červen 2018

Genetická společnost Gregora Mendela, z.s.

INFORMAČNÍ LISTY

číslo 51

Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela, z.s., konané dne 9. 5. 2018 v Brně

Přítomni: Doškař, Knoll, Kočová, Nešvera, Relichová, Šeda, Ševčovičová, Šmarda, Tomáška, Zelený

Omluveni: Čellárová, Holá, Mašek, Slaninová, Zadražil

Program schůze:

1. Kontrola zápisu z minulé schůze výboru GSGM
2. Informace o činnosti spolku v období od poslední schůze výboru GSGM
3. Informace o přípravě konference GSGM v Bratislavě
4. Informace o počtu přihlášek do soutěže GSGM a ustavení odborné posuzovatelské komise pro udělení ceny
5. Příprava voleb výboru GSGM a revizorů účtů na nové funkční období
6. Informace o změnách v evidenci členské základny GSGM, projednání nových přihlášek
7. Zhodnocení náplně posledního čísla IL a příprava dalšího vydání
8. Projednání možností realizace směrnice EU o ochraně osobních údajů
9. Různé

ad 1)
Kontrola zápisu z poslední schůze výboru GSGM konané dne 29. 11. 2017 v Brně proběhla bez připomínek a nebyly shledány žádné nesplněné / nerozpracované úkoly vyplývající ze zápisu.

ad 2)
Předseda informoval o činnosti spolku v uplynulém období, zmínil odborné semináře a akce, které v uplynulém období proběhly a kterých se někteří členové spolku zúčastnili. Všichni členové GSGM jsou o akcích v předstihu informováni a zájemci se mohou účastnit. Výbor i nadále doporučuje podporovat, popř. podle možností i spoluorganizovat podobné aktivity a propagovat je mezi členy spolku. Předseda dále informoval o semináři „Mendel Day“, který se uskutečnil v Mendelianu 8. 3. 2018 ve spolupráci a za účasti zahraničních partnerů. Předseda na Mendel Day představil činnost GSGM a byly diskutovány možnosti spolupráce zejména s Gregor Mendel Gesellschaft v Rakousku.

ad 3)
Prof. Tomáška informoval o přípravě genetické konference, která se uskuteční ve dnech 12. – 14. 9. 2018 v Bratislavě. Program konference a veškeré další informace související s jejím konáním jsou zveřejněné na stránkách konference. Ke dni 9. 5. 2018 bylo zaregistrováno více než 100 účastníků a 8 firem, které se podílejí na sponzorování konference. Přítomní členové výboru konstatovali, že konference je výborně připravená a organizačně zajištěná. Organizátoři konference ještě promýšlejí, jak nejvhodněji zorganizovat soutěž o nejlepší poster. Případná upřesnění budou zveřejňována průběžně. Sou-

částí konference je slavnostní oznámení výsledků a předání Ceny GSGM, která byla vyhlášena a zveřejněna v IL 2016 a podmínky byly uvedeny na stránkách GSGM. Cena je tradičně sponzorována firmou MGP Zlín. Detaily převodu financí z firmy MGP pro výherce budou upřesněny se zástupci organizačního výboru konference.

ad 4)
Předseda informoval o počtu přihlášek, které výbor do uvedeného data obdržel. Celkem bylo doručeno 7 přihlášek, které byly zařazeny do soutěže. Členové výboru diskutovali kritéria pro hodnocení soutěžních prací. Byla navržena a schválena tříčlenná komise: Holá (předsedkyně komise), Tomáška, Knoll (členové komise), která práce posoudí a připraví konečné pořadí soutěžních prací. Bylo konstatováno, že dokumenty k přihlášeným soutěžním pracím jsou velmi obsáhlé a výbor souhlasil s návrhem dr. Zeleného, který zajistí jejich rozeslání členům hodnotící komise. Předsedkyně komise upraví hodnotící tabulku, jejíž základní parametry již předem připravil předseda výboru, doplní údaje všech soutěžních prací (tj. jméno uchazeče, počet publikací, první/korespondující autor, součet IF, popř. další) a pošle oběma dalším členům komise k vlastnímu hodnocení. Každý člen komise poté samostatně zhodnotí soutěžní práce a stanoví své pořadí, z něhož nakonec komise společně vytvoří konečné pořadí. Výbor GSGM následně rozhodne o udělení ceny. Výsledek bude výherci oznámen v dostatečném předstihu, aby si mohl připravit plenární přednášku, kterou přednese na konferenci v Bratislavě.

ad 5)
Členové výboru diskutovali přípravu voleb výboru spolku a revizorů účtů pro příští funkční období. Tajemnice připravila a předložila k projednání návrh formulářů, které by byly rozeslány všem členům GSGM spolu s Informačními listy v průběhu července. Jednalo by se o formulář s výzvou pro podání návrhů na kandidáty do výboru a na revizory účtů, dále by byla rozeslána pozvánka na valné shromáždění s termínem, programem a informacemi o volbách. Současně tajemnice připraví a zajistí v součinnosti s organizačním výborem konference GSGM vlastní volby.

ad 6)
Výbor GSGM obdržel v uplynulém období 12 nových přihlášek (11 ze SR, 1 z ČR), které byly projednány a jednomyslně schváleny. Noví členové spolku Mgr. Katarína Juríková, Mgr. Lucia Zeiselová, RNDr. Zuzana Jurčacková, Mgr. Michaela Antalová, RNDr. Katarína Nigutová, PhD., RNDr. Andrea Schreiberová, PhD., Mgr. Mariia Logoida, RNDr. Jana Henzelyová, RNDr. Miroslava Bálintová, RNDr. Katarína Bruňáková, PhD., RNDr. Linda Petijová, PhD. a ing. Jiří Korecký, Ph.D. budou informováni o přijetí a o právech a povinnostech členů GSGM . Výbor dále schválil za novou členku GSGM Mgr. Markétu Pernisovou, Ph.D., která požádala o členství těsně před zasedáním výboru. Nová členka GSGM bude o přijetí rovněž informována mailem. Výboru byla doručena žádost prof. ing. Milana Lstibůrka, Ph.D. o ukončení členství v GSGM z důvodu značného pracovního vytížení. Řádné členství na vlastní žádost zaniklo 23. 1. 2018. Knoll a Kočová informovali o průběžné aktualizaci a výhodách sdíleného adresáře členů společnosti na webovém úložišti Dropbox. Upozornili, že i v tomto případě je nezbytné dbát na směrnici o ochraně OÚ a neumožnit přístup neoprávněným uživatelům.

ad 7)
Výbor zhodnotil poslední číslo IL a konstatoval tradiční vysokou úroveň. Hlavní redaktor prof. Šmarda vyzval jednotlivé redaktory i ostatní členy výboru, aby zasílali vhodné příspěvky, které by mohly být zveřejněny v připravovaném čísle IL. Nové číslo bude zpracované do konce června a budou do něj vloženy formuláře pro návrh kandidátů do nového výboru a kandidátů na revizory účtů a dále pozvánka na valné shromáždění s informací o volbách (viz bod 5). Tak bude zajištěno, že všichni členové GSGM dostanou s dostatečným předstihem informace a nezbytné dokumenty k nadcházejícím volbám.

ad 8)
Předseda informoval členy výboru o realizaci směrnice vyplývající z Obecného nařízení o ochraně osobních údajů GDPR a o povinnostech, které z této směrnice vyplývají pro spolky. Přítomní členové výboru se shodli, že ještě získají upřesňující stanoviska právníků a zástupců Rady vědeckých společností a na základě těchto jednání bude rozhodnuto o případných dalších krocích k zajištění ochrany osobních údajů členů spolku. Přihlášky za členy spolku, v nichž je uvedeno pouze datum narození, pracoviště a kontaktní údaj jsou uloženy v uzamčeném prostoru a údaje v nich uvedené slouží pouze pro komunikaci uvnitř spolku.

ad 9)
Přítomní členové výboru diskutovali možné návrhy na udělení čestného členství GSGM. Návrhy podává a schvaluje valné shromáždění GSGM a tento bod je zařazený do programu schůze valného shromáždění u příležitosti konání Genetické konference (viz. bod 5).

Zapsala: M. Kočová

VYÚČTOVÁNÍ HOSPODAŘENÍ GSGM OD 1.1.2017 DO 31.12.2017 ZA ČR

Zůstatek k 31.12.2016		**22701,54 Kč**
z toho	na účtu KB	21236,54
	v pokladně	1465,00
Příjmy v roce 2017		**13450,00 Kč**
členské příspěvky (13450 Kč):		
z toho	placené na účet KB	8700,00
	placené hotově	4750,00
Výdaje v roce 2017		**4220,00 Kč**
poplatky bance za vedení účtu a položky		1875,00
drobné občerstvení - schůze výboru		373,00
kancelářské potřeby		429,00
faktura za grafickou úpravu IL		1000,00
legalizace listin ve spojení s úředními úkony dle zákona		543,00
Zůstatek k 31.12.2017		**31931,54 Kč**
z toho	na účtu KB	27061,54
	v pokladně	4870,00

Zpracoval: Aleš Knoll

VYÚČTOVÁNÍ HOSPODAŘENÍ GSGM OD 1.1.2017 DO 31.12.2017 ZA SR

Zůstatek k 31.12.2016		**1060,20 EUR**
z toho	na účtu Tatra banky	931,20
	v pokladně	129,00
Příjmy v roce 2017		**40,00 EUR**
členské příspěvky		40,00
Výdaje v roce 2017		**73,91 EUR**
poplatky bance za vedení účtu a položky		66,85
kancelářské potřeby		7,06
Zůstatek k 31.12.2017		**1026,29 EUR**
z toho	na účtu Tatra banky	889,35
	v pokladně	136,94

Zpracovala: Miroslava Slaninová

Z Mendelovy korespondence

Anna Matalová

Centrum Mendelianum, Muzejní 1, 602 00 Brno

„Velevážený pane!

Přijměte můj nejsrdečnější dík za semena Hieracií, která jsem v pořádku obdržel. Jsem Vám za tuto přátelskou zásilku velmi zavázán a vysoce si také vážím Vaší laskavosti, která mi dává vyhlídku na zásilku živých rostlin! Vynaložím všechnu námahu, abych vytvořil všechny možné hybridní formy mezi různými druhy, a pokud budou plodné, chtěl bych sledovat i jejich potomky po několik generací. Jen Vás snažně prosím, abyste výdaje za nákup a transport, stejně jako další náklady, připsal na můj účet.

S hlubokou lítostí jsem přijal zprávu o úrazu, který Vás, vysoce vážený pane, potkal 1. března a mám upřímnou radost z toho, že neštěstí nemělo nejhorší následky. V mých poměrech nastala v poslední době zcela nečekaná hluboká změna, má maličkost byla totiž 30. března zvolena za doživotního představeného řádové kapituly, jejímž jsem členem. Z dosavadního zcela skromného postavení učitele experimentální fyziky jsem se naráz přenesl do sféry, kde mi tak mnohé připadá cizí, a vyžádá si ještě nějakou dobu a námahu, než v tom zdomácním. Snad mě to mezitím neodvede od pokračování pokusů s křížením, které jsem si tolik oblíbil, dokonce doufám, že jim budu moci věnovat více času a pozornosti, jen co se zapracuji do svého nového postavení.

Rostliny na mé pokusné plantáži přezimovaly celkem dobře a poměrně značně pokročily ve svém vývoji; většina Piloselloid a také část Archieracií už ukazuje květní poupata. Za zdařilé mohu zatím uznat kříženec: H. auricula + H. pilosella, H. praealtum (Bauhini) + H. aurantiacum a snad také H. pilosella + H. auricula. Z podzimních semenáčků předloňského křížence H. praealtum + H. stoniflorum (Autor.) jich přezimovalo asi 100. Zatím se rostliny (ovšem velmi malé) teprve tvoří a oděním listů se od sebe neliší a shodují se s mateřskou rostlinou kříženec. S jistým napětím očekávám jejich další vývoj.

S ujištěním dokonalé úcty znamenám se

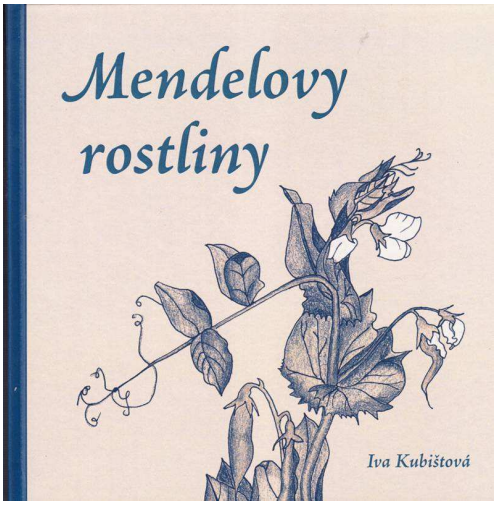
Váš nejoddanější přítel
Gregor Mendel
opat a prelát řádu sv. Tomáše“

Brno 4. května 1868

Informační listy GSGM, 2018, 51: 5–6

Před 150 lety sděloval Mendel ve svém pátém dopisu profesoru Nägelimu do Mnichova, že byl zvolen opatem. V této souvislosti vyjádřil nejistotu v tom, jak rychle si svou novou funkci osvojí. Obával se, aby ho opatská agenda neodvedla od jeho oblíbených pokusů s rostlinami. Dělal si naději, že po zvládnutí úkolů ve svém novém postavení, bude snad moci pokusům věnovat více času. O pět let později Nägelimu přiznal, jak je nešťastný, že musí své rostliny tak moc zanedbávat. A tak to zůstalo až do konce jeho života. Netušil, že jeho opus magnum bylo sepsáno už v době jeho „skromného postavení učitele fyziky“.

V básni, kterou složil C. Janetschek na počest J. G. Mendela, se vzpomínalo na jeho práci s rostlinami, které Mendel miloval (*flores amavit*). S prezentací Mendelových rostlin započalo Mendelianum již před více než půlstoletím a v roce 2007 publikovalo jejich unikátní soubor (ISBN 9788087028025). Aktuálně Mendelianum nabízí seznámení s Mendelovými rostlinami formou vzdělávací výstavy a prezentace živých exemplářů na terase Mendelových rostlin sousedící s prostorami Mendelovy vědecké (Hospodářské) společnosti v muzejním dvoře v centru Brna pod Petrovem. Terasa vybízí také k posezení, které si mohou návštěvníci zpříjemnit listováním v bohatě ilustrované knize Mendelovy rostliny (ISBN 9788026309574) nebo interaktivními úkoly. Při zvláštních příležitostech a oslavách, např. Mendelova narození, je na terase podáváno občerstvení. Terasa je přístupná jako součást expozice Mendeliana od května do září.



PhDr. Anna Matalová je nyní emeritní pracovnicí Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně. V Mendelianu působí již od jeho založení, po roce 1989 až do odchodu do důchodu pracovala jako jeho vedoucí. Je autorkou řady odborných publikací, má klíčový podíl na vytvoření Centra Mendelianum a představení Mendelovy osobnosti nejenom ve vědeckém kontextu, ale také v rámci jeho dalších aktivit ve vztahu k městu Brnu a dalším místům.

Ohlédnutí za mezinárodním Mendelovým dnem 2018

Eva Matalová

Centrum Mendelianum, Moravské zemské muzeum, Zelný trh 6, 659 37 Brno

Mezinárodní Mendelův den se tradičně konal 8. března, ve výroční den závěrečné části Mendelovy „objevitelské přednášky“ v roce 1865. Na jeho přípravě opět participovali odborníci z celého světa. V Brně, epicentru Mendelova dne, se letos sešli zástupci sedmi zemí. Místem setkání bylo Mendelianum, které aktuálně sídlí v autentických prostorech, kde se scházela Mendelova vědecká společnost a kde Mendel získal inspiraci pro svůj výzkum.

Doprovodnou přednášku prof. T. Nagaty z Tokia uváděl prof. T. Urban, který nabídl hostování této akci na Mendelově univerzitě, partnerském pracovišti Mendeliana. Tématem byla genetická determinace pohlaví u jinanu/ginkga, stromu, jehož list je symbolem Tokia, odkud přednášející přiletěl. Brno se pyšní jinanem, který roste na Mendelově náměstí a podle odhadu stáří pamatuje Mendela.

Informační listy GSGM, 2018, 51: 7–11

Mendelův den nabídl program nejenom pro studenty, ale byl také setkáním expertů, letos z ČR, Rakouska, Německa, Francie, Velké Británie, USA a Japonska. Letošní Mendelův den nabídl také platformu pro setkání představitelů Mendelových společností v ČR/SR, Rakousku a Japonsku (Genetická společnost G. Mendela, Gregor Mendel Gesellschaft, 日本メンデル協会概要). Diskutovaly se aktuální akce, nové poznatky a další výhledy spolupráce na výzkumu, rozvoji a propagaci Mendelova vědeckého a kulturního odkazu. GSGM zastupoval její předseda, prof. Jiří Doškař.

K Mendelovu dni patřilo opět předání Mendelovy pamětní medaile udělované každoročně Moravským zemským muzeem. Z rukou generálního ředitele MZM, dr. J. Mitáčka a vedoucího Mendeliana, dr. J. Sekeráka ji převzal prof. W. Wackernagel z Německa.

Laureátovi Mendelovy pamětní medaile poblahopřál také honorární konzul Rakouska, Mag. G. Stögl, který u příležitosti Mendelova dne 2018 převzal záštitu nad aktivitami propojujícími Mendelovo Brno a Mendelovu Vídeň.

V rámci Mendelova dne si účastníci mohli prohlédnout expozice Mendeliana, ale také aktuální výstavy. Jednou z nich byla Věda fotogenická zapůjčená Akademií věd ČR pro Mendelův týden. Další zajímavostí ke shlédnutí byl originál Mendelova dopisu rodičům vystavený v sousedním Dietrichsteinském paláci MZM.

Prof. W. Wackernagel po obdržení Mendelovy pamětní medaile nabídl zajímavé postřehy týkající se vědecké popularizace života a díla J. G. Mendela formou přednášky v Historickém sále Mendeliana v závěru Mendelova dne. Následující den vedl prof. Wackernagel seminář pro studenty na téma GMO Biosafety. Akce proběhla na půdě Veterinární a farmaceutické univerzity, která patří mezi instituce spolupracující v rámci Centra Mendelianum. Hosty byli další zahraniční účastníci Mendel Day, mezi nimi také prof. D. Fairbanks, děkan College of Science na univerzitě v americkém Utahu.

Prof. D. Fairbanks propojuje svým dílem nejen jednotlivé ročníky Mendel Day, ale také vědu s uměním a Evropu s Amerikou. Inspiraci ke svému mendelovskému dílu získal na Jubilejním Mendel Forum 2015 v Brně, bustu J. G. Mendela začal tvořit na Mendel Day 2016 v USA, na Mendel Day 2017 představil svoje dílo formou výstavy a v roce 2018 se výběr z jeho tvorby stal součástí expozic Mendeliana.

Mendelův týden byl symbolicky uzavřen 12. března na svátek Řehoře, kdy „čáp letí přes moře a líný sedlák, který neoře“. Selský synek Jan Mendel se stal Řehořem právě před 175 lety, kdy ho existenční nouze nasměrovala do starobrněnského kláštera. Od příchodu do Brna v roce 1843 pak Mendel v tomto městě strávil téměř čtyřicet let svého života a proslavil je po celém světě.

U příležitosti 175. výročí příchodu Mendela do Brna nabízí Mendelianum řadu novinek, mezi které patří Mendelova stezka do kapsy, volně dostupná pro všechny návštěvníky. Příjemná procházka po stopách Mendela uzavřela Mendel Day 2018 v Brně.

Těšíme se na setkání v Mendelianu/Mendelově Brně a také na další ročník mezinárodního Mendelova dne!

Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. (e-mail: matalova@iach.cz) je vědeckou pracovnicí Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., profesorkou na Fakultě veterinárního lékařství VFU Brno a dlouholetou spolupracovnicí Mendeliana MZM Brno, kde je také odbornou garantkou projektů Mendelianum – atraktivní svět genetiky a Mendelova interaktivní škola genetiky.

Udelenie Ceny a Štipendia dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej za rok 2017 bolo spojené s otvorením Laboratória nesúcim jej meno.

Ľubomír Tomáška

Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina B1, 842 15 Bratislava

18. 12. 2017 sa na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Komenského (PriF UK) v Bratislave uskutočnil slávnostný ceremoniál udeľovania Štipendia a Ceny dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej za rok 2017. Ide o druhý ročník udeľovania Ceny sponzorovanej Ing. Viliamom Sedlárom na počesť jeho manželky, ktorá sa zaslúžila o rozvoj genetiky a evolučnej biológie na Slovensku v druhej polovici 50. rokov 20. storočia. Ceremoniál spoločne organizovali dekan PriF UK, doc. RNDr. Milan Trizna, PhD., a občianske združenie Natura.

Do finále súťaže o Cenu sa dostali štyria kandidáti, z ktorých komisia vybrala tohtoročného laureáta – doc. Dr. Petra Vďačného, PhD. z Katedry zoológie PriF UK. Laureát počas stále relatívne krátkej vedeckej kariéry už významnou mierou svojimi originálnymi výsledkami prispel do rozvoja oblastí, ktoré sú mu najbližšie: morfologickej a molekulárnej fylogenézy dravých nálevníkov triedy *Litostomatea* a taxonómii a systematike voľne žijúcich, predovšetkým pôdnych nálevníkov. Doc. Vďačný získal Cenu, spojenú s finančnou odmenou 2000 EUR, za spoluautorstvo série prác venovaných integrovanej analýze fylogenézy vybraných skupín nálevníkov, pri ktorej využil unikátnu kombináciu klasických i moderných morfologických, behaviorálnych, fylogenetických a bioinformatických prístupov. Na ich základe popísal viaceré evolučné trendy týkajúce sa vzniku nových druhov, ako aj ich vymierania. Významný prínos doc. Vďačného k realizácií uvedených publikácií je ilustrovaný tým, že je na nich prvým a/alebo korešpondujúcim autorom. Okrem toho, na viacerých z nich s ním spolupracovali jeho študenti (magistri i bakalári), čo ilustruje aj edukačný dosah jeho výskumných aktivít.

Vzhľadom k tomu, že aj ďalší traja navrhovaní kandidáti dosiahli v roku 2017 originálne výsledky ilustrované veľmi kvalitnými publikáciami, dekan PriF UK sa rozhodol udeliť im čestné uznanie. Konkrétne, Mgr. Renáta Švubová, PhD. z Katedry fyziológie rastlín PriF UK bola ocenená za zásadný podiel na príprave monografie *Embryológia krytosemenných rastlín* vysvetľujúcej funkciu rôznych génov pri tvorbe reprodukčných orgánov, pri generatívnom množení a pri vzniku a vývine embrya s plnohodnotným štruktúrnym opisom. Mgr. Andrea Cillingová z Katedry biochémie PriF UK získala čestné uznanie za vynikajúce vedecké výsledky v oblasti štúdia degradácie hydroxyderivátov benzénu kvasiniek a za objav génov pre špecifické transportéry týchto zlúčenín do kvasinkovej bunky. RNDr. Ján Radvánszky, PhD. z Ústavu klinického a translačného výskumu Biomedicínskeho centra Slovenskej akadémie vied bol dekanom ocenený za vynikajúce vedecké výsledky v oblasti štúdia molekulárno-genetického základu Say-Barber-Biesecker-Young-Simpsonovho a genitopatelárneho syndrómu.

Informační listy GSGM, 2018, 51: 12–14

Cena LSR 2017: (zľava) prof. Jordan Kolarov (Katedra biochémie PriF UK; predseda Natura o.z.), doc Peter Vďačný (laureát Ceny za rok 2017, Katedra zoológie PriF UK), dr. Silvia Bágeľová-Poláková (laureátka Ceny za rok 2016, Centrum biologických vied SAV), prof. Peter Moczo (proektor Univerzity Komenského v Bratislave), Ing. Viliam Sedlár a doc. Milan Trizna (dekan PriF UK).

Okrem Ceny bola tento rok prvý krát výhlásená aj súťaž o Štipendium, ktoré získala Ing. Silvia Schmidtová z Ústavu experimentálnej onkológie Biomedicínskeho centra SAV. Financie vo výške 1000 EUR využije na trojmesačný pobyt na Department of Pathology, Erasmus Medical Center v Rotterdame. V laboratóriu prof. Looijenga bude charakterizovať bunkové línie rezistentné voči cisplatine a naučí sa metodiku prípravy tzv. *patient derived tumor xenografts* (PDTXs), tzn. nádorov, ktoré vznikli po aplikácii časti primárneho nádorového tkaniva z pacienta na imunodeficientnú myš. Štipendium jej ak pomôže získať cenné výsledky pre svoj výskum, ako aj získať experimentálne zručnosti, ktoré bude môcť využiť jej domovské labratórium.

Ceremoniálu predchádzalo slávnostné otvorenie Laboratória dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej, ktoré Ing. Sedlár podporil finančnou čiastkou 20000 EUR. Laboratórium sa nachádza v priestoroch Katedry genetiky PriF UK a bude miestom pre realizáciu experimentov využívajúcich moderné molekulárno-genetické metódy.

Sponzorovanie vedeckého výskumu a vzdelávania zo súkromných zdrojov bez očakávania finančného návratu je na Slovensku výnimočným aktom. Rozhodnutie Ing. Viliama Sedlára podporovať talentovaných a výnimočných slovenských vedcov a výskum na univerzitnej pôde si preto jednak zasluhuje obdiv a zároveň vzbudzuje nádej, že nájde aj nasledovníkov.

Ing. Silvia Schmidtová

Prof. RNDr. Ľubomír Tomáška, DrSc. je vedoucím Katedry genetiky Prírodovedecké fakulty UK v Bratislavě (http://fns.uniba.sk/kge/; (e-mail: lubomir.tomaska@uniba.sk). Zabývá se molekulárnou genetikou kvasinek. Spolu prof. Jozefom Nosekom vedie spoločné laboratórium katedier biochémie a genetiky PriF UK (http://www.biocenter.sk/welcome1.html).

Evolúcia dravých nálevníkov

Peter Vďačný

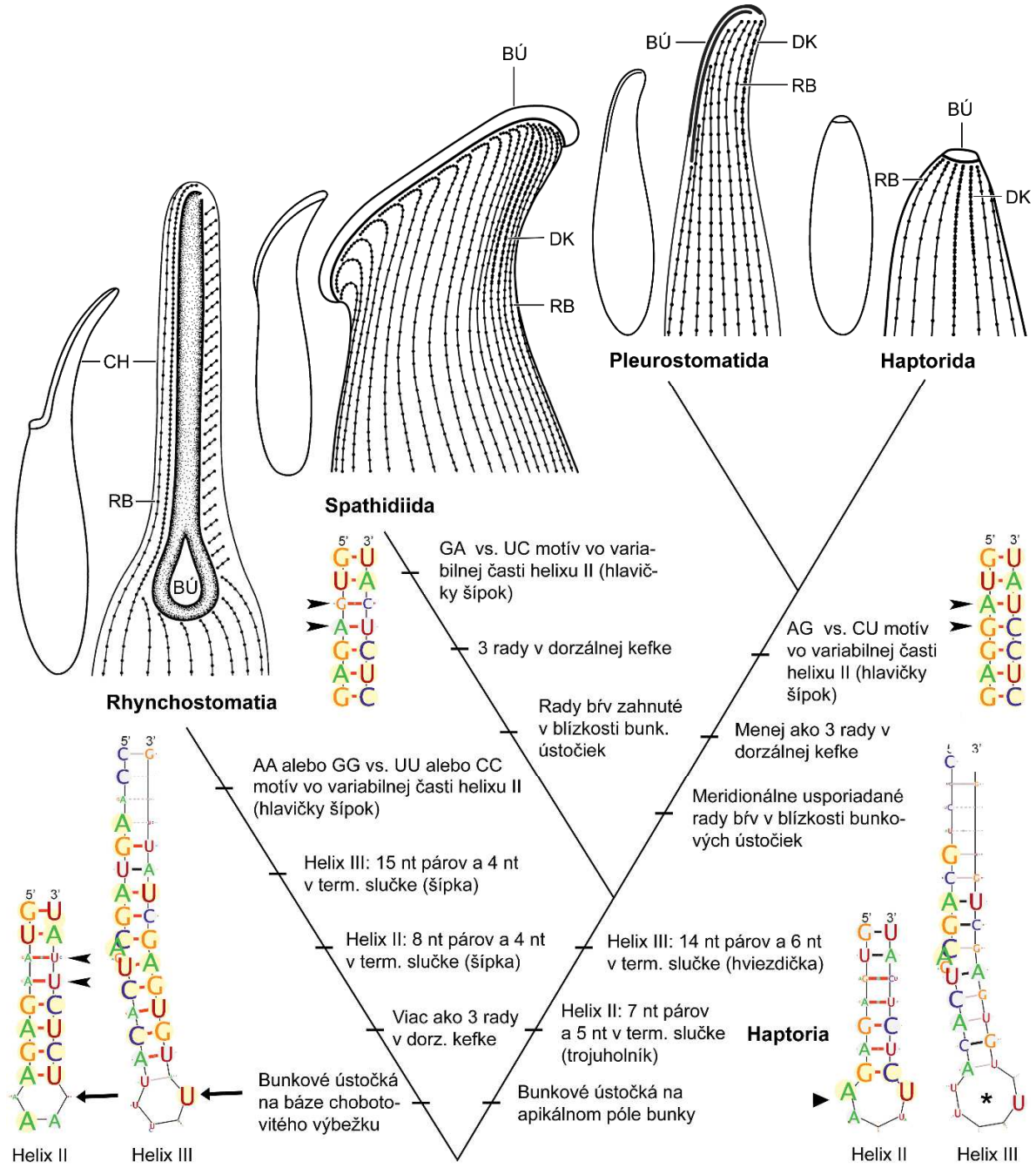
Katedra zoológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina B1, 842 15 Bratislava

Čas je dôležitým faktorom v evolúcii, umožňujúci vznik veľkej rozmanitosti živých tvorov. Aj napriek mikroskopickej veľkosti sa v priebehu stoviek miliónov rokov z nálevníkov stala jedna z morfologicky najdiverzifikovanejších skupín eukaryotických jednobunkovcov. Corliss (2000) uvádza približne 8000 druhov nálevníkov známych pre vedu, z ktorých ca. 200 pripadá na fosílne taxóny, 2600 na endo- respektíve ektosymbionty celej palety živočíchov a 5200 na voľne žijúce druhy. Pomocou štatistických modelov Foissner et al. (2008) naznačili, že tieto počty by mohli predstavovať len 11–17 % skutočného druhového bohatstva nálevníkov dnešných čias! Veľká časť nálevníkov teda stále čaká na svoje objavenie, kým mnohé vyhynuli v priebehu geologických epoch a pečať o ich živote môžeme nájsť len v skamenelinách (napr. Reháková 2000). Na základe dostupného fosílneho záznamu v prvohorných vápencoch (Lipps et al. 2013), druhohornom jantári (Schönborn et al. 1999), hostiteľsko-špecifických vzťahov (Wright & Lynn 1997) a relaxovaných Bayesiánskych molekulárnych hodín predpokladáme, že posledný spoločný predok nálevníkov žil pred 1,9 až 2,2 miliardami rokov (Berney & Pawlowski 2006, Eme et al. 2014, Wright & Lynn 1997, Vďačný 2005). Tento štatistický odhad založený predovšetkým na géne kódujúcom 18S rRNA molekulu, ktorá je súčasťou malej podjednotky eukaryotického ribozómu, robí nálevníky veľmi starobylou evolučnou líniou, a to aj vzhľadom na 4,6 miliardy dlhú históriu Zeme. Je fascinujúce, že informácia potrebná na dešifrovanie evolučnej minulosti a diverzifikačnej dynamiky nálevníkov je stále ukrytá v sekvenciách ich DNA, predovšetkým v génoch kódujúcich ribozomálne RNA molekuly a v prepisovaných medzerníkoch oddeľujúcich tieto gény.

Modelom pre výskum evolúcie, diverzifikačnej dynamiky a jej súvisu s fenotypom sa v mojích štúdiách stali dravé nálevníky triedy *Litostomatea*. Je to fascinujúca skupina mikroskopických predátorov, ktoré svoju korisť pravdepodobne lokalizujú pomocou špeciálne modifikovaných bŕv na dorzálnej strane bunky (tzv. dorzálnej kefky) a usmrcujú ju pomocou toxicýst ukotvených v bunkových ústočkách (Foissner & Xu 2007, Vďačný & Foissner 2012). Rekonštrukcia evolúcie litostomátnych nálevníkov je výzvou kvôli kombinácii dvoch typov problémov: rapídnej radiácii na jednej strane a postupnému vymieraniu na strane druhej (Rajter & Vďačný 2016). Explozívna radiácia nových evolučných línií týchto mikroskopických predátorov spôsobila, že máme ťažkosti pri hľadaní zdieľaných molekulárnych znakov zakonzervovaných v sekvenciách ich DNA, ktoré by mohli podporiť ich príbuzenské vzťahy. Vďaka vymieraniu v priebehu geologických dôb sa nám ešte navyše nenávratne stratila aj časť molekulárnej informácie, ktorá by mohla pomôcť osvet-

liť niektoré vzťahy medzi žijúcimi líniami litostomátnych nálevníkov. Aj napriek tejto komplikovanej situácii sa môžeme vďaka fylogenetickým matematickým metódam a Bayesiánskej štatistike vybrať na cestu do histórie a odhaliť aspoň časť tajomstiev evolúcie dravých nálevníkov.

Kritickým údajom pri štúdiu diverzifikačnej dynamiky je substitučná rýchlosť zvoleného molekulárneho markera (Yang 2014). Vďaka tomu, že niektoré litostomátne nálevníky sa sekundárne stali obligátnymi endosymbiontami rôznych skupín cicavcov, ktorých dobrý fosílny záznam k dispozícii máme, odhadol som substitučnú rýchlosť 18S rRNA génu litostomátnych nálevníkov v priemere na $1{,}75 \times 10^{-4}$, s 95%-ným kredibilitným intervalom $1{,}18 \times 10^{-4}$ až $2{,}36 \times 10^{-4}$ substitúcií na pozíciu za jeden milión rokov (Vďačný 2015). Na základe tejto skutočnosti a dostupných kalibračných bodov sa mi podarilo pomocou relaxovaných Bayesiánskych hodín vypočítať, že korunná divergencia litostomátnych nálevníkov prebehla v kryogéne pred ca. 680 miliónmi rokov, kedy sa rozdelili na líniu *Rhynchostomatia* s ventrálne lokalizovanými bunkovými ústočkami na báze chobotovitého výbežku a na líniu *Haptoria* s apikálne lokalizovanymi ústočkami a bez chobotovitého výbežku. Línia *Rhynchostomatia* zostala takmer 265 miliónov rokov od jej vzniku konzervatívna, kým začala ďalej divergovať. Naproti tomu línia *Haptoria* sa rozrôznila na niekoľko nezávislých vetiev explozívnou radiáciou v priebehu niekoľkých desiatok miliónov rokov (Vďačný 2015). Toto fundamentálne rozdelenie na *Rhynchostomatia* a *Haptoria* je veľmi dobre podporené nielen polohou bunkových ústočiek a prítomnosťou / neprítomnosťou chobotovitého výbežku (Vďačný et al. 2010, 2011), ale aj sekundárnou štruktúrou ITS2 molekuly (Rajter & Vďačný 2017, Vďačný et al. 2012; Obr. 1). ITS2 je transkribovaný medzerník lokalizovaný medzi génmi kódujúcimi 5,8S a 28S rRNA molekuly, ktoré sú na rozdiel od 18S rRNA molekuly súčasťou veľkej podjednotky eukaryotického ribozómu. Sekundárna štruktúra ITS2 molekuly je dôležitá pri maturačných procesoch 5,8S a 28S rRNA molekúl a preto je v priebehu evolúcie značne konzervovaná (napr. Côté et al. 2002, Ferreira-Cerca 2008, Schultz et al. 2005, Wolf et al. 2005). Podarilo sa nám zistiť, že helixy II a III v ITS2 molekule sú dlhšie o jeden bázový pár pri zástupcoch podtriedy *Rhynchostomatia*, kým terminálne slučky oboch helixov sú dlhšie o jeden respektíve dva nukleotid/-y pri zástupcoch podtriedy *Haptoria* (Rajter & Vďačný 2017; Obr. 1). ITS2 molekula tiež pekne odráža vzájomné vzťahy v rámci podtriedy *Haptoria*, ktorá v našich analýzach bola zastúpená tromi líniami na taxonomickej úrovni radu – *Haptorida*, *Pleurostomatida* a *Spathidiida*. Rad *Spathidiida* sa v rámci podtriedy *Haptoria* odštiepil ako prvý pred približne 655 miliónmi rokov. Rady *Haptorida* a *Pleurostomatida* boli klasifikované v molekulárnych analýzach ako sesterské skupiny, ktoré zdieľali spoločného predka pred ca. 635 miliónmi rokov (Vďačný 2015). Vo variabilnej časti helixu II ITS2 molekuly nachádzame pri zástupcoch radu *Spathidiida* motív 5'-GA-3' vs. 5'-UC-3', kým pri zástupcoch radov *Haptorida* a *Pleurostomatida* tu naopak nachádzame variant 5'-AG-3' vs. 5'-CU-3' (Obr. 1). Sesterský vzťah haptoridov a pleurostomatidov okrem tejto spoločnej molekulárnej signatúry podporujú aj viaceré zdieľané morfologické znaky. Rady bŕv haptoridov a pleurostomatidov sú usporiadané meridionálne v oblasti bunkových ústočiek a ich dorzálna kefka pozostáva z menej než troch radov sploštených a skrátených bŕv. Naproti tomu spathidiidy majú rady bŕv zahnuté smerom k bunkovým ústočkám a typicky majú trojradovú dorzálnu kefku (Rajter & Vďačný 2017; Obr. 1).



Obr. 1. Fylogenetické vzťahy štyroch hlavných línií dravých nálevníkov triedy *Litostomatea* na základe morfológie a sekundárnej štruktúry ITS2 molekuly (podľa Rajter & Vďačný 2017). Podtrieda *Rhynchostomatia* má bunkové ústočka umiestnené na báze chobotovitého výbežku, kým podtrieda *Haptoria* ich má umiestnené na apikálnom póle bunky. Helixy II a III v ITS2 molekule sú dlhšie o jeden bázový pár pri zástupcoch podtriedy *Rhynchostomatia*, kým terminálne slučky oboch helixov sú dlhšie o jeden respektíve dva nukleotid/-y pri zástupcoch podtriedy *Haptoria*. Rad *Spathidiida* sa v rámci podtriedy *Haptoria* odštiepil ako prvý a rady *Haptorida* a *Pleurostomatida* predstavujú sesterské skupiny. Vo variabilnej časti helixu II ITS2 molekuly nachádzame pri zástupcoch radu *Spathidiida* motív 5’-GA-3’ vs. 5’-UC-3’, kým pri zástupcoch radov *Haptorida*

a *Pleurostomatida* tu naopak nachádzame variant 5'-AG-3' vs. 5'-CU-3'. Rady bŕv haptoridov a pleurostomatidov sú usporiadané meridionálne v oblasti bunkových ústočiek a ich dorzálna kefka pozostáva z menej než troch radov. Naproti tomu spathidiidy majú rady bŕv zahnuté smerom k bunkovým ústočkám a typicky majú trojradovú dorzálnu kefku. BÚ – bunkové ústočka, DK – dorzálna kefka, CH – chobotovitý výbežok, RB – rady bŕv.

Čo sa týka podtriedy *Rhynchostomatia*, jej dve hlavné skupiny sa značne líšia v počte druhov. Rad *Tracheliida* obsahuje iba dva známe druhy, kým rad *Dileptida* zahŕňa až 64 taxónov skupiny druhu (Vďačný & Foissner 2012). Komparatívne analýzy naznačili, že v morfológii rhynchostomátnych nálevníkov je zakonzervovaných viacero starobylých pleziomorfných čŕt, pričom morfológia tracheliidov sa najviac podobá na rekonštrukciu ancestrálnej morfológie posledného spoločného predka triedy *Litostomatea* (Vďačný & Rajter 2015, Vďačný et al. 2010, 2011, 2012, 2017). Tracheliidy majú takmer sférické telo s nepohyblivým chobotovitým výbežkom a ich dorzálna kefka nie je schodovito usporiadaná. Na druhej strane posledný spoločný predok dileptidov mal veľmi pravdepodobne cylindrické telo s pohyblivým chobotovitým výbežkom a schodovitú dorzálnu kefku. Na základe Bayesiánskej analýzy BiSSE (Binary State Speciation and Extinction model) by mohli byť práve tieto odvodené apomorfné znaky dileptidov zodpovedné za kladogenický úspech radu *Dileptida*. Na druhej strane druhovo chudobné tracheliidy pravdepodobne ostali uväznené v „pleziomorfnej pasci" ich veľmi starobylej morfológie (Vďačný et al. 2017).

Pomocou analýzy kvantitatívnych morfologických charakteristík QuaSSE (*Quantitative State Speciation and Extinction model*) sme zasa zistili, že diverzifikácia v rámci podtriedy *Rhynchostomatia* lineárne narastá so zväčšujúcou sa dĺžkou tela a s narastajúcou relatívnou dĺžkou chobotovitého výbežku (Vďačný et al. 2017). Týmto rhynchostomáti vyhovujú Copeho pravidlu založenom na fosílnom zázname živočíchov, ktoré hovorí, že veľkosť tela narastá v priebehu evolúcie, t.j. potomkovia majú tendenciu byť väčší ako ich predkovia (Alroy 1988, Jablonski 1997). V skutku rhynchostomátne nálevníky nadobúdajú väčšiu veľkosť tela v porovnaní s ostatnými litostomátnymi nálevníkmi. Priemerná dĺžka ich tela varíruje od 150 do 500 µm s maximom až 1500 µm (Vďačný & Foissner 2012)! Na druhej strane spathidiidy nadobúdajú hodnoty od 60 do 150 µm s maximom 400 µm (Foissner & Xu 2007) a pleurostomatidy sú väčšinou vo veľkostnej škále od 50 do 200 µm s maximom 700 µm (Foissner et al. 1995). Hoci spathidiidy a pleurostomatidy sú menšie než rhynchostomáti, predstavujú niekoľko násobne druhovo bohatšie línie. Z toho môžeme usúdiť, že diverzifikácia v rámci triedy *Litostomatea* vykazuje rozdielnosti v jednotlivých evolučných líniách. Tento jav sa nazýva kládovo-špecifická diverzifikácia a bola tiež rozoznaná napr. pri primátoch (FitzJohn 2010). Ak zoberieme do úvahy diverzitu a veľkostnú škálu hlavných litostomátnych línií, môžeme predpokladať, že väčšia veľkosť tela naozaj „pomáha" diverzifikácii rhynchostomátov, avšak veľmi pravdepodobne prostredníctvom znižovania rizika ich vymretia.

Nálevníky svojou komplexnou morfologickou architektúrou bunky, vysokým druhovým bohatstvom a osídlením rozmanitých ekologických ník poskytujú ideálnu modelovú skupinu na výskum diverzifikačnej dynamiky eukaryotických mikroorganizmov v priebehu dlhých geologických dôb. A práve harmonické prepojenie údajov o ich aktuálnej morfológii, ekológii a druhovom spektre s molekulárnymi fylogenetickými technikami nám môže pomôcť lepšie pochopiť formovanie vzorov biodiverzity, ktoré pozorujeme v dnešnom čase.

Poďakovanie

Na tomto mieste by som chcel vyjadriť úprimnú vďaku prof. RNDr. Ľubomírovi Tomáškovi, DrSc. za nomináciu na udelenie Ceny Dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej za rok 2017. Ďalej ďakujem občianskemu združeniu Natura, že som za môj výskym venovaný integrovanej analýze evolúcie vybraných skupín nálevníkov získal uznanie Ceny Dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej. Výskum v tejto práci bol podporovaný Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-15-0147.

Literatúra

Alroy, J. (1988). Cope's rule and the dynamics of body mass evolution in North American fossil mammals. *Science* 280, 731–734.

Berney, C., Pawlowski, J. (2006). A molecular time-scale for eukaryote evolution recalibrated with the continuous microfossil record. *Proc. R. Soc. Lond. B* 273, 1867–1872.

Corliss, J.O. (2000). Biodiversity, classification, and numbers of species in protists. In: Raven, P.H., Williams, T. (Eds.), *Nature and Human Society. The Quest for a Suitable World*. National Academy Press, Washington, pp. 130–155.

Côté, C.A., Greer, C.L., Peculis, B.A. (2002) Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. *RNA* 8, 786–797.

Eme, L., Sharpe, S.C., Brown, M.W., Roger, A.J. (2014). On the age of eukaryotes: evaluating evidence from fossils and molecular clocks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 6, a016139.

Ferreira-Cerca, S. (2008). Analysis of the in vivo functions and assembly pathway of small subunit ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. PhD Thesis, Universität Regensburg. http://epub.uniregensburg.de/10718/1/Ferreira Cerca S.pdf

FitzJohn, R.G. (2010). Quantitative traits and diversification. *Syst. Biol.* 59, 619–633.

Foissner, W., Xu, K. (2007). *Monograph of the Spathidiida (Ciliophora, Haptoria).* Vol. I: Protospathidiidae, Arcuospathidiidae, Apertospathulidae. Springer, Dordrecht.

Foissner, W., Berger, H., Blatterer, H., Kohmann, F. (1995). Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems – Band IV: Gymnostomatea, Loxodes, Suctoria. *Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft* 1/95, 1–540.

Foissner, W., Chao, A., Katz, L.A. (2008). Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). *Biodivers. Conserv.* 17, 345–363.

Jablonski, D. (1997). Body-size evolution in Cretaceous molluscs and the status of Cope's rule. *Nature* 385, 250–252.

Lipps, J.H., Stoeck, T., Dunthorn, M. (2013). Fossil tintinnids. In: Dolan, J., Montagnes, D., Agatha, S., Coats, W., Stoecker, D. (Eds.), Biology and Ecology of Tintinnid Ciliates: Models for Marine Plankton. Wiley-Blackwell, West Sussex, pp. 186–197.

Rajter, Ľ., Vďačný, P. (2016). Rapid radiation, gradual extinction and parallel evolution challenge generic classification of spathidiid ciliates (Protista, Ciliophora). *Zool. Scr*., 45, 200–223.

Rajter, Ľ., Vďačný, P. (2017). Constraints on phylogenetic interrelationships among four free-living litostomatean lineages inferred from 18S rRNA gene-ITS region

sequences and secondary structure of the ITS2 molecule. *Acta Protozool.* 56, in press (10.4467/16890027AP.17.023.7825).
Reháková, D. (2000). Calcareous dinoflagellate and calionellid bioevents versus sea-level fluctuations recorded in the West-Carpathian (Late Jurassic/Early Cretaceous pelagic environments). *Geol. Carpathica* 51, 229–243.
Schönborn, W., Dörfelt, H., Foissner, W., Krienitz, L., Schäfer, U. (1999). A fossilized microcenosis in Triassic amber. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 571–584.
Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., Müller, T., Wolf, M. (2005). A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA* 11, 361–364.
Vďačný, P. (2015). Estimation of divergence times in litostomatean ciliates (Ciliophora: Intramacronucleata), using Bayesian relaxed clock and 18S rRNA gene. *Eur. J. Protistol*. 51, 321–334.
Vďačný, P., Foissner, W. (2012). Monograph of the dileptids (Protista, Ciliophora, Rhynchostomatia). *Denisia* 31, 1–529.
Vďačný, P., Rajter, Ľ. (2015). Reconciling morphological and molecular classification of predatory ciliates: Evolutionary taxonomy of dileptids (Ciliophora, Litostomatea, Rhynchostomatia). *Mol. Phylogenet. Evol*. 90, 112–128.
Vďačný, P., Orsi, W., Foissner, W. (2010). Molecular and morphological evidence for a sister group relationship of the classes Armophorea and Litostomatea (Ciliophora, Intramacronucleata, Lamellicorticata infraphyl. nov.), with an account on basal haptorid litostomateans*. Eur. J. Protistol.* 46, 298–309.
Vďačný, P., Orsi, W., Bourland, W.A., Shimano, S., Epstein, S.S., Foissner, W. (2011). Morphological and molecular phylogeny of dileptid and tracheliid ciliates: resolution at the base of the class Litostomatea (Ciliophora, Rhynchostomatia). *Eur. J. Protistol.* 47, 295–313.
Vďačný, P., Bourland, W.A., Orsi, W., Epstein, S.S., Foissner, W. (2012). Genealogical analyses of multiple loci of litostomatean ciliates (Protista, Ciliophora, Litostomatea). *Mol. Phylogenet. Evol.* 65, 397–411.
Vďačný, P., Rajter, Ľ., Shazib, S.U.A., Jang, S.W., Shin, M.K. (2017). Diversification dynamics of rhynchostomatian ciliates: the impact of seven intrinsic traits on speciation and extinction in a microbial group. *Sci. Rep.* 7, 9918.
Wolf, M., Achtziger, M.C., Schultz, J., Dandekar, T., Müller, T. (2005). Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. *RNA* 11, 1616–1623.
Wright, A.-D.G., Lynn, D.H. (1997). Maximum ages of ciliate lineages estimated using a small subunit rRNA molecular clock: crown eukaryotes date back to the Paleoproterozoic. *Arch. Protistenkd.* 148, 329–341.
Yang, Z. (2014). *Molecular Evolution: A Statistical Approach*. Oxford University Press, Oxford.

doc. Dr.rer.nat. Peter Vďačný, PhD. (1983) je pracovníkom Katedry zoológie Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave. Počas stále relatívne krátkej vedeckej kariéry už významnou mierou svojimi originálnymi výsledkami prispel do rozvoja oblastí, ktoré sú mu najbližšie: morfologickej a molekulárnej fylogenézy dravých nálevníkov triedy *Litostomatea* a taxonómii a systematike voľne žijúcich, predovšetkým pôdnych nálevníkov. (Foto: S. Girguš, rektorát UK v Bratislave).

Autofagie

Adéla Kábelová

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

Autofagie je evolučně vysoce konzervovaný katabolický proces, jehož funkcí je lysozomální degradace a recyklace buněčného materiálu za účelem udržení buněčné homeostáze. Autofagie má důležitou úlohu nejen za fyziologických podmínek, kdy se podílí na degradaci nepotřebných či poškozených proteinů a organel, ale i za podmínek patologických, jako odpověď na různé formy buněčného stresu. Správná regulace a průběh autofagie je nezbytnou součástí zdravě proliferující buňky a její deregulace může být spojena s rozvojem řady onemocnění, včetně onemocnění nádorových (shrnuto v Codogno and Meijer 2005).

U eukaryot rozlišujeme tři základní typy autofagie - makroautofagii, mikroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony. V procesu makroautofagie jsou nepotřebné proteiny a organely obaleny membránou za vzniku autofagozomu, který posléze fúzuje s lysozomy. Během mikroautofagie se do lysozomů dostávají pouze menší části cytoplasmy a inkluze a to přímou invaginací lysozomální membrány. Při autofagii zprostředkované chaperony jsou specificky degradovány proteiny nesoucí konzervovaný pentapeptidový motiv, které jsou pomocí chaperonů transportovány do lumen lysozomu (shrnuto v Glick et al. 2010). V rámci tohoto článku se dále budu zabývat pouze procesem makroautofagie (dále jen autofagie) v savčích buňkách.

Průběh a molekulární mechanismy autofagie

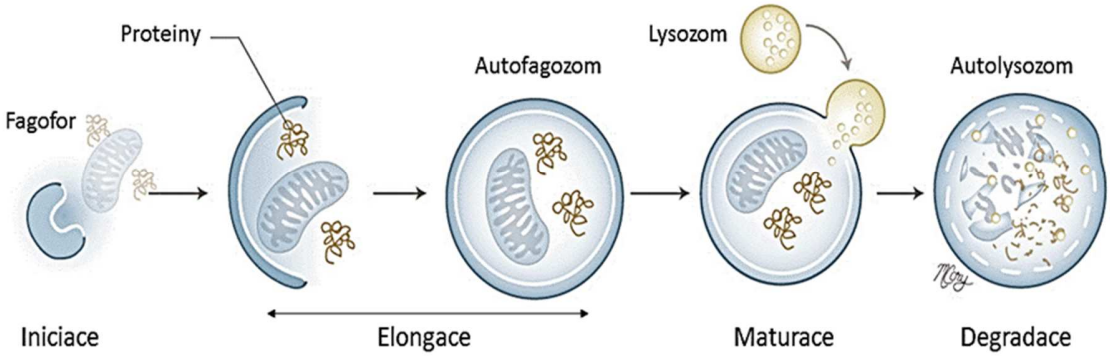
Podle morfologických charakteristik a zúčastněných proteinů lze průběh autofagie rozdělit do několika fází. Na počátku, během iniciační fáze, dochází ke vzniku malé izolované membránové struktury - fagoforu. Ten se následně prodlužuje ve fázi elongace, obklopuje buněčný materiál určený k degradaci a uzavírá se za vzniku autofagozomu. Ve fázi maturační splývá vzniklý autofagozom s lysozomem, kde je buněčný materiál v procesu degradace rozložen a jednotlivé monomerní podjednotky jsou transportovány zpět do cytoplasmy (Obr. 1) (shrnuto v Glick et al. 2010).

Ačkoliv byly morfologické znaky autofagie popsány nejdříve u savčích buněk, její výzkum na molekulární úrovni byl umožněn až objevením rodiny genů ATG (Autophagy-related genes) u kvasinek. ATG rodina čítá v dnešní době minimálně třicet různých proteinů a pro správnou biogenezi autofagozomu je nezbytně nutná přítomnost přibližně poloviny z nich (shrnuto v Simonsen and Tooze 2009).

Iniciační fáze autofagie

Autofagie je v určité bazální míře aktivována téměř v každé buňce, kde se primárně podílí na udržení stálého vnitřního prostředí. K její indukci však může dojít i vlivem nejrůznějších extracelulárních (nedostatek živin, hypoxie, bakteriální a virové infekce) a intracelulárních

(nedostatek ATP, akumulace poškozených či nepotřebných proteinů) signálů. Hlavním regulačním proteinem, který integruje řadu buněčných signálů a na jejich základě rozhoduje o spuštění autofagické dráhy, je protein mTOR (shrnuto v Yang and Klionsky 2010).

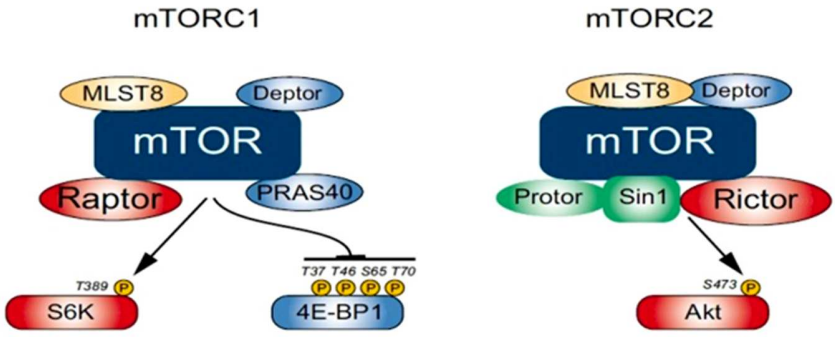


Obr. 1: Fáze autofagie (převzato a upraveno z http://www.melissaecory.com/)

Protein mTOR a jeho kompexy

Protein mTOR (mammalian target of rapamycin) je serin/threonin kináza, která za normálních podmínek aktivně funguje v signálních drahách, které působí proliferačně a současně inhibují autofagii. Antiproliferační signály, jako je například nedostatek živin, vedou naopak k inhibici proteinu mTOR, která vyústí v aktivaci autofagické signální dráhy. Molekulární podstatou těchto dějů je tvorba dvou rozdílných multiproteinových komplexů označovaných jako mTORC1 a mTORC2 (mTOR complex 1/2), které se jednak liší zúčastněnými proteiny, ale i odlišnou senzitivitou k bakteriálnímu produktu rapamycinu (shrnuto v Wullschleger et al. 2006).

Proteiny společné pro oba zmíněné komplexy jsou mTOR, MLST8 a Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein). Komplex mTORC1 je dále tvořen proteiny Raptor (Regulatory-associated protein of mTOR) a PRAS40, zatímco komplex mTORC2 obsahuje protein Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR),* mSin1 (*mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1*) a Protor (Obr. 2). Na iniciaci autofagie se jako její negativní regulátor podílí komplex mTORC1, zatímco mTORC2 se regulace autofagie neúčastní (shrnuto v Jung et al. 2010).



Obr. 2: Komplexy mTORC1 a mTORC2. Oba komplexy obsahují společné proteiny mTOR, Deptor a MLST8. Komplex mTORC1 obsahuje dále proteiny Raptor a PRAS40, zatímco komplex mTORC2 obsahuje proteiny Protor, Sin1 a Rictor. Mezi substráty mTORC1 patří kináza S6K a

protein 4E-BP1, které pozitivně regulují proces translace a buněčné proliferace. Hlavním substrátem mTORC2 je kináza Akt, která se podílí na regulaci buněčné proliferace, migrace a organizaci aktinového cytoskeletu (převzato a upraveno z Tchevkina & Komelkov 2012).

Komplex mTORC1 funguje jako senzor celé řady extra a intracelulárních signálů, které integruje a prostřednictvím aktivace dalších signálních komponent, například kinázy S6K a proteinu 4E-BP1, pozitivně reguluje proteosyntézu, buněčnou proliferaci a inhibuje proces autofagie. Komplex mTORC2 je senzitivní k růstovým faktorům a prostřednictvím aktivace Akt kinázy se účastní regulace buněčné proliferace, migrace, buněčného metabolismu a organizace aktinového cytoskeletu (viz Obr. 2) (shrnuto v Tchevkina & Komelkov 2012)

Substrátem aktivního komplexu mTORC1 je také komplex autofagického proteinu ATG13 a serin/treonin kinázy ULK (unc-51-like kinase). Fosforylace ULK kinázou mTOR brání její aktivaci, čímž se inhibuje iniciace autofagie. Inhibice mTORC1 se naopak projeví defosforylací těchto proteinů a aktivaci ULK, která fosforyluje sama sebe a proteiny ATG13 a FIP200 (200 kDa focal adhesion kinase family interacting protein). Ty společně vytváří komplex, který je lokalizován v oblasti vznikajícího fagoforu (Jung et al. 2009). Součástí komplexu ATG13:ULK:FIP200 je dále protein ATG101, jehož funkce spočívá ve stabilizaci genové exprese proteinu ATG13 a jeho ochraně před proteazomální degradací (Mercer et al. 2009). Inaktivace komplexu mTORC1 umožní kromě tvorby výše uvedeného komplexu též transkripci dalších ATG genů, které se účastní pozdějších fází autofagické kaskády.

Tvorba autofagozomální membrány

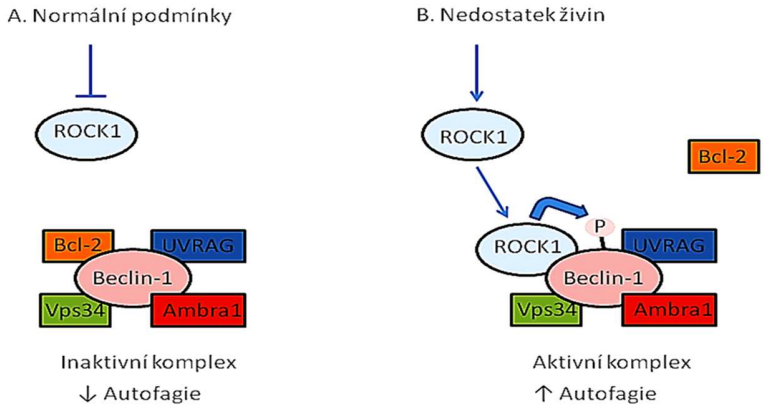
Bezprostředně po iniciaci autofagické signální dráhy dochází v cytosolu ke vzniku dvojvrstvé izolované membrány - fagoforu, který se následně prodlužuje a obklopuje buněčný materiál určený pro degradaci. Původ membrány fagoforu je zatím nejasný, pravděpodobně však nevzniká *de novo* a zdrojem membránových lipidů jsou spíše některé buněčné membránové struktury. Podle studie Axe a kol. 2008 pochází membránové lipidy fagoforu ze specifické oblasti ER, tzv. omegazomu, která je zvláště bohatá na fosfatidylinositol-3 fosfát (PI3P), jehož zvýšené množství bylo detekováno i v membráně fagoforu. Jiné studie označují jako původce této membrány mitochondrie (Cook et al. 2014), Golgiho aparát (Yen et al. 2010) či cytoplasmatickou membránu (Ravikumar et al. 2010).

Proces nukleace iniciační membrány fagoforu závisí na aktivitě multiproteinového komplexu fosfatidylinositol-3 kinázy III třídy (PI3KC3), který je tvořen proteinem PI3KC3 (Vps34), regulačními kinázami p150 a Vps15, proteiny UVRAG (*Ultraviolet irradiation resistant-associated gene*), Ambra1 (*Activating molecule in Beclin-1 regulated autophagy*), Barkor a Beclin-1. Tento komplex se nachází na vznikající membráně fagoforu a jeho funkcí je translokace dalších ATG proteinů do této oblasti a tvorba PI3P nutného pro elongaci membrány (Itakura et al. 2008; Sun et al. 2008).

Aktivita komplexu PI3KC3 je striktně regulována řadou proteinů, které se také velice často účastní regulace iniciace apoptózy. Antiapoptotický protein Bcl-2 je za normálních podmínek asociován s BH doménou proteinu Beclin-1, čímž znemožňuje aktivaci výše uvedeného komplexu. Za stresových podmínek dochází k aktivaci kinázy ROCK1 (*Rho associated, coiled-coil containing protein kinase 1*), která váže protein Beclin-1, fosforyluje jej na Thr119, čímž umožní disociaci proteinu Bcl-2 a aktivaci komplexu PI3KC3 (Obr. 3) (Gurkar et al. 2013). Jiným důležitým regulačním prvkem je protein Rubicon, který též

váže protein Beclin-1 a inhibuje aktivaci PI3KC3 komplexu tím, že brání jeho asociaci s dalším členem komplexu - proteinem Barkor (Itakura et al. 2008).

Zatím však není zcela jasné, jakým způsobem jsou během iniciace autofagie propojeny komplexy ATG13:ULK:FIP200 a PI3KC3. Tyto komplexy se pravděpodobně mohou vzájemně regulovat, s cílem koordinovat iniciaci autofagie. Mohou však také fungovat jako receptory různých autofagických signálů v paralelních signálních drahách (Jung et al., 2010).



Obr. 3: Aktivace komplexu fosfatidylinositol 3-kinázy třídy III (PI3KC3). Za normálních podmínek je kináza ROCK1 inaktivní a komplex PI3KC3 tvořený proteiny Vsp34, UVRAG, Ambra1 a Beclin-1 je inhibován asociací s proteinem Bcl-2. Buněčný stres aktivuje ROCK1, která asociuje s proteinem Beclin-1 a fosforyluje ho, čímž dojde k disociaci proteinu Bcl-2 a aktivaci komplexu. Pro zjednodušení jsou v obrázku uvedeny pouze vybrané proteiny tvořící tento komplex (převzato a upraveno podle Gurkar et al. 2013).

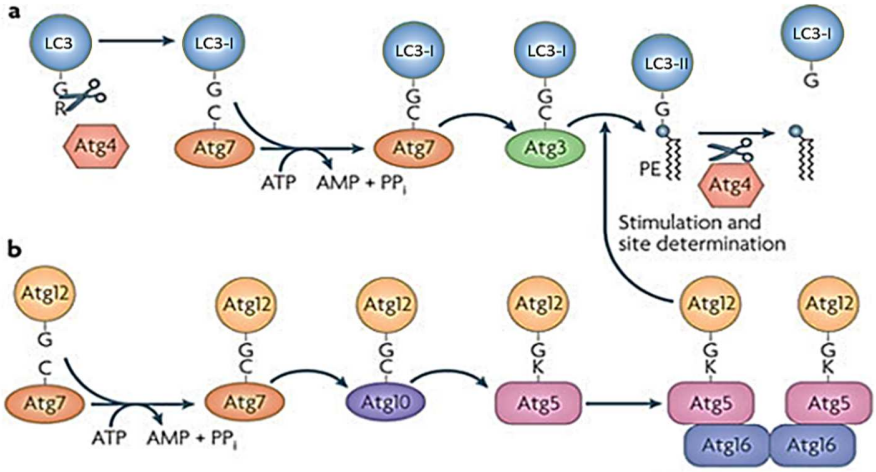
Elongační fáze autofagie a vznik autofagozomu

V prodlužující se membráně fagoforu dochází ke strmému nárůstu hladiny PI3P, jakožto hlavní lipidické složky. Důležitým proteinem u savců v tomto procesu je protein WIPI1, který váže PI3P, a funguje jako molekulární lešení pro stavbu a elongaci membrány autofagozomu (Proikas-Cezanne et al. 2004). Další protein ATG9 přináší do prodlužující se membrány lipidy. Protein ATG9 a také další protein VMP1 (*vacuole membrane protein 1*) translokují na vznikající membránu autofagozomu další efektorové proteiny včetně komplexu PI3KC3 (Reggiori et al. 2004; Ropolo et al. 2007)

V elongaci autofagosomální membrány hrají důležitou úlohu dva konjugační systémy ATG12:ATG5-ATG16L1 a lipidovaná forma proteinu LC3, které fungují obdobně jako proces ubiquitinace (Obr. 4). Konjugace proteinu ATG12 k ATG5 probíhá záhy po jejich syntéze a vyžaduje ATG7, který aktivuje ATG12, a předá jej na ATG10. Činností ATG10 pak vzniká konjugát ATG12:ATG5, který dále nekovalentně asociuje s proteinem ATG16L1 za tvorby oligomerních komplexů (Yang and Klionsky 2009). Vzniklý komplex ATG12:ATG5-ATG16L1 pak asociuje s proteinem LC3 a účastní se aktivně druhého konjugačního systému při vzniku lipidovaného LC3.

V druhém konjugačním systému je nejprve protein LC3 štěpen proteázou ATG4, která na jeho C-konci zanechá zbytek aminokyseliny glycinu. Tímto koncem je pak aktivovaný LC3, označovaný jako LC3-I připojen na ATG7, který jej následně přenese na ATG3 (Yang and Klionsky 2009). Komplex vzniklý v prvním konjugačním systému ATG12: ATG5

-ATG16L1 pak přenese LC3-I z ATG3 na polární část fosfatidyletanolaminu, lipidu v autofagozomální membráně. Lipidovaná forma proteinu LC3, označovaná jako LC3-II se vyskytuje striktně pouze v membráně autofagozomu a to v obou vrstvách, zatímco nekonjugované formy LC3 a LC3-I jsou lokalizovány volně v cytosolu (Hanada et al. 2007).



Obr. 4: Konjugační systémy LC3 a ATG12. Konjugace proteinu LC3 na fofatidylethanolamin (PE) probíhá ve třech krocích (viz Obr. 4a). Nejprve je cytosolický LC3 štěpen proteázou Atg4 za vzniku LC3-I, který je připojen na ATG7. Následně je LC3-I přenesen na ATG3 a posléze komplexem Atg12:Atg5-Atg16L1 konjugován na PE. Konjugace proteinu ATG12 na ATG5 (viz Obr. 4b) probíhá nejprve aktivací ATG12 pomocí ATG7 a následnou konjugací k proteinu ATG5 pomocí ATG10. Vzniklý komplex Atg12:Atg5-Atg16L1 funguje jako E3-ligáza při konjugaci LC3-I na PE (Nakatogawa et al. 2009).

Po zformování úplného autofagozomu, který již obklopuje buněčný materiál určený k degradaci, opouští komplex Atg12:Atg5-Atg16L1 membránu a lipidovaná forma proteinu LC3 je z cytosolické strany autofagosomální membrány odštěpena a recyklována (Fujita et al. 2008). Změny hladiny forem proteinu LC3, tj. volného LC3-I a konjugovaného LC3-II, jsou často využívány jako ukazatel buněčné míry autofagie.

Maturační fáze a degradace buněčných komponent

Posledním krokem procesu autofagie je maturace autofagozomu, která spočívá v zabudování cholestorolu do autofagozomální membrány, snížení pH v lumen autofagozomu a jeho následné fúzi s lysozomem za vzniku degradační organely - autolysozomu (autofagolysozomu).

Maturace autofagozomu je mimo jiné závislá na proteinu Beclin-1 a jeho interakcích s proteiny komplexu PI3KC3, který hraje úlohu též v iniciační fázi autofagie). Zatímco komplex Beclin-1:PI3KC3:Rubicon brání dozrávání autofagozomu, komplex Beclin-1:PI3KC3:UVRAG dozrávání autofagozomu urychluje a napomáhá též pohybu vesikulů (Zhong et al. 2009).

Vyhledání a asociaci cílových membrán, případně jejich následné fúzi, napomáhají monomerní G-proteiny z rodiny Rab, zvláště Rab7 (Jager et al. 2004). Samotná fúze cílových membrán je zprostředkována proteiny z rodiny SNARE, které jsou lokalizovány v obou fúzujících membránách a proteiny DRAM, které se nacházejí pouze v membráně

lysozomu. Buněčný materiál spolu s autofagosomální membránou je následně degradován lysozomálními hydrolázami za vzniku monomerů - aminokyselin, mastných kyselin a nukleotidů, které jsou pomocí membránových přenašečů exportovány zpět do cytosolu. Zvýšení hladiny živin v cytosolu má pozitivní vliv na komplex mTORC1, který následně zpětně inhibuje proces autofagie (shrnuto v Mehrpour et al. 2010).

Úloha mikrotubulů v procesu autofagie

Důležitou úlohu v procesu autofagie mají také mikrotubuly, které se jednak účastní počáteční fáze autofagie při vzniku autofagozomu, tak i následně ve fázi maturační, kdy zajišťují transport autofagozomu cytoplasmou a napomáhají tak jejich fúzi s lysozomy. Dle studie Kochl a kol. 2006) se však mikrotubuly účastní primárně autofagie indukované buněčným stresem a jejich úloha v autofagii za fyziologických podmínek je diskutabilní.

Úloha mikrotubulů v iniciační a elongační fázi autofagie

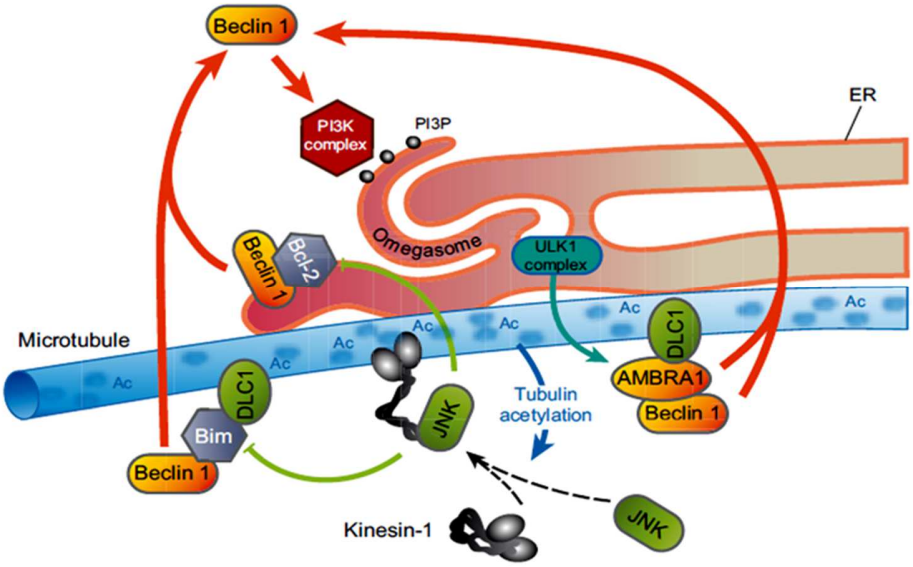
Úloha mikrotubulů ve vzniku autofagozomu spočívá jednak v regulaci komplexů mTORC1 a PI3KC3, které iniciují proces autofagie, ale i ve funkci molekulárního lešení pro proteiny, které se tohoto procesu účastní.

Komplex mTORC1, který je negativním regulátorem iniciace autofagie, je asociován s cytosolickou vrstvou lysozomální membrány. Buněčná lokalizace lysozomů je dána činností mikrotubulů a s nimi asociovaných molekulárních motorů kinesinů. Činností kinesinů-2 a -3 jsou lysozomy transportovány do periferních oblastí buňky, což je spojeno s aktivací komplexu mTORC1. Během indukce autofagie dochází k disociaci kinesinů z mikrotubulů a přesunu lysozomů do středu buňky, čímž dochází k inaktivaci komplexu mTORC1 a iniciaci autofagie (Korolchuk et al. 2011).

Komplex PI3KC3 je tvořen mimo jiné proteinem Beclin-1, který je pomocí mikrotubulů lokalizován ve dvou různých komplexech. Tyto komplexy obsahují společně kromě proteinu Beclin-1 také lehký řetězec dyneinu (DLC1) a následně buď protein Ambra1, nebo proapoptotický protein Bim. Během iniciace autofagie jsou paralelně fosforylovány kinázou ULK protein Ambra1 a protein Bim kinázou JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). V obou případech vede fosforylace k uvolnění proteinu Beclin-1 a jeho translokaci do komplexu PI3KC3 do oblasti omegasomu na ER, kde se iniciuje tvorba autofagozomální membrány (Di Bartolomeo et al. 2010; Luo et al. 2012). Kináza JNK také fosforyluje antiapoptotický protein Bcl-2 lokalizovaný na membráně ER a tím umožní disociaci proteinu Beclin-1 z komplexu Beclin-1:Bcl-2 a tím aktivaci autofagie (Obr. 5) (shrnuto v Mackeh et al. 2013).

K aktivaci kinázy JNK v procesu autofagie může docházet několika mechanismy. Jednou z možností je aktivace pomocí kinázy ROCK1 (Ongusaha et al. 2008), případně také pomocí kinesinu-1. Podmínkou asociace kinesinu-1 s JNK a její aktivace je hyperacetylace mikrotubulů, která umožní změnu laterárních interakcí mezi podjednotkami tubulinu a translokaci kinesinu-1 na mikrotubuly (Obr. 5) (Geeraert et al. 2010).

Mikrotubuly také přímo nebo prostřednictvím adaptorových proteinů MAPs (*microtubule-associated proteins*) interagují s řadou autofagických proteinů, např. s proteiny ULK, LC3, ATG5 a Beclin-1. Dynamika mikrotubulů spojená s relokalizací autofagických proteinů tak následně urychluje a umožňuje proces biogeneze autofagozomu (shrnuto v Mackeh et al. 2013).



Obr. 5: Úloha mikrotubulů ve vzniku autofagozomu. Před zahájením autofagie zajišťují mikrotubuly sekvestraci autofagického proteinu Beclin-1 do dvou různých komplexů obsahujících společně lehký řetězec dyneinu 1 (DLC1) a protein Ambra1, nebo protein Bim. Protein Beclin-1 také interaguje s proteinem Bcl-2 a vytváří komplex lokalizovaný na cytosolické vrstvě membrány endoplasmatického retikula. Během iniciační fáze autofagie fosforyluje komplex ULK protein Ambra1, čímž dojde k uvolnění proteinu Beclin-1 z tohoto komplexu a jeho translokaci do komplexu PI3KC3. Současně vede hyperacetylace mikrobululů k translokaci proteinu kinesin-1 na mikrotubuly a následné aktivaci JNK. Aktivovaná JNK pak fosforyluje proteiny Bim a Bcl-2, čímž uvolní protein Beclin-1 z příslušných komplexů a tím iniciují tvorbu autofagosomu (shrnuto v Mackeh et al. 2013).

Vznik autofagozomálních struktur je však dán celkovou souhrou mezi stabilitou a dynamikou mikrotubulárního systému. Narušení intaktní mikrotubulární sítě použitím taxanů, ale i jiných látek deregulujících přirozené vlastnosti mikrotubulů se proces autofagie inhibuje (Kochl et al. 2006).

Úloha mikrotubulů v maturační fázi autofagie

Vznik autolysozomu je závislý na transportu autofagozomů směrem k lysozomu a následně na jejich fúzi. Zatímco úloha mikrotubulů v samotné fúzi je stále diskutovanou otázkou, samotný transport autofagozomu napříč cytosolem je proces na mikrotubulech plně závislý. Vytvořené autofagosomy jsou pohybovány podél mikrotubulů prostřednictvím molekulárních motorů - dyneinů a jsou koncentrovány v perinukleární oblasti blízko lysozomů, se kterými následně splývají (shrnuto v Mackeh et al. 2013).

Úloha autofagie v buněčné smrti - PCD II a apoptóza

Autofagie má kromě cytoprotektivní funkce další uplatnění v procesu buněčné smrti. Samotný proces autofagie může představovat jeden z typů programované buněčné smrti, který se označuje jako PCD II (Programmed cell death II). Současně je autofagie velice

úzce spjata s apoptózou a proteiny, které v těchto drahách figurují, mohou oba tyto procesy navzájem různými způsoby regulovat.

Autofagie jako typ buněčné smrti - PCD II

Jeden z možných mechanismů buněčné smrti realizované procesem autofagie je ten, že autofagie dosáhne takové míry, kdy katabolické procesy převáží anabolické, čímž dojde k buněčné atrofii, která vyústí v buněčnou smrt. Druhým mechanismem je autofagická degradace specifických proteinů a organel, které jsou pro fungování buňky nezbytné a jejichž absence vede k buněčné smrti. Morfologicky je PCD II charakterizována akumulací autofagozomů a na rozdíl od apoptózy se jedná o proces nezávislý na kaspázách, při kterém nedochází k fragmentaci DNA ani k tvorbě apoptotických tělísek (shrnuto v Tsujimoto and Shimizu 2005).

Autofagický typ buněčné smrti bývá nejčastěji pozorováván u buněk, které v důsledku mutací genů pro apoptotické proteiny nejsou schopny iniciovat a realizovat proces apoptózy. Příkladem může být zvýšení exprese anitoapoptotických proteinů Bcl-2 rodiny, či naopak inhibice proapoptotických členů Bax a Bak, jež v důsledku vedou k inhibici procesu apoptózy a iniciaci autofagie (Shimizu et al. 2004). Ve studii Yu a kol. (2004) byla PCD II pozorována v buňkách s inhibovanou kaspázou 8. K nadměrné aktivaci autofagie může také vést neschopnost tvorby komplexu Bcl-2:Beclin-1, v důsledku mutace genu pro Beclin-1, čímž dochází ke ztrátě inhibičního efektu tohoto komplexu v iniciaci autofagie (Pattingre et al. 2005).

Stále však není jasné, zda se dá PCD II skutečně považovat za samostatný typ buněčné smrti, nebo je pouze provázejícím jevem apoptózy. Otázkou také zůstává, je-li zvýšená míra autofagie samotnou příčinou buněčné smrti, nebo naopak snahou buňky se buněčné smrti vyhnout.

Vzájemný vztah mezi autofagií a apoptózou

Procesy autofagie a apoptózy jsou spolu velice úzce spojeny, neboť jejich rovnováha hraje úlohu v udržení buněčné hemeostáze. Tyto procesy mohou fungovat kooperativně, kdy oba dva vedou společně k buněčné smrti, přičemž jeden z nich může být záložním mechanismem v případě, že selže první proces. V jiných případech se mohou tyto procesy vzájemně inhibovat a fungovat jako antagonisté, kdy cílem autofagické dráhy bude obnovení buněčné homeostaze, zatímco v případě apoptózy bude cílem eliminace buňky. V neposlední řadě může být autofagie doprovodným jevem apoptózy, jejíž funkcí je zajišťovat správné podmínky pro její průběh, např. udržováním stále hladiny ATP (shrnuto v Maiuri et al. 2007).

Společnými regulačními prvky iniciace autofagie a apoptózy jsou některé proteiny Bcl-2 rodiny. Příkladem inhibice autofagické i apoptotické dráhy může být již zmíněná asociace proteinu Beclin-1 s Bcl-2. Tvorba komplexů Beclin-1:Bcl-2 může být naopak inhibována proapoptotickými proteiny Bad, Bik a Puma, které kompetují s proteinem Beclin-1 o vazbu k Bcl-2 (shrnuto v Levine et al. 2008). Antagonické chování autofagie a apoptózy může být důsledkem štěpení a degradace proteinu Beclin-1 prostřednictvím kaspáz, které se aktivují během apoptózy (Wirawan et al. 2010).

Autofagie u nádorových onemocnění

Příčinou nádorové transformace buňky jsou poruchy její fyziologie, vzniklé v důsledku deregulace proteinů, které se účastní oprav genetické informace buňky, proliferace, ale i

řady dalších dějů. Úloha autofagie u nádorových onemocnění je velmi komplexní, a tudíž i velice komplikovaná. V závislosti na typu nádorového onemocnění, stádiu rozvoje a genetickém pozadí nádorové buňky může autofagie fungovat jednak jako nádorový supresor, nebo naopak rozvoj nádorů podporovat (shrnuto v Rosenfeldt and Ryan 2011).

Protinádorová úloha autofagie

Protinádorová funkce autofagie vychází z jejího cytoprotektivního charakteru, kdy eliminuje poškozené proteiny a organely, které by mohly potenciálně vést k buněčnému poškození a potenciovat tak nádorovou transformaci. Jedním z příkladů může být degradace poškozených mitochondrií, které generují velké množství reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). ROS reagují s nukleovými kyselinami a působí genotoxicky, což vede k nárůstu počtu mutací a s tím spojené nádorové transformace (Zhang et al. 2008). Ke zvýšení hladiny ROS také přispívá akumulace proteinu p62/SQSTM (Sequestosome 1) v cytosolu. Tento protein je však během autofagie specificky degradován, čímž je potlačen jeho tumorogenní účinek (Mathew et al. 2009).

Nádorové buňky také velice často nesou mutace genů, které regulují a realizují průběh autofagie. Časté jsou například mutace v proteinech Beclin-1, UVRAG, ATG12 a LC3. Řada nádorů má také hyperaktivovanou signalizační dráhu mTOR, která inhibuje autofagii a podporuje buněčnou proliferaci (Qu et al. 2003).

Tumorogenní úloha autofagie

U nádorových buněk je velmi častá zvýšená bazální hladina autofagie, která koresponduje s její tumorogenní úlohou. Recyklace buněčných komponent prostřednictvím autofagie může uspokojit zvýšené nároky nádorových buněk na přísun živin. Autofagie také umožňuje překonat stresové podmínky indukované např. hypoxií a metastázováním a tím zajistit nádoru další růst a expanzi (shrnuto v Rosenfeldt and Ryan 2011).

Hyperaktivace autofagické dráhy je také potenciálním mechanismem rezistence nádorových buněk k chemoterapii (Wu et al. 2013b). Inhibice autofagie by tak teoreticky mohla být prostředkem pro překonání rezistence. Řada studií potvrzuje fakt, že inhibice autofagie může vést k obnovení senzitivity nádorů k chemoterapii a k apoptóze (Xi et al. 2011; Zhang et al. 2013), jiné studie však tuto hypotézu popírají. Turcotte and Giaccia (2010) pozorovali po inhibici autofagie zvýšení rezistence k chemoterapii, což ukazuje, že autofagie v tomto případě pravděpodobně fungovala jako PCD II.

Lze tedy shrnout, že zatímco u normálních buněk autofagie spíše brání nádorové transformaci, tak u samotného nádoru a při tvorbě metastáz je její funkce spíše tumorogenní. Znalost úlohy autofagie v nádorových onemocnění může být zásadním předpokladem úspěšné léčby a právě kombinace chemoterapeutik s regulátory autofagie by v budoucnu mohla nabídnout zdárný přístup k terapii těchto onemocnění (shrnuto v Liu and Ryan 2012).

Metody studia autofagie

Úloha autofagie v kontextu dalších buněčných dějů je nejčastěji studována pomocí chemických látek, které modulují její aktivitu a působí ve specifických fázích autofagické kaskády, a které lze jednoduše rozdělit na aktivátory a inhibitory autofagie. Mezi aktivátory autofagie patří zejména rapamycin produkovaný bakteriemi *Streptomyces hygroscopicus*. Rapamycin se v buňce váže na komplex mTORC1, čímž jej inhibuje a aktivuje autofagickou dráhu (Wu et al. 2013a). Bafilomycin A1 a 3-methyladenin fungují naopak

jako inhibitory autofagie. 3-methyladenin působí jako inhibitor PI3K, která se podílí na tvorbě iniciační membrány fagoforu, zatímco bafilomycin A1 blokuje funkci protonové pumpy, která snižuje pH v lumen autofagozomu. Bafilomycin A1 tedy působí až v maturační fázi autofagie, a jeho aplikace je spojena s akumulací autofagozomů, neboť je inhibována jejich fúze s lysozomy (shrnuto v Klionsky et al. 2007; Mizushima et al. 2010).

Samotná míra autofagie je pak většinou testována prostřednictvím detekce hladiny některých autofagických markerů metodou western blot či jejich vizualizací mikroskopickými metodami. Často užívanými autofagickými markery jsou zejména dva proteiny - LC3 a p62. Protein LC3 hraje důležitou úlohu v elongační fázi autofagie a existuje ve dvou různých formách. Zatímco hladina LC3-I ukazuje míru solubilního cytosolického proteinu LC3, hladina LC3-II ukazuje míru LC3 lokalizovaného v membráně autofagozomu, který je během autofagie degradován. Detekce hladiny LC3-II, který má tedy pouze omezenou životnost tak poměrně přesně odráží aktuální počet autofagozomů v buňce a tím i míru autofagie (shrnuto v Mizushima et al. 2010).

Protein p62/SQSTM1 asociuje během autofagie s proteinem LC3-II a je též inkorporován do membrány autofagozomu a následně degradován. V případě inhibice autofagie dochází naopak k jeho akumulaci v cytosolu a detekované množství p62 je tak nepřímo úměrné míře autofagie. Protein p62 je však jen nepřímým markerem autofagie, neboť se v buňce účastní i řady jiných dějů a nelze jej tedy využít k detekci autofagii osamoceně, ale pouze v kombinaci s dalšími autofagickými markery (shrnuto v Klionsky et al. 2007; Mizushima et al. 2010).

Literatura

AXE, E. L., S. A. WALKER, M. MANIFAVA, P. CHANDRA, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, Aug 25 2008, 182(4), 685-701.

CODOGNO, P. AND A. J. MEIJER Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation,* Nov 2005, 12, 1509-1518.

COOK, K. L., D. R. SOTO-PANTOJA, M. ABU-ASAB, P. A. G. CLARKE, et al. Mitochondria directly donate their membrane to form autophagosomes during a novel mechanism of parkin-associated mitophagy. *Cell and Bioscience*, Mar 27 2014, 4.

DI BARTOLOMEO, S., M. CORAZZARI, F. NAZIO, S. OLIVERIO, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *Journal of Cell Biology*, Oct 4 2010, 191(1), 155-168.

FUJITA, N., T. ITOH, H. OMORI, M. FUKUDA, et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, May 2008, 19(5), 2092-2100.

GEERAERT, C., A. RATIER, S. G. PFISTERER, D. PERDIZ, et al. Starvation-induced Hyperacetylation of Tubulin Is Required for the Stimulation of Autophagy by Nutrient Deprivation. *Journal of Biological Chemistry*, Jul 30 2010, 285(31), 24184-24194.

GLICK, D., S. BARTH AND K. F. MACLEOD Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, May 2010, 221(1), 3-12.

GURKAR, A. U., K. CHU, L. RAJ, R. BOULEY, et al. Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nature Communications*, Jul 2013, 4.

HANADA, T., N. N. NODA, Y. SATOMI, Y. ICHIMURA, et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, Dec 28 2007, 282(52), 37298-37302.

ITAKURA, E., C. KISHI, K. INOUE AND N. MIZUSHIMA Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell*, Dec 2008, 19(12), 5360-5372.

JAGER, S., C. BUCCI, I. TANIDA, T. UENO, et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*, Sep 15 2004, 117(20), 4837-4848.

JUNG, C. H., C. B. JUN, S.-H. RO, Y.-M. KIM, et al. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell*, Apr 2009, 20(7), 1992-2003.

JUNG, C. H., S.-H. RO, J. CAO, N. M. OTTO, et al. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, Apr 2 2010, 584(7), 1287-1295.

KLIONSKY, D. J., A. M. CUERVO AND P. O. SEGLEN Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*, May-Jun 2007, 3(3), 181-206.

KOCHL, R., X. W. HU, E. Y. W. CHAN AND S. A. TOOZE Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*, Feb 2006, 7(2), 129-145.

KOROLCHUK, V. I., S. SAIKI, M. LICHTENBERG, F. H. SIDDIQI, et al. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nature Cell Biology*, Apr 2011, 13(4), 453-U242.

LEVINE, B., S. SINHA AND G. KROEMER Bcl-2 family members - Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, Jul 1 2008, 4(5), 600-606.

LIU, E. Y. AND K. M. RYAN Autophagy and cancer - issues we need to digest. J*ournal of Cell Science,* May 15 2012, 125(10), 2349-2358.

LUO, S., M. GARCIA-ARENCIBIA, R. ZHAO, C. PURI, et al. Bim Inhibits Autophagy by Recruiting Beclin 1 to Microtubules. *Molecular Cell*, Aug 10 2012, 47(3), 359-370.

MACKEH, R., D. PERDIZ, S. LORIN, P. CODOGNO, et al. Autophagy and microtubules - new story, old players. *Journal of Cell Science*, Mar 1 2013, 126(5), 1071-1080.

MAIURI, M. C., E. ZALCKVAR, A. KIMCHI AND G. KROEMER Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Sep 2007, 8(9), 741-752.

MATHEW, R., C. M. KARP, B. BEAUDOIN, N. VUONG, et al. Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62*. Cell,* Jun 12 2009, 137(6), 1062-1075.

MEHRPOUR, M., A. ESCLATINE, I. BEAU AND P. CODOGNO Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res*, Jul 2010, 20(7), 748-762.

MERCER, C. A., A. KALIAPPAN AND P. B. DENNIS A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, Jul 1 2009, 5(5), 649-662.

MIZUSHIMA, N., T. YOSHIMORI AND B. LEVINE Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*, Feb 5 2010, 140(3), 313-326.

NAKATOGAWA, H., K. SUZUKI, Y. KAMADA AND Y. OHSUMI Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. Nature Reviews Molecular Cell Biology, Jul 2009, 10(7), 458-467.

ONGUSAHA, P. P., H. H. QI, L. RAJ, Y.-B. KIM, et al. Identification of ROCK1 as an Upstream Activator of the JIP-3 to JNK Signaling Axis in Response to UVB Damage. *Science Signaling*, Nov 25 2008, 1(47).

PATTINGRE, S., A. TASSA, X. P. QU, R. GARUTI, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, Sep 23 2005, 122(6), 927-939.

PROIKAS-CEZANNE, T., S. WADDELL, A. GAUGEL, T. FRICKEY, et al. WIPI-1 alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene*, Dec 16 2004, 23(58), 9314-9325.

QU, X. P., J. YU, G. BHAGAT, N. FURUYA, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, Dec 2003, 112(12), 1809-1820.

RAVIKUMAR, B., K. MOREAU, L. JAHREISS, C. PURI, et al. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature Cell Biology*, Aug 2010, 12(8), 747-U715.

REGGIORI, F., K. A. TUCKER, P. E. STROMHAUG AND D. J. KLIONSKY The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental Cell*, Jan 2004, 6(1), 79-90.

ROPOLO, A., D. GRASSO, R. PARDO, M. L. SACCHETTI, et al. The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, Dec 21 2007, 282(51), 37124-37133.

ROSENFELDT, M. T. AND K. M. RYAN The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*, Jul 2011, 32(7), 955-963.

SHIMIZU, S., T. KANASEKI, N. MIZUSHIMA, T. MIZUTA, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology*, Dec 2004, 6(12), 1221-1228.

SIMONSEN, A. AND S. A. TOOZE Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *Journal of Cell Biology*, Sep 21 2009, 186(6), 773-782.

SUN, Q., W. FAN, K. CHEN, X. DING, et al. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Dec 9 2008, 105(49), 19211-19216.

TSUJIMOTO, Y. AND S. SHIMIZU Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, Nov 2005, 12, 1528-1534.

TURCOTTE, S. AND A. J. GIACCIA Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. *Current Opinion in Cell Biology*, Apr 2010, 22(2), 246-251.

WIRAWAN, E., L. VANDE WALLE, K. KERSSE, S. CORNELIS, et al. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death & Disease*, Jan 2010, 1.

WU, L., Z. FENG, S. CUI, K. HOU, et al. Rapamycin Upregulates Autophagy by Inhibiting the mTOR-ULK1 Pathway, Resulting in Reduced Podocyte Injury. *Plos One*, May 8 2013a, 8(5).

WU, S., X. WANG, J. CHEN AND Y. CHEN Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, May 17 2013b, 434(4), 898-903.

WULLSCHLEGER, S., R. LOEWITH AND M. N. HALL TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, Feb 10 2006, 124(3), 471-484.

XI, G., X. HU, B. WU, H. JIANG, et al. Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters*, Aug 28 2011, 307(2), 141-148.
YANG, Z. AND D. J. KLIONSKY An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Autophagy in Infection and Immunity*, 2009 2009, 335, 1-32.
YANG, Z. AND D. J. KLIONSKY Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, Apr 2010, 22(2), 124-131.
YEN, W.-L., T. SHINTANI, U. NAIR, Y. CAO, et al. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *Journal of Cell Biology*, Jan 11 2010, 188(1), 101-114.
YU, L., A. ALVA, H. SU, P. DUTT, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, Jun 4 2004, 304(5676), 1500-1502.
ZHANG, H., M. BOSCH-MARCE, L. A. SHIMODA, Y. S. TAN, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, Apr 18 2008, 283(16), 10892-10903.
ZHANG, Q., S. SI, S. SCHOEN, J. CHEN, et al. Suppression of autophagy enhances preferential toxicity of paclitaxel to folliculin-deficient renal cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Dec 4 2013, 32.
ZHONG, Y., Q. J. WANG, X. LI, Y. YAN, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature Cell Biology*, Apr 2009, 11(4), 468-U262.
Elena Tchevkina and Andrey Komelkov (2012). Protein phosphorylation as a key mechanism of mTORC1/2 signaling sathways. Book Article. *Protein Phosphorylation in Human Health*, ISBN 978-953-51-0737-8, DOI: 10.5772/48274

Mgr. Adéla Kábelová (e-mail: adela.kabelova@lf1.cuni.cz) absolvovala magisterské studium v oboru Buněčná a vývojová biologie na Přírodovědecké fakutlě UK, přičemž svou diplomovou práci věnující se mechanismům rezistence nádorových buněk k aplikaci taxanů vypracovala na 3. LF UK. V současné době absolvuje doktorské studium na 1. LF UK, kde se zabývá nutrigenomickým výzkumem nutraceutik v prevenci rozvoje metabolického syndromu.

Jaderná architektura a genová exprese u *Caenorhabditis elegans*

Jitka Bolková

Katedra buněčné biologie, BIOCEV, Průmyslová 595, 252 50 Vestec

Úvod

Jaderná architektura a mobilita chromatinu

V průběhu buněčného cyklu mění chromozomy razantně svůj tvar. Při vstupu do mitózy chromatin kondenzuje a proměňuje se na pentlicovité chromozomy. Po rozdělení buňky, v interfázi, dochází k rozvolnění chromozomů a chromatin se rozprostře v jaderném objemu. Již na začátku minulého století zavedl Theodor Boveri pojem chromozomální teritoria, kde každý chromozom zaujímá v jádře určité postavení (Boveri, 1909). Později byla tato hypotéza experimentálně potvrzena (Cremer et al., 1982).

Díky pokročilým metodám zobrazování živých buněk a díky fluorescenčním proteinům v kombinaci s konfokální mikroskopií s dostatečným rozlišením je možné přímo sledovat chromozomální pohyby v jednotlivých buňkách. Opakovaně bylo experimentálně předvedeno, že vzájemné pozice chromozomálních teritorií jsou v průběhu interfáze stabilně zachovány tak, že nedochází k širokosáhlému přeskupování chromozomů (Gerlich et al., 2003, Walter et al., 2003, Cvačková et al., 2009, Strickfaden et al., 2010).

Velmi lákavou se stala otázka dědičnosti chromozomálního uspořádání. Tedy, jestli se dané rozložení chromatinu přenese přes mitózu na dceřiné buňky nebo jestli se v novém buněčném cyklu vždy vytvoří nové uspořádání, které bude v souladu s nově vzniklými potřebami buňky. Cvačková a kolektiv předvedli experimenty na jádrech lidské HepG2 linie označených fotokonvertibilním proteinem Dendra2 (Cvačková et al., 2009). Díky tomu mohli vytvářet různé vzorce na chromatinu a následně pozorovat jejich chování v čase. Ačkoli rozložení značeného chromatinu v dceřiných buňkách s porovnáním s mateřskou buňkou považují autoři za nenáhodné, většina z těchto rozdělených buněk disponovala výrazně odlišnými fluorescenčními vzorci oproti jejich původu. Z jejich studie vyplývá, že pozice chromozomálních teritorií nejsou přenášeny z buněčné generace na generaci, ale spíše dochází k sestavování *de novo* na začátku buněčného cyklu.

Podobných výsledků ohledně mitózy dospěli také Strickfaden s kolegy pozorováním jader plochého tvaru linie RPE-1, buňky pigmentového epitelu sítnice označených RFP (červený fluorescenční protein), a fotoaktivovatelnou formou GFP (Strickfaden et al., 2010). Autoři přišli s myšlenkou, že prometafáze je stádium, kdy dochází k největším změnám v chromozomálním uspořádání.

Jaderná architektura parentálních genomů

Diploidní organismy nesou ve své výbavě somatických buněk dvě odpovídající sady chromozomů, jednu od otce, *paternální*, a jednu od matky*, maternální*. U valné většiny orga-

nizmů jsou pro správný vývoj a fungování jedince nezbytné obě sady (McGrath and Solter, 1984, Surani et al., 1984). V procesu fertilizace se haploidní gamety, oocyt a spermie, nesoucí vždy jednu sadu chromozomů spojí, aby daly vzniknout diploidní zygotě, která následně v průběhu embryogeneze prochází řadou buněčných dělení.

S ohledem na organizovanost genomu v jádře a na význam jeho epigenetické informace, je třeba podívat se blíže i na otázku jaderného uspořádání z hlediska původu. Tedy, jak jsou chromozomy zděděné od matky a od otce rozděleny v jaderném prostoru? Odpověď na tuto otázku je komplikována nesnázemi, jak rozpoznat maternální a paternální chromozomy v jádře.

Badatelé pod vedením Thomase Haafa pro rozlišení původu genomu využili techniku imunofluorescenčního *in situ* značení chromatinu pomocí 5-bromodeoxyuridinu (BrdU). Myší spermie značené BrdU byly použity pro oplození neznačeného oocytu. Následně bylo BrdU značení detekováno pomocí protilátek v časném diploidním embryu (Mayer et al., 2000c). Po rozpadu prvojaderných obalů oba chromozomální sety byly stále oddělené v průběhu první mitózy a v obou jádrech v dvoubuněčném embryu. Separované genomy v jádrech byly pozorovány až do čtyřbuněčného stádia, kde se BrdU signál začínal vytrácet díky inkorporaci nových nukleotidů v replikaci DNA. V pozdějších fázích embryonálního vývoje se rozdělení parentálního genomu jevilo spíše náhodné. Pro vyloučení možnosti separace obou genomů kvůli přítomnosti inkorporovaných BrdU značek v DNA spermie využili autoři v další studii myši z rozdílných druhů (*Mus musculus* a *Mus spretus*). Rozdílné sekvence centromerické DNA u těchto druhů umožnily pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) rozpoznání maternálních a paternálních centromer v F1 hybridních embryích (Mayer et al., 2000c). I v tomto případě byla pozorována separace rodičovských konstitutivních heterochromatinů oblasti centromer v mitóze, ve dvou- a částečně i v čtyřbuněčném embryonálním stádiu. Na těchto mezidruhových křížencích bylo ukázáno separované rozložení parentálních genomů v pozdních haploidních spermatidách (Mayer et al., 2000a). Jaké je uspořádání rodičovských chromozomů v diferenciovaných tělních buňkách se rozhodli rozluštit Hepperger s kolegy. Ti na jádrech mulů, kříženců osla a koně, a lidských lymfocytech a fibroblastech pomocí FISH ukázali, že v somatických jádrech rodičovské chromozomy nevykazují žádné známky prostorově oddělených pozic (Hepperger et al., 2009).

Pokud nahlédneme do rostlinné říše, najdeme i zde příklady topologického oddělení mateřského a otcovského genomu. Problém, jak vizuálně rozlišit oba genomy, byl u většiny těchto případů vyřešen pomocí hybridních kříženců, kdy navzdory určité genetické rozdílnosti došlo ke vzniku F1 populace. Separované genomy byly pozorovány u kříženců tabáku a rulíku v somatických buňkách (Gleba et al., 1987), v mitotických i interfázních buňkách na kořenové špičce hybridu ječmene a žita pomocí genomické in situ hybridizaci (Leitch et al., 1991) a u kříženců dvou druhů ječmenu (Schwarzacher et al., 1992).

Otázkou stále zůstává, mechanismus a podstata, jak a proč k separaci homologních chromozomů od otce a od matky dochází (Haaf, 2001). Jedno z možných vysvětlení oddělených genomů v časném embryu předkládají autoři rozdílné epigenetické znaky dvou genomů. Imunofluorescenční značení myších embryí protilátkou proti 5-metylcytosinu (MeC) ukázalo, že oba genomy procházejí různými stupni modifikace DNA (Mayer et al., 2000b). Před oplozením je genom oocytu oproti genomu spermie ve stavu nízké metylace. Krátce po oplození dochází u oocytu k rapidní vlně *de novo* metylace (Howlett & Reik1991) tak, že ve stádiu prvojader, asi 3-6 hodin po oplození, jsou oba chromozomální sety přibližně na stejné metylační úrovni. Již 8 hodin po fertilizaci nastává velmi rychlá

demetylace paternální DNA ještě před nástupem replikace DNA. Jádra dvoubuněčného embrya vykazovala lokalizované barvení MeC, které odráží rozdílné stupně metylace a prostorové oddělení obou genomů. Tento stav přetrvává až do stádia čtyřbuněčného stádia, kdy s přibývajícími buněčnými cykly dochází k postupné demetylaci i maternálního genomu (Mayer et al., 2000b).

Genová exprese v meióze

Před oplozením oocyt potřebuje vyrobit a naakumulovat obrovské zásoby nezbytné pro růst a pro první kroky embryonálního vývoje, které byly vystihnuty v předchozí kapitole. Velká výzva regulace meiotické genové exprese je na úrovni produkce RNA. Oproti genové expresi v somatických buňkách, která probíhá na interfázních rozvolněných chromozomech, meiotická transkripce musí být zajištěna ve stavu, kdy jsou chromozomy již kondenzovány, a přístup k chromatinu může být omezen.

Studium meiózy modelových organismů přispělo zajímavými údaji. U obojživelníků, plazů, ptáků, ryb a některých bezobratlých byly pozorovány charakteristické chromozomální struktury zvané štětkovité (lampbrush) chromozomy. V profázi meiózy I jsou v oocytu velmi rozvolněné bivalenty, z nichž vybíhají dlouhé chromatinové smyčky do stran. Tyto smyčky jsou snadno přístupné a vysoce transkripčně aktivní (Gaginskaya et al., 2009). U savců štětkovité chromozomy pozorovány nebyly. Chromatin v savčích oocytech ve stádiu germinálního vesiklu (GV) se mění z transkripčně aktivní dekondezované konformace v diploténe na velmi kondenzovaný a transkripčně umlčený stav po ukončení růstu oocytů (Zuccotti et al., 1995, De La Fuente et al., 2004). Pomocí značení fosforylované RNA polymerázy II u savců se podařilo ukázat, že transkripční aktivita je v počátečních fázích profáze I nízká, reaktivuje se ve střední pachyténe a trvá až do diploténe (Page et al., 2012).

Hlístice *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), česky háďátko obecné, je bezobratlý mnohobuněčný modelový organismus. Jedná se o asi 1 mm dlouhý nepatogenní (neparazitický) organismus patřící do kmene hlístic. Háďátko může být izolováno prakticky po celém světě z tlejícího ovoce či zeleniny, která obsahuje dostatečný zdroj bakteriální potravy (Barrière and Félix, 2014). Modelovým organismem je *C. elegans* již od roku 1965, kdy byl Sydney Brennerem ustanoven jako vhodný genetický model pro studium vývojové biologie a neurobiologie (Brenner, 1988).

Ráda bych tedy vyzdvihla hlavní výhody, které činí *C. elegans* mimořádným experimentálním systémem. Jeho malá velikost, nenáročná kultivace a bakteriální zdroj potravy (v laboratorních podmínkách se jedná o agarovou petriho misku s vrstvou *E. coli*) představují velmi nenákladnou údržbu. Průhledné tělo umožňuje zobrazování jednotlivých buněk i detailů uvnitř buněk pomocí DIC (*differential interference contrast)* optiky nebo s pomocí fluorescenčních proteinů. *C. elegans* má velmi rychlý životní cyklus, ve kterém háďátko po vylíhnutí prochází čtyřmi larválními stádii, L1, L2, L3 a L4 než se promění v dospělce. Rychlost růstu se může přizpůsobovat podle teploty, od 15 do 25 °C. Při 20 °C se z embrya vyvine dospělec schopný kladení dalších vajec již za 4 dny. Embryonální vývoj při stejné teplotě trvá přibližně 16 hodin. Užitečnou vlastností *C. elegans* je schopnost samooplození, jež ulehčuje udržování linie. I jen jeden jedinec může vytvořit celou populaci (~300 potomků). Háďátka se totiž přirozeně vyskytují v podobě hermafroditů (>99%), kteří produkují jak spermie, tak vajíčka, a jsou schopni oplodnit samy sebe. Samci

představují jen asi 0,2 % populace a jsou schopni oplodnit hermafrodity. Přítomnost samců umožňuje jednotlivé kmeny mezi sebou křížit. Pohlaví je u *C. elegans* určeno geneticky. Hermafroditi nesou dva pohlavní X chromozomy (XX) a samci jen jeden X chromozom (X0).

Háďátko je příkladem organismu s determinačním vývojem, při kterém je osud každé buňky určen již při jejím vzniku (Sulston et al., 1983). V průběhu vývoje se tak každá buňka v embryu a larvě dělí a diferencuje na stejný počet a typ buněk podle stejného programu. Děje se tak v každém jedinci stejně, čili reprodukovatelně. Výsledkem je, že každý dospělý jedinec obsahuje stejný počet tělních buněk, 959 u hermafroditů, 1039 u samců.

Gametogeneze u *C. elegans*

Zralá gonáda hermafrodita je formována do tvaru U a skládá se z distálního a proximálního ramena. V celé distální části gonády jsou zárodečná jádra lokalizována na periferii, čímž obklopují velkou bezjadernou zónu uvnitř gonády zvanou rachis. Plasmatická membrána okolo každá buňky je neúplná a vytváří tak propojení mezi cytoplasmou zárodečných buněk a rachis (Hirsh et al., 1976). Rachis je tak místo sdílení cytoplazmatického obsahu. Syncytiální struktura gonády tak umožňuje přímou komunikaci mezi jednotlivými buňkami. Samci C. elegans vytvářejí jen jednu gonádu ve tvaru U, která produkuje pouze spermatické buňky.

Ty zárodečné buňky, které jsou nejblíže buňkám distální špičky (DTCs, *distal tip cells*), se dělí mitoticky, a proto se této části říká mitotická zóna. Jak jádra zárodečné linie postupují proximálně směrem k děloze a vulvě, procházejí jednotlivými stádii, které jsou snadno rozpoznatelné podle morfologie chomozomů. Oblast, kde buňky podstupují přechod mezi mitózou a meiotickou profází, se nazývá transition zóna (Crittenden et al., 1994). Meióza je komplexní buněčné dělení, které zahrnuje párování homologních chromozomů, tvorbu synapse, rekombinaci a segregaci chromozomů za účelem vytvoření haploidních buněk. Transition zóna koresponduje se stádii leptoténe a zygoténe profáze meiózy I. Jádra zde zaujímají tvar půlměsíce. Během tohoto procesu dochází k aktivnímu hledání dvou homologních kopií každého chromozomu. Mezi spárovanými chromozomy se zipovitě formuje proteinová struktura synaptonemálního komplexu. Plnohodnotné spojení homologů, tzv. synapse, je charakteristické pro stádium pachyténe. Sesterské chromatidy jsou v každém homologu pevně sbaleny tak, že z každé strany vybíhá řada chromatinových smyček (Schild-Prüfert et al., 2011). V procesu homologní rekombinace dochází k překřížení, zlomům a znovuspojení chromatid, jehož výsledkem je crossing-over. Chromozomy se přesunují na periferii jádra a obklopují jadérko. Jádra v pachyténe tak mají typickou morfologii připomínající klubko. Tato fáze zaujímá ze všech zón nejdelší část profáze meiózy I, a proto ji rozdělujeme na časnou, střední a pozdní. V pozdní pachyténe se synaptonemální komplex začíná rozpadat, tzv. desynapse. Chromozomy jsou nadále spojeny pomocí rekombinačních uzlíků (chiasmata). Desynapse v diploténe je provázena přechodnou fází, kdy se chromatin částečně dekondenzuje (Chan et al., 2004). Postup z pachyténe a diploténe vyžaduje MAP (*mitogen-activated protein*) kinázovou signální dráhu, která je zodpovědná za rozpad synaptonemálního komplexu (Church et al., 1995, Nadarajan et al., 2016). MAP kinázová dráha je potencionálním zprostředkovatelem fosforylace serinu25 proteinu SYP-2, čímž reguluje jeho rozpad. SYP-2 je centrální komponentou synaptonemálního komplexu (Nadarajan et al., 2016). Během posunu meiotických chromozomů z diploténe do diakineze dochází k chromozo-

mální reorganizaci, kdy se chromatin rapidně kondenzuje za vzniku šesti oddělených bivalent (Chan et al., 2004).

V ohybu gonády zárodečné buňky přecházejí do stádia diploténe. V místě, kde vstupují do proximálního ramena se rachis uzavírá. Jádra se začínají celularizovat a přijímají obsah z centrální cytoplasmy, která díky aktomyosinovému cytoskeletu proudí proximálním směrem (Wolke et al., 2007). V ohybu se buňky organizují se do jedné řady. O zárodečných buňkách v diakinezi, kde dochází k oogenezi, hovoříme jako o oocytech. Oocyt nejblíže ke spermatéce je nazýván -1, druhý oocyt od stermatéky je -2 atd. -1 oocyt prochází meiotickou maturací, která zahrnuje rozpad jaderného obalu, sestavení dělícího vřeténka, segregaci chromozomů a další změny nezbytné pro oplození a proměnu oocytu v embryo (Kim et al., 2013).

Genová exprese v meióze *C. elegans*

Doposud získaná data lokalizující transkripční aktivitu v zárodečných buňkách meiotické profáze u *C. elegans* jsou velmi nejednoznačná. První pokusy o detekci syntézy RNA vycházejí z radioaktivního značení uridinu v gonádách (Starck, 1977, Starck et al., 1983). Z jejich dat bohužel není patrné, zdali se jedná o mRNA nebo o rRNA a hovoří o celkové RNA syntéze. Další studie se spoléhaly jen na lokalizaci fosforylované formy RNA polymerázy II, které naznačují uniformní transkripční aktivitu mezi mitotickou zónou v distální části a diploténe (Walker et al., 2007).

Oplození a časná embryogeneze *C. elegans*

Oocyty jsou před oplozením zastaveny ve stádiu diakineze v profázi meiózy I. K fertilizaci dochází ve spermatéce dospělého hermafrodita. Jediná spermie proniká do oocytu, který poté prochází do dělohy, kde oocyt dozrává a začíná embryogeneze (Albertson, 1984). Maternální genom dokončuje meiózu I a vyděluje se první pólové tělísko. Následuje meióza II, která vede k tvorbě druhého pólového tělíska (McCarter et al., 1999). Během této doby je DNA spermie ve vysoce kondenzovaném stavu a okamžitě po dokončení meiózy II chromatin dekondenzuje. Formují se maternální a paternální prvojádra a začíná se replikovat DNA (Edgar and McGhee, 1988). Nejprve mateřské prvojádro migruje k prvojádru spermie, poté se společně přesunou do centra zygoty a přitom provedou rotaci o 90°. Pohyby prvojader jsou zprostředkovány paternálně získanými centrozomy, které také formují dělící vřeténko (Gönczy et al., 1999). Obě prvojádra vstupují do první mitózy, kondenzované chromozomy se seskupují do metafázní roviny a dochází k rozpadu jaderného obalu (Gorjánácz and Mattaj, 2009).

Zygota *C. elegans* se dělí asymetricky na dvě blastomery. Na anteriorní straně embrya je větší AB buňka, která vytváří vždy somatické části embrya. Na posteriorní části se nachází menší P1 buňka, která je předchůdcem buněk zárodečných a některých somatických. Během druhého dělení se AB buňka dělí symetricky podélně (o 90° k předozadní ose) na buňky ABa a ABp, zatímco P1 blastomera se dále dělí nerovnoměrně příčně za vzniku EMS a P2 linie. Ve třetí sérii dělení vznikají na anteriorní straně buňky ABal, ABar, ABpl a ABpr. Buňka EMS se dělí na linii MS, ze které následně vzniká většina svalových buněk, a E, která je předchůdcem pro střevní buňky. Na posteriorní straně se P2 buňka rozdělí na linii C, která později vytváří hypodermis a svalové buňky, a P3, jež definuje zárodečnou linii (Sulston et al., 1983).

Nukleo-cytoplazmatický poměr

Jedna z dalších charakteristik jádra a vůbec buňky jako takové je její rozměr. S velikostí jádra souvisí důležitý parametr jeho hodnocení, kterým je tzv. nukleo-cytoplazmatický poměr. Jedná se o poměr objemu jádra (J) k objemu cytoplazmy (C) vyjma jádra, J/(C-J). Ve většině případů objem jádra silně koreluje s objemem buňky. Již v roce 1903 Richard Hertwig navrhl koncept, ve kterém poměr objemů jádra a cytoplasmy bývají zhruba konstantní (Wilson, 1925). Objem jádra je také dán velikostí genomu a jeho ploidií (Cavalier-Smith, 1978, Henery and Kaufman, 1992). Různé buněčné typy mají své charakteristické poměry. Nukleo-skeletální teorie uvádí, že velikost jádra je určena množstvím DNA, mírou kompaktace chromatinu a množstvím komponentů jaderné membrány (Cavalier-Smith, 1982). Může se zdát, že ploidie přímo ovlivňuje velikost jádra. Na druhou stranu, velikost jádra se po duplikaci DNA v S fázi nezdvojnásobuje (Jorgensen et al., 2007).

Ukázalo se, že poměrné velikosti jádra a cytoplasmy mají zásadní vliv na zrání savčích oocytů. Postupnými odběry části cytoplasmy pomocí mikromanipulace se zvyšoval nukleo-cytoplazmatický poměr oocytů ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle, profáze meiózy I). Tyto změny měly za následek prodloužení až zastavení zrání oocytů, narušení meiotické segregace chromozomů a struktury dělícího vřeténka (Fulka et al., 1998, Cui et al., 2005).

Velmi blízký vztah mezi velikostí jaderného a cytoplasmatického obsahu byl popsán během embryogeneze. Ve stádiu střední blastuly v embryonálním vývoji dochází u Xenopa a Drozofily k dramatickým změnám (MBT; midblastula transition), které jsou iniciovány náhlou změnou nukleo-cytoplazmatického poměru (Lu et al., 2009, Newport and Kirschner, 1982). Jakmile nukleo-cytoplazmatický poměr dosáhne určitého bodu, rychlé časově sladěné dělení se asynchronicky zpomaluje a aktivuje se transkripce embryonálních genů. Zvýšením obsahu DNA v jádře (tetraploidií či přidáním DNA molekul navíc) nastává tento stav dříve, naopak snížením jaderného objemu odebráním DNA dochází ke zpoždění.

Nukleo-cytoplazmatický poměr u *C. elegans*

Během embryonálního vývoje *C. elegans* je velmi zřetelná změna ve velikosti buněk. Celkový objem embrya se nemění, protože je omezen vaječným obalem. S každým dělením se tedy zmenšuje velikost blastomer. Japonští badatelé změřili velikosti cytoplasmy a jader v prvních embryonálních stádiích *C. elegans*. Zaměřili se na vztah mezi délkou buněčného cyklu a velikostí blastomer v embryu a ukázali, že mezi těmito dvěma faktory existuje nepřímá úměrnost (Arata et al., 2014). Proměřili také objemy jader a hodnoty použili pro výpočet nukleo-cytoplazmatického poměru. Vyhodnotili, že vztah mezi jaderným a cytoplasmatickým objemem je nelineární a nerovnoměrný. Bylo ukázáno, že velikost embryonální buňky *C. elegans* je zásadní faktor určující účinnost kontrolního bodu během napojování dělícího vřeténka (Galli and Morgan, 2016). Další studie ukázala, že během embryogeneze koreluje délka dělícího vřeténka s velikostí blastomer *C. elegans* (Hara and Kimura, 2009).

Navzdory velmi zřejmému nárůstu velikosti zárodečných buněk během gametogeneze u *C. elegans*, systematické měření objemu buněk a jader v gonádě nebylo dokumentováno. K dispozici tedy nejsou ani rozdíly v nukleo-cytoplazmatickém poměru.

Cíle práce

1) Připravit vhodný model pro studium chování parentálního chromatinu v raných embryích *C. elegans*. Dokumentovat vzájemné rozložení mateřského a otcovského chromatinu v prvních cyklech embryonálního dělení a určit časové období, kdy dochází k jeho promíchání.

2) Popsat a lokalizovat transkripční aktivitu a její dynamiku v gonádě *C. elegans*. Kvantifikovat míru syntézy mRNA v jednotlivých stádiích profáze meiózy I.

3) Porovnat jaderné a cytoplazmatické objemy zárodečných buněk v gonádě dospělce a jednotlivých blastomer v časném embryonálním vývoji *C. elegans* a zjistit nukleo-cytoplazmatický poměr těchto buněk.

Materiál a metody

Použitý model: *Caenorhabditis elegans*

Hlavní metody použité v práci:
- příprava transgenních kmenů *C. elegans* pomocí mikroinjikace
- produkce kříženců *C. elegans*
- příprava živých vzorků *C. elegans* pro mikroskopování
- imunofluorescenční značení gonád *C. elegans*
- značení nascentní RNA v gonádách *C. elegans* pomocí 5-etynyl uridinu
- *single molecule RNA FISH*

Výsledky

Dynamika parentálního chromatinu v časném embryonálním vývoji *C. elegans*

Po průniku spermie do vajíčka se u *C. elegans* začínají formovat prvojádra. Od této chvíle až do doby, kdy se obě haploidní prvojádra v profázi prvního embryonálního dělení spojí, je lokalizace otcovského a mateřského genomického příspěvku evidentní. Potíž nastává již od chvíle uspořádání chromozomů do metafázní roviny, kdy se jaderný obal rozpadá a jednotlivé chromozomy již nejsou ohraničeny.

Pro značení chromatinu jsme zvolili fotokonvertibilní protein Dendra2, který nám umožnil selektivně označit maternální či paternální chromatin a následovat jeho chování v živých embryích v čase. Dendra2 ve své nativní konformaci emituje fluorescenci v zeleném spektru. Po ozáření 405nm škálou se její fluorescence konvertuje na červenou. Důležitým znakem tohoto jevu je jeho nevratnost, tedy již červené molekuly nemohou být přeměněny na molekuly zelené v nativní konformaci (Gurskaya et al., 2006).

Pro vytvoření transgenní linie *C. elegans* s chromatinem označeným fotokonvertibilním proteinem Dendra2 byla použita metoda mikroinjikace gonád zprostředkovaná MosSCI (Mos1-mediated Single Copy Insertion), která umožňuje vložení jedné kopie expresní kazety na předem určené místo v genomu (Frøkjaer-Jensen et al., 2008,

Frøkjær-Jensen et al., 2012). Vytvořený kmen byl nazván JBL1. JBL1 vykazuje silnou expresi Denra2-H2B v zárodečné linii, tedy v celé délce gonády, ve spermiích a v embryích umístěných v děloze.

Ve stádiu časné zygoty kmenu JBL1 exprimující Dendra2-H2B bylo vždy jedno prvojádro fotokonvertováno. Následně byl snímán chromatin z fotokonvertovaného a nefotokonvertovaného prvojádra až do čtyřbuněčného stádia embrya. Zachytili jsme dobře ohraničenou separaci maternálního a paternálního chromatinu v zygotě a v dvoubuněčném embryu. Ve všech mitotických jádrech čtyřbuněčného embrya je chromatin již promíchaný.

Za účelem kvantifikace a určení bližšího časového úseku smísení rodičovských chromatinů jsme vytvořili nový kmen JBL2, který vedle Dendra2-H2B exprimuje i GFP-γ-tubulin. Tím jsme navíc získali vizualizaci centrozomů v cytoplasmě. Počet a pozice centrozomů nám umožnily posoudit aktuální fázi buněčného cyklu dceřiné P2 buňce. Jako referenční časový bod byla stanovena chvíle uspořádání následující metafázní roviny, protože začátek snímání nebyl vždy přesně synchronizován. V průběhu metafáze byla polovina chromatinu v jádře P1 buňky fotokonvertována a následně snímána až do stádia další metafáze. Chromatinové domény zůstávají po fotokonverzi oddělené po zbytek mitózy, během dekondenzace chromatinu a během prvních minut buněčného cyklu. První okamžiky promísení byly zachyceny 4 ± 1 minuty po začátku buněčného cyklu, 2 ± 1 minuty po zjevení dvou oddělených centrozomů a 6 ± 1 minuty předtím než jeden z centrozomů začal migrovat na opačnou stranu jádra. Tato pozorování naznačují, že k promísení chromatinu v časném embryu *C. elegans* nedochází během dekondenzace chromatinu na konci mitózi, ale poměrně náhle 3-5 minut po vstupu do buněčného cyklu, tedy ještě předtím než jeden z duplikovaných centrozomů začne migrovat k opačnému pólu. V samostatném experimentu jsme předvedli, že k promísení chromatinových domén překvapivě nedochází během mitózy, jak bylo dříve ukázáno u savčích buněk v kultuře (Strickfaden et al., 2010).

Během získávání obrazového materiálu embryonálního chromatinu *C. elegans* pro posuzování dynamiky rodičovského chromatinu jsme zaznamenali pozoruhodné otáčivé pohyby jader v anterior-posteriorní ose. Tuto rotaci bylo možné vizualizovat díky schopnosti fúzního proteinu Dendra2-H2B kmenu JBL1 a JBL2 označit chromatin a následovat ho v čase. Jedno z prvojader bylo před jejich fúzí fotokonvertováno. Chromatin byl snímán od metafáze až do úplného rozdělení buňky. Rotace chromatinu, která začala v časné anafázi a byla dokončena v pozdní telofázi zygotického dělení, nebyla nikdy pozorována v pozdějších stádiích embryogeneze. Chromatin se vždy otočil o půl otáčky, tedy o 180°, a celý proces trval přibližně 1 minutu. Zobrazováním P granulí a druhého pólového tělíska kmenu JBL3 nám pomohlo odhalit, že se jedná o celé embryo, které se otáčí uvnitř vaječného obalu.

Transkripční aktivita v gonádě *C. elegans*

Pro studium vztahu jaderné architektury a genové exprese jsme se zaměřili na transkripční aktivitu v gonádě, velmi dynamickém orgánu *C. elegans*. K tomuto účelu jsme se rozhodli využít metody single molecule RNA FISH (smRNA FISH), která umožňuje vizualizaci nascentní transkripce pomocí fluorescenčně značených prób, jež hybridizují na cílové molekuly mRNA. smRNA FISH umožňuje uniformní *in situ* značení individuálních RNA molekul, které jsou zobrazeny jako jednotlivé tečky v cytoplasmě (Raj and van Oudenaarden, 2009, Larson et al., 2009, Raj et al., 2006, Levsky et al., 2002).

smRNA FISH signály byly dokumentovány ve čtyřech stádiích meiózy v gonádě na základě genové exprese dvou vybraných genů. V časném stádiu pachyténe nebyly detekovány téměř žádné jaderné transkripční spoty. Velmi podobná situace byla pozorována pro dvě předchozí fáze, tedy mitotická a transition zóna. Zato v pozdní pachyténe a v celé diploténe vykazují buňky vysokou míru exprese. Většina buněk v těchto fázích měla jedno až dvě místa aktivní transkripce v jádře. V žádném z diakinetických oocytů transkripční místa nebyla dokumentována.

Naším cílem bylo zobrazení genové exprese meiotických zárodečných buněk v globálním měřítku. Jako první jsme se rozhodli prošetřit tento úkol pomocí immunofluorescenčního značení RNA polymerázy II, která je zodpovědná za syntézu mRNA. RNA polymeráza II byla na chromozomech od mitotické části až do diploténe velmi rovnoměrně akumulovaná, na diakinetických oocytech byla polymeráza detekována jen v nukleoplazmě, na chromozomech nikoliv.

Pro dokumentaci aktuálního stavu celkové transkripce a její dynamiky v gonádě jsme využili metody inkorporace 5-etynyluridinu (EU). EU je nukleosidový analog uridinu, který se po přeměně na UTP (uridintrifosfát) inkorporuje během aktivní RNA syntézy. Jedná se o alternativní metodu ke značení pomocí 5-bromouridinu (BrU), jež je běžně detekován pomocí protilátek. Vizualizace EU je založena na chemické „click“ reakci alkynu na 5-etynyluridinu s fluorescenčně značeným azidem. V daných podmínkách jsme pozorovali velmi nízkou míru transkripce v části mitotické a prakticky žádnou v oblasti diploténe. Aktivní transkripce postupně sílila s nejvyšší úrovní v pachyténe a diploténe.

Na detailních snímcích značené gonády získaných za pomoci konfokální mikroskopie jsme si všimli velmi zajímavé struktury EU inkorporace na chromozomech. Chtěli jsme tento jev blíže prošetřit a rozhodli jsme se pro snímání pomocí super-rezolučního mikroskopu. Zvolili jsme mikroskopii se strukturovaným osvětlením SIM (*Structured Illumination Microscopy*), jenž umožňuje získat obrázky s jemnějšími detaily o rozlišení okolo 100 nm (Gustafsson, 2000, Gustafsson, 2005). Ze super-rezolučních snímků je zřejmé, jak chromatin mění od pachyténe přes diploténe svou morfologii. Pachyténní chromozomy ve formě synapse vytvářejí na periferii jádra tvar klubka. Zajímavé pro nás bylo zjištění, že aktivní transkripce značená pomocí EU je v těchto jádrech lokalizována na periferii chromozomů. Distribuce nascentní mRNA v pachyténe a diploténe je velmi vzorovaná, takže se zdá, že transkripce neprobíhá na chromozomech rovnoměrně.

Nukleo-cytoplazmatický poměr *C. elegans*

Gonáda *C. elegans* je velmi dynamický orgán. Jednotlivé zárodečné buňky v průchodu jednotlivými stádii meiózy značně mění morfologii jádra, reorganizují cytoplazmu, vytvářejí si makromolekuly nezbytné pro oplození a časnou embryogenezi. Dalším znakem, který provází buňky v gametogenezi *C. elegans* je postupné zvyšování velikosti buněk. Začátek tohoto chování je viditelný právě v pozici ohybu gonády. Z našich předchozích výsledků je vidět, že tato oblast je v gonádě transkripčně nejvíce aktivní. Naším dalším cílem se proto stalo bližší prozkoumání změn jaderné morfologie a jejich propojení je s metabolismem celého orgánu. Zaměřili jsme se na změnu velikosti buněk a jader a na jejich vzájemný vztah. Chtěli jsme získat data, která co nejvíce odpovídají skutečnosti. Proto jsme rozhodli provést měření na intaktních tkáních v živých jedincích *C. elegans*. Jedná se o velmi unikátní přístup vyžadující špičkovou techniku vícebarevné fluorescenční mikroskopie. Připravili jsme si kmen *C. elegans*, který exprimuje fluorescenčně značenou cytoplazmatickou membránu [GFP-PH(PLCdelta1)], lamin B (YFP-LMN-1) a chromatin

(mCherry-H2B). Gonády byly snímány ve 3D na konfokálním mikroskopu pomocí vodního objektivu se zaměřením na ohyb gonády a oocyty v proximální části. YFP značený lamin jasně určil kontury jádra. Signál z GFP značené cytoplazmatické membrány nám posloužil pro definování obrysu buněk a následně pro měření jejich objemu. Pro poměření velikostí jader a celých buněk jsme nasnímali obrázky gonád, které byly segmentovány a rekonstruovány ve 3D pomocí programu Amira 6.2 od FEI. Pro získání objemu cytoplazmy (*C*) byl objem buňky (*B*) zmenšen o objem jádra (*J*): $C = B - J$. Z našich výsledků je patrné, že cytoplazma roste rychleji než jádra, která se v průměru od pachyténe až k poslednímu oocytu zvětší přibližně desetkrát, cytoplazma se zvětší stokrát. To se projevuje na snižujícím se nukleo-cytoplazmatickém poměru, který u -1 oocytu spadne skoro na desetinu své hodnoty v pachyténe.

V návaznosti na rostoucí velikosti zárodečných buněk v gonádě jsme se dále rozhodli zdokumentovat rozměry buněk v procesu hned následujícím, tedy embryogenezi, kde naopak dochází k postupnému zmenšování jednotlivých blastomer v rámci vývoje. Vnější obal embrya *C. elegans* se během embryogeneze nezvětšuje. S každým rozdělením blastomer se tak velikost buněk zmenšuje. Pro měření objemu jader a celých buněk byl zvolen kmen OD95, který exprimuje značený chromatin (H2B-mCherry) a cytoplasmatickou membránu [GFP-PH(PLCdelta1)]. Objemy byly opět měřeny manuálně po jednotlivých vrstvách. Velikost jednotlivých blastomer v prvních třech buněčných dělení během embryonálního vývoje podle očekávání razantně klesá. Zmenšuje se i velikost jader, i když oproti cytoplazmě velmi pozvolně. Nesouladné snižování jaderného a buněčného objemu se projevilo v nukleo-cytoplazmatickém poměru, který má vzrůstající tendenci. Nápadné je uchování menší cytoplazmatické velikosti pohlavní linie (P) oproti sousední somatické linii (AB) v průběhu embryogeneze.

Diskuse

Separace parentálních genomů v časném embryu *C. elegans*

Rodičovské chromatinové domény zůstávají po oplození prostorově odděleny v zygotě a v dvoubuněčném embryu. Až ve stádiu čtyřbuněčného embrya jsou parentální chromatinové domény již promíseny. Naše pozorování vyvolává řadu otázek, jako je třeba, proč nedochází k promísení rodičovských genomů mnohem dříve. Co se zygoty týče, odpověď je nasnadě. Vnitřek prvojader je chráněn před promícháním jaderným obalem, který u *C. elegans* zůstává celistvý až do tvorby a vyrovnání metafázních rovin obou prvojader (Gorjánácz and Mattaj, 2009). Rychlé a řízené pohyby chromozomů během následné anafáze se nezdají být slučitelné s chromatinovým promícháním. Nicméně není jasné, proč rodičovské chromatiny setrvávají odděleny v AB a P1 blastomerách, jakmile je zygotické dělení ukončeno. Je možné, že existuje mechanismus, který aktivně zabraňuje chromatinovému promísení ve dvoubuněčném embryu, pravděpodobně na základě epigenetických modifikací. Ačkoliv se vyskytují studie popisující rozdíly v post-translačních modifikacích histonů mezi otcovskými a mateřskými prvojádry, zejména v nedostatku trimetylace H3K79m a acetylace H4K16 na paternálním chromatinu, tyto rozdíly se rychle vyrovnávají, takže modifikace specifické pro otcovské histony ve dvoubuněčném stádiu dosud nebyly popsány (Samson et al., 2014).

Bez ohledu na molekulární mechanismus tohoto procesu se zdá zřejmé, že pro to, aby mohlo k promísení dojít, je potřeba vytvořit časový prostor. Mobilita chromatinu v S

fázi v savčích buňkách se jeví spíše omezená (Walter et al., 2003). Z naší práce vyplývá, že prostorové uspořádání chromatinu je během mitózy v časném embryu *C. elegans* do značné míry uchováno. Na tomto základě navrhujeme hypotézu, že doba mezi dekondenzací chromatinu po mitóze a zahájením S fáze, tedy případná G1 fáze, je právě tím faktorem v procesu promísení rodičovského chromatinu u tohoto organismu. Tato myšlenka je v souladu s předchozími výsledky, které ukazují, že mobilita chromatinu v savčích buňkách je vyšší v G1 fázi než ve zbytku buněčného cyklu (Thomson et al., 2004, Walter et al., 2003).

Na savčích buňkách v kultuře bylo popsáno, že k rozsáhlému přeuspořádání chromatinových pozic dochází během prometafáze (Strickfaden et al., 2010). V naší studii jsme v této fázi buněčného cyklu nepozorovali významné přeskupení značených chromozomů. Důvod tohoto rozdílu zůstává nejasný. Avšak se můžeme domnívat, že svoji roli v tomto jevu hraje pozdější rozpad jaderného obalu během mitózy v časném (< 30 buněk) embryu *C. elegans* (Lee et al., 2000) a že uchování těchto jaderných struktur až do počátku anafáze může omezovat a řídit chromatinové pohyby.

Dále jsme pozorovali reprodukovatelnou rotaci chromatinové masy v pozdní anafázi a telofázi zygotického dělení. Zobrazování P granulí a pólových tělísek nám pomohlo odhalit, že rotaci podstupuje celé embryo, které se otáčí uvnitř vaječného obalu. Otáčení okolo anterior-posteriorní osy je stále stejným směrem. Podobné pozorování bylo popsáno ve studii využívající kortikálních granulí a GFP-NMY-2 jako navigační značky (Schonegg et al., 2014). Autoři tohoto článku uplatnili neměnnou orientaci této rotace v určení vnitřní chirality komponent uvnitř jednobuněčného embrya. Dále navrhli, že tato chiralita by mohla poskytnout vodítko pro utvoření pravolevé asymetrie v pozdějším stádiu.

Transkripční aktivita v gonádě *C. elegans*

Ačkoliv je zřejmé, že maternálně vyprodukované mRNA a proteiny se musí uskladnit v oocytech pro správný vývoj embrya, plnohodnotná charakterizace jejich syntézy není u *C. elegans* dosud objasněna.

Pomocí metody smRNA FISH jsme detekovali transkripční aktivitu vybraných genů ve střední části gonády, tedy v pozdní pachyténe a diploténe. RNA polymeráza II se rovnoměrně akumuluje na chromatinu ve všech fázích meiotické profáze kromě diakineze, kde je RNA polymeráza II přítomna pouze v nukleoplazmě. Tento výsledek z velké části neodpovídá zobrazení transkripce pomocí smRNA FISH, kde jsme v distální části gonády nedetekovali žádnou transkripční aktivitu. Jedná se totiž o techniky s odlišnými atributy. Obohacení chromatinu o RNA polymerázu II nám nepodá přesnou informaci o aktivitě transkripce tak, jako metoda smRNA FISH. Fosforylace serinu5 na CTD doméně RNA polymerázy II značí iniciaci transkripce. Zdá se, že RNA polymeráza II je mezi mitotickou částí a diploténe rovnoměrně navázána, třebaže nedochází k elongaci. smRNA FISH na druhou stranu vykazuje expresní údaje jen vybraných transkriptů.

Značení RNA pomocí inkorporace EU nám umožnilo získat hodnotné informace o globálním stavu genové exprese v celé gonádě *C. elegans*. Tímto jsme potvrdili výsledky získané pomocí metody smRNA FISH dvou vybraných transkriptů.

Naše výsledky lokalizace meiotické transktipční aktivity v gonádě *C. elegans* korespondují s daty z jiných studií odlišných organismů. Transkripce u savců také postupně stoupá počátkem profáze I a vrcholí v pozdní pachyténe a diploténe (Page et al., 2012). Štětkovité (lampbrush) chromozomy u obratlovců (mimo savce) a některých bezobratlých,

které jsou přítomny v diploténních jádrech, disponují zvýšenou transkripční aktivitou (Gaginskaya et al., 2009). Zajímavé projekty pocházejí i z rostlinné říše. U mikrosporocytů modřínů byla zjištěna korelace mezi transkripční aktivitou a stavy chromatinové dekondenzace v diploténe, která u tohoto druhu trvá 5 měsíců (Kołowerzo-Lubnau et al., 2015). Homologní chromozomy v pachyténe jsou spojeny v synapsi za pomoci synaptonemálního komplexu. Struktura synapse je charakteristická tím, že z proteinové kostry vybíhají do strany chromatinové smyčky. Pomocí super-rezoluční mikroskopie se nám podařilo získat detailní snímky zachycující transkripci jako nehomogenní proces v rámci chromozomu. Pachyténní chromozomy vykazovaly expresní aktivitu na svém obvodu, zatímco centrální část chromozomu byla aktivní výrazně méně. Podoba této struktury podněcuje k myšlence, že transkripční aktivita je lokalizována především ve smyčkách synapse. Možnosti zhoršené penetrace značených EU molekul je nepravděpodobná, jelikož chromozomy v diploténe byly značeny celé. Vzorovaná struktura inkorporace EU naznačuje, že chromozom disponuje místy s různými mírami transkripční aktivity.

Ze super-rezolučních snímků je dále patrné, jak se mění chromatinová morfologie v pachyténe a diploténe. Chromatin v diploténe je jasně rozvolněnější než chromatin v pachyténe. Právě stupeň dekondenzace chromatinu může hrát důležitou roli v navýšení transkripční aktivity díky přístupnosti chromatinu transkripční mašinérii. Diploténe je charakteristická pro počátek separace homologních chromozomů (desynapse) díky rozpadu synaptonemálního komplexu. Mechanismus dekondenzace chromatinu v této fázi je neznámý. Pravděpodobně v něm hrají svou úlohu reorganizační procesy kondenzinů, kohezinů a dalších DNA vazebných proteinů na chromatinu a synaptonemálním komplexu (Chan et al., 2004, Crawley et al., 2016). Hlavní protein synaptonemálního komplexu SYP-2 se po fosforylaci MAP kinázovou dráhou odvazuje (Nadarajan et al., 2016) a zřejmě se účastní chromatinového rozvolnění v přechodu mezi pachyténe a diploténe.

Nukleo-cytoplazmatický poměr u *C. elegans*

Úsek kolem ohybu gonády *C. elegans* se zdá být značně metabolicky aktivní. Pro prošetření souvislosti zvýšené transkripční aktivity v ohybu gonády s nukleo-cytoplazmatickým poměrem jsme se zaměřili na měření buněčných a jaderných velikostí. U obojživelníků a Drozofily má náhlá změna nukleo-cytoplazmatického poměru ve stádiu střední blastuly zásadní vliv na aktivaci transkripce embryonálních genů (Lu et al., 2009, Newport and Kirschner, 1982).

Snímáním gonád živých jedinců *C. elegans* ve 3D jsme získali data pro kvantifikaci jaderných a cytoplazmatických objemů. Zásadní nárůst objemů začíná od druhé poloviny diploténe a stále narůstá až k -1 oocytu. Velikost jader se v průběhu zvětšuje pomaleji než velikosti cytoplazmy. Tento jev se promítá do nukleo-cytoplazmatického poměru, který se tak snižuje s postupem buněk proximálním směrem. Na základě našich výsledků se nukleo-cytoplazmatický poměr neukazuje jako faktor, který přímo ovlivňuje transkripční metabolismus v gonádě *C. elegans*. Spíše by se mohlo jednat o vliv opačný. Produkované transkripty a proteiny jsou z cytoplazmy buněk v pachyténe a diploténe transportovány do rachis, odkud jsou pomocí aktomysinového proudění distribuovány do buněk. To může mít za následek zvyšující objem cytoplazmy. Toto rozdělování makromolekul funguje jen do doby, kdy jsou cytoplazmy oocytu spojeny s rachis. Proximální oocyty přijímají žloutkové lipoproteinové partikule vyprodukované střevními buňkami (Kimble and Sharrock 1983) v procesu receptorem zprostředkovaná endocytóza (Grant and Hirsh 1999). Tento zdroj

má pravděpodobně největší vliv na zvyšující se velikost buněk, které v diakinezi rostou nejrychleji.

Oogeneze a embryogeneze u *C. elegans* jsou z hlediska změn velikostí jader a cytoplazmy procesy obrácené. Z našich výsledků embryonálního vývoje do osmibuněčného stádia je patrné, že nukleo-cytoplazmatický poměr blastomer s každým buněčným dělením stoupá. To je dáno strmějším poklesem velikosti buněk oproti jádrům. Z hlediska jaderné architektury se nabízí velmi zajímavá otázka, jak se důsledkem stále zvyšujícího nukleo-cytoplazmatického poměru mění vyšší uspořádání embryonálního chromatinu. Větší objem jádra znamená i větší jaderný povrch. Obal jádra může být osazen větším počtem jaderných pórů určených pro komunikaci mezi nukleoplazmou a cytoplazmou a tím zvýšit efektivitu genové exprese.

Shrnutí

Ve své disertační práci jsem se na modelovém organismu *C. elegans* zabývala studiem separace a promísení rodičovských chromatinů v časném embryu, zygotickou rotací, transkripční dynamikou v meióze a buněčnými a jadernými objemy a jejich vzájemnému vztahu v gametogenezi a časné embryogenezi.

Dosažené výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

- mateřský a otcovský chromatin po oplození setrvávají v jádře oddělené i ve dvoubuněčném embryu; k promísení dochází krátce po zahájení buněčného cyklu ve čtyřbuněčném stádiu.

- během zygotické cytokineze podstupuje celé embryo reprodukovatelnou rotaci o 180° v anterior-posteriorní ose.

- transkripční aktivita zárodečných buněk v gonádě dosahuje svého vrcholu ve stádiu pozdní pachyténe a diploténe, kdy dochází k dramatické restrukturalizaci chromozomů, poté v diakinezi skokově klesá na minimun.

- nuklocytoplazmatický poměr zárodečných buněk v gonádě postupně klesá, zatímco v embryogenezi stoupá.

Literatura

Albertson, D. G. (1984) 'Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos', *Dev Biol,* 101(1), pp. 61-72.

Arata, Y., Takagi, H., Sako, Y. and Sawa, H. (2014) 'Power law relationship between cell cycle duration and cell volume in the early embryonic development of Caenorhabditis elegans', *Front Physiol*, 5, pp. 529.

Barrière, A. and Félix, M. A. (2014) 'Isolation of C. elegans and related nematodes', *WormBook,* pp. 1-19.

Boveri, T. 1909. Die Blastomerenkerne von Ascaris megalocephala und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Archiv für Zellforschung.*

Brenner, S. 1988. Foreword. *The Nematode Caenorhabditis elegans*, edited by W. B. Wood.Foreword. The Nematode Caenorhabditis elegans,edited by W. B. Wood. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cavalier-Smith, T. (1978) 'Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox', *J Cell Sc*i, 34, pp. 247-78.

Cavalier-Smith, T. (1982) 'Skeletal DNA and the evolution of genome size', *Annu Rev Biophys Bioeng*, 11, pp. 273-302.

Chan, R. C., Severson, A. F. and Meyer, B. J. (2004) 'Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions', *J Cell Biol*, 167(4), pp. 613-25.

Church, D. L., Guan, K. L. and Lambie, E. J. (1995) 'Three genes of the MAP kinase cascade, mek-2, mpk-1/sur-1 and let-60 ras, are required for meiotic cell cycle progression in Caenorhabditis elegans', *Development*, 121(8), pp. 2525-35.

Crawley, O., Barroso, C., Testori, S., Ferrandiz, N., Silva, N., Castellano-Pozo, M., Jaso-Tamame, A. L. and Martinez-Perez, E. (2016) 'Cohesin-interacting protein WAPL-1 regulates meiotic chromosome structure and cohesion by antagonizing specific cohesin complexes', *Elife*, 5, pp. e10851.

Cremer, T., Cremer, C., Baumann, H., Luedtke, E. K., Sperling, K., Teuber, V. and Zorn, C. (1982) 'Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments', *Hum Genet*, 60(1), pp. 46-56.

Crittenden, S. L., Troemel, E. R., Evans, T. C. and Kimble, J. (1994) 'GLP-1 is localized to the mitotic region of the C. elegans germ line', *Development*, 120(10), pp. 2901-11.

Cui, L. B., Huang, X. Y. and Sun, F. Z. (2005) 'Nucleocytoplasmic ratio of fully grown germinal vesicle oocytes is essential for mouse meiotic chromosome segregation and alignment, spindle shape and early embryonic development', *Hum Reprod*, 20(10), pp. 2946-53.

Cvačková, Z., Masata, M., Staněk, D., Fidlerová, H. and Raska, I. (2009) 'Chromatin position in human HepG2 cells: although being non-random, significantly changed in daughter cells', *J Struct Biol,* 165(2), pp. 107-17.

De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Burns, K. H., Adashi, E. Y., Matzuk, M. M. and Eppig, J. J. (2004) 'Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function', *Dev Biol,* 275(2), pp. 447-58.

Edgar, L. G. and McGhee, J. D. (1988) 'DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in C. elegans'*, Cell*, 53(4), pp. 589-99.

Frøkjaer-Jensen, C., Davis, M. W., Hopkins, C. E., Newman, B. J., Thummel, J. M., Olesen, S. P., Grunnet, M. and Jorgensen, E. M. (2008) 'Single-copy insertion of transgenes in Caenorhabditis elegans', *Nat Genet*, 40(11), pp. 1375-83.

Frøkjær-Jensen, C., Davis, M. W., Ailion, M. and Jorgensen, E. M. (2012) 'Improved Mos1-mediated transgenesis in C. elegans'*, Nat Methods*, 9(2), pp. 117-8.

Fulka, J., First, N. L. and Moor, R. M. (1998) 'Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation', *Mol Hum Reprod*, 4(1), pp. 41-9.

Gaginskaya, E., Kulikova, T. and Krasikova, A. (2009) 'Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome expression', *Cytogenet Genome Res*, 124(3-4), pp. 251-67.
Galli, M. and Morgan, D. O. (2016) 'Cell Size Determines the Strength of the Spindle Assembly Checkpoint during Embryonic Development', *Dev Cell*, 36(3), pp. 344-52.
Gerlich, D., Beaudouin, J., Kalbfuss, B., Daigle, N., Eils, R. and Ellenberg, J. (2003) 'Global chromosome positions are transmitted through mitosis in mammalian cells', *Cell*, 112(6), pp. 751-64.
Gleba, Y. Y., Parokonny, A., Kotov, V., Negrutiu, I. and Momot, V. (1987) 'Spatial separation of parental genomes in hybrids of somatic plant cells', *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(11), pp. 3709-13.
Gorjánácz, M. and Mattaj, I. W. (2009) 'Lipin is required for efficient breakdown of the nuclear envelope in Caenorhabditis elegans', *J Cell Sci*, 122(Pt 12), pp. 1963-9.
Gurskaya, N. G., Verkhusha, V. V., Shcheglov, A. S., Staroverov, D. B., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, S. and Lukyanov, K. A. (2006) 'Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light', *Nat Biotechnol*, 24(4), pp. 461-5.
Gustafsson, M. G. (2000) 'Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy', *J Microsc,* 198(Pt 2), pp. 82-7.
Gustafsson, M. G. (2005) 'Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution', *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(37), pp. 13081-6.
Gönczy, P., Pichler, S., Kirkham, M. and Hyman, A. A. (1999) 'Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage Caenorhabditis elegans embryo'*, J Cell Biol*, 147(1), pp. 135-50.
Haaf, T. (2001) 'The battle of the sexes after fertilization: behaviour of paternal and maternal chromosomes in the early mammalian embryo', *Chromosome Res*, 9(4), pp. 263-71.
Hara, Y. and Kimura, A. (2009) 'Cell-size-dependent spindle elongation in the Caenorhabditis elegans early embryo', *Curr Biol*, 19(18), pp. 1549-54.
Henery, C. C. and Kaufman, M. H. (1992) 'Relationship between cell size and nuclear volume in nucleated red blood cells of developmentally matched diploid and tetraploid mouse embryos', *J Exp Zool*, 261(4), pp. 472-8.
Hepperger, C., Mayer, A., Merz, J., Vanderwall, D. K. and Dietzel, S. (2009) 'Parental genomes mix in mule and human cell nuclei', *Chromosoma*, 118(3), pp. 335-47.
Hirsh, D., Oppenheim, D. and Klass, M. (1976) 'Development of the reproductive system of Caenorhabditis elegans', *Dev Biol*, 49(1), pp. 200-19.
Jorgensen, P., Edgington, N. P., Schneider, B. L., Rupes, I., Tyers, M. and Futcher, B. (2007) 'The size of the nucleus increases as yeast cells grow', *Mol Biol Cell*, 18(9), pp. 3523-32.
Kim, S., Spike, C. and Greenstein, D. (2013) 'Control of oocyte growth and meiotic maturation in Caenorhabditis elegans'*, Adv Exp Med Biol*, 757, pp. 277-320.
Kołowerzo-Lubnau, A., Niedojadło, J., Świdziński, M., Bednarska-Kozakiewicz, E. and Smoliński, D. J. (2015) 'Transcriptional activity in diplotene larch microsporocytes, with emphasis on the diffuse stage', *PLoS One,* 10(2), pp. e0117337.

Larson, D. R., Singer, R. H. and Zenklusen, D. (2009) 'A single molecule view of gene expression', *Trends Cell Biol*, 19(11), pp. 630-7.
Lee, K. K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J. and Wilson, K. L. (2000) 'C. elegans nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis', *Mol Biol Cell*, 11(9), pp. 3089-99.
Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Mosgfiller, W., Bennett, M. D. and Heslop-Harrison, J. S. 1991. Parental genomes are separated throughout the cell cyclein a plant hybrid. *Chromosoma.*
Levsky, J. M., Shenoy, S. M., Pezo, R. C. and Singer, R. H. (2002) 'Single-cell gene expression profiling', *Science*, 297(5582), pp. 836-40.
Lu, X., Li, J. M., Elemento, O., Tavazoie, S. and Wieschaus, E. F. (2009) 'Coupling of zygotic transcription to mitotic control at the Drosophila mid-blastula transition', *Development*, 136(12), pp. 2101-10.
Mayer, W., Fundele, R. and Haaf, T. (2000a) 'Spatial separation of parental genomes during mouse interspecific (Mus musculus x M. spretus) spermiogenesis', *Chromosome Res*, 8(6), pp. 555-8.
Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. and Haaf, T. (2000b) 'Demethylation of the zygotic paternal genome', *Nature*, 403(6769), pp. 501-2.
Mayer, W., Smith, A., Fundele, R. and Haaf, T. (2000c) 'Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos', *J Cell Biol*, 148(4), pp. 629-34.
McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T. and Schedl, T. (1999) 'On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in Caenorhabditis elegans', *Dev Biol*, 205(1), pp. 111-28.
McGrath, J. and Solter, D. (1984) 'Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes', *Cell,* 37(1), pp. 179-83.
Nadarajan, S., Mohideen, F., Tzur, Y. B., Ferrandiz, N., Crawley, O., Montoya, A., Faull, P., Snijders, A. P., Cutillas, P. R., Jambhekar, A., Blower, M. D., Martinez-Perez, E., Harper, J. W. and Colaiacovo, M. P. (2016) 'The MAP kinase pathway coordinates crossover designation with disassembly of synaptonemal complex proteins during meiosis', *Elife*, 5, pp. e12039.
Newport, J. and Kirschner, M. (1982) 'A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage', *Cell*, 30(3), pp. 675-86.
Page, J., de la Fuente, R., Manterola, M., Parra, M. T., Viera, A., Berríos, S., Fernández-Donoso, R. and Rufas, J. S. (2012) 'Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis?', *Chromosoma,* 121(3), pp. 307-26.
Raj, A., Peskin, C. S., Tranchina, D., Vargas, D. Y. and Tyagi, S. (2006) 'Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells', PLoS Biol, 4(10), pp. e309.
Raj, A. and van Oudenaarden, A. (2009) 'Single-molecule approaches to stochastic gene expression', *Annu Rev Biophys*, 38, pp. 255-70.
Samson, M., Jow, M. M., Wong, C. C., Fitzpatrick, C., Aslanian, A., Saucedo, I., Estrada, R., Ito, T., Park, S. K., Yates, J. R. and Chu, D. S. (2014) 'The specification and global reprogramming of histone epigenetic marks during gamete formation and early embryo development in C. elegans', *PLoS Genet*, 10(10), pp. e1004588.
Schild-Prüfert, K., Saito, T. T., Smolikov, S., Gu, Y., Hincapie, M., Hill, D. E., Vidal, M., McDonald, K. and Colaiácovo, M. P. (2011) 'Organization of the synaptonemal complex during meiosis in Caenorhabditis elegans', *Genetics*, 189(2), pp. 411-21.

Schonegg, S., Hyman, A. A. and Wood, W. B. (2014) 'Timing and mechanism of the initial cue establishing handed left–right asymmetry in Caenorhabditis elegans embryos', *Genesis*, 52(6), pp. 572-80.
Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J. S., Anamthawat-Jonsson, K., Finch, R. A. and Bennett, M. D. 1992. Parental genome separation in reconstructions of somatic and premeiotic metaphases of Hordeum vulgare x H. bulbosum. *Journal of Cell Science.*
Starck, J. (1977) 'Radioautographic Study of RNA Synthesis in Caenorhabditis elegans (Bergerac Variety) *Oogenesis*', 30 (2), pp. 181-182.
Starck, J., Gibert, M.-A., Brun, J. and Bosch, C. (1983) 'Ribosomal RNA synthesis and processing during oogenesis of the free living nematode Caenorhabditis elegans', *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75B(4), pp. 575-580.
Strickfaden, H., Zunhammer, A., van Koningsbruggen, S., Köhler, D. and Cremer, T. (2010) '4D chromatin dynamics in cycling cells: Theodor Boveri's hypotheses revisited', *Nucleus*, 1(3), pp. 284-97.
Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N. (1983) 'The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans', *Dev Biol*, 100(1), pp. 64-119.
Surani, M. A., Barton, S. C. and Norris, M. L. (1984) 'Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis', *Nature*, 308(5959), pp. 548-50.
Thomson, I., Gilchrist, S., Bickmore, W. A. and Chubb, J. R. (2004) 'The radial positioning of chromatin is not inherited through mitosis but is established de novo in early G1', *Curr Biol*, 14(2), pp. 166-72.
Walker, A. K., Boag, P. R. and Blackwell, T. K. (2007) 'Transcription reactivation steps stimulated by oocyte maturation in C. elegans', *Dev Biol*, 304(1), pp. 382-93.
Walter, J., Schermelleh, L., Cremer, M., Tashiro, S. and Cremer, T. (2003) 'Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages', *J Cell Biol*, 160(5), pp. 685-97.
Wilson, E. B. 1925. The karyoplasmic ratio. In *The Cell in Development and Heredity.* Third edition ed. New York: The Macmillan Company.
Wolke, U., Jezuit, E. A. and Priess, J. R. (2007) 'Actin-dependent cytoplasmic streaming in C. elegans oogenesis', *Development*, 134(12), pp. 2227-36.
Zuccotti, M., Piccinelli, A., Giorgi Rossi, P., Garagna, S. and Redi, C. A. (1995) 'Chromatin organization during mouse oocyte growth', *Mol Reprod Dev*, 41(4), pp. 479-85.

Mgr. Jitka Bolková, Ph.D. absolvovala obor Vývojová a buněčná biologie na 1. LF UK se školícím pracovištěm Katedra buněčné biologie, BIOCEV na PřF UK. Svou disertační práci úspěšně obhájila 14.6.2017. V současné době pracuje jako embryolog v Centru asistované reprodukce v nemocnici U Apolináře a aktuálně je na mateřské dovolené.

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.

„V předsňatkové poradně můžeme doporučit rodičům, aby se buď zřekli plánu na potomstvo, nebo něco jiného.“

***

„U muže dozrává čtyřikrát víc pohlavních buněk než u ženy, tj. asi 4 spermie za měsíc.“

***

„Pohlavně se rozmnožovaly už ryby, ale tam to bylo mimoděložní.“

***

„Ke genomovým mutacím pohlavního chromosomu X patří Kleinefelnerův snydrom, Turnerův syndrom a tak zvaná sex-bomba“

***

„Histony jsou tvořeny globulárními částicemi, které jsou tvořeny histony.“

eppendorf

Mrazivé CryoCube® F740hi

Nejúspornější model hlubokomrazících boxů na trhu.

Spotřeba elektrické energie při nastavení na -80 °C je 10,5 kWh/den – úspora minimálně 15 % oproti srovnatelným modelům.

Další benefity:

> Izolace přístroje pomocí VIP vakuovaných stěn
> Maximální kapacita 578 krabiček na 2 palcové zkumavky
> Velmi tichý přístroj s hodnotou hluku 41,4 dB při -80 °C
> Ekologicky přívětivý - nepoužívá jako chladivo HCFC, CFC, tedy freony
> Mazivo kompresorů biologicky odbouratelné
> Prostorný 5 palcový dotykový displej
> Bohatý SW včetně dataloggeru
> Přístroj vyroben z 98 % recyklovatelných materiálů
> Prodloužená záruka na přístroj

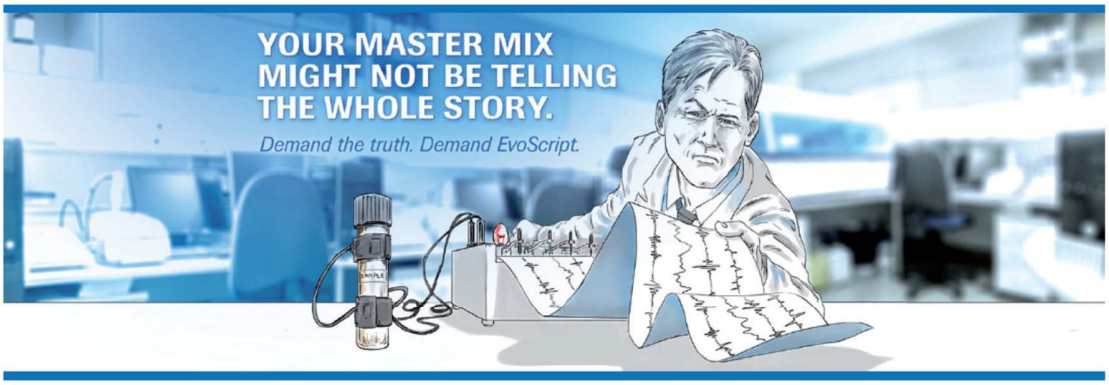
www.eppendorf.cz

Kontakt: Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o. · Voděradská 2552/16 · 251 01 Říčany u Prahy
Pro bližší informace kontaktujte obchodního zástupce RNDr. Milana Řezku na: rezka.m@eppendorf.cz

NOVÁ GENERACE TECHNOLOGIE REVERZNÍ TRANSKRIPCE

EvoScript Master Mixes

Produkty EvoScript jsou vhodné pro vysoce specifickou a přesnou jednokrokovou RT-qPCR, zejména pro genovou expresi



Proč použít EvoScript Master Mixy

- **Vynikající citlivost RT-qPCR, specifita, provedení genové exprese a detekce patogenu**
- **Robustní výsledky pro cílovou RNA izolovanou z různých vstupních materiálů**
- **Vynikající účinnost**
- **Časnější hodnoty Cq**
- **Vyšší citlivost**
- **Široký dynamický rozsah**
- **Práce s vysoce variabilním obsahem GC párů**
- **Variabilní délka cílové sekvence**
- **Vysoce termostabilní RT**
- **Kompatibilní UNG**
- **Vyšší fluorescence**

Více informací najdete na stránkách:
www.lifescience.roche.com

Objednávky prosím posílejte:
E-mailem: prague.objednavkydia@roche.com
Tel.: +420 220 382 565

Roche, s.r.o.,
Diagnostická divize
Na Valentince 3336/4
150 00 Praha 5