2. Stabilizovaný a aktivovaný protein p53 potom aktivuje transkripci svých cílových genů, které regulují buněčný cyklus, apoptózu, opravy DNA a angiogenezi (upraveno dle Vogelstein et al. 2000).

p53 „v běhu dějin“

Již ze stručného nástinu funkce p53 je totiž zřejmé, že p53 je skutečně klíčovým nádorovým supresorem, který chrání buňku před neoplastickou transformací velmi komplexně. Zasahuje do několika buněčných funkcí, jejichž deregulace je pro nádory typická. Obecné, univerzální znaky nádoru shrnuli ve své legendární práci z roku 2000 „The Hallmarks of Cancer“ Hanahan a Weinberg (Hanahan a Weinberg 2000). Napsali, že nádory jsou (1) soběstačné v produkci proliferačních signálů, (2) necitlivé k signálům, které proliferaci brzdí. Jsou (3) odolné k buněčné smrti, získávají (4) schopnost neomezeně se replikovat, (5) indukovat angiogenezi a (6) metastazovat. S postupnou akumulací těchto znaků pak souvisí (7) zvýšená genetická nestabilita a rychlost, kterou se v nádorových buňkách akumulují mutace. Srovnáním výčtu těchto znaků a nástinu funkce p53 snadno ověříme, že se p53 se svými aktivitami pohybuje napříč signálními drahami a buněčnými mechanismy, které se zajišťováním skutečně všech uvedených funkcí souvisejí.

Na počátku letošního roku publikovali Hanahan a Weinberg rozsáhlý přehled „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“ (Hanahan a Weinberg 2011), ve kterém revidují svou představu o nádorech po více než deseti letech intenzivního celosvětového výzkumu. Především kriticky zvažují a posléze potvrzují platnost všech dříve navržených znaků nádorů. Spektrum typických znaků nádorů ale výrazně doplňují o další znaky (obr. 2). Těmi jsou (8) přítomnost zánětu, (9) přeprogramování energetického metabolismu a (10)



Obr. 2: Typické vlastnosti nádorů (upraveno dle Hanahan a Weinberg 2011).

schopnost vyhnout se destrukci imunitním systémem. Je naprosto fascinující podívat se na funkci p53 optikou tohoto rozšířeného konceptu kancerogeneze a zjistit, že p53 spolehlivě „drží krok“ a významně se podílí i na regulaci nově pojmenovaných nádorových znaků.

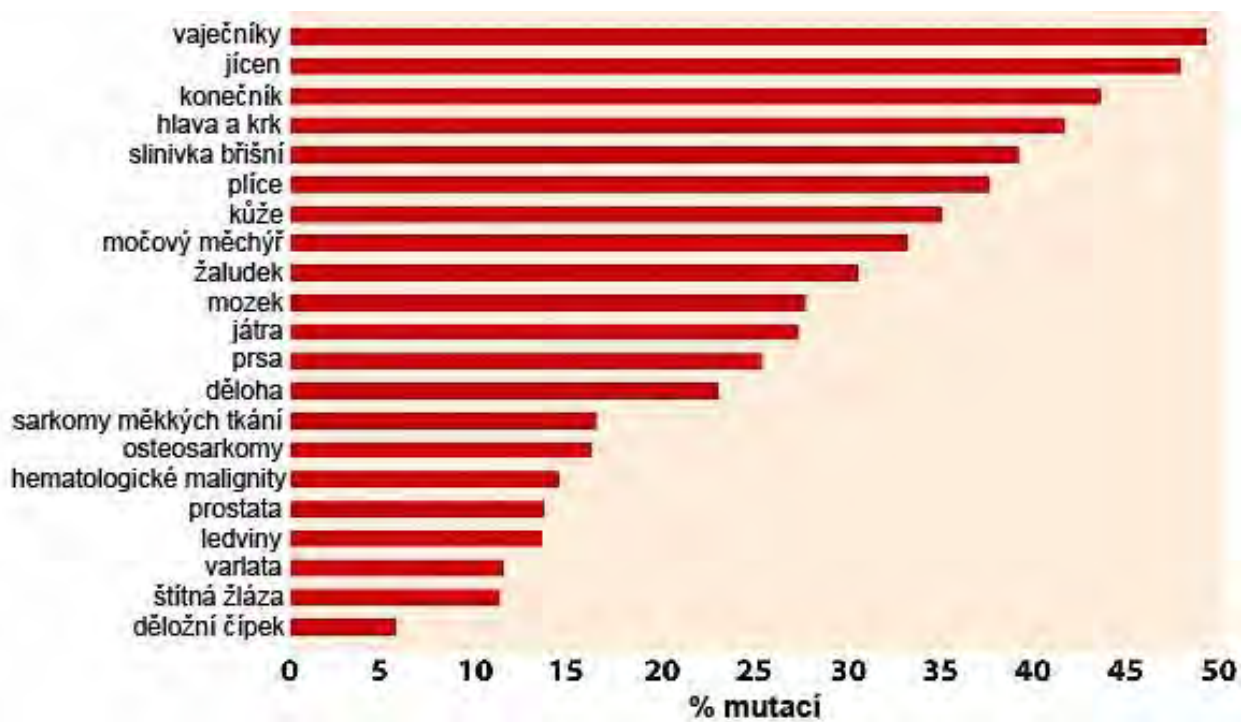
Téměř všechny nádory obsahují buňky imunitního systému, které se podílejí na zánětlivé reakci. Zánět pravděpodobně stimuluje vývoj nádoru tím, že mikroprostředí nádoru obohacuje o řadu bioaktivních molekul včetně mitogenních signálů, proangiogenních faktorů, faktorů přežití, faktorů, které stimulují přestavbu extracelulární matrix, invazi a metastázování a také navyšují genetickou nestabilitu. Klíčovou molekulou, která souvisí s nastolením chronického zánětu je transkripční faktor NF- κ B, který je často u nádorů konstitutivně aktivován (Ben-Neriah a Karin, 2011). Vzájemný funkční vztah NF- κ B a p53 je komplikovaný. Jejich funkční dopad je velmi odlišný a zjednodušeně lze napsat, že je téměř opačný. Funkční p53 suprimuje funkci NF- κ B a udržuje rozvoj zánětu pod kontrolou (Gudkov *et al.* 2011).

Většina buněk v aerobních podmínkách metabolizuje glukózu glykolýzou na pyruvát a následně na oxid uhličitý oxidativní fosforylací v mitochondriích. V anaerobních podmínkách probíhá přednostně glykolýza. Nádorové buňky i v aerobních podmínkách přeprogramují svůj metabolismus a upřednostňují glykolýzu, stav, který se označuje jako „aerobní glykolýza“ nebo Warburgův efekt. Aerobní glykolýza je 18x méně efektivní způsob získávání energie než oxidativní fosforylace. To je kompenzováno zvýšenou expresí transportérů glukózy a importem glukózy do buněk. Zvýšená glykolýza poskytuje prekurzory pro syntézu biomakromolekul nutných k výstavbě rychle proliferujících buněk (Tennant *et al.* 2009). Opět trochu zjednodušeně lze označit p53 za antagonistu Warburgova efektu. p53 inhibuje glykolýzu, snižuje import glukózy do buňky a stimuluje mitochondriální respiraci (Vousden a Ryan 2009).

Mutace p53

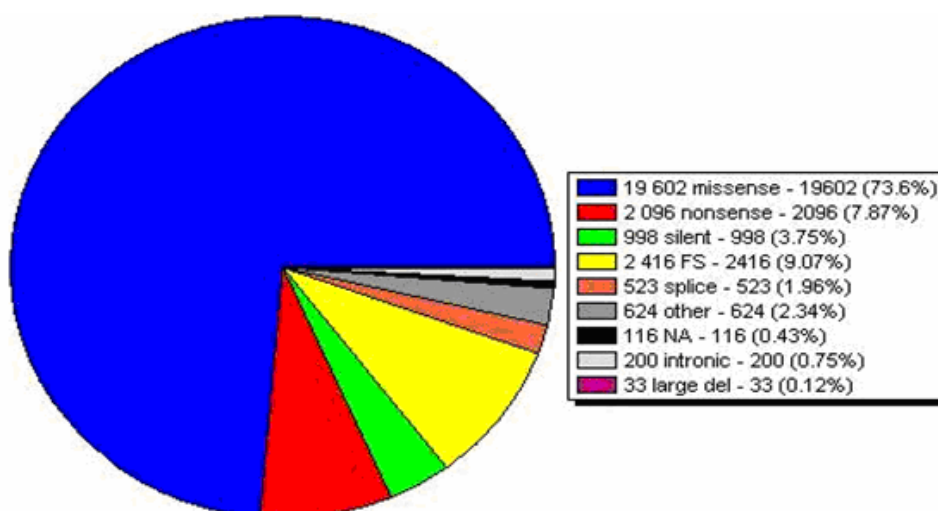
O významu nádorového supresoru p53 v ochraně buňky před onkogenní transformací svědčí několik okolností. Především vysoká frekvence, s jakou se u lidských nádorů somatické mutace p53 vyskytují. Lze je detekovat asi u 40% všech nádorů a vyskytují se téměř u všech typů nádorů (obr. 3). Mutace p53 se mohou vyskytovat také v zárodečné linii a pak jsou spojeny s Li-Fraumeniho syndromem, velice závažným, poměrně vzácným autozomálně dominantním nádorovým syndromem predisponujícím k vývoji nádorů v mladém věku, především nádorů prsu, sarkomů, adrenokortikálních karcinomů, leukemií a nádorů mozku. Poslední verze databáze mutací p53 [verze R15 z listopadu 2010; <http://www-p53.iarc.fr>; Petitjean *et al.* 2007, Olivier *et al.* 2010] zahrnuje 27 580 somatických a 597 vrozených mutací p53.

Na rozdíl od většiny nádorových supresorů, které jsou obvykle inaktivovány rozsáhlými delecemi nebo ztrátou celého genu, u p53 převažují bodové mutace zaměřující v mutovaném proteinu p53 jednu aminokyselinu za



Obr. 3: Frekvence mutací p53 u různých typů nádorů (upraveno dle Weinberg, 2007).

jinou. Představují asi 75% všech detekovaných mutací (obr. 4). Mutace p53 se nacházejí ve všech exonech genu p53, ale jejich distribuce není pravidelná. Nejčastěji se vyskytují v centrální DNA vazebné doméně. Gen p53 má celkem 393 kodonů. Mezi kodony 125 a 300, které odpovídají DNA vazebné doméně, je detekováno 86% všech mutací, z nichž 88% jsou záměny jednoho nukleotidu. Mutace se nacházejí také v oligomerizační doméně a okrajových částech genu. Ty jsou méně časté a podíl bodových záměn je v těchto oblastech pouze 40% (Olivier et al. 2010).



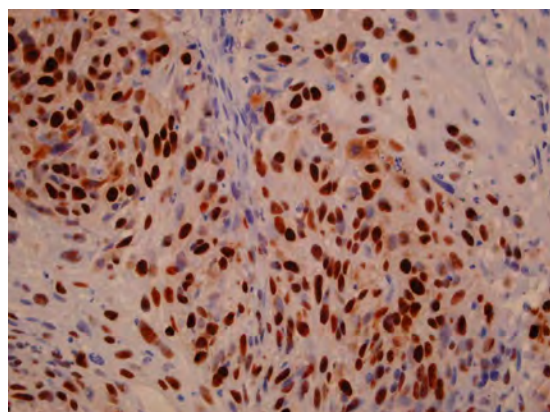
Obr. 4: Podíl různých typů somatických mutací p53 (dle databáze <http://www-p53.iarc.fr>, verze R15 z listopadu 2010; Petitjean et al. 2007).

Mutační spektra

U některých typů nádorů nesou mutační spektra p53 znaky typické pro poškození indukované specifickými mutageny (Olivier *et al.* 2010). Tak byl formulován koncept o mutagenech, které v molekule p53 zanechávají „otisky prstů“. Ke klasickým a nejlépe dokumentovaným příkladům asociace etiologického činidla a mutačního otisku prstů u některého typu nádoru patří expozice aflatoxinu B a mutace v pozici 249 (AGG-AGT) u jaterních karcinomů (Hussain *et al.* 2007). Dále je to spojení mezi expozicí UV záření a přítomností tandemových transicí CC-TT u nemelanomových nádorů kůže (Giglia-Mari a Sarasin, 2003) a kouřením tabáku a transversí G-T ve specifických pozicích genu p53 (především 157) u karcinomů plic (Pfeifer a Hainaut, 2003). Nejnověji popsaným příkladem je spojení mezi expozicí plodinám kontaminovaných semeny *Aristolochia sp* a transversemi A-T, které se vyskytují v genu p53 v uroteliálních nádorech, které se vyvíjejí v rámci Balkánské endemické nefropatie (Arlt *et al.* 2007).

Zpětnovazebná klička p53-MDM2

Jedním z cílových genů p53 je gen *mdm2*, jehož translační produkt, protein MDM2, funguje jako ubikvitin ligáza. MDM2 ubikvitinuje p53 a indukuje jeho degradaci (obr. 1). MDM2 a p53 tak tvoří zpětnovazebnou kličku. Komplex p53-MDM2 je odpovědný za udržování adekvátní hladiny p53 v buňce. V případě stresu jsou p53 i MDM2 posttranslačně modifikovány a degradace p53 je tak dočasně zastavena. Mutovaný protein p53, který nemůže aktivovat transkripci genu *mdm2*, je často v buňce výrazně akumulován a lze jej imunohistochemicky detekovat (obr. 5). K této akumulaci dochází i bez souvislosti s buněčným stresem, i když stres může stabilizaci a akumulaci proteinu p53 dále posílit. Pro úplnost je třeba dodat, že stabilitu a také funkci proteinu p53 ovlivňuje i řada dalších faktorů, včetně např. Pirh2, Cop-1, MDMX, MDM4 a dalších (Lavin a Gueven, 2006, Goh *et al.* 2011).

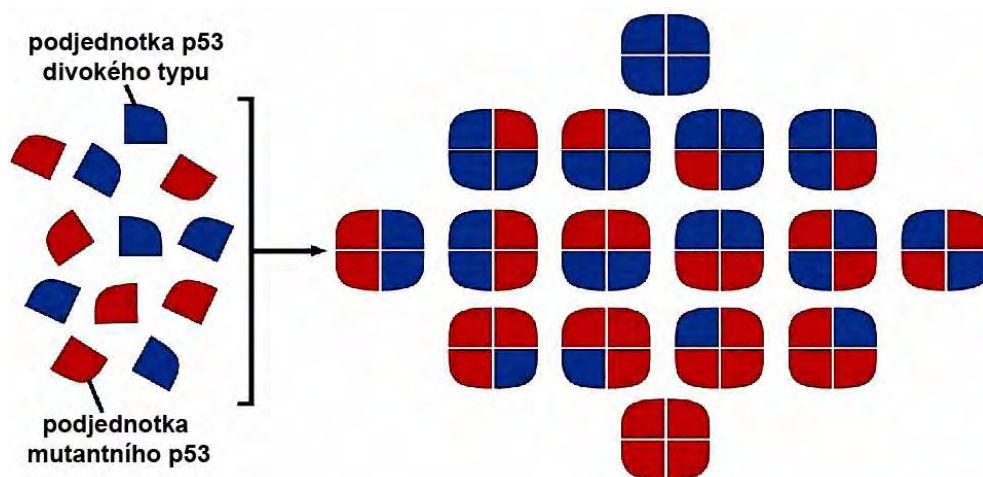


Obr. 5: Akumulace proteinu p53 v jádrech nádorových buněk. Imunohistochemická detekce proteinu p53 na řezu nádorové tkáně pomocí monoklonální protilátky DO-1.

Dominantně negativní mutace p53 a ztráta heterozygotnosti

Mutovaná alela genu p53 může ovlivnit funkci standardní alely dominantně negativním efektem. To souvisí s tím, že p53 funguje jako tetramer (dimer dimerů). Heterooligomery p53 tvořené standardními a mutovanými pro-

teiny nejsou schopny se vázat na DNA a aktivovat transkripci. Je-li jedna alela p53 mutovaná tak, že vzniká protein schopný oligomerizace, ale neschopný vazby na DNA, tvoří se nahodile tetramery složené z funkčních a nefunkčních podjednotek. Z nich 15/16 obsahuje alespoň jednu nefunkční podjednotku, pouze 1/16 je plně funkční (obr. 6). Ovšem navození dominantně negativního fenotypu je u p53 mnohem komplexnější. Závisí na celkové hladině mutovaného a standardního proteinu p53 (při nízkých hladinách proteinu p53 se spíše uplatňuje mechanismus haploinsuficience, při vysokých hladinách mechanismus dominantní negativity) a také na typu mutace p53. Např. varianty s delecí N-koncové oblasti jsou extrémně účinné v inhibici standardního proteinu p53 (Chan *et al.* 2004, Olivier *et al.* 2010, Goh *et al.* 2011). I přes dominantně negativní charakter mnoha mutací p53 je heterozygotní stav genu p53 často jen přechodný a během progresu nádoru je mutace jedné alely následována ztrátou heterozygotnosti, kdy druhá alela p53 je buď ztracena delecí, nebo mutována (Rivlin *et al.* 2011).



Obr. 6: Sestavování tetrametrů p53 v heterozygotní buňce p53mut/p53wt. Je-li mutovaná varianta p53 schopná oligomerizace, tvoří se nahodile tetramery složené z funkčních a nefunkčních podjednotek. Pouze 1/16 vzniklých tetramerů je plně funkčních (podle Weinberg 2007).

Funkční varianty mutací p53

Funkční dopad mutací p53 je velmi komplexní. Většina mutací vede k úplné ztrátě transkripčních schopností proteinu p53, ale podle funkčních studií až 30% mutantů p53 si ponechává nějakou míru schopnosti aktivovat transkripci alespoň některých svých cílových genů alespoň za určitých podmínek (Kato *et al.* 2003, Menendez *et al.* 2006). Takové změny ve spektru aktivovaných cílových genů mohou změnit biologické důsledky fungování p53 a mohou potenciálně ovlivnit prognostický či prediktivní dopad takových mutací p53. To bylo potvrzeno například pro specifickou skupinu mutací p53 vyskytujících se u nádorů prsu, které se vyvíjely v souvislosti s mutacemi

BRCA1 (Resnick a Inga, 2003), nebo u některých mutací p53 v zárodečné linii vedoucích k vývoji Li-Fraumeniho syndromu (Monti *et al.* 2007).

Strukturní typy mutací p53

Mutanti p53 se někdy rozdělují na kontaktní a konformační. U DNA-kontaktních mutantů zůstává zachována celková architektura proteinu p53, ale změněna je některá z aminokyselin, které při vytváření specifické vazby do p53 responzivního elementu bezprostředně vstupují do kontaktu s DNA. Konformační mutace sice míjejí tyto kritické „kontaktní“ aminokyseliny, ale navozují ve výsledném proteinu p53 takové změny jeho celkové konformace, které narušují jeho schopnost specifické vazby na DNA (Joerger a Fersht 2007).

Mutovaná p53: zisk funkce (GOF)

Jak bylo uvedeno výše, nejčastější typ mutací p53 vede k akumulaci vysokých hladin proteinu p53, který se od standardního proteinu liší jediným aminokyselinovým zbytkem. Již dlouho je známo, že takový mutovaný a akumulovaný protein p53, získává vedle ztráty své nádorově supresivní funkce (LOF) také nové – onkogenní - aktivity, které přispívají k další progresi nádorů a také zvyšují jejich rezistenci k terapii. Pokud jde o zvažování mechanismu takto nově získané funkce, nejčastěji se bere v úvahu okolnost, že většina mutovaných variant p53 si zachovává funkční transaktivační doménu a dále schopnost tvořit meziproteinové interakce. Nejčastěji se v souvislosti s GOF p53mut diskutuje vytváření přímé interakce s proteiny p63 a p73 a dalšími proteiny, a také funkční interakce s drahami NF- κ B, TGF- β a dalšími signálními drahami (Oren a Rotter 2010, Goldstein *et al.* 2011).

Klinický význam mutací p53

Nádorový supresor p53 je jedním z nejčastěji mutovaných genů u lidských nádorů. Mutace p53 jsou častější u pokročilých stadií nádorů a u agresivních nádorů. Přesto byl prognostický a/nebo prediktivní význam mutací p53 spolehlivě prokázán jen u omezeného počtu diagnóz. K nim patří karcinomy prsu, karcinomy hlavy a krku, karcinomy jater a některé lymfomy a leukemie. Zdá se, že jednou z překážek širšího praktického využití p53 je mimo jiné komplexita a komplikovanost jeho funkce a funkčních souvislostí, ale také komplexita jeho mutací. Prognostický a prediktivní dopad mutací p53 záleží nejenom na typu nádoru, v němž se mutace objevuje, případně na fázi vývoje nádoru, ale významně také na konkrétním typu a umístění mutace v rámci genu p53 (Soussi 2007, Olivier *et al.* 2010).

Prognostický význam mutací p53 u CLL

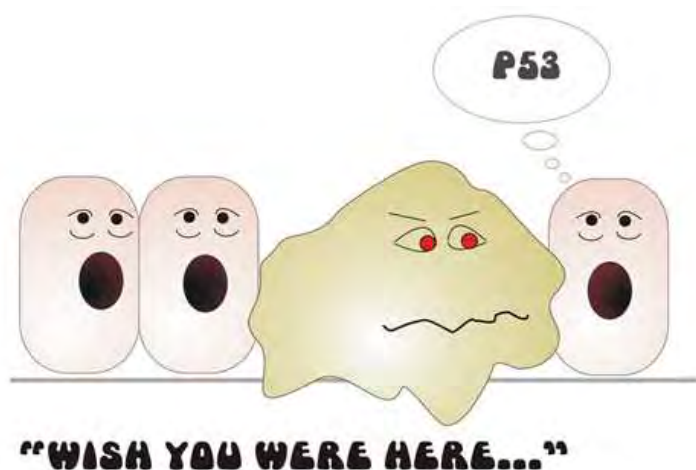
Jednou z nemocí, kde mají mutace p53 prokazatelně významnou prognostickou hodnotu, je chronická lymfocytická leukemie (CLL). CLL je indolentní lymfoproliferativní onemocnění, jehož podstatou je proliferace a akumulace klonálních, maligně transformovaných vyzrálých B-lymfocytů. Medián přežití je u CLL asi 8 až 10 let, ale mezi pacienty existuje vysoká

variabilita a u menší skupiny pacientů má CLL velmi dramatický, agresivní průběh. K nejzávažnějším prognostickým markerům u CLL patří mutační status variabilní oblasti těžkého imunoglobulinového řetězce IgVH a status genu p53. Také my jsme opakovaně ukázali, že přítomnost mutace p53 je spojena s výrazně kratším celkovým přežitím pacientů s CLL (Malčíková *et al.* 2009). Zjistili jsme, že mutace, které vedly k záměně jediné aminokyseliny v DNA-kontaktní pozici DNA-vazebné domény jsou spojeny s výrazně horším přežitím než mutace měnící konformaci proteinu p53 a nesmyslné mutace, krátké dalece a inserce (Trbušek *et al.* 2011).

Závěr

p53 je klíčový nádorový supresor. V mnoha směrech chrání buňku před onkogenní transformací. Samotná ztráta funkce p53 znamená obrovský posun buňky k nádorovému fenotypu, navíc velký podíl mutovaných variant proteinu p53 získává v důsledku mutace další, onkogenní vlastnosti, které buňku ještě dále k získání plně maligního fenotypu přibližují. Mutace p53 tedy nepochybně představují zásadní krok na cestě k nádoru.

V úvodu tohoto příspěvku je uvedeno motto, modlitba, která bývá připisována mnoha autorům a kterou mnoho autorů použilo, parafrázovalo, zpracovalo: „Bože, dej mi odvahu změnit věci, které změnit mohu, vyrovnanost, abych se smířil s věcmi, které změnit nemohu, a moudrost, abych je od sebe dokázal rozpoznat.“ O p53 se říká, že zprostředkovává adekvátní reakci buňky na nejrůznější typy stresu. Pomáhá buňce se rozhodnout, kdy zastavit či zpomalit a opravit, co opravit lze, a kdy přijmout fakt, že vše opravit nelze a přiměřeně na to reagovat. Představuje tedy jakousi buněčnou „moudrost“ (a odpovědnost), schopnost správně se rozhodovat. Je tedy proč si přát, aby buňce zůstala funkce p53 (a nám moudrost) zachována (obr. 7)!



Obr. 7: Poselství přednášky o p53. (Lucie Bino, Filip Trčka a další absolventi magisterského studia MBG Přírodovědecké fakulty MU Brno, 2010).

Poděkování

Tato práce bylo podpořena grantem IGA MZ NS/10448-3/2009.

Literatura

- Arlt V.M., Stiborova M., vom Brocke J., Simoes M.L., Lord G.M., Nortier J.L., Hollstein M., Philips D.M., Schneider H.H. (2007) Aristolochic acid mutagenesis: Molecular clues to the etiology of Balkan endemic nephropathy - associated urothelial cancer. *Carcinogenesis* 28: 2253-2261.
- Ben-Neriah Y., Karin M. (2011) Inflammation meets cancer, with NF- κ B as a matchmaker. *Nat. Immunol.* 12: 715-723.
- Chan W.M., Siu W.Y., Lau A., Poon Y.C. (2004) How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol. Cell. Biol.* 24: 3536-3551.
- Flaman J.M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Chappuis P., Sapino A.P., Limacher J.M., Bron L., Benhattar J., Tada M., Van Meier E.G., Estreicher A., Iggo R.D. (1995) A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3963-3967.
- Giglia-Mari G., Sarasin A. (2003) TP53 mutations in human skin cancers. *Hum.Mutat.* 21: 217-228.
- Goh A.M., Coffill C.R., Lane D.P. (2011) The role of mutant p53 in human cancer. *J.Pathol.* 223: 116-126.
- Goldstein I., Marcel V., Olivier M., Oren M., Rotter V., Hainaut P. (2011) Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Therapy* 18: 2-11.
- Gudkov A.V., Gurova K.V., Komarova E.A. (2011) Inflammation and p53: A tale of two Stresses. *Genes Cancer* 2: 503-516.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: The new generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hussain S.P., Schwank J., Staib F., Wang X.W., Harris C.C. (2007) TP53 mutations and hepatocellular carcinoma. Insights into etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 26: 8612-8625.
- Ishioka C., Frebourg T., Yan Y.X., Vidal M., Friend S.H., Schmidt S., Iggo R. (1993) Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nature Genet.* 5: 124-129.
- Joerger A.C., Fersht A.R. (2007) Structure-function-rescue: The diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene* 26: 2226-2242.
- Kato S., Han S.Y., Liu W., Otsuka K., Shibata H., Kanamaru R., Ishioka C. (2003) Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100: 8424-8429.
- Lane D.P., Crawford L.V. (1979) T-antigen is bound to host protein SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.
- Lavin M.F., Gueven N. (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Different.* 13: 941-950.

- Linzer D.I., Levine A.J. (1979) Characterization of a 54Kdalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cell and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
- Menendez D., Inga A., Resnick M.A. (2006) The biological impact of the human master regulator p53 can be altered by mutations that change the spectrum and expression of its target genes. *Mol.Cell Biol.* 26: 2297-2308.
- Malcikova J., Smardova J., Rocnova L., Tichy B., Kuglik P., Vranova V., Cejkova S., Svitakova M., Skuhrova Francova H., Brychtova Y., Doubek M., Brejcha M., Klabusay M., Mayer J., Pospisilova S., Trbusek M. (2009) Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 114: 5307-5314.
- Monti P., Ciribilli Y., Jordan J., Menichini P., Umbach D.M., Resnick M.A., Luzzatto L., Inga A., Fronza G. (2007) Transcriptional functionality of germline p53 mutants influences cancer phenotype. *Clin.Cancer Res.* 13: 3789-3795.
- Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. (2010) TP53 mutations in human cancers: Origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.*;2:a001008
- Oren M., Rotter V. (2010) Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* 2:a001107.
- Petitjean A., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian S.V., Hainaut P., Olivier M. (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 28: 622-6299.
- Pfeifer G.P., Hainaut P. (2003) On the origin of G-T transversions in lung cancer. *Mut. Res.* 256: 39-43.
- Resnick M.A., Inga A. (2003) Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100: 9934-9939.
- Rivlin N., Brosh R., Oren M., Rotter V. (2011) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes Cancer* 2: 466-474.
- Soussi T. (2007) p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 26: 2145-2156.
- Tennant D.A., Duran R.V., Boulahbel H., Gottlieb E. (2009) Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis* 30: 1269-1280.
- Trbušek M., Šmardová J., Malčíková J., Šebejová L., Dobeš P., Svitáková M., Vránová V., Mráz M., Skuhrová Francová H., Doubek M., Brychtová Y., Kuglík P., Pospíšilová S., Mayer J. (2011) Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Oncol.* 29: 2703-2708.
- Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.

Vousden K.H., Ryan K.M. (2009) *Nature Rev.* 9: 691-700.

Weinberg R.A. (2007) *The biology of cancer*. Garland Science, NY, USA.



Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc. (e-mail: janasmarda@seznam.cz) vede Laboratoř molekulární patologie Ústavu patologie Fakultní nemocnice Brno-Bohunice a je členkou Laboratoře buněčné diferenciaci Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Úloha proteinů vázaných na chromatin při DNA reparaci

Lenka Stixová, Gabriela Šustáčková a Eva Bártová

Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.,
Královopolská 135, 612 65 Brno

Abstrakt

Stabilita genomu je zachována jen v případě zachování optimálních buněčných funkcí, ke kterým kromě replikace, transkripce, sestřihu patří i reparace DNA. Genom je neustále vystavován genotoxickým vlivům, což vede obecně k indukci zlomů v DNA a především dvouřetězcové zlomy (DSBs) jsou nebezpečné z hlediska jejich chybných oprav. Výsledkem chybné reparace DNA je vznik mutací a chromosomálních přestaveb. Mechanismy reparace DNA jsme se snažili oslovit i v našich experimentech, řešících funkci epigenetických faktorů v jádrech nádorových buněk.

Úvod

Geny jsou nepřetržitě napadány nejrůznějšími faktory exogenního a endogenního původu a proto k udržení jejich integrity jsou nezbytné účinné a precizní opravné mechanismy. Nejčastější poškození DNA je indukováno z vnějšího prostředí, například UV záření, ale zdroji mohou být také děje probíhající uvnitř buněk, jako je produkce reaktivních kyslíkových radikálů, rekombinace během odpovědi imunitního systému, či zastavení DNA-replikační vidlice (Wyman a Kanaar, 2006). Tyto události mohou vést k poškození bází, ke vzniku jednořetězcových (ssDNA) a dvouřetězcových (DSBs) zlomů. DSBs jsou buňkám obzvláště nebezpečné, protože neúčinná a nesprávná oprava může mít za následek vznik mutací a chromosomálních translokací, které mohou dále přispět ke vzniku nádorového onemocnění (Lobrich a Jeggo, 2007). Proti těmto poškozením genomu se vyvinuly

komplikované buněčné mechanizmy umožňující dohled a opravu poškozené DNA (Misteli a Soutoglou, 2009).

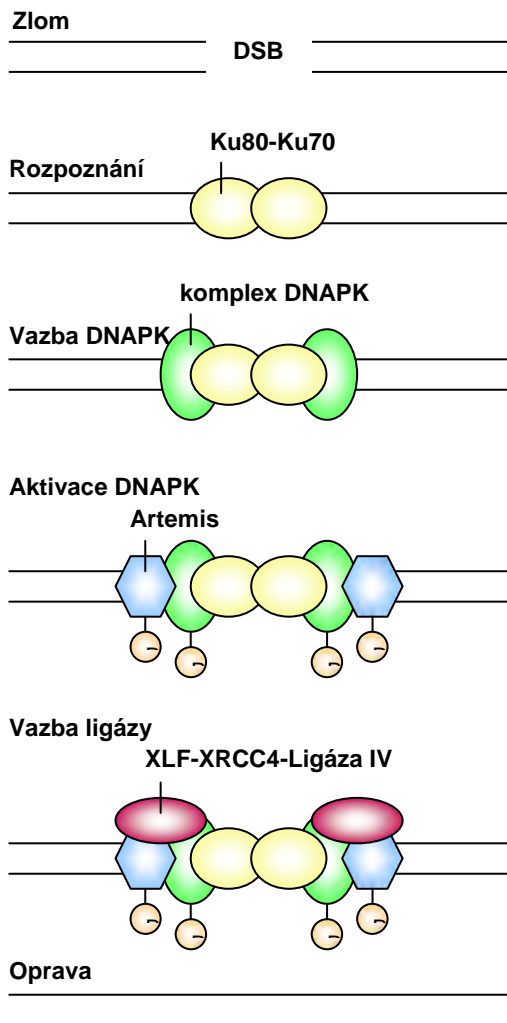


Doc. RNDr. Eva Bártová, CSc. při své přednášce na Genetické konferenci GSGM v Lednici dne 15. 9. 2011.

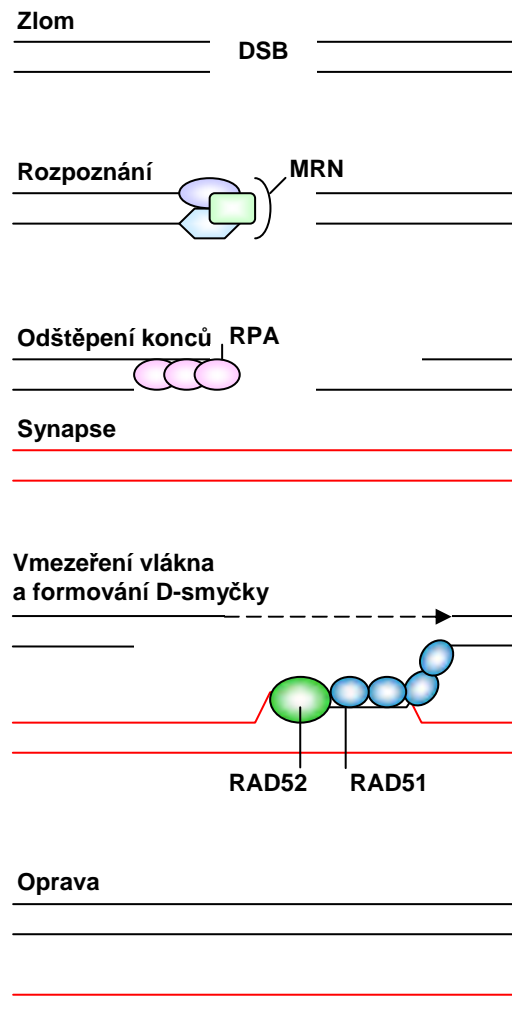
Oprava DSBs je prováděna dvěma hlavními mechanizmy: homologní rekombinací (homologous recombination repair – HRR) a nehomologním spojováním konců (non-homologous end joining – NHEJ) (Obr. 1) (Kanaar *et al.*, 2008; Misteli a Soutoglou, 2009). NHEJ je hlavní způsob opravy zlomů, které nejsou spojené s replikací a vyskytují se převážně v G1 fázi buněčného cyklu. Naopak HRR se vyskytují zejména v průběhu pozdní S fáze a během G2 fáze buněčného cyklu. Zatímco v případě NHEJ, kde se konce DSBs jednoduše spojují, HRR využívá sesterskou chromatidu jako homologní templát k obnově genetické informace (Kanaar *et al.*, 2008). Oprava DSBs zahrnuje více než jen spojení přerušovaných oblastí chromosomů. Vznik DSBs má za následek aktivaci kaskády buněčných odpovědí na komplexní poškození DNA. Tento mechanismus zahrnuje rozpoznání poškozené DNA a následnou amplifikaci a přenos signálu, který vyvolá mnoho buněčných odpovědí – především aktivaci kináz Chk1 a Chk2 (tzv. checkpoint kinases), které zastavují poškozené buňky při průchodu buněčným cyklem, dokud není poškození odstraněno. Pokud je poškození příliš velké, dochází k indukci apoptózy nebo k iniciaci stárnutí (senescence). Dráhy uplatňující se při odpovědi na poškození DNA jsou univerzální a většina proteinů účastnících se těchto procesů jsou v živočišné říši zachovány od kvasinek až ke člověku (Lukas *et al.*, 2004).

Z hlediska rozpoznání DNA lezí se uplatňují nejenom tak zvané *bona fide* reparační proteiny, ale hraje zde úlohu i řada proteinů, které jsou například zodpovědné za formování heterochromatinu. Mezi tyto proteiny patří skupina PcG (Polycomb group), která představuje negativními regulátory genové exprese. Funkce PcG proteinů se uplatňuje během embryonálního vývoje,

Nehomologní spojování konců



Homologní rekombinace



Obr. 1: Dva hlavní typy opravy dvouřetězcových zlomů. **Nehomologní spojování konců (NHEJ).** DSBs jsou rozpoznány heterodimerem Ku80-Ku70, který váže katalytickou podjednotku proteinkinázy DNAPKcs, což má za následek tvorbu komplexu DNAPK a aktivaci jeho kinázové aktivity. Rostoucí důkazy naznačují, že DNAPK funguje jako regulační komponenta NHEJ, pravděpodobně usnadňující a regulující procesy na koncích DNA. DNAPK tedy zvyšuje navázání XRCC4, DNA ligázy IV, XLF a faktoru Artemis, které se účastní konečné reparační reakce. **Homologní rekombinace.** Poškození DNA je rozpoznáno komplexem MRN (MRE11-RAD50-NBS1), který je vázán do DSB, aby resekci vytvořil jednovláknovou DNA. Jednovláknové konce DNA jsou vázány k replikačnímu proteinu A (RPA), RAD51 a RAD52 a následně mohou vniknout k homolognímu templátu vytvořením D-smyčky a „Holliday junction“ a zahájit syntézu DNA a tak kopírovat a obnovit genetickou informaci, která byla porušena vznikem DSBs. Převzato a upraveno z (Misteli a Soutoglou, 2009).

v inaktivaci chromosomu X a při kontrole buněčné proliferace (Jacobs a van Lohuizen, 2002). Naopak skupina proteinů TrxG (Trithorax group) byla popsána jako skupina agonistů transkripce, kteří udržují aktivní stav genové

exprese (Lund a van Lohuizen, 2004). Funkční spojení mezi proteiny PcG a TrxG bylo intenzivně studováno u *D. melanogaster* a *S. cerevisiae*. Studie u *D. melanogaster* odhalily, že PcG proteiny hrají důležitou úlohu v represi transkripce *HOX* genů během vývoje (Ringrose a Paro, 2004). Nedávné pozorování poukázalo na významnou roli proteinů PcG v genomu savců (Laible *et al.*, 1997). V lidském genomu je regulace genové exprese pomocí proteinů PcG opět důležitá z hlediska fyziologického vývoje. Kromě toho, zvýšená exprese proteinů PcG koreluje s malignitou a invazivností nádorových buněk (Jacobs a van Lohuizen, 2002; Sauvageau a Sauvageau, 2008).

Proteiny PcG jsou umístěny v interfázním jádře do několika zřetelných ohnisek (Buchenau *et al.*, 1998; Saurin *et al.*, 1998), které jsou považované za represivní domény genové transkripce. Těsná blízkost chromosomů, jak je tomu u procesu, který se nazývá „gene kissing“ (Kioussis, 2005; Lanctôt *et al.*, 2007), byla popsána pro endogenní cílové geny PcG a má se za to, že přispívá k dějům vedoucím k potlačení transkripce. Těsné spojení genů se může vyskytovat v ostrůvcích PcG, které určují jejich transkripční aktivitu či neaktivitu (Bantignies *et al.*, 2003). PcG proteiny jsou organizovány do dvou hlavních represivních komplexů (PRC). PRC1 zahrnuje proteiny jakými jsou HP, PSC, RING1 a BMI1 a další (Lund a van Lohuizen, 2004; Ringrose a Paro, 2004), zatímco PRC2 se skládá u *D. melanogaster* z Enhancer of zeste (E(z)), Suppressor zeste 12 Su(z)12, Extra sex combs (Esc) proteinů a z remodelačního faktoru nukleozomu Nurf55 (nebo EED, EZH2, SU(Z)12, YY1) (Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2002). V roce 2004 byl popsán komplex PRC2 jako komplex obsahující histonovou lysin-specifickou metyltransferázu (HMT) EZH2 (Kuzmichev *et al.*, 2004). Aktivita této HMT je především zodpovědná za tri-metylaci na histonu H3 v pozici lysinu 27 (H3K27me3) (Cao *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2004). Například při umlčování *HOX* genů, komponenta PRC2 EED-EZH2 zprostředkovává trimetylaci H3K27 (H3K27me3) a umožňuje tak vazbu komplexu PRC1. Vazba PRC1 způsobuje kondenzaci chromatinu a brání navázání jiných remodelujících komplexů chromatinu na DNA, což vede k umlčení genů (Cao a Zhang, 2004). Dále bylo prokázáno, že komplex EED-EZH2 je sice zodpovědný za tri-metylaci H3K27, ale nezprostředkuje metylaci H3K9, což je další marker transkripčně umlčeného chromatinu (Cao *et al.*, 2002; Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2004; Plath *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). Nicméně zda faktory obsažené v PcG těliscích (bodies) přispívají k H3K9 metylaci, která představuje vazebné místo pro heterochromatinový protein 1 (HP1), zůstává zatím nevyřešeno a je diskutováno v některých významných článcích (Cao a Zhang, 2004).

Proteiny HP1 (varianty HP1 α , β , γ) jsou zodpovědné zejména za formování heterochromatinu, ale byly rovněž nalezeny v místech dvouřetězcových zlomů na DNA, které byly indukovány UV zářením. Tyto vlastnosti HP1 proteinů jsou zprostředkovány chromoshadow doménou (CSD) tohoto proteinu (Luijsterburg *et al.*, 2009). Zmíněné experimenty ukazují, že DSBs nejsou svázané pouze s fosforylovaným histonem γ H2AX, ale rovněž fosforylace HP1 β na threoninu (Thr51) doprovází uvolnění a mobilizaci HP1 β

do míst dvouřetězcových zlomů. Tyto děje mohou být potlačeny vlivem inhibitoru kaseinové kinázy 2 (Ayoub *et al.*, 2008). Na základě těchto poznatků a ze zjištěných interakcí mezi proteinem HP1 a proteiny spojenými s PcG jsme testovali hypotézu, zda rovněž PcG proteiny mají schopnost rozpoznávat chromatin poškozený UV zářením a zda je tento proces ovlivněn změnami v acetylačních profilech histonů.

Udržení umlčení genů spojené s PcG se prezentuje nejen přes strukturní funkce, jako jsou organizace proteinů PcG do PcG tělísek, ale také jako kondenzace chromatinu a posun umlčených oblastí do míst heterochromatinu. Např. proteiny PRC1 se akumuluje do pericentrického heterochromatinu (Luijsterburg *et al.*, 2009; Saurin *et al.*, 1998). Navíc v lidském genomu, PcG tělíška přednostně asociují s oblastmi pericentrického heterochromatinu chromosomu 1 (1q12), 9, 15 a 16 (Saurin *et al.*, 1998; Sewalt *et al.*, 2002). Funkční význam tohoto strukturního uspořádání však zatím není znám (Damelin *et al.*, 2006). Tato pozorování však přispívají k předpokladu, že proteiny spojené s PcG by mohly interagovat s HP1 proteiny, které se rovněž vyskytují v oblastech centromerického a pericentrického heterochromatinu (Minc *et al.*, 2001; Minc *et al.*, 1999). Navíc působení jak PcG proteinů, tak HP1 v genomu není spojené s pasivními epigenetickými konsekvencemi, ale jedná se o dynamický proces. Tato myšlenka je podpořena skutečností, že komplexy proteinů PcG aktivně přispívají k umlčování genů a BMI1 tvoří nejméně dvě různé kinetické frakce (Hernández-Muñoz *et al.*, 2005). Podobně je tomu i u variant HP1 proteinu (Ayoub *et al.*, 2008; Baldeyron *et al.*, 2011; Luijsterburg *et al.*, 2009). Z tohoto důvodu jsme v uvedené práci testovali strukturální a funkční vlastnosti PcG proteinu BMI1 a HP1 proteinů, především s ohledem na procesy DNA reparace.

Materiál a metody

Kultivace buněk

Lidské buňky U2OS stabilně exprimující GFP-BMI1 pocházejí z laboratoře Prof. Maarten Van Lohuizen, The Netherlands Cancer Institute, Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis, Amsterdam, The Netherlands. Tyto buňky nám poskytl doc. Dušan Cmarko, Univerzita Karlova v Praze. Pro detekci proteinu BMI1 byla použita protilátka anti-BMI, clone F6 (#05-637, MilliporeQ5). Buňky byly kultivovány v médiu D-MEM s 10% BFS do 70% konfluence a dále ovlivněny 100 nM Trichostatinem A (TSA) nebo 15mM Vorinostatem (SAHA). Jak TSA, tak Vorinostat jsou inhibitory histonových deacetyláz (HDACs), které jsou zodpovědné za acetylaci histonů.

Stejné podmínky kultivace byly použity také v případě myších buněk 3T3, které stabilně exprimují EGFP-HP1 β . Tyto buňky jsme získali jako dar od Dr. Paul Verbruggen z Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, The Netherlands. Buňky byly kultivovány ve 37°C, 95% vlhkosti, v atmosféře obsahující 5% CO₂. Pro FRAP experimenty (Fluorescence Recovery after Photobleaching) (Šustáčková *et al.*, 2011) a indukci DSBs byly buňky kultivovány na speciálních mikroskopických miskách (MatTek CorporationQ6, #P50G-0-30-F).

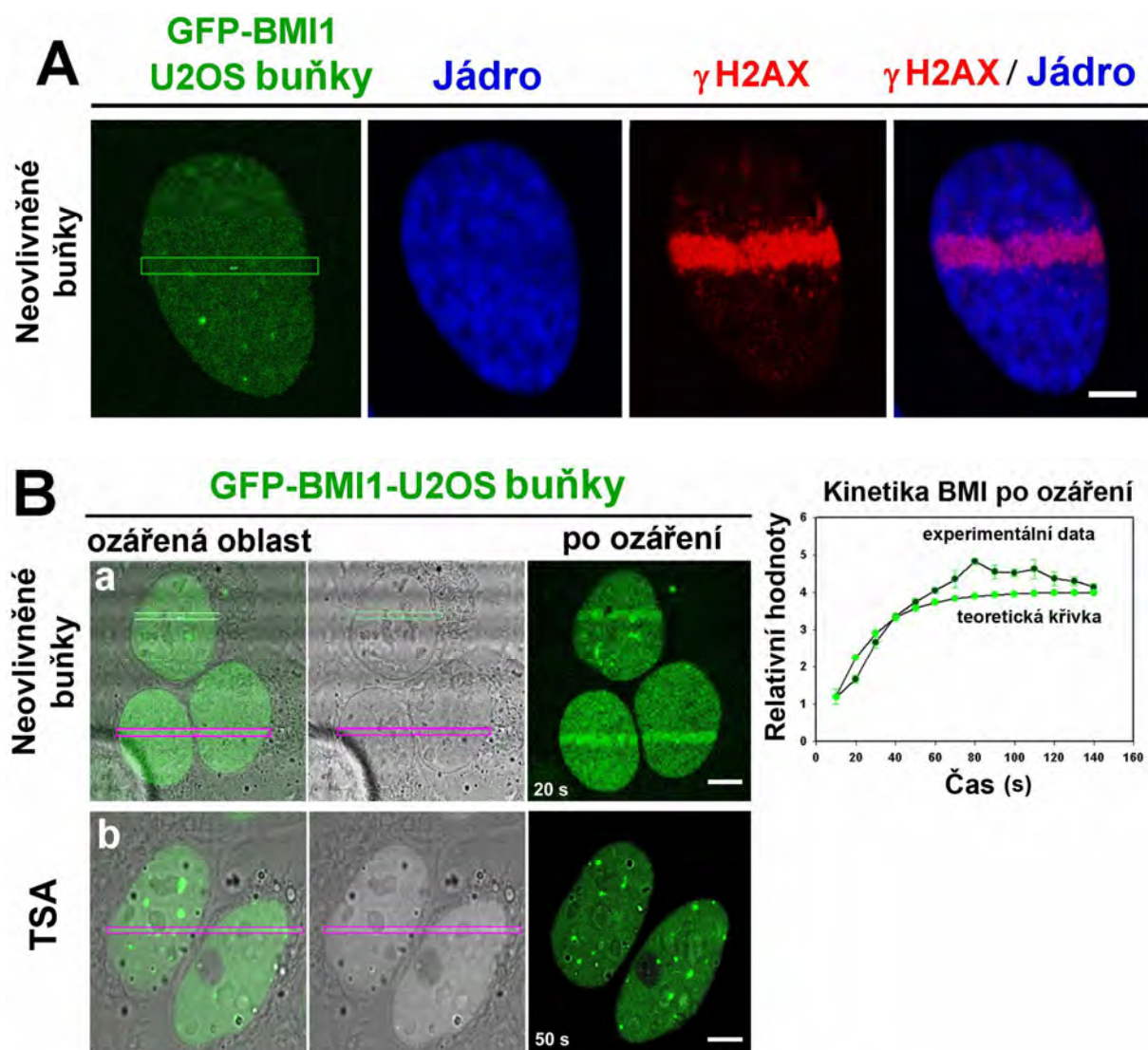
Indukce dvouřetězcových zlomů

U2OS buňky stabilně exprimující GFP-BMI1 a buňky 3T3 stabilně exprimující EGFP-HP1 β byly kultivovány za standardních podmínek. Jakmile buňky dosáhly 70% konfluency, byly ovlivněny 10 μ M 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). BrdU způsobuje zcitlivění buněk k UV záření a byl podáván 18 h před ozáření. Buňky U2OS a 3T3 neovlivněné a ovlivněné TSA byly značeny pomocí BrdU Labeling and Detection Kitu (#11296736001, Roche, CZ). Kontrolní detekce inkorporace BrdU byla provedena dle protokolu od výrobce. Buňky senzitivované BrdU byly ozářeny pomocí UV laseru (355nm). Ozařovali jsme určité oblasti buňky (polovinu nebo menší vybrané oblasti zájmu, ROIs) (Obr. 2A) 80% výkonem laseru, který byl redukován akusto-optickým laditelným filtrem (AOTF). Bylo použito následující nastavení: 512 x 512 pixelů, 400Hz, „bidirectional“ mode, 64 lines, zoom > 5-10. Ozářené buňky byly fixovány 4% paraformaldehydem a fosforylace histonu H2A.X (γ H2AX), jako velmi dobře známý marker DNA lézí, byla detekovaná specifickou protilátkou proti γ H2A.X (phospho S139; #ab2893, Abcam, UKQ8). K detekci imunofluorescence jsme použili konfokální mikroskop LEICA SP5X.

Výsledky

Protein BMI1 se shromažďuje v místech chromatinu poškozených UV zářením

Dvouřetězcové zlomy byly indukovány UV laserem (355 nm). Následné poškození DNA bylo potvrzeno protilátkou proti fosforylovanému H2AX (γ H2AX), jehož přítomnost je znakem dvouřetězcových zlomů (Obr. 2A). Nejprve nás zajímalo, zda protein BMI1 rozpoznává poškození DNA indukované UV zářením (Hong *et al.*, 2008). Na obrázku 2Ba je ukázáno, že protein BMI1 se v jednotlivých buňkách přednostně shromažďuje v místech poškození DNA mikroozáření. Zvýšená akumulace BMI1 proteinu v místech dvouřetězcových zlomů se projevila velmi rychle, 15-20 s po ozáření, ve srovnání s dalšími proteiny spojenými s heterochromatinem, jako je např. HP1 β , který byl detekován v oblastech DNA lézí v rozsahu 100 až 800 s (Ayoub *et al.*, 2008; Luijsterburg *et al.*, 2009). Zvýšené množství proteinu BMI1 v místech dvouřetězcových zlomů byla doprovázena stabilní hladinou H3K27me3, která je vazebným partnerem PRC1 komplexu (Obr. 2C). Výrazné navýšení BMI1 v chromatinu poškozeném UV zářením bylo pozorováno u živých buněk, které stabilně nebo přechodně exprimovaly BMI1. Tato skutečnost byla potvrzena i pro endogenní BMI1 protein (není ukázáno). Naše zkušenosti jsou však ve shodě s Hong *et al.* (2008), který vysvětluje slabý výskyt endogenních proteinů spojených s PcG v místě chromatinu poškozeném UV zářením. To je pravděpodobně dáno omezenými možnostmi metodických přístupů imunofluorescence, kde nízká senzitivita protilátek anebo rychlá disociace proteinů z poškozených míst, může ovlivnit intenzitu fluorescence proteinu detekovaného imunocytochemicky.



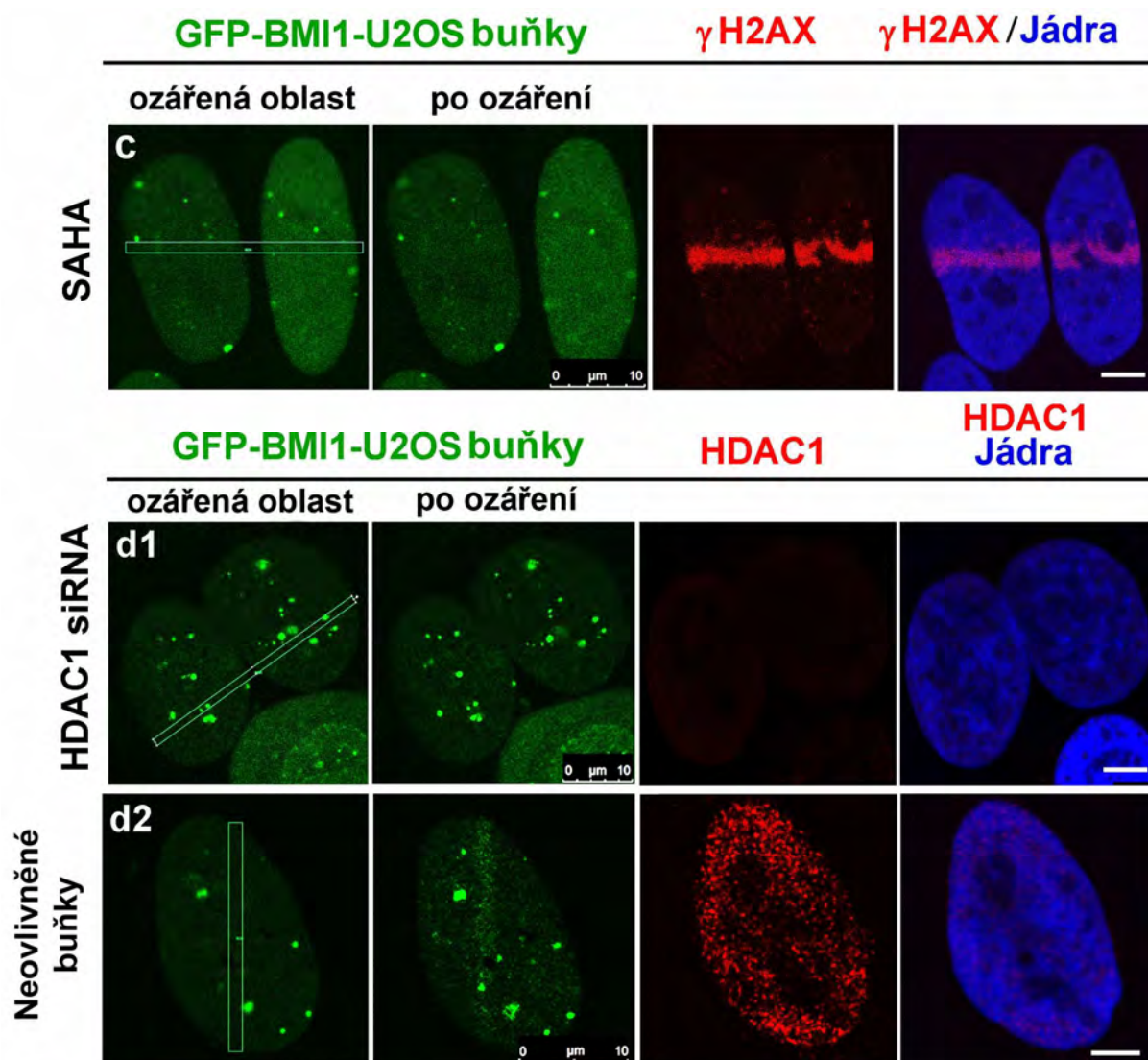
Obr. 2: Vazba proteinu BMI1 do míst chromatinu poškozených UV je závislá na acetylaci.

A: Optimalizace lokálního ozáření UV laserem (355 nm) u U2OS buněk stabilně exprimujících GFP-BMI1 (zelená). Přítomnost γ H2AX (červená) byla zviditelněna specifickou protilátkou **Ba:** Buňky GFP-BMI1-U2OS byly sledovány v průběhu 100s po ozáření a akumulace BMI1 byla detekována již po 15-20 s. Kinetické vlastnosti proteinu BMI1 po ozáření jsou zaznamenány v příloženém grafu. **Bb:** TSA brání zvýšené akumulaci BMI1 v místech poškozených UV zářením.

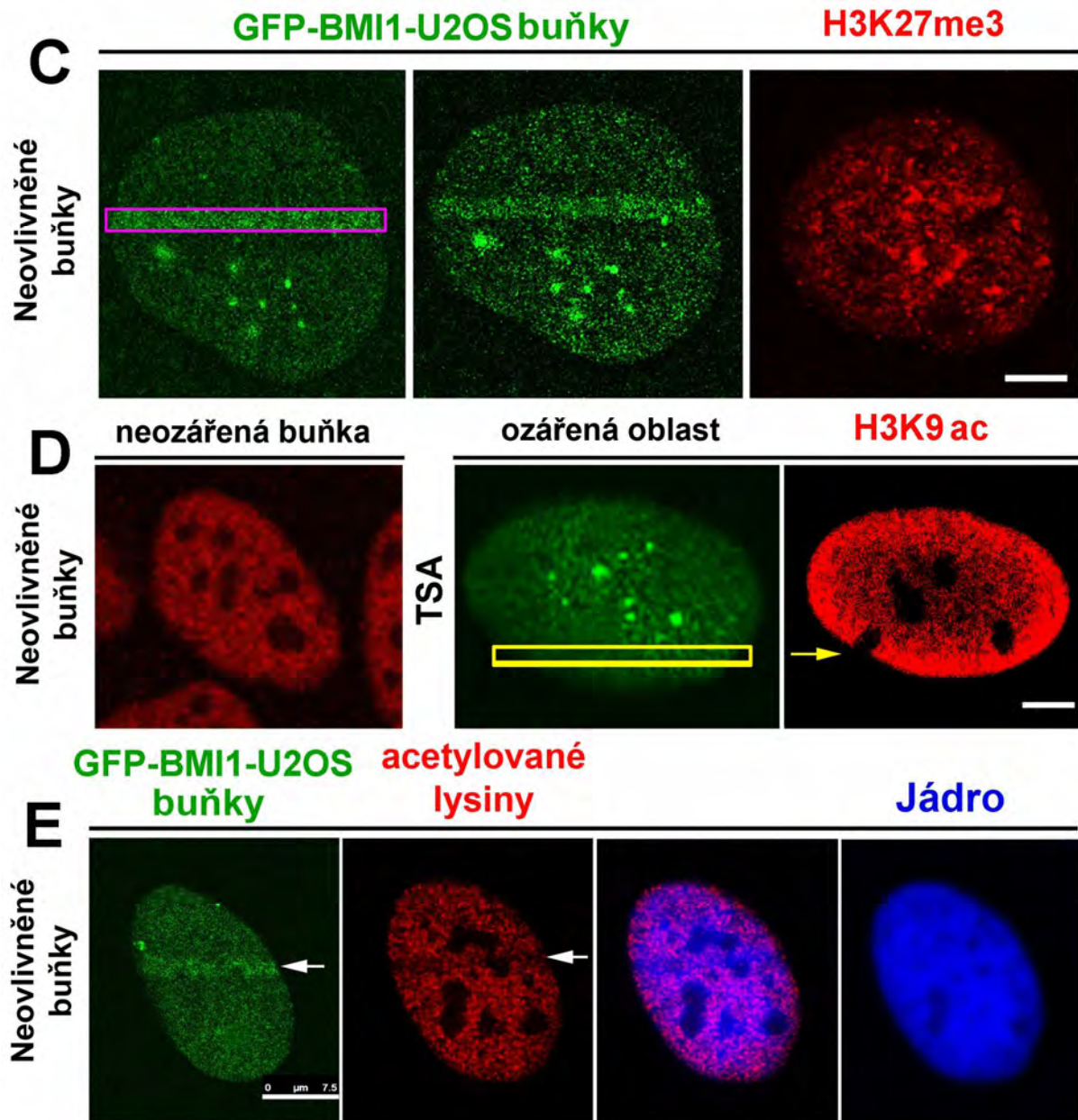
Vazba proteinu BMI1 do míst chromatinu poškozených UV je závislá na acetylaci

Pokud byly buňky ovlivněny inhibítorem HDACs, TSA, nebyla zaznamenána žádná akumulace, ale ani úplná absence proteinu BMI1 v místech douřetězcových zlomů (Obr. 2Bb). Podobný účinek hyperacetylace histonů na schopnost vazby proteinu BMI1 do míst chromatinu poškozeného UV byl potvrzen po působení Vorinostatu (SAHA) (Obr. 2Bc) a po degradaci mRNA HDAC1 pomocí siRNA (porovnejte Obr. 2Bd1 s Bd2). Tato data

poukazují na důležitou úlohu acetylace histonů při reparaci DNA. Ačkoliv množství acetylovaného BMI1 by mělo být také bráno v úvahu. Pomocí imunoprecipitace jsme pozorovali nejenom to, že BMI1 interaguje s HP1 β (Obr. 3A), ale že hyperacetylace, způsobená TSA (Obr. 2D), snižovala množství acetylovaného BMI1 (Obr 3B). Rovněž acetylace všech lysinů byla snížena v místě akumulace BMI1 (Obr. 2E). Tyto výsledky ukazují, že acetylace hraje významnou úlohu v rozpoznávání chromatinu poškozeného UV zářením.



Obr. 2 - pokračování: Bc: Vorinostat (SAHA) brání zvýšené akumulaci BMI1 v místech poškozených UV zářením. **Bd:** HDAC1 siRNA (d1) brání zvýšené akumulaci BMI1 v místech poškozených UV zářením; (d2) akumulace proteinu BMI1 (zelená) po ozáření u kontrolních buněk se standardním množstvím HDAC 1 (červená).

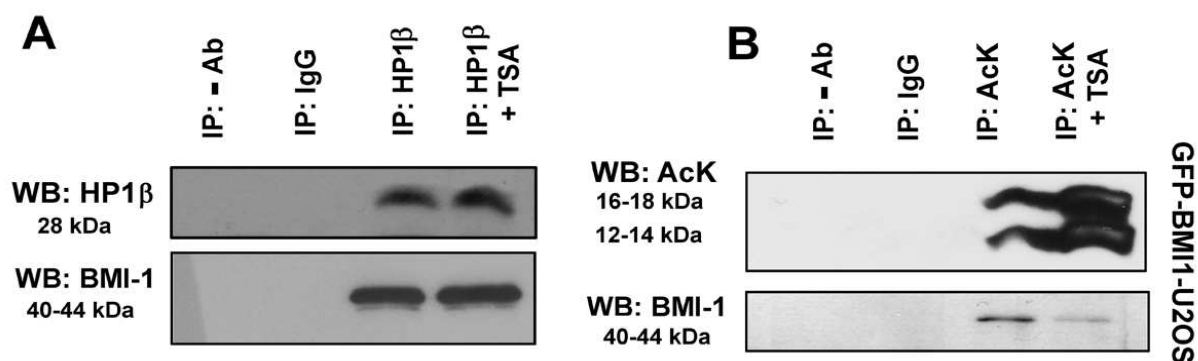


Obr. 2 – pokračování: **C:** Hladina H3K27me3 v místech poškozených UV zářením byla stabilní (červená). **D:** Zvýšená acetylace H3K9 (červená) u buněk ovlivněných TSA. Hladina acetylace H3K9 byla nižší u neovlivněných buněk (levý panel) ve srovnání s buňkami ovlivněnými TSA (pravý panel, červená). Velikost měřítka v pravém dolním rohu snímků A-D je uvedeno v μm . **E:** Protilátka proti acetylovaným lysinům znázorňuje snížené množství všech acetylovaných lysinů (červená) v místě poškození chromatinu UV zářením se zvýšenou akumulací proteinu BMI1 (zelená). Proužek v pravém dolním rohu před-stavuje 7,5 μm .

HP1 β se hromadí v místech chromatinu poškozených UV mnohem pomaleji než BMI1, ale inhibitory HDAC brání zvýšenému nahromadění obou proteinů BMI1 i HP1 β

Následující experimenty ukázaly, že BMI1 je možným vazebným partnerem HP1 β (Obr. 3A). Proto nás zajímalo, zda BMI1 a HP1 β spolu

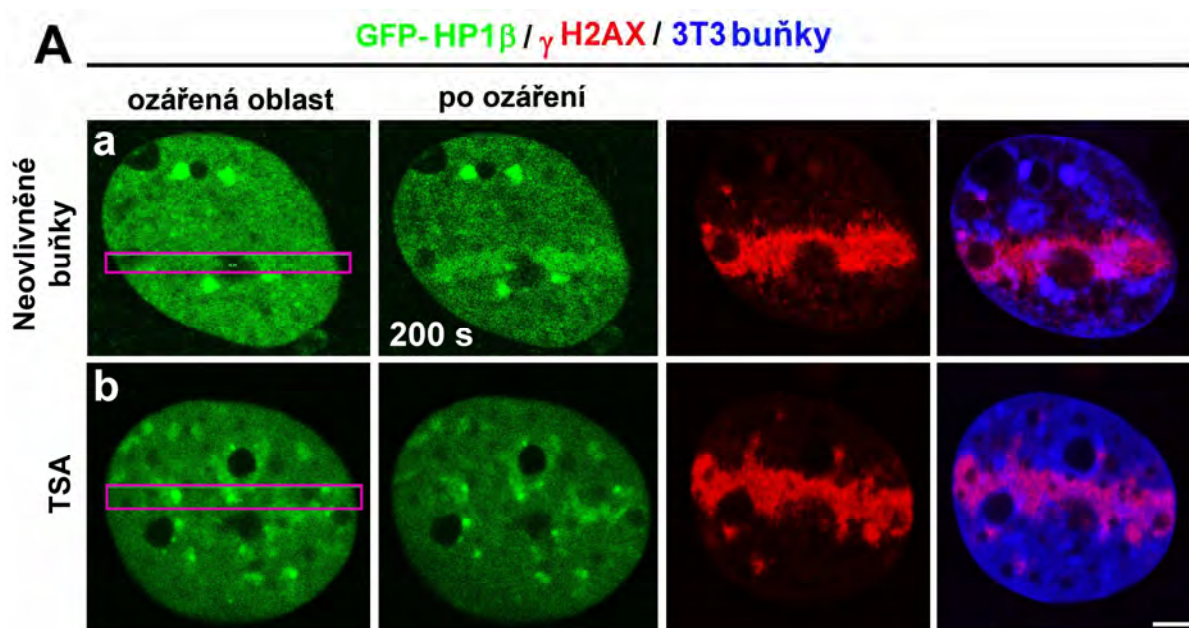
mohou interagovat v místech chromatinu poškozených UV. Protein HP1 β se akumuloval do poškozených oblastí pomaleji (200 s po ozáření, Obr. 4Aa) (Luijsterburg *et al.*, 2009) než BMI1, který se začal hromadit již po 15 - 20 s po ozáření (Obr. 2Ba). Inhibice histonových deacetyláz pomocí TSA bránila oběma proteinům BMI1 i HP1 β se vázat do poškozených oblastí chromatinu (Obr. 2Bb a Obr. 4Ab), což naznačuje, že funkce obou proteinů BMI1 i HP1 β v chromatinu poškozeném UV zářením může být podobně ovlivněna změnami v celkové acetylaci proteinů indukované pomocí TSA (Obr. 2D) (Bártová *et al.*, 2005; Tóth *et al.*, 2004). Na základě těchto pozorování se zdá být zřejmé, že nejen acetylace histonů, ale také acetylace nehistonových proteinů může hrát úlohu při opravě DNA. Když jsme provedli imunoprecipitaci s protilátkou proti všem acetylovaným lysinům, pozorovali jsme sníženou hladinu acetylovaného BMI1 po působení TSA (Obr. 3B). Naopak TSA způsobuje hyperacetylaci histonů (Obr. 2D). I přes tyto odlišné skutečnosti, naše výsledky nepopírají důležitou úlohu acetylce v průběhu opravy chromatinu poškozeného UV zářením. Přesto je těžké rozlišit, zda hyperacetylce histonů nebo hypoacetylce BMI1, které se vyskytují současně po působení TSA, ovlivňuje zvýšenou akumulaci proteinu BMI1 do oblastí poškozených UV zářením. Dalším zajímavým výsledkem je, že když jsme inhibovali RNA Pol II pomocí aktinomycinu D, nepozorovali jsme žádnou zvýšenou akumulaci BMI1 v chromatinu poškozeném UV zářením (neukázáno, stejné jako po přidání TSA). Tento výsledek potvrdil domněnku Chou *et al.* (Chou *et al.*, 2010), že RNA Pol II, zapojená do transkripční mašinerie, může ovlivňovat i opravné procesy na DNA, ale její funkce bude zřejmě velmi specifická, ne přímo vztažená k transkripční aktivitě chromatinu.



Obr. 3: Vztahy mezi proteiny HP1 β a BMI1 a acetylací lysinu. A: Pomocí imunoprecipitace byla prokázána vazba proteinů HP1 β a BMI1. Působení TSA neovlivnilo významně interakci mezi HP1 β a BMI1. **B:** Rozsah acetylce BMI1 byl studován pomocí protilátky proti acetylovaným lysinům. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, kdy k imunoprecipitaci nebyla použita žádná protilátka nebo nespecifický IgG (Rabbit Control IgG-ChIP Grade, #ab46540, Abcam).

Kinetika HP1 β v místech chromatinu poškozených UV zářením

Po působení TSA nebo aktinomycinu D nebyla zaznamenána ani akumulace a ani absence proteinů BMI1 a HP1 β v oblastech poškozených UV zářením. Proto bylo možné studovat kinetiku proteinů v ozářených oblastech pomocí FRAP techniky. Jako příklad uvádíme fotovybělení (photobleaching) v místech chromatinu ozářených UV laserem u kontrolních buněk a buněk ovlivněných TSA, které expimovaly EGFP-HP1 β . Výsledky ukazují, že působení TSA neovlivnilo obnovení fluorescence proteinu HP1 β po fotovybělení (Obr. 4B). Navíc kinetické vlastnosti HP1 β byly v místě poškozeném UV zářením podobné, pokud jsme rozlišili oblast euchromatinu a heterochromatinu jak u kontrolních tak i u buněk ovlivněných TSA (Obr. 4B). K podobným závěrům jsme dospěli i v případě kinetiky BMI1 proteinu v oblastech DNA lézí (Šustáčková *et al.* 2011).

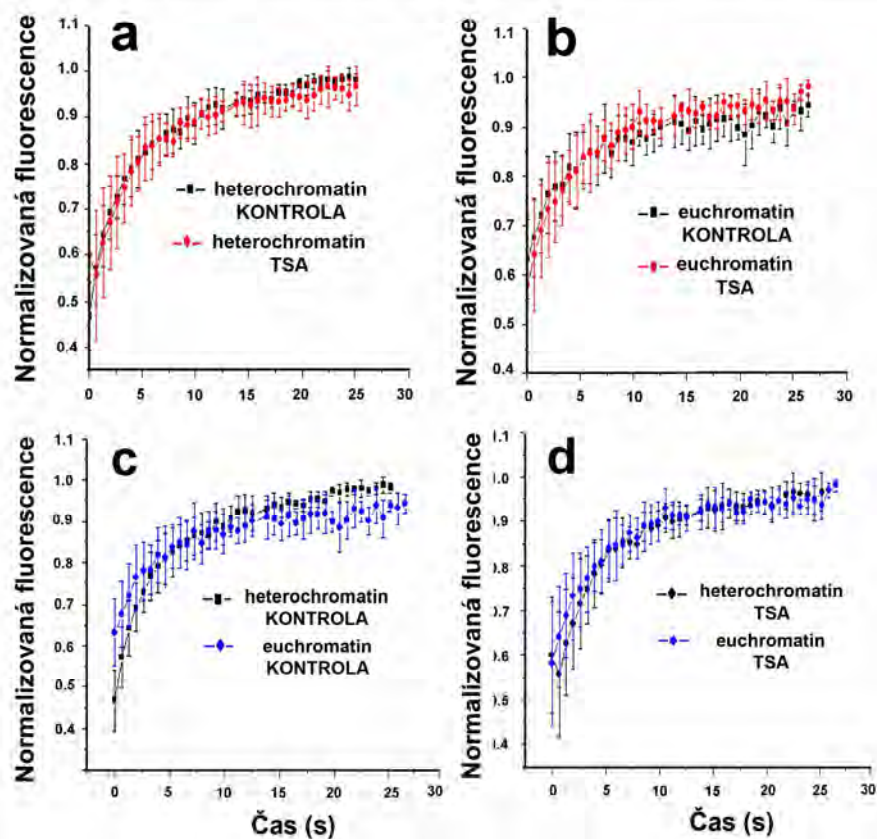


Obr. 4: Vazba proteinu HP1 β do míst chromatinu poškozených UV je závislá na acetylaci. A: Buňky EGFP-HP1 β -3T3 byly sledovány po mikroozáření a zvýšená akumulace HP1 β byla detekovaná během 200 s. Působení TSA bránilo zvýšené akumulaci HP1 β v místech poškozených UV zářením, ale bazální hladina HP1 β zůstávala zachována. Měřítka v pravém dolním rohu představuje 4 μ m.

Diskuze

Ukázali jsme, že k akumulaci proteinu BMI1 do oblastí chromatinu poškozených UV zářením dochází velice rychle po ozáření. Tento děj probíhá mnohem rychleji než v případě HP1 β proteinu, který se hromadí až 100 – 800 s po ozáření UV (Obr. 2Ba, 4Aa) (Ayoub *et al.*, 2008; Luijsterburg *et al.*, 2009). Vazba HP1 do míst poškození DNA byla závislá na „chromoshadow“ doméně (CSD) a nezávislá na chromodoméně (CD) HP1 proteinu, což naznačuje, že tento proces je nezávislý na tri-metylaci H3K9, která je vazeb-

B HP1 β in DSBs / 3T3 buňky



Obr. 4 - pokračování: B: FRAP experimenty byly provedeny v oblasti chromatinu poškozené UV zářením u EGFP-HP1 β -3T3 buněk kontrolních a ovlivněných TSA. **Ba:** Srovnání kinetiky proteinu HP1 β v heterochromatinu buněk kontrolních a ovlivněných TSA. **Bb:** Srovnání kinetiky proteinu HP1 β v euchromatinu buněk kontrolních a ovlivněných TSA. **Bc:** Srovnání kinetiky proteinu HP1 β v heterochromatinu a euchromatinu kontrolních buněk. **Bd:** Srovnání kinetiky proteinu HP1 β v heterochromatinu a euchromatinu buněk ovlivněných TSA.

ným partnerem variant HP1 proteinu (Luijsterburg *et al.*, 2009; Rice a Allis, 2001). Navíc Ayoub *et al.* (Ayoub *et al.*, 2008) ve své práci ukázal, že fosforylace HP1 β na Thr51 jeho CD domény je důležitá pro mobilizaci a uvolnění z chromatinu a pro vazbu HP1 β do poškozených míst na DNA. Inhibice kaseinové kinázy 2 (CK2), což je enzym zapojený do reparace DNA, snižuje fosforylaci Thr51 a mobilizaci HP1 β (Ayoub *et al.*, 2008). Dále Baldeyron *et al.* (Baldeyron *et al.*, 2011) prokázal, že deplece HP1 β vede k nestandardní opravě DNA a že vazba HP1 β k chromatinu s DSBs vyžaduje histonový chaperon p150CAF-1. Tato data naznačují, že specifické epigenetické události a biochemické modifikace proteinů vázajících se na chromatin, včetně HP1 jsou zodpovědné za uspořádání chromatinu a také opravu DNA. V této práci jsme ukázali, že zvýšená akumulace HP1 β probíhá

současně se zvýšenou vazbou proteinu BMI1 v místě chromatinu poškozeného UV zářením. Navíc tyto děje jsou závislé na acetylaci. Na základě našich výsledků se lze domnívat, že BMI1 by mohl být potenciálním vazebným partnerem proteinu HP1 β v chromatinu poškozeném UV zářením. Zajímavé je, že proteiny HP1 rozpoznávají DNA léze bez ohledu na H3K9me3 (Luijsterburg *et al.*, 2009). Navíc my jsme nezaznamenali zvýšenou akumulaci jiného epigenetického znaku, H3K27me3, v oblasti DNA lezí, kde se významným způsobem hromadil protein BMI1 (Obr. 2C). Nicméně pozorované množství H3K27me3 by mohlo být dostatečné pro vazbu BMI1 k chromatinu s DSBs (Obr. 2C). Dalším důležitým klíčovým hráčem ve vazbě BMI1 k poškozenému chromatinu je poly-ADP-ribozová polymeráza (PARP) (Chou *et al.*, 2010; (Ismail *et al.* 2010).

Dohromady vzato, ukázali jsme, že protein BMI1, spojený s PcG funkcí, rozpoznává DNA leze bezprostředně po mikroozáření, na což navazuje zvýšená akumulace HP1 β do těchto oblastí genomu. Nicméně si uvědomujeme, že fyziologický význam mikroozáření pomocí UV-A může být limitovaný, stejně jako biologický význam exprese exogenního proteinu BMI1 a HP1 β . Avšak v tomto experimentálním systému, BMI1 akumulace v UV-indukovaných DNA lezích byla spíše závislá na acetylačních změnách, což vychází ze skutečnosti, že hyperacetylace histonů brání zvýšené akumulaci BMI1 a HP1 β do poškozeného chromatinu (Obr. 2Bb a 4Ab). Naopak dříve bylo ukázáno, že oprava DNA je více účinná v hyperacetylovaných, dekonzenzovaných nukleosomech (Ramanathan a Smerdon, 1986; Ramanathan a Smerdon, 1989). V našem případě jsme zjistili, že spíše hyperacetylace brání rozpoznání DNA lezí indukovaných UV. Tudíž, použitím nezávislých experimentálních přístupů jsme poukázali na důležitou úlohu acetylace v procesech opravy DNA. Naše výsledky tedy přispívají k vysvětlení, jak specifický histonový kód přispívá k opravným mechanismům na DNA, které brání nestabilitě genomu.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projekty: LC535, LC06027, ME 919, AVOZ50040702 a AVOZ50040507, LD11020, dále evropským projektem COST TD09/05 a projektem Marie Curie PIRSES-GA-2010-269156-LCS. Za podporu rovněž děkujeme Grantové agentuře ČR, projekt P302/10/1022. Chtěli bychom také poděkovat Dr. Paul Verbruggen (z Swammerdam Institute for Life Sciences University of Amsterdam, The Netherlands, ze skupiny Prof. Roel van Driel), který nám poskytl buňky 3T3 a dále doc. D. Cmarkovi, z Univerzity Karlovy v Praze za buňky U2OS, stabilně exprimující GFP-BMI1, pocházející z laboratoře Prof. Maarten Van Lohuizen (The Netherlands Cancer Institute, Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis, Amsterdam, The Netherlands).

Literatura

- Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Venkitaraman AR (2008) HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* 453: 682-6.
- Baldeyron C, Soria G, Roche D, Cook AJ, Almouzni G (2011) HP1alpha recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair. *J Cell Biol* 193: 81-95.
- Bantignies F, Grimaud C, Lavrov S, Gabut M, Cavalli G (2003) Inheritance of Polycomb-dependent chromosomal interactions in *Drosophila*. *Genes Dev* 17: 2406-20.
- Bártová E, Pacherník J, Harničarová A, Kovařík A, Kovaříková M, Hofmanová J *et al* (2005) Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci* 118: 5035-46.
- Buchenau P, Hodgson J, Strutt H, Arndt-Jovin DJ (1998) The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in *Drosophila* embryos: impact on models for silencing. *J Cell Biol* 141: 469-81.
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P *et al* (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: 1039-43.
- Cao R, Zhang Y (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14: 155-64.
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V (2002) *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111: 185-96.
- Damelin M, Ooi SK, Bestor TH (2006) Combing over heritable gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 13: 100-1.
- Hernández-Muñoz I, Taghavi P, Kuijl C, Neefjes J, van Lohuizen M (2005) Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Mol Cell Biol* 25: 11047-58.
- Hong Z, Jiang J, Lan L, Nakajima S, Kanno S, Koseki H *et al* (2008) A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell. *Nucleic Acids Res* 36: 2939-47.
- Chou DM, Adamson B, Dephoure NE, Tan X, Nottke AC, Hurov KE *et al* (2010) A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18475-80.
- Ismail IH, Andrin C, McDonald D, Hendzel MJ (2010) BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *J Cell Biol* 191: 45-60.

- Jacobs JJ, van Lohuizen M (2002) Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602: 151-61.
- Kanaar R, Wyman C, Rothstein R (2008) Quality control of DNA break metabolism: in the 'end', it's a good thing. *EMBO J* 27: 581-8.
- Kioussis D (2005) Gene regulation: kissing chromosomes. *Nature* 435: 579-80.
- Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D (2004) Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* 14: 183-93.
- Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C, Lebersorger A *et al* (1997) Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres. *EMBO J* 16: 3219-32.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8: 104-15.
- Lobrich M, Jeggo PA (2007). The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 7: 861-9.
- Luijsterburg MS, Dinant C, Lans H, Stap J, Wiernasz E, Lagerwerf S *et al* (2009). Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J Cell Biol* 185: 577-86.
- Lukas J, Lukas C, Bartek J (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3: 997-1007.
- Lund AH, van Lohuizen M (2004). Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 16: 239-46.
- Minc E, Allory Y, Courvalin JC, Buendia B (2001). Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes. *Methods Cell Sci* 23: 171-4.
- Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC, Buendia B (1999). Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108: 220-34.
- Misteli T, Soutoglou E (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 243-54.
- Muller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B *et al* (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* 111: 197-208.
- Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H *et al* (2003). Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300: 131-5.
- Ramanathan B, Smerdon MJ (1986). Changes in nuclear protein acetylation in u.v.-damaged human cells. *Carcinogenesis* 7: 1087-94.
- Ramanathan B, Smerdon MJ (1989). Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J Biol Chem* 264: 11026-34.

- Rice JC, Allis CD (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 263-73.
- Ringrose L, Paro R (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 38: 413-43.
- Saurin AJ, Shiels C, Williamson J, Satijn DP, Otte AP, Sheer D *et al* (1998). The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol* 142: 887-98.
- Sauvageau M, Sauvageau G (2008). Polycomb group genes: keeping stem cell activity in balance. *PLoS Biol* 6: e113.
- Sewalt RG, Lachner M, Vargas M, Hamer KM, den Blaauwen JL, Hendrix T *et al* (2002). Selective interactions between vertebrate polycomb homologs and the SUV39H1 histone lysine methyltransferase suggest that histone H3-K9 methylation contributes to chromosomal targeting of Polycomb group proteins. *Mol Cell Biol* 22: 5539-53.
- Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nesterova TB, Webster Z *et al* (2003). Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell* 4: 481-95.
- Šustáčková G, Kozubek S, Stixova L, Legartova S, Matula P, Orlova D *et al* (2011). Acetylation-dependent nuclear arrangement and recruitment of BMI1 protein to UV-damaged chromatin. *J Cell Physiol*.
- Tóth KF, Knoch TA, Wachsmuth M, Frank-Stohr M, Stohr M, Bacher CP *et al* (2004). Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 117: 4277-87.
- Wyman C, Kanaar R (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40: 363-83.

Buněčné jádro a jeho epigenetika

Jana Suchánková, Lenka Stixová, Eva Bártová

Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.,
Královopolská 135, 612 65 Brno

Úvod

Pojem epigenetika šířil od roku 1942 Conrad Hal Waddington, britský profesor genetiky, který definoval epigenetiku jako soubor změn genové exprese determinující vývoj organismu. V současnosti epigenetiku chápeme jako vědu zabývající se biochemickou modifikací DNA a s ní asociovaných proteinů, tak zvaných histonů. V tomto případě nedochází ke změnám v sekvencích DNA, tudíž jde o takové modifikace chromatinu, které neovlivňují pořadí nukleotidů v řetězci. Tyto biochemické modifikace způsobují pouze změnu v kompaktnosti DNA a tím ovlivňují funkci jednotlivých genů, tudíž i celého buněčného jádra.

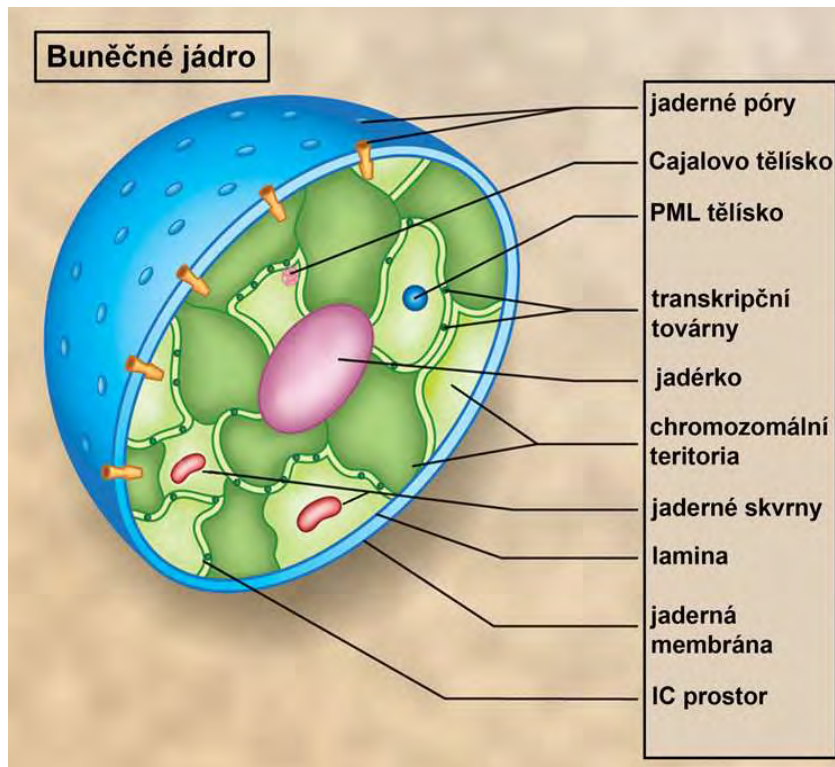
Zpočátku se zdálo, že význam epigenetiky je pouze okrajový, ovšem s rozvojem experimentálních technik se začal biochemickým modifikacím chromatinu přikládat větší význam. O tom, že epigenetika je důležitým tématem současné molekulární a buněčné biologie svědčí například jedno z posledních speciálních čísel časopisu *Science* (vydané 29. října 2010), věnované právě tomuto podoboru genetiky. Z řady nových poznatků je zřejmé, že sledování epigenetických změn v lidském genomu je důležité, především pro pochopení mechanismů zodpovědných za vznik řady civilizačních onemocnění, včetně nádorové transformace buněk. Navíc, epigenetické faktory přesně určují nejen stupeň šroubovicovitého stočení DNA, ale dále jsou zodpovědné za organizaci buněčného jádra a fyziologickou strukturu chromatinu vyššího řádu.

Organizace buněčného jádra.

Buněčné jádro je nejnápadnější organelou eukaryotické buňky a obsahuje většinu jejích genů. Celé jádro je uspořádáno do mnoha funkčních celků (obr. 1). Prostor jádra vyplňuje chromatin, který se skládá z DNA a především proteinů histonové povahy. Dále je v jádře obsaženo velké množství nehistonových proteinů a RNA (Snustad a Simmons, 2009). Zbytek jádra je vyplněn interchromatinovým prostorem (obr. 1), který obsahuje makromolekulární komplexy, potřebné pro jaderné funkce, jako je replikace (tvorba kopií molekuly DNA), transkripce (přepis genetické informace z DNA do RNA), sestřih (post-syntetická úprava pre-mRNA) či reparace (oprava poškozené DNA) (Cremer a Cremer, 2001). V buněčném jádře se dále nachází řada tělísek a domén – především Cajalova tělíska, promyelocytická leukemická tělíska (promyelocytic leukemia - PML), jaderné skvrny a několik dalších regulačních domén, typu transkripčních „továren“ obsahujících RNA polymerázu II, která jako hlavní faktor reguluje transkripci genů kódujících pre-mRNA (Hernandez-Verdun, 2006). Speciální jadernou strukturu dále představuje jadérko, které je považováno za největší transkripční „továrnu“ (Obr. 1). Důvodem tohoto označení je, že transkripce ribozomálních genů a syntéza ribozomálních pod-jednotek probíhá právě v kompartmentech jadérka (Raška *et al.*, 2004).

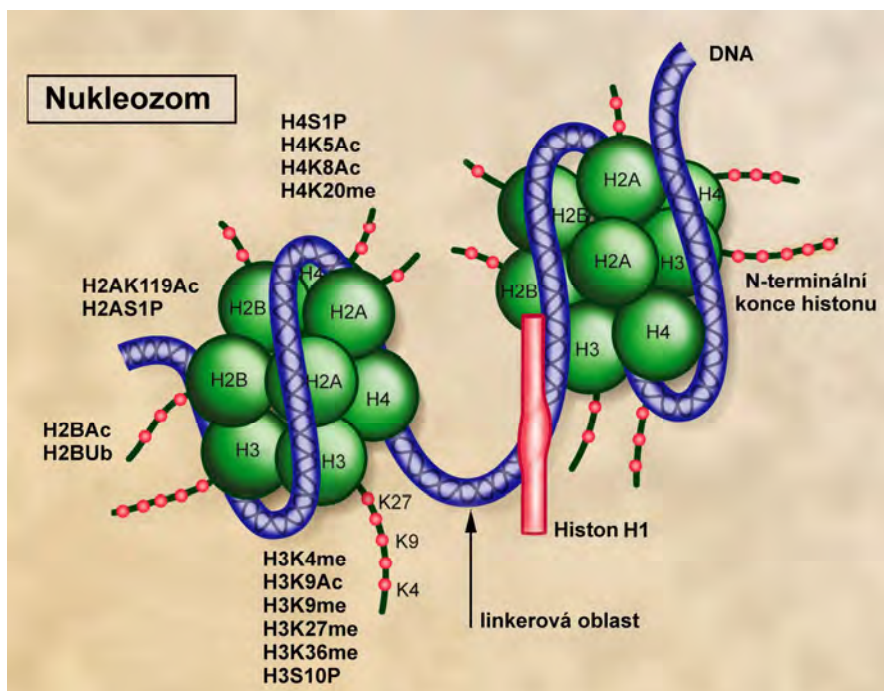
Základní struktura chromatinu a epigenetické modifikace histonů

Základní strukturní podjednotkou chromatinu savčích buněk je nukleozom, který je tvořen oktamerem histonů (dvě molekuly každého z histonů H2A, H2B, H3 a H4) a navinutou DNA (Alberts *et al.*, 1998; Campbell a Reece, 2006) (obr. 2). Molekula dalšího histonu, nazývaného H1, se připojuje k volné DNA v blízkosti nukleozomu, v takzvané "linkerové" oblasti, a s jeho pomocí je DNA uspořádána do 30nm chromatinového vlákna. Toto vlákno může tvořit ještě kondenzovanější struktury, ovšem způsob jejich vzniku a formy organizace chromatinových vláken jsou neustále předmětem diskuse (Yokota *et al.*, 1995).



Obr. 1: Schéma uspořádání vybraných kompartmentů buněčného jádra. Jádro je charakteristické svou vysokou kompartmentalizací, tedy rozdělením prostoru do menších funkčních celků. Povrch jádra je tvořen jadernou membránou protkanou jadernými póry, pod kterou se nachází vrstva intermediárních filament tvořících nukleární laminu. Dominantou vnitřního prostoru jádra je jadérko, kolem kterého jsou organizována chromozomální teritoria a interchromozomální prostor (IC).

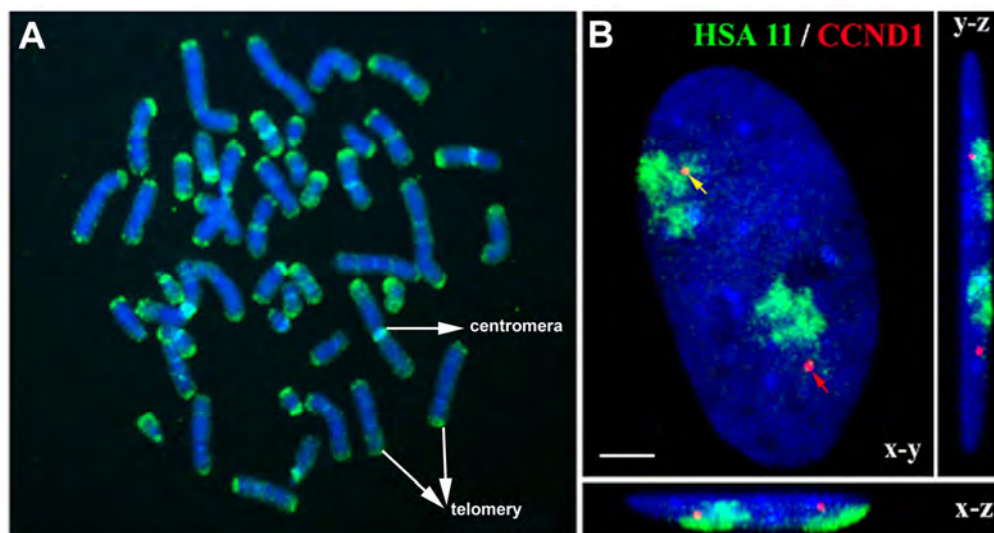
Větší „laguny“ interchromozomálního prostoru obsahují například Cajalova tělíska (zodpovídají za tvorbu transkripčních a sestřihových komplexů), tělíska PML (účastní se regulace transkripce, omezení růstu nádorů, potlačení apoptózy a oprav DNA) a jaderné skvrny (obsahují vysokou koncentraci sestřihových faktorů).



Obr. 2: Nukleozomy obtočené DNA a jejich epigenetické modifikace na vybraných N-koncích.

Stupeň kondenzace chromatinu závisí především na buněčném cyklu, který zahrnuje interfázi (G1, S, G2 fáze) a mitotické dělení. Během interfáze jsou chromatinová vlákna v jádře rozvolněná, ale při přípravě buňky na mitózu

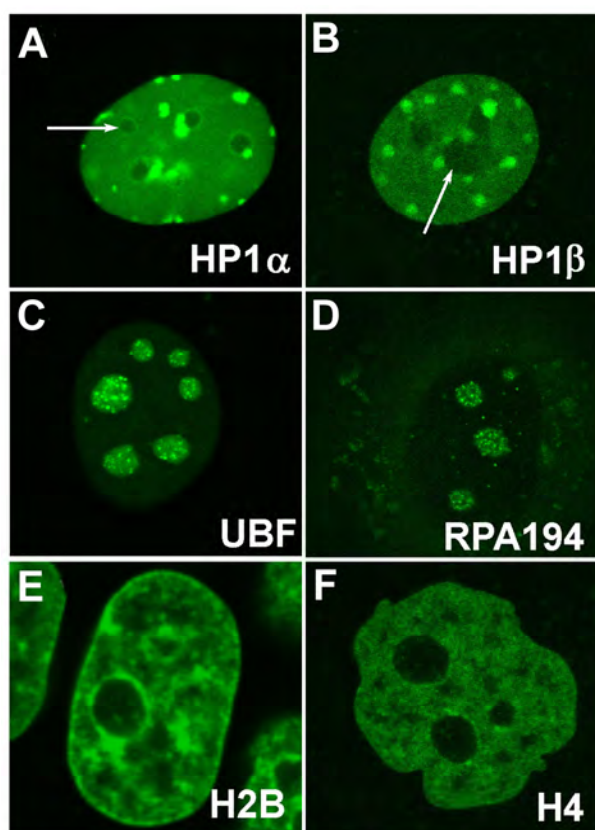
dochází k jejich kondenzaci a jsou viditelná jako typické metafázní chromozomy. Ty představují nejvyšší možný stupeň sbalení chromatinu, takzvaný chromatin vyššího řádu (obr. 3A). Avšak ani interfázní chromozomální teritoria (obr. 3B) nejsou ve své struktuře homogenní, liší se ve stupni svého sbalení (kondenzace) a tedy i ve stupni vyjádření genů (exprese).



Obr. 3: Příklad metafázních chromozomů (modře) a jejich DNA metylace (zeleně). Naznačeno je umístění centromer a konce chromozomů, telomery (A). Interfázní profil teritorií lidského chromozomu 11 (HSA11) (zeleně) a na něm umístěné CCND1 geny (červeně). Interfázní jádro je značeno modře (B).

V rámci buněčného jádra rozlišujeme dva základní typy chromatinu: euchromatin a heterochromatin (Felsenfeld a Groudine, 2003). Zatímco euchromatin je rozvolněný a transkripčně aktivní, heterochromatin je mnohem kompaktnější, vysoce kondenzovaný a z velké míry transkripčně neaktivní. Heterochromatin můžeme dále dělit na fakultativní (neaktivní chromozom X v genomu samic) a konstitutivní (primární zaškrcení [konstrikce] chromozomů zvané centromery nebo konce chromozomů zvané telomery (obr. 3A).

Kondenzace interfázního chromatinu ovlivňují také biochemické modifikace histonu H1 a koncových částí histonů, takzvaných N-terminálních konců, vyčnívajících z nukleozomů (Snustad a Simmons, 2009) (obr. 2). Tyto chemické modifikace mohou pozitivně i negativně ovlivňovat expresi genů (viz níže). Ke zmíněným post-translačním modifikacím dochází v důsledku působení specifických enzymů, zodpovědných za vazbu nebo odštěpení například methylové, acetylové, fosforylové či jiné epigeneticky významné skupiny vázané na histony. Dalšími faktory, které ovlivňují kondenzaci chromatinu jsou sub-typy heterochromatinového proteinů 1 - HP1 α , HP1 β a HP1 γ (viz níže, obr. 4A, B). V neposlední řadě je exprese jednotlivých genů regulována transkripčními faktory (epigeneticky významné proteiny, které se váží na promotory genů a iniciují transkripci). Dále může být exprese genů ovlivněná polohou genů v rámci chromozomálního teritoria nebo i celého interfázního jádra (obr. 3B) (Croft *et al.*, 1999; Lanctôt *et al.*, 2007).



Obr. 4: Distribuce HP1 α (A), HP1 β (B), UBF (C), RPA194 (D) a histonů H2B (E), H4 (F) v interfázním jádře živých buněk (myší embryonální fibroblasty). Převzato ze Stixová et al. (2011).

Chromozomální teritoria

Tak jako je metafázní chromatin organizován do kondenzovaných chromozomů, tak i uspořádání interfázního jádra není zcela náhodné (obr. 1). Ač se po dlouhou dobu předpokládalo, že jednotlivé interfázní chromozomy jsou vzájemně propletené a neuspořádané. Postupně převládá názor, že pokud jádro obsahuje tak velké množství chromatinu, musí být tento chromatin nějakým způsobem organizován. A právě uspořádání interfázního jádra je zcela zásadní pro regulaci exprese genů.

Carl Rabl (Rabl, 1885) jako první usoudil, že jednotlivé chromozomy jsou od sebe prostorově odděleny, což v několika desetiletích významně prostudovala skupina Prof. Thomase Cremera z Mnichova (shrnutí v (Cremer a Cremer, 2010)). Obohacení Rablových teorií provedl Theodor Boveri, který ve své práci uvedl, že každý chromozom, který je viditelný během mitózy, si i během interfáze udržuje svou individualitu a v jádře zabírá specifický prostor. Boveri v této práci také poprvé použil termín chromozomální teritorium. S vyvinutím nových experimentálních technik se teorie chromozomálních teritorií rozšířila o několik nových modelů, které se sice v některých ohledech liší, ale jejich základní myšlenka zůstává prakticky neměnná.

Umístění jednotlivých chromozomálních teritorií v interfázním jádře není náhodné, ale je pravděpodobně ovlivněno genovou hustotou. Chromozomy, které ve srovnání s ostatními obsahují větší množství genů a obecně tedy

vykazují i vyšší transkripční aktivitu, jsou během interfáze umístěny blíže středu buněčného jádra, zatímco genově méně zastoupené a méně transkripčně aktivní chromozomy bývají lokalizovány na jaderné periférii. Jako příklad bývá uváděn známý případ chromozomů 18 a 19, které se vyznačují velmi podobnou velikostí, avšak rozdílnou genovou hustotou. Chromozom 19, který je charakteristický vysokým počtem genů se u většiny buněčných typů nachází blíže středu jádra než geny méně zastoupený chromozom 18 (Boyle *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 1999).

Jadérko a jeho význam

Jadérko je nápadná buněčná struktura, viditelná během interfáze. Ačkoliv se v každé buňce zpočátku formuje základ pro několik jadérek, tyto „pre-jadérka“ začnou brzy fúzovat a většina savčích buněk má tedy obvykle jedno až čtyři jadérka, která zodpovídají za syntézu ribozomální RNA (rRNA) (Olson, 2004). Samotné transkripci rRNA předchází tvorba preiniciačního komplexu (pre-initiation complex – PIC) (shrnutí v (Bártová *et al.*, 2010)). PIC obsahuje SL1 (selectivity factor 1) a UBF faktory (upstream binding factor) (obr. 4C), které pravděpodobně ovlivňují navázání RNA Pol I na promotor přepisovaného genu (obr. 4D ukazuje zastoupení RPA194 podjednotky RNA Pol I v jadérku). UBF a další součásti PIC navázané na promotor genu jsou také zodpovědné za topologické změny v rDNA (Grummt, 2003; Learned *et al.*, 1985; Prieto a McStay, 2008).

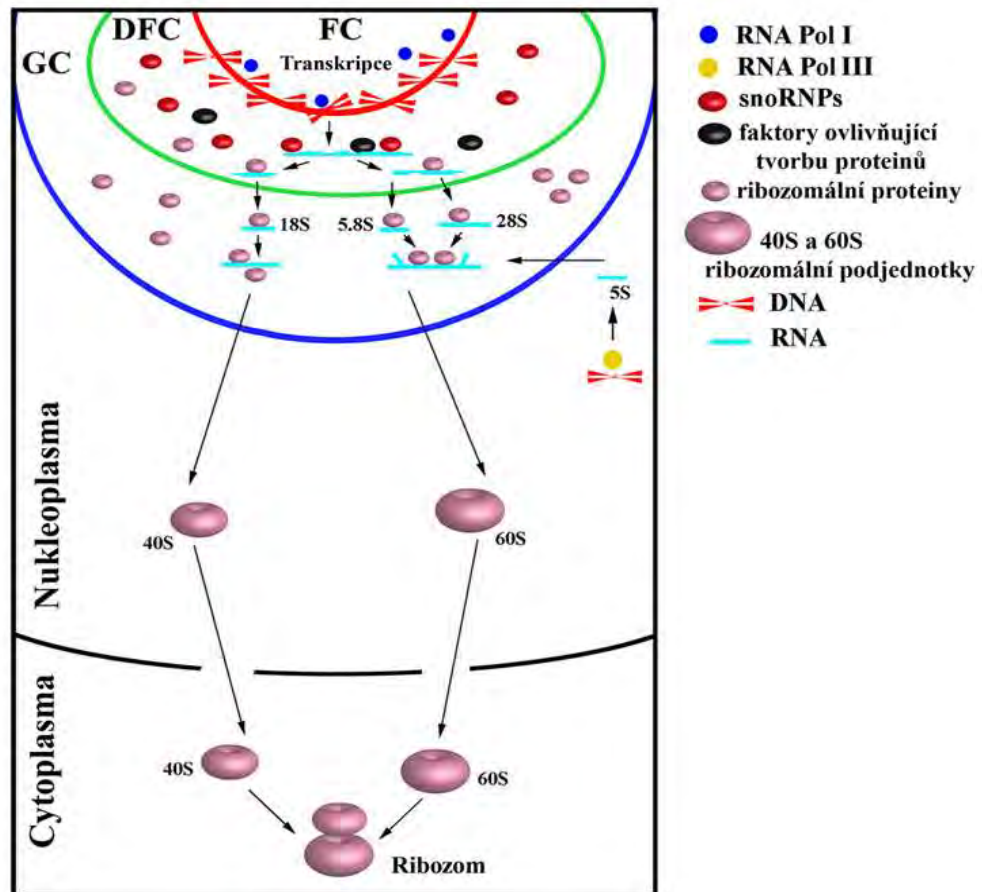
Hlavní funkce jadérka jsou následující: transkripce rDNA genů, syntéza pre-ribozomálních podjednotek, přidávání proteinů k pre-ribozomálním podjednotkám, úpravu primárních transkriptů do podoby 18S, 5.8S a 28S rRNA a začlenění 5S rRNA, která je RNA polymerázou III syntetizovaná mimo jadérko (shrnutí v (Bártová *et al.*, 2010)). Syntéza rRNA, respektive tvorba ribozomálních podjednotek, není jedinou funkcí jadérka. Existuje mnoho důkazů i pro další funkce. Optimální funkce jadérka jsou například zásadní z hlediska regulace buněčného cyklu, stresových odpovědí buňky, pochodu stárnutí. Změny v uspořádání jadérek se objevují i u maligně transformovaných buněk. Faktory obsažené v jadérku dále hrají významnou roli v boji proti virovým infekcím (shrnutí v Boisvert *et al.*, 2007; Raška *et al.*, 2006).

Vzhledem k tomu, že ribozomy jsou nezbytné k translaci, syntéze polypeptidových řetězců a bílkovin, je zcela pochopitelné, že nejlépe probádanou funkcí jadérka nadále zůstává tvorba ribozomálních podjednotek. Tento komplexní proces je zahájen už samotnou formací tří dynamických částí jadérka, jako je fibrilární centrum (fibrillar centers - FCs), denzní fibrilární komponenty (dense fibrillar components - DFCs) a granulární komponenty (granular components - GCs) (obr. 5). Jadérko není obklopeno membránou, ale je z velké části formováno perinukleárním chromatinem, jehož charakteristickým znakem je vysoký stupeň metylace DNA (vysvětleno níže). Z hlediska tvorby a funkce jadérka jsou velice důležité takzvané organizátory jadérka (NORs - Nucleolus Organizer Regions). Oblasti NORs jsou v lidském genomu rozmístěny na krátkých raméncích akrocentrických chromozomů 13,

14, 15, 21 a 22 (Fatica a Tollervey, 2002; Henderson *et al.*, 1972), u myši se nacházejí na chromozomech 12, 15, 16, 17, 18 a 19 (Dev *et al.*, 1977). Každá z oblastí NORs je tvořena krátkými sekvencemi rDNA, tzv. transkripčními jednotkami. Transkripční jednotky rDNA jsou u savců poměrně rozsáhlé, v lidské DNA tvoří oblasti o velikosti ≈ 43 kb, u myši ≈ 45 kb (McStay a Grummt, 2008). Každou transkripční jednotku lze dále rozdělit do dvou částí. První částí je sekvence kódující prekurzory rRNA (pre-rRNA), tedy úsek DNA dlouhý 13-14 kb, za kterým následuje nepřepisovaný mezerník oddělující jednotlivé geny (intergenic spacer – IGS) o přibližné délce 30 kb (McStay a Grummt, 2008).

Struktura aktivně přepisovaných rDNA genů byla poprvé popsána na základě výzkumu oocytů obojživelníků v roce 1969 (Raška *et al.*, 2004). Dá se říci, že uspořádání přepisované rDNA je v mnoha ohledech podobné uspořádání transkripčně aktivních genů kódujících pre-mRNA. Tak jako transkripčně aktivní geny, kódující pre-mRNA, vybíhají v podobě smyček vně příslušného chromozomálního teritoria (obr. 6A), tak i ribozomální geny jsou uspořádané do podoby takzvaných „vánočních stromů“ (Christmas trees; obr. 6B) (shrnuto v (Bártová *et al.*, 2010)). Pomyslné větve tohoto stromu, tvořené aktivními rRNA geny a vznikající pre-rRNA, vybíhají od masy nepřepisované rDNA tvořící základ „vánočního stromu“ (Koberna *et al.*, 2002).

Stejně jako mRNA vzniká uvnitř transkripčních továren (obr. 6A), tak i aktivní ribozomální geny jsou lokalizované uvnitř jadérka, které jak bylo řečeno, představuje největší transkripční továrnu buněčného jádra. Avšak vzhledem k vysoké kompaktnosti jadérka je obtížné určit přesné místo transkripce ribozomálních genů (Koberna *et al.*, 2002). Je jisté, že počáteční fáze syntézy ribozomů se odehrávají v centrálních částech jadérka, zatímco dosyntetizování ribozomálních podjednotek je lokalizováno na jeho okraji (Shaw *et al.*, 1995; Thiry *et al.*, 2000). Používání rozdílných experimentálních technik a způsobů vizualizace však značně ovlivňuje získané výsledky, a tak ani po více než dvaceti letech diskuzí nelze s konečnou platností určit kompartment jadérka, ve kterém transkripce probíhá (Boisvert *et al.*, 2007; Raška, 2003). Jak již bylo zmíněno, FCs obsahují velké množství ribozomálních genů. Otázkou však zůstává, zda jsou tyto geny transkripčně aktivní či nikoliv. Lokalizace transkripčně aktivních genů zůstává i nadále předmětem diskuzí. Někteří usuzují, že transkripčně aktivní geny se nacházejí převážně v FC (např. (Thiry *et al.*, 2000)), jiní za místo transkripce rDNA genů považují hranici mezi FC a DFC (např. (Boisvert *et al.*, 2007; Cheutin *et al.*, 2003); obr. 5), další autoři tento proces lokalizují do DFC (např. Raška, 2003). Celý průběh transkripce je ovlivněn mnoha faktory, které se vzájemně značně ovlivňují. Některé z nich již byly v krátkosti zmíněny, ale nejnápadnějším způsobem, jak buňka reguluje transkripční aktivitu genů kódujících jak pre-mRNA, tak rRNA zůstávají epigenetické modifikace DNA a asociovaných histonů.

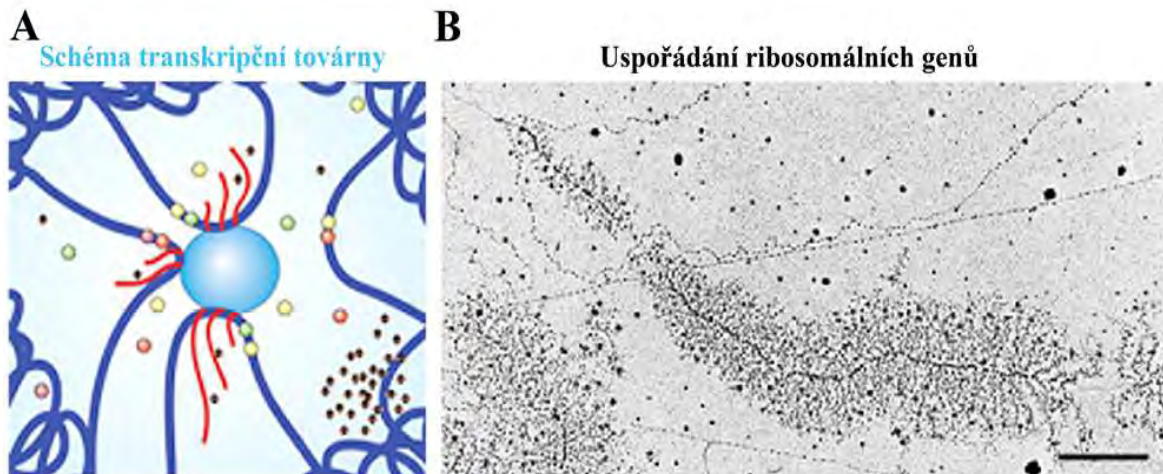


Obr. 5: Schéma syntézy ribozomů. Jednotlivé kompartmenty jádřka jsou označeny: fibrilární centrum (fibrillar centers - FCs), denzní fibrilární komponenty (dense fibrillar components - DFCs) a granulární komponenty (granular components - GCs). Přepis genetické informace z rDNA do rRNA je na tomto obrázku lokalizována na hranici FC a DFC. Následuje štěpení pre-rRNA v DFC, úpravy rRNA, tvorba ribozomálních podjednotek v GC a jejich transport do cytoplasmy. Převzato z Boisvert *et al.* (2007) a upraveno podle Bártová *et al.* (2010).

Epigenetické úpravy histonů

Nejznámějšími faktory, které regulují jaderné procesy, jsou epigenetické modifikace DNA a histonů. Tyto modifikace mají za následek změnu chromatinové struktury, přičemž pořadí nukleotidů v řetězci DNA zůstává zachováno. Prakticky se jedná o biochemické substituce probíhající na DNA a histonech, které mají za následek změnu konformace chromatinu s níž se pojí například rozdílná přístupnost chromatinu právě pro transkripční nebo reparační faktory.

Toto obecné schéma platí i pro speciální případ rDNA nacházející se v jádřku. Zde epigenetický stav rDNA genů udržuje integritu jádřka a samozřejmě zodpovídá i za jejich aktivní transkripci či umlčení (Bártová *et al.*, 2010). Podobně jako zbytek jaderné DNA je i rDNA v jádřku modifikována nejrůznějšími epigenetickými faktory. Jedná se především o metylaci DNA a



Obr. 6: Porovnání transkripce genů kódujících rRNA a pre-mRNA. **A:** Schéma transkripční továrny; modrý kruh uprostřed obrázku označuje akumulaci RNA Pol II. Dále jsou znázorněna vlákna DNA (tmavě-modrá), která na smyčkách vybíhají vně odpovídajícího chromozomálního teritoria. Červeně jsou označeny vznikající transkripty genů, kódujících pre-mRNA a drobná kolečka znázorňují transkripční faktory účastnící se transkripce. Převzato z Chakalova a Fraser (2010). **B:** Na obrázku je znázorněna struktura „vánočního stromu“ myší buňky zachycená elektronovým mikroskopem. Transkripčně aktivní ribosomální geny jsou umístěny na pomyslných větvích tohoto stromu. Převzato z Raška (2003).

modifikace s ní asociovaných histonů. Histony jsou bazické proteiny obsahující 20 až 30 % argininu a lyzinu, dvou kladně nabitých aminokyselin (Snustad a Simmons, 2009). Nechráněné skupiny $-NH_3^+$ argininu a lyzinu jsou důležité při interakci histonů se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA. Skupiny $-NH_3^+$ se vyskytují na aminoterminálních koncích i v samotném jádře histonu. Pro epigenetické modifikace jsou však kvůli své výborné přístupnosti důležité především skupiny lokalizované na volných koncích histonů, kde probíhá i většina jejich modifikací (obr. 2).

Histony (obr. 2 a 4E, F) mohou být modifikovány mnoha způsoby. Na histonech existuje více než 60 odlišných reziduí, které mohou být nejméně osmi způsoby upraveny, přičemž některé z modifikací mají několik variant (Jenuwein, 2006; Kouzarides, 2007). Jako příklad bývá uváděna metylace lyzinu a argininu, která se může vyskytovat ve třech formách pro každý z nich, přičemž lyzin může být mono-, di- nebo tri-metylován a arginin může být mono-metylován nebo symetricky či asymetricky di-metylován (Kouzarides, 2007). Z uvedeného faktu je zřejmé, že pro histony existuje obrovské množství variant epigenetických modifikací. Musíme mít však na paměti, že každé reziduum může být modifikováno pouze některými z uvedených způsobů a také že některé modifikace se vzájemně vylučují. Tedy jeden histon nemůže být v určitém okamžiku modifikován všemi možnými způsoby.

Všechny histony jsou evolučně velmi konzervativní, přičemž mezi organizmy je největší podobnost u histonů H3 a H4. Lze tedy vytvořit obecná pravidla následků jednotlivých modifikací, takzvaný histonový kód: konkrétní

chemická modifikace určité aminokyseliny v určitém histonu vede buď k transkripční aktivaci nebo inaktivaci. Obecně lze tedy modifikace histonů rozdělit do dvou skupin: první z nich navozuje takové změny chromatinu, které mají za následek transkripční aktivitu, druhá skupina modifikací se naopak pojí s transkripčně neaktivním chromatinem (Kouzarides, 2007). Struktura transkripčně aktivního chromatinu je charakteristická například hypometylací DNA, acetylací histonu H3 a H4 a di-metylací histonu H3 v pozici lyzinu 4 (H3K4). Struktura transkripčně neaktivního chromatinu je specifická svou hypoacetylací histonu H3 a H4, metylací histonu H3 v pozici lyzinu 9 (H3K9), metylací histonu H4 v pozici lyzinu 20 (H4K20) a CpG hypermetylací (obr. 2) (Lawrence *et al.*, 2004; Santoro *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). Skutečnost je ovšem mnohem složitější – některé modifikace se mohou pojit jak s transkripčně aktivním, tak i neaktivním chromatinem a závisí pouze na vlivu dalších faktorů (Kouzarides, 2007). Jako příklad bývá uváděna metylace histonu H3 v pozici lyzinu 36 (H3K36), která je v kódující oblasti znakem transkripčně aktivního chromatinu a v oblasti promotoru naopak slouží k umlčení příslušného genu. Dalším příkladem je metylace H3K9, která má pravděpodobně stejný efekt: v oblasti promotoru slouží k inaktivaci transkripce, v kódujícím regionu k její aktivaci.

Metylace DNA

Metylace DNA je post-replikační úprava chromatinu, která probíhá téměř výlučně na cytosinu (v pozici C5) v dinukleotidech CpG (takzvané CpG ostrůvky), které se nacházejí především v oblasti promotoru genu (McStay a Grummt, 2008). Metylace zprostředkují DNA metyltransferázy (DNMT), běžně rozdělované do tří podrodin: DNMT1, DNMT2 a DNMT3, přičemž u člověka nejvyšší aktivitu vykazují metyltransferázy DNMT1, DNMT3a a DNMT3b (Grummt a Pikaard, 2003). DNMT1 rozeznávají po replikaci DNA dinukleotid CpG na nově syntetizovaném vlákně a odpovídají tedy za udržovací metylace. DNMT3 mají schopnost metylovat *de novo* a působí během rané fáze ontogenetického vývoje, kdy je nastavován metylační profil buněk.

Metylace DNA je typickým znakem heterochromatinu, přičemž čím více je DNA metylována, tím méně jsou geny transkripčně aktivní. Metylace DNA může způsobovat změny v konformaci chromatinu, ale také se vyskytuje v oblastech promotorů typicky se pojících s CpG ostrůvky. Zde dochází k metylaci cytozinu tím způsobem, že metylová skupina směřuje do velkého žlábků DNA, kde brání vazbě transkripčních faktorů a také slouží k navázání dalších inhibitorů transkripce. Například metylace CpG ve specifických oblastech rDNA znemožňuje vazbu UBF faktoru k templátové DNA, zabraňuje tak zformování iniciačního komplexu PIC a inhibuje tedy iniciaci transkripce rDNA genů (Grummt a Pikaard, 2003; McStay a Grummt, 2008; Santoro a Grummt, 2001).

Acetylace histonů

První popsanou modifikací histonů byla acetylace, která zodpovídá za strukturu transkripčně aktivního euchromatinu a je zprostředkována

histonovými acetyltransferázami (HATs). Acetyltransferázy bývají rozdělovány do tří rodin: GNAT, MYST a CBP/p300 (Sterner a Berger, 2000). Histonové deacetylázy (HDACs) zodpovídají za opačný proces, způsobují tedy inaktivaci transkripce. Deacetylázy jsou také rozdělovány do tří rodin: histonové deacetylázy I. a II. třídy, závislé na zinku (Zn), a III. třídy zahrnující enzymy rodiny sirtuinů (Sir), závislé na NAD (Nikotinamid Adenin Dinukleotid).

Acetyltransferázy modifikují ϵ -aminoskupinu lyzinu, což vede ke snížení jeho bazicity (Kouzarides, 2007; Rice a Allis, 2001). Tím je neutralizován kladný náboj amino-terminálních konců histonů a následně omezena schopnost histonů interagovat se záporně nabitou DNA. Acetylace tedy způsobuje rozvolnění chromatinové struktury a zpřístupňuje tak DNA transkripčním faktorům a dalším enzymům (Kouzarides, 2007). Naopak deacetylace histonů způsobuje vyšší bazicitu histonů, umožňuje jejich vazbu k molekule DNA a vznik struktury transkripčně neaktivního chromatinu. Uvedené procesy lze jen stěží pozorovat *in vivo*, bylo ale prokázáno, že například H4K16 acetylace má negativní vliv na formování 30nm chromatinových vláken a vyšších struktur a umožňuje tak vznik struktury transkripčně aktivního chromatinu.

Acetylace probíhá především na N-terminálních koncích histonů, které jsou pro acetyltransferázy dobře přístupné (Kouzarides, 2007). Byla však prokázána také acetylace histonu H3 v pozici lyzinu 56 (H3K56) probíhající v oblasti nukleozomového jádra. Reziduum K56 je na nukleozomu umístěno tak, že směřuje do velkého žlábků DNA a má tedy výhodnou pozici na ovlivnění interakce mezi histonem a DNA.

Acetylace H3K9, typický znak transkripčně aktivního chromatinu, má také vliv na umístění daného lokusu v jádře. Podle Strašáka *et al.* (2009) (Strašák *et al.*, 2009) jsou lokusy s vysokou mírou acetylace umístěny ve středu buněčného jádra, zatímco méně acetylované se nacházejí na jeho periférii. Uvedené údaje korelují s polohou rDNA, kolem níž se formuje jadérko, které je lokalizované v jaderném středu. Stupeň acetylace samozřejmě také ovlivňuje další histonové modifikace. Například deacetylace specifických lyzinových reziduí (např. deacetylace H3K9) předchází metylaci H3K9, DNA metylaci a navázání HP1 proteinu zodpovědného za formování heterochromatinu (Zhang a Reinberg, 2001).

Metylace histonů

Ačkoliv metylace probíhá na lyzinu a argininu (Bannister a Kouzarides, 2005), v souvislosti s jadérkem byla prozkoumána pouze metylace lyzinu zprostředkovaná lyzinovými metyltransferázami. Lyzinové metyltransferázy vykazují vysokou specifitu srovnatelnou se specifitou acetyltransferáz (Kouzarides, 2007). Dá se říci, že tyto metyltransferázy ve většině případů modifikují pouze určitý lyzin určitého histonu (Bannister a Kouzarides, 2005). Jako příklad bývá uváděna metyltransferáza SUV39h1 jenž je zodpovědná za tri-metylací H3K9 nebo metyltransferáza G9a zodpovědná za mono-metylací a di-metylací téže pozice (Kouzarides, 2007).

Teprve nedávno byly objeveny histonové demetylázy jako je lyzin-specifická demetyláza (LSD1) zodpovědná za de-metylaci H3K4, enzym JHDM1 zodpovědný za de-metylaci H3K36, JHDM2 působící proti tri-metylaci H3K9 perinukleárního heterochromatinu nebo JHDM1B způsobující v jádru de-metylaci H3K4 (shrnutí v (Bártová *et al.*, 2010)).

Narozdíl od acetylace může metylace histonů transkripci genů podporovat i inhibovat. Transkripční aktivita například koreluje s H3K4, H3K36 a H3K79 metylací, přičemž metylace H3K4 a metylace H3K36 je důležitá pro elongaci transkriptu (Kouzarides, 2007; Lawrence *et al.*, 2004; Santoro a Grummt, 2005; Santoro *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). S inaktivací transkripce je spojována H3K9, H3K27 a H4K20 metylace (obr. 2). Metylová skupina je však poměrně malá a není pravděpodobné, že by sama o sobě mohla výrazně ovlivnit záporný náboj lyzinu a argininu, jako je tomu v případě acetylové skupiny (Bannister a Kouzarides, 2005; Santoro a Grummt, 2005). Mnohem pravděpodobnější je možnost, že metylová skupina vytváří vazebné místo pro regulační proteiny a deacetylázy. Například pro histonové metyltransferázy zprostředkovávající H3K9 metylaci je typická evolučně stabilní chromodoména shodná s HP1 proteiny. Právě tyto metyltransferázy (jako je SUV39h1 a SUV39h2) plně zodpovídají za vazbu HP1 proteinů v oblastech heterochromatinu (shrnutí v (Kouzarides, 2007)).

HP1 protein byl objeven v pericentromerických a telomerických regionech chromozomů octomilky *Drosophila melanogaster* James a Elgin, 1986). V lidských a myších buňkách byly postupně identifikovány jeho tři podtypy: HP1 α , HP1 β a HP1 γ , které se významně podílejí na remodelaci chromatinu (Bártová *et al.*, 2005) (obr. 4A, B). Navzdory vzájemné podobnosti ve struktuře a biochemických vlastnostech se jednotlivé varianty HP1 výrazně liší ve svých funkcích a své jaderné lokalizaci (shrnutí v (Dialynas *et al.*, 2007). Zatímco výskyt HP1 α je spojován se strukturou heterochromatinu, HP1 β a HP1 γ bývají v interfázním jádře a především v jádru lokalizovány jak v heterochromatinu, tak i v euchromatinu (Bártová *et al.*, 2005; Minc *et al.*, 1999). Například bylo prokázáno, že pokud se H3K9 metylace spolu s γ isoformou HP1 vyskytuje v kódujícím regionu genu, může být tento gen transkripčně aktivní (Kouzarides, 2007). Tento jev nebyl doposud plně objasněn; předpokládá se však, že zatímco H3K9 metylace v oblasti promotoru genu způsobuje inaktivaci transkripce, totožná modifikace v kódující oblasti může mít opačný efekt. Díky tomuto poznatku bylo vyvráceno dogma o propojení HP1 výlučně s transkripčně neaktivním chromatinem (Bártová *et al.*, 2010; Dialynas *et al.*, 2007; Santoro a Grummt, 2005).

V jádru se HP1 β vyskytuje v perinukleárním chromatinu a ve vysoké koncentraci byl detekován i v částech jádru obsahujících bílkovinu fibrilarin (Horáková *et al.*, 2010), tudíž je vysoce pravděpodobné, že HP1 β se v jádru paradoxně účastní regulace transkripce. Výskyt HP1 α a HP1 γ se také pojí s kompartmenty obsahujícími fibrilarin, ovšem koncentrace těchto sub-typů v jádru je v porovnání s koncentrací HP1 β mnohem nižší (Horáková *et al.*, 2010).

HP1 v jadérku slouží jednak k udržení jeho struktury, jednak k regulaci transkripce. Například di-metylace H3K9 asociovaná s HP1 γ a CSB proteinem má pozitivní vliv na transkripci rDNA genů (shrnuto v Bártová *et al.*, 2010)). Naopak interakce mezi histonem H3 metylovaným v pozici lyzinu 9 a HP1 α udržuje stabilitu perinukleárního heterochromatinu, který tvoří jadérko.

Závěrem lze říct, že epigenetické faktory, především post-translační modifikace histonů a metylace DNA představují slibné cíle pro terapeutické zásahy, kterými by bylo možné měnit strukturu chromatinu, a tak cíleně regulovat transkripci genů zodpovědných za příslušná onemocnění.

Poděkování

Článek byl koncipován na základě poznatků shrnutých v bakalářské práci Jany Suchánkové a o některé nové poznatky byl rozšířen. Výzkum laboratoře Biofyzikálního ústavu Akademie věd byl podpořen projekty Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR: LC06027, LC535, ME 919 a projektem COST-CZ LD11020.

Literatura

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K *et al* (1998). Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. *Espero Publishing, Ústí nad Labem*.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2005). Reversing histone methylation. *Nature* 436: 1103-6.
- Bártová E, Horáková AH, Uhlířová R, Raška I, Galiová G, Orlova D *et al* (2010). Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. *J Histochem Cytochem* 58: 391-403.
- Bártová E, Pacherník J, Harničarová A, Kovařík A, Kovaříková M, Hofmanová J *et al* (2005). Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci* 118: 5035-46.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascues J, Lamond AI (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 574-85.
- Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* 10: 211-9.
- Campbell NA, Reece JB (2006). Biologie. *Computer Press, Brno*.
- Cremer T, Cremer C (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2: 292-301.
- Cremer T, Cremer M (2010). Chromosomal territories. *The nucleus. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*: 93-114.
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145: 1119-31.

- Dev VG, Tantravahi R, Miller DA, Miller OJ (1977). Nucleolus organizers in *Mus musculus* subspecies and in the RAG mouse cell line. *Genetics* 86: 389-98.
- Dialynas GK, Terjung S, Brown JP, Aucott RL, Baron-Luhr B, Singh PB *et al* (2007). Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *J Cell Sci* 120: 3415-24.
- Fatica A, Tollervey D (2002). Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14: 313-8.
- Felsenfeld G, Groudine M (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-53.
- Grummt I (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 17: 1691-702.
- Grummt I, Pikaard CS (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 641-9.
- Henderson AS, Warburton D, Atwood KC (1972). Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 3394-8.
- Hernandez-Verdun D (2006). Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 125: 127-37.
- Horáková AH, Bártová E, Galiová G, Uhlířová R, Matula P, Kozubek S (2010). SUV39h-independent association of HP1 beta with fibrillar-positive nucleolar regions. *Chromosoma* 119: 227-41.
- Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T (2003). Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299: 721-5.
- James TC, Elgin SC (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* 6: 3862-72.
- Jenuwein T (2006). The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J* 273: 3121-35.
- Koberna K, Malinský J, Pliss A, Mašata M, Večeřová J, Fialová M *et al* (2002). Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" in situ. *J Cell Biol* 157: 743-8.
- Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8: 104-15.
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N *et al* (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* 13: 599-609.
- Learned RM, Cordes S, Tjian R (1985). Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specificity to human RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* 5: 1358-69.
- McStay B, Grummt I (2008). The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 131-57.

- Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC, Buendia B (1999). Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108: 220-34.
- Olson MOJ (2004). The Nucleolus. *Springer, New York*.
- Prieto JL, McStay B (2008). Pseudo-NORs: a novel model for studying nucleoli. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2116-23.
- Raška I (2003). Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol* 13: 517-25.
- Raška I, Koberna K, Malinský J, Fidlerová H, Mašata M (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 96: 579-94.
- Raška I, Shaw PJ, Cmarko D (2006). New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol* 255: 177-235.
- Rice JC, Allis CD (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 263-73.
- Santoro R, Grummt I (2001). Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol Cell* 8: 719-25.
- Santoro R, Grummt I (2005). Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Mol Cell Biol* 25: 2539-46.
- Santoro R, Li J, Grummt I (2002). The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* 32: 393-6.
- Shaw PJ, Highett MI, Beven AF, Jordan EG (1995). The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *EMBO J* 14: 2896-906.
- Snustad DP, Simmons MJ (2009). Genetika. *Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno*.
- Sterner DE, Berger SL (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 435-59.
- Strašák L, Bártová E, Harničarová A, Galiová G, Krejčí J, Kozubek S (2009). H3K9 acetylation and radial chromatin positioning. *J Cell Physiol* 220: 91-101.
- Thiry M, Cheutin T, O'Donohue MF, Kaplan H, Ploton D (2000). Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA* 6: 1750-61.
- Yokota H, van den Engh G, Hearst JE, Sachs RK, Trask BJ (1995). Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus. *J Cell Biol* 130: 1239-49.
- Zhang Y, Reinberg D (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15: 2343-60.
- Zhou Y, Santoro R, Grummt I (2002). The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 21: 4632-40.

Jana Suchánková



Lenka Stixová



Eva Bártová



Korespondence: Doc. RNDr. Eva Bártová, CSc. (e-mail: bartova@ibp.cz). Eva Bártová je vedoucí skupiny řešící strukturu a funkci chromatinu v Biofyzikálním ústavu AV ČR v Brně. Skupina se dále zabývá epigenetickými procesy, především post-translačními modifikacemi histonů. EB přednáší Molekulární fyziologii genomu na PŘF Masarykovy univerzity v Brně.

Epigenetika a sexualita

Boris Vyskot

Oddělení vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.
Královopolská 135, 612 65 Brno

Definice oboru

Epigenetika byla původně chápána jako suma změn genové exprese, které vedou k diferenciaci v ontogenezi. Po pochopení určitých mechanismů epigenetických procesů byla epigenetika považována za tzv. chromatinovou dědičnost, tedy že o expresi či umlčování genů rozhoduje stav chromatinového templátu. Po objevu regulačních úloh malých molekul RNA je situace ještě složitější, neboť jejich úloha se týká především posttranskripčních regulací. Dnes tedy epigenetiku můžeme chápat jako široký soubor mechanismů, které dědičně ovlivňují genovou expresi beze změny primární genetické informace. Dědičnost může fungovat jen v buněčných liniích (v průběhu života jedince) nebo transgeneračně, tedy předávána do pohlavních generací. Jde však prakticky vždy o procesy reverzibilní, tedy potenciálně vratné v řádově vyšších frekvencích, než je tomu u genetických mutací. Některé typy epigenetických změn jsou relativně velmi nestálé, potom hovoříme o vyznívající dědičnosti. Zpočátku se zdálo, že epigenetika je omezena jen na náhodné jevy, tzv. epimutace, a její význam je jen okrajový. Dnes se ukazuje, že epigenetické řízení genové exprese je v říši eukaryotických organismů univerzální. Pouze můžeme konstatovat, že dílčí molekulární epigenetické mechanismy (např. metylace DNA) jsou u různých skupin eukaryot (jako jsou například kvasinky, rostliny, prvoústí či druhoústí živočichové) odlišné.



Prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc. při své přednášce na Genetické konferenci GSGM v Lednici (dne 16. 9. 2011).

Vymezení epigenetiky

Je zjevné, že podstatou epigenetických procesů jsou geny, resp. genetická informace. Tato genetická informace však nezbytně nemusí být uložena jen v DNA, ale též v dalších informačních molekulách, jako jsou RNA či proteiny. Vztah genetiky a epigenetiky je snad možné vyjádřit příměrem s knihou (která obsahuje veškerý text či genetickou informaci) a jejím čtením (ne vše co je napsáno, tak čteme, a to ještě různým způsobem a v různém čase). Epigenetika zdůrazňuje vliv podmínek životního prostředí na expresi genů. Všechny molekuly, které hrají roli v epigenetických procesech, jsou samozřejmě kódovány geny. Jaký smysl má tedy vůbec vymezovat předmět epigenetika? Klasická či molekulární genetika dostatečně nevysvětluje řadu mechanismů nemendelistické dědičnosti. Úlohou epigenetiky je tyto mechanismy objasňovat a nacházet v nich kauzální faktory a zákonitosti.

Epigenetika a reprodukce

Zajímavá je otázka vztahu epigenetiky a reprodukce. Na řadě příkladů eukaryotických modelů bylo demonstrováno, že tyto procesy jsou těsně spřaženy. U prvoků (například u trepky) jde především o epigenetický přenos informace z makrojádra do mikrojádra další generace, což je v příkrém rozporu s jeho původem. Jak samozřejmě víme, makrojádru po procesech konjugace či autogamie zaniká, takže teoreticky by žádná (epigenetická) informace z makrojádra neměla přecházet do další generace. Příčinou tohoto nestandardního přenosu jsou zřejmě malé molekuly RNA, které se přenášejí v cytoplazmě. Podobně zajímavá je situace u jiných jednobuněčných eukaryot – kvasinek. V průběhu vegetativního růstu se kvasinky množí pouhým pučením, což by vedlo k rozsáhlé akumulaci jednoho ze dvou pohlavních typů

v populaci. Proto vždy jedna z mateřských buněk po dělení změní své pohlaví cestou tzv. genové konverze: vlastní pohlavní lokus (MAT) je rozštěpen a na jeho místo se vreplicuje kopie náhradního pohlavního lokusu. Tyto náhradní pohlavní lokusy jsou v genomu kvasinek silně heterochromatické, aby omylem nedocházelo k jejich vlastní duplicitní expresi. Prvním jednoduchým eukaryotickým modelem, u kterého se vyvinul mechanismus metylace cytozinu v DNA je plíseň chlebová. V průběhu životního cyklu plísně dochází minimálně ke třem epigenetickým jevům, kde se metylace DNA uplatňují. Nejznámějším z nich jsou repetitivně indukované bodové mutace (RIP). Dochází k nim při pohlavním rozmnožování, kdy před karyogamií nastává ještě v heterokaryonu kontrola obou haploidních genomů. Pokud systém najde nadpočetnou (repetitivní) sekvenci DNA, tato je ihned inaktivována metylací cytozinu. Metylovaný cytozin je vzápětí deaminován, takže dochází k víceméně ireverzibilní změně – bodové mutaci C → T.

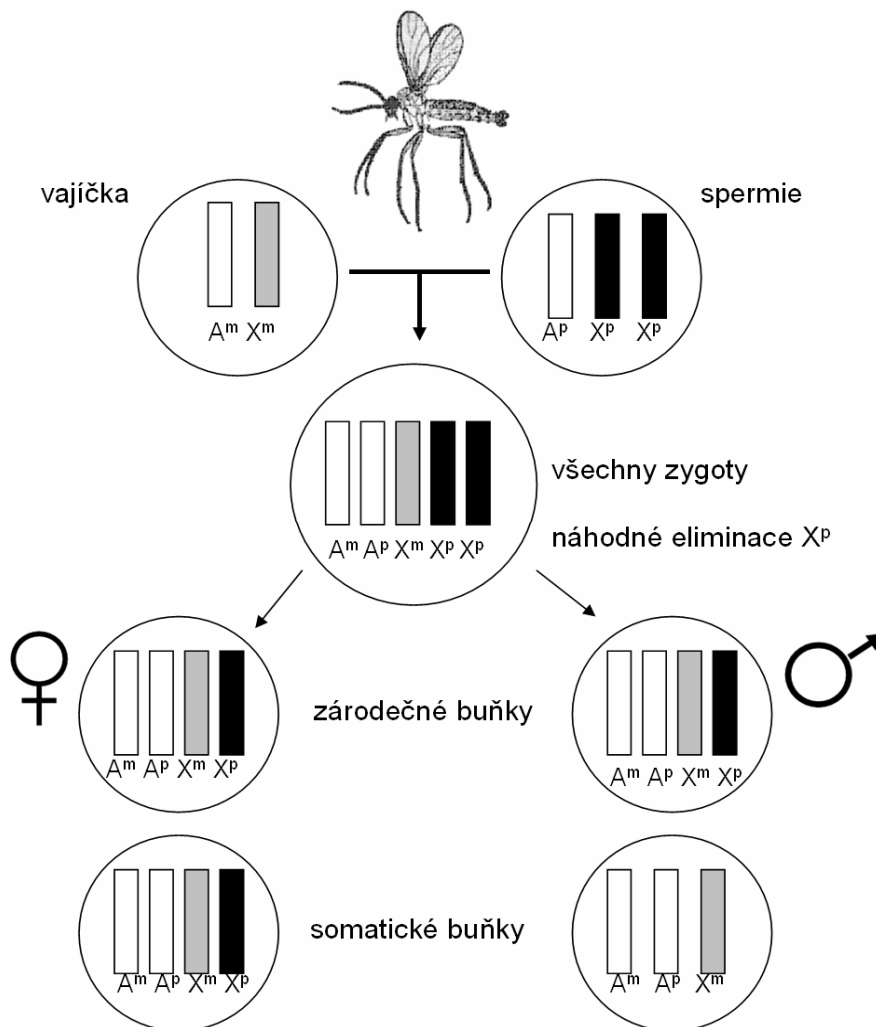
Epigenetické jevy u hmyzu

U drozofily se setkáváme s jediným dosud známým pozitivním typem dávkové kompenzace genů vázaných na chromozom X. Jediný chromozom X v buňkách samečka je díky zvýšené acetylaci nukleozomálních histonů hyperaktivní, takže hladina X-produktů je v buňkách samic a samečků drozofily přibližně shodná. Úloha metylací DNA dosud nebyla u drozofily prokázána, avšak zřejmě to neplatí o včele medonosné. Jedinci typu XX se v úlu vyvíjejí podle toho, jaká je jejich výživa. Při standardní výživě vznikají sterilní dělnice, zatímco (vzácně) larvy živěné mateří kašičkou směřují svůj vývoj k fenotypu plodné královny. Nedávné výzkumy prokázaly, že tato změna vývojového určení je zřejmě řízena metylací DNA: inhibice enzymu DNA metyltransferázy vedla k četnému výskytu královen. Detailní výsledky pak ukázaly, že u včely metylace cytozinu zřejmě narušují správný sestřih RNA. Velmi ojedinělým příkladem, kdy epigenetický charakter chromatinu determinuje pohlaví jedince je moucha smutnice (*Sciara coprophila*). U smutnice, podobně jako u drozofily či hlístice), rozhoduje o pohlaví poměr počtu chromozomů X vůči počtu sad autozomů. Při meióze u samečka dochází inherentně k non-disjunkci chromozomů X, takže všechny spermie mají dva chromozomy X a všechny zygoty jsou trizomické (obr. 1). V časném vývinu embrya však dochází ke ztrátě jednoho nebo obou paternálních chromozomů X: vznikají tak samičky (AAXX) respektive samečci (AAX). Tento jev byl pozorován již v polovině 20. století a byl nazván parentálním imprintingem.

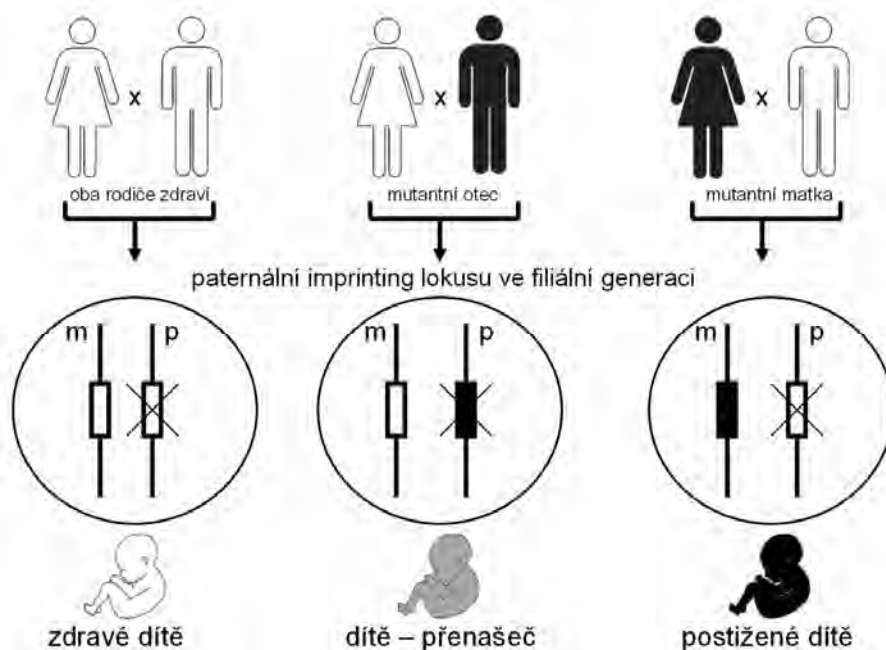
Genomový imprinting

Genomový imprinting byl poprvé pozorován u savců v osmdesátých letech minulého století na základě experimentů s přenosem jader po oplození oocyty spermií u myši. Bylo prokázáno, že samicí a samčí genom nejsou ekvivalentní, tedy ke zdárnému vývinu embrya je třeba kombinace samicího a samčího jádra. Genomový imprinting je definován jako reverzibilní proces, při kterém je pravidelně umlčována určitá alela v závislosti na pohlaví rodiče, od

kterého je zděděna. Genomový imprinting se evolučně vyvinul jako součást války pohlaví (či parentálního konfliktu) u druhů, kdy embryonální vývin jedince se odehrává uvnitř těla matky. Smyslem imprintingu tedy zřejmě je zajišťovat rovnováhu exprese paternálních (obvykle růst-podporujících) a maternálních (obvykle růst-potlačujících) alel. Důsledkem imprintingu je potom monoalelická exprese asi jedné stovky lokusů v lidském genomu, což může v kombinaci s genetickými defekty (jako jsou bodové mutace, delece, či translokace) způsobovat výskyt řady vážných vrozených chorob (obr. 2). Dosud byl genomový imprinting popsán u savců a krytosemenných rostlin a jistě souvisí mj. i s metylací cytozinu. Imprintingový záznam vzniká při gametogenezi, což zaručuje tvorbu pohlavně specifického záznamu u samců a samic. Specifický imprinting vykazuje chromozom X, který je v trofektodermu embryí myších samic zásadně inaktivován ve své paternální kopii.



Obr. 1: Epigenetická determinace pohlaví u mouchy smutnice, *Sciara coprophila*. Pohlaví je primárně určováno poměrem počtu chromozomů X a sad autozomů. Samčí meióza je však atypická a po nondisjunkci vede k dizomickým spermům se dvěma chromozomy X. V časném embryonálním stádiu pak dochází k eliminaci buď jednoho (samice $X^m X^p / A^m A^p$) nebo obou paternálních chromozomů X (samečci $X^m 0 / A^m A^p$). Zárodečná linie obou pohlaví však má stejný genetický základ ($X^m X^p / A^m A^p$).



Obr. 2: Dědičnost mutace v paternálně imprintovaném lokusu v potomstvu člověka. Pokud jsou oba rodiče zdraví (vlevo), maternálně (m) zděděná alela se u dětí exprimuje a alela paternálního původu (p) je umlčena (křížek). Pokud je alela otce mutována (jako například bodovou mutací či delecí, uprostřed), v příští generaci se to neprojeví, protože tato alela je umlčena: dítě je však přenašečem choroby. Pokud je však mutována alela maternálního původu (vpravo), tato je v bezprostředním potomstvu díky paternálnímu imprintingu (jako jediná) exprimována a může se projevit fenotyp choroby – postižené dítě.

Genomový imprinting u rostlin?

Genomový imprinting u krytosemenných rostlin také souvisí se specifickou metylací DNA, má však podstatně jiný průběh i funkci. Byl dosud prokázán jen v několika desítkách lokusů a obvykle vede k umlčování alel paternálního původu. Nejznámějším imprintovaným genem u rostlin je gen *Medea*, který je po celý život inaktivován, pouze při vzniku samičího zárodečného vaku a vývinu endospermu jsou aktivovány jeho dvě maternální alely. Produktem genu *Medea* je protein typu Polycomb, který má za úkol potlačovat nadměrný vývin endospermu i embrya. Se zánikem endospermu při vývinu semene zaniká i imprintový záznam: genomový imprinting u rostlin tedy zjevně nemá reverzibilní charakter, jako je tomu u savců.

Epigenetická dědičnost u rostlin

Rostliny díky absenci pravé zárodečné linie i evoluci mnoha epigenetických mechanismů s adaptivní funkcí mají vyšší pravděpodobnost dědění změn získaných v průběhu života. Takové děděné změny bývají klasifikovány jako epimutace a jsou zodpovědné i za četné fenotypové změny v reprodukčním vývoji. Patří mezi ně například gen *Cycloidea*, jehož metylace vede ke změně květní symetrie, nebo katastrální gen *Superman*, který řídí velikosti oblasti květu, kde se vyvíjejí tyčinky a pestíky. Inaktivace transpozonů obvykle vede i k inaktivitě sousedních genů. Příkladem může být jednodomý

meloun, kde inserce a metylace transpozonu vedly k umlčení genu *CmWIP1* a konverzi samčích květů na samičí (tedy pohlavní reverze jednodomá → samičí rostlina). Indukovanou chemickou hypometylací genomu lze také navodit dědičnou pohlavní změnu samčí → hermafroditní rostlina u knotovky *Silene latifolia*. V nedávné době byl také prezentován první jednoznačný molekulární důkaz transgeneračního epigenetického přenosu. Technikou teplotního šoku byl rozkolísán genom *Arabidopsis thaliana* a došlo k rozsáhlé transkripci retroelementů. U standardního typu tvořícího siRNA byla tato invaze retroelementů potlačena, ale v mutantu s poruchou v syntéze siRNA došlo k jejich amplifikaci a v následující generaci k integraci do genomu. Tato práce ukazuje význam epigenetických mechanismů k obraně proti genomovým parazitům, ale také demonstruje, že změny získané v průběhu života rostliny mohou být jednoznačně děděny do dalších pohlavních generací.

Literatura

- Allis, C.D., Jenuwin, T., Reinberg, D., Caparro, M.L. (2007). Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Jaenisch, R., Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genet.* 33: 245-254.
- Jirtle, R.L., Skinner, M.K. (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Rev Genet.* 8: 253-262.
- Markoš, A. (1997) Povstávání živého tvaru. Vesmír, Praha.
- Portella, A., Esteller, M. (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnol.* 28: 1057-1068.
- Richards, E.J. (2006) Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. *Nature Rev Genet.* 7: 395-601.
- Schwartz, Y.B., Pirotta, V. (2007) Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature Rev Genet.* 8: 9-22.
- Straub, T., Becker, P.B. (2007) Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nature Rev Genet.* 8: 47-57.
- Tollefsbol, T.O. (Ed) (2004) Epigenetic Protocols. Humana Press, Totowa.
- Vyskot, B. (1999) The role of DNA methylation in plant development. In: Ainsworth, C.C.: *Sex Determination in Plants*, str. 101-120, Bios, Oxford
- Vyskot, B. (2010) *EpiGenetika*. Vydavatelství Palackého univerzity, Olomouc
- Wolffe, A. (1998) *Chromatin: Structure and Function*. Academic Press, San Diego



Prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc. (e-mail: vyskot@ibp.cz), je vedoucím oddělení vývojové genetiky rostlin Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně. V roce 2003 byl zvolen řádným členem Učené společnosti ČR. Zabývá se vývojovou genetikou a pohlavní determinací. Přednáší vývojovou genetikou a epigenetiku na Masarykově univerzitě v Brně a Univerzitě Palackého v Olomouci.



Doc. RNDr. Eduard Kejnovský, CSc. při své přednášce na Genetické konferenci GSGM v Lednici (16. 9. 2011).

Skákající geny – parazité nebo pomocníci

Eduard Kejnovský

Oddělení vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.,
Královopolská 135, 612 65 Brno

V poslední době se stále jasněji ukazuje, že genomy nejsou neměnné genetické entity. Jedná se naopak o systémy velice dynamické, generátory vlastních přestaveb citlivě reagující na změny prostředí. Významnou roli v dynamice genomů hrají mobilní genetické elementy, neboli transponovatelné elementy, transpozony či populárně „skákající geny“. Transpozony tvoří často významnou část jaderného genomu, u člověka asi polovinu.

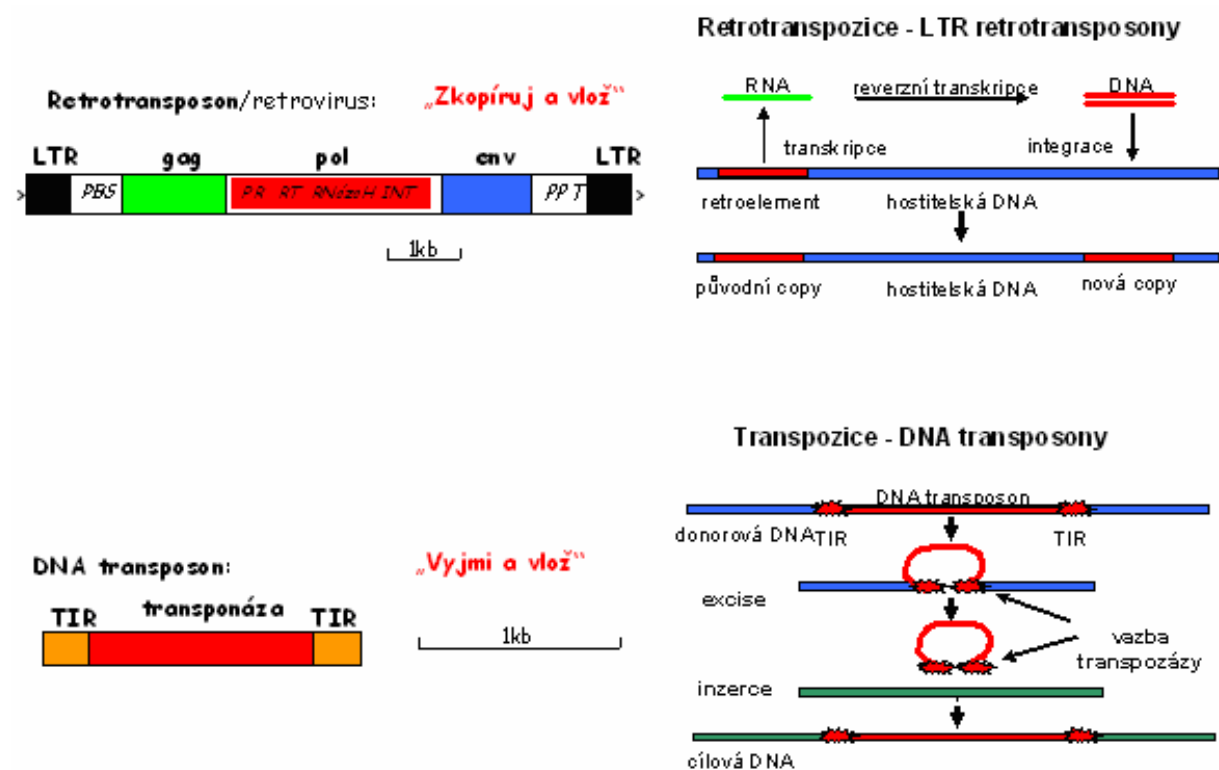
Velikost genomů

Základním parametrem genomu je jeho velikost. Již od dob, kdy byli vědci schopni měřit velikost genomů se ukazovalo, že neexistuje korelace mezi velikostí genomu a komplexitou organismu. Tato záhada byla označena jako „paradox hodnoty C“, protože „C“ označovalo velikost genomu a udávala se dříve v pikogramech na jádro, nyní spíše v párech bází DNA. Postupně se ukazovalo, že klíčem k řešení paradoxu hodnoty C je existence opakujících se úseků DNA v genomu, tzv. „repetitivní DNA“. Repetitivní DNA je v genomu uspořádána buď v podobě tandemových repeticí, které jsou označovány také

jako satelitní DNA, nebo je rozptýlena, což představují právě zmíněné transposony. Genomy mají tedy jak repetitivní charakter tak jsou i díky „skákájícím genům“ velmi dynamické. Pohled na rozsahy velikostí genomů u různých taxonů ukazuje, že zatímco u některých taxonů (savci či ptáci) je rozmezí velikostí genomů poměrně malé, u jiných taxonů (rostliny či obojživelníci) je rozmezí velmi široké, sahající např. u rostlin od 10^7 do 10^{11} párů bází. Při pohledu na lidský genom uvidíme, že pouze 1,5% tvoří exony, tedy části genů kódující proteiny, introny představují asi 25% a zhruba polovinu našeho genomu tvoří různé rodiny transposonů. Dokonce, nedávné práce naznačují, že pokud se přísnost vyhledávání transposonů v našem genomu sníží, pak transposony tvoří až 70% lidského genomu.

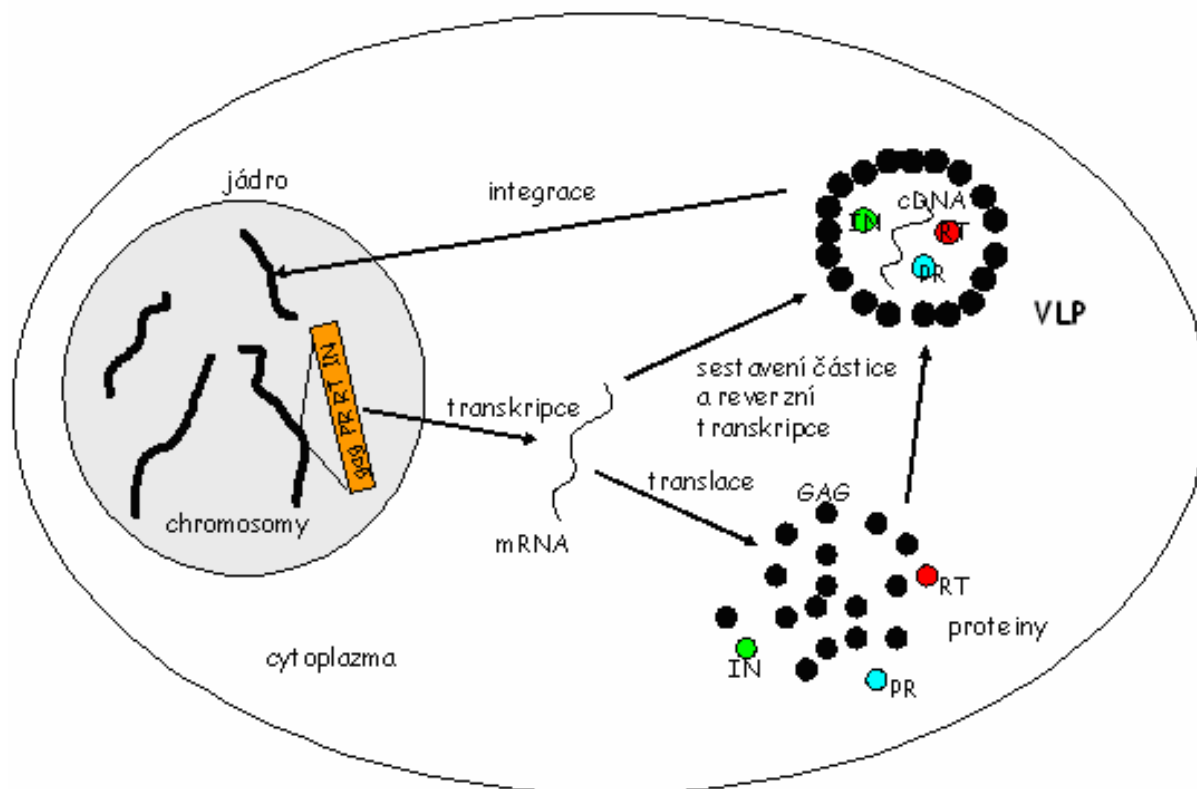
Struktura a životní cyklus transposonů

Jak si transposony můžeme představit? V dnešní době je známo široké spektrum různých rodin transposonů, o jejichž terminologii a klasifikaci se stále vedou v literatuře či na konferencích debaty. Nicméně při určitém zjednodušení můžeme říci, že existují dvě hlavní skupiny transposonů – retrotransposony a DNA transposony (obr. 1). Retrotransposony se šíří po genomech prostřednictvím molekul RNA mechanismem retrotranspozice a mají tudíž vždy duplikativní charakter. Jejich genovou výbavu představuje gen „gag“ kódující strukturální protein tvořící virům podobnou částici (VLP, virus-like particle) a gen „pol“, který kóduje nezbytnou enzymatickou výbavu – reverzní transkriptázu, integrázu, proteázu a RNázuH.



Obr. 1: Schéma struktury retrotransposonů a DNA transposonů a jejich šíření po genomu.

Kromě genů osahují retrotransposony regulační oblasti označované jako dlouhé koncové repetice (LTR, long terminal repeat), místo vazby primeru (PBS, primer-binding site) a polypurinové místo (PPT, polypurine tract), jež jsou důležité pro reverzní transkripci. Životní cyklus retrotransposonu pak vypadá tak, že se element nejprve přepíše do RNA, ta se následně přeloží do proteinů (gag, reverzní transkriptázy, integrázy) a současně je zabalena do strukturních proteinů gag za vzniku virům podobné částice (VLP), kde poté probíhá reverzní transkripce za vzniku cDNA (obr. 2). Následně integráza včlení novou kopii elementu do nového místa v genomu. Druhou hlavní skupinou jsou DNA transposony. DNA transposony se šíří mechanismem „vyjmi a vlož“. Kódují transpozázu, která se váže na koncové obrácené repetice (TIR, terminal inverted repeat) a element vyštěpí a vloží na jiném místě genomu. Retrotransposony jsou dlouhé kolem 10 tisíc párů bází, výjimečně přes 20kb, DNA transposony mají délku jen několik kilobází.



Obr. 2: Schéma retrotranspozice – životní cyklus retrotransposonů.

Kde se v genomech transposony nacházejí

Podívejme se nyní, kde se v genomu transposony nacházejí. V současné době se prosazuje pohled na genom jako na ekosystém různých elementů, kdy jednotlivé rodiny elementů obsazují určité chromosomové niky. Mezi transposony existuje celé spektrum vztahů od parazitismu přes kompetici po kooperaci. Dokonce i když nový transposon vstoupí do nového genomu, např. horizontálním genovým přenosem, lze pozorovat určitý vývoj. Popisuje

to pravidlo tří „K“ (konflikt-kompromis-kooperace). Na počátku se transposon maximálně amplifikuje a dojde ke konfliktu s hostitelským genomem. Po nějaké době hostitel aktivuje své obranné systémy, jako je zejména metylace DNA a RNA interference, výsledkem čehož je umlčení transposonu. Vytvoří se jakási rovnováha sil (kompromis). V některých případech pak může dojít k využití transposonu pro funkci užitečnou pro hostitele, kdy mluvíme o tzv. „domestikaci“ transposonu (kooperace). Podíváme-li se na obsah různých elementů v chromosomu, můžeme vidět, že v centromerách a subtelomerách se často nacházejí tandemové repetice (satelity). Jsou známy i některé transposony, které specificky obsazují centromery či subtelomery nebo se specificky včleňují do heterochromatinu. Dříve se soudilo, že určitá specifická lokalizace transposonů je spíše následkem selekce, nyní se ukazuje, že v mnoha případech se jedná o cílené včleňování (targeting) do určitých oblastí DNA či typu chromatinu. Zajímavá je i akumulace transposonů na degenerujícím chromosomu Y. Většina transposonů ale je rozptýlena po chromosomech víceméně rovnoměrně. Naopak geny rozptýleny rovnoměrně nejsou, nýbrž tvoří jakési shluky, ostrovy v moři repetitivní DNA. Transposony se často včleňují do jiných transposonů, což asi souvisí s tím, že takové inserce mají méně negativní dopad na hostitele.

Retrotransposony a dávný svět RNA

Jaký je původ transposonů? Zejména o retrotransposonech platí, že do kteréhokoliv genomu se důkladněji podíváme, tam je najdeme. Jsou nejen všudypřítomné ale mají i konzervativní mechanismu své replikace. Důležitou roli při reverzní transkripci totiž hrají molekuly tRNA, považované za jedny z nejstarších biomakromolekul. Střídání fáze molekul DNA a RNA je reminiscencí dávného „světa RNA“. Co je to „svět RNA“? Nynější biologické systémy jsou založeny na DNA jako mediu pro uchování genetické informace a na proteinech jako realizátorech genetické informace. Avšak DNA potřebuje ke své replikaci proteiny a ty jsou zase kódovány molekulami DNA. Máme zde problém slepice a vejce. Řešením je právě představa světa RNA, podle níž byly na počátku jednoduché replikátory na bázi RNA, a z nich se v průběhu evoluce vyvinula složitá biochemie založená na DNA, RNA a proteinech. Nutno si uvědomit, že přechod ze světa RNA do dnešního světa DNA a proteinů stále probíhá. Celá plejáda molekul RNA (snRNA, snoRNA, guideRNA, aj.) je skryta ve spleti buněčných procesů a může být vnímána jako relikty světa RNA.

Funkce transposonů

Snad nejkontroverznější ale i nejzajímavější je otázka funkce transposonů. Podle mého názoru vnímání transposonů velmi negativně ovlivnily dva články v časopise Nature z roku 1980, jejichž autory byly Orgel a Crick, resp. Doolittle a Sapienza. Transposony v nich byly prezentovány jako pouhé parazitické elementy, jejichž jediným cílem je se maximálně amplifikovat bez ohledu na prospěch pro hostitele. Od té doby se však nahromadilo mnoho informací týkajících se nejrůznějších aspektů života transposonů. V posledních letech se

stále jasněji ukazuje, že transposony jsou klíčovými hráči struktury a fungování genomů, dávající genomům silný evoluční potenciál. Primárně jsou transposony parazitické elementy, které mají mnohdy negativní vliv na hostitelský genom. Vyplývá to z jejich inherentní schopnosti se amplifikovat a šířit po genomu. Jedná se o endogenní genomové mutageny, stochastické ale regulované. Svými insercemi způsobují také řady chorob. Jak již bylo řečeno, genom má obranné mechanismy bránící šíření transposonů, mezi něž patří zejména metylace DNA a RNA interference. Oba mechanismy dnes slouží zejména jako nástroje regulace genové exprese, původně však zřejmě vznikly jako nástroje obrany proti endogenním i exogenním parazitickým sekvencím DNA. Úlohu metylace DNA v umlčování transposonů ilustruje elegantní experiment, kdy byl vnesen retrotransposon Tto1 z tabáku do arabidopsis. Transposon se začal v arabidopsis rychle amplifikovat až do té doby, než byl "zametylován". Vědci šli však dále a zkřížili tuto arabidopsis s mutantem, který měl poruchu v metylaci. Stalo se to, co vědci očekávali – transposon se opět začal amplifikovat.

Vliv transposonů na fenotyp

Transposony mají často značný vliv na fenotyp. U rostlin jsou známy příklady, kdy jediný skok transposonu změni barvu nebo tvar květu či plodu. Například barva hroznů vína závisí na včleňování a vyčleňování retrotransposonu Gret1 do promotoru genu Vvmyb1. V závislosti na tom, jak velký úsek tohoto retrotransposonu v promotoru zůstane, pak mají hrozny barvu od světle zelené až po tmavě modrou. Jiným příkladem je zbarvení myší srsti, kde hraje roli dokonce epigenetický stav transposonů. Myší mutanti „Agouti“ mají žluté zbarvení srsti. Různý stupeň metylace DNA transposonu IAP, který se nachází před genem Agouti, pak vede k různému stupni exprese genu Agouti. Výsledkem je celé spektrum barev srsti od žluté až po standardní šedou. Dokonce i Gregor Mendel měl co do činění s transposony. Ukázalo se, že zvrásnění semen hrachu, jeden ze znaků s nimiž pracoval (lokus rugosus), je důsledek inserce transposonu do genu pro metabolismus škrobu. Transposony jsou pravděpodobně zodpovědné za významnou část variability lidské populace. Způsobují také některé lidské nemoci. Nedávné studie ukazují, že v mnoha buňkách je transkribována většina lidského genomu. Z toho plyne, že je transkribována i většina transposonů tvořících asi polovinu genomu. V rakovinných buňkách dochází k hypometylaci DNA, což má za následek aktivaci různých transposonů, zejména Alu a LINE elementů, jež jsou nejhojnější. Dochází pak nejen k jejich transkripci ale i k insercím do nových míst v genomu včetně například tumorsupresorových genů. Aktivita transposonů zvýší i četnost rekombinačních přestaveb genomu. Nedávné studie právě naznačují, že příčinou nádorového bujení a stárnutí jsou spíše celogenomové změny než určité konkrétní lokální mutace. Zajímavý je i fakt, že vazebné místo tumorsupresorového proteinu p53, označovaného jako „strážce genomu“, je odvozené z transposonů.

Pozoruhodnou vlastností transposonů je jejich schopnost být aktivován stresem, což je zřetelné zejména u rostlin. Bylo prokázáno, že sucho, UV záření, poškození, kultivace in vitro, napadení patogenem a jiné faktory aktivují transposony. Stres, aktivace transposonů a následné rozkolísání genomu umožní některým potomkům lepší adaptaci na změněné prostředí. Je otázkou, zda-li v tomto kontextu pohlížet na transposony jako na „škůdce“, kteří využijí dočasného oslabení hostitele a aktivují se, nebo naopak jako na „pomocníky“, kteří svoji aktivitou zvýší variabilitu a tudíž adaptační schopnosti hostitele. Je ale jasné, že důležitou roli v aktivaci transposonů stresem hraje epigenetický kód, který citlivě a reverzibilně reaguje na změny prostředí. Vezmeme-li v úvahu, že uvedené genetické změny způsobené transposony a indukované prostředím jsou dědičné, připomíná to myšlenky Jeana Baptiste Lamarcka o dědičnosti získaných znaků. Další dimenzi tomu dává i fakt, že včleňování transposonů je často cílené do specifických genomových nik.

Domestikace transposonů

Již bylo řečeno, že stále přibývá příkladů tzv. „domestikace“ transposonů, kdy genom využil tyto elementy pro funkci prospěšnou pro hostitele. Mnohdy jako by „odpadní DNA“ byla recyklována za vzniku „zlatých cihliček“ fungování genomu. Uvedme alespoň pár příkladů. Konce chromosomů, telomery, chrání u většiny druhů určité opakující se sekvenční motivy (např. TTAGGG u člověka). U drozofily tyto tandemové repetice nebyly nalezeny. K překvapení vědců se ukázalo, že konce chromosomů u drozofily chrání retrotransposony dvou rodin (Het-A a TART) specificky skákající na konce chromosomů. Dalším příkladem domestikace je protein CENP-B vážící se na centromery a hrající klíčovou roli při buněčném dělení. CENP-B má homologii s transpozázou DNA transposonů, z níž se zřejmě vyvinul. Snad nejznámějším příkladem domestikace transposonů je dáván do souvislosti s imunitním systémem obratlovců. Při tvorbě protilátek dochází k tzv. VDJ rekombinaci. Ukázalo se, že mechanisticky je VDJ rekombinace velmi podobná vyčleňování a včleňování DNA transposonů a také, že klíčový protein VDJ rekombinace - Rag1 - vznikl z transpozázy.

Snad nejvýznamnější příkladem využití transposonů pro hostitele je jejich role při vytváření regulačních sítí buňky. Pokud se totiž transpozáza přemění například v transkripční faktor a zachová si schopnost vázat se na transposonové sekvence, pak může regulovat expresi mnoha genů, v jejichž blízkosti se příbuzné transposony nacházejí. Existuje mnoho transkripčních faktorů obsahujících DNA vazebnou doménu odvozenou z transpozázy DNA transposonů. Často se jedná o chimerické geny obsahující ještě další domény. Příkladem může být gen Setmar vzniklý z transpozázy a histonmetyltransferázy. Výše uvedený typ regulace může fungovat nejen na úrovni transkripční ale i posttranskripčně nebo dokonce i s využitím malých molekul RNA – microRNA – odvozených z transposonů. Tímto elegantním způsobem se transposony podílejí na vytváření a modulování složitých regulačních sítí, kdy je možné efektivně a v koncertu regulovat expresi mnoha genů.

Chimerické geny mohou vznikat i činností nedávno objevených DNA transponů, tzv. helitronů. Helitrony se šíří po genomu mechanismem otáčivé kružnice a mají unikátní schopnost „sbírat“ geny. Byly nalezeny helitrony obsahující fragmenty až 12 různých genů. Možná, že zde vidíme v akci mechanismus tvorby nových genů, kdy lze kombinovat exony a jim odpovídající proteinové domény za tvorby nové kvality.

Transposony a speciace

Nedávná publikace v časopisu Science ukázala, že krátkonohost (chondrodysplasii) u psů způsobilo včlenění retrogenu *fgf4* do těsné blízkosti LINE elementu, což změnilo expresi genu *fgf4*. Jediná evoluční událost tak vedla k zásadní změně fenotypu. Odtud již není daleko k reprodukční izolaci a speciaci. Úloha transponů ve speciaci byla silně podpořena i prací, která ukázala, že oddělování evolučních větví v linii vedoucí k primátům korelovalo s explosivními amplifikacemi různých rodin transponů. Amplifikace transponů (a pravděpodobně následné přestavby) vždy předcházely speciacím. Zajímavé jsou i studie retrotransponů BARE u ječmene pocházejícího z tzv. „Evolučního kařonu“ v Izraeli. Tam bylo zjištěno, že rostliny na svahu obráceném k jihu obsahují třikrát více BARE elementů než populace na protilehlém svahu. Sucho a teplo jako stresor pravděpodobně způsobily takto velké rozdíly v četnosti transponů. Ani odtud není daleko ke speciaci. Transposony hrají také roli při opačném procesu, při mezidruhově hybridizaci, kdy dochází k narušení jejich umlčení a aktivaci u mezidruhových hybridů.

Hranice druhů překonává tzv. horizontální genový přenos (HGT, horizontal gene transfer), který významně přispívá k dynamice genomů. Nejen geny, ale i transposony mohou být přeneseny horizontálně z druhu na jiný druh. Mluví se i o souvislosti sexuality a transponů. Dokonce o tom, že druhy byly k sexualitě „donuceny“ transposony, neboť infiltrace do nových „panenských“ druhů je pro parazitické elementy výhodná. Skutečně bylo ukázáno, že druhy s výraznější sexualitou (cizosprašné oproti samosprašným či asexuálním) obsahují agresivnější typy transponů, např. duplikativně se množící retrotransposony oproti méně škodlivým DNA transponům. Překonávání mezidruhových bariér a horizontální genový přenos jsou běžné u prokaryot, kde se někdy mluví o společném „rybníku genů“, v němž si bakterie půjčují geny podle své momentální potřeby. Horizontální přenos je ale běžný i u eukaryot, jak ukazuje řada nedávných studií. Spíše než o stromu života bychom měli mluvit o pavučině života, kde přírodní genetické inženýrství je velmi časté a to dokonce i mezi značně vzdálenými druhy.

Závěr

Snad je tedy zřejmé, že transposony nejsou jen parazitické sekvence DNA, ale že se jedná o důležité hráče evoluce genomů. Paradigma se mění. Nový pohled na transposony je jedním z pilířů postneodarwinistických představ. Zkusme se podívat na transposony jako na bodovou mutaci. Je škodlivá nebo užitečná? Bez změny není evoluce. Transposony se podílejí na

tvorbě nových genů, napomáhají přestavbám genomu, vytvářejí regulační sítě, když skáčou vedle genů kde pak fungují jako regulátory exprese. Někdy se až zdá, že si transposony přetvářejí genomy k obrazu svému jako ideální místo pro své přežívání. Nicméně, spíše jde o krásnou ukázkou logiky evoluce, která jde cestou záplatování a využívá přitom vše, co má po ruce, třebaže jsou to původně parazitické elementy. Co je ale naše a co je cizí. Neexistuje přece nějaké „oni“ parazité a „my“. Vždyť i naše transposony jsou naší neoddelitelnou součástí.

Literatura

Orgel LE and Crick FH (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284, 604-607.

Doolittle WF and Sapienza C (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284, 601-603.

Biemont C and Vieira C (2006) Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443, 521-524.

Feschotte C (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet* 9, 397-405.

Parker HG et al An expressed *fgf4* retrogene is associated with breed-defining chondrodysplasia in domestic dogs. *Science* 325, 995-998.



Doc. RNDr. Eduard Kejnovský, CSc. (e-mail: kejnovsk@ibp.cz, tel 541517203) je výzkumným pracovníkem Laboratoře vývojové genetiky rostlin Biofyzikálního ústavu AVČR, v.v.i. v Brně. Specializuje se na problematiku dynamiky genomů, evoluce pohlavních chromosomů a biologii transposonů.

Perličky ze školních lavic

Výroky zkoušených studentů tak, jak je zaznamenal během své pedagogické kariéry na Biologickém ústavu Lékařské fakulty MU (dříve UJEP) prof. MUDr. Jan Šmarda, DrSc.

"U pralidí byla žena hlavním stavebním kamenem tlupy"

"Jedinci páterní generace byli homozygotní"

"Pardon, já se špatně vyřádila".

(Při probírání dědičnosti Downova Syndromu): "Původně se tato choroba jmenovala mongolismus, ale mongolská vláda proti tomu protestovala, a tak se jí teď říká choroba Darwinova".

"Když Pavlov rozsvítil světlo a nepřinášel žrádlo, pes mu zase neslintal".

"Mendel nevěděl nic o genetice, jen určité základy".

"Darwin byl první, kdo podal správně zprávu o průběhu ovulace".



PODZIMNÍ SLEVY

**až 55 %
na produkty Roche**

**více na
www.roche-diagnostics.cz/askonecroku**

Roche s.r.o.

Diagnostická divize

Karlovo náměstí 17, 120 00 Praha 2,

tel.: +420 220 382 565 (564),

fax: +420 220 382 595,

email: czech.appliedscience@roche.com



Mastercycler® Trade-in-program

Získejte kvalitní přístroj za méně peněz

Vyměňte starý termocycler za nový. Výměnou za jakýkoliv starý cycler, i jiné značky než Eppendorf, dostanete od nás **slevu 28 %** na koupi zcela nového přístroje řady **Eppendorf Mastercycler® pro!**
Akce platí do 31. 12. 2011.

Mastercycler® pro

Reprodukovatelnost, přesnost a rychlost - to jsou požadavky na PCR aplikace, které **Mastercycler® pro** splňuje.

Mastercycler® pro nabízí maximální flexibilitu:

- Výběr ze tří variant bloků:
 - formát 96 x 0,2 ml - stříbrný blok
 - formát 96 x 0,2 ml - aluminiový blok
 - formát 384 jamek
- Možnost použití jakýchkoliv PCR destiček, zkumavek nebo stripů

Charakteristika

- Víko **vapo.protect™** - zabraňuje odpařování vzorků
- Rychlost ohřívání bloku až 6° C / s
- Gradientové bloky se SteadySlope® technologií
- Intuitivní grafické programování
- Možnost uživatelsky testovat funkčnost Peltier článků
- Možnost ovládat 1 - 5 cyclerů z jednoho ovládacího panelu

Bližší informace o produktu na: www.eppendorf.com/mastercycler

eppendorf
 — Czech & Slovakia —