

## Sylabus Molekulární fyziologie genomu 2019

Vyučující: Doc. RNDr. Eva Bártová, Ph.D.

1. **Definice chromatinu:** Jednotlivé složky chromatinu, úrovně organizace chromatinu, chromozomální teritoria a uspořádání chromatinu do chromozomálních teritorií.
2. **Struktura nukleozómů:** Varianty a typy histonů, formování nukleozómů, funkce histonu v buněčných jádrech.
3. **Epigenetické modifikace histonů:** acetylace, metylace, fosforylace a ubiquitinace. Korelace mezi metylací histonů a DNA.
4. **Funkce chromatinu:** Ve vztahu k replikaci, transkripci, sestřihu a DNA reparaci. Charakteristika struktury chromatinu během zmíněných procesů.
5. **Struktura metafázních chromozómů:** typy a sub-typy metafázních chromozómu, karyotypování, klinické aplikace
6. **Definice buněčné diferenciaci:** Struktura chromatinu u cyklujících a diferencujících se buněk.
7. **Diferenciaci embryonálních kmenových buněk:** Možnosti využití myších ES buněk ke studii epigenomu, možnosti využití lidských ES buněk jako terapeutického nástroje - diskuse.
8. **Krvetvorba:** hlavní diferenciacní směry
9. **Metodické přístupy:** Fluorescenční in situ hybridizace (FISH technika)
10. **Metodické přístupy:** Imunocytochemie
11. **Metodické přístupy:** Komparativní genomická hybridizace
12. **Metodické přístupy:** GFP technologie, FRAP technika, Dendra2 (fluorochrom) fotokonverze
13. HP1 protein a centromerický heterochromatin: Význam z hlediska struktury a funkce chromatinu
14. **Apoptóza** – morfologie, molekulárně-biologické změny, hlavní apoptotické dráhy, metodiky studia apoptózy
15. **Struktura a funkce cytoskeletu:** hlavní složky cytoskeletu, proteiny cytoskeletu
16. **Jaderná matrix:** Složky jaderné matrix, kontroverzní přístupy k existenci jaderné matrix, vztah jaderná matrix k formování chromatinu
17. **Laminy a další proteiny jaderné matrix:** Typy laminů a jejich funkce.
18. **BAC/PAC knihovny** a jejich využití pro FISH techniku - princip FISH techniky
19. **Patofyziologie a cytogenetika nádorových buněk:** Cytogenetické metody aplikované v klinické cytogenetice. Základní cytogenetické změny u vybraných typů nádorů jako je retinoblastom, nádory tlustého střeva, mnohočetný myelom.
20. **Konfokální mikroskopie** - princip a využití
  
21. HP1 proteiny – struktura a funkce
22. Methylace DNA versus methylace histonů
23. Epigenetická modifikace histonů a jejich funkce
24. Varianty histonů
25. Organizace chromatinu, struktura nukleozómů
26. Epigenetické modifikace centromer, inaktivace X chromosomu (Xi) a epigenetika telomer
27. Účinky HDAC inhibitorů

## Literatura:

1. Cremer, T. and Cremer, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2, 292-301.
2. Rice, J.C. and Allis, C.D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 263-273.
3. Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I. and Groudine, M. (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 137-143.
3. Bártová and Kozubek (2006) Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies, *Biol Cell* 98: accepted.
4. Raška I. Buněčné jádro, *Vesmí*, 563-572, 2000
5. Bednár J., Staněk D., Malínský J., Raška I. Dnešní mikroskopie v biomedicíně, *Vesmír*, 581-585, 2004

## Otázky:

1. Replikace genomu
2. Struktura buněčného jádra
3. Regulace exprese genů u eukaryotických buněk
4. Numerické aberace - cytogenetika
5. Opravy DNA pomocí homologní rekombinace
6. Vznik aberací u chromosomů - příklad translokace chromosomů, nádorového supresoru, protoonkogenu, amplifikace genů
7. Pohyblivost genomu – experimenty na živých buňkách, GFP technologie
8. Struktura genomu - chromosomy
9. Strukturální aberace
10. Regulace exprese u eukaryotních buněk
11. Faktory ovlivňující chromatin
12. NHEJ reparace DNA
13. Působení UV záření na genom
14. Epigenetická regulace exprese
15. Poškození genomu
16. Post-translační modifikace histonů a jejich úloha
17. Struktura genomu
18. Enhancery a aktivátory
19. Stanovení zlomů DNA – experimentální přístupy

## Molecular pathophysiology of the genome

1. **Definition of chromatin:** Chromatin components, levels of chromatin organization, chromosomal territories and chromatin arrangement into chromosome territories.
2. **Structure of nucleosome:** Histone variants, nucleosome arrangement, histone function in the interphase cell nuclei.
3. **Epigenetic modification of histones:** acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitination. Correlations between histone and DNA methylation states.
4. **Function of chromatin:** chromatin architecture related to the replication, transcription, splicing and DNA repair.

5. **Structure of metaphase chromosomes:** types and sub-types of metaphase chromosomes, karyotyping and clinical applications
6. **Definition of the cell differentiation:** Chromatin structure of cycling and differentiated cells.
7. **Differentiation of embryonic carcinoma cells:** Possibility to use mouse ES cells (knockout organisms), possibilities to use human ES cells as a therapeutic tool.
8. **Hematopoiesis:** Main differentiation pathways.
9. **Methodological approaches:** Fluorescence in situ hybridization (FISH technique), immunocytochemistry, Comparative genomic hybridization (CGH), DNA microarrays, GFP technologies, FRAP technique.
10. **Heterochromatin protein 1 (HP1) and centromeric heterochromatin:** An importance of HP1 in relationship to chromatin structure and function.
11. **Apoptosis:** Morphology, molecular-biological changes, main apoptotic pathways.
12. **Structure and function of cytoskeleton:** Main parts of cytoskeleton, cytoskeletal proteins.
13. **Nuclear matrix:** Components of nuclear matrix, controversial approaches to the existence of the nuclear matrix. Relationship of nuclear matrix to chromatin architecture.
14. **Lamins and other proteins of nuclear matrix:** Types of lamins and their function.
15. **MARs, SARs, LBARs regions of nuclear matrix,** their function and relationship to the chromatin structure.
16. **BAC/PAC clones** and their importance for FISH technique.
17. **Tumor cell pathophysiology and cytogenetics:** Cytogenetic methods applied in clinical laboratories. Basic cytogenetic changes in selected tumors such as retinoblastoma, colorectal carcinoma and multiple myeloma.
18. Confocal microscopy: Application, FLIM-FRET analysis, FRAP analysis

Anotace:

Hlavní cíle kurzu Molekulární fyziologie genomu vedou k porozumění základů korelací mezi strukturou a funkcí chromatinu. Cyklus přednášek je koncipován tak, aby posluchačům poskytl řadu nových poznatků z oblasti biologie chromatinu. Uspořádání chromatinu vyššího řádu je probíráno v kontextu s řadou fyziologických dějů jako je proliferace buněk, diferenciace a buněčná smrt apoptóza a patofyziologických procesů, jako je nádorová transformace buněk. Velká pozornost je věnována problematice epigenetických regulací genomu, jako jsou například methylace a acetylace histonů a methylace DNA. Dalším cílem je podrobně vyložit nejnovější postupy a možnosti konfokální mikroskopie a cytometrie s vysokým rozlišením. Studenti mají možnost se seznámit s řadou molekulárně biologických metod. Na konci tohoto kurzu bude student schopen vysvětlit význam struktury chromatinu při regulaci jaderných procesů jako je replikace, transkripce, sestřih a DNA reparace. Studenti by měli pochopit principy metod jako je například fluorescenční in situ hybridizace (FISH), chromatinová imunoprecipitace, komparativní genomová hybridizace (CGH), imunofluorescence, RT-PCR a další. Informace mohou využít především v dalších kurzech zabývajících se biologií nádorů. Celá problematika je vysvětlována z pohledu základního výzkumu a studenti mají možnost se seznámit s nejnovějšími poznatky a trendy v biologii chromatinu.

The main aims of lectures from Molecular Physiology of the Genome lead to an understanding of correlations between structure and function of chromatin. Lectures offer new knowledge in the field of chromatin biology. The arrangement of higher order chromatin structure is discussed from the view of physiological events such as cell proliferation, differentiation, and cell death apoptosis. Moreover, we are interested in changes in chromatin architecture during a pathophysiological process such as tumor cell transformation and laminopathies. A part of the chromatin structure course pays attention to epigenetic regulation of genome. Students are informed about the functional and structural aspects of histone acetylation, histone methylation, and DNA methylation. In the next part, of course, we lecture the latest principles and facilities of confocal microscopy, high-resolution cytometry and/or super resolution techniques. Students are familiarized with a vast array of molecular-biology methods. At the end of course the student will be able to explain the importance of chromatin structure during regulation of replication, transcription, splicing, and DNA reparation. Students would understand the principles of essential methods such as fluorescence in situ hybridization (FISH), chromatin immunoprecipitation, comparative genomic hybridization (CGH), immunofluorescence, RT-PCR, and others. Students gain a lot of knowledge in the field of tumor cell biology, which could be applied in other courses and their diploma thesis with a similar area of interest. The chromatin biology is explained from the view of basic research and students are familiarized with recent trends in this attractive field of science.

1. Buněčné jádro, jadérko – kompartmentalizace interfázních jader
2. Transkripce, RNA procesy a RNA interference
3. Struktura chromatinu a transkripce
4. Struktura chromatinu a buněčná diferenciac
5. Struktura chromatinu a apoptóza
6. Epigenetické aspekty chromatinu
7. Cytoskelet, lamíny a kontroverzní jaderná matrix
8. BAC/PAC knihovny a příprava DNA sond pro FISH techniku
9. Konfokální mikroskopie a relevantní metody
10. Struktura chromatinu a epigenetické změny u nádorových buněk
11. Cytometrie s vysokým rozlišením - princip a statistické a bioinformatické analýzy
12. Microarray technologie
13. Reparační mechanismy DNA. -