

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Boris Vyskot

# **EpiGenetika**

Olomouc  
**2010**

Oponenti: RNDr. Aleš Kovařík, CSc.  
Mgr. Jaroslav Fulneček, CSc.

1. vydání

© Boris Vyskot, 2010

**ISBN 978-80-244-2534-4**

# Obsah

<b>1 ÚVOD</b>	<b>5</b>
<b>2 HISTORIE EPIGENETIKY</b>	<b>6</b>
<b>3 MECHANIZMY EPIGENETICKÝCH PROCESŮ</b>	<b>11</b>
3.1 Metylace cytozinu	11
3.1.1 Distribuce 5-metylcytozinu	12
3.1.2 DNA metyltransferázy a vazebné proteiny	13
3.1.3 Inhibitory metylace DNA	14
3.2 Modifikace jaderných histonů	16
3.2.1 Struktura chromatinu	16
3.2.2 Acetylace histonů	19
3.2.3 Metylace histonů	20
3.2.4 Ubiquitinace a sumoylace histonů	22
3.3 Proteiny skupin Polycomb a Trithorax	22
3.4 Úlohy malých molekul RNA	24
3.4.1 Historie objevu RNA interference	25
3.4.2 Mechanizmy RNAi	26
3.5 Chromatin remodelující proteiny	28
3.6 Priony	28
3.7 Trojrozměrná struktura jádra	29
3.8 Divergence epigenetických mechanismů	29
<b>4 METODY STUDIA EPIGENETIKY</b>	<b>31</b>
4.1 Analýza genové exprese	31
4.2 Analýza metylace DNA	33
4.3 Studium modifikací histonů	36
<b>5 JEDNODUCHÉ EUKARYOTICKÉ MODELY</b>	<b>39</b>
5.1 Prvoci	39
5.1.1 Trepka, <i>Paramecium tetraurelia</i>	39
5.1.2 Cytoplazmatická dědičnost	41
5.1.3 Strukturní dědičnost	42
5.1.4 Chromatin makrojádra a mikrojádra	43
5.1.5 Restrukturalizace genomu makrojádra	43
5.1.6 Umlčování genů cestou RNAi	44
5.1.7 Dědičnost restrukturalizací genomu	44
5.2 Kvasinky	46
5.2.1 Kvasinka pивní, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
5.2.1.1 Genová konverze	46
5.2.1.2 Charakteristika heterochromatinu	47
5.2.1.3 Reportérové geny	47
5.2.2 Kvasinka, <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	49
5.2.2.1 Centromerický poziční efekt	49
5.2.2.2 Charakteristika centromerického heterochromatinu	49
5.3 Plíseň chlebová, <i>Neurospora crassa</i>	50
5.3.1 Životní cyklus	50
5.3.2 Epigenetické procesy u <i>N. crassa</i>	51
5.3.2.1 Repeticemi indukované bodové mutace, RIP	51

5.3.2.2	Potlačování genové exprese, quelling . . . . .	52
5.3.2.3	Meiotické umlčování nepárované DNA, MSUD . . . . .	52
<b>6</b>	<b>MODELÝ STUDIA BEZOBRATLÝCH ŽIVOČICHŮ . . . . .</b>	<b>53</b>
6.1	Hlístice, <i>Caenorhabditis elegans</i> . . . . .	53
6.1.1	Determinace pohlaví . . . . .	53
6.1.2	Kompenzace dávky genů . . . . .	54
6.1.3	Potlačování funkce chromozomu X v zárodečné linii . . . . .	55
6.1.4	RNA interference . . . . .	56
6.2	Moucha octomilka, <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	58
6.2.1	Determinace pohlaví . . . . .	59
6.2.2	Kompenzace dávky X-vázaných genů. . . . .	60
6.2.3	Poziční efekt . . . . .	61
6.3	Parentální imprinting u hmyzu . . . . .	63
<b>7</b>	<b>EPIGENETICKÉ PROCESY U KRYTOSEMENNÝCH ROSTLIN . . . . .</b>	<b>65</b>
7.1	Epimutace . . . . .	67
7.2	Nukleolární dominance . . . . .	71
7.3	Paramutace . . . . .	72
7.4	Umlčování mobilních genetických elementů. . . . .	74
7.5	RNA interference u rostlin. . . . .	76
7.6	Epigenetické řízení květního vývoje. . . . .	79
7.7	Genomový imprinting . . . . .	80
<b>8</b>	<b>EPIGENETIKA SAVCŮ . . . . .</b>	<b>84</b>
8.1	Metylace genomu a CpG ostrovy. . . . .	84
8.2	Kompenzace dávky X-vázaných genů . . . . .	84
8.3	Genomový imprinting . . . . .	88
8.4	Dědičnost epigenetických změn. . . . .	97
8.5	Dědičnost řízená RNA a proteiny . . . . .	101
<b>9</b>	<b>MEDICÍNSKÉ ASPEKTY EPIGENETIKY . . . . .</b>	<b>104</b>
9.1	Zárodečná linie a kmenové buňky . . . . .	104
9.2	Reprodukční a terapeutické klonování . . . . .	106
9.3	Choroby člověka s epigenetickými aspekty . . . . .	108
9.3.1	Poruchy genomového imprintingu . . . . .	108
9.3.2	Choroby způsobené poruchou metylace DNA . . . . .	110
9.3.3	Choroby související se strukturou chromatinu . . . . .	110
9.3.4	Epigenetické choroby vázané na chromozom X . . . . .	112
9.4	Epigenetika nádorového bujení . . . . .	113
9.5	Epigenetika a neurobiologie . . . . .	115
9.6	Transgenerační efekty. . . . .	117
<b>10</b>	<b>SHRnutí EPIGENETICKÝCH JEVŮ . . . . .</b>	<b>120</b>
<b>11</b>	<b>SLOVNÍČEK NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH TERMÍNŮ . . . . .</b>	<b>122</b>
<b>12</b>	<b>INTERNETOVÉ STRÁNKY . . . . .</b>	<b>135</b>
<b>13</b>	<b>POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA. . . . .</b>	<b>137</b>

# 1 ÚVOD

Epigenetika je relativně velmi mladý vědní obor, který můžeme datovat teprve od 80. let 20. století. Předpona *epi-* má poněkud nadřazený nádech vůči genetice, je však její součástí. Mendelistická a molekulární genetika samozřejmě představují základy dědičnosti, obvykle se však zabývají znaky s úplnou penetrancí a expresivitou. Typickým rysem epigenetiky je naopak exprese neúplná či kolísavá (mozaikový fenotyp) a nepravidelná penetrance projevu genů v potomstvu. Kromě toho se epigenetika zabývá nemendelistickou dědičností znaků, které souvisejí s modifikací – zákonitou či náhodnou – příslušných genů. Mezi pravidelné modifikace genetické informace patří především genomový imprinting, tedy specifická reverzibilní změna genové exprese v závislosti na rodičovském původu. Ke změnám náhodným (stochastickým) patří například epimutace, kdy náhodným (či environmentálně indukovaným) procesem nastává změna genové exprese, která může být děděna i do pohlavního potomstva.

Epigenetika byla Waddingtonem chápána jako suma změn genové exprese, které vedou k diferenciaci v ontogenezi. Po pochopení určitých mechanismů epigenetických procesů byla epigenetika považována za tzv. chromatinovou dědičnost, tedy že o expresi či umlčování genů rozhoduje stav chromatinového templátu. Po objevu regulačních úloh malých molekul RNA je situace ještě složitější, neboť jejich úloha se týká především posttranskripčních regulací. Dnes tedy **epigenetiku můžeme chápat jako široký soubor mechanismů, které dědičně ovlivňují genovou expresi beze změny primární genetické informace, tedy sekvence nukleotidů v DNA.** Dědičnost může fungovat jen v buněčných liniích (v průběhu života jedince) nebo transgeneračně, tedy předávána do pohlavních generací. Jde však prakticky vždy o procesy reverzibilní, tedy potenciálně vratné v řádově vyšších frekvencích, než je tomu u genetických mutací. Některé typy epigenetických změn jsou relativně velmi nestálé, potom hovoříme o vyznívajícím dědičnosti. Zpočátku se zdálo, že epigenetika je omezena jen na náhodné jevy, tzv. epimutace, a její význam je jen okrajový. Dnes se ukazuje, že epigenetické řízení genové exprese je v říši eukaryotických organismů univerzální. Pouze můžeme konstatovat, že dílčí molekulární epigenetické mechanismy (např. metylace DNA) jsou u různých skupin eukaryot (jako jsou například kvasinky, prvoústí či druhoústí živočichové) odlišné.

Je zjevné, že podstatou epigenetických procesů jsou geny, resp. genetická informace. Tato genetická informace však nezbytně nemusí být uložena jen v DNA, ale též v dalších informačních molekulách, jako jsou RNA a proteiny. Vztah genetiky a epigenetiky je snad možné vyjádřit příměrem s knihou (která obsahuje veškerý text či genetickou informaci) a jejím čtením (ne vše co je napsáno, tak čteme, a to ještě různým způsobem a v různém čase). Epigenetika zdůrazňuje vliv podmínek životního prostředí na expresi genů. Všechny molekuly, které hrají roli v epigenetických procesech, jsou samozřejmě kódovány geny. Jaký smysl má tedy vůbec vymezovat předmět epigenetika? Klasická či molekulární genetika dostatečně nevysvětlují řadu mechanismů nemendelistické dědičnosti. Úlohou epigenetiky je tyto mechanismy objasňovat a nacházet v nich kauzální faktory a zákonitosti.

## 2 HISTORIE EPIGENETIKY

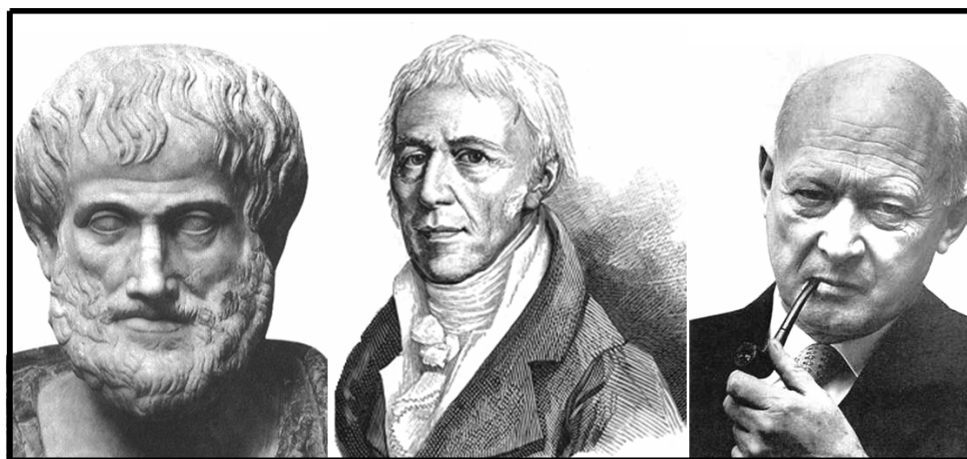
Málokterý obor současné genetiky má v podstatě tak krátkou historii, jako má epigenetika. Abychom však byli přesnější, musíme jít k prapůvodním kořenům epigenetiky a ty leží již na přelomu 18. a 19. století v díle slavného francouzského biologa **Jean-Baptiste Lamarcka** (1744–1829, obr. 2.1). Lamarcka můžeme považovat za prvního badatele, který se pokusil o seriózní výklad evoluční teorie. Na jeho dílo je samozřejmě nutné se dívat v kontextu doby, v níž žil. I když se na vědeckou dráhu dal až v relativně pozdním věku, byl to člověk encyklopedických znalostí, zprvu slavný botanik, poté založil biologii bezobratlých živočichů. Jeho největším dílem je rozsáhlá kniha *Philosophie zoologique*, kterou vydal v roce 1809 a v jejímž úvodu shrnuje své představy o přírodě a životě vůbec. Na rozdíl od svých slavných předchůdců, zejména **Carla Linného** (1707–1778) byl přesvědčen o tom, že se příroda vyvíjí, a to pod tlakem vnějších životních podmínek. Lamarck tyto reakce považoval za adaptace, takže evoluční vývoj považoval za soustavné přizpůsobování prostředí. Vývoj považoval za kontinuální proces, který vede od hmoty neživé k živým bytostem, od jednoduchých forem ke složitým, od méně dokonalých tvorů k dokonalejším. Výsledkem takového procesu je pak tvor, který je dokonale přizpůsoben stávajícímu životnímu prostředí. Dle pozorování přírody správně usuzoval, že organizmy reagují na změny ve svém prostředí vývojem nových orgánů nebo změnou struktury a funkce stávajících orgánů. Jinými slovy, prostředí ovlivňuje dokonalost orgánů či vede k jejich zániku. Jeho teorie je nazývána **adaptivní evolucí** či („měkkou“) selekcí a zásadně počítá s tím, že adaptivní změny jsou dědičné. Znamenalo by to ovšem, že změny získané v průběhu života v somatické linii by se měly nějakým způsobem přenášet do potomstva. S dědičností získaných znaků ovšem počítal ve své **evoluci přírodním výběrem** i **Charles Darwin** (1809–1892), ovšem nekladl na ni takovou váhu.

Díky své teorii o dědičnosti získaných znaků byl Lamarck brzy po objevení se Darwinova díla dehonestován a vstoupil do učebnic jako autor nesprávné evoluční teorie. Mezi jeho největší kritiky patřil zejména německý učenec **August Weismann** (1834–1914), který sledoval dědičnost experimentálně indukovaných změn v somatické dráze (konkrétně uřezával myším ocásky) a došel k závěru, že takové změny se nedědí. Weismann je také autorem teorie o divergenci zárodečné a somatické dráhy. V zásadě jde o správnou teorii, že u (vyšších) živočichů se v časně embryogenezi ustavuje zárodečná dráha, a sice determinují se zárodečné buňky, které vzápětí putují do (budoucích) gonád a tím se zásadně izolují od těla jedince (somatické dráhy): tato teorie vyšla ve známost jako **Weismannova bariéra**. U rostlin a primitivních živočichů (jako je například nezmar) se zárodečná dráha takto nediferencuje a v podstatě somatická linie se může účastnit pozdějšího reprodukčního procesu. Není ovšem pravdou, že Weismannova bariéra může zabránit v ovlivňování buněk zárodečné dráhy liniemi somatickými. Somatické buňky se vskutku obvykle do další generace nepřenášejí, mohou však různými fyziologickými vlivy měnit expresi genů buněk zárodečné dráhy a ovlivňovat případně i další pohlavní generaci. Takto je snad možné dnes vysvětlovat Lamarckovu teorii dědičnosti získaných znaků. V podstatě však jde o schopnost adaptovat se na změny životního prostředí a tyto schopnosti jsou zajisté dědičné. Demonstroval to i americký psycholog **James Mark Baldwin** (1861–1934), autor učení o ontogenetické evoluci. Prokazoval, že jedinci, vybíraní podle zvýšené schopnosti se učit nové dovednosti v podstatě mají šanci tuto schopnost přenášet do další generace, i když tato schopnost nemusí být jen geneticky podmíněna. Podstatné tedy je, že se nepřenáší znak jako takový, ale schopnost organismu znak fenotypově projevit.

Počátek 20. století se vyznačuje nástupem mendelistické genetiky a s malými výjimkami je Lamarckovo dílo zcela zatracováno. Určitě k tomu přispěla i snaha některých pseudovědců, kteří pod termíny „environmentální vitalismus“ (rakouský zoolog Paul Kammerer, 1880–1926) či „tvůrčí sovětský“ dar-

winismus (ruský agronom Trofim Denisovič Lysenko, 1898–1976) prezentovali falzifikované výsledky podporující ideu dědičnosti získaných znaků.

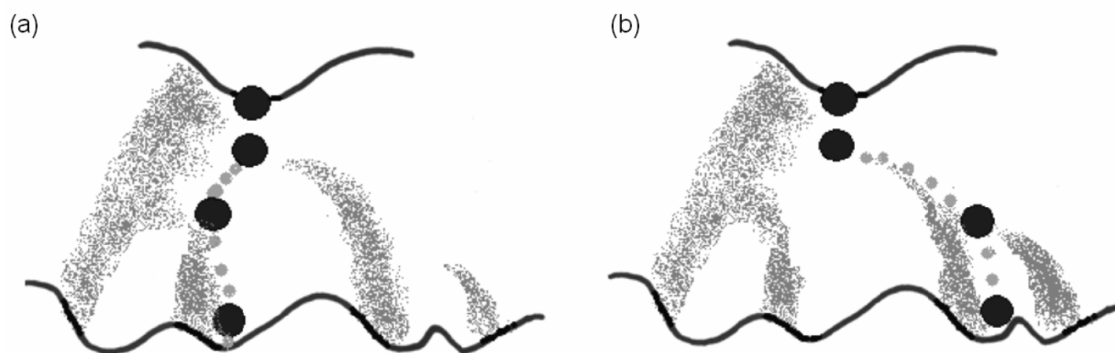
Jistá změna pak nastává až v polovině 20. století, kdy se rozvíjí vývojová biologie především v díle britského polyhistora **Conrada Hala Waddingtona** (1905–1975, **obr. 2.1**). Největší zásluhou Waddingtona je jistě snaha o syntetický pohled na biologii, především genetiku, vývojovou biologii (embryologii) a evoluci. Zpočátku se Waddington věnoval embryologii a mj. potvrdil Spemannovu teorii embryonální indukce u ptáků. Později se věnoval zejména otázkám diferenciaci a teoretické biologie, i když některé ze svých odvážných teorií prokazoval i experimentálně. Do biologie uvedl celou řadu nových termínů, z nichž některé se ujaly v široké vědecké komunitě. Patří sem zejména termín **epigenetika**, který zavedl ve 40. letech 20. století. Waddington si k tomu vypůjčil termín **epigeneze** od Aristotela, což představovalo schéma individuálního vývoje organismů spočívající v postupném vzrůstání jejich komplexity. **Aristoteles** (384–322 př. n. l., **obr. 2.1**) tím chtěl vyjádřit, že výsledná forma organismu není dopředu dána, ale vzniká postupnými kreativními procesy (tedy opak preformizmu). Tuto ideu Waddington akceptoval a rozšířil svou epigenetiku o genetiku, která je ve své podstatě preformistická: je založena na studiu dědičného materiálu nacházejícího se v zygotě. Syntetický Waddingtonův termín epigenetika tedy vyjadřuje symbiózu genetiky a vývojové biologie (která představuje studium změn, ke kterým dochází v postzygotickém období), což v té době představovalo především řešení otázek buněčné diferenciaci. Termín epigenetika se rozšířil až od 70. let 20. století, kdy se pomalu začínaly objasňovat některé nemendelistické jevy přenosu genetické informace.



**Obr. 2.1** U kolébky epigenetiky stáli (zleva) Aristoteles (384–322 př. n. l.), Jean-Baptiste Lamarck (1744–1829) a Conrad Hal Waddington (1905–1975).

Waddington je neméně známý jako autor tzv. **epigenetické krajiny**, která zobrazuje míček pohybující se gravitací zvlněnou krajinou dolů (**obr. 2.2**). Míček je symbolem buňky (na počátku diferenciaci zygoty), která se v průběhu vývoje podrobuje různým metabolickým drahám v závislosti na podmínkách prostředí. Údolí, kterými se buňka pohybuje, nazval Waddington chreodami, ústí v omezený počet cílových míst (tedy fenotypů): tento proces nazval kanalizací. Genetickou kanalizaci mistrně demonstroval německý genetik **Richard B. Goldschmidt** (1878–1958). V průběhu embryonálního vývoje motýla babočky kopřivové (*Aglais urticae*) aplikoval tepelný šok, kterým narušil řádnou diferenciaci a navodil tak jinou (alternativní) tvorbu tvarů. Středoevropská varianta babočky kopřivové tak tvořila imaga, která byla k nerozeznání od formy, která se přirozeně vyskytuje na Sardinii (**obr. 2.3**). Je tedy

zjevné, že (a) fenotypová změna je vyvolána vlivem prostředí (tento jev se nazývá polyfenizmus), a (b) díky genetické kanalizaci vzniká jen omezený počet fenotypů.



**Obr. 2.2** Ilustrace epigenetické krajiny Conrada Waddingtona. (a) Pohyb kuličky horskými údolími představuje standardní dráhu diferenciaci buňky. (b) V kritických rozcestích může dojít vlivem environmentálních faktorů k vychýlení z původní dráhy (změna diferenciaci typu buňky) a tato změna může být fixována i do dalších generací (genetická asimilace).

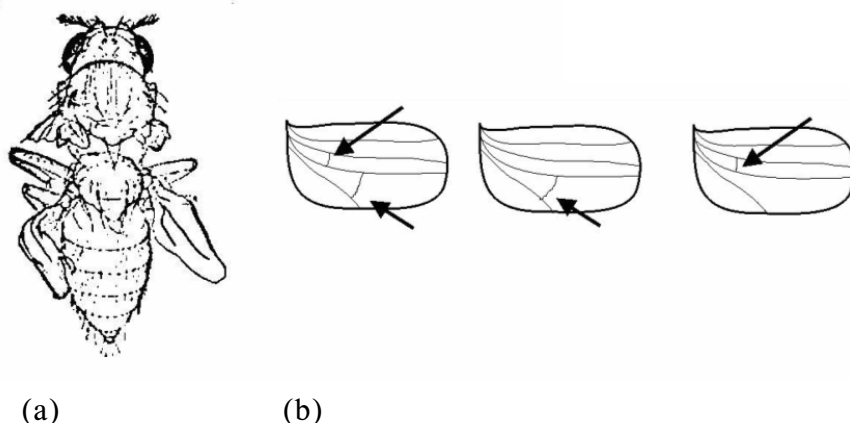


**Obr. 2.3** Ilustrace vlivu tepelného šoku na fenotyp motýla babočky kopřivové (podle Richarda Goldschmidta): vlevo středoevropská varianta, vpravo varianta ze Sardinie a uprostřed je středoevropská varianta, kdy embryo bylo vystaveno tepelnému šoku - vyvolání fenokopie připomínající formu ze Sardinie.

Pokud environmentální podmínky vyvolají změnu chreody (trajektorie, čili metabolické dráhy vedoucí ke specifickému fenotypu), je otázkou, zdali taková změna může být přenášena do další generace, je-li tedy dědičná. Tuto otázku Waddington experimentálně zkoumal ve svých pokusech s drozofilou (**obr. 2.4**). Vycházel, stejně jako Goldschmidt, ze stejného experimentálního schématu. Pomocí určitého fyzikálního (teplota) či chemického vlivu (éter) vyvolal v embryogenezi stres, což vedlo k narušení řádného vývoje, v podstatě k teratogenezi. Waddington v této parentální generaci provedl selekci na určité nestandardní znaky, jako jsou tvorba druhého páru křídel (fenokopie homeotické mutace *bithorax*) nebo ztráta tvorby příčných žilek na křídlech. Jedince, kteří jevíli příslušnou fenotypovou odchylku, křížil mezi sebou a jejich potomstvo ve stádiu larev opět podrobil stresovému zásahu a příslušné selekci na úrovni imaga. Je jistě s podivem, že v každé další generaci byl podíl jedinců *bithorax* či bez příčných žilek na křídlech vyšší a vyšší. Asi po 20 generacích stresu a selekce dosahovala frekvence fenokopii přes 70 % a tyto hodnoty byly téměř shodné i v případech, kdy stres již aplikován vůbec nebyl; znak byl tedy děděn. Znamená to, že znak, který byl jednou environmentálně spuštěn, se stal v genomu „asimilovaným“. V podstatě to odpovídá i volné interpretaci Lamarckovy teorie adaptivní evoluce. Další experimentální důkazy v té době nebyly, protože chyběly metodiky, které by objasnilly podstatu

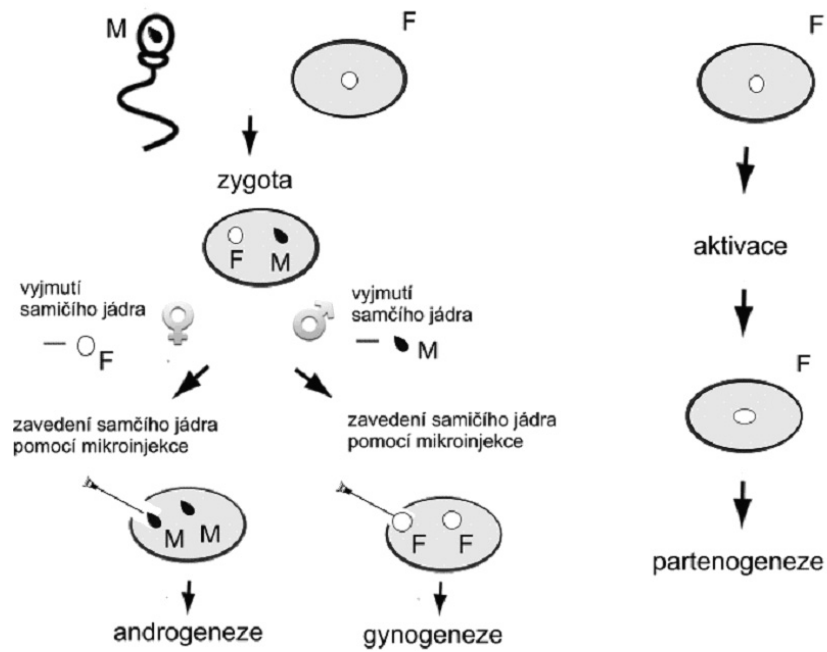


epigenetických procesů. Ve Waddingtonově teorii v podstatě nikdo přímo nepokračoval, obdobnými teoriemi se však zabýval i ruský evoluční biolog **Ivan Ivanovič Schmalhausen** (1884–1963).



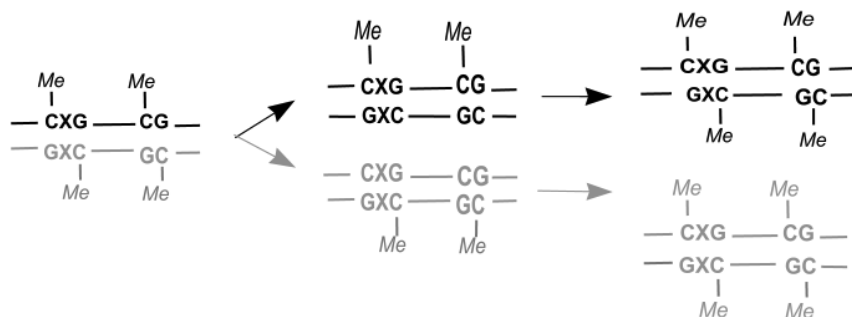
**Obr. 2.4** Příklady dědičnosti indukovaných fenotypových změn (genetické asimilace) u drozofily v experimentech Conrada Waddingtona. (a) Tvorba a selekce fenokopie mutace bithorax po aplikaci éteru na embrya: přední křídla jsou pro názornost odstraněna, zadní pár kyvadélek je částečně změněn v křídla. (b) Teplotním šokem vyvolaná dědičná ztráta příčných žilek na křídlech (vlevo standardní křídlo, uprostřed a vpravo indukované, dědičné změny; šipky ukazují příčné žilky).

Šedesátá a sedmdesátá léta minulého století přinesla první poznatky o chemických modifikacích DNA, zejména metylaci cytozinu. Potenciální význam této zásadní modifikace genetické informace jako první rozeznal australský molekulární genetik **Robin Holliday**. V roce 1979 zveřejnil svou epigenetickou teorii o možné podstatě nádorového bujení a v roce 1987 obecnou studii o možné dědičnosti epigenetických defektů. Mezitím ovšem metodika detekce 5-metylcytozinu pokročila natolik, že v roce 1983 umožnila americkým lékařům **Andrew P. Feinbergovi** and **Bertu Vogelsteinovi** zjistit zásadní rozdíly mezi metylací DNA nádorových a normálních buněk. Tím tedy bylo jednoznačně potvrzeno, že metylace DNA může být jedním z kauzálních faktorů onkogeneze. Za rok zrození moderní epigenetiky můžeme považovat rok 1984, kdy **Davor Solter** v Philadelphii a **Azim Surani** v Cambridge provedli slavné mikromanipulační experimenty, v nichž přenášeli buněčná jádra po oplození myšního oocyty (**obr. 2.5**). Zjistili, že viabilní je pouze přirozená kombinace samčího a samičího haploidního jádra, tedy že k životu je potřeba genetické informace obou rodičů. Tak byl objeven **genomový imprinting**, který hraje zásadní roli zejména ve vývoji placentálních savců. Epigenetika začíná být uznávaným vědním oborem, což akceptoval i velký evoluční biolog **John Maynard Smith**, když epigenetické mechanismy označil jako významný faktor evoluce. Mezitím dochází i k velkým pokrokům ve studiu nukleozomálních histonů a jejich chemických modifikací a k identifikaci mnoha dalších proteinů a enzymů, které hrají roli v dostupnosti chromatinového templátu. Zatím posledním šokem, který epigenetika přinesla, je objev **RNA interference**, tedy schopnosti malých molekul RNA provádět specifické posttranskripční umlčování genů. Za tento objev dostali američtí biologové **Craig Mello** a **Andrew Fire** v roce 2006 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství.



**Obr. 2.5** Ilustrace mikroinjekčních experimentů Davora Soltera a Azima Suraniho: přenos jádra s následným zdárným vývojem embrya myši nastává jen tehdy, pokud je kombinováno jádro samčí (spermie, M) a jádro samičí (oocyt, F). Androgeneze (vývoj pouze z jader spermii), gynogeneze (vývoj pouze z jader oocytu) či partenogeneze (vývoj z neoplozeného vajíčka) vedou k abortu embrya v důsledku nepřítomnosti kombinovaného paternálního a maternálního imprintingu.

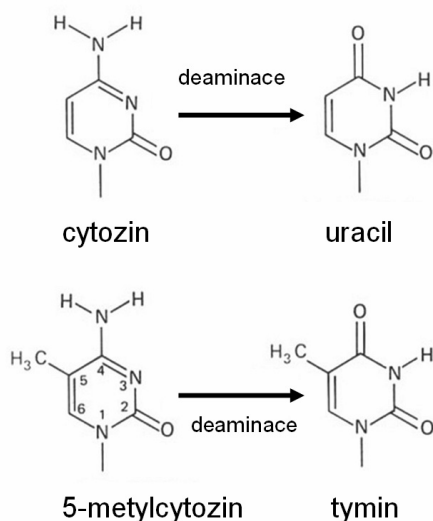




**Obr. 3.2** Metylace cytozinu (Me-C) je nejčastější modifikací DNA templátu. Dochází k ní obvykle v dinukleotidu CpG, popř. i v jiném sledu nukleotidů, CpXpG (u vyšších rostlin). Na příkladu uchování a replikativního předávání metylačních spekter CpG lze demonstrovat mechanismus mitotické či meiotické transmise epigenetického signálu: metylaci dceřinného vlákna DNA zajišťuje enzym udržovací DNA metyláza podle hemimetylovaného vlákna (podle Birda, 2002).

### 3.1.1 Distribuce 5-metylcytozinu

Obsah metylcytozinu je u různých druhů eukaryotických organismů (a v různých fázích jejich ontogeneze) rozmanitý. U některých bezobratlých živočichů je hladina metylcytozinu na úrovni detekčního minima, u savců činí metylační index [obsah mC/(mC + C) × 100 %] asi 10 %, u velkých genomů krytosemenných rostlin má tento index výši i přes 30 %. U rostlin také byly nalezeny i jiné metylované sekvence než CpG, časté jsou zejména CpNpG a CpNpN. Rozmístění 5-mC v genomu také není rovnoměrné. Nejvyšší hustota 5-mC je v heterochromatinových oblastech chromozomů, jako jsou centromery či subtelomerické repetitivní sekvence DNA. Vysoce metylované jsou zejména DNA transpozony a retroelementy, což souvisí s obranným mechanismem buňky ve vztahu k aktivitě těchto mobilních sekvencí. V genomu savců jsou CpG sekvence v genomu zastoupeny v nižší frekvenci, bývají zpravidla nahloucheny v **CpG ostrovech**, které jsou soustředěny s geny, resp. promotory a prvními exony genů. Nižší zastoupení CpG sekvencí je dáno občasnou spontánní deaminací 5-metylcytozinu v tymin (**obr. 3.3**). CpG ostrovy mají zvýšený obsah G+C, nižší stupeň metylace cytozinu, jsou asi 1kb dlouhé a u člověka se kryjí s promotorovými oblastmi až 70 % genů, zejména konstitutivně exprimovaných.



**Obr. 3.3** Spontánní deaminace 5-metylcytozinu vede ke tvorbě tyminu. Tím může dojít k ireverzibilní bodové mutaci z cytozinu na tymin: epigenetická změna se fixuje ve změnu genetickou. Pokud je deaminován cytozin, vzniká uracil, který je reparačním systémem buňky nahrazen znovu cytozinem.

U rostlin, na rozdíl od živočichů, lze použít technologii metylační filtrace. Využívá se zde rozdíl v metylaci oblastí genomu bohatých a chudých na geny. Obohacené rostlinné nemetylované DNA frakce jsou poté výchozím materiálem v projektech sekvenování velkých genomů. Distribuce 5-metylcytosinu s rozlišením jednoho nukleotidu byla získána pomocí vysoce paralelního sekvenování DNA *Arabidopsis thaliana* modifikované hydrogensířičitanem sodným v roce 2008. Tato studie přinesla řadu zajímavých zjištění, například, že třetina genů obsahuje vysokou četnost 5-metylcytosinu uvnitř své kódující sekvence (*gene-body methylation*).

Výskyt 5-metylcytosinu je u některých druhů eukaryot omezen jen na repetitivní sekvence (*Neurospora crassa*), zatímco u většiny bezobratlých živočichů se vyskytuje tzv. mozaiková metylace, která obsahuje domény vysoce metylovaných úseků a domény, které 5-metylcytosin vůbec neobsahují. U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* se také vyskytuje mozaikové uspořádání metylovaných úseků. Navzdory této podobnosti existují zásadní rozdíly mezi uspořádáním metylačních domén u živočichů a rostlin. Nejdůležitějším jsou zřejmě rozsáhlé metylace mimo CpG ostrovy u rostlin, které jsou spouštěny transponovatelnými elementy pomocí mechanismu, který závisí na malých, interferujících molekulách RNA (*small interfering: si RNA*). Genomy obratlovců a velké genomy většiny rostlinných druhů jsou tzv. globálně metylovány, tedy celkově metylovány s výjimkou CpG ostrovů.

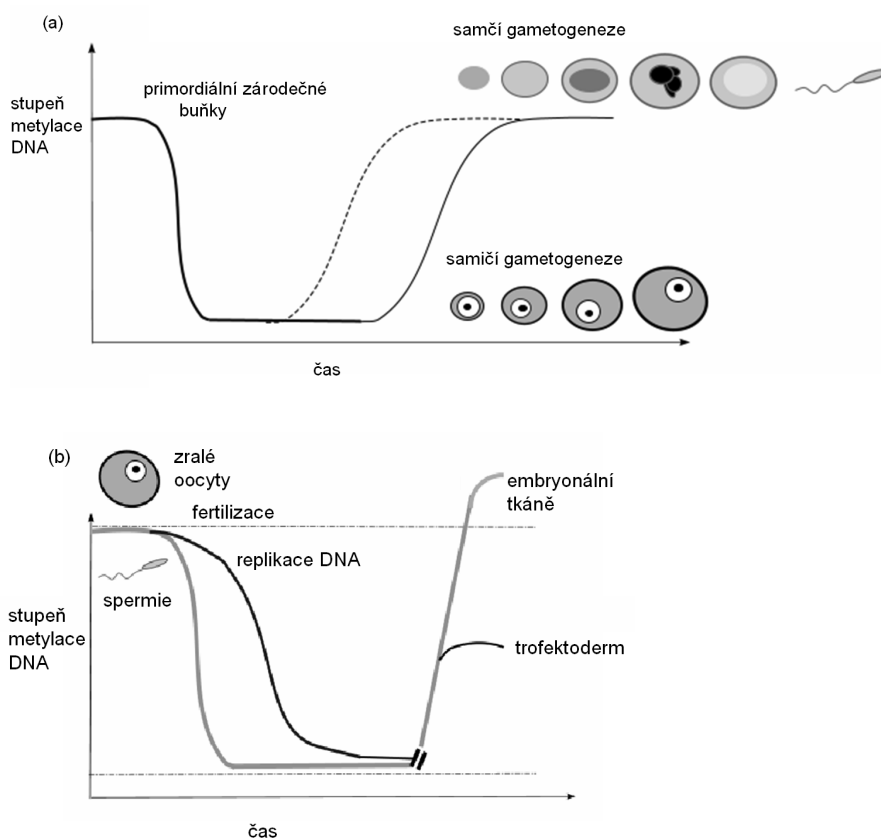
### 3.1.2 DNA metyltransferázy a vazebné proteiny

Eukaryotické **DNA metyltransferázy** obsahují konzervativní karboxyterminální katalytickou doménu a tvoří u většiny druhů několik podrodin. V genomech savců probíhá metylace cytosinu především v CpG sekvencích repetitivních úseků DNA, v oblastech imprintovaných genů a genů inaktivovaných na X chromozomu u samic. Rozdělují se do tří podrodin: Dnmt1 enzymy odpovídají za udržování metylace v CpG dinukleotidech po replikaci DNA, Dnmt2 mají pouze slabou aktivitu v některých sekvencích CpG, a třetí podrodina Dnmt3 má *de novo* metyltransferázovou aktivitu (inaktivace této enzymové aktivity má obvykle letální důsledek). U rostlin byly popsány tři základní podrodiny DNA metyltransferáz. První tvoří podrodina MET1, která udržuje metylaci v CpG sekvencích. Druhá skupina enzymů, specifická pro rostliny, jsou chromometylázy (*chromo: chromatin organization modifier*), které slouží k udržení metylace v CpNpG i v nesymetrických motivech. Třetí podrodinou jsou DRM metyltransferázy, které jsou odpovědné za *de novo* metylaci cytosinu ve všech sekvenčních motivech. Tyto rostlinné *de novo* metyltransferázy jsou unikátní přeskupením svých konzervativních motivů.

Na metylované oblasti DNA se vážou specifické proteiny rodiny **vazebných proteinů**, které mají pro příslušné genové oblasti umlčující účinek. Jedním z nich je MeCP2 u obratlovců. Pokud je mutován u člověka, vyvolává Rettův syndrom: u děvčat vážnou neurologickou diagnózu, u chlapců je letální, neboť gen je vázán na chromozom X. Knokaut myšního homologu tohoto genu vyvolává podobné problémy jako u člověka. Pokud je tento gen v myši aktivován, dojde k nápravě: průběh choroby je tedy reverzibilní. Vede to k optimistickému závěru, že Rettův syndrom bude i u člověka léčitelný.

Metylace se podrobují v průběhu individuálního vývoje jedince u obratlovců výrazným **cyklickým změnám**. Primordiální zárodečné buňky obou pohlaví se rozsáhle demetylují a teprve při zrání gamet dochází k prudkému nárůstu aktivity DNA-metyltransferáz i stupně metylace genomu (**obr. 3.4**). Smyslem těchto dynamických změn je zřejmě určitá ochrana (metabolické umlčení) genomu pohlavních buněk. Nejmenší frakci metylcytosinu, avšak důležitou, tvoří jeho přítomnost v promotorech imprintovaných genů. Tento záznam vzniká zřejmě při meióze a je pohlavně specifický. Z hlediska proporcí

metylovaného cytozinu v genomu jde jen o zlomek procenta: pouze několik desítek imprintovaných genů bylo identifikováno u savců a krytosemenných rostlin.

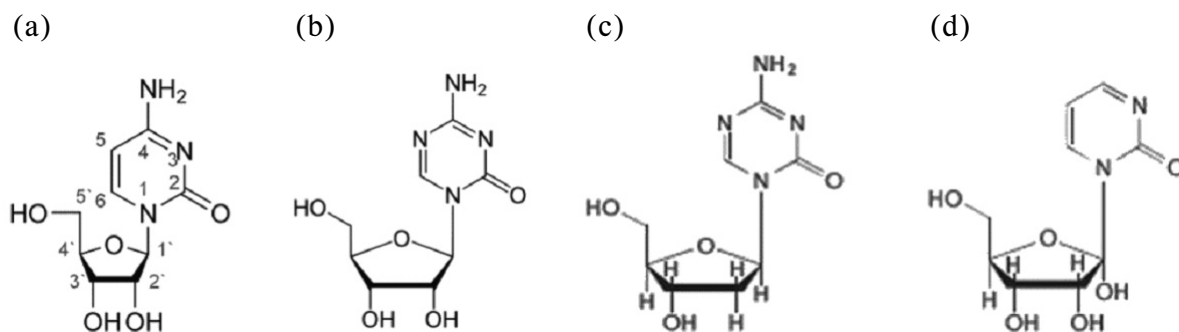


**Obr. 3.4** Dynamika globálních metylačních změn jaderného genomu při samčí a samičí gametogenezi (a) a po fertilizaci a časné embryogenezi (b) u savců (podle Reika et al., 2001).

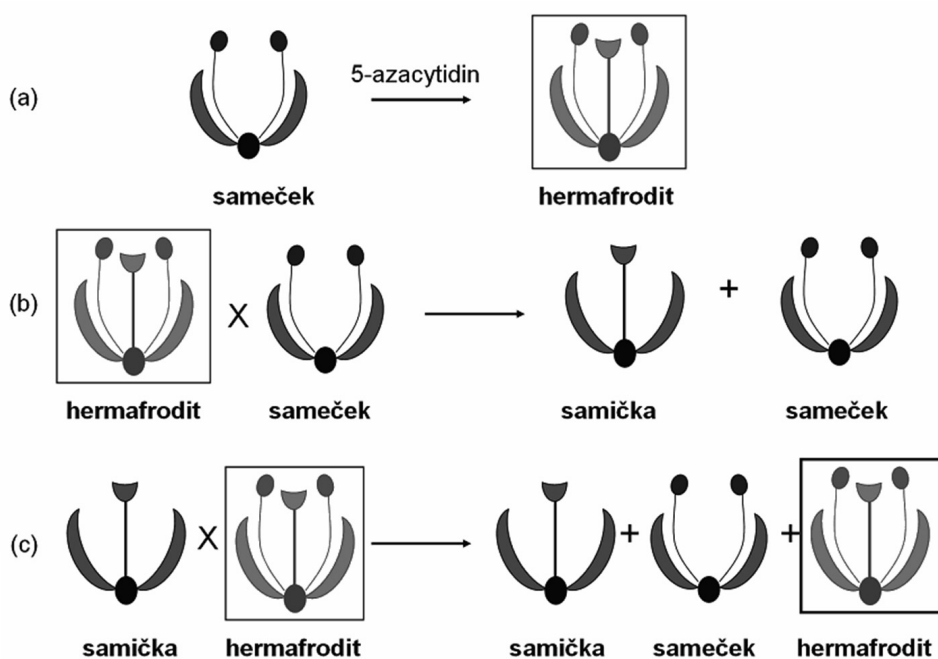
### 3.1.3 Inhibitory metylace DNA

Hladinu metylace genomu lze manipulovat knockautem (či jiným umlčením) DNA metyltransferázy nebo aplikací inhibitorů metylace. Nejznámějším takovým inhibitorem je **5-azacytidin** (nebo 5-aza-2'-deoxycytidin, **obr. 3.5**). Látka je analogem přirozeného nukleozidu cytidinu, obsahuje místo pyrimidinového skeletu (cytozinu), triazinový skelet. Cytostatická účinnost 5-azacytidinu při experimentální léčbě vyvolala zájem v mnoha světových laboratořích a látka byla postupně testována na nejrůznějších modelech neoplazie. Další studium mechanismu účinku 5-azacytidinu ukázalo, že indukuje změny v diferenciaci myších embryonálních buněk a inhibuje udržovací metylaci DNA, ale také *de novo*. Inkorporace 5-azacytozinu způsobuje kovalentní vazbu DNA metyltransferázy na DNA, a tím dochází k hypometylaci dinukleotidů CpG. Účinek 5-azacytidinu lze demonstrovat i u rostlin. Jeho aplikace na semena dvoudomé rostliny knotovky (*Silene latifolia*) vede u samčího genotypu (XY) ke tvorbě bisexuálních (hermafroditních) květů. Účinek drogy samozřejmě vyvolává rozsáhlou hypometylaci genomu v CpG sekvencích, která vede k aktivaci samičího reprodukčního programu (**obr. 3.6**). Důležité je, že hypometylací indukovaná **pohlavní reverze** je dědičná, pokud je ke křížení použita hermafroditní rostlina jako pylový donor. Jde tedy o holandrickou (Y-vázanou) epigenetickou změnu. Hermafroditismus byl děděn s neúplnou expresivitou (řada rostlin vytvářela vedle bisexuálních květů

i výhradně samčí) a variabilní penetrancí (různé počty samčích rostlin vytvářely hermafroditní fenotyp). Tyto výsledky ukazují, že geny determinující pohlaví jsou řízeny epigeneticky.



**Obr. 3.5** Inhibitory metylace DNA - analogy (a) cytidinu: 5-azacytidin (b), 5-aza-2'-deoxycytidin (c), zebularin (d).



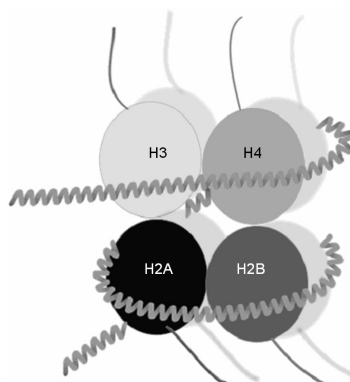
**Obr. 3.6** Dědičná pohlavní reverze u rostliny knotovky (*Silene latifolia*) způsobená rozsáhlou hypometylací genomu indukovanou 5-azacytidinem (podle Vyskota, 1999). (a) Generace  $F_0$  po ovlivnění semen 5-azacytidinem: přes 20 % rostlin s karyotypem XY tvořilo bisexuální květy. Pokud byli hermafrodité použiti jako samičí rodič, do potomstva se znak nepřenašel (b). V případě reciprokého křížení (stejně jako v případě samoopylení) však ve vysoké frekvenci docházelo k přenosu epigenetické pohlavní reverze (c).

## 3.2 Modifikace jaderných histonů

Z hlediska mikroskopického pozorování je možné v interfázovém jádře rozlišit tři základní typy oblastí. Nejnižší hustotu má **jadérko** (nukleolus), kde se odehrává transkripce rRNA genů. Ostatní oblasti jádra lze zhruba rozdělit mezi slabě barvitelný **euchromatin** (obvykle obsahující transkribované geny) a kondenzovaný **heterochromatin** (převážně umlčené sekvence DNA). Heterochromatin ještě můžeme rozdělit na konstitutivní (vysoký obsah repetitivních sekvencí DNA, vyšší obsah 5-metylcytosinu) a fakultativní (programované umlčování chromozomů nebo jejich úseků, jako je například inaktivace jednoho chromozomu X u samic savců). Konstitutivní heterochromatin se nachází zejména v oblasti centromer a v subtelomerických oblastech: jeho blízkost může vést k umlčování sousedících genů (poziční efekt, nejlépe popsany u drozofily).

### 3.2.1 Struktura chromatinu

Histony jsou primárními proteiny, které zprostředkovávají uspořádání DNA v chromatinu. Kromě sbalení DNA se také histony podrobují interakcím navzájem i s jinými chromozomálními proteiny. Základní jednotkou chromatinu jsou **nukleozomy** (obr. 3.7). Každý nukleozom obsahuje histonové jádro, kolem kterého se otáčí DNA o délce 146 párů bází a dalších 15 až 55 párů je spojovací (linker) DNA, která tvoří navázání jednotlivých nukleozomů. Nukleozomové uspořádání je také nazýváno jako „korálky na šňůrce“ (chromatinové vlákno o tloušťce 11 nm), které je dále s pomocí internukleozomálního histonu H1 skládáno v chromatinové vlákno o tloušťce 30 nm. Jádro nukleozomu obsahuje vždy dvě molekuly od čtyř různých histonových proteinů – H2A, H2B, H3 a H4. Hlavními interakcemi nukleozomálních histonů a DNA jsou elektrostatické síly. Všechny nukleozomální **histony** jsou evolučně významně konzervativní z hlediska délky i aminokyselinového složení. Nejvíce konzervativní jsou histony H3 a H4, kde dokonce mezi savci a rostlinami se H4 liší jen ve dvou aminokyselinách ze 102. Všechny nukleozomální histony jsou malé bazické proteiny o molekulární hmotnosti mezi 11 000 a 16 000 Da, které obsahují relativně velká množství lyzinu a argininu (činí to více než 20 % ze všech aminokyselin). Všechny čtyři histony mají prodlouženou globulární doménu na karboxyterminální konci proteinu, prostřednictvím které se odehrávají interakce histonů navzájem i s molekulou DNA.



**Obr. 3.7** Základní jednotkou chromatinu je nukleozom, který sestává ze 146 párů bází DNA, která se obtáčí kolem histonového oktameru (asi 1,65 otáčky). Každý oktamer obsahuje dvě kopie každého z histonů H2A, H2B, H3 a H4. Nukleozomová struktura umožňuje těsné uložení DNA v jádře. Změna této struktury může vést ke změně exprese příslušných genů bez změny genetického kódu (epigenetický mechanismus).



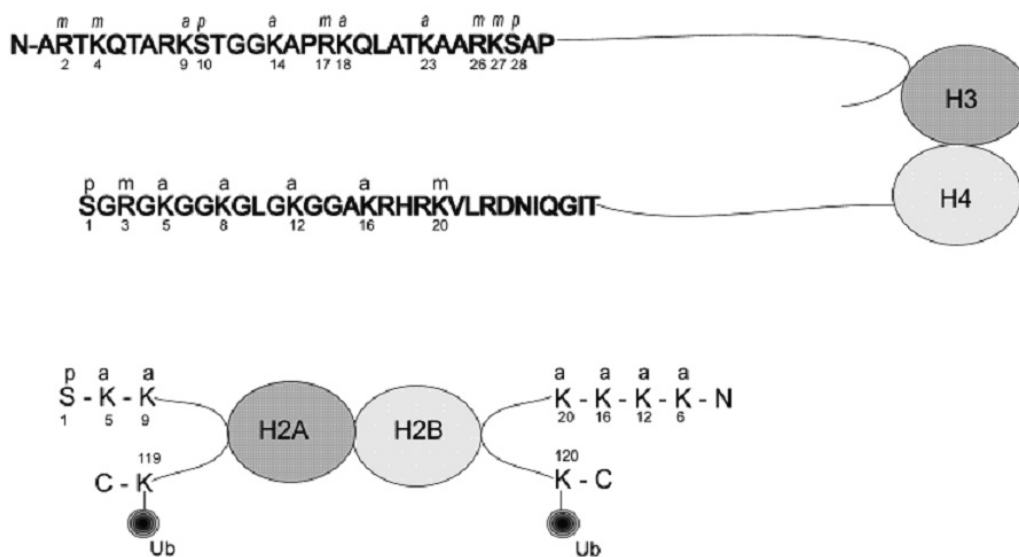
**Aminoterminální konce** vybíhající z nukleozomu nesou pozitivní elektrický náboj a obsahují většinu lyzinových reziduí. Tyto nabitě aminoterminální konce představují místa většiny posttranslačních modifikací histonů (**tab. 3.1**). Eukaryotické buňky obsahují ještě pátý hlavní histon, internukleozomální, značený H1. Je vysoce bazický, bohatý na lyzin a jeho vazba k DNA je slabší než u ostatních histonů. H1 interaguje s DNA v oblasti mezi nukleozomy. Kromě těchto základních typů histonů existuje ještě mnoho specifických variant histonů, často i specifických pro jednotlivé biologické druhy, které se často podílejí na potenciální transkripční aktivitě či inaktivitě příslušné genové oblasti.

modifikace	úloha v transkripci	modifikovaná místa
acetylace	aktivace	H2A H2B (K6, K7, K16, K17) H3 (K9, K14, K18, K56) H4 (K5, K8, K12, K16)
metylace	aktivace represe	H3 (K4, K36, K79) H3 (K9, K27) H4 (K20)
fosforylace	aktivace	H3 (S10)
ubiquitinace	aktivace represe	H2B (K123) H2A (K119)
sumoylace	represe	H2A (K126) H2B (K6, K7, K16, K17) H4 (K5, K8, K12, K16)

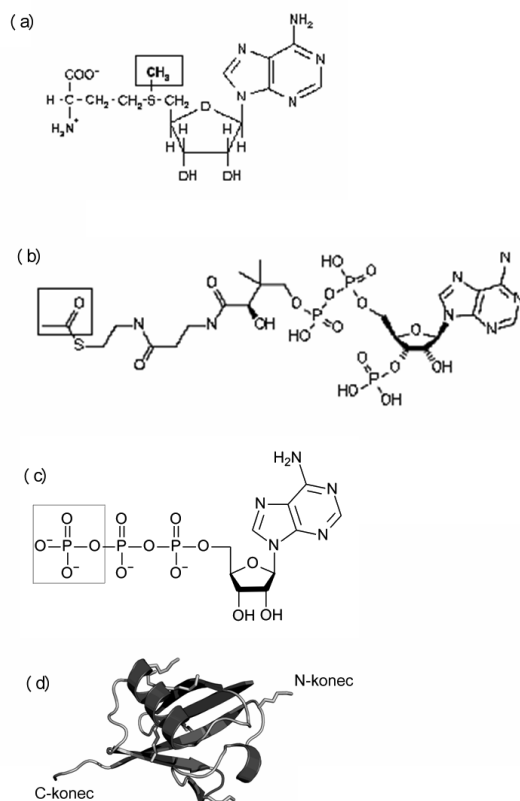
**Tab. 3.1** Hlavní typy kovalentních modifikací nukleozomálních histonů. Modifikace někdy dělíme na malé úpravy (acetylace, fosforylace a metylace) a větší úpravy dané adicí peptidů (ubiquitinace a sumoylace). U každé úpravy můžeme identifikovat změnu funkce (aktivace transkripce či umlčování) a místo úpravy – tedy typ histonu (H2A, H2B, H3 či H4) a typ a pořadí aminokyseliny (počítaje od aminoterminálního konce) v příslušném histonu (K znamená lyzin, S serin). Tento histonový kód je univerzální – platí prakticky u všech eukaryotických organismů od kvasinek přes rostliny až k savcům.

Aminokyselinová rezidua ve specifických pozicích aminoterminálních konců histonů se podrobují řadě posttranslačních modifikací, jako jsou **acetylace, metylace, fosforylace, ubiquitinace, sumoylace a ADP-ribozylace**. Modifikovatelné aminokyseliny se také nacházejí v globulárních doménách histonů, jako je například lyzin v pozici 79 v histonu H3. V průběhu posledních 20 let bylo prokázáno, že všechny tyto chemické modifikace histonů zásadně ovlivňují expresi příslušných genových oblastí. Z dosavadních studií na různých modelových organizmech (zejména kvasinkách, drozofile, arabidopsis a savcích) také vyplývá existence univerzálního histonového kódu (platí s určitými výjimkami): určitá chemická modifikace určité aminokyseliny v určitém histonu vede zákonitě k transkripční aktivaci resp. inaktivaci. Tak například acetylace lyzinu v pozici 8 histonu H4 vede u všech eukaryot k (potenciální) aktivaci genu, zatímco metylace lyzinu v pozici 9 histonu H3 vede vždy k umlčování genu. Přehled chemických modifikací histonů a jejich biologických efektů je uveden v **obr. 3.8**. Donory příslušných chemických skupin (například metylu – S-adenozylmetionin, acetylu – acetylkoenzym A, fosfátu – adenosintrifosfát)

fosfát, **obr. 3.9**) jsou využívány specifickými enzymy (histon metylázami, histon acetylázami, histon fosforylázami atd.) k posttranslačním úpravám histonů. Je podstatné, že tyto reakce jsou reverzibilní, tedy jiné specifické enzymy (histon demethylázy, histon deacetylázy, histon fosfatázy atd.) mohou – podle fyziologických či environmentálních změn – měnit stavy genové exprese, a tím tak nastavovat adaptační mechanismy buňky i individua.



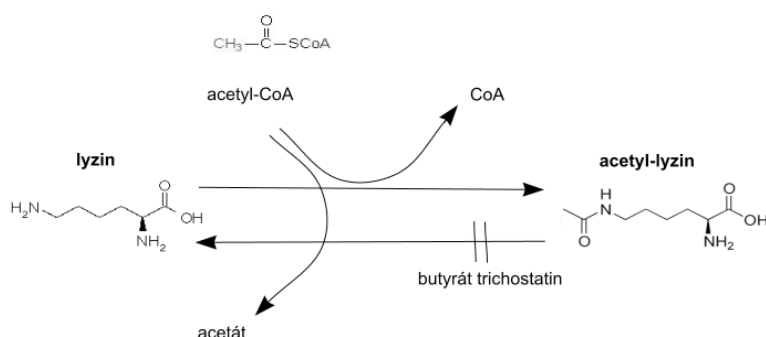
**Obr. 3.8** Přehled hlavních alternativních chemických modifikací nukleosomálních histonů (shora H3, H4, H2A a H2B). Čísla ukazují pozice modifikovaných aminokyselin od aminoterminálního konce (N). Těmito modifikacemi mohou obvykle být acetylace (a), metylace (m), fosforylace (p) či ubiquitinace (Ub). Zkratky modifikovaných aminokyselin: R – arginin, K – lyzin, S – serin.



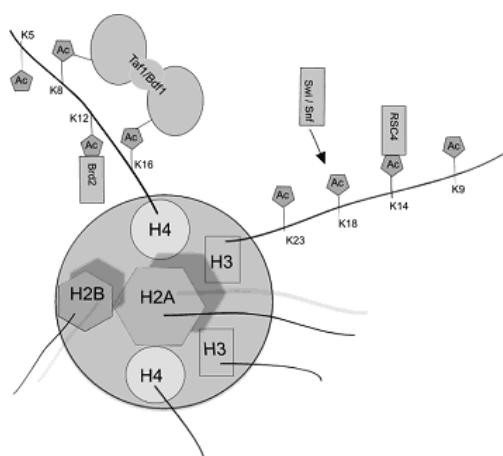
**Obr. 3.9** Donory nejčastějších chemických modifikací nukleosomálních histonů: (a) metylace – S-adenozylmetionin (SAM), (b) acetylace – acetylkoenzym A, (c) fosforylace – adenzin trifosfát (ATP), (d) ubiquitinace – ubiquitin.

### 3.2.2 Acetylace histonů

Historicky nejdříve popsanou modifikací histonů byly již v roce 1963 **acetylace**. Brzy poté bylo zjištěno, že acetylované histony (H3, H4, H2A i H2B) jsou asociovány výhradně s transkripčně aktivním chromatinem. Acetylace histonů způsobuje snížení pozitivního náboje histonového aminoterminálního konce, což má za následek méně kondenzovanou chromatinovou strukturu a naopak zvýšenou přístupnost transkripčních faktorů vůči DNA (**obr. 3.10**). V podstatě i mnoho transkripčních aktivátorů má histon acetyltransferázovou (HAT) aktivitu. Euchromatinové domény jsou tedy bohaté na histony s acetylovanými liziny, zatímco umlčené heterochromatinové oblasti mají nižší obsah acetylovaných lizinů (**obr. 3.11**).



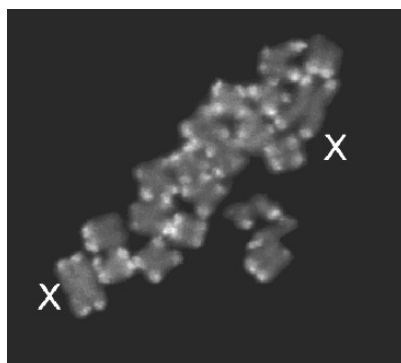
**Obr. 3.10** Cílem modifikace lizinu je jeho ε-aminoskupina, což vede k neutralizaci pozitivního náboje (podle Allise et al., 2007). Přímá reakce (acetylace) je katalyzována histon acetyltransferázou, donorem acetylové skupiny je acetylkoenzym A. Za zpětnou reakci odpovídají histon deacetylázy (které lze chemicky blokovat například butyrátem sodným či trichostatinem). Acetylace vždy vedou ke genové aktivaci. V jednom nukleozomu může být acetylováno až 26 lizinových reziduí lokalizovaných v aminoterminálních ramenech histonového oktameru – H4 (celkem čtyři acetylovatelné liziny), H3 (také čtyři), H2A (jeden) a H2B (čtyři).



**Obr. 3.11** Acetylace lizinů na histonech H3 a H4 je nejčastější modifikací a má vždy aktivační charakter (v případě H3 jsou to liziny v pozicích 9, 14, 18, 23, či 56, u histonu H4 jde o liziny 5, 8, 12 nebo 16). Tato místa jsou rozpoznávána proteiny s bromodoménou (například Swi/Snf, Taf1/Bdf1 či RSC4), které příslušný chromatin aktivují.

Asi nejlépe prozkoumanými regulačními proteiny s histon deacetylázovou aktivitou jsou **SIR** proteiny (*Silent Information Regulatory proteins*) původně zjištěné u kvasinek. Jedna skupina těchto proteinů (SIR2) patří do rodiny NAD-dependentních histon deacetyláz (HD), vysoce konzervativních umlčo-

vacích proteinů od bakterií až ke člověku. Pomocí imunobarvení se značenou protilátkou vůči acetylovaným lyzinům histonu H4 lze experimentálně prokázat, že inaktivovaný chromozom X v somatických buňkách samic savců je výrazně hypoacetylovaný. I když chromozomy ve stádiu mitotické metafáze mají potlačenou transkripci, silná acetylace euchromatinových oblastí zůstává zachována a představuje tak jeden z mechanismů uchování či přenosu epigenetické informace (**obr. 3.12**). V průběhu replikace DNA jsou do nukleozomů inkorporovány další acetylované histony, rovněž posttranslačně modifikované. U řady modelových organizmů byly izolovány mutanty genů histon acetyláz i histon deacetyláz, pomocí kterých jsou studovány jejich vlivy na genovou expresi. Acetylaci histonů lze také experimentálně manipulovat pomocí chemických činidel: trichostatin A či butyrát sodný jsou známými inhibitory enzymatické aktivity histon deacetyláz a navozují tak hyperacetylovaný stav chromatinu.

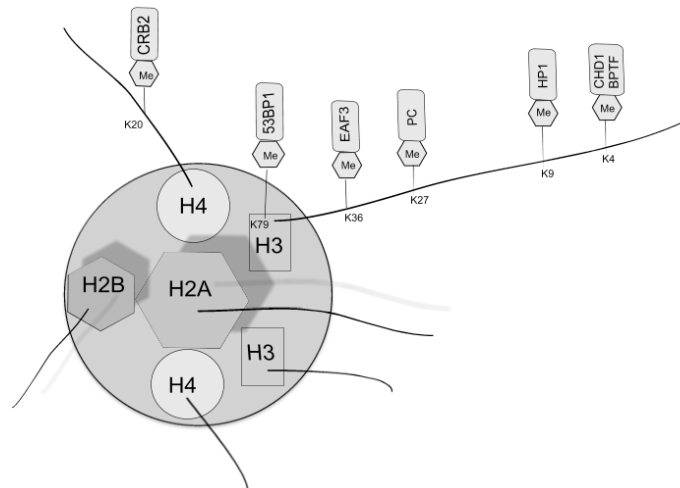


**Obr. 3.12** Imunobarvení chromozomů silenky (*Silene latifolia*; X značí pohlavní chromozomy) značenou protilátkou vůči acetylovanému lyzinu v pozici 8 histonu H4 ukazuje silný signál poblíž konců chromozomů (euchromatin), což dokazuje i vysoká denzita genů v těchto oblastech.

Některé typy histon acetyltransferáz (HAT) obsahují evolučně konzervativní motiv nazývaný **bromodoména**. Tato bromodoména se přednostně váže na acetylované lyziny na aminoterminálních výběžcích histonů. Z toho vyplývá, že funkcí acetylace histonů je značka na histonové molekule, která vede k vyvolání a vazbě histon acetylázy obsahující bromodoménu popřípadě i jiných koaktivátorů transkripce chromatinu.

### 3.2.3 Metylace histonů

První důkazy o **metylaci histonů** byly prezentovány také v 60. letech minulého století. Histony jsou metylovány především v argininových reziduích (aminoterminální pozice 2, 17 a 26 histonu H3) a v lyzinech (pozice 4, 9, 27 a 79 histonu H3 a 20 histonu H4), viz **obr. 3.13**. Je obvyklé, že jak v případě argininu tak i lyzinu může docházet i k více substitucím v daném místě (mono-, di- a tri-metylace). Zatímco metylace argininu je obvykle spojena s aktivací transkripce, metylace lyzinu může být kauzálním faktorem aktivace (například v pozicích 4, 36 nebo 79 histonu H3), v jiných případech příčinou transkripční represe (například v pozicích 9 a 27 histonu H3). Metylace lyzinu v pozici 9 histonu H3 se zdá být univerzálním markerem umlčování genů u všech modelových organizmů od kvasinek po savce. Na tuto metylovou skupinu se pak váže umlčovací protein **HP1** (*heterochromatin protein 1*), což vede k heterochromatinizaci dané oblasti chromozomu. Protein HP1 a řada podobných heterochromatinových proteinů (jako třeba supresor *variegace* u drozofily, Su(var)3-9) sdílejí evolučně konzervativní doménu, která se nazývá **chromodoména** (*chromatin organization modifier*). Tyto proteiny jsou součástí represivních proteinových komplexů, které indukují a udržují umlčovaný epigenetický stav.



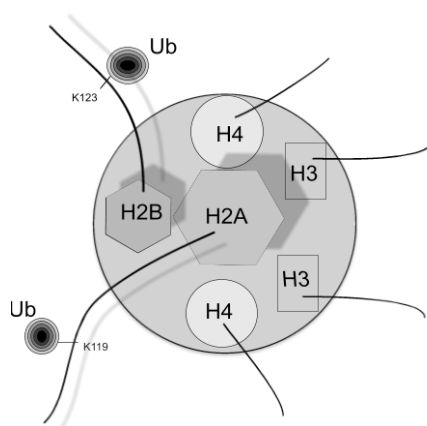
**Obr. 3.13** Metylace histonů patří mezi nejčastější modifikace histonů, obvykle na lyzinech histonů H3 a H4 (podle Allise et al., 2007). Je zajímavé, že v některých případech vede metylace k aktivaci příslušných genů (například H3K4 a H3K36), zatímco metylace v jiných pozicích vede k umlčování (například H3K27 či H4K20). Ve všech případech se na metylované lyziny vážou specifické proteiny („readers“, např. CRB2, HP1 či PC), které čtou metylační signál a vytvářejí příslušné struktury chromatinu.

Metylace DNA a histonové modifikace jsou vzájemně závislými procesy, které se obvykle realizují přes **interakce DNA metyltransferáz a histon metyltransferáz**. Epigenetika, jak víme, pojednává o umlčování genů. Potenciální expresi genů můžeme považovat za základní (naivní) stav chromatinu. Epigenetické mechanismy jsou tedy stavy vedoucí k umlčování genů resp. k heterochromatinizaci. Z hlediska umlčování genů jsou hlavními mechanismy metylace cytozinových reziduí v DNA a histonové modifikace, zvláště metylace lyzinu v histonu H3 v pozicích 9 a 27. Metylace DNA a modifikace histonů jsou realizovány odlišnými chemickými reakcemi a vyžadují odlišné enzymy, ale přitom koordinovaně řídí expresi genů i diferenciaci buněk. Je zřejmé, že metylace DNA a histonů se ovlivňují v obou směrech: metylace DNA je templátem pro určité typy histonových postreplikativních modifikací, zatímco metylace histonů pomáhá usměrňovat DNA-metylační spektra v genomu. Histonové a DNA metylace se do značné míry liší ve stabilitě chemické modifikace: metylace histonů mají výrazně tranzientní charakter (labilní transkripční represe), zatímco metylace DNA bývají relativně velmi stabilní (obvykle se mění až při gametogenezi či embryogenezi).

Variabilita a velké množství různých histonových modifikací vedou k závěru, že každý histon či dokonce jejich aminokyselinová rezidua mohou být cílem enzymatických posttranslačních modifikací. Zjevně to souvisí s faktem, že chromatin je fyziologickým templátem pro základní genetickou informaci (vše, co souvisí s DNA) a histonové modifikace řídí strukturu a funkci chromatinu. Různé typy a kombinace místně-specifických chemických modifikací histonů pak vedou k odlišným biologickým projevům. Například kombinace acetylace lyzinu 8 histonu H4, acetylace lyzinu 14 histonu H3 a fosforylace serinu 10 histonu H3 jsou obvykle asociovány s aktivní transkripcí. Naproti tomu trimetylace lyzinu v pozici 9 histonu H3 a ztráta acetylace lyzinů v histonech H3 a H4 koreluje u všech vyšších eukaryot s represí transkripce. Některé modifikace histonů souvisejí spíše s buněčným cyklem a představují tak prvek **dynamiky chromatinu**. Například diacetylace histonu H4 v pozicích lyzinů 5 a 12 je svázána s ukládáním histonů do chromatinu v S-fázi buněčného cyklu, zatímco fosforylace histonu H2A (v pozici serin 1 a treonin 119) a H3 (v pozicích treonin 3 a serin 10 a 28) jsou markery kondenzovaného mitotického chromatinu.

### 3.2.4 Ubiquitinace a sumoylace histonů

**Ubiquitinace** a sumoylace histonů jsou dosti odlišnými modifikacemi ve srovnání s acetylací, metylací či fosforylací, protože jde o poměrně velké polypeptidy, které vazbou na histony podstatně zvětší jejich velikost. Ubiquitin a SUMO jsou částečně identické v aminokyselinových sekvencích a mají i podobnou trojrozměrnou strukturu. Ubiquitinace histonů může mít buď represivní nebo aktivační účinek v závislosti na místě příslušného aminokyselinového rezidua. Polyubiquitinace je jinak běžnou metabolickou reakcí, která obvykle vede k proteolýze. U histonů jde výhradně o monoubiquitinaci – lyzinu v pozici 119 histonu H2A nebo lyzinu v pozici 123 histonu H2B (**obr. 3.14**). V prvním případě jde o represivní účinek katalyzovaný proteinem ze skupiny Polycomb, ve druhém případě má ubiquitinace efekt aktivace transkripce vedoucí k metylaci lyzinu v pozici 4 histonu H3. Specifické proteiny, které by se vázaly na ubiquitin v histonech, nejsou dosud známy. Ubiquitinace je jako každá posttranslační histonová modifikace reakcí reverzibilní: deubiquitinace vede k udržování umlčování heterochromatinu.



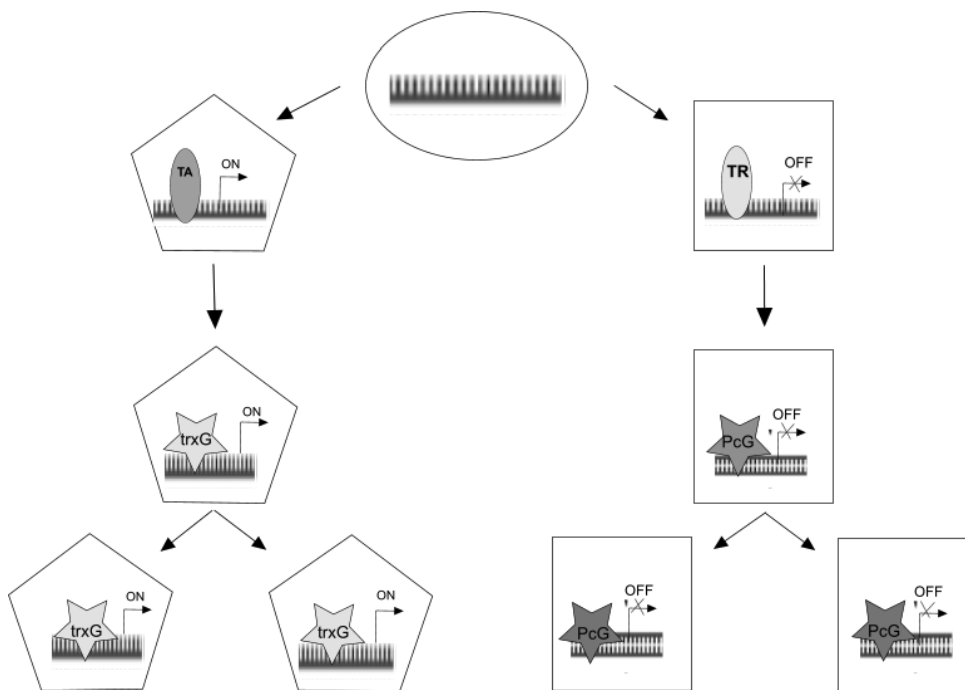
**Obr. 3.14** Ubiquitinace (Ub) se obvykle odehrává na histonech H2A a H2B. Tyto modifikace vedou k odlišným důsledkům: ubiquitinace H2AK119 (lyzin 119) vede k transkripční aktivaci, zatímco ubiquitinace H2BK123 (lyzin 123) má za následek represi genu.

**SUMO** (*small ubiquitin-related modifier*) jsou malé proteiny podobné ubiquitinu strukturou i mechanismem uchycení na cílových proteinech včetně histonů. Sumoylace je v metabolismu buňky obecným jevem, který často odpovídá za zavedení proteinů do specifických buněčných oblastí či regulaci transkripčních faktorů, jako je například p53. Konjugace proteinů SUMO (i ubiquitinu) k cílovému proteinu se odehrává obdobným způsobem. SUMO je štěpen ve dvou konzervativních glycinech a poté je přichycen karboxyterminálním koncem k lyzinu cílového proteinu. Sumoylace je konzervativní od kvasinek až k savcům a její efekt je výhradně represivní: brání v posttranslačních modifikacích histonů, které by vedly k transkripční aktivaci. Sumoylované histony přímo blokují rezidua lyzinů, které mohou být alternativně acetylovány či sumoylovány, nebo mohou vyvolávat aktivitu histon deacetyláz.

## 3.3 Proteiny skupin Polycomb a Trithorax

Proteiny skupiny **Polycomb** (*PcG*, *Polycomb Group*) jsou poměrně velkou skupinou obecných transkripčních represorů nezbytných pro vývojové procesy u eukaryotických organismů. Nazývají se Polycomb podle mutace genu, která způsobuje ektopickou tvorbu kopulačních příchytů na nohou u samečka

drozofily. Ještě obecněji jsou známy jako represory, které vymezují aktivitu homeotických genů živočichů podél antero-posteriorní tělní osy. Často obsahují motiv skládaného listu, ale spíše jsou charakterizovány podle funkce, nikoli podle struktury. PcG proteiny organizují chromatin do kondenzovaného stavu, geneticky umlčeného, po poměrně dlouhou dobu mnoha buněčných dělení. Udržují tedy reprimovaný stav genů při diferenciaci a nazývají se proto také **paměťovými proteiny** (*chromatin cellular memory proteins*; **obr. 3.15**). Udržování reprimovaného stavu PcG proteiny vyžaduje řadu mechanistických vlastností: (1) transkripce musí být pevně potlačena, (2) represe musí být patřičně cílená pro jednotlivé tkáňové typy buněk, (3) reprimované domény musí zahrnovat velké úseky DNA (desítky až stovky kilobází), takže systém musí být schopen svého šíření podél chromozomů a (4) stav represe musí být dědičný po mnoho buněčných dělení.



**Obr. 3.15** Schéma funkce paměťových proteinů Polycomb (PcG) a Trithorax (trxG). Tyto proteiny rozhodují o mitotické dědičnosti exprese jednotlivých genů. Transkripční aktivátory (TA) a transkripční represory (TR) spouštějí („ON“ resp. blokuji „OFF“) expresi genů. Tato informace je fixována vazbou aktivačních (Trithorax, levá dráha) či represorových proteinů (Polycomb, vpravo) v diferencujících se buněčných liniích (podle Allise et al., 2007).

PcG proteiny se dělí na bázi svých fyzických asociací v různých multiproteinových komplexech nazývaných **Polycomb represorové komplexy** (PRCs, *Polycomb repressor complexes*) do dvou tříd. Třída I proteinů PcG tvoří řadu komplexů *in vivo*, které jsou spojeny s histon metyltransferázou Enhancer of Zeste, E(z). Tato skupina proteinů byla nalezena ve všech mnohobuněčných druzích a slouží k regulaci vývojových procesů. Třída II PcG proteinů se vyskytuje pouze u drozofily a obratlovců. Tyto proteiny vytvářejí odlišný velký komplex, který se podílí na tvorbě chromatinové struktury, která je odolná vůči genové expresi. Výzkumy ukazují, že hlavní funkcí PcG třídy I je udržování represivního stavu, zatímco primární funkcí třídy II je přímo inhibovat genovou expresi.

**Komplexy PcG třídy I** byly molekulárně charakterizovány u drozofily a člověka: E(z) podjednotka těchto komplexů metyluje histon H3 v pozici lyzinu 27 a tato modifikace se silně asociuje s úseky DNA zvanými *Polycomb response elements* (PREs). Primárním cílem pro metylaci u komplexů třídy I

je tedy lyzin 27 histonu H3, může však docházet i k jiným modifikacím, jako například lyzinu v pozici 26 u internukleozomálního histonu H1. Schopnost komplexů třídy I metylovat lyzin 27 histonu H3 vede ke zvýšení afinity H3 ke chromodoméně Polycomb, což může být podobné i pro jiné umlčovací systémy, jako je například vazba heterochromatinového proteinu 1 (HP1). HP1 je hlavním umlčovacím proteinem, který se svou chromodoménou váže na metylovaný lyzin 9 histonu H3. Vedle klíčové úlohy PcG proteinů třídy I ve vývojové regulaci homeotických genů u živočichů mohou mít tyto proteiny také jiné umlčovací funkce, jako například při řízení buněčné proliferace, umlčování retrovirů nebo při inaktivaci chromozomu X. Dávková kompenzace u savců je zprostředkována umlčením jednoho chromozomu X u samic přes netranslatovanou RNA genu *Xist*. Tato inaktivace vyžaduje alespoň tranzientní asociaci komplexů PcG třídy I a metylaci lyzinu v pozici 27 histonu H3 na inaktivním chromozomu X.

**Komplexy PcG třídy II** jsou součástí proteinových komplexů, které jsou přímo odpovědné za vyvolávání umlčování genové exprese. Jsou strukturně i funkčně odlišné od komplexů třídy I. Jejich úloha zřejmě spočívá ve svazování chromatinu do represivní konformace, která zabraňuje genové expresi. Nejlépe je tato skupina inhibičních proteinů charakterizována u drozofily. Fungují antagonisticky s proteiny skupiny Trithorax: mutace genů Trithorax potlačuje fenotyp způsobený funkcí PcG. Je také možné, že PcG komplexy třídy II nepůsobí jen na strukturu chromatinu, ale že využívají i kombinace jiných mechanismů, například mohou blokovat transkripční mašinerii.

Zatímco PcG proteiny jsou potřebné k udržování represivního stavu, regulační proteiny skupiny **Trithorax** (*trithorax group*, *trxG*) jsou hlavními paměťovými proteiny s aktivační funkcí, zejména to platí pro zajišťování kontinuální exprese homeotických genů. Geny skupiny trithorax byly identifikovány prostřednictvím studia mutací, které napodobují homeotické fenotypy nebo potlačují fenotypy PcG mutací. Trithorax představuje řadu proteinů, které hrají roli v aktivaci genů a některé i slouží jako zesilovače efektu poziční variegace (PEV). Klíčový gen *trx* byl identifikován jako mutace, která napodobuje homeotickou mutaci ztráty funkce u drozofily. Proteiny *trx* jsou nezbytné od časně embryogeneze až po pozdní larvální stádia a řídí správnou činnost mnoha homeotických genů. Velkou podobnost s genem *trx* má lidský gen *mll* (*mixed lineage leukemia*) odpovědný za dětskou leukémii. Studia ukázala, že *trx* a *mll* proteiny nejsou jen strukturně blízké, ale hrají také podobné role ve vývoji. Myši s homozygotní mutací ztráty funkce genu *mll* mají narušenou expresi homeotických genů, což vede k embryonální letalitě.

### 3.4 Úlohy malých molekul RNA

Zatímco DNA bývá charakterizována jako základní (a skladovací) genetická informace, RNA – která je jejím primárním produktem – bývá nazývána pouze přenašečem informace (z DNA do proteinů). Její struktura se kromě ribózy v nukleotidech (v DNA jsou deoxyribózy) liší jen přítomností uracilu (namísto tyminu v DNA). RNA vytváří sled komplementárních nukleotidů s DNA a je tedy schopna na principu párování bazí vytvářet *in vitro* i *in vivo* hybridní molekuly. Experimentálně se této schopnosti využívá při detekci mRNA na cytologických či histologických preparátech (*in situ* hybridizace). Již od 80. let minulého století bylo zjištěno, že vnesená **protismyslová vlákna RNA** (*antisense RNA*, vznikající přepisem druhého, správně nečteného vlákna DNA) jsou v buňce schopna se na principu párování bazí vázat na homologní RNA a tuto degradovat. Tato technologie protismyslové RNA byla široce využívána v genovém inženýrství mikroorganismů, živočichů i rostlin. Tato technologie se stala i významnou metodikou funkční genetiky, tedy studium funkce genů na bázi jejich umlčování na post-



transkripční úrovni. Tak tomu bylo až do 90. let, kdy byla objevena překvapivá regulační úloha mnoha typů krátkých molekul RNA.

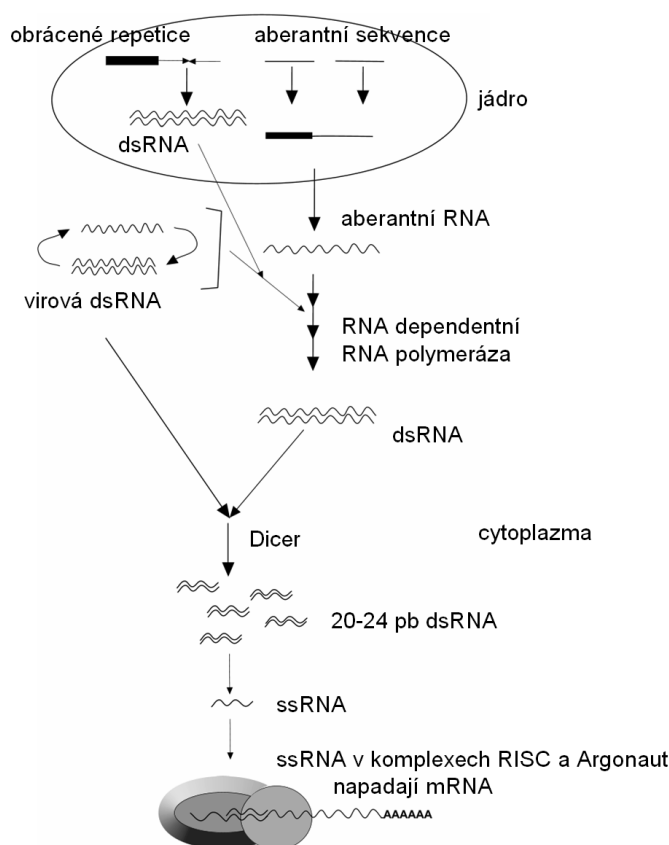
### 3.4.1 Historie objevu RNA interference

V laboratoři Kena Kemphuese na Cornellské univerzitě v roce 1995 PhD studentka Sue Guo analyzovala funkci genu *PAR-1* u *Caenorhabditis elegans* technikou protismyslové RNA. Tento gen kóduje serin-treonin kinázu a maternálně poskytovaný protein PAR-1 je nezbytný pro založení časné embryonální polarity. Sue Guo aplikovala *in vitro* připravenou antisense RNA mikroinjekcí do časných embryí *C. elegans* a vskutku 52 % embryí uhynulo; řádná funkce genu *PAR-1* je tedy k životu hlístice nezbytná. Každý experiment však musí zahrnovat i negativní kontrolu: v tomto případě to byla aplikace sense RNA vlákna (tedy transkribovaného vlákna, mRNA) genu *PAR-1*, připravená ovšem i v tomto případě enzymatickou reakcí *in vitro*. V tomto případě teoreticky nemělo docházet k žádnému efektu, avšak překvapivě 54 % embryí zahynulo. Smrt nebyla způsobena fyzickým poraněním embryí, neboť mikroinjikovaný vzorek vody zahynutí žádného embrya nezpůsobil. Tento experiment zůstal nějakou dobu nevysvětlen, až záhada zaujala Andyho Firea a Craiga Melloa v Carnegie institutu v Marylandu v roce 1998. Studovali vlastnosti antisense i sense RNA na funkci genu *UNC-22*. Protein UNC-22 je nezbytný ve svalech *C. elegans* k regulaci aktomyozinového kontrakčního cyklu a pro udržování normální morfologie svaloviny. Porucha funkce tohoto genu vede k nekoordinovanému pohybu (škubání). Jejich experimenty ukázaly, že každý připravený preparát RNA - sense či antisense (tedy smyslové či protismyslové vlákno RNA) - byl dostatečný k navození mutantního fenotypu. Tento jev nazvali **RNA interferencí**. Interferenční efekty obvykle přetrvávaly do další generace, i když většina endogenních RNA transkriptů byla rychle degradována již v časném embryu.

Andy Fire si uvědomil, že molekuly RNA používané k mikroinjekci se obvykle připravují s pomocí bakteriofágové RNA polymerázy. Tyto polymerázy, i když jsou vysoce specifické, tvoří některé náhodné či ektopické transkripty. Populace interferenčních RNA tedy mohou zahrnovat některé molekuly s dvojvláknovým charakterem. Následné experimenty probíhaly až po dokonalé purifikaci RNA produktů. Aplikace čisté sense, stejně jako čisté antisense RNA nevedla k umlčování projevu genu *UNC-22*, zatímco 100 % červů po mikroinjekci směsi sense a antisense RNA se projevilo nekoordinovaným pohybem. Směs „sense plus antisense“ RNA molekul byla o dva řády „interferenčně“ účinnější než kterákoli ze samotných jednovláknových molekul. Tak byla objevena **regulační úloha dvojvláknových molekul RNA**. Téhož roku Andy Fire také našel geniálně jednoduchý způsob aplikace RNA. Namísto pracné mikroinjekce zavedl techniku ingesce, tedy přímé a jednoduché aplikace RNA v potravě do trávicího traktu hlístice. Využil k tomu dvou zásadních faktů: (1) hlístice se živí bakteriemi *Escherichia coli*, lze je kultivovat *in vitro* na Petriho miskách, (2) hlístice má velmi nedokonalé trávení a pohlcené molekuly RNA se mohou dostat do tělních prostor. Tyto výhody sdílejí i některé další modely vývojové genetiky - například ploštěnky a prvoci. Do *E. coli* se obvykle vnese rekombinantní plazmid, který nese DNA sekvenci, kterou chceme v organismu utlumit, se dvěma protilehlými promotory, přepisujícími současně obě vlákna DNA. Vznikají tak obě - sense i antisense - vlákna RNA, která se mohou párovat a jako potrava se dostávají do buněk hlístice, kde interagují s příslušnou mRNA a vyvolávají dědičné posttranskripční umlčování genu.

### 3.4.2 Mechanizmy RNAi

Umlčování genů prostřednictvím RNA interference bylo od té doby pozorováno i u mnoha jiných organismů, jako jsou rostliny, drozofila, ploštěnky, houby a obratlovci (obr. 3.16).



**Obr. 3.16** Obecné schéma RNA interference. Dvouvláknová RNA vzniká buď na bázi vnitřní homologie molekul RNA (miRNA), aberantní syntézou RNA, aplikací exogenní RNA (siRNA) nebo aktivitou RNA-dependentní RNA polymerázy. Takové dsRNA jsou štěpeny endoribonukleázou Dicer na krátké molekuly dsRNA. Tyto jsou upravovány komplexy RISC v jednovláknové RNA, které štěpí homologní mRNA molekuly nebo inhibují jejich translaci.

Mechanismus účinku nemusí být vždy posttranskripční, známá je i indukce metylace DNA promotoru a změny chromatinové struktury. Hlavními biologickými funkcemi RNAi je obranná reakce vůči virům a regulace genové exprese v průběhu diferenciace. Ve výše uvedených příkladech šlo o experimentální zásah, tedy o záměrnou aplikaci – ať už mikroinjekcí či v potravě – dvouvláknové (ds)RNA. V jiných případech se ale tyto molekuly vytvářejí v živých buňkách transkripcí sekvencí DNA. Dvouvláknové RNA molekuly mohou vznikat zejména dvěma způsoby. Prvním je přítomnost DNA sekvencí v obráceném pořadí (například inverzní repétice): potom dojde transkripcí ke vzniku obou vláken komplementární RNA, která mohou na principu párování bazí vytvářet dvojité řetězce. Druhou alternativou, vysoce pravděpodobnou při nadměrné či aberantní expresi genu nebo v případě virové RNA, je tvorba dvouvláknových RNA molekul v cytoplasmě z jednovláknových molekul syntézou druhého vlákna na základě jednovláknového templátu: úloha buněčných **RNA dependentních RNA polymeráz (RdRP)**, popřípadě virových RNA polymeráz. Výsledkem jsou tedy dlouhé dvouvláknové molekuly RNA, které jsou v dalším kroku štěpeny RNA endonukleázou **Dicer** na dvouvláknové RNA fragmenty o délce 21 až 22 nukleotidů. Proteiny Dicer jsou ATP-dependentní nukleázy obsahující aminoterminální helikázovou

doménu, dvě domény s RNázovou III aktivitou v karboxyterminální části a dsRNA-vazebné motivy. Zahrnují také známou doménu PAZ, která se nachází i v proteinech skupiny Argonaut. Malé RNA molekuly navádějí proteinový komplex **Argonaut** na svá cílová místa v homologní mRNA. Argonauty jsou charakterizovány dvěma doménami - Piwi (ribonukleáza) a PAZ (ssRNA vazebný modul). Tato interakce obvykle ústí ve štěpení homologní mRNA či virové RNA nebo v inhibici translace, tedy k umlčování specifických genů na posttranskripční úrovni. Argonaut je zřejmě složkou velkého **RNA-indukovaného umlčovacího komplexu** (RISC; *RNA-induced silencing complex*) zahrnujícího jedno vlákno malé RNA kompletující se s mRNA a aktivující RNázu. U rostlin byla zjištěna ještě jedna významná úloha malých molekul RNA: jsou schopny vyvolávat metylaci DNA příslušného genu.

Existuje velká rozmanitost regulací založených na RNA-zprostředkovaném umlčování - například mikroRNA (miRNA), malé interferující RNA (siRNA) či Piwi-interagující RNA (piRNA), které se vytvářejí prostřednictvím odlišných metabolických drah a fungují se speciálními efektorovými proteiny z rodiny Argonaut a Piwi (**tab. 3.2**). Je také několik typů lokusů, které vytvářejí funkční malé RNA. Některé vytvářejí primární transkripty, které zaujímají sekundární struktury podle aktivity Diceru a nevyžadují RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRP).

třída	genový původ a způsob tvorby	funkce
mikroRNA (miRNA)	úprava skládání miRNA genových transkriptů proteiny Dicer a RNázou III	posttranskripční regulace transkriptů mnoha genů
malé interferenční RNA (primární siRNA)	úprava dsRNA nebo složení RNA proteiny skupiny Dicer	vazba na komplementární cí- lovou RNA, iniciace na RdRP závislé sekundární syntéze siRNA
malé interferenční RNA (sekundární siRNA)	úprava dlouhé dsRNA vzniklé RdRP aktivitou	posttranskripční regulace transkriptů (heterochromatin)
trans-působící siRNA (tasiRNA)	miRNA-závislé štěpení a RdRP závislá přeměna transkriptu genu TAS v dsRNA	posttranskripční regulace transkriptů
přirozené, z antisense transkriptu odvozené siRNA (natsiRNA)	úprava dsRNA vznikající ze sense a antisense transkripčních párů	posttranskripční regulace genů hrajících roli v obraně rostlin vůči patogenům a stresu
Piwi-interagující RNA (piRNA)	biogeneze závisí na proteinu Argonaut	umlčování transpozonů a retroelementů v zárodečné linii drozofily a savců

**Tab. 3.2** Hlavní třídy malých RNA molekul u eukaryotických organizmů (podle Chapmana a Carringtona, 2007).

**miRNA** působící jako posttranskripční regulátory genové exprese jsou kódovány genomem mnohobuněčných živočichů a jednobuněčných řas. Vznikají z primárních transkriptů s vnitřní komplementaritou, která se podrobuje procesům zrání za účasti RNáz II včetně Diceru. Geny kódující miRNA jsou obvykle transkribovány RNA polymerázou II. Endogenní **siRNA** vznikají z obrácených či přímých opakování DNA (repeticí). Obrácené repetice dávají vznik transkriptům s dokonalou komplementaritou, které jsou běžné v rostlinných genomech a obvykle dávají vznik populacím heterogenních siRNA molekul, které nevyžadují RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRP). Transkripce z protilehlých promotorů dává přímo vznik dsRNA. U rostlin přirozený antisense transkript siRNA (**natsiRNA**) vzniká z překrývajících se transkriptů, které jsou indukovány abiotickým či biotickým stresem. Stresem indukovaná transkripce vede ke tvorbě dsRNA, ze které vzniká specifická natsiRNA aktivitou Dicerových proteinů. **tasiRNA** vznikají u rostlin ze specifických lokusů *TAS*. Transkripty *TAS* vznikají prostřednictvím RNA polymerázy II a fungují jako prekurzory pro tvorbu siRNA. Piwi-interagující RNA (**piRNA**) se nacházejí v zárodečné linii drozofily a savců. Jsou kódovány transpozony a repeticemi, případně shluky genů obsahujících transpozony a retroelementy. Známy spouštěči RNA umlčování jsou exogenní nukleotidové sekvence, jako jsou mikroinjikované dsRNA, transgeny a viry, dobře popsané u rostlin a *C. elegans*. Přímo z těchto spouštěcích molekul RNA vznikají primární **siRNA**. Sekundární siRNA vznikají odlišně v závislosti na RNA-dependentní RNA polymeráze. Tento systém pak funguje v buněčných i mimobuněčných úrovních a vede k šíření umlčovacího signálu ve tkáních organismu.

### 3.5 Chromatin remodelující proteiny

Přístup k základní genetické informaci uložené v DNA spočívá ve struktuře chromatinu. V buňce existuje celá řada mechanismů, které strukturu chromatinu upravují, například chemické modifikace histonů, inkorporace histonových variant, vazba nehistonových proteinů (jako je heterochromatinový protein HP1). K zajištění vazby faktorů s DNA templátem jsou modulovány i interakce histonů a DNA v nukleozomech. Chromatin-remodelující enzymy jsou závislé na adenosintrifosfátu (ATP) a mění interakce histonů a DNA v chromatinu nezbytné k zajištění procesů, jako jsou transkripce, replikace či rekombinace. Chromatin-remodelující faktory katalyzují pohyb a přesun nukleozomů, přenos histonového oktameru a umožňují i přístup nukleáz k DNA. Chromatin-remodelující komplexy jsou strukturně i funkčně rozmanité, i když mají stejnou motorickou podjednotku – rodinu **Snf2 faktorů ATPáz**. Asi nejlépe prostudovaným komplexem je **SWI/SNF**, což je velký remodelující komplex konzervativní od kvasinek až po člověka. Tyto komplexy se vážou k regulačním oblastem genů prostřednictvím specifických DNA-vazebných faktorů a regulují tak transkripční aktivitu cestou remodelování chromatinu. Jiným známým komplexem je rodina **CHD1**, která obsahuje chromodoménu a DNA-vazebný motiv. Přítomnost těchto komplexů spolu s histon deacetylázami naznačuje, že tyto faktory mohou využívat chromatin-remodelující aktivity k deacetylaci nukleozomálních histonů.

### 3.6 Priony

Podle centrálního dogmatu molekulární biologie není možné přenášet genetickou informaci mimo nukleové kyseliny. Tomuto dogmatu odporuje tzv. prionová teorie. Některé proteiny v mozku savců jsou schopny změnit svou konformaci a tuto předávat podobným bílkovinám v organismu i jiným hostitelům. Obvykle mají za následek letální neurodegenerativní onemocnění, jako je známá **Creutz-**

**feldt-Jakobova choroba.** Jde tedy o autoreplikaci specifického konformačního stavu. Prostřednictvím potravy je tento vadný protein infekčně přenášen dál: například ze skotu na člověka. Jedná se tedy o typ horizontálního přenosu informace prostřednictvím a ve formě proteinů. Priony (*Prion proteins*, *PrP*) jsou vysoce rezistentní vůči nukleázám i UV-záření, takže infekčním agens zjevně nejsou nukleové kyseliny. Infekčnost je naopak citlivá vůči inaktivaci proteinů, což vedlo k závěru, že infekčním faktorem je protein (*protein-only hypothesis*). Priony jsou všude exprimovány v normální,  $\alpha$ -šroubovicové buněčné formě, která se označuje PrP<sup>C</sup> jako membránově vázaný glykoprotein s neznámou funkcí. Chorobný protein zřejmě primárně vzniká velmi vzácnou mutací v genu. Když je buňka infikována, prion změní svou formu na proteázově rezistentní formu  $\beta$ -skládaného listu, polymerní konformaci známou jako PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> se množí konverzí molekul PrP<sup>C</sup> na stav PrP<sup>Sc</sup>. V průběhu této řetězové reakce dochází v centrálním nervovém systému jedince k degeneraci. Proteiny s funkční charakteristikou prionů jsou odpovědné i za nemendelistickou dědičnost některých znaků u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.7 Trojrozměrná struktura jádra

Prostorové uspořádání chromatinu (3D-struktura) či genů uvnitř buněčného jádra eukaryotické buňky také podléhá modifikacím, resp. představuje dynamický proces. Studia eukaryotických buněk prováděná pomocí konfokální mikroskopie naznačují, že zde dochází ke kompartmentalizaci jádra, založené zejména na teritoriích chromozomů a oblastech interchromatinu, který zahrnuje enzymatické komplexy vyžadované pro replikaci DNA a chromatinu, transkripci genů, sestřih mRNA a reparace DNA. Značení DNA v průběhu replikace, imunobarvení s protilátkami vůči různě modifikovaným histonům či jiným proteinům nebo použití fluorescenčně značených hybridizačních DNA sond s následnou konfokální analýzou umožňuje studovat topologii buněčného jádra. Dosavadní výsledky těchto studií jsou rozporuplné. Zatímco u většiny rostlinných modelů (jako je zejména *Arabidopsis thaliana*) nebyly zjištěny žádné zákonitosti či pravidelnosti ohledně uspořádání chromatinu či lokace exprimovaných resp. umlčených genů, savčí buňky jsou zřejmě poněkud odlišné. Menší chromozomy jsou obecně orientovány více ke středu jádra, zatímco větší chromozomy se nacházejí na periférii jádra. Podobně platí, že chromozomy s vysokým genovým obsahem (a tedy i s potenciálně vyšší genovou aktivitou) se nacházejí spíše uvnitř jádra, zatímco chromozomy s nízkým obsahem genů jsou na periférii jádra. Podobně bylo zjištěno, že například nádorové buňky mají jiné prostorové uspořádání chromozomů a genů než standardní buňky a podobně lze charakterizovat i jednotlivé tkáňové typy. Jako extrémní případ lze označit Barrovo tělísko, inaktivní pohlavní chromozom X v somatických buňkách savčích samic. Tento fakultativní heterochromatin se zásadně nachází na periférii jádra. Podobně je tomu u Y-tělísek v somatických buňkách samčích rostlin šťovíku (*Rumex acetosa*): tato tělíska představují dva Y chromozomy, které mají vysoký obsah konstitutivního heterochromatinu (repetitivních sekvencí DNA). Lze shrnout, že dosavadní výzkumy sice obvykle prokazují určité pravidelnosti v uspořádání buněčného jádra, ale kauzálnost faktorů genové exprese či umlčování versus topologická pozice genů uvnitř jádra nebyla dosud prokázána.

### 3.8 Divergence epigenetických mechanismů

Ještě před deseti či dvaceti lety se vědci domnívali, že za všechny epigenetické jevy je zodpovědná metylace DNA. Neplatí to zjevně pro nižší eukaryota, jako jsou kvasinky či bezobratlí živočichové, kteří 5-metylcytosin nemají. Pozdější studia ukázala, že kauzálním (primárním) faktorem epigenetických

změn by mohly být modifikace nukleozomálních histonů. Některé z nich, jako například acetylace lyzinu vedoucí k aktivnímu chromatinu, se navíc vyskytují u všech studovaných eukaryotických organizmů (**tab. 3.3**). Je pravděpodobné, že modifikace histonů a DNA obvykle vytvářejí určitý signál či zápis o aktivitě chromatinu („*writers*“) a vazebné proteiny, jako jsou například HP1, Polycomb, SIR či vazebné proteiny k metylcytozinu, potom tento signál čtou („*readers*“) a realizují v příslušnou strukturu chromatinu. V každém případě jsou epigenetické informace mnohonásobné – jde o stovky potenciálně metylovaných cytozinů v každém genu a ještě vyšší počet posttranslačně modifikovaných histonů v příslušných nukleosomech. Epigenetickou informaci musíme také označit za jev kvantitativní – rozsah částečných metylací je velký, na rozdíl od sekvence nukleotidů v genetické informaci, který je diskretní. Poslední desetiletí ukázalo významnou úlohu malých regulačních molekul RNA. Kromě *Saccharomyces cerevisiae* byly dosud prokázány u všech eukaryotických modelů. Jejich úloha probíhá jak na posttranskripční tak i na transkripční úrovni regulace genové exprese. Snad největší záhadou epigenetiky je otázka, kde se bere specifická informace o umlčování genů, neboli jak má buněčný aparát poznat, který gen má být umlčen a který aktivován. Na tuto otázku mohou nejlépe odpovědět právě RNA molekuly a to na bázi jejich shodných či podobných sekvencí nukleotidů, jako se nacházejí v DNA (genech).

epigenetický mechanismus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	savci	rostliny
umlčování transpozonů	+	+	+	+	+	+
genomový imprinting	–	–	–	(+)	+	+
RNA interference	–	+	+	+	+	+
acetylace histonů (aktivace)	+	+	+	+	+	+
represivní metylace histonu H3	–	+	+	+	+	+
metylace DNA CpG	–	+	–	–	+	+
CpNpG/CpNpN	–	+	–	–	–	+
protein HP1 (heterochromatin)	–	+	+	+	+	+
Polycomb protein	–	–	+	+	+	+

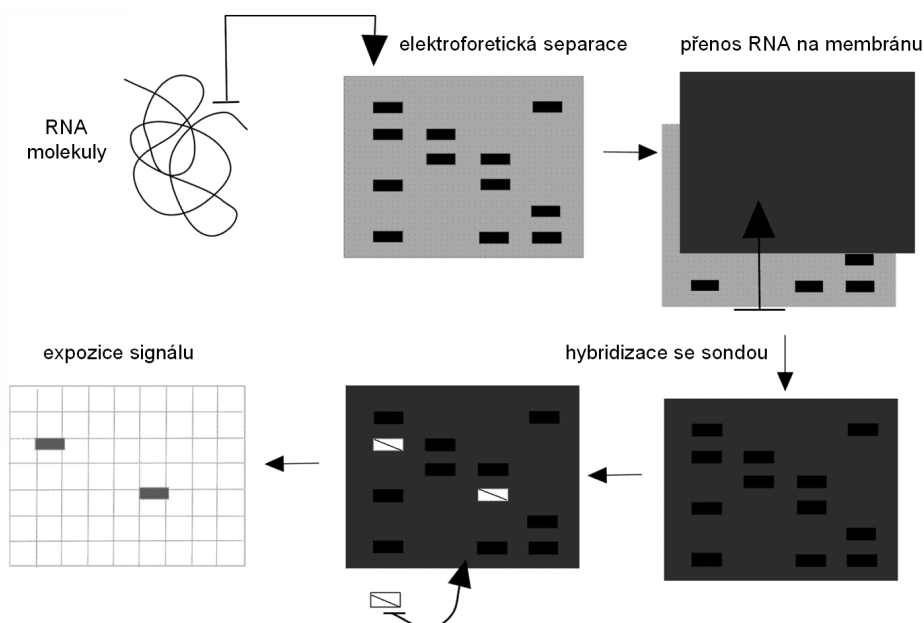
**Tab. 3.3** Přehled epigenetických mechanismů u různých eukaryotických modelů

## 4 METODY STUDIA EPIGENETIKY

Epigenetika je vědou o regulaci funkce genů, metodami jejího výzkumu budou tedy především techniky, které sledují funkci genů. Většina těchto metodik jsou standardními technikami molekulární biologie (například northernova hybridizace či RT-PCR), jiné mají specifitu ve hledání mechanismů umlčování genů (genomové sekvenování k mapování 5-metylcytosinu či chromatinová imunoprecipitace umožňující sledovat stav modifikací histonů v jednotlivých genech). Tato kapitola uvádí jen stručný přehled nejpoužívanějších metod.

### 4.1 Analýza genové exprese

Klasickou metodou analýzy genové exprese je detekce specifických molekul mRNA metodou **northernovy hybridizace** se značenou sondou. Obvykle se k separaci molekul RNA používá agarózové elektroforézy, avšak pro studium například krátkých RNA hrajících roli v procesech RNAi se používá polyakrylamidová elektroforéza. Velikostně separované molekuly RNA jsou pak přenášeny na nenabitou membránu (při neutrálním pH). Přenos se provádí klasickým kapilárním postupem, jako v případě přenosu DNA (Southernova hybridizace). Molekuly RNA jsou pak fixovány na membránu, tato je promyta roztokem bránícím nespecifické absorpci sondy a poté hybridizována se značenou sondou na imobilizovanou RNA (**obr. 4.1**). Značka (obvykle radioaktivní) je detekována na rentgenovém filmu nebo snímači PhosphorImager. Alternativní metodou analýzy RNA je test ochrany před účinkem RNázy (*RNase protection assay*). Izolovaná RNA je smíchána s protismyslovou RNA či DNA, takže komplementární vlákna mohou hybridizovat za tvorby dsRNA či DNA-RNA hybridu. Poté je vzorek vystaven účinku ribonukleázy, která výhradně štěpí pouze jednovláknovou RNA. Prežívající RNA vytvářejí komplexy s dodanou protismyslovou sekvencí a jsou tedy důkazem přítomnosti příslušné mRNA ve vzorku.



**Obr. 4.1** Detekce specifických molekul RNA metodou northernovy hybridizace. Molekuly RNA izolované z biologického materiálu jsou separovány agarózovou (nebo polyakrylamidovou) elektroforézou (vlevo nahoře), poté jsou přeneseny na nylonovou membránu a hybridizovány se značenou (obvykle radioaktivně) DNA sondou. Po expozici na rentgenovém filmu vidíme signál v oblastech, kde se sonda navázala na homologní molekuly RNA (vlevo dole).

V současné době je metoda northernovy hybridizace vytlačována metodou zvanou **real-time RT-PCR**. Tento postup vychází z izolované RNA, která je reverzní transkripcí přepisována na cDNA, která je specifickou polymerázovou řetězovou reakcí kvantifikována. RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) je zjevně nejcitlivější dostupnou technikou umožňující kvantifikaci mRNA na bázi fluorescenčního signálu ve velmi malých vzorcích až do úrovně jediné buňky. V současné době existují čtyři odlišné strategie, jak generovat a měřit fluorescenční signál: tyto strategie jsou prezentovány chemickými společnostmi TaqMan®, Molecular Beacons, Scorpions® a SYBR® Green. Real-time PCR vyžaduje speciální přístrojové vybavení, které zahrnuje termální cyklér, počítač s příslušným softwarem a optiku pro excitaci fluorescence a detekci emitovaného záření.

Metodou, která umožňuje zjišťovat přítomnost specifických mRNA v jednotlivých tkáních a buňkách je **in situ hybridizace** prováděná obvykle na tenkých řezech. V případě menších objektů, jako je například vajíčko či larva drozofily je možné fixovat i celý objekt najednou a provádět hybridizaci na řezech (*whole-mount approach*). Metoda spočívá v šetrně připraveném preparátu, který je hybridizován s příslušnou sondou, obvykle značenou cDNA, která může vytvářet duplexy s mRNA. Značení DNA sond se obvykle provádí pomocí radioaktivně či neradioaktivně značených deoxyribonukleotid-trifosfátů, které jsou do sondy včleňovány metodou posunu DNázového naštěpení a účinkem DNA polymerázy I (*nick translation*) nebo vazbou náhodných primerů na denaturovaný templát a dosyntetizováním druhého vlákna DNA Klenowovým fragmentem DNA polymerázy (*multiprime labeling*). Dnes jsou k dispozici pro velkoobjemovou analýzu genové exprese i čipové technologie, které využívají markerů pro všechny významné geny: takové syntetické oligonukleotidy jsou fixovány na sklo jako mikrotečky. Analyzovaný vzorek biologického materiálu se purifikuje k izolaci polyadenylované mRNA, která se reverzní transkripcí převede na cDNA, fluorescenčně označí a hybridizuje na sklo s markerovými oligonukleotidy. Po mikroskopickém sejmutí signálů a počítačové analýze obrazu lze získat obraz o celkové expresi vysokého počtu genů (**transkriptom**).

Genovou expresi je možné samozřejmě studovat i na úrovni finálních genových produktů, tedy proteinů. Proteiny mohou být například separovány polyakrylamidovou elektroforézou, přeneseny na membránu a inkubovány se značenou specifickou protilátkou, postup známý jako **western blotting**. Podobně je možné detekovat specifické proteiny na tkáňových řezech pomocí značených protilátek. Ke sledování genové exprese bývají často využívány reportérové geny, buď endogenního původu (přirozeně se vyskytující geny) nebo ektopické transgeny. Endogenní **reportérové geny** se obvykle projevují výrazným fenotypem, jako je například tvorba pigmentu. Mezi nejznámější takové systémy patří gen *Agouti* (kódující žlutou barvu myši srsti), gen chalkon syntáza (řídící tvorbu červeného pigmentu v květech rostlin) či gen *Ade* (odpovědný za syntézu adeninu u kvasinek, jeho umlčení se projeví akumulací červeného pigmentu). Ektopické transgeny jsou často využívány ke studiu umlčování cizorodých sekvencí DNA. Patří sem například zeleně fluoreskující protein vyklonovaný z medúzy (používaný u celé řady biologických modelů) nebo bakteriální  $\beta$ -glukuronidáza (často používaná u rostlin, snadno biochemicky detekovatelná). Při studiu regulace funkce transgenů je však třeba brát v úvahu, že jde o cizorodé sekvence, které mohou být cíleně umlčovány (patří sem například jevy potlačování genové exprese u *Neurospora crassa* či kosuprese u rostlin, často vázané na metylace DNA nebo RNAi).

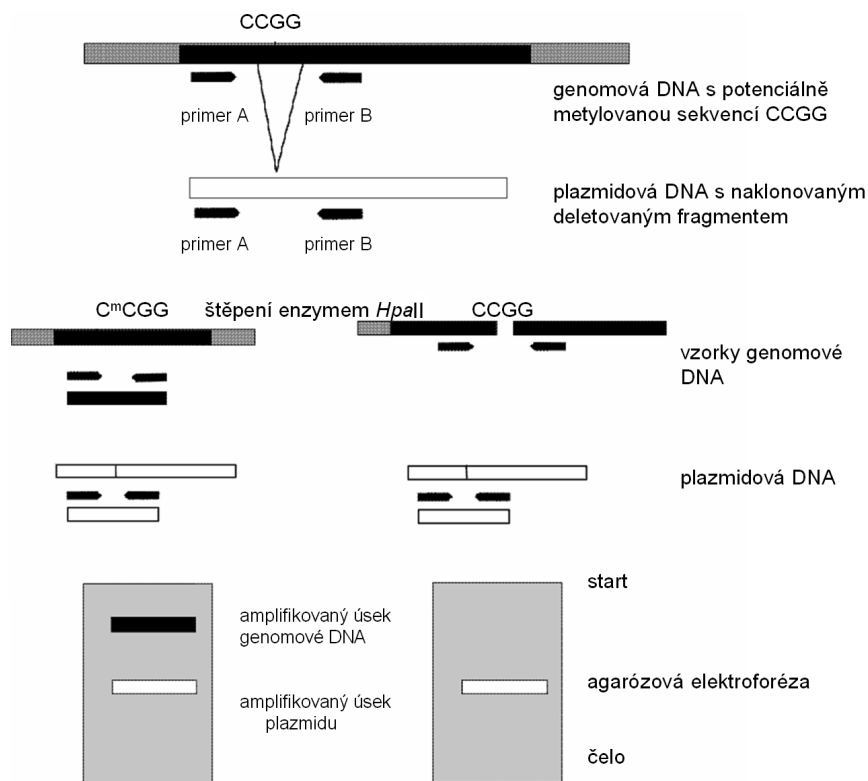


## 4.2 Analýza metylace DNA

Metylace cytozinu byla prvně identifikována v 60. letech minulého století především technikou vysokotlaké kapalinové chromatografie. Po objevu restričních endonukleáz bylo zjištěno, že některé z nich jsou citlivé na přítomnost 5-metylcytozinu v cílové sekvenci: metylace často vede k tomu, že restriční místo není rozpoznáno a DNA se neštěpí (tab. 4.1). Existují i restriktázy, které mají stejné cílové místo – **izoschizomery** – a přitom jsou různě citlivé na přítomnost 5-metylcytozinu. Tak například cílová sekvence C<sup>m</sup>CGG je štěpena enzymem *MspI*, ale není štěpena enzymem *HpaII*. Při nalezení sekvence nukleotidů CCGG v oblasti citlivé na metylaci (promotorové oblasti genů) je možné tedy využít izoschizomerů k detekci 5-metylcytozinu. Příslušné restriční fragmenty jsou poté analyzovány technikou **Southernovy hybridizace** nebo **PCR** (*polymerase chain reaction*). Strategie využití izoschizomerů s následující PCR je schematicky zobrazena na obr. 4.2. Studovaná sekvence zahrnuje cílové místo CCGG: jako kontrolní sekvence k ověření štípání i amplifikace DNA je oblast klonována do plazmidového vektoru, odkud je bodovou mutací nebo delecí cílové místo CCGG odstraněno. Analyzovaná sekvence DNA (přímo izolovaná ze zkoumaného vzorku) je smíchána s klonovanou DNA, štěpena restriktázou citlivou na 5-metylcytozin a vzorek je s pomocí připravených primerů amplifikován Taq polymerázou. Na agarózovém gelu musí být vždy přítomna klonovaná sekvence a dle metylace eventuelně i neštěpená (metylovaná) sekvence genomové DNA.

restriční enzym	cílová sekvence	metylované sekvence štěpené	metylované sekvence neštěpené
<i>MspI</i> <i>HpaII</i>	C/CGG	C <sup>m</sup> CGG	<sup>m</sup> CCGG, <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CGG <sup>m</sup> CCGG, C <sup>m</sup> CGG, <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CGG
<i>MboI</i> <i>Sau3AI</i>	/GATC	GAT <sup>m</sup> C	GAT <sup>m</sup> C
<i>XmaI</i> <i>SmaI</i>	C/CCGGG	CC <sup>m</sup> CGGG C <sup>m</sup> CCGGG	<sup>m</sup> CCCGGG CC <sup>m</sup> CGGG, <sup>m</sup> CCCGGG
<i>MvaI</i> <i>EcoRII</i>	CC/WGG	<sup>m</sup> CCWGG, C <sup>m</sup> CWGG <sup>m</sup> CCWGG	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CWGG C <sup>m</sup> CWGG, <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CWGG

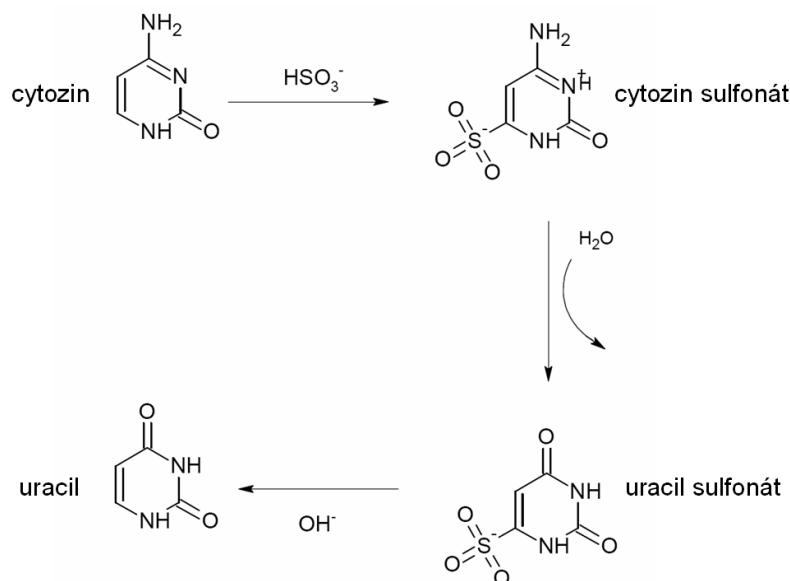
**Tab. 4.1** Přehled některých dvojic izoschizomerů restričních endonukleáz odlišně citlivých vůči přítomnosti 5-metylcytozinu (<sup>m</sup>C) v cílové sekvenci. Analýzou restričních fragmentů po jejich separaci na agarózovém gelu a Southernově hybridizaci lze identifikovat metylaci jednotlivých reziduí cytozinu v definovaných úsecích DNA (genech). Například srovnáním hybridizačních spekter po štípání *MspI* a *HpaII* lze detekovat metylaci vnitřního cytozinu v sekvenci CCGG. W značí adenin nebo tymin.



**Obr. 4.2** Detekce specifické metylace DNA v genomu pomocí techniky polymerázové řetězové reakce (PCR) po štěpení DNA restrikční endonukleázou citlivou vůči metylaci cytozinu v cílové sekvenci (podle Meyera et al., 1993). Předpokladem použití této metody je znalost nukleotidových sekvencí obklopujících studované místo metylace (v tomto případě metylace vnitřního cytozinu v tetranukleotidu CCGG). Genomová DNA je štípána restrikční endonukleázou *HpaII*, která sekvenci CCGG nerozštěpí, pokud je kterýkoli ze dvou cytozinů metylován (vlevo): takový úsek DNA je amplifikován z primerů, které jej obklopují. Pokud však genomová DNA není v příslušném místě metylována, dojde ke štěpení C/CGG a úsek se neamplifikuje technikou PCR (vpravo). Jako vnitřní kontrola pro úplnost štípání i reakci PCR je přidána plasmidová DNA, která obsahuje naklonovaný úsek genomové DNA, v němž však místo CCGG bylo odstraněno. Po separaci produktů PCR na agarózovém gelu (zcela dole) musí být vždy přítomen amplifikovaný fragment plasmidu (světlý proužek), zatímco přítomnost/absence amplifikované genomové DNA (tmavý proužek) je důkazem metylované/nemetylované cílové sekvence CCGG.

Zásadní zlom v metodice sledování a mapování 5-metylcytozinu v genomových vzorcích měl objev Marianne Frommerové ze Sydney v roce 1992. Metoda spočívá v odlišné citlivosti cytozinu a 5-metylcytozinu vůči působení **hydrogensířičitanu sodného**. Princip spočívá v tom, že nemetylovaný cytozin je hydrogensířičitanem sulfonován v pozici 6C; vzniklý cytozin-sulfonát je hydrolyticky deaminován na uracil-sulfonát, který se v alkalickém prostředí desulfonuje na uracil (**obr. 4.3**). Výsledkem této modifikace je konverze cytozinu na uracil, což po následné PCR vede k tranzici C→T. 5-metylcytozin je díky 5-metylové skupině na pyrimidinu vůči hydrogensířičitanu rezistentní (**obr. 4.4**), je po PCR a sekvenování vždy čten jako cytozin (techniky sekvenování neumožňují rozlišení cytozinu od 5-metylcytozinu). Hlavní výhodou hydrogensířičitanového genomového sekvenování je informace o rozmístění 5-metylcytozinu v celé sledované sekvenci (a nikoli jen v jediném restrikčním místě) a vysoká citlivost reakce, která díky finálnímu kroku PCR amplifikace umožňuje studovat i velmi malé vzorky. Izolovaná vysokomolekulární genomová DNA se štěpí na menší fragmenty, ty se purifikují, denaturují v alkalickém prostředí a posléze se podrobí inkubaci v nasyceném roztoku hydrogensířičitanu. Desulfonace se pak provede alkalickým působením. Následuje technika PCR s vhodnými primery k amplifikaci jednoho vlákna modifikované DNA. Produkty jsou klonovány do plasmidového vektoru, poté trans-

formovány do *Escherichia coli* a nakonec sekvenovány. Největším úskalím metody je skutečnost, že musíme dosáhnout prakticky 100 % konverze všech cytozinů na tymin. K ověření, zdali hydrogensířičitanové působení je dosti účinné, potřebujeme plazmidovou DNA se studovanou sekvencí a se známou pozicí 5-metylcytosinu, kterou dosáhneme po metylaci *in vitro*. Sekvenování takového kontrolního vzorku pak odhalí, zdali hydrogensířičitan vskutku selektivně konvertoval všechny cytoziny (a nikoli 5-metylcytosiny).



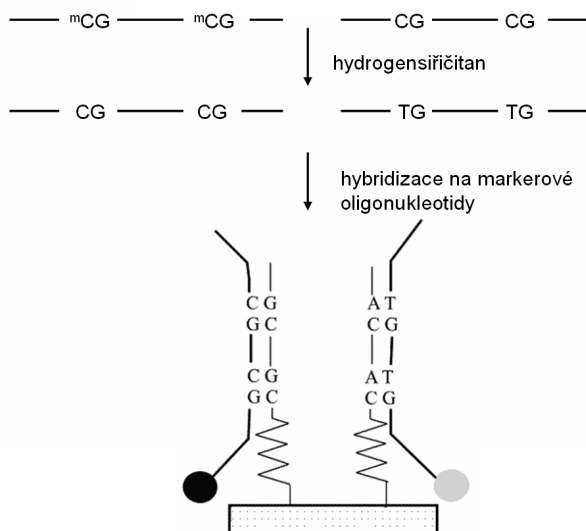
**Obr. 4.3** Princip specifické modifikace cytozinu pomocí aplikace hydrogensířičitanu sodného. Na 6. uhlíku pyrimidinového kruhu dochází k sulfonaci, která vede k hydrolytické deaminaci na uhlíku 4. Výsledkem je přeměna cytozinu v uracil, po aplikaci PCR pro účely sekvenování tedy dochází ke konverzi cytozinu na tymin. Podstatné je, že 5-metylcytosin je díky metylaci vůči této reakci rezistentní. Pokud známe základní sekvenci nukleotidů v daném úseku DNA, přečteme ve změně cytozinu na tymin cytozin nemetylovaný, zatímco cytozin, který po aplikaci hydrogensířičitanu zůstává cytozinem, je metylovaný.

původní genomová sekvence	G	T	T	G	<sup>m</sup> C	G	C	T	C	A	C
standardní sekvenování	G	T	T	G	C	G	C	T	C	A	C
sířičitanové sekvenování	G	T	T	G	C	G	<u>T</u>	T	<u>T</u>	A	<u>T</u>

**Obr. 4.4** Příklad sekvenovaného úseku DNA po sířičitanovém ovlivnění. Nahoře je původní sekvence nukleotidů z biologického vzorku, uprostřed je sled nukleotidů získaný po standardním sekvenování, které není schopno odlišit metylovaný a nemetylovaný cytozin a dole je obraz získaný po aplikaci hydrogensířičitanu a sekvenování: zde je 5-metylcytosin čten jako cytozin, zatímco cytozin jako tymin.

V posledních letech byla na bázi hydrogensířičitanového efektu vypracována metodika velkoplošného genomového mapování 5-metylcytosinu (**MSO**, *methylation-specific oligonucleotide array*). Využívá také čipové technologie: jsou připraveny syntetické oligomery jako markery důležitých genů a tyto jsou kovalentně (jako mikrotečky) vázány na skleněnou destičku. Testovaná genomová DNA je také štípána na oligonukleotidy, podrobena působení hydrogensířičitanu, což vede k diferencované konverzi cytozinů v tyminy. Takto modifikované oligonukleotidy jsou na 3'-konci značeny fluorochromem

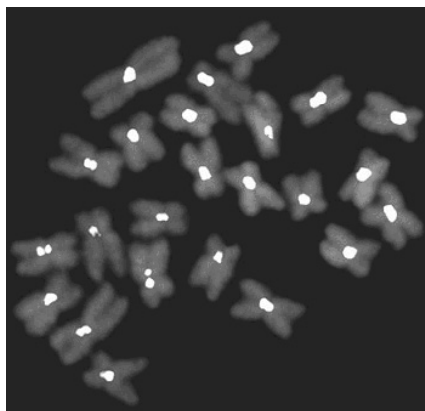
a hybridizovány na čipová skla (**obr. 4.5**). Intenzita hybridizačního signálu samozřejmě souvisí s efektivitou hybridizace: ta se s mírou C→T konverzí samozřejmě snižuje. Fluorescenční signál je snímán mikroskopickou technikou a softwarově kvantifikován. Touto technikou byly během posledních pár let objasněn **metylom** (stav metylace celého genomu v určitém buněčném nebo tkáňovém typu) například u člověka nebo *Arabidopsis*.



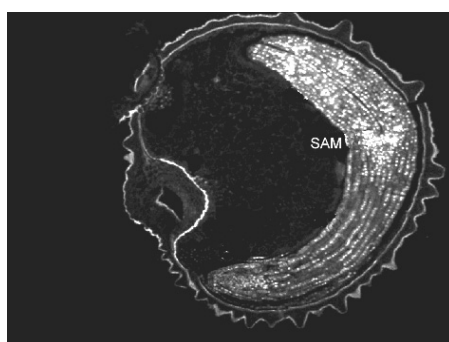
**Obr. 4.5** Metoda mikročipů, která umožňuje analýzu metylace DNA rozsáhlých genových sekvencí. Metoda MSO (*methylation-specific oligonucleotide microarray*) využívá techniky hydrogensířičitanové modifikace (konverze cytozinu na tymin) studovaných úseků DNA. Tyto DNA jsou po vhodném zkrácení fluorescenčně označeny na 3'-konci a hybridizovány na komerční markerové oligonukleotidy, které jsou natištěny na sklíčka. Hydrogensířičitanová konverze vede k bodové mutaci, která ovlivní intenzitu hybridizace k markerovému oligonukleotidu.

### 4.3 Studium modifikací histonů

Hlavním nástrojem studia modifikovaných histonů jsou protilátkové reakce. Přípravují se jako polyklonální či monoklonální protilátky v savčích systémech a po patřičné purifikaci se aplikují na studovaný chromatin. Zpočátku se protilátky, obvykle fluorescenčně značené, používaly k **imunobarvení jader a chromozomů**. Pomocí protilátek je možno na 3-D struktuře jádra či lineární struktuře chromozomů pozorovat oblasti, kde je výraznější podíl určitého modifikovaného histonu (**obr. 4.6**). Dnes jsou komerčně dostupné protilátky proti prakticky všem specifickým modifikacím nukleozomálních histonů. Lze provádět i imunobarvení tkáňové, kdy se protilátka aplikuje obvykle na tenký řez na skle. Takto lze analyzovat nejen specifitu modifikací histonů, ale i metylace DNA či jiné epigenetické procesy (**obr. 4.7**).

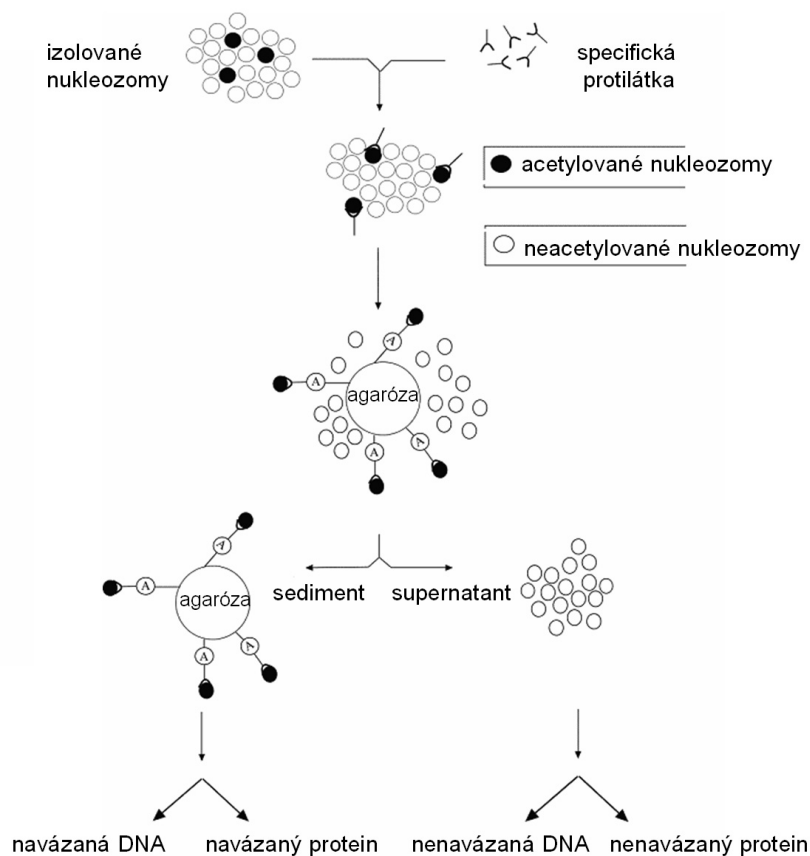


**Obr. 4.6** Imunodetekce modifikovaných histonů na chromozomech rostliny *Silene latifolia*: značená protilátka vůči modifikovanému histonu CENP-A fosforylovanému v pozici serinu 7 jasně ukazuje, že k této modifikaci dochází specificky jen v centromerické (vysoce kondenzované) oblasti chromozomů.



**Obr. 4.7** Ukázka techniky imunobarvení: řez fixovaným embryem (semenem) rostliny *Silene latifolia* po barvení myší protilátkou vůči 5-metylcytozinu a sekundární anti-myší protilátkou značenou fluoresceinem. Nejsilnější signál v oblasti apikálního meristému (SAM, *shoot apical meristem*) ukazuje, že v této oblasti je nejvyšší stupeň metylace DNA.

Purifikace protilátek vysoce specifických k jednotlivým komponentám chromatinu umožnilo zavedení techniky **chromatinové imunoprecipitace** (*ChIP*, *chromatin immunoprecipitation*). Je to opět technologie širokospektrální, která umožňuje při aplikaci specifických protilátek analyzovat nejen modifikace histonů a DNA v daných fragmentech DNA, ale i studium DNA- vazebných proteinů a proteinových komplexů. Metodika začíná šetrnou izolací jader a jejich šetrnou fixací formaldehydem, aby nedošlo k uvolnění nekovalentních vazeb DNA a proteinů. Chromatin se poté štěpí na menší části (řádově nukleozomy) mikrokokální nukleázou nebo ultrazvukem. Poté se aplikuje protilátka, která se váže jen na specifické chromatinové fragmenty. Vysrážené fragmenty chromatinu jsou pak odděleny od frakce chromatinu bez navázané protilátky (**obr. 4.8**). Poté jsou v obou frakcích odděleny molekuly DNA od proteinů a identita jednotlivých DNA je odhalena technikou PCR. Dnes se také zavádí technologie analýzy vysrážených fragmentů chromatinu resp. úseků DNA hybridizací DNA/DNA na čipech.



**Obr. 4.8** Schéma imunoprecipitační analýzy chromatinu, která umožňuje lokalizovat acetylované histony na specifických sekvencích DNA (*chromatin immunoprecipitation, ChIP*, podle Crane-Robinsonové a Wolffeho, 1998). Izolovaný chromatin, fragmentovaný na nukleozomy mikrokokální nukleázou, tvoří konjugáty s protilátkou vůči acetylovanému histonu a tyto jsou imobilizovány na proteinu A agarózových kuliček. Takto mohou být analyzovány oddělené frakce acetylovaného a neacetylovaného chromatinu a následně Southernovou hybridizací nebo PCR zjišťována acetylace jednotlivých fragmentů DNA (genů).

Interakce DNA a proteinů se studují i s pomocí řady dalších technik. Patří k nim například gelová zpomalovací analýza (*gel retardation assay*), která pomáhá určit, zda je určitá sekvence DNA místem vazby jistého proteinu. Značená sonda DNA se smísí se studovaným proteinem a provede se elektroforetický test pohyblivosti: pokud se protein váže na DNA, způsobí snížení její pohyblivosti v gelu. Ověření specifiity interakce lze provést například přidáním protilátky vůči proteinu, což dále snižuje elektroforetickou mobilitu komplexu.

## 5 JEDNODUCHÉ EUKARYOTICKÉ MODELY

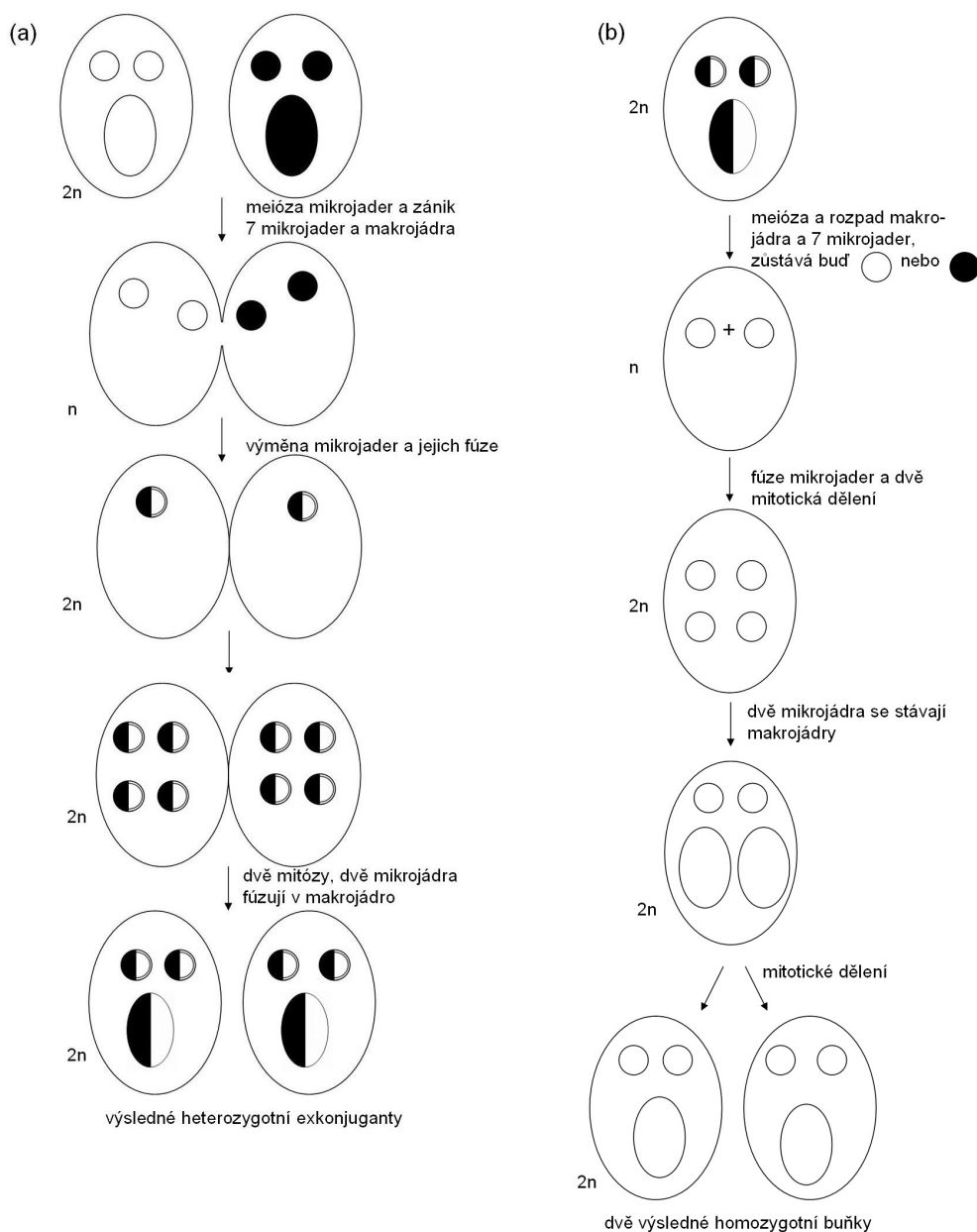
### 5.1 Prvoci

Prvoci jsou jednobuněčnými eukaryotickými organizmy. Celé tělo včetně funkčních i strukturních prvků je tvořeno jedinou buňkou, tyto funkce jsou zajišťovány miniaturními ústroječky. Mají pravé buněčné jádro s jadernou membránou, proto mohou být využívány jako jednoduché eukaryotické modely. Někteří prvoci nemají v cytoplazmě jen jediné jádro, ale dvě nebo více jader. Například bičíkovci *Lambliia* mají trvale dvě stejná jádra, jiní bičíkovci (jako například *Calonympha*) mají i několik desítek jader. Nejzajímavější je situace u nálevníků, kde dochází k diferenciaci jader na velký vegetativní **makronukleus** a malý generativní **mikronukleus**. U některých nálevníků může být počet makrojader i mikrojadér i vyšší. U nejnámějšího modelového druhu trepky *Paramecium aurelia* jsou dvě mikrojadra a jedno makrojádro, zatímco hruštička *Tetrahymena thermophila* má jedno makrojádro i jedno mikrojádro.

#### 5.1.1 Trepka, *Paramecium tetraurelia*

**Trepka** se stala modelem buněčné biologie a genetiky ve 30. letech minulého století díky T. M. Sonnenbornovi, který, mimo jiné, objevil i její pohlavní typy. Brzy se ukázalo, že ne všechny dědičné znaky prvků mohou být vysvětleny Mendelovými zákony. Diploidní mikrojadra jsou transkripčně umlčená, podrobují se meioze dávající vznik gametickým jádrům, která představují příští pohlavní generaci. Vysoce polyploidní (až  $800n$ ) makrojadra jsou v průběhu vegetativního života trepky odpovědná za genovou expresi a rozhodují tak o fenotypu buňky. Během pohlavního vývoje však makrojádro zaniká a je tak považováno za ekvivalentní vůči somatické linii živočichů. Makrojadra a mikrojadra se dělí odlišnými mechanismy: mikrojadra se podrobují standardní mitóze, makrojadra amitoticky bez kondenzace chromozomů. Pokud se trepky nepodrobují sexuální reprodukci, nýbrž se množí jen vegetativním štěpením, postupně stárnou a umírají. Zatímco rodičovská mikrojadra dávají vznik mikrojadřům a makrojadřům další generace, parentální jádro se u prvků různými mechanismy ztrácí. U trepky je fragmentováno asi na 30 částí, které sice zastaví replikaci DNA, ale jsou transkripčně aktivní i v průběhu diferenciaci nových makrojader.

Trepka je diploidní prvek o velikosti 120 až 180  $\mu\text{m}$ , který se podrobuje pohlavnímu rozmnožování typu **konjugace** (obr. 5.1a). Na počátku má každá buňka dvě mikrojadra, která hrají roli v konjugačním procesu. Když se dvě buňky dostanou do kontaktu, obě jádra se podrobí meioze, což má za následek přítomnost osmi mikrojadér v každé buňce. Sedm z těchto mikrojadér plus makrojádro se rozpadají, takže v každé buňce zůstává jen jediné mikrojádro, které se podrobí jednomu mitotickému dělení. Poté se buněčná membrána mezi buňkami částečně rozvolní a buňky si vzájemně vymění jedno mikrojádro. Původem odlišná mikrojadra pak fúzí a vytvářejí diploidní jádro. Po této výměně jader jsou obě buňky genotypově identické a obvykle nedochází ke smíchání cytoplazmy. Pak následují dvě mitotická dělení každého jádra a nakonec dvě z mikrojadér spolu fúzí za vzniku makrojader. Proces konjugace je ukončen za vzniku dvou diploidních exkonjugantů. Při konjugaci tedy počet buněk zůstává, ale genotyp výsledných buněk je v podstatě hybridem genomů původních buněk. Mikrojadra zůstávají diploidní, zatímco makrojádro se podrobuje vysoké polyploidizaci a genomové restrukturalizaci. Základní nepohlavní množení trepek nastává ve vegetativním stádiu růstu příčným štěpením.



**Obr. 5.1** Pohlavní životní cyklus trepky: konjugace a autogamie. Při konjugaci (a) dochází mezi dvěma buňkami odlišných pohlavních typů ke vzájemné výměně mikrojadra, původní makrojádra zanikají. Vznikají shodné heterozygotní hybridy (diploidní exkonjuganty), kde produkty fúze mikrojadra dávají i vznik novým makrojádřům. Při autogamii (b) se mikrojadro podrobí meióze, sedm produktů zaniká a zbývající jádro se jednou rozdělí a dvě vznikající mikrojadra spolu fúzí za vzniku diploidního jádra. Při meióze tedy dochází ke ztrátě poloviny genetické výbavy, z původního heterozygota (vzniklého konjugací) se po autogamii stává homozygot.

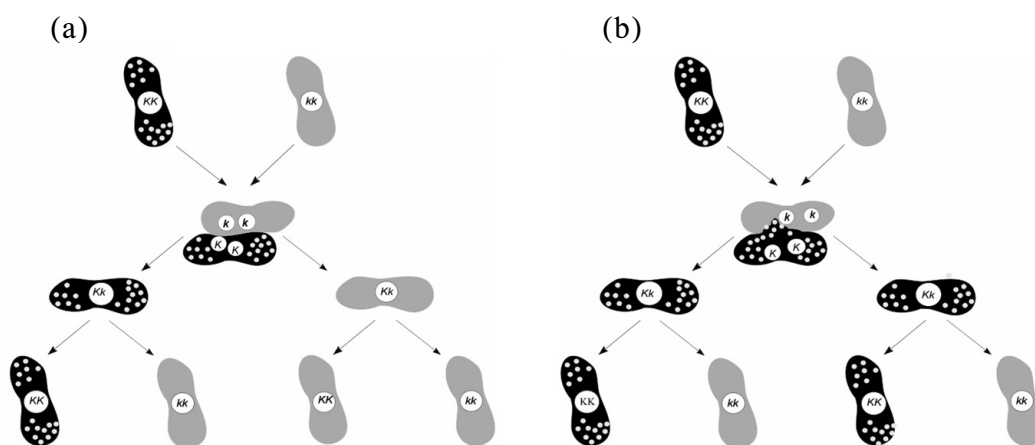
Jediná buňka trepky se může příležitostně podrobit i **autogamii (obr. 5.1b)**. Dochází při ní k meióze a opět sedm mikrojadra zaniká. Přežívající mikrojadro se mitoticky rozdělí a produkty spolu fúzí za vzniku diploidního jádra. Pokud je původní jádro heterozygotní, stává se nyní homozygotním, protože je odvozeno z jediného meiotického produktu. Přežívající mikrojadro se vybírá náhodně: polovina buněk v populaci tedy obsahuje jednu alelu a polovina druhou. Toto diploidní homozygotní jádro se podrobí dvěma mitotickým dělením za vzniku čtyř jader. Dvě jádra se stanou makrojádry, dvě zůstávají mikrojadry. Posledním krokem je mitóza mikrojadra a rozdělení buňky: výsledkem jsou dvě



buňky, každá se dvěma diploidními mikrojádry a jedním makrojádrem. Obě tyto buňky mají shodný genotyp. Z genetického hlediska je to tedy proces obrácený vůči konjugaci: původní heterozygot se v průběhu autogamie při meióze náhodně „zbaví“ jedné části svého hybridního genomu. Z hlediska celé populace ale žádný genom nemizí, nýbrž heterozygoty segregují na homozygoty.

### 5.1.2 Cytoplazmatická dědičnost

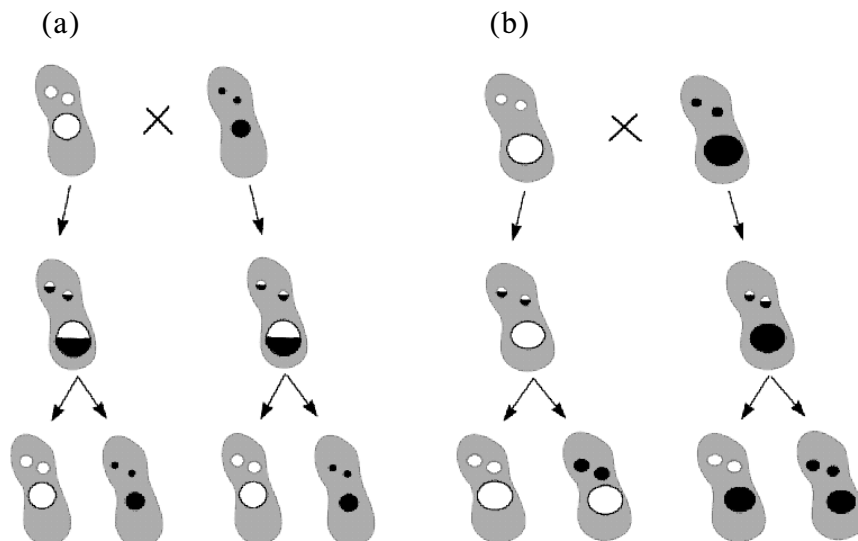
Trepky jsou klasickým modelem **cytoplazmatické dědičnosti**. Známy je jejich „zabíječský“ účinek (*killer effect*). **Zabíječské kmeny** trepky uvolňují do prostředí látky, které mají letální efekt k mnoha jiným kmenům. Zabíječské kmeny mají ve své cytoplazmě bakterie zvané kappa částice – buňky *Caedobacter taeniospiralis* – které jedovaté látky vytvářejí. Udržování bakterií v trepce je podmíněno jedním dominantním jaderným genem *K*, který má zřejmě i (spolu)odpovědnost za imunitu kmene vůči toxinům (**obr. 5.2**). Pokud při konjugaci mezi zabíječským kmenem *KK* a senzitivním kmenem *kk* nedochází k výměně cytoplazmy, vznikají exkonjuganty se stejným heterozygotním genotypem *Kk*, ale odlišným fenotypem: jeden zabíječský (obsahující toxické bakterie) a jeden senzitivní (bez bakterií). Následně se obě buňky mohou podrobit autogamii, při které z heterozygotů vznikají homozygoty. Ze zabíječských buněk *Kk* se stanou zabíječi *KK* a senzitivní buňky *kk*. Ze senzitivních buněk *Kk* se autogamií stanou senzitivní *KK* a senzitivní *kk*. Pokud při konjugaci mezi zabíječským jedincem *KK* a senzitivním jedincem *kk* dojde k částečné výměně cytoplazmy, senzitivní jedinec je infikován bakterií. Oba exkonjuganty tak mají shodný hybridní genotyp *Kk* a obsahují bakterie, jsou tedy zabíječi. Shodně oba tyto heterozygotní zabíječi dávají vznik dvěma typům homozygotů: zabíječům *KK* a senzitivním jedincům *kk* (tyto buňky vzhledem k nepřítomnosti dominantní alely *K* si nemohou udržet v cytoplazmě bakterie).



**Obr. 5.2** Dědičnost zabíječského fenoménu při konjugaci trepky. Křížení mezi infekčními (*KK*) a senzitivními jedinci (*kk*) bez předávání cytoplazmy (a), resp. s výměnou části cytoplazmy (b); je vyznačeno vždy jen jedno mikrojádro. Světlé tečky v cytoplazmě představují parazitické bakterie (částice kappa). Gen *K* zodpovídá za schopnost trepky udržovat ve své buňce bakterie, kdežto recesivní alela *k* tuto schopnost nemá (tyto trepky jsou naopak k zabíječům senzitivní). Pokud při konjugaci nedojde k výměně cytoplazmy, bakteriální infekce se nepřenáší. Zásadně se tedy zabíječský fenomén předává maternálně.

Jiným příkladem cytoplazmatické dědičnosti jsou **pohlavní typy**. U trepky jsou dva pohlavní typy O a E, které se dědí cytoplazmaticky: jsou diferencovanými fenotypy somatického makrojádra. Po konjugaci, při které nedochází k míchání cytoplazmy, si jednotlivé exkonjuganty zachovávají svůj pohlavní typ: vegetativní klon pocházející z rodiče O zůstává O, zatímco jedinec vznikající z rodiče E zůstává E. To

je zjevně v rozporu s genetickou konstitucí obou exkonjugantů, neboť tyto mají identické zygotické genomy (**obr. 5.3**). Pohlavnost je určována fyzicky přítomnými cytoplazmatickými faktory: pokud při konjugaci dojde k rozsáhlejší výměně cytoplazmy, oba jedinci obvykle vykazují pohlavní typ E.



**Obr. 5.3** Mendelistická (a) a maternální (b) dědičnost u trepky. Pokud je znak řízen jaderným genem dochází při konjugaci (horní řádek) ke vzniku shodných heterozygotů v generaci F1 (prostřední řádek). V další generaci dochází díky autogamii k segregaci genomů za vzniku původních typů (dolní řádek). Genetická informace se tedy předává přes mikrojádru. Pokud je znak řízen maternálně (b), například pohlavní typ trepky – O resp. E, dochází sice při konjugaci k výměně mikrojader (a tím i genetické informace o pohlavním typu), avšak původní pohlavní typ zůstává (dědí se tedy cytoplazmaticky, maternálně).

### 5.1.3 Strukturální dědičnost

Trepka je i příkladem tzv. **strukturální dědičnosti**, tedy dědičnosti na základě fyzického přenosu struktury tvaru těla. Tělo trepky je pokryto asi dvěma tisíci řasinkami o délce asi 10 $\mu$ m, které jsou jejím pohybovým ústrojem. Řasinky jsou v těle zakotveny bazálními tělísky (kinetozomy). Při růstu trepky se napřed vždy rozdělí bazální tělísky, teprve pak z nich vznikají nové řasinky. Bazální tělísky s řasinkami jsou určitým způsobem uspořádána: v určitém sklonu a v podélných řadách. Při dělení buňky je duplikace bazálních tělísek určována strukturou řasinek, takže nová bazální tělísky zůstávají ve stejné orientaci. Experimentální přenos malé oblasti bazálního tělíska do obrácené orientace (anterio-posteriorní inverze) však vede po duplikaci bazálních tělísek ke tvorbě celé obrácené řady řasinek. Při vegetativním dělení je tato anterio-posteriorní inverze předávána po mnoho generací a při konjugaci se přenáší maternálně. Tento experiment je názornou ukázkou, že za takovou strukturální variabilitu je rozhodující úloha preexistujících struktur. Podobnými příklady mohou být autoreplikující se priony nebo centromery eukaryotických chromozomů. Lze též připomenout, že podstatné části buněk (například mitochondrie, plastidy či ribozomy) respektive i buňky celé, se dědí preformované a jinak vznikají ani nemohou (**Virchowova buněčná teorie**).

## 5.1.4 Chromatin makrojádra a mikrojádra

Makronukleus a mikronukleus jsou modelovými systémy pro odlišné **struktury chromatinu** fungující v jediné buňce resp. cytoplazmě. Modelem se stalo srovnávací biochemické a imunocytochemické studium makrojádra a mikrojádra u hruštičky, *Tetrahymena thermophila*. Již bylo zmíněno, že makronukleus je transkripčně aktivní a vysoce polyploidní, zatímco mikronukleus je umlčený, kondenzovaný a diploidní (**tab. 5.1**). Biochemické analýzy také prokázaly, že v makrojádře se vyskytují specifické **varianty histonů** H2A.Z, H3.3 a macH1, které se v mikrojadře nevyskytují. Typickou modifikací pro aktivní makrojádru je acetylace všech typů nukleozomálních histonů. Metylce histonů (H3 v pozicích lyzinu 4, 9 a 27) je také výhradním znakem makrojádra a vyvíjejícího se makrojádra. V makrojádrech hruštičky byly také poprvé izolovány enzymy histon acetyltransferáza (HAT) a metyltransferáza (HKMT). Některé specifické fosforylace se vyskytují naopak jen v mikrojadře (zejména fosforylace serinu v pozici 10 histonu H3), což zjevně souvisí s kondenzací chromozomů při mitotickém dělení.

	základní rysy	složení histonů	modifikace histonů
mikrojádru	umlčený chromatin, diploidní stav kondenzace chromozomů	H2A, H2B, H3, H4, specifická varianta H1	fosforylace serinu H3
makrojádru	transkripčně aktivní polyploidní stav restrukturalizace genomu	H2A, H2B, H3, H4, specifické varianty H1, H2 a H3	metylce lyzinu H3, acetylce lyzinu v histonech H2A, H2B, H3 a H4

**Tab. 5.1** Charakteristické rysy jader prvoků

## 5.1.5 Restrukturalizace genomu makrojádra

V průběhu vývoje makronukleu dochází u prvoků k rozsáhlé **restrukturalizaci genomu**, zatímco genom mikrojádra (ekvivalent zárodečné dráhy) zůstává stabilní. Dvěma základními typy restrukturalizací jsou u prvoků **vnitřní delece DNA** a **fragmentace chromozomů**. Analýzy ukazují, že v průběhu vývoje makrojádra je eliminováno 10 až 95 % původního genomu. Jde především o repetitivní sekvence DNA včetně transpozonů. Počty genomových restrukturalizací mohou dosahovat až několika desítek tisíc. Tyto rozsáhlé procesy umožňují studium epigenetických mechanismů, které takové sekvence DNA vyhledávají.

Vnitřní delece DNA zahrnují **přesné intragenové** a **nepřesné intergenové repetitivní sekvence**. Přesné delece jsou ty, které se odehrávají ve stejných nukleotidových pozicích ve všech kopiích chromozomů makrojádra a obvykle představují krátké unikátní úseky DNA odstraňované z kódujících sekvencí. Přesné intragenové úseky jsou ohraničeny krátkými přímými repeticemi, které jsou druhově specifické. U trepky a jiných prvoků byla zjištěna taková konzervativní sekvence obsahující dinukleotid 5'-TA-3'. Deleční hranice pro nepřesné intergenové delece v polyploidním makrojádře se různí. Tato heterogenita má rozsah od desítek párů bazí u hruštičky až po několik kilobází u trepky. Tyto delece se obvykle vyskytují mezi krátkými repetitivními sekvencemi.

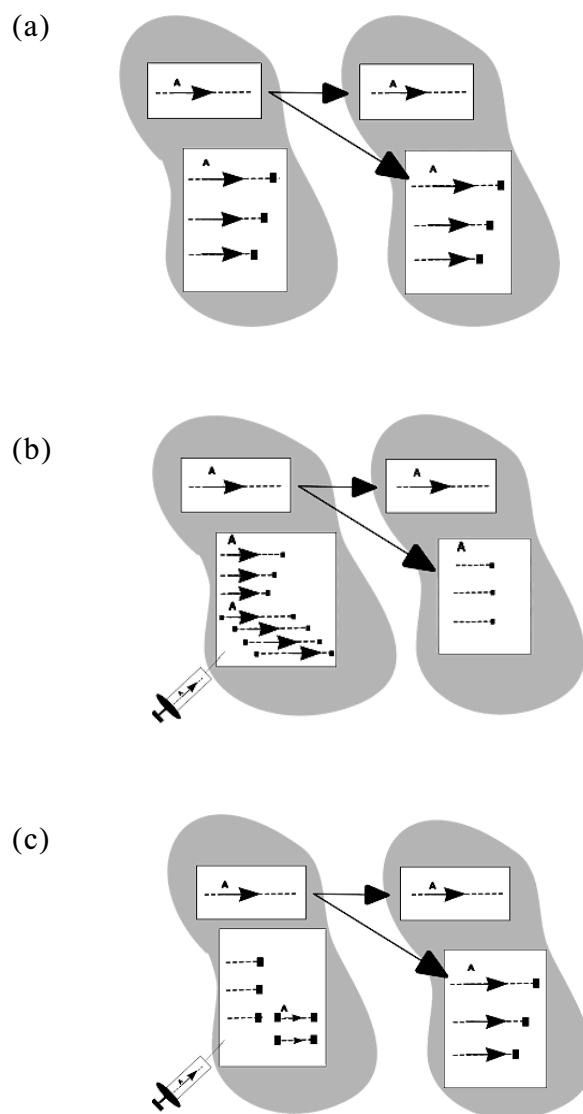
Fragmentace chromozomů nastává při vývoji makrojádra a vede ke štěpení na kratší molekuly DNA, které jsou koncově obalovány adicí **telomerických repetitivních sekvencí** *de novo*. Výsledné chromozomy postrádají centromery a jejich distribuce v průběhu amitotických dělení polyploidního makrojádra je jen přibližná. Proces fragmentace je u většiny prvků nepřesný, takže je i nepřesná pozice dosyntetizovaných telomerických repetitivních sekvencí. Snad jedinou výjimkou je konzervativní 15-párů bází dlouhá sekvence u *T. thermophila* (CBS; *chromosome breakage sequence*), která je charakteristická pro několik set deletovaných lokusů.

### 5.1.6 Umlčování genů cestou RNAi

U trepky a jiných prvků bylo prokázáno **umlčování genů** zprostředkované RNA. Transformace makrojádra trepky injekcí velkého počtu molekul transgenů s homologií vůči endogennímu genu má za následek jeho posttranskripční umlčení. Toto umlčení korelovalo s akumulací krátkých, přibližně 23-nukleotidových RNA (siRNA; *short interfering RNA*). Primárním spouštěčem tohoto umlčování je dvojvláknová RNA. Bylo to prokázáno i technikou podávání obouvláknového genového produktu prostřednictvím *Escherichia coli* v potravě. K umlčování docházelo již po 24 hodinách v průběhu tří vegetativních dělení. Byla tu opět prokázána akumulace malých 23-bázových molekul RNA, což dokazuje stejnou RNAi umlčovací strategii, jako byla pozorována v případě mikroinjekce transgenů. Umlčování indukované dsRNA podávané v potravě *E. coli* je reverzibilní. Pokud se ve stravě podá jiná standardní bakterie, potlačovaný gen se opět aktivuje. Jde tedy pouze o tranzientní umlčování homologních genů, neboť dsRNA se v průběhu vegetativního vývoje rychle vyřadí. Znamená to, že dsRNA molekuly se v cytoplazmě nemohou samy amplifikovat. RNA interference tedy na rozdíl od hlístice *C. elegans* u prvků nevede ke stabilnímu dědičnému umlčování genů v makrojádre. Zřejmě to souvisí s absencí metylace histonu H3 v lyzinové pozici 9 makrojádra hruštičky *Tetrahymena thermophila*.

### 5.1.7 Dědičnost restrukturalizací genomu

**Restrukturalizace genomu makrojádra** a její dědičnost jsou především epigenetickými procesy. Při standardní autogamii jsou gen či jeho okolí v makrojádre vždy stejným způsobem upravovány a jejich konce jsou chráněny *de novo* telomerickými sekvencemi (**obr. 5.4a**). Příslušné sekvence DNA v mikrojádre se samozřejmě žádným změnám nepodrobují. Restrukturalizaci je možné dědičně experimentálně změnit injekcí velkého počtu klonovaných sekvencí DNA do makrojádra s homologií vůči endogennímu genu. Mikrojádro by nemělo být dotčeno a makrojádro nepřechází do další generace a zaniká. V makrojádre další generace po autogamii dochází k neuvěřitelnému epigenetickému efektu: transgen injikovaný do makrojádra v předchozí generaci indukuje restriktivní typ delece homologní sekvence včetně tvorby telomerických repetitivních sekvencí (**obr. 5.4b**). Fenotypově se to může projevit umlčováním příslušného genu (telomerový poziční efekt). Tento restrukturalizační jev nemůže být vysvětlen zákony genetiky: jak u standardní autogamie tak i v případě indukované změny totiž DNA mikrojádra nenesou informaci pro deleční program. Přesný molekulární mechanismus ještě nebyl objasněn. Je zřejmé, že sekvencně-specifická informace se přenáší v průběhu autogamie prostřednictvím cytoplazmy z transformovaného maternálního makrojádra do vyvíjejícího se zygotického makrojádra. Pravděpodobným prostředníkem jsou molekuly RNA, které jsou přenášeny mezi jádry a především poskytují sekvencní informaci na principu párování bází. Recentní experimenty prokázaly, že specifické restrukturalizace mohou být vyvolány i potravou *E. coli* s expresí příslušné dsRNA.



**Obr. 5.4** Restrukturalizace genomu makrojádra trepky má při autogamii přesný dědičný charakter (a). Injekce transgenů klonovaného genu *A* do makrojádra trepky indukuje ektopickou delecí a telomerický poziční efekt (b). Transformace makrojádra sekvencí genu *A* specificky restauruje funkci genu *A* ve vyvíjejícím se makrojádře pohlavního potomstva (paradigma *d48*, c; podle Allise et al., 2007). Horní obdélník je vždy mikrojádro, dolní obdélník makrojádro.

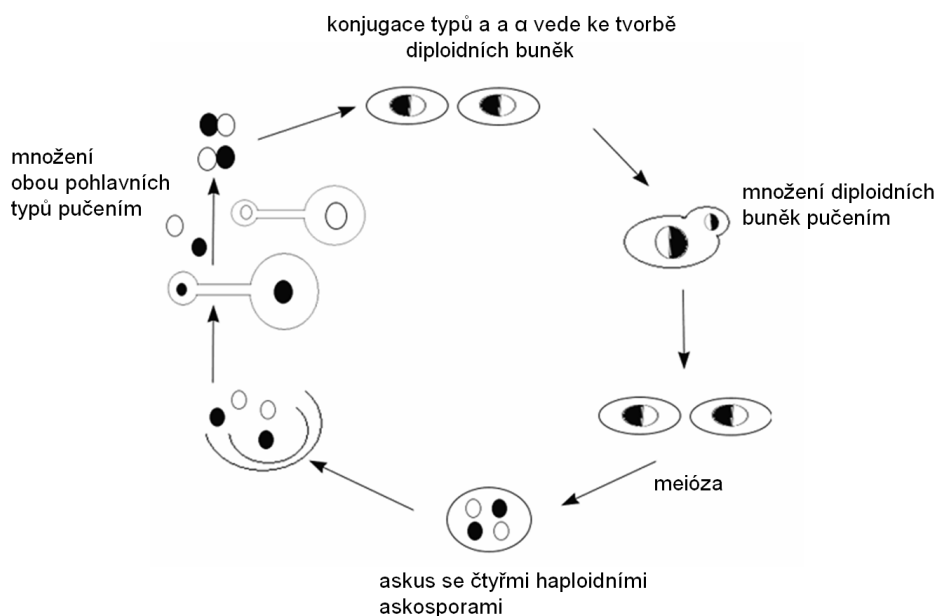
Experimentálně indukované restrukturalizace genomu mohou být děděny do dalších generací vývoje makrojádra. Nejznámějším příkladem takové změny je „záchrana“ genu *A* ve variantní linii *d48* trepky *P. tetraurelia*. Gen *A* kóduje povrchový antigen, který je děděn cytoplazmaticky (maternálně). Ve standardním makrojádře je gen *A* lokalizován několik desítek kilobází od telomery a není tak v rámci reprogramování genomu eliminován. V buněčné linii označované *d48* však gen *A* není exprimován, protože je aberantně odštěpen a eliminován, a to v každé pohlavní generaci. Linii *d48* přesto nemůžeme nazývat mutací, protože mikrojádro obsahuje standardní genom včetně genu *A* (**obr. 5.4c**). Přenos standardní cytoplazmy či mikroinjekce klonovaného genu *A* do vyvíjejícího se makrojádra linie *d48* však vede k restauraci funkce genu *A* (tento není již vyštěpován z genomu), která je dědičná do pohlavního potomstva. Zatímco tedy v předchozím odstavci byl popsán případ transgenem indukovaného umlčení endogenního genu (analogie s kosupresí u rostlin), **paradigma *d48*** znamená nemendelistický proces epigenetické informace o změně strukturování genomu makrojádra děděný z jedné generace makrojádra do další.

## 5.2 Kvasinky

Kvasinky jsou heterogenní skupinou převážně vřeckovýtrusných hub. Jsou jednobuněčné, což představuje výhodnou vlastnost eukaryotického modelu. Množí se vegetativně pučením, občas i pohlavně tvorbou vřecek.

### 5.2.1 Kvasinka pивní, *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinka *S. cerevisiae* (*budding yeast*) je mikroskopicky rozeznatelná svým charakteristickým mitotickým pučením v haploidním i diploidním stavu. Kvasinka vytváří dva **pohlavní typy** - a,  $\alpha$  - které jsou schopny spolu konjugovat. Tyto pohlavní typy sekretují odlišné feromony, které atrahují odlišný pohlavní typ a vážou se k jejich povrchovým receptorům. Tyto interakce vedou k zastavení buněčného cyklu uprostřed  $G_1$  fáze. Haploidní buňky odlišných pohlavních typů potom spolu fúzí za vzniku a/ $\alpha$  diploida. Hladovění vyvolává meiózu, která ústí ve tvorbu vřeka se čtyřmi spórami, po dvou od každého pohlavního typu (**obr. 5.5**).

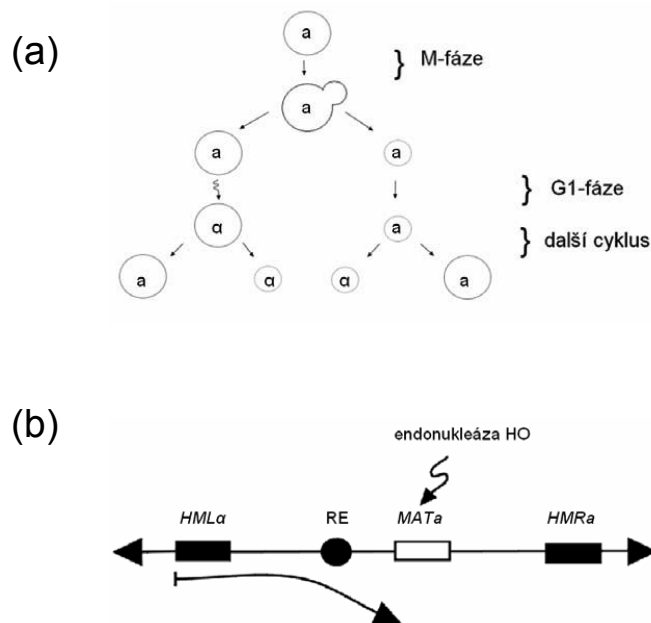


**Obr. 5.5** Životní cyklus kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinka má v haploidním stavu dva pohlavní typy, které se množí pučením a jsou schopny spolu konjugovat a vytvářet diploidní buňky a/ $\alpha$ . Tyto buňky se opět vegetativně množí nebo se podrobují meióze, při které vznikají čtyři haploidní vřeckaté spóry.

#### 5.2.1.1 Genová konverze

V přírodních podmínkách kvasinka každou generaci mění svůj pohlavní typ (**obr. 5.6a**). Tato změna je indukována endonukleázovou aktivitou (HO), která vytvoří specifický dvouvláknový zlom v pohlavním lokusu MAT. Vlastní přeměna spočívá v mechanismu **genové konverze**, která se odehrává před replikací DNA. Jde o transpozici opačného pohlavního lokusu z konstitutivně umlčeného donorového lokusu *HML $\alpha$*  nebo *HMR $\alpha$*  do aktivního lokusu MAT. Tyto umlčené lokusy *HM* jsou v podstatě kopiemi aktivních pohlavních lokusů MAT, nejsou nikdy samy exprimovány, ale slouží jako zálohy pro replikativní genovou konverzi. Jsou nyní klasickým modelem pro studium heterochromatinu (**obr.**

**5.6b).** K pohlavní změně dochází vždy po buněčném dělení haploidní buňky v buňce dceřiné, která vznikla pučením z mateřské buňky. V přírodních populacích vegetativně se množících kvasinek tak dochází k vytváření přibližně stejných počtů jedinců obou pohlavních typů, což posléze umožňuje jejich konjugaci. V laboratoři však byly mutagenézou genu kódujícího endonukleázu HO zkonstruovány kmeny, které se genové konverzi a tudíž pohlavní změně podrobovat nemohou a zůstávají tak trvale typu  $\alpha$  nebo  $a$  (heterotalické kmeny).



**Obr. 5.6** Přepínání pohlavních typů *S. cerevisiae* po každém buněčném dělení (a). Mechanismem tohoto přepínání je genová konverze (b). Endonukleáza HO rozštěpí funkční lokus *MAT* ( $a$  nebo  $\alpha$ ) a do tohoto lokusu se vrepikuje sekvence záložního heterochromatického lokusu *HMRa* resp. *HMLa*. Locus RE značí zesilovač rekombinace (*enhancer of recombination*).

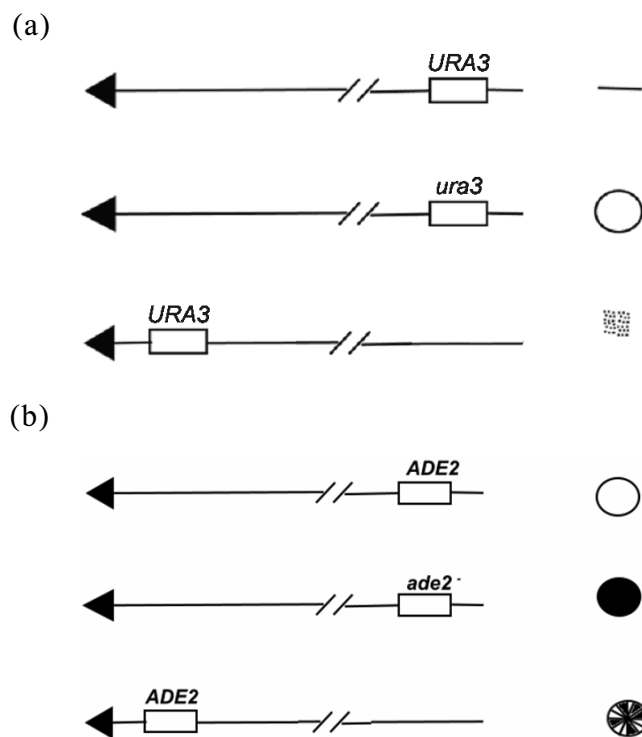
### 5.2.1.2 Charakteristika heterochromatinu

Všechny tři pohlavní lokusy *HMLa*, *HMRa* a *MATa/a* jsou přítomny na chromozomu III *S. cerevisiae*. Oba heterochromatické lokusy *HMLa* a *HMRa* jsou obklopeny krátkými umlčovacími úseky DNA zvanými E a I. Pouze transpozice těchto genů do lokusu *MAT* vede k jejich transkripční aktivitě. Přenos *HMLa* nastavuje pohlavní orientaci *MATa* a *HMRa* přepíná na *MATa*. Znamená to, že tyto náhradní pohlavní lokusy jsou potenciálně zcela funkční, pouze jsou epigeneticky umlčeny. Je to zárukou, aby v jedné buňce nedocházelo k expresi obou transkriptů  $\alpha$  i  $a$  současně, což by vedlo ke sterilitě. Při analýze heterochromatických genů *HMLa* a *HMRa* byly identifikovány minimálně čtyři proteiny, které za tento stav odpovídají: **Sir1, Sir2, Sir3 a Sir4** (*silent information regulatory proteins*). Mutace příslušných genů obvykle vedou ke ztrátě umlčování heterochromatických genů. Proteiny Sir nemají větší vzájemnou homologii a s výjimkou Sir2 se nacházejí jen u *S. cerevisiae*. Protein Sir2 má histon deacetylázovou aktivitu (specificky odstraňuje acetylovou skupinu z lyzinu v pozici 16 histonu H4) a byl zjištěn u všech zkoumaných eukaryotických druhů.

### 5.2.1.3 Reportérové geny

Ke sledování stavu a funkce chromatinu se používají i reportérové geny, jejichž aktivita je snadno sledovatelná. Heterochromatin se také nachází bezprostředně u telomerických repetitivních DNA. Pokud

je reportérový gen přemístěn do subtelomerického heterochromatinu, může docházet k jeho umlčování. Tento jev se nazývá **telomerovým pozičním efektem** (TPE; *telomere position effect*). Telomerický heterochromatin v podstatě vyžaduje stejné umlčovací proteiny jako *HM* lokusy (například Sir2, Sir3 a Sir4). Jelikož projev telomerového efektu není jednoznačný – v různých buněčných liniích kolonií je umlčování různé, bývá srovnáván s efektem poziční variegace u drozofily (modelově studováno pomocí exprese genu *white* ve složeném oku). Ke studiu telomerového efektu se využívá zejména dvou známých reportérových systémů – Ura3 a Ade2. Pokud je do média pro kvasinky přidána kyselina 5-fluoroorotová (5-FOA) je enzymem **Ura3** přeměněna na 5-fluorouracil (5-FU), který inhibuje syntézu DNA a způsobuje smrt buňky. Pokud je však gen *Ura3* vložen do heterochromatinu a umlčen, buňka přežívá (**obr. 5.7a**). Telomerový efekt ovšem není absolutní, takže se umlčování projevuje jen v některých buňkách a tím ovlivňuje i velikost kvasinkových kolonií. Pomocí sériového ředění aplikovaných buněk na agarové médium s 5-FOA je tedy možné kvantitativně měřit účinnost telomerového umlčování. Sledováním senzitivity k potenciálnímu toxinu lze také studovat kauzální vliv jednotlivých chromatinových mutantů.



**Obr. 5.7** Reportérové geny kvasinek sloužící ke studiu umlčování: (a) *URA3* a (b) *ADE2*. Tyto alely jsou ve standardní kvasince exprimovány, což vede ke smrti při růstu v selektivním médiu (*URA3*) resp. ke vzniku bílých kolonií (*ADE2*). Mutantní formy těchto genů (*ura3<sup>-</sup>*, *ade2<sup>-</sup>*) vedou k přežití kvasinek resp. ke tvorbě červených kolonií. Pokud jsou geny *URA3* či *ADE2* translokovány do telomerického heterochromatinu (značen špičkou), může docházet k jejich (částečnému) umlčování, což se projeví sníženým počtem kolonií rostoucích na selektivním médiu resp. tvorbou bílo-červených sektorů v koloniích (vpravo).

Druhým experimentálním reportérovým systémem *S. cerevisiae* je **Ade2**, který odpovídá za syntézu adeninu. Pokud je gen mutován nebo umlčen, v buňkách se hromadí prekurzor biosyntézy adeninu, což způsobuje načervenalou barvu kolonií (standardní kolonie jsou bílé). Pokud je gen *Ade2* lokalizován subtelomericky může docházet k jeho nepravidelnému umlčování prostřednictvím telomerického heterochromatinu (**obr. 5.7b**). Fenotypově se tento metastabilní epigenetický stav projevuje v různé



barevných radiálních sektorech kolonií, které představují jednotlivé buněčné linie v průběhu růstu kolonie. Svou podstatou i fenotypovým vyjádřením tento systém silně připomíná efekt poziční variegace u drozofily.

### 5.2.2 Kvasinka, *Schizosaccharomyces pombe*

**Kvasinka** *S. pombe* (*fission yeast*) je v mnoha směrech odlišná od *S. cerevisiae*. Cytologicky je také dobře odlišitelná díky tvorbě příčných přehrádek namísto pučení při mitotickém dělení. Díky možnosti růstové regulace buněčného cyklu se stala modelem pro objev klíčových regulátorů a mechanismů buněčného cyklu (Leland H. Hartwell, Tim Hunt a Paul M. Nurse - Nobelova cena za fyziologii a lékařství v roce 2001). Z epigenetického hlediska je také výrazně odlišná od *S. cerevisiae*. *S. pombe* totiž k umlčování genů využívá RNA interference, metylaci lyzinu v pozici 9 histonu H3 a heterochromatinových proteinů typu HP1. Je to v podstatě haploidní organizmus, který se každé dvě hodiny mitoticky dělí. Stejně jako *S. cerevisiae* tyto haploidní buňky mají **pohlavní charakteristiku (+/-)** a tuto jsou schopny po mitotickém dělení měnit s pomocí dvou epigeneticky umlčených kazet. Když odstraníme z kultivačního média zdroj dusíku, buňky se zastaví v G<sub>1</sub> fázi a je indukována pohlavní část životního cyklu prostřednictvím konjugace + a - buněk za vzniku diploidní zygoty. Tato diploidní buňka se podrobí meiotickému dělení za vzniku vřeka se čtyřmi haploidními sporami: dvěma typu + a dvěma -. Po vyklíčení se dělí mitoticky (obvykle s přepínáním pohlavních typů) a mohou opět konjugovat.

#### 5.2.2.1 Centromerický poziční efekt

Rozsáhlé heterochromatinizaci se u *S. pombe* podrobují náhradní pohlavní lokusy (umlčené kazety), telomery a centromery. Zatímco *S. cerevisiae* k umlčování používá Sir proteiny, u *S. pombe* jsou to především histonové modifikace a RNAi. Heterochromatinizace centromer je nezbytná k zajišťování segregace chromozomů při dělení jader. Přenos genu do této oblasti může vést k jeho umlčení - **centromerický poziční efekt** (CPE; *centromere position effect*). Centromerické oblasti jsou u *S. pombe* složeny z vnějších repetitivních sekvencí, které přiléhají k centrální doméně zahrnující vnitřní repetice a centrální jádro. Celá centromera má velikost několik desítek kilobází. K monitorování centromerického pozičního efektu se používá reportérových genů podobných jako u *S. cerevisiae* - *ura*<sup>4+</sup> (v případě umlčeného genu se neprojeví letalita vůči kyselině 5-fluoroorotové) a *ade*<sup>6+</sup> (jehož umlčení se projeví akumulací červeného pigmentu po blokadě syntézy adeninu). Umlčení reportérového genu do vnějších repetic centromery je silnější, zatímco lokalizace genu v centrální doméně je nestabilní a projevuje se tvorbou sektorově variegovaných kolonií.

#### 5.2.2.2 Charakteristika centromerického heterochromatinu

Za heterochromatinizaci jsou zřejmě odpovědné dva typy chromatinových struktur - heterochromatin zahrnující vnější repetice a chromatin označovaný CENP-A, který se váže k centrální doméně, kde je tvořen kinetochor. **Centromerický heterochromatin** při vnějších repeticích je asociován s dimetylací a trimetylací lyzinu 9 histonu H3. Ještě předtím vyžaduje aktivitu histon deacetyláz k deacetylaci histonu H3. Metylace lyzinu 9 histonu H3 histon metyltransferázami vytváří specifické vazebné místo pro **chromodoménový motiv** proteinů Swi6, Chp2 (homolog heterochromatinového proteinu HP1) a Chp1.

**Centrální chromatinová doména** centromery má výrazně odlišné složení chromatinu. U všech zkoumaných eukaryot bylo zjištěno, že k aktivním centromerám se váže protein typu histonu H3 známý jako

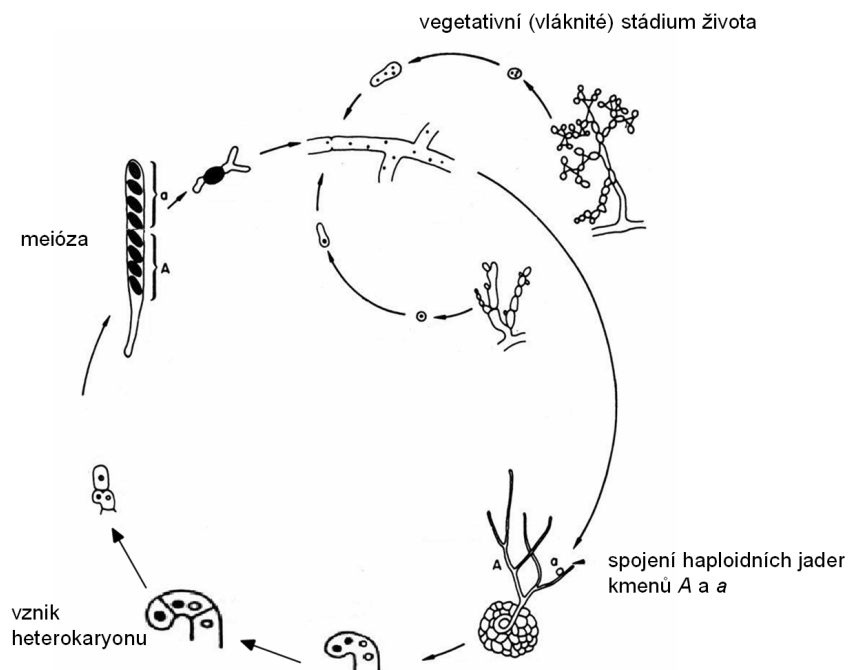
**CENP-A**, který je významný pro specifikaci místa uspořádání kinetochoru. Umlčování případných genů v centrální části centromery je nutností k zachování funkce kinetochoru, zahrnuje několik desítek proteinů, které brání transkripci resp. přístupu enzymu RNA polymerázy II.

Bylo prokázáno, že také u *S. pombe* funguje mechanismus **RNA interference**. Mutace genů kódujících proteiny Argonaut, Dicer nebo RNA-dependentní RNA polymerázu vede k fenotypovým důsledkům jako u *swi6* mutantů: redukce dimetylovaného lyzinu 9 histonu H3 a ztráta umlčování genů v oblastech vnějších repetecí centromer.

### 5.3 Plíseň chlebová, *Neurospora crassa*

Plíseň *N. crassa* je klasickým modelem genetiky eukaryot, protože haploidní fáze života jí umožňuje odhalovat recesivní mutace. Patří mezi **vláknité vřeckovýtrusné houby**. Uspořádání spor v askosporách navíc umožňuje přesnou analýzu genetické rekombinace. V padesátých letech minulého století vypracovali Edward Tatum a George Wells Beadle na tomto modelu svou teorii „jeden gen – jeden enzym“, za kterou v roce 1958 získali Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství.

#### 5.3.1 Životní cyklus



**Obr. 5.8** Životní cyklus plísně *Neurospora crassa*. Vegetativní fáze životního cyklu počíná z askospóry a představuje ji mnohobuněčné vláknité stádium (podhoubí). V tomto stádiu může docházet k umlčování genů po experimentálním vnesení DNA (*quelling*). V pohlavní fázi vývoje vzniká heterokaryon, kdy nastává vyhledávání a likvidace duplikovaných úseků DNA (RIP, *repeat-induced point mutation*). Po vzniku synkaryonu dochází k meióze, kdy nastává meiotické umlčování nepárované DNA (MSUD, *meiotic silencing of unpaired DNA*).

Vegetativní fáze růstového cyklu začíná dělením pohlavní spóry (askospóry) nebo nepohlavní spóry (konidie). Dělení ústí ve vláknité rozvětvené mnohobuněčné (i mnohojaderné) struktury - **mycelia**. Přehrádky mezi jednotlivými buňkami mycelia jsou jen částečné, proto dochází ke vzájemnému ovlivňování buněk. Mycélia jsou v závislosti na askospoře dvojího pohlavního typu - *A* nebo *a*. Rozrostlá vlákna plísně vytvářejí několikajaderné barevné **konidie**, kterými se *N. crassa* nepohlavně množí. Konidie mají samozřejmě pohlavní typ (*A* nebo *a*) podle mycélia, ze kterého pocházejí. Když nastává nedostatek potravy, dochází k indukci pohlavního rozmnožování. Vytvářejí se plodnice (**protoperitécia**): její specializované vlákno (zvané trichogyn) kontaktuje tkáň opačného pohlavního typu, odebere její buněčné jádro a přenesení jej zpět do protoperitécia. Mezi fertilizací a splynutím jader je poměrně dlouhé období, tzv. **heterokaryotická fáze** vývoje. Heterokaryotické buňky se dělí a obsahují vždy dvě jádra odlišného pohlavního typu. Tyto buňky vytvářejí zvláštní struktury podobné háčku a poslední mitóza vede ke tvorbě čtyř jader a příslušných buněčných přehrádek. Tato buňka vede ke vzniku vřecka. Z jediného maternálního a jediného paternálního jádra vzniká alespoň sto vřecek. Po splynutí jader (karyogamie) se diploidní zygota ihned podrobí meióze. Produkty meiózy se mitoticky dělí a vytvářejí vřecka s askospórami (**obr. 5.8**).

### 5.3.2 Epigenetické procesy u *N. crassa*

*N. crassa* je unikátním eukaryotem, který v genomu obvykle nemá téměř žádné repetitivní sekvence DNA či aktivní transpozony. Je to způsobeno kontrolním obranným epigenetickým mechanismem, který je založen na srovnávání homologií genomu (RIP). Kromě RIP má *N. crassa* ještě další dva epigenetické supresivní mechanismy - quelling a MSUD.

#### 5.3.2.1 Repeticemi indukované bodové mutace, RIP

*N. crassa* je prvním nižším eukaryotickým modelem, který má vyvinut mechanismus metylace cytozinu. DNA metyltransferázy tu mají výraznou homologii s jinými eukaryotickými modely, které mají systém metylace cytozinu - s rostlinami a savci. Zatímco u rostlin a savců má demethylace letální důsledky, u *N. crassa* je slučitelná se životem, což umožňuje genetickou analýzu mutací. Analýza vnesených transgenů ukázala, že k metylacím dochází *de novo* jak v symetrických sekvencích CpG, tak i trinukleotidech CpNpG. Studium přirozených či vnesených duplikací DNA bylo zjištěno, že v haploidních jádrech dvoujaderných buněk po fertilizaci dochází k tranzičním bodovým mutacím - G/C na A/T. V jediné pohlavní generaci tak asi 30 % G/C párů v duplikovaných sekvencích DNA může být zmutováno. Bylo zjištěno, že tato bodová mutace je následkem enzymatické deaminace 5-metylcytozinu. Primárně je tedy v heterokaryonu rozpoznána duplikace určitého úseku genomu, v průběhu karyogamie a meiózy je účinkem DNA metyltransferáz metylována, což může vést ke spontánní deaminaci 5-metylcytozinu v thymin. Tento jev se nazývá **indukce bodových mutací repeticemi DNA** (*RIP*, *repeat-induced point mutation*). RIP je omezen na sexuální fázi života *N. crassa*. Je zřejmé, že eliminace duplikovaných sekvencí DNA má zásadní vliv na evoluci genomu: neumožňuje využívat evolučního potenciálu duplikací k selekci nových forem.

Další studia prokázala, že DNA metylace v RIP systému *N. crassa* jsou závislé na modifikacích nukleozomálních histonů: aplikace inhibitoru histon deacetyláz způsobovala hypometylaci úseků DNA. Byl izolován mutant (*dim-5*), který zcela postrádá DNA metylaci. Analýzou příslušného proteinu DIM-5 byla identifikována jeho SET doména, která má histon H3 metyltransferázovou aktivitu: trimetyluje

lyzin v pozici 9. Je pravděpodobné, že tato lyzinová trimetylace je místem pro vazbu homologa heterochromatinového proteinu HP1, který spouští DNA metyltransferázovou aktivitu.

### 5.3.2.2 Potlačování genové exprese, quelling

Genetické transformace *N. crassa* ukázaly, že u velké části transformantů dochází k umlčování transgenů nebo endogenních sekvencí homologních k transgenům. Tento jev byl nazván **umlčováním** (*quelling*) a je analogický s kosupresí (*posttranscriptional gene silencing, PTGS*) transgenů u rostlin. Umlčování je u *N. crassa* monitorováno reportérovými geny *albino*, které kódují enzymy potřebné k biosyntéze karotenoidů, takže exprese takového transgenů se projeví barvou vláken plísňe. K tomuto procesu dochází výhradně během vegetativního vývoje (haploidní vlákna) a projevuje se nejen v transformovaných jádrech mycelia, ale je i neznámým způsobem vyjádřeno v jádrech netransformovaných. Struktura vláken je totiž taková, že umožňuje migraci jader, přehrádky mezi buňkami jsou neúplné. Bylo například prokázáno, že transformované jádro může umlčovat homologní sekvence v sousedních jádrech. Byly analyzovány geny odpovědné za umlčování a bylo zjištěno, že jde o **složky RNAi** systému popsaného u jiných druhů (například RNA-dependentní RNA polymeráza, Argonaut či Dicer). Transformující DNA zřejmě vytváří aberantní transkripty, které spouštějí mašinérii RNAi a degradují homologní molekuly mRNA. Umlčování transgenů v tomto případě nesouvisí ani s metylací DNA, ani s modifikacemi histonů.

### 5.3.2.3 Meiotické umlčování nepárované DNA, MSUD

Dalším epigenetickým umlčovacím systémem *N. crassa* je meiotické umlčování nepárované DNA (MSUD; *meiotic silencing of unpaired DNA*). Experimentálně bylo prokázáno, že deleční mutace genu *Asm-1* (odpovídajícího za zrání askospor) má funkčně dominantní charakter. Další analýzy vedly k závěru, že sekvence DNA postrádající v meiotické profázi párovacího partnera způsobují meiotické umlčování identických nebo podobných sekvencí. Výsledky naznačují, že MSUD souvisí s umlčováním typu quelling a je zprostředkováno komponentami RNAi, jako jsou proteiny Argonaut, Dicer a RNA-dependentní RNA polymeráza.

## 6 MODELY STUDIA BEZOBRATLÝCH ŽIVOČICHŮ

Nejlépe prostudovanými modely vývojové genetiky a epigenetiky jsou bezesporu hlístice *Caenorhabditis elegans* a moucha octomilka *Drosophila melanogaster*. Tyto modely vynikají svým malým genomem i malými rozměry svého těla, krátkým životním cyklem i minimálními nároky na kultivaci. Zejména dobře je rozpracována jejich embryogeneze a molekulární mechanizmy pohlavní determinace. Pokud se týká mechanismů jejich epigenetických procesů jde zejména o **modifikace histonů** a **RNA interferenci**; dosud nebyla průkazně demonstrována přítomnost či úloha metylací DNA. Oba tyto modelové organizmy mají vyvinutu kompenzaci dávky genů vázaných na chromozom X, ale v detailu jsou tyto mechanismy odlišné. Zatímco u hlístice dochází k částečnému utlumení funkce dvou chromozomů X u hermafroditů konstituce XX, u drozofily nastává zvýšení transkripce jediného chromozomu X u samečků XY.

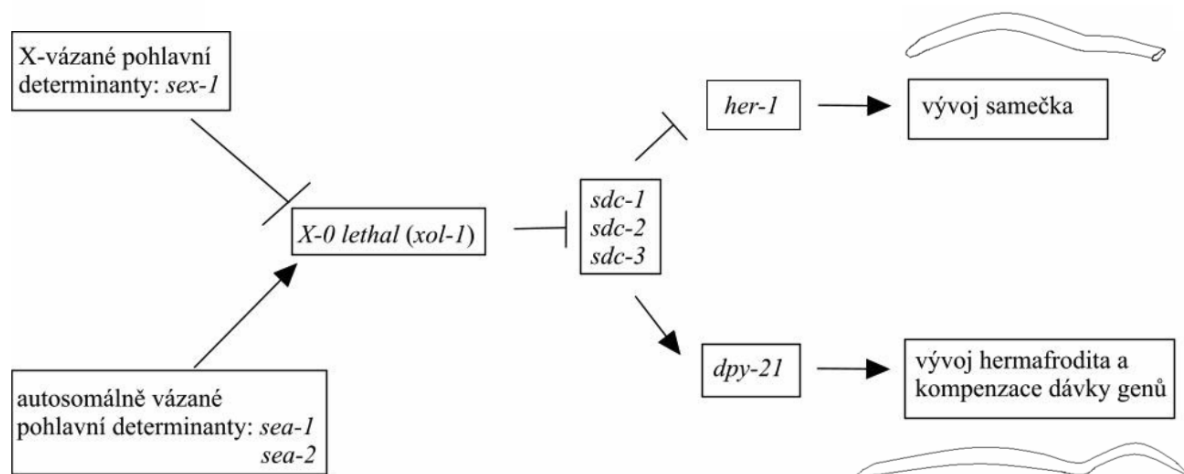
### 6.1 Hlístice, *Caenorhabditis elegans*

Hlístice *C. elegans* byla uvedena mezi modely vývojové biologie teprve před 20 lety, ihned však zaujala některými svými mimořádnými vlastnostmi. Je to velmi jednoduchý organizmus s malým počtem buněk, který se vyvíjí **mozaikovým typem**: jde o invariantní vývin, kdy všichni jedinci daného pohlaví (samčího nebo hermafroditního) se vyvíjejí synchronně v prostoru a čase, což má za výsledek i stejný počet buněk. Hlístice má tělo dlouhé jen asi 1 mm, kultivuje se v Petriho miskách a je dokonce možné jedince skladovat zmrazováním. Zárůdečná linie se zakládá vždy z posteriorní buněčné linie.

#### 6.1.1 Determinace pohlaví

Základním pohlavním typem hlístice je **hermafrodit** se dvěma chromozomy X. Příležitostně díky non-dizjunkci chromozomu X v meióze vznikají gamety bez chromozomu X, které po oplození se standardní gametou X dávají vznik samečkům X0. Hermafrodité mají dvouramennou gonádu, která zprvu tvoří spermie a poté vajíčka. Samečci mají jednoramennou gonádu, která stále produkuje jen spermie. Pohlaví hlístice je v zásadě určováno poměrem počtu chromozomů X a sad autozomů, jako je tomu například i u drozofily. Na chromozomu X je malá oblast několika **numerátorových genů** (*XSE*; *X signal elements*) a na autozomech byl dosud identifikován jeden **denominátorový gen** (*ASE*; *autosomal signal element*). X-vázané a autozomálně kódované faktory spolu vytvářejí primární molekulární signál, který řídí další procesy vedoucí k pohlavní diferenciaci. Poměr X : A (tj. X0 : AA) = 0,5 vede k aktivitě prvního známého genu *xol-1*; tento gen je pro samečky nezbytný a jeho mutace způsobuje letalitu: proto se nazývá **X0-lethal**. Dráha vedoucí k pohlavní diferenciaci zahrnuje signální kaskádu minimálně 6 genů: aktivita genu *xol-1* u samečka vede k supresi genů *sdc-1*, *sdc-2* a *sdc-3*, které jsou klíčovými spouštěči jak pohlavní determinace, tak i kompenzace dávky X-vázaných genů. Tyto geny *sdc* tedy fungují jen u hermafrodita a spouštějí u něj **dávkovou kompenzaci**, která je realizována jako částečné potlačení exprese genů nesených na obou chromozomech X. Dalšími geny pohlavní dráhy jsou pak *hermaphrodite-1* (*her-1*), *transformer-2* (*tra-2*), geny nutné k vývoji samečka *fem-1*, *fem-2* a *fem-3* (jejich mutace vedou k feminizaci samečka) a konečně *transformer-1*, jehož aktivita vede k vývinu hermafrodita, zatímco suprese vede ke tvorbě těla samečka (**obr. 6.1**). Vysoká hladina genového produktu *sdc-2* v jedincích XX umožňuje tvorbu oboupohlavních orgánů a v somatických buněčných liniích dochází k aktivaci kondenzinových komplexů (*DCC*; *dosage compensation complex*) snižujících expresi obou chromozomů

X asi na polovinu. V jedincích X0 naopak nízká hladina genového produktu *sdc-2* potlačuje tvorbu samičích pohlavních orgánů a nedochází k aktivaci mechanismu dávkové kompenzace X-vázaných genů.



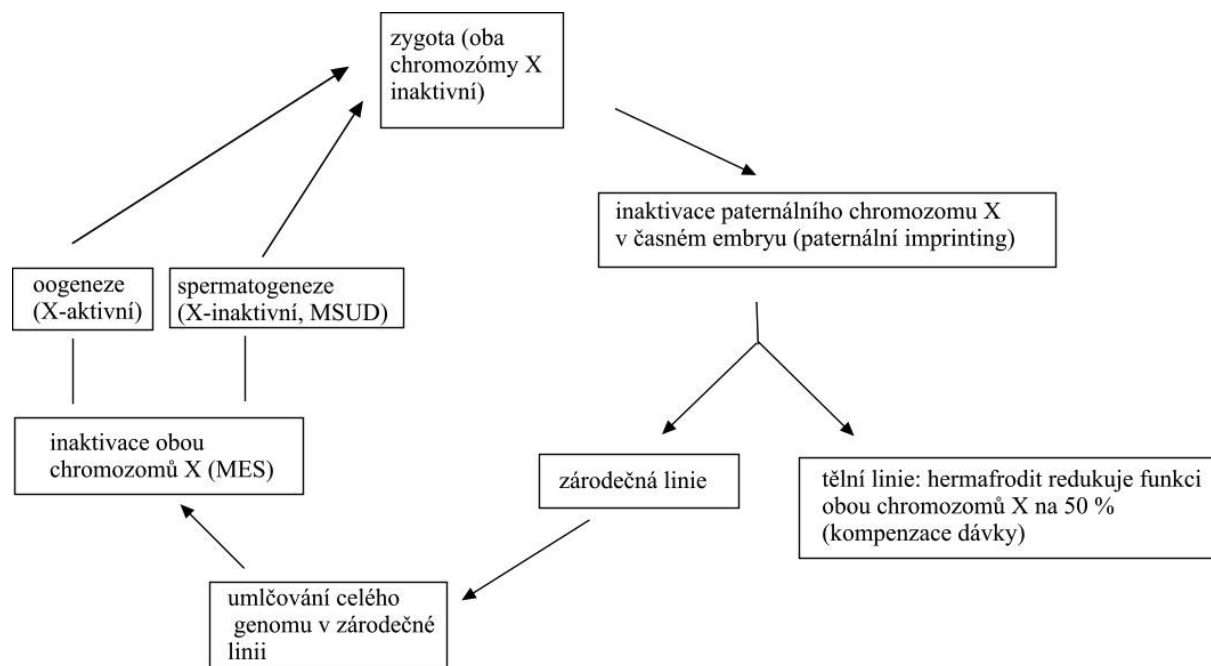
**Obr. 6.1** Geny řídící vývojovou kaskádu pohlavní diference a kompenzace dávky X-vázaných genů u *Caenorhabditis elegans*. Základní rozhodnutí spočívá jako u drozofily na poměru počtu chromozomů X a sad autozomů. Při poměru XX/AA není funkční gen *X-0 lethal (xol-1)*, což vede k aktivitě skupiny genů *sdc*, které spouštějí jak vývoj hermafroditního fenotypu, tak i systém kompenzace dávky X-vázaných genů. Při poměru X0/AA je gen *xol-1* aktivní, čímž nedojde k nastartování mechanismu dávkové kompenzace a v pohlavní kaskádě se aktivují mj. geny *her-1* a *fem*, což vede k vývoji samečka (podle Snustada a Simmonse, 2009).

### 6.1.2 Kompenzace dávky genů

Pokud by nedocházelo ke kompenzaci dávky X-kódovaných produktů, mohlo by to vést k postižení nebo letalitě jednoho z pohlaví. Dávková kompenzace v somatických tkáních hlístice se odehrává výhradně v hermafroditech XX, zatímco umlčování chromozomů X v zárodečné linii nastává jak v samečcích X0, tak i v hermafroditech XX. Kromě toho v časném embryu hermafrodita (ve stádiu 2 až 24 buněk) dochází ke specifickému umlčování paternálního chromozomu X (**paternální imprinting**). Aktivita chromozomů X je tedy regulována v různých vývojových stádiích a v různých tkáních odlišnými mechanismy (**obr. 6.2**).

Proces kompenzace dávky genů začíná v embryu, které v té době čítá asi 30 buněk, poté, co se oddělila zárodečná a somatická linie. **Kondenzinový komplex DCC** vznikající v hermafroditech a redukující expresi obou chromozomů X je tvořen asi 10 proteiny: již zmíněnými produkty genů *sdc-1*, *sdc-2* a *sdc-3* (které patří mezi sex-determinující geny a spouštěče dávkové kompenzace; *sex dosage compensation*), několika produkty genů *Dumpy* (mutace těchto genů vede k zavalitému tvaru těla; *Dpy-21*, *Dpy-26*, *Dpy-27*, *Dpy-28* a *Dpy-30*; jde o kondenzinové podjednotky) a protein kódovaný genem *Mix-1* (*mitosis and X-associated*; další podjednotka kondenzinu). Některé části DCC komplexu (*Dpy* a *Mix-1*) jsou podobné 13S-kondenzinovému komplexu dříve popsanému u žáby drápatky. Kondenzinový komplex je vysoce konzervativní u všech eukaryot a odpovídá za kondenzaci chromozomů a jejich segregaci v průběhu mitózy i meiózy. Je pravděpodobné, že komplex DCC se vyvinul z původního kondenzinového komplexu za účelem částečného potlačení exprese X-vázaných genů. Většina proteinů komplexu

DCC je poskytována maternálně prostřednictvím oocyty do embryí obou pohlavních typů. Klíčovým regulátorem komplexu je však protein Sdc-2, který se vytváří jen v hermafroditních jedincích XX.



**Obr. 6.2** Aktivita chromozomů X u hermafrodita *C. elegans* je regulována v různých vývojových stádiích a v různých tkáňích odlišnými mechanizmy. V časném embryu dochází k inaktivaci paternálního chromozomu X (paternální imprinting). Po diferenciaci zárodečné linie dochází v somatické linii k částečnému potlačení exprese obou chromozomů X (kompenzace dávky genů). V zárodečné linii pak dochází k inaktivaci obou chromozomů X prostřednictvím proteinů MES (podle Allise et al. 2007).

Šíření komplexu DCC po chromozomech X a jejich částech je zřejmě iniciováno na krátkých úsecích specifických sekvencí DNA, souvisí s lokálními modifikacemi chromatinu, ale zřejmě v něm nehrají roli nekódující molekuly RNA, jak je tomu u savců a drozofily. Zatímco u drozofily je hyperaktivace jediného chromozomu X u sameček spojena s rozsáhlými modifikacemi histonů, u hlístice nebyly zjištěny průkazné rozdíly v histonech X chromozomů a autozomů v buňkách hermafrodita. Funkce komplexu DCC vyplývá z jeho podobnosti s kondenzinovým komplexem: jde o **kondenzaci chromatinu**, která může způsobovat omezený přístup RNA polymerázy a transkripčních faktorů do promotorových oblastí. Komplex DCC nepůsobí jen na chromozomy X, ale také na autozomální lokus *her-1* v somatických buňkách hermafrodita a způsobuje asi 20-násobné potlačení jeho exprese (zatímco v případě chromozomů X jde jen o poloviční potlačení exprese). Represe genu *her-1* tak zajišťuje hermafroditní typ vývoje; je to jediný autozomální lokus, který je funkcí DCC zasažen.

### 6.1.3 Potlačování funkce chromozomu X v zárodečné linii

Zárodečné buňky v gonádě proliferují v distální oblasti, vstupují do meiózy ve střední části gonády a v její proximální oblasti dokončují gametogenezi. U hermafroditů začínají obě ramena gonády tvořit spermie v pozdějších larválních stádiích a v dospělosti přecházejí na tvorbu oocytů. V zárodečné linii je chromozom X umlčován jak v případě hermafroditů XX, tak i u sameček XO. Toto umlčování

je provázeno modifikací histonů, především metylací lyzinu v pozici 27 histonu H3. Immunoanalýzy ukázaly, že chromozomy X v zárodečné linii jsou rozsáhle deacetylovány a chybí také metylace lyzinu v pozici 4 histonu H3, což jsou signály aktivního chromatinu.

Genetické analýzy ukázaly, že za inaktivaci obou chromozomů X v zárodečné linii u hermafrodita je odpovědnou asi deset **proteinů rodiny MES**, jejichž mutace způsobují sterilitu (MES; *maternal-effect sterile mutants*). Poslední výzkumy ukazují, že umlčovací funkce MES proteinů je regulována prostřednictvím řady histonových modifikací, ke kterým dochází na chromozomech X v zárodečných buňkách. Tři z těchto MES proteinů jsou příbuzné Polycomb proteinům, které byly popsány u drozofily, savců a rostlin. Tyto proteiny zprostředkovávají metylaci lyzinu v pozici 27, což je jasným signálem inaktivace chromatinu. Fenotyp *mes* je příkladem epigenetického procesu, který je svázán s modifikacemi histonů. Jde o gen s maternálním účinkem, který jako takový nemá vliv na první generaci homozygota, projevuje se však v následující generaci. V této generaci embrya *mes/mes* nejsou schopna vytvářet protein MES a buňky zárodečné dráhy degenerují.

Jediný chromozom X v zárodečné linii sameček je v průběhu pachytene meiotické profáze hyperkondenzován, čímž vytváří kulovité tělísko podobné tělísku XY tvořenému v průběhu meiózy u savců. Kromě předčasné kondenzace jediný chromozom X u samečka jeví dimetylací lyzinu 9 histonu H3. Tento proces se nazývá **meiotické umlčování nepárované DNA** (MSUD; *meiotic silencing of unpaired DNA*). Tento proces není pro hlístici unikátní, neboť se v průběhu meiózy vyskytuje i u plísně *Neurospora crassa* a myši. Mechanismy tohoto umlčování jsou ale u různých modelů různé. Meiotické umlčování u *N. crassa* vyžaduje aktivitu proteinů zahrnutých v RNA interferenci, u myši je nezpárovaná oblast obohacena o dimetylací lyzinu 9 histonu H3. U *C. elegans* je dimetylace lyzinu 9 histonu H3 provázena aktivitou RNA-dependentní RNA polymerázy. Díky procesu MSUD, který inaktivuje nepárovaný chromozom X u sameček X0, což nenastává u hermafrodita XX, dochází k odlišné epigenetické informaci ve spermiích samečka a hermafrodita.

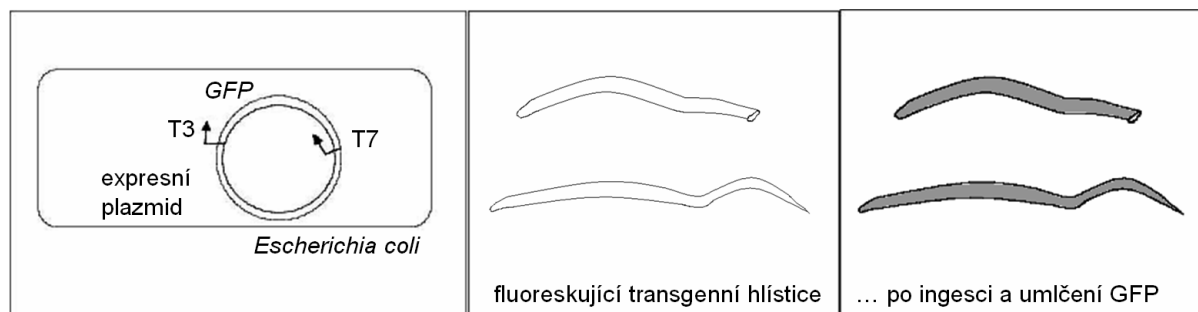
Zatímco chromozom X zůstává ve spermiích inaktivní, v oocytech se X aktivuje. Zygota tedy získává dva epigeneticky odlišné genomy, zvláště s ohledem na transkripční aktivity chromozomů X. Po vstupu spermie do oocyty dochází ve spermatickém jádře k rozsáhlým histonovým modifikacím, které vedou k dekonenzaci. Avšak nepřítomnost specifické modifikace histonu H3, která je udržována po řadu buněčných dělení, vede ke tvorbě epigenetického záznamu na chromozomu X původem ze spermie: tento chromozom je **imprintován** a následně v časném embryu umlčen. K imprintingu celého genomu však u *C. elegans* nedochází, protože uniparentální dizomie kteréhokoli z autozomů nemá žádný vliv na životnost. Tento paternální imprinting chromozomu X je však postupně vymazán, modifikace histonů se tak dostanou na úroveň autozomů. Ve stádiu 24 buněk se transkripční aktivita obou chromozomů X a autozomů postupně vyrovnává. Ve stádiu asi 30 buněk však dochází v somatické linii hermafrodita XX k částečnému potlačení exprese obou chromozomů X vazbou kondenzinového komplexu DCC.

#### 6.1.4 RNA interference

RNA interference (RNAi) byla ještě před svým objevem široce používána jako technologie posttranskripčního umlčování genů prostřednictvím aplikace protismyslové RNA. Detailní analýzou těchto experimentů se však zjistilo, že nezbytným intermediátem tohoto umlčování je **dvouvláknová RNA** a jev byl nazván RNA interferencí. Dále bylo zjištěno, že účinek RNAi u hlístice je systemický (informace se šíří od zasažených buněk po celém organismu) a dědičný. Brzy byla nalezena podobnost i s pří-



buznými jevy u jiných eukaryot, jako jsou například posttranskripční umlčování genů u rostlin a hub. Jev RNAi je dědičný zřejmě pouze u hlístice, u jiných organismů nebyl jeho přenos do další pohlavní generace dosud prokázán. Prvotní studie RNAi byly realizovány injekcí dsRNA do gonády nebo tělní dutiny. Posléze byly vypracovány ještě snadnější postupy, kdy dsRNA je podávána v bakteriální potravě (technika zvaná *ingesce*, **obr. 6.3**) nebo je hlístice jednoduše ponořena do roztoku obsahujícího dsRNA. Tyto přístupy umožnily skrínování funkce celých cDNA knihoven i izolaci mutantů, které mají mutaci v RNA-interferenčním mechanismu.



**Obr. 6.3** Zjednodušená metoda aplikace dsRNA k umlčování genů u hlístice. Příslušný gen (zde *GFP*), který má být v hlístici umlčen, je naklonován do plazmidu bakterie *Escherichia coli* pod dva promotory (zde T3 a T7) tak, aby byla prepisována obě vlákna DNA (vlevo). Bakteriální transkripty se pak kombinují v dsRNA. Bakterie je hlístici podávána jako potrava a její nedokonalá trávicí soustava umožňuje vstup dsRNA do tělní dutiny a její šíření v těle. Dvouvláknové molekuly RNA jsou pak zpracovávány proteinovým komplexem Dicer a prostřednictvím komplexu RISC štěpí homologní mRNA (v tomto případě mRNA genu *GFP*). Jde o posttranskripční umlčování genu, které se projeví ztrátou zelené fluorescence při UV ozáření (vpravo).

První mutace v RNAi dráze byla nazvána *rde* (***RNAi deficient***). Prvními identifikovanými fenotypy mutantů *rde* byly mutátorové geny, které mají za úkol umlčování transpozonů v zárodečné dráze. Takové mutanty se projevily mobilizací transpozonů, které se translokovaly do různých genů a způsobovaly zvýšenou frekvenci mutací. Detailní analýzy prokázaly, že významným intermediátem mechanismu RNAi jsou **krátké RNA** (*short interfering RNA*, *siRNA*), které zřejmě představují i dědičný faktor RNAi u hlístice. RNAi dráha tedy zahrnuje dvoustupňový proces, který představuje tvorbu krátkých RNA molekul z dlouhých dsRNA a jejich vazbu na cílové molekuly mRNA. Prvním krokem je tedy tvorba krátkých RNA prostřednictvím komplexů proteinu **Dicer** (*Dcr-1*) a dalších proteinů (PAZ-PIWI, Rde-1, Rde-4 a Drh-1). Dicer je ribonukleáza typu III, která je odpovědná za štípání dlouhých dsRNA na krátké molekuly. Druhý krok RNAi dráhy zahrnuje opět proteinové komplexy s hlavní rolí **RNA-indukovaného umlčovacího komplexu** (RISC; *RNA-induced silencing complex*), které zahrnují zejména proteiny typu VIG a Tudor; Tudor je zřejmě exonukleázou fungující v cytoplazmě a štěpící cílové mRNA molekuly. Pro aktivitu RNAi jsou nezbytné i **RNA-dependentní RNA polymerázy** (RdRP). Tyto zřejmě využívají malých RNA tvořených komplexem Dicer jako primery k vytvoření druhého vlákna s použitím mRNA jako templátu. Výsledkem tohoto procesu je amplifikace dsRNA, která se opět stává substrátem pro Dicer.

Původně byly injekce dsRNA směřovány do gonád hlístice, aby se zjistila případná dědičnost umlčování. Posléze se však zjistilo, že i injekce dsRNA do tělní dutiny nebo střeva způsobuje **dědičnou RNA interferenci**. Umlčovací signál se pak šíří tělem hlístice včetně gonád. Umlčování tedy pokračuje do další pohlavní generace, dále už obvykle nefunguje. Výjimkou jsou jen případy, že je zasažen gen exprimovaný v zárodečné dráze. Protože cílová mRNA je i podmínkou k amplifikačnímu kroku RNAi

mašinérie, akumuluje se siRNA právě ve tkáních, kde jsou tyto geny exprimovány. Z tohoto důvodu také dochází k dlouhodobější dědičnosti inaktivace genů, které jsou exprimovány v gonádách. Podobně platí, že injekce siRNA do gonád je účinná, pokud tu jsou cílené geny exprimované. Pokud mají být umlčovány geny exprimované v jiných tkáních, má injekce do gonád jen minimální efekt. Dokonce u hermafrodita, který má dvě izolované gonády (samčí a samičí) způsobuje injekce dsRNA blokující embryonální vývoj jen do jedné gonády úmrtnost jen 50 % embryí. Znamená to tedy, že siRNA není schopna účinného transportu mezi gonádami. Dosud zůstává otázkou, které molekuly dvouvláknové RNA – dlouhé či krátké – jsou odpovědné za šíření RNAi tkáněmi. Mutanty, které mají defekt v šíření umlčujícího signálu jsou označovány jako *sid* (*systemic RNAi defective*) nebo *rsd* (*RNAi spreading defective*). Byl například izolován gen *sid-1/rsd-8*, který kóduje transmembránový protein, je exprimován v buňkách s vnějším kontaktem a zajišťuje pohlcování dsRNA z prostředí buňkami hlístice. Novější výsledky naznačují, že podobně jako u rostlin je systemické šíření RNAi zřejmě mechanismem anti-virové ochrany.

Nejčastěji používanou technikou transgenózy u hlístice je injekce klonované DNA, jež spontánně vytváří **repetitivní struktury**, které se dědí jako extrachromozomální elementy. Opakující se elementy bývají často předmětem umlčování, což je svázáno i s funkcí proteinů Polycomb a heterochromatinovým proteinem HP1 a di- a trimetylací lyzinu 9 histonu H3. V umlčování repetitivních struktur také hrají roli siRNA vytvářené z obousměrně transkribovaných sekvencí. Tyto siRNA nastavují potlačování exprese repetitivních struktur v zárodečné dráze; další udržování stavu je závislé zřejmě jen na struktuře chromatinu. Také přirozeně se vyskytující repetitivní elementy hlístice včetně transpozónů jsou funkčně umlčovány dráhou RNAi.

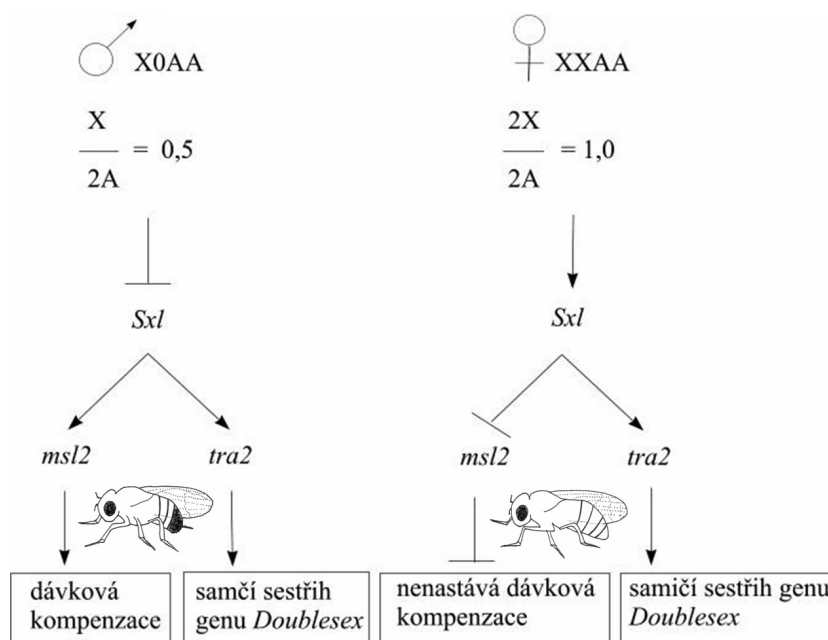
**MikroRNA (miRNA)** jsou krátké endogenní RNA, které regulují funkci jiných genů. Podobně jako siRNA jsou tvořeny štěpením enzymatickým komplexem Dicer a fungují prostřednictvím rodiny proteinů Argonaut. MikroRNA se vytvářejí na bázi vnitřní homologie vlásečkové struktury. Známým příkladem těchto miRNA je *lin-4*, která je složkou heterochronní dráhy řízení larválních stádií u hlístice. Detailní studia ukázala, jak dochází k posttranskripčnímu umlčování vazbou *lin-4* miRNA na cílové místo – 3'-konec netranslatované oblasti mRNA. Tato cílová místa nejsou přesně homologní s miRNA a umlčování probíhá potlačováním translace, zatímco siRNA vazba s přesnou homologií vede ke štěpení mRNA. MikroRNA byly nalezeny u mnoha eukaryotických modelů včetně rostlin a savců a prostřednictvím bioinformatických výpočtů se zdá, že u savců asi 20 % genů je funkčně regulováno prostřednictvím miRNA.

## 6.2 Moucha octomilka, *Drosophila melanogaster*

Drozofila je jistě geneticky nejpropracovanějším modelem. Její životní cyklus trvá jen 4 dny, má podobně jako hlístice malý genom a přitom je její tělo strukturně poměrně složité, což výzkumníkům poskytuje možnost sledovat bezpočet fenotypů a znaků. I když je individuální vývoj drozofily dosti specifický (zahrnuje například mnohojaderné stádium syncytia či stádium kukly se zárodečnými terčíky), je dokonale zmapován a je známo několik stovek genů, které embryogenezi řídí. Drozofila se stala modelem studia homeotických genů, které řídí anterio-posteriorní specifikaci těla, či modelem studia genů s maternálním účinkem a paměťových proteinů Polycomb.

## 6.2.1 Determinace pohlaví

Základními pohlavními typy drozofily jsou samička (XXAA) a sameček (XYAA). Chromozom Y však hraje roli jen v samčí fertilitě, jeho přítomnost tedy není kritická pro pohlavní determinaci: ta je dána poměrem počtu chromozomů X a sad autozomů A. Dráha určující pohlaví zahrnuje u drozofily tři základní kroky: zjišťování poměru X/A v časném embryu, přenos tohoto poměru ve vývojový signál a systém, který reaguje na tento signál tvorbou buď samčích, nebo samičích struktur. Základem zjišťování poměru X/A jsou interakce mezi maternálně tvořenými proteiny, které jsou uloženy do cytoplazmy oocyty, a embryonálně syntetizovanými proteiny, které jsou kódovány několika geny vázanými na chromozom X. Z důvodu striktní dávkové závislosti mají tyto X-vázané proteiny dvakrát vyšší hladinu v embryích s konstitucí XX než v embryích XY, a tím umožňují sledování přítomných chromozomů X. Protože geny, které kódují tyto proteiny, ovlivňují čítec (numerátor) poměru X/A, nazývají se **numerátorovými elementy**. Jiné geny, které jsou lokalizovány na autozomech, ovlivňují jmenovatel (denominátor) zlomku X/A. Tyto tzv. **denominátorové elementy** kódují proteiny, které soutěží s produkty numerátorových elementů.



**Obr. 6.4** Pohlavní determinace u drozofily je primárně určována poměrem aktivity X-vázaných (numerátorových) a autozomálních (denominátorových) genů. Poměr  $XX/AA = 1$  určuje, že nastane správný samičí sestřih transkriptu genu *Sex lethal* (*Sxl*), který zabrání spuštění dávkové kompenzace a přes produkty genu *Transformer* (*Tra*) zajistí správný sestřih genu *Doublesex* (*Dsx*), který potlačuje samčí pohlaví. Poměr  $X/AA = 0,5$  vede naopak k nesprávnému sestřihu *Sxl*, což způsobuje aktivitu genu *Male sex lethal* (*Msl*) vedoucí k nastartování dávkové kompenzace a přes produkt genu *TRA2* ke specifickému sestřihu genu *Dsx*, který determinuje samčí pohlaví.

Po zjištění poměru X/A dojde k jeho převedení na signál, který řídí expresi X-vázaného genu *Sex-lethal* (*Sxl*), klíčového regulátoru determinace pohlavní dráhy (**obr. 6.4**). V časném vývoji tento signál aktivuje transkripci genu *Sxl* z  $P_E$ , což je jeho „časný“ promotor, avšak pouze v embryích XX. „Časné“ transkripty z tohoto promotoru jsou sestřihány a po translaci se vytvoří funkční protein Sex-lethal, označovaný SXL. Po několika málo cyklech dělení je transkripce z promotoru  $P_E$  nahrazena transkripcí z jiného promotoru  $P_M$ , tzv. udržovacího promotoru genu *Sxl*. Je zvláštní, že transkripce z promotoru

$P_M$  začíná také v embryích XY. Transkripty z promotoru  $P_M$  jsou řádně sestřihovány pouze za přítomnosti funkčního proteinu SXL. Proto v embryích XY, kde se tento protein nevytváří, jsou transkripty *Sxl* alternativně sestřihovány a ponechán je exon s terminačním kodonem. Po translaci těchto alternativně sestřihovaných transkriptů se vytváří pouze krátký polypeptid bez regulační funkce. Alternativní sestřih *Sxl*-transkriptů tedy nevede k tvorbě funkčního proteinu SXL, a při jeho absenci se embrya vyvíjejí jako samečci.

Protein SXL také reguluje sestřih transkriptů dalšího genu dráhy určující pohlaví, genu *transformer* (*tra*). Tyto transkripty mohou být upravovány dvěma různými cestami. U samečků XY, kde protein SXL není přítomen, sestřihový aparát vždy ponechává terminační kodon ve druhém exonu *tra* RNA. Po translaci takto sestřihované *tra* RNA se vytváří nefunkční polypeptid. U samic, kde je protein SXL přítomen, je tento předčasný stop kodon alespoň v některých transkriptech odstraněn alternativním sestřihem. Při translaci pak vzniká funkční protein *transformer* (označovaný TRA). Protein SXL tedy umožňuje syntézu funkčního proteinu TRA v embryích XX, avšak nikoli v embryích XY. Protein TRA je také regulátorem sestřihu RNA. Společně s TRA2, proteinem kódovaným genem *transformer2* (*tra2*), řídí expresi autozomálního genu *doublesex* (*dsx*), který může vytvářet alternativním sestřihem své RNA dva odlišné proteiny. V embryích XX, kde je protein TRA přítomen, jsou *dsx*-transkripty upravovány ke kódování proteinu DSX, který potlačuje geny nutné pro samčí vývoj. Taková embrya se proto vyvinou v samičky. V embryích XY, kde není protein TRA přítomen, jsou transkripty *dsx* sestřihovány ke kódování proteinu DSX, který potlačuje expresi genů nutných pro samčí vývoj: tato embrya se vyvinou jako samečci.
















Klíčovým genem, který u drozofily spouští mechanismus **kompence dávky X-vázaných genů**, je *male sex lethal* (*msl2*). Jeho název pochází z mutace tohoto genu: pokud je nefunkční, je pro samečka letální. Gen *msl2* je výhradně regulován funkčním produktem genu *sxl*. Ten u samic brání expresi *msl2*, takže v jejím těle ke kompenzaci X-vázaných genů nedochází. U samečků však *sxl* nevytváří funkční protein, takže *msl2* není inhibován a spouští dávkovou kompenzaci.

### 6.2.2 Kompence dávky X-vázaných genů

Dávková kompenzace u drozofily spočívá ve zvýšení aktivity jediného chromozomu X u samečka: je to jediný známý systém pozitivní kompenzace dávky genů. Také molekulární mechanismus dávkové kompenzace je zásadně odlišný od hlístice i od savců (**obr. 6.5**). Kompenci dávky poprvé popsal **Hermann Joseph Muller** v roce 1930, když pozoroval paradox funkce genů vázaných na chromozom X. Jednalo se o **hypomorfni gen** *white*, odpovídající za tvorbu pigmentu složeného oka. Intenzita pigmentace je přímo úměrná počtu aktivních alel: v nepřítomnosti aktivní alely je oko bílé, jedna funkční alela odpovídá světle červenému oku, dvě alely vedou ke tvorbě tmavě červeného oka. Paradox spočívá v tom, že u samečka je díky hyperaktivitě jediného chromozomu X alela *white* exprimována přibližně dvojnásobně, oko je tedy tmavě červené jako u samic se dvěma chromozomy X.

Klíčovým regulátorem kompenzace je **MSL komplex** (*male specific lethal*), který souvisí se specifickou acylací lyzinu 16 histonu H4. MSL je ribonukleoproteinový komplex složený ze dvou dlouhých nekódujících RNA (roX1 a roX2) a pěti proteinů MSL1, MSL2, MSL3, MOF a MLE. Všechny tyto protein-kódující geny jsou transkribovány v obou pohlavích, avšak translace transkriptu MSL2 je u samic blokována produktem genu *Sex lethal*. Za nepřítomnosti proteinu MSL2 je i protein MSL1 degradován. Základem kompenzačního komplexu je protein MSL1, neboť interaguje se všemi ostatními

proteiny. Přítomnost komplexu MSL na chromozomu X u samečka koreluje se specifickou **acetylací lyzinu 16 histonu H4**. Tato acetylace vede k neutralizaci pozitivního náboje a k zeslabení represivní internukleozomální struktury. Bylo zjištěno, že součástí MSL komplexu je i protein **MOF** (*males absent on the first*), který má histon acetyltransferázovou aktivitu a odpovídá za hyperacetylaci chromozomu X u samečka. Úlohou proteinů MSL1 a MSL2 je pak vazba komplexu MSL na chromatin, která je mimořádně stabilní. Zmíněné dvě nekódující RNA – roX1 a roX2 (*RNA on X*) – mají za cíl zaměřovat komplex MSL na samčí chromozom X. roX RNA jsou kódovány lokusy na chromozomu X. Je možné, že právě tyto lokusy představují homologní sekvence, na které se vážou roX RNA molekuly. Znamenalo by to tedy, že roX sekvence jsou centrem hyperaktivace chromozomu X u drozofily. Podobnou úlohu má X-inaktivační centrum u savců, u kterého však jde o umlčování chromozomu X. Důkazem tohoto modelu je experiment, kdy translokace roX lokusu na autozom vede u drozofily k přitahování a šíření vazby proteinů MSL.

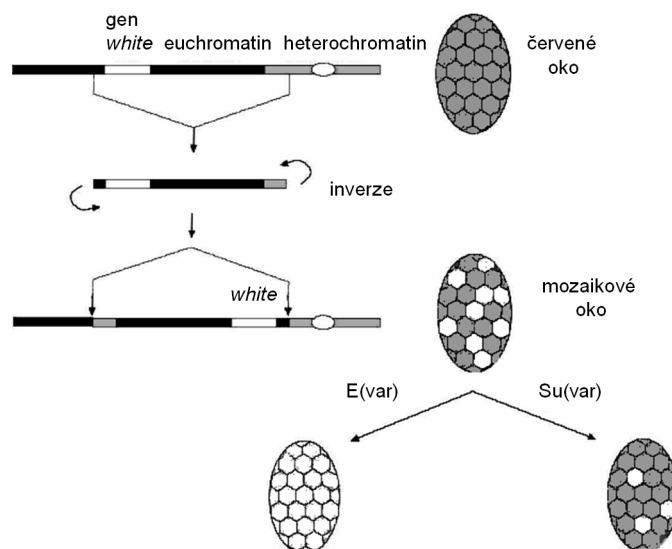
model	pohlaví	počet chromozomů X	mechanismus	transkripty	poměr
savci					
	samička	2 	inaktivace 1X		1
	sameček	1 			1
octomilka					
	samička	2 			1
	sameček	1 	hyperaktivita X		1
hlístice					
	hermafrodit	2 	redukce obou X		1
	sameček	1 			1

**Obr. 6.5** Různorodost strategií k dosažení kompenzace dávky X-vázaných genů u savců, drozofily a hlístice. *Drosophila* má pozitivní mechanismus dávkové kompenzace: jediný X chromozom u samečka je hyperaktivní. U hlístice i savců se vyvinula negativní strategie. V somatické linii hlístice dochází u hermafrodita k poklesu exprese obou chromozomů X a u savců k náhodné inaktivaci jednoho X v tělních buňkách samic. Také molekulární epigenetické mechanismy dávkové kompenzace jsou u těchto modelů odlišné.

### 6.2.3 Poziční efekt

Jednou z prvních mutací studovaných u drozofily byla mutace genu *white*, která má za následek tvorbu bílého oka. **Hermann Joseph Muller** ve 30. letech minulého století ji izoloval po aplikaci rentgenového záření: složené oko drozofily bylo tvořeno mozaikou červených a bílých facet. Takový fenotyp naznačoval, že gen *white* v podstatě narušen nebyl, neboť některé facety zůstaly standardně červené. Bylo spíše zjevné, že gen *white* byl v některých buňkách umlčen. Cytologická analýza pak prokázala, že mutantní fenotyp byl způsoben chromozomální inverzí, kdy k jednomu zlomu došlo v pericentromerickém heterochromatinu a k druhému v okolí genu *white* (**obr. 6.6**). Protože variegovaný fenotyp je způsoben změnou pozice genu uvnitř chromozomu, označuje se tento jev jako **poziční efekt** (PEV; *position-effect*

*variegation*). Podobné fenomény byly popsány i u kvasinek a savců. Jde o to, že sousedící chromatin ovlivňuje funkci genů a restrukturalizace chromozomu vedoucí k translokaci genu k heterochromatinové oblasti může způsobovat jeho umlčování. Fenotypová variabilita jako následek translokace genu *white* se může projevat v počtu pigmentovaných buněk, velikosti pigmentovaných skvrn i hladině pigmentu v buňkách oka. K umlčování vlivem sousedícího heterochromatinu dochází v embryogenezi a poté je umlčovací signál epigeneticky přenášen v somatických i zárodečných buněčných liniích.



**Obr. 6.6** Poziční efekt (PEV) u drozofily. Signální gen pro barvu oka *white* je ve své standardní pozici aktivní a odpovídá za tvorbu červeného pigmentu. Po ozáření nebo jiné indukci může nastat translokace či inverze, která gen *white* přemístí do blízkosti centromerického heterochromatinu, což může vést k částečnému umlčování genu *white* (projevující se bílým pigmentem s mozaikovým fenotypem). Další geny mohou modifikovat toto umlčování: produkty genů *Su(var)* umlčování potlačují (vede k návratu ke standardnímu červenému oku) a naopak produkty genů *E(var)* umlčování zintenzivňují (více bílé oko).

Genetická analýza prokázala řadu mutací, které poziční efekt ovlivňují: buď PEV potlačují – **supresory variegace** (*Suppressor of variegation*, Su[*var*]), fenotyp se tedy může navracet ke standardu, nebo PEV zesilují – **zesilovače variegace** (*Enhancer of variegation*, E[*var*]). Dosud bylo identifikováno několik desítek modifikátorů jevu poziční variegace. V některých případech záleží výsledný fenotyp na počtu funkčních kopií modifikátorových genů: například jediná kopie modifikátoru může způsobovat potlačení PEV, zatímco tři kopie způsobují zesílení PEV. Tato kvantifikace naznačila, že proteiny kódované těmito geny hrají roli ve struktuře a šíření heterochromatinu. PEV je ovlivněn i mnoha jinými faktory, jako třeba teplotou v době embryogeneze: zvýšená teplota vede ke ztrátě umlčování, zatímco nižší teplota způsobuje zesílení umlčování. Modifikace odhalily, že příslušné geny způsobují šíření heterochromatického umlčování. Jedním z nich je například gen *Su(var)2-5*, který kóduje protein vázaný na heterochromatin a značí se **HPI** (*heterochromatin protein 1*). Analýza proteinu Su(var)3-9 prokázala jeho klíčovou roli v heterochromatinovém umlčování: protein má SET doménu, která vykazuje metyltransferázovou aktivitu na lyzinu 9 histonu H3. Dalším markerem heterochromatinu drozofily je metylace lyzinu 27 histonu H3 zprostředkovaná histon metyltransferázou. Tyto metylace (ve skutečnosti mono-, di- a trimetylace) jsou rozhodující pro vazbu umlčovacích proteinů Polycomb.

Poziční efekt představuje změnu genové exprese, která má za následek umlčení genu sousedícího s heterochromatinem. Genetické výsledky ukázaly, že efekt není následkem ztráty nebo změny sekvence

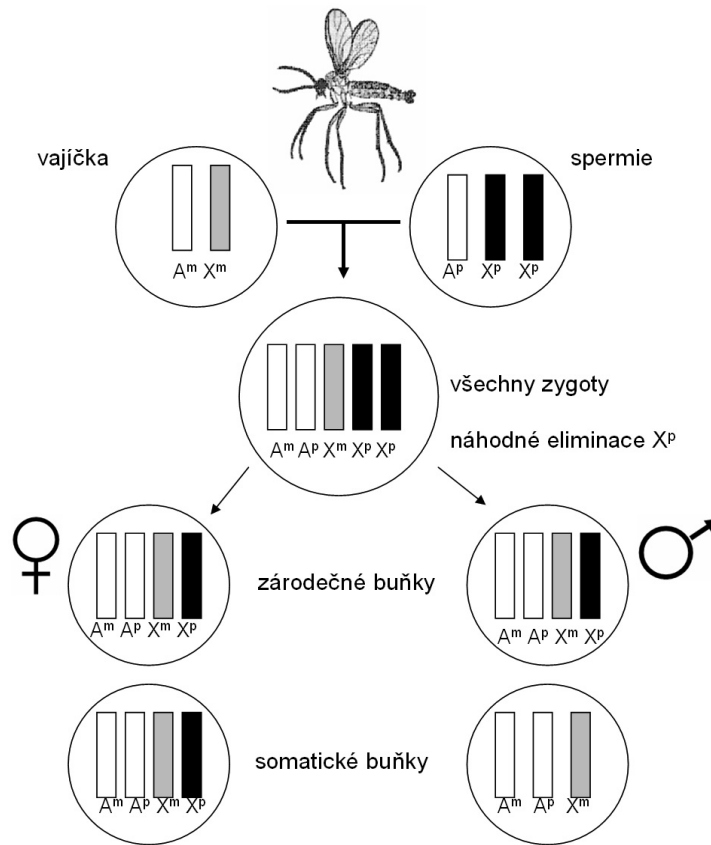
nukleotidů tohoto genu. Mechanismem je zřejmě šíření **heterochromatinizace** do euchromatinových oblastí. Takové oblasti jsou v rámci chromozomů odděleny tzv. **izolátorovými sekvencemi**, které v oblastech chromozomů vykazujících poziční efekt řádně nefungují. Typickými znaky euchromatinu drozofily je acetylace lyzinu 9 histonu H3, metylace lyzinu 4 histonu H3 a fosforylace serinu 10 histonu H3, zatímco metylace lyzinu 9 histonu H3, lyzinu 27 histonu H3 a lyzinu 20 histonu H4 jsou specifické pro heterochromatin. Heterochromatinizace euchromatických oblastí tedy vyžaduje specifické deacetylase, demetylase a defosforylace histonů euchromatinu. Prvním krokem je obvykle deacetylase lyzinu 9 histonu H3 katalyzovaná histon deacetylázou 1. Mutace *Su(var)* genů způsobují potlačování pozičního efektu a brání šíření heterochromatinu do euchromatinu.

Poziční efekt byl poprvé pozorován u drozofily jako následek translokace části chromozomu po záření X, které tyto změny čteně vyvolává. Podobné translokace s následným umlčováním dříve aktivních genů byly také pozorovány u myši a rostlin. Mnoho aspektů pozičního efektu stále zůstává neobjasněno. Patří k nim zejména **nestabilní fenotyp** a zvláštní typ mitotické dědičnosti efektu, který má často mozaikové uspořádání.

### 6.3 Parentální imprinting u hmyzu

Některé druhy hmyzu mají v liniích somatických buněk určitou nestabilitu genomu, která se často projevuje specifickým umlčováním či ztrátou paternálních chromozomů. Takový jev se vyskytuje například u červce citroníkového (*Planococcus citri*, *Homoptera*), kdy dochází k fakultativní heterochromatinizaci celého paternálního genomu (**pseudoarrhenotokie**). Tyto změny se mohou podílet i na determinaci pohlaví či u určitých pohlaví k nim dochází zákonitě. Nejlépe prozkoumaným modelem **epigeneticky podmíněné pohlavní determinace** je moucha smutnice, *Sciara coprophila*. Tuto specifickou determinaci pohlaví objevil už ve 30. letech minulého století C. W. Metz a při detailním studiu paternální eliminace chromozomu X použila americká cytoložka **Helen Crousová** poprvé termínu **imprinting**. Tímto výrazem je míněna rodičovská sex-specifická úprava genomů či spíše chromatinu, která vede k tomu, že samčí a samičí genomy nejsou zcela ekvivalentní. U hmyzu se to projevuje eliminací či umlčováním výhradně samčích chromozomů (tedy paternální imprinting). U savců se parentální imprinting vyvinul v samčí i samičí dráze (paternální i maternální imprinting) a představuje základní systém regulace růstu embrya a plodu uvnitř těla matky. Imprinting se také vyvinul u krytosemenných rostlin, avšak nikoli v embryonální dráze, ale pouze v endospermu. Jeho úkolem je také u rostlin základní regulace vývinu embrya a semena, ke kterému dochází uvnitř mateřské rostliny.

*Sciara coprophila* je monogenním druhem, kdy matky mají buď jen syny nebo dcery. Nemá chromozom Y a pohlaví jedince je určováno poměrem počtu chromozomů X a sad autozomů, jako je tomu u většiny bezobratlých živočichů. Při samčí meióze nastává **nondisjunkce pohlavních chromozomů X** a všechny spermie jsou tak stejné a aneuploidní (AXX). V prvním meiotickém dělení spermatogeneze totiž vzniká jen monopolární vřetenko, pomocí kterého jsou chromozomy maternálního původu taženy k jedinému pólu a paternální chromozomy se pohybují směrem od pólu. Paternální chromozomy tak získávají určitou značku (imprint), podle které mohou být rozpoznány v dalším vývoji. Tento **imprint** musí být reverzibilní, protože paternální chromozomy v jedné generaci se mohou stát maternálními v generaci následující. Ve druhém meiotickém dělení spermatocytů vytvoří chromozomy X dyádu a objeví se u pólu vřetenka dříve než ostatní chromozomy. Produkt meiózy bez chromozomu X zaniká a všechny výsledné spermie mají dva chromozomy X. Teoreticky by tak mohlo docházet v každé generaci k akumulaci chromozomů X, dochází však k jejich eliminaci v embryu (**obr. 6.7**).



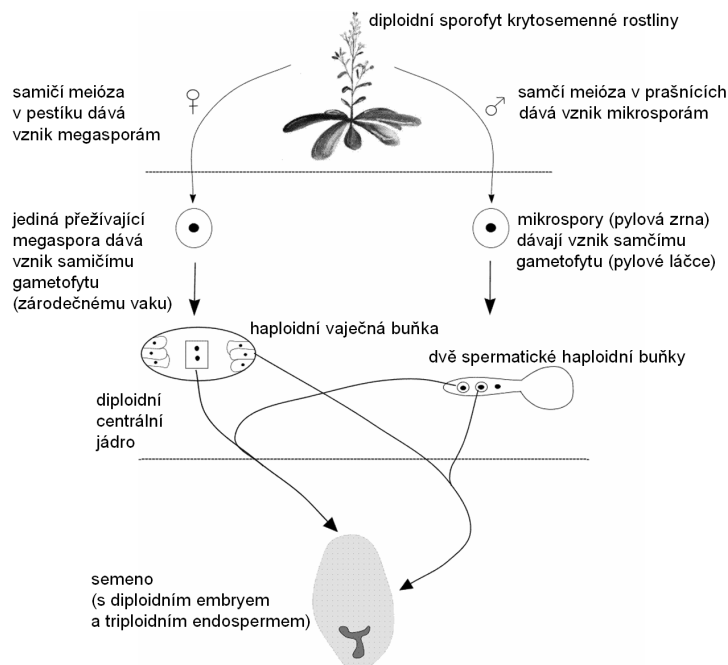
**Obr. 6.7** Epigenetická determinace pohlaví u mouchy smutnice, *Sciara coprophila*. Pohlaví je primárně určováno poměrem počtu chromozomů X a sad autozomů. Samčí meióza je však atypická a po nondisjunkci vede k dizomickým spermiiím se dvěma chromozomy X. V časném embryonálním stádiu pak dochází k eliminaci buď jednoho (samičky  $X^mX^p/A^mA^p$ ) nebo obou paternálních chromozomů X (samečci  $X^m0/A^mA^p$ ). Zárodečná linie obou pohlaví však má stejný genetický základ ( $X^mX^p/A^mA^p$ ).

Oogeneze u *S. coprophila* je standardního typu, takže všechny zygoty mají tři chromozomy X: jeden maternálního původu  $X^m$  a dva paternálního původu  $X^p$ . Při sedmém nebo osmém rýhovacím dělení blastomer je jeden chromozom  $X^p$  z tělní linie **eliminován** – tak vznikají samičky ( $X^mX^p/AA = 1,0$ ). Pokud jsou eliminovány oba paternální chromozomy X, vznikají samečci ( $X^m/AA = 0,5$ ). Později ve vývoji, když vzniká **zárodečná dráha**, dochází k eliminaci jednoho ze dvou paternálních chromozomů X, takže genetické složení obou zárodečných drah (u samečků a samiček) je diploidní a shodné ( $X^mX^pAA$ ). Předpokládá se, že kontrolním elementem, který řídí jak nondisjunkci chromozomu X v samčí meióze, tak i specifickou eliminaci v časně embryogenezi je centromerická oblast chromozomu X.



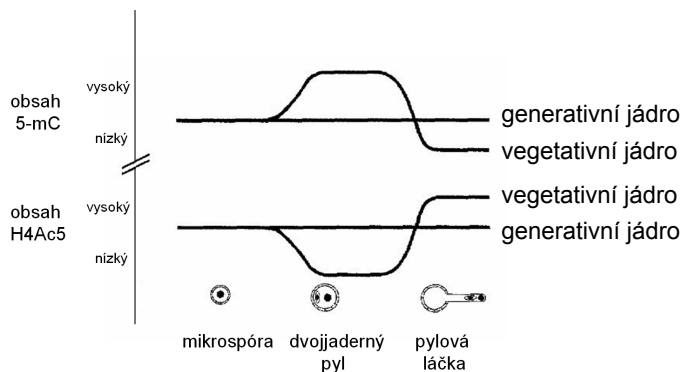
## 7 EPIGENETICKÉ PROCESY U KRYTOSEMENNÝCH ROSTLIN

Krytosemenné rostliny jsou vrcholem evoluční vývojové větve fotosyntetizujících organizmů. Vyznačují se mnoha unikátními vlastnostmi. Ve svém životním cyklu střídají **haploidní a diploidní fázi vývoje (obr. 7.1)**. Zatímco u nižších rostlin převažuje fáze haploidní, u vyšších rostlin převládá diploidní sporofyt nad haploidním gametofytem. Gametofyt je u krytosemenných rostlin odkázán na výživu sporofytem a tvoří jej obvykle jen tři (samčí mikrogametofyt) nebo osm (samičí megagametofyt) buněk. U těchto rostlin je charakteristické **dvojitě oplození**: dvě ekvivalentní spermatické buňky oplozují vaječnou buňku (tvorba diploidního embrya) a centrální jádro samičího zárodečného vaku (obvykle triploidní endosperm). Endosperm není součástí rostliny, jen po jistou dobu zajišťuje výživu embrya (popřípadě klíčící rostlinky). Je možné ho proto srovnat s placentou u savců. Charakteristickým rysem krytosemenných rostlin tedy je, že embryo se stejně jako u savců vyvíjí v těle matky, a proto se u těchto organizmů zřejmě vyvinul významný kontrolní vývojový mechanismus – genomový imprinting. Rostliny se vyznačují ztrátou lokomočního pohybu: musely si tedy vyvinout extrémní adaptační mechanismy k překonávání podmínek vnějšího životního prostředí. Zřejmě proto se u rostlin vyskytují všechny typy epigenetických mechanismů, jako jsou metylace CpG i CpNpG, genomový imprinting, modifikace histonů, RNA interference atd. Vzhledem k tomu, že rostliny nemají definovanou zárodečnou dráhu, jako je tomu u živočichů, mohou se v principu epigenetické změny ze somatických buněk dostávat do gamet a tak se dědit do další pohlavní generace. Takové stochastické změny se obvykle nazývají **epimutacemi** a u rostlin se s nimi setkáváme v širším měřítku než u živočichů, kde jim v penetraci může do značné míry bránit tzv. Weismannova bariéra. Některé epigenetické jevy, dnes popsané u různých skupin eukaryot, byly primárně popsány právě u rostlin: patří k nim paramutace (interakce alel s dědičným projevem), nukleolární dominance (umlčování jaderek v buňkách hybridů), umlčování mobilních genetických elementů, transgenů a virů, či DNA metylace zprostředkované mechanismem RNA interference.

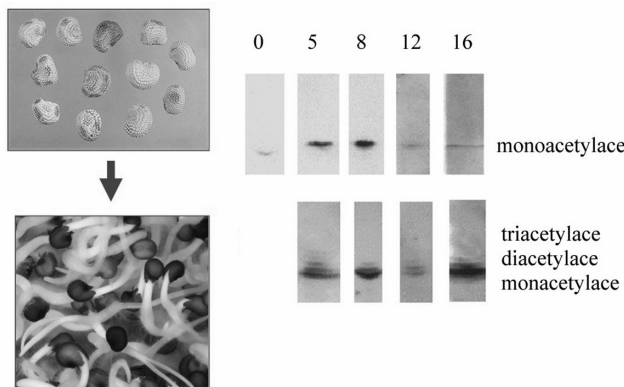


**Obr. 7.1** Životní cyklus krytosemenné rostliny. Na rozdíl od živočichů nejsou u rostlin výsledkem meiózy gamety, ale haploidní spóry: samčí mikrospóry a samičí megaspóry. Každá mikrospóra se podrobuje dvěma děleními za konečného vzniku tříjaderného mikrosporofytu (pylová láčka). Ze čtyř megaspor přežívá obvykle jen jedna, která dvěma mitózami dává vznik osmijadernému megagametofytu (samičímu zárodečnému vaku). Oplození je dvojitě: jedna spermie splývá s buňkou vaječnou a dává vznik embryu, druhá spermie oplodní diploidní centrální jádro zárodečného vaku a vzniká endosperm.

Podobně jako u savců dochází v různých buňkách a v různých fázích životního cyklu rostlin k odlišným epigenetickým tokům. Nejmarkantnější jsou změny kritické pro reprodukční cyklus – meióza, embryogeneze a přechod z klidového semene do aktivního semenáčku. Například v průběhu vývoje **samčího gametofytu** dochází k dynamickým globálním změnám ve struktuře vegetativního jádra – a to jak v četnosti metylace cytozinu, tak i v acetylacích histonu H4 – což zjevně souvisí s jeho transkripční aktivitou (**obr. 7.2**). Jádra buněk z vegetativních meristémů vykazují vyšší hodnoty metylcytozinu, což má zřejmě úlohu ochrany budoucí zárodečné dráhy. Pro demonstraci úlohy acetylací histonů i metylace DNA je možné využít přechodového stádia, kdy dormantní semeno je aktivováno ke **klíčení**. Při něm dochází k masivní tvorbě triacetylovaných lyzinů H4 z původní monoacetylované formy a k poklesu obsahu metylcytozinu (**obr. 7.3**).



**Obr. 7.2** Diagram představující dynamiku metylace DNA a acetylace nukleozomálního histonu H4 v průběhu vývinu vegetativního a generativního jádra v pylu u lilie: výsledky byly získány imunobarvením. Jak je z obrázku patrné, k podstatným změnám dochází ve fázi dvojjaderného pylu, kdy vegetativní jádro se podrobuje rozsáhlé hypermetylací DNA provázené hypoacetylací histonů H4.

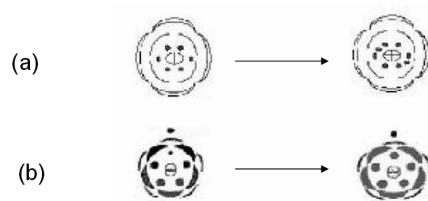


**Obr. 7.3** Dynamika acetylace histonu H4 v průběhu klíčení semen. Histony podrobené separaci v akrylamidovém gelu jsou přeneseny na membránu, která reaguje se specifickými protilátkami vůči histonu H4 acetylovanému v pozicích lyzinu 5, 8, 12 nebo 16. Značka 0 představuje reakci s protilátkou vůči neacetylovanému H4. Obrázek jasně ilustruje, že v průběhu transkripční aktivace (klíčení rostlin) dochází ke globální acetylaci histonu H4.

## 7.1 Epimutace

Rostlinné genomy jsou charakterizovány vysokým obsahem metylovaného cytozinu: zlomek  $mC/(mC + C)$  činí u některých velkých rostlinných genomů až 30 %. Sekvenční specifita též není striktní, kromě standardních palindromů CpG to mohou být cytoziny prakticky v jakékoli sekvenci nukleotidů. Nejvyšší obsah metylcytozinu se nachází v heterochromatických oblastech centromer a subtelomer. Vysoký obsah metylcytozinu koreluje s vysokým obsahem transpozonů a retroelementů. Vzhledem k tomu, že meristém rostliny představuje základ jak somatické, tak i zárodečné linie budoucího jedince, je možné si dobře představit, že epigenetická informace indukovaná v buňce meristému vlivem vnějšího prostředí se stává součástí budoucí pohlavní generace.

Historicky nejstarší zachycenou **epimutací** je zřejmě dědičná pelorická změna květní symetrie u lnice. Lnice (*Linaria vulgaris*) má zygomorfní květy, ale občas se objeví i květy aktinomorfní (**obr. 7.4b**). Tato změna bývá často dědičná. V roce 1744 takovou pelorickou formu našli žáci Carla Linnéa a od té doby je uložena v londýnském herbáři. V pelorické formě lnice našel zalíbení i Charles Darwin, který (současně s Gregorem Mendelem) prováděl i hybridizace rostlin. Po křížení normálních a pelorických forem získává v F2 generaci štěpný poměr 127 standardních : 37 pelorických rostlin, což svědčí o mendelistické segregaci. Darwin však statistickou analýzu neprováděl: pouze konstatoval, že změna je dědičná. Od počátku 20. století pak byla pelorická forma lnice považována za klasický případ genetické mutace. V 90. letech se stal jedním z modelových druhů pro studium květní biologie hledík (*Antirrhinum majus*), blízce příbuzná rostlina s lnicí (čeleď *Scrophulariaceae*). Při studiu hledíku byl izolován gen *cycloidea*, který odpovídá za květní symetrii. Enrico Coen z John Innes Institutu v Norwichi si povšiml nápadné podobnosti pelorických forem hledíku a lnice a izoloval z lnice homolog genu *cycloidea*. Sekvenační analýzou tohoto genu a jeho promotoru pak Coen zjistil, že pelorická alela je v promotoru silně metylovaná, zatímco standardní alela nikoli. Jedná se tedy o epimutaci: sekvence nukleotidů zůstává stejná, ale metylace cytozinu mění fenotypový projev genu. Příklad pelorie považovaný za klasickou genetickou mutaci je tedy zřejmě epigenetickým jevem. Existuje celá řada genů, jejichž projev je epigeneticky labilní. Může to být způsobeno i tím, že se nacházejí poblíž úseku heterochromatinu, který šíří do okolí umlčující efekt. Nejznámějším labilním genem u *Arabidopsis* je *Superman*. Je to katastrální květní gen: v kaskádě tvorby květu rozhoduje o tom, jak velké oblasti květního lůžka budou určeny pro tvorbu prašníků a pestíků. Promotor tohoto genu bývá často metylovaný: takové alely se nazývají *clark kent* a projevují se zvýšeným počtem tyčinek nebo pestíků (**obr. 7.4a**).

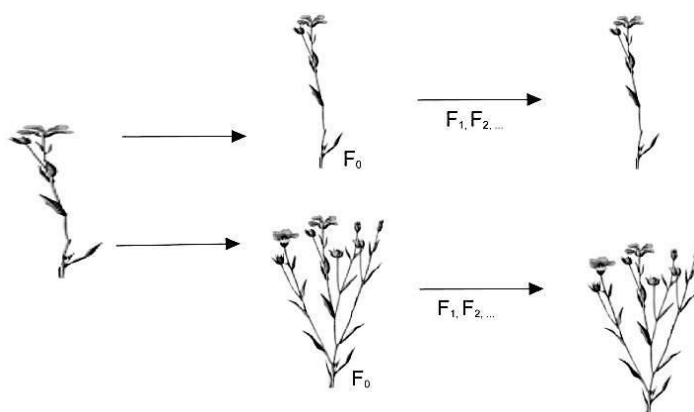


**Obr. 7.4** Epimutace u rostlin: (a) Metylace katastrálního genu *Superman* u *Arabidopsis thaliana* obvykle způsobuje tvorbu nadpočetných tyčinek. (b) Metylace promotoru genu *cycloidea* u lnice způsobuje pelorickou formu květu (změnu zrcadlově souměrného květu v paprscitě souměrný).

Klíčovým genem řídícím zrání plodů u rajčete je gen *Cnr* (*Colorless non-ripening*). Mutace tohoto genu blokuje normální proces zrání a vytváří výrazný fenotyp s bezbarvým amorfním perikarpem (se

ztrátou mezibuněčných adhezí). Molekulární analýza prokázala, že v *Cnr* genu se nachází SBP-box (*Squamosa promoter binding protein-like*). Epigenetická změna v SBP-boxu má za následek fenotyp *Cnr*: byly prokázány metylace sekvence DNA v oblasti 286 pb od počátku čtení proti směru transkripce. Dříve považovaná mutace způsobující poruchu zrání plodů je tedy epimutací.

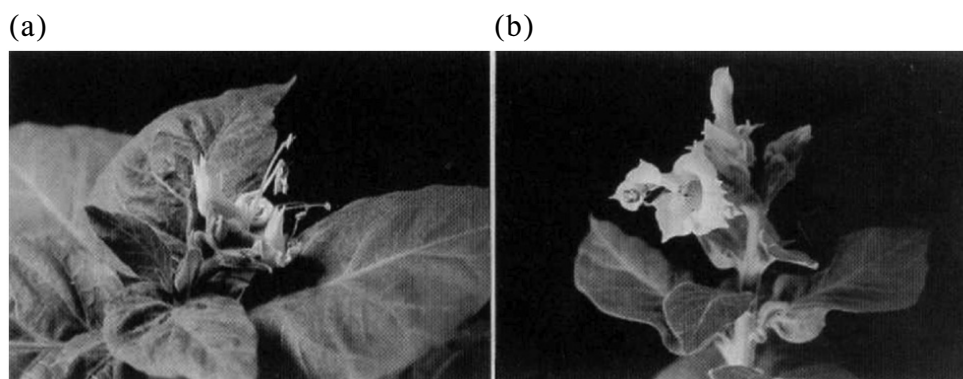
Len setý (*Linum usitatissimum*) je rostlinou s extrémní adaptační schopností. Environmentální faktory, jako jsou počasí či přístupnost živin, vedou k bezprostředním změnám ve fenotypu rostlin. Tyto změny pak mají dědičný charakter, i když jen tzv. vynívacího charakteru, tedy po pár generacích zase zanikají. Tyto fenotypové změny zvané **genotrofy** jsou provázeny rozsáhlými genomovými modifikacemi v průběhu vegetativního vývoje rostliny (**obr. 7.5**). Tyto genomové restrukturalizace, způsobené především vyšší dodávkou živin, vedou k výraznému poklesu počtu kopií ribozomálních genů a k rychlému šíření jistých inzerčních sekvencí po celém genomu. Detailně byl charakterizován jeden z takových elementů nazvaný *Linum Insertion Sequence 1* (LIS-1). Tento element má velikost 5,8 kb a nachází se ve stejné pozici ve všech liniích lnu podrobených stejnému experimentálnímu režimu. Element LIS-1 je zřejmě výsledkem restrukturalizačního programu, protože v genomu původní linie se vůbec nevyskytuje. Je možné, že tento element také představuje DNA-mechanismus, kterým je indukovaná změna fenotypu přenášena do další generace. Analýza sekvence nukleotidů prokázala přítomnost duplikace tří párů bazí v cílovém místě, což indikuje transpozici událost: element LIS-1 však nevykazuje náležitost k některé ze skupin rostlinných transpozónů. Je pravděpodobné, že element vzniká jako koordinovaná sada inzerce krátkých repetitivních sekvencí, které společně vytvářejí LIS-1.



**Obr. 7.5** Indukce genotrofů u lnu (*Linum sativum*). Různé environmentální faktory (jako jsou výživa či podnebí) mohou způsobovat vznik odlišných fenotypů rostlin. Tyto fenotypové projevy různých environmentálních faktorů bývají u lnu dědičné až po několik generací.

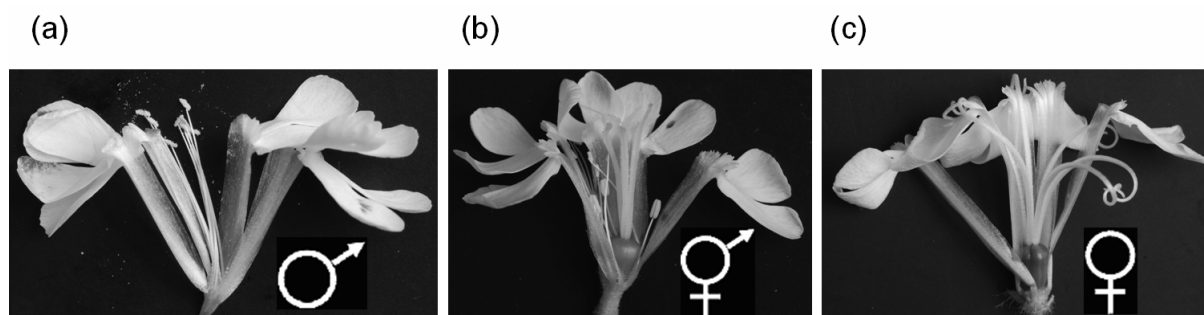
U rostlin se také vyskytuje jev zvaný **polyfenismus**: genotyp je fenotypově realizován v závislosti na podmínkách prostředí. U živočichů je nejznámějším příkladem polyfenizmu tvorba barvy pokožky housenky motýla lišaje tabákového (*Manduca sexta*). Ten má v podstatě dva možné alternativní programy: pokud se housenka vylíhne z vajíčka za nízké teploty – vytváří tmavou pokožku, pokud se vylíhne za vyšší teploty – tvoří zelenou pokožku. Je zjevné, že polyfenismus přináší housence potenciální výhodu: tmavá barva akumuluje teplo při nižší teplotě, zatímco zelená pokožka poskytuje při vyšší teplotě a ozelenění okolní přírody ochranu před predátory. Rostliny mají při ztrátě schopnosti lokomočního

pohybu velmi dobře vyvinuté adaptační mechanismy včetně polyfenických. Snad nejnázornějším příkladem je rostlina **bahnička živorodá** (*Eleocharis vivipara*) z čeledi *Cyperaceae*. Rostlina je schopna žít ve vodě i na vzduchu a zapojuje přitom odlišné biochemické dráhy, které vedou k odlišným fenotypům i metabolismu: ve vodní formě je fotosyntéza realizována drahou C3 meziproduktů, ve vzdušné formě je to typ fotosyntézy C4. Z hlediska fenotypové flexibility je jistě nejzajímavější tzv. podivný model – **kosmatec krystalový** (*Mesembryanthemum crystallinum*, řád *Caryophyllales*). Používá se zejména ke studiu abiotického stresu a odolnosti vůči salinitě. Je perspektivním rostlinným modelem i z hlediska molekulární genetiky, neboť má relativně malý genom (asi 0,4 pg DNA v haploidním jádře) a nízký počet chromozomů ( $n = 9$ ). Tato rostlina postupně vytváří – ve shodě s environmentálním prostředím nevadské pouště – minimálně šest odlišných životních forem: (1) diploidní semenáček sukulentního charakteru, (2) juvenilní formu s velkými primárními listy, (3) dospělou rostlinu s odlišným typem fotosyntézy, vysokou tolerancí vůči soli a s nastupující polyploidizací, (4) kvetoucí formu s polyploidními měchýřkovitými buňkami, (5) formu tvořící semennou generaci, vysoce odolnou vůči soli, a (6) konečnou formu sezóny – epidermální měchýřkové buňky s extrémním stupněm 256C-polyploidie. Všechny tyto formy vznikají ve specifických podmínkách počasí a představují ideální mechanismy adaptace. Je podstatné, že rostlina dokáže svůj 6-fázový vývojový program modifikovat podle aktuální změny počasí či požadavku experimentátora. Pokud například aplikujeme těžký solný stres na dospělou rostlinu, která má standardně vytvořit velké primární listy, dojde k vytvoření formy s úzkými sekundárními listy. Kosmatec krystalový tak představuje ideální model ke studiu mechanismů rezistence vůči salinitě.



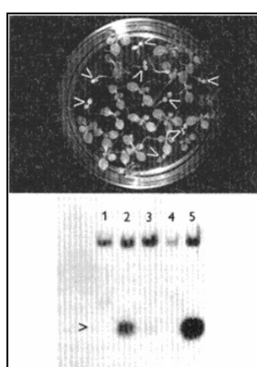
**Obr. 7.6** Fenokopie homeotických květních změn u tabáku způsobené vlivem 5-azacytidinu. (a) Aborce vnějších kruhů, koruna se vůbec nevytváří. (b) Reprodukční orgány vytvářejí petaloidní struktury (i pohlavní orgány mají částečný charakter korunních plátků). Obrázky ilustrují, že i exprese homeotických genů je určitým způsobem řízena metylací DNA.

Experimentálně lze epigenetické změny indukovat několika metodami, při nichž se obvykle inaktivují DNA metyltransferázy. Snížení stupně **metylace genomu** lze navodit aplikací analogů cytozinu, které se včleňují do DNA a nejsou metylovatelné. Patří sem zejména 5-azacytidin, který může být aplikován například do živného média a způsobuje výraznou hypometylaci. Projevy hypometylací mohou být různé, často se projevují (jako v případě genů *cycloidea* a *superman*) při tvorbě květů. Tak například u tabáku (*Nicotiana tabacum*) vede indukovaná hypometylace ke tvorbě fenokopii homeotických květních změn (**obr. 7.6**). U dvojdomé silenky (*Silene latifolia*) nastává po hypometylaci genomu dědičná pohlavní reverze ze samčího na hermafroditní pohlaví (**obr. 7.7**).



**Obr. 7.7** Experimentální hypometylace DNA vede u dvoudomé silenky širolisté *Silene latifolia* k pohlavní reverzi samčích (prašnickových) rostlin konstituce XY (a) v rostliny s hermafroditními květy (s prašníky i pestíky) (b). Tato epigenetická změna je holandricky (přes pylového rodiče) dědičná po mnoho dalších generací. Fenotyp samičích (pestíkových) rostlin konstituce XX zůstává beze změn (c).

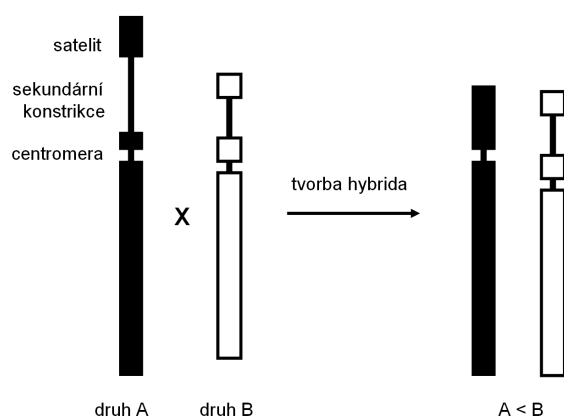
Rostlinné buňky se vyznačují **totipotencí**, tedy každá (somatická i generativní) buňka je v principu schopna dát opět vznik celé rostlině. V praxi se to realizuje prostřednictvím tzv. explantátových kultur, kdy na živných médiích – obvykle s exogenně aplikovaným auxinem a cytokininem – můžeme regenerovat rostliny z různých fragmentů orgánů, pletiv či jednotlivých buněk a protoplastů. Při detailní analýze větších populací klonovaných regenerantů se však zjistilo, že nejsou zcela shodné. Takovému jevu říkáme **somaklonální variabilita** a tato má obvykle dvě základní příčiny: genetické a epigenetické. Mezi genetické příčiny variability patří především nepravidelnosti v mitotickém dělení a následné aneuploidie či polyploidie. Za epigenetické příčiny variability mezi klony byly identifikovány zejména změny v metylačních spektrech DNA. Explantátové kultury *in vitro* obvykle představují velký stres pro kultivované buňky: patří mezi ně především heterotrofní výživa, nepřiměřeně vysoká relativní vlhkost a v neposlední řadě i aplikace chemických analogů růstových regulátorů. Protože explantátové kultury často představují i nezbytnou fázi v procesu transgenozie prostřednictvím vektorů *Agrobacterium tumefaciens*, může být exprese transgenů (resp. jeho případné umlčení) ovlivněna právě stresovými faktory *in vitro* kultur (**obr. 7.8**).



**Obr. 7.8** Expresa bakteriálního transgenů *nptII* (neomycin fosfotransferáza) v tabáku. V některých transgenních rostlinách dochází k umlčení transgenů, obvykle v důsledku metylace příslušného promotoru, takže rostlinky jsou citlivé vůči kanamycinu v médiu (nahore, označené šipkami). Dolní snímek ukazuje enzymatický test na neomycin fosfotransferázovou aktivitu. Šipka ukazuje radioaktivně značený fosforylovaný kanamycin. Vzorek číslo 1 je z kontrolní rostliny, vzorky 2 až 5 pocházejí z jednotlivých transgenních rostlin (rostliny 2 a 4 transgen exprimují, zatímco v rostlinách 3 a 4 byl transgen umlčen).

## 7.2 Nukleolární dominance

Eukaryotické genomy obsahují velký počet kopií genů, které kódují ribozomální RNA. Jejich úlohou je zajišťovat syntézu ribozomů a proteinů. Tyto rRNA geny jsou přepisovány prostřednictvím speciálního aparátu s RNA polymerázou I. V genomu vytvářejí rRNA geny obvykle několik shluků. V mnoha mezidruhových hybridních dochází k **parentálně specifické expresi rRNA genů**: rDNA geny původem z jednoho rodiče jsou normálně aktivní, zatímco rRNA geny z druhého rodiče jsou umlčeny. Aktivní rDNA vytvářejí jádérka. Tento jev byl na cytologické úrovni poprvé pozorován ruským botanikem **Michailem Navašinem** v roce 1928, který jej nazval *differential amphiplasty*: chromozomy vnesené mezidruhovou hybridizací jeví v určitých kombinacích druhů změny své morfologie. Navašin prováděl své slavné pokusy zejména na mezidruhových hybridních rodu *Crepis* (škarda, čeleď *Asteraceae*). Jeden z chromozomů (označovaný písmenem D) vykazuje v parentálních druzích satelit, tedy úsek chromozomu oddělený od hlavní části chromozomu sekundární konstrikcí. V osmi hybridních mezidruhových kombinacích z 21 analyzovaných chromozomů D vytvářel tento satelit (**obr. 7.9**). Ve zbývajících 13 hybridních chromozomů D tento satelit netvořil. Je podstatné, že k modifikaci tvaru chromozomu D v hybridních nezáleželo na směru křížení, tedy který z druhů byl maternálním či paternálním rodičem. K tomuto jevu dochází ve všech buňkách jedince, je však v podstatě reverzibilní: v generaci F<sub>2</sub> při segregaci parentálních genomů se zase satelit na chromozomu D objeví. Je tedy zřejmé, že tento jev je způsoben interakcí parentálních genomů. Podobné reverzibilní interakce byly pozorovány i v průběhu ontogeneze hybridů u brásků (*Brassica*) a žáby drápatky (*Xenopus*). Později bylo zjištěno, že tvorba satelitu je způsobena tvorbou jádérka v oblasti organizátoru jádérka (NOR, *nucleolus organizer region*), který odpovídá shluku několika stovek až tisíců rRNA genů. Výskyt sekundární konstriktce je tak způsoben transkripcí rRNA genů a strukturou jádérka, která brání v daném místě kondenzaci chromozomů. Ribozomální RNA geny přítomné v organizátoru jádérka kódují tři ze čtyř typů molekul RNA, které spolu s velkým počtem proteinů vytvářejí ribozomální podjednotky. Každý ribozomální gen nese informaci pro velký 45S transkript, který je dále upravován na molekuly 18S, 5,8S a 25S RNA. Ribozomální geny jsou uspořádány v přímých tandemových opakováních a jednotlivé kopie genů jsou odděleny mezigenovými mezerníky.



**Obr. 7.9** Cytogenetický projev nukleolární dominance u mezidruhových hybridů rodu *Crepis*. Přítomnost sekundární konstriktce naznačuje funkční jádérko. Tyto sekundární konstriktce resp. aktivní jádérka se nacházejí na chromozomech parentálních druhů A i B. Ve výsledném hybridu se však vyskytuje sekundární konstriktce jen u druhu B, neboť jádérko druhu A je umlčeno.

Molekulární podstata jadérové dominance byla objasněna u žáby drápatky. V hybridních mezi *Xenopus laevis* a *X. borealis* docházelo ke tvorbě *X. laevis* rRNA transkriptů pouze v časně embryogenezi; jadérová dominance je tedy regulací na úrovni transkripce. Byly vysloveny dvě základní hypotézy vysvětlující jadérovou dominanci. První hypotéza jev vysvětluje možnost, že transkripční faktory odpovědné za aktivitu rRNA genů jsou druhově specifické a tudíž nemusí být funkční v jiných genomech. Druhá hypotéza naznačuje existenci mechanismu, který diskriminuje rRNA geny v hybridních buňkách na bázi afinit DNA-vazebných transkripčních faktorů. Tato alternativa také vysvětluje nezávislost na maternálních či paternálních efektech. U rostlin je rozsáhlé umlčování rRNA genů dááno do souvislosti s metylací DNA řízenou siRNA a dále s úlohou specifických 5-metylcytosin vazebných proteinů.

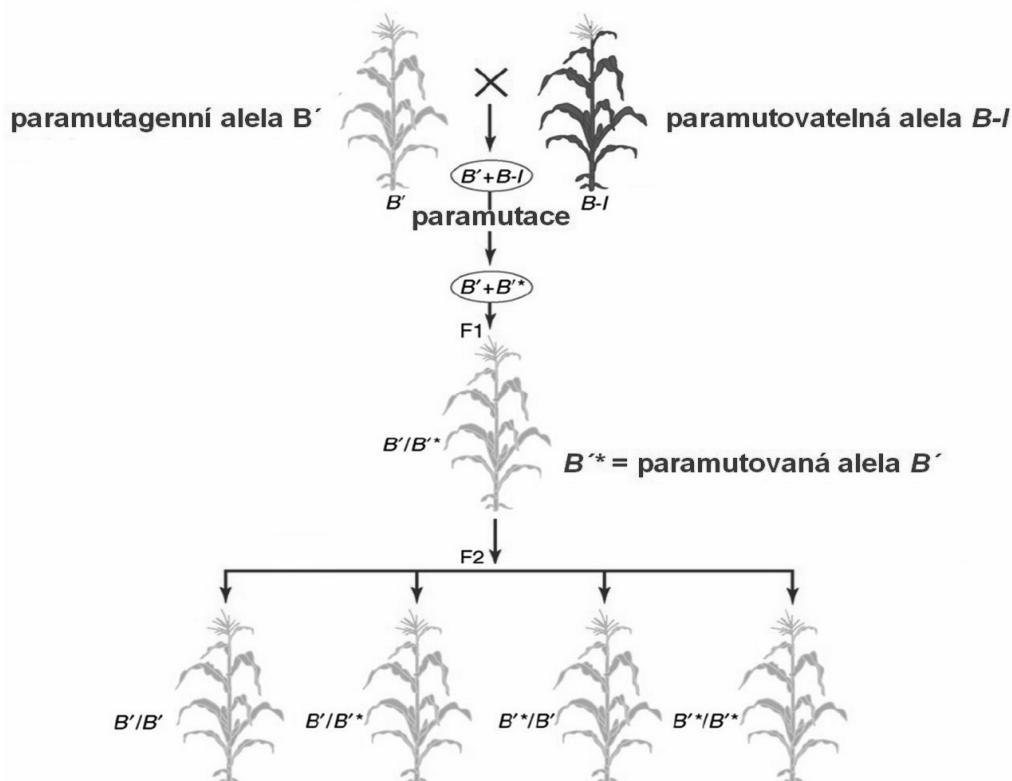
Modelovým systémem studia nukleolární dominance u rostlin jsou hybridy *Arabidopsis thaliana* a *A. arenosa*. Reciproký hybrid vzniklý (přirozeným nebo experimentálním) křížením těchto druhů se nazývá *A. suecica* a exprimuje pouze rRNA geny *A. arenosa*. Analýzou PCR bylo zjištěno, že hybridní genom obsahuje rRNA geny obou parentů, ale nebyla prokázána přítomnost rRNA z rodiče *A. thaliana*. Nukleolární dominance může být revertována chemickými inhibitory metylace DNA nebo deacetylase histonů. Tento experimentální výsledek naznačuje, že nukleolární dominance je výsledkem cíleného umlčování jedné sady rRNA genů (a nikoli selektivní aktivací druhé sady genů). Protože rRNA geny jsou organizovány ve shlucích ve formě stovek až tisíců repeticí představující miliony párů bazí, je nukleolární dominance – vedle inaktivace chromozomu X u samic savců – jedním z nejrozsáhlejších příkladů epigenetického jevu umlčování genů. Studia hybridů prokázala, že metylace DNA, acetylase histonů a metylace histonů jsou hlavními mechanismy, které řídí počet aktivních rRNA genů. Snížení metylace DNA a inhibice deacetylase histonů (v pozicích lyzinů 9 a 14 histonu H3 a lyzinů 5 a 12 histonu H4) vedou k aktivaci rRNA genů, zatímco vyšší stupeň metylace DNA a metylace lyzinu 9 histonu H3 vedou k umlčování. Aktivní geny v organizátorech jádérka *A. arenosa* jsou v hybridu dekonzenzovány, jejich DNA je hypometylována a histony se vyznačují následujícími modifikacemi lyzinů: acetylase v pozicích 5, 8, 12 a 16 histonu H4, acetylase v pozicích 9 a 14 histonu H3 a metylace v pozici 4 histonu H3. Naproti tomu umlčené organizátory jádérka původem z *A. thaliana* jsou kondenzované, mají vyšší obsah metylcytozinu a vykazují metylaci lyzinu v pozici 9 histonu H3.

### 7.3 Paramutace

Paramutace je výsledkem dědičné změny genové exprese, která nastává po interakci alel. Odporuje tak zjevně Mendelově pravidlu o nezávislé segregaci alel. Paramutace jsou dobře popsány u řady druhů rostlin. V poslední době však přicházejí informace i o paramutacích u savců. Paramutace patří k nejstarším pozorovaným epigenetickým jevům. Již v polovině minulého století americký genetik **Alexander Brink** pozoroval u kukuřice, že interakce mezi dvěma alelami mohou způsobovat mitoticky i meioticky dědičnou změnu exprese jedné ze dvou alel. Když alela *R-r*, která odpovídá za tmavě červená semena, byla přikřížena k alele *R-stippled*, kódující červeně tečkovaná semena, byla alela *R-r* dědičně změněna, takže se projevovala tvorbou slabě pigmentovaných semen (označených *R-r*'), zatímco alela *R-stippled* segregovala nezměněná. Později byly paramutace identifikovány u mnoha druhů rostlin, hub i savců. Na rozdíl od pravých mutací je jejich frekvence vyšší a naopak stabilita je nižší. Paramutace představuje typ komunikace mezi homologními sekvencemi DNA, které se nacházejí v pozici *in trans*, tedy na různých chromozomech. Paramutace nezpůsobují změny sekvence DNA, nýbrž jde o změny metylace DNA a struktury chromatinu, tedy změny epigenetické. Paramutace představují interakce alel: ta, která změnu indukuje, se nazývá **paramutagenní**, a alela, která se paramutací podrobuje, se



nazývá **paramutovatelná** (obr. 7.10). Paramutagenní alela tedy vyvolává změnu a předává jí svůj expresní stav, zatímco paramutovatelná alela se podrobuje epigenetické změně. Již paramutované alely mohou vykazovat sekundární paramutace: tedy vyvolávat paramutace dalších „naivních“ paramutovatelných alel. Často se k monitorování paramutačního jevu používají rostlinné pigmenty, protože jejich pozorování je snadné a pro rostliny nemají žádné negativní důsledky. Nejčastějšími modely pro studium paramutací jsou kukuřice, hledík, petunie a rajče.



**Obr. 7.10** Schéma fenoménu paramutace u kukuřice; obvykle je studován na barvě aleuronu endospermu. Je křížena rostlina s alelou  $B'$  (paramutagenní, slabě exprimovanou) s rostlinou nesoucí paramutovatelnou alelu  $B-I$  se silnou expresí. V okolí alely  $B'$  se nacházejí silně metylované repetice, které posléze dávají vznik malým umlčovacím dsRNA molekulám. Uniformní hybridní potomstvo má fenotyp rostliny s původní paramutagenní alelou  $B'$  a jeho genotyp značíme  $B'B^*$  (protože původní alela  $B-I$  se změnila na  $B^*$ ). Po samopylení bychom v další generaci měli sledovat nezávislou segregaci alel. Díky paramutaci však vzniká uniformní populace s fenotypem paramutagenní alely, i když jejich genotypy jsou odlišné ( $B'B'$ ,  $B'B^*$ ,  $B^*B'$  a  $B^*B^*$ ; podle Allemana et al., 2006).

Výsledkem paramutace je obvykle umlčení paramutovatelné alely na úrovni transkripce. Existují minimálně dva modely, které paramutace vysvětlují na molekulární úrovni. První hypotéza říká, že paramutace je zprostředkována zvláštními molekulami RNA, které jsou odvozeny z paramutagenního lokusu a ovlivňují transkripci paramutovatelného lokusu *in trans*. Tato teorie tedy nevyžaduje fyzický kontakt mezi příslušnými alelami. Druhá hypotéza je naopak postavena na bázi kontaktu paramutagenní a paramutovatelné alely: paramutagenní lokus předává svůj transkripčně inaktivní stav svému partneru prostřednictvím párování homologních sekvencí. Pokud se paramutovatelná alela stane paramutovanou, stává se také sama schopna vyvolávat paramutace: takový jev se nazývá sekundární paramutace. Bylo také prokázáno, že frekvence *trans* inaktivací je vyšší u polyploidních rostlin. V některých případech byla prokázána pozitivní korelace paramutace s hypermetylací DNA. Sama metylace DNA se však nezdá být jedinou podmínkou paramutace, spíše je procesem následným, který fixuje změněný stav chromatinu. Nejnovější výsledky studia paramutací u kukuřice ukazují na úlohu krátkých interferujících RNA (siRNA) a RNA-dependentní RNA polymerázy (RDRP).

## 7.4 Umlčování mobilních genetických elementů

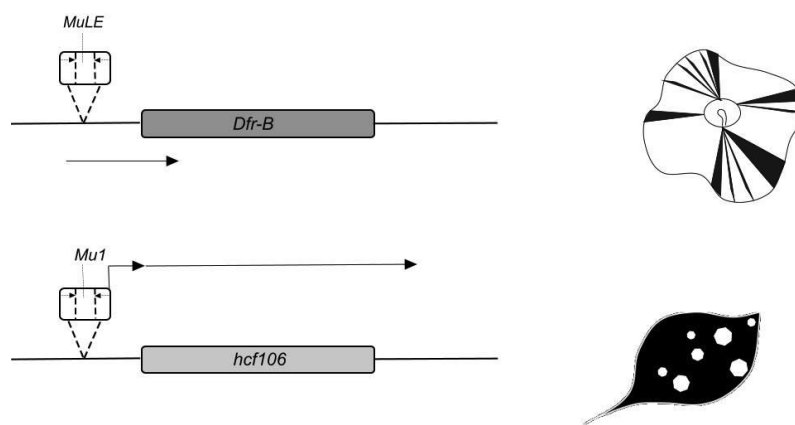
Mobilní genetické elementy různých skupin tvoří významnou část eukaryotických genomů (řádově desítky procent). Aktivní mobilní elementy (ať už DNA transpozony či retroelementy) jsou potenciálně vysoce mutagenní: mohou svou inzerci zasahovat kódující genové sekvence, či způsobovat zlomy a restrukturalizace chromozomů. Transpozony také mohou ze svého promotoru či zesilovače spouštět ektopickou expresi přilehlých genů. K obraně svého genomu si většina eukaryotických organismů vyvinula epigenetické mechanismy k potlačování jejich aktivity. Znamená to, že epigeneticky inaktivní transpozony díky represivní struktuře chromatinu nevytvářejí proteiny potřebné ke své mobilitě. Transponovatelné elementy jsou klasifikovány především na základě mechanismu transpozice. Transpozony vyžadující ke svému přenosu krok reverzní transkripce se nazývají **retrotranspozony** (typ I). Retrotranspozony se na základě přítomnosti či absence přímých opakování (LTR, *long terminal repeats*) dělí na dva typy elementů. Jejich proteiny pol a gag jsou příbuzné retrovirovým proteinům, ale postrádají obalový protein, který by jim umožnil přechod do jiné buňky. Retrotranspozony se podrobují duplikační transpozici, takže jejich proporce v genomu stále vzrůstá. **DNA transpozony** ke své integraci do genomu nevyžadují reverzní transkripci. Transpozáza, enzym kódovaný transpozonom, rozpoznává koncová obrácená opakování transpozonů (TIR, *terminal inverted repeats*), vyštěpí transpozon z původní pozice a integruje jej do nového místa.

Existuje celá řada **modifikací chromatinu**, které potlačují transkripci transpozonů, jako jsou modifikace aminoterminálních konců histonů, metylace DNA, RNA interferenční mechanismus a kondenzace chromatinu. Modifikace aminoterminálních konců mění vazbu proteinových faktorů, a tak i možnosti vazby transkripčních faktorů. Bylo zjištěno, že nukleozomy, které jsou zahrnuty v DNA sekvencích transpozonů se vyznačují zvýšenou hladinou metylace lyzinu 9 v histonu H3, což je signálním znakem umlčeného chromatinu. Naopak mutace v dráze této histonové modifikace vedou k reaktivaci transpozonů. Methylace DNA jsou nástrojem umlčování transpozonů zejména u rostlin a savců. Přitom symetrické CpG metylace jsou jednoduše při každém buněčném dělení kopírovány z mateřských vláken DNA na dceřinná. Asymetrické metylace DNA jsou užívány k umlčování transpozonů u rostlin a v některých typech savčích buněk, zejména embryonálních. Jde o *de novo* metylace, které nezávisejí na metylovaném templátu a musejí se nastavovat každou buněčnou generaci. Proteiny se uplatňují při umlčování transpozonů zejména kondenzací chromatinu. U *Arabidopsis* jsou dobře prostudovány mechanismy RNA-řízené metylace DNA a umlčování transpozonů. Zde byly identifikovány dvě skupiny malých siRNA molekul odlišné velikosti. Menší molekuly RNA (21 až 22 nukleotidů) hrají roli v posttranskripční regulaci, zatímco ty delší (24 až 26 nukleotidů) řídí RNA-dependentní metylaci DNA a jsou odvozeny z transpozonů a tandemových repetací. Vzniká samozřejmě otázka, jak může docházet k heterochromatinizaci prostřednictvím siRNA, které vznikají transkripcí umlčených transpozonů. U *Arabidopsis* to zajišťuje specifická **RNA polymeráza IV**. Její případná mutace vede k reaktivaci umlčených transpozonů.

**Centromery** *A. thaliana* obsahují ve vnitřních satelitních oblastech roztroušené retroelementy, zatímco vnější pericentromerické oblasti obsahují více DNA transpozonů. Centromery jsou typickým místem s konstitutivně heterochromatickým stavem, což je významné pro funkci chromozomů i integritu genomu. Reaktivace epigeneticky umlčených mobilních elementů v centromerách vede ke štěpení chromozomů a meiotickým defektům. Centromerické satelitní repetice mnoha druhů eukaryot mají

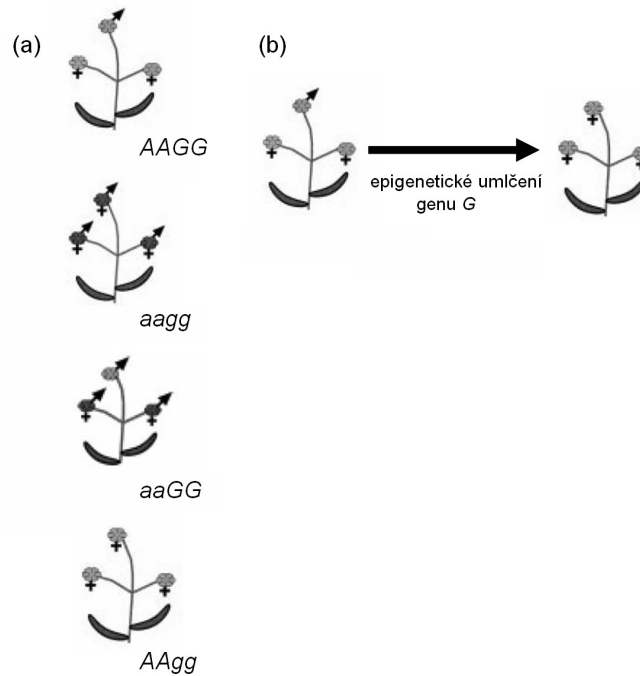
sekvenční homologii k transpozonomům, ačkoli samy již ztratily schopnost translokace. **Chromatinové izolátory** (*chromatin insulators*) jsou hraničními sekvencemi genových oblastí, které hrají roli v organizaci chromatinu v jaderné kompartmenty odlišné svým transkripčním stavem. V těchto chromatinových izolátorech hrají významnou roli mobilní genetické elementy.

Mobilní genetické elementy obvykle nemají svůj vlastní projev, ale vzhledem k různorodosti své inserce vytvářejí genetickou a fenotypovou variabilitu, ať už v různých buněčných liniích či v populacích jednotlivců. **Epialely** jsou dědičné epigenetické změny genové exprese, které mohou být řízeny okolními transpozony. Epialely jsou nestabilní, v různých buňkách mohou vést k odlišnému fenotypu, což se projevuje jako variegace či mozaicismus. Promotory transpozonů mohou ovlivňovat transkripci okolních genů. V jednoduchém případě mohou transkripty řízené promotorem transpozonu vytvářet své transkripty a z nich pokračovat do sousedícího genu (**obr. 7.11**). Dochází tak k ektopické (popř. konstitutivní) expresi tohoto genu. Alternativou genové aktivace je naopak umlčení sousedícího genu. K tomu dochází poté, když sekvence DNA transpozonu je rozpoznána hostitelem jako parazitická sekvence a různým mechanismem umlčena. Vznikající heterochromatinizace se pak může šířit i dál a způsobit umlčení sousedního genu (**obr. 7.11**).



**Obr. 7.11** Vliv transpozonů na genovou expresi přilehlých oblastí chromozomů. Ektopická inaktivace genu kódujícího dihydroflavonol reduktázu (*Dfr-B*) z metylovaného transpozonu MuLE způsobuje tvorbu bílých sektorů v koruně květu svlačce povojníku, *Ipomea purpurea*. (nahoře). Transposon může transkribovat nejen svou, ale i sousední oblast DNA, čímž dochází k ektopické expresi genu (dole). V tomto případě jde o expresi genů *hcf106* a *les28* z neautonomního transpozonu Mu1, což způsobuje světlé skvrny a nekrotické leze na listech (podle Slotkina a Martiensena, 2007).

Recentně bylo zjištěno, že transpozonom indukovaná epigenetická změna může vést k odlišné **determinaci pohlaví** u melounu. Meloun má dva klíčové geny ovládající pohlavnost: gen *A* blokuje tvorbu tyčinek, zatímco gen *G* blokuje vznik pestíku. U melounu jsou jedinci jednodomí (*AAGG*, *monoecious*) se separátními samčími a samičími květy a jedinci *aaGG* (*andromonoecious*), kteří tvoří na hlavním stonku květy samčí a na úžlabních větvích oboupohlavné květy. Kromě toho má meloun formy, které vytvářejí pouze květy samičí (*AAGg*, *gynoecious*) nebo oboupohlavné (*aagg*, *hermaphrodite*). Detailní analýza promotoru genu *G* prokázala, že obsahuje transposon. Jeho inserce do promotoru vede k epigenetické změně, která má za následek šíření metylace DNA a umlčování genu *G*: fenotypově to má za následek změnu pohlavnosti jednodomých rostlin *AAGG* na rostliny samičí (**obr. 7.12**).



**Obr. 7.12** (a) Schéma pohlavních vzorců a genotypů u melounu (podle Martina et al., 2009). Shora dolů jsou květní pohlavní vzorce jedinců monoecických (*AAGG*), hermafroditických (*aagg*), andromonoecických (*aaGG*) a gynoecických (*AAgg*), přičemž gen *G* odpovídá za blokádu gynoecia (pestíku) a gen *A* za inhibici tvorby androecea (tyčinek). (b) Inzerce a umlčení transpozonu vede k iniciaci a rozšíření metylace DNA v promotoru genu *G* u jednodomých rostlin s genotypem *AAGG*, což má za následek tvorbu samičích rostlin.

## 7.5 RNA interference u rostlin

V 90. letech minulého století bylo současně s efektem experimentálního umlčování genů cestou injekce dsRNA u *Caenorhabditis elegans* také zjišťováno, že dsRNA má u rostlin i funkci při umlčování transgenů a zejména pak při obraně vůči virům, transpozonům i při vývojové regulaci genové exprese. Je zřejmé, že obrana rostlin vůči virům je založena na dsRNA intermediech, které se objevují při virové replikaci RNA. Tyto dvouvláknové molekuly RNA jsou štěpeny na menší úseky RNázou III Dicer. Jakmile tedy nastane infekce rostliny, jsou **virové RNA molekuly** objektem aktivity komplexu RISC (*RNA-induced silencing complex*) a virová replikace je zpomalena. Dosud není jasné, zdali i viry v živočišných hostitelích jsou podrobovány umlčování cestou RNAi. V počátečních fázích infekce rostliny se ještě virová RNA nestává cílem umlčování, protože replikační intermediát se dosud neakumuloval v dostatečné hladině: k tomu dochází v pozdějších stádiích vývoje virové infekce. Je třeba však zmínit, že mnoho druhů virů kóduje proteiny, které jsou supresory RNA umlčování. Výsledný stupeň infekce rostliny je pak odrazem míry supresorové aktivity.

Existují minimálně tři odlišné dráhy přirozeného umlčování cestou RNAi u rostlin. První je dráha cytoplazmatického umlčování **siRNA** (*short interfering RNA*). Tato dráha se může uplatňovat ve virem infikovaných buňkách, kde dsRNA může být replikačním intermedielem nebo produktem sekundární struktury virové jednovláknové RNA. V případě rostlinných DNA virů mohou být dsRNA tvořeny asociací překrývajících se komplementárních transkriptů. Tento typ umlčování obvykle končí štěpením perfektně homologní mRNA sekvence. Druhým typem dráhy je umlčování mRNA cestou jedno-

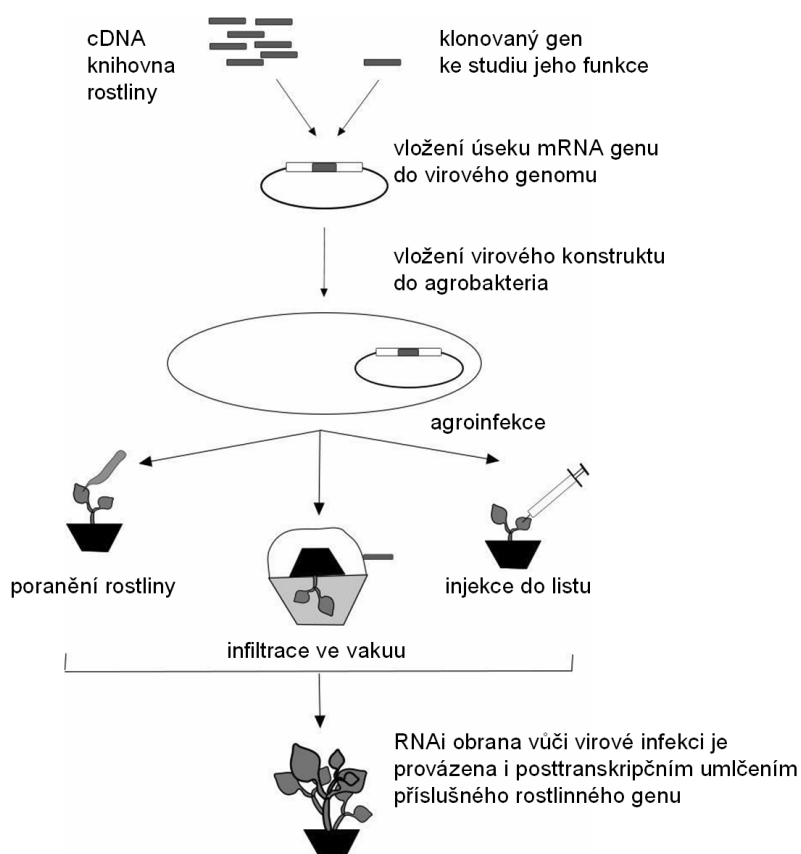
vláknové **miRNA** (*microRNA*). Tyto miRNA negativně regulují genovou expresi párováním s částečně homologními molekulami mRNA, což má za následek obvykle zábranu translace. Stejně jako siRNA jsou i miRNA krátké 21 až 24 nukleotidů jako produkt štěpení RNA prekurzoru RNázou Dicer. RNA se ovšem může párovat jak s RNA, tak i s DNA a mechanismus RNAi tedy může ovlivňovat genovou funkci i na úrovni genomové DNA. Třetí dráhou umlčování RNA u rostlin je **metylace DNA** a potlačování transkripce. K této dráze vedou důkazy ze studií transgenů a virovou RNA-řízenou metylaci DNA. RNA-řízená DNA metylace (*RdDM*, *RNA-directed DNA methylation*) stejně jako RNAi-zprostředkovaná tvorba heterochromatinu jsou epigenetickými procesy, které mají za následek kovalentní modifikaci cytozinu v DNA resp. nukleozomálních histonů (zejména metylaci lyzinu v pozici 9 histonu H3). RdDM je dobře charakterizován u rostlin, zatímco RNAi-heterochromatinizace funguje u kvasinek, rostlin i živočichů. RdDM je první známou RNA-řízenou epigenetickou modifikací genomu (popsána u rostlin infikovaných viroidem již v roce 1994). Brzy poté bylo prokázáno, že proces RdDM vyžaduje dsRNA, které jsou štěpeny na malé molekuly dsRNA. Takové molekuly, které mají homologii k promotorovým oblastem v genomu mohou iniciovat jejich metylaci a transkripční umlčování genů. RdDM vede k *de novo* metylaci cytozinu ve všech sekvenčních motivech, nikoli jen v palindromech CpG. Je zajímavé, že tato metylace je striktně omezena na oblast sekvenční homologie a dále se v genomu nešíří. RdDM je procesem postupným, který je iniciován signály RNA a místně-specifickými DNA metyltransferázami. Po *de novo* metylaci nastává modifikace histonů (deacetylace a metylace lyzinu 9 histonu H3), která pomáhá udržovat metylaci DNA.

V principu se všechny tři typy umlčování – miRNA, siRNA a RNAi-řízená metylace DNA – vyskytují i u některých jiných eukaryot, ne však u všech. Například u savců zřejmě funguje jen mechanismus umlčování cestou miRNA. Standardní součástí všech těchto typů umlčování jsou enzymatické komplexy Dicer a Argonaut. Dicer představuje u rostlin celou genovou rodinu, jejíž členové mohou představovat různé dráhy štěpení dsRNA. Proteiny Argonaut jsou pak součástí ribonukleázového komplexu RISC, který obvykle štěpí cílovou sekvenci mRNA.

Rostlinné a živočišné **miRNA** mají podobný charakter. Představují 20 až 22-nukleotidové jednovláknové molekuly miRNA, které vznikají RNázovou aktivitou Diceru a závisí i na funkci proteinu Argonaut: tyto procesy se odehrávají v jádře. U živočichů je miRNA připravována enzymy Drosha a Dicer ve dvoukrokovém postupu v jádře i v cytoplasmě. Dalším významným rozdílem je skutečnost, že miRNA u rostlin se ve vyšší míře páruje s cílovou sekvencí RNA, čímž dochází k jejímu štěpení (a nikoli ke translační represi). U živočichů jsou miRNA cíleny ke 3'-netranslatované oblasti mRNA, zatímco rostlinné miRNA směřují ke kódující sekvenci nebo dokonce k 5'-netranslatovanému konci. Ve většině případů bylo zjištěno, že miRNA odpovídají mRNA kódujícím transkripční faktory a jiné regulační proteiny, které řídí vývojovou regulaci. RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRP) je klíčovým faktorem tvorby dsRNA z jednovláknového templátu – například virové RNA nebo RNA z transgenů. RdRP tak odpovídá i za amplifikaci umlčovacího signálu. Důležitá je také mobilita umlčovacího signálu v rostlině, která se může projevit ještě před vstupem viru do buňky. Systemický signál zjevně odpovídá dsRNA a proteinům, které zajišťují průchod dsRNA přes membránu. Tento systém umlčování virových sekvencí funguje u rostlin a *Caenorhabditis elegans*, nikoliv však u savců.

**Virem-indukované umlčování genů u rostlin** (*VIGS*, *virus-induced gene silencing*) je technika založená na schopnosti rostliny bránit se proti virové infekci prostřednictvím RNA molekul. Replikační virový intermediát je dvouvláknová RNA, která dává vznik siRNA v infikované buňce korespondující k části virového genomu. Pokud je do virového genomu naklonován inzert z hostitelského genomu, vznikající siRNA bude směřovat k odpovídající hostitelské mRNA a výsledný fenotyp infikované rostliny by měl

odrážet ztrátu funkce (umlčení) příslušného genu. Příkladem může být aplikace viru mozaiky tabáku nesoucí inzert rostlinného genu fytoen desaturázy. Infekce rostliny, šíření virové infekce a indukovaná obranná reakce rostliny vyvolaly symptomy fotochemické destrukce rostliny odrážející nepřítomnost fotoprotektivních karotenoidních pigmentů, které vyžadují enzym fytoen syntázu. Podobně inserce genu zahrnutého v syntéze chlorofylu vedla k jeho umlčení a k vytváření symptomů chlorózy. Jiným příkladem může být inserce genu *leafy*, což je gen nezbytný k indukcii květního vývoje. Mutanty *leafy* se ztrátou funkce – stejně jako vektorem infikované rostliny – vytvářely malformované květy. Metoda VIGS by se tak mohla stát cennou metodou ke studiu genové funkce u rostlin (**obr. 7.13**). Dosud však byla úspěšně aplikována pouze u několika druhů rostlin, především na virologickém modelu tabáku – *Nicotiana benthamiana*. *N. benthamiana* je vnímavá vůči širokému spektru virů a zřejmě hlavní předností této rostliny je vysoká schopnost vylučování látek plazmodezmaty a předávání dsRNA molekul z buňky do buňky. VIGS je postup velmi rychlý: od infekce rostliny až po projev umlčeného genu to trvá několik dnů až týdnů. U většiny testovaných druhů rostlin však metoda VIGS nefunguje. Existuje více omezení této metody. Viry nevstupují do meristému rostliny, takže v podstatě nelze přímo studovat funkci genů exprimovaných v meristému. Dalším omezením je studium základních genů metabolických drah: jejich umlčení může mít na rostlinu letální efekt.



**Obr. 7.13** Schéma metody VIGS (*virus-induced gene silencing*) ke studiu funkce genů. Klon cDNA knihovny připravené z rostliny je klonován spolu s celou virovou cDNA do binárního vektoru systému *Agrobacterium tumefaciens*. Tímto krokem jednak obejdeme nutnost *in vitro* transkripce a dále po infekci rostliny agrobakteriem zajistíme, že v místě vpichu dojde ke genetické transformaci, která je stálým zdrojem příslušných transkriptů (metoda agroinfekce). Virové částice (spolu s vloženým rostlinným genem) se šíří systémově rostlinou, vyvolávají obrannou reakci, která by se měla projevit i posttranskripčním umlčením příslušného homologního genu (podle Burch-Smitha et al., 2004).

Často bývá umlčování cestou VIGS demonstrováno na transgenních rostlinách tabáku *N. benthamiana*, které mají exprimovaný transgen *GFP* (*green fluorescent protein*). Pokud se na rostlinu posvítí ultrafialovým světlem, fluoreskuje zeleně. Jako VIGS vektor se používá složitějšího vektorového systému včetně *Agrobacterium tumefaciens* (**agroinfekce**). Úlohou agrobaktéria je genetická transformace injikovaných buněk střední žilky listu tabáku. T-DNA se zřejmě integruje do příslušných buněčných jader a zajišťuje transkripci vloženého virového genomu i se sledovaným genem: v tomto případě GFP. Při superinfekci rostliny vektorovým systémem *Agrobacterium tumefaciens* - virus - *GFP* dochází k šíření virové infekce a tím i k vyvolání obranné reakce rostliny prostřednictvím dsRNA intermediátu. Fenotypově se to projeví tím, že se rostlinou šíří umlčující signál, což se projeví ztrátou zelené fluorescence pod UV světlem.

V osmdesátých letech minulého století se díky vyvinutí agrobakteriálních vektorů stalo genové inženýrství rutinní záležitostí a objevily se i první neočekávané výsledky při introdukci reportérových genů. Šlo o umlčování genů na bázi homologie, což často korelovalo se zvýšeným počtem integrovaných transgenů. Byly zjištěny dva molekulární mechanismy: degradace zvýšené hladiny mRNA cestou **posttranskripčního umlčování** (*PTGS*, *posttranscriptional gene silencing*) a **represe transkripce** (*TGS*, *transcriptional gene silencing*). V obou případech docházelo i ke zvýšené metylaci umlčovaných genů. Zvláštní příklad PTGS u transgenní petunie byl označen termínem **kosuprese** (*cosuppression*). Pokusy modifikovat květní barvu zvýšenou expresí chalkon syntázy, která odpovídá za tmavě červené korunní plátky, vedlo často k variegovaným nebo zcela bílým květům. Bylo prokázáno, že inhibice pigmentace je výsledkem koordinovaného umlčení jak chalkon syntázového transgenu, tak i endogenního chalkon syntázového genu. Pozdější výsledky ukázaly, že kosuprese u rostlin je ekvivalentní RNAi mechanismu u *Caenorhabditis elegans*.

## 7.6 Epigenetické řízení květního vývoje

U mnoha druhů rostlin je proces kvetení pod epigenetickou kontrolou: aplikace nízké teploty na vyvíjející se rostliny nebo klíčící semena vede k indukci časného kvetení. Tento proces se nazývá **vernalizace** (jarovizace). V podstatě jde o indukci změny vegetativního meristému v reprodukční meristém, který vytváří květenství. Vernalizace má dva významné atributy. Genová aktivita indukovaná nízkou teplotou se mitoticky dědí po mnoho buněčných generací, které předcházejí tvorbě reprodukčního meristému. Znamená to tedy dlouhodobou separaci indukčního vlivu od fenotypové odpovědi (časného kvetení). Druhým atributem je reverzibilita v další pohlavní generaci: původní stav je zřejmě resetován při tvorbě gamet. Klíčovým genem vernalizační reakce u *Arabidopsis* je gen *Flowering locus C* (*Flc*). Vernalizací indukovaný stav potlačené transkripční aktivity lokusu *Flc* spočívá v modifikacích histonů příslušné chromatinové oblasti. Gen *Flc* patří mezi MADS-boxové květní geny a jeho produkt - protein *Flc* udržuje vrcholový meristém rostliny ve vegetativním stavu. Existuje několik dalších lokusů, které aktivitu *Flc* ovlivňují; patří mezi ně zejména aktivátor *Frigida*. Recentně byla naznačena i funkce malých RNA v regulaci funkce genu *Flc*: byly identifikovány 30 a 24-nukleotidové malé RNA komplementární ke transkribovanému vlákně *Flc* a umístěné ve 3' oblasti mRNA. Narušení oblasti kódující tyto malé RNA vede ke zvýšené expresi genu *Flc* a pozdějšímu kvetení. Redukovaná aktivita *Flc* a časnější kvetení mohou být také vyvolány redukcí hladiny **metylace DNA**. Experimentální snížení hladiny DNA metyltransferázy MET1 nebo aplikace 5-azacytidinu vedlo ke snížení genomové metylace až na 15 % vůči standardu a rostliny časně kvetly. Při této hypometylaci indukované redukcí aktivity *Flc* nastala v *Flc* lokusu deacetylace histonu H3 i H4, podobně jako při chladovém působení.

## 7.7 Genomový imprinting

Genomový imprinting je programované, pohlavně-specifické značení genové exprese. Znamená to, že některé geny (u savců a krytosemenných rostlin) jsou exprimovány v závislosti na tom, od kterého rodiče pocházejí. **Paternální imprinting** tedy znamená, že příslušná alela zděděná od otce je umlčována, zatímco původem maternální alela je funkční. **Maternální imprinting** pak znamená obrácenou situaci: maternální alela je umlčena a paternální je aktivní. Dosud je známo asi 100 imprintovaných genů u savců (**tab. 8.1**) a okolo 20 takových genů u rostlin (**tab. 7.1**).

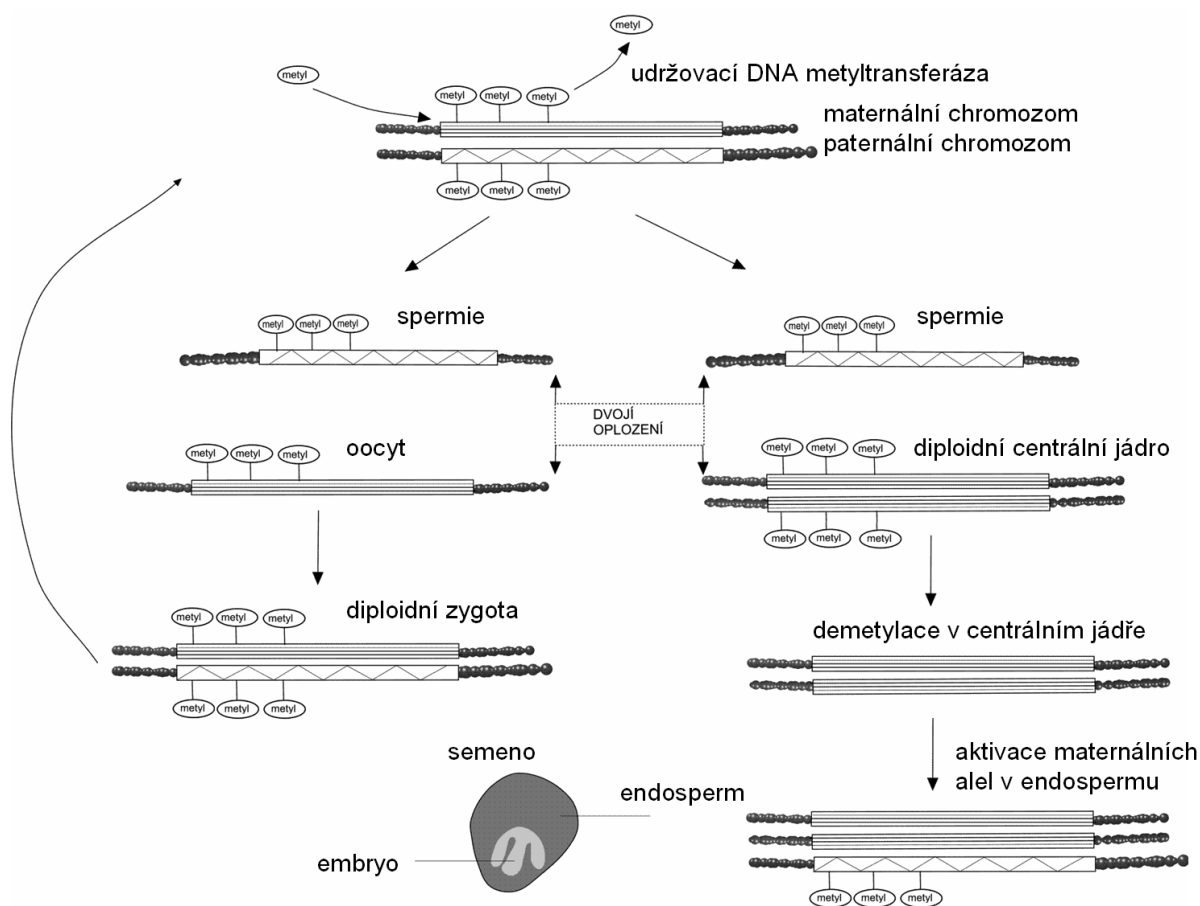
<i>gen</i>	<i>druh</i>	<i>exprese</i>	<i>mechanismus</i>	<i>funkce</i>
<i>MEDEA</i>	<i>Arabidopsis</i>	maternální	Polycomb	remodelování chromatinu
<i>PHERES1</i>	<i>Arabidopsis</i>	paternální	Polycomb	transkripční faktor
<i>FWA</i>	<i>Arabidopsis</i>	maternální	DNA-metyltransferáza	transkripční faktor
<i>FIS2</i>	<i>Arabidopsis</i>	maternální	DNA-metyltransferáza	remodelování chromatinu
<i>FIE</i>	<i>Arabidopsis</i>	maternální	?	remodelování chromatinu
<i>AGL80</i>	<i>Arabidopsis</i>	maternální	?	transkripční faktor
<i>AtFH5</i>	<i>Arabidopsis</i>	maternální	?	regulace aktinu
<i>FIE1</i>	<i>Zea mays</i>	maternální	DNA-metyltransferáza	remodelování chromatinu
<i>FIE2</i>	<i>Zea mays</i>	maternální	DNA-metyltransferáza	remodelování chromatinu
<i>R</i>	<i>Zea mays</i>	maternální	?	syntéza pigmentu
<i>Mee1</i>	<i>Zea mays</i>	maternální	?	vývin embrya

**Tab. 7.1** Imprintované geny u krytosemenných rostlin

Společným jmenovatelem savců a krytosemenných rostlin je skutečnost, že embryo se vyvíjí uvnitř těla matky a je po tu dobu výhradně maternálně vyživováno. Vývoj embrya musí být přísně regulován tak, aby byl přiměřený. Genomový imprinting se zřejmě evolučně vyvinul jako reakce na potenciální **rodičovský konflikt** (*sex conflict, tug of war between mother and progeny*): tuto teorii postuloval David Haig v 80. letech 20. století. Podle ní se předpokládá, že zájmy otce a matky jsou v rozporu. Otec si přeje maximální vývoj svých dětí, zatímco matčin zájem spočívá v přiměřeném vývinu všech svých potomků, které může mít současně i s více otci. Klíčovým zájmem matky je také postupné vícenásobné těhotenství, takže její zdraví nesmí být při vývinu embrya poškozeno. U savců je hlavním mechanismem imprintingu **metylace DNA** v promotorech několika desítek určitých genů, ke které dochází při gametogenezi. Při gametogenezi dochází nejprve k vymazání původního rodičovského záznamu (což je kombinace maternálního a paternálního genomu předchozí generace) a poté ke vzniku nového, pohlavně specifického: tedy odlišného u spermií a oocytů. Říkáme proto, že genomový imprinting u savců je reverzibilní. Zdá se, že u rostlin je tomu jinak. U asi dvou desítek genů bylo zjištěno, že jsou uniparentálně exprimovány: nikoli však v embryonální linii ale v **endospermu**. Také v těchto případech byla zjištěna průkazná korelace s metylací příslušných genů. Protože endosperm (analog trofektodermu u savců) je výživové, extraembryonální terminální pletivo, odlišný metylační záznam není reverzibilní, ale končí s krátkodobou existencí endospermu (**obr. 7.14**). Jedinou výjimkou je zřejmě **gen meel1** (*maternally expressed in embryo 1*) zjištěný u kukuřice. Tento gen je paternálně imprintován jak v embryu tak



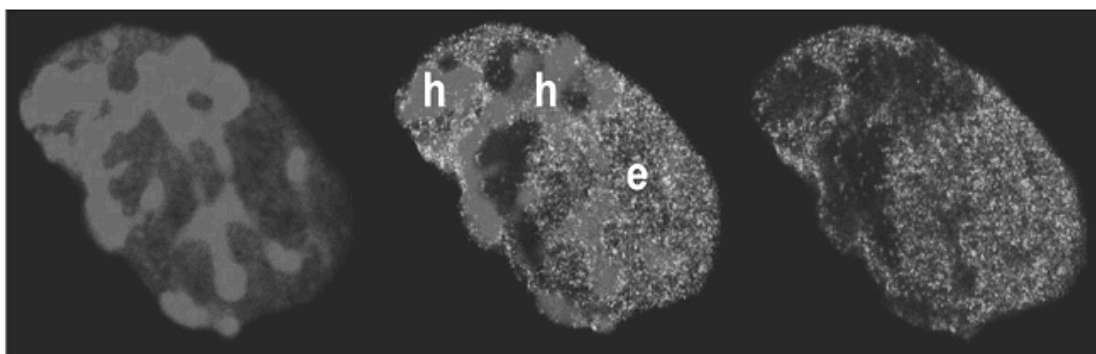
i v endospermu a tyto stavy korelují s odlišnou metylací alel. Tato epigenetická asymetrie v endospermu zůstává, zatímco embryonální maternální alela je demetylována při fertilizaci oocyty a remetylována v pozdní embryogenezi. Pokud se tato práce potvrdí, znamenalo by to existenci dvou nezávislých typů imprintingu u krytosemenných rostlin – v endospermu a v zárodečné linii.



**Obr. 7.14** Schéma genomového imprintingu v endospermu rostlin na příkladu genů *Meeda* a *FWA* u *Arabidopsis thaliana* (podle Feila a Bergera, 2007). Maternální alely těchto genů jsou aktivovány v centrálním jádře zárodečného vaku aktivitou DNA glykozylázy Demeter. Aktivní maternální alely tak působí v endospermu, kde regulují růst embrya. V embryu nebyla aktivita těchto genů zjištěna, maternální i paternální alely jsou tak ve vegetativní fázi vývoje rostliny zcela umlčeny.

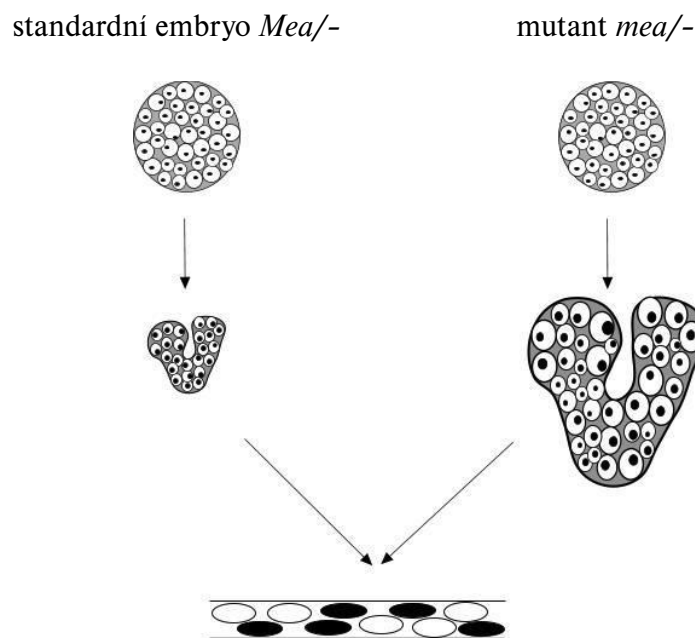
Jedním z prvních důkazů, že maternální a paternální genomy v endospermu jsou odlišně exprimovány (imprintovány) pochází z reciprokého křížení  $6n$  a  $2n$  rostlin *Arabidopsis thaliana*. Zatímco při standardním křížení diploidů je vyvážený poměr genomů maternální : paternální 2 : 1 (dvě jádra samičího zárodečného vaku jsou oplozena jednou spermí), což umožňuje přiměřený vývin endospermu i embrya, při **křížení rostlin odlišného stupně ploidie** nastávají problémy. Pokud použijeme hexaploidní rostlinu ( $6n$ ) jako semenného dárce (mateřského) a opylíme ji diploidem, nastane poměr maternálních a paternálních genomů v endospermu 6 : 1, což vede ke zvýšenému maternálnímu příspěvku (*maternal excess*), které mají tendenci potlačovat vývin endospermu i embrya. Endosperm je tedy malý a nestačí k řádnému vývinu embrya. Reciproké křížení – tedy jako semenný donor je použita diploidní rostlina, která je opylena pylem z hexaploida – vede k poměru maternálních a paternálních genomů 2 : 3, což je nadpočetní dávka paternálních kopií imprintovaných genů (*paternal excess*), která vede k nadměrnému vývinu endospermu i embrya.

Přirozeným projevem imprintingu v endospermu je specifické umlčování části maternálního genomu – **fakultativní heterochromatinizace** – u rostliny křivatec žlutého, *Gagea lutea* (**obr. 7.15**). Křivatec tvoří tetrasporický zárodečný vak typu *Fritillaria* s výsledným triploidním chalazálním a haploidním mikropylárním jádrem. Po oplození spermii vzniká pentaploidní endosperm syncytiálního charakteru. Starší cytologické výzkumy ukázaly, že v jádrech endospermu vznikají rozsáhlé masy vysoce kondenzovaného heterochromatinu původem ze tří nadpočetných maternálních genomů původem z chalazálního polárního jádra. Imunocytochemická analýza těchto jader prokázala vysokou korelaci stupně acetylace histonu H4 s charakterem kondenzace jednotlivých částí chromatinu: euchromatinové oblasti jádra byly vysoce acetylované, zatímco heterochromatinové části byly výrazně hypoacetylované. Podobné experimenty s použitím specifické protilátky vůči 5-metylcytozinu však neprokázaly jasnou korelaci heterochromatinizace endospermu a metylace DNA.



**Obr. 7.15** Pentaploidní endosperm u křivatec žlutého, *Gagea lutea*. Vlevo je jádro obarveno DAPI, splývající světlé oblasti představují vysoce kondenzovaný fakultativní heterochromatin maternálního původu. Pravý snímek je pořízen po imunobarvení stejného jádra protilátkou vůči acetylovanému lyzinu 5 histonu H4. Značení je pravidelné v dekonzenzovaných euchromatinových oblastech jádra. Uprostřed je složený snímek jasně vymezuující hyperacetylovaný euchromatin (e) a hypoacetylovaný heterochromatin (h).

Snad nejznámějším imprintovaným genem u rostlin je *Medea* (*Mea*) izolovaný u *Arabidopsis thaliana*. Tento gen je exprimován výhradně maternálně (tedy paternální imprinting), a to pouze v určité fázi života – v centrálním jádře samičího zárodečného vaku a v endospermu. *Medea* kóduje protein typu Polycomb, což je skupina supresorových vazebných proteinů. Protein *Medea* má za úkol hlídat vývin embrya. Při funkční maternální alele *Mea* dochází k určitému potlačování vývinu embrya, takže semeno má přiměřenou velikost. Pokud je však maternální alela nefunkční (*mea*), buď z genetického hlediska (bodová mutace, delece aj.) nebo epigenetického (v endospermu nedojde k demetylaci promotoru genu *Mea*), endosperm i embryo se podrobují nepřiměřeně intenzivnímu vývoji a vzniká obří letální embryo (analogie s infanticidou v antické báji *Medea*). Tak jako v jiných případech paternálního imprintingu na alele genu *Medea* přinášené ve spermii nezáleží: není v průběhu života jedince vůbec exprimována. Pokud jsou heterozygotní rostliny *Mea/mea* samoopyleny, 50 % semen abortuje. Tato segregace 1 : 1 je typická pro mutaci, která disruptuje gen vyžadovaný v samičím gametofytu, protože polovina haploidních gametofytů nese mutantní alelu. Pokud byly heterozygotní rostliny *Mea/mea* použity jako pylový dárce k opylení standardní rostliny, byla tvorba semen normální, i když 50 % tohoto potomstva neslo mutaci *mea*. Letalita embryí způsobovaná mutací *mea* je tedy gametofyticky řízeným maternálním efektem (**obr. 7.16**). Mutantní embrya se zpočátku vyvíjejí normálně, ale od pozdního globulárního stádia jsou až 10× větší než standardní embrya, jejich diferenciací je však pomalejší a v průběhu de-sikace semen degenerují. Základní funkcí standardního genu *Medea* je restrikce buněčné proliferace v embryu a podpora jaderného dělení v endospermu.



šesule se semeny standardního genotypu (*Mea*/-; bílá) a letálními (*mea*/-; tmavá)

**Obr. 7.16** Paternální imprinting genu *Medea* u *Arabidopsis thaliana*. Gen *Medea* kóduje supresorový protein typu Polycomb, který je maternálně aktivován v endospermu a má pod kontrolou vývin embrya. Pokud je však maternální alela nefunkční, embryo se podrobí gigantickému růstu a abortuje. Paternální alela *Medea* je nefunkční, nemůže tedy zabránit malformaci embrya. V potomstvu křížení mateřské heterozygotní rostliny *Mea/mea* a pylového donora *Mea/Mea* (standard) tedy získáme 50 % letálních semen *mea/Mea* (značeny tmavě) a 50 % životaschopných semen *Mea/Mea*. V případě reciprokého křížení, kdy mateřskou rostlinou bude standardní typ *Mea/Mea* a pylovým dárcem heterozygot *Mea/mea* budou všechna semena (genotypů *Mea/Mea* a *Mea/mea*) vypadat normálně; mutace se však přenáší do potomstva.

V genu *Medea* byly zjištěny alespoň dva umlčující signály: metylace DNA a di- a trimetylace lyzinového rezidua v pozici 27 histonu H3. Gen *Mea* je aktivován při samičí gametogenezi před fertilizací funkcí genu *Demeter* (*Dme*). Tento gen kóduje enzym DNA glykozylázu, který odstraňuje 5-metylcytozin z DNA a tím indukuje aktivní demetylaci. Mutanty *dme* způsobují aborci semen podobně jako mutanty *mea*. Produkt genu *Mea* potlačuje předčasnou expresi genu *Pheres1* (*Phe1*). **Pheres1** je MADS-boxový transkripční faktor, který je maternálně blokován polycombovými produkty genů *Medea*, *FIE* (*fertilization-independent endosperm*) a *FIS2* (*fertilization-independent seed*). Gen *Phe1* je tedy paternálně exprimován (maternální imprinting). Protein Pheres je dosud málo charakterizován, zřejmě jde o regulátor nezbytný k normálnímu vývinu semene.

## 8 EPIGENETIKA SAVCŮ

### 8.1 Metylace genomu a CpG ostrovy

**Epigenetické reprogramování** bylo poprvé pozorováno v myších embryích. Souviselo především se změnami metylace DNA a byl zaznamenán rozsáhlý pokles hladiny 5-metylcytozinu v preimplantačních stádiích až po blastocystu. Další studie ukázaly, že k podobně rozsáhlé ztrátě metylace dochází také v zárodečných buňkách poté, co doputují do genitální rýhy (**obr. 3.4**). Genomy gamet jeví vysoký stupeň metylace, zejména spermie, které mají též vysoce kondenzovaný chromatin: nukleozomová struktura histonů je tu nahrazena vysoce bazickými protaminy. Po fertilizaci je v zygotě paternální genom rychle demetylován ještě před replikací, takže zjevně jde o aktivní demetylaci. Sekvence DNA, které jsou demetylovány, zahrnují jak repetitivní, tak i genové úseky. Netýká se to jen několika desítek lokusů, které jsou parentálně-specificky imprintovány. Maternální genom zřejmě aktivně demetylován není, což asi souvisí s jeho odlišnou strukturou chromatinu. Demetylace genomu v průběhu preimplantačního období je prováděna **pasivní demetylací**: k replikaci DNA před mitózou dochází za nepřítomnosti udržovací metyltransferázy (Dnmt1).

Metylace cytozinu jsou v savčích genomech velmi nerovnoměrně zastoupeny. Nacházejí se především v oblastech centromer a obecně v repetitivních sekvencích a transpozonech. Pokud dojde k deaminaci 5-metylcytozinu, vzniká thymin. Tím tedy nastává z epigenetického umlčování bodová mutace a evoluční změna. Analýzou centromerických transpozonových sekvencí bylo zjištěno, že statisticky je tu vyšší frekvence thyminu než cytozinu. V savčích genomech se také nacházejí rozsáhlejší oblasti (obvykle >500 pb), které zpravidla vůbec 5-metylcytozin neobsahují: říkáme jim **CpG ostrovy**. Jde o oblasti promotorů genů, které bývají stabilně exprimovány. Podle dosavadních údajů je v literatuře konstatováno, že metylace cytozinu se u savců vyskytují výhradně v palindromech 5´-CG-3´. Nejnovější údaje však naznačují, že v raných fázích embryogeneze může docházet k četným metylacím i mimo tyto sekvence.

CpG ostrovy jsou obecně charakterizovány **transkripčně aktivním chromatinem**: je možné, že slouží jako mechanismus rozpoznávání promotorových oblastí od rozsáhlých, geneticky neaktivních intergenových oblastí. Promotory v CpG ostrovech představují specifickou třídu startovacích míst transkripce. CpG ostrovy byly prvně identifikovány v myším genomu s použitím CpG senzitivní restriktázy *HpaII*. Analýza takových štěpených oblastí ukázala, že jsou odvozeny z celkem 26 300 diskretních CpG ostrovů. Předběžné počítačové analýzy naznačují, že v genomu člověka se nachází asi 50 260 CpG ostrovů. Je zajímavé, že CpG ostrovy zůstávají nemetylované i v průběhu rozsáhlé globální metylace v průběhu časného vývoje. K vysvětlení tohoto jevu byly vysloveny alespoň dvě hypotézy: jedna uvažuje o jisté imunitě těchto úseků genomu vůči *de novo* DNA metyltransferázám, druhá spekuluje o proteinových vazebných faktorech, které se vážou na CpG ostrovy (*CpG-binding protein*).

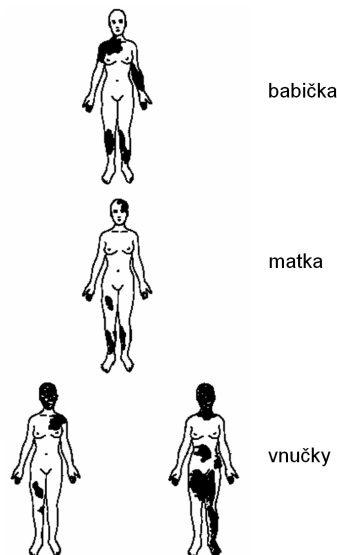
### 8.2 Kompenzace dávky X-vázaných genů

**Pohlavní chromozomy** jsou evolučním derivátem páru standardních autozomů. Předpokládá se, že primární událostí bylo vytvoření páru chromozomů s jediným odlišným lokusem: v systému X/Y je to především samčí pohlaví determinující lokus na chromozomu Y. V tomto systému je **samčí pohlaví heterogametické** a **samičí homogametické**. K tomuto lokusu se začnou na chromozomu Y hromadit geny,

keré zvýhodňují vývoj samčího pohlaví. Aby se zabránilo vzniku intersexů, byl v této oblasti potlačen crossing-over mezi chromozomem X a Y. Ztráta schopnosti rekombinace vede k akumulaci repetitivních sekvencí na chromozomu Y a především ke **vzniku mutací**, které nemohou být rekombinačně reparovány. Na chromozomu X se naproti tomu selekcí hromadí geny, které jsou výhodné pro rozvoj samčího jedince. Nerekombinující se oblast chromozomu **Y postupně degeneruje** (model jednosměrné Mullerovy rohatky) a chromozom postupně ztrácí většinu svých funkčních genů. Například u savců nese chromozom X asi tisíc funkčních genů, chromozom Y jich má jen několik desítek. Protože chromozom X nese geny nezbytné pro rozvoj obou pohlaví, musí být v savčím organismu vždy přítomna alespoň jedna kopie tohoto chromozomu. Určitá oblast chromozomu Y však zůstává funkční a v meióze se páruje s úsekem chromozomu X: je to **pseudoautozomální oblast** (*pseudoautosomal region, PAR*).

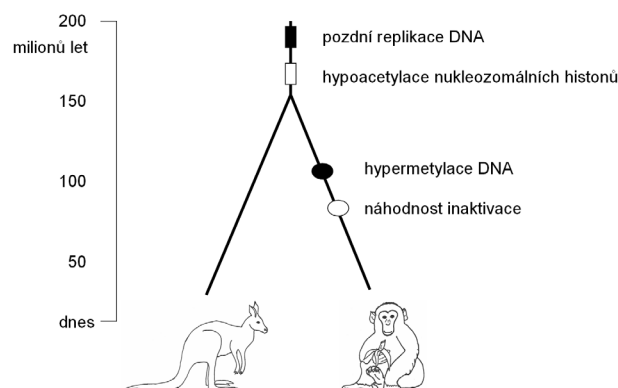
U většiny druhů savců je chromozom Y rozsáhle degenerován, obsahuje především repetitivní sekvence, podrobuje se velkým inverzím a je z větší části heterochromatický. Jeho degenerace je potvrzena také velikostí. Rozsáhlé eliminace úseků chromozomu Y, které nemohou být reparovány rekombinací, se ztratí a chromozom Y tak patří k nejkratším chromozomům v genomu. Nicméně alespoň jedna jeho část musí být funkční: je to oblast determinující vývoj testes u samečků: **SRY** (*sex region Y*, také nazývaná **TDF**, *testis determining factor*). Jak již bylo zmíněno, většina z asi jednoho tisíce X-vázaných genů nemá přímou souvislost s pohlavní determinací a jsou nezbytné pro zdárný individuální vývin obou pohlaví. Proto se u různých živočišných druhů evolučně vyvinuly **mechanizmy dávkové kompenzace**. Znamená to, že u heterogametního samčího pohlaví je přibližně stejně vysoká koncentrace X-kódovaných genových produktů jako u homogametních sameček. V kapitole 6 jsme se seznámili s mechanismy dávkové kompenzace u modelových bezobratlých živočichů. Samečci drozofily mají také degenerovaný chromozom Y, zatímco *Caenorhabditis* chromozom Y vůbec nemá. U obou těchto druhů je pohlaví primárně determinováno poměrem počtu chromozomů X a sad autozomů. U drozofily se vyvinul systém **pozitivní dávkové kompenzace**: jediný chromozom X u samečka je hyperaktivní (mechanismem je acetylace histonů v příslušných nukleosomech). U *Caenorhabditis* je systém dávkové kompenzace **negativní**: oba chromozomy X u hermafrodita jsou kondenzinovými komplexy částečně potlačovány. U savců se také evolučně vyvinul negativní systém kompenzace: inaktivace jednoho ze dvou chromozomů X v somatické linii sameček. Skutečnost, že evolucí vznikly tak odlišné a nezávislé mechanismy dávkové kompenzace jen potvrzuje, jak důležité je srovnání hladin X-produktů u obou pohlaví. Mutace, které kompenzační mechanismy vyřazují, mají obvykle letální charakter.

Již v roce 1949 pozoroval Murray Barr, že v některých somatických jádrech sameček savců se nachází po standardním barvení silně **heterochromatické tělísko** (*Barr body*) na periferii interfázního jádra. Japonský genetik a evoluční biolog Susumo Ohno se domníval, že by mohlo jít o inaktivovaný chromozom X. Konečný důkaz této hypotézy podala genetickou analýzou britská bioložka Mary Lyonová v roce 1961. Využila k tomu X-vázaný gen kódující barvu srsti u myši. Samičí jedinci heterozygotní pro tento lokus měli **mozaikovou expresi**: v různých částech těla se exprimovala vždy jedna ze dvou alel. Podle počtu a velikosti skvrn Lyonová odhadla, že k umlčování jednoho ze dvou chromozomů X dochází náhodně a nezávisle až v pokročilejší fázi embryogeneze, kdy embryo je složeno z několika set buněk (**obr. 8.1**). Je zajímavé, že pokud má samičí organizmus více kopií chromozomu X, jsou všechny – vždy s výjimkou jednoho – inaktivovány („pravidlo n-1“). Znamená to tedy, že u samců a sameček je úroveň X-produktů ve srovnání s autozomy na poloviční (haploidní) úrovni. Recentní kvantitativní čipová studia však naznačují, že i jediný funkční chromozom X má vyšší hladiny produktů, tj. přibližně stejné, jako u produktů kódovaných autozomy.



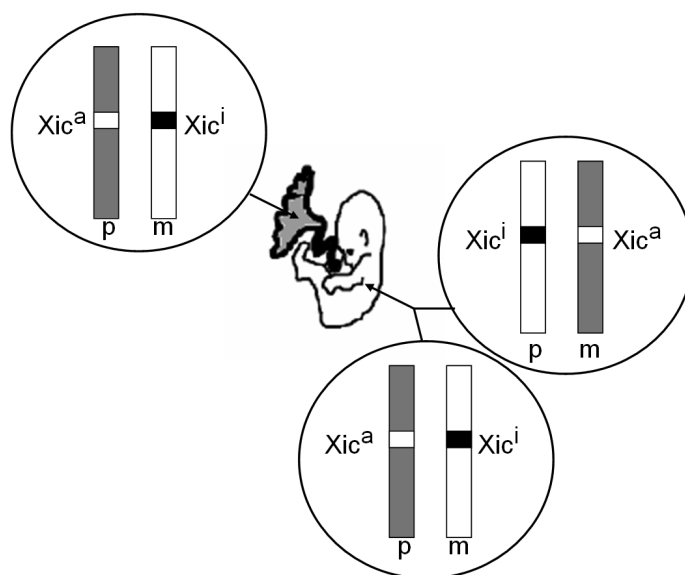
**Obr. 8.1** Demonstrace náhodné inaktivace chromozomu X u ženy (podle Goodwina, 1991). K této inaktivaci dochází v mnohobuněčném embryu náhodně, tedy bez ohledu na maternální či paternální původ chromozomu X, výsledkem je mozaikový fenotyp exprese genů vázaných na chromozom X u samic. Na obrázku je lokalizace oblastí dědičné X-vázané kožní choroby (*anhidrotic ectodermal dysplasia*, mutace X-genu způsobuje absenci potních žláz) u tří generací žen. Lokalizace mutantních tkání jsou náhodné, vznikají vždy mozaiky, avšak odlišné u jednotlivých žen.

Inaktivace chromozomu X je vývojově regulována. V časném období embryogeneze jsou oba chromozomy X aktivní. Když dochází k inaktivaci jednoho chromozomu X u samic savců je stejná pravděpodobnost, že bude inaktivován X paternálního původu ( $X^p$ ) či maternálního původu ( $X^m$ ). Chromozom X je však podobně jako autozomy imprintován: buňka tedy může rozlišit, zda se jedná o paternální nebo maternální X. V některých případech také dochází k výhradní **inaktivaci paternálního chromozomu X** a zřejmě je to evolučně původnější typ dávkové kompenzace, dodnes fungující u klokanů (**obr. 8.2**). K preferenční inaktivaci paternálního chromozomu X dochází také v preimplantačním stádiu myšičího embrya. Tato inaktivace je pak v samotném vlastním embryu reaktivována, zůstává však v extraembryonálním **trofektodermu** (část placenty odvozená ze zygoty). Pokud se týká chromozomu X je tedy placenta díky imprintingu pod maternální kontrolou (**obr. 8.3**). K aktivaci paternálního chromozomu X dochází také v primordiálních zárodečných buňkách, což je nutné k zajištění funkce chromozomu X v oocytech.



**Obr. 8.2** Evoluce a srovnání mechanismů inaktivace chromozomu X u samic vačnatců a placentálních savců. K oddělení vývojových větví vačnatců a savců došlo asi před 150 milióny let. Pozdní replikace DNA inaktivního chromozomu X a hypoacetylace jeho nukleozomálních histonů jsou mechanismy vývojově starší, které se vyskytují u obou větví. Náhodnost inaktivace maternálního či paternálního X a hypermetylace DNA inaktivního X se vyvinuly pouze u placentálů. Dalšími rozdíly inaktivace X u vačnatců a placentálů jsou především nestabilita, tkáňová specifita a neúplná inaktivace u vačnatců (není možné pozorovat Barrovo tělísko).

Genetické analýzy prokázaly, že inaktivace chromozomu X je iniciována klíčovým lokusem známým jako **X-inaktivační centrum** (*Xic*, *X inactivation center*). Tento lokus zásadně působí v pozici *cis*, tedy inaktivuje jen chromozom X, na kterém se nachází (**obr. 8.3**). Lokus se transkribuje v **nekódující RNA**, která se nazývá *Xist* (*X inactive specific transcript*). Tato velká molekula RNA má schopnost vázat se a šířit po chromozomu X. V případě imprintového umlčování paternálního chromozomu X byla prokázána přítomnost represivní značky v X-inaktivačním centru maternálního chromozomu. V případě náhodného umlčování se spekuluje o tom, že ve všech buňkách je blokována jedna alela lokusu *Xic*, čímž je vyznačen jediný aktivní chromozom X. Všechny ostatní přítomné alely *Xic* zůstávají expri-movány, čímž způsobují umlčování příslušných chromozomů X, na kterých se nacházejí. Byl objeven i protismyslový regulátor lokusu *Xic*, který se nazývá *Tsix* (písmena v obráceném pořadí jako *Xist*), který spouští syntézu RNA, jež eliminuje *Xist* RNA. Chromozom X, který by nesl delecii v promotoru *Tsix*, pak bude preferenčně inaktivován. Podle dnešních poznatků není sporu o tom, že primární událostí inaktivace chromozomu X je *Xist* RNA. Je prokázáno, že *Xist* je aktivní pouze na umlčeném chromozomu X a že tato RNA je tvořena před X-inaktivací. *Xist* RNA je zřejmě iniciátorem X-umlčování a heterochromatinizace, zatímco jeho udržování v následných buněčných liniích je realizováno jinými epigenetickými procesy.



**Obr. 8.3** Náhodná a nenáhodná (imprintovaná) inaktivace chromozomu X u samic placentálních savců. V trofektodermu (placentě, vlevo) je vždy inaktivován X paternálního původu, zatímco ve vlastním embryu (vpravo) dochází v průběhu gastrulace k náhodné inaktivaci buď paternálního či maternálního X. Inaktivace začíná syntézou RNA z lokusu *Xic* příslušného umlčovaného chromozomu. Když je *Xic* aktivní (*Xic*<sup>a</sup>, na obrázku bíle), chromozom X je inaktivován (vybarven šedě). Pokud se *Xic* neaktivuje (*Xic*<sup>i</sup>, vybarven černě), chromozom X zůstává aktivní (vybarven bíle).

O inaktivovaném chromozomu X se říká, že je **fakultativně heterochromatický**. V interfázi je pozorovatelný jako kondenzované Barrovo tělísko a replikuje se v pozdní S-fázi buněčného cyklu. Imunobarvení metafázních chromozomů jasně prokazují, že inaktivní X má výrazně nižší hladinu acetylace všech základních nukleozomálních histonů, což je důkazem transkripční inhibice. Dalším potvrzením heterochromatinizace je di- a tri-metylace lyzinu v pozici 9 histonu H3, což je obecně markerem umlčování chromatinu. Na tuto modifikaci histonu se váže také heterochromatinový protein HP1. Bylo též prokázáno, že v časném stádiu inaktivace se vyskytuje další represivní marker – metylace lyzinu 27 v histonu H3. Na inaktivním chromozomu X byly také identifikovány histonové varianty, jako

například makroH2A. Teprve po těchto procesech přicházejí metylace DNA. Celkově však metylace cytozinu na umlčeném X není příliš vyšší než v ostatním genomu s výjimkou většiny CpG ostrovů, které souvisejí s promotory genů a jsou na inaktivním X hypermetylovány. Lze tedy konstatovat, že na umlčování X se podílí celá řada epigenetických mechanismů, z toho většina funguje také v konstitutivním heterochromatinu.

Inaktivace jednoho chromozomu X u samic savců je **reverzibilní proces**. Umlčený X je pravidelně reaktivován v samičích primordiálních zárodečných buňkách. Tato reaktivace koreluje se ztrátou tvorby Xist a ostatních epigenetických markerů heterochromatinizace. K reaktivaci X dochází také po přenosu jádra samičí somatické buňky do neoplozeného vajíčka. K inaktivaci X pak dochází až po invaginaci embrya do dělohy matky, jako při standardním vývoji.

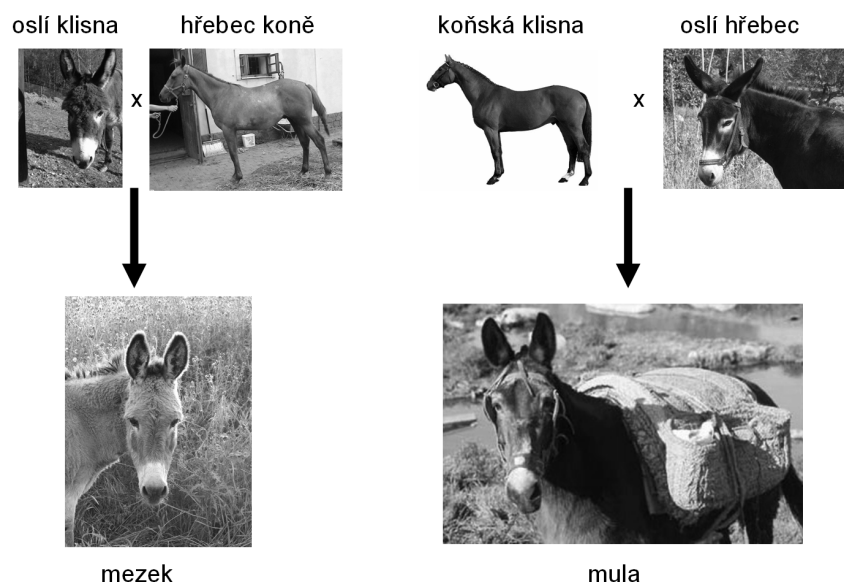
### 8.3 Genomový imprinting

Genomový (také zvaný parentální či gametický) imprinting je zákonitým procesem **pohlavně specifické modifikace** několika desítek lokusů savčího genomu. Dosud bylo u savců identifikováno asi 85 takových lokusů; bioinformatičtí však odhadují, že jich je v genomu několik set. Jde o reverzibilní událost, kdy tato epigenetická modifikace genů v parentální generaci vede k funkčním rozdílům mezi paternálními a maternálními geny (alelami) v potomstvu. Znamená to tedy, že alespoň u savců neplatí, že paternální a maternální informace jsou ekvivalentní. Experimentálně to bylo ověřeno v roce 1984, kdy byly provedeny experimenty s **mikroinjekčním přenosem jader** do myšičího oocyty – Davor Solter a Azim Surani (**obr. 2.5**). Jediná kombinace jader v zygotě vedla ke zdárnému vývoji jedince: jádro oocyty + jádro spermie. Gynogenetická embrya obsahující dvě jádra oocyty se do jisté míry vyvíjela normálně, avšak dysfunkce placenty vedla k abortu. Naopak androgenetická embrya se dvěma spermatickými jádry se od počátku špatně vyvíjela, i když placenta byla dobře vyvinuta.

Termín imprinting se ovšem užívá i širěji: zejména je známý tzv. filální imprinting v etologii, který u některých živočišných druhů popisuje stav, kdy čerstvě narozený jedinec si na první pohled zafixuje své rodiče. Nás bude zajímat jen **genomový imprinting**, který vlastně představuje určité značky na chromozomech, které v další generaci umožní jedinci realizovat paternální a maternální genomový příspěvek. Imprintovány mohou být celé genomy, nebo jen některé chromozomy. Termín imprinting poprvé použila Helen Crousová v roce 1960 k popisu rodičovských rozdílů mezi chromozomy mouchy smutnice, kde dochází k částečné eliminaci paternálních chromozomů X (viz kapitola 6.3). Také u červců pozoroval již v roce 1964 Uzi Nur **heterochromatinizaci paternálních chromozomů**. Genomový imprinting *strictu senso* se uplatňuje jen u savců, ale v širším slova smyslu jej nacházíme i u některých jiných eukaryot – zejména krytosemenných rostlin (viz kapitola 7.7) a hmyzu. Odlišná epigenetická informace otce a matky způsobuje, že imprintované alely se dědí nemendelisticky: neplatí pravidlo o identitě reciprokových křížení. Nejpopulárnějším příkladem tohoto jevu je křížení osla a koně, prováděné Araby již v dobách před naším letopočtem. Jde o mezidruhovému křížení, které vede k odlišným fenotypům v závislosti na pohlaví rodiče. Křížením oslí klisny a koňského hřebce vzniká mezek; křížením koňské klisny a oslího hřebce vzniká mula. Jedinci mohou být samčí nebo samičí, ve všech případech jsou však hybridy sterilní. Podstatné je, že mezek a mula se významně odlišují svým tělem i chováním (**obr. 8.4**). V obou případech jsou však hybridy vždy více podobní své matce než otci. Mezci a muly

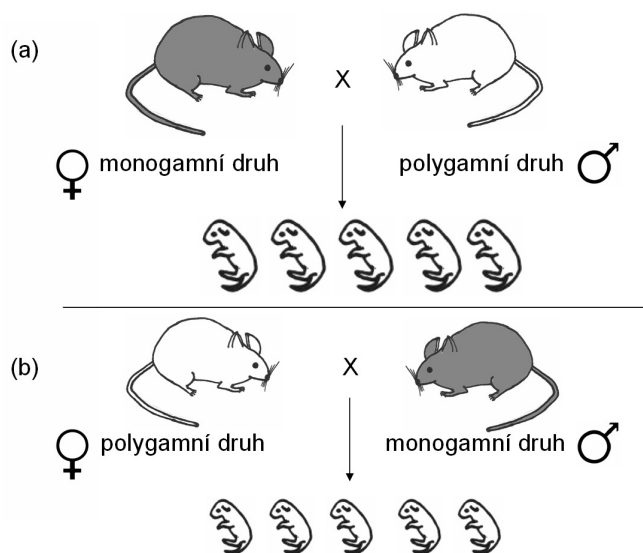


však nejsou zcela správným příkladem imprintingu: jde o mezidruhové křížení, kdy embryo a plod je výrazněji pod metabolickým i hormonálním vlivem matky.



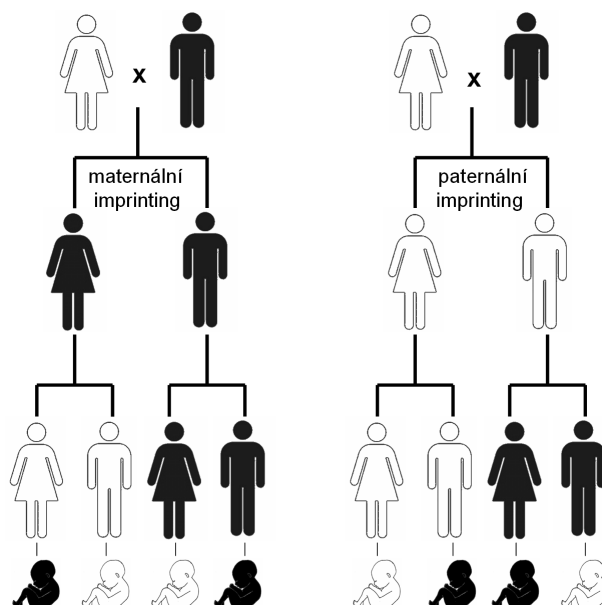
**Obr. 8.4** Neekvivalentní reciproká křížení mezi koněm a oslem. Jsou tradována jako příklady genomového imprintingu. Jde však o mezidruhová křížení, takže příčin rozdílnosti výsledků podle směru křížení (otec versus matka) může být více.

Ještě před prudkým rozvojem moderní epigenetiky v 80. letech minulého století došlo k dalším pozorováním, která naznačovala existenci **specifických parentálních efektů**. Například Wallace Dawson v Ohiu v roce 1965 zjistil, že velikost těla mezidruhových hybridů myši v rámci rodu křeččík (*Peromyscus*) závisí na směru křížení. Klíčovým rozdílem mezi těmito druhy je skutečnost, že křeččík dlouhoocasý (*P. maniculatus*) je polygamním druhem, zatímco křeččík bělonohý (*P. polionotus*) je monogamní. Polygamní chování má za následek, že v těle matky se mohou současně vyvíjet embrya více otců, kteří mohou mít i odlišnou rychlost růstu. Vzhledem k tomu je třeba, aby matka v průběhu vývinu embrya a plodu měla možnost tyto vývojové procesy regulovat a srovnávat. Pokud bylo provedeno křížení monogamního druhu jako matky s polygamním druhem (tedy *P. polionotus* × *P. maniculatus*), nebylo potomstvo v těle matky pod řádnou kontrolou a křeččíci se rodili s nadměrným vzrůstem. Při reciprokém křížení (*P. maniculatus* × *P. polionotus*) byla polygamní matka schopna regulovat vývin embryí a křeččíci se rodili v přiměřené velikosti. Z toho je zřejmé, že u polygamního druhu se evolučně vyvinul maternální mechanismus regulace embryogeneze, zatímco u monogamního druhu k tomu nebyl důvod (**obr. 8.5**). Později byly tyto závěry podpořeny teorií parentálního konfliktu Davida Haiga. U rostlin byl imprinting prokázán v endospermu, nejprve v 70. letech minulého století v aleuronu kukuřice (například v lokusu *R/r*), o dvacet let později i u *Arabidopsis* (gen *Medea*). V roce 1971 George Sharman z Austrálie prokázal, že u samic vačnatců je vždy inaktivován paternální chromozom X, a to i v embryonální linii. Znamená to, že chromozom X musí být imprintován; paternální X musí nést nějakou identifikační značku, která jej v embryogenezi rozezná od maternálního, a vede k jeho umlčení.

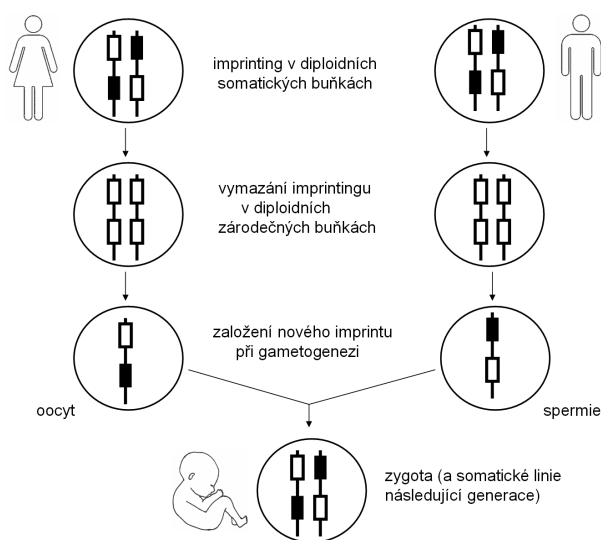


**Obr. 8.5** Neekvivalentní reciproká křížení mezi dvěma druhy křečička: monogamním druhem křečička bělonohého (*Peromyscus polionotus*) a polygamním druhem křečička dlouhoocasého (*P. maniculatus*). (a) U monogamního druhu se evidentně nevyvinul imprintový mechanismus maternální kontroly vývoje, neboť potomstvo křížení s polygamním druhem je nadměrně vyvinuté. (b) U polygamního druhu se vyvinul mechanismus, kterým samice srovnává a reguluje vývoj potomstva, které se vyvíjí v jejím těle: potomstvo má přiměřenou velikost těla.

**Teorie parentálního konfliktu** (*parent-offspring conflict*) Davida Haiga uvedená v roce 1991 představuje zřejmě jediné racionální vysvětlení evoluce imprintingu. Je také nazývána válkou pohlaví (*battle of sexes*) nebo „přetahování se lanem“ mezi matkou a potomstvem v děloze (*tug of war between mother and progeny in utero*). U savců se embryo vyvíjí v těle matky a jeho vývoj musí být přiměřený. Podle Haigovy teorie je zájmem otce, aby jeho potomci přicházeli na svět co nejsilnější, aby měli větší šanci přežít. Naopak zájmem matky je, aby (zejména v případě polygamie) se všechno její potomstvo vyvíjelo stejně a aby těhotenství vážněji nenarušilo její zdraví a umožnilo jí i opakované mateřství. Bylo zjištěno, že některé z **paternálně exprimovaných lokusů** (a současně maternálně umlčených) výrazně podporují embryonální i postnatální růst, zatímco **maternálně exprimované lokusy** (současně i paternálně umlčené) jsou růstovými supresory. Genomový imprinting je tedy pohlavně specifické umlčování alel v závislosti na jejich rodičovském původu (**obr. 8.6**). Některé lokusy jsou exprimovány výhradně paternálně (= **maternální imprinting**), jiné výhradně maternálně (= **paternální imprinting**). Počet lokusů, které se podrobují specifickému umlčování, je u člověka zřejmě kolem jedné stovky (**tab. 8.1**). Říkáme, že imprinting u savců je reverzibilní proces: klíčovým vývojovým stádiem je gametogeneze (**obr. 8.7**). V průběhu gametogeneze je nejdříve vymazán původní imprint získaný od rodičů a posléze se vytváří nový, podle pohlaví příslušného jedince – paternální (při spermiogenezi) či maternální (při oogenezi). Tato informace přechází s gametou do potomstva, kde se kombinuje s informací od druhého pohlaví. Výsledný obraz genomového imprintingu zůstává v somatické linii savců až do smrti; k reverzi dochází výhradně v zárodečné linii. Imprinting je tedy závislý na pohlaví rodiče, ale není ovlivněn pohlavím potomstva (tedy nezáleží na tom, jde-li o syny nebo dcery, **obr. 8.6**).



**Obr. 8.6** Základní schéma fenotypového projevu parentálního genomového imprintingu na abstraktním příkladu dědičnosti exprese genu kódujícího kožní pigment u člověka. Vlevo je zobrazen imprinting maternálního lokusu: alela mateřského původu (kódující bílý pigment) je v potomstvu synů i dcer umlčena, exprimuje se zde alela otcovská (černý pigment). Vpravo je příklad imprintingu paternálního lokusu: alela otcovského původu (černý pigment) je v potomstvu umlčena, projeví se pouze alela mateřská (bílý pigment). Jak je z obrázku zřejmé, záleží vždy na pohlaví rodiče, od kterého je alela zděděna a nezáleží na pohlaví potomka (sourozenci – syn a dcera – mají shodný imprinting). Imprinting je reverzibilní v zárodečné linii, kdy se původní rodičovský záznam vymaže a vzniká nový podle pohlaví příslušného jedince.



**Obr. 8.7** Cyklický průběh imprintingového procesu. Původní rodičovský imprinting se vymazává v diploidních buňkách zárodečné dráhy a v zápětí vzniká nový (maternální či paternální) při gametogenezi. Zygotický imprinting zůstává zachován v somatických liniích jedince po celý život, zatímco v jeho zárodečné dráze je opět revertován.

organismus	gen	aktivní alela	funkce
člověk	<i>WT1</i>	mateřská	nádorový supresor
	<i>IGF2</i>	otcovská	růstový faktor
	<i>H19</i>	mateřská	nekódující RNA
	<i>ZNF127</i>	otcovská	transkripční faktor
	<i>SNRPN</i>	otcovská	sestřih hn-RNA
	<i>PEG1</i>	otcovská	hydroláza
	<i>IPW</i>	otcovská	nekódující RNA
	<i>P57</i>	mateřská	inhibitor cyklin-dependentní kinázy
myš	<i>Igf2</i>	otcovská	růstový faktor
	<i>H19</i>	mateřská	nekódující RNA
	<i>Mash2</i>	mateřská	tvorba spongiofoblastu
	<i>Ins1, 2</i>	otcovská	růstové faktory
	<i>Gnas1</i>	otcovská	signalizační faktor
	<i>Mas</i>	otcovská	angiotenzinový represor
	<i>Peg1</i>	otcovská	hydroláza
	<i>Peg3</i>	otcovská	transkripční faktor
	<i>Snrpn</i>	otcovská	sestřih hn-RNA
	<i>P57kip2</i>	mateřská	regulace buněčného cyklu
	<i>Xist</i>	otcovská (jen v placentě)	RNA způsobující X-inaktivaci
	<i>Znf127</i>	otcovská	transkripční faktor

**Tab. 8.1** Příklady některých imprintovaných genů u savců

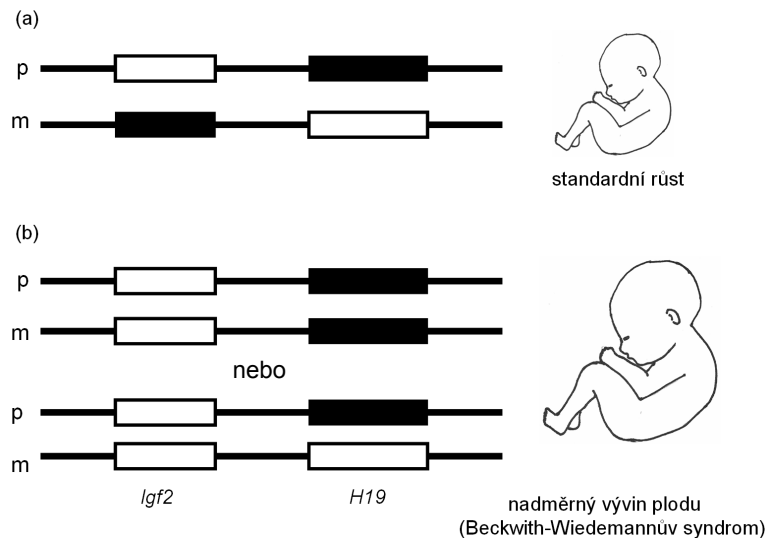
Existuje ovšem i řada jiných teorií, které vysvětlují evoluci imprintingu. Imprinting je považován za mechanismus, který kontroluje **pohlavní rozmnožování**, které je jistě výraznou evoluční silou. Jde o zabránění partenogenezi, která je celkem běžná u řady nižších živočichů a především rostlin. Podobně to platí i pro jednotlivé chromozomy. Vzhledem k tomu, že prakticky každý chromozom je u savců paternálně i maternálně imprintován, projeví se jeho nepřítomnost či nadpočetnost jako těžký, obvykle letální růstový hendikep. Imprinting tedy hlídá, aby každá zygota obsahovala právě jednu sadu paternálních a jednu sadu maternálních chromozomů. Jiné teorie zdůrazňují především skutečnost, že bez imprintingu a maternální kontroly by hrozilo v těhotenství vysoké nebezpečí tvorby nádorů v samičí zárodečné dráze a především v placentě. Diskutuje se také o tom, že genomový imprinting mohl vzniknout náhodně v rámci obranného boje proti parazitickým sekvencím DNA, jako jsou transpozony nebo viry. Tyto sekvence bývají často umlčovány, zejména metylací DNA, a imprintované geny, které se nacházely v těsném sousedství mohly být inaktivovány pozičním efektem heterochromatinu.

Imprintované geny jsou vysoce **konzervativní**; stejné imprintované geny můžeme najít u různých druhů savců (jako například u člověka a myši, **tab. 8.1**). Evolučně vznikl poměrně recentně asi před 180 miliony let při rozvoji savců. Nachází se u **placentálních savců a vačnatců**, nikoli však u vejcorodých savců – protože u nich se embryo vyvíjí mimo tělo matky. Imprintované geny nejsou na chromozomech

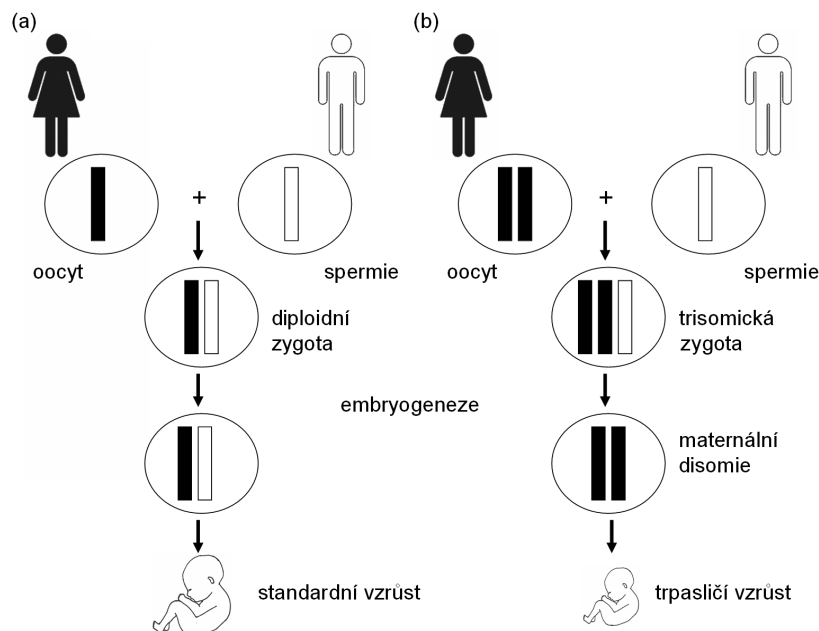
rozmístěny zcela náhodně, ale bývají lokalizovány ve **shlucích**. Je přitom zajímavé, že tyto oblasti, velké řádově stovky tisíc kilobází, obsahují geny s reciprokým imprintem: tedy paternálním i maternálním. Tyto oblasti můžeme považovat za jakési kontrolní body na chromozomech, které mají zaručovat správný vývin embrya. Odlišná exprese sousedních genů (aktivace versus inaktivace) na jednotlivých chromozomech je zajišťována funkcí tzv. **chromatinových izolátorů** (*chromatin insulator*). V oblasti mezi imprintovanými geny se nacházejí sekvence bohaté na CTC, kde cytozin může být metylován v závislosti na pohlaví rodiče, od kterého pocházejí, a v tom případě brání vazbě určitého proteinu, čímž brání v expresi sousedního genu. To je příklad nejznámější dvojice imprintovaných vázaných genů na chromozomu 11 u člověka – paternálně exprimovaného genu *Igf2* a maternálně exprimovaného lokusu *H19*.

Vyšší organizmy jsou obvykle diploidní. Diploidie, tedy funkční přítomnost dvou alel stejného genu, je obvykle dostatečnou pojistkou pro zajištění patřičné genové funkce. Imprinting však přináší pro lokusy nebezpečnou **funkční haploidii**: je u nich vždy nastavena inaktivace jedné – paternální nebo maternální – alely. K nastavení imprintingu dochází při gametogenezi a je revertováno výhradně až v gametogenezi další pohlavní generace. Pokud se imprintovaná alela setká v zygote s druhou alelou mutovanou, může se stát, že ani jedna alela příslušného lokusu nebude funkční. To samozřejmě vede k těžkým vývojovým vadám. Podobně nebezpečná je i chyba imprintingu, která vede k tomu, že alela, která má být umlčena, inaktivována není. Potom nastane nesprávná bialelická exprese tohoto lokusu, která opět může mít za následek těžkou vývojovou poruchu. Funkční haploidie je tedy cenou, kterou savčí organizmus platí za genomový imprinting.

Asi nejlepším příkladem antagonistického působení maternálně a paternálně imprintovaných genů jsou nadměrný vývin plodu (gigantismus) – Beckwith-Wiedemannův syndrom a trpasličí vývin zvaný Russel-Silverův syndrom (nanismus). Kauzální příčiny těchto chorob jsou různé od chybného imprintingu, přes delece částí maternálního či paternálního chromozomu až po uniparentální dizomii. U **Beckwith-Wiedemannova syndromu** (BWS, obr. 8.8) jde o genový shluk o velikosti asi 1 Mb zahrnující 12 maternálně nebo paternálně imprintovaných lokusů v oblasti p15.5 chromozomu 11. Jde o dvě imprintovaná centra oddělená neimprintovanou oblastí. Jedno z těchto center zahrnuje reciproce imprintovaný lokus *H19* a gen kódující inzulinový růstový faktor *IGF2*. Lokus *H19* je maternálně aktivní a kóduje netranslatovanou pol II RNA, zatímco *IGF2* je aktivní paternálně a kóduje růstový faktor. Ve svém důsledku má maternální faktor *H19* růst potlačující efekt a *IGF2* paternální efekt růst podporující. Tato vyváženost parentálních efektů hraje významnou úlohu v balancovaném rozvoji embrya a plodu. Pokud nastane převaha paternálního faktoru nebo umlčení maternálního supresoru nastává nadměrný růst často provázený i nádorovým bujením obvykle vedoucí ke smrti. Vítězství zájmů otce – maximální vývin jeho potomstva – tedy končí jeho zánikem. Jistým opakem BWS je choroba trpasličího vzrůstu **Russel-Silverův syndrom** (RSS, obr. 8.9). Příčin tohoto růstového potlačení spojeného s malým vzrůstem a asymetrií hlavy může být mnoho. Nejčastěji je uváděna maternální dizomie (maternální UPD) chromozomu 7. Tento imprintovaný chromozom je v případě maternální UPD přítomen ve dvou výhradních kopiích a způsobuje nevyváženou převahu maternálních růstových supresorů. RSS může být také způsoben chybou imprintingu oblasti p15.5 chromozomu 11. Chybný imprinting může mít za následek opět převahu maternálních supresorů: například bialelickou expresi *H19* nebo pokles exprese paternálního faktoru *IGF2*. Lze konstatovat, že Beckwith-Wiedemannův syndrom a Russel-Silverův syndrom představují jasný příklad platnosti teorie parentálního konfliktu mezi paternálními a maternálními zájmy.

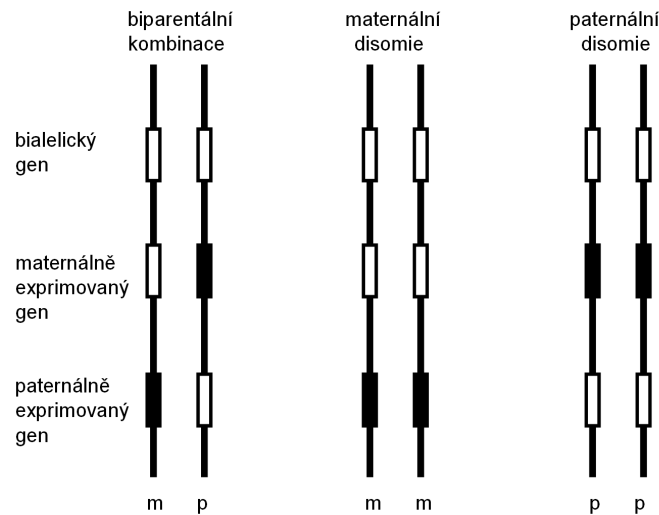


**Obr. 8.8** Beckwith-Wiedemannův syndrom, tj. nadměrný fetální růst následovaný nádorovým bujením v dětském věku, je výsledkem chybné exprese rodičovských alel imprintovaného genového shluku v oblasti p15.5 chromozomu 11: paternální alely *IGF2* (kódující *insulin-like growth factor II*) a maternální alely *H19* (kódující mRNA, která zřejmě není translatována; její funkce spočívá v potlačování růstu embrya) v oblasti p15.5 chromozomu 11. Světle jsou vyznačeny alely aktivní, tmavě vyplněné symboly alel znázorňují jejich inaktivitu (často provázenou metylací DNA). Jde o demonstraci úlohy genomového imprintingu v parentálním konfliktu. (a) Správný imprinting obou lokusů vede k přiměřenému vývinu embrya. (b) Zvýšená exprese paternálního faktoru *IGF2* provázena případně i úplným potlačením transkripce lokusu *H19* vede k nadměrnému vývinu potomstva.



**Obr. 8.9** Častou příčinou těžkých psychomotorických vývojových vad je uniparentální dizomie. (a) Řádný vývoj nového jedince nastává po splynutí haploidního genomu oocytu s genomem spermie. Zygota i následně embryo a jedinec jsou diploidní s jednou úplnou sadou imprintovaných maternálních a jednou sadou paternálně imprintovaných chromozomů. (b) Při aberantní meióze (na obrázku samiči) vzniká aneuploidní oocyt s jedním nadpočetným chromozomem. Pokud je tento oocyt oplozen, vzniká trisomické embryo. V průběhu jeho vývoje bývá při mitóze jedna ze tří kopií chromozomu vyředěna a může se stát, že v genomu zůstanou dva chromozomy původem od jednoho rodiče (na obrázku maternální dizomie), které nezaručí funkci imprintovaného chromozomového páru. Příkladem maternální dizomie je Russell-Silverův syndrom (chromozom 7).

Většina genů savčího genomu je přítomna ve dvou funkčních kopiích (bialelická exprese), i když obvykle jen jediná alela je dostatečná k zajištění příslušné funkce. **Uniparentální dizomie**, obvykle primárně způsobená nondisjunkcí chromozomů při gametogenezi, není pro bialelicky exprimované geny nebezpečná: obě alely by měly být aktivní bez ohledu na původ chromozomu (**obr. 8.10**). Jinak je tomu v případě imprintovaných lokusů. Maternální dizomie určitého chromozomu nastavuje dvojnásobnou expresi maternálně exprimovaných lokusů a absenci paternálně exprimovaných lokusů, což může ústít v růstovou supresi. Naopak přítomnost dvou kopií paternálního chromozomu vede k absenci exprese maternálních genů a nadprodukcii paternálních faktorů. Výsledkem uniparentální dizomie je tak nevyváženost paternálních a maternálních vlivů, která obvykle vede k těžkým vývojovým vadám.

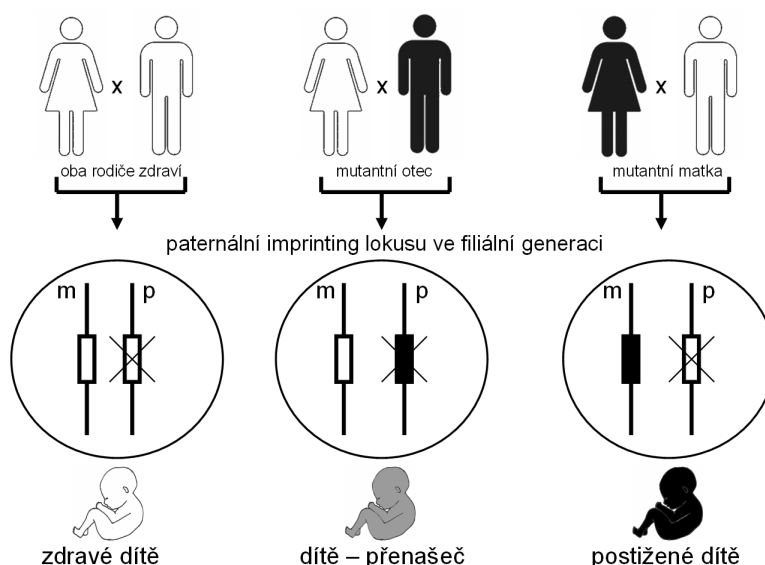


**Obr. 8.10** V savčím genomu můžeme najít tři skupiny genů: geny s (potenciálně) bialelickou expresí (těch je evidentně nejvíce, kolem 25 000 lokusů) a geny exprimované výhradně maternálně nebo paternálně (dohromady je jich dosud známo jen kolem stovky). Pokud nastane správná zygotická kombinace maternálního (m) a paternálního (p) chromozomu (vlevo), je zaručena exprese jak bialelických, tak i imprintovaných genů. Pokud nastává maternální dizomie (uprostřed) nebo paternální dizomie (vpravo), exprese bialelického genu není ohrožena, ale dochází k fatálnímu vypnutí či nadprodukcii imprintovaných lokusů.

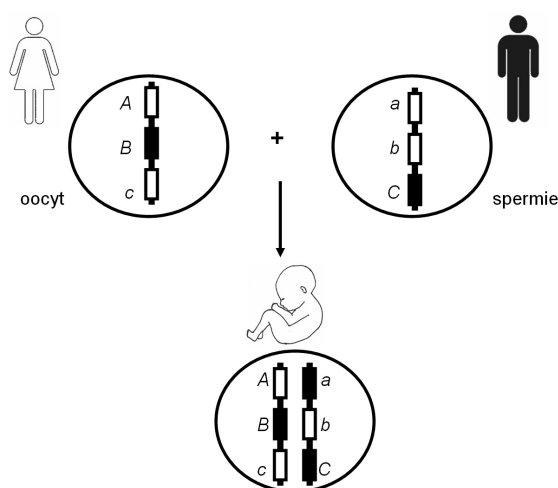
Při projevu postižení či při přenosu choroby hrají roli **genetické i epigenetické faktory**. Pokud je mutací zasažena alela, jejíž lokus je imprintován, může dojít i při recesivním charakteru mutace k jejímu projevu již v následující filiální generaci (**obr. 8.11**). Záleží na tom, od kterého rodiče mutovaná alela pochází a jak je tento lokus imprintován. Na uvedeném obrázku je znázorněna dědičnost a fenotypový projev paternálně umlčovaného genu. Mutovaná alela paternálního původu je v potomstvu umlčena, tudíž se nemůže projevit: tito jedinci jsou však **přenašeči choroby**, protože dcery z této generace mohou mutovanou alelu zdědit a předat ji v aktivním stavu svým dětem. Pokud je mutovaná alela paternálně imprintovaného lokusu předávána do potomstva matkou, projeví se bezprostředně u synů i dcer v podobě postižení.

Lokusy savčího genomu tedy můžeme rozdělit na **mendelistické a imprintované (obr. 8.12)**. Při diagnostice a prognóze dědičnosti vrozených chorob tedy musíme uvažovat o tom, jak je který gen děděn. Komplikaci samozřejmě přináší **variabilní penetrance a expresivita**, které ovlivňují projev drtivě většiny genů, zvláště těch, které jsou epigeneticky labilní. U mendelistických genů obvykle rozhoduje o expresi vztah dominance a recesivity alel. U imprintovaných lokusů záleží jen na tom, od kterého rodiče alela přichází – paternální nebo maternální imprinting. Imprinting patří mezi **pravidelné (obligatorní) jevy** a jeho dysfunkce obvykle vede k letalitě embrya. Ve výjimečných případech však může být tolerována

a nastává exprese imprintovaného lokusu bez ohledu na pohlaví. Lokus *Axin-fused* (*Axin<sup>Fu</sup>*) u myši je maternálně imprintován, v potomstvu by se tedy vždy měla projevit jen paternální alela projevující se „zauzleným“ ocáskem (**obr. 8.13**). Vzhledem k tomu, že do tohoto lokusu přeskočil retroelement, který může být metylován a inaktivován, stal se lokus epigeneticky labilním. V potomstvu je tak možné identifikovat jedince s aktivní paternální alelou, jedince s aktivní maternální alelou a případně i jedince s oběma alelami aktivními i inaktivními.

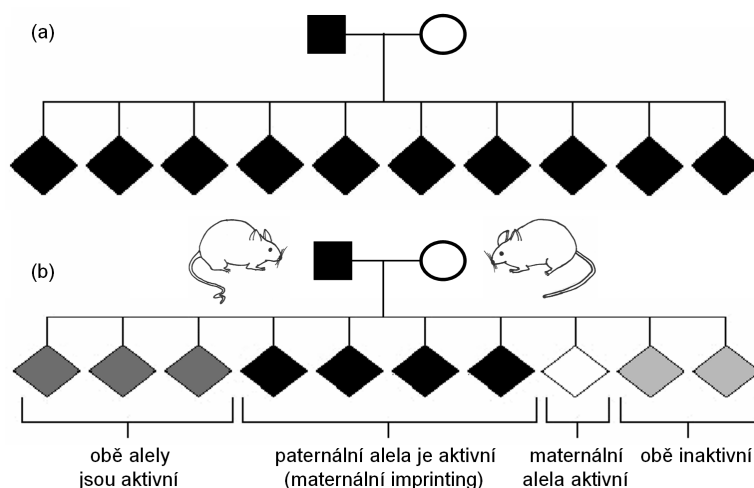


**Obr. 8.11** Dědičnost mutace paternálně imprintovaného lokusu v potomstvu člověka. Pokud jsou oba rodiče zdraví (vlevo), maternálně (m) zděděná alela se u dětí exprimuje a alela paternálního původu (p) je umlčena (křížek). Pokud je alela otce mutována (jako například bodovou mutací či delecí, uprostřed, vyznačena tmavě), v příští generaci se to neprojeví, protože tato alela je umlčena: dítě je však přenašečem choroby. Pokud je však mutována alela maternálního původu (vpravo), tato je v bezprostředním potomstvu díky paternálnímu imprintingu (jako jediná) exprimována a může se projevit fenotyp choroby – postižené dítě.



**Obr. 8.12** Při prognóze dědičnosti určitého znaku či choroby člověka je třeba znát, jestli je gen řízen mendelisticky (na obrázku lokus *A*) nebo imprintingem (na obrázku je maternálně imprintovaný lokus *B* a paternálně imprintovaný *C*). V případě mendelistického lokusu rozhoduje v potomstvu o expresi stav dominance a recesivity: v daném případě se projeví alela *A* od matky a otcovská alela *a* se jako recesivní neprojeví. V případě imprintovaných lokusů však dominance a recesivita alel nerozhodují. V případě lokusu *B* je maternální alela vždy inaktivována a projeví se tedy výhradně otcovská. Analogicky je tomu v případě lokusu *C*, který je imprintován paternálně. Funkční alely jsou značeny světle, nefunkční tmavě.



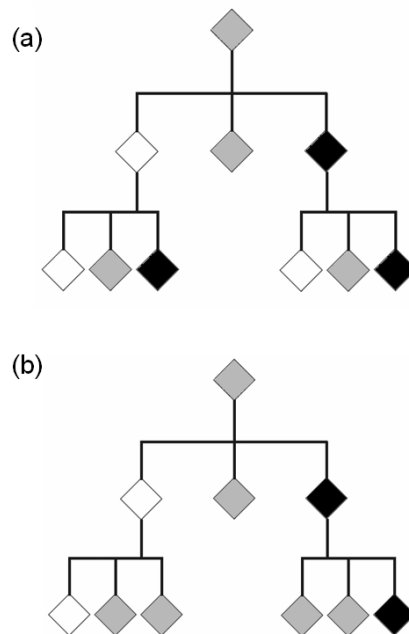


**Obr. 8.13** (a) Klasické schéma maternálního imprintingu. Otec (tmavě) předává všemu svému potomstvu (bez ohledu na jejich pohlaví, viz kosočtverce) svou exprimovanou alelu, je tedy vždy „dominantní“. (b) Labilní maternální imprinting lokusu *Axin-fused* (*Axin<sup>Fur</sup>*) u myši projevující se „zauzleným“ ocáskem. Tento lokus je původně maternálně imprintován, ve skutečnosti se však dědí s variabilní expresivitou paternálně i maternálně.

Základní vlastností imprintingu je jeho **cis-efekt**, imprinting tedy působí pouze na chromozom, kde je inaktivační signál funkční. Počátkem imprintingu tedy musí být epigenetický systém, který modifikuje jeden ze dvou parentálních chromozomů. Tato modifikace vede posléze k vazbě represorových proteinů podle pravidla „*write and read*“, kde primárním signálem („*write*“) jsou modifikace histonů a metylace DNA. **Metylace DNA** byly prvním mechanismem imprintingu, který byl od 90. let minulého století zkoumán. Byly identifikovány *de novo* DNA metyltransferázy, které jsou schopny vytvářet primární záznam imprintu při gametogenezi. Udržovací DNA metyltransferázy pak tuto epigenetickou informaci předávají při buněčných děleních. Methylace DNA mohou zajišťovat dvě základní funkce imprintingu: vytvářet specifickou značku k odlišení paternální a maternální kopie chromozomu a dále představovat signál pro genovou represi. V imprintovaných oblastech na metylace DNA navazují i **modifikace histonů**. Dochází především k rozsáhlým deacetylacím nukleozomálních histonů a poté ke tvorbě jejich represivních stavů (jako jsou například metylace H3 v lyzinech 9 a 27). Imprintované genové shluky jsou často provázeny lokusy odpovědnými za syntézu **protein-nekódující RNA** (*ncRNA*), které mají také regulační funkci, podobně jako krátké RNA účastníci se RNA interference.

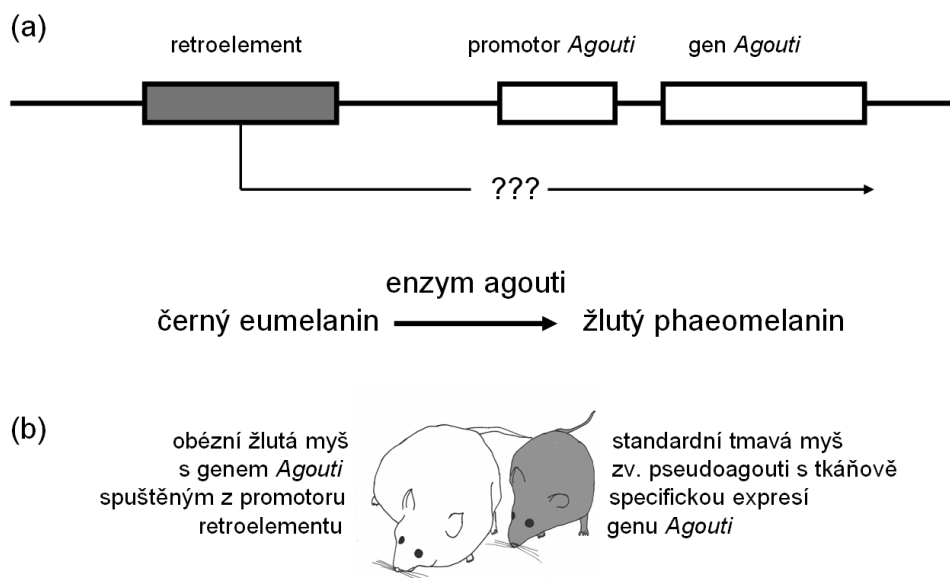
## 8.4 Dědičnost epigenetických změn

Vzhledem k časté variabilitě a proměnlivé penetranci je obtížné identifikovat, jakým způsobem se příslušný gen nebo fenotyp dědí. Jsou v zásadě tři možnosti. Již zmíněná **mendelistická dědičnost** je obvykle řízena dominancí či recesivitou příslušné alely (**obr. 8.12**). Druhou alternativou je **náhodnost exprese určitého genu**, která obvykle souvisí s velkou proměnlivostí a bývá způsobena vnějšími faktory nebo dynamickou aktivitou retroelementů (**obr. 8.14a**). Jak je z obrázku patrné, projevené fenotypy se nedědí. Bez ohledu na fenotyp rodiče se v další generaci opět projevuje variabilita v plné šíři. Příkladem této náhodné dědičnosti je průchod alely  $A^{y/y}$  skrze samčí zárodečnou dráhu u myši (viz **obr. 8.16a**). Třetí alternativou je částečná **dědičnost epigenotypu** (**obr. 8.14b**). Jak z obrázku vyplývá, epigenetická informace je (částečně) přenášena a exprimována v následné generaci. Fenotypový výběr z existující variability má vliv na potomstvo. Jedinci se světlým fenotypem budou mít vyšší frekvenci světlých potomků atd. Je to případ epigenetické dědičnosti při průchodu alely  $A^{y/y}$  skrze samičí zárodečnou dráhu.



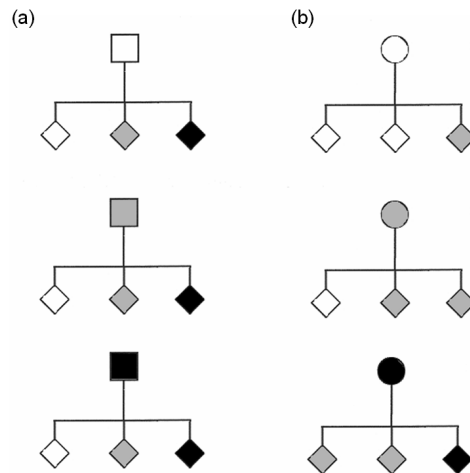
**Obr. 8.14** Expresivita znaku bývá často velmi variabilní (podle Whitelawové a Martina, 2001). (a) Příklad dědičnosti variabilního znaku, který je zřejmě ovlivňován environmentálně a nemá epigenetickou ani genetickou podstatu. Tedy bez ohledu na fenotyp rodiče se v dalších generacích stále (a v podobné četnosti) vyskytují všechny možné fenotypy. (b) Příklad epigenetické dědičnosti: znak má zjevně variabilní expresivitu, avšak s větší pravděpodobností se dědí rodičovský fenotyp (buď maternálně, nebo paternálně, nebo z obou rodičovských stran). Znamená to, že epigenetická informace o expresi určitého genu může být předávána do další generace.

Jedním z nejoblíbenějších modelů studia epigenetické dědičnosti je **gen *Agouti*** u myši, který odpovídá za barvu srsti. Kóduje enzym, který konvertuje černé barvivo eumelanin ve žlutý pheomelanin. Gen má vlastní promotor, který je orgánově i časově specifický: exprimuje se jen ve tvořících se chloupcích embrya, a to jen po krátkou dobu. Výsledkem je tmavá srst zvaná fenotyp **pseudoagouti** (černý chloupek se žlutým proužkem), tedy standardní fenotyp. Pokud není přítomna ani jedna funkční alela genu *Agouti*, myš bude mít černou srst. Pokud by došlo ke konstitutivní expresi genu *Agouti* z jiného promotoru, myš by byla žlutá a obézní (obezita díky ektopické expresi genu v jiných somatických buňkách). Podařilo se izolovat klon myši, kde **retroelement** náhodně přeskočil do 5'-blízkosti genu *Agouti* a učinil z něj epigeneticky labilní lokus. Tento retroelement je obranným systémem hostitele rozpoznáván a může být epigeneticky umlčen, jde především o metylaci DNA retroelementu. Retroelement má ovšem svůj vlastní promotor a pokud tento není umlčen, může fungovat jako spouštěč exprese přilehlého genu, v tomto případě *Agouti* (**obr. 8.15**). Je významné, že epigenotypy mají variabilní expresivitu a podobně jako v případě pozičního efektu u drozofily, v podstatě každá buňka embrya činí své vlastní rozhodnutí o umlčení retroelementu: výsledkem tedy není jen tmavá či žlutá myš, ale celé barevné (a skvrnitě) spektrum myší srsti podle rozsahu a doby umlčení.



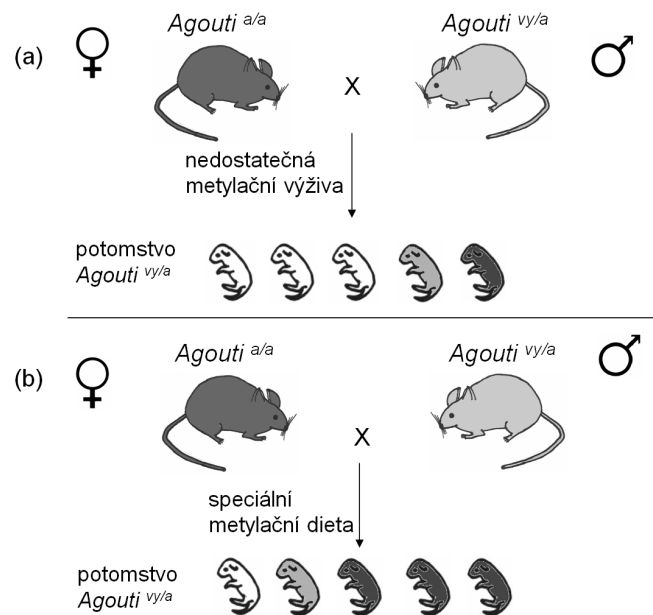
**Obr. 8.15** Modelový gen *Agouti* u myši, který řídí barvu srsti (podle Morgana et al., 1999). Kóduje enzym katalyzující tvorbu žlutého phaeomelaninu z černého eumelaninu. Gen *Agouti* je exprimován jen po krátkou dobu v embryogenezi, takže chloupek srsti je převážně černý se žlutým proužkem (fenotyp zvaný pseudoagouti). (a) Pokud se v blízkosti lokusu *Agouti* objeví retroelement, může spustit gen *Agouti* ektopicky ze svého promotoru: myš pak bude žlutá a obézní (b). Pokud je retroelement metylován, nastává reverze ke standardnímu fenotypu pseudoagouti.

Pokud získáme spektrum barvy myši srsti způsobené částečným umlčováním blízkého retroelementu, můžeme s odlišnými fenotypy provádět křížení a sledovat tak **dědičnost epigeneticky řízeného stavu**. Nejprve ale bylo nutné izolovat linii, kdy by se neprojevovala obezita žluté myši, neboť tato vedla k mortalitě: výsledkem je linie zvaná *Agouti viable yellow*, *Agouti<sup>vy</sup>*. Myši s heterozygotním genotypem *Agouti<sup>vy/a</sup>* různé barvy srsti jsou vždy kříženi s partnerem, který má mutované obě alely *Agouti* (*Agouti<sup>a/a</sup>*, tedy černá srst). Ke křížení byly vybírány odlišné fenotypy a byla sledována i dědičnost v závislosti na pohlaví rodiče. Výsledky ukázaly velké rozdíly v barvě srsti myšího potomstva v závislosti na tom, zda epigeneticky labilní lokus byl přenášén z otce nebo z matky (**obr. 8.16**). V potomstvu byly samozřejmě sledováni jen jedinci, kteří od rodiče získali alelu *Agouti<sup>vy</sup>* (50 % potomstva od heterozygotního rodiče získá alelu *Agouti<sup>a</sup>*). Pokud byla sledována srst potomstva odlišně zbarvených otců (s různě metylovaným retroelementem: žlutých, skvrnitých či tmavých, **obr. 8.16a**), nebylo shledáno žádných rozdílů: všichni otcové měli stejně variabilní potomstvo, fenotyp se tedy paternálně nedědil. Jinak tomu bylo u samic: žluté samičky *Agouti<sup>vy/a</sup>* (nemetylované) měly výrazně vyšší podíl žlutého (nemetylovaného) potomstva *Agouti<sup>vy/a</sup>*, zatímco tmavé samičky (metylované) měly vyšší četnost tmavého (metylovaného) potomstva. Jde tedy o epigenetickou dědičnost maternálního lokusu (**obr. 8.16b**): v širším kontextu lze hovořit o **lamarckistické dědičnosti získaného fenotypu**. Je nutné zdůraznit, že všechny studované myši měly stejný genotyp (*Agouti<sup>vy/a</sup>*), avšak často rozdílný a proměnlivý fenotyp. Další studie pak ukázaly, že ostatní faktory, jako je prostředí dělohy matky či maternální cytoplazma, tuto epigenetickou dědičnost neovlivňují. Naopak, další křížení žlutých heterozygotních samic s homozygotně recesivními samečkami vedlo ještě k vyšší frekvenci žlutých myši v potomstvu (zesilovací efekt). Z hlediska zárodečné dráhy lze konstatovat, že maternální dráha je tolerantnější vůči epimutacím, neboť umožňuje přenos informace (metylace/demetylace) z matky na potomstvo. Samčí zárodečná dráha je evidentně striktnější, zřejmě otcův metylační záznam vymazává.



**Obr. 8.16** Epigenetická dědičnost alely *Agouti Viable Yellow* ( $A^{vy}$ , podle Morgana et al., 1999). Jde vždy o křížení mezi heterozygotním jedincem *Agouti*  $^{vy/a}$  a recesivním homozygotem *Agouti*  $^{a/a}$ , kde  $a$  znamená nefunkční alelu. (a) Pokud jsou heterozygotní samečci vybíráni podle fenotypu (nahore žlutí, uprostřed skvrnití, dole tmaví), je jejich potomstvo nesoucí alelu *Agouti*  $^{vy}$  stále stejné s podobnou frekvencí žlutých, skvrnitých a tmavých jedinců: epigenetický stav lokusu *Agouti*  $^{vy}$  se tedy paternálně nedědí. (b) Jinak je tomu v případě, že budeme sledovat potomstvo heterozygotních samic *Agouti*  $^{vy/a}$  v závislosti na jejich fenotypu. Pokud budeme vybírat žluté samičky, získáme v potomstvu více žlutých jedinců; pokud budeme sledovat potomstvo tmavých samic, bude převážně tmavé. Epigenetický stav lokusu *Agouti*  $^{vy}$  je tedy děděn do potomstva maternálně.

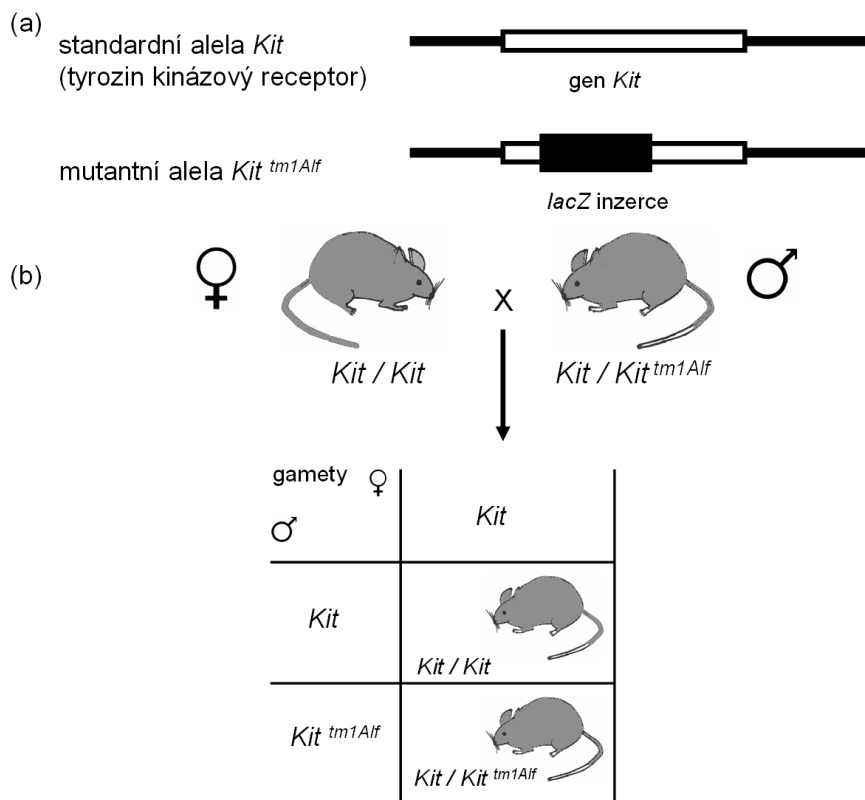
Většina globálních metylací DNA nastává v průběhu **embryogeneze**, tedy u savců uvnitř těla matky (**obr. 3.4**). V té době jde především o umlčování retroelementů a jiných repetitivních sekvencí DNA v genomu, neboť genomový imprinting nastal již dříve, při gametogenezi. Pokud nenastává epigenetické umlčování potenciálně nepřátelských sekvencí DNA, může to mít za následek i těžké vývojové vady způsobené mobilizací transpozonů do míst, kde mohou ovlivnit (umlčet či ektopicky aktivovat) důležité geny hostitele. Častým mechanismem inaktivace repetitivních sekvencí jsou metylace DNA, které po deaminaci vedou k bodové mutaci (C→T), čímž se epigenetické umlčení promění ve změnu irreverzibilní. Univerzálním donorem metylových skupin pro všechny typy buněčných metylací (například pro metylaci DNA či histonů) je S-adenozylmetionin. Pokud je v buňce či organismu pouze nízká hladina této látky, může docházet mj. k hypometylaci DNA, což může mít negativní důsledky. Experimenty na myších ukázaly, jak důležitá je skladba **potravy pregnantní matky**, v jejímž těle probíhá vývin embryí. K pokusům byl opět vybrán modelový systém *Agouti*, který umožňuje monitorování metylace DNA pouhým sledováním barvy srsti. Heterozygotní žluté myši *Agouti*  $^{vy/a}$  byly vybrány jako samečci do křížení s recesivně homozygotní samicí *Agouti*  $^{a/a}$  a byla sledována barva srsti potomstva (čili metylace/demetylace retroelementu) v závislosti na dietě pregnantní matky. Standardní výživa vedla ke standardně variabilnímu potomstvu – od nemetylovaných žlutých myši přes skvrnité až k metylovaným tmavým myším. Maternální výživa, která byla bohatší o prekurzory S-adenozylmetioninu (jako jsou například metionin či kyselina listová) však vedla k potomstvu, které mělo tmavší srst a vyšší hladinu metylace DNA (**obr. 8.17**). Zvýšení metabolismu metylace tak vedlo k zajištění inaktivace retroelementu u genu *Agouti*. Tato zjištění mají samozřejmě hluboký dopad do biomedicíny, neboť vhodná dieta těhotných žen by mohla pozitivně ovlivňovat zdraví dítěte. Spekuluje se i o tom, že nastavení metylačního stavu v době březosti/těhotenství zasahuje minimálně dvě následující generace, neboť uvnitř embrya v těle matky se vytváří i zárodečná dráha embrya.



**Obr. 8.17** Možnost ovlivnění epigenetické dědičnosti výživou pregnantní matky. Protože se metylační stav genomu tvoří v průběhu embryogeneze v těle matky, je možné vhodnou dietou tento stav ovlivnit. (a) Při nevhodné výživě, která nezaručuje metabolismus metylace vzniká v potomstvu nesoucí alelu *Agouti* <sup>vy</sup> více žlutých myší, což svědčí o nedostatečné metylaci retroelementu, který ektopicky spouští gen odpovědný za žlutou srst. (b) Pokud je dieta v období březosti obohacena o metionin a jiné prekurzory S-adenozylmetioninu, je retroelement umlčen, což indikuje převážně tmavé potomstvo.

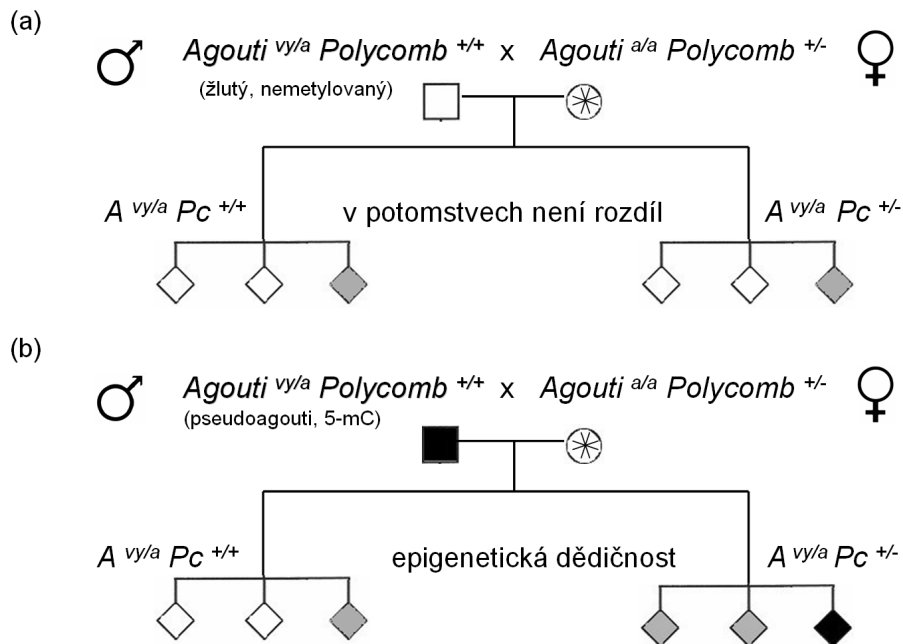
## 8.5 Dědičnost řízená RNA a proteiny

Dosud jsme v epigenetické dědičnosti uvažovali o mechanismech, které jsou založeny na modifikacích DNA či histonů, popřípadě o úloze vazebných chromatinových proteinů a RNAi. V následujících dvou případech uvidíme, že roli nositele epigenetické informace mohou být i mRNA nebo paměťové proteiny Polycomb. Byla připravena transgenní myš, kde transgen *lacZ* byl integrován do genu *Kit* kódujícího tyrozin kinázový receptor. V homozygotním stavu je mutace letální, ale heterozygotní mutant (značený *Kit* / *Kit* <sup>tm1Alf</sup>) má pouze zajímavý fenotyp: bílý konec ocásku případně bílé konce končetin. Při křížení tohoto heterozygotního mutantu se standardním typem (*Kit* / *Kit*) by se v potomstvu mělo objevit 50 % standardních myší a 50 % myší s bílým ocáskem nesoucích mutantní alelu. Výsledek tohoto křížení však byl překvapující: velká většina potomstva měla bílý ocásek a to bez ohledu na to, zdali myši měly mutantní alelu (**obr. 8.18**). Tento efekt byl zvlášť silný, pokud bylo sledováno potomstvo heterozygotního samečka a standardní samičky. Molekulární analýzou bylo zjištěno, že aberantní alela *Kit* s transgenem dává vznik **aberantní mRNA**, která se přenáší přes spermie do další generace a odpovídá za mutantní fenotyp, i když mutovaná alela již není přítomna. Tento jev byl nazván **paramutací**. Podobně jako u rostlin (viz kapitola 7.3) jde o dědičnou změnu způsobenou interakcí alel: v tomto případě mutovaná alela pozměnila alelu standardní. Úloha aberantní RNA byla prokázána i tím, že mutantní fenotyp byl vyvolán i mikroinjekcí příslušné RNA do zygoty.



**Obr. 8.18** Dědičnost řízená aberantní RNA: paramutace u myši (podle Solowaye, 2006). (a) Standardní alela genu *Kit* kóduje tyrozin kinázový receptor. Po jeho mutagenезi transgenem vzniká heterozygotní myš *Kit / Kit<sup>tm1Alf</sup>*, která se fenotypově projevuje zejména bílým koncem ocásku (homozygotní mutant je letální). Pokud křížíme heterozygotního samečka *Kit / Kit<sup>tm1Alf</sup>* se standardní samičkou *Kit / Kit*, mělo by dojít k segregaci na 50 % myši s bílým ocáskem a 50 % myši standardních. Ve skutečnosti vznikají téměř všechny myši s bílým ocáskem a to i ty, které mají standardní genotyp *Kit / Kit*. Příčinou je syntéza a přenos aberantní RNA z genu s transgenem přes spermie do další generace.

V předchozí kapitole 8.4 je popsáno, že epigenetický stav alely *Agouti* je přenášén do další generace pouze přes matku a nikoli přes otce. Protože se v některých případech nepodařilo prokázat rozhodující úlohu metylace DNA, studovali vědci i úlohu **paměťových proteinů Polycomb**. Ve standardním experimentu byli opět heterozygotní samečci *Agouti<sup>w/a</sup>* kříženi se samičkami bez alely *Agouti* (*Agouti<sup>a/a</sup>*), navíc nesly samičky mutaci *Polycomb* v heterozygotním stavu (*Polycomb<sup>+/-</sup>*). V potomstvu u jedinců s alelou *Agouti<sup>w</sup>* pak byla sledována barva srsti v závislosti na přenosu maternální mutace *Polycomb* (**obr. 8.19**). V případě sledování přenosu nemetylované alely *Agouti<sup>w</sup>* (tedy v případě žlutých samečků) nebyly v potomstvu rozdíly v barvě srsti mezi jedinci se standardní a mutovanou alelou *Polycomb*: většina jedinců obou skupin měla žlutou srst, přítomnost funkčního maternálního paměťového proteinu tedy nehrála žádnou roli. Jinak tomu však bylo v případě tmavých samečků pseudoagouti, tedy s metylovanou a umlčenou alelou *Agouti<sup>w</sup>*. Funkce maternálního proteinu Polycomb zásadně ovlivnila přenos metylačního signálu do potomstva. Většina jedinců, kteří zdědili maternální funkční alelu *Polycomb* byla žlutých: v průběhu embryogeneze tedy došlo díky tomuto proteinu k vymazání metylačního záznamu. Pokud maternální protein Polycomb byl nefunkční, původní metylační záznam z otcovské alely byl udržén: většina potomstva měla tmavší srst. Je snad možné shrnout, že za epigenetickou dědičností se skrývá celá řada různých mechanismů, které koordinovaně regulují genovou expresi.



**Obr. 8.19** Epigenetická dědičnost ovlivňovaná proteinem Polycomb (podle Blevitta et al., 2006). Epigenetický stav genu *Agouti* se epigeneticky přenáší jen maternálně. V kombinaci se ztrátou funkce paměťového proteinu Polycomb (Pc) je však možné navodit i paternální dědičnost. Křížení mezi samečkem – heterozygotem *Agouti*  $vy/a$  a samičkou – heterozygotem pro protein Polycomb (označena hvězdičkou,  $Pc^{+/-}$ ) dává odlišné potomstvo v závislosti na fenotypu samečka a maternální přítomnosti mutace *Polycomb*. (a) Žlutí samečci (s hypometylovaným retrotranspozónem) mají stejné potomstvo bez ohledu na funkční či nefunkční maternální alelu *Pc*. (b) V případě tmavých samečků (s metylovaným retroelementem) je epigenetická informace přenášena do potomstva pouze v případě nefunkčního maternálního genu *Polycomb*: potomstvo bude výrazně tmavší.

## 9 MEDICÍNSKÉ ASPEKTY EPIGENETIKY

Epigenetické modifikace chromatinu jsou charakteristické pro jednotlivé buněčné typy, zejména pro buňky zárodečné linie. Stav chromatinu somatických buněk může být též kritický při klonování mikroinjekčním přenosem jádra do oocyty. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, mutace nebo chyby v modifikacích chromatinu genů, které jsou imprintovány, vedou k **těžkým vrozeným vývojovým vadám**. Existuje bohužel i mnoho komplexních neurovegetativních syndromů, které souvisejí se ztrátou funkce genů, které zajišťují epigenetické procesy. Metylace DNA jsou také jedním z kauzálních mechanismů **kancerogeneze**. Závěr kapitoly bude věnován dědičnosti epigenetických poruch u člověka.

### 9.1 Zárodečná linie a kmenové buňky

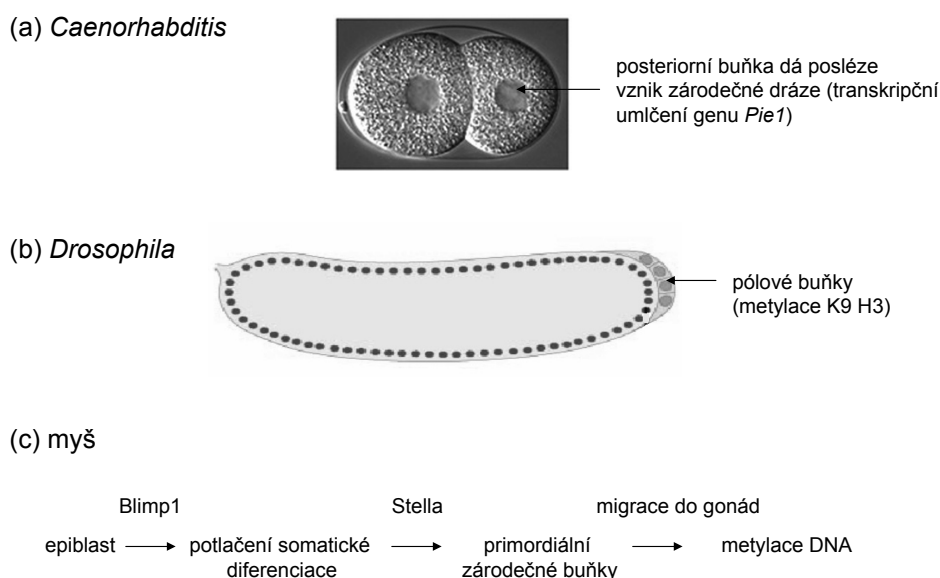
Zárodečná dráha je u živočichů zakládána již v časně embryogenezi a u mnoha druhů jsou zárodečné buňky prakticky prvními buňkami embrya. Zárodečné buňky poté migrují do gonád a stávají se progenitory pohlavních buněk. U různých živočišných druhů můžeme sledovat dva typy iniciace zárodečné dráhy. Prvním z nich je typ **preformace**, což je dědičná determinace určitých buněk, aby se staly zárodečnými. Tento typ se vyskytuje například u *Caenorhabditis* či drozofily. Druhý typ iniciace zárodečné dráhy spočívá v **epigenezi**. U tohoto typu existuje více ekvivalentních, potenciálně pluripotentních buněk a v reakci na indukční signály se některé buňky stanou zárodečnými, zatímco zbývající buňky budou tvořit somatické linie. S tímto typem se setkáváme například u savců a rostlin.

Klíčovým prvkem při tvorbě zárodečné dráhy u živočichů je v podstatě blokování somatického vývojového programu v zárodečných buňkách, i když mechanismy tohoto umlčování nejsou evolučně konzervativní. U **hlístice** vede první dělení zygoty ke dvěma odlišným blastomerám: vzniká anteriorní somatická buňka AB a posteriorní buňka P1, která je prekurzorem zárodečné dráhy. Tato posteriorní buňka poskytuje při každém dělení vždy anteriorní buňku somatickou, zatímco buňka posteriorní se stává transkripčně umlčenou (**obr. 9.1a**). Toto transkripční umlčování je udržováno regulačním proteinem PIE-1 s doménou zinkových prstů, který inhibuje transkripční elongaci zprostředkovanou RNA polymerázou II. V časném stádiu však všechny blastomery vykazují transkripčně aktivní chromatin s markerem metylovaného lyzinu 4 histonu H3. Dělením blastomery P4 vznikají první dvě buňky zárodečné linie a v nich se šíří umlčovací chromatin: od ztráty aktivačního markeru K3K4me až po zvýšení hladiny represivního metylovaného histonu 9 histonu H3. U **drozofily** se prekurzory zárodečné dráhy – pólové buňky – objevují již před počátkem vývinu embrya, které má jinak syncytiální charakter (**obr. 9.1b**). Jsou opět transkripčně inaktivní, což je provázeno represivní modifikací histonu H3 metylací lyzinu v pozici 9. Transkripční umlčování v pólových buňkách je zjevně regulováno genem *pgc* (*polar granule component*), protože ztráta jeho funkce vede i ke ztrátě represe v pólových buňkách.

**Savčí gamety** získávají své specifické epigenetické informace od rodičů. Po oplození dochází k rozsáhlé demetylaci, zvláště spermatického jádra. Paternální jádro je také zbaveno protaminů a obaluje se histony bez aktivačních inhibitorů H3K9metyl2 a H3K27metyl3, které neobsahuje ani jádro oocyty. Rýhováním zygoty vznikají zatím nedeterminované blastomery přes stádium moruly až do stádia **blastocysty**, kdy dochází k diferenciaci na vlastní embryo (*ICM*, *inner cell mass*) a výživovou extraembryonální tkáň (trofektoderm). Vlastní embryo se poté podrobuje zvýšení hladiny 5-metylcytozinu i metylovaných histonů H3K9metyl2 a H3K27metyl213. Program epigenetické modifikace zárodečných buněk nastává v postimplantačním stádiu. Časné prekurzory zárodečných buněk vznikají z malé skupiny buněk embrya jako výsledek příjmu signálních molekul a sice z trofektodermální části. **Primordiální**



**zárodečné buňky** (*PGC*, *primordial germ cells*) se před vstupem do gonád opět podrobují odstraňování represivních markerů (5-metylcytosinu a dimetylace lyzinu 9 v histonu H3). *De novo* metylace včetně rodičovského imprintingu se odehrávají až v pozdějších fázích vývoje zárodečných buněk. Ještě před vznikem zárodečné dráhy dochází k vývinu epiblastu z vnitřní buněčné masy. Pluripotentní buňky epiblastu jsou v postimplantačním období také hlavním zdrojem somatických tkání i primordiálních zárodečných buněk. Diferenciace somatických linií vede ke třem primárním zárodečným listům – ektodermu, mezodermu a endodermu. Buňky, které jsou odvozeny z vnitřní buněčné masy, se nazývají pluripotentními **embryonálními kmenovými buňkami** (*ESC*, *embryonic stem cells*).



**Obr. 9.1** Zakládání zárodečné dráhy ve vývoji. (a) U hlístice *Caenorhabditis* je zárodečná linie specifikována po prvním buněčném dělení zygoty transkripčním umlčením genu *Pie1* v posteriorní buňce: buňka anteriorní se stává somatickou. (b) U drozofily jsou prekursori zárodečných buněk pólové buňky v posteriorní části syncytia, transkripční umlčování somatického programu zde závisí na RNA kódované genem *Pgc* (*polar granule component*), je prováděno metylací lyzinu 9 histonu H3. (c) U myši vede v některých buňkách vlastního embrya exprese genu *Blimp1* k represii somatického programu. Následuje exprese několika genů (jako např. *Stella*) a vznikají primordiální zárodečné buňky. V nich dochází k řadě modifikací histonů a vstupují do gonád, kde nastává zejména rozsáhlá metylace DNA.

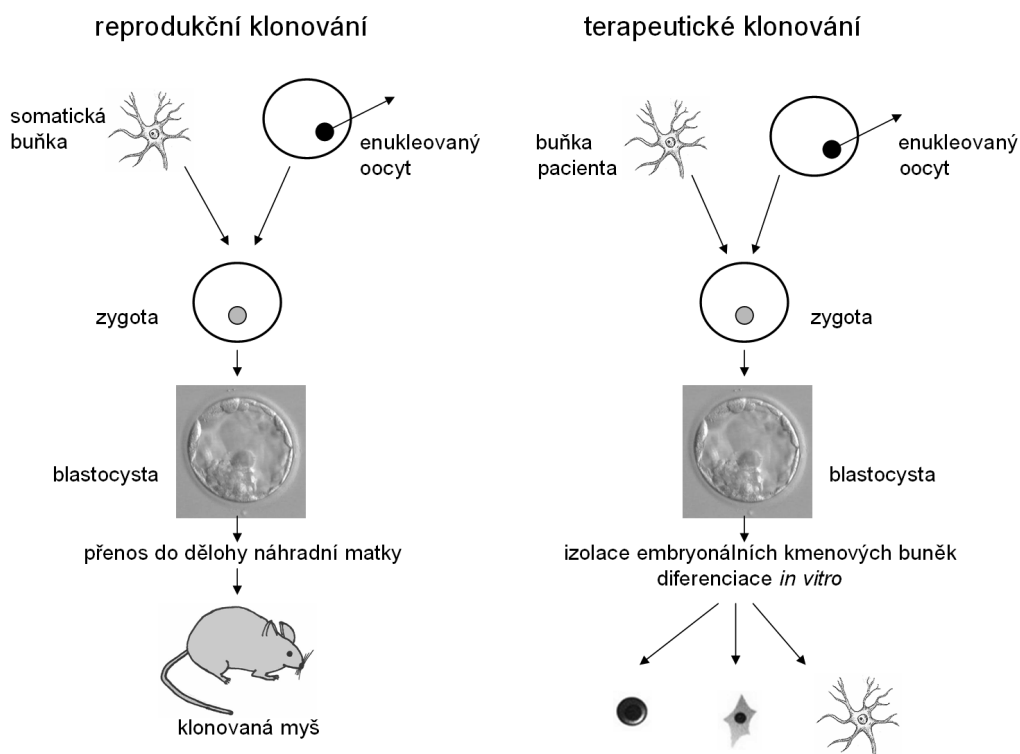
Primordiální zárodečné buňky mohou být prvně pozorovány jako skupina asi 40 buněk v časném embryu, které vznikají prostřednictvím signálních molekul *Bmp4* a *Bmp8b* (**obr. 9.1c**). Mezi další klíčové transmembránové faktory patří například *fragilis* a *stella*. Protein *fragilis* dává vznik jak primordiálním zárodečným buňkám, tak i sousednímu trofektodermu. Specifikace ke tvorbě primordiálních zárodečných buněk je pak dána expresí genu *stella*. V této době primordiální buňky vykazují expresi pluripotentních genů, jako jsou *Sox2* a *Oct4*: tyto buňky jsou tedy – na rozdíl od okolních somatických buněk – pluripotentní. Naopak v nich dochází k represii homeotických genů (*Hoxb1* a *Hoxa1*), silně exprimovaných v somatické linii, což svědčí o potlačení somatického vývojového programu v zárodečných buňkách. Klíčovou úlohu v diferenciaci zárodečné dráhy má gen *Blimp1*: potlačuje somatický vývojový program v primordiálních zárodečných buňkách. **Blokáda somatického vývojového programu** v buňkách zárodečné linie je tedy u všech živočišných druhů evolučně konzervativní, avšak její mechanismy (cf. hlístice, drozofila a savci) jsou výrazně odlišné.

Zárodečné buňky a buňky vnitřní buněčné masy jsou potenciálními donory k odvození **pluripotentních kmenových buněk *in vitro***. Pokud jsou přeneseny do blastocysty, mohou diferencovat ve všechny typy somatických tkání. Pokud jsou kultivovány *in vitro*, je možné z nich odvodit řadu specifických typů tkání, což má obrovský impakt v biomedicině při náhradách ztracených či nefunkčních tkání. V zygotě a při rýhování vajíčka až do stádia blastocysty se buňky vnitřní buněčné masy a trofektodermy podrobují odlišným epigenetickým modifikacím. Oba typy těchto tkání mohou být dlouhodobě kultivovány *in vitro*. Klíčový význam mají **embryonální kmenové buňky (ESC, *embryonic stem cells*)** odvozené z vnitřní buněčné masy (vlastního embrya). Takové buňky mohou být i geneticky manipulovány *in vitro* a reintrodukovány do blastocysty, kde mohou kolonizovat všechny tkáně včetně zárodečné linie, s výjimkou trofoblastových buněk placenty. Buňky trofektodermy mohou být též kultivovány či geneticky manipulovány, avšak po reintrodukci do blastocysty přispívají pouze k vývoji placenty. Embryonální kmenové buňky mohou být dlouhodobě udržovány v nediferencovaném stavu nebo s pomocí specifických růstových faktorů mohou *in vitro* diferencovat v určité typy tkání, jako jsou svalstvo, kůže či neurony. Diferenciace kmenových buněk je charakterizována transkripčním umlčováním genů pluripotence. Jedním z nich je například gen *Oct4*, který akumuluje DNA metylace a represivní metylace histonů.

## 9.2 Reprodukční a terapeutické klonování

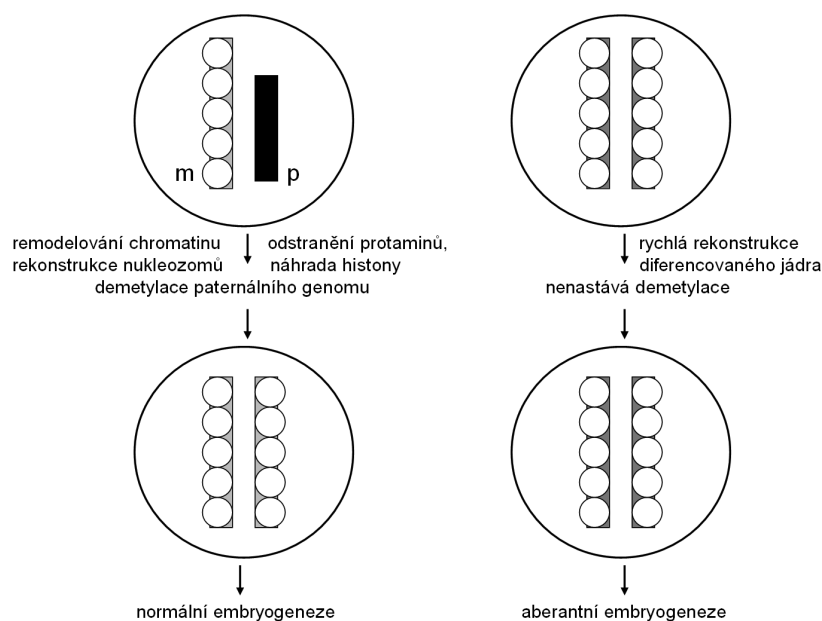
Klíčovou buňkou pro pohlavní rozmnožování živočišných i rostlinných druhů je vaječná buňka, oocyt. **Savčí oocyt** obsahuje nejen haploidní gametický genom, ale také **epigenetickou informaci**, která je dvojího typu: jde o nastavení funkce a struktury chromatinu vhodné k vytvoření zygoty, ale jde také o maternální imprinting vytvářený v průběhu oogeneze. V neposlední řadě jde o cytoplazmu oocytu, která je výsledkem aktivity **genů s maternálním účinkem**. Tyto geny, funkční ve vaječnicku matky, vkládají do cytoplazmy oocytu jedinečné mRNA a proteiny, které oocyt činí buňkou pro rozmnožování nenahraditelnou. Znamená to, že všechny pokusy o klonování cestou přenosu buněčného jádra musí jako recipientní buňky využívat právě oocyt. První úspěšný přenos somatického jádra do oocytu s cílem získání plně vitálního potomstva byl realizován u žaby drápatky v 60. letech minulého století Johnem Gurdonem.

**Klonování přenosem jádra** bylo poprvé u myši realizováno Solterem a Suranim v roce 1984, kdy nahrazovali jádro oocytu a spermie v heterokaryonu zygoty, kde prokázali nezaměnitelnou úlohu obou typů jader: uniparentální embrya vždy abortovala. Další úspěšné klonovací experimenty byly prováděny na dobytku (berani, krávy a prasata), kdy do oocytu byla přenášena jádra z raných embryí. Úspěšnost těchto pokusů bývá dávána do souvislosti se závislostí na časování přechodu úlohy genů s maternálním účinkem na zygotické geny. V embryích dobytka k tomuto přechodu dochází až ve stádiu 16 buněk, zatímco u myši nastává už ve stádiu dvou blastomer. První úspěšné klonování přenosem jádra somatické buňky do oocytu pak byla **ovce Dolly** prezentovaná Ianem Wilmutem v roce 1997. Do dnešního data bylo touto cestou klonováno již asi 15 živočišným druhů včetně myši. Po přenosu jádra do oocytu, který je obvykle realizován elektrofúzí, je oocyt kultivován až po stádium blastocysty *in vitro* a poté je blastocysta implantována do dělohy pseudopregnantní náhradní matky. Alternativou je tkáňová kultura blastocysty, která generuje embryonální kmenové buňky (*NT-ES, nuclear transfer embryonic stem cells*), vhodné pro **terapeutické klonování (obr. 9.2)**.



**Obr. 9.2** Srovnání reprodukčního klonování a terapeutického klonování. Při reprodukčním klonování (vlevo) je do enukleovaného oocytu vpraveno jádro somatické buňky a zygota je kultivována *in vitro* do stádia blastocysty. Ta je vložena do dělohy náhradní matky a může dojít k narození klonované myši. Při terapeutickém klonování (vpravo) je postup zpočátku shodný s tím rozdílem, že se do enukleovaného oocytu vnáší jádro somatické buňky pacienta, který potřebuje určitou náhradní tkáň (transplantaci). Z blastocysty jsou pak izolovány embryonální kmenové buňky, které s pomocí specifických růstových faktorů mohou diferencovat v potřebné tkáňové typy.

Ve většině případů končí vývoj klonovaného embrya savců brzy po implantaci. Pokud vývoj pokračuje až po narození, jde často o nadměrně vyvinuté novorozence se zvětšenou placentou (*large offspring syndrome*). Tito jedinci také často trpí poruchami dýchání či srdce a ledvin. Jejich život často končí předčasně s velkou obezitou. Důvody těchto fenotypových změn jsou zjevně epigenetické: v potomstvu klonovaných jedinců se již obvykle nevyskytuje. Problémem je epigenetický program přenášeného jádra somatické buňky. Při standardním pohlavním rozmnožování jsou oba genomy – samičí a samčí – výrazně bohaté na 5-metylcytozin a jádro spermie je v hluboce inaktivním stavu: nemá nukleozomovou strukturu a histony byly nahrazeny ještě bazičtějšími protaminy (**obr. 9.3**). Po oplození dochází k aktivní demetylaci genomu spermie a především k vytváření nové struktury chromatinu celé zygoty. Tyto epigenetické procesy vedou k řádnému nastavování genové exprese a ústí v normální proces embryogeneze. Naproti tomu při klonování přenosem jádra je do oocytu vnášen **epigenetický program somatické buňky**, který je zcela odlišný od programu oocytu či spermie. Jak je patrné z nízké úspěšnosti přežívání klonovaných embryí, jen v málo případech se embryonálním buňkám podaří somatický program zvrátit a nastavit řádný embryonální epigenetický program, který by vedl k úspěšné embryogenezi.



**Obr. 9.3** Srovnání struktury chromatinu při normálním rozmnožování a při klonování přenosem somatického jádra. Při standardní fertilizaci (vlevo) je jádro spermie vysoce kondenzováno, metylováno a nemá nukleozomovou strukturu: histony jsou nahrazeny silně bazickými protaminy (vyznačeno černě). Po oplození nastává rozsáhlé remodelování chromatinu, odstranění protaminů a demethylace paternálního genomu. Při klonování (vpravo) je oocyt enukleován a je vloženo aktivované diploidní somatické jádro. Demethylace DNA neprobíhá a dochází k rychlé rekonstrukci jádra, jejímž výsledkem může být chybná embryogeneze a vznik vývojových vad.

## 9.3 Choroby člověka s epigenetickými aspekty

Choroby člověka s epigenetickými aspekty představují dlouhý seznam obvykle těžkých vývojových vad, které – přímo či nepřímo – souvisejí s epigenetickými procesy. Často bývá primárním činitelem genetická aberace (mutace, delecce či uniparentální dizomie), která odhaluje nepříznivý rys genomového imprintingu – funkční haploidii řady desítek lokusů. Další velká skupina chorob je způsobena poruchami funkce genů, které odpovídají za epigenetické modifikace chromatinu (methylace DNA, acetylace a jiné modifikace histonů či chromatin-remodelující enzymy).

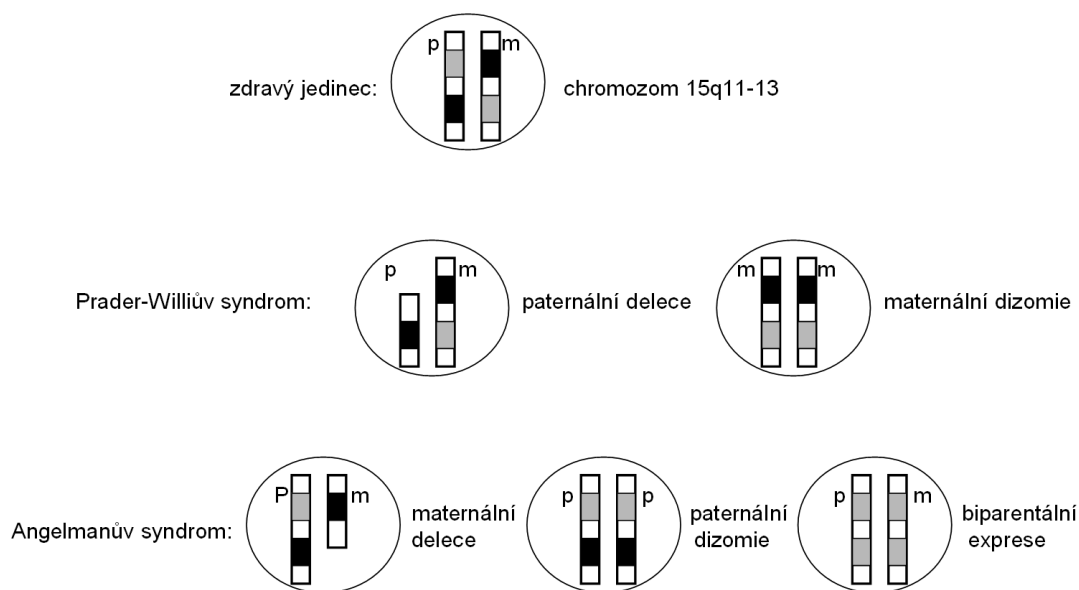
### 9.3.1 Poruchy genomového imprintingu

Takových chorob je celá řada a jistě ještě nejsou všechny objasněny, neboť nejsou identifikovány ani všechny imprintované geny.

**Beckwith-Wiedemannův syndrom** (*BWS*, *Beckwith-Wiedemann syndrome*) je zřejmě nejjasnější demonstrací teorie parentálního konfliktu (**obr. 8.8**). Je způsoben mutací či vadným imprintingem oblasti p15.5 chromozomu 11. V této oblasti jsou maternálně i paternálně imprintované geny (*IGF2*, *CDKN1C*, *H19*). Pokud dojde k výrazné převaze tvorby paternálních, růst podporujících faktorů (*IGF2*), dochází k nadměrnému vývinu embrya a plodu („pohádka o Otesáncovi“), často i k smrti dítěte. Fenotyp bývá často provázen nádorovým bujením ledvin (**Wilmsův ledvinový tumor**, imprinting chromozomu 11, viz kapitola 9.4).

**Russell-Silverův syndrom** (*Russell-Silver syndrome*) je opačným fenoménem: maternální růst-suprimující faktory mají převahu nad paternálními faktory, takže výsledkem je podměrné dítě trpasličího vzrůstu (**obr. 8.9**). Obvykle jde o maternální dizomii chromozomu 7, na němž se nachází imprintovaná oblast p11.2. Podobný fenotypový projev má i epimutace (bialelická exprese *H19* a pokles *IGF2*) v oblasti 11p15.5. Vedle trpasličího vývinu dítěte („pohádka o Palečkovi“) bývá fenotyp charakteristický trojúhelníkovým obličejem; inteligence obvykle není ovlivněna. Je zajímavé, že i když imprintované geny mají svou aktivitu vyměřenu jen pro vývoj *in utero*, děti narozené s Russell-Silverovým syndromem růstový hendikep nikdy nedoženou.

Angelmanův a Prader-Williův syndrom jsou dvě komplexní psychomotorické zděděné choroby, které mohou být způsobeny genetickými nebo epigenetickými poruchami dvou imprintovaných genových shluků na chromozomu 15. **Angelmanův syndrom** (*AS*, *Angelman syndrome*) je způsoben chybnou expresí genu *UBE3A* způsobenou maternální delecí, mutací nebo chybou imprintingu v oblasti q11-13 (**obr. 9.4**). Jde o velmi těžké psychomotorické onemocnění („*puppet children*“). Jeho výrazně lehčí formou je **Prader-Williův syndrom** (15q11-q13), který vede jen k nižší mentální retardaci a atypické obézní postavě. Je způsoben paternální delecí nebo maternální dizomií, postižena je především syntéza snoRNA (**obr. 9.4**).



**Obr. 9.4** Prader-Williův a Angelmanův syndrom jsou komplexní neurovegetativní choroby, které souvisejí s imprintingem genového shluku (jsou naznačeny vždy dva lokusy) na chromozomu 15. Aktivní (světlé symboly) a imprintované (tmavé symboly) alely se nacházejí na paternálním (p) i maternálním (m) chromozomu. Nejčastější příčinou lehčího PW syndromu jsou delece na paternálním chromozomu a maternální dizomie. Těžší AS je obvykle způsoben maternální delecí, paternální dizomií nebo biparentální expresí.

**Pseudohypoparatyreóza** (*PHP*, *pseudohypoparathyroidism*) je poruchou metabolické funkce hormonu příštítných tělísek, která vede ke změně metabolismu vápníku a fosforu, což ústí v řadu vývojových defektů. Jde o bodovou mutaci, epigenetickou příčinu nebo uniparentální dizomii chromozomu 20 oblasti q13.2. V této oblasti se nachází gen *GNAS1* (guanin-vazebný protein), který má tři alternativní exony, jež jsou sestříhovány do různých sekvencí a tvoří odlišné transkripty. Odlišná **metylace cytozinu** v okolí těchto exonů vede k výhradní expresi maternální alely jednoho exonu a dvou paternálních exonů.

### 9.3.2 Choroby způsobené poruchou metylace DNA

Metylace DNA je jedním z klíčových mechanismů epigenetických procesů u savců. Hraje zejména roli v genomovém imprintingu, ale je důležitá i při globálních změnách metylomu v embryogenezi a chrání genom před nebezpečnou aktivitou transponovatelných elementů. Úplné vyřazení metyltransferázových genů má u savců letální účinek, stejně jako ztráta metylačního metabolismu či nepřítomnost specifických proteinů vážících se na metylovanou DNA. Ideálním analytickým materiálem k odlišení genetické a negenetické složky dědičnosti jsou samozřejmě **jednovaječná dvojčata**. Měla by mít 100% shodný genom, tedy veškeré rozdílnosti padají na vrub epigenetické proměnlivosti včetně environmentálních vlivů. Nedávná studie srovnávala stupeň metylace DNA a acetylace histonů H3 a H4 u dvojčat ve věku 3 let a ve věku 50 let. Výsledky jasně ukázaly, že se vzrůstajícím věkem stoupá rozdílnost epigenetických modifikací mezi dvojčaty. Podobně semikvantitativní analýza genové exprese u párů jednovaječných dvojčat prokázala, že s věkem roste počet genů s výrazně rozdílnou expresí: u 3letých byla v průměru rozdílná exprese asi u 1000 genů, u 50letých dvojčat byla u více než 3000 genů. Obecně platí, že s věkem nastává globální pokles DNA metylací u člověka a soudí se, že procesy metylace vedou ke **stárnutí**. Metylace DNA mohou být ovlivněny i environmentálními faktory, jako jsou například mikrobiální infekce. U myši bylo například zjištěno, že orální infekce březí samice bakteriemi *Campylobacter rectus* či *Porphyromonas gingivalis* vede k hypermetylaci a umlčení imprintovaného genu *Igf2* v potomstvu, vyvíjejícím se v jejím těle.

**ICF syndrom** (*ICF, immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies syndrome*) je obvykle těžkou komplexní poruchou, která vede k časté dětské úmrtnosti. Jde o mutaci **DNA metyltransferázového (*Dnmt3b*) genu**, tato mutace je autozomálně recesivní (**obr. 9.5a**). Má za následek redukci sérového imunoglobulinu, což snižuje imunitu k infekčním chorobám, vede též k hypometylaci subtelomerických repeticí na chromozomech 1, 9 a 16. Choroba se dále projevuje v karyologické nestabilitě centromer, kraniofaciálních defektech a psychomotorické retardaci.

Jeden ze syndromů mentální retardace je způsoben mutací genu **metyléntetrahydrofolát reduktázy (*MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase*)**, který kóduje klíčový enzym v dráze tvořící **S-adenozylmetionin** (obecný donor metylových skupin). *MTHFR* nevratně redukuje 5,10-metyléntetrahydrofolát na 5-metyltetrahydrofolát, který je použit ke konverzi homocysteinu na metionin, významný prekurzor syntézy S-adenozylmetioninu. Deficience enzymu *MTHFR* způsobuje vzácnou autozomálně recesivní mentální poruchu. Gen *MTHFR* je vysoce polymorfní, některé formy genu vykazují souvislost se schizofrenií

Těžkým syndromem neurovegetativní retardace je i **Rettův syndrom (*RS, Rett syndrome*)**. Je způsoben mutací genu *MECP2*, což je mutace genu vázaného na chromozom X kódujícího **5-metylcytozin-vazebný protein**. Úkolem tohoto proteinu je v podstatě inaktivovat vysoce metylované oblasti genomu. U děvčat mutace *MECP2* v heterozygotním stavu způsobuje těžkou mentální retardaci („Rettovi andělé“); u chlapců se choroba nevyskytuje, neboť mutovaná alela genu *MECP2* na jediném chromozomu X vede k ranému abortu.

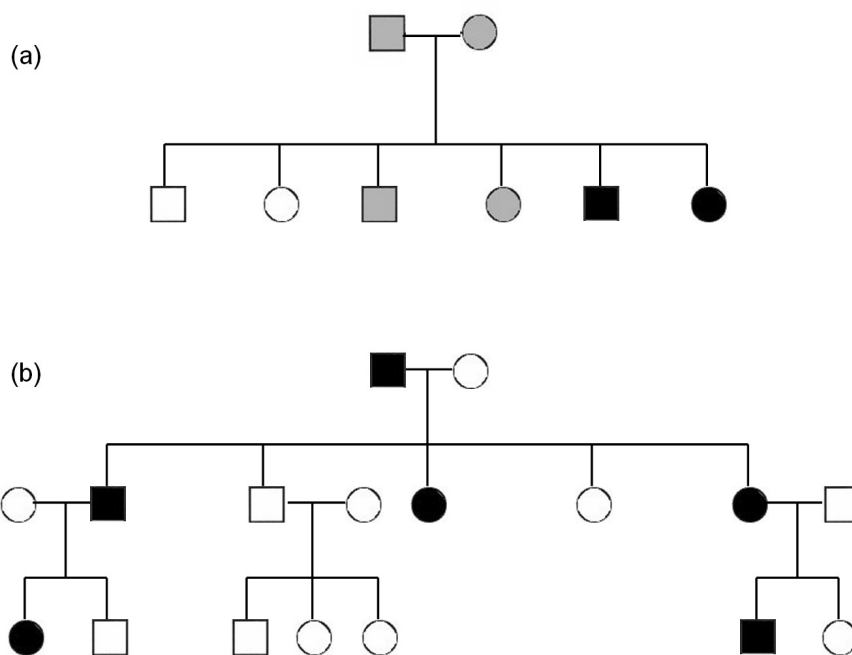
### 9.3.3 Choroby související se strukturou chromatinu

Další řada chorob je způsobena i poruchou jiných epigenetických mechanismů, jako jsou modifikace nukleozomálních histonů či chromatin-remodelujících proteinů.

**Schimkeho imunoskeletální dysplázie** (*SIOD*, *Schimke immuno-osseous dysplasia*) je velmi těžká a komplexní vývojová vada. Jde o mutaci genu *SWI/SNF2*, který kóduje aktin-dependentní **regulátor chromatinu** SMARCA1. Je to autozomálně recesivní choroba, způsobuje komplexní syndrom charakteristický dysplázií páteře a konců dlouhých kostí, růstovou retardací, poruchami ledvin a imunity.

**Rubinstein-Taybiho syndrom** (*RSTS*, *Rubinstein-Taybi syndrome*) je psychomotorickou retardací způsobenou poruchou funkce genů *CREBBP* nebo *EP300*. Defekt genu *CREB* vede k haploidní nedostatečnosti vazebného proteinu CREB, který reguluje řadu jiných genů hrajících roli v dělení a vývinu buněk. Vede mimo jiné i k poklesu aktivity **histon acetyltransferáz**. Mutace je autozomálně dominantní a vyskytuje se jen vzácně (**obr. 9.5b**). U myši je možné tento defekt revertovat aplikací inhibitorů histon deacetyláz. Choroba se vyznačuje malou postavou, širokými prsty a mírně až středně těžkou mentální retardací.

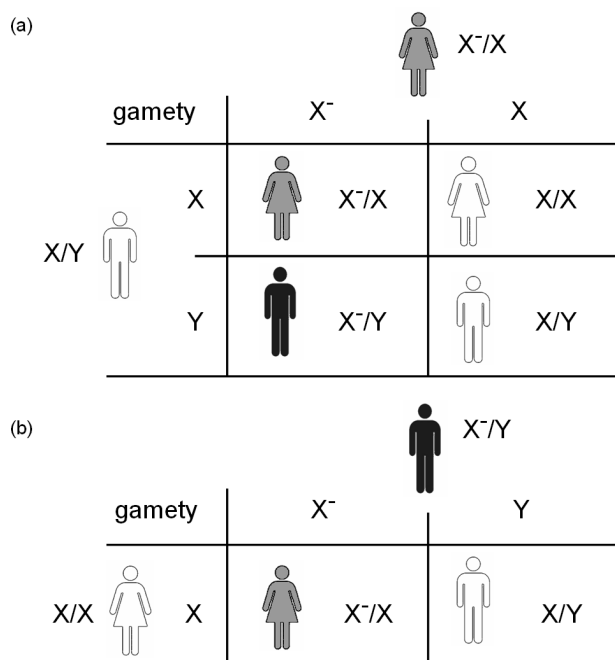
**Facioscapulohumerální svalová dystrofie** (*FSHD*, *facioscapulohumeral dystrophy*) vede k aborcí svalstva obličeje, ramen, paží a krku, je autozomálně dominantní. Je způsobena **změnou chromatinového stavu** subtelomerické oblasti chromozomu 4. Lokus *FSHD* se nachází v subtelomerické oblasti chromozomu 4 poblíž repetice s polymorfními, 3,3 kb GC bohatými repeticemi, jejich kontrakce může vést ke změněné transkripci přilehlých genů.



**Obr. 9.5** Schémata dědičnosti chorob vázaných na autozomy. (a) U autozomálně recesivní dědičnosti (například syndrom ICF) se příznaky objeví až při mutaci v homozygotním stavu (černě). Vycházíme tedy ze skutečnosti, že oba rodiče musí být heterozygotní (šedě). Potomstvo je buď zdravé (bíle) nebo postižené (černě), nebo jde o přenašeče (šedě). (b) V případě autozomální dominance (například Rubinstein-Taybiho syndrom) v podstatě každý jedinec, který získá mutovanou alelu, může být postižen (černě).

### 9.3.4 Epigenetické choroby vázané na chromozom X

Řada chorob souvisejících s epigenetickými procesy je způsobována dysfunkcí genů, které jsou vázány na chromozom X. Díky tomu je i nestandardní dědičnost těchto aberací (dědičnost křížem, *criss-cross inheritance*, obr. 9.6.). Některé choroby jsou tak exprimované převážně u mužů ( $X^+Y$ ), u žen ( $X^+X$ ) mají jen lehčí projev. Jiné choroby jsou výhradně u žen (jen v heterozygotním stavu,  $X^-X$ ), protože muži s jediným vadným  $X^-$  abortují. V kapitole 9.3.2 je již zmíněn **Rettův syndrom**, který je způsoben X-vázanou mutací genu kódujícího 5-metylcytozin-vazebný protein MECP2.

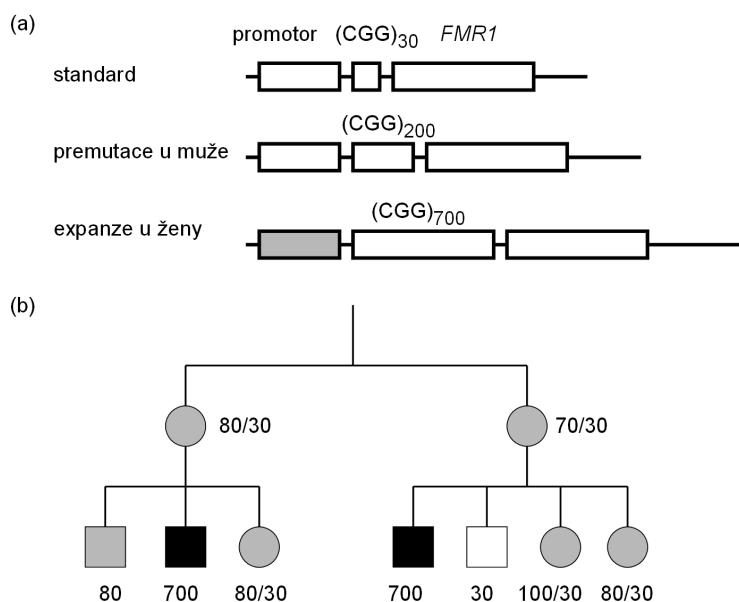


**Obr. 9.6** Schéma dědičnosti vázané na chromozom X (dědičnost křížem). (a) U žen se v heterozygotním stavu X-vázané mutace ( $X^-$ ) často vůbec neprojeví (s četnými výjimkami, jako je například Rettův syndrom), proto hovoříme především o přenašečkách choroby (šedě). Se zdravým otcem (bíle) mohou mít polovinu dcer zdravých (bíle) a polovinu přenašeček. Polovina synů by měla být postižená (černě), polovina zdravá. (b) Postižený otec nesoucí mutaci na svém jediném chromozomu X předává mutaci výhradně (všem) svým dcerám; synové jsou zdraví, protože od otce získávají chromozom Y.

Asi nejznámější X-vázanou mentální retardací je **Martin-Bellův syndrom**, fragilní chromozom X (*Martin-Bell syndrome, fragile X*). Jde o dysfunkci genu *FMRI*, který kóduje protein nezbytný pro funkci mozku. V promotoru genu se nachází **triplet CGG** v počtu 20 až 50 přímých opakování. Pokud je tento triplet amplifikován, může dojít k inaktivaci genu *FMRI* po **metylaci sousedních CpG** sekvencí. Vskutku k tomu v jisté nízké četnosti dochází a sice u mužů se zvýší počet tripletů až na 200 kopií (premutace). U jejich dcer pak dochází k expanzi počtu tripletů až přes 700 kopií (obr. 9.7). U mužů jde vzhledem k jedinému X o vážnou poruchu. Choroba bývá provázena kraniofaciálními i jinými fyzickými poruchami. Kromě středně těžké mentální retardace patří k projevům onemocnění i hyperaktivita, charakteristický vzhled (protažený obličej, zvětšené ušní boltce, prominující brada, zvětšená varlata). Onemocnění postihuje především chlapce, mírnou mentální retardaci mohou vykazovat i některé ženy – přenašečky. Podobnou příčinu má i **Huntingtonova chorea**, která ovšem není vázána na chromozom X. Onemocnění je způsobeno zmnóžením **CAG tripletů** (vzniká dynamickou mutací). Onemocnění se projevuje, pokud počet repetit přesáhne 40. Onemocnění má značně pozdní nástup



až po 40. roku věku pacienta. Po nástupu choroby dochází k degenerativním změnám na mozku, což se projevuje motorickými poruchami a progresivní demencí.



**Obr. 9.7** Fragilní chromozom X – Martin-Bellův syndrom. (a) Standardní počet CGG tripletů je maximálně 50 opakování. K premutaci dochází u muže (asi 200 kopií), k expanzi pak u jeho dcer (okolo 700 kopií), kde dochází k umlčení promotoru genu *FMR1* (šedě). Fenotypový projev (těžká mentální retardace) však je běžná jen u mužů díky jediné kopii chromozomu X. (b) Schéma dědičnosti Martin-Bellova syndromu. Prázdné symboly znamenají fenotypově standardní jedince, tmavé symboly jsou postižení, šedě jsou znázorněni přenašeči. Čísla udávají počet CGG repetici v genu *FMR1*.

Další těžkou chorobou je **mentální retardace vázaná na  $\alpha$ -thalasemii a chromozom X** (*ATRX*, *X-linked  $\alpha$ -thalassemia mental retardation syndrome*). U postižených mužů s mutovaným genem *ATRX* (Xq13) kódujícím chromatin remodelující protein nastává blok v syntéze hemoglobinu (thalasemie), což je provázeno **abnormální metylací** řady sekvencí DNA. Muži trpí mentální retardací, mikrocefálií, neschopností koordinované chůze apod. U žen se mutace v heterozygotním stavu obvykle vůbec neprojeví.

**Cofflin-Lowryho syndrom** (*Cofflin-Lowry syndrome*) je těžká mentální retardace spojená se skeletálními abnormalitami (především s kraniofaciálními defekty). Retardace se výrazněji projevuje jen u mužů. Jde o mutaci X-vázaného genu *RSK2* (Xp22.2-22.1), který kóduje růstový faktor regulovaný protein kinázou, související s faktorem CREB, který **fosforyluje serin** v pozici 10 **histonu H3** (aktivace chromatinu).

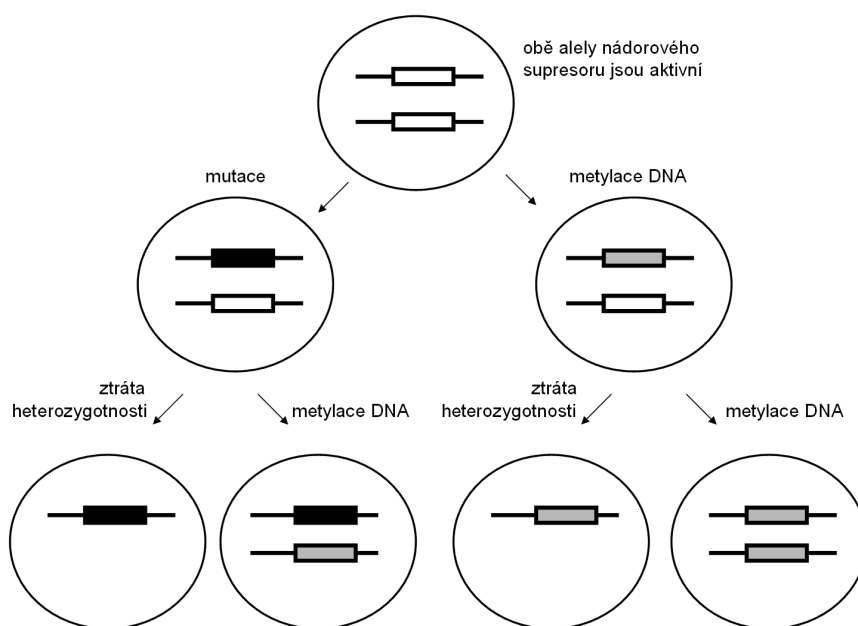
## 9.4 Epigenetika nádorového bujení

Nádorový růst buněk, který se vymyká vývojové kontrole, je způsoben deregulací funkce některých genů a tato deregulace, provázená obvykle nekontrolovaným mitotickým dělením, je v buněčné linii dědičná. Dochází často také k potlačování procesu apoptózy a mobilitě buněk v rámci organismu. Existují zhruba dvě velké skupiny genů, které hrají roli v regulaci onkogeneze. První skupinou jsou **onkogeny** (například *RAS*), které při své aktivaci spouštějí procesy nádorového bujení. Druhou skupinou jsou **nádorové supresory** (například *p53*), jejichž úkolem je vznik nádorového růstu potlačovat. Koordinace funkcí těchto dvou skupin genů vede k výslednému zdravému/nádorovému fenotypu. O funkci onkogenů a nádorových supresorů rozhodují mutace i epigenetické procesy. Je řada důkazů svědčící-

cích o tom, že nádorové buňky mají významně změněnou strukturu chromatinu a metylace sekvencí DNA. Z hlediska funkce signálních genů jde obvykle o aktivaci onkogenu či inaktivaci nádorového supresoru. **Aktivace onkogenů**, které zvyšují aktivitu růst-podporujících faktorů a vedou k nádorovému růstu, bývají dominantní. Naproti tomu **umlcování funkce nádorových supresorů** má obvykle recesivní charakter. Chromatinové rozdíly mezi normálními a nádorovými buňkami jsou tak rozsáhlé, že je lze pozorovat mikroskopicky a představují markery nádorového růstu: jde o velikost jádra, stupeň kondenzace chromatinu, viditelnost jadérek, tvorbu hyperkondenzovaných oblastí jádra či vyšší poměr jaderného objemu vůči cytoplazmě.

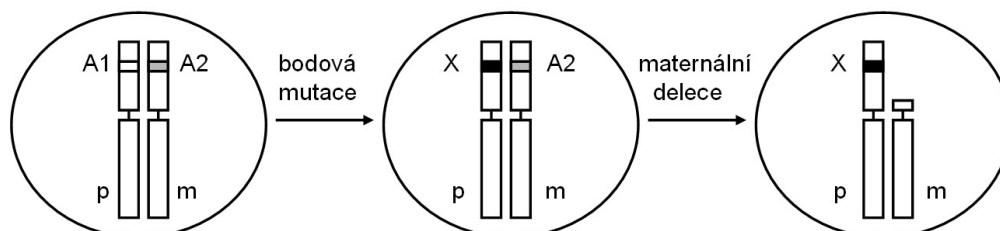
Již v roce 1983 zjistili Andrew P. Feinberg a Bert Vogelstein, že nádorové a nenádorové buňky se vyznačují odlišným stupněm **metylace cytozinu** v DNA. Obecně platí, že metylace DNA jsou jedním z nejvýznamnějších epigenetických mechanismů u savců a jsou tak klíčovým faktorem regulujícím funkci genů. Chyby v metylaci DNA, zejména v promotorových oblastech některých genů, tak mohou vést ke spuštění nádorového růstu. Hypometylace DNA mívají za následek rozvolnění chromatinu a zvýšení genomové nestability, zatímco hypermetylace mohou vést k umlcování promotorů. 5-metylcytozin v úsecích DNA, které nejsou pokryty 5-metylcytozin-vazebnými proteiny, může být deaminován za vzniku tyminu: vzniká tím bodová mutace, která může aktivovat například onkogeny. 5-metylcytozin také může představovat oblasti zvýšené senzitivity vůči UV-záření či vazby karcinogenů.

Nejlépe prostudovaným mechanismem, jak metylace DNA přispívají ke vzniku nádorového růstu jsou **hypermetylace promotorů supresorových genů (obr. 9.8)**. Tyto vedou k umlcení jedné ze supresorových alel, takže lokus se stává heterozygotním. Alternativně, heterozygotní stav může být navozen i bodovou mutací. Podle Knudsonovy hypotézy dvojího zásahu pak přichází druhý faktor, který změní stav heterozygotní na „ztrátu funkce“. Může se tak stát po rozsáhlejší deleci nebo opětné hypermetylaci DNA. Experimentálně bylo prokázáno, že takovou hypermetylací je možné revertovat po aplikaci inhibitorů metylace, jako je například 5-azacytidin.



**Obr. 9.8** Role metylací v nádorovém růstu (podle Allise et al., 2007). V normální buňce je nádorový supresor aktivní v obou alelách. Podle teorie „dvojího zásahu“ je nejprve navozena funkční haploidie (mutací - vyznačeno černě nebo metylací DNA - šedě) a poté je dalším zásahem (delece, metylace) supresor zcela vyřazen z funkce.

Jednou z příčin nádorového růstu může být i ztráta heterozygotnosti v imprintované oblasti chromozomu. Příkladem je **Wilmsův renální tumor** (*WT*, *Wilms' tumor*). Wilmsův tumor je jedním z nejčastěji se vyskytujících solidních tumorů dětského věku, výskyt 1 na 10 000 porodů. Nejčastěji se vyskytuje ve formě sporadického nádoru ledvin; přibližně 1 % onemocnění má dědičný charakter autozomálně dominantního onemocnění s neúplnou penetrancí. Nejčastěji nacházenou genetickou změnou u dědičné formy WT je mutace v tumor supresorovém genu *WT1* v imprintované oblasti chromozomu 11, ke vzniku nádoru vede ztráta alely maternálního původu (**obr. 9.9**).



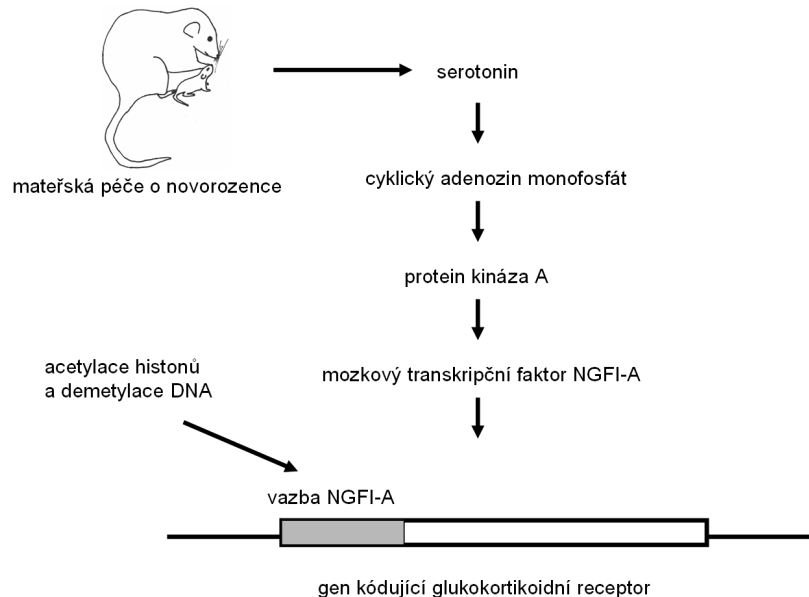
**Obr. 9.9** Příčiny Wilmsova renálního tumoru; jde o imprintovanou oblast chromozomu 11, která obsahuje i tumorový supresor *WT1*. Prvním krokem k tumorigenezi embryonálních ledvin bývá bodová mutace (X, černě) v paternálním chromozomu (p, A1) a druhým - konečným - je delece oblasti A2 maternálního (m) původu.

Epigenetické umlčování může svým fenotypovým efektem imitovat genetickou mutaci. Pokud dojde k epimutaci v genu, který řídí nádorový růst, může dojít i ke změně dědičné dispozice, pokud nastane v zárodečné dráze. Příkladem mohou být i metylace genů hrajících roli v **reparaci DNA** - kontrole správného párování obou vláken DNA (*mismatch repair*). Tak například byla zjištěna u dvou pacientů mozaiková hypermetylace reparačního genu *MLH1*. Jejich četné primární nádory vykazovaly defekt tohoto reparačního genu, aniž by byla zjištěna jeho mutace. Oba pacienti trpěli vrozeným kolorektálním nádorem. Epimutace (hypermetylace genu *MLH1*) byla zjištěna nejen v somatických buňkách pacientů, ale i v jejich spermiích, což představuje možný mechanismus pro dědičný přenos této choroby. Jiným reparačním genem, který může být odpovědný za vznik kolorektálních tumorů, je *MSH2*. U tohoto genu bylo prokázáno, že jeho hypermetylace vede k dědičnému charakteru této choroby: ve třech následných generacích byla prokázána jak hypermetylace promotoru *MSH2*, tak i výskyt kolorektálního karcinomu.

## 9.5 Epigenetika a neurobiologie

Předchozí kapitoly prezentovaly velkou řadu případů, kdy v důsledku chybné epigenetické informace dochází obvykle ke vrozené poruše vývoje, která často ústí v těžké neurologické defekty. Svědčí to o tom, že správná epigenetická informace je nezbytná jak k vývoji vegetativnímu, tak i nervové soustavy. Epigenetické mechanismy, jako jsou metylace DNA či kovalentní modifikace histonů jsou ovlivňovány i vnějšími faktory, jako například dietou nebo mateřskou péčí. U potkanů bylo například sledováno, zdali alkohol nezpůsobuje změnu acetylace či metylace nukleozomálních histonů H3. Experimentální aplikace **etanolu** a následné analýzy histonů v různých somatických tkáních: některé obsahovaly podstatně vyšší hladinu acetylovaných histonů (markery aktivity), jiné měly vyšší obsah metylovaných histonů jako markerů inaktivace. Závěrem tedy zřejmě je, že konzumace alkoholu může vést k nepředvídatelným změnám epigenetického programu. Také u člověka bylo studováno, zdali konzumenti alkoholu versus čerství abstinenti nejeví změny v metylaci promotoru genu kódujícího patologický protein  $\alpha$ -synuclein. U pacientů-alkoholiků byla zjištěna vyšší frekvence metylace promotoru  *$\alpha$ -synucleinu*,

což zjevně souvisí se zvýšenou hladinou homocysteinu (prekurzor donoru metylové skupiny), zatímco hladina metylace u kontrolního genu (*presinil-1*) byla stejná u alkoholiků a abstinentů. Podobně byly na krysách studovány i potenciálně negativní vlivy **nikotinu** na zdraví potomstva březí matky i do další pohlavní generace. Bylo zjištěno, že potkaní samice podrobené aplikaci nikotinu ve stádiu březosti i laktace jevíly v potomstvu i v generaci F2 různé metabolické poruchy, včetně zvýšeného krevního tlaku a zvýšené hladiny sérového inzulínu. V obdobných experimentech byly studovány i další drogy, jako například **kokain**: v tomto případě bylo prokázáno, že kokain má aktivační úlohu v genové expresi prostřednictvím histon acetyltransferáz.



**Obr. 9.10** Úloha epigenetických mechanismů v regulaci chování u potkana. Mateřská péče (lízání a mazlení) o mláďata v postnatálním období vede k indukcii tvorby serotoninu, který přes cyklický adenosin monofosfát a protein kinázu A, vede k syntéze mozkového transkripčního faktoru NGFI-A: ten zajišťuje aktivaci genu kódujícího glukokortikoidní receptor, což je spjato s demethylací DNA a acylací histonů jeho promotoru. Tato aktivace receptoru vede ke klidnému, nestresovému způsobu chování po celý život potkana.

Tradičně je známo, že dobrá **mateřská péče** vede k dobrému psychickému stavu potomstva. Tento fenomén dosud nebyl biochemicky podložen a o jeho epigenetické podstatě se jen spekulovalo. Recentní studie ukázaly, že epigenetické programování klíčového genu psychiky potkana – genu kódujícího **glukokortikoidní receptor** – probíhá až v časném postnatálním období. V tomto období se potkaní matka obvykle věnuje i fyzické péči o své potomky (lízání a mazlení, *licking and grooming*). Díky těmto podnětům dochází v potomstvu k syntéze serotoninu, který aktivuje cyklický adenosin monofosfát, protein kinázu A a konečně mozkový transkripční faktor NGFI-A. Tento transkripční faktor aktivuje gen kódující glukokortikoidní receptor a spolu s efektem histon acetyltransferázy vede k aktivitě tohoto genu: vyšší hladina glukokortikoidního receptoru odpovídá dobré psychice jedince až do dospělosti (**obr. 9.10**). Pokud není maternální péčí navozena serotoninová dráha, nedochází ani ke tvorbě mozkového transkripčního faktoru a gen kódující glukokortikoidní receptor není aktivován; dochází naopak k jeho DNA metylaci. Nepřítomnost glukokortikoidního receptoru vede ke stresovému chování jedince až do jeho dospělosti. Toto epigenetické programování však není dědičné: s každou pohlavní generací se nastavuje znovu (analogicky jako u procesu vernalizace u rostlin). Bylo též prokázáno, že nejde o vliv genotypu, neboť nastavení chromatinu promotoru bylo indukováno i náhradní potkaní matkou.

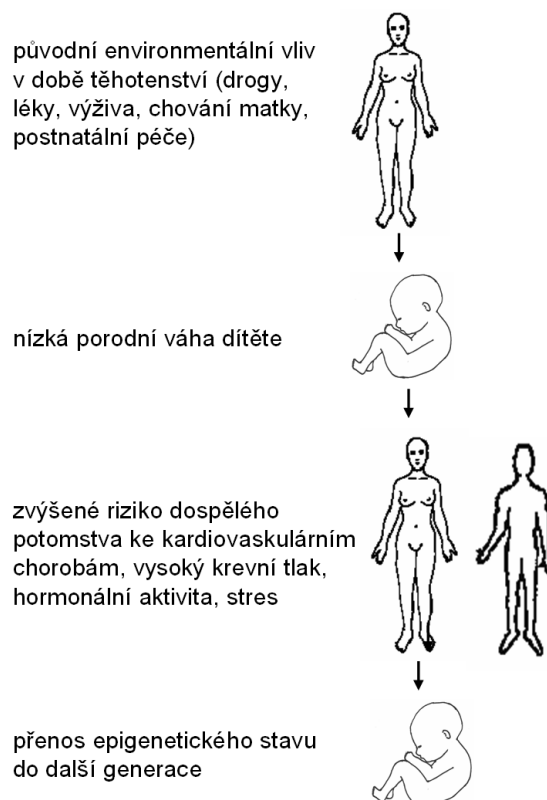
Experimentátoři se také pokusili prokázat, jakou roli v tomto procesu hrají metylace DNA a zda je tato epigenetická reakce reverzibilní. Provedli infúzi metioninu do mozků potkanů, kteří byli vedeni mateřskou péčí či nikoli. Po aplikaci metioninu (potenciálním donorem metylových skupin) došlo k výrazně vyšší globální metylaci DNA včetně dříve aktivovaného receptoru u jedinců s dobrou mateřskou péčí. Z výsledků této studie vyplývá, že změna nastavení chování jedince je reverzibilní a chování je možné s pomocí vhodné terapie regulovat.

Úzkostlivé chování člověka může vést až k jeho **sebevraždě**. Je otázkou, do jaké míry v těchto stavech hrají roli epigenetické procesy. Určitá dispozice k sebevraždám má genetickou podstatu, mezi rizikové faktory patří zejména špatné zážitky z dětství. Diskutuje se také o expresi řady genů, které působí zejména v mozku. Tyto geny by pak mohly být řízeny například mechanismem metylace DNA. Tak je tomu i u repetitivních genů kódujících **ribozomální rRNA**, kde jediná CpG metylace v určité pozici blokuje transkripci příslušné jednotky rRNA. Ribozomální RNA má zásadní vliv na proteosyntézu, a tak nedostatek těchto molekul může vést k zásadním defektům ve vývoji. Byly provedeny experimenty – analýzy metylačního stavu rRNA genů v mozku u sebevrahů ve srovnání se zemřelými podobného věku avšak na náhodnou tragickou událost. Bylo prokázáno, že v některých částech mozku byla u sebevrahů zjištěna výrazně vyšší hladina 5-metylcytosinu, takže měli redukovanou dostupnost rRNA. Tyto výsledky naznačují, že epigenetické procesy hrají významnou roli i v neurologických procesech.

## 9.6 Transgenerační efekty

Transgeneračními efekty rozumíme přenos epigenetické informace z jedné pohlavní generace do druhé. Pokud se týká aplikace tohoto termínu v medicínských vědách, máme na mysli spíše vliv negativních faktorů na zdraví a dědičnost těchto (teratogenních) změn u člověka nebo modelových savců (myš, potkan). Jedním z faktorů, které významně ovlivňují zdravý vývoj jedince, je výživa pregnantní matky. V kapitole 8.4 je popsán modelový systém *Agouti* u myši a demonstrováno, jak může správná **metylační dieta pregnantní matky** ovlivnit fenotyp (zdraví) potomstva. Později bylo prokázáno, že tento jev je dědičný minimálně do generace F2. V průběhu březosti se totiž vyvíjí nejen epigenetický program embryí, ale současně se v nich i zakládá zárodečná dráha, která posléze dá vznik další generaci. Pokud se týká konkrétní diety u člověka, je tradicí asijských žen sójová dieta, která obsahuje fytoestrogen genistein. Genistein je pokládán za látku odpovědnou za redukcii početí, za prevenci vůči rakovině i za pokles obezity. Modelová studie se sójovou výživou myši *Agouti* ukázala, že genistein je především odpovědný za metylaci DNA: dieta vedla k výrazně vyšší frekvenci metylovaného fenotypu pseudogouti než u myši se standardní výživou. Vliv výživy, ať už v období pregnancy nebo v jiných stádiích života, na další vývin jedince i v následných generacích je studován i s pomocí statistických analýz. Velmi cenné jsou archivní údaje o třech **skupinách obyvatel ze severního Švédska (*Överkalix cohorts*)** narozených v letech 1980, 1905 a 1920. Archivní materiály zaznamenávají i různé detaily ze života těchto lidí i jejich potomstva minimálně po dobu dvou generací. Statistiky ukázaly, že například pokud nebylo možné přejídání v období pomalé růstové periody otce (8–12 let), děti v další generaci netrpěly úmrtností na kardiovaskulární choroby. Naopak se zvýšila mortalita na diabetes, pokud v období dětství trpěl obezitou. Podobně byl zjištěn i účinek časného kouření na zvýšení hmotnosti synů, nikoli dcer. Podobné efekty pohlaví byly zjištěny i u jiných parametrů: například výživa dědečků měla vliv na úmrtnost vnuků a nikoli vnuček. Zdá se, že pohlavně specifické transgenerační efekty mají racionální podklad a mohou být eventuálně vázány i na pohlavní chromozomy X nebo Y. Jak se v těchto procesech uplatňují také epigenetické mechanismy, není dosud jasné.

Mnoho epidemiologických studií ukázalo, že existuje úzký vztah mezi **nízkou porodní váhou** člověka a jeho následným sklonem k hypertenzi, rezistenci k inzulínu, diabetes typu 2 a kardiovaskulárním chorobám. Byly vysloveny minimálně dvě hypotézy, které vysvětlují vliv environmentálních faktorů na vztah mezi nízkou porodní váhou a zdravotními problémy v dospělosti: špatná výživa plodu a aplikace glukokortikoidů. Epidemiologické analýzy naznačily, že nízká porodní váha může mít **transgenerační charakter**. Jestliže je nízká porodní váha spojena se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem, vedlo by to k dědičnosti predispozice k nízké porodní váze i kardiovaskulárním chorobám napříč generacemi (**obr. 9.11**). Možná vysvětlení intergeneračních efektů zahrnují například názory, že genetické předpoklady se manifestují podobně u matky a jejího potomstva, nebo že nepříznivé environmentální účinky působí po více generací. Je zjevné, že efekt špatného intrauterinního vývoje jedince může přetrvávat v metabolických poruchách v dalším vývoji a tím se (zejména u matky) může vytvořit suboptimální prostředí pro jeho plod. Je zjevné, že jak nízká porodní váha tak i dispozice ke kardiovaskulárním chorobám souvisejí s parentálním příspěvkem: maternální vliv je přitom výrazně silnější než paternální. Recentní výsledky naznačují, že porodní váha souvisí s lokusem na chromozomu 11, který je maternálně imprintovaný. Je zjevné, že intergenerační programování může probíhat i po delší absenci environmentálního vlivu. Expozice embrya či plodu škodlivému vlivu *in utero* může vést k přetrvávající fyziologické změně v dospělosti, což může způsobovat i fixaci fyziologické změny v potomstvu. Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících fetální programování je samozřejmě maternální podvýživa či špatná dieta. Je známa i celá řada genů, které regulují fetální růst a některé z nich jsou imprintované (jako například *IGF2*). Epigenetické umlčování alel je modulováno i maternální dietou a může vést k podměrečnému nebo naopak nadměrnému růstu plodu. Taková epigenetická změna může být přenášena do další generace a může být tedy příčinou intergeneračního přenosu poruchy růstu a vývoje.



**Obr. 9.11** Epigenetický záznam se vytváří u savců v průběhu embryogeneze, tedy uvnitř těla matky. Rušivé zásahy v průběhu těhotenství, jako jsou stres, špatná výživa, léky, drogy nebo alkohol, mohou vést k nízké porodní váze a zvýšenému riziku potomstva vůči kardiovaskulárním chorobám, stresu či hormonálním poruchám. Pokud tyto nastávají, zejména u ženy, mohou vést k transgenerační dědičnosti epigenetických defektů.

V některých případech při studiu efektu různých toxických látek na myši **reprodukční systém** byly také shledány aspekty epigenetické dědičnosti. Anti-androgenní látka - fungicid vinclozolin - působí tranzičně v době determinace pohlaví embrya a vede k částečným defektům fertility sameček v generaci F1. Následná analýza tří dalších generací myši pak prokázala, že defekt je přenášen samčí drahou přinejmenším do generace F4. Zřejmě při primární aplikaci toxinu došlo k nastartování alternativní (patologické) dráhy vývoje spermií, která pak byla geneticky asimilována (jako v případě Waddingtonových drozofil, viz **obr. 2.4**). Podobné výsledky byly dosaženy při studiu vlivu jiného environmentálního polutantu benzpyrénu v období březosti u myši. Příslušné glukokortikoidní receptory v brzlíku sameček byly benzpyrénem redukovány minimálně do F2, zatímco u samic tomu tak bylo jen v generaci F1. Tyto výsledky naznačují možnost epigenetického přenosu negativních environmentálních vlivů na vývoj plodu včetně drog či nevhodných terapeutických léčiv.

## 10 SHRNUTÍ EPIGENETICKÝCH JEVŮ

Na základě dnes dostupných vědeckých informací lze shrnout, že epigenetika se vyznačuje následujícími pravidly či zákonitostmi:

[1] Epigenetické jevy se vyskytují výhradně u **eukaryotických organismů**, přitom kauzální mechanismy jsou u různých skupin eukaryot často odlišné.

[2] **Epigenetika** se vymezuje vůči klasické genetice především tím, že dědičnost jejích znaků se obvykle neřídí mendelovskými zákony.

[3] **Epigenetické jevy charakterizujeme jako dědičné fenotypové změny**, které jsou způsobeny nad rámcem základní genetické informace (tedy nejde o pořadí nukleotidů v řetězcích DNA).

[4] **Klíčovými informačními molekulami**, které za epigenetické jevy odpovídají, mohou být DNA, RNA nebo proteiny – včetně jejich chemických či strukturních modifikací.

[5] Epigenetická informace obvykle spočívá v **umlcování genů**, může ale vést i k aktivaci a zesilování genové exprese.

[6] Epigenetická informace má **kvantitativní charakter** a je **mnohonásobná**: například rozsah jednotlivých metylací cytozinu je velký, na rozdíl od sekvence nukleotidů, která je diskretní.

[7] V podstatě každá buňka každého eukaryotického organismu nese jedinečnou epigenetickou informaci – **epigenom**. Zhruba však lze říci, že základní počet epigenomů jedinců určitého druhu odpovídá počtu jeho tkáňových typů.

[8] Epigenetické procesy jsou **dynamické** (mění se v průběhu vývoje, diferenciaci a stárnutí) a **reverzibilní** (v zákonitých či nahodilých fázích životního cyklu mohou revertovat).

[9] Epigenetická informace obvykle funguje na bázi několika těsně spřažených mechanismů, kde primárními procesy se zdají být **RNAi** a **modifikace histonů** a sekundárními procesy **metylace DNA** a vazba **paměťových proteinů**.

[10] **Jednodušší eukaryota** (prvoci, kvasinky, *Caenorhabditis*) mají vyvinuty pouze systémy RNAi a modifikace nukleozomálních histonů (především aktivující acetylaci). Všichni **živočiškové a krytosemenné rostliny** využívají umlčujících funkcí Polycomb a heterochromatinového proteinu HP1. Methylace DNA se jako zjevně sekundární epigenetický proces sloužící k udržování umlčeného stavu vyvinul pouze u některých hub (například *Neurospora*), krytosemenných rostlin a savců.

[11] Typickými rysy epigenetických jevů, které je odlišují od mendelovských znaků, jsou jejich **neúplná penetrance** a **variabilní expresivita**.

[12] Mezi klíčové faktory, které ovlivňují penetranci a expresivitu epigeneticky řízených znaků, patří **environmentální vlivy** (fyzikální, chemické) a **vnitřní vlivy** (biochemické, metabolické; genetické pozadí).



[13] Epigenetické jevy se vyskytují **pravidelně** (obligatorně) nebo **náhodně** (stochasticky), obvykle však s řádově vyšší četností než genetické mutace.

[14] Základním obligatorním epigenetickým jevem je **genomový imprinting**. Vyskytuje se v několika desítkách lokusů u savců a krytosemenných rostlin, zjevně souvisí s kontrolou vývoje embrya uvnitř těla matky. Chyba v imprintingu má často letální charakter nebo je spojena s těžkou vývojovou vadou.

[15] Imprinting se u savců vyvíjí v zárodečné dráze a má **reverzibilní charakter**: při gametogenezi se původní imprint vymaže a vzniká nový podle pohlaví jedince. U rostlin se imprinting vytváří zřejmě jen v endospermu, který není pravou součástí embrya a záhy zaniká. Procesy imprintingu u savců a krytosemenných rostlin tedy představují **evoluční konvergenci**.

[16] Zákonitým epigenetickým procesem je u řady živočišných druhů s pohlavními chromozomy X a Y **kompence dávky X-vázaných genů**. Strategie dávkové kompenzace i její molekulární mechanismy jsou však odlišné. Negativní strategii (potlačovací) mají savci a *Caenorhabditis*: u savců se vyvinul mechanismus umlčení jednoho ze dvou chromozomů X u samic (s úlohou RNA, modifikace histonů a metylace DNA), u *Caenorhabditis* se částečně potlačují oba chromozomy X u hermafroditů (kondenzinový komplex). *Drosophila* má strategii pozitivní: u sameček je jediný chromozom X hyperaktivní (acetylace histonů).

[17] **Doba trvání** epigenetických změn je různá: od jednotlivých buněčných dělení (mitotický **bookmarking**), přes dědičnost vyhasínající v parentální generaci (například kompenzace dávky X-vázaných genů či vernalizace) až po stabilně dědičné fenotypové změny (**transgenerační dědičnost, epimutace**).

[18] Epigenetické jevy jsou často kritickým **kontrolním mechanismem** v individuálním vývoji, jako například kontrola kombinace odlišných parentálních genomů (genomový imprinting u savců), umlčování onkogenů nebo eliminace nadpočetných sekvencí DNA (mechanismus RIP u *Neurospora crassa*).

[19] Epigenetické mechanismy se zřejmě evolučně vyvinuly z **obranných mechanismů umlčování parazitických sekvencí DNA a RNA**, jako jsou DNA transpozony, retrotranspozony nebo viry.

[20] Epigenetické mechanismy významně rozšiřují **schopnost adaptace** organismů na vnější podmínky prostředí. Jejich fixace v **evolučním toku** (genetická asimilace) však dosud není dostatečně objasněna.

## 11 SLOVNÍČEK NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH TERMÍNŮ

**Acetylace histonů** (*histone acetylation*) – jedna z jejich nejčastějších chemických modifikací, obvykle má za následek aktivaci příslušných genových oblastí. Donorem acetátu je acetylkoenzym A, reakci katalyzují histon acetylázy, reverzně histon deacetylázy [viz kapitola 3.2.2].

**Ade** (*Ade*) – reportérový gen u kvasinek (*Ade2* u *Saccharomyces cerevisiae*, *Ade<sup>6+</sup>* u *Schizosaccharomyces pombe*) odpovědný za syntézu adeninu. Jeho mutace či umlčení se projeví kumulací prekursoru – červeného pigmentu [viz kapitola 5.2.1.3].

**Agouti** (*Agouti*) – gen kódující enzym katalyzující tvorbu žlutého pigmentu phaenomelaninu z původně černého eumelaninu v srsti myši. Přírozená exprese genu z vlastního promotoru vede k fenotypu pseudoagouti (tmavá srst – krátkodobá exprese enzymu vede ke tvorbě černého chloupku se žlutým proužkem). Gen *Agouti* je používán k monitorování epigenetického umlčování: blízkost retroelementu vede k ektopické expresi genu z retrovirového promotoru [viz kapitola 8.4].

**Angelmanův syndrom** (*Angelman syndrome*) – těžká vrozená komplexní neurovegetativní choroba člověka. Je obvykle způsobena ztrátou exprese maternálně exprimovaného genu *UBE3A* v imprintované oblasti p11–13 na chromozomu 15 (podobně jako Prader-Williův syndrom) [viz kapitola 9.3.1].

**Argonautové proteiny** (*Argonaute proteins*) – jsou efektory umlčování prostřednictvím malých molekul RNA. Malé RNA navádějí argonauty na svá cílová místa RNA. Argonauty jsou charakterizovány dvěma doménami – Piwi (ribonukleáza) a PAZ (ssRNA vazebný modul) [viz kapitola 6.1.4].

**Autogamie** (*autogamy*) – pohlavní rozmnožování trepky, kterého se však účastní jen jediná buňka. Dochází při ní k meióze, ale přežívá jen jediné mikrojádro. Pokud bylo původní jádro heterozygotní, stává se nyní homozygotním [viz kapitola 5.1.1].

**5-azacytidin** (*5-azacytidine*) – analog cytidinu, který se při replikaci včleňuje do DNA a blokuje funkci DNA metyltransferáz. Může aktivovat geny a používá se jako terapeutická látka vůči nádorovým chorobám [viz kapitola 3.1.3].

**Baldwinův efekt** (*Baldwin effect*) – evoluční reakce na environmentální změnu, která zachovává nebo dokonce zvyšuje fenotypovou plasticitu uvnitř druhu. Jinými slovy je to dědičná schopnost organismu se adaptovat na vnější změny v průběhu života [viz kapitola 2].

**Barrovo tělísko** (*Barr body*) – inaktivovaný chromozom X u samic savců vytváří v interfázi některých buněk na periferii jádra silně barvitelný, kondenzovaný fakultativní heterochromatin. Poprvé je pozoroval Murray Barr v roce 1949 [viz kapitola 8.2].

**Beckwith-Wiedemannův syndrom** (*Beckwith-Wiedemann syndrome*) – obvykle maternálně děděná choroba způsobující příliš nadměrný fetální růst a dispoziční k embryonálním nádorům (jako je například Wilmsův ledvinový tumor). Jde o chybnou expresi paternální alely *IGF2* (kódující insulinový růstový faktor II) a maternální alely *H19* (kódující RNA, která není translatována, ale způsobuje potlačování růstu embrya) v oblasti p15.5 chromozomu 11 [viz kapitola 8.3, 9.3.1].

**Blastocysta** (*blastocyst*) – časné stádium embryonálního vývoje, ve kterém se buňky začínají diferencovat do různých vývojových linií [viz kapitola 9.2].

**Bromodoména** (*bromodomain*) – je konzervativní doména proteinů, které rozpoznávají a vážou se na acetylovaná rezidua lyzinu na aminoterminálních koncích nukleosomálních histonů. Tato vazba je podmínkou pro remodelování chromatinu (aktivaci) [viz kapitola 3.2.2].

**Butyrát sodný** (*sodium butyrate*) – sodná sůl kyseliny máselné (krátká mastná kyselina), která působí jako inhibitor histon deacetyláz [viz kapitola 3.2.2].

**CENP-A** – varianta centromerického heterochromatinu kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*, je variantou histonu H3 [viz kapitola 5.2.2.2].

**Centromerický heterochromatin** (*centromeric heterochromatin*) – obsahuje geneticky inertní konstitutivní heterochromatin v oblasti centromer chromozomů. Zahrnuje převážně specifické tandemové repetice DNA [viz kapitola 5.2.2].

**Centromerický poziční efekt** (*CPE, centromere position effect*) – je odpovědný za umlčování genů, které jsou do této oblasti chromozomu lokalizovány. Je nejvíce zkoumán na modelu kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* [viz kapitola 5.2.2.1].

**Cofflin-Lowryho syndrom** (*Cofflin-Lowry syndrome*) – představuje těžkou (zvláště u chlapců) psychomotorickou retardací a skeletální abnormality. Je to X-vázaná choroba, gen kóduje protein kinázu, má histon fosforylační aktivitu [viz kapitola 9.3.4].

**CpG ostrovy** (*CpG islands*) – oblasti DNA o velikosti přes 500 párů bazí s vysokou denzitou dinukleotidu CpG, které jsou obvykle nemetylovány a nacházejí se v promotorových oblastech mnoha savčích genů [viz kapitola 8.1].

**Cytoplazmatická dědičnost** (*cytoplasmatic parental inheritance*) – nemendelistická dědičnost znaků, která spočívá ve fyzickém přenosu cytoplazmatických informačních molekul (RNA nebo proteiny) nebo organel (plastidy a mitochondrie) do zygoty resp. jedince příští generace [viz kapitola 5.1.2].

**Dicer** (*dicer*) – důležitá komponenta RNA interferenčního (umlčovacího) mechanismu. Je to RNA endonukleáza, která štěpí dvouvláknovou RNA na malé fragmenty RNA o velikosti přibližně 21 nukleotidů [viz kapitola 3.4.2, 5.3.2, 7.5].

**DNA metyltransferázy a demetylázy** (*DNA methyltransferases and demethylases*) – představují četné rodiny enzymů, které katalyzují metylaci cytozinu v DNA většiny eukaryotických buněk. Udržovací metyltransferázy mají za úkol udržovat metylaci dceřinných vláken po replikaci, *de novo* metylázy metylují nemetylovanou DNA podle potřeb buňky. DNA demetyláza byla zatím jednoznačně prokázána jen u rostlin (N-glykozyláza), u živočichů zřejmě aktivní demetylace nastává reparačním procesem [viz kapitola 3.1.2].

**Dvojitá oplození** (*double fertilization*) – proces sexuální reprodukce krytosemenných rostlin, kdy dvě buňky samičího megagametofytu (zárodečného vaku) jsou nezávisle oplozeny dvěma spermii po-

cházejícími z pylové láčky (samčího gametofytu). Z jednoho splynutí vzniká diploidní embryo, ze druhého zpravidla triploidní endosperm [viz kapitola 7].

**Embryonální kmenové buňky** (*ESC, embryonic stem cells*) – pluripotentní kmenové buňky odvozené z vnitřní buněčné masy časného embrya. Tyto buňky jsou schopné diferencovat ve všechny možné buněčné typy organismu [viz kapitola 9.1].

**Endosperm** (*endosperm*) – zásobní rostlinné pletivo určené k výživě embrya (analogie s placentou u savců). Je výsledkem oplození obvykle diploidní centrální buňky samičího zárodečného vaku jednou ze dvou spermií. Endosperm se vyskytuje ve vyvíjejícím se semenu a není již součástí další generace. Některé geny jsou v endospermu imprintovány, jejich exprese závisí na rodičovském původu; převládají geny exprimované maternálně [viz kapitola 7, 7.7].

**Enhancer of Zeste** [E(z)] – regulační protein (histon metyltransferáza) prvně identifikovaný u drozofily. Určitá doména proteinu E(z) je odpovědná za umlčování genů. Tato doména je však homologní i k proteinům skupiny Trithorax, což jsou známé transkripční aktivátory [viz kapitola 3.3].

**Epialely** (*epialleles*) – alternativní stavy chromatinu daného lokusu v příslušném tkáňovém typu. Exprese epialel může být rozdílná, taktéž se různí i jejich stabilita [viz kapitola 7.4].

**Epigenetická determinace pohlaví** (*epigenetic sex determination*) – pohlavní determinace řízená epigenetickým procesem. U mouchy *Sciara coprophila* dochází k náhodné eliminaci jednoho nebo dvou paternálních chromozomů X, podle toho vznikají samečci nebo samičky [viz kapitola 6.3].

**Epigenetická dědičnost** (*epigenetic inheritance*) – transgenerační přenos epigenetické informace [viz kapitola 8.4].

**Epigenetická krajina** (*epigenetic landscape*) – představa Conrada Waddingtona o buněčné diferenciaci: kulička se v krajině pohybuje gravitační silou (ireverzibilně) alternativními údolími (tzv. chreodami) a podle nich může měnit směr pohybu i destinaci (výsledný fenotyp, kanalizace) [viz kapitola 2].

**Epigenetická restrukturalizace makrojádra** (*epigenetic restructuring of macronucleus*) – jsou přesné a programované intragenové delece a nepřesné fragmentace chromozomů u prvoků. Jejich úlohou je obrana genomu (delece) transpozonů a repetitivních sekvencí, předpokládá se tu funkce malých molekul siRNA [viz kapitola 5.1.5].

**Epigenetika** (*epigenetics*) – vědní obor genetiky, který se zabývá dědičností – mitotickou i meiotickou – fenotypových změn, které nejsou podmíněny změnou nukleotidových sekvencí v DNA [viz kapitola 1, 10].

**Epigeneze** (*epigenesis*) – Aristotelova idea vývojové biologie: tělo organismu není předem vytvořeno (preformováno), nýbrž vzniká postupně od jednoduchých tvarů ke komplexním formám [viz kapitola 2].

**Epigenom** (*epigenome*) – komplex možných epigenetických modifikací genomu eukaryotické buňky. Tyto modifikace zahrnují metylace DNA, histonové modifikace a další proteiny vázané na chromatin [viz kapitola 10].

**Epimutace** (*epimutation*) – dědičná změna fenotypu způsobená epigenetickým mechanismem, například změnou metylace DNA. Může být děděna po mnoho pohlavních generací [viz kapitola 7.1].

**Euchromatin** (*euchromatin*) – především cytologická charakteristika potenciálně aktivního chromatinu. Představuje rozvolněný chromatin, jen slabě barvitelný, charakteristický pro genové oblasti obvykle s vysokým obsahem acetylovaných histonů [viz kapitola 3.2].

**Expresivita genu** (*gene expressivity*) – míra projevu příslušného genu, resp. znaku. Expresivita mendelisticke děděných znaků bývá vysoká, u epigeneticky děděných znaků bývá nižší a kolísavá [viz kapitola 8.3].

**Genetická asimilace** (*genetic assimilation*) – Waddingtonův termín pro evoluční reakci na environmentální změnu, která má za následek genetickou kanalizaci. Jde zvláště o výskyt individuí s adaptivním znakem dokonce za nepřítomnosti původního environmentálního stimulu, který změnu vyvolal (viz Waddingtonovy experimenty s narušeným embryonálním vývojem drozofily) [viz kapitola 2].

**Genomové sekvenování** (*genomic sequencing, sodium bisulfite treatment*) – metoda detekce 5-metylcytozinu v sekvencích DNA. Po aplikaci hydrogensířičitanu sodného na izolovanou DNA dochází ke konverzi cytozinu v uracil, zatímco metylová skupina v pozici C5 cytozinu hydrolytickou deaminací cytozinu v uracil inhibuje [viz kapitola 4.2].

**Genomový imprinting** (*genomic, parental imprinting*) – reverzibilní epigenetická modifikace (umlčování) některých jaderných genů v závislosti na pohlaví rodiče. U savců k němu dochází při gametogenezi a obvykle v somatické linii zůstává po celý život jedince. V genomu savců je imprintováno několik desítek lokusů. Imprinting se také vyskytuje u krytosemenných rostlin a některých druhů hmyzu [viz kapitola 6.3, 7.7, 8.3].

**Genová konverze** (*gene conversion*) – typ genetické rekombinace, kdy během meiózy popřípadě mitózy dochází k náhradě určitého genu jeho jinou kopií. Vyskytuje se pravidelně při přepínání genů pohlavnosti (*MAT*) u kvasinek. Může být odpovědná i za nemendelisticke dědičnost znaků [viz kapitola 5.2.1.1].

**Heterochromatin** (*heterochromatin*) – cytologická charakteristika kondenzovaného, umlčeného chromatinu. Dělí se na konstitutivní (permanentně umlčené oblasti genomu či chromozomu obsahující četné repetitivní sekvence DNA) a fakultativní (dočasně umlčené oblasti genomu, například Barrovo tělísko) [viz kapitola 3.2].

**Heterochromatinový protein 1** (HP1; *heterochromatin protein 1*) – konzervativní složka umlčených heterochromatických oblastí. Obsahuje chromodoménu, která se váže na nukleozomy obsahující v histonu H3 metylovaný lyzin v pozici 9 [viz kapitola 3.2.3].

**Histony** (*histones*) – krátké bazické proteiny, které se vážou na DNA a tvoří základ chromatinové struktury. Aminoterminální konce histonů (H2A, H2B, H3 a H4) se podrobují kovalentním modifikacím, které se podílejí na regulaci genové exprese. V oblastech mezi nukleozomy se váže histon H1 [viz kapitola 3.2].

**Hypomorfní mutace** (*hypomorphic mutation*) – míra exprese genu závisí na počtu jeho kopií, konkrétně heterozygot s jedinou funkční alelou má slabší míru exprese než homozygot se dvěma funkčními

alelami. Poprvé jev popsal Hermann Joseph Muller v roce 1930 na barvě oka drozofily (gen *white*) [viz kapitola 6.2.3].

**Chromatin** (*chromatin*) – základní materiál jádra eukaryotické buňky složený především z DNA, histonů a mnoha dalších vazebných proteinů. Základní jednotkou chromatinu jsou nukleozomy, které představují oktamer histonů (vždy po dvou histonech H2A, H2B, H3 a H4), který je obtočen vláknem DNA. V oblastech mezi nukleozomy se váže histon H1 [viz kapitola 3.2.1].

**Chromatin remodelující proteiny** (*chromatin-remodeling proteins*) – jsou enzymy závislé na adenosintri-fosfátu (ATP) a mění interakce histonů a DNA v chromatinu nezbytné k zajištění procesů, jako jsou transkripce, replikace či rekombinace [viz kapitola 3.5].

**Chromatinová imunoprecipitace** (*ChIP, chromatin immunoprecipitation*) – technika využívaná k analýze genomové lokalizace proteinů vázaných na DNA. Zahrnuje vyvázání DNA-proteinových komplexů, jejich imunoprecipitaci pomocí protilátky vůči specifickému proteinu (např. vůči histonu H4 acetylovanému na lyzinu v pozici 8). Imunoprecipitace pak umožňuje analýzu izolovaných sekvencí DNA (např. prostřednictvím PCR a sekvenováním) [viz kapitola 4.3].

**Chromatinový izolátor** (*chromatin insulator*) – má funkci rozhraní mezi sousedními, různě imprintovanými geny u savců. Odlišná exprese sousedních genů je způsobena vazbou regulačního faktoru na CTC-sekvenci chromatinového izolátoru [viz kapitola 8.3].

**Chromodoména** (*chromodomain*) – vysoce konzervativní proteinová doména o velikosti asi 50 aminokyselin nalezená v heterochromatinovém proteinu HP1 drozofily a v proteinech skupiny Polycomb. Tyto proteiny se vážou na aminotermální výběžky nukleozomálních histonů, které jsou specificky metylovány [viz kapitola 3.2.3].

**ICF syndrom** (*ICF syndrome; immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies syndrome*) – vzácná autozomálně-recesivní porucha imunitního systému. Je způsobena mutací DNA metyltransferázového genu *Dnmt3b*, což vede k hypometylaci subcentromerických repeticí (heterochromatinu) na chromozomu 1, 9 a 16 [viz kapitola 9.3.2].

**Imunobarvení** (*immunostaining*) – technika vizualizace proteinů na cytologických či histologických preparátech s pomocí specifických značených protilátek [viz kapitola 4.3].

**Inaktivace chromozomu X** (*X chromosome inactivation*) – epigenetické umlčování jednoho ze dvou chromozomů X v somatických buňkách samic savců. Inaktivace chromozomu zahrnuje zvýšenou metylaci DNA a modifikace nukleozomálních histonů, představuje mechanismus dávkové kompenzace X-vázaných genů u savců [viz kapitola 8.2].

**In situ hybridizace** (*in situ hybridization*) – technika detekce úseků DNA nebo RNA na fixovaných preparátech buněk či tkání, která je založena na hybridizaci a vizualizaci značené sondy. V případě detekce úseků DNA mluvíme o mapování chromozomů a užívá se fluorescenčně značených DNA sond (FISH), zatímco při studiu lokalizace genové exprese se obvykle používají komplementární RNA sondy a barevné detekce ve viditelném světle [viz kapitola 4.1].

**Jadéřková dominance** (*nucleolar dominance*) – druhově specifické umlčování funkce jadérka v mezidruhových hybridech některých rostlin a živočichů. Inaktivace jadérka bývá provázána ztrátou sekundární konstrikce na příslušném chromozomu s rDNA a její zvýšenou metylací [viz kapitola 7.2].

**Kaliko** (*calico*) – zbarvení srsti koček řízené X-vázaným genem. Kocouři s jediným chromozomem X jsou jednobarevní (černí nebo žlutí), zatímco kočky (XX) mají mozaikové černo-žluté zbarvení díky náhodné inaktivaci chromozomu X v časně embryogenezi [viz kapitola 8.2].

**Kanalizace** (*canalization*) – Waddingtonův termín pro rezistenci vůči změnám fenotypu v populaci. Environmentální narušení původního genetického plánu vede k relativně nízkému počtu odlišných fenotypů [viz kapitola 2].

**Kinázy a fosfatázy histonů** (*histone kinases and phosphatases*) – enzymy katalyzující fosforylaci histonů s donorem ATP, resp. jejich defosforylaci [viz kapitola 3.2.3].

**Kinetochor** (*kinetochore*) je proteinová struktura, která se vytváří v oblasti centromery a kde se vážou vlákna vřeténka v průběhu mitózy a meiózy [viz kapitola 5.2.2.2].

**Klonování reprodukční a terapeutické** (*reproductive and therapeutic cloning*) – v obou případech jde o mikrochirurgický přenos jádra ze somatické buňky do enukleovaného oocytu a jeho následnou kultivaci *in vitro*. V případě reprodukčního klonování je embryo vloženo do dělohy náhradní matky s cílem vytvoření nového jedince (například ovce Dolly). Při terapeutickém klonování je embryo dopěstováno v blastocystu a z ní jsou odvozeny embryonální kmenové buňky, které mohou diferencovat v různé tkáňové typy vhodné k transplantacím [viz kapitola 9.2].

**Kompenzace dávky X-vázaných genů** (*dosage compensation of X-linked genes*) – evoluce vyrovnávání hladin genových produktů kódovaných X-vázanými geny mezi samičkami (XX) a samečkami (XY). Zatímco u savců funguje náhodné umlčování jednoho chromozomu X u samiček, u hlístice *Caenorhabditis elegans* jsou oba X u hermafrodita částečně utlumeny. Jediný pozitivní systém dávkové kompenzace byl popsán u drozofily: jediný chromozom X u samečka má zvýšenou transkripční aktivitu [viz kapitola 6.1.2, 6.2.2, 8.2].

**Komplex dávkové kompenzace** (DCC; *dosage compensation complex*) – umlčující proteinový (kondenzinový) komplex *C. elegans*, který zajišťuje kompenzaci dávky X-vázaných genů. Jeho aktivita v hermafroditech XX snižuje hladinu obou chromozomů na polovinu [viz kapitola 6.1.2].

**Konjugace** (*conjugation*) – pohlavní proces u prvoků, při kterém dochází k přenosu (reciproké výměně) genetické informace mikrojádra [viz kapitola 5.1.1].

**Kosuprese** (*co-suppression*) – umlčování funkce genu nebo transgenu u rostlin způsobená nepřirozeně vysokou hladinou příslušného transkriptu. Jev je vysvětlován mechanismem RNA interference [viz kapitola 7.5].

**Kvantitativní RT-PCR** (*real-time PCR*) – je laboratorní technika umožňující kvantifikaci příslušné mRNA prostřednictvím reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce [viz kapitola 4.1].

**Lamarckismus** (*Lamarckism*) – adaptační evoluční teorie francouzského učenice Jean-Baptista Lamarcka z počátku 19. století. Tato teorie zahrnovala i dědičnost získaných znaků [viz kapitola 2].

**Lyonizace** (*lyonisation*) – náhodná inaktivace jednoho ze dvou chromozomů X v somatických buňkách samic savců. Objevena pomocí genetické analýzy X-vázaného genu kódujícího barvu srsti myši Mary Lyonovou v roce 1961 [viz kapitola 8.2].

**Makronukleus, mikronukleus** (*macronucleus, micronucleus*) – funkčně i strukturně diferencovaná jádra u některých prvoků. Makronukleus představuje exprimované jádro s rozvolněným euchromatinem, které v průběhu rozmnožovacího procesu zaniká. Generativní jádro je fakultativně heterochromatické a představuje vlastně zárodečnou dráhu. Mechanizmy RNAi dochází k přenosu získané informace z makronuklea do mikronuklea [viz kapitola 5.1.1].

**Martin-Bellův syndrom** (*Martin-Bell syndrome*) – známý též jako fragilní chromozom X. Jde (zejména u mužů) o těžkou mentální retardaci způsobenou amplifikací a metylací tripletu CGG v X-vázaném genu *FMRI*, jehož produkt je nezbytný pro funkci mozku [viz kapitola 9.3.3].

**MAT lokusy** (*MAT, mating loci*) – geny kódující odlišné pohlavní typy u kvasinek. Vyznačují se schopností přepínání funkčních lokusů cestou genové konverze [viz kapitola 5.2.1].

**Maternální programování epigenetických stavů** (*experience-dependent chromatin plasticity*) – chování matky po narození dítěte může ovlivnit epigenom dítěte. Teorie je založena na experimentech s potkany, kde mazlení se matky s mládětem navozuje demetylaci a expresi genu kódujícího glukokortikoidní receptor v mozku, což vede ke stabilní psychice dospělého potomstva [viz kapitola 9.5].

**Medea** (*Medea*) – klíčový, v endospermu krytosemenných rostlin paternálně imprintovaný gen kódující protein skupiny Polycomb. Jeho mutace v maternální linii je letální. Maternální alely *Medea* jsou v endospermu aktivovány demetylací (N-glykozyláza kódovaná genem *Demeter*). Protein *Medea* blokuje předčasný vývoj embrya potlačením genu *Pheres* [viz kapitola 7.7].

**Meiotické umlčování nepárované DNA** (MSUD; *meiotic silencing by unpaired DNA*) – sekvence DNA plísňe *Neurospora crassa*, které postrádají svého párujícího partnera v meiotické profázi, mohou způsobovat meiotické umlčování identických sekvencí DNA [viz kapitola 5.3.2.3].

**Meiotické umlčování chromozomu X** (MSUD; *meiotic silencing of unpaired DNA*) – proteinový komplex umlčuje v zárodečné linii sameček jediný chromozom X *C. elegans*. Díky tomu mají spermie ze samečka jiné epigenetické nastavení modifikace histonů než spermie hermafrodita [viz kapitola 6.1.3].

**Metylace DNA** (*DNA methylation*) – odehrává se především v repetitivních sekvencích DNA v palíndromech CpG u většiny skupin eukaryotických organismů (mimo kvasinky a některé bezobratlé živočichy). Methylace DNA potlačuje transkripci inhibicí vazby specifických transkripčních faktorů a zejména vazbou specifických CpG-vazebných proteinů, které kooperují společně s dalšími represivními komplexy [viz kapitola 3.1].

**Metylačně senzitivní restriční endonukleázy** (*methylation-sensitive restriction endonucleases*) – restriční endonukleázy, které mají ve svém cílovém místě DNA cytozin a jsou inhibovány, pokud je tento



cytozin metylovaný. Enzymy, které mají stejné restriční místo (například CCGG), ale liší se citlivostí vůči metylcytozinu, se nazývají izoschizomery (*MspI* a *HpaII*) [viz kapitola 4.2].

**Metylačně-specifická oligonukleotidová mikroarray** (*methylation-specific oligonucleotide microarray*) – čípková metoda (celo)genomového sledování metylace genomové DNA na bázi její hybridizace po siřičitanovém působení vůči známým sekvencím oligonukleotidů [viz kapitola 4.2].

**5-metylcytozin** (*5-methylcytosine*) – metylovaná forma cytozinu na pátém atomu uhlíku pyrimidinového kruhu. Tato modifikace nemá vliv na párování bází v DNA. Je katalyzována DNA metyltransferázami a donorem metylové skupiny je S-adenozylmetionin. Vyskytuje se u většiny druhů eukaryot a má významný vliv na možnost transkripce příslušného genu. Metylce cytozinu je reverzibilním procesem. Spontánní deaminací 5-metylcytozinu však vzniká thymin, čímž může dojít k bodové mutaci C → T [viz kapitola 4.2].

**Metylentetrahydrofolát reduktáza** (*MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase and mental retardation*) – katalyzuje zásadní reakce v metylačním metabolismu: přenos metylové skupiny z metylenetetrahydrofolátu přes homocystein a metionin, konečným donorem metylové skupiny pro DNA a histon metyltransferázy je S-adenozylmetionin (SAM). Deficience MTHFR způsobuje u člověka vzácnou autozomálně-recesivní mentální poruchu [viz kapitola 9.3.2].

**MikroRNA** (*microRNAs*) – malé endogenní molekuly RNA (délky asi 22 nukleotidů), které působí jako regulátory genové exprese v průběhu vývoje a diferenciaci. Na základě sekvenční homologie s mRNA dochází k potlačení translace nebo dokonce ke štěpení mRNA [viz kapitola 3.4.2].

**Modifikátory pozičního efektu** (*modifiers of PEV*) – u drozofily vykazující poziční efekt (PEV) lze izolovat sekundární mutace, které buď suprimují fenotyp - *Su(var)* způsobují ztrátu umlčení (*suppressor of variegation*), či zesilují fenotyp - *E(var)* zvyšují umlčování (*enhancer of variegation*) [viz kapitola 6.2.3].

**MSL komplex** (*male specific lethal complex*) – je ribonukleoproteinový komplex složený ze dvou dlouhých nekódujících RNA (roX1 nebo roX2) a pěti proteinů MSL1, MSL2, MSL3, MOF a MLE. Váže se na jediný chromozom X u samečka drozofily, způsobuje acetylaci lyzinu 16 histonu H4 a indukuje zvýšenou expresi tohoto chromozomu (pozitivní mechanismus kompenzace X-vázaných genů) [viz kapitola 6.2.2].

**Nukleozom** (*nucleosome*) – základní strukturní jednotka chromatinu eukaryotických buněk. Sestává z oktameru histonových proteinů obtočeným asi 146 páry bází dlouhou DNA [viz kapitola 3.2.1].

**Paradigma d48** (*paradigm d48*) – nemendelistický proces epigenetické informace u linie d48 trepky *Paramecium tetraurelia* o změně strukturování genomu makrojádra děděný z jedné generace makrojádra do další [viz kapitola 5.1.7].

**Paramutace** (*paramutation*) – alelické interakce vedoucí k dědičným změnám expresního stavu: jedna z alel (paramutagenní) vyvolá v průběhu somatického vývoje jedince změnu druhé alely (paramutovatelná). Paramutace byly již od poloviny 20. století pozorovány u kukuřice, nově byly popsány i u myši. Paramutace představují výjimku z Mendelova zákona o nezávislé segregaci alel [viz kapitola 7.5, 8.5].

**Partenogeneze** (*parthenogenesis*) – je asexuální formou reprodukce, která představuje vývoj jedince z neoplozené vaječné buňky. U rostlin (apomixe) a některých bezobratlých živočichů jde o běžný jev. U savců není partenogeneze za standardních podmínek možná, protože genomy – samičí a samčí – jsou odlišně imprintovány [viz kapitola 8.3].

**PAZ doména** (*PAZ domain*) – se nazývá podle regulačních proteinů Piwi, Argonaut a Zwille. Tato doména byla zjištěna u dvou rodin proteinů, které hrají roli v posttranskripčním umlčování genů – rodina proteinů Piwi a Dicer (která zahrnuje i Cappel factory protein). Funkce těchto proteinů není v detailu známa, zřejmě zprostředkovávají tvorbu komplexů mezi proteiny Piwi a Dicer heterodimerizací [viz kapitola 3.4.2].

**Penetrance** (*penetrance*) – vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou se alela genu projeví ve fenotypu následující generace. U mendelisticky děděných znaků se obvykle penetrance blíží hodnotě 1 (tedy všichni jedinci nesoucí určitou alelu ji – v různé míře – exprimují), zatímco u epigeneticky děděných bývá penetrance nižší (projev genu je zde více ovlivněn prostředím) [viz kapitola 8.3].

**Piwi-interagující RNA** (piRNA; *Piwi-interacting RNA*) – je největší skupinou malých molekul RNA, které se vyskytují v živočišných buňkách. piRNA vytváří komplexy RNA-protein prostřednictvím interakcí s Piwi proteiny. Tyto komplexy odpovídají za transkripční umlčování retrotranspozonů a jiných sekvencí v zárodečné dráze, především při spermatogenezi [viz kapitola 3.4.2].

**Polycomb** (*PcG, Polycomb group proteins*) – skupina proteinů charakteristická pro umlčený chromatin. Jsou vysoce konzervativní, vyskytují se u většiny eukaryot, prvně charakterizovány u drozofily, kde jejich chybná funkce způsobuje homeotické transformace. PcG umlčování je vyvoláno vazbou sekvencně specifických DNA-vazebných faktorů na určité regulační úseky DNA (zvané PREs, *Polycomb response elements*) [viz kapitola 3.3].

**Polyfenismus** (*polyphenism*) – je biologická schopnost vytvářet na bázi jediného genotypu a různých environmentálních podmínek více odlišných fenotypů [viz kapitola 7.1].

**Potlačování genové exprese** (*quelling*) – transformace plísně *Neurospora crassa* nativním genem vede k potlačování exprese transgenu nebo homologního genu. Projevuje se nejen v transformovaných jádrech mycelia, ale je i vyjádřeno v jádrech netransformovaných. Srovnává se s posttranskripčním genovým umlčováním (kosuprese u rostlin), souvisí výhradně s RNAi mašinérií vedoucí k degradaci homologních RNA [viz kapitola 5.3.2.2].

**Poziční efekt** (*PEV, position-effect variegation*) – umlčující vliv sousedního heterochromatinu na expresi určitého genu. Prvně studován u drozofily po experimentální translokaci euchromatického genu do heterochromatinu. Toto umlčování probíhá stochasticky pouze v některých buňkách jedince, výsledkem je mozaikový fenotyp. K umlčování exprese genů může docházet i pravidelně v pericentromerických oblastech (centromerický efekt) a subtelomerických oblastech (telomerický efekt) [viz kapitola 6.2.3].

**Prader-Williův syndrom** (*PWS, Prader-Willi syndrome*) – středně těžká vrozená komplexní neurovegetativní choroba člověka. Je obvykle způsobena defektem v maternálně i paternálně imprintované oblasti q11-13 na chromozomu 15, zejména uniparentální dizomií (podobně jako Angelmanův syndrom) [viz kapitola 9.3.1].

**Priony** (*PrP*, *prion proteins*) – je označení pro špatně složenou formu tzv. prionové bílkoviny, vyskytující se v nervových buňkách některých savců. Nejznámějším případem nemoci způsobené takovou bílkovinou je Creutzfeldt-Jacobova choroba [viz kapitola 3.6].

**Pseudoarrhenotokie** (*pseudoarrhenotoky*) – eliminace nebo inaktivace (heterochromatinizace) celé paternální sady chromozomů u některých druhů hmyzu [viz kapitola 6.3].

**Repeticí vyvolaná bodová mutace** (*RIP*, *repeat-induced point mutation*) – obranný systém genomu plísně *Neurospora crassa*, kdy jakákoli duplicitní vnesená či přirozená sekvence DNA indukuje metylaci *de novo*. Metylcytosin je při replikaci DNA často deaminován za vzniku thyminu (bodová mutace) [viz kapitola 5.3.2.1].

**Repeticí vyvolané umlčování genů** (*RIGS*, *repeat-induced gene silencing*) – typ transkripčního umlčování způsobený zejména vyšším počtem kopií genu (transgenu), vyskytuje se často u rostlin [viz kapitola 7.4].

**Retrotranspozon** (*retrotransposon*) – mobilní genetický element, jehož DNA je transkribována v RNA, která je zpětně přepisována v DNA a poté vložena do nového místa v genomu. Retroelementy jsou častým cílem umlčovacích epigenetických mechanismů [viz kapitola 7.4, 8.4].

**Rettův syndrom** (*Rett syndrome*) – těžká vrozená mentální retardace projevující se u děvčat. Je způsobena mutací X-vázaného genu *MECP2*, který kóduje CpG-vazebný protein a představuje tak zásadní regulátor genové exprese. Děvčata (heterozygotní mutanty) přežívají, chlapi (s jediným mutovaným X) jsou aborty [viz kapitola 9.3.2].

**RNA-dependentní RNA polymeráza** (RdRP; *RNA-dependent RNA polymerase*) – je enzym, který katalyzuje replikaci RNA z jednovláknového RNA templátu. Naproti tomu klasická RNA polymeráza katalyzuje syntézu RNA (transkripci) z DNA templátu [viz kapitola 3.4.2].

**RNA-indukovaný umlčovací komplex** (RISC; *RNA-induced silencing complex*) – je multiproteinový komplex, který zahrnuje jedno vlákno malé interferující molekuly RNA (**siRNA**; *small interfering RNA*). Komplex RISC využívá siRNA jako templátu k rozpoznávání komplementární mRNA. Když ji najde, aktivuje RNázu a mRNA štěpí. Tato reakce hraje také roli v genové regulaci prostřednictvím mikroRNA (**miRNA**; *microRNA*) a v obranné úloze vůči virovým infekcím [viz kapitola 3.4.2].

**RNA-řízená metylace DNA** (RdDM; *RNA-directed DNA methylation*) – vede k *de novo* metylaci všech cytozinových reziduí uvnitř oblasti sekvencí identity mezi spouštěcí RNA a cílovou DNA. Představuje dráhu od posttranskripčního ke transkripčnímu umlčování genů. Tato dráha byla zatím zjištěna jen u rostlin [viz kapitola 7.5].

**RNA interference** (RNAi; *RNA interference*) – je obecný mechanismus regulace genové exprese a diferenciace u eukaryot. Spočívá ve tvorbě malých molekul RNA, které zprostředkovávají potlačování (*downregulation*) genové exprese posttranskripčním mechanismem, který vede k degradaci nebo translační represí příslušné sekvencí specifické RNA [viz kapitola 3.4.1, 6.1.4, 7.5].

**Rubinstein-Taybiho syndrom** (*Rubinstein-Taybi syndrome*) – těžká mentální retardace provázená deformacemi těla. Mutace genu CREB kódujícího transkripční faktor, hrající roli v intracelulární signalizaci v mozku. Souvisí s histon acetylázovou aktivitou [viz kapitola 9.3.3].

**Russel-Silverův syndrom** (*RSS, Russell-Silver syndrome*) – je vrozená choroba člověka projevující se malým vzrůstem, nízkou porodní vahou a nesouměrností těla (trpasličí vzrůst). Choroba je způsobena maternální dizomií imprintovaného chromozomu 7 [viz kapitola 8.3, 9.3.1].

**SET doména** (*SET domain*) – prvně popsána jako konzervativní sekvence tří regulačních proteinů u drozofily: (1) modifikátor pozičního efektu (*Suppressor of variegation 3-9*), (2) regulátor skupiny Polycomb (*Enhancer of zeste*) a (3) regulátor skupiny *Trithorax*. Doména má asi 130 aminokyselin a byla zjištěna u všech eukaryotických organizmů. Je přítomna v mnoha histon metyltransferázách a je vyžadována pro jejich enzymovou aktivitu [viz kapitola 5.3.2.1, 6.2.3].

**Schimkeho imun skeletální dysplázie** (*Schimke immuno-osseous dysplasia*) – autozomálně recesivní komplexní syndrom charakteristický dysplázií páteře a konců dlouhých kostí, růstovou retardací, poruchou ledvin a imunity. Je způsoben mutací genu *SMARCAL1* (*SW1/SNF2*, aktin-dependentní regulátor chromatinu), který kóduje protein regulující transkripční aktivitu prostřednictvím remodelování chromatinu [viz kapitola 9.3.3].

**Sir2 proteiny** (*Sir2 proteins*) – první z izolovaných genů skupiny *sirtuins* (*Silent Information Regulator Two* (*Sir2*) *proteins*) izolovaný u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Jsou to proteiny s histon deacetylázovou aktivitou vysoce konzervativní u všech eukaryot [viz kapitola 3.2.2, 5.2.1.2].

**Specifický letální komplex** (*MSL, male specific lethal complex*) – proteinový komplex odpovědný za kompenzaci X-vázaných genů u drozofily: váže se na jediný chromozom X u samečka, čímž zvyšuje jeho aktivitu (korelace se specifickou acetylací lyzinu 16 histonu 4) [viz kapitola 6.1.2].

**Strukturní dědičnost** (*structural inheritance*) – dědičnost znaku spočívající v přenosu struktury (a nikoli příslušného genu). Je dobře popsána u prvoků, ale v podstatě se vyskytuje u všech organizmů, kdy dochází k mezigeneračnímu přenosu hotových buněčných struktur, jako jsou mitochondrie, plastidy, ribozomy, membrány atp. Odpovídá i buněčné teorii Rudolfa Virchowa („každá buňka pochází opět z jiné buňky“) [viz kapitola 5.1.3].

**SUMOylace** (*SUMOylation, small ubiquitin-related modifier*) – kovalentní adice polypeptidu SUMO, což jsou molekuly podobné ubiquitinu. V případě modifikace histonů mění jejich regulační funkce [viz kapitola 3.2.4].

**Superman** (*Superman*) – katastrální gen u krytosemenných rostlin odpovídající za velikost květních oblastí pro tyčinky a pestíky. Je epigeneticky nestabilní, jeho metylačně odlišné alely (*clark kent alleles*) se projevují zvýšeným či sníženým počtem tyčinek či pestíků [viz kapitola 7.1].

**SWI/SNF** – je velký chromatin-remodelující komplex konzervativní od kvasinek až po člověka. Váže se k regulačním oblastem genů prostřednictvím sekvence specifických DNA-vazebných faktorů a reguluje tak transkripční aktivitu cestou remodelování chromatinu [viz kapitola 5.2.2.2].

**Teorie parentálního konfliktu** (*battle of sexes, tug of war between mother and progeny*) – vysvětluje potenciální konflikt zájmů otce a matky vůči potomstvu (popřípadě konflikt zájmů matky a jejího potomstva). Podle této teorie otec hledí jen na osud svých genů (paternální exprese růstových faktorů), matka sleduje zájem všech svých dětí i svého stavu v době těhotenství (maternální aktivita růstových supresorů). Je filozofickým vysvětlením evoluce genomového imprintingu u savců: autorem teorie byl David Haig v roce 1991 [viz kapitola 7.7].

**Transponovatelné elementy** (*transposable elements*) – všechny typy mobilních DNA elementů bez ohledu na jejich mechanismus transpozice [viz kapitola 7.4].

**Transvekce** (*transvection*) – proces dědičného ovlivňování exprese genů popsáný u drozofily. Homologní chromozomy se v somatických buňkách ovlivňují, což může mít za následek *trans* aktivaci některých zesilovačů či silencerů. Jde o proces analogický paramutacím popsáným zejména u rostlin [viz kapitola 6.2, 7.3].

**Trichostatin A** (*trichostatin A*): je antibiotikum původem z houby, které působí jako efektivní inhibitor histon deacetyláz (HDAC) a touto cestou může aktivovat genové oblasti resp. může být použit jako látka s protinádorovým účinkem [viz kapitola 3.2.2].

**Trithorax** (*trxG, Trithorax group proteins*) – chromatinové regulační proteiny, které obecně působí k udržování genové exprese. Jde o heterogenní skupinu proteinových komplexů. Hlavním úkolem trithoraxového komplexu je aktivovat transkripci indukci trimetylace lyzinu v pozici 4 histonu H3 ve specifických regulačních místech cílového chromatinu. Tento aktivní stav je provázen acetylací histonu H4. Proteiny skupiny Trithorax mají navíc i chromatin-remodelující aktivitu, při které využívají energii ATP k mobilizaci nukleozomů [viz kapitola 3.3].

**Trofektoderm** (*trophectoderm*) – je vedle vlastního embrya (*inner cell mass*) derivátem zygoty u savců. Trofektoderm spolu s mateřskou tkání vytváří placentu, která vyživuje embryo. V trofektodermu samičky je inaktivace chromozomu X výhradně paternální [viz kapitola 8.2, 9.1].

**Ubiquitinace** (*ubiquitylation*) – kovalentní adice malého polypeptidu – ubiquitinu – k mnoha typům buněčných proteinů. Zatímco polyubiquitinace cílových proteinů vede k jejich degradaci, monoubiquitinace histonů mění jejich funkční vlastnosti [viz kapitola 3.2.4].

**Umlčování transgenů** (*transgene silencing*) – hostitel může rozpoznávat cizorodou DNA transgenů jako sekvenci parazitickou a může ji umlčovat. Umlčování probíhá na transkripční nebo posttranskripční úrovni. Transkripční umlčování probíhá obvykle na bázi metylace DNA, zatímco posttranskripční umlčování je zprostředkováno RNA interferencí [viz kapitola 5.3.2.1, 7.1, 7.5].

**Ura** (*Ura*) – reportérový gen u kvasinek (*Ura3* u *Saccharomyces cerevisiae*, *Ura<sup>4+</sup>* u *Schizosaccharomyces pombe*). Pokud je do média pro kvasinky přidána kyselina 5-fluoroorotová (5-FOA) je enzymem Ura přeměněna na 5-fluorouracil (5-FU), který inhibuje syntézu DNA a způsobuje smrt buňky. Pokud je však gen *Ura* vložen do heterochromatinu a umlčen, buňka přežívá [viz kapitola 5.2.1.3].

**Vernalizace** (též jarovizace; *vernalization*) – proces chladové květní indukce známý u některých druhů krytosemenných rostlin. Aplikace nízké teploty na semena před klíčením navozuje nedědičnou epigenetickou změnu (obvykle hypometylaci DNA) v promotoru určitých květních genů [viz kapitola 7.6].

**Viry indukované umlčování genů (VIGS; *virus induced gene silencing*)** – technologie, která využívá přirozeného antivirového mechanismu rostlin zprostředkovaného RNA. V rostlinách infikovaných nemodifikovaným virem je tento mechanismus přesně zacílen vůči virovému genomu. Pokud však virový vektor nese inzerty z genů hostitele, může být RNA mechanismus zaměřen i vůči odpovídající mRNA. VIGS je nyní využívána k analýze funkce genů u rostlin na bázi RNA interference a potlačování translace (přístup *knock down*) [viz kapitola 7.5].

**X-inaktivační centrum (*X-inactivation center*)** – aktivace genu *Xist* vede ke tvorbě RNA, která se váže na chromozom X (cis-vazba) u samiček savců. *Xist* RNA spouští umlčování chromozomu vyvoláním chromatin-modifikujících aktivit a dále kaskádou epigenetických modifikací [viz kapitola 8.2].

**Zabíječské kmeny (*killer effect*)** – některé trepky uvolňují do prostředí látky, které mají letální efekt k mnoha jiným kmenům, způsobeno bakteriemi zvanými kappa částice – buňky *Caedobacter taeniospiralis*. Dědí se maternálně přenosem přes cytoplazmu [viz kapitola 5.1.2].

**Zápis informace a její čtení (*writers and readers*)** – kovalentní modifikace histonů jsou prováděny histon-modifikujícími enzymy – *writers* – a odstraňovány antagonistickými aktivitami. Jsou klasifikovány do rodin podle typu enzymové reakce (acetylace, fosforylace, metylace aj.). Proteinové domény (bromo-, chromo-) se specifickou afinitou k histonovým modifikacím se nazývají *readers* [viz kapitola 3.8].

**Zlomová sekvence chromozomu (CBS; *chromosome breakage sequence*)** – konzervativní 15-párů bází dlouhá sekvence DNA u prvoka *Tetrahymena thermophila*, která je charakteristická pro několik set deletovaných lokusů v průběhu restrukturalizace makronukleu [viz kapitola 5.1.7].

## 12 INTERNETOVÉ STRÁNKY

<http://www.abcam.com/>

- stránky firmy dodávající protilátky na modifikované histony

<http://www.bioinfo.org.cn/NONCODE>

- databáze věnovaná seznamu nekódujících RNA

<http://www.dnamethsoc.com/main.htm>

- stránky mezinárodní společnosti DNA Methylation Society

<http://www.epigeneticstation.com/>

- stránky věnované především metodikám epigenetiky

<http://www.epigenome-noe.net/aboutus/epigenetics.pgh>

- stránky projektu evropské excelence Epigenome Network of Excellence

<http://www.epigenome.org>

- stránky evropského projektu medicínské epigenetiky Human Epigenome Project

<http://www.epigenomics.com/>

- stránky firmy zabývající se diagnostikou metylací DNA

<http://epigentek.com>

- stránky firmy dodávající nejrůznější kity zejména ke studiu metylace DNA

<http://www.geneimprint.com/>

- stránky prof. Randy Jirtla, Duke University v Durhamu, portál věnovaný především problematice imprintingu a evoluce imprintingu včetně článků a rešerší, videa a přednášek

[http://www.histone.com/modification\\_map.htm](http://www.histone.com/modification_map.htm)

- stránky firmy Upstate věnované modifikacím histonů

<http://www.chromatin.us>

- stránky dr. Jima Bonea věnované struktuře a funkci chromatinu

<http://www.igc.otago.ac.nz/home.html>

- databáze imprintovaných genů

<http://www.landesbioscience.com/journals/epigenetics/>

- stránky nového vědeckého časopisu Epigenetics

<http://www.methdb.de/>

- databáze metylací DNA a environmentálních epigenetických jevů

**<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting>**

- chromozomální mapy myši s vyznačenými imprintovanými geny

**<http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx>**

- vyhledávání CpG ostrovů v savčím genomu



## 13 POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA

### Kapitola 1

- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML (ed): Epigenetics. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007 (ISBN 13: 978-0-87969-724-2)
- Bird A: Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396–398, 2007
- Ferguson-Smith AC, Gready JM, Martienssen RA (ed): Epigenomics. Springer Verlag, 2009 (ISBN 978-1-4020-9186-5)
- Gibson G: The environmental contribution to gene expression profiles. *Nature Rev Genet* 9: 575–581, 2008

### Kapitola 2

- Dietrich MR: Richard Goldschmidt: hopeful monsters and other ‚heresies‘. *Nature Rev Genet* 4: 68–74, 2003
- Feinberg AP, Tycko B: The history of cancer epigenetics. *Nature Rev Cancer* 4: 143–152, 2004
- Holliday R: Epigenetics. A historical overview. *Epigenetics* 1: 76–80, 2006
- Jablonka E, Lamb MJ: The changing concept of epigenetics. *Ann NY Acad Sci* 981: 82–96, 2002
- Jablonka E, Lamb MJ, Avital E: ‚Lamarckian‘ mechanisms in darwinian evolution. *Trends Evol Ecol* 13: 206–210, 1998
- Komárek S: Dějiny biologického myšlení. Vesmír, Praha, 1997 (ISBN 80-85977-10-9)
- Markoš A: Tajemství hladiny. Hermeneutika živého. Vesmír, Praha, 2000 (ISBN 80-85977-32-X)
- Rádl E: Dějiny biologických teorií novověku. Academia, Praha, 2006 (ISBN 80-200-1394-6)
- Robertson A: Conrad Hal Waddington. *Bibl Memoirs Fellows Royal Soc* 23: 575–622, 1977
- Serafini A: The Epic History of Biology. Perseus Publishing, Cambridge, Massachusetts, 1993 (ISBN 0-7382-0577-X)
- Slack JMW: Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nature Rev Genet* 3: 889–895, 2002
- Soyfer V: Rudá biologie. Pseudověda v SSSR. Stilus, Brno, 2005 (ISBN 80-90-3550-5-6)
- Speybroeck LV: From epigenesis to epigenetics. The case of C. H. Waddington. *Ann New York Acad Sci* 981: 61–81, 2002
- Stern CD: Conrad H. Waddington’s contributions to avian and mammalian development, 1930–1940. *Int J Dev Biol* 44: 15–23, 2000
- Youngson RM: Vědecké omyly, bludy a podvrhy. H&H Vyšehradská s.r.o., Praha, 2004 (ISBN 80-86022-84-6)

### Kapitola 3

- Baulcombe D: RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356–363, 2004
- Cedar H, Bergman Y: Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Rev Genet* 10: 295–304, 2009
- Cerutti L, Mian N, Bateman A: Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Bioch Sci* 25: 481–482, 2000

- Cremer T, Cremer C: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev Genet* 2: 292–301, 2001
- Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X: The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 6: 227, 2005
- Driel R van, Otte AP (ed): *Nuclear Organization, Chromatin Structure, and Gene Expression*. Oxford Univ Press, Oxford, 1997 (ISBN 0 19 854923 7)
- Fedorova E, Zink D: Nuclear genome organization: common themes and individual patterns. *Curr Opin Genet Devel* 19: 166–171, 2009
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 1998–811, 1998
- Flynth AS, Lai EC: Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nature Rev Genet* 9: 831–842, 2008
- Fulneček J: Rostlinné DNA-(cytosin-5)-methyltransferasy. *Biol listy* 70: 129–150, 2005
- Ghildiyal M, Zamore PD: Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Rev Genet* 10: 94–107, 2009
- Guo S, Kemphues K: *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81: 611–620, 1995
- Hannon GJ (ed): *RNAi. A Guide to Gene Silencing*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2003 (ISBN-0-87969-641-9)
- Ho KL, McNae I, Schmiedeberg L, Klose R, Bird A, Walkinshaw M: MeCP2 binding to DNA depends upon hydration at methyl-CpG. *Mol Cell* 29: 525–531, 2008
- Chapman EJ, Carrington JC: Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Rev Genet* 8: 884–896, 2007
- Illingworth RS, Bird AP: CpG islands – ‘a rough guide’. *FEBS Lett* 583: 1713–1720, 2009
- Jones PA, Takai D: The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068–1070, 2001
- Levine SS, King IFG, Kingston RE: Division of labor in Polycomb group repression. *Trends Biochem Sci* 29: 478–485, 2004
- Lusser A, Kadonaga JT: Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays* 25: 1192–1200, 2003
- Mahnoudi T, Verrijzer CP: Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene* 20: 3055–3066, 2001
- Mallory AC, Vaucheret H: MicroRNAs: something important between the genes. *Curr Opin Plant Biol* 7: 120–125, 2004
- Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF: RNA regulation of epigenetic processes. *BioEssays* 31: 51–59, 2009
- Matzke MA, Matzke AJM: Planting the seeds of a new paradigm. *PLoS Biol* 2: 0582–0586, 2004
- Meaburn KJ, Misteli T: Chromosome territories. *Nature* 445: 379–381, 2007
- Novina CD, Sharp PA: The RNAi revolution. *Nature* 430: 161–164, 2004
- Peterson CL, Laniel MA: Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14: R546–R551, 2004
- Reik W: Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447: 425–432, 2007
- Rice JC, Allis CD: Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 263–273, 2001
- Schwartz YB, Pirrotta V: Polycomb silencing mechanisms and management of genomic programmes. *Nature Rev Genet* 8: 9–22, 2007

- Slotkin RK, Martienssen R: Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Rev Genet* 8: 272–285, 2007
- Sumner AT: Chromosomes. Organization and Function. Blackwell, Oxford, 2003 (ISBN 0-632-05407-7)
- Surani MA: Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122–128, 2001
- Suzuki MH, Bird A: DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Rev Genet* 9: 465–476, 2008
- Timmons L, Fire A: Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854, 1998
- Vyskot B: The role of DNA methylation in plant development. In: Ainsworth CC (ed): *Sex Determination in Plants*, str. 101–120, Bios, Oxford, 1999 (ISBN 1 85996 042 1)
- Wolffe A: *Chromatin: Structure and Function*. Academic Press, San Diego, 1998 (ISBN 012-761914-3)
- Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM: Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426: 469–474, 2003 Zhang X: The epigenetic landscape of plants. *Science* 320: 489–492, 2008

## Kapitola 4

- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5350–5354, 1977
- Bowler C, Benvenuto G, Laflamme P, Molino D, Probst AV, Tariq M, Paszkowski J: Chromatin techniques for plant cells. *Plant J* 39: 776–789, 2004
- Burnette WN: „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195–203, 1981
- Callinan PA, Feinberg AP: The emerging science of epigenomics. *Human Mol Genet* 15: R95-R101, 2006
- Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M: DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nature Protocols* 1: 2353–2364, 2007
- Coolen MW, Statham AL, Gardiner-Garden M, Clark SJ: Genomic profiling of CpG methylation and allelic specificity using quantitative high-throughput mass spectrometry: critical evaluation and improvements. *Nucleic Acids Res* 35: e119, 2007
- Crane-Robinson C, Wolffe AP: Immunological analysis of chromatin: FIS and CHIPS. *Trends Genet* 14: 477–480, 1998
- Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6–13, 1983
- Ferguson-Smith AC, Grealley JM, Martienssen (ed): *Epigenomics*. Springer, 2009 (ISBN 978-1-4020-9186-5)
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt M, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1827–1831, 1992
- Mager J, Bartolomei MS: Strategies for dissecting epigenetic mechanisms in the mouse. *Nature Genet* 37: 1194–1199, 2005
- Meyer P, Heidmann I, Niedenhof I: Differences in DNA methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *Plant J* 4: 89–100, 1993

- Park PJ: ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Rev Genet* 10: 669-680, 2009
- Renart J, Reiser J, Stark GR: Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3116-3120, 1979
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: Labeling deoxyribonucleic-acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA-polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-251, 1977
- Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001 (ISBN 0-87969-576-5)
- Schones DE, Zhao K: Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nature Rev Genet* 9: 179-191, 2008
- Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517, 1975
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J: *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 2005 (ISBN 80-210-3841-1)
- Tollefsbol TO (ed): *Epigenetic Protocols*. Humana Press, Totowa, 2004 (eISBN 1-59259-828-5)

## Kapitola 5

- Allis CD, Glover CV, Bowen JK, Gorovsky MA: Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Cell* 20: 609-617, 1980
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML (ed): *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007 (ISBN 13: 978-0-87969-724-2)
- Aramayo R, Metzzenberg RL: Meiotic transvection in fungi. *Cell* 86: 103-113, 1996
- Beisson J, Wright M: Basal body/centriole assembly and continuity. *Curr Opin Cell Biol* 15: 96-104, 2003
- Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF: Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112: 407-421, 2003
- Garnier O, Serrano V, Duharcourt S, Meyer E: RNA-mediated programming of developmental genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Mol Cell Biol* 24: 7370-7379, 2004
- Hartl DL, Jones EW: *Genetics. Principles and Analysis*. 4th Edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, 1998 (ISBN 0-7637-0489-X)
- Harumoto T: Induced change in a non-Mendelian determinant by transplantation of macronucleoplasm in *Paramecium tetraurelia*. *Mol Cell Biol* 6: 3498-3501, 1986
- Chalker DL, Fuller P, Yao MC: Communication between parental and developing genomes during *Tetrahymena* nuclear differentiation is likely mediated by homologous RNAs. *Genetics* 169: 149-160, 2005
- Jahn CL, Klobutcher LA: Genome remodeling in ciliated protozoa. *Annu Rev Microbiol* 56: 489-520, 2002
- Jírovec O, Wenig K, Fott B, Bartoš E, Weiser J, Šrámek-Hušek R: *Protozoologie*. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1953
- Klar AJS: Lessons learned from studies of fission yeast mating-type switching and silencing. *Annu Rev Genet* 41: 213-236, 2007
- Kouzminova EA, Selker EU: *Dim-2* encodes a DNA-methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *EMBO J* 20: 4309-4323, 2001

- Meyer E: Induction of specific macronuclear developmental mutations by microinjection of a cloned telomeric gene in *Paramecium primaurelia*. *Genes Dev* 6: 211–222, 1992
- Partridge JF, Borgstrom B, Allshire RC: Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere. *Genes Dev* 14: 783–791, 2000
- Pond FR, Gibson I, Lalucat J, Quackenbush RL: R-body producing bacteria. *Microbiol Rev* 53: 25–67, 1989
- Rusche LN, Kirchmaier AL, Rine J: The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 72: 481–516, 2003
- Selker EU: Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu Rev Genet* 24: 579–613, 1990
- Shiu PK, Raju NB, Zickler D, Metzenberg RL: Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* 107: 905–916, 2001
- Singer MJ, Marcotte BA, Selker EU: DNA methylation associated with repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 15: 5586–5597, 1995
- Vavra KJ, Allis CD, Gorovsky MA: Regulation of histone acetylation in *Tetrahymena* macro- and micronuclei. *J Biol Chem* 257: 2591–2598, 1982
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA: Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297: 1833–1837, 2002
- Yao MC, Fuller P, Xi X: Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense. *Science* 300: 1581–1584, 2003
- You Y, Aufderheide K, Morand J, Rodkey K, Forney J: Macronuclear transformation with specific DNA fragments controls the content of the new macronuclear genome in *Paramecium tetraurelia*. *Mol Cell Biol* 11: 1133–1137, 1991

## Kapitola 6

- Akhtar A, Becker PB: Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell* 5: 367–375, 2000
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML (ed): *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007 (ISBN 13: 978-0-87969-724-2)
- Birchler JA, Pal-Bhadra M, Bhadra U: Dosage dependent gene regulation and the compensation of the X chromosome in *Drosophila males*. *Genetica* 117: 179–190, 2003
- Cline TW, Meyer BJ: Vive la difference: males vs females in flies vs worms. *Annu Rev Genet* 30: 637–702, 1996
- Crouse HV: The controlling element in sex chromosome behavior in *Sciara*. *Genetics* 45: 1429–1443, 1960
- Csankovszki G, McDonel P, Meyer BJ: Recruitment and spreading of the *C. elegans* dosage compensation complex along X chromosomes. *Science* 303: 1182–1185, 2004
- Csankovszki G, Petty EL, Collette KS: The worm solution: a chromosome-full of condensin helps gene expression go down. *Chromosome Res* 17: 621–635, 2009
- Fagegaltier D, Baker BS: X chromosome sites autonomously recruit the dosage compensation complex in *Drosophila males*. *PLoS Biol* 2: e341, 2004
- Ferguson-Smith AC, Gready JM, Martienssen RA (ed): *Epigenomics*, Springer, 2009 (ISBN 978-1-4020-9186-5)
- Fire A, Xu AQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811, 1998

- Fong Y, Bender L, Wang W, Strome S: Regulation of the different chromatin states of autosomes and X chromosomes in the germline of *C. elegans*. *Science* 296: 2235–2238, 2002
- Gilfillan GD, Straub T, de Wit E, Greil F, Lamm R, van Steensel B, Becker PB: Chromosome-wide gene-specific targeting of the *Drosophila* dosage compensation complex. *Genes Dev* 20: 858–870, 2006
- Grishok A: RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 579: 5932–5939, 2005
- Guo S, Kemphues KJ: *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81: 611–620, 1995
- Hallacli E, Akhtar A: X chromosomal regulation in flies: when less is more. *Chromosome Res* 17: 603–619, 2009
- Kelley RL, Wang J, Bell L, Kuroda MI: Sex lethal controls dosage compensation in *Drosophila* by a non-splicing mechanism. *Nature* 387: 195–199, 1997
- Kelly WG, Schaner CE, Dernburg AF, Ho-Lee M, Kim SK, Villeneuve AM, Reinke V: X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*. *Development* 129: 479–492, 2002
- Meyer BJ: Sex in the worm counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet* 16: 247–253, 2000
- Morales V, Straub T, Neumann MF, Mengus G, Akhtar A, Becker PB: Functional integration of the histone acetyltransferase MOF into the dosage compensation complex. *EMBO J* 23: 2258–2268, 2004
- Pannuti A, Lucchesi JC: Recycling to remodel: evolution of dosage-compensation complexes. *Curr Opin Genet Dev* 10: 644–650, 2000
- Park Y, Kelley RL, Oh H, Kuroda MI, Meller VH: Extent of chromatin spreading determined by roX RNA recruitment of MSL proteins. *Science* 298: 1620–1623, 2002
- Prahlad V, Pilmgrim D, Goodwin EB: Roles for mating and environment in *C. elegans* sex determination. *Science* 302: 1046–1049, 2003
- Shin TH, Mello CC: Chromatin regulation during *C. elegans* germline development. *Curr Opin Genet Dev* 13: 455–462, 2003
- Shiu PK, Raju NB, Zicker D, Metzberg RL: Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* 107: 905–916, 2001
- Snustad DP, Simmons MJ: *Genetika*. 1. české vydání, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno, 2009 (ISBN 978-80-210-4852-2)
- Straub T, Dahlsveen IK, Becker PB: Dosage compensation in flies: mechanism, models, mystery. *FEBS Lett* 579: 3258–3263, 2005
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC: The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123–132, 1999
- Turner BM, Birley AJ, Lavender J: Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69: 375–384, 1992
- Turner JM: Sex chromosomes make their mark. *Chromosoma* 114: 300–306, 2005
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E: *Principles of Development*. Current Biology, London, 1998 (ISBN 0-19-850263-X)
- Yonker SA, Meyer BJ: Recruitment of *C. elegans* dosage compensation proteins for gene-specific versus chromosome-wide repression. *Development* 130: 6519–6532, 2003

## Kapitola 7

- Alleman M, Sidorenko L, McGinnis K, Seshadri V, Dorweiler JE, White J, Sikkink K, Chandler VL: An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. *Nature* 442: 295–298, 2006
- Alvarez-Venegas R, Pien S, Sadler M, Witmer X, Grossniklaus U, Avramova Z: ATX-1, an *Arabidopsis* homolog of *Trithorax*, activates flower homeotic genes. *Curr Biol* 13: 627–637, 2003
- Autran D, Huanca-Mamani W, Vielle-Caldaza JP: Genomic imprinting in plants: the epigenetic version of an Oedipus complex. *Curr Opin Plant Biol* 8: 19–25, 2005
- Baulcombe D: RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356–363, 2004
- Baulcombe D: Of maize and men, or peas and people: case histories to justify plants and other systems. *Nature Med* 14: xx–xxiii, 2008
- Bayer M, Nawy T, Giglione C, Galli M, Meinnel T, Lukowitz W: Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 323: 1485–1488, 2009
- Bender J: Plant epigenetics. *Curr Biol* 12: R412–R414, 2002
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinett O: Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320: 1185–1190, 2008
- Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP: Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J* 39: 734–746, 2004
- Buzek J, Ebert I, Ruffini-Castiglione M, Siroky J, Vyskot B, Greilhuber J: Structure and DNA methylation of partially heterochromatinised endosperm nuclei in *Gagea lutea*. *Planta* 204: 506–514, 1998
- Buzek J, Riha K, Siroky J, Ebert I, Greilhuber J, Vyskot B: Histone H4 underacetylation in plant facultative heterochromatin. *Biol Chem* 379: 1235–1241, 1998
- Cullis CA: Mechanisms and control of rapid genome changes in flax. *Ann Bot* 95: 201–206, 2005
- Dadejova M, Yoong YK, Kamila Souckova-Skalicka K, Matyasek R, Grandbastien MA, Leitch AR, Kovarik A: Transcription activity of rRNA genes correlates with their tendency towards intergenomic homogenisation in *Nicotiana* allotetraploids. *New Phytologist* 174: 658–668, 2007
- Dennis ES, Peacock WJ: Epigenetic regulation of flowering. *Curr Opin Plant Biol* 10: 520–527, 2007
- Exner V, Hennig L: Chromatin rearrangements in development. *Curr Opin Plant Biol* 11: 64–69, 2007
- Feil R, Berger F: Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet* 23: 192–199, 2007
- Gehring M, Bubb KL, Henikoff S: Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science* 324: 1447–1451, 2009
- Grant-Downton RT, Dickinson HG: Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Ann Bot* 96: 1143–1164, 2005
- Gregory BD, O'Malley RC, Lister R, Urich MA, Tonti-Filippini J, Chen H, Millar AH, Ecker JR: A link between RNA metabolism and silencing affecting *Arabidopsis* development. *Devel Cell* 14: 854–866, 2008
- Grossniklaus U, Vielle-Caldaza JP, Hoepfner MA, Galgiano WB: Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a Polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280: 446–450, 1998
- Henderson IR, Jacobsen SE: Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447: 418–424, 2007
- Henderson IR, Jacobsen SE: Tandem repeats upstream of the *Arabidopsis* endogene SDC recruit non-CG DNA methylation and initiate siRNA spreading. *Genes Devel* 22: 1597–1606, 2008
- Henikoff S: Rapid changes in plant genomes. *Plant Cell* 17: 2852–2855, 2005

- Henry IM, Dilkes BP, Comai L: Genetic basis for dosage sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *PloS Genet* 3: e70, 2007
- Chan SWL, Henderson IR, Jacobsen SE: Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Rev Genet* 6: 351–360, 2005
- Chandler VL, Stam M: Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nature Rev Genet* 5: 532–544, 2004
- Chinnusamy V, Zhu JK: Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12: 133–139, 2009
- Jahnke S, Scholten S: Epigenetic resetting of a gene imprinted in plant embryos. *Curr Biol* 19: 1677–1681, 2009
- Kinoshita T, Miura A, Choi Y, Kinoshita Y, Cao X, Jacobsen SE, Fischer RL, Kakutani T: One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science* 303: 521–523, 2004
- Köhler C, Hennig L, Spillane C, Pien S, Gruissem W, Grossniklaus U: The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. *Genes Devel* 17: 1540–1553, 2003
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC: Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30: 296–303, 2003
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB: A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBD-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genet* 38: 948–952, 2006
- Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, Pitrat M, Dogimont C, Bendahmane A: A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* 461: 1135–1139, 2009
- Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, Smathajitt C, Paszkowski J: Transgenerational stability of the *Arabidopsis* epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell* 130: 851–862, 2007
- Matzke MA, Matzke AJM: Planting the seeds of a new paradigm. *PloS Biol* 2: 0582–0586, 2004
- Matzke MA, Birchler JA: RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Rev Genet* 6: 24–35, 2005
- Novack MK, Shirzadi R, Dissmeyer N, Dolf A, Endl E, Grini PE, Schnittger A: Bypassing genomic imprinting allows seed development. *Nature* 447: 312–316, 2007
- Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Henikoff S, Fischer RL: DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *104*: 6752–6757, 2007
- Pikaard CS: Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. *Plant Mol Biol* 43: 163–177, 2000
- Preuss SB, Costa-Nunes P, Tucker S, Pontes O, Lawrence RJ, Mosher R, Kasschau KD, Carrington JC, Baulcombe DC, Viegas W, Pikaard CS: Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol Cell* 32: 673–684, 2008
- Rangwala SH, Elumalai R, Vanier C, Ozkan H, Galbraith DW, Richards EJ: Meiotically stable natural epialleles of Sadhu, a novel *Arabidopsis* retroposon. *PloS Genet* 2: e36, 2006
- Rapp RA, Wendel JF: Epigenetics and plant evolution. *New Phytol* 168: 81–90, 2005
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F: RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441: 469–474, 2006
- Reinders J, Wulff BBH, Mirouze M, Mari-Ordóñez A, Dapp M, Rozhon W, Bucher E, Theiler G, Paszkowski J: Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic *Arabidopsis* epigenomes. *Genes Devel* 23: 939–950, 2009



- Saze H: Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants. *Seminars Cell Biol* 19: 527–536, 2008
- Seymour G, Poole M, Manning K, King GJ: Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. *Curr Opin Plant Biol* 11: 58–63, 2008
- Slotkin RK, Martienssen R: Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Rev Genet* 8: 272–285, 2007
- Stam M, Scheid MO: Paramutation: an encounter leaving a lasting impression. *Trends Plant Sci* 10: 283–289, 2005
- Vielle-Caldaza JP, Thomas J, Spillane C, Coluccio A, Hoepfner MA, Grossniklaus U: Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis* *mea* locus requires zygotic DDM1 activity. *Genes Devel* 13:2971–2982, 1999
- Walbot V, Evans MMS: Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nature Rev Genet* 4: 369–379, 2003
- Zemach A, Grafi G: Methyl-CpG-binding domain proteins in plants: interpreters of DNA methylation. *Trends Plant Sci* 12: 80–85, 2007
- Zhang X: The epigenetic landscape of plants. *Science* 320: 489–492, 2008
- Zilberman D, Henokoff S: Epigenetic inheritance in *Arabidopsis*: selective silence. *Curr Opin Genet Devel* 15: 557–562, 2005

## Kapitola 8

- Albert M, Peters AHFM: Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Curr Opin Genet Devel* 19: 113–121, 2009
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML (ed): *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007 (ISBN 13: 978-0-87969-724-2)
- Bestor TH: Cytosine methylation mediates sexual conflict. *Trends Genet* 19: 185–190, 2003
- Bird A: Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396–398, 2007
- Blewitt ME, Vickaryous NK, Paldi A, Koseki H, Whitelaw E: Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. *PloS Genet* 2: e49, 2006
- Delaval K, Feil R: Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Devel* 14: 188–195, 2004
- Feng YQ, Desprat R, Fu H, Olivier E, Lin CM, Lobell A, Gowda SN, Aladjem MI, Bouhassira EE: DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. *PloS Genet* 2: e65, 2006
- Ferguson-Smith AC, Gready JM, Martienssen RA (ed): *Epigenomics*. Springer Verlag, 2009 (ISBN 978-1-4020-9186-5)
- Ferguson AC, Reik W: The need for Ead. *Nature Genet* 33: 433–434, 2003
- Ferguson-Smith AC, Surani MA: Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 293: 1086–1089, 2001
- Gibson G: The environmental contribution to gene expression profiles. *Nature Rev Genet* 9: 575–581, 2008
- Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A: Widespread monoallelic expression of human autosomes. *Science* 318: 1136–1140, 2007
- Goodwin BC: *Development*. Hodder and Stoughton, The Open University, Milton Keynes, 1991 (ISBN 0-340-53190-8)
- Gupta V, Parisi M, Sturgill D, Nuttall R, Doctolero M, Dudko OK, Malley JD, Eastman PS, Oliver B: Global analysis of X-chromosome dosage compensation. *J Biol* 5: e3, 2006

- Hellman A, Chess A: Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 315: 1141–1143, 2007
- Hochedlinger K, Plath K: Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136: 509–523, 2009
- Cheng MK, Disteche CM: Silence of the fathers: early X inactivation. *BioEssays* 26: 821–824, 2004
- Illingworth RS, Bird AP: CpG islands – „a rough guide“. *FEBS Lett* 583: 1713–1720, 2009
- Jirtle RL, Weidman JR: Imprinted and more equal. *Amer Scientist* 95: 143–179, 2007
- Jones PA, Takai D: The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068–1070, 2001
- Krawetz SA: Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nature Rev Genet* 6: 633–642, 2005
- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR: Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315–322, 2009
- Mager J, Bartolomei MS: Strategies for dissecting epigenetic mechanisms in the mouse. *Nature Genet* 37: 1194–1199, 2005
- Morgan HD, Sutherland HGE, Martin DIK, Whitelaw E: Epigenetic inheritance at the *agouti* locus in the mouse. *Nature Genet* 23: 314–318, 1999
- Murphy SK, Jirtle RL: Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays* 25: 577–588, 2003
- Nguyen DK, Disteche CM: Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. *Nature Genet* 38: 47–53, 2006
- Park Y, Kuroda MI: Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. *Science* 293: 1083–1085, 2001
- Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, Luu KVK, Whitelaw E: Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine *Axin<sup>Fu</sup>* allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2538–2543, 2003
- Rassoulzadegan M, Granshean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F: RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441: 469–474, 2006
- Rassoulzadegan M, Magliano M, Cuzin F: Transvection effects involving DNA methylation during meiosis in the mouse. *EMBO J* 21: 440–450, 2002
- Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, Luu KV, Whitelaw E: Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine *Axin<sup>Fu</sup>* allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2538–2543, 2003
- Rakyan VK, Beck S: Epigenetic variation and inheritance in mammals. *Curr Opin Genet Devel* 16: 573–577, 2006
- Reik W: Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447: 425–432, 2007
- Reik W, Dean W, Walter J: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089–1092
- Sasaki H, Matsui Y: Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Rev Genet* 9: 129–140, 2008
- Surani MA: Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122–128, 2001
- Suzuki MM, Bird A: DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Rev Genet* 9: 465–476, 2008

- Weidman JR, Dolinoy DC, Maloney KA, Cheng JF, Jirtle RL: Imprinting of opossum *Igf2r* in the absence of differential methylation and *Air*. *Epigenetics* 1: 49–54, 2006
- Whitelaw E, Martin DIK: Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nature Genet* 27: 361–365, 2001
- Wood AJ, Oakey RJ: Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *PLoS Genet* 2: e147, 2006
- Wutz A, Gribnau J: X inactivation Xplained. *Curr Opin Genet Devel* 17: 387–393, 2007
- Zhang Y, Oliver B: Dosage compensation goes global. *Curr Opin Genet Devel* 17: 113–120, 2007
- Zhang Y, Rohde C, Tierling S, Jurkowski TP, Bock C, Santacruz D, Ragozin S, Reinhardt R, Groth M, Walter J, Jeltsch A: DNA methylation analysis of chromosome 21 gene promoters at single base pair and single allele resolution. *PLoS Genet* 5: e1000438, 2009

## Kapitola 9

- Aerts L, Van Assche FA: Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Internatl J Biochem Cell Biol* 38: 894–903, 2006
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML (ed): *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007 (ISBN 13: 978-0-87969-724-2)
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308: 1466–1469, 2005
- Badcock C, Crespi B: Battle of the sexes may set the brain. *Nature* 454: 1054–1055, 2008
- Bao SQ, Tang F, Li K, Hayashi K, Gillich A, Lao K, Surani MA: Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 461: 1292–1295, 2009
- Bird A: Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396–398, 2007
- Bobetsis YA, Barros SP, Lin DM, Weidman JR, Dolinoy DC, Jirtle RL, Boggess KA, Beck JD, Offenbacher S: Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J Dental Res* 86: 169–174, 2007
- Brook JS, Whiteman M, Brook DW: Transmission of risk factors across three generations. *Psychol Rep* 85: 227–241, 1999
- Cooney CA: Germ cells carry the epigenetic benefits of grandmother's diet. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17071–17072, 2006
- Csaba G, Inczeffi-Gonda A: Transgenerational effect of a single neonatal benzpyrene treatment on the glucocorticoid receptor of the rat thymus. *Human Exptl Toxicol* 17: 88–92, 1998
- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL: Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13056–13061, 2007
- Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL: Maternal genistein alters coat color and protects *A<sup>y</sup>* mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Persp* 14: 567–572, 2006
- Drake AJ, Walker BR: The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol* 180: 1–16, 2004
- Feinberg AP, Tycko B: The history of cancer epigenetics. *Nature Rev Cancer* 4: 143–152, 2004
- Ferguson-Smith AC, Gready JM, Martienssen RA (ed): *Epigenomics*. Springer Verlag, 2009 (ISBN 978-1-4020-9186-5)
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10604–10609, 2005

- Fraga MF, Esteller M: Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 23: 413–418, 2007
- Gallou-Kabani C, Junien C: Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. *Diabetes* 54: 1899–1906, 2005
- Heng HHQ, Bremer SW, Stevens JB, Ye KJ, Liu G, Ye CJ: Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: a genome-centric perspective. *J Cell Physiol* 220: 538–547, 2009
- Hochedlinger K, Plath K: Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136: 509–523, 2009
- Chan TL, Yuen ST, Kong CK, Chan YW, Chan ASY, Ng WF, Tsui WY, Lo MWS, Tam WY, LiVSW, Leung SY: Heritable germline epimutation of *MSH2* in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genet* 38: 1178–1183, 2006
- Jirtle RL, Skinner MK: Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Rev Genet* 8: 253–262, 2007
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL: Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428: 145–150, 2004
- Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S: Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Human Genet* 10: 682–688, 2002
- Lund AH, van Lohuizen M: Epigenetics and cancer. *Genes Devel* 18: 2315–2335, 2004
- Meaney MJ, Szyf M: Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? *Trends Neurosci* 28: 456–463, 2005
- Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J, the ALSPAC Study Team: Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Human Genet* 14: 159–166, 2006
- Petronis A: Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics. *Trends Genet* 17: 142–146, 2001
- Rhind SM, Taylor JE, De Sousa PA, King TJ, McGarry M, Wilmut I: Human cloning: can it be made safe? *Nature Rev Genet* 4: 855–864, 2003
- Rideout WM III, Eggan K, Jaenisch R: Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293: 1093–1098, 2001
- Robertson KD, Wolffe AP: DNA methylation in health and disease. *Nature Rev Genet* 1: 11–19, 2000
- Rodenhiser D, Mann M: Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Can Med Assoc J* 174: 341–348, 2006
- Ruden DM, Xiao L, Garfinkel MD, Lu Z: Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the trans-generational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer. *Human Mol Genet* 14: R149–R155, 2005
- Scaffidi P, Gordon L, Misteli T: The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises. *PLoS Biol* 3: e395, 2005
- Solter D: Mammalian cloning: advances and limitations. *Nature Rev Genet* 1: 199–207, 2000
- Suter CM, Martin DIK, Ward RL: Germline epimutation of *MLH1* in individuals with multiple cancers. *Nature Genet* 36: 497–501, 2004
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ: Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Rev Neurosci* 8: 355–367, 2007
- Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, Granjean V, Gounon P, Cuzin F, Rassoulzadegan M: RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Devel Cell* 14: 962–969, 2008
- Waterland RA, Lin JR, Smith CA, Jirtle RL: Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) locus. *Human Mol Genet* 15: 705–716, 2006

Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ: Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neurosci* 7: 847–854, 2004  
Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzales GL, Guzman C, Larrea F, Nathanielsz PW: Sex differences in transgenerational alterations of growth metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 561: 225–236, 2005

## Kapitola 10

Agrawal AA, Laforsch C, Tollrian R: Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature* 401: 60–63, 1999  
Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML (ed): *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007 (ISBN 13: 978-0-87969-724-2)  
Blewitt ME, Vickaryous NK, Paldi A, Koseki H, Whitelaw E: Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. *PLoS Genet* 2: e49, 2006  
Drake AJ, Walker BR: The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol* 180: 1–16, 2004  
Feil R, Berger F: Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet* 23: 192–199, 2007  
Ferguson-Smith AC, Gready JM, Martienssen RA (ed): *Epigenomics*. Springer Verlag, 2009 (ISBN 978-1-4020-9186-5)  
Ghildiyal M, Zamore PD: Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Rev Genet* 10: 94–107, 2009  
Gibson G: The environmental contribution to gene expression profiles. *Nature Rev Genet* 9: 575–581, 2008  
Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E: Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 23: 635–638, 2007  
Holliday R, Ho T: DNA methylation and epigenetic inheritance. *Methods* 27: 179–183, 2002  
Holliday R: Epigenetics. A historical overview. *Epigenetics* 1: 76–80, 2006  
Chong S, Vickaryous N, Ashe A, Zamudio N, Youngson N, Hemley S, Stopka T, Skoultschi A, Matthews J, Scott HS, de Kretser D, O'Bryan M, Blewitt M, Whitelaw E: Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nature Genet* 39: 614–622, 2007  
Jaenisch R, Bird A: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genet* 33: 245–254, 2003  
Jirtle RL, Wideman JR: Imprinted and more equal. *Amer Sci* 95: 143–149, 2007  
Johannes F, Colot V, Jansen RC: Epigenome dynamics: a quantitative genetics perspective. *Nature Rev Genet* 9: 883–890, 2008  
Kelly WG, Aramayo R: Meiotic silencing and the epigenetics of sex. *Chromosome Res* 15: 633–651, 2007  
Martin C, Zhang Y: Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* 19: 266–272, 2007  
Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, Luu KVK, Whitelaw E: Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine *Axin<sup>Fu</sup>* allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2538–2543, 2003  
Richards EJ: Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. *Nature Rev Genet* 7: 395–401, 2006  
Robertson KD, Wolffe AP: DNA methylation in health and disease. *Nature Rev Genet* 1: 11–19, 2000  
Rodenhiser D, Mann M: Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Can Med Assoc J* 174: 341–348, 2006

- Sarge KD, Park-Sarge OK: Gene bookmarking: keeping the pages open. *Trends Biochem Sci* 30: 605–610, 2005
- Straub T, Becker PB: Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nature Rev Genet* 8: 47–57, 2007
- Vyskot B: Přenos epigenetické informace v liniích buněk somatické a zárodečné dráhy. In: *Molekulární biologie a genetika XII*, ed Jonák J, Jonák J, pp 7–21, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha 2006 (ISBN 80-902588-5-9)
- Waterland RA, Lin JR, Smith CA, Jirtle RL: Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) locus. *Human Mol Genet* 15: 705–716, 2006
- Whitelaw NC, Whitelaw E: Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease. *Curr Opin Genet Devel* 18: 273–279, 2008

#### Poděkování:

Autor děkuje RNDr. Aleši Kovaříkovi, CSc. a Mgr. Jaroslavu Fulnečkovi, CSc. za velmi podnětné recenze tohoto učebního textu. Dále vyjadřuje svůj dík studentkám Oddělení vývojové genetiky BFÚ AV ČR Věře Kováčové a Magdě Soukupové za pomoc při tvorbě ilustrací. Autor je podporován granty LC06004 (MŠMT), P501/10/0102 (GAČR), 204/09/H002 (GAČR) a výzkumnými záměry BFÚ AV ČR.



**prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.**  
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.  
612 65 Brno, Královopolská 135  
vyskot@ibp.cz

## **EpiGenetika**

Určeno pro studenty magisterského navazujícího programu MBB a BiCh na PřF UP

Výkonný redaktor prof. RNDr. Tomáš Opatrný  
Odpovědná redaktorka Mgr. Jana Kreiselová  
Technická redaktorka RNDr. Miroslava Kouřilová

Tato publikace neprošla redakční jazykovou úpravou

Vydala a vytiskla Univerzita Palackého v Olomouci  
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc  
[www.upol.cz/vup](http://www.upol.cz/vup)  
e-mail: [vup@upol.cz](mailto:vup@upol.cz)

Olomouc 2010

1. vydání

Ediční řada - Skripta.

**ISBN 978-80-244-2534-4**