Sustackova G, Kozubek S, Stixova L, Legartova S, Matula P, Orlova D *et al* (2011). Acetylation-dependent nuclear arrangement and recruitment of BMI1 protein to UV-damaged chromatin. *J Cell Physiol*.
Toth KF, Knoch TA, Wachsmuth M, Frank-Stohr M, Stohr M, Bacher CP *et al* (2004). Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* **117:** 4277-87.
Wyman C, Kanaar R (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* **40:** 363-83.

Foto

Buněčné jádro a jeho epigenetika

Jana Suchánková, Lenka Stixová, Eva Bártová

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

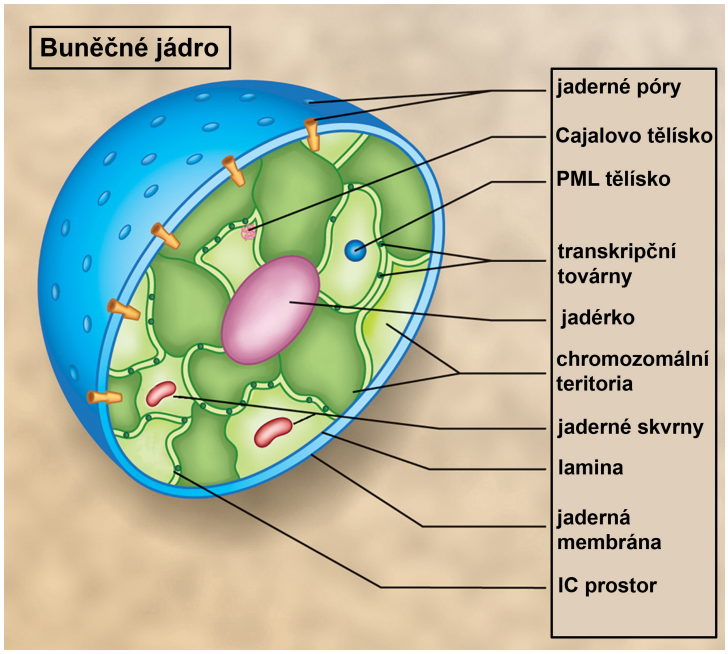
Úvod

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

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

Organizace buněčného jádra.

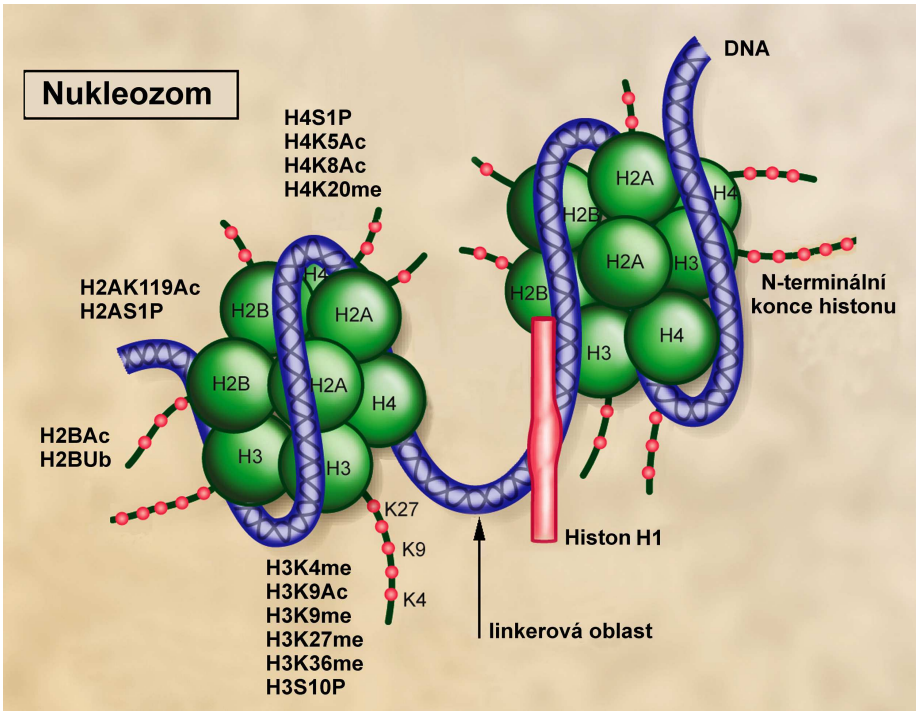
Buněčné jádro je nejnápadnější organelou eukaryotické buňky a obsahuje většinu jejích genů. Celé jádro je uspořádáno do mnoha funkčních celků (obr. 1). Prostor jádra vyplňuje chromatin, který se skládá z DNA a především proteinů histonové povahy. Dále je v jádře obsaženo velké množství nehistonových proteinů a RNA [1]. Zbytek jádra je vyplněn interchromatinovým prostorem (obr. 1), který obsahuje makromolekulární komplexy, potřebné pro jaderné funkce, jako je replikace (tvorba kopií molekuly DNA), transkripci (přepis genetické informace z DNA do RNA), sestřih (post-syntetická úprava pre-mRNA) či reparaci (oprava poškozené DNA) [2]. V buněčném jádře se dále nachází řada tělísek a domén – především Cajalova tělíska, promyelocytická leukemická tělíska (promyelocytic leukemia - PML), jaderné skvrny a několik dalších regulačních domén, typu transkripčních „továren“ obsahujících RNA polymerázu II, která se jako hlavní faktor reguluje transkripci genů kódujících pre-mRNA [3]. Speciální jadernou strukturu dále přestavuje jadérko, které je považováno za největší transkripční „továrnu“ (Obr. 1). Důvodem tohoto označení je, že transkripce ribozomálních genů a syntéza ribozomálních pod-jednotek probíhá právě v kompartmentech jadérka [4].



Obr. 1. Schéma uspořádání vybraných kompartmentů buněčného jádra. Jádro je charakteristické svou vysokou kompartmentalizací, tedy rozdělením prostoru do menších funkčních celků. Povrch jádra je tvořen jadernou membránou protkanou jadernými póry, pod kterou se nachází vrstva intermediálních filament tvořících nukleární laminu. Dominantou vnitřního prostoru jádra je jadérko, kolem kterého jsou organizována chromozomální teritoria a interchromozomální prostor (IC). Větší „laguny“ interchromozomálního prostoru obsahují například Cajalova tělíska (zodpovídají za tvorbu transkripčních a sestřihových komplexů), tělíska PML (účastní se regulace transkripce, omezení růstu nádorů, potlačení apoptózy a oprav DNA) a jaderné skvrny (obsahují vysokou koncentraci sestřihových faktorů).

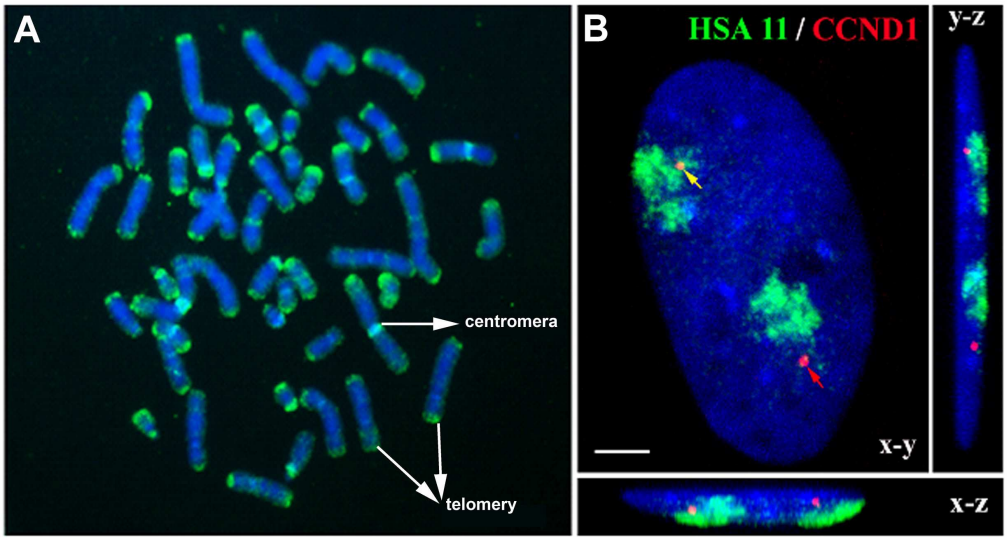
Základní struktura chromatinu a epigenetické modifikace histonů

Základní strukturní podjednotkou chromatinu savčích buněk je nukleozom, který je tvořen oktamerem histonů (dvě molekuly každého z histonů H2A, H2B, H3 a H4) a navinutou DNA [5, 6] (obr. 2). Molekula dalšího histonu, nazývaného H1, se připojuje k volné DNA v blízkosti nukleozomu, v takzvané linkerové oblasti, a s jeho pomocí je DNA uspořádána do 30nm chromatinového vlákna. Toto vlákno může tvořit ještě kondenzovanější struktury, ovšem způsob jejich vzniku a formy organizace chromatinových vláken jsou neustále předmětem diskuse [7].



Obr. 2 Nukleosomy obtočené DNA a jejich epigenetické modifikace na vybraných N-terminálních koncích.

Stupeň kondenzace chromatinu závisí především na buněčném cyklu, který zahrnuje interfázi (G1, S, G2 fáze) a mitotické dělení. Během interfáze jsou chromatinová vlákna v jádře rozvolněná, ale při přípravě buňky na mitózu dochází k jejich kondenzaci a jsou viditelná jako typické metafázní chromozomy. Ty představují nejvyšší možný stupeň sbalení chromatinu, takzvaný chromatin vyššího řádu (obr. 3A). Avšak ani interfázní chromosomání teritoria (obr. 3B) nejsou ve své struktuře homogenní, liší se ve stupni svého sbalení (kondenzace) a tedy i ve stupni vyjádření genů (exprese). V rámci buněčného jádra rozlišujeme dva základní typy chromatinu: euchromatin a heterochromatin [8]. Zatímco euchromatin je rozvolněný a transkripčně aktivní, heterochromatin je mnohem kompaktnější, vysoce kondenzovaný a transkripčně neaktivní. Heterochromatin můžeme dále dělit na fakultativní (neaktivní chromozom X v genomu samic) a konstitutivní (primární zaškrcení [konstrikce] chromozomů zvané centromery nebo konce chromozomů zvané telomery, viz. obr. 3A).



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

Kondenzace interfázního chromatinu ovlivňují také biochemické modifikace histonu H1 a koncových částí histonů, takzvaných N-terminálních konců, vyčnívajících z nukleozomů [1] (obr. 2). Tyto chemické modifikace mohou pozitivně i negativně ovlivňovat expresi genů (viz níže). Ke zmíněným post-translačním modifikacím dochází v důsledku působení specifických enzymů, zodpovědných za vazbu nebo odštěpení například methylové, acetylové, fosforylové či jiné epigeneticky významné skupiny vázané na histony. Dalšími faktory, které ovlivňují kondenzaci chromatinu jsou sub-typy heterochromatinového proteinů 1 - HP1α, HP1β, HP1γ (viz níže, obr. 4A, B). V neposlední řadě je exprese jednotlivých genů regulována transkripčními faktory (epigeneticky významné proteiny, které se váží na promotory genů a iniciují transkripci). Dále může být exprese genů ovlivněná polohou genů v rámci chromozomálního teritoria nebo i celého interfázního jádra (obr. 3B) [9, 10].

Chromozomální teritoria

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

Carl Rabl (Rabl, 1885) jako první usoudil, že jednotlivé chromozomy jsou od sebe prostorově odděleny, což v několika desetiletích významně prostudovala skupina Prof. Thomase Cremera z Mnichova (shrnuto v [11]).

Obohacení Rablových teorií provedl Theodor Boveri, který ve své práci uvedl, že každý chromozom, který je viditelný během mitózy, si i během interfáze udržuje svou individualitu a v jádře zabírá specifický prostor. Boveri v této práci také poprvé použil termín chromozomální teritorium. S vyvinutím nových experimentálních technik se teorie chromozomálních teorií rozšířila o několik nových modelů, které se sice v některých ohledech liší, ale jejich základní myšlenka zůstává prakticky neměnná.

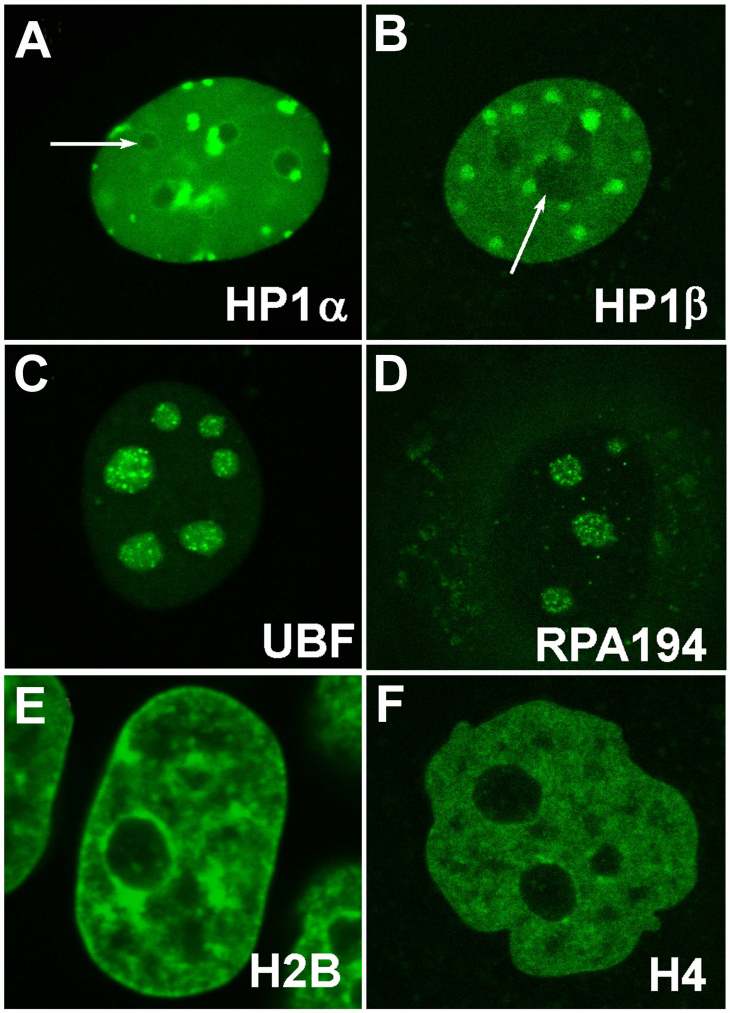
Umístění jednotlivých chromozomálních teritorií v interfázním jádře není náhodné, ale je pravděpodobně ovlivněno genovou hustotou. Chromozomy, které ve srovnání s ostatními obsahují větší množství genů a obecně tedy vykazují i vyšší transkripční aktivitu, jsou během interfáze umístěny blíže středu jádra, zatímco genově méně zastoupené a méně transkripčně aktivní chromozomy bývají lokalizovány na jaderné periferii. Jako příklad bývá uváděn známý případ chromozomů 18 a 19, které se vyznačují velmi podobnou velikostí, avšak rozdílnou genovou hustotou. Chromozom 19, který je charakteristický vysokým počtem genů se u většiny buněčných typů nachází blíže středu jádra než geny méně zastoupený chromozom 18 [9, 12].

Jadérko a jeho význam

Jadérko je nápadná buněčná struktura, viditelná během interfáze. Ačkoliv se v každé buňce zpočátku formuje základ pro několik jadérek, tyto „pre-jadérka" začnou brzy fúzovat a většina savčích buněk má tedy obvykle jedno až čtyři jadérka, která zodpovídají za syntézu ribozomální RNA (rRNA) [13]. Samotné transkripci rRNA předchází tvorba preiniciačního komplexu (pre-initiation complex – PIC) (shrnuto v [14]). PIC obsahuje SL1 (selectivity factor 1) a UBF faktory (upstream binding factor) (obr. 4C), které pravděpodobně ovlivňují navázání RNA Pol I na promotor přepisovaného genu (obr. 4D ukazuje zastoupení RPA194 podjednotky RNA Pol I v jadérku). UBF a další součásti PIC navázané na promotor genu jsou také zodpovědné za topologické změny v rDNA [15-17].

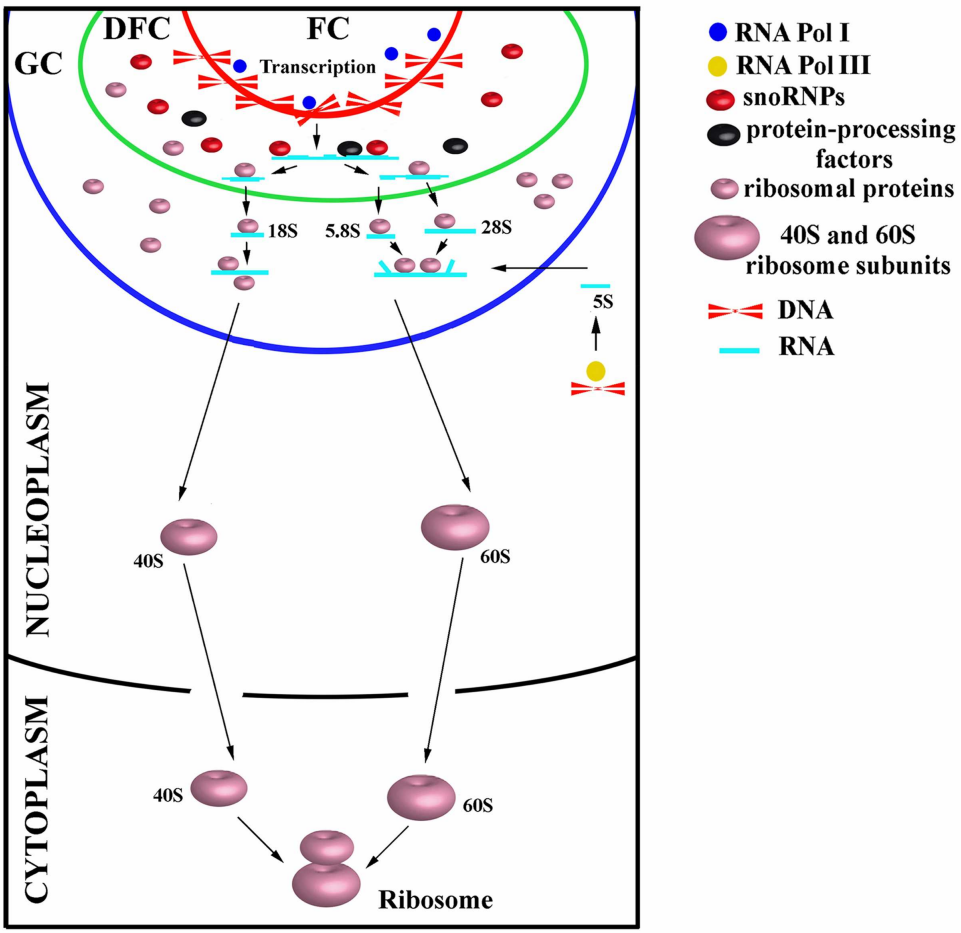
Hlavní funkce jadérka jsou následující: transkripce rDNA genů, syntéza pre-ribozomálních pod-jednotek, přidávání proteinů k pre-ribozomálním podjednotkám, úpravu primárních transkriptů do podoby 18S, 5.8S a 28S rRNA a začlenění 5S rRNA, která je RNA polymerázou III syntetizovaná mimo jadérko RNA (shrnuto v [14]). Syntéza rRNA, respektive tvorba ribozomálních podjednotek, není jedinou funkcí jadérka. Existuje mnoho důkazů i pro další funkce. Optimální funkce jadérka jsou například zásadní z hlediska regulace buněčného cyklu, stresových odpovědí buňky, pochodů stárnutí. Změny v uspořádání jadérek se objevují i u maligně transformovaných buněk. Faktory obsažené v jadérku dále hrají významnou roli v boji proti virovým infekcím (shrnuto v [18, 19]).

Vzhledem k faktu, že ribozomy jsou nezbytné k translaci, syntéze polypeptidických řetězců a bílkovin, je zcela pochopitelné, že nejlépe probádanou funkcí jadérka nadále zůstává tvorba ribozomálních podjednotek. Tento komplexní proces je zahájen už samotnou formací tří dynamických částí



Obr. 4. Distribuce HP1α (A), HP1β(B), UBF (C), RPA194 (D) a histonů H2B (E), H4 (F) v interfázním jádře živých buněk. Převzato ze Stixová et al. (2011).

jadérka, jako je fibrilární centrum (fibrilar centers - FCs), denzní fibrilární komponenty (dense fibrillar components - DFCs) a granulární komponenty (granular components - GCs) (obr. 5). Jadérko není obklopeno membránou, ale je z velké části formováno perinukleárním chromatinem, jehož charakteristickým znakem je vysoký stupeň metylace DNA (vysvětleno níže). Z hlediska tvorby a funkce jadérka jsou velice důležité takzvané organizátory jadérka (NORs - Nucleolus Organizer Regions). Oblasti NORs jsou v lidském genomu rozmístěny na krátkých raménčích akrocentrických chromozomů 13, 14, 15, 21 a 22 [20, 21], u myší se nacházejí na chromozomech 12, 15, 16, 17, 18 a 19 [22]. Každá z oblastí NORs je tvořena krátkými sekvencemi rDNA, tzv. transkripčními jednotkami. Transkripční jednotky rDNA jsou u savců poměrně rozsáhlé, v lidské DNA tvoří oblasti o velikosti ≈43 kb, u myší ≈45 kb [23]. Každou transkripční jednotku lze dále rozdělit do dvou částí. První částí je sekvence kódující prekurzory rRNA (pre-rRNA), tedy úsek DNA dlouhý 13-14 kb, za kterým následuje nepřepisovaný mezerník oddělující jednotlivé geny (intergenic spacer – IGS) o přibližné délce 30 kb [23].

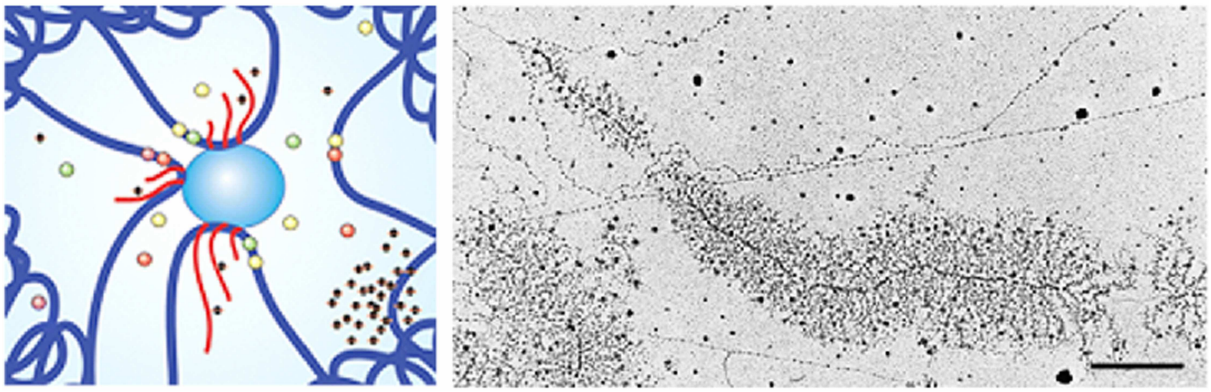


Obr. 5. Schéma syntézy ribozomů. Jednotlivé kompartmenty jadérka jsou označeny: fibrilární centrum (fibrilar centers - FCs), denzní fibrilární komponenty (dense fibrillar components - DFCs) a granulární komponenty (granular components - GCs) Přepis genetické informace z rDNA do rRNA je na tomto obrázku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

Struktura aktivně přepisovaných rDNA genů byla poprvé popsána na základě výzkumu oocytů obojživelníků v roce 1969 [4]. Dá se říci, že uspořádání přepisované rDNA je v mnoha ohledech podobné uspořádání transkripčně aktivních genů kódujících pre-mRNA. Tak jako transkripčně aktivní pre-mRNA geny vybíhají v podobě smyček vně příslušného chromozomálního teritoria (obr. 6A), tak i ribozomální geny jsou uspořádané do podoby takzvaných „vánočních stromů" (Christmas trees; obr. 6B) (shrnuto v [14]). Pomyslné větve tohoto stromu, tvořené aktivními rRNA geny a vznikající pre-rRNA, vybíhají od masy nepřepisované rDNA tvořící základ „vánočního stromu" [24].

Stejně jako mRNA vzniká uvnitř transkripčních továren (obr. 6A), tak i aktivní ribozomální geny jsou lokalizované uvnitř jadérka. Avšak vzhledem k vysoké kompaktnosti jadérka je obtížné určit přesné místo transkripce [24]. Je jisté, že počáteční fáze syntézy ribozomů se odehrávají uvnitř jadérka, zatímco dosyntetizování ribozomálních podjednotek je lokalizováno na jeho

okraji [25, 26]. Používání rozdílných experimentálních technik a způsobů vizualizace však značně ovlivňuje získané výsledky, a tak ani po více než dvaceti letech diskuzí nelze s konečnou platností určit kompartment jadérka, ve kterém transkripce probíhá [14, 18, 27]. Jak již bylo zmíněno, FCs obsahují velké množství ribozomálních genů. Otázkou však zůstává, zda jsou tyto geny transkripčně aktivní či nikoliv. Lokalizace transkripčně aktivních genů zůstává i nadále předmětem diskuzí. Někteří usuzují, že transkripčně aktivní geny se nacházejí převážně v FC (např. [26]), jiní za místo transkripce rDNA genů považují hranici mezi FC a DFC (např. [18, 28]; obr. 5), další autoři tento proces lokalizují do DFC (např. [27]). Celý průběh transkripce je ovlivněn mnoha faktory, které se vzájemně značně ovlivňují. Některé z nich již byly v krátkosti zmíněny, ale nejnápadnějším způsobem, jak buňka reguluje transkripční aktivitu genů kódujících jak pre-mRNA, tak rRNA zůstávají epigenetické modifikace DNA a asociovaných histonů.



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

Epigenetické úpravy histonů

Nejznámějším způsobem regulace syntézy RNA jsou vedle působení transkripčních faktorů i epigenetické modifikace DNA a histonů. Tyto epigenetické modifikace mají za následek změnu chromatinové struktury, přičemž pořadí nukleotidů v řetězci DNA zůstává zachováno. Prakticky se jedná o biochemické substituce probíhající na DNA a histonech, které mají za následek změnu konformace chromatinu s níž se pojí například rozdílná přístupnost chromatinu právě pro transkripční faktory.

Toto obecné schéma platí i pro speciální případ rDNA nacházející se v jadérku. Zde epigenetický stav rDNA genů udržuje integritu jadérka a

samozřejmě zodpovídá i za jejich aktivní transkripci či umlčení [14]. Podobně jako zbytek jaderné DNA je i rDNA v jadérku modifikována nejrůznějšími epigenetickými faktory. Jedná se především o metylaci DNA a modifikace s ní asociovaných histonů. Histony jsou bazické proteiny obsahující 20 až 30 % argininu a lyzinu, dvou kladně nabitých aminokyselin [1]. Nechráněné skupiny – NH_3^+ argininu a lyzinu jsou důležité při interakci histonů se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA. Skupiny –NH_3^+ se vyskytují na aminoterminálních koncích i v samotném jádře histonu. Pro epigenetické modifikace jsou však kvůli své výborné přístupnosti důležité především skupiny lokalizované na volných koncích histonů, kde probíhá i většina jejich modifikací (obr. 2).

Histony (obr. 2 a 4E, F) mohou být modifikovány mnoha způsoby. Na histonech existuje více než 60 odlišných reziduí, které mohou být nejméně osmi způsoby upraveny, přičemž některé z modifikací mají několik variant [29, 30]. Jako příklad bývá uváděna metylace lyzinu a argininu, která se může vyskytovat ve třech formách pro každý z nich, přičemž lyzin může být mono-, di- nebo trimetylován a arginin může být monometylován nebo symetricky či asymetricky dimetylován [30]. Z uvedeného faktu je zřejmé, že pro histony existuje obrovské množství variant epigenetických modifikací. Musíme mít však na paměti, že každé reziduum může být modifikováno pouze některými z uvedených způsobů a také že některé modifikace se vzájemně vylučují. Tedy jeden histon nemůže být v určitém okamžiku modifikován všemi možnými způsoby.

Všechny histony jsou evolučně velmi konzervativní, přičemž mezi organizmy je největší podobnost u histonů H3 a H4. Lze tedy vytvořit obecná pravidla následků jednotlivých modifikací, takzvaný histonový kód: konkrétní chemická modifikace určité aminokyseliny v určitém histonu vede buď k transkripční aktivaci nebo inaktivaci. Obecně lze tedy modifikace histonů rozdělit do dvou skupin: první z nich navozuje takové změny chromatinu, které mají za následek transkripční aktivitu, druhá skupina modifikací se naopak pojí s transkripčně neaktivním chromatinem [30]. Struktura transkripčně aktivního chromatinu je charakteristická například hypometylací DNA, acetylací histonu H3 a H4 a dimetylací histonu H3 v pozici lyzinu 4 (H3K4). Struktura transkripčně neaktivního chromatinu je specifická svou hypoacetylací histonu H3 a H4, metylací histonu H3 v pozici lyzinu 9 (H3K9), metylací histonu H4 v pozici lyzinu 20 (H4K20) a CpG hypermetylací (obr. 2) [31-33]. Skutečnost je ovšem mnohem složitější – některé modifikace se mohou pojit jak s transkripčně aktivním, tak i neaktivním chromatinem a závisí pouze na vlivu dalších faktorů [30]. Jako příklad bývá uváděna metylace histonu H3 v pozici lyzinu 36 (H3K36), která je v kódujícím regionu znakem transkripčně aktivního chromatinu a v oblasti promotoru naopak slouží k umlčení příslušného genu. Dalším příkladem je metylace H3K9, která má pravděpodobně stejný efekt: v oblasti promotoru slouží k inaktivaci transkripce, v kódujícím regionu k její aktivaci.

Metylace DNA

Metylace DNA je post-replikační úprava chromatinu, která probíhá téměř výlučně na cytosinu (v pozici C5) v dinukleotidech CpG (takzvané CpG ostrůvky), které se nacházejí především v oblasti promotoru genu [23]. Metylace probíhá pomocí DNA metyltransferáz (DNMT), běžně rozdělovaných do tří podrodin: DNMT1, DNMT2 a DNMT3, přičemž u člověka nejvyšší aktivitu vykazují metyltransferázy DNMT1, DNMT3a a DNMT3b [34]. DNMT1 rozeznávají po replikaci DNA dinukleotid CpG na nově syntetizovaném vlákně a odpovídají tedy za udržovací metylace. DNMT3 mají schopnost metylovat *de novo* a působí během rané fáze ontogenetického vývoje, kdy je nastavován metylační profil buněk.

Metylace DNA je typickým znakem heterochromatinu, přičemž čím více je DNA metylována, tím méně jsou geny transkripčně aktivní. Metylace DNA může způsobovat změny v konformaci chromatinu, ale také se vyskytuje v oblastech promotorů typicky se pojících s CpG ostrůvky. Zde dochází k metylaci cytozinu tím způsobem, že metylová skupina směřuje do velkého žlábku DNA, kde brání vazbě transkripčích faktorů a také slouží k navázání dalších inhibitorů transkripce. Například metylace CpG ve specifických oblastech rDNA znemožňuje vazbu UBF faktoru k templátové DNA, zabraňuje tak zformování iniciačního komplexu PIC a inhibuje tedy iniciaci transkripce rDNA genů [23, 34, 35].

Acetylace histonů

První popsanou modifikací histonů byla acetylace, která zodpovídá za strukturu transkripčně aktivního euchromatinu a je zprostředkována histonovými acetyltransferázami. Acetyltransferázy bývají rozdělovány do tří rodin: GNAT, MYST a CBP/p300 [36]. Histonové deacetylázy zodpovídají za opačný proces, způsobují tedy inaktivaci transkripce. Deacetylázy jsou také rozdělovány do tří rodin: histonové deacetylázy I. až II. třídy, závislé na zinku (Zn), a III. třídy zahrnující enzymy rodiny sirtuinů (Sir), závislé na NAD (Nikotinamid Adenin Dinukleotid).

Acetyltransferázy modifikují ε-aminoskupinu lyzinu, což vede ke snížení jeho bazicity [30, 37]. Tím je neutralizován kladný náboj amino-terminálních konců histonů a následně omezena schopnost histonů interagovat se záporně nabitou DNA. Acetylace tedy způsobuje rozvolnění chromatinové struktury a zpřístupňuje tak DNA transkripčním faktorům a dalším enzymům [30]. Naopak deacetylace histonů způsobuje vyšší bazicitu histonů, umožňuje jejich vazbu k molekule DNA a vznik struktury transkripčně neaktivního chromatinu. Uvedené procesy lze jen stěží pozorovat *in vivo*, bylo ale prokázáno, že například H4K16 acetylace má negativní vliv na formování 30nm chromatinových vláken a vyšších struktur a umožňuje tak vznik struktury transkripčně aktivního chromatinu.

Acetylace probíhají především na N-terminálních koncích histonů, které jsou pro acetyltransferázy dobře přístupné [30]. Byla však prokázána také acetylace histonu H3 v pozici lyzinu 56 (H3K56) probíhající v oblasti nukleozomového jádra. Reziduum K56 je na nukleozomu umístěno tak, že

směřuje do velkého žlábku DNA a má tedy výhodnou pozici na ovlivnění interakce mezi histonem a DNA.

Acetylace H3K9, typický znak transkripčně aktivní rDNA v jadérku, má také vliv na umístění daného lokusu v jádře. Podle Strašáka a kol. (2009) [38] jsou lokusy s vysokou mírou acetylace umístěny ve středu buněčného jádra, zatímco méně acetylované se nacházejí na jeho periferii. Uvedené údaje korelují s polohou rDNA, kolem níž se formuje jadérko, které je lokalizované v jaderném středu. Stupeň acetylace samozřejmě také ovlivňuje další histonové modifikace. Například deacetylace specifických lyzinových reziduí (např. deacetylace H3K9) předchází metylaci H3K9, DNA metylaci a navázání HP1 proteinu zodpovědného za formování heterochromatinu [39].

Metylace histonů

Ačkoliv metylace probíhá na lyzinu a argininu [40], v souvislosti s jadérkem byla prozkoumána pouze metylace lyzinu zprostředkovaná lyzinovými metyltrasferázami. Lyzinové metyltransferázy vykazují vysokou specifitu srovnatelnou se specifitou acetyltransferáz [30]. Dá se říci, že tyto metyltrasferázy ve většině případů modifikují pouze určitý lyzin určitého histonu [40]. Jako příklad bývá uváděna metyltrasferáza SUV39h1 jenž je zodpovědná za trimetylaci H3K9 nebo metyltransferáza G9a zodpovědná za monometylaci a dimetylaci téže pozice [30].

Teprve nedávno byly objeveny histonové demetylázy jako je lyzin-specifická demetyláza (LSD1) zodpovědná za demetylaci H3K4, enzym JHDM1 zodpovědný za demetylaci H3K36, JHDM2 působící proti trimetylaci H3K9 perinukleárního heterochromatinu nebo JHDM1B způsobující v jadérku demetylaci H3K4 (shrnuto v [14]).

Narozdíl od acetylace může metylace histonů transkripci genů podporovat i inhibovat. Transkripční aktivita například koreluje s H3K4, H3K36 a H3K79 metylací, přičemž metylace H3K4 a metylace H3K36 je důležitá pro elongaci transkriptu [30-33, 41]. S inaktivací transkripce je spojována H3K9, H3K27 a H4K20 metylace (obr. 2). Metylová skupina je však poměrně malá a není pravděpodobné, že by sama o sobě mohla výrazně ovlivnit záporný náboj lyzinu a argininu, jako je tomu v případě acetylové skupiny [40, 41]. Mnohem pravděpodobnější je možnost, že metylová skupina vytváří vazebné místo pro regulační proteiny a deacetylázy. Například pro histonové metyltransferázy zprostředkovávající H3K9 metylaci je typická evolučně stabilní chromodoména shodná s HP1 proteiny. Právě tyto metyltransferázy (jako je SUV39h1 a SUV39h2) plně zodpovídají za vazbu HP1 proteinů v oblastech heterochromatin (shrnuto v [30]).

HP1 protein byl objeven v pericentromerických a telomerických regionech chromozomů octomilky *Drosophila melanogaster* [42, 43]. V lidských a myších buňkách byly postupně identifikovány jeho tři pod-typy: HP1α, HP1β a HP1γ, které se významně podílejí na remodelaci chromatinu [44] (obr. 4A, B). Navzdory vzájemné podobnosti ve struktuře a biochemických vlastnostech se jednotlivé varianty HP1 výrazně liší ve svých funkcích a své jaderné lokalizaci (shrnuto v [45]). Zatímco výskyt HP1α je spojován se strukturou

heterochromatinu, HP1β a HP1γ bývají v interfázním jádře a především v jadérku lokalizovány jak v heterochromatinu, tak i v euchromatinu [44, 46]. Například bylo prokázáno, že pokud se H3K9 metylace spolu s γ isoformou HP1 vyskytuje v kódujícím regionu genu, může být tento gen transkripčně aktivní [30]. Tento jev nebyl doposud plně objasněn; přepokládá se však, že zatímco H3K9 metylace v oblasti promotoru genu způsobuje inaktivaci transkripce, totožná modifikace v kódující oblasti může mít opačný efekt. Díky tomuto poznatku bylo vyvráceno dogma o propojení HP1 výlučně s transkripčně neaktivním chromatinem [14, 41, 45].

V jadérku se HP1β vyskytuje v perinukleárním chromatinu a ve vysoké koncentraci byl detekován i v částech jadérka obsahujících bílkovinu fibrilarin [42], tudíž je vysoce pravděpodobné, že HP1□ se v jadérku paradoxně účastní regulace transkripce. Výskyt HP1α a HP1γ se také pojí s kompartmenty obsahujícími fibrilarin, ovšem koncentrace těchto sub-typů je v porovnání s koncentrací HP1β mnohem nižší [42].

HP1 v jadérku slouží jednak k udržení jeho struktury, jednak k regulaci transkripce. Například dimetylace H3K9 asociovaná s HP1γ a CSB proteinem má pozitivní vliv na transkripci rDNA genů (shrnuto v [14]). Naopak interakce mezi histonem H3 metylovaným v pozici lyzinu 9 a HP1□ udržuje stabilitu perinukleárního heterochromatinu, který tvoří jadérko.

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

Poděkování

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

Literatura

1. Snustad, et al., Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno (2009).
2. Cremer, et al., Nat Rev Genet **2**, 292 (2001).
3. Hernandez-Verdun, Histochem Cell Biol **125**, 127 (2006).
4. Raska, et al., Biol Cell **96**, 579 (2004).
5. Alberts, et al., Espero Publishing, Ústí nad Labem (1998).
6. Campbell, et al., Computer Press, Brno (2006).
7. Yokota, et al., J Cell Biol **130**, 1239 (1995).
8. Felsenfeld, et al., Nature **421**, 448 (2003).
9. Croft, et al., J Cell Biol **145**, 1119 (1999).
10. Lanctot, et al., Nat Rev Genet **8**, 104 (2007).
11. Cremer, et al., The nucleus. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 93 (2010).

12. Boyle, et al., Hum Mol Genet **10**, 211 (2001).
13. Olson, Springer, New York (2004).
14. Bártová, et al., J Histochem Cytochem **58**, 391 (2010).
15. Grummt, Genes Dev **17**, 1691 (2003).
16. Learned, et al., Mol Cell Biol **5**, 1358 (1985).
17. Prieto, et al., Biochim Biophys Acta **1783**, 2116 (2008).
18. Boisvert, et al., Nat Rev Mol Cell Biol **8**, 574 (2007).
19. Raška, et al., Int Rev Cytol **255**, 177 (2006).
20. Fatica, et al., Curr Opin Cell Biol **14**, 313 (2002).
21. Henderson, et al., Proc Natl Acad Sci U S A **69**, 3394 (1972).
22. Dev, et al., Genetics **86**, 389 (1977).
23. McStay, et al., Annu Rev Cell Dev Biol **24**, 131 (2008).
24. Koberna, et al., J Cell Biol **157**, 743 (2002).
25. Shaw, et al., EMBO J **14**, 2896 (1995).
26. Thiry, et al., RNA **6**, 1750 (2000).
27. Raška, Trends Cell Biol **13**, 517 (2003).
28. Cheutin, et al., Science **299**, 721 (2003).
29. Jenuwein, FEBS J **273**, 3121 (2006).
30. Kouzarides, Cell **128**, 693 (2007).
31. Lawrence, et al., Mol Cell **13**, 599 (2004).
32. Santoro, et al., Nat Genet **32**, 393 (2002).
33. Zhou, et al., EMBO J **21**, 4632 (2002).
34. Grummt, et al., Nat Rev Mol Cell Biol **4**, 641 (2003).
35. Santoro, et al., Mol Cell **8**, 719 (2001).
36. Sterner, et al., Microbiol Mol Biol Rev **64**, 435 (2000).
37. Rice, et al., Curr Opin Cell Biol **13**, 263 (2001).
38. Strašák, et al., J Cell Physiol **220**, 91 (2009).
39. Zhang, et al., Genes Dev **15**, 2343 (2001).
40. Bannister, et al., Nature **436**, 1103 (2005).
41. Santoro, et al., Mol Cell Biol **25**, 2539 (2005).
42. Horáková, et al., Chromosoma **119**, 227 (2010).
43. James, et al., Mol Cell Biol **6**, 3862 (1986).
44. Bártová, et al., J Cell Sci **118**, 5035 (2005).
45. Dialynas, et al., J Cell Sci **120**, 3415 (2007).
46. Minc, et al., Chromosoma **108**, 220 (1999).
47. Stixová, et al., Epigenetics and Chromatin **4,** 5 (2011)
48. Chakalova and Fraser, Cold Spring Harb Perspect Biol **2,** a000729 (2010)

Afiliace
Korespondence: Eva Bártová, E-mail: bartova@ibp.cz