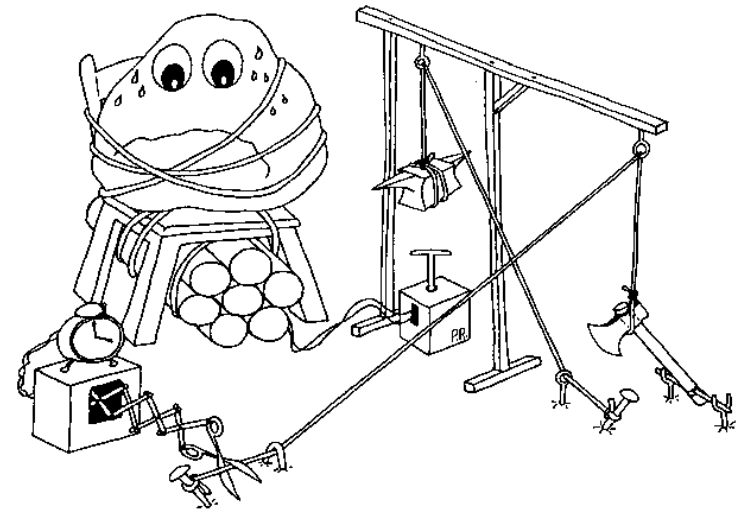


Programovaná buněčná smrt

Jan Šmarda
Ústav experimentální biologie, PŘF MU



Přednáška kurzu Bi4010 Základy molekulární biologie, 2018/19

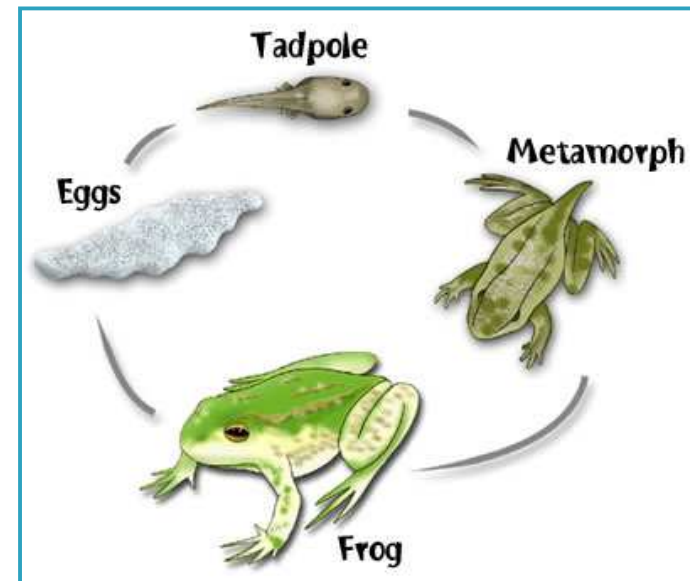
Buněčná smrt

Programovaná

- zprostředkována specifickým buněčným signálním systémem
- prospěšná pro organismus, jehož je umírající buňka součástí

Neprogramovaná

- nastává neregulovaně z vnějších příčin (insult)



Umírání je přirozené



- každý den v našem těle odumře 50-70 miliard buněk
- složení těla se obměňuje
- zdravá buňka je vždy připravena zemřít, sebedestrukční mechanismus se spustí pouhou absencí signálů „pro-survival“

Typy buněčné smrti

- **apoptóza** (zprostředkovaná kaspázami během vývoje, stárnutí nebo jako odezva na specifické podněty)
- **autofagie** (rozklad buněčných složek v lysozomech)
- **excitotoxicita** (smrt nervových buněk v důsledku přílišné aktivace receptorů pro nervové přenašeče)
- **anoikis** (důsledek poruchy interakcí, které buňku ukotvují v matrix)
- **nekróza** (indukovaná nespecifickým traumatem)
- **nekroptóza** (programovaná forma nekrózy, závislá na aktivitě specifických kináz RIP, bez dominantní účasti kaspáz)

Apoptóza – obecně

- fyziologický proces odumírání buňky
- popsána u živočichů i rostlin
- probíhá řízeně podle speciálního programu
- destrukci buňky zajišťují speciální enzymy - kaspázy
- výsledkem je rychlá fragmentace a fagocytóza buňky
- nástroj udržování homeostáze

Proč?

- stresové podněty z okolního prostředí
- nevratné poškození DNA
- vývojové procesy
- reakce na viry/patogeny



Apoptóza - úloha

- protiváha nadměrné proliferace buněk
- podíl na formování a tvarování orgánů a tkání („sculpting“)
- eliminace přestárých buněk
- eliminace poškozených nebo geneticky aberantních buněk (neopravitelné poškození DNA, extrémní kyslíková deprivace, významná signální nerovnováha, apod.)



Apoptóza

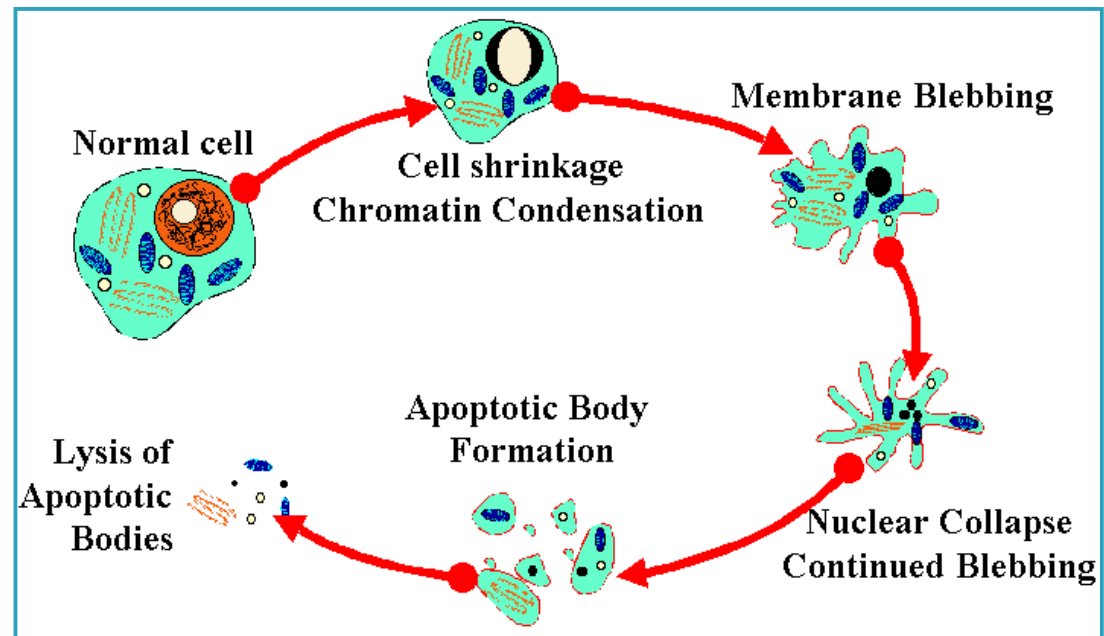
- název z řečtiny (opadávání květů nebo listů)
- provázena charakteristickými morfologickými změnami

Apoptosis (ay-paw-TOE-sis): A Natural End to Life



Morfologické projevy

- zmenšování buněk
- kondenzace a fragmentace jádra
- řízená fragmentace chromozomální DNA
- v konečné fázi se fragmentuje celá buňka do malých kompaktních tělísek, které podléhají fagocytóze
- nedojde ke vzniku zánětu



Nežádoucí projevy

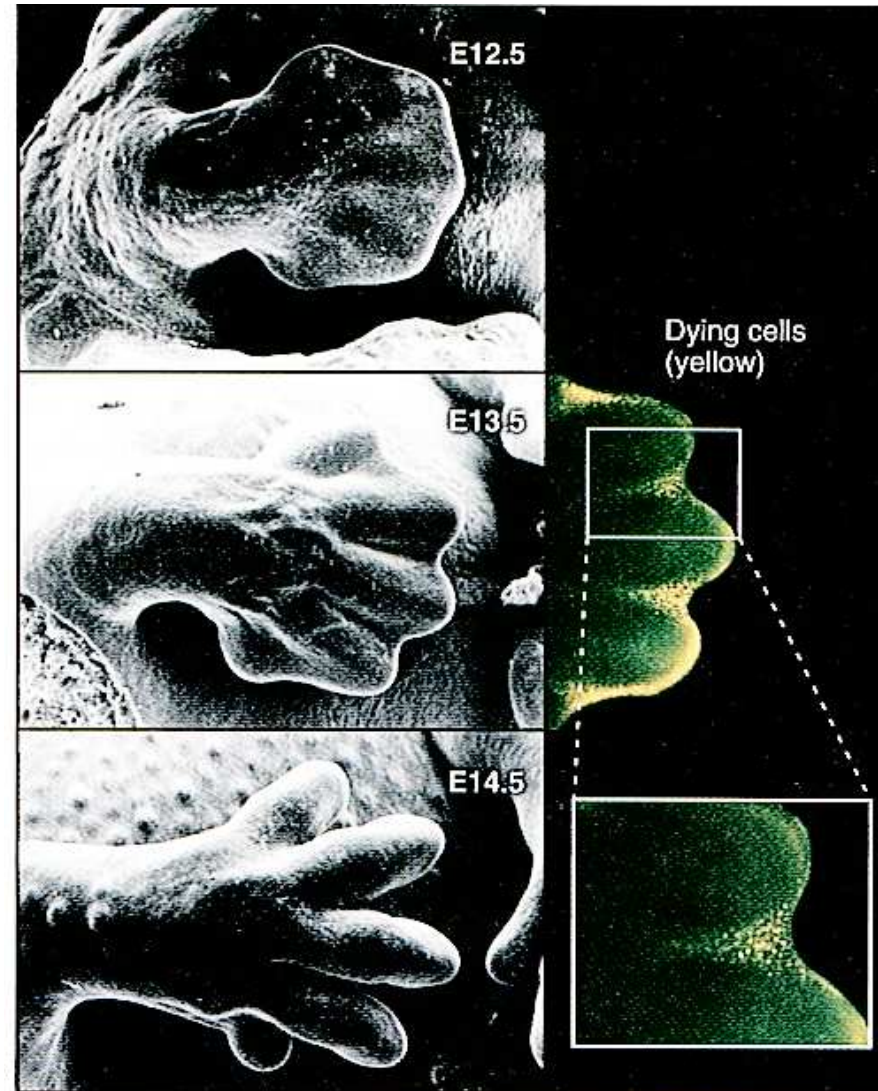
- nadbytek i nedostatek apoptózy je nežádoucí
- přílišná apoptóza poškozuje tkáně (degenerativní procesy)
- nedostatečná apoptóza buňky predisponuje k hromadění genetických poruch a tvorbě nádorů
- změny v apoptóze zaznamenány u autoimunitních chorob, AIDS, rakoviny, neurodegenerativních chorob (Huntington, Alzheimer), mrtvice, infarktu
- snahy indukovat apoptózu u nádorových buněk
- snahy redukovat apoptózu v případě odumírání mozkových buněk po mrtvici

Apoptóza a formování tkání

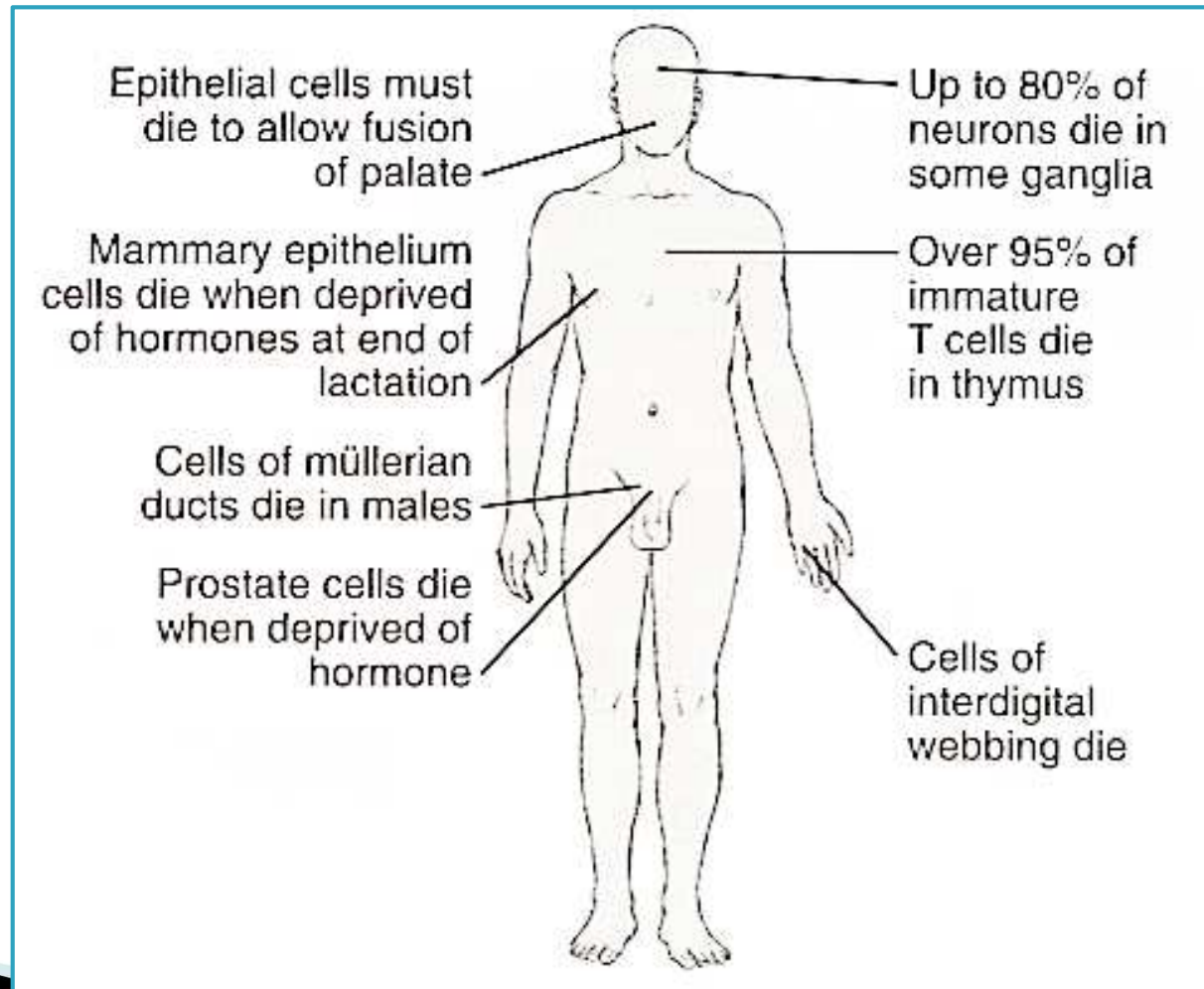
- apoptózou jsou během morfogeneze odstraňovány nežádoucí buňky – tvorba funkčních a řádně tvarovaných tkání a orgánů
- spolu s migrací, proliferací a diferenciací buněk jde o klíčový proces doprovázející vývoj organismů
- geneticky pozměněné myši, které postrádají klíčové složky apoptotického aparátu vykazují vývojové poruchy: nadbytek neuronů v mozku, obličejové abnormality, poruchy formování prstů, atd.

Vývoj končetiny

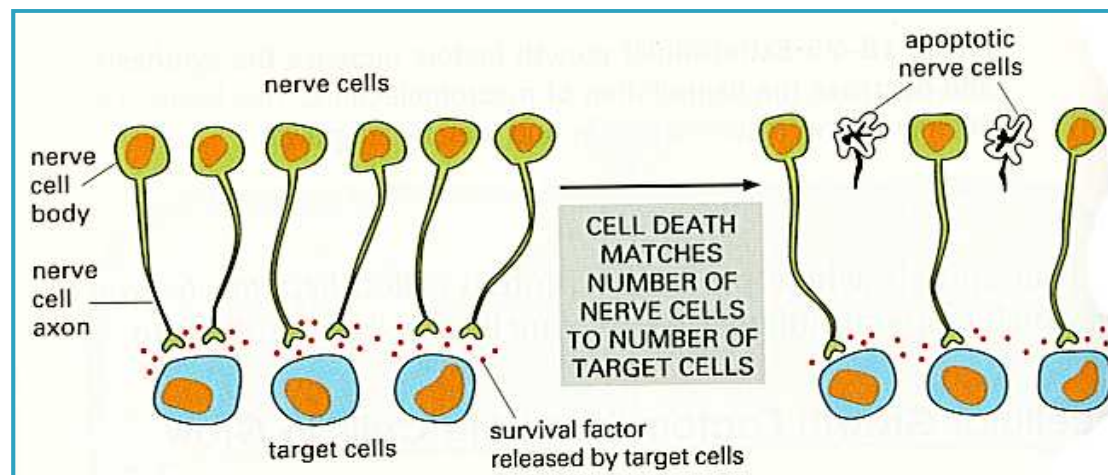
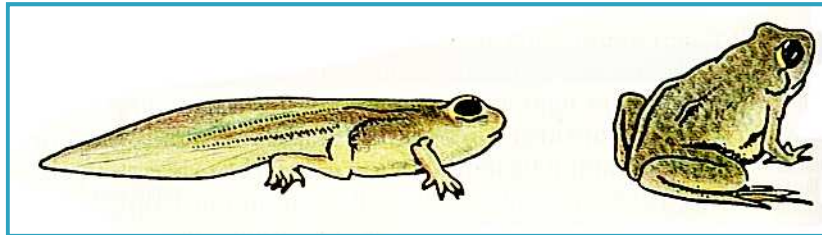
buňky odumírají v prostoru
mezi formujícími se prsty



Příklady apoptózy u člověka



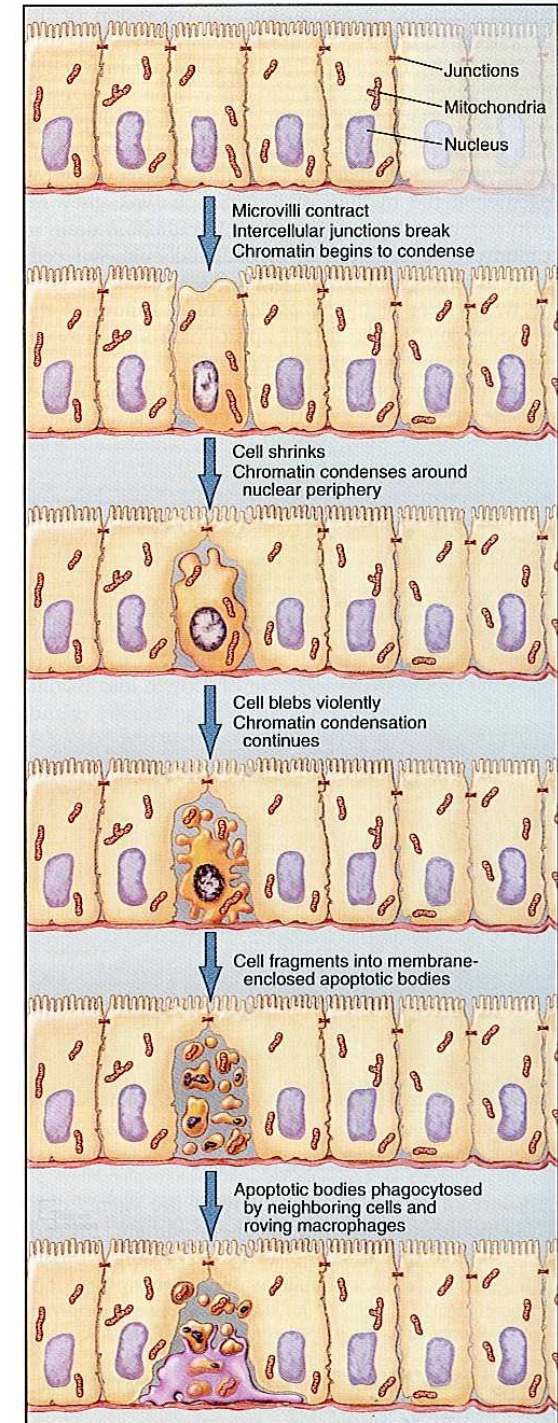
Příklady apoptózy



Apoptóza versus nekróza

Apoptóza

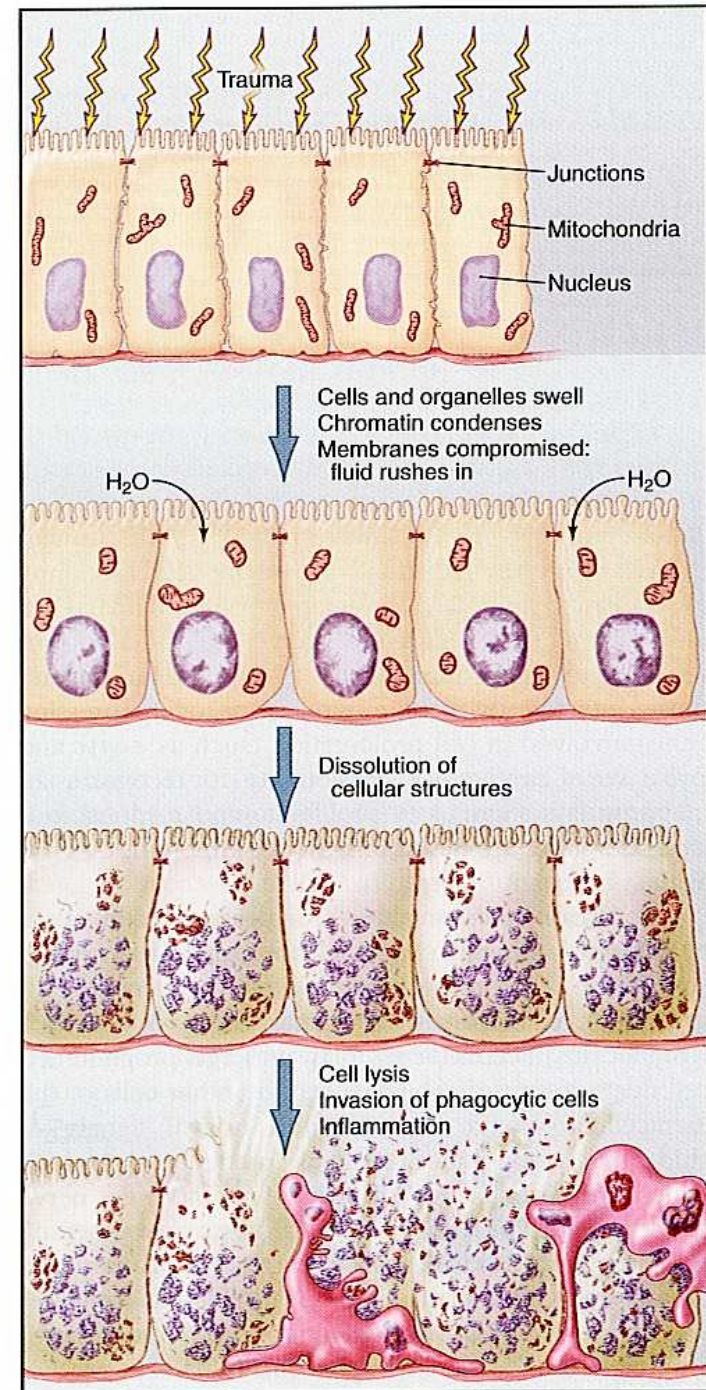
- aktivní proces
- přesný harmonogram
- kondenzace chromatinu
- rozpad jádra
- odbourání cytoskeletu („zhroucení“ buňky)
- fragmentace chromozomální DNA
- mitochondrie dlouho intaktní
- výběžky buněčné membrány
- fagocytóza pozůstatků buňky



Apoptóza versus nekróza

Nekróza

- pasivní smrt
- postihuje skupiny buněk
- vyvolaná neléčitelným zraněním (nedostatek kyslíku, extrémní teploty, mechanické poškození, atd.)
- poškození mitochondrií - vyčerpání ATP
- poškozenou membránou proniká do buňky voda, buňka se zvětšuje
- zvětšují se organely
- celková dezintegrace
- uvolnění nitrobuněčných komponent
- vznik zánětu



Signály indukující apoptózu

vnitřní

- ze samotné buňky podléhající apoptóze
- poškození DNA, virová infekce, exprese onkogenů

vnější

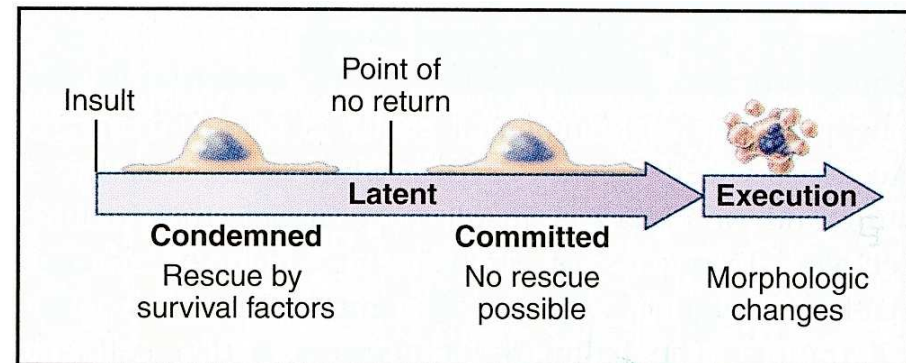
- z okolních buněk organismu nebo vnějšího prostředí
- nedostatek vyživovacích signálů (absence signálů „pro-survival“)
- přítomnost signálů indukujících apoptózu („pro-death“)

Průběh apoptózy: dvě fáze

fáze latentní následovaná fází exekuční

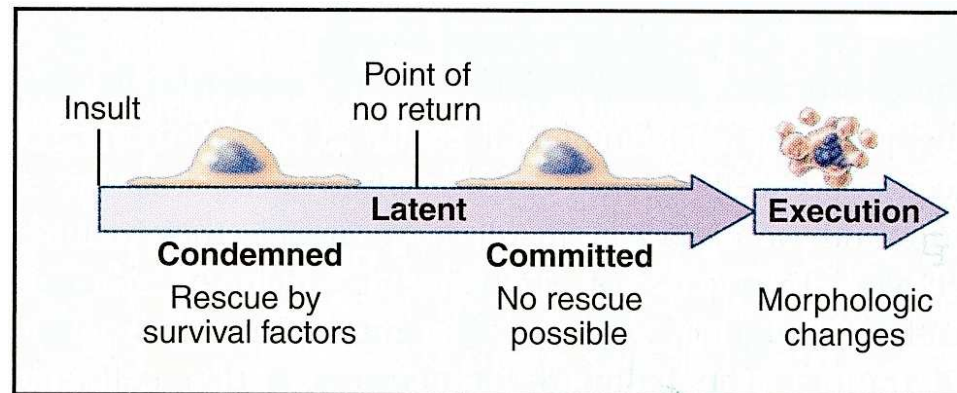
Latentní fáze

- normální vzhled a fungování buněk
- **podfáze „odsouzení“** – buňka je na dráze směřující k smrti, ale může být zachráněna anti-apoptotickými faktory
- **podfáze „rozhodnutí“** - buňka již nevyhnutelně směřuje k exekuční fázi
- trvání latentní fáze je variabilní



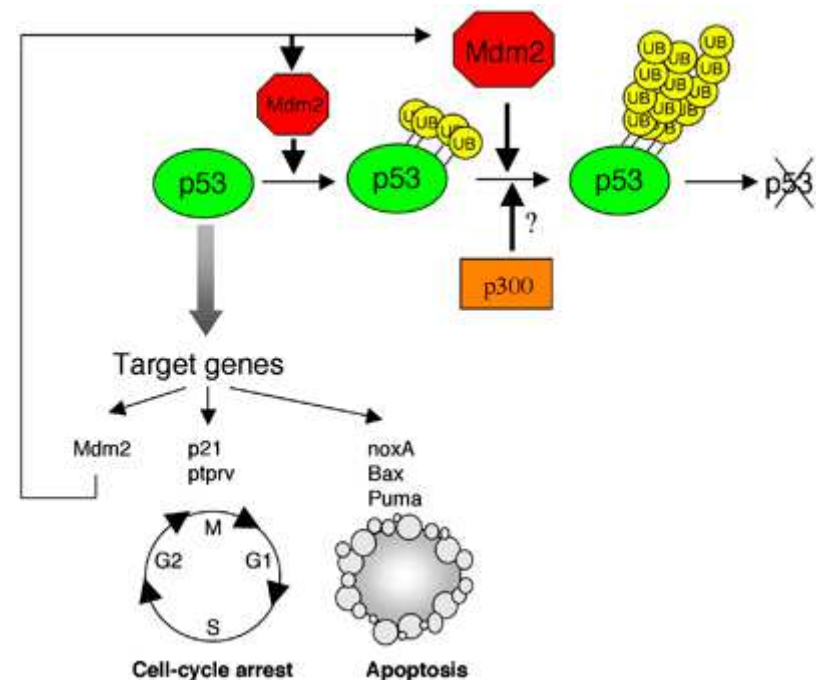
Exekuční fáze

- zahájení morfologických a fyziologických změn
- trvání této fáze je velmi rychlé ve srovnání s latentní fází (do 1 hod)
- konzervativní průběh



Protein p53 a apoptóza

- **p53** je transkripční faktor, který funguje jako nádorový supresor
- v nepoškozené buňce je hladina p53 nízká v důsledku řízené vlastní degradace:
 - p53 aktivuje expresi ubikvitin ligázy Mdm2
 - Mdm2 připojí ubikvitin k p53
 - p53 s kovalentně připojeným řetězcem ubikvitinů je degradován v proteazomu
- v buňce vystavené stresu se p53 fosforyluje a začne aktivovat expresi jiných genů (např. zapojených do kontroly buněčného cyklu a apoptózy)
 - bez aktivace *mdm2* se p53 stabilizuje a jeho hladina v buňce rychle stoupá



p53 reaguje na různé typy stresu

negenotoxické

- nedostatek růstových faktorů
- nedostatek ribonukleotidů
- přítomnost určitých cytokinů

genotoxické

- poškození DNA
- záření
- oxidativní stres

p53 řídí osud buňky

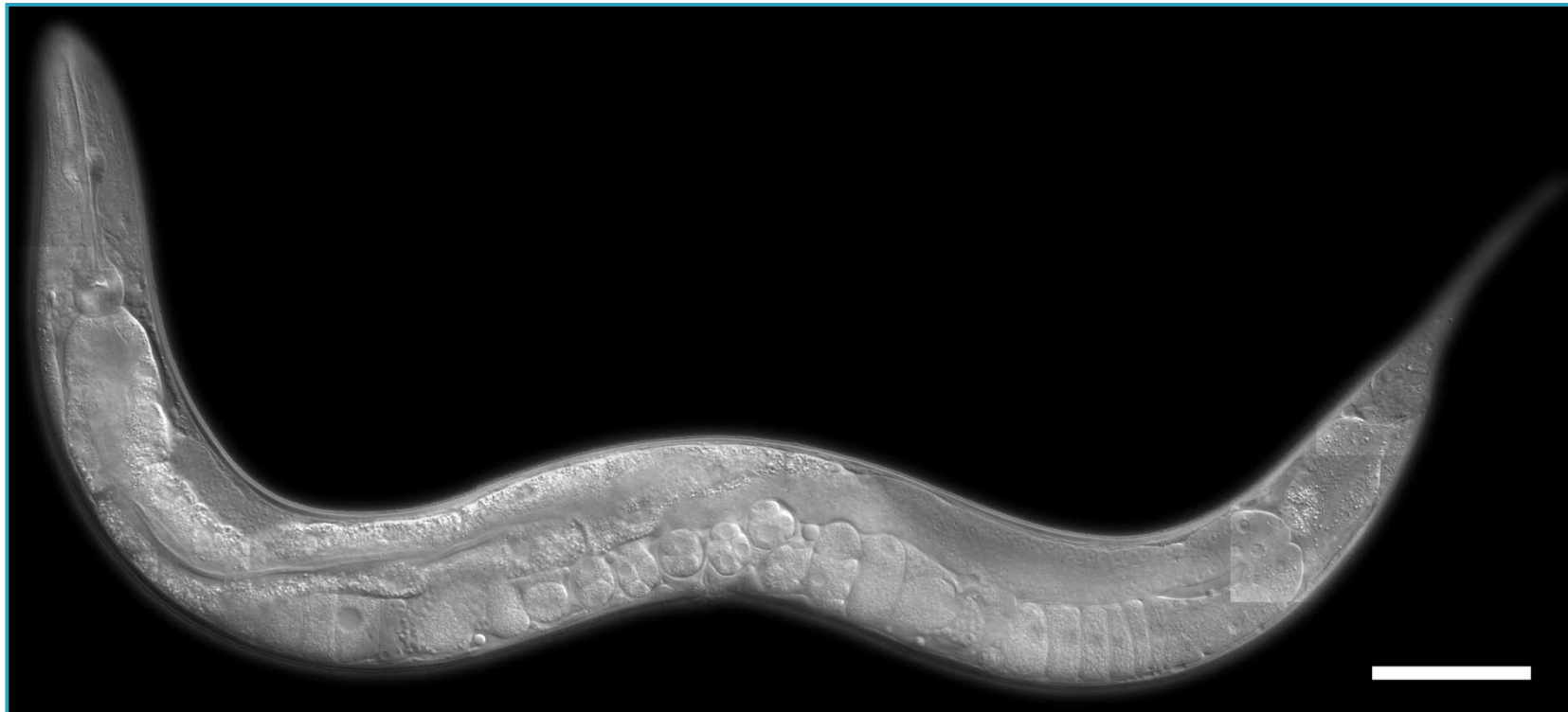
možnosti:

- indukce apoptózy
- zastavení buněčného cyklu
- zahájení opravy DNA
- diferenciacce buněk

účinky dány jeho schopností měnit expresi svých cílových genů

Genetická analýza apoptózy

- identifikace klíčových regulátorů
- využití modelu hlístice *Caenorhabditis elegans* (Hád'átko obecné)



Genetická analýza apoptózy



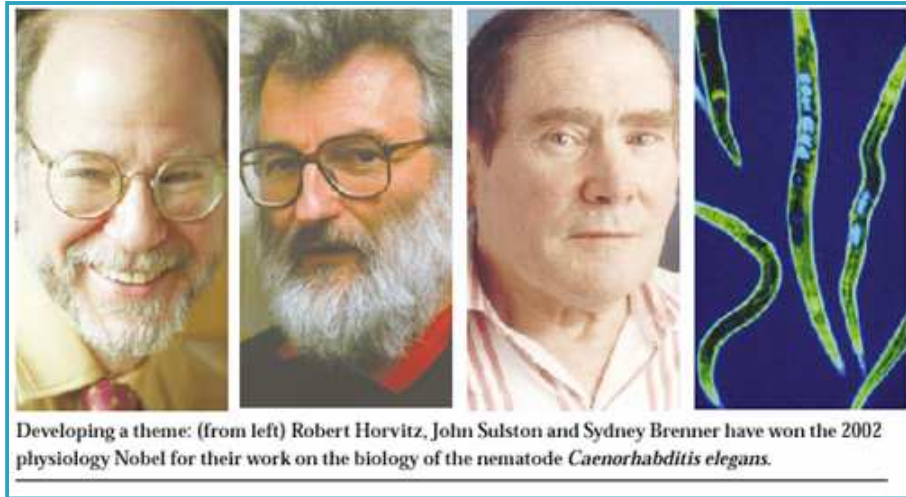
- pomocí speciální optiky (Nomarski) lze mikroskopií sledovat každou buňku vyvíjejícího se těla *C. elegans*
- sestavení mapy původu každé jednotlivé buňky a sledování její historie až k oplozenému vajíčku
- z 1090 somatických buněk vytvořených během embryogeneze 131 buněk odumírá to místně a časově specificky
- identifikováno 14 genů ovlivňujících programovanou buněčnou smrt



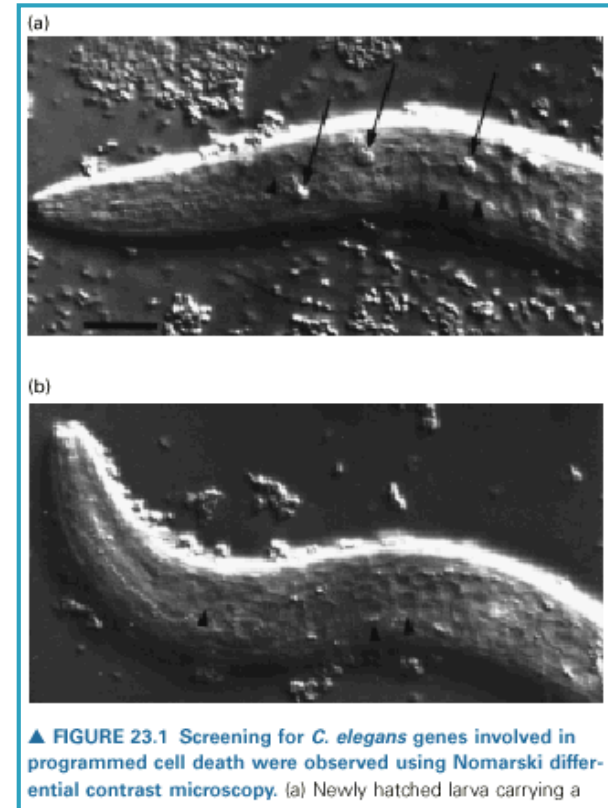
Robert Horvitz

John Sulston

Sydney Brenner

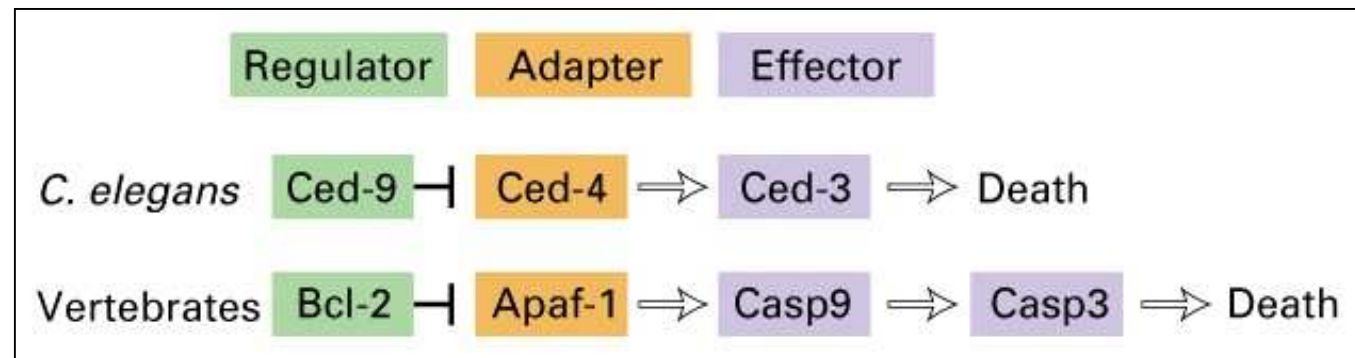


Nobelova cena 2002



V apoptotické signalizaci se uplatňují tři skupiny proteinů

- regulátory
- adaptéry
- efekторы

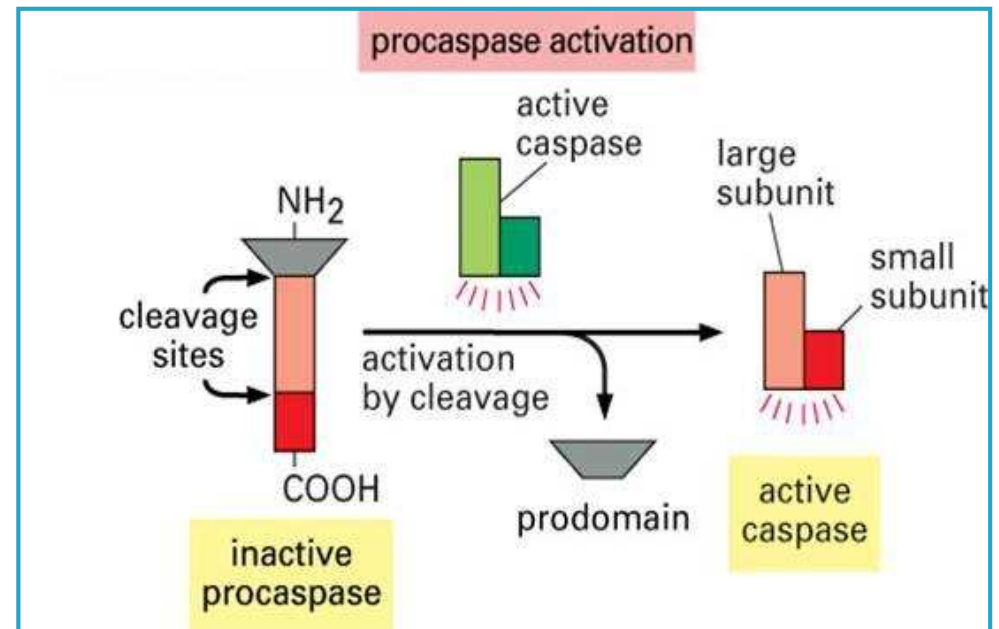


ced = cell death abnormal mutants

- *ced-3* a *ced-4* jsou pro-apoptotické
- *ced-9* blokuje funkci genů *ced-3* a *ced-4* (je anti-apoptotický)

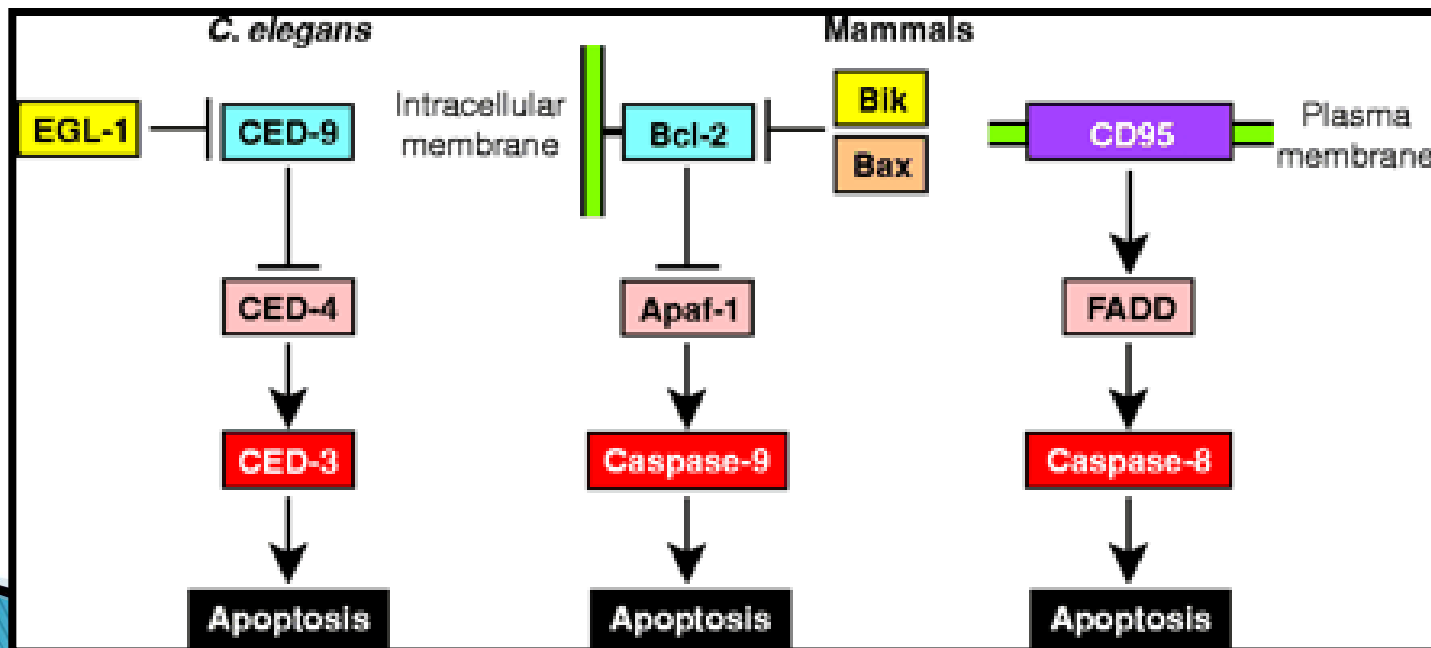
Geny *ced* mají své homology u savců

- **Ced-3** patří do rodiny proteáz, zvaných **kaspázy**
- kaspázy jsou klíčovými výkonnými účastníky apoptózy
- **cysteinyl aspartát-specifické proteázy** (cystein je přítomen v aktivním místě enzymu; kyselina asparagová je přítomna v cílovém místě štěpeného substrátu)
- syntetizovány jako inaktivní zymogeny
 - prokaspázy, které se aktivují odštěpením inhibiční prodomény



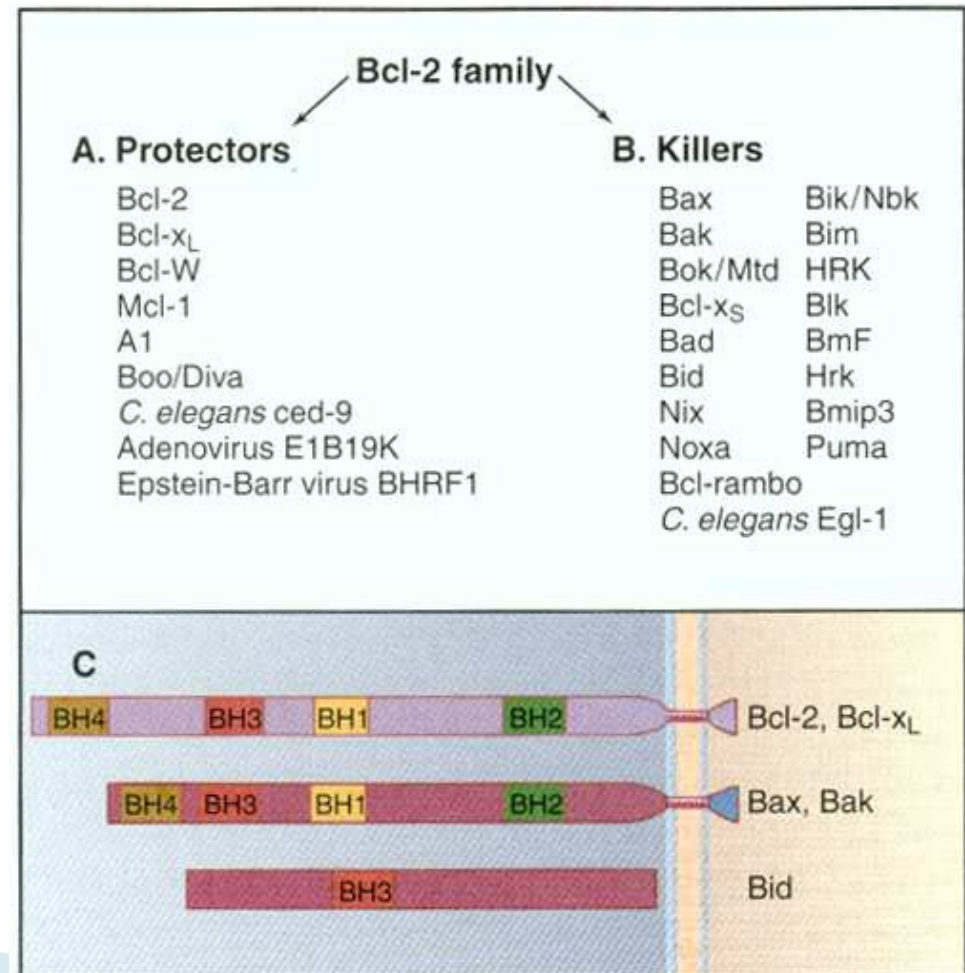
Geny *ced* mají své homology u savců

- **Ced-4** se podílí na aktivaci kaspáz - savčím protějškem je **Apaf-1** („apoptotic protease-activating factor 1“)
- **Ced-9** patří do rodiny **Bcl-2** regulátorů buněčné smrti



Regulátory apoptózy – rodina Bcl-2

- pro- nebo anti-apoptotická funkce
- lidský gen rodiny *bcl-2* může funkčně nahradit chybějící gen *ced-9* u *C. elegans*
- obsahuje strukturně příbuzné proteiny s doménou BH (BCL-homology)
- doména BH je potřebná pro meziproteinové interakce proteinů Bcl-2

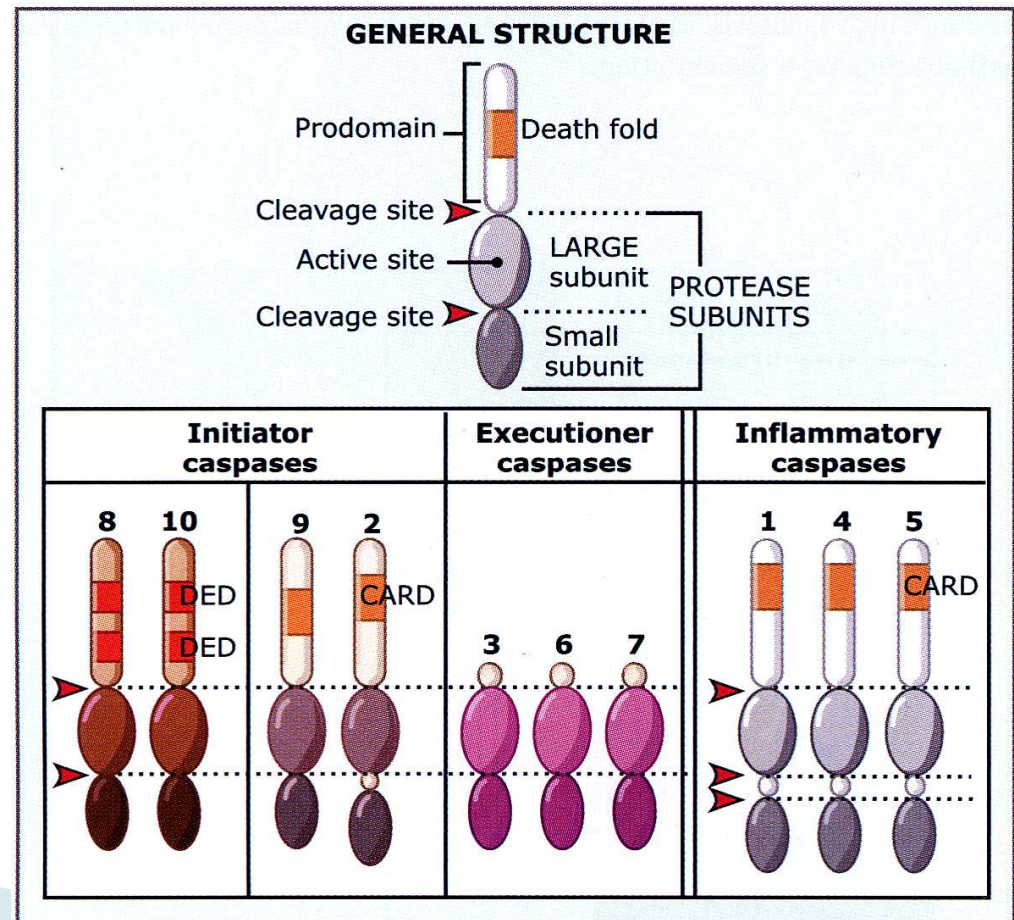


Proteiny Bcl-2 a rakovina

- regulátory apoptózy mohou být nebezpečné
- název *bcl-2* odráží souvislost s lymfomy B-buněk (B-cell lymphoma)
- tento typ rakoviny vzniká v důsledku translokace t(14;18), díky které se gen *bcl-2* dostává do intenzivně přepisované oblasti genu kódujícího těžký řetězec imunoglobulinů: hladina Bcl-2 v těchto buňkách proto stoupá, což je důležitým faktorem nádorové transformace
- *bcl-2* je možné považovat za onkogen, který ale neindukuje proliferaci buněk, ale narušuje rovnováhu mezi životem a smrtí buněk
- buňky s vysokou expresí *bcl-2* jsou odolné k induktorům smrti

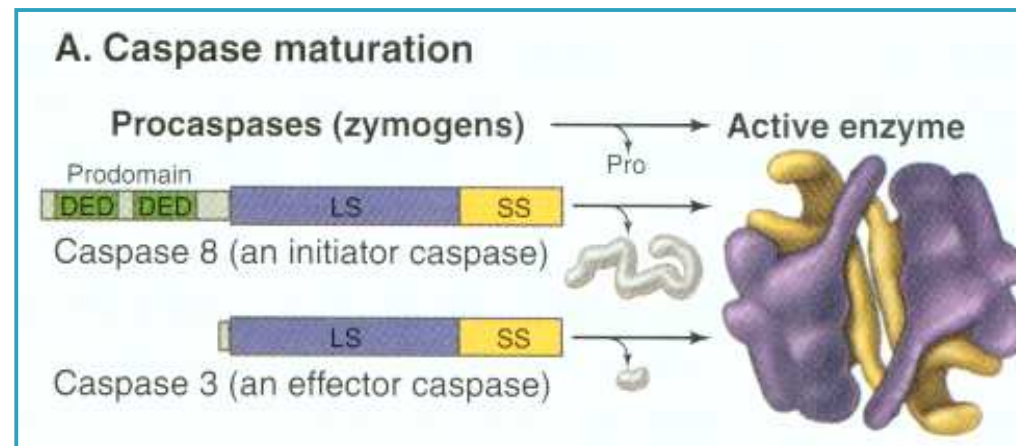
Kaspázy

- po aktivaci degradují klíčové buněčné struktury
- uplatňují se jako iniciátory i efekторы apoptózy
- dosud známo 13 členů rodiny kaspáz, které se dělí na iniciační, exekuční a záněťové
- záněťové kaspázy nemají souvislost s apoptózou, ale indukci zánětlivé reakce (produkci cytokinů, apod.)



Kaspázy - struktura

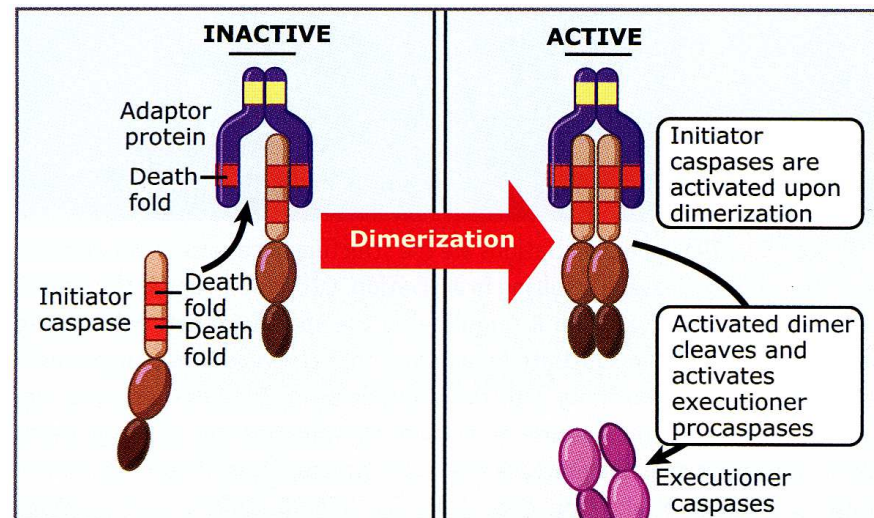
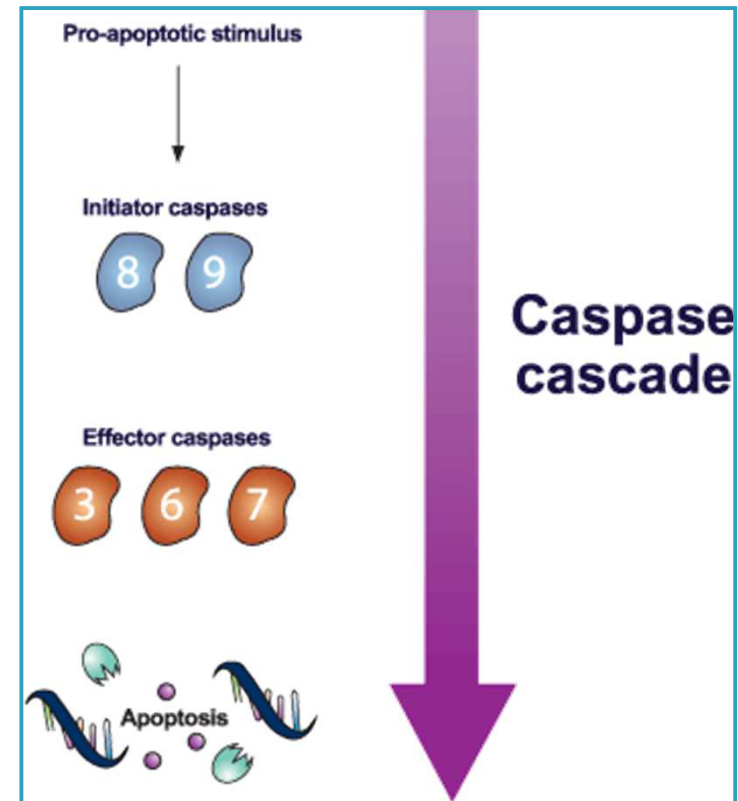
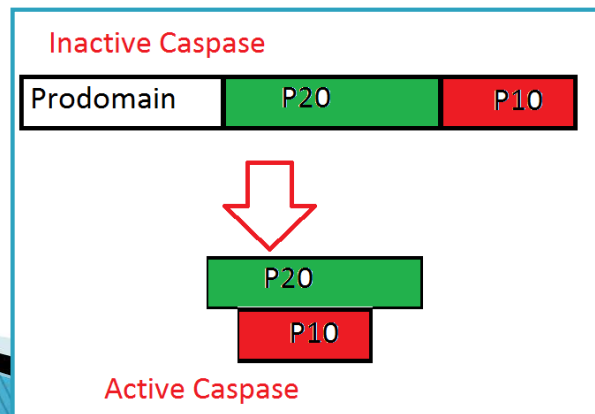
- v aktivní formě složené ze 2 velkých a 2 malých podjednotek
- inaktivní zymogeny obsahují N-koncovou pro-doménu, za kterou následuje velká a malá doména
- mezi doménami jsou aspartátové zbytky, tj. cíle kaspázového aktivačního štěpení, po kterém vzniká velká a malá podjednotka, které spolu heterodimerizují



Iniciační kaspázy

kaspázy 2, 8, 9, 10

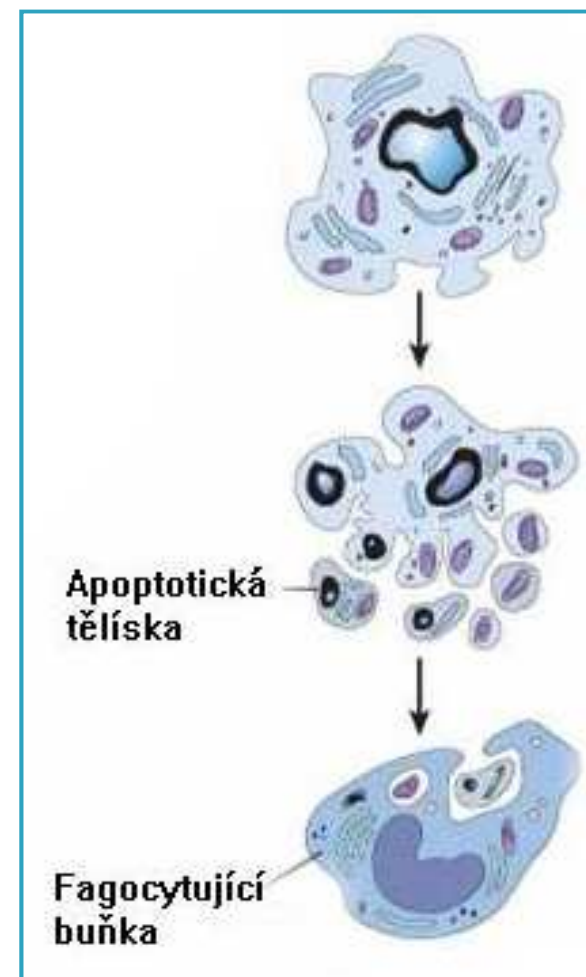
- obsahují velkou pro-doménu na N-konci zajišťující interakci s jinými proteiny
- fungují jako iniciátory procesů buněčné smrti – aktivují exekuční kaspázy
- v inaktivní formě mají podobu monomerů
- při aktivaci jsou adaptérovými molekulami převedeny do podoby dimerů



Exekuční kaspázy

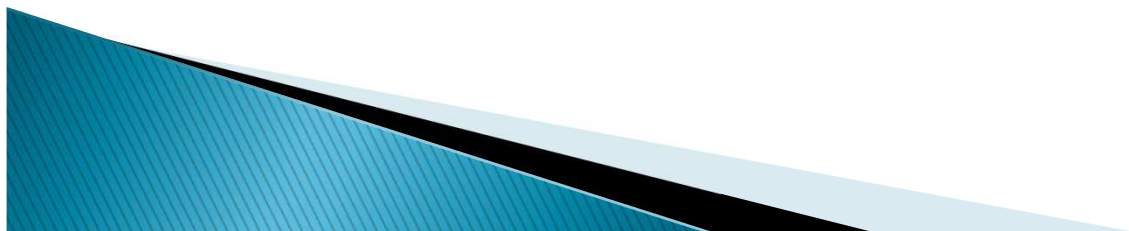
kaspázy 3, 6, 7

- obsahují malou pro-doménu na N-konci
- aktivují se štěpením iniciačními kaspázami, následkem je zpřístupnění aktivního místa
- nejsou schopné autoaktivace
- štěpí různé substráty, které přímo způsobují morfologické a biochemické změny v buňkách



Cíle kaspázového štěpení

- kaspázy jsou selektivní enzymy, štěpí jen omezené spektrum jaderných a cytoplazmatických proteinů
- štěpeno je několik strukturních proteinů a mnoho proteinů zapojených do buněčných signalizací (např. kináz)
- kinázy mají často autoregulační domény, díky kterým se zapínají nebo vypínají podle potřeby; tyto domény jsou kaspázami odstraněny: výsledkem jsou konstitutivně aktivní/inaktivní kinázy, které aktivují pro-apoptotické procesy

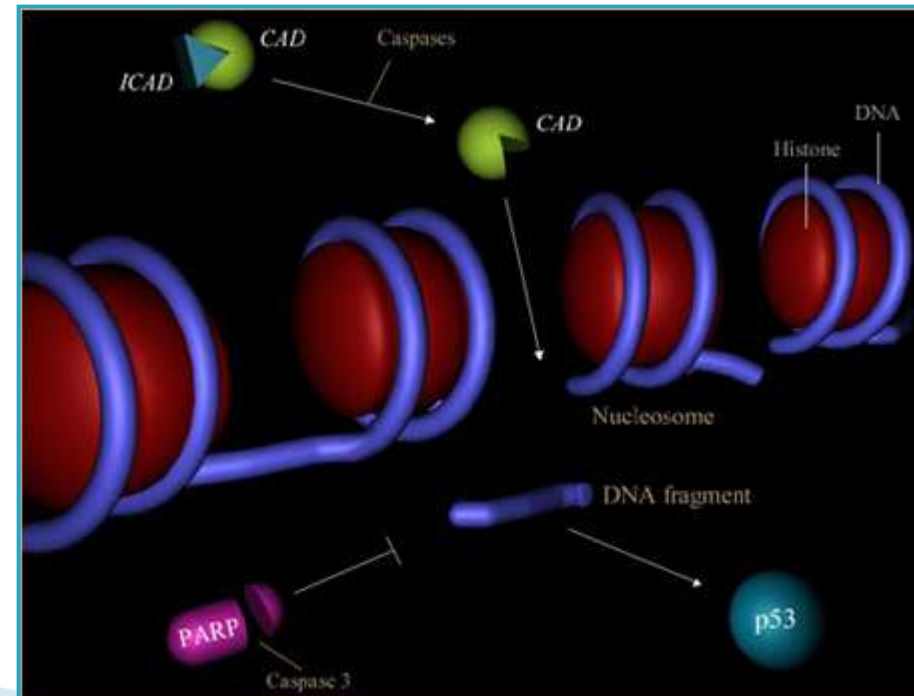
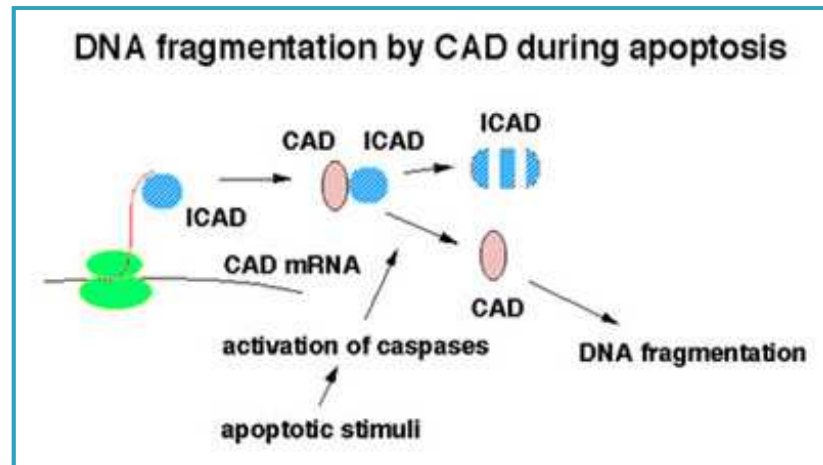


Substráty exekučních kaspáz

- **FAK (focal adhesion kinase):** kináza nutná pro adhezi buněk k matrix nebo okolním buňkám (ztráta aktivity při apoptóze)
- **laminin na vnitřním povrchu jaderné membrány** (kondenzace chromatinu a pyknóza jádra)
- **aktin, plektin, vimentin, gelsolin** (intermediární filamenta): kolaps cytoskeletu a tvorba vychlípenin plazmatické membrány: tvorba apoptotických tělísek
- **inhibitor kaspázou-aktivované DNAázy (ICAD)** uvolňuje DNázu CAD (caspase-activated DNase), která pak fragmentuje DNA

Účinky kaspázy 3

- efektor apoptotické signalizace
- štěpí různé buněčné proteiny
- aktivuje specifickou DNázu (**CAD – „caspase-activated DNase“**)
- v buňkách je CAD v komplexu se svým inhibitem ICAD
- kaspáza 3 v apoptotických buňkách štěpí ICAD a umožňuje tak CAD štěpit DNA mezi nukleozomy



Jak jsou kaspázy aktivovány?

specifickými induktory:

- vnitřními podněty: abnormalitami ve struktuře DNA
- vnějšími podněty: absencí růstových faktorů, přítomností specifických cytokinů (TNF, ligand Fas)

apoptózovými signálními drahami:

- vnitřní dráhou závislou na mitochondriích
- vnější dráhou nezávislou na mitochondriích

Dvě signální dráhy apoptózy: vnitřní a vnější

APOPTÓZA

vnitřní dráha

mitochondrie

cytochrom c

kaspázy

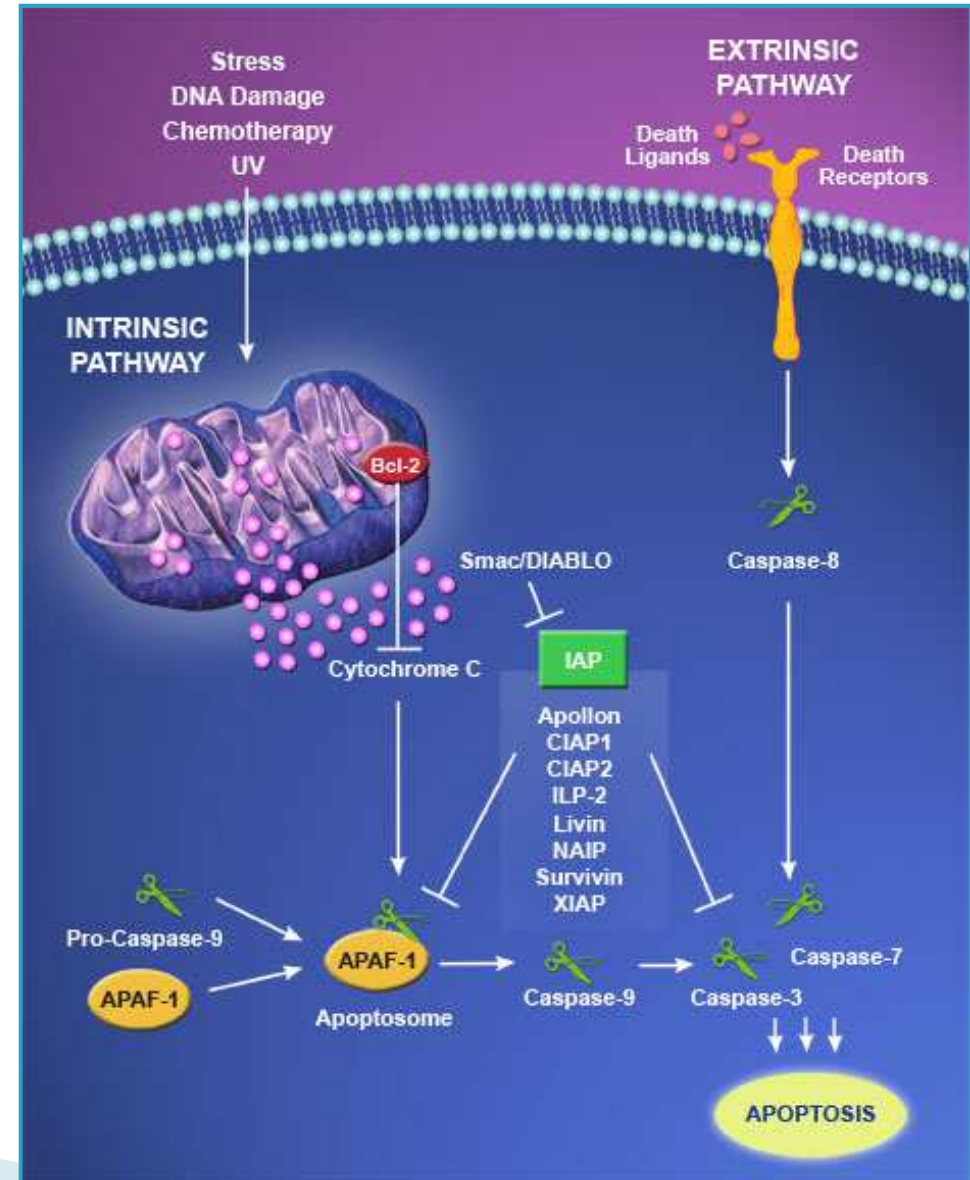
buněčná smrt

vnější dráha

receptory smrti

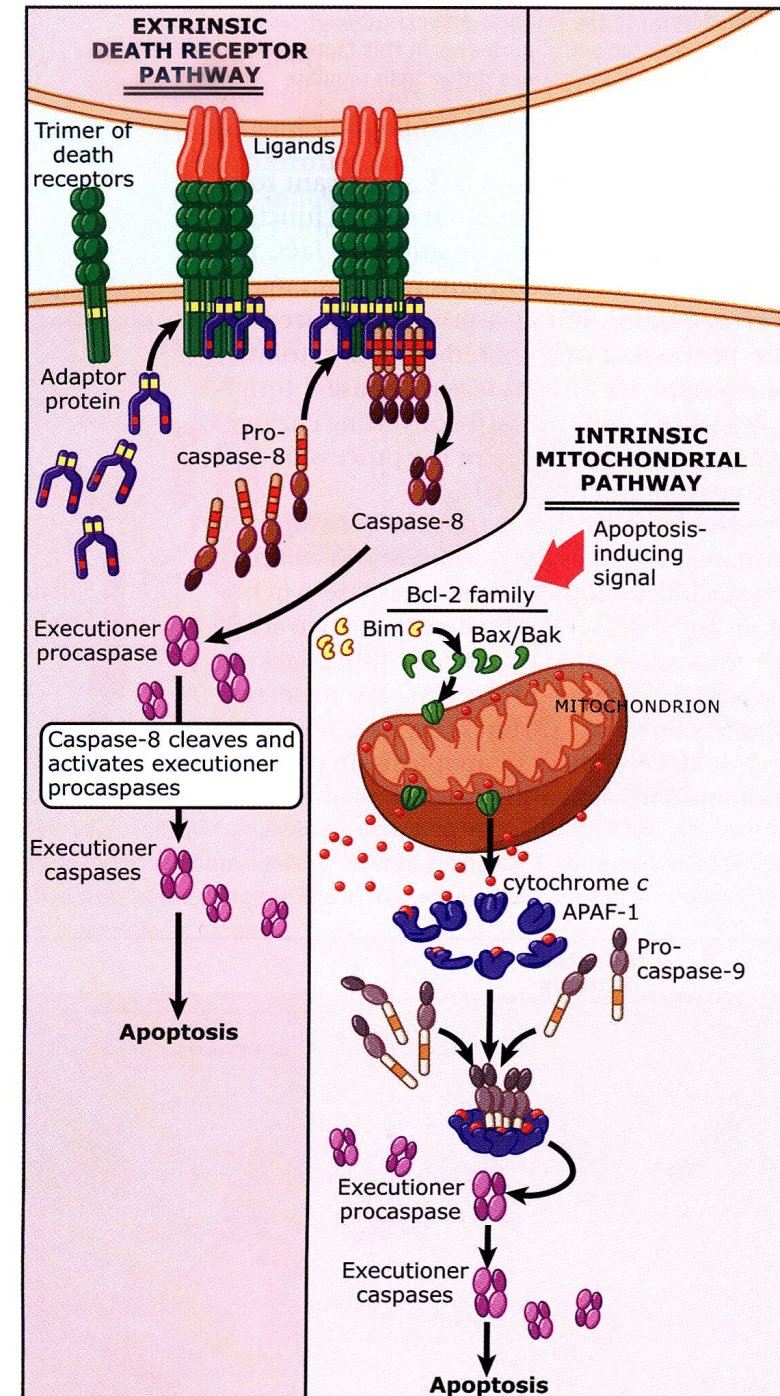
kaspázy

buněčná smrt



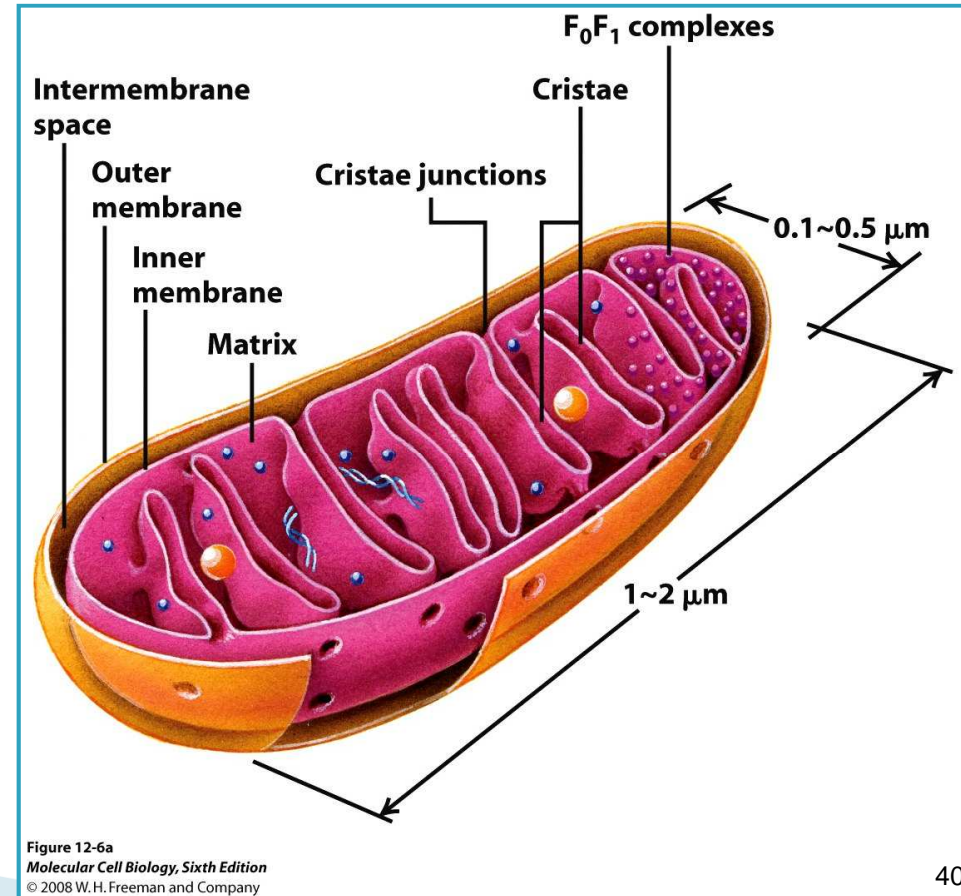
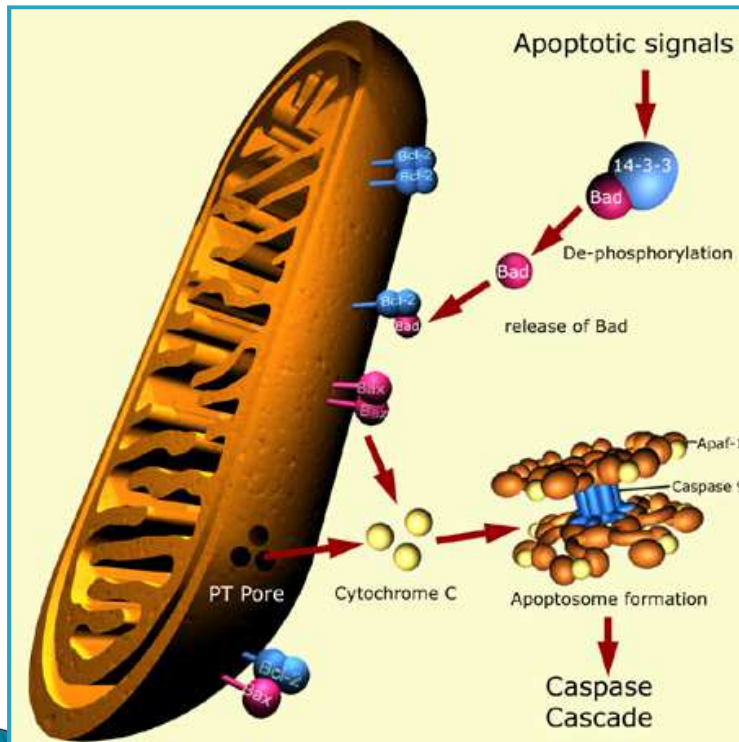
Signální dráhy apoptózy

- receptorová (vnější) se aktivuje vazbou ligandů smrti na příslušné membránové receptory
- mitochondriální (vnitřní) se aktivuje změnou permeability vnější mitochondriální membrány



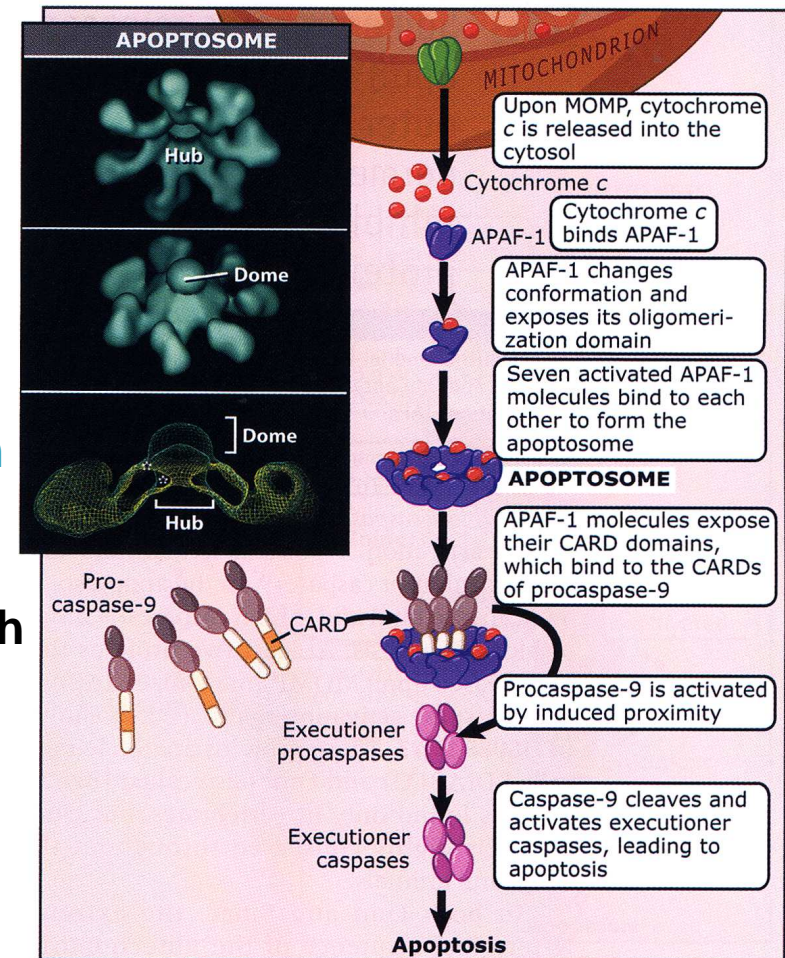
Vnitřní (mitochondriální) dráha

- hlavním elementem jsou mitochondrie a **cytochrom c** obsažený v prostoru mezi vnější a vnitřní membránou
- translokace cytochromu c do cytozolu je kritickou událostí dráhy



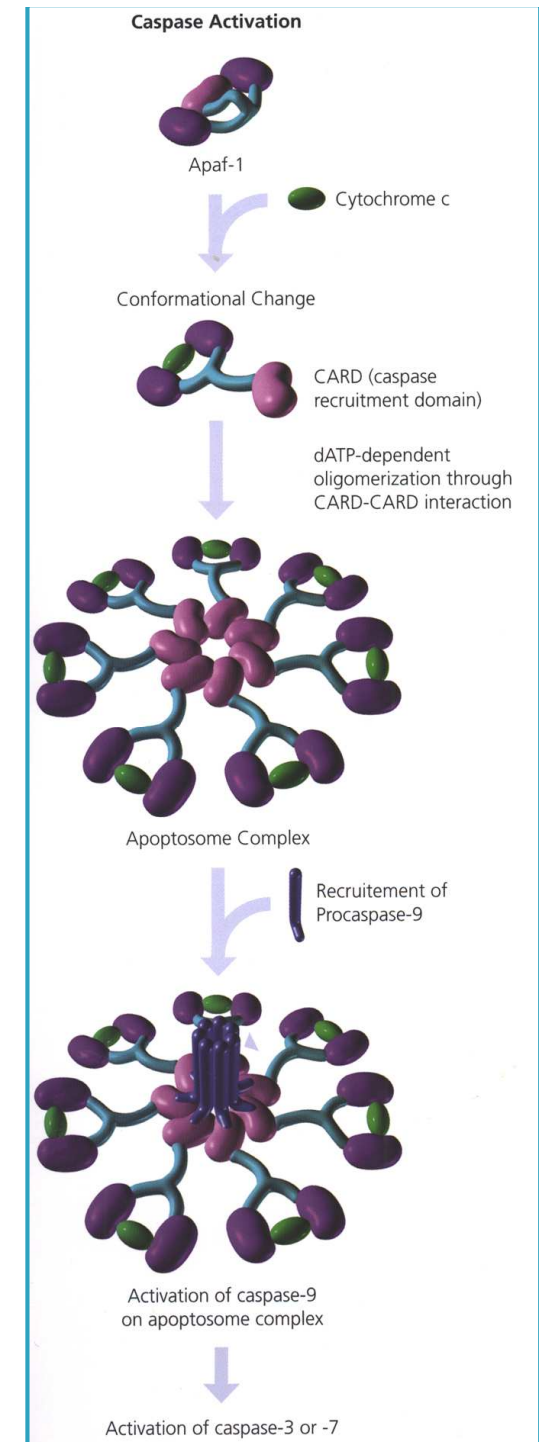
Cytochrom c

- běžně přítomen v prostoru mezi vnitřní a vnější membránou mitochondrie, podíl na transportu elektronů při oxidativní fosforylaci
- permeabilizovanou vnější mit. membránou difunduje z mezimembránového prostoru do cytozolu
- váže se na Apaf-1 („**a**poptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor“)
- Apaf-1 mění konformaci-umožnění vazby dATP
- vazbou dATP se konformace Apaf-1 dále mění - obnažení oligomerizační domény
- 7 molekul Apaf-1 se spojuje-vzniká **apoptozom**
- apoptozom váže iniciační **prokaspázu 9**
- **molekuly prokaspázy 9 se v apoptozomu dostávají do těsné blízkosti, což vede k jejich aktivaci**
- kaspáza 9 aktivuje exekuční kaspázy 3 a 7



Apoptozom

- **cytochrom c** uvolněný z mitochondrií do cytozolu se váže na **Apaf-1**
- Apaf-1/cytochrom c díky dATP mění konformaci a oligomerizuje („apoptozom“)
- apoptozom váže a aktivuje **prokaspázu 9**
- aktivovaná kaspáza 9 aktivuje další kaspázy zodpovídající za apoptotickou smrt buňky (kaspázy 3 nebo 7)



Co rozhoduje o uvolnění cytochromu c?

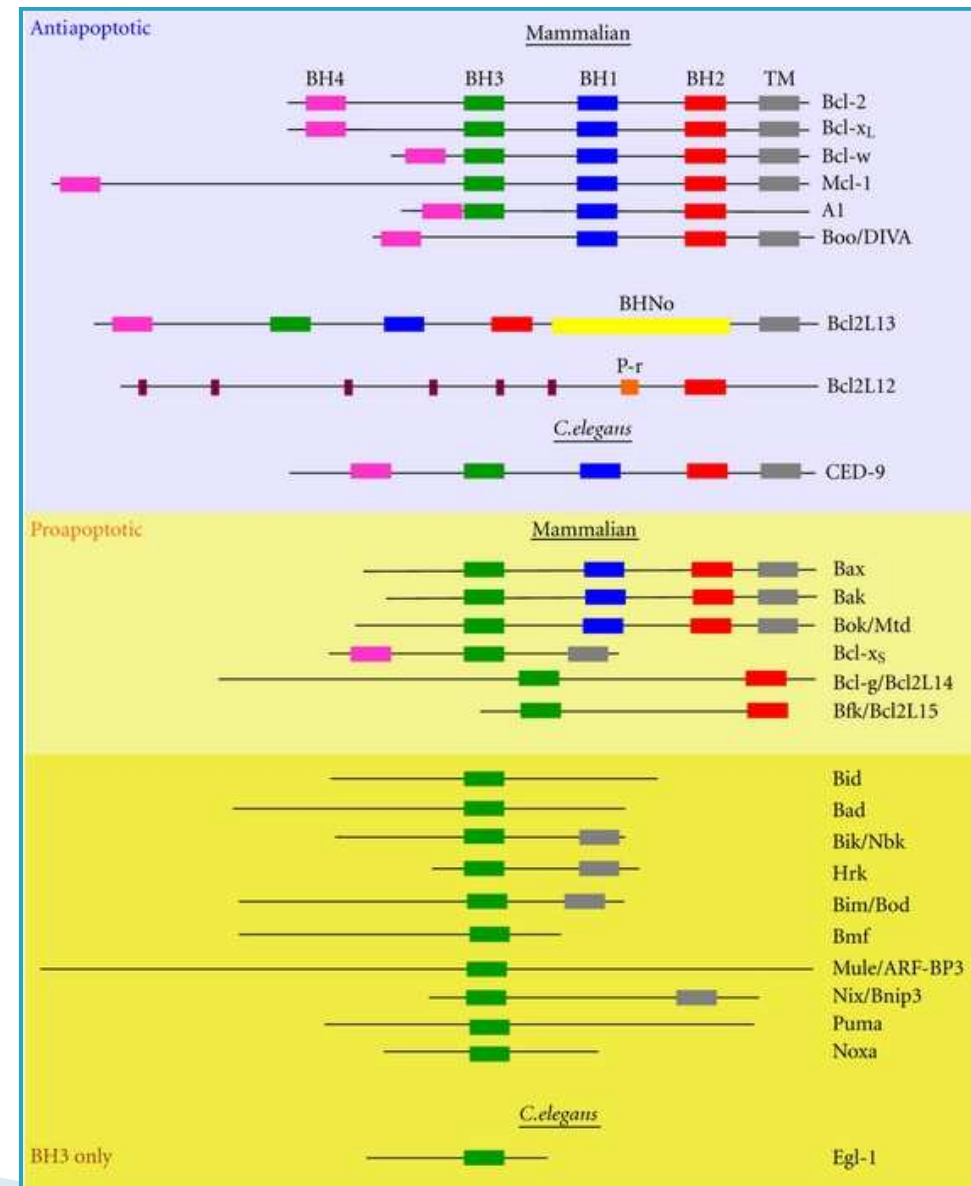
- proteiny rodiny Bcl-2
- poměr anti-apoptotických („pro-survival“) a pro-apoptotických vzájemně heterodimerizujících proteinů rozhoduje a propustnosti mitochondriální membrány pro cytochrom c

Table 4.1. Selected proteins in the Bcl-2 superfamily

Pro-apoptotic	Anti-apoptotic
Bax	Bcl-2
Bak	Bcl-X _L
BOK	Bcl-W
BIM	MCL-1
BID	Bcl-B
BAD	+ viral homologs
NOXA	
PUMA	

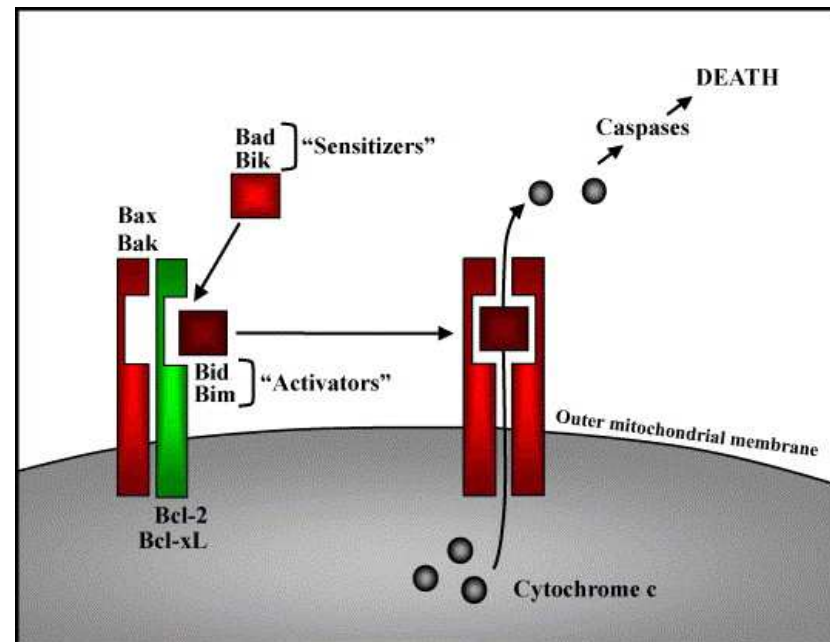
Proteiny Bcl-2 tvoří dimery

- prostřednictvím domény BH homodimerizují nebo heterodimerizují
- homodimery Bax indukují apoptózu
- Bcl-2 tvoří s proteinem Bax heterodimery, čímž jeho proapoptickou aktivitu inhibují
- poměry faktorů „pro-death“ a „pro-survival“ rodiny Bcl-2 rozhodují o smrti buněk



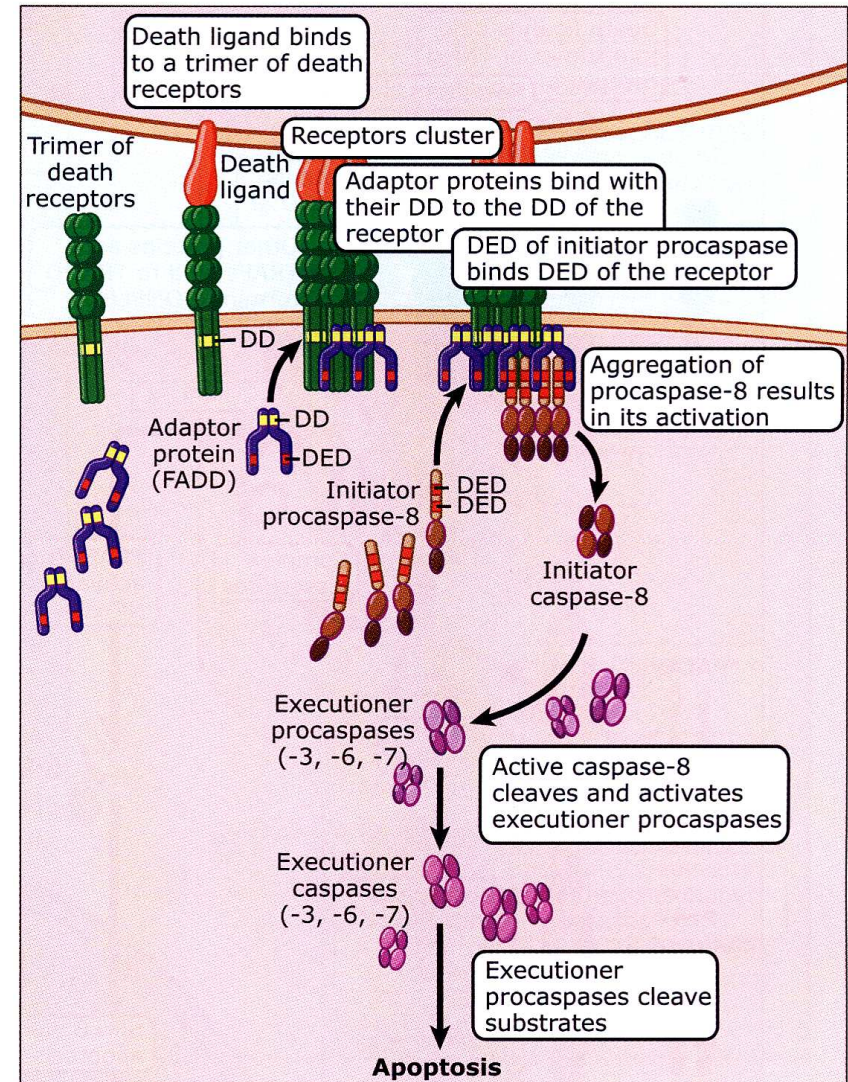
Rodina Bcl-2

- pro-apoptotické signály způsobují depolarizaci vnější mitochondriální membrány a sestavení takových dimerů z proteinů rodiny Bcl-2, které usnadňují přenos cytochromu c membránou do cytozolu, kde se spojuje s dalšími proteiny a spouští kaskádu reakcí vedoucí k apoptóze
- anti-apoptotické signály vedou k sestavování takových komplexů rodiny Bcl-2, které uvolnění cytochromu c mimo mitochondrie neumožňují



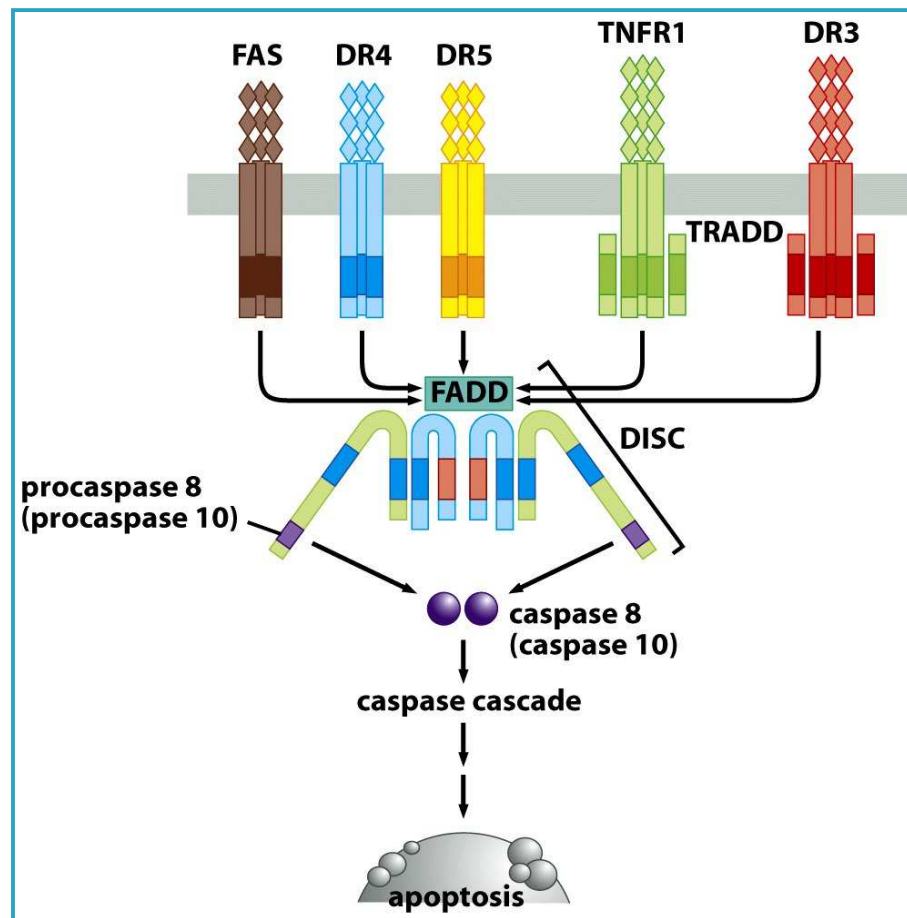
Vnější (receptorová) dráha

- aktivovaná vnějšími („death“) ligandy
- registrace ligandů povrchovými receptory Fas a TRAIL (rodin receptorů TNF)
- receptory po aktivaci tvoří trimery
- dva nebo tři trimery se prostřednictvím ligandů propojují
- nitrobuněčné domény těchto receptorů se tím aktivují – jsou schopny interakce s dalšími proteiny – např. adaptérovým proteinem FADD
- FADD je následně schopen interakce s monomery prokaspázy 8 a stimulace jejich dimerizace
- dimerizace aktivuje kaspázu 8, která tak může aktivovat exekuční kaspázy



Receptory smrti

- transmembránové proteiny schopné vyvolat apoptózu
- napojují se na vnitřní kaspázovou signalizaci

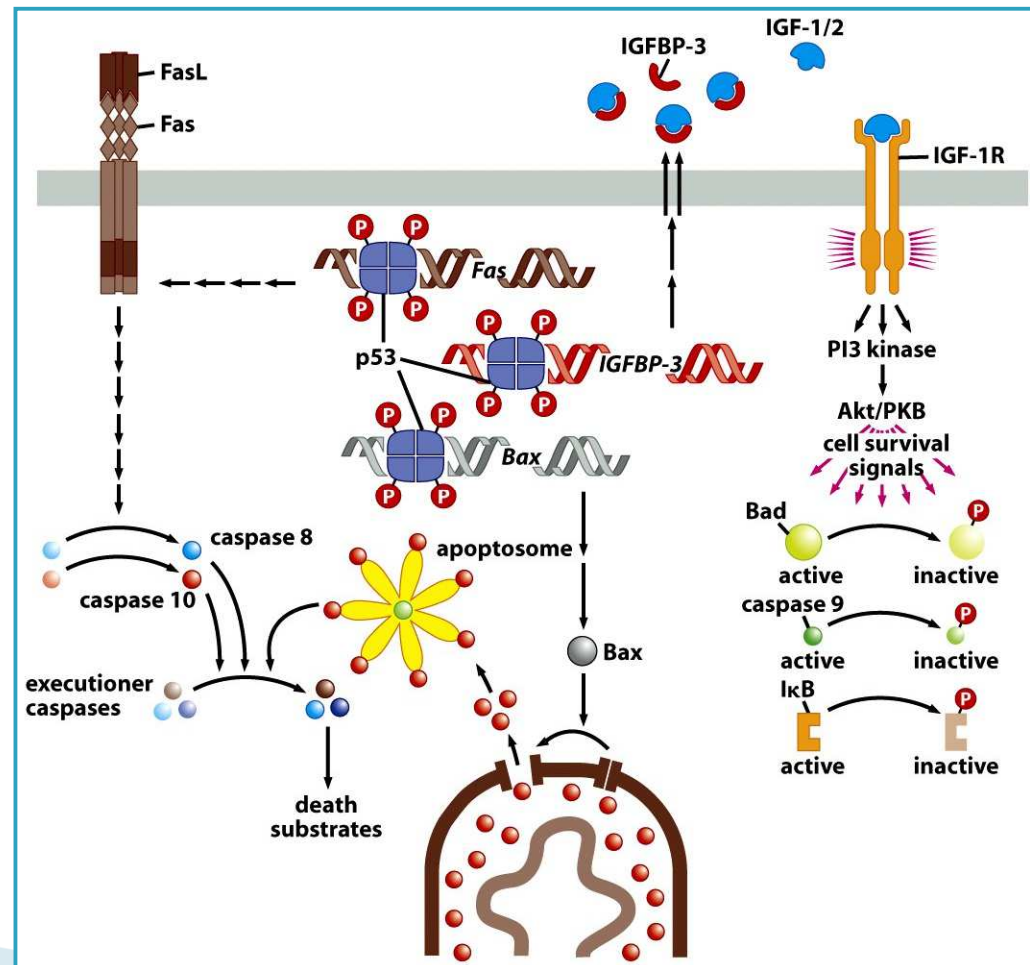


Apoptóza a p53

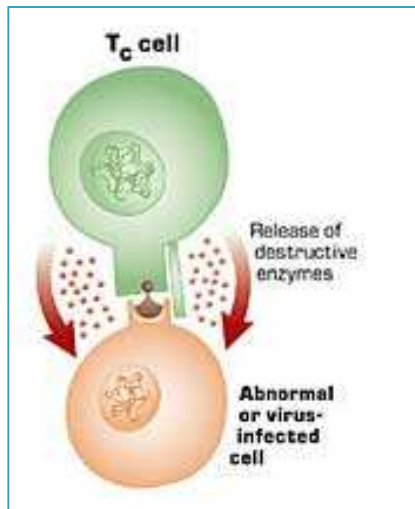
- poškození DNA, nedostatek růstových faktorů a další stresové podněty mohou indukovat apoptózu pomocí proteinu p53

p53

- aktivuje expresi *bax*, který kóduje pro-apoptotický protein uvolňující cytochrom c z mitochondrií (aktivace kaspáz)
- posiluje expresi receptoru **Fas**
- blokuje anti-apoptotickou dráhu řízenou **IGF (Insulin-like growth factor)**



Apoptóza vyvolaná perforinem a granzymem B



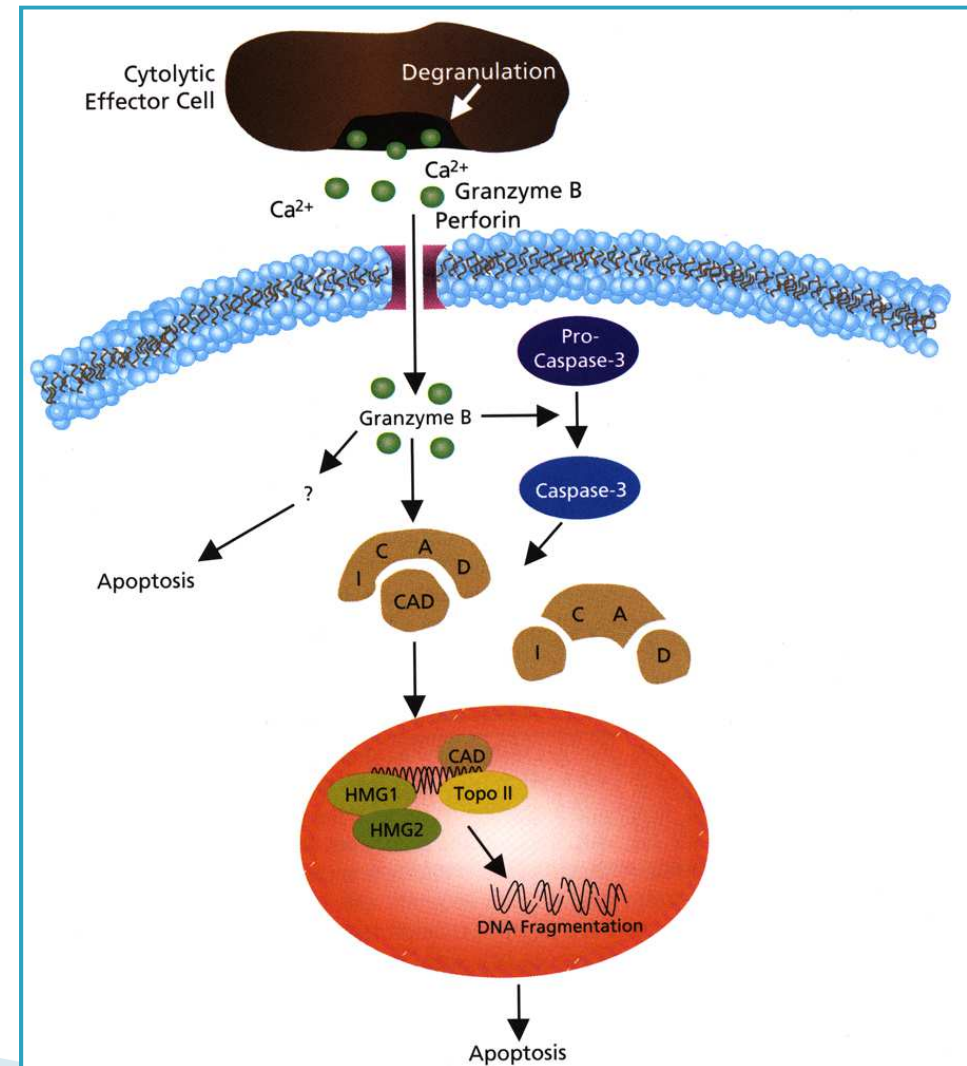
oba proteiny uvolňovány cytotoxickými T-buňkami

Perforin:

tvorba transmembránových pórů pro zajištění průniku granzymu do buňky

Granzym B:

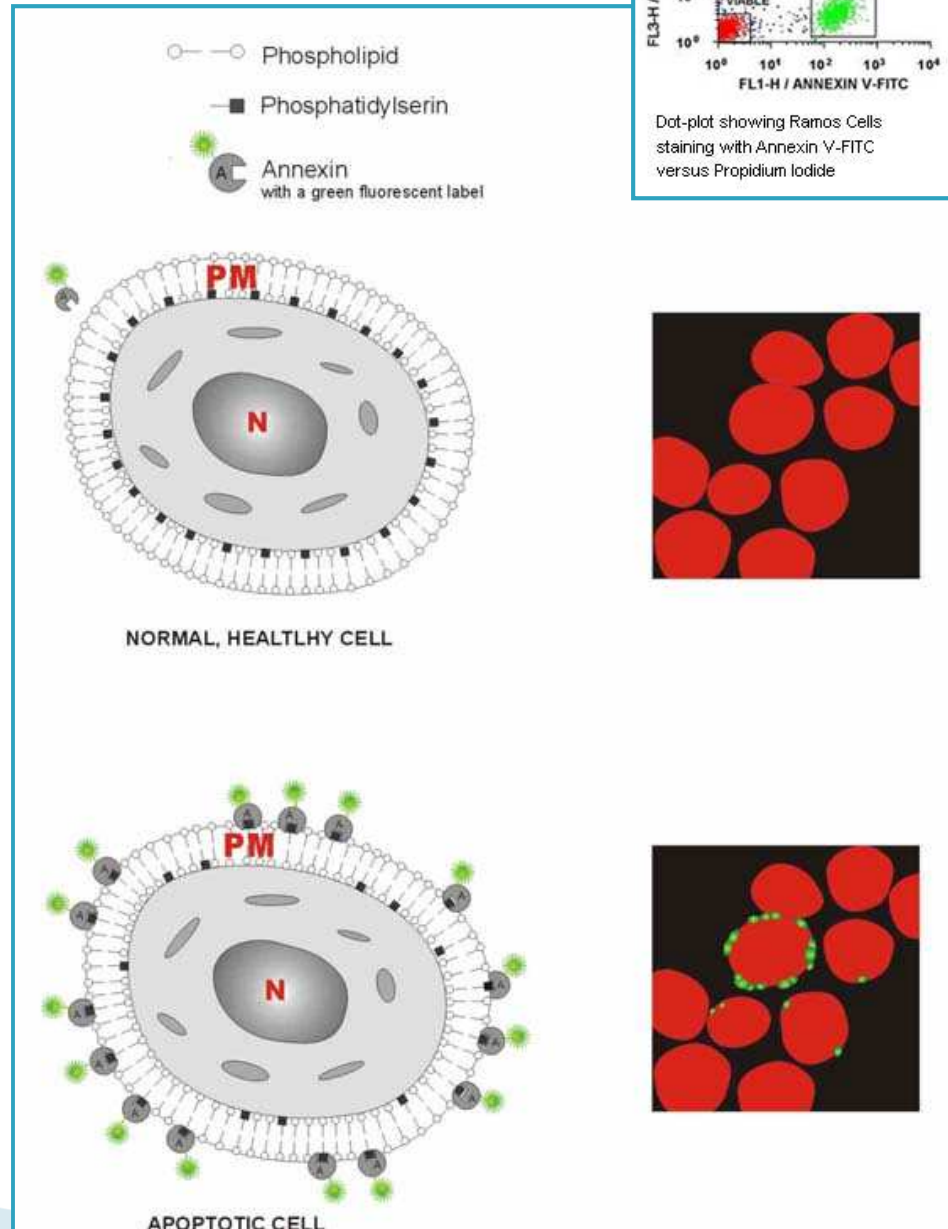
- štěpení efektorových prokaspáz (kaspáza 3)
- štěpení inhibitoru ICAD



Metody detekce apoptózy

Změny v plazmatické membráně

- translokace fosfatidylserinu z vnitřní do vnější vrstvy – znak rané apoptózy
- detekce proteinem Annexin V, který se k fosfatidylserinu váže
- označení Annexinu V fluoreskující značkou - detekce fluorescenční mikroskopií nebo průtokovou cytometrií
- nekrotické buňky mohou poskytovat falešnou pozitivitu díky poškození membrán - lze eliminovat současným barvením DNA (např. propidium jodidem – „double-staining“)

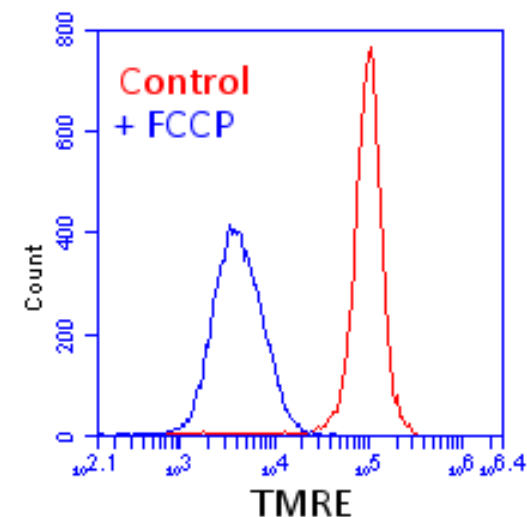


Metody detekce apoptózy

Změny v mitochondriální membráně

- snížený membránový potenciál – znak rané apoptózy
- lze detekovat sondou TMRE (tetrametylrodamin, etyl ester), což je barvivo, které proniká do buněk a váže se na mitochondrie
- u mitochondrií v apoptotických buňkách se sníženým membránovým potenciálem je vazebná schopnost TMRE snížena
- obvyklá detekce – průtokovou cytometrií
- lze stanovit i uvolněné mitochondriální proteiny (např. cytochrom c)

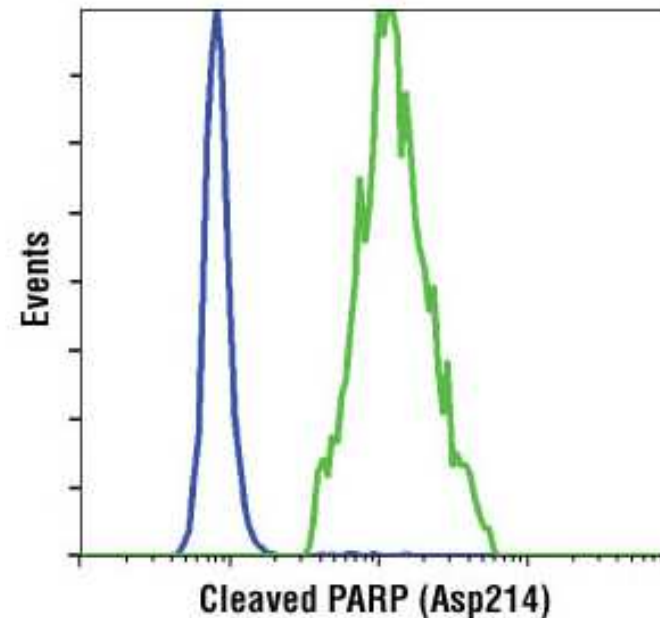
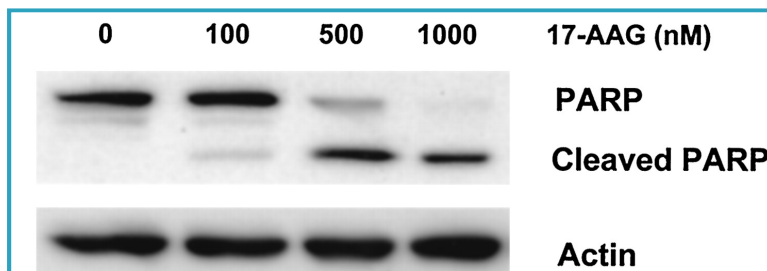
FCCP indukuje permeabilizaci mitochondriální membrány



Metody detekce apoptózy

Změny v cytoplazmě

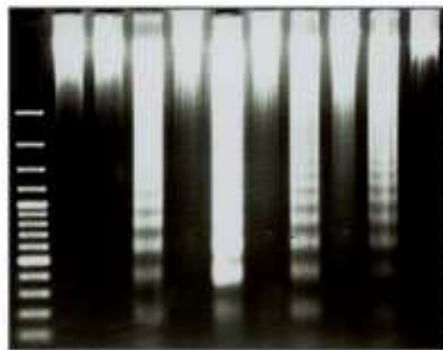
- aktivace kaspáz
- detekce pomocí specifických kaspázových substrátů, např. PARP nebo cytokeratin
- detekce pomocí protilátek zaměřených na epitopy, které se obnažují po štěpení kaspázami nebo přímo degradaci substrátů – např. westernovým přenosem nebo průtokovou cytometrií



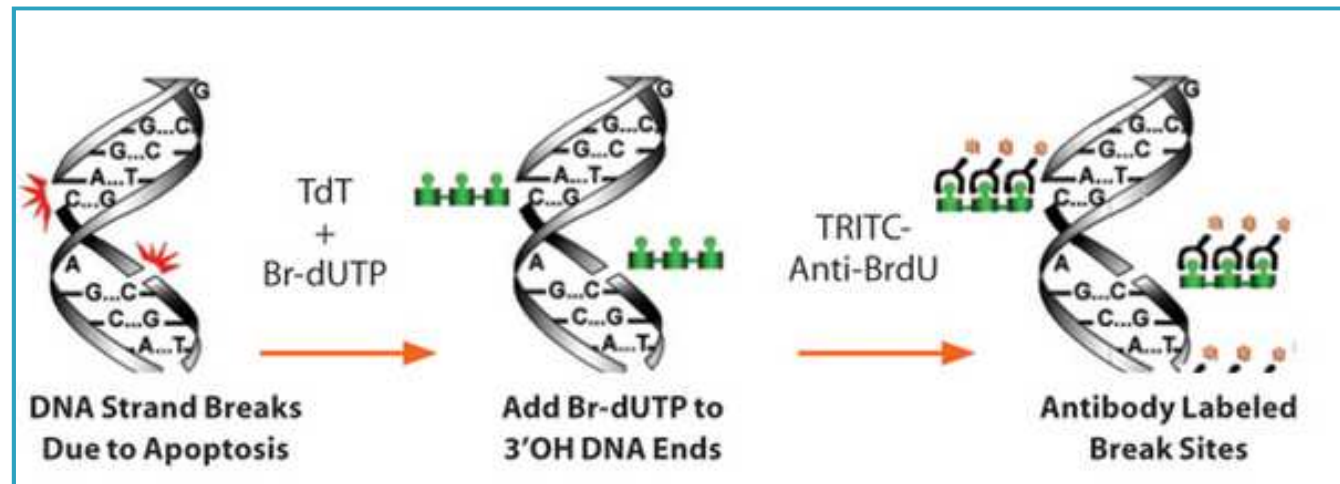
Metody detekce apoptózy

Změny jádře

- kondenzace chromatinu
- fragmentaci DNA (dvouřetězcové zlomy mezi nukleozomy) lze detekovat gelovou elektroforézou nebo technikou TUNEL
- TUNEL (terminal deoxy-nucleotidyltransferase dUTP nick end labelling) assay
- zlomy DNA jsou označeny enzymem TdT, které se pak stanovují protilátkami (imunohistochemicky nebo průtokovou cytometrií)



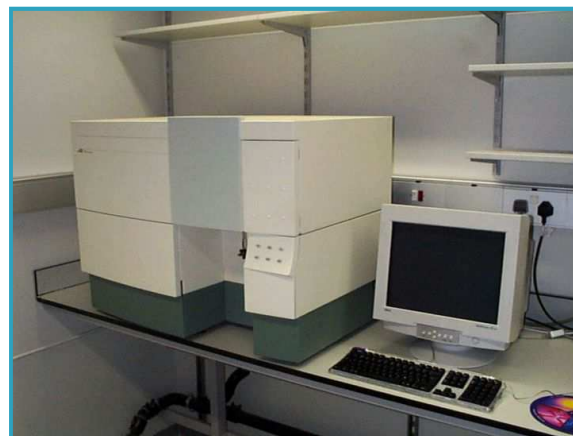
Sil	-	200	-	130	-	200	-	130	-	130
OTA	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
AcD	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
TNF α	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
H $_2$ O $_2$	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
UV-C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-



Průtoková cytometrie

Co dokáže?

- rozlišit živé buňky od mrtvých
- zhodnotit míru emitované fluorescence každou jednotlivou buňkou
- frakcionovat buňky podle určitých vlastností, které korelují s mírou fluorescence
- vyhodnotit více než 100 buněk za 1 minutu



Průtoková cytometrie

Účel: Studium vlastností individuálních buněk v buněčné populaci

- míra přítomnosti určitých antigenů (např. sledování diferenciacce buněk)
- míra přítomnosti DNA (např. sledování buněčného cyklu, apoptózy)
- velikost buněk, přítomnost granulí v cytoplazmě (určení buněčných typů ve směsích buněk)
- možno využít k frakcionaci buněk dle určitých vlastností (FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorter)

Průtoková cytometrie

Princip: Počítačové zpracování míry emitované fluorescence jednotlivých buněk

Předpoklad: Míra fluorescence odpovídá sledovanému parametru (antigen, DNA...)

Pojmy:

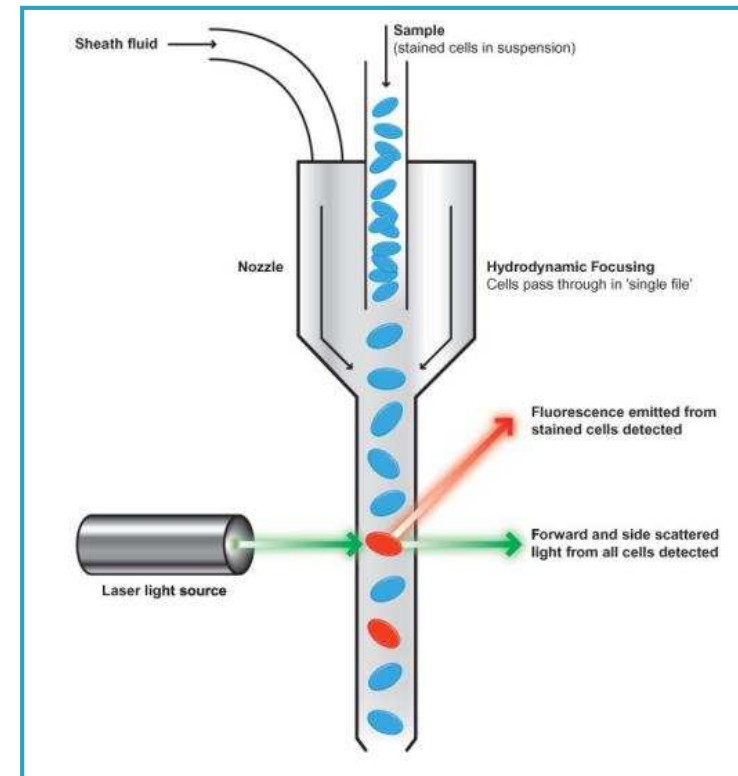
„Flow cytometry“ - měření určité vlastnosti buněk v průběhu jejich toku přístrojem

„Flow sorting“ (Fluorescence-activated cell sorting FACS) oddělování buněk podle jejich vlastností zjištěných v průběhu průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie

Postup:

- koncentrovaná suspenze buněk je opatřena **fluorescenční značkou** specifickou pro cílovou molekulu (pro DNA - propidium jodid, pro protein - fluoreskující protilátka)
- buněčná suspenze je rozdělena na malé kapičky (každá z nich obsahuje jednu buňku)
- jednotlivé kapičky jsou ozářeny **laserovým paprskem** - dojde k excitaci fluorescenční značky a **emisi fluorescence**
- měření míry fluorescence pro každou buňku (určuje míru přítomnosti cílové molekuly)
- měření míry rozptylu světla pro každou buňku (určuje míru granulace cytoplazmy, velikost a tvar buňky)



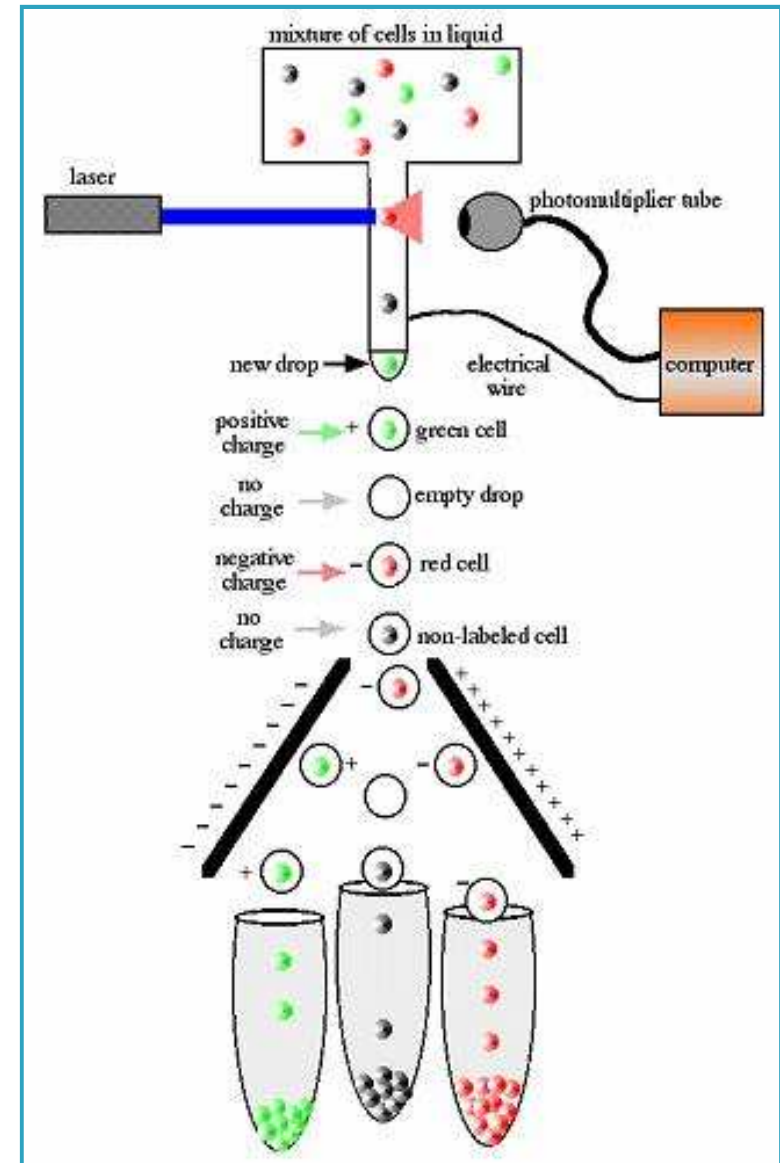
Frakcionace buněk - FACS

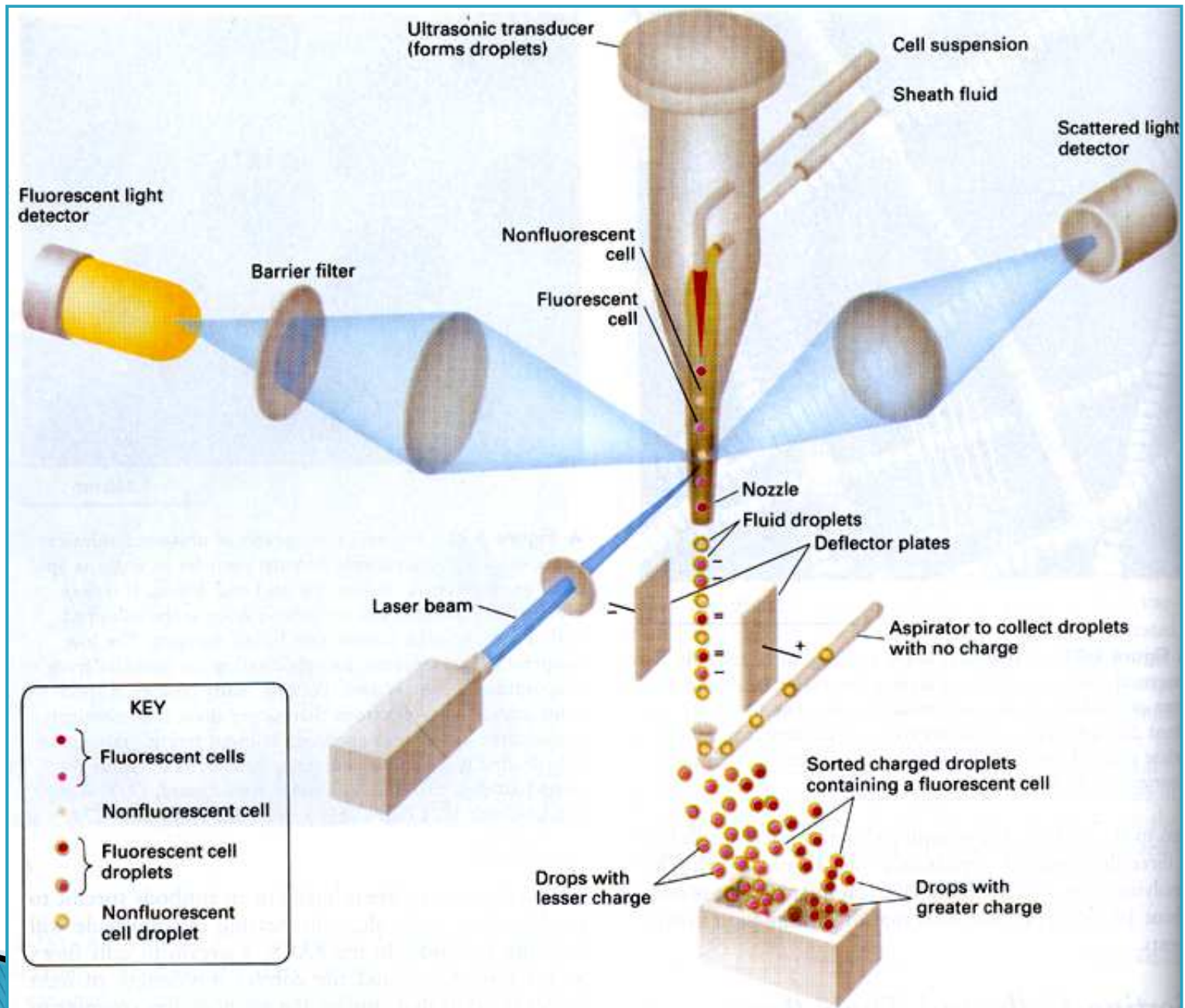
Princip:

- podle míry fluorescence je každé kapičce s jednotlivou buňkou udělen proporcionální elektrický náboj
- kapičky procházejí prostorem mezi dvěma elektrodami a dochází k jejich frakcionaci podle náboje

Výhoda:

- buňky nejsou průtokovou cytometrií poškozeny - udržují si životaschopnost
- buňky nejsou kontaminovány - lze je dále kultivovat





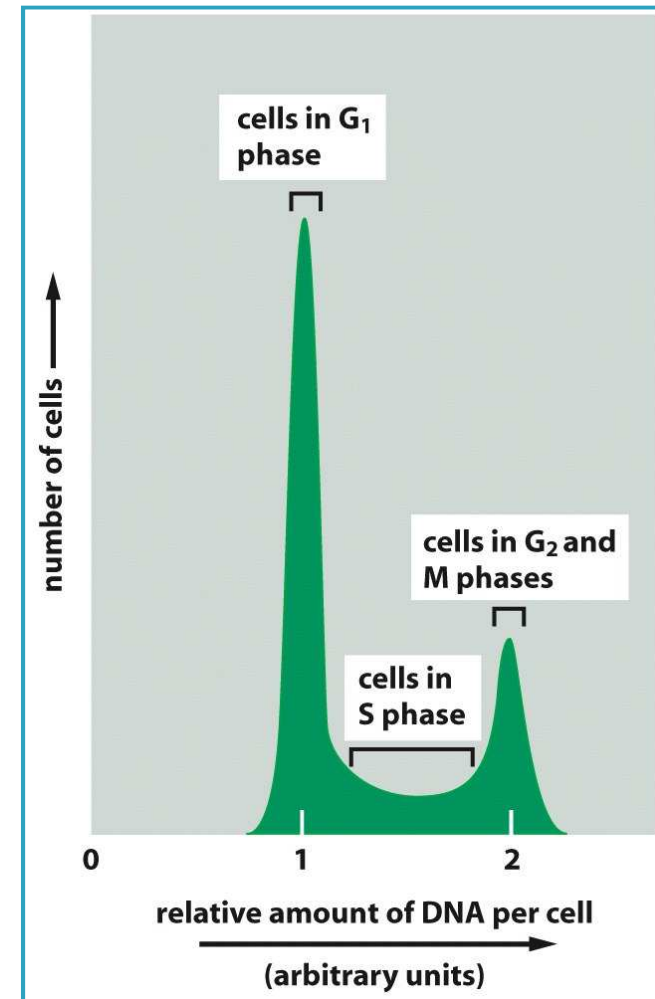
Využití průtokové cytometrie pro analýzu buněčného cyklu

Princip:

- měření obsahu DNA v jednotlivých buňkách, který se v průběhu cyklu periodicky mění

Postup:

- obarvení DNA fluorescenčním barvivem - propidium jodidem
- měření míry fluorescence emitované jednotlivými buňkami
- počítačové zpracování dat a grafické vyhodnocení



Využití průtokové cytometrie pro analýzu fragmentace DNA

Princip:

- buňky se ošetří 70% etanolem a poškozenou membránou uniká fragmentovaná DNA
- fragmentovaná DNA po obarvení propidium jodidem fluoreskuje v oblasti subG1)

