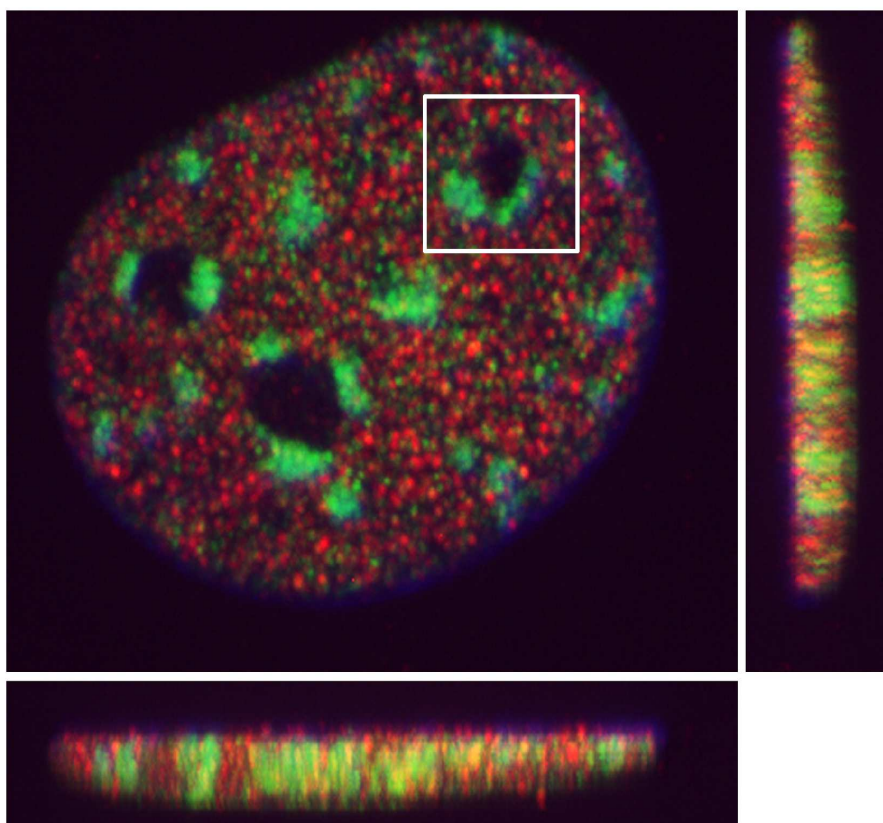


**Masarykova univerzita v Brně  
Přírodovědecká fakulta  
Učební text**

**Molekulární fyziologie genomu  
Katedra fyziologie živočichů**

**RNDr. Eva Bártová, Ph.D.  
Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.  
Laboratoř molekulární cytologie a cytometrie  
Brno 2009**



**Genom je sbírkou přesně organizovaných smyček.**

**Obsah**

<b>Zkratky</b> .....	4
<b>1. Úvod</b> .....	5
<b>1.1. Základní poznatky o struktuře genomu</b> .....	5
<b>2. Struktura a funkce chromatinu</b> .....	8
2.1. Historie studia organizace chromozómů a dalších jaderných kompartmentů.....	8
2.2. Uspořádání chromatinu a dynamická architektura buněčného jádra.....	11
2.3. Změny chromatinu ve vztahu k reparaci DNA.....	22
2.4. Vybrané jaderné kompartmenty, které se podílí na regulaci transkripce a post-transkripčních úpravách.....	24
2.5. Změna ve struktuře chromatinu během buněčné diferenciaci a apoptózy.....	27
2.6. Epigenetické charakteristiky genomu.....	31
2.7. Vliv proteinů intermediálních filament na strukturu genomu a epigenomu.....	37
2.8. Struktura chromatinu nádorových buněk.....	40
2.9. Kvantitativní analýza struktur buněčného jádra.....	42
<b>3. Metodická část</b> .....	45
3.1. Kultivace a diferenciaci buněk.....	45
3.2. Imunofluorescenční značení interfázních jader.....	46
3.3. Izolace DNA z BAC/PAC klonů a “nick” translace.....	47
3.4. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	47
3.5. RNA-FISH.....	48
3.6. Analýzy pomocí western blotů.....	50
3.7. Průtoková cytometrie.....	50
3.8. Analýza a zpracování obrazu.....	51
3.9. Izolace RNA a RT-PCR.....	52
3.10. Konvenční chromatinová imunoprecipitace (ChIP).....	52
3.11. “ChIP-on-chip” analýza.....	53
<b>4. Závěr</b> .....	54
<b>5. Seznam použité literatury</b> .....	55

## Zkratky

APL: Akutní promyelocytická leukemie  
Aza-dC: 5-aza-2'-deoxycytidin  
bFGF: "basic Fibroblast Growth Factor", růstový faktor pro fibroblasty  
53BP1: vazebný protein 1 pro p53 nádorový supresor  
CTs: Chromozomální teritoria  
CENP-A: Varianta histonu H3 v centromerických oblastech  
DEPC: Diethylpyrokarbonát  
DMSO: Dimethylsulfoxid  
Dnmts: DNA methyltransferázy  
DSBs: "Double strand breaks", dvouřetězcové zlomy  
FISH: Fluorescenční *in situ* hybridizace  
FITC: Fluorescein isothiokyanát  
GFP: "Green Fluorescein Protein", zelený fluorescenční protein  
H3K9 (K4, K27, K36, K79): Histon H3 a jeho specifické modifikace na lysinech (K)  
H3S10: Histon H3 a jeho specifická modifikace na serinu (S) v pozici 10  
HAT: Histonové acetyltransferázy  
HDACs: Histonové deacetylázy  
HDACi: Inhibitory histonových deacetyláz  
hESCs: "human Embryonic Stem Cells", lidské embryonální kmenové buňky  
HMTs: Histonové methyltransferázy  
HGPS: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom  
HP1: Heterochromatinový protein 1  
HSA: "Homo Sapiens autosome", obecně chromozomální teritorium lidských autozómů  
HSRs: Homogenně značená oblast  
ICD (IC): Interchromozomální kompartment  
LAPs: "Lamin Associated Polypeptides", polypeptidy jejichž funkce je spojená s laminy  
LCR: "Locus Control Region", DNA oblast ovlivňující lokusy z hlediska jejich transkripce  
LIF: "Leukemia Inhibitory Factor", leukemický inhibiční faktor  
me1; me2; me3: monomethylace, dimethylace, trimethylace  
Me: Methylace DNA  
MeCP: Methyl CpG vazebný protein  
MEF: Myší embryonální fibroblasty  
MM: Mnohočetný myelom  
NaBt: "Sodium butyrate", butyrát sodný  
PBS: Fosfátový pufr  
PcG: "Polycomb group" proteiny  
PML: Promyelocytická leukemická tělíska  
PMA: Phorbol-12-myristát-13-acetát  
Pol II (RNAP II): Polymeráza II  
Rb1: Retinoblastomový protein 1  
RA: "*all-trans* retinoic acid", kyselina retinová  
RIDGE: "Regions of Increased Gene Expression", oblast se zvýšenou expresí genů  
SAGE: "Serial Analysis of Gene Expression", několikanásobná analýza exprese genů  
SC-35: "Nuclear speckles", jaderné skvrny  
SUMO: sumoylace  
TEM: Transmisní elektronový mikroskop  
TSA: Trichostatin A  
*Xi*: Inaktivní X chromozóm  
*Xic*: X inaktivační centrum

## 1. Úvod

### 1.1. Základní poznatky o struktuře genomu

I přes fakt, že primární struktura genomu řady organismů byla kompletně zmapována, jen málo je známo o prostorovém uspořádání chromatinu v kontextu jaderných procesů jako je replikace, transkripce, sestřih a DNA reparace. Velkým pokrokem ve studiu struktury chromatinu byl objev fluorescenční *in situ* hybridizace (Pinkel et al., 1988; Lichter et al., 1988; 1990), která v kombinaci s imunofluorescencí a konfokální mikroskopií umožňuje vizualizaci chromozomálních teritorií, jejich jednotlivých domén i proteinů asociovaných s chromatinem. Pomocí zmíněných technik je možné získat reprodukovatelné výsledky, které charakterizují uspořádání chromozómů v rámci interfázních jader, jadernou strukturu transkripčně aktivních i neaktivních lokusů nebo distribuci zajímavých proteinů v buňkách.

Zásadním poznatkem v biologii chromatinu je popis interfázních chromozomálních teritorií a formulování funkčního modelu uspořádání interfázních jader (shrnutí v Cremer a Cremer 2001; Lanctôt et al., 2007). Bylo zjištěno, že interfázní chromozómy tvoří vzájemně se nepřekrývající teritoria (CTs), mezi kterými se nachází takzvaný interchromatinový kompartment (IC), jehož funkce je důležitá z hlediska transportu regulačních molekul k cílovým místům DNA (Cremer a Cremer 2001; Lanctôt et al., 2007). Nedávno byl však popsán autory Branco a Pombo (2006) kontroverzní model, který připouští vzájemný překryv teritorií chromozómů, což je velice pravděpodobné především z hlediska případných translokací chromozomálních domén. Navíc, lokální uspořádání chromatinu, jeho epigenetické modifikace a transkripce genů pravděpodobně ovlivňují míru interakce mezi jednotlivými chromozomálními teritorii (Branco a Pombo 2006). Dalším velice zásadním kritériem hodnocení uspořádání chromozómů je jejich radiální poloha v rámci interfázních jader. Významný přínos v této oblasti přinesla lisabonská skupina, která jako první publikovala výsledky o specifickém radiálním uspořádání genů v interfázním jádře (Parreira et al., 1997; Neves et al., 1999). Výsledky experimentů této skupiny významně korelují s pracemi Kozubek et al. (1997) a Kozubek et al. (2002). Navíc, analýza radiálních poloh všech lidských chromozómů byla publikována současně v článcích Bártová et al. (2001) a Boyle et al. (2001). Ukázalo se, že radiální uspořádání chromozómů souvisí s genovou hustotou (Boyle et al., 2001) nebo

genovou expresí (Croft et al., 1999; Kozubek et al., 2002). Jako velice zajímavé se rovněž jeví změny v uspořádání chromozomálních domén během buněčné diferenciaci. Z tohoto důvodu jsme se v rámci naší experimentální skupiny začali zabývat aspekty týkající se diferenciačně závislých změn na úrovni chromatinu (Bártová et al., 2000a, 2000b, 2002; Galiová et al., 2004, Harničarová et al., 2006 and Bártová et al., 2008a).

Dalším velice významným fenoménem struktury chromatinu je objev transkripčně aktivních genů, které jsou lokalizovány na chromatinových smyčkách vybíhajících mimo vlastní kompaktní chromozomální teritorium (Volpi et al., 2000; Mahy et al., 2002; Williams et al., 2002). Zmíněný jev byl pozorován převážně u genů zodpovědných za pluripotenci embryonálních kmenových buněk a nebo u ontogeneticky významných lokusů. K těmto lokusům patří například gen Oct3/4 nebo skupina Hox genů (Chambeyron et al., 2004; Wiblin et al., 2005; Bártová et al., 2008a). Na základě popsaných výsledů však není úplně jasné, zda uspořádání chromozomálních teritorií je příčinou nebo následkem transkripčních procesů (Chubb et al., 2003). Určité snahy o objasnění podstaty vztahu mezi strukturou chromatinu a genovou expresí byly naznačeny v práci Kurz et al. (1996). Zde bylo zjištěno, že kódující sekvence se preferenčně vyskytují na periférii příslušného chromozomálního teritoria, zatímco anonymní DNA fragment byl umístěn náhodně v rámci daného chromozómu. Stejně tak transkripčně aktivní ANT2 (Xq24-q25) a ANT3 geny (Xp22.3) byly umístěny na periférii relevantního teritoria, v porovnání s transkripčně neaktivním lokusem ANT2 (Dietzel et al., 1999). Navíc bylo pozorováno, že oblasti se zvýšeným obsahem GC párů bazí mají větší variabilitu v rámci chromozomálního teritoria než AT bohatá místa (Tajbakhsh et al., 2000). Periferní lokalizace transkripčně aktivního genu c-myc v rámci daného chromozomálního teritoria byla pozorována i v našich experimentech (Harničarová et al., 2006). Navíc jsme zjistili, že radiální distribuce c-myc transkripčních míst není ovlivněna diferenciačními procesy a transkripce a post-transkripční úpravy probíhají v centrálních částech interfázních jader (Harničarová et al., 2006). V případě ontogeneticky důležitých genů, jako je  $\beta$ -globinový klastr nebo gen Oct3/4, jsme pozorovali umístění těchto lokusů na chromatinových smyčkách, které opět vybíhali mimo vlastní teritorium daného chromozómu (Galiová et al., 2004; Bártová et al., 2008a). Na druhou stranu existují však práce, které ukazují na možnost transportu transkripčních faktorů do vnitřních částí chromozomálního teritoria, což ukazuje na fenomén takzvané

“invaginace” interchromatinových kanálů do nitra interfázních chromozómů (Verschure et al., 1999 a Mahy et al., 2002). Pohled na vzájemné interakce mezi expresí genů a určitým strukturálním seskupením ovlivnila i práce Schübeler et al. (2001), v níž bylo zjištěno, že umlčení genové exprese může být zprostředkováno přiblížením lokusů k robustním oblastem heterochromatinu, jako jsou například centromery. Tento typ umlčení genové exprese, připomínající poziční PEV (“Position Effect Variegation”) efekt u *Drosophily melanogaster*, je pravděpodobně spojený s deacetylací histonů v daném lokusu. Vliv centromerického heterochromatinu na transkripční aktivitu genů byl rovněž ověřen v práci Bártovej et al. (2002), která se zabývá hledáním zákonitostí mezi strukturou a funkcí genomu u leukemických buněk stimulovaných k myeloidní diferenciaci. V tomto případě bylo zjištěno, že centromerický heterochromatin a X chromozóm významně ovlivňují heterochromatinizaci a transkripční inaktivaci vybraných lokusů.

Z hlediska regulace transkripční aktivity genů a formování euchromatinu a heterochromatinu se do popředí zájmu rovněž dostávají studie řešící problematiku epigenetických modifikací jak DNA, tak histonů (Rice a Allis 2001; Lachner a Jenuwein 2002; Lachner et al., 2003; Martin a Zhang 2005; Jenuwein 2006; Kouzarides 2007). Na základě principů modelů kompartmentalizace interfázních jader několik strukturálních studií směřovalo k poznání jaderného uspořádání specificky modifikovaných histonů (Cremer et al., 2004; Zinner et al., 2006; 2007; Skalníková et al., 2007). Bylo zjištěno, že histonový kód významně ovlivňuje a nebo je alespoň asociován s kompartmentalizací genomu do odlišných euchromatinových a heterochromatinových domén. Základní principy kompartmentalizace je možné pozorovat i v interfázních distribucích epigenetických modifikací chromatinu. Významné experimenty byly v tomto směru udělány vídeňskou skupinou profesora Thomase Jenuweina, která kromě jiného zjistila, že H3K9 dimethylace (me<sub>2</sub>) představuje významný epigenetický znak centromerického heterochromatinu (Lachner et al., 2003), zatímco H3K27 trimethylace (me<sub>3</sub>) se uplatňuje v procesech inaktivace chromozómu X (Kohlmaier et al., 2004). Významné změny v epigenomu byly rovněž pozorovány po působení inhibitorů histonových deacetyláz (HDACi) (Taddei et al., 2001; Gilchrist et al., 2004; Bártovej et al., 2005a; 2007). Zjistilo se, že histony umístěné na jaderné periférii jsou vystaveny větším změnám v epigenetických profilech než histony umístěné ve vnitřní části interfázních jader (Taddei et al., 2001; Bártovej et al., 2005a).

Rovněž zásah do epigenomu pomocí HDACi ovlivňuje jaderné uspořádání klastrů centromer (chromocentra popsaná v Alcobia et al., 2000; 2003) a jejich asociaci s hlavním heterochromatickým proteinem 1 (HP1) (Taddei et al., 2001; Bártová et al., 2005a; 2007).

Snahou experimentů, jejichž výsledky jsou uvedeny v dalších odstavcích bylo proniknout do biologie chromatinu, která se významně mění během jaderných a následně i buněčných procesů. Hledání asociací mezi strukturou chromatinu, epigenetickými modifikacemi histonů a transkripční aktivitou diferenciacně významných genů se rovněž zabývala autorka této práce a výsledky jsou uvedeny a diskutovány v dalších kapitolách a přiložených publikacích.

## **2. Struktura a funkce chromatinu.**

### **2.1. Historie studia organizace chromozómů a dalších jaderných kompartmentů**

Buněčné jádro bylo popsáno před více než 150 lety, přesto studium jeho struktury je v popředí zájmu mnoha renomovaných biologických laboratoří i v současnosti. Buněčné jádro představuje vysoce organizovanou strukturu, jejíž jednotlivé složky začaly být studovány již během 19. století. K prvním autorů, kteří se zabývali touto problematikou, patří Matthias Schleiden (1804-1881) a Theodor Schwann (1810-1882), kteří popsali buněčné jádro jako strukturu skládající se ze směsi prvků jako je dusík, uhlík, fosfor a směs různých minerálů a nutričních komponent. V té době byla buněčná biologie otázkou filozofických pohledů na život a živé systémy. Schleiden jako první poskytl důkaz o buněčném dělení na modelu kvasinek, čili spontánní *de novo* obnovení buněčných organel. Teorie spontánního množení mikroorganismů byla nahrazena novou teorií Luise Pasteura (1822-1892) o množení mikroorganismů zodpovědných za infekční choroby. Práce Pasteura byly jako první založeny na koncepci vědeckých důkazů, na rozdíl od předešlých teorií, většinou vytvořených na základě odhadů a dedukcí. Je třeba si uvědomit, že všechny zmíněné teorie o spontánním dělení, tzv. "*generatio spontanea*" z 19. století přispěly k odhalení významu chromozómů jako nositelů dědičné informace. První teorie o dědičné podstatě chromozómů byla vytvořena v roce 1880 a společně s Darwinovou evoluční teorií představovala nejvýznamnější zlom v chápání podstaty lidského života. V roce 1873



Friedrich Anton Schneider (1831-1890) udělal zajímavé zjištění, že během buněčného dělení jádro podléhá několika specifickým změnám, které byly popsány jako nepřímé buněčné dělení, čili mitóza. V roce 1882 Walter Flemming (1843-1906) popsal ve své knize "Buněčná hmota, jádro a buněčné dělení" přesný model dělení buněk a to z mnoha aspektů. Flemming jako první použil termín chromatin a mitóza a dále pozoroval, že mitotické chromozómy se během buněčného dělení rozkládají do dvou polovin. Flemming však nedokázal vysvětlit přesný význam tohoto jevu. V roce 1888 Wilhelm Waldeyer (1836-1921) definitivně označil chromatinová vlákna za chromozómy. O dva roky později, Emil Heuser (1851-1928) publikoval, že chromatidy každého chromozómu se přesně oddělují na opačné póly jádra. Během 80. let 19. století August Weismann (1834-1914) jako první navrhl chromozomální teorii dědičnosti. Weismann rozlišoval mezi ideální a skutečnou teorií, to je teoriemi, které poskytují nejenom formální pohled na význam chromozómů v jádře, ale objasňují i její funkční důsledky. Weismann uvažoval, že dědičný materiál je umístěn právě v jednotlivých chromozómech, avšak v čase, kdy publikoval svou teorii dědičnosti (Weisman 1892a; 1892b), neznal práci J. G. Mendela (1822-1884), který v roce 1856 zahájil své experimenty s křížením rostlin. Mendel považoval proměnlivost rostlin za doloženou skutečnost. Byl první, kdo udělal významný diagnostický převrat, kdy nehodnotil organismus jako celek, ale rozložil ho na jednotlivé znaky. Jednotlivé znaky, chápal protikladně, jako dvě strany jedné mince. Hodnotil přenos genetických znaků jako přenos vloh. V představách Mendela se u potomka projeví vloh pro jednotlivé znaky mateřské a otcovské rostliny. Mendelova diagnostická metoda, pravděpodobně předchůdce dnešní biostatistiky, umožnila vyhodnocení výsledků sedmi párů znaků, vyzorovaných při křížení hrachu. Hodnocení bylo založeno na principu dominance a recesivity protikladných parametrů. Mendelovým segregacním poměrům však neodpovídala Weissmanova teorie dědičnosti, která nepředpokládala, že ztráta chromozómů by mohla mít velký letální vliv na vývoj organismu, což bylo objasněno až později.

První teorie, určující uspořádání chromozómů v interfázních jádrech vytvořili Carl Rabl (1858-1917) a Theodor Boveri (1862-1915). Rabl předpokládal existenci přesného počtu chromozómů v buněčných jádrech. Druhým předpokladem byla přesná konformace chromozómů v mitotických buňkách. Povšiml si, že chromozómy jsou přesně polarizovány

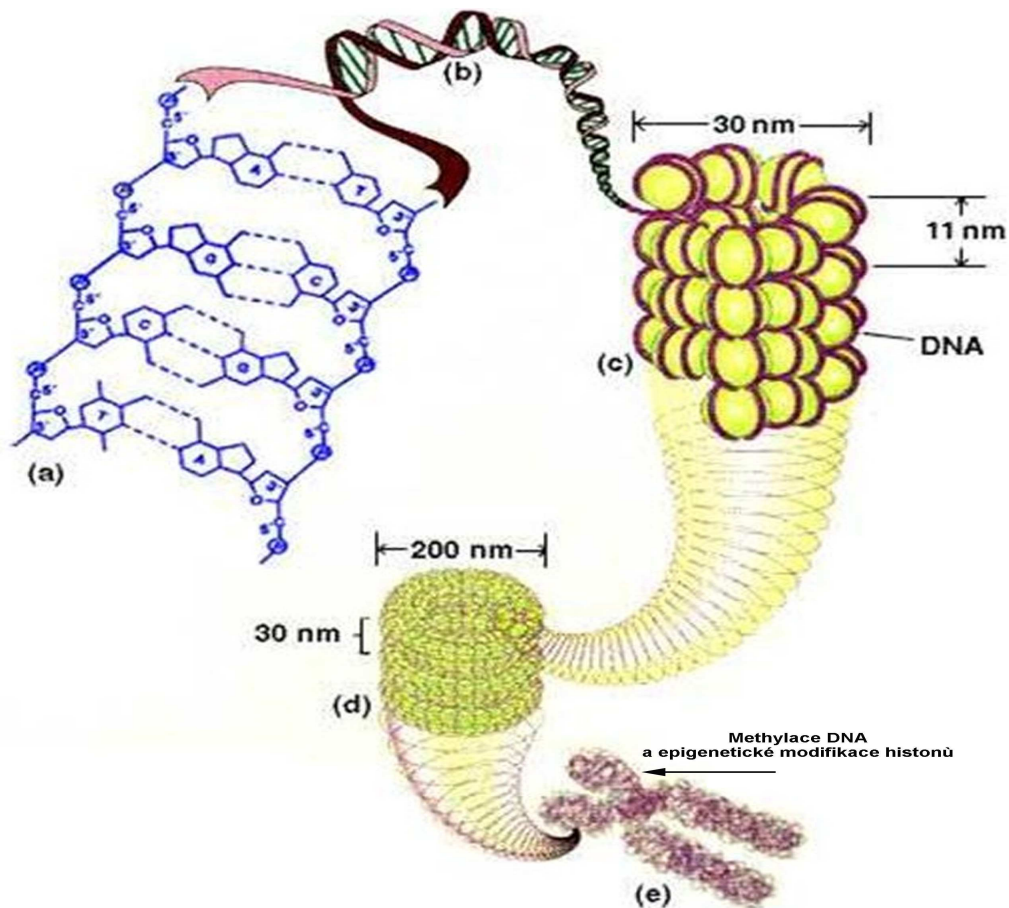
na začátku i na konci mitotického dělení. Zjistil, že jisté chromozomální oblasti se dotýkají mitotických vřetének a klastrují na jedné straně jádra, zatímco druhé konce chromozómů se natahují na opačný pól buněčného jádra. Primární konstrikce chromozómů, centromery, nebyly však Rablem definovány. Další jeho významná teorie se opět týkala chromozómů, jejichž struktura je stabilní během vytvoření jaderné matrix a trvá během interfáze. Navíc, chromozómy vytvářejí určité domény, které jsou důležité z hlediska jejich polarizace během jednotlivých stádií mitózy. Rabl předpokládal, že interfázní struktury chromozómů se skládají z primárních vláken, které dále vytváří sekundární a terciální uspořádání, což vede k vytvoření chromatinové sítě, která se rozpíná celým buněčným jádrem. Rablovy teorie přesného počtu chromozómů a jejich konzervativní uspořádání v interfázních jádrech se z dnešního pohledu jeví velmi pokrokové, avšak Rabl nepředpokládal, že každý chromozóm má svou jedinečnou funkci v dědičnosti, kterou nesdílí s jiným typem chromozómu. Velké obohacení Rablových teorií přinesla pozorování Theodora Boveri (1862-1915), který poskytl důkaz o individualitě jednotlivých chromozómů. V jeho práci se poprvé objevuje termín chromozomální teritoria, jejichž význam z hlediska regulace buněčných funkcí je v popředí zájmu i současných laboratoří, které se zabývají studiem struktury a funkce chromatinu. V moderní terminologii se za chromozomální teritoria považují interfázní protějšky mitotických chromozómů. Novodobá cytogenetika vychází z teorií Boveriho a Suttona (Walter a Sutton 1877-1916), kteří propojili své názory s významnými poznatky Johana Gregora Mendela, jehož teorie dědičnosti významně poukazuje na to, že chromozómy jsou základními nositeli dědičné informace a tudíž Mendelovy a Boveri-Sutonovy teorie jsou základním stavebním kamenem obecné genetiky a rovněž dědičné molekulární architektury buněčného jádra (Cremer et al., 2006). Teorie Boveriho a Suttona vysvětlila nejenom Mendelovy zákony v cytologických termínech, ale rovněž poskytla důkaz, že dědičné znaky, lokalizované na daném chromozómu, se mohou přenášet během mitózy do dceřinných buněk, což argumentuje proti možnosti přirozené výměny jednotlivých segmentů mezi homologními chromozómy (Boveri 1904). Boveri a Sutton prohlašovali, že se chromozómy odlišují v haploidním stavu obsahem dědičných elementů. Navíc, Sutton zdůraznil rozdíly v morfologii chromozómů a v jejich chování během mitózy. Předpoklad, že morfologický rozdíl mezi jednotlivými chromozómy hraje důležitou úlohu ve vývoji samčího a samičího plodu byl popsán Henkingem v roce 1891. Na základě těchto pozorování Boveri

ve svých teoriích shrnuje, že přesný počet chromozómů je důležitý pro optimální ontogenetický vývoj a přesná kompozice individuálních chromozómů je nepostradatelná. Tyto zákonitosti byly předpovídány ve Weismannově chromozomální teorii dědičnosti, ale jeden z nejlepších konceptů té doby byl poskytnut pouze Boverim v jeho “Teorii chromozomální jedinečnosti”. Velkým převratem ve zmíněných teoriích byl objev nukleových kyselin v buněčném jádře (Kossel 1882; Miescher 1897; Watson a Crick 1953). Molekula DNA jako taková byla objevena v roce 1869, kdy se švýcarskému lékaři Miescherovi podařilo izolovat DNA z bílých krvinek. Nedařilo se však vytvořit dostatečně čistý vzorek na to, aby DNA mohla být dále zkoumána. Objev dvoušroubovicové struktury DNA se datuje do roku 1952, kdy o rok později James Watson a Francis Crick publikují závěry své práce. Všechny tyto objevy a zákonitosti postavily základní stavební kameny dnešních teorií struktury chromatinu, především konceptu uspořádání interfázních chromozomálních teritorií, který byly vytvořeny později na základě analýz pomocí elektronové a konfokální mikroskopie (shrnuto v Cremer a Cremer 2001; Lanctôt et al., 2007; Misteli et al., 2004; Branco a Pombo 2006).

## **2.2. Uspořádání chromatinu a dynamická architektura buněčného jádra**

Za hlavní součást buněčného jádra je považována DNA, která společně s histony tvoří komplex nazývaný se chromatin. Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleozóm, který je tvořen oktamerem histonů (H2A, H2B, H3 a H4) a je ovinutý DNA, přibližně o velikosti 147 bp. Histony nukleozómu mohou být specificky epigeneticky modifikovány a typ modifikace, jako je acetylace, methylace, ubiquitinace a fosforylace histonů a methylace DNA, významně ovlivňuje vytváření různých chromatinových domén (Jenuwein 2006; Kouzarides 2007, Obr. 1). Zmíněné modifikace tvoří takzvaný histonový kód, který se uplatňuje v regulaci funkcí chromatinu, jako je transkripce nebo DNA reparace (Kouzarides 2007).

Šířka nukleozómu je uváděna v rozmezí 10-11 nm a mezi jednotlivými nukleozómy se vyskytuje takzvaná “linkerová” oblast o velikosti 20 až 100 bp. Výše organizovanou strukturou chromatinu je komplex nukleozómů, které se stáčí do 30nm vlákna tak, aby byla následně vytvořena další struktura chromatinu, kterou představují 60-130nm vlákna chromonem. Za nejvíce organizovanou strukturu chromatinu jsou považovány metafázní



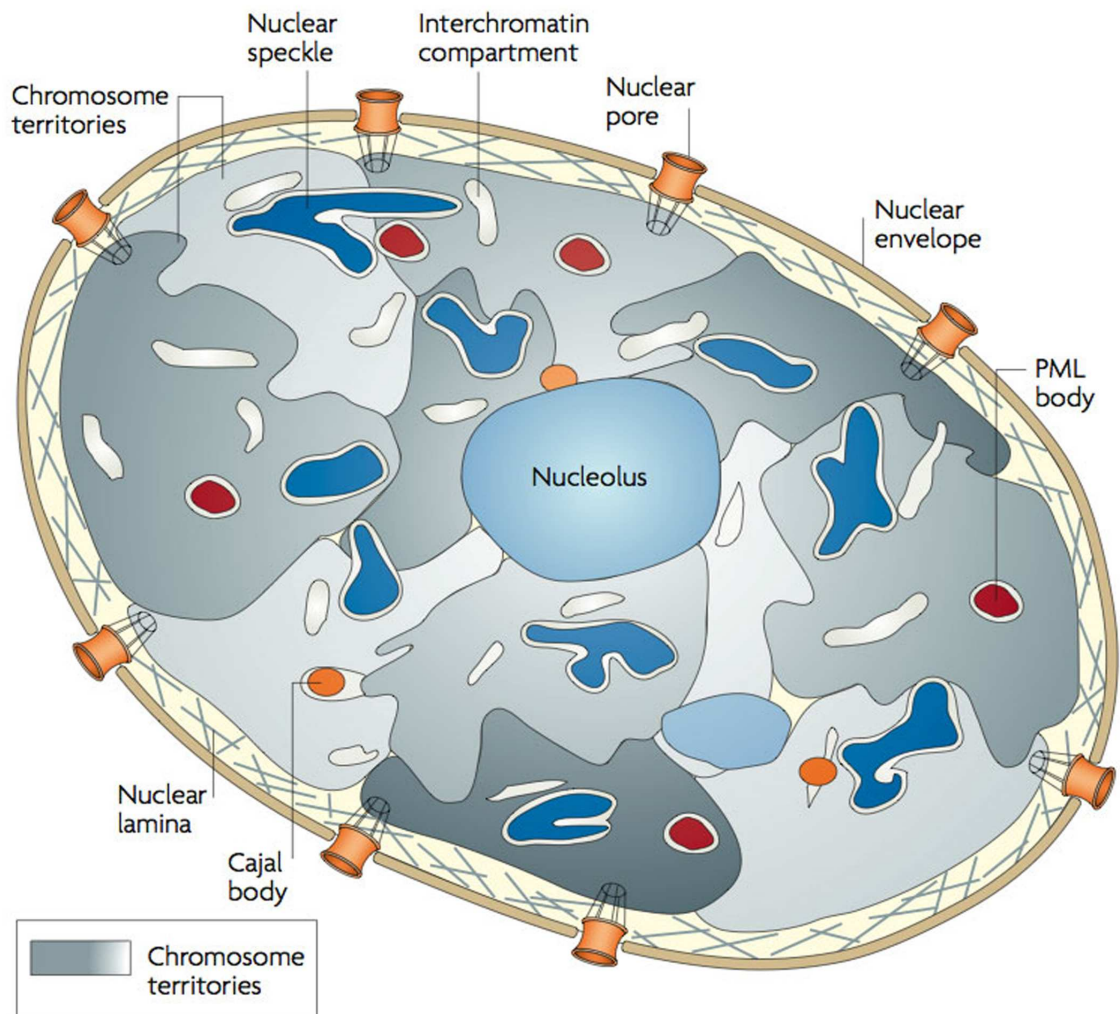
**Obrázek 1**

*Příklad organizace chromatinu. Převzato z <http://www.actrec.gov.in/pi-webpages/SanjayGupta/index.htm>. DNA může být specificky methylována v oblasti CpG ostrůvků a volné konce histonů mohou být epigeneticky modifikovány; vyskytují se zde především acetylace, fosforylace, methylace a ubiquitinace histonů.*

chromozómy a interfázní chromozomální teritoria (Obr. 1 a 2) (shrnuto v Adkins et al., 2004; Gilbert et al., 2005). Z hlediska uspořádání chromatinu byly navrženy různé modely, kdy k nejčastěji zmiňovaným modelům patří takzvaný solenoid o velikosti 30 nm, jehož struktura byla publikována na základě studií pomocí elektronového mikroskopu (Finch a Klug 1976). S využitím elektronové tomografie bylo zjištěno, že chromatin u živých buněk tvoří tak zvaný “zig-zag” model (Horowitz et al., 1994; Rydberg et al., 1998), ve kterém byly navíc popsány různé úrovně stáčení chromatinových vláken, například do struktur o průměru 700 nm nebo 1400 nm v případě chromatid metafázních chromozómů (shrnuto v Adkins et al. 2004; Gilbert et al., 2005).

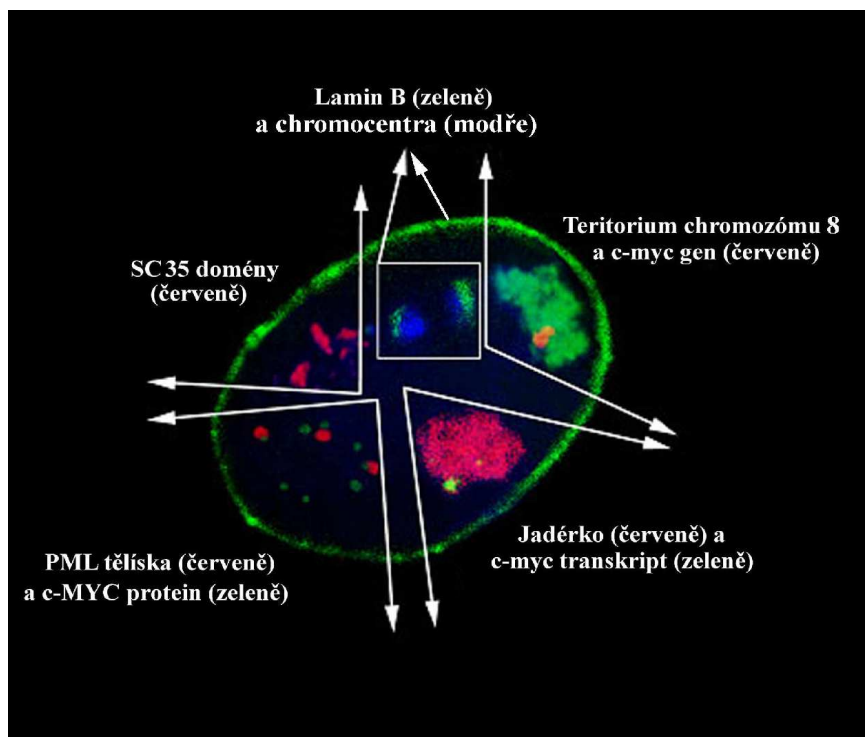
Důležitou vlastností chromatinu je jeho specifické uspořádání v rámci interfázních jader. Nápadným rysem jaderné architektury je existence odlišných strukturálních a funkčních kompartmentů. Základní model jaderné architektury popisuje formování jednotlivých

chromozómů do chromozomálních teritorií, které jsou od sebe odděleny interchromatinovým kompartmentem, což je soustava kanálů nezbytných pro transport regulačních molekul k cílovým místům DNA. Podle modelu chromozomálních teritorií - interchromatinového kompartmentu (CT-IC model) je vzájemný překryv teritorií omezený (Lanctôt et al., 2007; Obr. 2).



## Obrázek 2

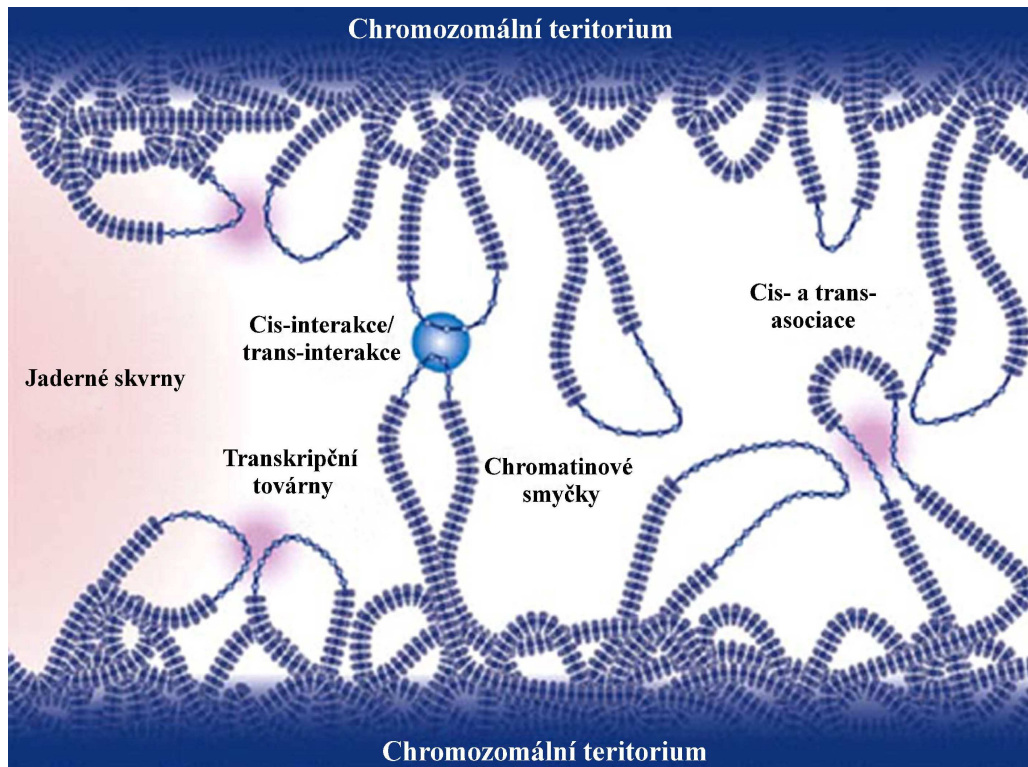
*Příklad kompartmentalizace chromozomálních teritorií a interchromatinového prostoru. Na obrázku je dále znázorněno umístění různých jaderných struktur, domén a tělísek, jako například promyelocytická leukemická tělíska (PML bodies), Cajalovo tělísko, jaderné skvrny a další. Převzato z publikace Lanctôt et al. (2007).*



**Obrázek 3**

*Ilustrativní obrázek umístění vybraných struktur v interfázním jádrě. Na obrázku jsou znázorněny jaderné skvrny (SC35), jádérka, c-myc gen, c-myc transkript, c-MYC protein, PML tělíska a distribuce laminu B.*

Na druhou stranu vzájemné prolínání (“intermingling”) chromozomálních teritorií a přítomnost “transkripčních továren” v oblasti překrytí chromozómů byly publikovány autory Branco a Pombo (2006). Podle těchto autorů, interakce mezi jednotlivými chromozómy je asociována s transkripční aktivitou, což ukazuje na fakt, že exprese genů a lokální konformace chromatinu určují míru interakce mezi jednotlivými chromozomálními teritorii. Vzájemný vztah mezi chromozómy může být buněčně specifický a může ovlivňovat stabilitu genomu, především s ohledem na možné translokace chromozomálních domén (Branco a Pombo 2006). Kompartmentalizace chromozomálních teritorií je zachována u různých buněčných typů, nádorových buněk i během buněčné diferenciaci. K náhodné fragmentaci chromozomálních teritorií a k jejich rozpadu dochází až v rané fázi indukce programované buněčné smrti apoptózou (Bártová et al., 2003a). Kromě kompartmentu chromozomálních teritorií, byly v rámci interfázních jader charakterizovány i významné struktury jako je jaderná lamina, jádérka, promyelocytická leukemická (PML) tělíska, Cajalova tělíska nebo jaderné skvrny, takzvané SC35 domény obsahující faktory sestřihu (viz. ilustrativní Obr. 3). Většina těchto strukturálních komponent obsahuje faktory, které jsou důležité z hlediska regulace jaderných procesů jako je replikace, transkripce, sestřih a DNA reparace. Bylo například zjištěno, že replikace probíhá v takzvaných “replikačních ohniscích,” stejně jako transkripce v “transkripčních továrnách” (Osborne et al., 2004). Transkripční továrny (Obr. 4) jsou místem koncentrace RNA polymerázy II (RNAP II), která je zodpovědná



**Obrázek 4.**

*Příklad lokalizace transkripčních továren, cis- a trans-interakcí a umístění jaderných skvrn v interchromatinovém prostoru. Cis- a trans-iterakce představují vliv genetických elementů (enhancery, LCR - “Locus Control Region”) a specifických proteinů na transkripci. Převzato z publikace Fraser a Bickmore (2007).*

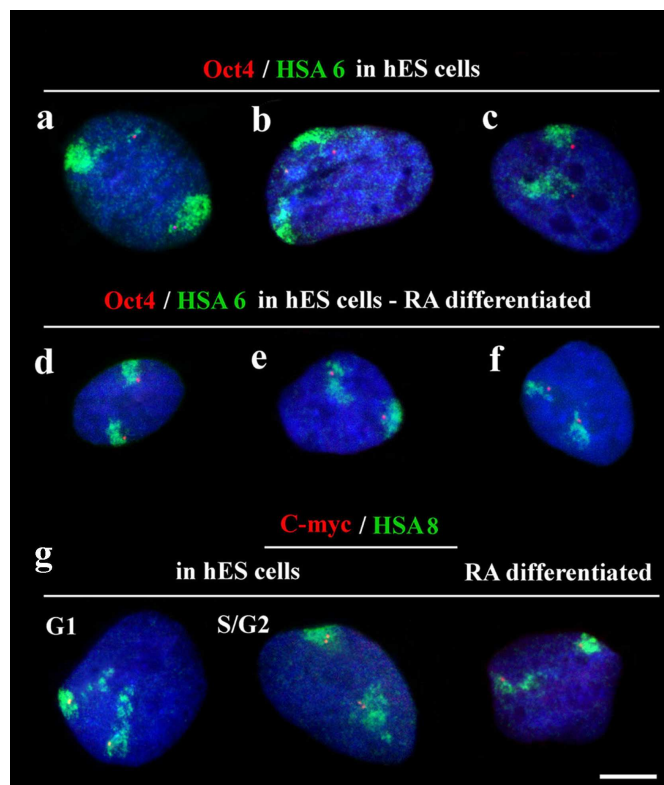
za přepis mRNA genů. V práci Osborne et al. (2004) bylo publikováno, že transkripčně aktivní geny z různých chromozomálních teritorií sdílí shodnou “transkripční továrnu”, ve které se vyskytují ve formě vysoce dekonzenzovaného chromatinu (Obr. 4). Během post-transkripčních úprav bylo zjištěno, že se faktory sestřihu rovněž koncentrují do specifických domén, takzvaných jaderných skvrn (“nuclear speckles”). Regulace transkripce a post-transkripční úpravy jsou pravděpodobně rovněž zprostředkovány faktory, které jsou obsaženy v PML tělísčích, jejichž význam byl studován v procesu DNA reparaace. Neméně významné se z hlediska jaderných funkcí jeví právě “reparační ohniska” (Soutoglou et al., 2007; Soutoglou a Misteli 2007), které obsahují řadu reparačně důležitých proteinů.

V devadesátých letech minulého století skupina vedená P. Lichterem navrhla model interchromozomálních domén (ICD). Původní verze tohoto modelu naznačuje, že chromozomální teritoria (CTs) tvoří hladké struktury, které jsou od sebe odděleny interchromozomální doménou (ICD). Tato první teorie však neodpovídá možnosti lokalizace aktivních genů na periferii CTs tak, jak to bylo pozorováno v experimentech Kurz et al. (1996) nebo Bártová et al. (2002).

Umístění genů na samém okraji chromozomálních teritorií pravděpodobně umožňuje funkční interakci těchto genů s faktory obsaženými v transkripčních továrnách nebo jaderných skvrnách. V dalších studiích však bylo navrženo, že chromozomální teritoria jsou určitým způsobem strukturována, a tudíž transkripčně aktivní geny mohou být rovněž pozorovány ve vnitřních částech těchto teritorií (Verschure et al., 1999). Na základě zmíněných pozorování byl navržen takzvaný CT-IC model, který popisuje teritoria chromozómů jako strukturu s řadou invaginací tak, že IC kompartment zasahuje i do nitra teritorií interfázních chromozómů a tím zprostředkovává jejich kontakt s jadernou membránou (Cremer et al., 2006). Uspořádání chromatinu v jednotlivých teritoriích řeší řada modelů, z nichž jedním je takzvaný “Multiple Loop Model” (MLM) (Münkel et al., 1999), ve kterém série domén o velikosti chromatinových smyček kolem 100 bp tvoří rozety o velikosti 1 Mbp. Sousední 1 Mbp chromatinové domény jsou spojeny spojovacím chromatinem. Další názor na uspořádání chromatinu je představován “Giant Loop” modely, kdy prvním z těchto modelů byl “Random Walk/Giant Loop” (RW/GL) model, popsán Sachsem v roce 1995. U tohoto modelu má každá chromatinová smyčka (GL) velikost několika Mb DNA a je oddělena od druhé GL v tom samém chromozomálním teritoriu pomocí 200 kbp spojovací DNA (Sachs et al., 1995). Ovlivnění velikosti GL a spojovací oblasti mezi nukleozómy determinuje úroveň kondenzace chromatinu (Münkel et al., 1999). Několik článků popisuje expanzi GL z relevantních chromozomálních teritorií. Například Volpi et al. (2000) pozorovali, že na geny bohaté sekvence hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) jsou lokalizovány na chromatinových smyčkách, které vybíhají mimo relevantní kompaktní chromozomální teritorium. Lokalizace genů na podobných chromatinových smyčkách byla pozorována i pro EDC (“Epidermal Differentiation Complex”) klastr genů na lidském chromozomu 1 (Williamns et al., 2002) a dále pro oblast 11p15.5 (Mahy et al., 2002) nebo Hox1 gen během diferenciac embryonálních kmenových buněk (Chambeyron et al., 2004). Podobné umístění genů na velkých smyčkách chromatinu jsme rovněž pozorovali v naší práci Bártová et al. (2008a) pro gen Oct 3/4, který je zodpovědný za pluripotenci embryonálních kmenových buněk (ESCs). Během diferenciac jak myších (mESCs), tak lidských (hESCs) embryonálních kmenových buněk došlo k výraznému snížení exprese genu Oct3/4, což bylo doprovázeno změna v architektuře tohoto lokusu; u hESCs byl pozorován na periferii odpovídajícího



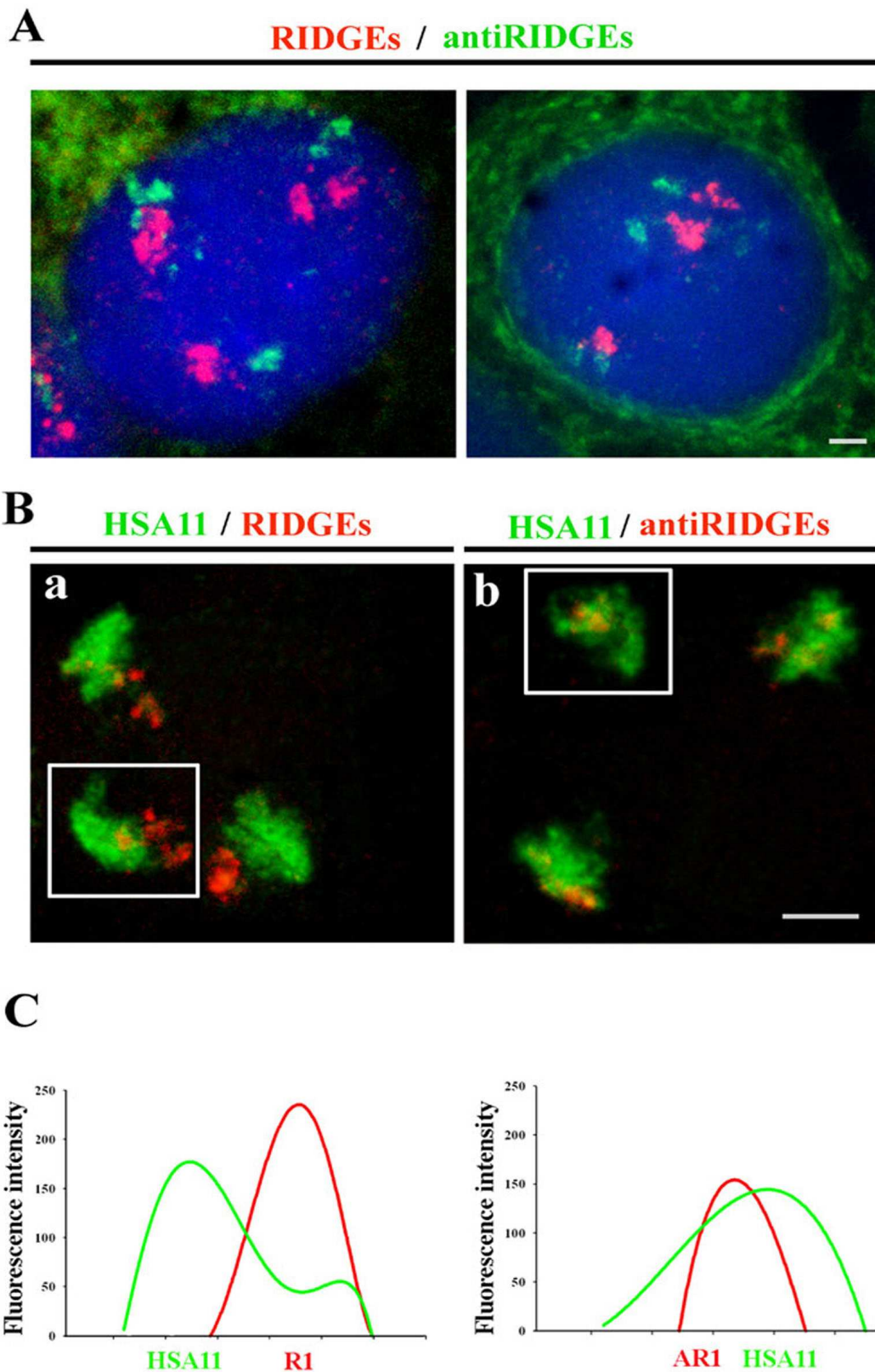
chromozomálního teritoria (Obr. 5). Na druhou stranu, vzdálenost genu Oct3/4 od středu jádra se významně nezměnila během indukce diferenciace (Bártová et al., 2008a). Je otázkou, zda všechny chromozomální oblasti jsou schopné tvořit GL a nebo jestli tato vlastnost je charakteristická pouze pro omezené množství genů, případně určité podoblasti chromozomálních teritorií. Z našich experimentů se ukazuje, že pouze některé lokusy mají schopnost tvořit GL a to pravděpodobně lokusy, které se uplatňují během vývoje a nebo jsou zodpovědné za pluripotenci hESCs. Tuto domněnku nám potvrzuje fakt, že protoonkogen c-myc v žádném modelovém experimentálním systému nevytvárel GL (Bártová et al., 2002; Harničarová et al., 2006; Bártová et al., 2008a; 2008b). V případě neutrofilních granulocytů byl sice c-myc umístěn v odlišném segmentu granulocytu (Bártová et al., 2001), ale velikost chromatinové smyčky byla zanedbatelná v porovnání se smyčkami, které nesou sekvence Oct3/4 u pluripotentních hESCs (Obr. 5a). Utvoření GL je pravděpodobně ovlivněno hustotou genů v dané oblasti, protože GL tvoří pouze klastry genů. Navíc epigenetické modifikace histonů a lokální struktura by mohly ovlivňovat míru dekondezace chromatinových smyček (Mahy et al., 2005). To bylo podpořeno našimi experimenty, které ukazují, že například gen c-myc, mapovaný v oblasti s nízkou transkripční aktivitou (anti-RIDGE) a v blízkosti telomer, není nikdy umístěn na velkých chromatinových smyčkách (Bártová et al., 2002; Harničarová et al., 2006; Bártová et al., 2008a, 2008b).



**Obrázek 5**

*Distribuce genu Oct3/4 (červeně) v rámci teritoria chromozómu 6 (zeleně) u lidských embryonálních kmenových buněk (hESCs) (a-c) a hESCs diferencovaných kyselinou retinovou (d-f). Jaderná topografie byla rovněž studována pro gen c-myc u pluripotentních hESCs a během jejich diferenciace (g). Publikováno v Bártová et al. (2008a).*

Z hlediska jaderného uspořádání transkripčně aktivního (euchromatinu) a neaktivního heterochromatinu má svůj funkční význam rovněž i radiálních jaderná distribuce jednotlivých struktur genomu. Bylo zjištěno, že transkripčně aktivní geny, stejně jako oblasti s vysokou transkripční aktivitou (RIDGE - “Regions of Increased Gene Expression”), se vyskytují v jaderném středu, zatímco transkripčně neaktivní lokusy a anti-RIDGE sekvence jsou umístěny spíše na jaderné periferii (Zink et al., 2004; Williams et al., 2006; Goetze et al., 2007; Obr. 6). V práci Harničarová et al. (2006) jsme rovněž ukázali, že transkripty genu *c-myc* asociují s jádérky, které jsou umístěny v jaderném středu, ve vzdálenosti kolem 40% jaderného poloměru, což je velmi centrální umístění v porovnání s kódujícími sekvencemi genu *c-myc*, které jsou umístěny v přibližně 70% jaderného poloměru. Navíc žádný z lokusů, studovaných v naší laboratoři, nevykazoval tak centrální lokalizaci jako transkripty *c-myc* (Harničarová et al., 2006; Bártová et al., 2008b). Například gen *TP53* patří mezi geny, které jsou umístěny ve velmi centrální oblasti interfázního jádra, v přibližně 45-50% jaderného poloměru (Jirsová et al., 2001; Bártová et al. 2003b), avšak transkripce a RNA procesy genu *c-myc* probíhají ještě centrálněji v rámci interfázních jader (Harničarová et al., 2006; Bártová et al., 2008b). Jak již bylo naznačeno, orientace RIDGE a anti-RIDGE oblastí v buněčných jádrech je velmi specifická (Goetze et al., 2007), což jsme potvrdili i v našich experimentech (Obr. 6). Významné objevy v této oblasti byly udělány i na příkladu chromozómu 18 (HSA 18), který je charakteristický malým obsahem genů, v porovnání s genově bohatým chromozómem 19 (HSA 19). Oba dva chromozómy jsou charakteristické podobnou velikostí v Mbp, ale pravděpodobně z důvodu odlišné genové hustoty je HSA 18 lokalizován na jaderné periferii, zatímco HSA 19 je umístěn blíže ke středu buněčného jádra (Croft et al., 1999). Zmíněným výsledkům odpovídají i naše stanovení radiálních distribucí všech lidských chromozómů (Bártová et al., 2001) a rovněž korespondují s našimi výsledky týkající se hustoty zastoupení H3K9 acetylce na chromozómech 17, 18 a 19 (Obr. 7). V tomto případě, H3K9 acetylce, epigenetický znak transkripčně aktivního chromatinu, byla silně zastoupena na centrálně lokalizovaných chromozómech jako je HSA 17 a HSA 19, zatímco chromozóm 18, asociovaný s jadernou periferií, byl spíše deacetylován (Obr. 7). Naše srovnání rovněž vychází z faktu, že radiální uspořádání jednotlivých chromozomálních teritorií i jejich subdomén v rámci interfázních jader je konzervativní u různých buněčných typů (Skalníková et al., 2000) a během evoluce vyšších primátů (Tanabe et al., 2002).



**Obrázek 6**

(A) Distribuce RIDGE (červeně) a anti-RIDGE oblastí (zeleně) v rámci interfázních jader buněk střevního adenocarcinomu (HT29) (modře). (B) Jadená topografie RIDGEs (červeně) (a) a anti-RIDGEs (červeně) (b) byla studována v rámci chromozomálních teritorií (zeleně). (C) Distribuce RIDGE a anti-RIDGE oblastí v teritoriu HSA 11 je uvedena na posledním panelu.



### Obrázek 7

*ChIP-on-chip analýza H3K9 acetylace pro vybrané lidské chromozómy 17, 18 a 19 u B-buněčné leukemické linie ARH77.*

Jak již bylo uvedeno v předcházejících odstavcích, dalším významným fenoménem z hlediska regulace transkripce je studium oblastí se zvýšenou genovou expresí (RIDGEs) a k nim opačných oblastí se sníženou transkripční aktivitou (anti-RIDGEs). V těchto případech bylo opět zjištěno, že RIDGEs jsou lokalizovány spíše centrálně v rámci interfázního jádra, zatímco anti-RIDGEs byly často asociovány s jadernou periferií (Goetze et al., 2007; Gierman et al., 2007). Rozdíl mezi RIDGE a anti-RIDGE oblastmi byl stanoven pomocí cDNA microarray technologií, jejichž výstupem, po vhodných statistických úpravách a normalizování dat, jsou transkripční mapy (Obr. 9A). Transkripční mapy jsou výsledkem expresních dat, která jsou měřena pomocí SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression”) postupů, což znamená několikanásobnou analýzu genové exprese v celém genomu (Caron et al., 2001; Versteeg et al., 2003; Gierman et al., 2007). RIDGEs a anti-RIDGEs dobře odpovídají takzvaným genově bohatým (“gene-rich”) a genově málo zastoupeným (“gene-poor”) oblastem (Kosak a Groudine 2004). Navíc, RIDGEs oblasti obsahují řadu “housekeeping” genů, které vykazují stabilní transkripční aktivitu u většiny buněčných typů (Lercher et al., 2002). Na druhou stranu buněčně specifická exprese však může být pozorována v RIDGE oblastech (Versteeg et al., 2003). Výsledky studií 3D-jaderné organizace interfázních RIDGE a anti-RIDGE oblastí, které byly publikovány nedávno v práci Goetze et al. (2007), ukázaly, že RIDGE oblasti jsou navíc dekondezovány a mají nepravidelný tvar v porovnání s více kondezovanými

anti-RIDGEs. Tato pozorování podporují teorie kompartmentalizace interfázních jader a navíc ukazují, že struktura chromatinu významně ovlivňuje genovou expresi a nebo naopak (shrnutí v Lanctôt et al., 2007). Určitá pravidla existují i mezi strukturou a funkcí genomu u buněk, které podléhají specifické diferenciaci, při níž je transkripční aktivita směřována do určité specifické podmnožiny genů. Během diferenciacních procesů bylo prokázáno, že tyto lokusy podléhají určitým strukturálním regulacím (shrnutí ve Francastel et al., 2000; Bártová a Kozubek 2006).

### 2.3. Změny chromatinu ve vztahu k reparaci DNA

Dvouřetězcové zlomy (DSBs) v DNA, pokud nejsou opraveny, jsou hlavní hrozbou neporušené a smysluplné genetické informace buňky. Chyby v reparačních mechanismech tak mohou vést k translokacím chromozómů, které jsou spojovány s patologickými procesy v buňkách a následně v tkáních.

O mechanismu, kterým dochází k translokacím chromozómů v savčích buňkách, se vedly a vedou spory. Jedním z předpokladů je fakt, že k translokaci může dojít jen mezi sousedními chromozomálními teritorii (Kruhlak et al., 2006). Bylo zjištěno, že indukce DSBs je lokálně omezená, stejně jako pohyb vytvořených volných konců DNA na delší jaderné vzdálenosti (Soutoglou et al., 2007). Indukce chromozomálních zlomů pouze vede ke zvýšenému pohybu přerušného úseku DNA v omezených oblastech, v rámci blízkých chromozomálních domén (Soutoglou et al., 2007).

DSBs tedy pravděpodobně nemohou migrovat k nějakým obecným reparačním továrnám, ale u každého DSB se budou formovat vlastní ohniska opravy (Soutoglou et al., 2007). Velice vhodným markerem pro detekci DSBs je fosforylovaný histon  $\gamma$ -H2AX, který je nezbytný pro déletrvající udržení proteinů zahrnutých v opravných procesech (Celeste et al., 2003). Například u více než 75 % pozorovaných buněk došlo k akumulaci fosforylovaného histonu  $\gamma$ -H2AX, což bylo pozorováno ve sledované oblasti zlomu během 5 minut po indukci DSBs (Soutoglou et al., 2007). Během 5 minut se u 75 % buněk nahromadil také další faktor opravy MDC1. Z tohoto důvodu pak faktor 53BP1 (vazebný protein 1 pro nádorový supresor p53) trvala akumulace k místům zlomů přibližně 15 min (Soutoglou et al., 2007). Na základě těchto experimentů byl shrnuto, že úseky DSBs na různých chromozómech patrně nejsou schopny volně difundovat jádrem savčí buňky, přinejmenším faktor KU80 se podílí na omezení pohybu konců porušeného chromozómu (Soutoglou et al., 2007). K chybnému spojení neopravených zlomů tedy bude docházet v rámci jejich omezených pohybových možností, převážně mezi sousedními chromozómy. Z tohoto důvodu je četnost chromozomálních translokací závislá na stupni vzájemné interakce mezi sousedními chromozomálními teritorii tak, jak to bylo popsáno v práci Kozubek et al. (1997) a Branco a Pombo (2006). Díky omezené mobilitě DSB úseků v rámci interfázních jader dochází ve většině případů k rychlé opravě poškozených míst, dříve než k translokaci. Omezení pohybu DSBs v savčích buňkách představuje pravděpodobně

ochranný mechanismus, který brání nestabilitě genomu (Soutoglou et al., 2007). K myšlence, že by se na udržování stability genomu mohla podílet i například PML tělíska, vedlo především pozorování asociace PML tělísek s proteiny spojenými s opravnými procesy jaderné DNA. Je známo, že přítomnost opravných faktorů v PML těliscích je zpravidla přechodná, dochází k jejich dynamické výměně mezi tělísky a nukleoplazmou. Navíc je stále předmětem výzkumu, zda se tak děje skutečně v reakci na poškození DNA. Velký význam mají i četné kontakty PML tělísek s chromatinem, převážně s 30nm vlákny (Boisevert et al., 2000), což přispívá k možnosti zapojení PML tělísek do opravných procesů. Zmíněnými jevy lze pravděpodobně vysvětlit i vzájemnou poziční stabilitu, která byla pozorována po několik hodin u PML tělísek v jádrech živých buněk (Eskiw et al., 2004).

Indukce zlomů v DNA však vede k destabilizaci a rozpadu PML tělísek. Původní pozorování popisují zvyšování počtu PML tělísek po vyvolání jedno- a dvouřetězcových zlomů ionizujícím zářením (Xu et al., 2003). Obdobná pozorování provázela také účinek endonukleáz v časně fázi indukované apoptózy (Eskiw et al., 2004). V těchto případech bylo zvýšení počtu PML tělísek bezprostředním důsledkem buněčné odpovědi na poškození DNA pomocí proapoptotických činidel jako je etoposid nebo doxorubicin. Ke změně morfologie PML tělísek v blízkosti DSBs dochází pravděpodobně v důsledku dekondezace chromatinu po indukci dvouřetězcových zlomů (Kruhlik et al., 2006). Tělíska také ztrácí středovou souměrnost a rozpadají se na dceřinná, takzvaná mikrotělíska, která jsou od rodičovských biochemicky nerozlišitelná (Eskiw et al., 2004; Dellaire et al., 2006). V průběhu procesu oprav dochází po úvodním rychlém nárůstu počtu PML tělísek k dalšímu zvyšování jejich počtu, mimo jiné i v místech vzdálených původním zlomům. Zůstává však otázkou zda jde o souvislost s globálním přeuspořádáním chromatinu v pozdní fázi reparační (Dellaire et al., 2006). Při menším rozsahu poškození, respektive nižších dávkách ionizujícího záření (< 5 Gy), dochází po době potřebné k opravám poškozené DNA k návratu počtu PML tělísek na původní hodnoty. Po ozáření dávkou větší jak 5 Gy, kdy dochází k nevratnému poškození DNA nad možnosti reparačního systému buňky, se již počet PML tělísek k původním hodnotám nevrací, což by mohlo být znakem stárnutí buněk, či indukce apoptózy (Dellaire et al., 2006). Zvýšení počtu PML tělísek po ozáření buněk jsme rovněž pozorovali v experimentech Krejčí et al. (2008), které ukázaly, že změna v počtu PML zásadně ovlivňuje jejich radiální distribuci v interfázních jádrech.

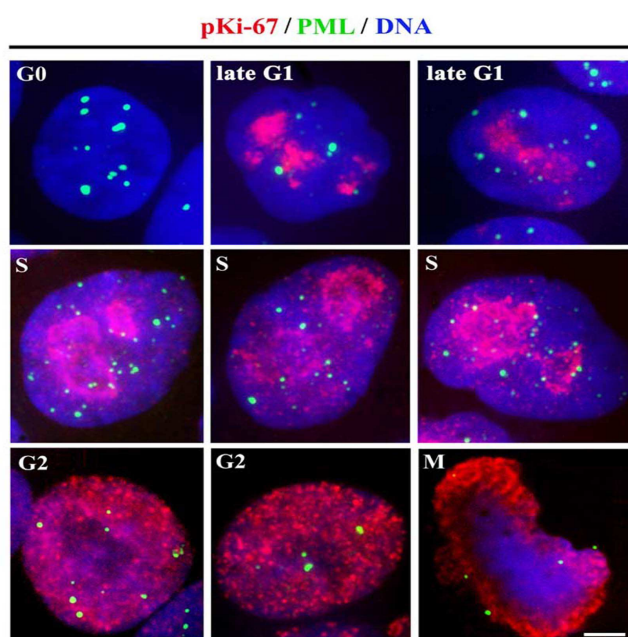
## 2.4. Vybrané jaderné kompartmenty, které se podílí na regulaci transkripce a post-transkripčních úpravách

Kromě kompartmentů, jako jsou chromozomální teritoria a interchromatinový prostor, existuje řada jaderných proteinů, které hrají velice důležitou úlohu z hlediska regulace replikace, transkripce, sestřihu a DNA reparace (shrnuto v Cremer a Cremer 2001; Lanctôt et al., 2007). Mnoho proteinů, které tyto funkce regulují, akumulují do specifických domén, což velice silně podporuje teorii kompartmentalizace interfázních jader (Spector 2003; Cremer a Cremer 2001; Lamond a Spector 2003; Lanctôt et al., 2007). Regulace transkripční aktivity je rovněž připisována doménám, které jsou asociovány s chromatinem, jsou to například “transkripční továrny”, “jaderné skvrny” a další proteinové struktury (shrnuto v Lamond a Spector 2003). K významným jaderným doménám jsou často řazena PML tělíška, která obsahují řadu proteinů, zodpovědných za regulaci transkripce, potlačení růstu nádorových buněk, indukci programované buněčné smrti apoptózou a obranu proti virům. Savčí buněčná jádra obsahují 10-30 sférických struktur, které se nazývají “PML nuclear bodies”, někdy PODs, ND10 nebo “Kremer bodies” (Maul et al., 2000; Borden 2002). Tato tělíška mají velikost 0.3-1  $\mu\text{m}$  a nejvíce jsou v nich zastoupeny proteiny PML a Sp100 (Dyck et al., 1994; Koken et al., 1994). Zájem o tato tělíška nastal s objevem translokace genu PML s receptorem pro kyselinu retinovou  $\text{RAR}\alpha$  [t(15;17)] u akutní promyelocytické leukémie (APL). Z tohoto důvodu se PML tělíška jeví jako významné struktury, které by v budoucnu mohly mít velký diagnostický význam. Na druhou stranu studium PML proteinu je velice komplikované a to z hlediska mnohočetných variant tohoto proteinu, které vznikají alternativním sestřihem. Navíc některé varianty PML jsou jaderné a jiné cytoplazmatické, dále ovlivněné post-translačními modifikacemi typu sumoylace (SUMO), která má svůj význam při degradaci proteinů v proteazomu (Wang et al., 1998). Dále bylo zjištěno, že PML tělíška u buněk APL pacientů jsou významně fragmentována a právě terapie kyselinou retinovou umožňuje obnovit fyziologický profil PML tělíšek v krevních buňkách pacientů (Weis et al., 1994). Velice významným proteinem v PML tělíškách je nádorově-supresorový protein p53, jehož fosforylace a acetylace, zprostředkovaná proteiny CBP a HIPK2, je asociována s poškozením DNA a spuštěním následných DNA reparačních mechanismů (shrnuto v Dellaire a Bazett-Jones 2004). Rovněž objev transkripce virů v blízkosti PML



tělísek a přítomnost nově vznikající RNA na periferii těchto struktur ukazuje na význam PML tělísek v regulaci některých jaderných funkcí, jako je například transkripce. Význam PML domén v regulaci genové exprese byl popsán také pro klastr genů MHC (“Major Histocompatibility Complex”), který je mapován na lidském chromozómu 6. Bylo zjištěno, že skupina těchto genů významně a nenáhodně asociuje s PML tělísky (Shiels et al., 2001). Tato asociace je specifická především pro tu část MHC, která přiléhá k centromerickému heterochromatinu. Jiným příkladem je transkripčně aktivní chromozóm X, který opět těsně přiléhá k blízkým PML doménám, na rozdíl od jeho transkripčně neaktivního homologu. Podobná asociace s PML tělísky byla prokázána pro “Histone-Encoding Gene Cluster” (HEGC), jehož transkripce probíhá v S-fázi, ve které ke zmíněné asociaci dochází. Kolokalizace HEGC s PML tělísky nebyla však pozorována v G0 a G1 fázích buněčného cyklu. Na druhou stranu, vizualizace transkriptů některých genů ukázala, že ne všechny geny jsou regulovány faktory, které jsou obsaženy v PML doménách (Wang et al., 2004). Některá pozorování spíše naznačují, že PML tělísky představují část nějakého funkčního kompartmentu, avšak pravděpodobně přímo neregulují transkripci.

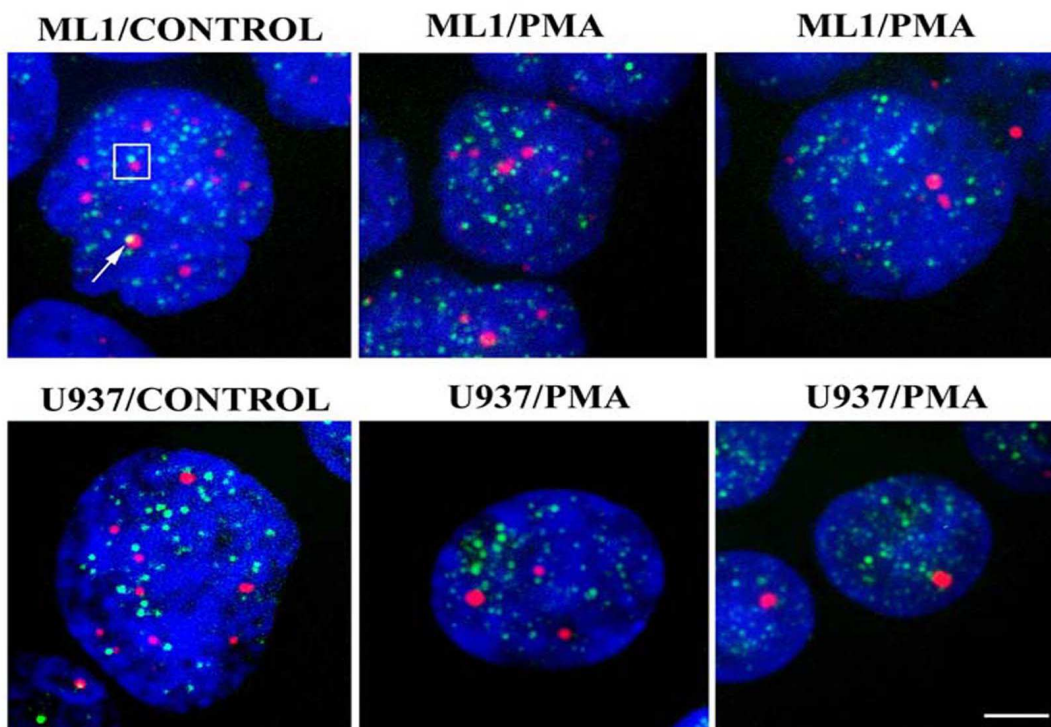
V našich experimentech jsme se rovněž zabývali studiem kompartmentu PML tělísek v rámci jednotlivých fází buněčného cyklu, které je možné určit *in situ* pomocí protilátky proti proteinu pKi-67. Zjistili jsme, že počet PML tělísek se významně zvyšuje v S-fázi buněčného cyklu, zatímco G0, G1 a G2-M fáze jsou charakteristické daleko nižším počtem PML tělísek (Krejčí et al., 2008; Obr. 8). Vzájemný prostorový vztah mezi PML a dalšími jadernými doménami je uveden na Obr. 9.



**Obrázek 12**

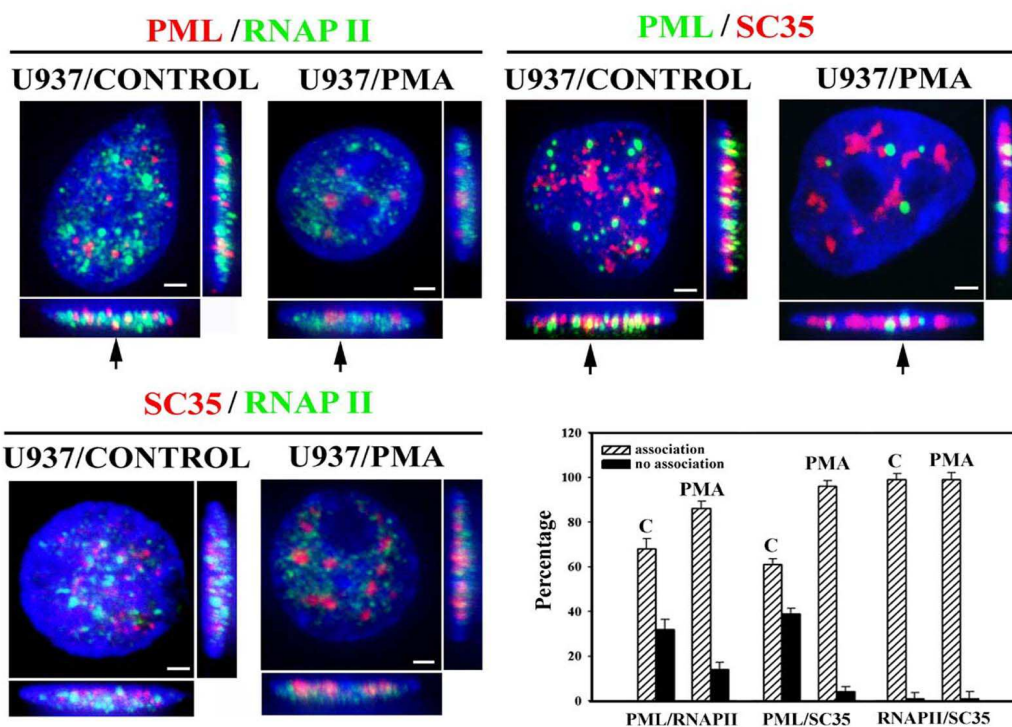
*Kolokalizace proteinu pKi-67 (červeně) a PML tělísek (zeleně) v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G0, pozdní-G1, S, G2 a M).*

PML / c-MYC



**Obrázek 8**

Asociace PML tělísek (červeně) s proteinem c-MYC (zeleně) u dvou leukemických linií ML1 a U937. Kolokalizace dvou studovaných domén byla pozorována ojediněle (viz šipka). Rámeček uvádí vzájemnou asociaci oblastí PML a c-MYC. Měřítko je 2  $\mu$ m. Převzato z Krejčí et al. (2008).



**Obrázek 9**

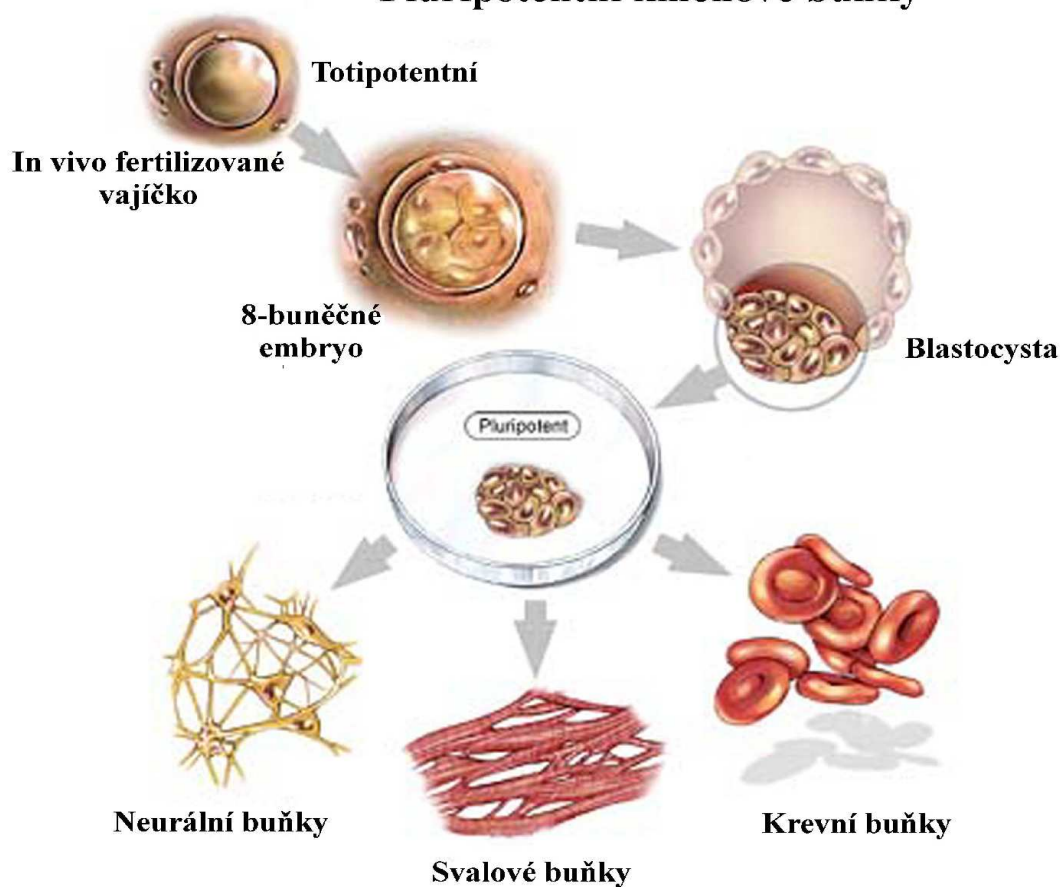
Vzájemné vztahy mezi jadernou lokalizací PML tělísek (červeně) a RNAP II (zeleně) nebo mezi PML (zeleně) a SC35 doménami (červeně) u leukemické buněčné linie U937 diferencované pomocí PMA do monocytů. V porovnání s kontrolou, PMA zvyšovalo procento asociace PML/RNAP II a PML/SC35.

## 2. 5. Změna ve struktuře chromatinu během buněčné diferenciaci a apoptózy

První práce na téma diferenciaci a struktura chromatinu byla naší skupinou publikována v roce 2000, kdy jsme se především zaměřili na studium diferenciacních procesů u hematopoetických buněk. Obecným znakem všech diferenciacních drah, které jsme studovali, byla repozice většiny centromer na jadernou periferii. I některé geny byly reorganizovány v rámci interfázních jader, ale repozice genů se s odstupem času a na základě dalších zjištění jeví jako buněčně specifická, ne vždy asociovaná se změnami v expresi studovaných genů (Bártová et al., 2000a; 2000b; 2002; 2005b; 2008a; Harničarová et al., 2006). V mnoha případech je těžké posoudit, jestli změny v radiálních distribucích přímo souvisí s transkripční aktivitou daného lokusu nebo naopak. Někteří autoři, například Daniela Zink et al. (2004), však přičítají velký význam lokalizaci transkripčně aktivních/neaktivních genů v rámci interfázního jádra. Z řady experimentů je však evidentní, že jaderné umístění genů je dost robustní parametr. Navíc v mnoha případech se jako zásadnější jeví umístění genů v chromozomálním teritoriu (Kurz et al., 1996; Harničarová et al., 2006). Již zmíněná lokalizace exprimujících se genů na chromatinových smyčkách, které vyčnívají mimo vlastní kompaktní chromozomální teritorium, je toho důkazem (Williams et al., 2002; Volpi et al., 2000; Mahy et al., 2002; Wiblin et al., 2005; Bártová et al., 2008a). Takto se chovají geny, jejichž exprese je důležitá z hlediska iniciace diferenciacních procesů, které probíhají během ontogenetického vývoje. Rovněž jsme zjistili, že utlumení exprese diferenciacně důležitých genů může být zprostředkována centromerickým heterochromatinem. Pokud jsou v buňce navozeny takové mechanismy, které způsobí, že je lokus přemístěn do blízkosti chromocenter, tak to vede k utlumení exprese příslušného genu (Brown et al., 1999; 1997; Bártová et al., 2002).

V případě studia diferenciacních procesů jsou velice zajímavým experimentálním modelem embryonální kmenové buňky (ES), které jsou unikátní svojí schopností diferencovat do všech tří zárodečných listů (Obr. 10). Původ těchto buněk je ve vnitřní buněčné mase blastocytu a jsou charakteristické schopností sebeobnovy. Z tohoto důvodu lidské embryonální kmenové buňky představují slibný nástroj, vhodný k léčbě některých degenerativních onemocnění. Je však pravdou, že *in vitro* kultivace hES buněk není plně optimalizována a to vede ke genomové nestabilitě těchto buněk.

## Pluripotentní kmenové buňky

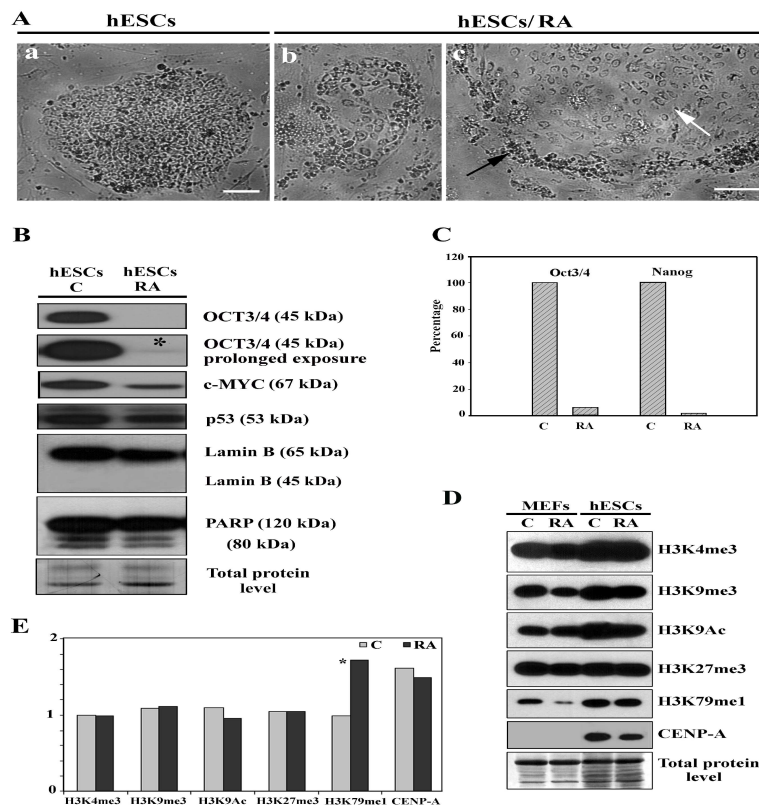


**Obrázek 10**

*Schéma izolace a možnosti diferenciacie pluripotentních embryonálních kmenových buněk. Převzato z [www.csa.com/discoveryguides/stemcell/overview.php](http://www.csa.com/discoveryguides/stemcell/overview.php).*

Především chromozomy 12, 17 a X jsou velmi senzitivní k různým genomovým přestavbám u hES buněk (Brimble et al., 2004; Cowan et al., 2004; Mitalipova et al., 2005; Baker et al., 2007). Lidské embryonální kmenové buňky vytvářejí *in vitro* kolonie (Obr. 11A), které rostou ve společné kultuře s myšími embryonálními fibroblasty (MEFs). MEF buňky produkují řadu růstových faktorů, které jsou důležité pro udržení pluripotence hES buněk (Reubinoﬀ et al., 2000). V našich experimentech jsme pro udržení pluripotence hESCs používali MEF buňky v kombinaci s bFGF faktorem, zatímco diferenciacie byla navozena odstraněním bFGF a přidáním kyseliny retinové. Po 4 dnech kultivace se významně změnila morfologie kolonií hESCs (Obr. 11B, C). Výsledkem diferenciaciích experimentů byla změna nejen v morfologii buněk, ale i celé hESC kolonie, která podléhala diferenciaci spíše do primitivního endodermu (Obr. 11A). Zatímco u pluripotentní populace hES buněk se na periferii kolonie vyskytují spíše buňky ektodermu a uvnitř kolonie se spontánně vytvářejí buňky primitivního endodermu (Dvořák et al., 2005).

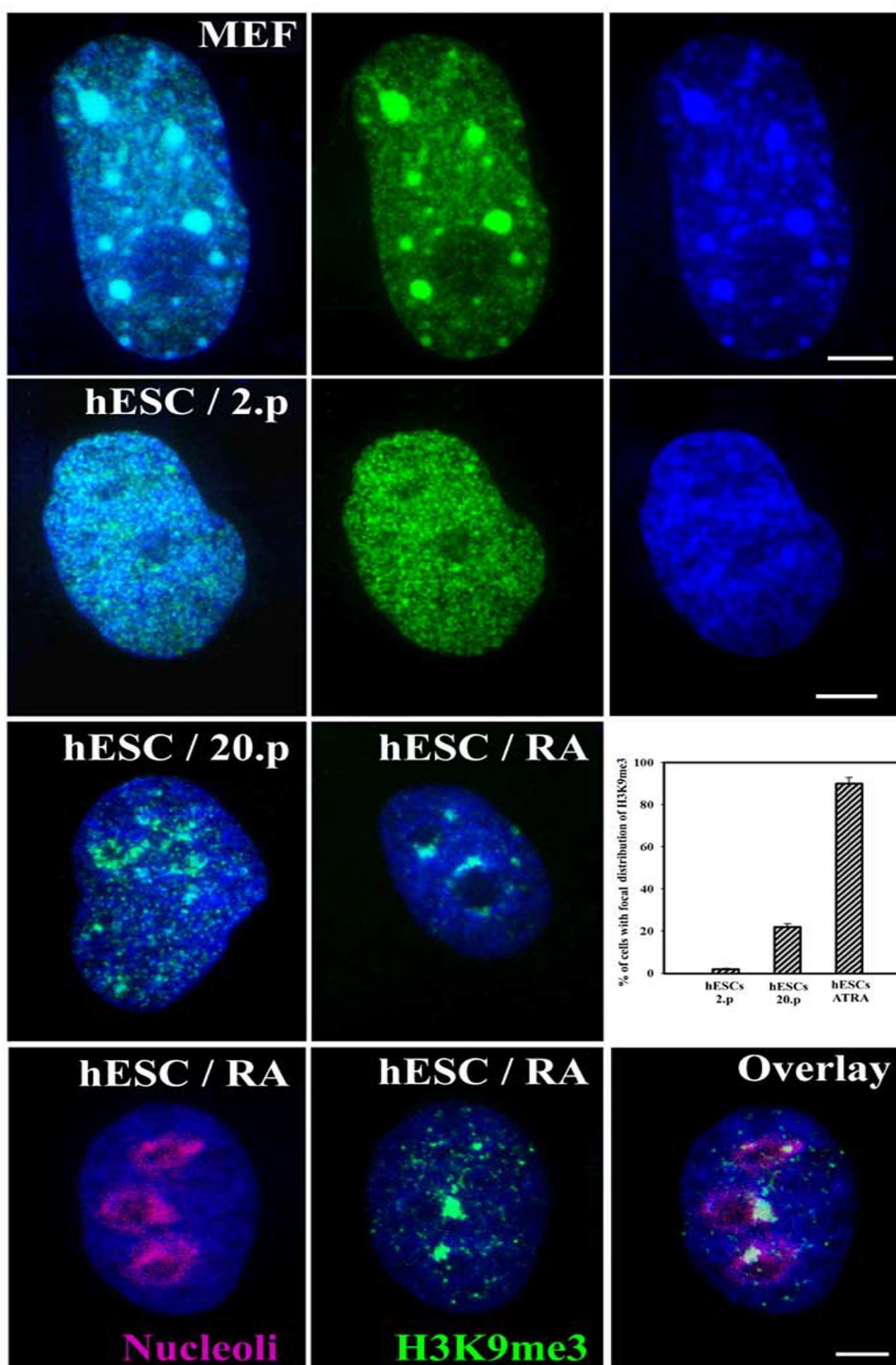
Pluripotentní hES buňky se od diferencovaných liší i odlišnou expresí řady genů, kdy nejznámější je snížení exprese genu Oct3/4 a lokusu Nanog (obr. 11B, C), ke které dochází během diferenciace indukované pomocí kyseliny retinové. V našich experimentech jsme rovněž pozorovali snížené množství proteinu c-MYC, zatímco množství p53 a některých epigenetických modifikací histonů se významně neměnilo během diferenciálních procesů (Obr. 11B, D). Důležitým znakem z hlediska rozpoznání mezi pluripotentním a diferencovaným stavem hESCs se ukazovaly změny v některých epigenetických modifikacích histonů, jako je H3K9me3 (Obr. 12), která přechází z difúzního stavu na fokální distribuci během diferenciace hES buněk.



### Obrázek 11

(A) Kolonie pluripotentních lidských embryonálních kmenových buněk (a) a hESCs diferencovaných pomocí kyseliny retinové (b-c). Měřítka uvádí 4  $\mu\text{m}$ . (B) Analýzy pomocí western blotů. U pluripotentních a RA-diferencovaných hESCs bylo studováno množství proteinů Oct3/4, c-MYC, p53 a dále byly analyzovány lamin B a PARP pomocí western blotů. (C) Real-time PCR pro geny Nanog a Oct3/4 u pluripotentních a RA-diferencovaných hESCs. (D-E) Stabilní H3K4, H3K9 a H3K27 trimethylace byla zjištěna během diferenciace hES buněk; mírné snížení bylo pozorováno pro H3K9 acetylaci a CENP-A. Dále jsme zjistili zvýšení pro H3K79 monomethylaci (hvězdička v panelu E).

## H3K9me3 / DNA

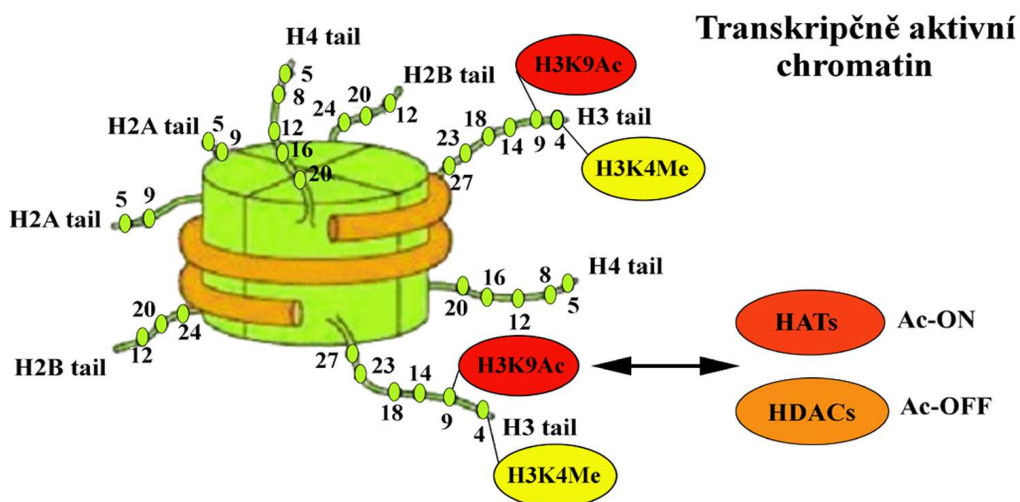


**Obrázek 12**

*Jaderný profil H3K9 trimethylace (H3K9me3) (zeleně) u MEF buněk, pluripotentních a RA-diferencovaných hES buněk. Graf uvádí procento buněk s fokální distribucí H3K9me3. Umístění H3K9me3 v blízkosti jadérek bylo ověřeno pomocí protilátky proti fibrilarinu. Měřítka představuje 1 $\mu$ m.*

## 2.6. Epigenetické charakteristiky genomu

Jak již bylo zmíněno v předcházejícím odstavci, epigenetické modifikace DNA a histonů hrají důležitou úlohu v regulaci jaderných funkcí. Epigenetika představuje vývojově specifické změny v genomu, ke kterým dochází nezávisle na změnách v sekvencích DNA. Za epigenetické znaky chromatinu je považována methylace DNA a methylace, acetylce, fosforylace nebo ubiquitnace histonů. Například methylace H3K4, H3K36 a H3K79 jsou považovány za specifický znak transkripčně aktivního chromatinu a jsou zodpovědné za dekonenzaci chromatinu a formování chromatinových smyček (Chambeyron a Bickmore 2004). Euchromatin je také charakteristický přítomností acetylce histonů, která je zprostředkována enzymy, takzvanými histonovými acetyltransferázami (HATs). Na druhou stranu histonové deacetylázy (HDACs) mají schopnost eliminovat acetyl-skupinu z N-terminálních konců histonů (Obr. 13). Takto navozená deacetylce vede k heterochromatinizaci, jejímž projevem je vysoká kondenzace chromatinu a dále aktivace histonových methyltransferáz (HMTs), které zprostředkovávají methylaci H3K9,



**Obrázek 13**

*Schéma epigenetických modifikací histonů, jako je H3K9 acetylce a H3K4 methylce, které jsou charakteristické pro transkripčně aktivní chromatin. Enzymy typu HATs a HDACs jsou zodpovědné za regulaci acetylce histonů. Obrázek nukleozómu byl upraven podle <http://chemistry.gsu.edu/faculty/Zheng/>.*

H3K27 a H4K20 představující epigenetické znaky heterochromatinu (Kouzarides 2007). Methylace H3K9 je jednou z nejvýznamnějších epigenetických modifikací histonů, za jejíž přítomnost je v lidském genomu zodpovědná SUV39H1 histonová methyltransferáza. Methylace H3K9 se může vyskytovat ve třech podobách a to mono- (me1), di- (me2) a tri-methylace (me3). Množství methyl-skupiny významně determinuje, jaký typ chromatinu bude vytvořen. To znamená, že zmíněné epigenetické znaky významně rozhodují o formování euchromatinu, fakultativního nebo konstitutivního heterochromatinu. H3K9 methylace navíc představuje vazebné místo pro hlavní heterochromatický protein HP1, což je spojeno s utlumením exprese genů a následnou heterochromatinizací (Obr. 14). Utlumení exprese euchromatických oblastí (genových lokusů) je navíc zprostředkováno korepresory, jakým může být například nádorově supresorový retinoblastomový protein pRb1 (Obr. 14).

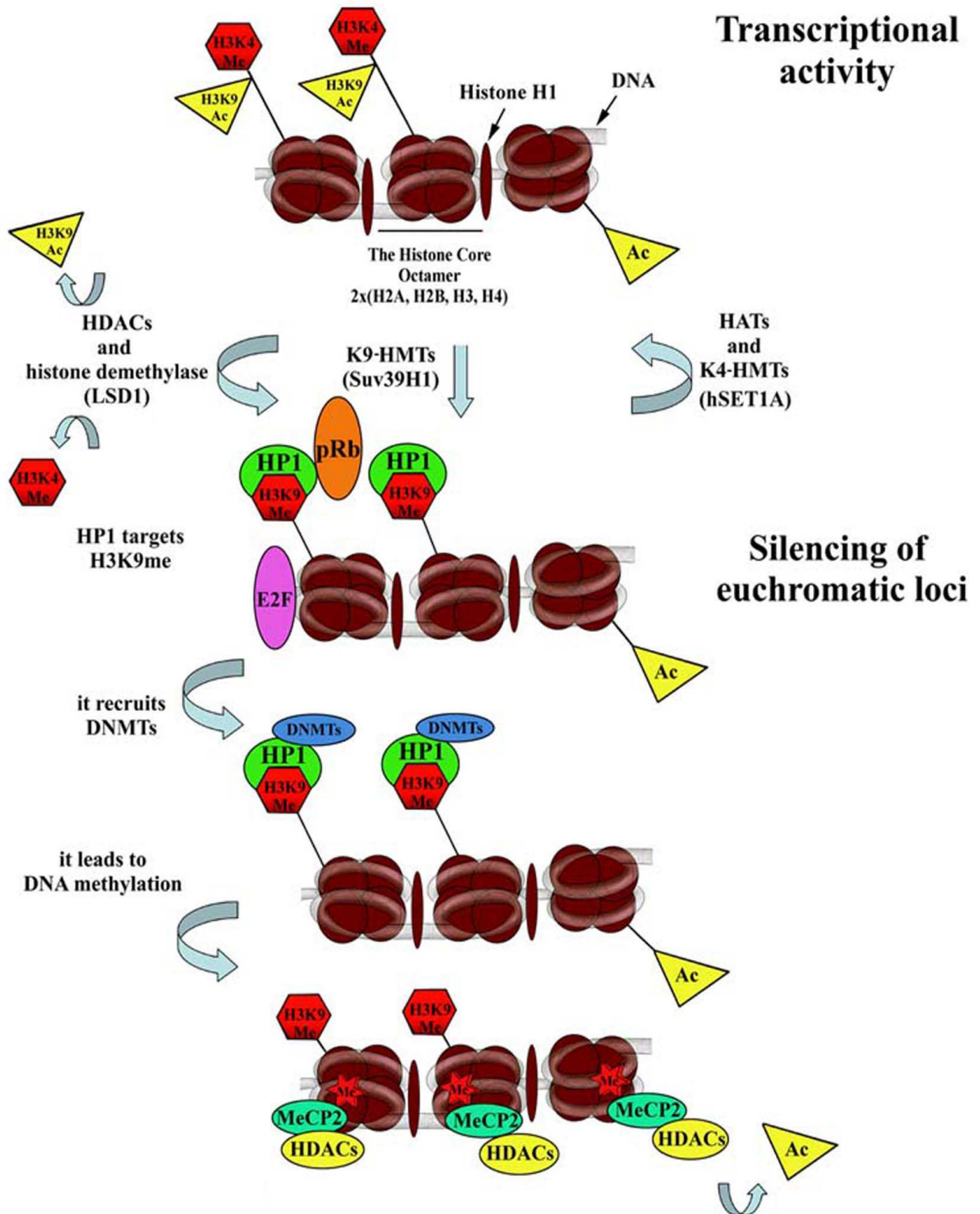
I když methylace histonů byla objevena před více než 45 lety, dlouhou dobu se čekalo na objev enzymů, které jsou zodpovědné za demethylaci histonů. Dříve se uvažovalo, že přítomnost této epigenetické modifikace je ovlivněna acetylačními procesy. V roce 2004 však byla objevena první histon demethyláza, nazvaná LSD1 (Shi et al., 2004). Tento enzym je zodpovědný za demethylaci H3K4, což vede k inaktivaci transkripce v daném lokusu. Avšak pokud LSD1 tvoří komplex s receptorem pro androgeny, způsobuje to demethylaci H3K9, tedy aktivaci transkripce (Metzger et al., 2005). V dalších letech byly objeveny ještě jiné demethylázy, například třída Jumonji (Klose et al., 2006; Klose a Zhang 2007; Kouzarides 2007). JHDM2A je například zodpovědná za H3K9 demethylaci, zatímco JHDM1 má schopnost měnit H3K36 dimethylaci na nemodifikovaný stav (Jenuwein 2006).

Velký význam z hlediska regulace transkripčně aktivního/neaktivního heterochromatinu mají fosforylace a ubiquitinace histonů. Bylo zjištěno, že fosforylace H3 na serinu 10 (H3S10) je asociována s transkripční aktivitou a je zodpovědná za dekonkondenzaci chromozómů (Grant 2001; Johansen a Johansen 2006). Z důvodu velkého funkčního významu epigenetických modifikací histonů, byla provedena řada studií, které řeší interfázní i metafázní profily jednotlivých epigenetických znaků. Bylo zjištěno, že stejně jako kompartmentalizace DNA struktur, logicky i histony a jejich specifické modifikace, jsou začleněny do určitých kompartmentů. Například autoři Cremer et al. (2004) zjistili, že specifické epigenetické modifikace histonů jsou klastrovány v rámci interfázních jader,



což může být například odrazem akumulace transkripčně aktivního chromatinu ve středních částech buněčného jádra, zatímco heterochromatin je umístěn spíše na jaderné periférii a okrajích jadérek (Croft et al., 1999; Sadoni et al., 1999). Ziner et al. (2006) a Sklaníková et al. (2007) dále zjistili, že existují určité vzájemně se nepřekrývající vrstvy v rámci interfázních jader, které ukazují na to, že interfázní chromatin a jeho epigenetické markery jsou významně kompartmentalizovány (Cremer a Cremer 2001; Lanctôt et al., 2007). Jaderná topografie histonových modifikací je rovněž ovlivněna přítomností H3K9 trimethylace v centromerických a telomerických oblastech chromozómů, za níž je zodpovědná histonová methyltransferáza SUV39h1 (Lachner et al., 2003; Garcia-Cao et al., 2004). Bylo například zjištěno, že u SUV39h1 deficientních myších buněk se vyskytuje pouze H3K9me1, což je spojeno s abnormálně se zkracujícími telomerami, zatímco normální telomery jsou H3K9 mono-, di- a tri-methylovány (Garcia-Cao, et al., 2004). Z tohoto faktu vyplývá, že distribuce methylace H3K9 determinuje jadernou topografii samotných interfázních telomer. Změny v radiálních distribucích telomer byly rovněž popsány v práci Amrichová et al. (2003). Navíc například lokalizace centromer významně koreluje s distribucí H3K9me3.

Změny v jaderném uspořádání epigenetických modifikací mohou být navozeny po působení inhibitorů enzymů, které jsou zodpovědné za tyto procesy. Tak například HDAC inhibitory jako TSA nebo butyrát sodný mění zastoupení modifikací histonů hlavně v oblasti jaderné periférie (Gilchrist et al., 2004; Bártová et al., 2005a). Po působení TSA rovněž způsobuje redistribuci a zvětšení chromocenter u embryonálních nádorových buněk (Bártová et al., 2007; Obr. 15B). Tento jev se rovněž odráží ve změněné jaderné topografii všech variant proteinu HP1 (HP1  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Bártová et al., 2007). Bylo zjištěno, že jak TSA, tak NaBt významně mění distribuci všech variant proteinu HP1. V případech ovlivnění buněk zmíněnými HDACi byl tento jev doprovázen i změnami v hladinách relevantních proteinů (Bártová et al., 2005).

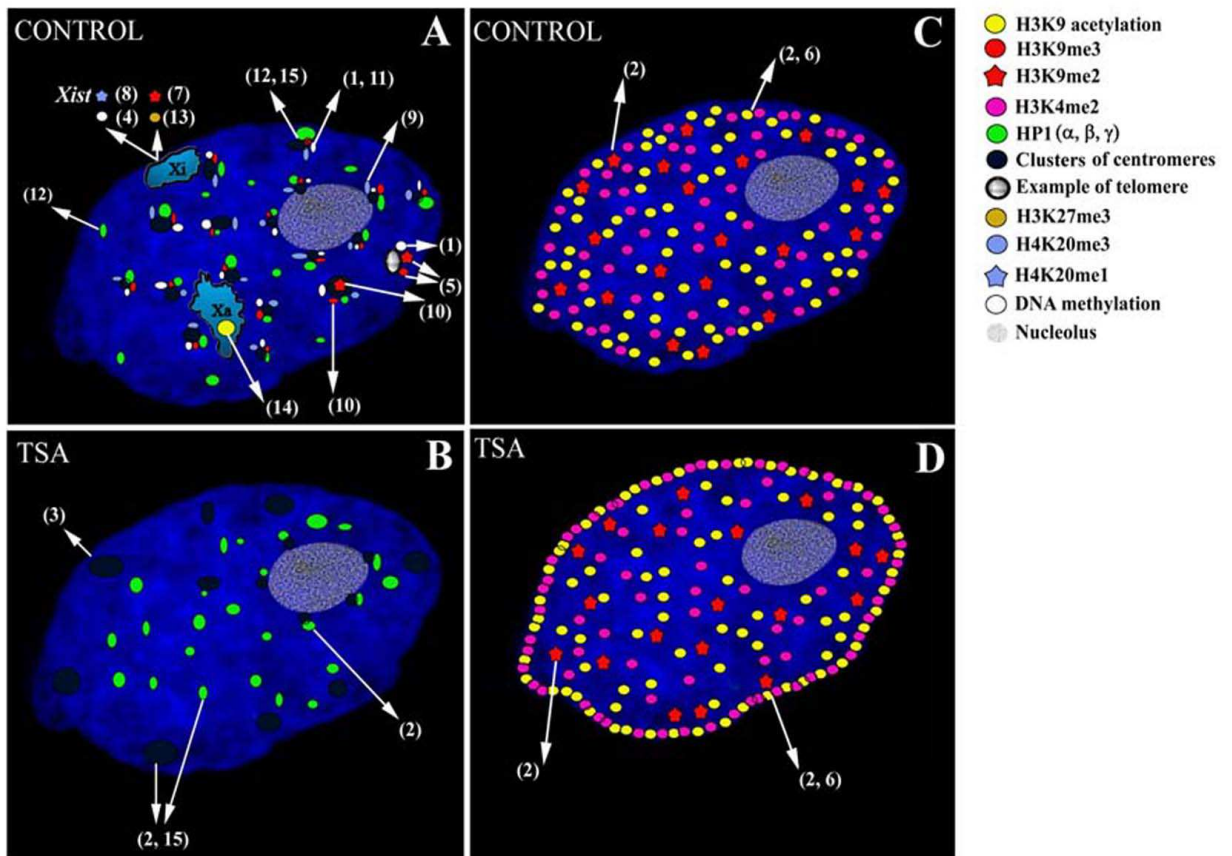


**Obrázek 14**

Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleozóm, který se skládá z oktameru histonů H2A, H2B, H3 a H4 a dvouřetězcové DNA o velikosti 146 párů bází. Z každého nukleozómu vyčnívají N-terminální konce jednotlivých histonů, které mohou být specificky epigeneticky modifikovány. Na obrázku jsou uvedeny příklady nejčastějších epigenetických modifikací histonů transkripčně aktivního a neaktivního chromatinu a důležité proteiny regulující modifikace histonů a následně genovou expresi. V obrázku jsou použity zkratky H3K9Ac (acetylace); H3K4Me a H3K9Me (methylace histonů); HAT (histonové acetyltransferázy), HDAC (histonové deacetylázy); HMTs (histonové methyltransferázy); HP1 (heterochromatinový protein 1); pRb (retinoblastomový protein) a Me znamená DNA methylace. Převzato z Bártová et al. (2008c).

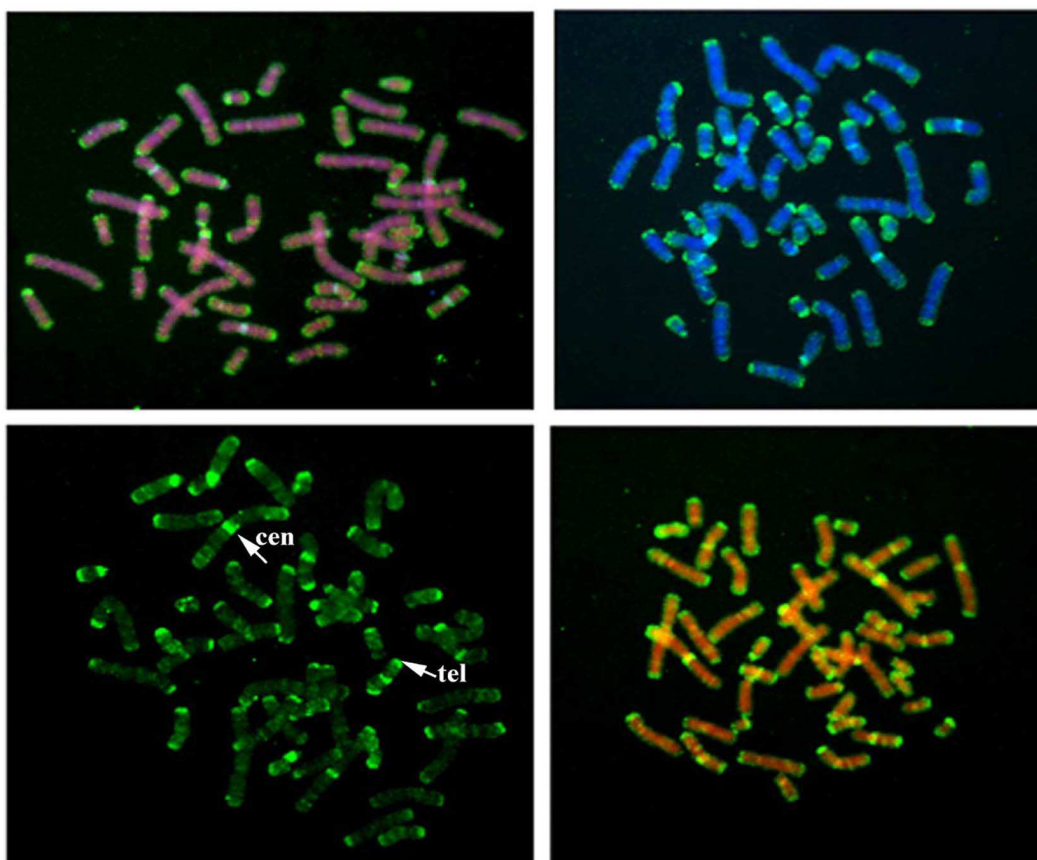
Velký význam z hlediska epigenetiky má methylace DNA, která byla popsána jako jeden z prvních epigeneckých znaků chromatinu. To ukazuje na fakt, že konstitutivní heterochromatin je obecně tvořen methylovanou DNA. Paralelně s touto modifikací se vyskytuje methylace H3K9, která rovněž představuje významný marker heterochromatinu. DNA methylace byla popsána jako faktor, který ovlivňuje klastrování centromer během buněčné diferenciaci (Brero et al., 2005). Kontroverzní se však jeví fakt, že například na geny bohatý lidský chromozóm 19 je silně DNA methylován, v porovnání s chromozómem 18, na kterém je mapováno jen málo genů (Barbin et al., 1994; Caron et al., 2001). V tomto případě by se čekalo opačné zastoupení DNA methylace na zmíněných chromozómech. Důvodem je specifické umístění těchto chromozómů v interfázních jádrech (Croft et al., 1999). Určité objasnění těchto záležitostí přinesli autoři Zinner et al. (2007), kteří publikovali shodnou H3K9 a H3K27 trimethylaci u obou chromozómů 18 a 19, avšak velmi zásadní byla přítomnost trimethylace H3K4, významně zastoupena u chromozómu 19. Zmíněné výsledky naznačují, že trimethylace H3K4 je zásadním epigenetickým znakem, jehož přítomnost silně koreluje s výskytem GC-bohatých oblastí ve vnitřních částech buněčných jader.

Epigenetické modifikace histonů a DNA methylace jsou rovněž rozhodující z hlediska inaktivace chromozómu X v genomu savců. Například dávková kompenzace exprese genů na jednom ze samičích X chromozómů je velmi intenzivně studovaným tématem buněčné biologie (Heard et al., 1997; 2001; Park a Kuroda, 2001). Inaktivní chromozóm X může být rozpoznán od jeho transkripčně aktivního homologu tím, že jsou zde exprimovány pouze geny (*Xist*), v takzvaném X inaktivačním centru (*Xic*). Nekódující *Xist* RNA obklopují celý chromozóm X, což způsobuje jeho transkripční utlumení. Tento proces je doprovázen mnoha změnami na úrovni chromatinu, jako je přítomnost varianty histonu H2A, takzvané macroH2A, přítomnost DNA methylace, či zvýšená H3K27me3 (Hall a Lawrence 2003; Obr. 15A). H4K20me1 a H3K27me3 (Obr. 15A) jsou navíc silně asociovány s *Xist* expresí, tudíž představují hlavní znak iniciace inaktivace chromozómu X (Kohlmaier et al., 2004; Obr. 15A). Pro inaktivní X chromozóm je dále charakteristická pozdní replikace, CpG methylace a H4 hypoacetylace (Czankovszki et al., 2001). Navíc H3K27 methylace a ubiquitinace H2A jsou asociovány s přechodnou aktivací *Polycomb group* proteinových komplexů (PcG), což představuje první iniciační krok v inaktivaci chromozómu X (Martin a Zhang 2005).



### Obrázek 15

Znázornění jaderné distribuce vybraných modifikací histonů a asociovaných proteinů jako je HP1 a dále struktury genomu, například centromery, telomery, a transkripčně aktivní a neaktivní X chromozómy u normálních buněk (A, C) a buněk ovlivněných HDACi, jako je TSA (B, D). Panel A znázorňuje epigenetické profily centromer, telomer a chromozómů X u neovlivněných buněk. Z technických důvodů je uveden pouze jeden příklad H3K9me2 v centromerické oblasti (číslo 10). To samé platí pro telomerickou oblast, znázorněnou na panelu A (čísla 1 a 5). Panel B ukazuje jadernou redistribuci centromerických klastrů a proteinů HP1 u buněk ovlivněných TSA. Panel C dokumentuje jadernou distribuci H3K9 acetylce, H3K9 dimethylce a H3K4 dimethylce u neovlivněných buněk. Panel D ukazuje na distribuci H3K9 acetylce, H3K9 dimethylce, a H3K4 dimethylce u buněk ovlivněných TSA. Uvedené panely byly sestaveny na základě následujících článků: 1) Barbin et al. (1994); 2) Bártová et al. (2005a); 3) Bártová et al. (2007); 4) Czankovszki et al. (2001); 5) García-Cao et al. (2004); 6) Gilchrist et al. (2004); 7) Khalil a Driscoll (2006); 8) Kohlmaier et al. (2004); 9) Kourmouli et al. (2004); 10) Lachner et al. (2003); 11) Lehnertz et al. (2003); 12) Minc et al. (1999); (2000); (2001); 13) Rouquelle et al. (2004); 14) například Skaniková et al. (2007) nebo Keohane et al. (1996); 15) Taddei et al. (2001). Převzato z Bártová et al. (2008c).



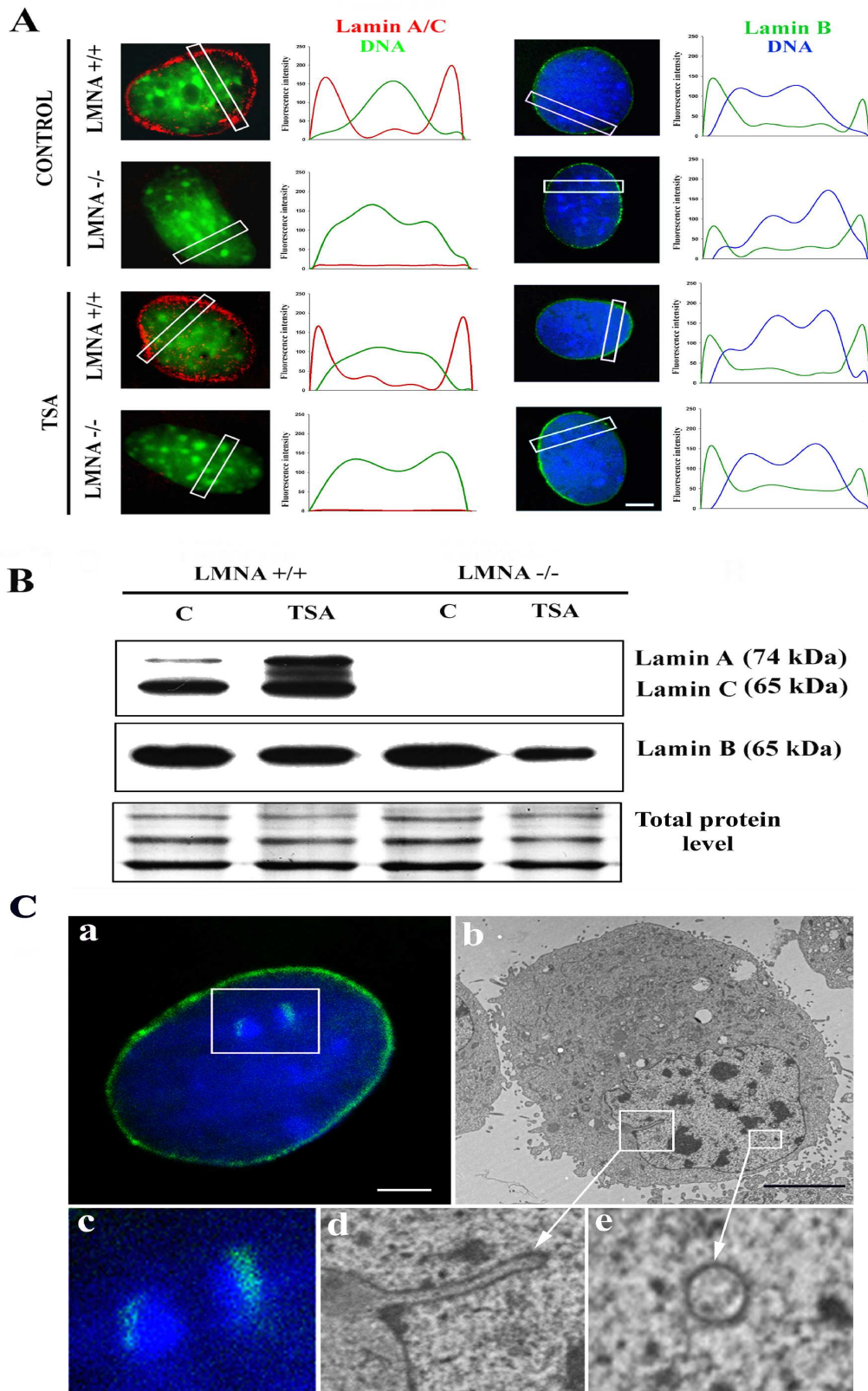
**Obrázek 16**

*Ukázka distribuce methylace DNA (zeleně) na jednotlivých metafázních chromozómech G0-lymfocytů periferní krve. Nejvyšší stupeň methylace byl pozorován v oblasti centromer a telomer (šipky).*

## **2.7. Vliv proteinů intermediálních filament na strukturu genomu a epigenomu**

Chromatin je vzájemně spojen s jadernou slupkou, takzvanou laminou. Tato vzájemná interakce určuje organizaci chromatinu vyššího řádu. Jaderná slupka, která odděluje jádro od cytoplasmy, se skládá z vnější a vnitřní jaderné membrány, které jsou od sebe oddělené meziprostorem. Důležitá je rovněž funkce jaderných pórů, které zajišťují transport různých molekul v obou směrech. Všechny zmíněné jaderné komponenty jsou důležité především z hlediska udržení tvaru buněčného jádra, kondenzace a uspořádání chromatinu (Schirmer a Foisner 2007). Za hlavní komponenty jaderné laminy jsou považovány laminy typu A a B, které tvoří podpůrnou síť podél vnitřní části jaderné membrány. Bylo zjištěno, že laminy typu A (lamin A a C) tvoří funkční komplexy s polynukleozómy, histony a DNA, bez ohledu na specificitu sekvencí (Dorner et al., 2007; Lattanzi et al., 2007). Navíc polypeptidy asociované s laminy (LAPs) hrají důležitou úlohu z hlediska

modifikací histonů, organizace chromatinu a genové exprese (Shirmer a Foiser 2007). Funkční závislost mezi histonovým kódem a laminy typu A byla poprvé navržena v práci Taniura et al. (1995), avšak vztah laminů k epigenetickým modifikacím histonů byl popsán teprve nedávno (Filesi et al., 2005; Scaffidi a Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006; Lattanzi et al., 2007). Scaffidi a Misteli (2006) publikovali, že hlavní znaky heterochromatinu, jako je methylace H3K9 a protein HP1 jsou redukovány u Hutchinson-Gilford Progeria Syndromu (HGPS), což je onemocnění asociované s mutacemi v genu, který kóduje laminy A a C, vznikající alternativním sestřihem. Navíc u buněk HGPS bylo zjištěno snížení H3K27me3 na inaktivním chromozómu X, zatímco pro laminopathie je charakteristická zvýšená H4K20me3 (Shumaker et al., 2006). Dekondenzace heterochromatinu, způsobená absencí laminů typu A, je často doprovázena změnami v jaderném uspořádání, což vede k disociaci proteinu HP1 a ke změnám v methylaci H3K9. Podobně HDACi způsobovaly dekonenzaci chromatinu a redistribuci epigenetických modifikací histonů a HP1 proteinů (Bártová et al., 2005a; Taddei et al., 2001). Působení HDACi u buněk deficientních na laminy typu A navíc ukázalo, že HDACi kompenzují a nebo umocňují efekty nepřítomnosti laminů typu A na strukturu chromatinu (Galiová et al., 2008). Tento jev byl pozorován na úrovni kondenzace chromozomálních teritorií a na příkladu jaderné redistribuce proteinů HP1 (Galiová et al., 2008). Jak je zřejmé z Obr. 17, laminy typu A i B jsou lokalizovány na jaderné periferii, ale jejich přítomnost byla rovněž zjištěna uvnitř buněčného jádra (Obr. 17C) (Constantinescu et al., 2006; Dorner et al., 2007). Tento jev byl vysvětlen na základě pozorování pomocí elektronového mikroskopu. Ukázalo se, že invaginace částí jaderné membrány do jaderného středu (Obr. 17C; Fricker et al., 1997) je zodpovědná za přítomnost laminů v tomto kompartmentu. Tyto experimenty naznačují, že laminy vyskytující se na jaderné periferii i uvnitř buněčného jádra, hrají důležitou úlohu v regulaci struktury chromatinu. Navíc existuje významný vztah mezi laminopathiemi a histonovým kódem (Filesi et al., 2005; Scaffidi a Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006; Lattanzi et al., 2007).



**Obrázek 17**

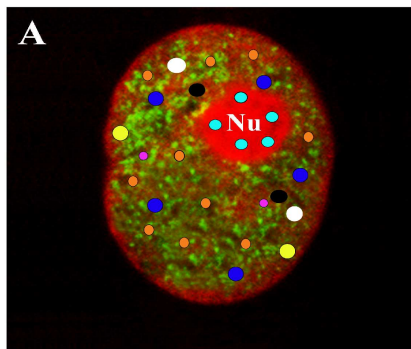
(A) Distribuce laminu A/C a laminu B u normálních (LMNA+/+) a lamin A/C deficientních (LMNA -/-) buněk. (B) Ty samé buňky byly testovány pomocí western blotů na přítomnost nebo absenci laminů typu A a dále byla testována možná apoptická fragmentace laminu B po působení TSA. (C) Porovnání přítomnosti laminu B v jaderném středu (konfokální mikroskopie) s invaginací jaderné membrány (transmisní elektronová mikroskopie; TEM). Měřítko představuje 1 $\mu$ m.

## 2.8. Struktura chromatinu nádorových buněk

Nádorové buňky jsou charakteristické nekontrolovanou proliferací, změněnou diferenciací a sníženou schopností indukovat apoptózu. Na úrovni genomu lze pozorovat řadu chromozomálních přestaveb a aneuploidií, které jsou doprovázeny změnami v epigenetických modifikacích histonů i DNA. Podobně je možné pozorovat zvýšení počtu jadérek a PML tělísek (Obr. 18). Nádorové buňky jsou charakteristické globální DNA hypomethylací, která je doprovázena hypermethylací v promotorech nádorově supresorových genů (Weber et al., 2005). Změny v celkové DNA methylaci u nádorových buněk byly poprvé popsány v publikacích Feinberg a Vogelstein (1983a; 1983b). To bylo následně vztaženo k faktu, že tyto změny hrají důležitou úlohu v destabilizaci chromozómů, což je silně spojeno s nádorovou transformací buněk (Yoder et al., 1997; Deng et al., 2002). V části našich experimentů jsme se rovněž zabývali změnami ve struktuře chromatinu nádorových buněk. V práci Taslerová et al. (2003) a (2006) jsme zjistili, že geny zahrnuté v translokaci jsou umístěny ve střední vzdálenosti jejich původních sekvencí. Na druhou stranu aneuploidie nemění radiální distribuci genetických elementů (Koutná et al., 2000; Finch et al., 2008). Radiální uspořádání vybraných genových lokusů se však měnilo po ozáření buněk gama zářením. V tomto případě docházelo dvě hodiny po ozáření ke vzájemnému přiblížení genů (například TP53), což bylo po delším časovém intervalu uvedeno do původního stavu (Jirsová et al., 2001; Bártová et al., 2003b). Mechanismy strukturální regulace odpovědi buňky na gama záření nejsou přesně známy, každopádně měly by být vztaženy k reparačním procesům v DNA (Dolling et al., 1997). Je známo, že reparační procesy probíhají na úrovni dvou sousedních dvouřetězcových zlomů, převážně v chromatinu o vysokém stupni dekondenzace (Falk et al., 2007). Navíc, tento poškozený chromatin je charakteristický přítomností H4K5 acetylace a sníženou H3K9me2. Při studiu chromatinu poškozeného zářením bylo zjištěno, že fosforylovaný histon  $\gamma$ -H2AX je důležitým markerem pro rozpoznávání dvouřetězcových zlomů DNA (DSBs) (Karlsson a Stenerlöw 2004). Současné studie odhalily, že nejenom fosforylovaný  $\gamma$ -H2AX, ale také protein 1, který váže nádorový supresor p53 (53BP1), kolokalizují s radiací indukovanými DSBs (DiTullio et al., 2002), což bylo popsáno jako na dávce závislý mechanismus (Marková et al., 2007). Všechny tyto experimenty ukazují, že tvorba DSB hraje důležitou úlohu v regulaci stability genomu. V případě chybné reparace to vede k tvorbě prekancerózních

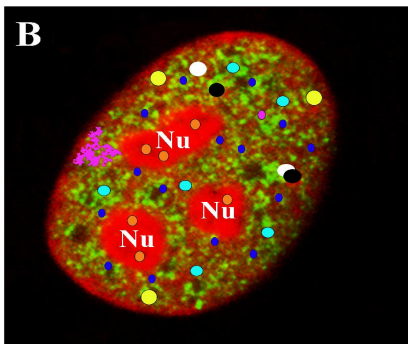


### Normal Cell Nucleus



- Nucleolus
- PML bodies
- Protooncogene
- Epigenetic modifications
- Locus I
- Locus II
- Locus III
- Oncoproteins
- BRCA1 foci

### Tumour Cell Nucleus



### Obrázek 18

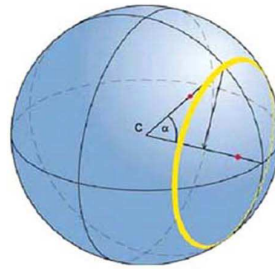
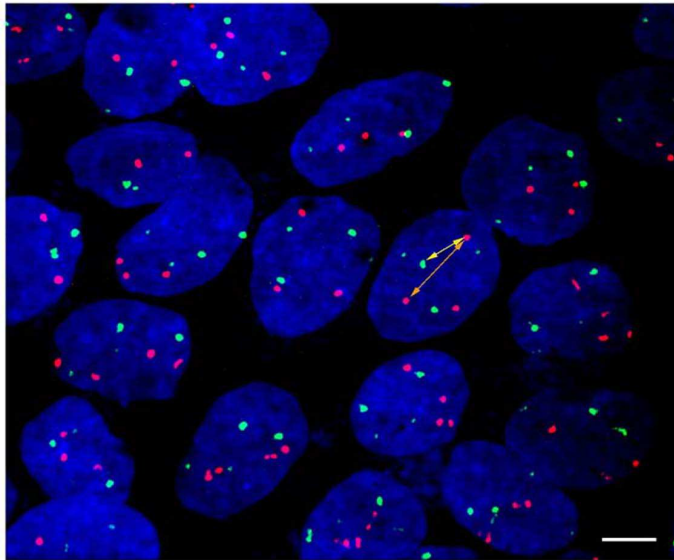
*Distribuce vybraných struktur buněčného jádra u normální a nádorové buňky. Byly vybrány následující struktury: jadérka, PML tělíska, obecně proto-onkogeny, obecně lokusy, onkoproteiny a specifický protein BRCA1. Převzato z Bártová et al. (2008d).*

lézí, k mutacím v nádorově supresorových genech jako je TP53 a následně k nádorové transformaci buněk (Halozonetis et al., 2008). Důsledkem vzniku DSBs a jejich chybné opravy je pravděpodobně vznik translokací chromozómů (Soutoglou a Misteli, 2007; Abdel-Halim et al., 2004; 2006). Z výše uvedených důvodů se zdá být velmi pravděpodobné, že vzájemná vzdálenost mezi jednotlivými dvouřetězcovými zlomy v rámci interfázních jader vede k zvýšené četnosti výskytu chromozomálních translokací (Kozubek et al., 1997; Soutoglou et al., 2007). Z hlediska vzniku chromozomálních přestaveb a jejich reparace je důležitá mobilita chromatinu, kdy především lokální difúze a na druhou stranu imobilita chromatinu rozhoduje o iniciaci opravných procesů na úrovni DNA, což významně ovlivňuje stabilitu genomu (Soutoglou a Misteli, 2007; Soutoglou et al., 2007). Z hlediska translokací chromozómů byl popsán i jejich funkční význam. U buněk mnohočetného myelomu bylo například zjištěno, že translokace genů CCND1/IgH pravděpodobně způsobuje zvýšenou expresi genu CCND1 (Pruneri et al., 2000). Na druhou stranu t(13;X) pravděpodobně způsobila sníženou expresi genu Rb1 u buněk pacienta s diagnostikovaným retinoblastomem (Bártová et al., 2003b). Všechna zmíněná cytogenetická pozorování i studium radiálních distribucí chromozómů vedou k závěru, že experimenty řešící tuto problematiku jsou zásadní z hlediska jejich potenciálních aplikací v klinické praxi. Například

testování vlivu cytostatik na histonový kód nebo na expresi genů pomocí širokospektrálních genomových analýz, jako jsou “array” technologie, vede k zlepšení diagnostických a léčebných postupů v klinické praxi. Problematika struktury chromatinu a epigenetických změn u nádorových buněk je popsána v review přijatého do časopisu “Cardiovascular and Hematological Disorders-Drug Targets (Bártová et al., 2008d) .

## **2.9. Kvantitativní analýza struktur buněčného jádra**

Velkou úlohu při studiu struktury chromatinu hraje kvantitativní analýza jaderných elementů, ať už to jsou sekvence DNA nebo jednotlivé proteiny. Pro přesnou analýzu obrazu je nutné získat kvalitní data, která kvantitativní analýza dokáže vhodně interpretovat. Velkým přínosem v tomto ohledu jsou fluorescenční *in situ* a *in vivo* metody, které v kombinaci s konfokální mikroskopií umožňují studium dvou- a tří-rozměrně fixovaných buněk. V ideálním případě, při využití GFP konjugovaných vektorů (GFP; “Green Fluorescence Protein”), je možné studovat vybrané proteiny u živých buněk a tímto způsobem analyzovat jejich dynamické změny v čase (například Cheutin et al., 2003; Ondřej et al., 2006). Vizualizace endogenních faktorů *in vivo* nepodléhá artefaktům, které mohou nastat během fixace a zpracování buněk při FISH technice a nebo imunofluorescenčním barvení. Na druhou stranu transfekce plasmidové DNA a exprese GFP pod silným promotorem jsou buňkami tolerovány jen s určitými obtížemi, což se odráží v životaschopnosti transfekovaných buněk a v úspěšnosti transfekce. Při analýze takto zpracovaných vzorků, musí být tolerována jistá divergence mezi jednotlivými preparáty. Rovněž musí být přihlédnuto k různorodosti jednotlivých jaderných struktur, které se liší morfologií, objemem, tvarem a uspořádáním v jádře (Obr. 19 a 20). Vizualizace konkrétních proteinů pomocí imunofluorescence vyžaduje několik základních kroků, jako je fixace a permeabilizace buněk. Je známo, že některé jaderné kompartmenty jako Cajalova tělíčka nebo jaderné skvrny jsou velmi tolerantní k řadě metodologických přístupů, zatímco pro RNAP II bylo zjištěno, že je velmi senzitivní k experimentálním podmínkám (Shiels et al., 2001). Rovněž RNA-FISH vyžaduje velmi pečlivé zpracování biologického materiálu (Levsky et al., 2002; Harničarová et al., 2006; Bártová et al., 2008b; Efroni et al., 2008). Vizualizace chromozómů v rámci interfázních jader nebo genů v rámci chromozomálních teritorií pomocí DNA-FISH, je ovlivněna denaturací cílových sekvencí DNA. Denaturace



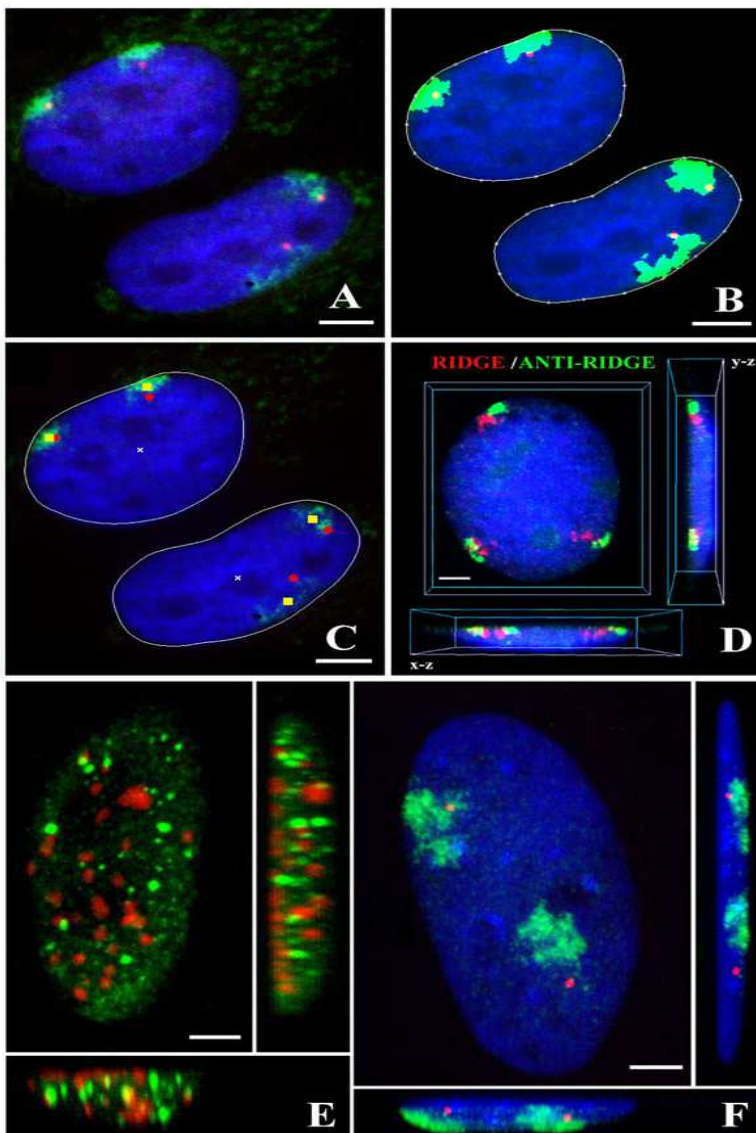
$$SS = \frac{\overline{R_1 R_2}}{(\overline{CH_1} + \overline{CH_2}) / 2} * 100$$

$$\cos(\alpha) = \frac{\overline{CR_1} * \overline{CR_2}}{|\overline{CR_1}| * |\overline{CR_2}|}$$

$$CS = \frac{\overline{CR_i}}{\overline{CH_i}} * 100$$

**Obrázek 19**

Ukázka zobrazení vybraných centromer chromozómů 10 a 12 u buněk HaCaT a příklad výpočtu radiální distribuce vybraných genetických elementů. První rovnice je nutná k výpočtu vzdálenosti mezi homologními lokusy (SS), druhá rovnice počítá úhel ( $\cos(\alpha)$ ) mezi lokusy a třetí rovnice stanovuje vzdálenost mezi těžištěm jádra a lokusem (CS).



**Obrázek 20**

(A) Ukázka konfokálního obrazu chromozomálních teritorií (zeleně) a v nich umístěných genů (červeně). (B) Analýza zmíněných oblastí genomu. (C) Softwarové určení těžiště jednotlivých genetických elementů. (D) Příklad 3D-projekce interfázního jádra s RIDGE (červeně) a anti-RIDGE (zeleně) oblastmi u buněk HT29 (podle Bártová a Kozubek 2006). (E) 3D-distribuce proteinů HP1 $\alpha$  (červeně) a HP1 $\beta$  (zeleně). Převzato z Bártová et al. (2007). (F) Ukázka 3D-distribuce chromozómu 11 (zeleně) a genu CCND1 (červeně). Převzato z Bártová a Kozubek (2006).

DNA významně ovlivňuje studované struktury chromatinu. V tomto případě je rovněž důležitá úspěšnost hybridizace DNA sondy k cílovým místům DNA. To je zásadní například z hlediska prahování chromozomálních teritorií při analýze obrazu (Kozubek M. et al., 1999; 2000). Existují dva základní přístupy DNA fluorescenční *in situ* hybridizace, buď se využívá 2D-fixace buněk v hypotonickém roztoku směsi methanolu a kyseliny octové, což způsobuje zvětšení poloměru jádra z důvodů zploštění buněk. Druhým přístupem je 3D-fixace pomocí paraformaldehydu, která zajišťuje zachování prostorového uspořádání interfázních jader (Kozubek S. et al., 2000). Na rozdíl od DNA FISH techniky, vyžadující denaturační krok, RNA-FISH a imunofluorescence u buněk fixovaných paraformaldehydem zachovávají trojrozměrnou strukturu interfázních jader (Bártová et al., 2008b). Tyto metody umožňují studium přesné radiální distribuce vybraných jaderných struktur (Obr. 19 a 20). Hodnocení radiálních vzdáleností mezi těžištěm buněčného jádra a daným lokusem nebo mezi jednotlivými homologními a heterologními genetickými elementy bylo zavedeno v naší laboratoři (Kozubek S. et al., 1997; Kozubek M. et al., 1999; Obr. 19). Ve spolupráci s kolegy z Fakulty informatiky MU Brno byl vytvořen program FISH 2.0 který umožňuje snímání a obrazovou analýzu jednotlivých genetických elementů. Po spuštění programu je možné nastavit režim snímání pomocí konfokálního mikroskopu a dále stanovit počet konfokálních řezů a vzdálenost v mikrometrech mezi jednotlivými řezy. V dalším módu je možné nastavit intenzitu fluorescence a nebo práh fluorescence pozadí. Program FISH umožňuje snímání biologických objektů v několika režimech a to 2D, 3D a snímání živých buněk exprimujících GFP. Parametry pro analýzu obrazu můžeme přesně stanovit, můžeme určit práh pro analýzu buněčných jader, intenzitu fluorescence studovaných struktur, dále například plochu chromozomálních teritorií. Program disponuje rovněž módem manuální segmentace, kdy okraje jádra mohou být vizuálně stanovené experimentátorem. Hledání bodů v rámci interfázních jader probíhá automaticky, s tím, že následně proběhne manuální selekce vybraných bodů (Obr. 20). Informace o radiálních distribucích jednotlivých genetických elementů jsou zapisovány do textového souboru a mohou být exportovány do vybraného statistického programu pro další analýzu. Dalším velmi přínosným programem pro naše experimenty je Acquarium software, který představuje novou generace programu FISH 2.0 (autoři Pavel a Petr Matulovi, Fakulta Informatiky MU, Brno). Tento program umožňuje získání velkého množství dat za velmi krátký časový interval. Pro prostorovou vizualizaci

biologických objektů rovněž používáme ANDOR iQ software (ANDOR, Technology), který byl zakoupen do naší laboratoře společně s novou kamerou s vysokým rozlišením.

### 3. Metodická část

Uvedené metodiky byly z velké části samostatně zvládnuty autorkou disertační práce, která je předala několika zaměstnancům a PGS studentů v Laboratoři molekulární cytologie a cytometrie BFÚ v Brně.

#### 3.1. Kultivace a diferenciaci buněk

V práci a přiložených publikacích jsou uvedeny experimenty, které se zabývají biologií řady buněčných linií i somatických buněk. *In vitro* byly studovány jak adherentní, tak suspenzní buněčné linie, které byly kultivovány ve vhodných médiích a dále pasážovány, diferencovány a ovlivněny různými činidly tak, jak je uvedeno v přiložených publikacích. Většinou jsme jako diferenciační činidlo používali kyselinu *all-trans* retinovou (RA), phorbol-12-myristát-13-acetát (PMA), interleukin 3 (IL-3) nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Pro kultivaci suspenzních, převážně leukemických nebo myelomových linií, bylo použito médium RPMI-1640 s 10 % (20 %) fetálního telecího séra. Adherentní linie se většinou kultivovali v D-MEM s 10 % fetálního telecího séra. V posledních dvou letech jsme se v naší laboratoři začali zabývat studiem struktury chromatinu lidských embryonálních kmenových buněk, které se kultivují na výživné vrstvě myších embryonálních fibroblastů (MEFs). Myší embryonální fibroblasty, izolované v naší laboratoři z myšího kmene ICR, byly kultivovány v médiu D-MEM s 10 % fetálního telecího séra, 500 U/ml penicilinu, 5 mg/ml streptomycinu, na miskách pokrytých 0,1% želatinou. Po dosažení požadované hustoty buněk byl k fibroblastům přidán mitomycin C (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Německo) po dobu 3 hodin. To bylo nutné k zastavení proliferační aktivity buněk. Poté následovalo důkladné promytí roztokem PBS a na vrstvu MEF buněk byly vysety lidské ES buňky. Kultivace lidských ES buněk probíhala v kompletním médiu KO-DMEM (Invitrogen Gibco), pro ES buňky obsahovalo 500 U/ml penicilinu, 5 mg/ml streptomycinu, 200 mM Glutamaxu (Invitrogen Gibco), 200 mM NEEA (“non-essential amino acids, PAN), β-merkaptetanolu (Invitrogen Gibco) a KO-serum replacement (Invitrogen Gibco). Dále byl do média přidán bFGF o konečné koncentraci 10 ng/ml (“Fibroblast Growth Factor”, Invitrogen) a faktor hLIF

o konečné koncentraci 12 ng/ml (“Leukaemia Inhibitory Factor”, Chemicon International), které zabraňují diferenciaci hESCs. Je známo, že LIF faktor se používá k udržení pluripotence myších embryonálních kmenových buněk (mESCs), ale kultivační protokol z laboratoře Prof. D. Meltona (Harvard University) doporučuje použití LIF faktoru i u hESCs. V případě kultivace hESCs je třeba buňkám vyměňovat médium každý den a k jejich pasážování se používá buď 0,05% trypsin a nebo vypichování kolonií kmenových buněk. Pro indukci diferenciaci, byla k buňkám přidána 2  $\mu$ M kyselina retinová (“*all-trans* retinoic acid”, RA, Sigma Aldrich) po dobu 4 dní. Při každé výměně kultivačního média byla RA znovu přidána a 4. den byly buňky fixovány na krycí sklíčka pro DNA a RNA hybridizaci nebo byly lyzovány pro western bloty a izolaci RNA v příslušných pufrech. Kultivace všech buněk probíhala vždy při standardních podmínkách, tj. při teplotě 37° C a ve zvlhčené atmosféře s 5% obsahem CO<sub>2</sub>.

### **3.2. Imunofluorescenční značení interfázních jader**

Pro 3D analýzy byly buňky fixovány po dobu 10 minut pomocí 4% paraformaldehydu, pak následovala permeabilizace buněk 8 minut roztokem 0,1% Tritonu X-100 v PBS a 12 minut v roztoku 0,1% saponinu (Sigma-Aldrich, Germany) při pokojové teplotě (PT). Poté byly preparáty opláchnuty 2x po 15 minutách v PBS a inkubovány v 1% BSA přibližně 1 hodinu, rovněž při pokojové teplotě. Poté byl preparát propláchnut v PBS a byly nanесeny příslušné primární protilátky naředěné většinou v poměru 1:200 v 1% BSA. Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc při 4°C. Příklady některých použitých protilátek jsou následující: anti-HP1 $\alpha$  (klon 15.19s2; Upstate, USA), anti-HP1 $\beta$  (Upstate, USA), anti-HP1 $\gamma$  (klon 42s2, Upstate, USA), anti-SC35 (#ab11826 Abcam, Velká Británie), anti-CENP-A (#ab13939, Abcam, Velká Británie), anti-PML (#ab6263, Abcam, Velká Británie), anti-TIF1 $\beta$  (C-16) (sc-19168, Santa Cruz, USA), anti-Oct-3/4 (C-10) (sc-5279, Santa Cruz, USA) a další. Po inkubaci s primární protilátkou byly preparáty promyty 2x po 5 minutách v PBS a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s vhodným fluorochromem (ředění bylo většinou 1:200 v 1% BSA). Použily jsme následující sekundární protilátky: anti-rabbit IgG-FITC (#F9887, Sigma, Německo), donkey anti-goat IgG-FITC (#sc-2024, Santa Cruz, USA), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (#A11005, Molecular Probes, Invitrogen, KRD Ltd., Česká

Republika). Nabarvené preparáty byly nakonec promyty 3x po 5 minutách v PBS a celková DNA byly obarvena TO-PRO-3 (R)-3 jodidem (0,04 µg/ml, Invitrogen, USA). Všechny preparáty byly pozorovány, snímány a hodnoceny pomocí konfokálního mikroskopu.

### **3.3. Izolace DNA z BAC/PAC klonů a “nick” translace**

DNA z BAC/PAC klonů byla izolována pomocí QIAGEN Large Construct kitu. Purifikované DNA fragmenty byly značeny pomocí DIG- nebo BIOTIN-Nick Translačního Mixu (Roche, Germany). Podle protokolu, každý 20.-25. nukleotid byl modifikován pomocí DIGOXIGENIN-11-dUTP nebo BIOTIN-16-dUTP v nově syntetizované DNA. Velikost fragmentů značené DNA byla v rozmezí 200-500 nucleotidů. Pro “nick” translaci jsme použili 1 µg DNA, která byla rozpuštěná v destilované vodě o konečném objemu 16 µl. K tomuto objemu byly přidány 4 µl DIG- nebo BIOTIN-Nick translačního mixu. Vzorky byly inkubovány při 15° C po dobu 90 min. Reakce byla zastavena přidáním 1 µl 0,5M EDTA a zahřátím na 65° C na 10 min. V dalším kroku byla aplikována lidská Cot-1 DNA (Roche), pomocí níž je eliminována hybridizace sond k repetitivním elementům. V reakcích jsme použili 120 ng DIG- nebo BIOTIN-značené DNA, 6 µg Cot-1 DNA a “salmon sperm” DNA, která byla přidána pro získání celkového množství 20 µg DNA. Pak byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2 objemy chlazeného 96% ethanolu (-20° C). Inkubace probíhala při -70° C, po dobu 30 min. Pak byly vzorky centrifugovány při 12 000 rpm po dobu 15 min a pelet byl pak opláchnut 400 µl 70% ethanolu (-20° C). Následně byl pelet lyofilizován a rozpuštěn ve 20 µl hybridizačního pufru (Hybrizol VII, Oncor, USA).

### **3.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

Buňky byly fixovány stejným způsobem jako při imunofluorescenčním barvení a pak následovala jejich permeabilizace po dobu 15 minut v 0,1M HCl s 0,2% Tritonem X-100 v PBS (pH 7.2), pak 10 minut v 0,1M roztoku Tris a 15 minut v 0,2% saponinu (Sigma-Aldrich, Německo). Dále byly buňky opláchnuty v 1xPBS 3x2 minuty a ekvibrace probíhala po dobu 20 minut ve 20% glycerolu. Sklíčka s buňkami byla 3x ponořena do tekutého dusíku a buňky byly dehydratovány po 2 minutách v ethanolové

řadě. Cílová DNA byla denaturována 15 minut v 50% formamidu při teplotě 80° C. Pak následovala dehydratace po 2 minutách v ethanolové řadě roztoků o koncentracích 70 %, 80 % a 96 % (-20° C). Denaturace sond probíhala po dobu 10 minut při 75° C a “annealing” byl 15-30 minut při 37° C. Připravené denaturované DNA sondy byly naneseny na preparáty a inkubovány přes noc při 37° C ve vlhké komůrce. Celochromozomové sondy byly zakoupeny od firmy Cambio (Velká Británie). Sondy pro jednotlivé genové lokusy byly většinou připraveny v naší laboratoři z BAC a PAC klonů podle Harničarová et al. (2006). Komerční translokační sondy pro geny PML/RAR $\alpha$  (LPH 004) nebo lokusy BCR/ABL byly dodány firmou Cytocell Technologies (Velká Británie) nebo Oncor (USA). Komerční sondy byly denaturovány podle přiloženého protokolu. V další fázi experimentů byly preparáty promývány po dobu 15 minut v 50% roztoku formamidu a 8 minut v roztoku 0,1% Tweenu ve 2xSSC při 43° C ve vodní třepací lázni. Pak následovalo opláchnutí preparátů v 0,2% Igepalu, který byl rozpuštěný ve 4xSSC. Inkubace probíhala 4 minuty při pokojové teplotě. Tímto krokem končí postup promývání sondy, která je přímo fluorescenčně značená. Na nepřímo značenou sondu, například diogoxigeninem nebo biotinem, se pak aplikuje příslušná protilátka, která je konjugovaná s fluorochromem, jako je například FITC-Avidin (Roche, Německo) nebo Rhodamin-anti-digoxygenin (Roche, Německo). Dalším krokem DNA FISH techniky je inkubace buněk s touto protilátkou po dobu 15 minut při 37° C ve vlhké komůrce. Přebytečná nenavázaná protilátka se následně vymyje 3x po 4 minutách v roztoku 4xSSC při 37° C ve vodní lázni. Dále se preparát omyje ve 4xSSC po dobu 4 minut při pokojové teplotě. Buněčná jádra se obarví buď DAPI (0,2  $\mu$ g/ml) v roztoku Vectashield (Vector Laboratories, USA) nebo pomocí TO-PRO-3 jodidu (0,04  $\mu$ g/ml, Molecular Probes, Invitrogen). Analýza preparátů byla opět provedena konfokální mikroskopií.

### **3.5. RNA-FISH**

Jaderná lokalizace genových traskriptů c-myc byla studována v práci Harničarová et al. (2006) a Bártová et al. (2008b) pomocí metody RNA-FISH (Levsky et al., 2002; Wilson et al., 2002). V těchto experimentech jsme použili biotinem značenou 50-mer oligonukleotidovou sondu, jejíž sekvence byly popsány v práci Levsky et al. (2002).



Oligonukleotidové sondy byly cílené na úsek exonu II a exonu III genu c-myc a jejich sekvence jsou uvedeny na webových stránkách: <http://singerlab.aecom.yu.edu> a rovněž publikovány v práci Harničarová et al. (2006). Sekvence sond jsou následující: 1) 5'-TCG T\*AG TCG AGG T\*CA TAG TTC CT\*G TTG GTG AAG CT\*A ACG TT\*G AGG GGC AT-3'; 2) 5'-CCA CAT\* ACA GTC CTG GAT\* GAT GAT GTT TT\*T GAT GAA GGT\* CTC GTC GT\*C CG-3'; 3) 5'-TGA CCT\* TTT GCC AGG AGC CT\*G CCT CTT TT\*C CAC AGA AAC AAC AT\*C GAT\* TT-3'; 4) 5'-CTG GT\*G CAT TTT CGG T\*TG TTG CTG AT\*C TGT CTC AGG ACT\* CTG ACA CT\*G TC-3'; 5) 5'-GGC CTT\* TTC ATT\* GTT TT\*C CAA CTC CGG GAT\* CTG GT\*C ACG CAG GGC AAA AA-3'. (hvězdička značí inkorporovaný biotin). Všechny roztoky pro RNA-FISH byly připraveny v 2x destilované vodě s rozpuštěným diethylpyrocarbonatem (DEPC) (Harničarová et al. 2006). Buňky, které rostly na krycích sklech byly opláchnuty v 1x PBS-MgCl<sub>2</sub> (PBS-M) a dále byly fixovány 10 min při pokojové teplotě ve 4% formaldehydu, který byl smíchan s 10 % kyseliny octové, což zvyšovalo pravděpodobnost detekce jaderné RNA. Permeabilizace byla provedena v 0,5% Tritonu X100 po dobu 5 min na ledu. Pak byla buněčná jádra permeabilizována v 0,1% saponinu, po dobu 10 min. Dále byly preparáty opláchnuty 3x5 min in PBS-M a 5 min v 2xSSC při pokojové teplotě. Nakonec byly buňky permeabilizovány v 70% ethanolu přes noc při 4° C. Druhý den byly buňky rehydratovány 10 min při pokojové teplotě v PBS-M a dále denaturovány 10 min v 50% formamidu. Následně proběhla hybridizace po dobu 4 hodin při 37° C v 20 µl hybridizační směsi, která obsahovala: 10% dextran sulfát, 1 µg/µl tRNA v 2xSSC a 1 pmol/µl každého oligonukleotidu konjugovaného s biotinem. Po hybridizaci byly buňky opláchnuty 3x5 min v 4xSSC s 0,1% Tweenem 20, při pokojové teplotě a 20 min v 4xSSC s 0,1% Tweenem 20 a 3% BSA při PT. Následně byl aplikován FITC-konjugovaný avidin (Oncor, USA) po dobu 20 min při PT. Nakonec byly buňky propláchnuty 3x5 min v 4xSSC s 0,1% Tweenem. TO-PRO-3 iodid (0,04 µg/ml), rozpuštěný v 2xSSC, byl použit k vizualizaci interfázních jader. K ověření RNA FISH výsledků jsme použili ovlivnění buněk RNázou A (100 µg/ml), která byla přidána ke kontrolním buňkám 1 hodinu před hybridizací. Pak byly buňky opláchnuty 3x15 min při 42° C v 50% formamidu, který byl rozpuštěn ve 2xSSC (pH 7,0). Dále byly preparáty opláchnuty v 0,1xSSC (pH 7,0), 3x15 min při 60° C. V tomto

případě jsme nepozorovali žádné RNA-FISH signály. Stejně jako po působení 100 µg/ml  $\alpha$ -amanitinu, který je inhibítorem RNA polymerázy II.

### **3.6. Analýzy pomocí western blotů**

Buňky byly lyzovány pomocí SDS lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1% SDS; 10% glycerol) a poté sonikovány. Koncentrace proteinů byla určena pomocí DC Protein Assay kitu (Bio-Rad, Bio-Consult, Česká, Republika) a k lyzátům byla přidána směs bromofenolové modři (0,01 %) a 1 %  $\beta$ -merkapt ethanolu (poměr 1:1). Vzorek se povařil 5 minut ve vodě a vzorky jaderných proteinů o stejném množství (10 µg) a vhodné markery byly podrobeny SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu. Po přenesení proteinů na PVDF membránu (Immobilon-P, Sigma-Aldrich, Německo) byly proteiny detekovány příslušnými primárními a sekundárními protilátkami a vizualizovány pomocí systému ECL-Plus reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Česká Republika) podle přiloženého návodu. V experimentech uvedených v přílohách byly použity následující primární protilátky: anti-HP1 $\alpha$  (klon 15.19s2; #05-689, Upstate, USA), anti-HP1 $\beta$  (#07-333, Upstate, USA), anti-HP1 $\gamma$  (klon 42s2, #05-690, Upstate, USA), anti-SC35 (#ab11826, Abcam, Velká Británie), anti-CENP-A (#ab13939, Abcam, Velká Británie), anti-PML (#ab6263, Abcam, Velká Británie), anti-TIF1 $\beta$  (C-16) (sc-19168, Santa Cruz, USA), anti-Oct-3/4 (C-10) (sc-5279, Santa Cruz, USA) a další. Následně byly použity sekundární protilátky: anti-rabbit IgG (#A4914, Sigma, Česká Republika), anti-goat IgG (#A4174, Sigma, Česká Republika), anti-mouse IgG (#A9044, Sigma, Česká Republika) a další.

### **3.7. Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie byla využita ke studiu změn v buněčném cyklu, které byly analyzovány především během diferenciaci a také ke stanovení různých specifických markerů diferenciaci, jako jsou povrchové antigeny na buněčných membránách. Pro stanovení buněčného cyklu byly buňky opláchnuty v PBS a fixovány po dobu 30 min v 70% ethanolu (-20° C). Po opakovaném promytí v PBS byla buněčná jádra značena propidium iodidem, který byl naředěný na koncentraci 10 µg/ml ve Vindelově roztoku

(1mM Tris-Cl, pH 8,0; 1 mM NaCl; 0,1% Triton X-100; 10 µg/ml RNaza A). Inkubace probíhala přibližně po dobu 30 min při 37° C. Profil buněčného cyklu a údaj o expresi povrchových antigenů byl získán pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson), který je vybavený argonovým laserem (488 nm). Průtokový cytometr je ovládán softwarem CellQuest a analýza dat byla provedena pomocí softwaru ModFit (Verity Software House, Topsham, USA).

### **3.8. Analýza a zpracování obrazu**

Obrazy fluorescenčně naznačených buněčných jader byly získávány pomocí konfokálního systému, který se skládá z epifluorescenčního mikroskopu Leica DMRXA (Leica, Německo), argon/kryptonového laseru (Innova 70, Coherent), akusticko-optického filtru (AOTF, Brimrose) pro volbu vlnové délky a konfokální jednotky (QLC 100; VisiTech International, UK). Skenovací systém je v naší laboratoři řízen softwarem FISH 2.0 (Kozubek et al., 1999), který je instalovaný na připojeném počítači. Obrazy jsou digitalizovány pomocí plně programovatelné digitální kamery CoolSnap CCD (Photometrix, Tucson, AZ). Zvětšení čoček objektivu je 100x, numerická apertura NA=1,3 a rozlišení je 15 pixelů na mikrometr. Adherentní buňky byly v našich experimentech většinou snímány ve 40 optických řezech a v případě imunobarvených buněk byla optimalizována intenzita fluorescence u kontrolních vzorků, což bylo pak použito k posouzení intenzity fluorescence u buněk experimentálních, například ovlivněných HDAC inhibitory nebo u buněk indukovaných k diferenciaci. Suspenzní buňky byly často snímány v 70 a více optických řezech, kdy jednotlivá vzdálenost mezi řezy byla 0,1-0,3 µm. Analýza obrazu byla provedena pomocí softwarů FISH 2.0 a Andor iQ a jaderně topografické parametry byly statisticky vyhodnocovány programem SigmaPlot 8.0 (Jandel Scientific, California). U jader obarvených imunofluorescenčně byly distribuce vybraných proteinů studovány pomocí Andor iQ softwaru. V případě hodnocení radiálních distribucí jsme studovali vzdálenosti mezi jednotlivými homologními a heterologními genetickými elementy a dále vzdálenost lokusů od těžiště buněčného jádra (Kozubek et al., 2002; Obr. 29). Vzdálenosti kandidátních lokusů byly normovány na lokální jaderný poloměr a byly počítány průměrné hodnoty. Jednotlivé údaje byly exportovány do programu Sigma plot (8.0) a distribuce genetických

elementů v rámci interfázních jader byla zaznamenána do grafů. Na závěr byla provedena statistická analýza pomocí vybraných biostatistických analýz, tak jak je uvedeno v práci Harničarová et al. (2006) nebo Krejčí et al. (2008).

### **3.9. Izolace RNA a RT-PCR**

Expres vybraných genů byla studována pomocí semikvantitativní RT-PCR nebo pomocí Real-Time PCR (Rotor Gene 6000, Corbett). RNA byla izolována s využitím trizolu (Invitrogen) nebo podle Bártová et al. (2002). Přečištění RNA bylo provedeno pomocí kolonek “RNeasy mini spin columns” (QIAGEN). Případná kontaminující DNA byla odstraněna pomocí DNázy (QIAGEN). Komplementární DNA byla syntetizována z 1 µg celkové RNA za pomoci iScript cDNA kitu (Bio-Rad). Sekvence primerů pro různé geny jsou uvedeny v příložených publikacích. RT-PCR amplifikační mix (20 µl) obsahoval 25 ng templátové cDNA, 2x SYBR Green I Master Mix (10 µl, Roche) a 200 nM každého primeru. Amplifikační reakce probíhala za použití termálního cyklu Rotor-Gene 6000. Většinou jsme používali následující kroky: 10 min denaturace DNA při 95° C a dále 40 cyklů při 95° C po 15 sec; annealing při 53° C po dobu 15 sec a elongace při 72° C po dobu 20 sec. Analýza byla provedena pomocí detekčního softwaru, který rovněž ovládá Rotor-Gene 6000. Za použití standardizovaných křivek byla stanovena exprese studovaného genu relativně k expresi vybraného “house keeping” genu, například HPRT1, GAPDH nebo β-actinu. Vizualizace RT-PCR produktů byla provedena pomocí 2% agarózového gelu.

### **3.10. Konvenční chromatinová immunoprecipitace (ChIP)**

Histony byly fixovány s DNA pomocí paraformaldehydu po dobu 10 min při 37°C, tak, že paraformaldehyd o koncentraci 1% byl přidán přímo do kultivačního média. Buňky byly centrifugovány, umístěny na led a opláchnuty studeným PBS, který obsahoval inhibitory proteáz (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin and 1 µg/ml peptastatin A). Další postup byl proveden přesně podle návodu, který byl uvedený v “ChIP assay” kitu (#17-295) firmy Upstate (USA). Buněčný lyzát byl sonikován tak, aby se získaly fragmenty DNA o velikosti 200-1000 bp, což bylo ověřeno na agarózovém gelu. Pro imunoprecipitaci jsme používali následující protilátky:

anti-acetyl H3K9, anti-dimethyl H3K9 a anti-trimethyl H3K9 (Upstate, USA). Po promytí histon-DNA-immunokomplexů a přidání 20  $\mu$ l 5M NaCl následovalo zahřátí vzorků na 65°C, což uvolnilo vazbu histonů a DNA. DNA byla ze suspence izolována pomocí QIAamp DNA Mini kitu (QIAGEN #51304) a vzorek bez protilátky byl použit jako negativní kontrola. Pro normování ChIP-PCR výsledků byl použit lyzát vstupní DNA, která neprošla imunoprecipitací, takzvaný “input”.

### 3.11. “ChIP-on-chip” analýza

Epigenetické modifikace histonů byly studovány pomocí “RefSeq Promoters array” (NimbleGen, Systems, Inc., USA), který zahrnuje dobře charakterizované geny podle RefSeq databáze. Používali jsme následující array: “2006-07-18\_HG18\_RefSeq\_promoter, 2200 bp upstream and 500 bp downstream”. V těchto experimentech ChIP-DNA a DNA z takzvaného “inputu” byla izolována pomocí QIAamp DNA Mini kitu (#51304, QIAGEN) a koncentrace vzorků byla kvantifikována pomocí UV absorpce (260 nm). Optimální koncentrace DNA byla dosažena na zařízení Speed-Vac a ChIP-DNA byla amplifikována pomocí LM-PCR (“Ligation Mediated PCR”). V tomto případě jsme použili “GenomePlex Complete Whole Genome Amplification” kit (WGA2, Sigma, USA). V prvním kroku byly přidány 2  $\mu$ l 1x “Library Preparation Buffer” a potom 1  $\mu$ l “Library Stabilization Solution”. Pak byly vzorky krátce centrifugovány a umístěny na termální cykler zahřátý na teplotu 95° C. Inkubace probíhala po dobu 2 min, pak byly vzorky umístěny na led. Na závěr, byl přidán 1  $\mu$ l “Library Preparation Enzyme” a vzorky byly inkubovány při následujících teplotách a časech: 16° C, 24° C, 37° C (20 min každý) a pak 75° C po dobu 5 min. Na závěr byly vzorky uchovány při 4° C pro další zpracování. Amplifikace proběhla v doporučeném pufu, při následujících podmínkách: počáteční denaturace při 95° C po dobu 3 min (14 cyklů), následně 94° C po dobu 15 sec a “annealing/extenze” při teplotě 65° C po dobu 5 min. Pak byly vzorky přečištěny pomocí PCR purifikačního kitu (#28104, QIAGEN) a ChIP-DNA byla rozpuštěna v deionizované vodě. DNA koncentrace byla kvantifikována pomocí UV absorpce. Poměr OD260/280 byl nejméně 1,8 a poměr OD260/230 měl hodnotu nejméně 1,6. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí “RefSeq Promoters arrays”. Statistická významnost výsledků byla stanovena pomocí takzvaného “FDR score” (“False Discovery Rate score”). Výsledky jsou uvedeny například na Obr. 7.

## 4. Závěr

Jak vyplývá z předchozích kapitol, výsledky naší skupiny významně přispěly k poznání zákonitostí mezi strukturou a funkcí chromatinu. Rovněž využití cytometrie s vysokým rozlišením představuje podstatný příspěvek k poznání struktury lidského genomu. Náš výzkum má jednak teoretický, ale i praktický význam. Teoretický význam spočívá v tom, že bylo obecně přijato, že vztahy mezi strukturou a funkcemi genomu jsou vzájemně spjaté entity a hledání vzájemných zákonitostí má velký funkční význam. Naše poznání ukazuje na to, že biochemické regulační mechanismy řídí například expresi genů nebo že mechanismy reparace DNA jsou důležité z hlediska fyziologického průběhu různých buněčných procesů. V tomto ohledu hraje struktura genomu opravdu zásadní funkci, jejíž studium bude dále velkou výzvou v biologii chromatinu. Jako velmi důležité se jeví experimenty odkrývající dynamiku struktury chromatinu a asociovaných proteinů. Je evidentní, že spojení genetických, biochemických a molekulárně-biologických přístupů by mohlo vést k poznání významu kompartmentalizace interfázních jader v genové expresi nebo reparaci DNA. Navíc fakt, že jaderná organizace je evolučně konzervativní, ukazuje na to, že struktura chromatinu je opravdu zásadní z hlediska regulace všech jaderných a následně buněčných procesů. Praktický význam vztahu struktury a funkce genomu je například v nádorové biologii, kdy především jaderná struktura různých chromozomálních přestaveb nebo jejich amplifikací je významná z hlediska regulace exprese genů. Velká pozornost je v současnosti věnována reparačním mechanismům, u kterých bylo dokázáno, že právě konformace okolního chromatinu významně limituje rozsah reparačních procesů.

Velký pokrok v biologii chromatinu rovněž představují různé mikroskopické metody a analýzy obrazu. V tomto směru byla vyvinuta řada metod, které umožňují kvantitativní i kvalitativní analýzu dat. Například automatizované snímání obrazu pomocí konfokálních mikroskopů a automatizovaná analýza obrazu přispěly k poznání jaderné kompartmentalizace chromozomálních teritorií a prostorové distribuce jednotlivých genetických elementů u různých buněčných typů a organismů. Uplatnění statistických metod rovněž významně přispělo k poznání zákonitostí ve struktuře chromatinu. V současné době je kladen velký důraz na pozorování živých systémů, kdy především GFP technologie a FRAP technika přispěly k odhalení dynamiky proteinů v rámci interfázních jader. Jak je ukázáno v předešlých kapitolách, úkolem naší skupiny je přispět k objasnění podstaty biologie chromatinu.

## 5. Seznam použité literatury

1. Abdel-Halim HI, Imam SA, Badr FM, Natarajan AT, Mullenders LH, Boei JJ. Ionizing radiation-induced instant pairing of heterochromatin of homologous chromosomes in human cells. *Cytogenet. Genome Res.* 2004, 104:193-199.
2. Abdel-Halim HI, Mullenders LH, Boei JJ. Pairing of heterochromatin in response to cellular stress. *Exp. Cell Res.* 2006, 312:1961-1969.
3. Adkins NL, Watts M, Georgel PT. To the 30-nm chromatin fiber and beyond. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1677:12-23.
4. Alcobia I, Dilao R and Parreira L. Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns. *Blood.* 2000, 95:1608-1615.
5. Alcobia I, Quina AS, Neves H, Clode N and Parreira L. The spatial organization of centromeric heterochromatin during normal human lymphopoiesis: evidence for ontogenically determined spatial patterns. *Exp. Cell Res.* 2003, 290:358-369.
6. Amrichová J, Lukášová E, Kozubek S and Kozubek M. Nuclear and territorial topography of chromosome telomeres in human lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 2003, 289: 11-26.
7. Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD, Shaw PJ, Heath PR, Holden H, Andrews PW. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2007, 25:207-215.
8. Barbin A, Montpellier C, Kokalj-Vokac N, Gibaud A, Niveleau A, Malfroy B, Dutrillaux B, Bourgeois CA. New sites of methylcytosine-rich DNA detected on metaphase chromosomes. *Hum. Genet.* 1994, 94:684-692.
9. Bártová E, Kozubek S, Kozubek M, Jirsová P, Lukášová E, Skalníková M, Buchníčková K. The influence of the cell cycle, differentiation and irradiation on the nuclear location of the *abl*, *bcr* and *c-myc* genes in human leukemic cells. *Leuk. Res.* 2000a, 24: 233-241.
10. Bártová E, Kozubek S, Kozubek M, Jirsová P, Lukášová E, Skalníková M, Cafourková A, Koutná I. Nuclear topography of the *c-myc* gene in human leukemic cells. *Gene.* 2000b, 244:1-11.

11. Bártová E, Kozubek S, Jirsová P, Kozubek M, Lukášová E, Skalníková M, Cafourková A, Koutná I, Paseková R. Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma*. 2001,110:360-370.
12. Bártová E, Kozubek S, Jirsová P, Kozubek M, Gajová H, Lukášová E, Skalníková M, Gaňová A, Koutná I, Hausmann M. Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells. *J. Struct Biol*. 2002, 139:76-89.
13. Bártová E., Jirsová P., Fojtová M, Souček K., Kozubek S. Chromosomal territory segmentation in apoptotic cells. *Cell Mol. Life Sci*. 2003a, 60:979-990.
14. Bártová E., Kozubek S., Gajová H., Jirsová P., Žlúvová J., Taslerová R., Koutná I., Kozubek M. Cytogenetics and cytology of retinoblastomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2003b,129:89-99.
15. Bártová E, Pacherník J, Harničarová A, Kovařík A, Kovaříková M, Hofmanová J, Skalníková M, Kozubek M, Kozubek S. Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J. Cell Sci*. 2005a, 118:5035-5046.
16. Bártová E, Harničarová A, Pacherník J, Kozubek S. Nuclear topography and expression of the BCR/ABL fusion gene and its protein level influenced by cell differentiation and RNA interference. *Leuk. Res*. 2005b, 29:901-913. 11.
17. Bártová E., Kozubek S. Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies. *Biol. Cell*. 2006, 98:323-336.
18. Bártová E, Pacherník J, Kozubík A, Kozubek S. Differentiation-specific association of HP1alpha and HP1beta with chromocentres is correlated with clustering of TIF1beta at these sites. *Histochem. Cell Biol*. 2007,127:375-388.
19. Bártová E, Krejčí J, Harničarová A, Kozubek S. Differentiation of human embryonic stem cells induces condensation of chromosome territories and formation of heterochromatin protein 1 foci. *Differentiation*. 2008a, 76:24-32.
20. Bártová E, Harničarová A, Krejčí J, Strašák L, Kozubek S. Single-cell c-myc gene expression in relationship to nuclear domains. *Chromosome Res*. 2008b, 16:325-343.
21. Bártová E, Krejčí J, Harničarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *J. Histochem. Cytochem*. 2008c, 56:711-721.



22. Bártová E, Krejčí J, Hájek R, Harničarová A, Kozubek S. Chromatin Structure and Epigenetics of Tumour Cells: a Review, Submitted 2008d.
23. Boisvert FM, Hendzel MJ, Bazett-Jones DP. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J. Cell Biol.* 2000, 148:283-92.
24. Borden KL. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol. Cell. Biol.* 2002, 22:5259-69. Review.
25. Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* 2001,10:211-219.
26. Branco MR, Pombo A. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol.* 2006, 4:e138.
27. Brero A, Easwaran HP, Nowak D, Grunewald I, Cremer T, Leonhardt H, Cardoso MC. Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation. *J. Cell Biol.* 2005, 169:733-743.
28. Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, Luo Y, Liu Y, Lyons IG, Freed WJ, Robins AJ, Rao MS, Schulz TC. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to 2001. *Stem Cells Dev.* 2004, 13:585-597.
29. Brown KE, Baxter J, Graf D, Merkenschlage M and Fisher AG. Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol. Cell* 1999, 3:207-217.
30. Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahm K, Merkenschlager M and Fisher AG. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell.* 1997, 91:845-854.
31. Caron H, van Schaij B, van der Mee M, Baas F, Riggins G, van Sluis P, Hermus MC, van Asperen R, Boon K, Voute PA, Heisterkamp S, van Kampen A, Versteeg R. The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science.* 2001, 29:1289-1292.

32. Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* 2003, 5:675-679.
33. Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, Csoka AB. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells.* 2006, 24(1):177-85. Erratum in: *Stem Cells.* 2006, 24:474.
34. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350:1353-1356.
35. Cremer M, Zinner R, Stein S, Albiez H, Wagler B, Cremer C, Cremer T. Three dimensional analysis of histone methylation patterns in normal and tumor cell nuclei. *Eur. J. Histochem.* 2004, 48:15-28.
36. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2001, 2:292-301.
37. Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S. Chromosome territories. A functional nuclear landscape. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2006, 18:307-316.
38. Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus *J. Cell Biol.* 1999, 145:1119-1131.
39. Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* 2001, 153:773-784.
40. Dellaire G, Bazett-Jones DP. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays.* 2004, 26:963-977.
41. Dellaire G, Ching RW, Ahmed K, Jalali F, Tse KC, Bristow RG, Bazett-Jones DP. Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *J. Cell Biol.* 2006, 175:55-66.
42. Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Sleisenger M, Kim YS. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with region-specific manner in colorectal cancer correlates with the gene silencing with region-specific manner in colorectal cancer.

Br. J. Cancer. 2002, 86:574-579.

43. Dietzel, S., Schiebel, K., Little, G., Edelmann, P., Rappold, G.A., Eils, R., Cremer, C. and Cremer, T. The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity. *Exp. Cell Res.* 1999, 252:363-375.
44. DiTullio RA Jr, Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, Bartek J, Halazonetis TD. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat. Cell Biol.* 2002, 4:998-1002. Erratum in: *Nat. Cell Biol.* 2003, 5:84.
45. Dolling JA, Boreham DR, Brown DL, Raaphorst GP, Mitchel RE. Rearrangement of human cell homologous chromosome domains in response to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 1997, 72:303-311.
46. Dorner D, Gotzmann J, Foisner R. Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *FEBS J.* 2007, 274:1362-1373.
47. Dorner D, Gotzmann J, Foisner R. Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *FEBS J.* 2007, 274:1362-1373.
48. Dvořák P, Dvořáková D, Kosková S, Vodinská M, Najvirtová M, Krekač D, Hampl A. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2005, 23:1200-1211.
49. Dyck JA, Maul GG, Miller WH Jr, Chen JD, Kakizuka A, Evans RM. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell.* 1994, 76:333-343.
50. Efroni S, Duttagupta R, Cheng J, Dehghani H, Hoepfner DJ, Dash C, Bazett-Jones DP, Le Grice S, McKay RD, Buetow KH, Gingeras TR, Misteli T, Meshorer E. Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008, 2:437-47.
51. Eskiw CH, Dellaire G, Bazett-Jones DP. Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2004, 279:9577-9585.
52. Falk M, Lukášová E, Gabrielová B, Ondřej V, Kozubek S. Chromatin dynamics during DSB repair. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, 1773:1534-1545.

53. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983a, 301:89-92.
54. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983b, 111:47-54.
55. Filesi I, Gullotta F, Lattanzi G, D'Apice MR, Capanni C, Nardone AM, Columbaro M, Scarano G, Mattioli E, Sabatelli P, Maraldi NM, Biocca S, Novelli G. Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol. Genomics* 2005, 23:150-158.
56. Finch JT, Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976, 73:1897-901.
57. Finch KA, Fonseka G, Ioannou D, Hickson N, Barclay Z, Chatzimeletiou K, Mantzouratou A, Handyside A, Delhanty J, Griffin DK. Nuclear organisation in totipotent human nuclei and its relationship to chromosomal abnormality. *J. Cell Sci.* 2008, 121:655-663.
58. Francastel C, Schubeler D, Martin DI, Groudine M. Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000, 1:137-143.
59. Fraser P, Bickmore W. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature*. 2007, 24:447:413-417.
60. Fricker M, Hollinshead M, White N, Vaux D. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 1997, 136:531-544.
61. Galiová G, Bártová E, Raška I, Krejčí J, Kozubek S. Chromatin changes induced by lamin A/C deficiency and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Eur. J. Cell. Biol.* 2008, 87:291-303.
62. Galiová G, Bártová E, Kozubek S. Nuclear topography of beta-like globin gene cluster in IL-3-stimulated human leukemic K-562 cells. *Blood Cells Mol. Dis.* 2004, 33:4-14.
63. García-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39H1 and SUV39H2 histone methyltransferases. *Nat. Genet.* 2004, 36:94-99.

64. Gierman HJ, Indemans MH, Koster J, Goetze S, Seppen J, Geerts D, van Driel R, Versteeg R. Domain-wide regulation of gene expression in the human genome. *Genome Res.* 2007, 17:1286-1295.
65. Gilbert N, Gilchrist S, Bickmore WA. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int. Rev. Cytol.* 2005, 242:283-336.
66. Gilchrist S, Gilbert N, Perry P, Bickmore WA. Nuclear organization of centromeric domains is not perturbed by inhibition of histone deacetylases. *Chromosome Res.* 2004, 12:505-516.
67. Goetze S, Mateos-Langerak J, Gierman HJ, de Leeuw W, Giromus O, Indemans MH, Koster J, Ondrej V, Versteeg R, van Driel R. The three-dimensional structure of human interphase chromosomes is related to the transcriptome map. *Mol. Cell Biol.* 2007, 27:4475-4487.
68. Grant PA. A tale of histone modifications. *Genome Biology.* 2001, 2:reviews 0003.1-0003.6.
69. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008, 319:1352-1355.
70. Hall LL, Lawrence JB. The cell biology of a novel chromosomal RNA: chromosome painting by XIST/Xist RNA initiates a remodeling cascade. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2003, 14:369-378.
71. Harničarová A, Kozubek S, Pacherník J, Krejčí J, Bártová E. Distinct nuclear arrangement of active and inactive c-myc genes in control and differentiated colon carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 2006, 312:4019-4035.
72. Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 1997, 31:571-610.
73. Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell.* 2001, 107:727-738.
74. Horowitz RA, Agard DA, Sedat JW, Woodcock CL. The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J. Cell Biol.* 1994, 125:1-10.
75. Chaly N, Munro SB. Centromeres reposition to the nuclear periphery during L6E9

- myogenesis in vitro. *Exp. Cell Res.* 1996, 223:274-278.
76. Chambeyron S, Bickmore WA. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev.* 2004, 18:1119-1130.
77. Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science.* 2003, 299:721-725.
78. Chubb JR, Bickmore WA. Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell.* 2003, 112:403-406.
79. Jenuwein T. (2006) The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.* 2006, 273:3121-3135.
80. Jirsová P, Kozubek S, Bártořová E, Kozubek M, Lukášová E, Cafourková A, Koutná I, Skalniková M. Spatial distribution of selected genetic loci in nuclei of human leukemia cells after irradiation. *Radiat. Res.* 2001, 155:311-319.
81. Johansen KM, Johansen J. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res.* 2006, 14:393-404.
82. Karlsson KH, Stenerlów B. Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions. *Radiat Res.* 2004, 161:517-527.
83. Keohane AM, O'Neill LP, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM. X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 1996, 180:618-630.
84. Khalil AM, Driscoll DJ. Histone H3 lysine 4 dimethylation is enriched on the inactive sex chromosomes in male meiosis but absent on the inactive X in female somatic cells. *Cytogenet. Genome Res.* 2006, 112:11-15.
85. Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature.* 2006, 442:312-316.
86. Klose RJ, Zhang Y. Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8:307-318.
87. Kohlmaier A, Savarese F, Lachner M, Martens J, Jenuwein T, Wutz A. A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biol.* 2004, 2:E171.

88. Koken MH, Puvion-Dutilleul F, Guillemain MC, Viron A, Linares-Cruz G, Stuurman N, de Jong L, Szostecki C, Calvo F, Chomienne C, et al. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J.* 1994, 13:1073-1083.
89. Kosak ST, Groudine M. Gene order and dynamic domains. *Science.* 2004, 306:644-647.
90. Kossel A. Zur chemie des zellkerns. *Hoppe-Seylers zeitschrift fur physiologische chemie.* 1882, 7:7-22.
91. Kourmouli N, Jeppesen P, Mahadevhaiah S, Burgoyne P, Wu R, Gilbert DM, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Shi W, Fundele R, Singh PB. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.* 2004, 117:2491-2501.
92. Koutná, I. Kozubek, S., Žaloudík, J., Kozubek, M., Lukášová, E., Matula, P., Bártoová, E., Skalníková, M., Cafourková, A. and Jirsová, P. Topography of genetic loci in tissue samples: towards new diagnostic tool using interphase FISH and high-resolution image analysis techniques. *Anal. Cell Pathol.* 2000, 20:173-185.
93. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007, 128:693-705.
94. Kozubek M, Kozubek S, Lukášová E, Marečková A, Bártoová E, Skalníková M, Jergová A. High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei. *Cytometry.* 1999, 36:279-293.
95. Kozubek M, Matula P. An efficient algorithm for measurement and correction of chromatic aberrations in fluorescence microscopy. *J. Microsc.* 2000, 200:206-217.
96. Kozubek S, Lukášová E, Rýznar L, Kozubek M, Lišková A, Govorun RD, Krasavin EA, Horneck G. Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood.* 1997, 89:4537-4545.
97. Kozubek, S., Lukášová, E., Amrichová, J., Kozubek, M., Lišková, A. and Šlotová, J. Influence of cell fixation on chromatin topography. *Anal. Biochem.* 2000, 282:29-38.
98. Kozubek S, Lukášová E, Jirsová P, Koutná I, Kozubek M, Gaňová A, Bártoová E, Falk M, Paseková R. 3D Structure of the human genome: order in randomness. *Chromosoma.* 2002, 111:321-331.
99. Krejčí J, Harničarová A, Kůrová J, Uhlířová R, Kozubek S, Legartová S, Hájek R, Bártoová E. Nuclear organization of PML bodies in leukaemic and multiple myeloma cells.

Leuk. Res. 2008, [Epub ahead of print].

100. Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Müller WG, McNally JG, Bazett-Jones DP, Nussenzweig A. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 2006, 172:823-834.

101. Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Benner A, Zirbel RM, Cremer T, Lichter P. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J. Cell Biol.* 1996, 135:1195-1205.

102. Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002, 14:286-298.

103. Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.* 2003, 116:2117-2124.

104. Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4:605-612. Review.

105. Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat. Rev. Genet.* 2007, 8:104-115.

106. Lattanzi G, Columbaro M, Mattioli E, Cenni V, Camozzi D, Wehner M, Santi S, Riccio M, Del Coco R, Maraldi NM, Squarzone S, Foisner R, Capanni C. Pre-Lamin A processing is linked to heterochromatin organization. *J. Cell Biochem.* 2007, 102:1149-1159.

107. Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.* 2003, 13:1192-1200.

108. Lercher, M.J., Urrutia, A.O. and Hurst, L.D. Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nat. Genet.* 2002, 31: 180-183.

109. Levsky JM, Shenoy SM, Pezo RC, Singer RH. Single-cell gene expression profiling. *Science* 297, 2002:836-840.

110. Lichter P, Cremer T, Tang CJ, Watkins PC, Manuelidis L, Ward DC. Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*



1988, 85:9664-9668.

111. Lichter P, Ledbetter SA, Ledbetter DH, Ward DC. Fluorescence in situ hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 87:6634-6638.

112. Mahy NL, Perry PE, Bickmore WA. Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J. Cell Biol.* 2002, 159:753-763.

113. Marková E, Schultz N, Belyaev IY. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int. J. Radiat. Biol.* 2007, 83:319-329.

114. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6:838-849.

115. Maul GG, Negorev D, Bell P, Ishov AM. Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J. Struct. Biol.* 2000, 129:278-287. Review.

116. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature.* 2005, 437:436-439.

117. Miescher F. Chemischezusammensetzung der eiterzelle. *Medicinisch-chemische untersuchungen (Hoppe-Seyer F, ed.)* 1871, 441-460.

118. Miescher F. Die histochemischen und physiologischen arbeiten von Friedrich Miescher. Leipzig F.C.W. Vogel, 1897.

119. Minc E, Allory Y, Courvalin JC, Buendia B. Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes. *Methods Cell Sci.* 2001, 23:171-174.

120. Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC, Buendia B. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 1999, 108:220-234.

121. Minc E, Courvalin JC, Buendia B. HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromozómes. *Cytogenet. Cell Genet.* 2000, 90: 279-284.

122. Misteli T. Spatial positioning; a new dimension in genome function. *Cell.* 2004, 119: 153-156.

123. Mitalipova MM, Rao RR, Hoyer DM, Johnson JA, Meisner LF, Jones KL, Dalton S, Stice SL. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23:19-20.
124. Montpellier C, Burgeois CA, Kokalj-Vokac N, Muleris M, Niveleau A, Reynaud C, Gibaud A, Malfoy B, Dutrillaux B. Detection of methylcytosine-rich heterochromatin on banded chromosomes. Application to cells with various status of DNA methylation. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1994, 78:87-93.
125. Münkkel C, Eils R, Dietzel S, Zink D, Mehring C, Wedemann G, Cremer T, Langowski J. Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment. *J. Mol Biol.* 1999, 285:1053-1065.
126. Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A and Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood.* 1999, 93:1197-1207.
127. Ondřej V, Kozubek S, Lukášová E, Falk M, Matula P, Matula P, Kozubek M. Directional motion of foreign plasmid DNA to nuclear HP1 foci. *Chromosome Res.* 2006,14:505-514.
128. Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat. Genet.* 2004, 36:1065-1071.
129. Park Y, Kuroda MI. Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. *Science.* 2001, 293:1083-1085.
130. Parreira L, Telhada M, Ramos C, Hernandez R, Neves H, Carmo-Fonseca M. The spatial distribution of human immunoglobulin genes within the nucleus: evidence for gene topography independent of cell type and transcriptional activity. *Hum. Genet.* 1997, 100:588-594.
131. Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, 85:9138-9142.
132. Pruneri G, Fabris S, Baldini L, Carboni N, Zagano S, Colombi MA, Ciceri G, Lombardi L, Rocchi M, Buffa R, Maiolo AT, Neri A. Immunohistochemical analysis of cyclin D1

- shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). *Am. J. Pathol.* 2000, 156:1505-1513.
133. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18: 399-404.
134. Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001, 13:263-273.
135. Rougeulle C, Chaumeil J, Sarma K, Allis CD, Reinberg D, Avner P, Heard E. Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol. Cell Biol.* 2004, 24:5475-5484.
136. Rydberg B, Holley WR, Mian IS, Chatterjee A. Chromatin conformation in living cells: support for a zig-zag model of the 30 nm chromatin fiber. *J. Mol. Biol.* 1998, 284:71-84.
137. Sadoni N, Langer S, Fauth C, Bernardi G, Cremer T, Turner BM, Zink D. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J. Cell Biol.* 1999, 146:1211-1226.
138. Sachs RK, van den Engh G, Trask B, Yokota H, Hearst JE. A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92:2710-4.
139. Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science.* 2006, 312:1059-1063.
140. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004, 119:941-953.
141. Shiels C, Islam SA, Vatcheva R, Sasieni P, Sternberg MJ, Freemont PS, Sheer D. PML bodies associate specifically with the MHC gene cluster in interphase nuclei. *J. Cell Sci.* 2001, 114(Pt 20):3705-3716.
142. Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Khuon S, Collins FS, Jenuwein T, Goldman RD. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103:8703-8708.
143. Schirmer EC, Foisner R. Proteins that associate with lamins: many faces, many

functions. *Exp. Cell Res.* 2007, 313:2167-2179.

144. Schübeler D, Groudine M, Bender MA. The murine beta-globin locus control region regulates the rate of transcription but not the hyperacetylation of histones at the active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98:11432-11437.

145. Skalníková M, Bártová E, Ulman V, Matula P, Svoboda D, Harničarová A, Kozubek M, Kozubek S. Distinct patterns of histone methylation and acetylation in human interphase nuclei. *Physiol. Res.* 2007, 56:797-806.

146. Skalníková M, Kozubek S, Lukášová E, Bártová E, Jirsová P, Cafourková A, Koutná I, Kozubek M. Spatial arrangement of genes, centromeres and chromosomes in human blood cell nuclei and its changes during the cell cycle, differentiation and after irradiation. *Chromosome Res.* 2000, 8:487-499.

147. Smith KP, Byron M, O'Connell BC, Tam R, Schorl C, Guney I, Hall LL, Agrawal P, Sedivy JM, Lawrence JB. c-Myc localization within the nucleus: evidence for association with the PML nuclear body. *J. Cell Biochem.* 2004, 93:1282-1296.

148. Soutoglou E, Dorn JF, Sengupta K, Jasin M, Nussenzweig A, Ried T, Danuser G, Misteli T. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 2007, 9:675-682.

149. Soutoglou E, Misteli T. Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2007, 17:435-442.

150. Spector DL. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 2003, 72:573-608.

151. Strašák L, Bártová E, Harničarová A, Galiova G, Krejčí J, Kozubek S. Histone acetylation dictates the nuclear architecture. Submitted 2008.

152. Taddei A, Maison C, Roche D, Almouzni G. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat. Cell Biol.* 2001, 3:114-120.

153. Tajbakhsh J, Luz H, Bornfleth H, Lampel S, Cremer C, Lichter P. Spatial distribution of GC- and AT-rich DNA sequences within human chromosome territories. *Exp. Cell Res.* 2000, 255:229-237.

154. Tanabe H, Müller S, Neusser M, von Hase, J, Calcagno E, Cremer M, Solovei I,

- Cremer C, Cremer T. Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99:4424-4429.
155. Taniura H, Glass C, Gerace L. A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J. Cell Biol.* 1995, 131:33-44.
156. Taslerová R, Kozubek S, Bártová E, Gajdušková P, Kodet R, Kozubek M. Localization of genetic elements of intact and derivative chromosome 11 and 22 territories in nuclei of Ewing sarcoma cells. *J. Struct. Biol.* 2006, 155:493-504.
157. Taslerová R, Kozubek S, Lukášová E, Jirsová P, Bártová E, Kozubek M. Arrangement of chromozóme 11 and 22 territories, EWSR1 and FLI1 genes, and other genetic elements of these chromozómes in human lymphocytes and Ewing sarcoma cells. *Hum. Genet.* 2003, 112:143-155.
158. Verschure PJ, van Der Kraan I, Manders EM, van Driel R. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J. Cell Biol.* 1999, 147:13-24.
159. Versteeg R, van Schaik BD, van Batenburg MF, Roos M, Monajemi R, Caron H, Bussemaker HJ, van Kampen AH. The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res.* 2003, 13:1998-2004.
160. Volpi EV, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campbell RD, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J, Trowsdale J, Sheer D. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J. Cell Sci.* 2000, 113:1565-1576.
161. Wang J, Shiels C, Sasieni P, Wu PJ, Islam SA, Freemont PS, Sheer D. Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J. Cell Biol.* 2004, 164:515-526.
162. Wang ZG, Delva L, Gaboli M, Rivi R, Giorgio M, Cordon-Cardo C, Grosveld F, Pandolfi PP. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science.* 1998, 279:1547-1551.
163. Watson JD, Crick FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1953, 171:964-967.
164. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler

- D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* 2005, 37:853-862.
165. Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A, Dejean A. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukaemia cells. *Cell.* 1994, 76:345-356.
166. Weismann A. *Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung*, 1892a.
167. Weismann A. *Aufsätze über Vererbung und verwandte biologische Fragen*, 1892b.
168. Wiblin AE, Cui W, Clark AJ, Bickmore WA. Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 2005, 118:3861-3868.
169. Williams RR, Broad S, Sheer D, Ragoussis J. Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Exp Cell Res.* 2002, 272:163-175.
170. Williams RR, Azuara V, Perry P, Sauer S, Dvorkina M, Jorgensen H, Roix J, McQueen P, Misteli T, Merkenschlager M, Fisher AG. Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the *Mash1* locus. *J. Cell Sci.* 2006, 119:132-140.
171. Xu ZX, Timanova-Atanasova A, Zhao RX, Chang KS. PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol. Cell Biol.* 2003, 23:4247-4256.
172. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 1997, 13(8):335-340. Review.
173. Zink D, Amaral MD, Englmann A, Lang S, Clarke LA, Rudolph C, Alt F, Luther K, Braz C, Sadoni N, Rosenecker J, Schindelbauer D. Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J. Cell Biol.* 2004, 166:815-825.
174. Zinner R, Albiez H, Walter J, Peters AH, Cremer T, Cremer M. Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem. Cell Biol.* 2006, 125:3-19.
175. Zinner R, Teller K, Versteeg R, Cremer T, Cremer M. Biochemistry meets nuclear architecture: Multicolor immuno-FISH for co-localization analysis of chromosome segments and differentially expressed gene loci with various histone methylations. *Adv. Enzyme Regul.* 2007, 47:223-241.