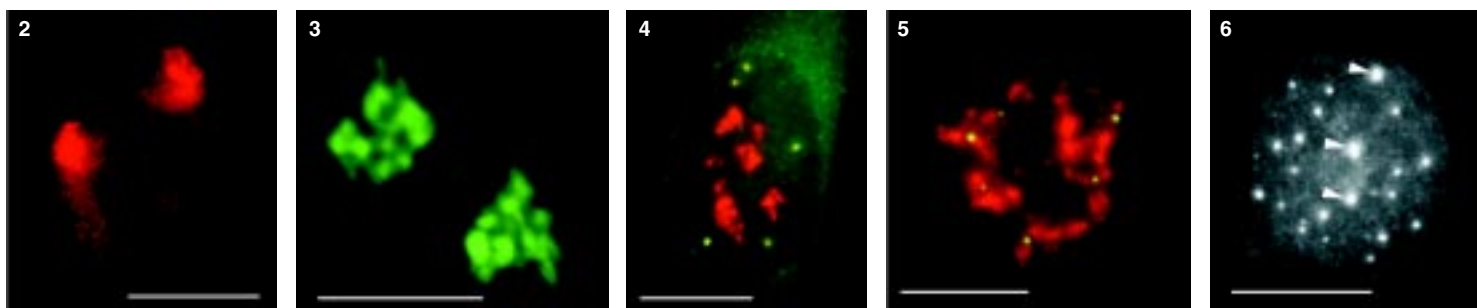


1. Nově replikovaná DNA lidské buňky HeLa značená modifikovaným nukleotidem. Buněčné jádro v pozdní fázi S buněčného cyklu je narušeno působením detergentu. Z obrázku je patrná původní akumulace DNA v několika stech jaderných replikačních center i rozvinutá DNA po uvolnění proteinových složek chromatinu působením detergentu. Lineární značené úseky jsou zvláště patrné vně jádra a odpovídají plně natažené dvojšroubovici DNA. Tímto způsobem lze měřit délku replikonu a rychlost replikační vidličky (za laskavé poskytnutí obrázku děkuji Dr. J. Malínskému). Měřítka 10 μm .

2. Výsledek fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) v diploidní lidské buňce se sondami specifickými pro lidský chromozom 1. V jádru jsou patrna dvě chromozomální teritoria. (Za laskavé poskytnutí obrázku děkuji Dr. I. Melčákovi.)



Buněčné jádro

*Jak vyrobit protein
a nezamotat se*

IVAN RAŠKA

Buněčné jádro popsal před více než 150 lety R. Brown. Dnes se o něj zajímají vědecké laboratoře po celém světě. Zájem samozřejmě pramení z toho, že jsou v jádře uloženy nositelé dědičné informace, chromozomy. Zároveň je výzkum jádra zajímavý proto, že je postaven před několik zásadních problémů. Žijeme v éře genomiky, pořadí nukleotidů v jednotlivých lidských chromozomech je již v podstatě stanoveno a na základě této znalosti můžeme určit detailní uspořádání genů. Víme však stále velmi málo o tom, jak jsou chromozomy v jádře organizovány. Význam genomiky je nezastupitelný, současně je však nutné si uvědomit, že jaderné procesy neprobíhají ve zkumavce, ale v rámci jaderné architektury, která se vyvíjela po miliony let.

Jak je možné, že jsou asi 2 m DNA v lidské buňce poskládány do jádra o průměru 10 μm? Navíc DNA musí být nejen uskladněna, ale během buněčného cyklu i zdvojená (replikována) právě jen jednou, a to pod bedlivým dohledem mechanismů zaručujících její bezchybné uchování. Poskládat DNA do jádra je jako uložit 2000 km dvoumilimetrového „vlasce“ do běžného obývacího pokoje v paneláku. Lidská somatická buňka však obsahuje 23 párů chromozomů s různým množstvím DNA (chromozomy mají různou velikost). V obývacím pokoji je tedy uloženo 46 více či méně rozmotaných obrovských „špulek“ vláknů! Z vlastní zkušenosti vím, že rozplést několik metrů

3. Obraz chromozomálního teritoria získaný jiným způsobem než na obr. 2. Do kultivačního média synchronizované buněčné kultury je po dobu celé fáze S (buněčný cyklus viz obr. 7) přidáván modifikovaný nukleotid, bromodeoxyuridin (BrdU), který je DNA-polymerázou začleněn do DNA místo deoxythymidinu. Nepoužitý BrdU je po sléze vymyt a buněčná kultura projde 5 buněčnými cykly, během nichž se chromozomy obsahující značenou DNA náhodně oddělují. Po 5 cyklech buněčné jádro obvykle obsahuje jen jeden nebo dva chromozomy značené BrdU. V imunofluorescenčním obraze s protilátkou proti BrdU vykazují teritoria jemnou strukturu v podobě subchromozomálních domén. (Za laskavé poskytnutí obrázku – konfokálního řezu – děkuji Mgr. M. Eltsovovi a Mgr. V. Čtrnácté.)

4. Jadérko značené protilátkou proti bílkovině fibrilarinu (červeně) a Cajalovo tělísko značené protilátkou proti proteinu p80-coilinu (zeleně). Cajalovo tělísko také obsahuje fibrilarin (signál v Cajalově tělísku je nažloutlý; kdyby zde fibrilarin nebyl obsažen, signál by měl výlučně zelenou barvu). To svědčí o tom, že Cajalova tělíska plní i obdobnou úlohu jako jadérko. (Za laskavé poskytnutí obrázku děkuji slečně L. Tomšíkové a slečně S. Ryšavé.)

5. Současné značení jaderných skvrn protilátkou proti bílkovině SC35 (červeně) a Cajalova tělíska protilátkou proti proteinu p80-coilinu (zeleně). SC35 je zkratka důležitého sestřihového proteinu SR. Cajalovo tělísko faktor SC35 neobsahuje. (Za laskavé poskytnutí obrázku děkuji panu J. Fisherovi.)

6. Fluorescenční obraz jádra, v němž byla detegována Cajalova tělíska (šipky) a tělíska PML.

POTÍŽE PŘI STUDIU JADERNÝCH PROCESŮ

Většina faktorů, které provádějí a regulují procesy replikace, transkripce a vyžrávání RNA, není dostatečně jedinečná. Např. skladba transkripční mašinerie přepisující geny aktinu a myozinu či jiných genů je často v prvním přiblížení identická. Svým způsobem lze říci, že jedinečnost je dána především pořadím nukleotidů v genu, respektive příslušné RNA.

K pochopení jaderných funkcí se používalo tří různých metodik v podstatě neprovázaných vědních disciplín. Biochemici a molekulární biologové se zabývali mechanismy biochemických reakcí, které analyzovali v bezbuněčných podmínkách *in vitro*. Genetici se snažili izolovat mutanty ovlivňující jadernou funkci a analýzou výsledného fenotypu odvozovali funkci daného proteinu či proteinů *in vivo*. A konečně strukturní biologové včetně morfologů popisovali, ať na molekulární či jaderné úrovni, strukturní změny za různých podmínek a odvozovali funkci jaderných makromolekul či kompartmentů. Částečně již v 80. letech a naplno teprve v letech 90. se všechny tři vědní disciplíny propojily a molekulárně-buněční biologové různé přístupy kombinují. To vše bylo doprovázeno rozsáhlým pokrokem v přístrojovém vybavení a metodách, jako jsou např. neofokální mikroskopie (viz Vesmír 74, 508, 1995/9) a neizotopová hybridizace *in situ*. A v tomto pozitivním smyslu prošly v 90. letech naše vědomosti o struktuře a funkci jádra „velkým třeskem“.

I. R.

zamotaného rybářského vlasce je svízelné, buněčné jádro to však musí zvládnout velmi rychle. Pokoj (jádro) je vlascem (DNA) doslova přeplněn, neboť je v komplexu s proteiny, jimž ve srovnání s vlascem přísluší asi dvojnásobný objem. Výsledný nukleoproteinový komplex, zvaný též **chromatin**, sám o sobě zabírá desítky kubických metrů prostoru obývacího pokoje (viz Vesmír 77, 390, 1998/7). Jak je vůbec v tak složitém prostředí organizován prepis určitého genu? A jak je to s navazujícími jadernými procesy genové exprese, zahrnujícími vyžrávání a úpravy molekul RNA (viz rámeček na této straně)?

Genová exprese

Připomeňme si zde základní etapy vyjádření genu (genové exprese) v jádře. Jeho první úrovní je transkripce – syntéza RNA podle předlohy DNA. Výsledkem je tzv. primární transkript. Transkripce se účastní několik desítek bílkovin v tzv. transkriptozomovém komplexu a ovlivňuje ho mimo jiné řada „návěstí“ na samotné molekule DNA, například promotorová sekvence, na kterou nasedá RNA-polymeráza, a různé další regulační oblasti. Tyto úseky zpravidla nejsou součástí prepisované sekvence DNA. Další stupeň genové exprese představuje vyžrávání primárního transkriptu spojené s jeho úpravami. Část informace obsažené v sekvenci vyžralé mRNA je v cytoplazmě přeložena do sekvence aminokyselin v polypeptidovém řetězci. (Podrobněji se genovou expresí zabývá tabulka na s. 570–571.)

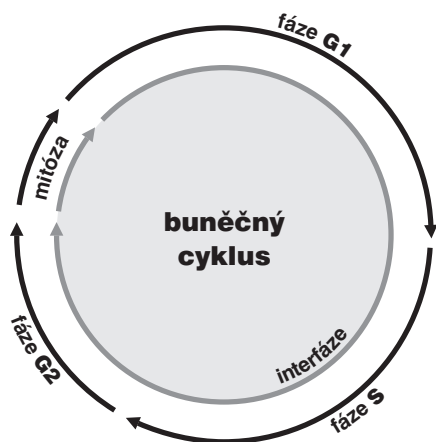
Poděkování autora: Článek je společným dílem pracovníků Laboratoře buněčné biologie, Ústavu experimentální medicíny AV ČR a Laboratoře genové exprese 3. Lékařské fakulty UK, kterým vzdávám dík. Mimo to chci poděkovat prof. K. Raškovi, dr. K. Kobernovi, dr. J. Malínskému a dr. D. Staňkovi za připomínky k článku, dr. J. Malínskému a panu J. Fischerovi za úpravu obrázků. Část mikroskopické dokumentace jsme zpracovali na konfokálním mikroskopu UK v Plzni, zde patří dík prof. J. Reischigovi a firmě Olympus. Vznik článku byl podpořen granty Wellcome Trust 049949/Z/97/Z/JMW/JPS/CG, Grantové agentury České republiky 302/99/0587 a 304/00/1481 a MŠMT VS 96129.

Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc., (*1945) viz Vesmír 79, 24, 2000/1



GRANTOVÁ AGENTURA ČR PŘEDSTAVUJE

7. Jednotlivé fáze buněčného či lépe jaderného cyklu eukaryont. Na základě optického pozorování lze rozlišit fázi mitózy, kdy mateřské jádro dává vzniknout dvěma novým jádrům, a interfázi, údobí mezi dvěma mitózami. Interfáze bývá dále rozdělována na období před počátkem replikace DNA, tzv. fázi G₁, období replikace, označované jako fáze S, a období mezi replikací a mitózou, zvané G₂. Na konec fáze M obvykle navazuje dělení buňky.



Genová exprese samozřejmě zahrnuje i návazné kroky, především transport mRNA do cytoplazmy, úpravy syntetizované bílkoviny a její nasměrování do cílového působíště (ať již uvnitř či vně buňky), které je často doprovázeno její chemickou modifikací, např. glykosylací nebo vyštěpením směrovacích signálů (viz Vesmír 79, 24, 2000). Množina přítomných proteinů a druh jejich modifikace určují funkční uspořádání příslušného buněčného kompartmentu (obr. 9).

Členění (kompartimentace) buněčného jádra

Buněčné jádro představovalo ještě před patnácti lety pro řadu biologů útvar, kde „v moři chromatinu plave jadérko“. Zcela odlišný obraz jádra však získáváme dnešními imunocytochemickými nebo hybridizačními přístupy (viz rámeček na této straně) při detekci

JÁDRO V RUKOU BIOLOGŮ

V současné době ovládla světelnou mikroskopii fluorescenční imunocytochemie, respektive fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH). V imunocytochemii využíváme vysoké vazebné síly protilátky vůči antigenu, zpravidla proteinu. Místo, na něž se tato „primární“ protilátka váže, detegujeme sekundární protilátkou (tj. protilátkou proti protilátce) s kovalentně navázaným fluorochromem (např. fluoresceinem, rhodaminem nebo v současné době hojně využívanými cyaninovými fluorochromy). Ve FISH místo primární protilátky používáme sondu nukleové kyseliny, v níž je sekvence nukleotidů v délce zpravidla několik desítek až stovek nukleotidů komplementární k sekvenci DNA či RNA, kterou chceme v buňce detegovat. V podstatě ve FISH probíhá obdobná reakce jako při vazbě antiparalelních řetězců v dvojšroubovici DNA. Sonda ovšem musí obsahovat specifickou značku, modifikovaný nukleotid, vůči kterému máme k dispozici protilátku s navázaným fluorochromem. Samozřejmě lze současně použít imunocytochemii a FISH (viz obrazové přílohy na s. 562 a 569). Ve fluorescenčním mikroskopu osvítlíme preparát dlouhovlnným UV-světlem, a tím přimějeme fluorochromy, aby vyzářily světlo ve viditelné oblasti spektra. Protože různé fluorochromy vyzářují ve vymezených vlnových délkách, lze současně detegovat několik různých antigenů či sekvencí nukleových kyselin (např. v červené, žlutozelené či fialové barvě). Imunocytochemické a FISH přístupy zpravidla (naštěstí ne vždy, viz některé dokumentované obrázky replikace a transkripce či použití hybridních proteinů GFP) vypovídají o rovnovážné distribuci makromolekul. Studujeme-li nějaký buněčný proces, detegujeme v rámci tohoto procesu jeho nejpomalejší kroky. Třeba při rychlosti eukaryotní RNA-polymerázy řádově asi 1000 nukleotidů za minutu může přepsání delších genů (např. gen dystrofinu) trvat desítky minut, ba i hodin (viz též článek E. Dráberové, Vesmír 79, 438, 2000/8). I. R.

jaderných bílkovin, genů nebo RNA. Mnoho těchto makromolekul je lokalizováno do zřetelně odlišitelných jaderných oblastí či domén. Jádro je tedy strukturálně členěno – kompartmentováno (obr. 8 a 10).

Chromatinové struktury do značné míry zaplňují jádro. Zbývající prostor jádra se nazývá **interchromatinový prostor** či **interchromozomální systém kanálů**. RNA je syntetizována na povrchu chromatinových struktur a po ukončení syntézy je uvolňována do interchromatinového prostoru. V něm se také sestavují multienzymové komplexy, zajišťující např. transkripci (transkriptozomy) či sestřih (spliceozomy).

V interchromatinovém prostoru se odehrává metabolismus RNA a nacházíme v něm řadu jaderných tělísek a domén – především **jadérko** (obr. 4); dále pak **Cajalova tělíska**, **tělíska PML** (promyelocytic leukemia), **jaderné skvrny** (obr. 4, 5 a 6) a několik dalších. S výjimkou jadérka dosud neznáme přesnou funkci žádného z nich.

DNA, chromatin a chromozomy

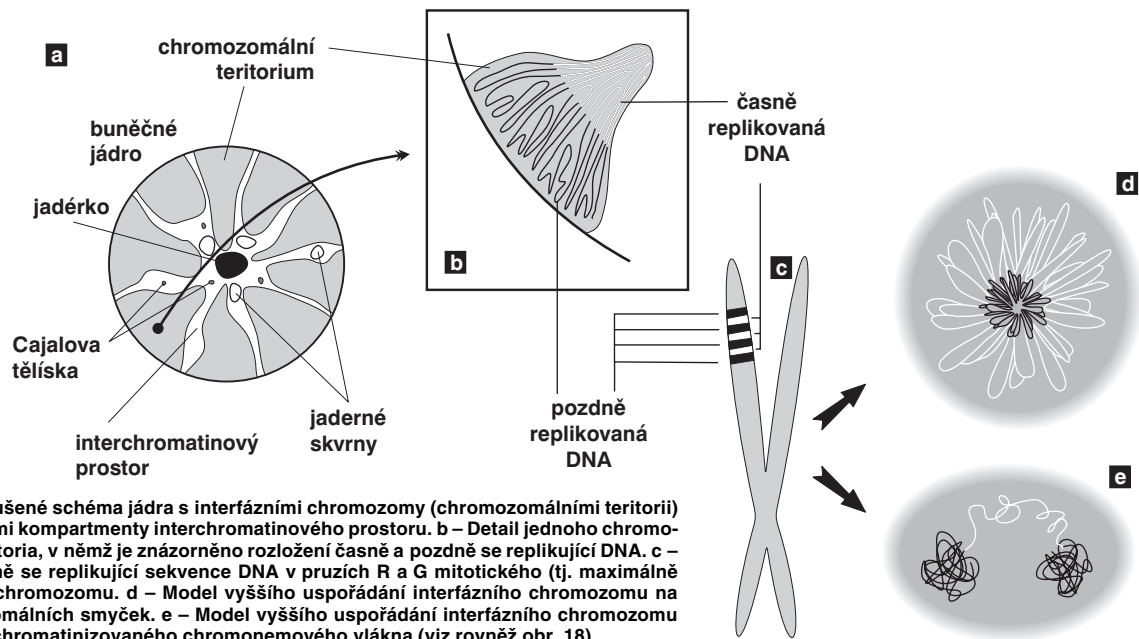
DNA je v buněčném jádře přítomna v komplexu s bazickými proteiny histony a nehistonovými bílkovinami ve formě chromatinu. Vzhledem k své délce je v chromatinu poskládána hierarchickým způsobem (viz Vesmír 77, 390, 1998/7). Nejvíce je kondenzována v mitotickém chromozomu. Interfázní chromatinová struktura je naopak více či méně rozvolněna (buněčný cyklus a pojmy s ním spojené vysvětluje obr. 7). Detailně známe pouze nejnižší stupeň interfázní hierarchie, tzv. nukleozomální uspořádání chromatinu neboli 10nm chromatinové vlákno. V něm jsou zhruba dvě otočky dvojšroubovice DNA svinuty do nukleozomu, obsahujícího histony. Svinutím 10nm vlákna vzniká vlákno 30nm. Jeho existence je obecně akceptována, jeho přesná struktura však není známa. Otázkou zůstává způsob poskládání 30nm vlákna do chromatinových struktur vyšších řádů, chromozomálních smyček anebo chromonemových vláken, ač se v učebnicích pravidelně setkáváme s různými spekulativními schématy. Víme však, že chromatinové struktury jednotlivých chromozomů nejsou navzájem promíchány a vytvářejí uvnitř jádra oddělená chromozomální teritoria (obr. 2 a 3). Existuje rovněž řada poznatků o tom, že vzájemné uspořádání chromozomálních teritorií v jádře není zcela náhodné a že transkripční aktivity jsou lokalizovány na povrch chromozomálních teritorií (resp. na povrch subchromozomálních domén; obr. 2 a 3).

Abý určitý gen mohl být přepsán RNA-polymerázou, musí mít polymeráza k sekvenci DNA přístup, kompaktnost chromatinové struktury musí být narušena. Přesný způsob a rozsah rozvolnění chromatinu však není v běžné (např. lidské) buňce znám. (Výjimku tvoří např. štětkovité chromozomy ve vajíčkách obojživelníků. Hledat však plnou analogii mezi speciálními případy a diploidní somatickou savčí buňkou může být zavádějící.)

V nejbližší době patrně dojde ke zvratu v poznání vyšších řádů organizace chromatinu, resp. chromozomů. Naznačuje to např. nedávný objev rozsáhlé rodiny proteinů SMC (Structural Maintenance of Chromosomes), které se podílejí na utváření jak mitotických chromozomů, tak interfázního chromatinu a také na metabolismu DNA včetně jejích oprav. Obrovského pokroku bylo dosaženo ve strukturálním popisu lokálního uspořádání chromatinu na úrovni 10nm vlákna. Mluví se o remodelaci chromatinu, ať již ve smyslu aktivace nebo represe transkripce, či –



GRANTOVÁ AGENTURA ČR PŘEDSTAVUJE

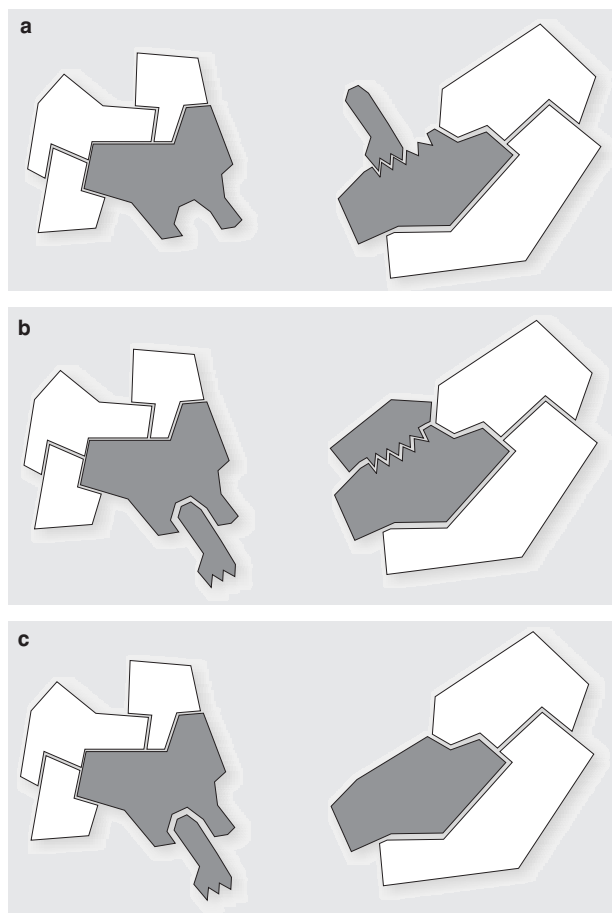


8. a – Zjednodušené schéma jádra s interfázními chromozomy (chromozomálními teritorii) a nejznámějšími kompartmenty interchromatinového prostoru. b – Detail jednoho chromozomálního teritoria, v němž je znázorněno rozložení časné a pozdně se replikující DNA. c – Časné a pozdně se replikující sekvence DNA v pruzích R a G mitotického (tj. maximálně „sbaleného“) chromozomu. d – Model vyššího uspořádání interfázního chromozomu na bázi chromozomálních smyček. e – Model vyššího uspořádání interfázního chromozomu na základě euchromatinizovaného chromonemového vlákna (viz rovněž obr. 18).

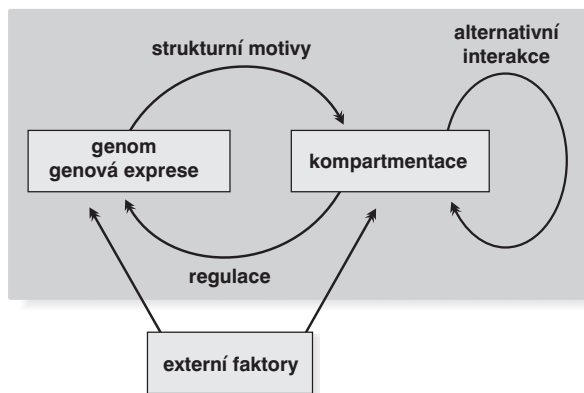
řečeno trochu jinak – o aktivním vlivu struktury chromatinu na genovou expresi, přičemž nejdiskutovanějšími ději jsou dnes acetylace a deacetylace histonů, popř. metylace a demethylace DNA. DNA-polymeráza, RNA-polymerázy a celá paleta regulačních proteinů jsou cílově nasměrovány genově specifickými regulátory a vyvolávají lokální změnu v uspořádání chromatinu, která se projevuje dvojitou možností funkce, buď transkripce, nebo replikace (obr. 8 a 10). Chybné nasměrování těchto a jiných enzymů a regulačních faktorů vede k nežádoucím změnám buněčného metabolismu.

Genom člověka obsahuje řádově 100 000 genů. Jejich délka činí jen několik málo procent celkové délky DNA v genomu. Navíc se v diferencované buňce exprimuje jen část genů. Cytogenetici vypracovali detailní mapy mitotických chromozomů pomocí cytochemických pruhovacích metod (obr. 8; viz rovněž Vesmír 70, 326, 1991/6). Modifikovaným barvením podle Giemsy vznikají na mitotickém chromozomu rovnoběžné **G-pruhy**, kolmé k delší chromozomální ose. Při jiném barvení vznikají komplementární **R-pruhy**. Zatímco R-pruhy odpovídají v interfázi spíše rozvolněnějšímu chromatinu (**euchromatinu**) a jsou v nich umístěny geny, G-pruhy odpovídají

v interfázi kondenzovanějšímu, transkripčně neaktivnímu chromatinu – **heterochromatinu** – a jsou v nich lokalizovány hlavně nekódující sekvence DNA. V mitotickém chromozomu se střídají části, které jsou v interfázi aktivní a neaktivní. V interfázi se v rámci jednoho chromozomálního teritoria aktivní a neaktivní části genomu prostorově oddělují. Aktivní oblasti chromozomálního teritoria se nacházejí spíše „uvnitř“ jádra, neaktivní na jeho periferii. Tento nálezný má zásadní význam, neboť svědčí o pohybu a reorganizaci interfázního teritoria vzhledem k uspořádání chromozomu mitotického. V tomto



9. Značná část obsahu článku je obsažena v tomto schématu, které popisuje dva vybrané příklady nového jaderného uspořádání makromolekul související s podstatou jaderné kompartmentace (viz rovněž obr. 10). Požadavek pro interakci, a tudíž zabudování makromolekuly do nějaké jaderné struktury, nezávisí jen na strukturálním motívu pro interakci, ale také na síle interakcí ostatních částí makromolekuly, jež jsou zprostředkovány jinými strukturálními motívy. V tomto případě se může stát, že je makromolekula na základě dvou strukturálních motívů kompartmentována do dvou různých struktur. Panel a ukazuje základní fyziologický stav uspořádání jaderných složek ve dvou různých kompartmentech. Panel b znázorňuje nové uspořádání makromolekuly způsobené přítomností jiné (např. nově syntetizované) makromolekuly s vyšší vazebnou afinitou. Panel c je příkladem obměny strukturálního motívu, např. fosforylací či defosforylací pomocí proteinokináz a fosforyláz. V tomto případě je výsledkem stejné uspořádání jako v předchozím případě. Za důležitou považují tu skutečnost, že interakce v daném komplexu makromolekul mohou být řízeny faktory, které jsou vyvázány v jiné, prostorově „vzdálené“ struktuře (kompartmentu). Jinými slovy to znamená regulaci na dálku! Tento regulační aspekt nelze vhodným způsobem postihnout v podmínkách *in vitro*, kde jsme schopni analyzovat do detailů jeden proces, ale nemůžeme dost dobře zároveň sledovat i další proces, odehrávající se na jiné struktuře. Potřebujeme k tomu kontext celého jádra, resp. celé buňky. To jen podtrhuje důležitost molekulární buněčné biologie. (Ze společné práce s dr. I. Melčákem.)

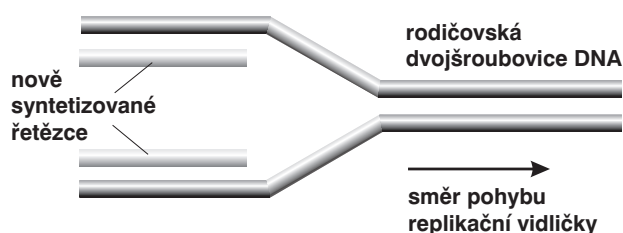


10. Zjednodušené schéma dokumentující vztah mezi genomem (genovou expresí) a jadernou kompartmentací. Domnívám se, že za kompartmentaci je odpovědná genetická informace a její exprese, a to prostřednictvím specifických strukturních motivů v jaderných složkách (proteinech, RNA či DNA; viz obr. 8). Kompartmentace ovlivňuje genetickou informaci (genovou expresi) skrze prostorové přemístění potřebných faktorů. Genová exprese zpětně moduluje kompartmentaci. Nicméně kompartmentace může být ovlivněna i prostřednictvím jiných strukturních motivů. Vnější podněty (např. pokusy s umělou infekcí, viry, hormony, inhibitory transkripce, tepelný šok) ovlivňují jak genovou expresi, tak kompartmentaci a mohou spustit jiné dráhy v interakcích. Výsledkem je jak pozměněná genová exprese, tak kompartmentace. Tyto nové dráhy jsou doprovázeny menšími, ale často i zcela zásadními změnami v jaderné architektuře (viz např. obr. 23). (Ze společné práce s dr. I. Melčákem.)

ohledu také není struktura teritoria homogenní, je složena ze **subchromozomálních domén** (obr. 3) a svědčí o částečném rozvolnění chromatinových struktur. Někteří autoři mluví dokonce o doménách s velikostí 400 až 800 nm, z nichž je teritorium vytvářeno. Objem interfázního chromozomu je přitom závislý na počtu jeho aktivních genů, tj. na zvýšení povrchu teritoria čili na rozsahu rozvolnění (euchromatinizace) chromatinu. Čím je počet aktivních genů vyšší, tím větší prostor teritorium zaujímá. Klasickým příkladem je srovnání aktivního a inaktivního X-chromozomu v lidské buňce ženského pohlaví (viz rovněž obr. 18).

Uspořádání chromatinu je důležité z hlediska replikace DNA. Vznikají při ní dvě dvojšroubovice, každá se skládá z jednoho řetězce původního a jednoho nově syntetizovaného (obr. 11). Miliardy nukleotidů lidské DNA jsou během několika málo hodin věrně zdvojeny. Jestliže si představím výše uvedenou analogii s vlascem, je to pro mne něco nemyslitelného. Před zahájením vlastní replikace nejprve vznikají prereplikační komplexy. Vlastní replikační komplex zahrnuje desítky dalších proteinů, od DNA-polymeráz až po enzymy, které přestříhnou a znovu spojí vlákna DNA. Ty také alespoň zčásti řeší, jak by se mohly bezchybně prostorově oddělit dceřiné řetězce DNA. Konečný výsledek se projeví až během mitózy

11. Schéma replikační vidličky vznikající při syntéze DNA



oddělením dceřiných DNA do dvou identických chromatid.

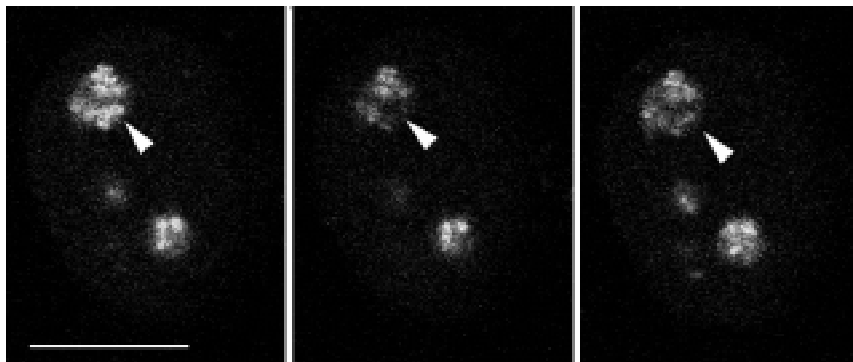
DNA-polymerázy eukaryotní buňky začleňují do nově vznikajícího řetězce DNA řádově jen asi 1000 nukleotidů za minutu. Je proto nutné, aby syntéza DNA probíhala současně na mnoha místech každého chromozomu. Vznikají stovky až tisíce replikačních jednotek, **replikonů**. Aktivita replikonu je ukončena v okamžiku, kdy replikační vidlička narazí na vedlejší aktivní replikon, popř. na již duplikovaný úsek DNA nebo na úsek DNA, který má být replikován později. Na buněčné úrovni vznikají replikační domény či ohniska (obr. 1, 14–16), přičemž každé z nich obsahuje jeden nebo několik, zpravidla sousedících replikonů. Replikony jsou dlouhé v průměru 100 000 nukleotidů, ale připouští se existence i replikonů mnohonásobně delších. Někteří autoři spekulují, že replikační ohniska odpovídají výše popsaným subchromozomálním doménám. Za důležitý nálezn považují skutečnost, že na počátku fáze S buněčného cyklu se jako první začínají replikovat především sekvence genů aktivních v předcházející fázi G1. To je snad usnadněno rozvolněnou strukturou chromatinu a faktory, které jsou přítomny v transkriptozomu a současně hrají úlohu při replikaci. V pozdní fázi S se replikují sekvence, které tvoří G-pruhy mitotického chromozomu.

Subchromozomální domény nás přivádějí k dalšímu biologickému problému. Regulační sekvence genu totiž nestačí k zajištění jeho exprese, která vyžaduje přítomnost mnohem delších specifických úseků DNA. Ukazuje se, že chromatin je organizován do nezávislých jednotek genové aktivity uspořádaných do menších či větších subchromozomálních domén a vymezených specifickými hraničními elementy. Ty izolují gen od vlivu sousedních sekvencí DNA. Nejpropracovanější modely této vyšší funkční organizace chromatinu jsou jednak *locus control region* (LCR) u savců, jednak *special chromatin structures* (scs a scs') u drozofily (obr. 17).

Na tomto místě je vhodné se zmínit o **modelu euchromatinizovaných chromonemových vláken**, která obsahují genové úseky lokalizované do R-pruhů. Na dlouhé sekvence obsahující aktivní geny (řádově miliony nukleotidů, čili množství DNA obsažené v jednotlivých pruzích mitotického chromozomu) jsou navázány regulační faktory (včetně např. acetyltransferáz). Vazba těchto faktorů pak vede k rozvolnění lokální chromatinové struktury, k euchromatinizaci. Ta dále indukuje rozvolňovací aktivitu i v sousedním chromatinu obsahujícím neaktivní geny a euchromatinizace se šíří po délce DNA odpovídající v mitóze R-pruhu. Taková interpretace je patrná z obr. 18a a 18b a ukazuje rovněž na přímý vliv změn lokální struktury chromatinu (na úrovni 10nm vlákn) na chromatinové struktury řádů vyšších.

Jak by se mohlo zdát, pro život buňky je důležitá jen ta malá část genomu, která obsahuje geny. Jakou funkci ale hrají zbylé sekvence lidské DNA, skládající se z mnohonásobně se opakujících identických či skoro identických kratších či delších úseků, nefunkčních duplikovaných genů apod.? V posledních letech již bylo prokázáno, že neaktivní heterochromatin sám o sobě hraje důležitou úlohu v genové expresi. Jestliže je aktivní gen, který se původně nachází v euchromatinu, přemístěn do heterochromatinové oblasti, jeho exprese je potlačena. Tento vliv polohy genu v rámci chromozomu (chromatinu) na jeho expresi je nejrozsáhleji propracován u drozofily a v menší míře i u savců. Např. transkripční regu-

12. Dynamika jádra dokumentovaná metodou FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching). V tomto případě byla v buňce exprimující hybridní protein fibrilarin-GFP osvětlena část jádérka silným laserovým zdrojem světla (a; šipka), takže v osvětlené oblasti se okamžitě vysvítl (vybělí) přítomné fluorochromy (b). Po velmi krátké době (řádově vteřinách, maximálně desítkách vteřin) však začne vybělená část jádérka opět fluoreskovat (c). Jiné hybridní proteiny GFP (včetně nově syntetizovaných bílkovin) putují do vybělené části jádérka a nahrazují proteiny původní. V podobném uspořádání lze provádět důležitou metodu FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching). (Za laskavé poskytnutí obrázku děkují dr. J. Malinskému a dr. D. Staňkovi.) Měřítka 10 μ m.



látor Ikaros se uplatňuje během diferenciacie lymfoidních buněk. Zatímco sledované aktivní geny jsou součástí euchromatinu, pohyb genů jádrem do heterochromatinové oblasti, v níž je přítomen Ikaros, je doprovázen inaktivací (umlčením) genů (obr. 21). Z uvedeného vyplývá další aktivní úloha chromatinu: nejen umožnit regulovanou genovou expresi prostřednictvím euchromatinu, ale též – prostřednictvím heterochromatinu – zamezit nechtěným interakcím.

Jadérko

Biosyntéza ribozomů se odehrává v jádru, které se vytváří v místech odpovídajících v mitóze chromozomálním organizátorům jádérka (nucleolar organizer regions – NOR), tedy těm oblastem DNA, kde jsou umístěny geny pro ribozomální DNA (rDNA). V lidské diploidní buňce se v organizátorech 10 chromozomů vyskytuje asi 400 genů a každý organizátor obsahuje mnoho genů uspořádaných za sebou. Ne vždy jsou všechny organizátory v interfázi aktivní a i několik aktivních organizátorů může být součástí jediného jádérka. V lidské buňce nacházíme zpravidla jedno až tři jádérka. Transkripční aktivita zjevně vede k vytvoření stabilně fungujícího jádérka v interfázi. Při mitóze se transkripce utlumuje, jádérko se rozpadá do malých tělísek, která po mitóze ihned splynou v místě organizátoru a vytvoří nové funkční jádérko. Některé složky jádérka, např. RNA-polymeráza I, zůstávají během mitózy asociovány s organizátorem na chromozomu. To vše svědčí o tom, že buňka je dobrým hospodářem. Využije části rozpadlých jáderek a je schopna okamžitě po mitóze začít s výrobou ribozomů. Vysoce ekonomicky se ostatně buňka chová i v případě syntézy RNA mimo jádérko.

Tvorba ribozomu je komplexní proces zahrnující transkripci (obr. 19 a 20) 45S prekurzorické rRNA, její vyzrávání, modifikaci a rovněž asociaci rRNA s ribozomálními proteiny a 5S rRNA, která se syntetizuje mimo jádérko (podrobně na s. 570–571). Vyzrávání rRNA se účastní mnoho proteinových faktorů a snRNA v komplexu, jemuž se říká **procésom**. Zmíněné snRNA jsou vzhledem k své lokalizaci nazývány malé jádérkové RNA (snoRNA) a obsahují funkčně důležité sekvence.

Ač byla funkce jádérka v biosyntéze ribozomů popsána na počátku 60. let, dosud není známo, jakým způsobem jsou ribozomální částice dopravovány z jádérka do cytoplazmy. Mezi další možné funkce jádérka lze zahrnout:

- účast v jaderném importu a exportu, včetně exportu a degradace mRNA;
- účast v biosyntéze SRP (Signal Recognition Particle – viz Vesmír 79, 24, 2000) a telomerní RNA (telomery jsou konce chromozomů; v interfázi jsou telomerní sekvence součástí heterochromatinu);

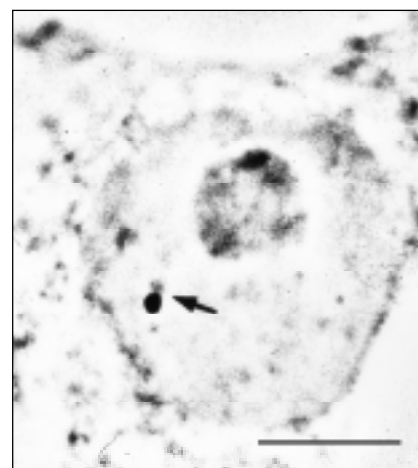
- hromadění důležitých makromolekul (např. faktorů regulujících buněčný cyklus), což jim zabraňuje plnit jejich funkce;
- účast na vyzrávání některých snRNA a tRNA.

Syntéza RNA mimo jádérko a její sestřih

Transkripce probíhá na povrchu chromatinových struktur v **perichromatinové oblasti** interchromatinového prostoru. Většina primárních transkriptů obsahuje introny, které musí být vystřiženy před transportem RNA do cytoplazmy, přičemž vystřižené introny jsou zpravidla rychle rozloženy. K sestřihu dochází často souběžně s transkripcí, ještě když je syntetizovaná RNA spojena s místem transkripce. Je však známo, že část prekurzorických RNA obsahuje introny i polyadenylovaný konec, jenž ale vzniká až po ukončení syntézy primárního transkriptu. Některé molekuly RNA proto musí být sestřihány až po transkripci. Prekurzorická RNA se v těchto případech uvolňuje z místa transkripce a je sestřihána na jiném místě interchromatinového prostoru.

Sledujeme-li obraz FISH (viz rámeček o metodice na s. 564) specifické RNA, včetně specifického označení intron-exonových a exon-exonových spojení, pozorujeme signál buď ve formě *terčičku*, v podstatě velmi podobný signálu genu, nebo ve formě protaženého signálu neboli *jaderné cestičky* (obr. 22). Sledujeme-li distribuci transkripčních a sestřihových faktorů, je možné fluorescenční signál v interchromatinovém prostoru rozdělit do dvou kategorií. První není výrazný a odpovídá spíše difuznímu signálu s místy fokální akumulace. Druhý odpovídá v savcích buňkách nahromadění faktorů v asi 10 až 50 fluorescenčně intenzivních jaderných skvrnách (obr. 5). Řada těchto faktorů, ale ne všechny (obr. 5), jsou obsaženy rovněž v několika Cajalových tělískách

13. Obraz Cajalova tělíska (tmavě) a asociovaného světlejšího GEM označeného šipkou. V tomto případě nebyla použita fluorescence, ale imunocytochemický přístup s protilátkou vůči p80-coilinu a sekundární protilátkou nesoucí značku pro stříbrčí metodu. Po aplikaci stříbrčí metody byl snímek zhotoven ve fázovém kontrastu. (Za laskavé poskytnutí obrázku děkují dr. I. Melčákovi.) Měřítka 10 μ m.



GRANTOVÁ AGENTURA ČR PŘEDSTAVUJE

(v lidské buňce zpravidla v jednom až pěti). Ta mají průměr menší než mikrometr a bývají někdy asociována s jadernými skvrnami a jádérky.

Jak lze tyto obrazy interpretovat? Signál mRNA ve formě terčíku přísluší zpravidla genu s relativně malou transkripční aktivitou, přičemž množství uvolněné RNA z místa transkripce, ať již sestřížené či ne, je pod detekční schopností FISH. Je možné na něj také nahlížet jako na právě aktivovaný gen (obr. 22b). V případě jaderných cestíček zjevně jde o gen s vyšší aktivitou, přičemž RNA nebyla vůbec sestřížena, nebo byla sestřížena jen zčásti, neboť cestíčky obsahují jak exony, tak introny.

Jaderné skvrny

Primární roli jaderných skvrn v transkripci lze vyloučit, neboť transkripční signál je v nich příliš nízký. Jaderné skvrny slouží jako zásobárny faktorů, které jsou rekrutovány aktivními geny nacházejícími se v blízkosti skvrn. Nicméně cestíčky vytvořené nesestříženou mRNA vedou od genu k těmto skvrnám (obr. 22e), které tak v sestřihu mohou hrát aktivní roli. Jak ale potom vysvětlit nízký transkripční signál ve skvrnách? Imunocytochemií a metodou FISH (viz rámeček na s. 564) detegujeme nejpomalejší kroky v rámci nějakého procesu. A jedním z takových procesů je právě transkripce. Na rozdíl od základního sestřihu může být regulovaný (či alternativní) sestřih zpomalený, a navíc může být prostorově oddělen od sestřihu probíhajícího během transkripce. Pozorovatelný transkripční signál ve skvrnách proto nemůže být výrazný. Jaderné skvrny se jeví nejen jako zásobárny transkripčních a sestřihových faktorů a jako možná místa regenerace či tvorby transkripčních a sestřihových komplexů, ale také jako místa aktivního sestřihu části prekurzorických mRNA.

Cajalova tělíska

O Cajalových tělískách se soudí, že jsou místem tvorby transkripčních i sestřihových komplexů. Hrají snad také roli v jejich recyklaci a nitrojaderném transportu. Uplatňují se v místech transkripce specifických genů, např. genů pro některé snRNA a rovněž aktivních histonových genů. Obsahují řadu jádérkových složek (obr. 4) a plní zjevně i jistou úlohu spolu s jádrem, s nímž se často spájejí.

Jádro jako dynamická organela

Z uvedeného zatím nevyplývá dynamický charakter jádra. Spíše se může zdát, že v jádře existují stabilní oblasti, i když v rámci nějakého rovnovážného rozmístění makromolekul. Opak je pravdou. Dynamika jádra je úžasná. Pohyb na úrovni kompartmentů či subkompartmentů potvrzují četné experimenty (obr. 18). Rychlost pohybu chromatinu, měřená např. pohybem centromery, je mezi jedním a deseti mikrometry za hodinu. Také inhibitory syntézy RNA vyvolají rozsáhlé změny struktury jádra ve velmi krátké době (obr. 23). Změna polohy genu v jádře je ve specifických případech mikroskopicky registrována již 5 minut po jeho aktivaci.

Velmi rychlá je v jádře i záměna identických makromolekul (obr. 12). Např. histony, které jsou součástí nukleozomu, jsou v chromatinu stabilně zabudovány, ale histon tvořící spojení mezi dvěma nukleozomy setrvává na místě řadově jen několik vteřin, než je nahrazen stejným typem histonu. Jak je to s pohybem makromolekul v interchromatinovém prostoru? Současné poznatky hovoří spíše o difuzi (obr. 24), ale především v souvislosti se za-

14. Fluorescenční obraz replikace (zeleně) a transkripce (červeně) v kultivané lidské buňce v časně fázi S. Obraz se skládá z velkého počtu zelených a červených domén a výjimečně je vidět překryvy ve formě domén žlutých. Snímek svědčí o tom, že na replikované sekvenci DNA dochází k útlumu transkripční aktivity. Povšimněte si, že transkripční signál v jádru (tmavě skvrny bez fluorescenčního signálu) není detegován. Je to způsobeno fixací buněk a nedostupností BrU pro protilátku. Při použití jiné fixace lze v jádru zaznamenat vysoký transkripční signál (viz obr. 19 a 20). (S laskavým svolením Springer-Verlag přetištěno z Chromozoma 108, 325–335, 1999.)

15. Posun replikačního signálu v čase. Většina replikačních domén vykazuje buď zelenou, nebo červenou barvu, žlutá barva není tak častá. To znamená, že replikační domény odpovídající dvěma časově odděleným pulzům již zpravidla nekolokalizují. (S laskavým svolením Springer-Verlag přetištěno z Chromozoma 108, 325–335, 1999.)

16. Detekce replikační aktivity (podobně jako na obr. 14 a 15) v natažených vláknech DNA po rozbití buňky i jádra. Obrázek dokumentuje směr replikace (od zeleně k červeně) a rychlost replikace (délkou značených úseků DNA). Rychlost replikační vidličky je v rozmezí 0,21 až 0,55 μm za minutu. (Za laskavé poskytnutí obrázku děkuji dr. J. Malinskému.)

17. Polytenní chromozom octomilky (*Drosophila melanogaster*) je přítomen v oběh buňkách slinných žláz. Vzniká mnohonásobnou duplikací DNA, výsledkem je několik set dvojrůbovic DNA uložených paralelně jedna vedle druhé. Na snímku vyznačuje hraniční domény (zeleně) protilátka proti proteinu BEAF, který se váže na sekvence scs'. Současně byl mapován sestřihový faktor SC35 (červeně). (Za laskavé poskytnutí obrázku děkuji Mgr. M. Eltsovovi.) Měřitko 5 μm .

18. Uměle vytvořené obří subchromozomální domény v buněčné línii křečce, čítající 90 milionů párů nukleotidů (90 Mbp) v dvojrůbovic DNA, v její kondenzované (a) a euchromatinizované formě (b). Doména se skládá ze stovek duplikovaných identických genů dihydrofolátreduktázy s vmezeřenými úseky obsahujícími opakující se vazebné sekvence pro represor laktózy. Represor vykazuje vůči této sekvenci vysokou vazebnou sílu. Té je využito na snímku a, kdy buňky byly transfektovány konstrukt, který exprimuje hybridní protein složený z represoru laktózy a GFP (green fluorescent protein; nicméně je zde fluorescence uměle dokumentována červeně). Vazbou hybridního proteinu na vazebnou sekvenci můžeme tuto doménu pozorovat. Přístupy využívající hybridní proteiny s GFP patří v posledních letech mezi rozšířené přístupy molekulární buněčné biologie, neboť hybridní protein fluoreskuje a lze pozorovat i živé buňky. Obraz (a) představuje detekci obří subchromozomální heterochromatinové domény o průměru asi jeden mikrometr a nacházející se poblíž jaderného obalu. V obraze (b) byl pro transfekci použit podobný GFP-konstrukt, který navíc obsahoval kódující sekvenci pro aktivní doménu velmi silného aktivátoru transkripce, faktoru VP16. Tím byla euchromatinizována chromozomální doména, která vykazuje délku 25 až 40 μm s tloušťkou chromonemového vlákna okolo 100 nm. Po euchromatinizaci odpovídá velikost domény několika chromozomálním teritoriím (je zajímavé srovnání její velikosti s obrazem domény v (a)!). K euchromatinizaci došlo i nezávisle na aktivní transkripci, tj. i v případě podání inhibitoru syntézy RNA. Aktivní doména v hybridním proteinu vázaném na DNA sama o sobě vyvolá masivní zapojení faktorů účastících se přestavby chromatinu, včetně transkripčního aparátu, a lokální změny ve vyšším hierarchickém uspořádání chromatinu se rozšíří na celou 90 Mbp subchromozomální doménu. Cytochemicky byla v (a) i (b) dobarvena (zeleňomodře) DNA. (Přetištěno z J. Cell Biol. 145, 1341–1354, 1999; za laskavé poskytnutí obrázků děkuji Dr. A. Belmontovi a za laskavý souhlas s jejich použitím The Rockefeller University Press). Měřitko 5 μm .

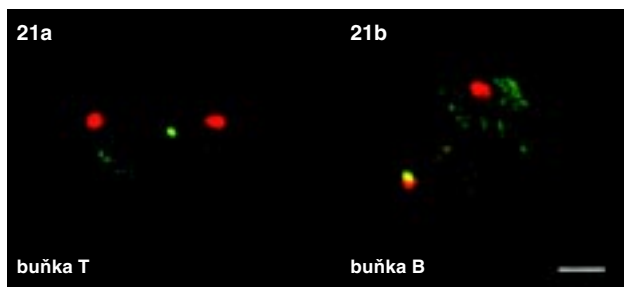
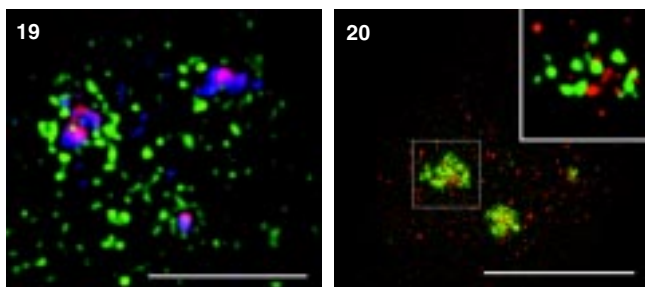
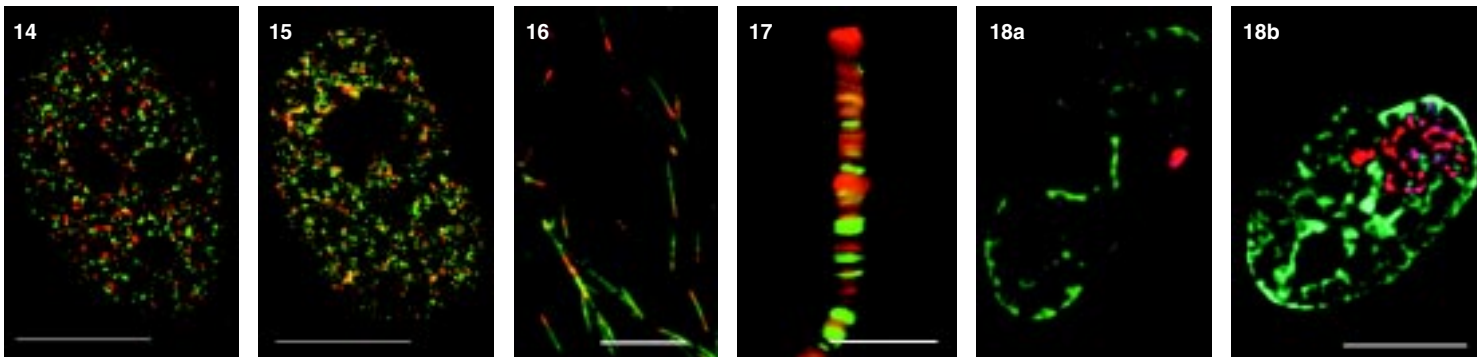
budováním makromolekul na určitá místa (tj. do určitého kompartmentu), či naopak s jejich uvolňováním jde zjevně o pochody vyžadující energii.

Buněčné jádro a nemoc

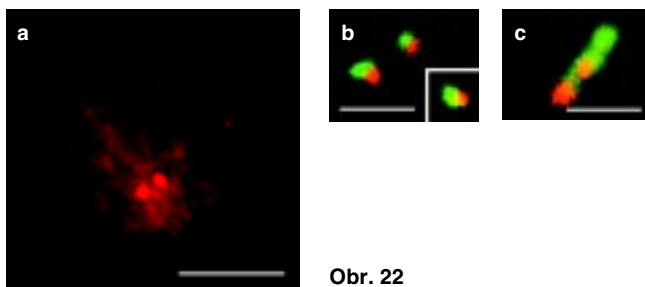
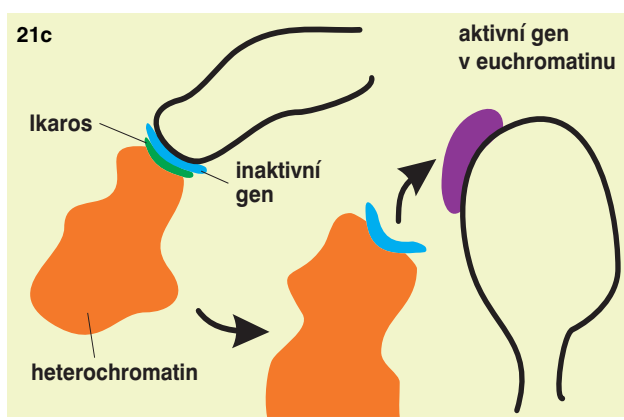
Změny ve struktuře buněčného jádra jsou asociovány s bezpočtem onemocnění, která často souvisí se změnou chromatinu. Uvedu jen dva příklady související s jadernými kompartmenty v interchromatinovém prostoru, Cajalovými tělisky a tělisky PML.

23. Inhibitor syntézy RNA (v tomto případě α -amanitin) vyvolá velmi rychle změnu uspořádání jádra (b) ve srovnání s normálním stavem (a). Dokumentována je změna jaderných skvrn (mapován byl faktor SC35), které se zvětší a zakulatí. Zároveň se sníží celkový nukleoplazmatický signál. (S laskavým svolením Springer-Verlag přetištěno z Chromozoma 108, 325–335, 1999.)

24. Pohyb mRNA skládající se ze dvou exonů a jednoho intronu. Po mikroinjekci je RNA signál v jádře víceméně homogenní. Po několika minutách se mikroinjekovaná RNA akumuluje v jaderných skvrnách, jak je v obrázku dokumentováno žlutou barvou (c). Pohyb v interchromatinovém prostoru zjevně odpovídá difuzi. RNA byla detegována červeně (a) a jaderné skvrny zeleně (b). Kombinace obou signálů je patrná jako žlutá barva na snímku c. (Za laskavé poskytnutí obrázku děkuji dr. I. Melčákovi.)



19. Detekce replikace (zeleně), rRNA (červeně) a transkripčních míst (modře) v jadérku v časně fázi S buněčného cyklu. Replikační signál není v jadérku detegovatelný, neboť rDNA je replikována v pozdější etapě fáze S. Transkripční místa částečně odpovídají místům distribuce rRNA (fialově). (Za laskavé poskytnutí obrázku děkuji Mgr. A. Plissovi.)
 20. Pohyb rRNA v jadérku. Krátkým pulsem BrUTP byla značena transkripce (červeně) a 20 minut nato deteovány transkripty a GFP-fibrilarin (zeleně). Pokud je detekce provedena bezprostředně po značení transkripce, oba signály se překrývají. Z pozorování vyplývá pohyb rRNA (viz zvětšený detail jadérka) vůči doménám obsahujícím GFP-fibrilarin, v nichž dochází k syntéze rRNA. (Za laskavé poskytnutí obrázku děkuji dr. D. Staňkovi.)
 21. a – Lokalizace lokusu CD4 (zeleně) v buněčné linii T-lymfocytů, v nichž je gen CD24 aktivní. Červeně je značena χ -satelitní DNA. b – Lokalizace téhož lokusu v buněčné linii B-lymfocytů, v nichž je neaktivní a je asociován s heterochromatinovou γ -satelitní DNA (žlutě) prostřednictvím faktoru Ikaros. (Přetištěno ze Science 280, 547–553, 1998; děkuji za laskavé poskytnutí obrázků Dr. A. Fischerové a dr. K. Brownové a za laskavý souhlas s jejich otištěním The American Association for the Advancement of Science.) c – Schéma souvislosti aktivace i represe genu CD4 s pohybem genu vůči heterochromatinu. Měřítka v obr. 21a–21b odpovídá 2 μ m.



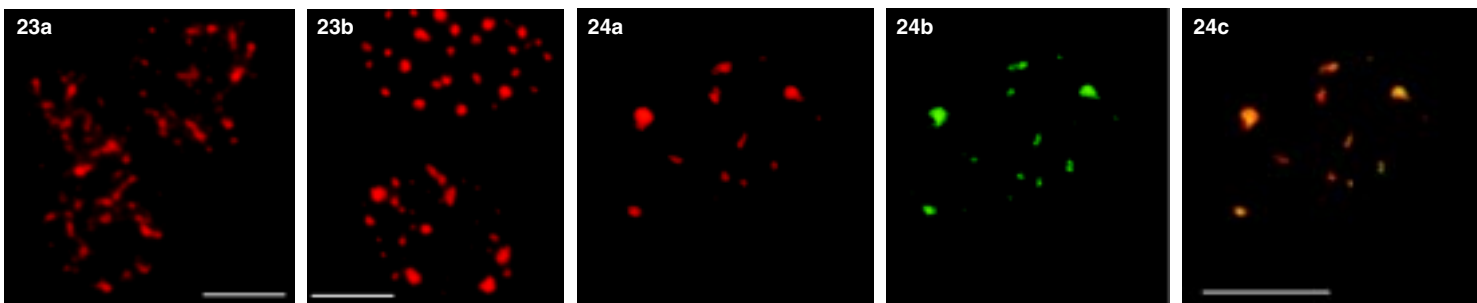
Obr. 22

22. Příklad mapování specifického genu i jeho transkriptů a putování transkriptů k jaderným skvrnám v lidských buňkách. Gen je v buněčné linii přítomen ve dvou kopiích pouze na jednom ze dvou chromozomů 1. Geny jsou aktivně transkribovány a alternativním sestříhem se tvoří několik mRNA kódujících různé proteiny.
 a – Mapování genu je získán obraz dvou blízkých fluorescenčních bodů. Je-li buňka v G2 fázi, můžeme pozorovat dvě dvojice fluorescenčních bodů. Měřítka 5 μ m.
 b, c – Dva příklady mapování genu (červeně) a mRNA (zeleně).
 b – Zde je signál RNA ve formě terčiku velice podobný obrazu genu a může např. odpovídat aktivaci genu po proběhlé mitóze. Měřítka 5 μ m.
 c – Velká většina RNA signálů (zeleně) má tvar „cestičky“. Všimněte si, že jeden z genů (červeně) je v cestičce polárně orientován, druhý gen

se nachází uvnitř cestičky. Oba geny jsou transkripčně aktivní. Měřítka 2 μ m.

d – Mapování RNA-signálu (červeně) vůči jaderným skvrnám (zeleně; použita byla protilátka SC35) svědčí o podobné lokalizaci konce cestičky se skvrnou. Povšimněte si fokálního signálu faktoru SC35 na opačném konci cestičky (je zvyrazněn při použití „vrstevnicového“ filtru v konfokálním mikroskopu a ukazuje na něj bílá šipka). Tento lokální signál svědčí o sestříhu RNA ještě během transkripce. Měřítka 2 μ m.

e – Současné mapování genů (červeně; malé šipky), transkriptů (zeleně) a jaderných skvrn (fialově; delší šipka). Transkripty putují od genů ke skvrnám. (Přetištěno z Mol. Biol. Cell. 11, 497–510, 2000 s laskavým souhlasem The American Society for Cell Biology.)



Existuje korelace mezi spinální svalovou dystrofií (SSD) a strukturou Cajalových tělísek. V některých buněčných typech jsou Cajalova tělíška asociována s dalším typem tělísek, zvaných GEM (Gemini of Cajal bodies; obr. 13). U pacientů je v Cajalových tělíškách přítomen protein SMN1, který je příčinou svalové dystrofie. Jeho mutace způsobují chybu v biogenezi snRNP a sestřih prekurzorických mRNA se stane nefunkčním. Je-li s Cajalovým tělíškem asociováno tělíško GEM, je SMN1 protein u dystrofie specifickou značkou tohoto tělíška. Stojí jistě za pozornost, že značné procento dědičných onemocnění má podstatu právě v chybném sestřihu.

Tělíška PML jsou ve srovnání s Cajalovými tělísky menší a často jich na jádro lidské buňky připadá více než deset (obr. 6). Někdy se vyskytují ve spojení s Cajalovými tělísky. Jednou z jejich specifických bílkovin je protein PML. U promyelocytární leukemie se v souvislosti s translokací chromozomů tato tělíška rozpadají. Během translokace se v sekvenci DNA spojí gen kódující protein PML a gen pro receptor kyseliny retinové (RAR) – vznikne hybridní protein PML-RAR. Stačí buňkám podat kyselinu retinovou a tělíška PML se opět vytvoří.

Buněčné jádro v novém miléniu

Ještě před 10 lety bylo studium buněčného jádra téměř výlučně popisné. Dnes se přeneslo na molekulární úroveň a existují předpoklady pro to, že se naše

vědomosti o struktuře chromatinu vyšších řádů a funkci jaderných kompartmentů v blízké budoucnosti významně prohloubí. Molekulární buněčná biologie už přinesla detailní poznatky o replikaci DNA, syntéze a vyzrávání RNA, a také o transportu makromolekul mezi jádrem a cytoplazmou (skrze neustále vytížené jaderné póry se v jedné buňce přepraví sem a tam milion makromolekul za minutu). Výsledky prací z posledních let svědčí i o pokroku v poznání strukturně-funkční organizace opravných mechanismů DNA a jaderné degradace RNA i proteinů. Snad také po mnoha letech úsilí zodpovíme otázku, zda existuje či neexistuje jaderná „matrix“ nebo nějaká forma jaderného skeletu, jak jej známe v cytoplazmě.

Jádro je vysoce dynamická organela, pro niž jsou typické její kompartmenty, ať již ve smyslu jednotlivých chromozomálních teritorií či kompartmentů interchromatinového prostoru. Rozdělení na kompartmenty je pro metabolismus jádra „ekonomicky“ výhodné a umožňuje předběžnou tvorbu makromolekulárních komplexů, které pak provádějí složité procesy replikace, transkripce i vyzrávání RNA. Jádro nelze považovat za „chromozomy a jádérka plovoucí v jaderné šťávě“. Je to naopak organizovaná organela s přísně regulovanou vysokou funkční přizpůsobivostí struktury. Hlubší porozumění funkci buněčného jádra a znalost kompletní sekvence lidského genomu otvírají úplně nové perspektivy pro genovou terapii a přispějí k revoluci v lidské medicíně. □