

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



MUDr. Pavel Jůda

Strukturně-funkční organizace buněčného jádra

Mikroskopická analýza jaderných subkompartmentů

Structure-function organization of the cell nucleus

Microscopical analysis of nuclear subcompartments

Dizertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Dušan Cmarko CSc.

Praha, 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17. 4. 2015

Pavel Jůda

.....

Identifikační záznam

JŮDA, Pavel. Strukturně-funkční organizace buněčného jádra. [*Structure-function organization of the cell nucleus*]. Praha, 2014, 137 stran, 0 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav buněčné biologie a patologie. Školitel: Doc. RNDr. Dušan Cmarko CSc.

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat Janě Šmigové, mé životní partnerce a zároveň kolegyni, za všechno co jsme spolu prožili, za její lásku, toleranci a nikdy nekončící diskuzi.

Můj velký dík patří přednostovi Ústavu buněčné biologie a patologie, prof. Ivanu Raškovi, za mnohé rady, podporu poskytovanou mi v průběhu studia a v neposlední řadě za pozorné čtení a opravu předkládané dizertační práce. Dále bych chtěl poděkovat školiteli doc. Dušanu Cmarkovi a všem kolegům, kteří mi kdy pomohli.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat celé své rodině a přátelům za podporu a zázemí.

Děkuji.

Vznik této dizertační práce byl finančně podpořen z následujících zdrojů:

Grantová agentura České republiky [GAČR P302/12/G157]

Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy [MSM 0021620806] a [LC535]

Akademie věd České republiky [AV0Z50110509]

Univerzita Karlova v Praze [UNCE 204022] a [Prvouk/1LF/1]

Grantová agentura Univerzity Karlovy v Praze [GA UK 610512]

Evropský fond pro regionální rozvoj, projekt BIOCEV [CZ.1.05/1.1.00/02.0109], OPVK [CZ.2.16/3.1.00/24010] a OPVK [CZ.1.07/2.3.00/30.0030]

Abstrakt

Buněčné jádro představuje komplexní buněčnou organelu. Jádro a jaderné procesy jsou organizovány do jednotlivých funkčně a morfologicky oddělených jaderných subkompartmentů. Tato dizertační práce se postupně zabývá několika jadernými subkompartmenty neboli doménami: místy aktivní replikace, Polycomb tělísky a jadernými inkluzemi tvořenými inozin monofosfát dehydrogenázou 2 (IMPDH2).

V první části práce jsme se soustředili na zkoumání vztahu MCM komplexu s předpokládanou DNA helikázovou aktivitou k replikaci DNA. Imunofluorescenčním značením buněk extrahovaných před fixací a analýzou dat pomocí kros-korelační funkce jsme prokázali přítomnost MCM proteinů v místech aktivní replikace. Naše výsledky přispěly k vyřešení jedné části tzv. MCM paradoxu.

Dále jsme studovali strukturní podstatu Polycomb tělísek. Polycomb tělíska byla na základě fluorescenční mikroskopie považována za jaderný subkompartment tvořený nahromaděním Polycomb proteinů v interchromatinovém prostoru. V naší práci jsme pomocí korelační světelné a elektronové mikroskopie a experimentů využívajících změn makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky, takzvaného makromolekulárního crowdingu, prokázali, že Polycomb tělíska nepředstavují jaderná tělíska, ale že odpovídají spíše chromatinové doméně. Naše výsledky ukázaly, že PcG tělíska představují lokální nakupení heterochromatinu.

V poslední části práce jsme se soustředili na studium inkluzí, nazývaných Rods a Rings, vytvářených IMPDH2 proteinem po jeho inhibici. Mikroskopickými přístupy jsme prokázali přítomnost IMPDH2 v jádře a zjistili jsme, že v experimentálních podmínkách tato jaderná frakce vytváří jadernou Rod inkluzi. Detailně jsme popsali ultrastrukturu těchto inkluzí stejně jako inkluzí tvořených IMPDH2 proteinem v cytoplazmě.

Naše výsledky přispěly k hlubšímu pochopení organizace buněčného jádra a v některých ohledech významně změnily dosavadní pohled na strukturní podstatu a složení zkoumaných jaderných subkompartmentů.

Klíčová slova: organizace buněčného jádra, jaderné subkompartmenty, replikace DNA, MCM proteiny, inozin monofosfát dehydrogenáza, Polycomb proteiny, Polycomb tělíska, korelační světelná a elektronová mikroskopie

Abstract

The cell nucleus is a complex cellular organelle. The nucleus and nuclear processes are organized into functionally and morphologically separated nuclear subcompartments. This thesis is particularly concerned with the three following nuclear subcompartments: sites of DNA replication, Polycomb bodies and nuclear inclusions constituted of inosine monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2).

First, we examined the relationship between MCM proteins and DNA replication. Using immunofluorescent labeling of cells extracted prior fixation and applying cross-correlation function analysis, we showed that MCM proteins are present at the sites of active DNA synthesis. Our results contributed to the solving of the first part of so-called MCM paradox.

Second, we studied the structural basis of the Polycomb bodies. Based on fluorescence microscopy studies, Polycomb bodies have been considered to be the nuclear subcompartments formed by the accumulation of Polycomb proteins in the interchromatin compartment. In our work, using correlative light electron microscopy and experimental changes in macromolecular crowding, we clearly showed that a Polycomb body is a chromosomal domain formed by an accumulation of heterochromatin structures, rather than a typical nucleoplasmic body.

Third, we were interested in the inclusions composed of inhibited IMPDH2 protein. Using microscopic methods, we showed the presence of IMPDH2 in the cell nucleus and its ability to form nuclear inclusions. We described in details the ultrastructure of these inclusions as well as the IMPDH2 inclusions in the cytoplasm.

Our results significantly contribute to the knowledge about the organization of the cell nucleus and in many aspects they change the current view on the structural basis and composition of some nuclear subcompartments.

Key words: organization of the cell nucleus, nuclear subcompartments, DNA replication, MCM proteins, inosine monophosphate dehydrogenase, Polycomb proteins, Polycomb body, correlative light electron microscopy

Seznam použitých zkratek

5-FU	5'-fluorouridin
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
CCF	cross-correlation function, kros-korelační funkce
CLEM	correlative light and electron microscopy, korelační světelná a el. mikroskopie
CMG	proteiny Cdc45 + MCM2-7 + GINS
CSK pufr	cytoskeleton buffer, cytoskeletární pufr
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DA/DAPI	Dystamycin A + DAPI
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium, Eaglovo médium modifikované Dulbecem
EdU	5-etylnyl-2'-deoxyuridin
FA	formaldehyd
FS	freeze-substitution, mrazová substituce
HPF	high-pressure freezing, zamrazování za vysokého tlaku
IMPDH 1/2	Inozin-5'-monofosfát dehydrogenáza 1/2
MCM	minichromosome maintenance, protein udržující minichromozomy
NDS	normal donkey serum, normální oslí sérum
NFM	non-fat milk, odtučněné mléko
NGS	normal goat serum, normální kozí sérum
ORC	origin recognition complex, komplex rozpoznávající replikační počátky
PBS	phosphate buffered saline, fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PBST	PBS s 0,5 % Tween-20
PRE	Polycomb response element, DNA sekvence vázající Polycomb proteiny
SB	sample buffer, Laemmliho vzorkový pufr
TEM	transmisní elektronová mikroskopie

Obsah

Prohlášení	2
Identifikační záznam.....	3
Poděkování.....	4
Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Seznam použitých zkratk.....	7
Obsah	8
Seznam obrázků.....	11
Seznam tabulek.....	11
1. Úvod.....	14
1.1. <i>Buněčné jádro</i>	<i>16</i>
1.2. <i>Vnitřní členění jádra - subkompartmentalizace</i>	<i>16</i>
1.2.1. Chromozomální teritoria	17
1.2.2. Chromatin	17
1.2.3. Interchromatinový prostor	20
1.2.3.1. Jaderná tělíska	20
1.2.3.2. Jaderné inkluze.....	20
1.3. <i>Replikace DNA, MCM proteiny a MCM paradox</i>	<i>21</i>
1.3.1. Replikace DNA	21
1.3.2. MCM proteiny a MCM paradox.....	23
1.4. <i>Genové umlčování, Polycomb proteiny a Polycomb tělíska</i>	<i>25</i>
1.4.1. Polycomb proteiny	26
1.4.2. Polycomb represivní komplex 2	27
1.4.3. Polycomb represivní komplex 1	28
1.4.4. Světelná mikroskopie – mikroskopický obraz PRC1 proteinů, Polycomb tělíska... 29	
1.5. <i>Buněčné „Rods and Rings“ inkluze tvořené enzymem inozin-5'-mofosfát dehydrogenáza 2.....</i>	<i>30</i>
1.5.1. Inozin-5'-mofosfát dehydrogenáza	30
1.5.2. Inhibice IMPDH pomocí specifických inhibitorů	30
1.5.3. Změna lokalizace IMPDH2 proteinu po jeho inhibici	31
2. Cíle práce.....	33
3. Materiál a metody	34
3.1. <i>Buněčné kultury, kultivace buněk.....</i>	<i>34</i>
3.2. <i>Příprava buněk pro světelnou mikroskopii</i>	<i>35</i>
3.2.1. Extrakce buněk pomocí CSK pufru	35
3.3. <i>Ovlivňování buněk před fixací.....</i>	<i>35</i>

3.3.1.	Kultivace buněk v hypertonickém médiu.....	35
3.3.2.	Kultivace buněk v hypotonickém médiu	36
3.3.3.	Inhibice IMPDH specifickými inhibitory, Indukování R&R inkluzí	36
3.4.	<i>Imunofluorescenční značení</i>	36
3.4.1.	Imunofluorescenční značení DNA.....	37
3.5.	<i>Značení replikace a transkripce</i>	38
3.5.1.	Značení replikace DNA.....	38
3.5.2.	Značení transkripce	38
3.5.3.	Kontroly imunoznačení	38
3.5.3.1.	Vynechání primární protilátky	38
3.5.3.2.	Kontrola pomocí protilátky stejného izotypu	39
3.6.	<i>Fluorescenční barvení</i>	40
3.6.1.	DAPI barvení.....	40
3.6.1.1.	DA/DAPI barvení	40
3.6.2.	Barvení DNA pomocí DRAQ5	41
3.7.	<i>Obrazová analýza – kros-korelační funkce</i>	41
3.8.	<i>Světelná mikroskopie</i>	42
3.8.1.	Zalévání vzorku	42
3.8.2.	Světelné mikroskopy	42
3.9.	<i>Elektronová mikroskopie</i>	43
3.9.1.	Chemická fixace, pre-embedding	43
3.9.1.1.	Preembedding buněk extrahovaných před fixací.....	44
3.9.2.	Fyzikální fixace, mrazová substituce	44
3.10.	<i>Imunoznačení vzorků pro elektronovou mikroskopii</i>	46
3.11.	<i>Korelační světelná a elektronová mikroskopie (CLEM)</i>	46
3.11.1.	CLEM na řezech	47
3.11.2.	CLEM - Preembedding	47
3.11.3.	CLEM - Fyzikální fixace pomocí HPF následovaná FS	48
3.11.4.	Korelace na světelné úrovni	49
3.11.4.1.	Korelace GFP signálu s imunofluorescenčním signálem.....	50
3.12.	<i>Kontrastování vzorků pro EM</i>	50
3.13.	<i>Použité elektronové mikroskopy</i>	52
3.14.	<i>Elektronová tomografie</i>	52
3.15.	<i>Kvantitativní analýza elektronmikroskopického značení</i>	52
3.16.	<i>Western blot</i>	53
3.16.1.	Příprava celobuněčných lyzátů	53
3.16.2.	Příprava cytoplazmatické a jaderné buněčné frakce.....	53
3.16.3.	Měření koncentrace proteinů.....	54
3.16.4.	Gelová elektroforéza	54
3.16.5.	Imunoznačení na nitrocelulóзовé membráně	55
3.16.6.	Digitalizace a analýza dat	55
4.	Výsledky	56

4.1. Asociace MCM proteinů s replikačními oblastmi	56
4.1.1. Vztah MCM proteinů k replikačním oblastem.....	56
4.2. Polycomb tělíska	63
4.2.1. Korelace signálu BMI1-GFP s imunofluorescenčním značením	64
4.2.1. Elektronová mikroskopie - fyzikálně fixované vzorky	66
4.2.1. CLEM na fyzikálně fixovaných vzorcích	67
4.2.2. CLEM na chemicky fixovaných vzorcích.....	73
4.2.2.1. CLEM na vzorcích extrahovaných před fixací.....	74
4.2.3. Korelace BMI1 signálu s DNA.....	76
4.2.3.1. Korelace BMI1 signálu s DNA imunozačením.....	76
4.2.3.2. Korelace BMI1 signálu s DA/DAPI barvením.....	76
4.2.4. Změna lokalizace BMI1 proteinu vlivem hypertonického prostředí.....	77
4.2.1. Chování ostatních proteinů PRC1 komplexu v hypertonickém prostředí	79
4.2.2. Porovnání in vivo BMI1-GFP signálu s imunofluorescenčním BMI1 a GFP signálem a barvením DA/DAPI před a po inkubaci buněk v hypertonickém médiu	80
4.2.3. Vliv různých osmolárně aktivních látek na změnu lokalizace BMI1 proteinu	81
4.2.4. Reverzibilita změny lokalizace Polycomb proteinů	83
4.2.5. Hypertonické prostředí a transkripce	84
4.2.6. Chování Polycomb tělísek v hypertonickém prostředí se liší od chování typických jaderných tělísek.....	84
4.2.7. In vivo DRAQ5 barvení uvolňuje BMI1 z chromatinu, ale Polycomb tělíska ve formě nahromadění chromatinu zůstávají zachována.....	87
4.2.8. Uvolnění PRC1 proteinů z chromatinu je spojeno se změnami ve fosforylaci těchto proteinů	89
4.3. IMPDH2 protein a jím tvořené „Rods a Rings“ inkluze	91
4.3.1. Základní analýza změn v distribuci IMPDH2 proteinu po inhibici specifickými inhibitory	91
4.3.2. Lokalizace IMPDH2 proteinu v neovlivněných buňkách.....	94
4.3.3. Změna lokalizace IMPDH2 proteinu v buňkách ovlivněných ribavirinem	95
4.3.4. Western blot analýza cytoplazmatické a jaderné frakce IMPDH2 proteinu	98
4.3.5. Ultrastruktura R&R inkluzí	101
4.3.6. Detailní ultrastruktura IMPDH2 inkluzí: elektronová tomografie	104
4.3.7. Tvorba R&R inkluzí v hypertonickém prostředí.....	105
5. Diskuze.....	107
5.1. MCM proteiny a DNA replikace.....	107
5.2. Polycomb tělíska	108
5.3. IMPDH2 inkluze.....	113
6. Závěrečná diskuze	118
7. Závěry.....	122
8. Seznam použité literatury.....	123
9. Seznam publikací autora dizertační práce	137

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Chromozomální teritoria	18
Obrázek č. 2: Nukleozom	19
Obrázek č. 3: Schématické znázornění buněčného jádra	21
Obrázek č. 4: Replikační vidlička	23
Obrázek č. 5: Sex comb u samečka <i>D. melanogaster</i>	27
Obrázek č. 6: Savcí PRC1 a PRC2 proteiny	29
Obrázek č. 7: De novo biosyntéza purinů	31
Obrázek č. 8: Kolokalizace MCM2 a 7 proteinů na extrahovaných buňkách během buněčného cyklu	58
Obrázek č. 9: Vliv extrakce na jadernou architekturu	59
Obrázek č. 10: Dynamika na chromatin vázané formy MCM2 proteinu od pozdní G1 fáze do pozdní S fáze buněčného cyklu	59
Obrázek č. 11: Kvantitativní analýza na chromatin vázaného MCM2 proteinu ve vztahu k DNA replikaci a chromatinu	62
Obrázek č. 12: Kvantitativní analýza na chromatin vázaného MCM2 proteinu ve vztahu k syntéze DNA po 90 min pauze (chase experiment)	63
Obrázek č. 13: Korelace GFP signálu nasnímaného na buňkách před jejich fixací se signálem anti-BMI1, GFP nebo DNA z imunofluorescenčního značení a signálem z barvení DAPI nebo DA/DAPI	65
Obrázek č. 14: Jádro U-2 OS buňky imunozačené proti BMI1 proteinu	68
Obrázek č. 15: Korelační světelná a elektronová mikroskopie na fyzikálně fixovaných vzorcích	70
Obrázek č. 16: Překryv fluorescenčního a elektronmikroskopického obrazu na stejném ultratenkém řezu	71
Obrázek č. 17: Imunofluorescenční značení BMI1 proteinu na ultratenkých řezech	72
Obrázek č. 18: CLEM na vzorcích značených technikou před zalitím	74
Obrázek č. 19: CLEM buněk extrahovaných před fixací a značených před zalitím	75
Obrázek č. 20: Kolokalizace DNA a Polycomb tělísek	77

Obrázek č. 21: Vliv zvýšené makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky na lokalizaci BMI1 proteinu	79
Obrázek č. 22: Rozpad Polycomb tělísek v hypertonickém prostředí detekovaný imunoznačením různých Polycomb proteinů PRC1 komplexu	81
Obrázek č. 23: Vliv zvýšené makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky na Polycomb tělíska	82
Obrázek č. 24: Změna lokalizace BMI1 proteinu vyvolaná různými osmoticky aktivními látkami	83
Obrázek č. 25: Vliv hypertonického prostředí na RNA transkripci	85
Obrázek č. 26: Reverzibilita změn vyvolaných inkubací buněk v hypertonickém médiu	86
Obrázek č. 27: Chování Polycomb tělíska v hypertonickém médiu se liší od chování typických jaderných tělísek.....	88
Obrázek č. 28: Uvolnění BMI1 proteinu z chromatinu indukované pomocí DRAQ5	89
Obrázek č. 29: Vystavení buněk hypertonickému prostředí vyvolává změny ve fosforylaci BMI1 a RING1a proteinů.....	90
Obrázek č. 30: Koncentrační závislost tvorby R&R inkluzí.....	92
Obrázek č. 31: R&R obraz indukovaný pomocí ribavirinu v různých lidských a myších buněčných liniích	93
Obrázek č. 32: Časová závislost tvorby R&R inkluzí	94
Obrázek č. 33: Imunofluorescenční lokalizace IMPDH2 proteinu v inhibitory neovlivněných Hep2 buňkách.....	96
Obrázek č. 34: Změna lokalizace ribavirinem inhibovaného IMPDH2 proteinu	97
Obrázek č. 35: Elektronová mikroskopie jaderné Rod struktury	98
Obrázek č. 36: Intenzitní plot fluorescenčního IMPDH2 a DAPI signálu v neovlivněných Hep2 buňkách.....	99
Obrázek č. 37: Western blot analýza IMPDH2 proteinu včetně jeho rozdělení do buněčných frakcí.....	100
Obrázek č. 38: Korelační světelná a elektronová mikroskopie R&R inkluzí	102
Obrázek č. 39: Ultrastruktura R&R inkluzí zobrazená pomocí elektronové tomografie	104
Obrázek č. 40: Tvorba R&R inkluzí po vystavení buněk hypertonickému prostředí.....	106
Obrázek č. 41: Různé modely Polycomb tělíska	120

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Přehled použitých buněčných linií a příslušných kultivačních medií34

Tabulka č. 2: Seznam použitých primárních protilátek.....37

1. Úvod

Buněčné jádro je složitou a vysoce organizovanou buněčnou organelou členěnou na jednotlivé strukturně a funkčně oddělené oblasti. Tyto oblasti buněčného jádra jsou nazývány jadernými subkompartmenty a navzájem se odlišují svým makromolekulárním složením. Jednotlivé subkompartmenty nejsou odděleny biologickou membránou a vznikají po vzájemné interakci makromolekul v makromolekulárně přeplněném prostředí buněčného jádra. Jaderné subkompartmenty jsou obecně rozdělovány na chromatinové, jejichž hlavní součástí je molekula DNA s přidruženými faktory, a interchromatinové, jejichž podstata je proteinové nebo ribonukleoproteinové povahy s malým nebo žádným obsahem DNA.

Předkládaná dizertační práce byla vypracována na Ústavu buněčné biologie a patologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zaměřuje se převážně na organizaci a strukturu buněčného jádra. Zabývá se jeho následujícími třemi subkompartmenty: místy replikace, Polycomb tělísky a experimentálně vyvolanou jadernou IMPDH2 Rod inkluzí, vždy s hlavním důrazem kladeným na určení strukturní podstaty těchto jaderných subkompartmentů, detaily jejich ultrastruktury a na jejich vztah k ostatním jaderným subkompartmentům. Pro řešení této práce bylo kromě dalších metod buněčné biologie využito především pokročilých metod světelné a elektronové mikroskopie. Velmi důležitou úlohu také hraje použití různých metod korelační mikroskopie, GFP fúzních proteinů a imunoznačení pomocí protilátek.

První kapitola *Úvod* poskytuje na celkem 19 stranách stručný přehled znalostí o buněčném jádře s důrazem na jeho kompartmentalizaci.

Druhá kapitola *Cíle práce* na straně 33 definuje základní otázky řešené v této dizertační práci.

V třetí kapitole *Materiál a metody* jsou uvedeny na 22 stranách použité metody tak, aby bylo na jejich základě možno pokusy nezávisle zopakovat. Jedná se především o techniky kultivace buněk a jejich přípravy pro mikroskopii, metody světelné, elektronové a korelační mikroskopie a metodu Western blot.

Čtvrtá kapitola uvádí, na celkem 51 stranách, vybrané *Výsledky* dosažené během mého Ph. D. studia a publikované ve čtyřech publikacích v impaktovaných časopisech. Kapitola je rozdělena do několika podkapitol. Kapitola 4.1 se zabývá MCM proteiny a jejich lokalizací v místech probíhající replikace, kapitola 4.2 strukturní podstatou Polycomb tělísek, zkoumanou několika různými přístupy a konečně kapitola 4.3 se zabývá buněčnými R&R inkluzemi tvořenými IMPDH2 proteinem, námi objevenou jadernou IMPDH2 inkluzí, jakož i ultrastrukturou cytoplazmatických i jaderných IMPDH2 inkluzí.

Pátá kapitola *Diskuze* postupně na 11 stranách jednotlivé námi dosažené výsledky rozebírá a dává do souvislostí s jinými výsledky publikovanými v odborné literatuře.

V šesté kapitole *Závěrečná diskuze* jsou dosažené výsledky shrnuty a diskutovány jako jeden celek.

V sedmé kapitole *Závěry* umístěné na 122. straně jsou v bodech vyjmenovány dosažené výsledky.

Na konci práce je uveden přehled použité literatury a úplný seznam publikací autora dizertační práce.

1.1. Buněčné jádro

Buněčné jádro je mikroskopicky nejvýraznější organelou eukaryotických buněk. Je místem uložení většiny buněčné DNA a tím většiny genetické informace obsažené v buňce. Genetická informace uložená v jádře a její exprese jsou zodpovědné za morfologickou a funkční charakteristiku buňky samotné.

Buněčné jádro je od okolní cytoplazmy odděleno dvojitou membránou zvanou jaderná obálka. Cytoplazma a vnitřní prostředí jádra jsou navzájem propojeny přes tzv. jaderné póry umožňující selektivní transport většiny látek z cytoplazmy do jádra a naopak. Selektivnost jaderných pórů způsobuje, že složení cytoplazmy a nukleoplazmy se zásadně odlišuje, a to jak v makromolekulárním, tak i iontovém složení. V jádře tak vzniká jedinečné prostředí umožňující správný průběh specifických jaderných procesů.

1.2. Vnitřní členění jádra - subkompartmentalizace

Vnitřní prostředí jádra není homogenní. Buněčné jádro je naopak uspořádáno do mnoha prostorově oddělených funkčních oblastí či domén označovaných jako jaderné subkompartmenty. Vnitřní prostředí jádra neobsahuje žádné reálné fyzikální bariéry např. v podobě biologických membrán, přesto se jaderné subkompartmenty od sebe vzájemně liší jak chemickým složením, tak funkcí. Důležitou roli při vytváření a udržování subkompartmentalizace jádra plní tzv. makromolekulární crowding - makromolekulárně přeplněné prostředí (Hancock, 2004; Hancock, 2004; Iborra, 2007). Makromolekulární crowding je základní a nedílnou vlastností všech buněk. Nahuštění buněčných komponent do omezeného prostoru výrazným způsobem zvyšuje asociační konstanty intermolekulárních interakcí a v konečném důsledku může vést k vzájemnému oddělení jednotlivých makromolekul způsobenému jejich preferenční interakcí (Hancock, 2004).

Nejdůležitějšími faktory podílejícími se na tvorbě, udržování a tvarování jaderných subkompartmentů jsou koncentrace makromolekul a jejich vzájemná afinita. Tyto interakce jsou navíc ovlivňovány kovalentními chemickými modifikacemi zúčastněných makromolekul, včetně DNA (Iborra, 2007; Dundr and Misteli, 2010; Meldi and Brickner, 2011; Dundr, 2012).

1.2.1. Chromozomální teritoria

DNA je v interfázním jádře uložena v tzv. chromozomálních teritoriích (Obr. 1). To znamená, že každý chromozom (tj. jedna molekula DNA) vyplňuje konkrétní objem jádra (Visser and Aten, 1999; Cremer and Cremer, 2001; Speicher and Carter, 2005; Cremer and Cremer, 2010) a s jinými chromozomy se do kontaktu dostává pouze na rozhraní mezi jednotlivými chromozomálními teritorii.

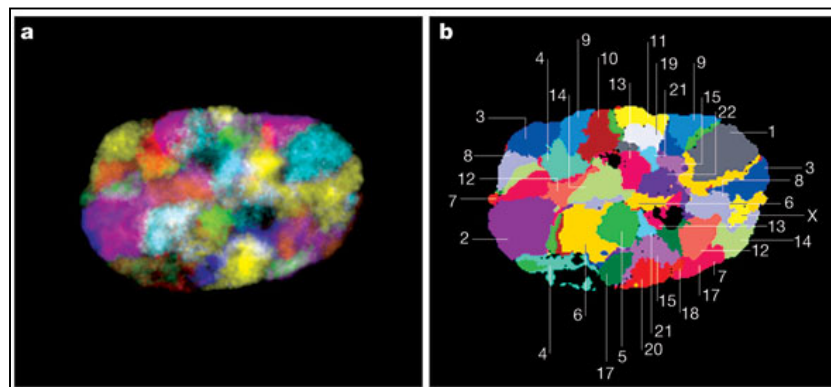
Rozmístění chromozomálních teritorií není úplně náhodné a některé chromozomy spolu preferenčně sousedí (Nagele et al., 1999; Parada et al., 2004). Byl rovněž popsán vzájemný kontakt jednotlivých vzdálenějších oblastí chromozomů prostřednictvím dlouhých smyček DNA. Tento nenáhodný chromozomální kontakt byl nazván „chromosome kissing“ fenomén (Cavalli, 2007).

1.2.2. Chromatin

DNA je v jádře uložena ve formě tzv. chromatinu. Dvoušroubovice DNA je ve více méně pravidelných intervalech omotána kolem jádra tvořeného bazickými proteiny - histony. Kromě DNA a histonů obsahuje chromatin další proteiny označované jako nehistonové. Každá z těchto tří základních složek se podílí na hmotnosti chromatinu přibližně jednou třetinou.

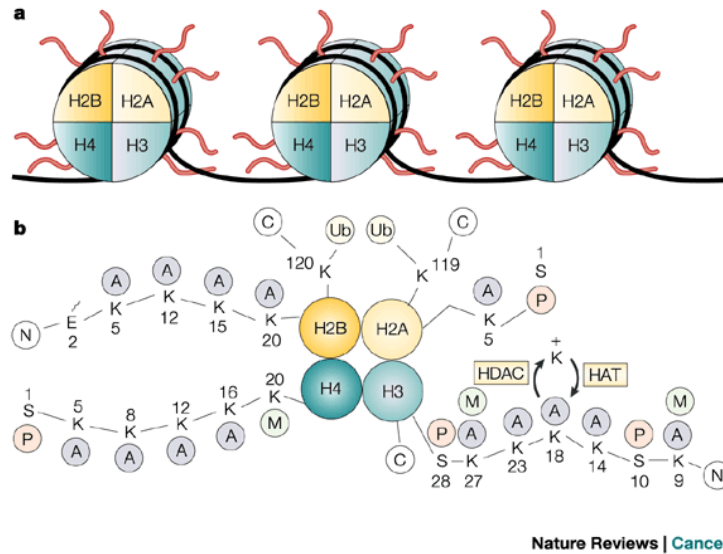
Histonové jádro je tvořeno osmi molekulami histonů, konkrétně dvěma od každého ze čtyř základních typů H2A, H2B, H3 a H4 (Finch et al., 1977; Dubochet and Noll, 1978). Jednotka chromatinu tvořená 146 páry bazí DNA omotaných kolem heterooktameru tvořeného histony se nazývá nukleozom (Kornberg and Thomas, 1974; Luger et al., 1997). Uspořádání DNA do takzvaného 10 nm vlákna, složeného z DNA a nukleozomů, zásadním způsobem zvyšuje kompaktnost DNA.

Kromě zvyšování kompaktnosti uložení DNA má chromatin další velice důležitou úlohu, kterou je ovlivňování genové exprese chemickými modifikacemi histonových konců vyčnívajících ze základní struktury nukleozomu (Obr. 2). Histonové modifikace slouží jako značky pro velké množství proteinů a jejich komplexů. Tyto proteiny následně různými mechanismy regulují genovou expresi. Změny v genové expresi nepodmíněné změnou sekvence nukleotidů jsou souhrně označovány jako epigenetické (Xu and Zhu, 2010; Gurard-Levin and Almouzni, 2014).



Obrázek č. 1: Chromozomální teritoria

Chromozomální teritoria všech chromozomů vizualizovaná v interfázním jádře. **(A)** Každé z chromozomálních teritorií je zobrazeno jinou barvou (vzniklou většinou kombinací několika různých fluorochromů). Obrázek představuje dekonvolvaný střední konfokální řez jádrem. **(B)** Rekonstrukce jednotlivých chromozomálních teritorií z obr. A s vyznačenými čísly chromozomů. Černé oblasti představují jádérka. Zdroj obrázku: Speicher and Carter, 2005



Obrázek č. 2: Nukleozom

Schématické znázornění nukleozomu. **(A)** Tři po sobě jdoucí nukleozomy spolu s dvoušroubovicí DNA obtáčejícím histonové jádro. **(B)** Polovina histonového oktameru složená z histonů H2A, H2B, H3 a H4 se svými N konci s vyznačením míst možných modifikací. **A** – acetyl, **C** – karboxylový konec proteinu, **E** – kyselina glutamová, **K** – lyzin, **M** – metylová skupina, **N** – N konec proteinu, **P** –fosfátová skupina, **S** – serin, **Ub** – ubiquitin. Zdroj obrázku: Marks et al., 2001

Chromatin jako celek může být rozdělen do dvou základních typů a to na transkripčně aktivní euchromatin obsahující převážně geny exprimované v dané buňce, a neaktivní heterochromatin obsahující hlavně geny umlčené nebo některé nekódující oblasti DNA, převážně repetitivní sekvence. Nejtypičtější uložení heterochromatinu je na vnitřní straně jaderné obálky (perinukleární heterochromatin), kolem jadérka (perinukleolární heterochromatin) nebo v nukleoplazmě ve formě nakupení heterochromatinu nazývaných chromocentra (Mateos-Langerak et al., 2007). Euchromatin je pak v jádře uložen preferenčně v oblasti mezi jadérkem a obálkou. V některých speciálních typech buněk, jako jsou tyčinky v sítnici oka nočních savců, však může být chromatin uložen odlišným způsobem (Solovei and Joffe, 2010).

1.2.3. Interchromatinový prostor

Kromě chromatinových oblastí se v jádře nacházejí oblasti, které obsahují málo nebo žádnou DNA. Tyto oblasti tvoří tzv. interchromatinový prostor (Cremer et al., 2000; Spector, 2001; Cremer et al., 2004; Misteli, 2008), ve kterém se nachází jaderné subkompartmenty jako jsou jaderná tělíska nebo inkluze.

1.2.3.1. Jaderná tělíska

Mezi nejvýraznější struktury nacházející se v buněčném jádře patří tzv. jaderná tělíska (Matera et al., 2009; Dundr, 2012). Jaderná tělíska jsou uložena v interchromatinovém prostoru, jsou v elektronovém mikroskopu morfologicky odlišitelná od ostatních struktur (Spector, 2001) a jsou převážně proteinové nebo ribonukleoproteinové povahy (Spector, 2001; Matera et al., 2009). Jaderná tělíska mohou být asociována s konkrétními geny (Verschure et al., 2002), ale obecně obsahují pouze malé množství DNA. Mezi nejznámější a nejlépe prostudovaná jaderná tělíska patří: Cajalova tělíska, jaderné skvrny (speckles), „paraspeckles“, tělíska histonového lokusu (histone locus bodies) nebo PML tělíska (promyelocytic leukemia nuclear bodies) (Dundr and Misteli, 2010). Další významnou, i ve světelném mikroskopu viditelnou strukturou buněčného jádra je jadérko. Ačkoliv je některými vědci považováno za speciální subkompartment buněčného jádra, svou makromolekulární podstatou a umístěním do interchromatinového prostoru patří také mezi jaderná tělíska.

1.2.3.2. Jaderné inkluze

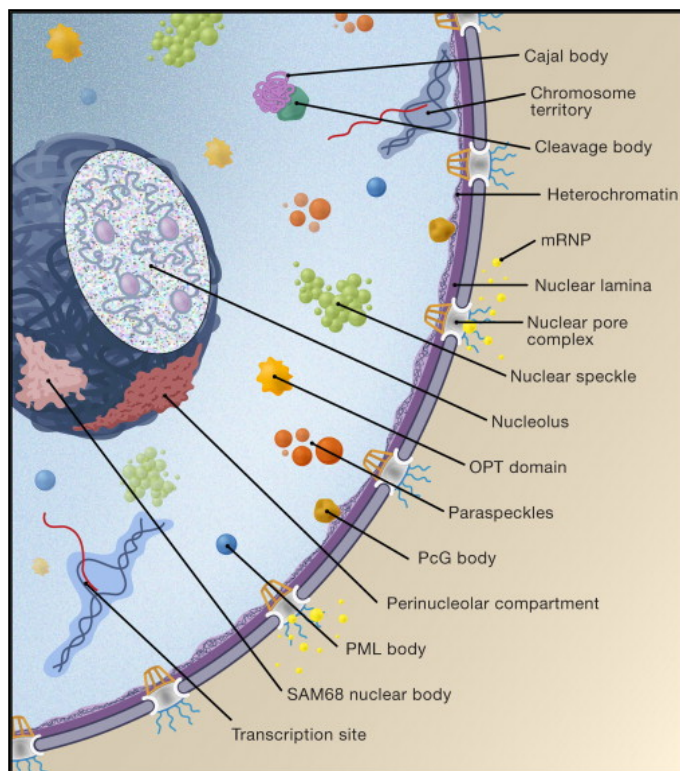
Dalšími útvary, které je možné nalézt v buněčném jádře jsou tzv. jaderné inkluze. Jaderné inkluze jsou útvary tvořené nahromaděním specifické substance často v důsledku jejího nadbytku nebo chybné lokalizace. Jedná se například o inkluze vznikající jako

důsledek vysoké tvorby virionů nebo jejich částí při napadení buňky virem (Moshe and Gorovits, 2012; Everett, 2013) nebo glykogenové a tukové jaderné inkluze jako důsledek chybného ukládání těchto buněčných komponent (Leduc and Wilson, 1959).

1.3. Replikace DNA, MCM proteiny a MCM paradox

1.3.1. Replikace DNA

Replikace DNA patří mezi základní buněčné procesy. Dříve, než dojde k rozdělení jedné mateřské buňky na dvě buňky dceřiné, musí být její DNA zdvojená tak, aby každá z nově vznikajících buněk obsahovala stejnou genetickou informaci. Proces zdvojení DNA do dvou shodných kopií se nazývá replikace DNA (shrnutí v Masai et al., 2010). DNA



Obrázek č. 3: Schématické znázornění buněčného jádra

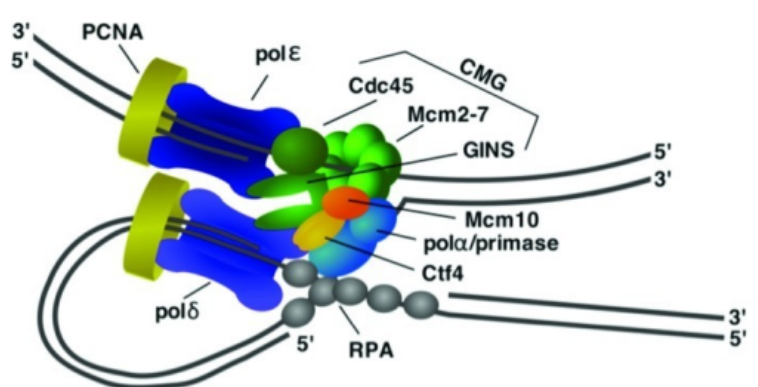
Schématické zobrazení jedné ze současných představ prostorového uspořádání buněčného jádra. Zachycena jsou chromozomální teritoria a různá jaderná tělíska. Zdroj obrázku: Kumaran et al., 2008

replikace probíhá v tzv. S neboli syntetické fázi buněčného cyklu. Té předchází tzv. G1 fáze. Po S fázi buňka prochází krátkou G2 fází následovanou mitózou spojenou s rozpadem jaderné obálky a jejím opětovným formováním. Buňka je rozdělena na dvě buňky dceřiné nacházející se opět v G1 fázi.

Replikace DNA začíná z míst, která jsou označována jako replikační počátky. Těch se v každé savčí buňce nachází několik desítek až stovek tisíc. Ne všechny jsou však aktivovány v každém buněčném cyklu (Huberman and Riggs, 1966; Mechali, 2010). Během jednoho buněčného cyklu je postupně aktivována replikace z 30 000-50 000 replikačních počátků (Huberman and Riggs, 1966; Mechali, 2010), přičemž zbývající replikační počátky nejsou v daném buněčném cyklu aktivovány a jsou označovány jako tzv. spící počátky (McIntosh and Blow, 2012).

Proces replikace DNA je přísně regulován. Je nutné zabezpečit, aby došlo ke zdvojení veškeré jaderné DNA a zároveň aby se každá část DNA zkopírovala pouze jednou. Na počátku G1 fáze nasedá na replikační počátky tzv. komplex rozpoznávající počátek (origin recognition complex, ORC). Na ORC nasedají další proteiny, které dohromady tvoří na chromatin pevně navázaný prereplikační komplex (blíže popsany níže). Prereplikační komplex umožňuje nasedání dalších proteinů a nakonec i DNA polymeráz, které zahajují vlastní replikaci DNA (Blow and Ge, 2008; Gilbert, 2010; Mechali, 2010). Bez prereplikačního komplexu navázaného na DNA nemůže dojít k odstartování replikace.

Po svém zahájení se replikace šíří ve formě replikačních vidliček (Obr. 4) na obě strany od replikačního počátku. Postupující replikace uvolňuje neaktivované prereplikační komplexy z replikovaných úseků DNA. Během S fáze tak postupně dojde k uvolnění všech prereplikačních komplexů jak z aktivovaných, tak i spících replikačních počátků. Na uvolněné replikační počátky může prereplikační komplex nasednout opět až po proběhnutí



Obrázek č. 4: Replikační vidlička

Schématická představa podoby replikační vidličky a proteinů účastnících se procesu replikace. Je zde také zobrazen CMG komplex skládající se z Cdc45 proteinu, GINS proteinů a MCM2-7 komplexu, jehož přesná lokalizace ve vztahu k replikační vidličce je stále předmětem diskuze. Zdroj obrázku: Galal et al., 2012

mitózy, tj. na počátku další G1 fáze. Tímto mechanismem je zajištěno, že žádná oblast DNA není replikována více než jednou během buněčného cyklu (Bell and Dutta, 2002; Forsburg, 2004; Blow and Ge, 2008; Gilbert, 2010; Mechali, 2010). Pokud dojde vlivem nějaké chyby k předčasnému zastavení replikace, je podle získaných výsledků aktivován nejbližší spící replikační počátek a místo se zastavenou replikací je zreplikováno z tohoto, původně spícího, počátku (Mechali, 2010; Tao et al., 2010). Tato skutečnost zajišťuje, že je každá oblast DNA zreplikována nejméně jednou a tedy právě jen jednou během každého buněčného cyklu.

1.3.2. MCM proteiny a MCM paradox

Proteiny udržující minichromozomy (minichromosome maintenance proteins, MCM proteiny) byly poprvé identifikovány při hledání mutantů *Saccharomyces cerevisiae* s defekty v udržování minichromozomů (Maine et al., 1984; Sinha et al., 1986; Gibson et al., 1990; Forsburg, 2004). Proteiny patřící do MCM rodiny náleží k superrodině AAA+ ATPáz

a nacházejí se ve všech eukaryotických organizmech (Forsburg, 2004). MCM proteiny jsou charakterizovány přítomností 200 nukleotidových párů dlouhou sekvencí nazývanou MCM box, která obsahuje dva konzervativní ATPázové motivy (Forsburg, 2004; Bochman and Schwacha, 2009). Eukaryotických MCM proteinů je celkem šest a nazývají se MCM proteiny 2-7 (Forsburg, 2004). Obecně se předpokládá, že v živých buňkách jsou proteiny MCM2-7 organizovány do heterohexamerního komplexu se stechiometrií 1:1:1:1:1:1 (Chong et al., 1995; Davey et al., 2003; Costa and Onesti, 2009).

K navázání MCM2-7 komplexů na chromatin dochází v pozdních fázích mitózy a v průběhu G1 fáze (Hesketh et al., 2015). Na konci G1 fáze je na chromatin navázáno značné množství MCM2-7 komplexů. Jejich množství 10-100x převyšuje množství replikačních počátků/prereplikačních komplexů (Krude et al., 1996; Dimitrova et al., 1999; Prasanth et al., 2004; Takahashi et al., 2005; Das et al., 2014).

Navázání MCM2-7 komplexů na chromatin je zprostředkováno proteiny CDC6 a CDT1, které interagují s ORC proteiny. Všechny proteiny dohromady pak tvoří tzv. prereplikační komplex v místě replikačního počátku (Blow and Ge, 2008; Gilbert, 2010; Mechali, 2010). Část navázaných MCM2-7 komplexů je aktivována pomocí CDC7/DBF4 a S-CDK proteinů předtím, než je DNA polymerázou zahájena vlastní replikace z daného replikačního počátku (Bell and Dutta, 2002; Bell and Botchan, 2013; Sheu et al., 2014). Tento proces v sobě zahrnuje také postupnou aktivaci Cdc45, GINS, Sld2, Sld3 a Dpb11 proteinů/proteinových komplexů. Cdc45 a GINS proteiny jsou spolu s MCM proteiny zodpovědné za odvíjení DNA. V *in vitro* podmínkách byla popsána jejich DNA helikázová aktivita (Costa and Onesti, 2009). Celý komplex je pak nazýván CMG komplex (Gambus et al., 2006; Moyer et al., 2006; Costa and Onesti, 2009; Ilves et al., 2010; Onesti and MacNeill, 2013). S proběhlou replikací je MCM2-7 komplex (respektive celý

CMG komplex) uvolněn z DNA a jeho opětovnému nasednutí až do pozdní mitózy brání přítomné proteiny CDK a geminin (McGarry and Kirschner, 1998; Nguyen et al., 2001; Nishitani and Lygerou, 2002). Tento mechanismus zajišťuje, že DNA je replikována během buněčného cyklu pouze jednou.

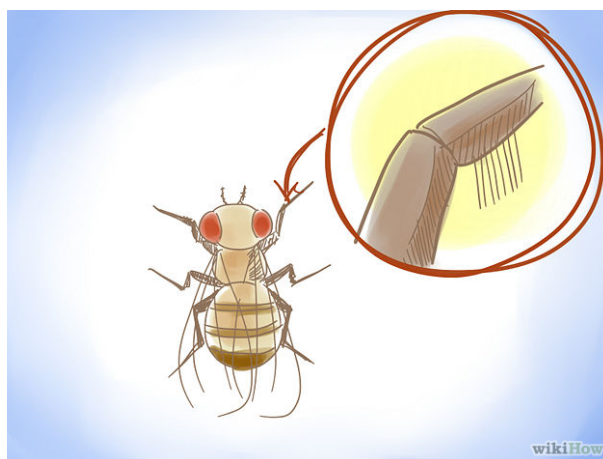
Výše uvedený proces vázání a aktivace MCM komplexu je společný pro všechny eukaryotické organizmy. Role MCM komplexu v průběhu vlastní replikace však není úplně zřejmá (Labib and Diffley, 2001). *In vitro* studie odhalily, že CMG komplex má DNA helikázovou aktivitu (Gambus et al., 2006; Moyer et al., 2006; Ilves et al., 2010), a je asociován s replikační vidličkou (Calzada et al., 2005; Pacek et al., 2006). Naopak imunofluorescenční studie ukazují, že MCM2-7 proteiny jsou uvolněny z DNA v místech aktivní replikace a jsou přítomny pouze na dosud nezreplikovaném chromatinu. Jako tzv. MCM paradox byla právě označena neschopnost detekovat MCM proteiny na DNA v místě a čase aktivní replikace pomocí imunofluorescenční mikroskopie spolu s pozorováním, že počet na chromatin vázaných MCM2-7 proteinů na konci G1 fáze mnohonásobně převyšuje počet replikačních počátků (Dimitrova et al., 1999; Edwards et al., 2002; Hyrien et al., 2003; Takahashi et al., 2005; Das et al., 2014).

1.4. Genové umlčování, Polycomb proteiny a Polycomb tělíska

Polycomb proteiny (Polycomb group proteins, PcG proteins) jsou skupinou konzervovaných, chromatin modifikujících proteinů, které fungují jako transkripční represory. Jejich umlčující funkce je zprostředkována histonovými modifikacemi jako jsou H3K27me3 a H2AK119Ub (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Cao and Zhang, 2004; Cao et al., 2005; Niessen et al., 2009) a následným sbalením (kompaktací) chromatinu.

1.4.1. Polycomb proteiny

Polycomb proteiny byly poprvé popsány u *D. melanogaster*, a to na základě typického fenotypu, který způsobují jejich mutace. Většinou se jedná o poruchy segmentálního členění a vývoje organismu. Podle jednotlivých fenotypů dostali i svá jména. Samo slovo „polycomb“ vyjadřuje zmnožení orgánu podobného hřebenu (sex comb, Obr. 5), který mají samečci na předních nohách a slouží jim k přidržování samičky při kopulaci. U některých jedinců byly pozorovány změny na tomto orgánu ve smyslu zmnožení počtu zubů hřebínku, zmnožení jejich celkového počtu, atypická lokalizace na jiných než předních končetinách nebo naopak jeho chybění. Při hledání genů, které by mohly stát v pozadí těchto fenotypových změn, byly nalezeny proteiny skupiny Polycomb a postupně byla odhalována jejich úloha, a to nejen v segmentálním uspořádání organismu (Orlando and Paro, 1995). Mimo hmyz byly proteiny analogické k Polycomb proteinům intenzivně zkoumány také u háďátka *C. elegans*, myši, člověka nebo kvetoucích rostlin. Na základě získaných výsledků se předpokládá, že se vyskytují u všech mnohobuněčných živočichů a vyšších rostlin (Hennig and Derkacheva, 2009). Typickým příkladem genů regulovaných Polycomb proteiny jsou Hox geny (Cao et al., 2005; Bantignies et al., 2011). Polycomb proteiny však umlčují expresi i mnoha dalších genů, jejichž proteinové produkty se účastní buněčných procesů jako je regulace buněčného cyklu, buněčná diferenciace, senescence nebo inaktivace X chromozomu (Sparmann and van Lohuizen, 2006). Polycomb proteiny vykonávají svoji umlčující funkci vazbou přímo na regulační DNA oblasti zvané Polycomb response elements (PREs), nebo do jejich blízkosti. Sekvence PREs však byly doposud jasně definovány pouze u *Drosophila melanogaster* (Fauvarque and Dura, 1993; Simon et al., 1993; Comet et al., 2011).



Obrázek č. 5: Sex comb u samečka *D. melanogaster*

Samečci *D. melanogaster* mají na předních končetinách umístěn hřebenu podobný orgán nazývaný sex comb. Mutace některých Polycomb proteinů způsobují morfologické změny, zmnožení nebo naopak chybění tohoto orgánu. Na základě změn ve fenotypu byly původně Polycomb proteiny objeveny a pojmenovány. Zdroj obrázku: Wikipedia, Licence: Creative Commons

Polycomb proteiny tvoří minimálně dva funkčně oddělené, i když v procesu genového umlčování úzce spolupracující, komplexy (Martinez and Cavalli, 2006; Enderle et al., 2011).

1.4.2. Polycomb represivní komplex 2

Polycomb proteiny nevykonávají svoji funkci jako samostatné proteiny, ale vytvářejí hetero-komplexy složené vždy z několika Polycomb proteinů (Orlando and Paro, 1995; Lund and van Lohuizen, 2004; Vandamme et al., 2011). Funkce Polycomb represivního komplexu 2 (Polycomb repressive complex 2, PRC2) předchází funkci Polycomb represivního komplexu 1 (Polycomb repressive complex 1, PRC1). Z tohoto důvodu jej uvádíme jako první, ačkoliv z historického důvodu je označován dvojkou.

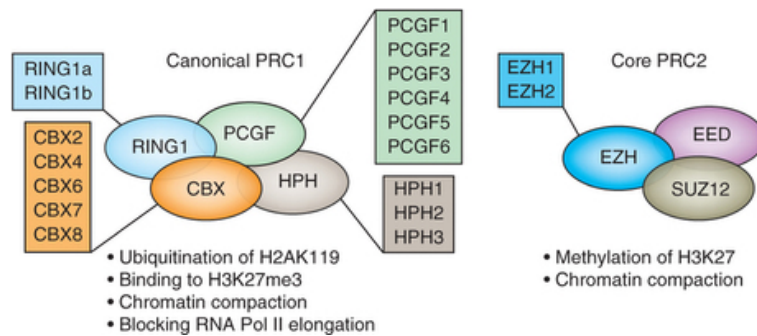
U *D. melanogaster* mezi PRC2 proteiny patří: E(z) - Enhancer of zeste, Esc - extra sex combs, Su(z)12 a NURF-55. PRC2 komplex v savčích buňkách, též označovaný jako Eed-Ezh2

komplex, má podobné složení. Je tvořen následujícími homologními savčími proteiny: Suz12, Eed, Ezh1 nebo Ezh2 a RbAp48 proteinu (Obr. 6). PRC2 komplex je zodpovědný za inicializaci genového umlčování prostřednictvím trimetylace na lyzinu 27 histonu H3 (H3K27me3), značky transkripčně neaktivního chromatinu (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002; Muller et al., 2002; Cao and Zhang, 2004).

1.4.3. Polycomb represivní komplex 1

Polycomb represivní komplex 1 (PRC1) nasedá na trimetylaci lyzinu 27 histonu H3 vytvořenou PRC2 komplexem a monoubiquitinyluje lyzin 119 na histonu H2A (H2AK119Ub) (Wang et al., 2004; Cao et al., 2005; Martin-Perez et al., 2010). Tato histonová modifikace je pravděpodobně zodpovědná za kompaktaci chromatinu (Wang et al., 2004; Cao et al., 2005; Martin-Perez et al., 2010). Schopnost PRC1 komplexu způsobovat kompaktaci chromatinu však byla prokázána pouze *in vitro* na izolovaném chromatinu (Francis et al., 2004; Grau et al., 2011).

PRC1 komplex je tvořen, podobně jako v případě PRC2 komplexu, několika různými proteiny. Ve srovnání se savčími buňkami je situace u *D. melanogaster* jednodušší a PRC1 komplex je tvořen čtyřmi proteiny: RING protein, Pc - Polycomb protein, PH - Polyhomeotic a PSC - Posterior sex combs (Orlando and Paro, 1995). V savčích buňkách má každý z těchto proteinů několik homologů, jak je názorně vidět na obr. 6. Konkrétně RING protein má dva savčí analogy: RING1a a RING1b, Pc má 5 analogů: CBX2, 4, 6, 7 a 8, PH má 3 analogy: HPH1-3 a PSC má celkem 6 savčích analogů PCGF1-6 z nichž některé jsou známější pod jinými jmény, např. PCGF2 je známější jako Mel18 a PCGF4 jako BMI1. Stejně tak proteiny CBX2, 4 a 6 jsou známy jako Polycomb protein 1-3 (Pc1-3) (Alkema et al., 1997; Vandamme et al., 2011).



Obrázek č. 6: Savčí PRC1 a PRC2 proteiny

Polycomb proteiny PRC1 a PRC2 komplexu se všemi jejich (dosud známými) analogy. Zdroj obrázku: Di Croce and Helin, 2013

Jednotlivé analogy existující v savčích buňkách se mohou v Polycomb komplexu vzájemně zastupovat. Rozdílné heterokomplexy pak vykonávají různé funkce (Vandamme et al., 2011). Existence mnoha analogických proteinů a množství jejich vzájemných kombinací při tvorbě Polycomb komplexů činí studium Polycomb proteinů a jejich interakcí v savčích buňkách velice náročným.

1.4.4. Světelná mikroskopie – mikroskopický obraz PRC1 proteinů, Polycomb tělíska

Polycomb proteiny PRC1 komplexu se nacházejí v jádře jako „difúzní“ frakce rovnoměrně rozptýlená v celém objemu buněčného jádra vyjma jadérek a jako takzvaná Polycomb tělíska, tj. lokální nahromadění PRC1 proteinů (Gunster et al., 1997; Satijn et al., 1997; Schoorlemmer et al., 1997; Saurin et al., 1998).

Velikost a počet Polycomb tělísek se mezi jednotlivými buněčnými typy výrazně liší (Sparmann and van Lohuizen, 2006). Velmi nápadná jsou Polycomb tělíska u buněčné linie U-2 OS odvozené z osteosarkomu. Jedná se o nejpoužívanější lidskou buněčnou linii pro výzkum Polycomb tělísek a Polycomb proteinů obecně.

1.5. Buněčné „Rods and Rings“ inkluze tvořené enzymem inozin-5'-mofosfát dehydrogenáza 2

1.5.1. Inozin-5'-mofosfát dehydrogenáza

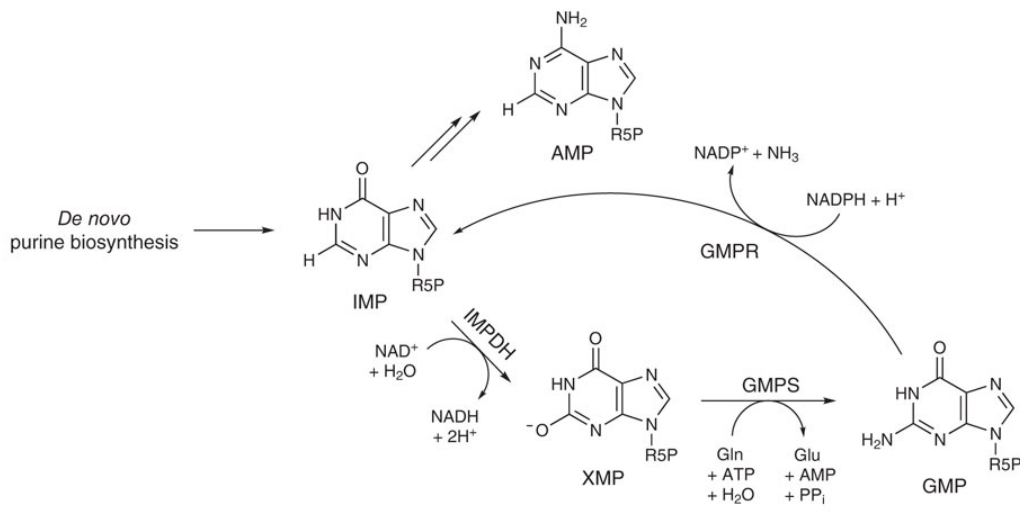
Inozin-5'-mofosfát dehydrogenáza (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH) je klíčový enzym *de novo* tvorby nukleotidu guanosinu. IMPDH katalyzuje NAD-závislou oxidaci inozin-5'-monofosfátu na xantozin-5'-monofosfát (Obr. 7). Tato reakce je prvním a nejdůležitějším krokem v tvorbě guanosin-trifosfátu (GTP) z inozin-monofosfátu (IMP) (Magasanik et al., 1957; Hedstrom and Gan, 2006; Hedstrom, 2009).

1.5.2. Inhibice IMPDH pomocí specifických inhibitorů

Enzymatická funkce IMPDH proteinu může být specificky inhibována pomocí kompetitivních nebo nekompetitivních inhibitorů. IMPDH inhibitorů je v dnešní době známo velké množství a z důvodu jejich klinické důležitosti jsou stále hledány další (Sintchak and Nimmesgern, 2000; Yang et al., 2011; Petrelli et al., 2013).

Inhibice IMPDH proteinu vede ke snížení buněčné koncentrace guanozinových nukleotidů, a tím ke snížení proliferace eukaryotických buněk (Markland et al., 2000). Nejvyšší účinek byl pozorován u T- a B-lymfocytů. Tyto buňky nemají funkční dráhu zodpovědnou za recyklaci guanozinu a jsou proto závislé na jeho novotvorbě (Allison et al., 1977; Allison and Eugui, 2000; Takebe et al., 2004).

IMPDH protein je častým terapeutickým cílem v humánní medicíně, protože IMPDH inhibitory obecně vykazují antivirové, antibakteriální, antiproliferativní a imunosupresivní účinky (Nair and Shu, 2007; Shu and Nair, 2008; Petrelli et al., 2013). Mezi nejznámější a nejčastěji klinicky používané IMPDH inhibitory patří ribavirin, kyselina mykofenolová (MPA) a mizoribin (Matyugina et al., 2012). Kyselina mykofenolová, častěji používaná jako



Obrázek č. 7: De novo biosyntéza purinů

Metabolická dráha *de novo* biosyntézy purinových nukleotidů. IMPDH enzym je zodpovědný za přeměnu IMP na XMP. Zdroj obrázku: Patton et al., 2011

její prekurzor mykofenolát mofetil, je předepisována jako imunosupresivní lék k prevenci odhojování transplantovaných orgánů (Kaufman et al., 2004) nebo při léčbě systémového *lupus erythematoses* (Merrill, 2012). Guanozinové analogy ribavirin a mizoribin jsou naopak používány k léčbě mnoha onemocnění způsobených RNA i DNA virem (Nair and Shu, 2007). Ribavirin pak má nejdůležitější klinické uplatnění v kombinaci s interferonem α při léčbě virové hepatitidy typu C (Hofmann et al., 2008).

1.5.3. Změna lokalizace IMPDH2 proteinu po jeho inhibici

IMPDH proteiny jsou předmětem intenzivního výzkumu již mnoho desetiletí. Avšak teprve v nedávné době bylo zjištěno, že tento enzym po své inhibici vytváří cytoplazmatické makromolekulární inkluze (Gunter et al., 2008; Carcamo et al., 2011; Thomas et al., 2012). Díky svému tvaru byly tyto inkluze nazvány „Rods and Rings“ (R&R, Dellavance et al., 2009; Seelig et al., 2011; Francescantonio et al., 2014). R&R inkluze byly původně objeveny během rutinního testování lidských sér pacientů s chronickou formou hepatitidy C na

přítomnost autoprotilátek (Carcamo et al., 2011; Keppeke et al., 2012; Carcamo et al., 2014). Během tohoto testování využívajícího imunofluorescenčního značení na sklíčkách s Hep2 buňkami byl pozorován zvláštní, dosud neznámý mikroskopický obraz. Byly pozorovány cytoplazmatické útvary jako jsou kruhy (Rings, ~2-5 μm v průměru), tyčky (Rods, ~3-10 μm dlouhých) a nebo inkluze ve tvaru osmičky, ucha jehly, zkrouceného kruhu, elipsy a různě prohnuté tyčky. Teprve později bylo prokázáno, že proteinem tvořícím tyto útvary je enzym IMPDH2, který je ve velkém množství exprimován hlavně v proliferujících, diferencujících se nebo neoplastických buňkách (Natsumeda et al., 1990; Konno et al., 1991).

R&R inkluze byly po inhibici nalezeny u všech dosud zkoumaných imortalizovaných buněčných linií (Hep2, HeLa, CAL27, HCT116, THP-1 a 3T3) nebo primokultur (myší primární kardiomyocyty) (Carcamo et al., 2011). Dále jsou R&R inkluze přítomné také u embryonálních kmenových buněk a to i bez jakéhokoliv ovlivnění. Navíc je možné je pozorovat u většiny buněčných linií v době bezprostředně po rozmrazení buněk z tekutého dusíku (Carcamo et al., 2011).

Co se týká R&R inkluzí a jejich vztahu k jiným buněčným strukturám, dosud nebyla nalezena žádná kolokalizace mezi R&R inkluzemi a nějakou cytoplazmatickou strukturou, jako např. Golgiho aparát, centrozomy, GW tělíška nebo primární cilie (Carcamo et al., 2011). Protože R&R inkluze představují velké buněčné struktury vláknitého charakteru, byl zkoumán také jejich vztah k cytoskeletálním proteinům. Bylo však zjištěno, že R&R inkluze neobsahují ani aktin, tubulin nebo vimentin. Předpokládá se tedy, že R&R představují nové buněčné inkluze (Carcamo et al., 2011). Protože se mohou vyskytovat i spontánně, tj. bez inhibice IMPDH proteinu, předpokládáme, že jejich vytváření má nějakou fyziologickou, pravděpodobně regulační funkci. Jejich funkce však není dosud známa.

2. Cíle práce

Cílem této dizertační práce bylo rozšířit naše znalosti o morfologii buněčného jádra a jeho subkompartmentech za využití moderních metod světelné a transmisní elektronové mikroskopie a korelačních technik. Konkrétně jsme se zabývali třemi různými jadernými subkompartmenty: místy replikace DNA a vztahu MCM proteinů k tomuto subkompartmentu, dále Polycomb tělísky a jejich strukturní podstatou a konečně inkluzemi tvořenými IMPDH2 proteinem.

Cíle:

- Prokázat přítomnost MCM proteinů v místech replikace, a tak přispět k vysvětlení tzv. MCM paradoxu
- Popsat ultrastrukturu Polycomb tělísek
- Zjistit, zda je strukturní podstata Polycomb tělísek proteinové nebo chromatinové povahy
- Detailně charakterizovat R&R inkluze tvořené IMPDH2 proteinem po jeho inhibici a popsat dynamiku jejich tvorby
- Popsat ultrastrukturu nově objevené jaderné IMPDH2 inkluze a porovnat ji s cytoplazmatickými R&R inkluzemi

3. Materiál a metody

3.1. Buněčné kultury, kultivace buněk

V tabulce (Tab. 1) jsou vyjmenovány buněčné linie použité při řešení této práce:

Tabulka č. 1: Přehled použitých buněčných linií a příslušných kultivačních medií

U-2 OS - lidská linie odvozená z osteosarkomu; G+ médium.

HeLa - lidská linie odvozená z karcinomu děložního krčku; G+ médium.

Hep G2 - lidská linie odvozená z hepatokarcinomu, G+ médium

Hep2 - buněčná linie odvozená od HeLa. Více detailů lze nalézt v (Chen, 1988; Lacroix, 2008); G- médium.

NIH 3T3 - myší buněčná linie odvozená z embryonálních fibroblastů, G- médium

MH-22A - myší buněčná linie odvozená z hepatokarcinomu, G+ médium

Všechny výše uvedené buněčné linie byly pěstovány v médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) se dvěma různými koncentracemi glukózy (vyznačeno u každé buněčné linie): médium se sníženou koncentrací glukózy (G-, koncentrace glukózy 1 g/l) a médium s běžnou koncentrací glukózy (G+, koncentrace glukózy 4,5 g/l, obě GIBCO, Life Technologies, Praha, Česká Republika). Ostatní složení obou medií bylo shodné. Médium bylo obohaceno o fetální hovězí sérum (GIBCO) ve výsledné koncentraci 10% a o antibiotika penicilin/streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Rakousko) v koncentraci 1:100 (1%).

Buňky byly pěstovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře obsahující 5% CO₂. Každý třetí den byly pasážovány do nové kultivační lahve (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) po uvolnění 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (T4049, Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika).

3.2. Příprava buněk pro světelnou mikroskopii

Buňky byly pěstovány na kulatém mikroskopickém krycím sklíčku o průměru 12 mm po dobu 1-3 dny. Pokud experiment zahrnoval působení chemických látek, pak o ně bylo médium obohaceno v uvedeném intervalu před fixací buněk (pro konkrétní látky popsáno níže, Kap. 3.3). Poté byly buňky fixovány 2-4% formaldehydem (FA) v PBS (phosphate buffered saline) po dobu 10 min. Po několikanásobném opláchnutí v PBS následovala permeabilizace pomocí 0,3 % roztoku Triton-X 100 v PBS 10 min. Takto připravená sklíčka byla imunofluorescenčně značena, případně jinak barvena.

3.2.1. Extrakce buněk pomocí CSK pufru

V pokusech s extrakcí nenavázaných či slabě vázaných buněčných komponent byly živé buňky extrahovány pomocí CSK pufru (10mM Pipes KOH, pH 7.0, 100mM NaCl, 300mM sacharóza, 3mM MgCl₂) (Fey et al., 1986) po dobu 5 min před fixací. Poté byly buňky fixovány 2 % PFA v CSK pufru. Před imunoznačením již buňky nebyly permeabilizovány.

3.3. Ovlivňování buněk před fixací

3.3.1. Kultivace buněk v hypertonickém médiu

Normální kultivační médium (~290 mOsmol) bylo upraveno přidáním sacharózy, sorbitolu nebo NaCl na hypertonický roztok s dvojnásobnou osmolaritou (~580 mOsmol). Buňky byly následně pěstovány v takto upraveném médiu po dobu uvedenou níže a poté ihned fixovány 4 % formaldehydem v PBS. V případě experimentů dokumentujících reverzibilitu bylo hypertonické médium opět nahrazeno běžným kultivačním médiem s normální tonicitou.

3.3.2. Kultivace buněk v hypotonickém médiu

Živé buňky byly po dobu 20 minut vystaveny působení hypotonického roztoku sestávajícího z 0,075 mM KCl v 12 mM fosfátovém pufru (Na_2HPO_4 a KH_2PO_4) nebo 2x ředěnému normálnímu médiu. Po 20 minutách byly buňky fixovány 4% FA v PBS.

3.3.3. Inhibice IMPDH specifickými inhibitory, Indukování R&R inkluzí

Tvorba R&R inkluzí byla vyvolána specifickými inhibitory IMPDH proteinů, jako je ribavirin (R9644) a kyselina mykofenolová (M5255, oba inhibitory byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich). Inhibitory byly přidány do média v množství odpovídajícímu cílové koncentraci uvedené v kapitole Výsledky. V takto připraveném médiu byly buňky pěstovány až do jejich zafixování.

3.4. Imunofluorescenční značení

Před imunofluorescenčním značením byla v buňkách zablokována místa pro nespecifickou vazbu protilátek a to dvěma základními postupy. Permeabilizované buňky byly inkubovány v PBS obsahujícím hovězí sérový albumin (BSA, bovine serum albumin; Sigma-Aldrich) v koncentraci 1,2% nebo BSA spolu s 5% normálním kozím sérem (NGS, normal goat serum; Sigma-Aldrich), případně v kombinaci s 0,1% roztokem Tween-20 (Sigma-Aldrich). Poté bylo krycí sklíčko s buňkami inkubováno jednu hodinu v roztoku primární protilátky (protilátek) obsahujícím 1-1,2% BSA a případně 0,1-0,5% Tween-20. Výčet primárních protilátek použitých v této práci je uveden v tab. 2. Po inkubaci s primární protilátkou byla sklíčka opakovaně promyta roztokem PBS (minimálně 3x5 min). Následně byl vzorek inkubován jednu hodinu (případně 45 minut) v roztoku PBS obsahujícím odpovídající ředěnou sekundární protilátku (Jackson ImmunoResearch Laboratories,

Název / Antigen	Host	Výrobce / Zdroj	Kat. číslo / Publikace
Aktin	Myší monoklonální	AbCam	ab3280
Bmi-1	Myší monoklonální	Merck – Millipore	05-637
BrdU	Myší monoklonální	Sigma	B8434
CBX 4	Myší monoklonální	Merck – Millipore	MAB11012
CBX 8	Králičí	Merck – Millipore	09-031
DNA	Myší monoklonální	Progen	AC-30-10
Fibrillarin	Králičí	AbCam	ab5821
GFP	Králičí	AbCam	ab290
GFP	Králičí	AbCam	ab6556
Histone H4Ac	Králičí	Millipore	06-866
IMPDH2	Králičí	Proteintech	12948-1-AP
IMPDH2 sérum	Lidská	Andrade, Luis Eduardo C.	(Keppeke et al., 2012)
MCM2 (BM28)	Myší monoklonální	BD TransductionLaboratories	610700
MCM3	Králičí	Rolf Knippers	(Burkhart et al., 1995)
MCM7	Králičí	Rolf Knippers	(Burkhart et al., 1995)
Mouse IgG1, kappa	Myší monoklonální	AbCam	ab18443
Ring1a	Králičí	AbCam	ab32807

Tabulka č. 1: Seznam použitých primárních protilátek

Suffolk, UK). Po sekundární protilátce byla sklíčka opět několikrát promyta v PBS a vzorky byly barveny fluorescenčními barvičkami (viz kap. 3.6) nebo přímo zamontovány do zalévacího média na podložní sklíčka (viz kap. 3.8.1).

3.4.1. Imunofluorescenční značení DNA

V případě imunoznačení protilátkou proti DNA (myší monoklonální protilátka anti-DNA, Progen) byl protokol shodný s protokolem uvedeným výše, pouze v kroku permeabilizace buněk byl použit roztok Tritonu X-100 o vyšší koncentraci, tj. mezi 0,3-2 %. Použití vyšší permeabilizace buněk bylo použito k docílení dobrého pronikání protilátky do denzních chromatinových struktur. Postupným zvyšováním koncentrace Tritonu X-100 bylo

zjištěno, že pro dobré pronikání protilátky do permeabilizované buňky je optimální koncentrace 2 % po dobu 5 minut.

3.5. Značení replikace a transkripce

3.5.1. Značení replikace DNA

Replikace byla značena pomocí Click iT Alexa 647 EdU Imaging Kit (Invitrogen, Molecular Probes). EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), analog tymidinu, byl přidán do média na 10-20 min ve finální koncentraci 10 μ M. Následně byly buňky krátce promyty v PBS a okamžitě fixovány nebo extrahovány před fixací. Po fixaci bylo provedeno imunoznačení tak, jak je popsáno výše. Po sekundární protilátce byl navázaný EdU vizualizován konjugační reakcí podle instrukcí výrobce kitu. Po vymytí nenavázaných reagensů byla sklíčka barvena DAPI podle standardním protokolu.

V „chase“ experimentu byly buňky po 10 minutovém pulzu 10 μ M EdU inkubovány v běžném médiu po dobu 90 min. Až poté byly fixovány.

3.5.2. Značení transkripce

RNA transkripce byla sledována pomocí inkorporace 5'-fluorouridinu (5-FU, Sigma-Aldrich). Do média byl přidán 5-FU 15 minut před fixací. Takto označené transkripty byly poté imunoznačeny protilátkou proti BrdU, která je známa svojí zkříženou reaktivitou s 5-FU (Tab. 2) a umožňuje tedy provedení tohoto imunoznačení.

3.5.3. Kontroly imunoznačení

3.5.3.1. Vynechání primární protilátky

U všech experimentů používajících imunoznačení pomocí protilátky jsme vždy provedli negativní kontrolu spočívající ve vynechání primární protilátky. Všechny kroky

imunoznačení jsou při této kontrole shodné jako ve vlastním experimentu, pouze v kroku primární protilátky je tato vynechána a místo ní je aplikován pouze roztok, ve kterém je normálně protilátka ředěna.

Takto provedený experiment slouží jako kontrola hned v několika aspektech. V první řadě slouží ke kontrole nespecifických vazeb sekundární protilátky. Každá protilátka se může vázat nespecificky na podobné epitopy nebo na základě nespecifických elektrochemických interakcí. Kontrola pak slouží k určení síly signálu pozadí tvořeného nespecificky navázanou sekundární protilátkou. Virtuálně, odečtením tohoto signálu od signálu z vlastního experimentu dostaneme sílu reálného signálu pocházejícího ze specificky navázané primární protilátky. V ideálním případě by pozadí mělo být nulové. V reálných experimentech nulového pozadí nelze dosáhnout, lze jej však často snížit zabráněním nespecifické vazby protilátky pomocí blokování různými proteiny (BSA, rybí želatina apod.) nebo jinými protilátkami, které však nereagují s žádným antigenem nacházejícím se v buňce a/nebo nemohou být detekovány použitou sekundární protilátkou (NGS, odtučněné mléko, apod.). A právě dostatečnost tohoto blokování (koncentrace, čas) je také sledována kontrolou s vynecháním primární protilátky. Protože se podmínky liší experiment od experimentu (přesný čas jednotlivých kroků, přesná koncentrace a pH všech použitých roztoků, teplota v místnosti, apod.) byla výše uvedená kontrola prováděna prakticky u všech imunodetekčních experimentů.

3.5.3.2. Kontrola pomocí protilátky stejného izotypu

V experimentech s MCM proteiny, kde byl nasnímaný fluorescenční obraz intenzivně analyzován kros-korelační funkcí (CCF, viz dále, kap 3.7) jsme provedli mimo kontroly s vynecháním primární protilátky také kontrolu pomocí protilátky stejného izotypu

(isotype control antibody). V experimentu byla primární protilátka nahrazena jinou protilátkou stejného izotypu (v tomto případě IgG1, ab18443, AbCam), u které je však prokázáno, že nereaguje s žádným antigenem nacházejícím se v lidských buňkách. Signál získaný pomocí této protilátky byl následně analyzován shodným způsobem jako signál získaný pomocí protilátky proti MCM2 proteinu. Na rozdíl od této protilátky, signál získaný při kontrole nevykazoval žádný pozitivní vrchol CCF křivky (viz kap. 3.7).

3.6. Fluorescenční barvení

3.6.1. DAPI barvení

Ve většině vzorků byla barvena DNA pomocí DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol; Sigma-Aldrich). Promyté vzorky po sekundární protilátce byly umístěny na roztok DAPI v PBS na dobu od 5 do 10 minut. Poté byly buňky několikrát promyty pomocí PBS, 2x v destilované vodě a zality do zalévacího média. V experimentech, ve kterých DAPI barvení sloužilo pouze k lokalizaci buněčných jader bez nutnosti podrobné analýzy signálu bylo DAPI barvení provedeno použitím zalévacího média Mowiol obsahujícího DAPI a barvení DNA tedy proběhlo současně se zalitím.

3.6.1.1. DA/DAPI barvení

DA/DAPI barvení bylo prováděno v principu obdobným způsobem jako samotné DAPI barvení s tím rozdílem, že vlastnímu DAPI předcházela inkubace s distamycinem A - HCl (Chemos, Regenstauf, Německo). Distamycin A – HCl je látka vázající se, podobně jako DAPI, do malého žlábků na DNA. Výsledné barvení se liší od barvení samotným DAPI (diskutováno v kap. 5.2). Místo PBS pufru jsme použili McIlvainův pufr o pH 7,0 (protokol je adaptován z publikace Schweizer and Ambros, 1994).

Nejdříve byly buňky vystaveny na 15 minut roztoku distamycinu A-HCl o koncentraci 0,2 mg/ml rozpuštěném v McIlvainovu pufru o pH 7. Poté byly buňky promyty v McIlvainově pufru a barveny pomocí DAPI o koncentraci 0,2 µg/ml po dobu 15 min a opět promyty čistým pufrém. Po promytí destilovanou vodou byly buňky zality do zalévacího média.

3.6.2. Barvení DNA pomocí DRAQ5

Živé buňky byly po dobu 30 minut vystaveny médiu obsahujícímu fluorescenční DNA barvičku DRAQ5 (Biostatus Limited, Leicestershire, Velká Británie) v koncentraci 1:1000 tj. ve finální koncentraci 5 µM. Poté byly promyty PBS a ihned fixovány 4 % formaldehydem.

3.7. Obrazová analýza – kros-korelační funkce

Kros-korelační funkce (cross-correlation function, CCF, van Steensel et al., 1996) byla vypočtena jako Pearsonův korelační koeficient (Pearson's correlation coefficient) podle vzorce: $\text{cov}(R(\Delta x), G) / (\text{var}(R(\Delta x)) \cdot \text{var}(G))$, kde R a G odpovídají intenzitám pixelů v zeleném a červeném kanále, zatímco proměnlivý horizontální posun byl aplikován na červený kanál. Výpočet byl proveden pomocí softwaru Matlab (The Math Works, Natick, USA).

Korelační koeficient může nabývat hodnot mezi -1 až +1. Hodnoty vyšší než 0 vypovídají o korelaci/kolokalizaci obou sledovaných signálů, hodnoty kolem 0 o náhodném rozdělení sledovaných signálů. Hodnoty pod 0 pak vypovídají o „anti-kolokalizaci“ sledovaných signálů, tj. pokud se v dané oblasti nachází jeden signál, druhý signál se zde nenachází. Čím vyšší/nížší je hodnota CCF (s maximem 1/minimem -1), tím vyšší je kolokalizace/anti-kolokalizace zkoumaných signálů.

3.8. Světelná mikroskopie

3.8.1. Zalévání vzorku

Po skončení imunoznačení nebo barvení (končícího zpravidla v roztoku PBS pufru) byly vzorky 2x promyty destilovanou vodou. Sklíčka byla poté montována na podložní sklíčko pomocí Mowiolu (Sigma-Aldrich) obsahujícího DABCO (Sigma-Aldrich) nebo zalévacího média ProLong (ProLong® Antifade, LifeTechnologies).

3.8.2. Světelné mikroskopy

Vzorky byly pozorovány a snímány převážně na konfokálním mikroskopu Leica SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo) vybaveném olejovým objektivem 63x PlanApochromat/1.4 NA a 40x/1,25 NA. Fluorescenční signál byl excitován lasery: 405 nm diodový laser; 488 nm argonový laser; 561 nm DPSS laser a 633 nm HeNe laser. Jednotlivé signály byly vždy snímány pomocí sekvenčního snímání jednotlivých kanálů, aby bylo v maximální možné míře zabráněno propagaci signálů mezi jednotlivými kanály.

Dále byly vzorky snímány na konfokálním mikroskopu s rotujícím diskem (spinning disc microscope) postaveném na Olympus IX83 mikroskopu a vybaveném 100x/1,4NA imerzním olejovým objektivem (Olympus, Tokio, Japonsko), CSU-X spinning disk jednotkou (Yokogawa, Tokio, Japonsko) a kamerou Ixon Ultra EMCCD (Andor).

Pro pozorování živých buněk byly oba uvedené mikroskopy vybaveny zabudovanými inkubátory (Leica, respektive Okolab).

V této práci byl také využit epifluorescenční mikroskop Olympus AX 70 Provis (Olympus), vybavený suchými objektivy 10x, 20x a 40x a imerzním objektivem 60x a 100x PlanApochromat.

3.9. Elektronová mikroskopie

3.9.1. Chemická fixace, pre-embedding

Buňky narostlé na 12 mm kulatém krycím sklíčku byly fixovány 15 minut 2 % formaldehydem v 0,2 M PIPES, pH 7,2, připraveným bezprostředně před použitím z paraformaldehydu. Fixované buňky byly permeabilizovány 0,1-0,2 % Tritonem X-100 v PBS po dobu 10 min. Po důkladném promytí v PBS byla možná nespecifická vazebná místa protilátky blokována 5% roztokem NGS v PBS po dobu 30 min. Po hodinové inkubaci s primární protilátkou a promytí v PBS následovala hodinová inkubace s odpovídající sekundární protilátkou s navázaným nanozlatem o velikosti 0,8 nm (Nanogold, Aurion, Wageningen, The Netherlands) v 1% roztoku BSA v PBS. Po několikanásobném promytí v PBS byly vzorky postfixovány 2,5% glutaraldehydem v PBS, následovaném důkladným promytím ultračistou vodou. Poté byly nanočástice zlata impregnovány stříbřením inkubací buněk se Silver enhancement reagent (R-GENT SE-EM, Aurion) po dobu 23-30 min podle protokolu výrobce. Tímto postupem byly původní, pro svoji malou velikost nedetekovatelné zlaté částice změněny na větší (~6-12nm velké) stříbrné částice. Poté byly buňky několikrát promyty ve vodě, dehydratovány ve zvyšující se koncentraci etanolu (30%, 50%, 70%, 90% a 100%) a prosyceny pryskyřicí Araldite/Embed 812 (Epon 812, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). Veškeré předcházející kroky byly prováděny při pokojové teplotě. Polymerizace pryskyřicí prosycených vzorků probíhala v peci při 60°C po dobu 3 dnů. Po odstranění sklíčka byl povrch ztvrdlých bločků zredukován na velikost menší než 1x1 mm ručním ořezáním pomocí žiletky a vzorky byly poté krájeny na ultramikrotomu Leica Ultracut S (Leica) na řezy o tloušťce přibližně 70 nm na diamantovém noži (Diatom, Biel, Švýcarsko). Ultratenké řezy byly umístěny na 3 mm niklové nebo měděné

elektronmikroskopické sítky typu slot (s otvorem 2x1 mm) nebo typu mřížka. V obou případech byly sítky potažené vrstvou formvaru a pouhlikovány.

3.9.1.1. Preembedding buněk extrahovaných před fixací

Celá procedura od kroku blokování před primární protilátkou byla provedena jako v kap. 3.9.1. Postup se lišil pouze v krocích fixace a permeabilizace, které po sobě následovaly prakticky v opačném pořadí.

Buňky nebyly přímo fixovány, ale nejdříve byly volné buněčné komponenty extrahovány pomocí CSK pufru s obsahem Tritonu-100 o konečné koncentraci 0,1% (viz imunofluorescenční značení, Kap. 3.2.1) po dobu 10 minut. Teprve poté byly buňky fixovány 30 minut 2 % formaldehydem v CSK pufru. Takto připravené buňky byly již dostatečně permeabilizovány a bylo možno přímo přistoupit k imunoznačení.

3.9.2. Fyzikální fixace, mrazová substitute

Pro mrazovou fyzikální fixaci byla použita metoda zmrazení za vysokého tlaku (high pressure freezing, HPF) s následnou mrazovou substitucí (freeze substitution, FS). Tato metoda představuje v současnosti nejvhodnější kompromis pro zachování ultrastruktury a zároveň antigenicity vzorku v elektronové mikroskopii.

Zmrazení za vysokého tlaku bylo prováděno pomocí přístroje EM PACT 2 high pressure freezer (Leica) vybaveného systémem pro rychlé vkládání vzorku (rapid transfer system, Leica EM RTS). Následná mrazová substitute byla prováděna v substitučním přístroji Leica freeze substitution apparatus (Leica EM AFS2) vybaveném robotickým systémem (Leica EM FSP), který umožňuje automatizované výměny substitučních a zalévacích médií.

Pro zmrazení za vysokého tlaku byly použity buňky narostlé na kulatých safírových sklíčkách o průměru 1,4 mm (Leica) nebo buňky v suspenzi, které byly získány seškrábáním buněk z povrchu kultivační nádoby sterilní škrabkou (firma TPP) nebo jejich uvolněním trypsinem (Sigma-Aldrich). Materiál byl zamrazen na měděných membránových nosičích firmy Leica (membrane carrier). Ty byly umístěny do držáku a po naplnění zamrazovaným materiálem zamrazeny za použití rapid transfer systému. Těsně před umístěním do nosiče byly vzorky promyty v 20% roztoku BSA (frakce V, Sigma) v kultivačním médiu nezávislém na CO₂ (CO₂ independent medium, GIBCO, Invitrogen) s přidavkem 10 % fetálního hovězího séra (FBS, GIBCO, Invitrogen). Vzniklý roztok slouží jako kryoprotektant a částečně zabraňuje poškození buněk během zmrazení tím, že brání tvorbě velkých ledových krystalů.

Zmrazené vzorky byly přeneseny v tekutém dusíku do přístroje pro mrazovou substituci, kde byly vloženy do substitučního roztoku předchlazeného na -90°C. Substituční roztok obsahoval bezvodý aceton a 0,1 % uranyl acetátu, který byl přidán jako 10 % roztok v metanolu. Mrazová substituce probíhala při -90°C po dobu 48h. Poté začala být teplota zvyšována z -90°C na -50°C rychlostí 5°C za hodinu. Při -50°C pokračovala substituce dalších 24h. Poté byly vzorky promyty čistým acetonem o teplotě -50°C a prosyceny pryskyřicí Lowicryl HM20 monostep (Electron Microscopy Sciences) ve zvyšující se koncentraci HM20 v acetonu. Proces prosycení pryskyřicí probíhal při teplotě -50°C a to podle následujícího schématu: 2h v 25% HM20, 3h v 50% HM20, 3h v 75% HM20 a 4 a 8h ve 100% HM20. Lowicryl byl před použitím 5 minut probubláván plynným dusíkem pro odstranění kyslíku, který by mohl narušit proces polymerizace. Během všech předcházejících kroků byl roztok pravidelně promícháván.

Po prosycení 100% pryskyřicí byla zahájena polymerizace vzorků UV světlem. Polymerizace probíhala při -50°C po dobu 26h. Poté byly vzorky po dobu 14 h převáděny

na teplotu 20°C, tj. 5°C za 1 h, za stálého ozařování UV světlem, které pokračovalo ještě 24h po dosažení 20°C ke konečnému vytvrzení bločků.

Po polymerizaci byly bločky vyřezány pomocí žiletky z plastové zalévací nádoby. Jednotlivé bločky byly zbaveny měděného nosiče ponořením do tekutého dusíku s následným odstraněním nosiče žiletkou. U vzorků, u kterých bylo použito safírové sklíčko, bylo sklíčko odstraněno opakováním stejného postupu jako v případě měděného nosiče. Takto připravené bločky byly krájeny na ultramikrotomu nejčastěji na řezy silné přibližně 70 nm. V případě vzorků určených pro tomografii byly připraveny 200-240 nm silné řezy.

3.10. Imunozačnění vzorků pro elektronovou mikroskopii

Ultratenké řezy umístěné na elektronmikroskopických sítkách byly značeny na kapkách obsahujících příslušné roztoky. Stejným způsobem byly i promývány.

Nejprve byly umístěny na blokující roztok obsahující 5 % NGS v PBS následovaný roztokem primární protilátky v PBS, 1-2% BSA a 0,5 % Tween 20 po dobu jedné hodiny. Po několikanásobném vmytí PBS pufrem byly vzorky znovu krátce blokovány v NGS v PBS a na 45 minut položeny na roztok sekundární protilátky (v 1% BSA v PBS) v komplexu s koloidním zlatem (Aurion). Imunokomplexy nesly zlaté kuličky o průměru 10 nebo 15 nm. Po promytí vzorků v PBS a v destilované vodě byly vzorky usušeny a připraveny k mikroskopii nebo ke kontrastování solemi těžkých kovů.

3.11. Korelační světelná a elektronová mikroskopie (CLEM)

Jako korelační světelná a elektronová mikroskopie (correlative light and electron microscopy, CLEM) je označována technika nebo kombinace technik, které v konečném důsledku vedou k zobrazení shodného místa vzorku jak ve světelné, tak elektronové mikroskopii. Existuje celá řada CLEM technik, od jednoduchých až po velmi komplikované

metody. V naší práci jsme použili hned několik různých postupů korelační světelné a elektronové mikroskopie.

3.11.1. CLEM na řezech

Řezy umístěné na elektronmikroskopických sítkách typu slot nebo sítkách opatřených lokalizační mřížkou s koordinátami byly nejdříve na 20 minut vystaveny blokujícímu roztoku sestávajícímu z 5 % normálního kozího nebo oslího séra (NGS, NDS, podle typu použité sekundární protilátky). Poté byly inkubovány jednu hodinu s roztokem primární protilátky obsahujícím 1-2% BSA a 0,2% Tween-20 (obě chemikálie ze Sigma-Aldrich). Po důkladném několikanásobném promytí byly řezy vystaveny sekundárním protilátkám s navázaným koloidním zlatem a fluorochromem nebo pouze s fluorochromem. Po promytí byly řezy usušeny a pozorovány nejdříve na fluorescenčním mikroskopu Olympus AX 70 Provis. Po fluorescenční lokalizaci námi hledaných objektů a zmapování okolí buněk tak, aby se nám následně podařilo najít stejnou oblast v elektronovém mikroskopu za pomoci lokalizační mřížky nebo výrazných orientačních bodů, skladů řezu nebo jiných markantů jsme zobrazili hledané objekty při různých zvětšeních.

3.11.2. CLEM - Preembedding

Korelační světelná a elektronová mikroskopie využívající ve své elektronmikroskopické části metodu značení před zalitím (preembedding) umožňuje korelaci fluorescenčního a elektronmikroskopického obrazu několika způsoby. Jedním z nich je nasnímání signálu fluorescenčního proteinu jako je GFP, fúzovaného s proteinem našeho zájmu, v živých nebo fixovaných buňkách narostlých na lokalizačním sklíčku a následné klasické imunoznačení pouze pro elektronovou mikroskopii (Kap. 3.9.1). Druhou

možností je použití sekundární protilátky značené jak fluorescenčně, tak zlatem. V tomto případě je fluorescenční signál snímán před krokem zvětšení zlatých částic stříbřením.

Při zkoumání ultrastruktury Polycomb tělísek metodou preembedding jsme použili následující postup: nejdříve jsme Polycomb tělíška lokalizovali *in vivo* v linii U-2 OS buněk stabilně exprimujících BMI1-GFP fúzní protein. Živé buňky, narostlé na lokalizačním sklíčku, byly pozorovány konfokálním mikroskopem Leica SP5 za použití 40x/1,25 NA olejového imerzního objektivu a byly nasnímány soubory Z řezů při velkém zvětšení. Následně byly buňky zafixovány a připraveny pro elektronovou mikroskopii jak je popsáno výše a v kap. 3.9.1.

Po vytvrzení bločků byla odstraněna sklíčka s lokalizační mřížkou ponořením do tekutého dusíku. Po odstranění sklíčka zůstala lokalizační mřížka otisknuta do povrchu bločku. Díky otisku mřížky bylo možno nalézt buňky našeho zájmu v binokulárním mikroskopu, který je součástí ultramikrotomu. Žiletkou byla zredukována horní plocha bločku na velikost 1x1 mm. Vzorek byl následně nakrájen na ultratenké řezy o síle přibližně 70 nm na diamantovém noži (Diatom). Řezy byly umístěny na elektronmikroskopické síťky typu slot a kontrastovány (viz kap. 3.12). Na takto připravených řezech byla lokalizována oblast zájmu a nasnímány elektronogramy při různém zvětšení.

3.11.3. CLEM - Fyzikální fixace pomocí HPF následovaná FS

Tato metoda spočívá v použití speciální molybdenové lokalizační mřížky (1,48 mm, Leica) umístěné nad safírové sklíčko s narostlými buňkami. Sklíčko i mřížka jsou umístěny do speciálního nosiče s otvorem 1,5 mm x 140 μ m, (Leica), který zároveň slouží jako platforma pro zamrazení vzorku v HPF přístroji. Sestava nosič-sklíčko-mřížka se nazývá „sendvič“.

Sendvič byl umístěn do konfokálního mikroskopu vybaveného glycerolovým objektivem NA 1,4 s velkou ohniskovou vzdáleností (Leica). Mikroskopem byly nasnímány soubory Z řezů vybraných buněk. Ty byly lokalizovány pomocí mřížky. Poté byly vzorky zmrazeny za vysokého tlaku a dále zpracovány jako běžné HPF vzorky (viz kap. 3.9.2). Rozdíl oproti konvenčním vzorkům je, že po odstranění safírového sklíčka ze ztvrdlého bločku zůstává lokalizační mřížka uvězněna v hloubce bločku a umožňuje opětovně lokalizovat vybrané buňky. Na rozdíl od mřížky otištěné na povrchu vzorku při CLEM spojeném s chemickou fixací, mřížka zalitá do hloubky vzorku částečně perspektivně zkresluje celkový obraz. Zároveň se v její blízkosti silně láme světlo a v kombinaci s měděným držákem vznikají práci ztěžující světelné odrazy. Mřížka tedy představuje pouze nepřesné vodítko k hledání buněk našeho zájmu. Tímto způsobem lze tedy korelovat malé skupiny buněk nebo buňky vykazující výrazné morfologické znaky. Rozmístění jednotlivých (nepočtených) buněk nebo jejich tvarová odlišnost nám, kromě vlastní lokalizační mřížky, poskytuje další vodítko ke korelaci. Námí použitý postup byl adaptován z práce (Verkade, 2008).

3.11.4. Korelace na světelné úrovni

Jedná se o velice důležitou metodu, umožňující porovnat dva odpovídající si světelné signály, které jsou od sebe odděleny časově, každý ze signálů byl získán jinou metodou a/nebo na jiném přístroji. Tato metoda má mnoho společných prvků s metodami CLEM. V první řadě je k úspěšné korelaci signálů důležitá schopnost opakovaně lokalizovat stejné místo vzorku na stejném nebo jiném mikroskopu. To je umožněno použitím různých lokalizačních prostředků, v našem případě krycího sklíčka nebo Petriho misky s lokalizační mřížkou. Z biologického hlediska je v případě korelace dvou fluorescenčních signálů důležitá skutečnost, že tato korelace se odehrává na úrovni konkrétní buňky. Nejde tedy

o obecné porovnávání trendů ve vývoji mikroskopického obrazu v čase nebo po ovlivnění, případně o jejich statistické zhodnocení. Jde o stanovení korelace konkrétních obrazů v konkrétní buňce.

3.11.4.1. Korelace GFP signálu s imunofluorescenčním signálem

Pro porovnání fluorescenčního signálu fúzního proteinu s GFP se signálem poskytovaným protilátkou při imunofluorescenčním značení jsme provedli korelační experiment na buňkách pěstovaných na Petriho misce se skleněným dnem opatřeným mřížkou (MatTek Corporation, Ashland, USA). To nám mimo jiné umožnilo sledovat BMI1-GFP signál jak v živých, tak ve fixovaných buňkách imunoznačených proti BMI1 a GFP proteinu. Pomocí korelace těchto tří signálů jsme ukázali, že BMI1-GFP signál odpovídá signálu získanému pomocí jedné nebo druhé protilátky. Vlastní postup korelační mikroskopie byl následující: U-2 OS buňky, stabilně exprimující fúzní protein BMI1-GFP, pěstované na Petriho misce se skleněným dnem s lokalizační mřížkou byly nasnímány živé konfokálním mikroskopem Leica SP5 vybaveným inkubační komorou při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Buňky byly následně zafixovány a imunofluorescenčně značeny podle standardního protokolu (Kap. 3.4). Po zalití buněk do zalévacího média byly stejné buňky znovu snímány ve 3D pomocí konfokálního mikroskopu.

3.12. Kontrastování vzorků pro EM

Ultratenké řezy byly umístěny na elektronmikroskopickou síťku a vysušeny. Následně byla síťka položena na kapku vodného roztoku uranyl acetátu o koncentraci 3 % po dobu 5-10 minut v komůrce zamezující přístupu světla. Řezy byly ve tmě promyty v destilované vodě 3x5 minut a inkubovány 2-3 minuty v roztoku citrátu olova (Reynold's Lead Citrate) v atmosféře se sníženým obsahem CO₂, která byla dosažena přítomností

pevného NaOH v komůrce, a opět promyty 3x5 minut v destilované, převařené a před okolní atmosférou chráněné vodě.

Roztok uranyl acetátu byl vytvořen jednoduchým rozpuštěním uranyl acetátu v destilované vodě (3 % w/v). Po půl hodině míchání byl roztok opakovaně přefiltrován přes stříkačkový filtr 0,22 μm .

Reynoldsův roztok byl připraven z dusičnanu olovnatého, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a citrátu sodného, $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$ podle následujícího protokolu: 1,33g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + 1,76g $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$ byl rozpuštěn v necelých 50 ml destilované vody a míchán nejméně půl hodiny. Poté bylo pomalu přidáno 0,8 ml 1N NaOH a vzniklý roztok byl doplněn do celkového objemu 50 ml destilovanou vodou a centrifugován při maximálních otáčkách použité centrifugy (~13 000 g). Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky a uchováván při 4°C. pH výsledného roztoku bylo 12.

3.13. Použité elektronové mikroskopy

V naší práci jsme používali 3 prozařovací elektronové mikroskopy:

1) Zeiss 900 - Carl Zeiss, Jena, Německo, urychlovací napětí 80kV, wolframová katoda, 1K CCD kamera KeenView.

2) Morgagni - FEI, Eindhoven, Nizozemí, urychlovací napětí 100kV, wolframová katoda, 1K CCD kamera Mega View III.

3) Tecnai G2 Sphera - FEI, Eindhoven, Nizozemí, urychlovací napětí 200kV, LaB6 katoda, kamera 2K Gatan Ultrascan 1000 CCD.

3.14. Elektronová tomografie

Elektronová tomografie byla vytvořena ze série snímků získaných otáčením vzorku kolem jedné osy v elektronovém mikroskopu FEI Tecnai G2 Sphera. Projekce byly zaznamenány v rozpětí $\pm 65^\circ$ s krokem 1° . Jednotlivé projekce byly defokuseovány o hodnotu $-2 \mu\text{m}$ při zvětšení 19 000x. Velikost pixelu dosažená v této konfiguraci byla 0,53 nm.

3D rekonstrukce tomografie byla vypočítána metodou vážené zpětné projekce v programu IMOD (Kremer et al., 1996) a post-rekonstrukčně úhlově filtrována (Kovacik et al., 2014) s cílem potlačit artefakty vyplývající z chybějícího úhlu náklonu (missing wedge artefacts).

3.15. Kvantitativní analýza elektronmikroskopického značení

Pro kvantitativní určení intenzity imunoznačení vně nebo uvnitř Polycomb tělíska jsme použili stereologické metody. Přes elektronogram byla digitálně položena mřížka a s její pomocí byla určena plocha, kterou v dané oblasti zaujímá heterochromatin. Následně byly s pomocí stejné mřížky spočítány i zlaté partikule nacházející se na dané

ploše. Toto měření bylo provedeno na celkem šesti Polycomb těliscích. Ze všech měření pak byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

3.16. Western blot

3.16.1. Příprava celobuněčných lyzátů

Téměř konfluentní buňky narostlé v kultivační lahvi nebo na Petriho misce byly promyty PBS. Poté byl přímo na buňky aplikován 2x koncentrovaný Laemmliho vzorkový pufr (Laemmli sample buffer, SB) spolu s inhibitory proteáz (Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-free, Merck-Millipore). V SB došlo k lýze buněk. Získané celobuněčné lyzáty byly několikrát protaženy injekční jehlou o velikosti 27G, zahřáty na 95°C po dobu 3 minut a zchlazeny na ledu. Po změření koncentrace (viz 3.16.3) byly lyzáty buď přímo nanášeny na gel nebo uchovány při -80°C pro pozdější použití.

3.16.2. Příprava cytoplazmatické a jaderné buněčné frakce

Téměř konfluentní buňky byly uvolněny od povrchu kultivační nádoby pomocí 1 mM roztoku EDTA v PBS zchlazeném na 4°C. Uvolněné buňky byly centrifugovány při 2 000g při 4°C po dobu jedné minuty. Buňky byly následně resuspendovány v hypotonickém roztoku sestávajícím z 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0,1mM EDTA, 1 mM DTT (vše Sigma-Aldrich) a inhibitorů proteáz (Merck-Millipore) a po dobu 15 min inkubovány na ledu. Poté byl přidán detergent Igepal-630 (Sigma-Aldrich) do výsledné koncentrace 0,6%. Roztok byl důkladně vortexován a zcentrifugován při 13 000 otáčkách při 4°C po dobu 30 sekund. Vzniklý supernatant představoval cytoplazmatickou frakci. K peletu byl přidán hypotonický roztok a vzorek byl znovu centrifugován. Vzniklý pelet představoval jadernou frakci. Čistota a celistvost jader byla vizuálně zkontrolována světelným mikroskopem s fázovým

kontrastem. Obě frakce, cytoplazmatická a jaderná, byly následně lyzovány pomocí 2x SB a zahřáty na 95°C po dobu 3 min. Další postup byl shodný s postupem popsáním v kap. 3.16.1.

3.16.3. Měření koncentrace proteinů

Pro změření koncentrace proteinů v lyzátech byla použita BCA metoda (Bicinchoninic acid assay, Sigma-Aldrich). Pro kalibraci byly použity roztoky BSA o definované koncentraci (200, 400, 600, 800 a 1000 µg/ml). 5µl měřeného roztoku bylo smícháno se 100 µl směsí kyseliny bicinchoninové (BCA) a síranu měďnatého (CuSO₄, obě chemikálie od Sigma-Aldrich) a inkubováno po dobu 30 minut při 37°C. Poté byly změřeny hodnoty absorbance při vlnové délce 562 nm. Jako kontrolní vzorek sloužila voda přidaná místo vzorku k BCA směsi. K měření (zároveň i k výpočtu kalibrace) byl použit BioPhotometer (Eppendorf, Praha, Česká Republika).

3.16.4. Gelová elektroforéza

Proteinové lyzáty byly naneseny v požadovaném množství na polyakrylamidový gel o koncentraci od 8 do 12% spolu s předem barvenými standardy molekulární hmotnosti (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Pardubice, Česká Republika). Poté byly proteiny rozděleny pomocí elektrického proudu o napětí 100-180 V po dobu 60–90 minut. Putování proteinů různých velikostí bylo kontrolováno průběžně během experimentu pomocí barvených proteinových standardů. Celková doba byla vždy přizpůsobena očekávané velikosti sledovaných proteinů.

Následně byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (Protran, GE Healthcare Life Sciences, Praha, Česká Republika) při napětí 100 V po dobu jedné hodiny.

3.16.5. Imunozačení na nitrocelulózové membráně

Nitrocelulózová membrána s přenesenými proteiny byla přes noc blokována v 5% roztoku odtučněného mléka (non-fat milk, NFM, Bio-Rad, Praha, Česká Republika) v PBST pufru (0,5% Tween 20 v PBS). Poté byla membrána inkubována 1-3h s primární protilátkou v 2,5% roztoku NFM a promyta 3x20min v PBST. Po promytí byla membrána inkubována 1-2 h se sekundární protilátkou s navázanou křenovou peroxidázou v 2,5% roztoku NFM. Následovalo promytí 3x20 min v PBST.

Detekce křenové peroxidázy byla provedena chemiluminiscenčním detekčním kitem (ECL detection kit, Thermo Scientific, Rockford, USA). Reakcí vzniklé záření bylo zachyceno na rentgenové filmy (Foma Bohemia, Hradec Králové, Česká Republika) za použití různých expozičních časů. Filmy pak byly vyvolány klasickým postupem za použití vývojky a ustalovače rentgenových filmů (obě chemikálie od Foma Bohemia, Hradec Králové, Česká Republika).

3.16.6. Digitalizace a analýza dat

Výsledky z Western blotu zachycené na rentgenové filmy byly digitalizovány pomocí skeneru Epson Perfection V700 flatbed scanner (Epson, Suwa, Japonsko). Filmy byly skenovány v průchozím světle s rozlišením minimálně 1200 dpi. Získané výsledky byly analyzovány pomocí softwaru ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

4. Výsledky

V naší práci jsme postupně zkoumali tři jaderné subkompartmenty, přičemž hlavní důraz byl kladen na zjištění jejich morfologie ať v normálních, tak experimentálních podmínkách.

4.1. Asociace MCM proteinů s replikačními oblastmi

4.1.1. Vztah MCM proteinů k replikačním oblastem

Prvním studovaným subkompartmentem bylo místo replikace DNA v HeLa buňkách a vztah MCM proteinů k tomuto subkompartmentu. Na počátku tohoto projektu jsme testovali specifitu protilátek anti-MCM2, 3 a 7 pro imunofluorescenční lokalizaci. Z důvodu omezeného množství králíčích protilátek anti-MCM3 a 7 jsme nebyli schopni provést kompletní sadu experimentů s každou z uvedených protilátek. Proto jsme provedli sérii kolokalizačních experimentů, které ukázaly, že každá z těchto tří protilátek poskytuje shodný mikroskopický obraz (Obr. 8). Pro další experimenty byla proto vybrána protilátka anti-MCM2, která je monoklonální a komerčně dostupná. Výsledky dosažené s touto protilátkou lze vztáhnout na celý hexamer MCM2-7, minimálně však na proteiny MCM2, 3 a 7.

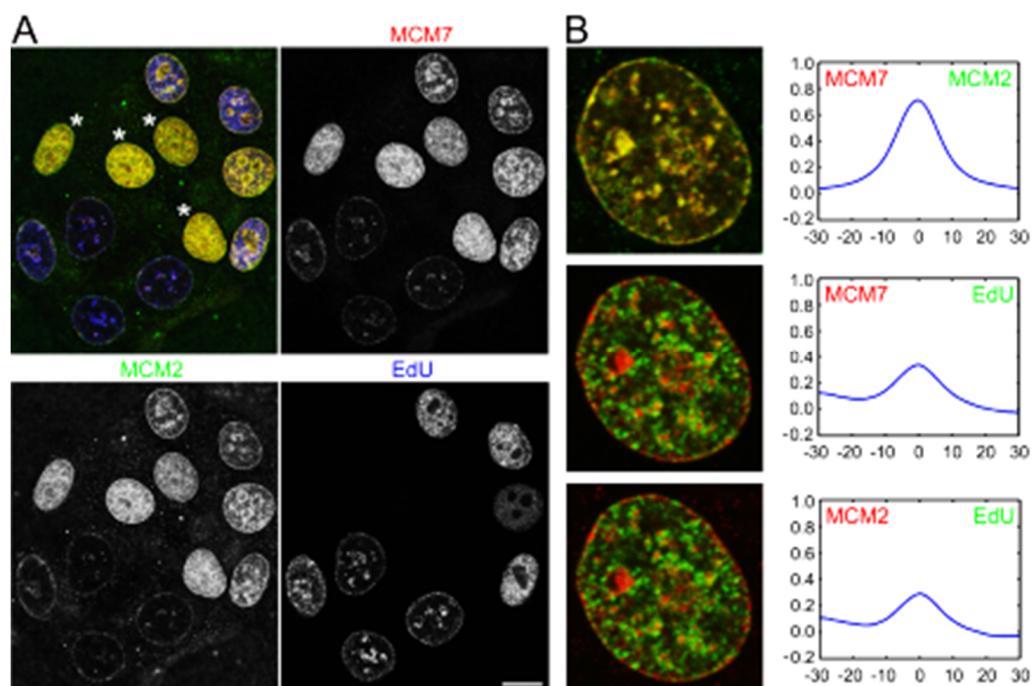
Ve fixovaných a imunozačených HeLa buňkách se MCM2 protein nachází v celém jádře s výjimkou jadérek ve formě rovnoměrně rozptýlených drobných granul (Obr. 9, první řádek). Tento mikroskopický obraz je tvořen jak volným, tak na chromatin vázaným MCM2 proteinem. Ačkoliv se vzájemný poměr obou těchto forem během buněčného cyklu značně mění, celkové množství proteinu zůstává shodné a díky mobilitě nevázané formy se celkový obraz jeví ve všech fázích buněčného cyklu jako stejný (Obr. 9, první řádek). Proto jsme použili postup, který nám umožnil odstranit nevázanou formu MCM2 proteinu. Metoda

je založena na aplikaci detergentu Triton-X-100 spolu se speciálním pufrům. Takzvaný cytoskeletární pufr (CSK) obsahuje jako hlavní osmoticky aktivní složku sacharózu. Sacharóza brání udržováním osmotického tlaku nadměrnému poškození buněčných struktur. Tato metoda se nazývá extrakce před fixací a detailnější postup je uveden v oddílu Materiál a metody (Kap. 3.2.1).

Použití extrakce před fixací nám umožnilo odstranit volnou formu MCM2 proteinu a tak vizualizovat pouze na chromatin pevně navázaný MCM2 protein. V G1 fázi většina buněčného MCM2 proteinu představuje na chromatin vázanou formu. Mikroskopický obraz vázaného MCM2, který je probíhající replikací postupně uvolňován z chromatinu, se významně mění během S-fáze buněčného cyklu. Po kompletním dokončení replikace, v G2 fázi, se veškerý MCM2 protein nachází ve volné formě. K jeho opětovnému navázání na DNA dochází až po proběhnutí mitózy na počátku G1 fáze buněčného cyklu.

Z výše uvedeného důvodu bylo důležité spolu s obrazem MCM2 proteinu zároveň zjišťovat, zda se daná buňka nachází v S fázi a v jakém jejím stádiu. Buňky v S-fázi jsme detekovali pomocí dvacetiminutové inkorporace EdU s jeho následnou vizualizací pomocí fluorescenční próby. Signál získaný pomocí EdU jsme srovnávali se signály MCM proteinů na extrahovaných a fixovaných buňkách. Pro potřeby této studie jsme S-fázi rozdělili do čtyř po sobě jdoucích úseků a to na velmi časnou (very early, VE), časnou (early, E), časnou až střední (early to mid, EM) a střední až pozdní (mid to late, ML). Buňky představující každý z těchto časových úseků S fáze a také buňky v G1 fázi jsou zobrazeny na obr. 10. Jednotlivé fáze byly určeny charakteristickým replikačním obrazem: v G1 fázi není detekovatelný žádný replikační signál; VE S fáze je charakterizována nízkým počtem drobných replikačních oblastí s převažující lokalizací ve středu buněčného jádra; E S fáze je charakterizována velkým počtem malých replikačních oblastí roztroušených napříč celým objemem jádra

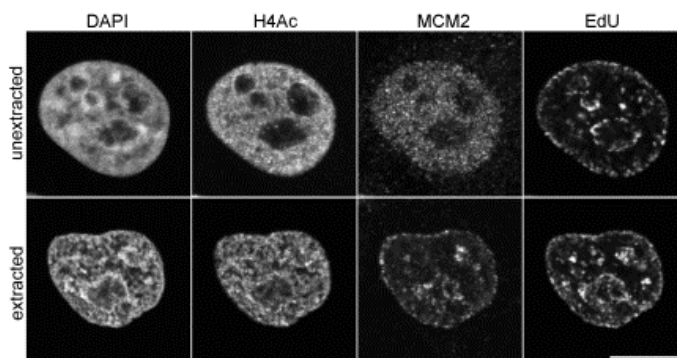
s výjimkou jadérek; EM S fáze je pak charakterizována velkým množstvím malých replikačních oblastí, které se však hlavně v okolí jadérka nebo v blízkosti jaderné membrány shlukují nebo vytvářejí struktury podobné řetízkům; konečně ML S fáze je charakterizována velkými replikačními oblastmi v okolí jadérek a jaderné membrány. V naší práci jsme neanalyzovali buňky v pozdní S fázi, protože signál vázaných MCM proteinů v této fázi buněčného cyklu je velmi slabý až nedetekovatelný.



Obrázek č. 8: Kolokalizace MCM2 a 7 proteinů na extrahovaných buňkách během buněčného cyklu

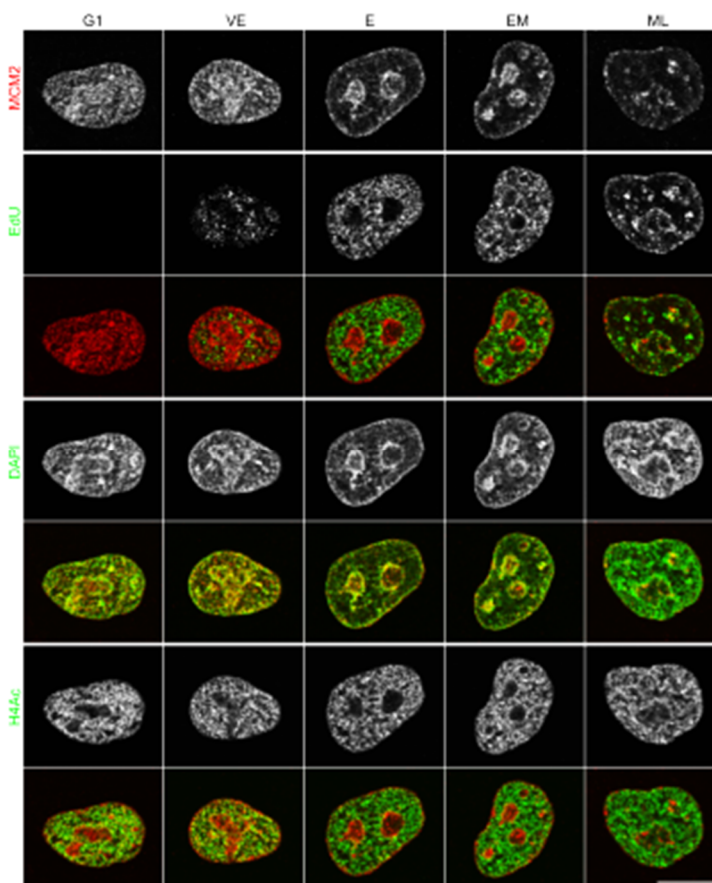
(A) Vysoký stupeň kolokalizace (žlutě) MCM7 proteinu (červený kanál v překryvu) a MCM2 proteinu (zelený kanál v překryvu) v buněčných jádrech. Zobrazeny jsou jak buňky v S fázi (buňky s pozitivním signálem EdU v modrém kanálu), tak buňky v G1 fázi (označeny hvězdičkou). Obrázek ukazuje jeden konfokální řez. Porovnání signálů MCM proteinů a EdU signálu ve všech replikujících buňkách jasně ukazuje, že replikační signál odpovídá MCM signálu. Měrka odpovídá **10 μm** .

(B) Vysoký stupeň kolokalizace mezi proteiny MCM2 a 7 a replikací byl potvrzen pomocí kros-korelační funkce na jednotlivých jádrech. První řádek představuje CCF křivku kolokalizace MCM2 a 7, druhý a třetí řádek pak CCF křivku kolokalizace jednotlivých MCM proteinů se signálem EdU. Ve všech případech se jedná o vysoce pozitivní kolokalizaci signálů.



Obrázek č. 9: Vliv extrakce na jadernou architekturu

Uspořádání neextrahovaných (**první řádek**) a extrahovaných (**druhý řádek**) buněčných jader (zobrazeny jsou střední konfokální řezy jádrem). Signály odpovídají **DAPI**, **H4Ac**, **MCM2** proteinu a signálu DNA replikace (**EdU**). Ačkoliv je jasně patrná kondenzace chromatinu způsobená extrakcí před fixací, nejvíce patrný je efekt extrakce vidět v odmytí na chromatin nevázané frakce MCM2 proteinu. Extrakce nám umožnila analyzovat na chromatin vázanou frakci MCM proteinů. Měrka odpovídá **10 μm**.



Obrázek č. 10: Dynamika na chromatin vázané formy MCM2 proteinu od pozdní G1 fáze do pozdní S fáze buněčného cyklu

Legenda na následující straně.

Extrahované buňky byly rozděleny do pěti skupin. Pozdní G1 fáze (**G1**) bez replikačního signálu a s velmi intenzivním signálem MCM2, velmi časná S (**VE**), časná S (**E**), přechod mezi časnou a střední S (**EM**) a přechod mezi střední a pozdní S (**ML**). Reprezentativní signál MCM2 proteinu je ukázán v prvním řádku a pak ve všech překryvech, kde je zobrazen červeně. **EdU**, **DAPI** a **H4Ac** signály jsou pak zobrazeny na příslušně označeném řádku a v překryvech vždy o řádek níže jsou zobrazeny v zelené barvě. Všechny obrázky v jednotlivých sloupcích zobrazují shodný konfokální řez vedený středem buněčného jádra. Zatímco signál DAPI a H4Ac je relativně stabilní, mikroskopické obrazy MCM2 a EdU se v průběhu buněčného cyklu značně mění. V překryvech je částečná kolokalizace signálů (žlutě) mezi MCM2 a EdU vidět pouze ve střední až pozdní S fázi a mezi MCM2 a H4Ac v G1 a rané S fázi. Naopak MCM2 a DAPI kolokalizují ve všech fázích buněčného cyklu, ačkoliv kolokalizace postupně klesá tak, jak klesá množství na chromatin vázaného MCM2 proteinu během postupující S fáze. Měrka odpovídá **10 μm**.

Zatímco se signál DAPI nebo H4Ac, epigenetickou značkou aktivního chromatinu, v průběhu S fáze téměř nemění, signál na chromatin vázaného MCM2 postupně mizí. Vzájemná kolokalizace MCM2 proteinu s replikací DNA, DAPI nebo H4ac signálem je zobrazena na jejich odpovídajících překryvech (Obr. 10). Výrazný překryv vázaného MCM2 proteinu s replikací je jasně viditelný pouze v pozdních stádiích S fáze charakterizovaných velkými replikačními oblastmi. Tyto replikační oblasti však ve skutečnosti sestávají z velkého množství malých replikačních ohnisek nerozlišitelných pomocí světelné mikroskopie (Raska et al., 1989; Raska et al., 1991; Leonhardt et al., 2000; Koberna et al., 2005). Překryv signálů MCM2 proteinu se značením H4ac je vysoký na přechodu mezi G1 a S fází. Na začátku S fáze kolokalizace mezi těmito signály rychle klesá. Tento výsledek potvrzuje fakt, že transkripčně aktivní oblasti chromatinu jsou replikovány dříve než oblasti umlčené. Změny jsou rovněž patrné mezi signály MCM2 a DAPI. Výsledky také ukazují, že množství na chromatin vázané frakce MCM2 proteinu během probíhající S fáze klesá. Tyto změny jsme pozorovali i u proteinů MCM3 a 7. Neschopnost vizuálně prokázat přítomnost MCM2

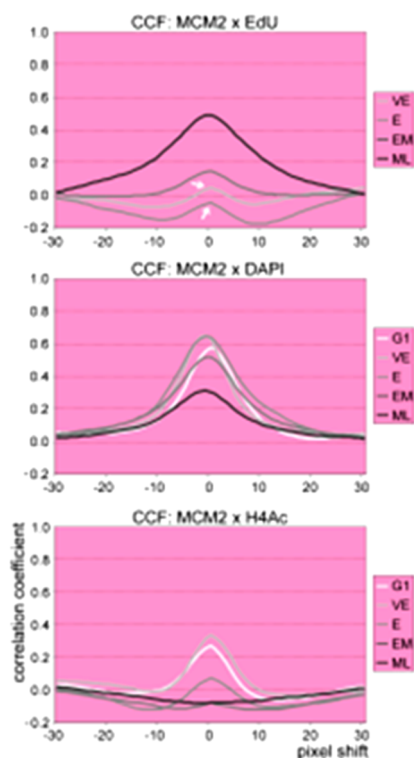
proteinu na chromatinu během replikace byla ve shodě s předchozími výsledky (Krude et al., 1996; Prasanth et al., 2004).

Abychom odhalili možné jemnější rozdíly, které nemohou být jednoduše rozlišitelné pouhou vizuální analýzou obrazových dat, analyzovali jsme získané fluorescenční obrázky pomocí kros-korelační funkce (CCF, van Steensel et al., 1996; Masata et al., 2005). Výsledky CCF analýzy jsou zobrazeny v obr. 11. V případě křivek pro MCM2 protein a DAPI/H4Ac matematické výsledky potvrzují analýzu obrazových dat pomocí barevného překryvu a pouhého zraku. V případě CCF křivek porovnávajících kolokalizaci MCM2 a EdU signály jsme však získali překvapivý výsledek. Na základě vizuální analýzy jsme předpokládali antikolokalizaci mezi MCM2 a EdU signálem na počátku S fáze, tj. podobný výsledek, jaký jsme získali pro MCM2 a H4Ac v přechodu mezi střední a pozdní S fází (černá křivka), ukazující „anti-kolokalizaci“ obou signálů v pozdní S fázi. CCF křivka kolokalizace MCM2 a EdU na počátku S fáze však vykazovala jasná, i když nízká, pozitivní maxima (bílé šipky v obr. 11) uprostřed negativních hodnot. Tento výsledek znamená, že ačkoliv se na počátku S fáze oba sledované signály nacházejí převážně v odlišných místech, malá část signálu MCM2 proteinu kolokalizuje (v mezích rozlišení světelného mikroskopu) s replikačními oblastmi. Navíc, tento typ CCF křivky je patrný také na přechodu mezi ranou a střední S fází, zatímco je částečně maskován u ML přechodu (Obr. 11). Toto maskování kolokalizace MCM2 a EdU je způsobeno přítomností velkých replikačních oblastí lokalizovaných do heterochromatinu v pozdní S fázi.

Z důvodu omezeného množství dostupných protilátek proti proteinům MCM3 a 7 nebylo možné provést veškeré experimenty jako s MCM2 proteinem, avšak provedené experimenty jasně ukazují obdobné výsledky pro všechny sledované MCM proteiny.

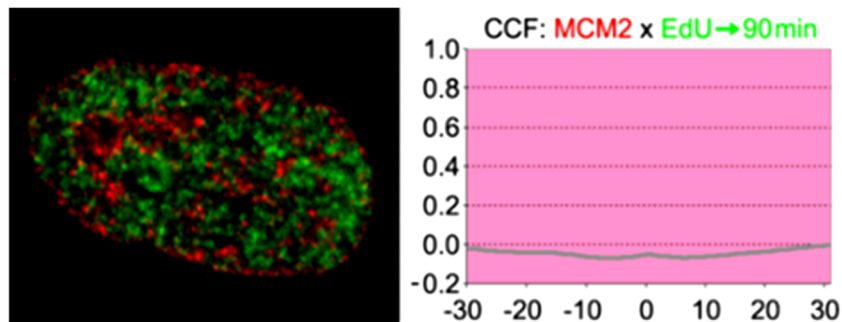
Naše výsledky jasně ukazují, že malá, ale nezanedbatelná frakce MCM proteinů zůstává asociována s replikačními oblastmi během celé S fáze.

Abychom zjistili, zda je výše zmiňovaná frakce MCM2 proteinu asociovaná pouze s aktivními replikačními oblastmi, provedli jsme tzv. chase experiment, kdy značení replikace o 90 minut předcházelo fixaci buňky. Mikroskopický obraz replikace tak odpovídá době 90 minut před pozorovaným obrazem MCM2 proteinu. Sledovány byly buňky, které



Obrázek č. 11: Kvantitativní analýza na chromatin vázaného MCM2 proteinu ve vztahu k DNA replikaci a chromatinu

Analýza kolokalizace mezi MCM2 proteinem a signály EdU, DAPI a H4Ac je zobrazena pomocí CCF křivek na odpovídajících grafech. Různé fáze buněčného cyklu jsou zobrazeny různými odstíny šedé (viz legenda v obrázku). Většina CCF křivek odpovídá výsledkům zobrazeným v obr. 9. CCF křivky navíc ukazují malá pozitivní maxima i v případech, kdy pouhá vizuální analýza není schopna odhalit jasnou kolokalizaci (maxima jsou označena šipkami). Tato pozitivní maxima na negativním pozadí ukazují existenci frakce MCM proteinů, která kolokalizuje s replikačními oblastmi dokonce i v rané S fázi. CCF křivky byly počítány z nejméně pěti buněk v každém zobrazeném stádiu S fáze nebo v G1 fázi.



Obrázek č. 12: Kvantitativní analýza na chromatin vázaného MCM2 proteinu ve vztahu k syntéze DNA po 90 min pauze (chase experiment)

Buňky byly po 10 min inkubaci s EdU několikrát promyty PBS a pěstovány dalších 90 min v kultivačním médiu bez EdU. Následně byly buňky fixovány.

Obrázek ukazuje CCF křivku mezi MCM2 a EdU signálem v buňce v časně S fázi. V porovnání s obr. 12 je vidět, že původní pozitivní maximum po 90 min pauze prakticky vymizelo. Tento výsledek ukazuje, že zbývající frakce MCM2 proteinu se v místech dokončené replikace nenachází.

se v době inkorporace EdU nacházely v časně S fázi. V této fázi buněčného cyklu, na rozdíl od střední nebo pozdní S, jsou replikační oblasti dobře prostorově odděleny (Raska et al., 1991; Leonhardt et al., 2000; Koberna et al., 2005). Po tomto chase experimentu pozitivní maximum v CCF mezi MCM2 a EdU signálem prakticky vymizelo (Obr. 12). To ukazuje, že zbývající MCM2 protein se z replikačních oblastí uvolnil, jakmile byla v těchto oblastech dokončena replikace. Podobné výsledky byly získány pro proteiny MCM3 a 7 (výsledky nejsou ukázány).

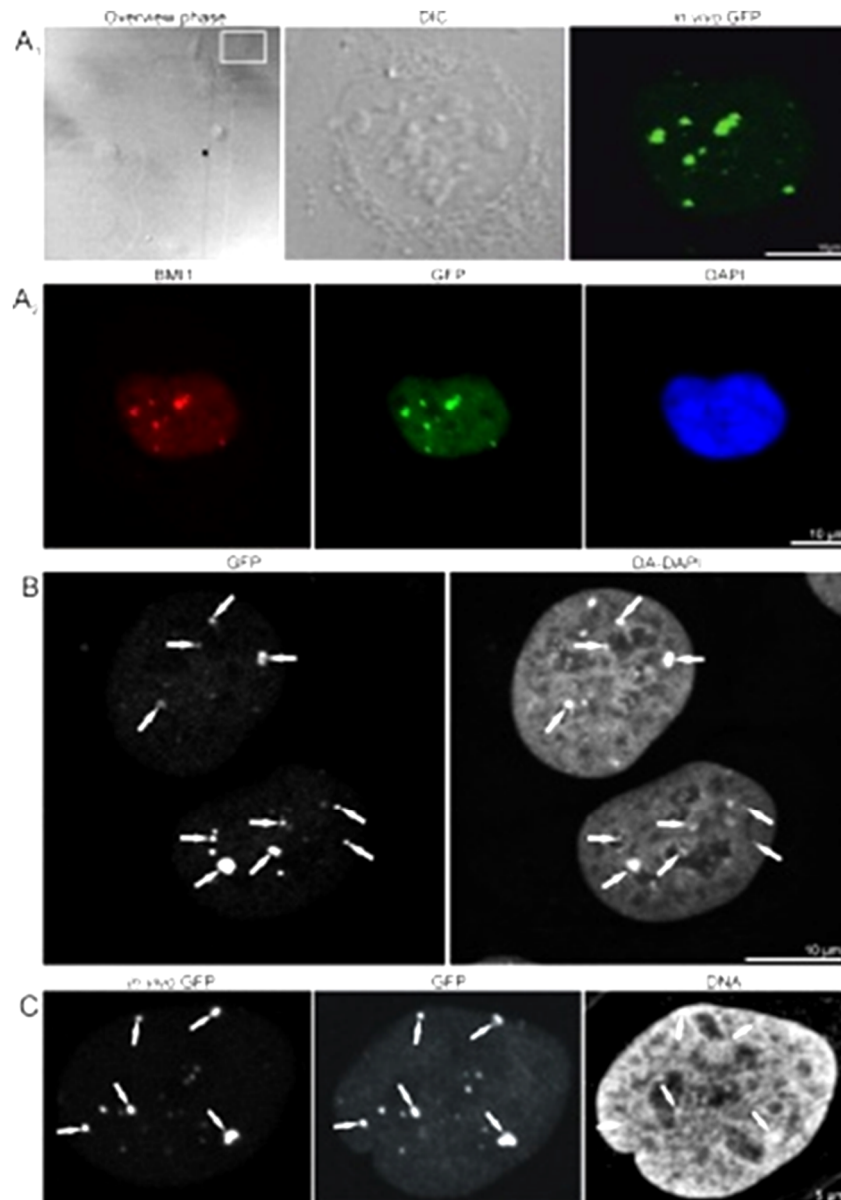
4.2. Polycomb tělíska

Dalším subkompartmentem buněčného jádra, kterým se zabývá tato dizertační práce, je Polycomb tělísko. Tento jaderný subkompartment byl původně identifikován fluorescenční mikroskopií a byl charakterizován prostorovým nakupením proteinů PRC1 komplexu (Saurin et al., 1998). Ultrastrukturní podoba tohoto subkompartmentu však nebyla známa.

Experimenty zabývající se Polycomb tělískem byly provedeny převážně na buněčné linii U-2 OS, protože tato buněčná linie obsahuje množství různě velkých Polycomb tělísek a představuje tak svým způsobem modelovou linii pro jejich výzkum (Saurin et al., 1998; Voncken et al., 1999; Hernandez-Munoz et al., 2005). Navíc se jedná o jednu z nejprozkoumanějších, buněčných linií vůbec. V naší práci jsme použili jak původní linii U-2 OS buněk, tak buněčnou linii stabilně exprimující fúzní protein BMI1-GFP (Hernandez-Munoz et al., 2005).

4.2.1. Korelace signálu BMI1-GFP s imunofluorescenčním značením

Nejdříve jsme provedli kontrolní experimenty spočívající v korelaci signálu BMI1-GFP proteinu v živých buňkách se signálem imunofluorescenčního značení provedeného po fixaci buněk, a to jak s použitím protilátky proti BMI1, tak proti GFP proteinu (Obr. 13). Zjistili jsme, že v rámci rozlišení světelné mikroskopie není patrný žádný významný rozdíl mezi GFP signálem v živých buňkách a imunofluorescenčním signálem jedné nebo druhé protilátky (Obr. 13 A) nebo GFP signálem před a po fixaci buněk (Obr. 13 C). Provedli jsme též analýzu signálu u netransfekovaných U-2 OS buněk (výsledky nejsou ukázány). Signály z obou linií jsou srovnatelné a odpovídají dříve publikovaným výsledkům (Hernandez-Munoz et al., 2005). Difúzní signál BMI1 proteinu je rovnoměrně rozprostřen v celé nukleoplazmě s výjimkou jadérek, akumulovaný signál vytváří různě velká Polycomb tělíska. V jednotlivých buňkách se nachází rozdílný počet tělísek, která se často vyskytují v těsné blízkosti jadérek. Tato naše pozorování jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky (výsledky nejsou ukázány, Saurin et al., 1998; Hernandez-Munoz et al., 2005).



Obrázek č. 13: Korelace GFP signálu nasnímaného na buňkách před jejich fixací se signálem anti-BMI1, GFP nebo DNA z imunofluorescenčního značení a signálem z barvení DAPI nebo DA/DAPI

(A₁) U-2 OS buňky exprimující BMI1-GFP fúzní protein byly pozorovány *in vivo* na Petriho misce s mřížkou. Oblast zájmu při malém zvětšení je umístěna v bílém obdélníku na obrázku **Overview phase**. Jádru sledované buňky při větším zvětšení je zobrazeno pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (**DIC**) a fluorescence GFP (***in vivo* GFP**). (A₂) Stejná buňka po fixaci a imunoznačení protilátkou proti **BMI1** nebo **GFP** proteinu. Zobrazeny jsou maximální projekce konfokálních řezů. Signál získaný barvením **DAPI** odpovídá střednímu konfokálnímu řezu jádrem.

Mikroskopický obraz GFP signálu z živých buněk odpovídá obrazu imunofluorescenčních signálů BMI1 i GFP.

(B) Buňky značené protilátkou proti GFP proteinu a barvené pomocí DA/DAPI. Polycomb tělíska **(šipky)** se nacházejí v místech s nejvyšší koncentrací chromatinu barveného pomocí DA/DAPI.

(C) Porovnání GFP signálu v živých buňkách (***in vivo* GFP**) se signálem získaným pomocí imunofluorescenčního značení protilátkou proti **GFP** proteinu a proti **DNA**. Srovnání signálů ukazuje, že se v Polycomb těliscích nachází zvýšená akumulace DNA **(šipky)**. Měrky v A, B odpovídají **10 μm**, v C **5 μm**.

4.2.1. Elektronová mikroskopie - fyzikálně fixované vzorky

Pro zobrazení ultrastruktury Polycomb tělíska v co nejvěrnější podobě jsme použili metodu zamrazení vzorků za vysokého tlaku následovaného mrazovou substitucí. Takto zpracované buňky mají dobře zachované cytoplazmatické buněčné struktury a buněčné membrány včetně jaderné obálky, která se u U-2 OS buněčné linie vyznačuje přítomností velkého množství cytoplazmatických intranukleárních invaginací. Ty se u transformovaných buněk nacházejí často (Fricker et al., 1997). Fyzikální fixace nám také umožnila dobré zachování ultrastruktury buněčného jádra, přičemž se výrazně lišila ultrastruktura heterochromatinových a euchromatinových oblastí. Heterochromatinové oblasti jsou více elektron denzní než oblasti euchromatinové (Obr. 14). Heterochromatinové oblasti u U-2 OS buněčné linie sestávají z heterochromatinových snopců silných v průměru několik desítek až stovek nanometrů. Nacházejí se napříč celou nukleoplazmou s určitou preferencí oblastí kolem jadérek a v blízkosti jaderné obálky. Ačkoliv kontrast jadérek vůči ostatní nukleoplazmě nebyl ve srovnání s chemicky fixovanými vzorky tak výrazný, jádérka byla jasně rozpoznatelná. Dobře zachovaná antigenicita vzorku nám zároveň umožnila imunodetekci BMI1 proteinu na řezech. BMI1 signál byl lokalizován téměř výhradně do heterochromatinových oblastí buněčného jádra. Imunozaření se nacházelo v celém

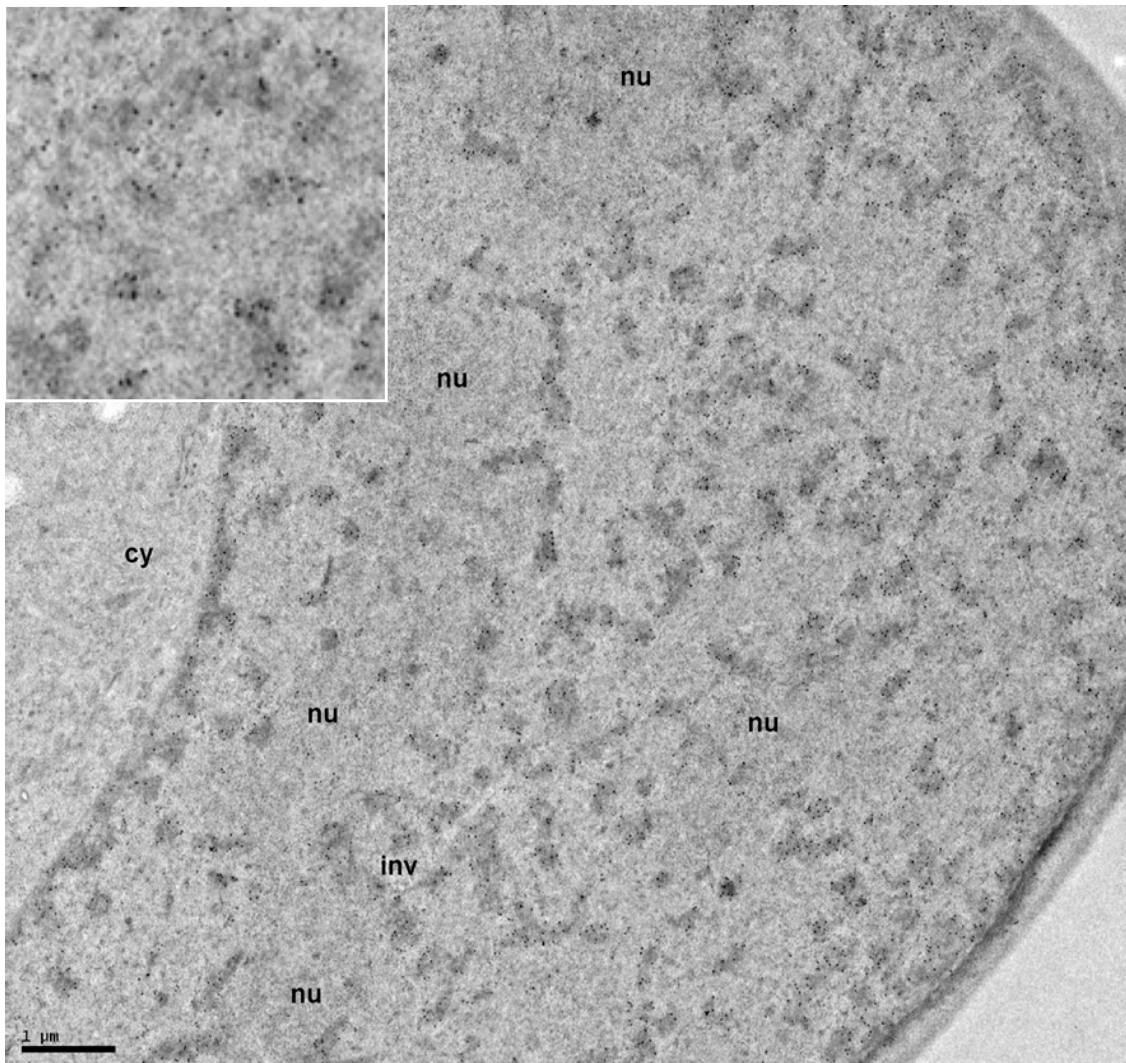
objemu heterochromatinových snopců s mírnou preferencí lokalizace blíže k jejich okrajům. Stejně intenzivně byly na ultratenkém řezu značeny všechny heterochromatinové oblasti napříč jádrem. Přestože bylo analyzováno velké množství takto značených řezů, včetně sériových řezů, žádné lokální nahromadění BMI1 signálu mimo snopce heterochromatinu nebylo pozorováno (Obr. 14).

4.2.1. CLEM na fyzikálně fixovaných vzorcích

Ačkoliv BMI1-GFP signál v živých buňkách nebo imunofluorescenční signál v buňkách fixovaných vytvářel jasná nakupení v podobě Polycomb tělísek, v buňkách fyzikálně fixovaných pro elektronovou mikroskopii a imunoznačených na řezech, nebyla nalezena žádná akumulace signálu odpovídající Polycomb tělískům. Proto jsme použili korelační světelnou a elektronovou mikroskopii (CLEM) s cílem lokalizovat Polycomb tělíska za pomoci fluorescenčního signálu nasnímaného v živých buňkách před vlastním zpracováním buněk pro elektronovou mikroskopii. Ve zkratce se jedná o lokalizaci buněk našeho zájmu narostlých na safírovém sklíčku pomocí lokalizační mřížky umístěné nad buňky. Tento postup umožňuje nalezení shodných buněk v obou typech mikroskopů. Podrobný postup je popsán v kap. 3.11.3.

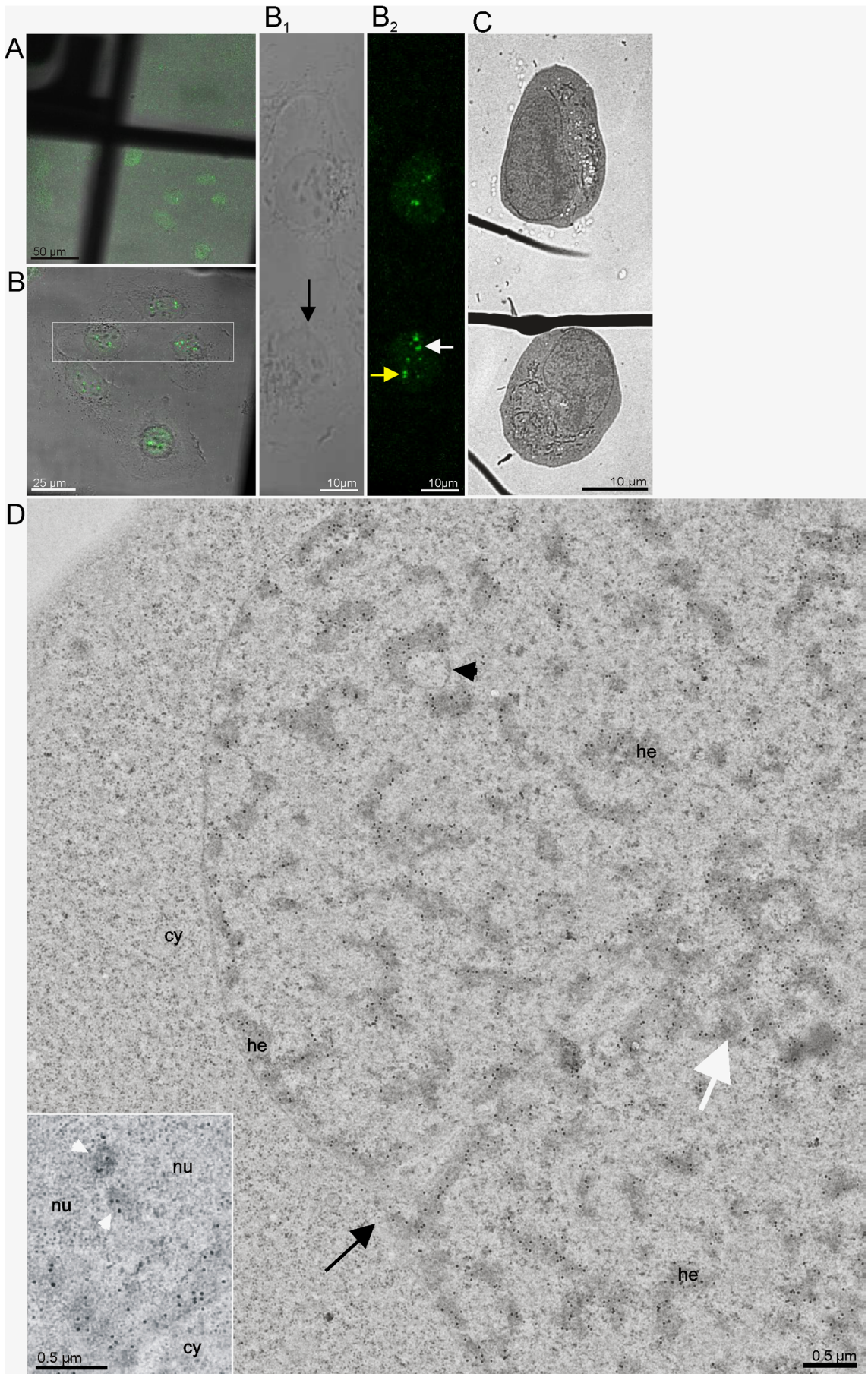
Použití CLEM techniky a získání sériových řezů buňkou nám nakonec umožnilo lokalizovat a ultrastrukturně popsat Polycomb tělíska. Imunoznačení odpovídalo výše uvedenému obrazu (Obr. 14) a nacházelo se téměř výhradně na snopcích heterochromatinu (Obr. 15, 16, 17). V místě Polycomb tělíska, lokalizovaného pomocí fluorescenčního obrazu, jsme pozorovali nahromadění heterochromatinových snopců v prostoru. Stereologicky určená intenzita signálu na heterochromatinu nalézajícím se vně nebo uvnitř „Polycomb tělíska“, vztažená na jednotku plochy heterochromatinu, však byla

shodná (číselně 1 ku $1,05 \pm 0,24$). Množství heterochromatinu na jednotku plochy jádra je však v Polycomb tělísku přibližně 3x vyšší.



Obrázek č. 14: Jádru U-2 OS buňky imunoznačené proti BMI1 proteinu

Na obrázku je zachycena ultrastruktura buněčného jádra U-2 OS buněčné linie. Vzorky byly zmrazeny za vysokého tlaku a kryosubstituovány. Veškeré heterochromatinové struktury (elektrondenzní oblasti) jsou specificky imunoznačeny pomocí anti-BMI1 protilátky (**15 nm zlaté částice**). Mimo elektrondenzní oblasti chromatinu se signál prakticky nenachází. Zkratky: **nu** – jádérko; **inv** – invaginace jaderné obálky; **cy** – cytoplazma. **Inzert** – zvětšený výřez obrázku. Měrka odpovídá **1 μm**.

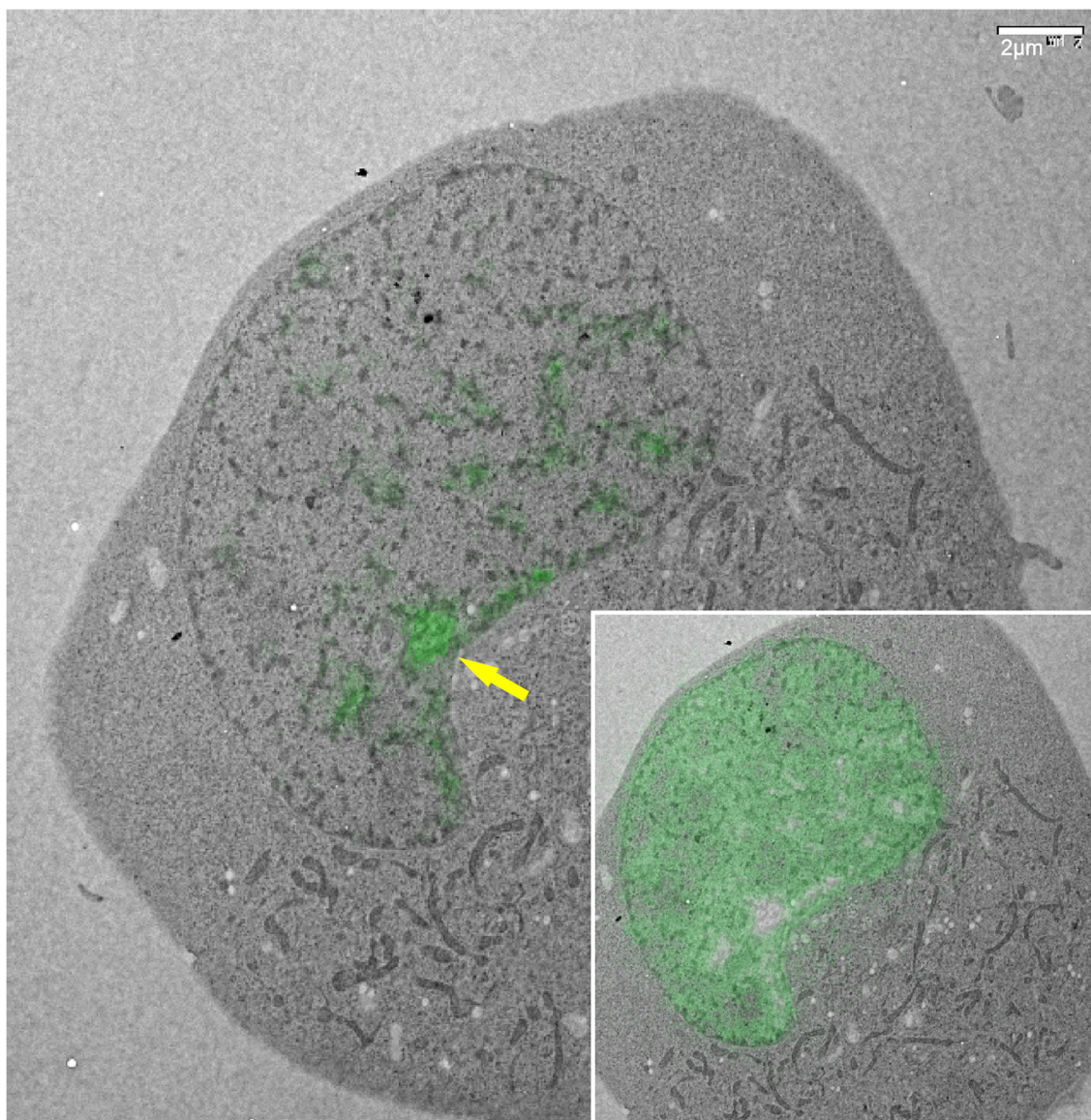


Obrázek č. 15: Korelační světelná a elektronová mikroskopie na fyzikálně fixovaných vzorcích

Obrázek na předchozí straně.

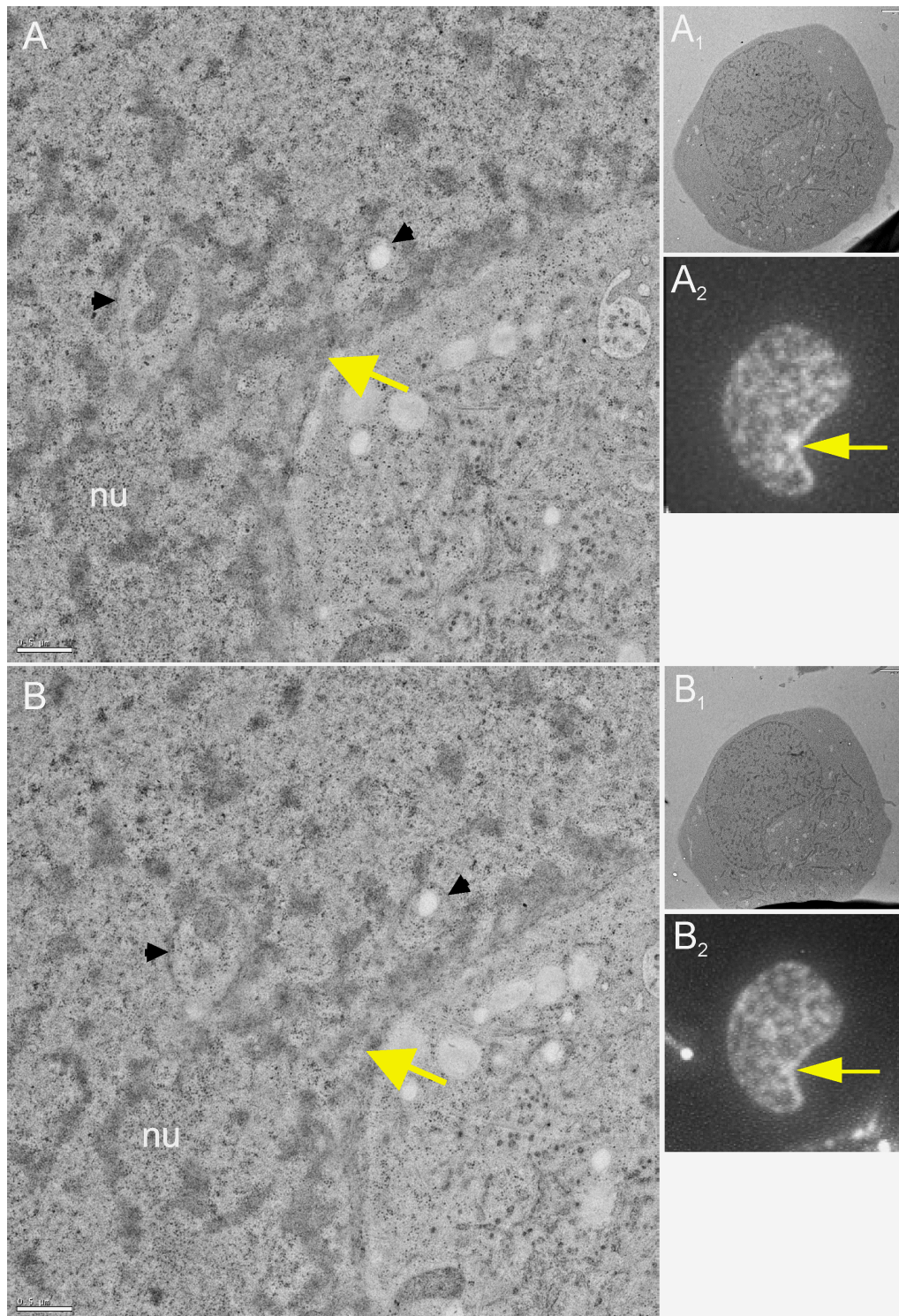
(A) Oblast zájmu spolu se zobrazenou korelační mřížkou ve světelném mikroskopu při malém zvětšení. **(B)** Část oblasti zájmu při větším zvětšení. Sledované dvě buňky jsou umístěny do bílého obdélníku. Buňky jsou zde zobrazeny v překryvu fázového kontrastu s fluorescenčním signálem. **(B₁, 2)** Oblast vymezená obdélníkem v **(B)** při větším zvětšení. **(B₁)** fázový kontrast, **(B₂)** *in vivo* fluorescence BMI1-GFP proteinu. **Bílá a žlutá šipka** označují dvě Polycomb tělíška. **(C)** Elektronogram stejných buněk při malém zvětšení. **(D)** Oblast obsahující Polycomb tělíško označené bílou šipkou při velkém zvětšení. **Černé šipky** ukazují na zachycené invaginace jaderné obálky. **(Inzert v D)** Značení heterochromatinových struktur lokalizovaných do jadérka. Jadérko neobsahuje žádné značení proti BMI1 proteinu (**15 nm zlaté částice**) Imunozačnění proti BMI1 proteinu. **he** – heterochromatin, **cy** – cytoplazma, **nu** – jadérko. Měrky odpovídají: A **50 μm**, B **25 μm**, B₁, B₂, C **10 μm** a D **500 nm**.

Naše výsledky jasně ukazují, že „Polycomb tělíško“ je tvořeno lokálním nahromaděním heterochromatinu. Nahromadění heterochromatinu v prostoru dostačuje na fluorescenční úrovni k vyvolání „dojmu“ výrazného nahromadění Polycomb proteinů. Tuto skutečnost jsme prokázali imunofluorescenčním značením na řezu, které je ze své podstaty dvourozměrným značením. Imunozačnění totiž probíhá pouze na povrchu ultratenkého řezu, kde může dojít k vyvázání primární protilátky na obnažený epitop. Sériové řezy byly značeny primární protilátkou proti BMI1 proteinu a sekundární protilátkou s navázaným fluorochromem (Obr. 16 a 17). Již na tomto 2D značení je z fluorescenčního signálu zřetelně vidět lokalizaci Polycomb tělíška.



Obrázek č. 16: Překryv fluorescenčního a elektronmikroskopického obrazu na stejném ultratenkém řezu

Ultratenký řez byl značen proti BMI1 proteinu s použitím fluorescenční sekundární protilátky. Po nasnímání fluorescenčního signálu bylo stejné místo řezu zobrazeno pomocí elektronového mikroskopu. V inzertu je zobrazen překryv elektronogramu s původním, neupraveným fluorescenčním obrazem (**inzert**). Fluorescenční obraz odpovídá rozmístění heterochromatinu, nejsilnější signál je lokalizován v oblasti Polycomb tělíska (**žlutá šipka**). Lidské oko však není schopno rozpoznat nevelké rozdíly v intenzitě fluorescenčního signálu. Proto ve zvětšeném obraze byl z fluorescenčního signálu odstraněn signál s nízkou intenzitou. Nejsilnější signál odpovídá Polycomb tělísku nacházejícímu se v blízkosti jaderné obálky (**žlutá šipka**). V místě Polycomb tělíska se zároveň nachází vyšší koncentrace heterochromatinových snopců.



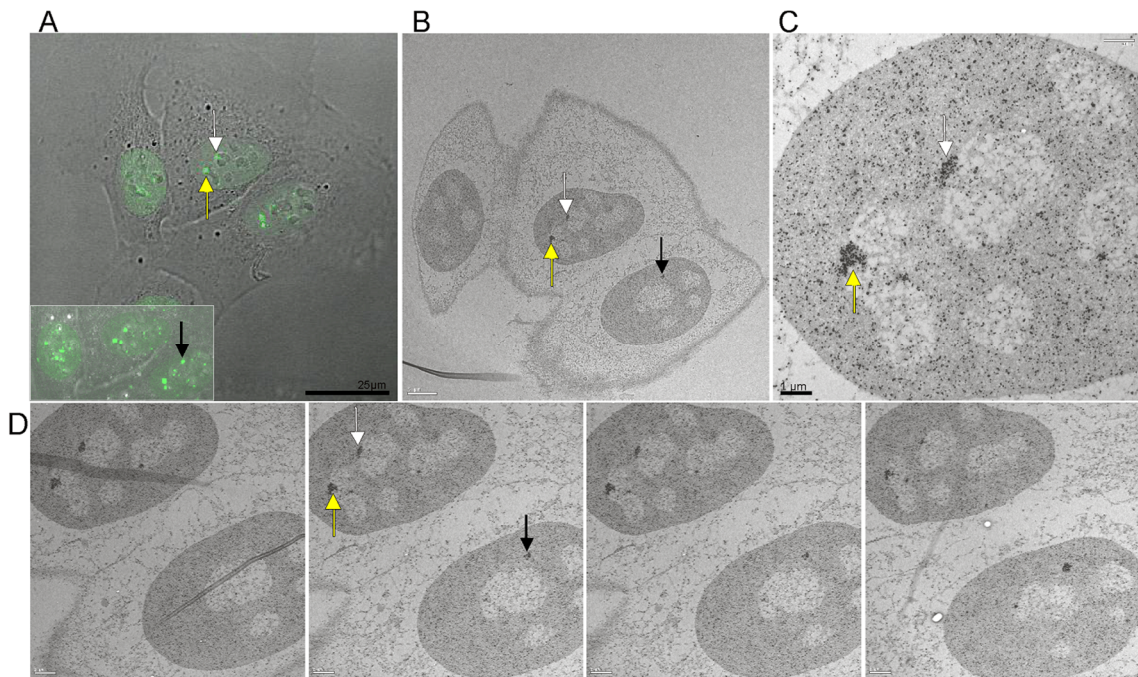
Obrázek č. 17: Imunofluorescenční značení BMI1 proteinu na ultratenkých řezech

Žluté šipky označují vzájemně si odpovídající oblasti - umístění Polycomb tělísek na dvou sériových řezech. **(A, B)** Velké zvětšení, **(A₁, B₁)** malé zvětšení v elektronovém mikroskopu. **(A₂, B₂)** Stejně řezy značené imunofluorescenčně proti BMI1 proteinu. Zobrazené Polycomb tělísko odpovídá tělísku označenému žlutou šipkou na obr. 15 B₂. Měrky v A a B odpovídají **500 nm**, v A₁ a B₁ **1 μm**.

4.2.2. CLEM na chemicky fixovaných vzorcích

Pro další potvrzení našich nálezů jsme zvolili metodu elektronové mikroskopie, při které je imunoznačení provedeno před zalitím buněk do pryskyřice. Tento přístup se nazývá metoda před zalitím - preembedding. Metoda se svým postupem podobá přípravě vzorku pro imunofluorescenční mikroskopii. V elektronmikroskopické metodě před zalitím bylo na fixovaných a šetrně permeabilizovaných buňkách provedeno imunoznačení s následným použitím sekundární protilátky s nanozlatem. Zlaté částice byly následně zvětšeny stříbřením a vzniklé stříbrné částice již měly rozměry 6-12 nm, které umožňují jejich detekci v elektronové mikroskopii. Poté byly vzorky zality do pryskyřice a po ztvrdnutí bločků krájeny na ultramikrotomu na ultratenké řezy. Tato metoda byla použita za účelem značení Polycomb tělíška v celém jeho objemu a po nakrájení v celém objemu řezu. Současně je třeba si uvědomit, že imunoznačení před zalitím probíhá na chemicky fixovaných a permeabilizovaných vzorcích čímž dochází k jisté alteraci ultrastruktury, především z důvodu slabé a relativně pomalé fixace vzorku následované permeabilizací.

Pro nalezení a identifikaci Polycomb tělísek na takto připravených vzorcích jsme použili opět metodu korelační světelné a elektronové mikroskopie (Kap. 3.11.2). a na chemicky fixovaných vzorcích se nám podařilo lokalizovat Polycomb tělíška (Obr. 18). Zatímco prakticky celá nukleoplazma mimo jadérek byla v celém svém objemu mírně značena proti BMI1 proteinu, v místech Polycomb tělísek bylo značení mnohem intenzivnější (Obr. 18). Použití korelační světelné a elektronové mikroskopie nám umožnilo prokázat, že místa s nahromaděním stříbrných částic odpovídají fluorescenčním Polycomb tělíškům. Avšak slabě zachovalá ultrastruktura buněčného jádra a především pak absence výrazného rozdílu v kontrastu mezi hetero- a euchromatinem, jako důsledek použité



Obrázek č. 18: CLEM na vzorcích značených technikou před zalitím

V živých U-2 OS buňkách rostoucích na Petriho misce s mřížkou byl nasnímán 3D signál BMI1-GFP proteinu. **(A)** Překryv fázového kontrastu a fluorescence BMI1-GFP. Zobrazen je jeden optický řez. **(Inzert v A)** Maximální projekce všech optických řezů. **(B)** Stejná skupina buněk jako v A zobrazená v elektronovém mikroskopu. **(C)** Sledovaná buňka ve vyšším rozlišení. Obrázek zachycuje nahromadění imunoznačení v místech odpovídajících fluorescenčním Polycomb tělískům. **(D)** Čtyři po sobě následující sériové řezy ukazující tři Polycomb tělíska (různobarevné šipky v A-D).

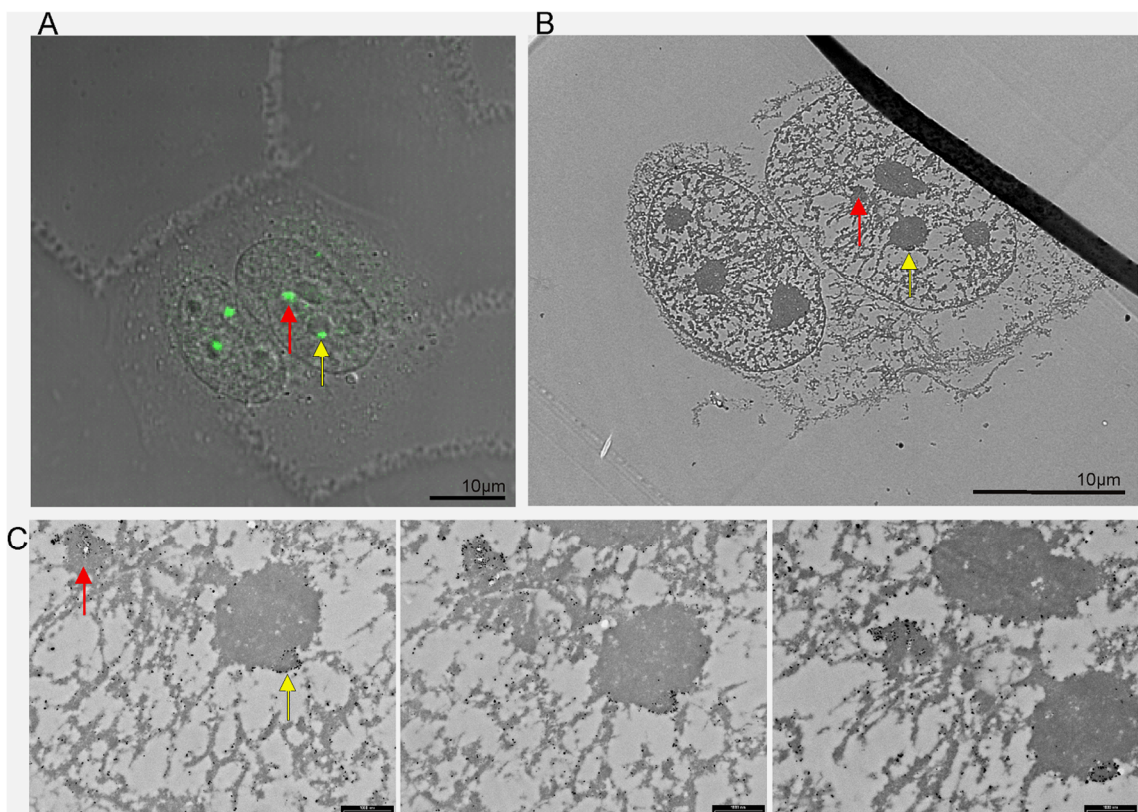
metody, nám neumožnily bližší popis vztahu Polycomb tělísek k ostatním složkám buněčného jádra.

4.2.2.1. CLEM na vzorcích extrahovaných před fixací

Pro odstranění difúzní frakce BMI1 proteinu jsme provedli extrakci před fixací následovanou metodou značení před zalitím (Obr. 19). Tato metoda nejenže umožňuje vyplavení na chromatin nevázaných proteinů z jádra, ale zároveň při ní dochází ke kondenzaci chromatinových struktur. Ačkoliv jemná ultrastruktura je při tomto postupu

značně pozměněna, v případě lokalizace Polycomb tělísek se tento postup ukázal být výhodou, protože vzniklá kondenzace chromatinu zvýraznila Polycomb tělíska vůči nukleoplazmě.

Použití extrakce před fixací (Kap. 3.9.1.1) spolu s CLEM technikou popsanou výše nám umožnilo lokalizovat Polycomb tělíska do heterochromatinových oblastí. Ve shodě s našimi předchozími výsledky jsme ukázali, že Polycomb tělíska jsou tvořena velkými



Obrázek č. 19: CLEM buněk extrahovaných před fixací a značených před zalitím

U-2 OS BMI1-GFP buňky byly po extrakci v CSK pufru a fixaci 2% FA snímány fluorescenčním mikroskopem. **Šipky** ukazují na dvě Polycomb tělíska. **(A)** Překryv fázového kontrastu s fluorescenčním signálem BMI1-GFP. Obrázek zobrazuje jeden konfokální řez. **(B)** Stejně buňky jako v (A) jsou zobrazeny na řezu v elektronovém mikroskopu při malém zvětšení. **(C)** Struktury odpovídající fluorescenčním Polycomb tělískům (**šipky**) ve třech po sobě jdoucích řezech značených protilátkou proti BMI1 proteinu metodou před zalitím. Heterochromatin odpovídající Polycomb tělískům je zde úzce asociován s jadéřky.

nakupeními heterochromatinu, často lokalizovanými do těsné blízkosti jadérek (Obr. 19). Dále jsme zjistili, že po použití extrakce, po níž dochází vlivem použitého postupu ke kondenzaci jaderných struktur, se Polycomb tělísko stává tak kompaktním útvarem, že neumožňuje pronikání protilátek do svého nitra a zůstává značeno jen na svém povrchu. Naopak, i tak denzní struktura, jakou je jadérko, bylo při použití této metody pro protilátky volně prostupné a umožňovalo značení jadérkových proteinů v celém svém objemu (data týkající se jadérka nejsou ukázána).

4.2.3. Korelace BMI1 signálu s DNA

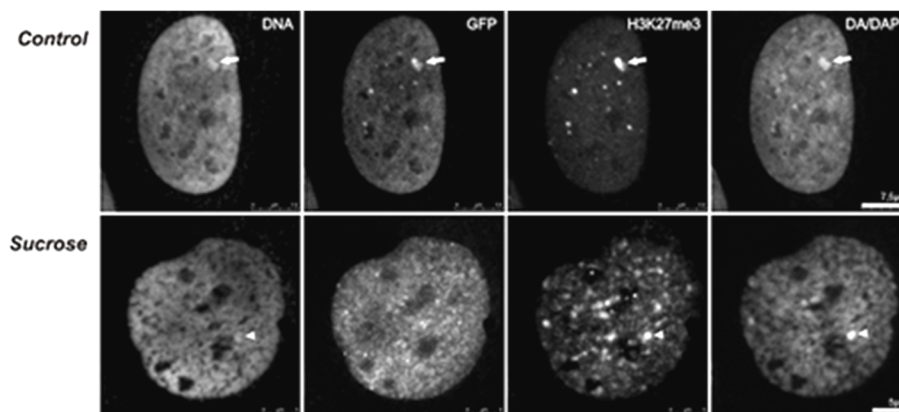
4.2.3.1. Korelace BMI1 signálu s DNA imunoznačením

Elektronovou mikroskopií jsme ukázali, že v místech Polycomb tělísek se nachází zvýšený obsah DNA. Pro další ověření této skutečnosti na úrovni světelné mikroskopie jsme provedli imunoznačení anti-DNA protilátkou. Z důvodu horšího pronikání použité IgM protilátky do chromatinových struktur jsme použili permeabilizaci pomocí Tritonu-X 100 o vyšší koncentraci (podrobnější postup v kap. 3.4.1). Použitím imunoznačení proti DNA jsme jasně ukázali, že místa s nejvyšším obsahem DNA v buňce odpovídají Polycomb tělískům imunofluorescenčně značeným proti GFP proteinu (Obr. 13 C, Obr. 20 Control).

4.2.3.2. Korelace BMI1 signálu s DA/DAPI barvením

Dále jsme provedli barvení DNA metodou Distamycin A/DAPI. Obraz získaný tímto barvením je shodný s obrazem Polycomb proteinů (zde BMI1-GFP proteinem, obr. 13 B) narozdíl od klasického barvení pouze pomocí DAPI (Obr. 13 A₂ DAPI).

Porovnali jsme signály získané imunoznačením protilátkou proti DNA a DA/DAPI barvením. Na obr. 20 je vidět, že DNA a DA/DAPI signály kolokalizují a jejich obraz je prakticky shodný se signálem tělísek značených protilátkou proti BMI1. Nejvyšší DNA



Obrázek č. 20: Kolokalizace DNA a Polycomb tělísek

(Control) V normálních, neovlivněných U-2 OS buňkách spolu kolocalizují jak signály BMI1-GFP (**GFP**) a **H3K27me3**, tak fluorescenční signály získané imunoznačením proti DNA nebo barvením metodou DA/DAPI. **(Sucrose)** V buňkách vystavených hypertonickému prostředí dochází ke změně lokalizace BMI1-GFP signálu, ostatní tři signály však stále kolocalizují. **Malé a velké šipky** ukazují vždy na odpovídající si místa v jednotlivých obrázcích.

i DA/DAPI signál je lokalizován v místech Polycomb tělísek. Výsledek jasně ukazuje, že imunoznačení DNA a DA/DAPI signál poskytují vzájemně si odpovídající výsledky. Z tohoto důvodu jsme pro určení množství DNA, a tím lokalizaci Polycomb tělísek, ve všech dalších experimentech použili již pouze DA/DAPI barvení.

4.2.4. Změna lokalizace BMI1 proteinu vlivem hypertonického prostředí

Pro další potvrzení chromatinové podstaty Polycomb tělíska jsme provedli sérii experimentů využívajících změn tonicity vnějšího prostředí.

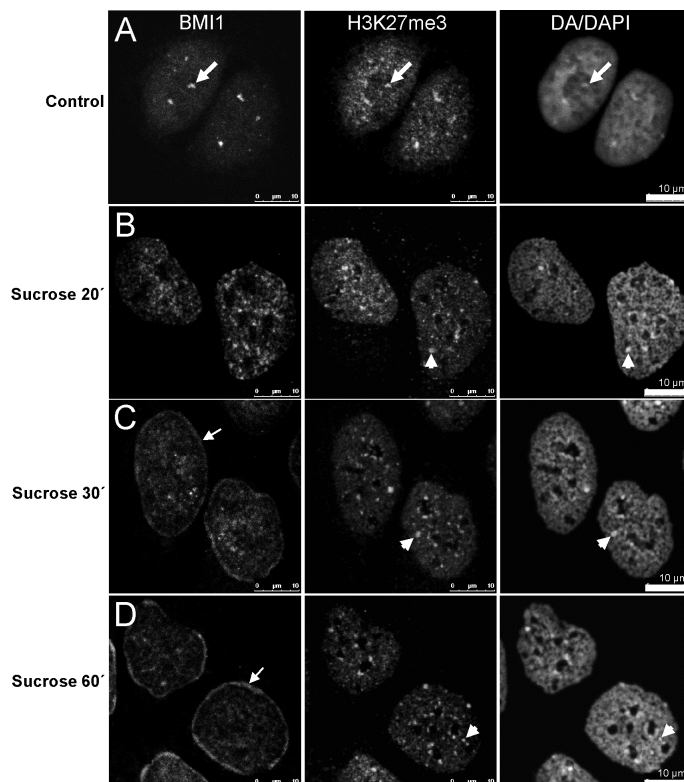
Pro studium chování Polycomb tělísek v hypertonickém prostředí bylo použito normální kultivační médium, jehož tonicita však byla zvýšena na dvojnásobek, a to přidáním sacharózy (Obr. 20), případně dalších osmoticky aktivních látek (viz níže). Buňky byly v takto upraveném médiu byly pěstovány po různě dlouhý časový interval od 5 min do 2 h. Po vystavení buněk hypertonickému prostředí docházelo ke změnám v buněčném jádře,

především k výrazné kondenzaci chromatinu s jasným oddělením a zvýrazněním interchromatinového kompartmentu. Ačkoliv v hypertonickém prostředí dochází k výrazné kompaktaci chromatinových struktur, nedochází zároveň s tím ke změnám architektury buněčného jádra jako celku nebo k vzájemnému prostorovému přeuspořádání jeho vnitřních komponent (Hancock, 2004). Kondenzace chromatinu a jeho „oddělení“ od interchromatinového prostoru bylo výraznější s prodlužováním inkubace v hypertonickém prostředí. Kondenzace chromatinu vedla ke zvýraznění značení H3K27me3, které nadále kolokalizovalo s taktéž zvýrazněným DA/DAPI barvením (Obr. 20).

Naproti tomu jsme zjistili, že v buňkách pěstovaných v hypertonickém prostředí docházelo ke změně lokalizace proteinů skupiny PRC1 z heterochromatinu do interchromatinového prostoru. Tato změna může být sledována i na živých buňkách pomocí BMI1-GFP proteinu. K vymizení Polycomb proteinů z většiny Polycomb tělísek dochází přibližně po 30-45 minutách. Po 60 minutách inkubace buněk v hypertonickém prostředí již byly všechny PRC1 proteiny prakticky ve všech buňkách přemístěny do interchromatinového prostoru (Obr. 21). Vlivem kondenzace chromatinu, a s tím souvisejícím zmenšováním jeho celkového objemu, dochází po 30-60 minutách inkubace k oddělení původně perinukleárního heterochromatinu od jaderné obálky a vytvoření nového interchromatinového prostoru na periferii buněčného jádra, tzv. perinukleárního lemu. Tento lem, stejně jako další interchromatinový prostor jádra, obsahoval proteiny PRC1 skupiny a naopak neobsahoval detekovatelné množství DNA. Tento nově vzniklý jaderný kompartment je na obr. 21 C, D označen tenkou šipkou.

4.2.1. Chování ostatních proteinů PRC1 komplexu v hypertonickém prostředí

Pro zjištění, zda se výše uvedený fenomén týká všech proteinů PRC1 skupiny, jsme provedli imunoznačení proti několika dalším PRC1 proteinům, jmenovitě: RING1a, PHC1,



Obrázek č. 21: Vliv zvýšené makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky na lokalizaci BMI1 proteinu

(A) U-2 OS buňky byly pěstovány v izotonickém médiu. Jedno z Polycomb tělísek je označeno tlustou šipkou. **(B-D)** Buňky byly inkubovány v médiu s 2x vyšší tonicitou vytvořenou přidáním sacharózy do média. Buňky byly v tomto médiu pěstovány 20 **(B)**, 30 **(C)** nebo 60 minut **(D)**. Buňky byly imunoznačeny protilátkou proti BMI1 proteinu **(BMI1)**, protilátkou proti histonu H3 nesoucímu trimetilaci na lyzinu 27 **(H3K27me3)** a barveny pomocí DA/DAPI **(DA/DAPI)**. V neovlivněných buňkách kolokalizují všechny tři zobrazené signály **(tlusté šipky)**. V buňkách vystavených hypertonickému prostředí dochází ke zmizení Polycomb tělísek, přičemž dochází k přesunu BMI1 signálu do interchromatinového prostoru **(BMI1 v B-D)**. Prodloužená inkubace buněk v hypertonickém médiu vede ke zformování lemu podél jaderné obálky, který prakticky neobsahuje DNA – obdoba interchromatinového prostoru **(tenké šipky)**. V buňkách ovlivněných hypertonicitou se BMI1 signál stěhuje do interchromatinového prostoru, ale H3K27me3 a DA/DAPI signály, i přes hypertonicitou způsobenou kondenzaci chromatinu, stále kolokalizují.

CBX4 a CBX8 (Obr. 22). Všechny sledované PRC1 proteiny byly vlivem hypertonického prostředí uvolněny z chromatinu a došlo ke zmizení Polycomb tělísek jako akumulací těchto proteinů.

4.2.2. Porovnání *in vivo* BMI1-GFP signálu s imunofluorescenčním BMI1 a GFP signálem a barvením DA/DAPI před a po inkubaci buněk v hypertonickém médiu

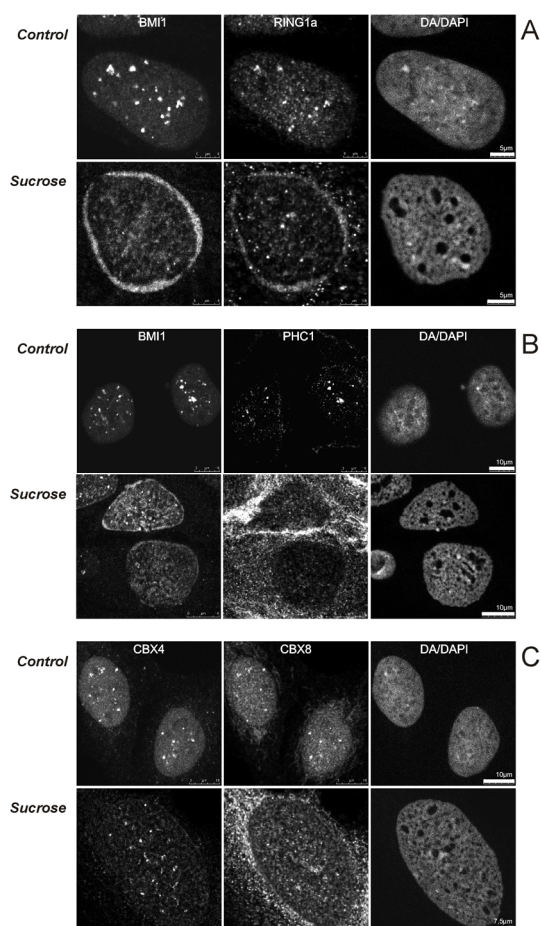
Pro sledování probíhajících změn v distribuci Polycomb proteinů *in vivo* jsme použili U-2 OS BMI1-GFP buňky a sledovali GFP signál a jeho změny v čase. Nejdříve jsme ověřili, že v transfekovaných buňkách má vystavení hyperosmolárnímu prostředí stejný účinek, jako v buňkách netransfekovaných (Obr. 23).

Buňky narostlé na Petriho misce s lokalizační mřížkou byly sledovány nejdříve *in vivo* a následně byly stejné buňky zobrazeny po imunozačnění. Tato korelační metoda různých fluorescenčních signálů nám umožnila sledovat změny mikroskopického obrazu v jednotlivých buňkách. Zjištění získaná touto metodou jsou daleko cennější ve srovnání s podobnými zjištěními učiněnými pouze z porovnávání obecných/statistických charakteristik mikroskopických obrazů před a po ovlivnění.

Na živých buňkách jsme ukázali, že mikroskopický obraz BMI1-GFP před ovlivněním a po něm se zásadně odlišují, a že změny jsou shodné s nálezy v netransfekovaných buňkách. Zároveň nám použití GFP techniky umožnilo sledovat změny v konkrétní buňce a tím ukázat, že DA/DAPI signál v ovlivněných buňkách odpovídá BMI1 signálu před ovlivněním. Pozorovali jsme, že chromatinové domény vytvářející Polycomb tělíska byly i po uvolnění BMI1 proteinu stále zachovány ve svém původním umístění (Obr. 23). Zároveň jsme na obr. 23 ukázali, že BMI1-GFP signál odpovídá signálu získanému po imunozačnění protilátkou proti BMI1 proteinu (nebo i GFP proteinu, Obr. 23 B, C a D).

4.2.3. Vliv různých osmolárně aktivních látek na změnu lokalizace BMI1 proteinu

Kladli jsme si otázku, zda je změna v lokalizaci Polycomb proteinů skupiny PRC1 v hypertonickém prostředí výsledkem zvýšené tonicity prostředí nebo je způsobeno

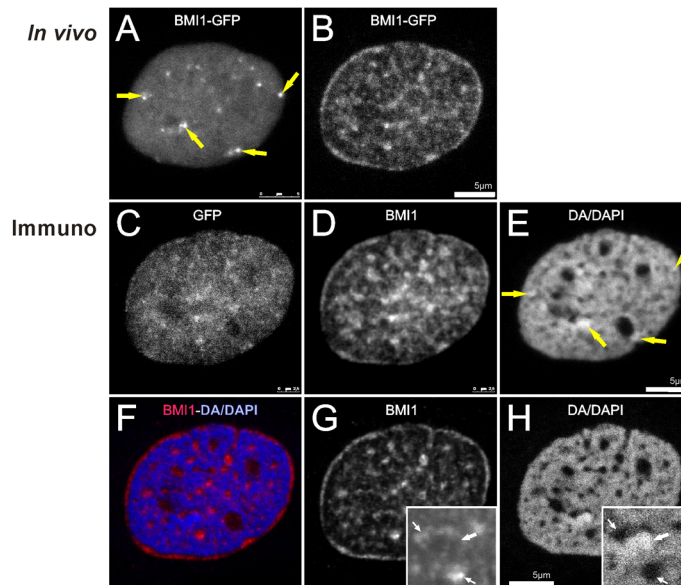


Obrázek č. 22: Rozpad Polycomb tělísek v hypertonickém prostředí detekovaný imunoznačením různých Polycomb proteinů PRC1 komplexu

U-2 OS buňky byly pěstovány v normálním médiu (**Control**) nebo v hypertonickém médiu vytvořeném přidáním sacharózy po dobu 45 minut (**Sucrose**). Buňky byly imunoznačeny proti **BMI1, RING1a, PHC1, CBX4 a CBX8** proteinu (vyznačeno v obrázku). Všechny vzorky byly barveny pomocí **DA/DAPI**. V buňkách pěstovaných v běžném médiu byly všechny sledované PRC1 proteiny lokalizovány v Polycomb těliscích. V buňkách pěstovaných v hypertonickém médiu nakupení PRC1 proteinů zmizela, ačkoliv vlastní tělíska, jako lokální nakupení chromatinu, zůstala zachována.

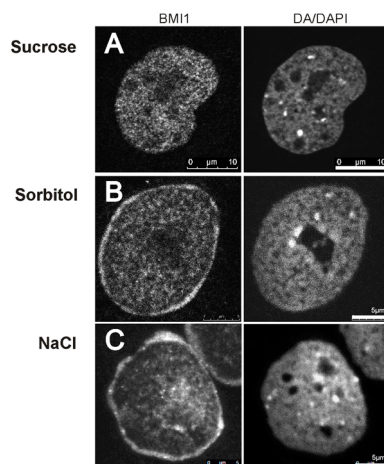
přítomností sacharózy samotné. K docílení hypertonicity prostředí jsme tedy použili dvě odlišné chemické látky: sorbitol, tj. alkohol odvozený z glukózy, a NaCl.

Obr. 24 zachycuje buňky, které byly po dobu 30 minut vystaveny hypertonickému prostředí vytvořenému přidáním sacharózy, sorbitolu nebo NaCl do inkubačního média. Ke změně lokalizace BMI1 proteinu došlo ve všech použitých hypertonických médiích. Změna



Obrázek č. 23: Vliv zvýšené makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky na Polycomb tělíska

(A-E) Korelace signálů v živých buňkách před a po ovlivnění hypertonickým prostředím se signálem z imunofluorescence a DA/DAPI barvení na fixovaných buňkách. Obrázky představují maximální projekce 3D konfokálních řezů. (A) U-2 OS BMI1-GFP buňky byly snímány *in vivo* za fyziologických podmínek. **Žluté šipky** ukazují na některá z Polycomb tělísek. (B) Stejná buňka zobrazená po 30 minutách v hypertonickém prostředí. Vlivem hypertonicity nakupení BMI1 proteinu v Polycomb tělíscích mizí a BMI1 protein se nachází převážně v interchromatinovém prostoru. Stejná buňka po fixaci a imunoznačení protilátkou proti GFP (C) a BMI1 proteinu (D) a barvená pomocí DA/DAPI (E). Vysoký signál DA/DAPI se nachází v místech původních Polycomb tělísek (**žluté šipky**). (F-H) Obrázky představují jeden střední konfokální řez buňkou: (F) překryv G a H, (G) BMI1 signál, (H) DA/DAPI signál. V **inzertech** v G a H je zachycen výřez jádra při větším zvětšení. **Malé šipky** ukazují do interchromatinového prostoru, zatímco **velká šipka** ukazuje na původní Polycomb tělísko – chromatinovou doménu.



Obrázek č. 24: Změna lokalizace BMI1 proteinu vyvolaná různými osmoticky aktivními látkami

U-2 OS buňky byly inkubovány po dobu 30 minut v hypertonickém médiu, které bylo vytvořeno přidáním **(A)** sacharózy, **(B)** sorbitolu nebo **(C)** NaCl. Buňky byly následně imunoznačeny proti **BMI1** proteinu a barveny **DA/DAPI**. Ke změně lokalizace BMI1 proteinu došlo ve všech použitých hypertonických médiích.

lokalizace PRC1 proteinů tedy nebyla způsobena sacharózou, ale byla výsledkem vystavení buněk hypertonickému prostředí (Obr. 24). Zjistili jsme však, že sorbitol a NaCl však působil hyperkondenzací chromatinu a vytvoření perinukleárního lemu rychleji než sacharóza.

4.2.4. Reverzibilita změny lokalizace Polycomb proteinů

Další naší otázkou bylo, zda je změna lokalizace PRC1 proteinů do interchromatinového prostoru vlivem hypertonického prostředí reverzibilní. Proto byly buňky po vystavení hypertonickému prostředí opět inkubovány v normálním izotonickém kultivačním médiu. Korelační světelnou mikroskopií jsme zjistili, že po návratu buněk do normálního média docházelo k obnovení původního Polycomb obrazu a buňky byly schopné normální proliferace (výsledky nejsou ukázány). V experimentu zobrazeném na obr. 26 byly buňky po návratu mikroskopického obrazu Polycomb proteinů do původní podoby vystaveny opět hypertonickému prostředí a následně zafixovány, imunoznačeny

a barveny DA/DAPI. Díky DA/DAPI barvení a imunoznačení protilátkou proti H3K27me3 jsme zjistili, že i po této opakované manipulaci zůstávalo umístění chromatinových domén reprezentujících původní Polycomb tělíska shodné s jejich umístěním před experimentem (Obr. 26).

4.2.5. Hypertonické prostředí a transkripce

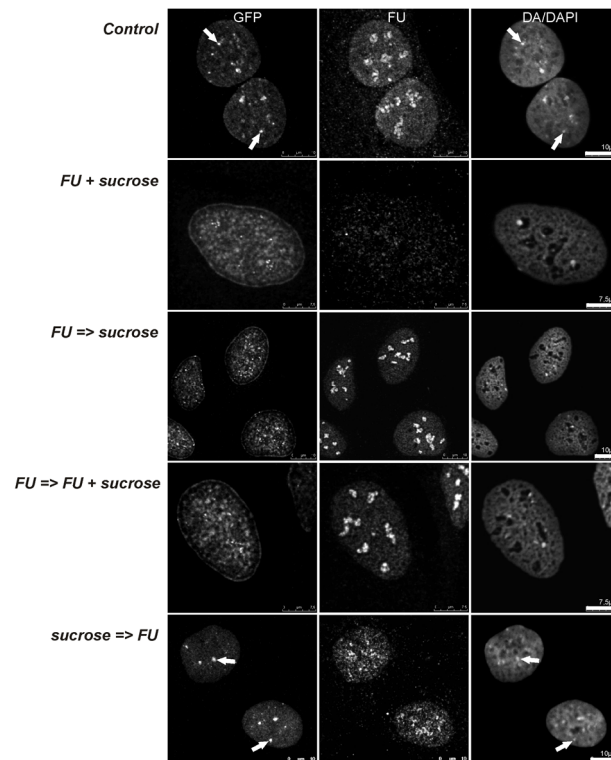
Protože Polycomb proteiny patří mezi negativní regulátory transkripce a jejich přemístění z chromatinu do interchromatinového prostoru jim prakticky znemožňuje vykonávat jejich regulační úlohu, zkoumali jsme, jaký efekt má vystavení buněk hypertonickému prostředí na buněčnou transkripci. RNA transkripce byla sledována pomocí inkorporace 5'-fluorouridinu (5-FU) do nově tvořených molekul RNA. Inkorporace 5-FU trvala 15 minut. 5-FU byl následně detekován pomocí protilátky proti BrdU (více viz kap. 3.5.2).

Po vystavení buněk hypertonickému prostředí došlo k zastavení transkripční aktivity. Po návratu buněk do normálního prostředí se transkripce rychle obnovila (Obr. 25). Pokud jsme značili transkripci ještě před vystavením buněk hypertonickému prostředí, zůstaly vzniklé transkripty lokalizovány v místě původní transkripce (Obr. 25). Vlivem hypertonického prostředí tedy nedochází k rozpadu již vytvořených transkripčních subkompartmentů.

4.2.6. Chování Polycomb tělísek v hypertonickém prostředí se liší od chování typických jaderných tělísek

Porovnali jsme chování Polycomb tělísek v hyper- a hypotonickém prostředí s chováním typického jaderného tělíska jakým je Cajalovo tělísko (Raska et al., 1990; Raska et al., 1991). Buňky byly imunofluorescenčně značeny proti BMI1 proteinu a coilinu,

markeru Cajalových tělísek. Za normálních podmínek se v U-2 OS buňkách nachází zpravidla několik Cajalových tělísek a několik Polycomb tělísek (Obr. 27 A). Pozorovali jsme, že po vystavení buněk hypertonickému prostředí Cajalova tělíska zůstávají zachována, zatímco nahromadění Polycomb proteinů v těliscích mizí. DA/DAPI signál zůstává nejsilnější

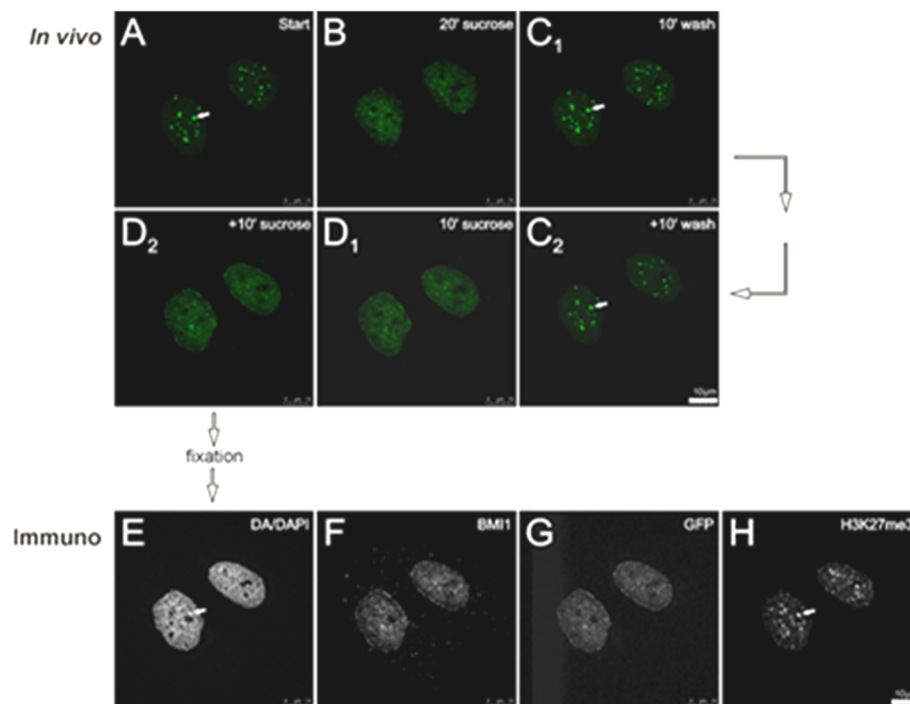


Obrázek č. 25: Vliv hypertonického prostředí na RNA transkripci

Transkripce byla sledována pomocí inkorporace 5-fluorouridinu do nově tvořených transkriptů. **(Control)** U-2 OS buňky pěstované v izotonickém prostředí vykazují normální transkripční obraz **(FU)**, zatímco buňky vystavené hypertonickému prostředí **(FU + sucrose)** nevykazují detekovatelnou transkripci. Pokud je však transkripce značena před vystavením buněk hyperosmolárnímu prostředí **(FU => sucrose, FU => FU + sucrose)**, nedochází jeho vlivem k rozpadu transkripčních oblastí a rozptýlení nasyntetizovaných RNA. Vystavení buněk hypertonickému prostředí následovaného izoosmolárním médiem obsahujícím 5-FU **(Sucrose => FU)** ukazuje, že k obnově transkripce zastavené v hypertonickém prostředí dochází velmi rychle po návratu buněk do normálního izotonického média.

“+” vyjadřuje současnou expozici uvedeným látkám; “=>” vyjadřuje postupnou expozici uvedeným látkám. Měrky odpovídají **7,5** nebo **10 μm** (vyznačeno v jednotlivých obrázcích).

v místech původních Polycomb tělísek (Obr. 27 B). Pokud jsou buňky vystaveny hypotonickému prostředí, Cajalova tělíska se v důsledku změněných protein-protein interakcí rozpadají, zatímco Polycomb tělíska zůstávají zachována v původním umístění (Obr. 27 C a C₁). Chování Polycomb tělísek se tedy zásadně odlišuje od chování typických jaderných tělísek.



Obrázek č. 26: Reverzibilita změn vyvolaných inkubací buněk v hypertonickém médiu

U-2 OS BMI1-GFP buňky byly pěstovány na Petriho misce se skleněným dnem opatřeným mřížkou. **(A)** V živých buňkách pěstovaných v normálním médiu jsou jasně viditelné akumulace mřížkou. **(B)** V buňkách vystavených hypertonickému médiu dochází k přemístění BMI1 proteinu do interchromatinového prostoru. **(C₁, C₂)** Buňky byly znovu pěstovány v normálním médiu po dobu 10 respektive 20 minut. Po této době došlo k úplné obnově původního mikroskopického obrazu BMI1 proteinu. **(D₁, D₂)** Po opětovném vystavení buněk hypertonickému prostředí došlo znovu k přemístění BMI1 proteinu do interchromatinového prostoru. Poté byly buňky fixovány a imunozačeny protilátkou proti **BMI1** proteinu a proti **H3K27me3** a barveny pomocí **DA/DAPI**.

Jedno z Polycomb tělísek je na relevantních obrázcích označeno **šipkou**. Měrka odpovídá **10 μm**.

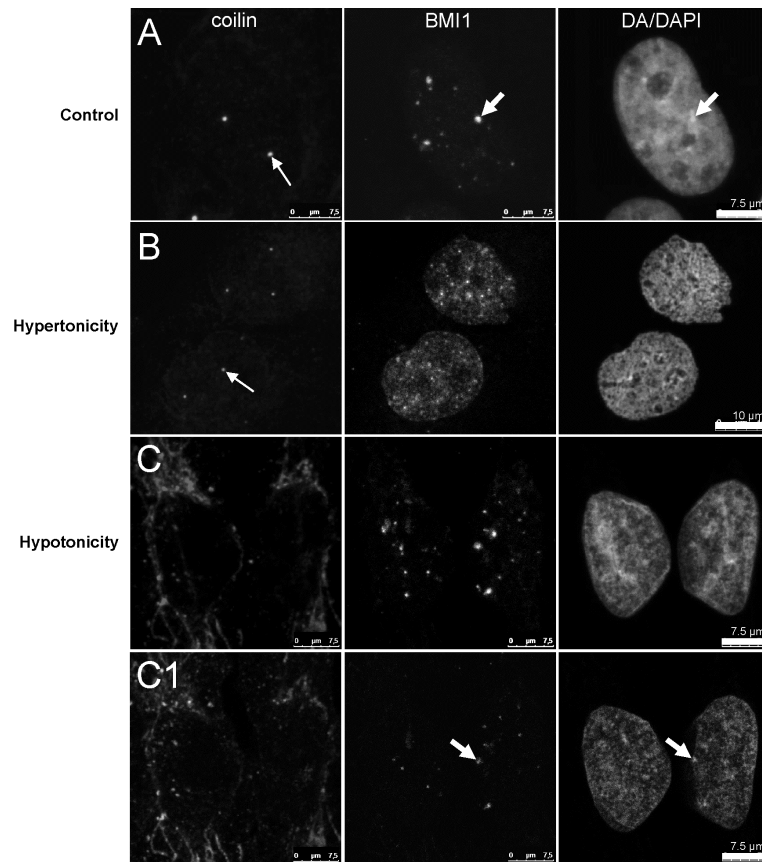
Protože výše uvedený efekt hypotonického roztoku by mohl být zapříčiněn chyběním některých důležitých živin normálně obsažených v kultivačním médiu, provedli jsme obdobný experiment s 2x naředěným normálním médiem. Dosažené výsledky byly shodné s předchozím experimentem s hypotonickým roztokem tvořeným KCl (data nejsou ukázána). Změny v lokalizaci proteinů jsou tedy způsobeny snížením tonicity prostředí.

4.2.7. *In vivo* DRAQ5 barvení uvolňuje BMI1 z chromatinu, ale Polycomb tělíska ve formě nahromadění chromatinu zůstávají zachována

V hypertonickém prostředí dochází k uvolnění PRC1 proteinů z chromatinu. Chromatinová doména nacházející se v původním umístění Polycomb tělísek však zůstává zachována. Příčinou této přetrvávající kondenzace však může být hypertonické prostředí, které samo o sobě způsobuje kondenzaci chromatinových struktur. Z tohoto důvodu jsme použili jiný přístup, který nám umožnil uvolnit vazbu PRC1 proteinů na chromatin, aniž bychom manipulovali s mírou kondenzace chromatinu pomocí změn v tonicitě prostředí. K uvolnění BMI1 proteinu z chromatinu jsme použili barvičku DRAQ5, která je běžně používána ke zviditelnění DNA *in vivo* (Martin et al., 2005; Edward, 2009). Je však známa i svojí schopností uvolňovat na chromatin vázané proteiny z této vazby (Mari et al., 2010; Richard et al., 2011).

Pro sledování změn způsobených barvičkou DRAQ5 jsme použili korelační fluorescenční mikroskopii. Ta nám umožnila sledovat stejné buňky před a po působení DRAQ5 *in vivo* (spolu se signálem BMI1-GFP) a dále po fixaci, imunozačnění a barvení pomocí DA/DAPI. Na živých buňkách byl nejdříve zachycen signál BMI1-GFP, který byl znovu nasnímán 30 minut po přidání DRAQ5 barvičky do média. 30 minut po přidání DRAQ5 barvičky jsme pozorovali, že prakticky veškerý BMI1 protein byl uvolněn z chromatinu a nacházel se v interchromatinovém prostoru. (viz srovnání signálů DRAQ5 a BMI1-GFP *in*

vivo, Obr. 28). Po zafixování byly buňky imunoznačeny proti BMI1 proteinu a barveny pomocí DA/DAPI. Porovnáním signálů DA/DAPI s BMI1-GFP z živých buněk před ovlivněním



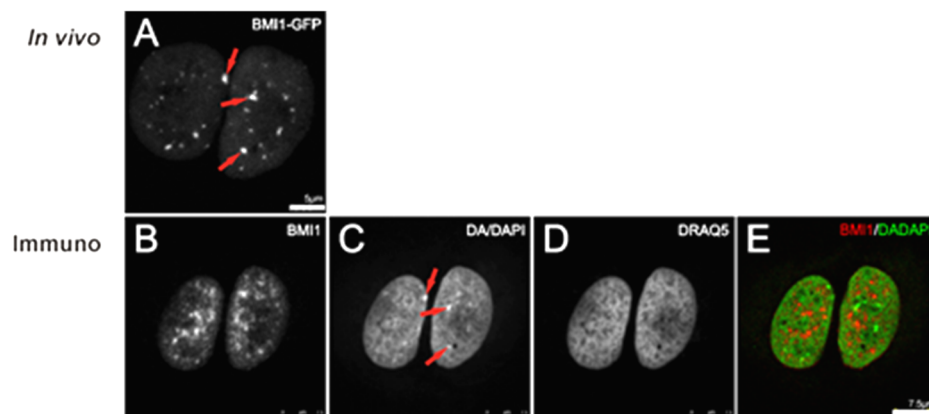
Obrázek č. 27: Chování Polycomb tělíska v hypertonickém médiu se liší od chování typických jaderných tělísek

U-2 OS buňky byly pěstovány v normálním kultivačním médiu (**A**) nebo v hypertonickém (**B**) a hypotonickém prostředí (**C**; **C₁** – jeden optický řez) a imunofluorescenčně značeny protilátkou proti **Coilinu** a **BMI1** proteinu a barveny pomocí **DA/DAPI**. (**A**) V buňkách pěstovaných v normálním médiu BMI1 signál odpovídá signálu DA/DAPI (**tlusté šipky**) a Coilin je lokalizován do Cajalových tělísek (**tenká šipka v A**). (**B**) V hypertonickém prostředí Cajalova tělíska zůstávají formována (**tenká šipka v B**), BMI1 protein je uvolňován z chromatinu do interchromatinového prostoru, zatímco nakupení chromatinu v místech původních Polycomb tělísek zůstávají zachována. (**C**) V hypotonickém prostředí naopak dochází k uvolnění Coilinu a rozpadu Cajalových tělísek, zatímco BMI1 protein zůstává asociován s chromatinem a Polycomb tělíska nadále existují ve svém původní umístění (**tlusté šipky v C₁**; **C₁** – zobrazuje jeden optický řez z C). Měrky, jak je vyznačeno v jednotlivých obrázcích, odpovídají **7,5** nebo **10 μm**.

jsme zjistili, že v místech původních Polycomb tělísek se stále nachází kondenzovaný chromatin, ačkoliv PRC1 proteiny jsou prakticky plně lokalizovány do interchromatinového prostoru (Obr. 28).

4.2.8. Uvolnění PRC1 proteinů z chromatinu je spojeno se změnami ve fosforylaci těchto proteinů

Abychom zjistili, zda je uvolnění proteinů PRC1 komplexu z chromatinu spojeno se změnou jejich velikosti nebo množství, provedli jsme Western blot analýzu proteinů PRC1 komplexu v ovlivněných a neovlivněných buňkách. Porovnáním buněčných lyzátů neovlivněných a hypertonickému prostředí vystavených buněk jsme zjistili, že v hypertonickém prostředí dochází ke změně v migraci BMI1 proteinu. V obou typech lyzátů byly zastoupeny čtyři migrační formy BMI1 proteinu (s velikostmi mezi 40 a 44 kDa). V neovlivněných buňkách však výrazně převládá nejmenší migrační forma BMI1 proteinu, zatímco v buňkách vystavených hypertonickému prostředí převládá forma největší

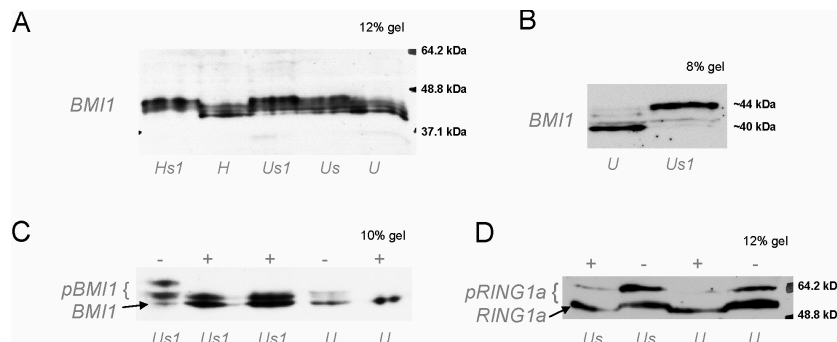


Obrázek č. 28: Uvolnění BMI1 proteinu z chromatinu indukované pomocí DRAQ5

(A) Neovlivněné U-2 OS BMI1-GFP buňky. Zobrazen je **BMI1-GFP** signál. (**Červené šipky**) označují některá Polycomb tělíska. (B-D) Buňky byly vystaveny DRAQ5 po dobu 30 min a pak imunozařeny protilátkou proti BMI1 (B) a barveny pomocí DA/DAPI (C). (D) Mikroskopický obraz fluorescence DRAQ5. (E) Překryv signálů BMI1 (červeně) a DA/DAPI (zeleně).

(Obr. 29 A a B). Obdobné výsledky byly získány i při značení RING1a proteinu (Obr. 29 D). Totožné změny u BMI1 a RING1a proteinu byly pozorovány i v pokusech s buněčnou linií HepG2 (Obr. 29 A).

Již dříve bylo prokázáno, že Polycomb proteiny mohou být fosforylovány (Voncken et al., 1999). Pomocí inkubace buněčných lyzátů s alkalickou fosfatázou jsme ukázali, že změny v migraci BMI1 a RING1a proteinu jsou způsobeny jejich fosforylací. Po inkubaci s alkalickou fosfatázou není totiž pomalu migrující forma téměř detekovatelná jak v normálních, tak hypertonickém prostředí ovlivněných buňkách (Obr. 29 C a D).



Obrázek č. 29: Vystavení buněk hypertonickému prostředí vyvolává změny ve fosforylaci BMI1 a RING1a proteinů

(A) Western blot lyzátů ze dvou různých buněčných linií, U-2 OS BMI1-GFP (**U**) a HepG2 (**H**), imunozačený protilátkou proti BMI1 proteinu. Buněčné lyzáty inkubované v hypertonickém prostředí 30 minut jsou označeny **s** (jako sacharóza), inkubované jednu hodinu jsou označeny **s1**. **(B)** V neovlivněných i ovlivněných buňkách jsou detekovatelné celkem čtyři formy BMI1 proteinu (s velikostí mezi 40 a 44 kDa). Zatímco v neovlivněných buňkách výrazně převládá nejrychleji putující forma, v hypertonickém prostředí ovlivněných buňkách převládá naopak forma putující nejpomaleji. Tento rozdíl je ještě patrnější u HepG2 buněk **(A)**. **(C)** Vystavení buněčných lyzátů účinku alkalické fosfatázy zvyšuje elektromobilitu BMI1 proteinu. Tento výsledek ukazuje, že změnu elektromobility BMI1 proteinu v ovlivněných buňkách způsobuje jeho zvýšená fosforylace. **(D)** Stejný efekt je viditelný u RING1a proteinu. Zkratky: **H** – lyzáty připravené z HepG2, **U** – z U-2 OS buněčné linie. Buňky byly vystaveny hypertonickému prostředí 30 min – **s**, 1 h – **s1**, **+** a **-** označují použití/nepoužití alkalické fosfatázy na buněčné lyzáty.

4.3. IMPDH2 protein a jím tvořené „Rods a Rings“ inkluze

4.3.1. Základní analýza změn v distribuci IMPDH2 proteinu po inhibici specifickými inhibitory

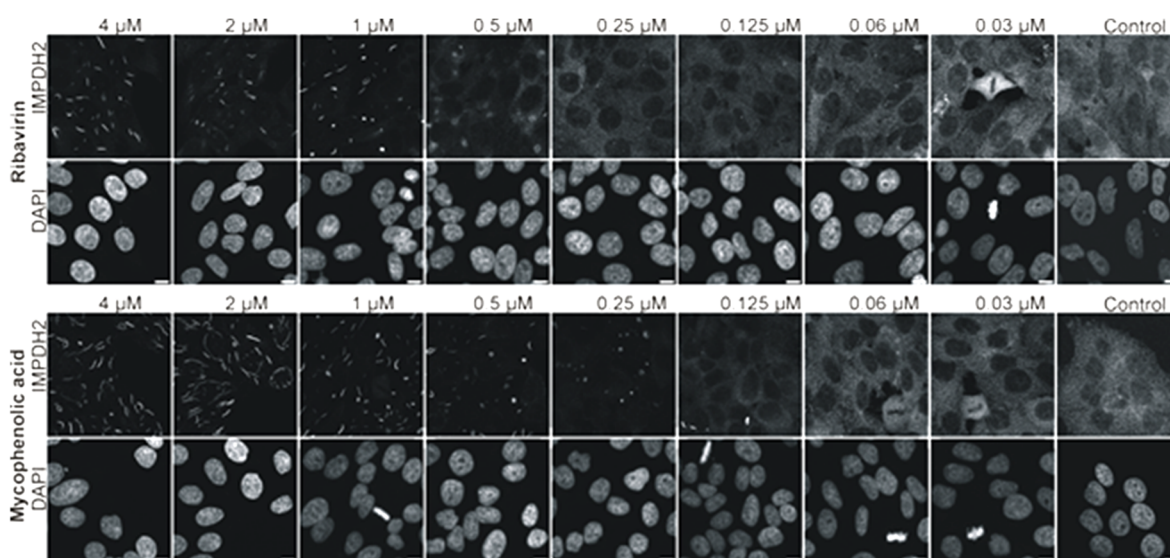
Dalším naším cílem bylo sledovat nitrobuněčnou distribuci IMPDH2 proteinu jak v neovlivněných, tak inhibitory ovlivněných buňkách s hlavním zaměřením na jeho málo prozkoumanou jadernou frakci. Distribuci IMPDH2 proteinu jsme studovali pomocí skenovacího konfokálního mikroskopu na imunofluorescenčně značených vzorcích (Obr. 30, 31, 32).

Tyto iniciální experimenty byly důležité pro poznání distribuce IMPDH2 proteinu jak u kontrolních buněk, tak i u buněk po inhibici IMPDH2 jeho specifickými inhibitory, jako jsou ribavirin nebo kyselina mykofenolová (MPA). V experimentech byly buňky ovlivňovány různými koncentracemi uvedených látek. Pro další experimenty byla použita minimální koncentrace inhibitoru, která vyvolávala tvorbu R&R inkluzí ve většině buněk. Pro určení dynamiky tvorby IMPDH2 inkluzí byly buňky také sledovány v různých časových intervalech (1 min - 48 h) od podání inhibitoru.

Zjistili jsme, že minimální koncentrace inhibitoru vedoucí k vytvoření typických R&R inkluzí byla 1 μM pro ribavirin a 0,5 μM pro MPA (Obr. 30). Ačkoliv tyto uvedené koncentrace vyvolávaly typický R&R obraz ve většině ovlivňovaných buněk, zbývající difúzní cytoplazmatický signál zůstal stále vysoký. Tento difúzní signál prakticky vymizel až při koncentracích inhibitorů kolem 4 μM v případě ribavirinu nebo 2 μM v případě MPA. Při těchto koncentracích byl téměř veškerý buněčný IMPDH2 protein lokalizován do R&R inkluzí. Difúzní signál již nebyl ve většině buněk světelnou mikroskopií detekovatelný (Obr. 30). Další zvyšování koncentrace inhibitorů nemělo na R&R již žádný fluorescenční mikroskopií detekovatelný vliv. Z výše uvedených důvodů jsme všechny následující

experimenty s R&R inkluzemi prováděli za použití 4 μM ribavirinu. Naše výsledky také ukazují, že MPA je silnějším inhibítoem a způsobuje změnu v lokalizaci IMPDH2 proteinu při nižších molárních koncentracích (Obr. 30 a 32).

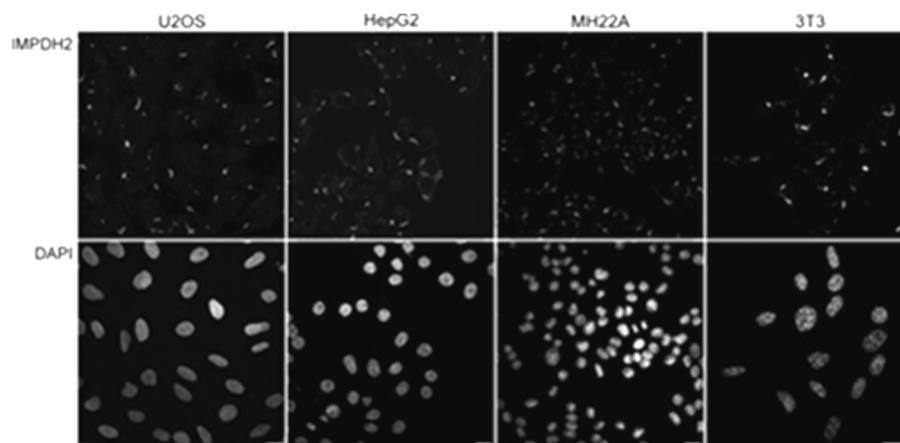
Experimenty byly provedeny zejména na buněčné linii Hep2, protože tato buněčná linie je pro výzkum IMPDH proteinů často používána. R&R mikroskopický obraz byl poprvé nalezen a popsán při rutinním testování autoprotilátek na komerčních sklíčkách právě u Hep2 buněk, které jsou pro toto rutinní testování nejčastěji používány (Carcamo et al., 2011; Keppeke et al., 2012). Imunofluorescenční experimenty jsme prováděli také na dalších lidských (U-2 OS, HepG2) a myších (MH22A, NIH 3T3) buněčných liniích s obdobnými výsledky jako u Hep2 buněčné linie (Obr. 31).



Obrázek č. 30: Koncentrační závislost tvorby R&R inkluzí

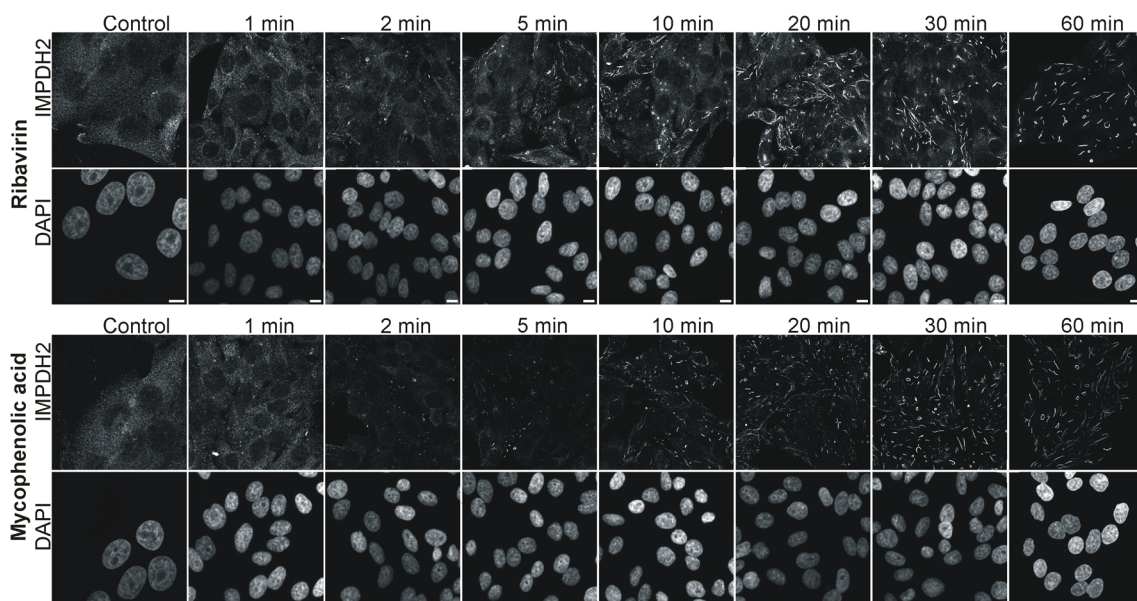
Hep2 buňky byly ovlivňovány různými koncentracemi (od 0,03 μM až po 4 μM) ribavirinu nebo kyseliny mykofenolové, vždy po dobu jedné hodiny. Následně byly buňky imunoznačeny pomocí anti-IMPDH2 protilátky a barveny pomocí DAPI. Koncentrace přibližně 2 μM v případě kyseliny mykofenolové a přibližně 4 μM v případě ribavirinu byla dostatečná pro vytvoření typických R&R inkluzí. Při nižších koncentracích není v R&R inkluzích lokalizován všechen detekovatelný IMPDH2 protein a naopak zvyšování koncentrace již nemá na výsledný R&R obraz žádný významný vliv. Měrky představují 10 μm .

Zjistili jsme, že tvorba R&R inkluzí představuje velice rychlý proces. Již 1 minutu od podání inhibitoru bylo v buňkách detekovatelné velké množství malých Rod struktur (Obr. 32), přičemž klesal difúzní IMPDH2 signál. S prodlužujícím se časem inkubace dochází ke zvětšování R&R inkluzí a zároveň snižování jejich počtu. Přibližně po 1 h od přidání inhibitoru nabývají R&R inkluze svoji typickou podobu (Obr. 32). Inhibice delší než 1 h (např. 24h nebo 48h, v jednom kontrolním experimentu dokonce 21 dnů, výsledky nejsou ukázány) již vzhled R&R inkluzí neovlivňuje, ačkoliv se v živých buňkách dá předpokládat jistá dynamika jak celých makrostruktur, tak jednotlivých molekul IMPDH2.



Obrázek č. 31: R&R obraz indukovaný pomocí ribavirinu v různých lidských a myších buněčných liniích

Lidské (U-2 OS a HepG2) a myší (MH-22A a NIH 3T3) buňky byly po dobu jedné hodiny pěstovány v médiu obsahujícím 4 μ M ribavirin. Ve všech zkoumaných buněčných liniích došlo působením ribavirinu k vytvoření R&R inkluzí detekovatelných anti-IMPDH2 protilátkou. Jádra byla barvena pomocí DAPI. Měrka odpovídá **20 μ m**.



Obrázek č. 32: Časová závislost tvorby R&R inkluzí

Hep2 buňky byly fixovány v různých časových intervalech (1, 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minut) po přidání ribavirinu nebo kyseliny mykofenolové. Následně byly imunoznačeny proti IMPDH2 proteinu a barveny pomocí DAPI. V kontrolních buňkách byl IMPDH2 difúzní a rovnoměrně rozložen napříč cytoplazmou. Již jednu minutu po přidání specifického inhibitoru začal IMPDH2 protein vytvářet detekovatelné cytoplazmatické Rod struktury, které se s přibývajícím časem stávaly většími a delšími, až po přibližně jedné hodině od přidání inhibitoru došlo k vytvoření typického R&R obrazu. Měrky odpovídají **10 μm** .

4.3.2. Lokalizace IMPDH2 proteinu v neovlivněných buňkách

Neovlivněné nebo ribavirinem ovlivněné Hep2 buňky byly imunofluorescenčně značeny IMPDH2 protilátkou a DNA byla obarvena fluorescenční barvičkou DAPI, která v těchto experimentech sloužila pro určení jaderné lokalizace proteinu (Obr. 33 a 34). V ribavirinem neovlivněných buňkách byl IMPDH2 protein rovnoměrně rozptýlen v celém objemu cytoplazmy v podobě jemně zrnité fluorescence (Obr. 33).

Překvapivým výsledkem bylo zjištění IMPDH2 proteinu lokalizovaného do buněčného jádra (Obr. 33 D). Přítomnost signálu v jádře byla dobře viditelná na křivce

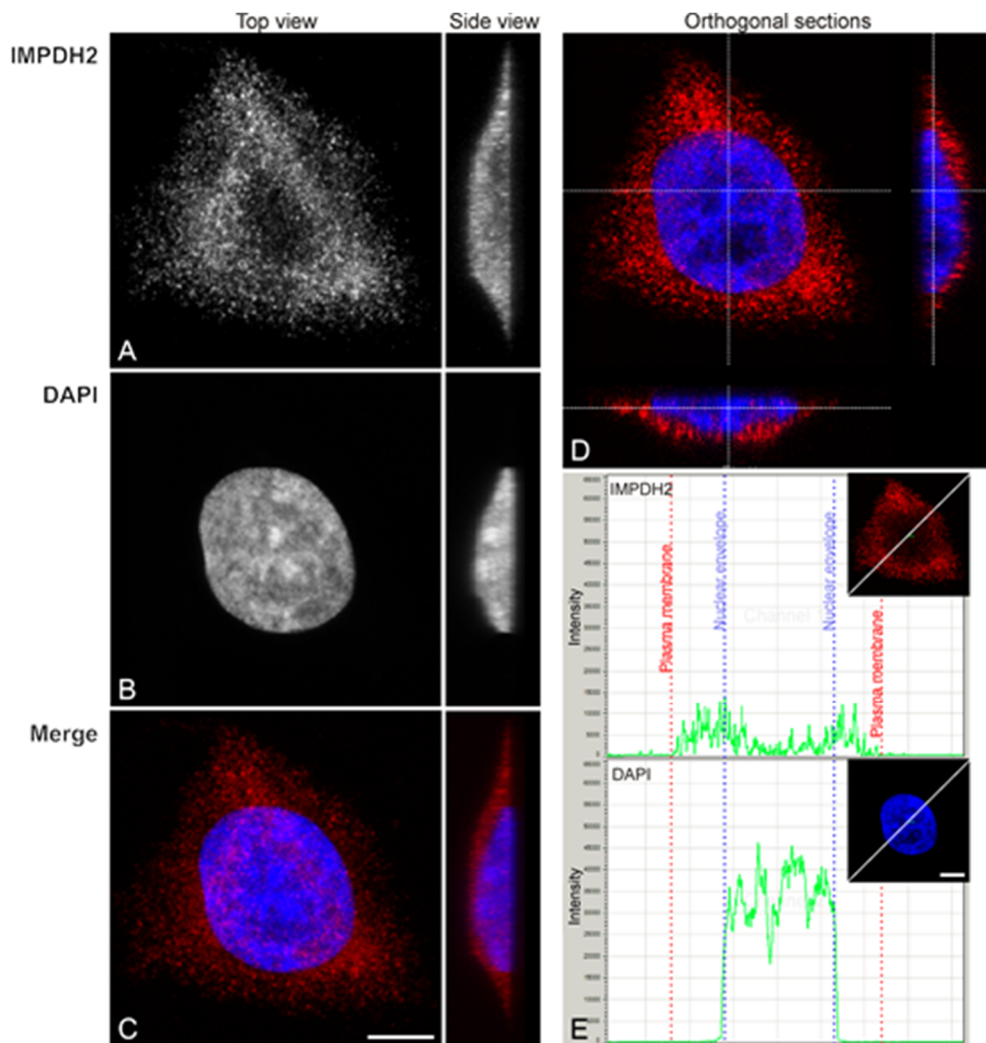
intenzit fluorescenčního signálu (Obr. 33 E). Ačkoliv byl jaderný signál nižší než ten cytoplazmatický, byl zároveň výrazně vyšší než pozadí mimo buňku (Obr. 33 E) nebo než byl signál v jádře v negativní kontrole s vynecháním primární protilátky (výsledky nejsou ukázány). Jaderný signál difúzní formy IMPDH2 byl preferenčně lokalizován do oblastí s nižším značením DAPI, tj. do interchromatinového prostoru (Obr. 33 E a 36).

4.3.3. Změna lokalizace IMPDH2 proteinu v buňkách ovlivněných ribavirinem

Po ovlivnění buněk pomocí 4 μ M ribavirinu docházelo k rychlé změně lokalizace IMPDH2 proteinu (Obr. 34). Intenzitní plot ukazuje, že tvorba R&R inkluzí je spojena se změnou lokalizace většiny buněčného IMPDH2 proteinu do vzniklých makromolekulárních struktur - inkluzí. Fluorescenční signál tvoří výrazná maxima a signál mimo R&R inkluze se prakticky rovná signálu pozadí (Obr. 34 E). Změna lokalizace IMPDH2 proteinu se týká i jeho jaderné formy. Po jedné hodině od přidání inhibitoru je již plně vytvořena jaderná Rod inkluze. Inkluze jiných tvarů se v jádře prakticky nevyskytují. Jaderná Rod inkluze je obvykle menší než cytoplazmatická a je lokalizována přednostně do oblastí s nižším DAPI značením (Obr. 34, bílá šipka). Délka jaderné Rod inkluze kolísá mezi 1 až 4 μ m, nejčastěji mezi 2 až 2,5 μ m.

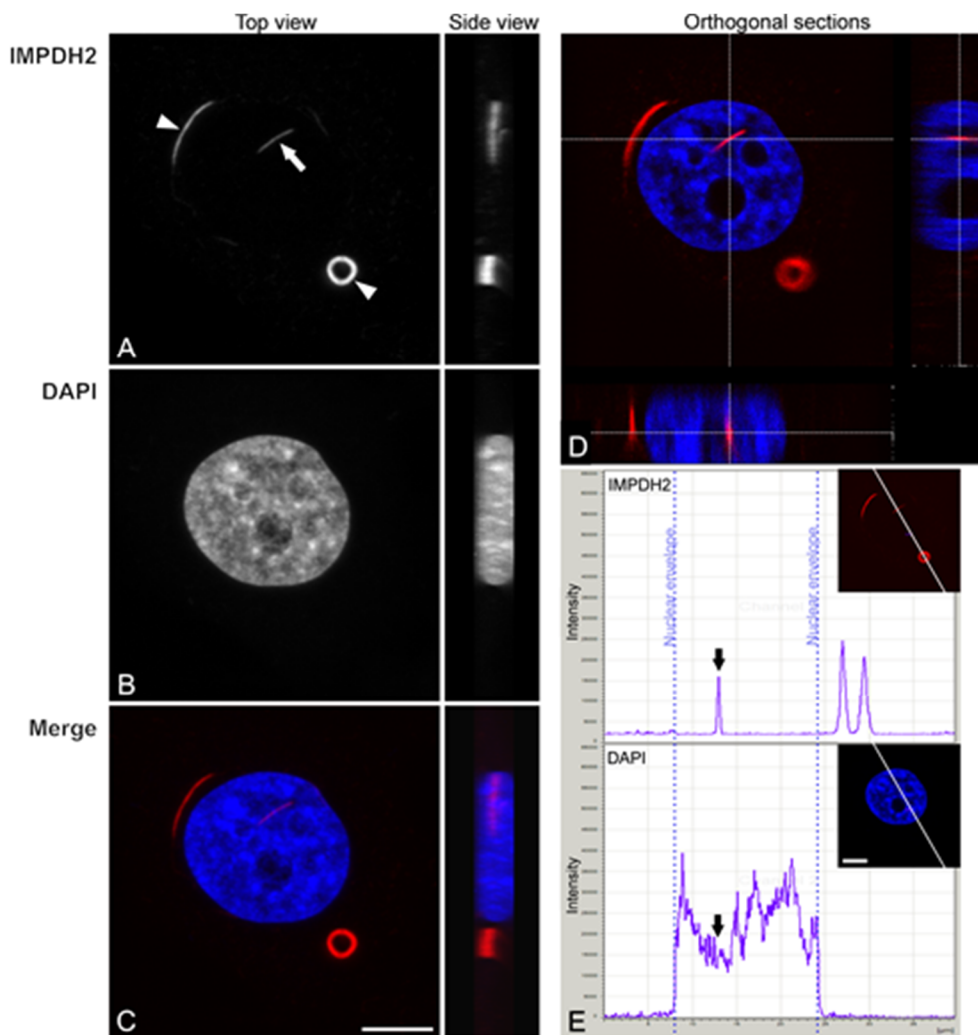
Abychom potvrdili jadernou lokalizaci Rod inkluzí, provedli jsme elektronovou mikroskopii na ribavirinem ovlivněných Hep2 buňkách. Značení IMPDH2 proteinu v celém objemu sledované struktury bylo docíleno metodou imunoznačení před zalitím, tzv. preembedding metodou. Výsledky elektronové mikroskopie jasně ukázaly, že jaderná IMPDH2 inkluze leží v prostoru buněčného jádra (Obr. 35). Pro detailnější určení kontextu IMPDH2 jaderné inkluze a prostoru, ve kterém se nachází, jsme použili elektronovou tomografii 200 nm silného řezu (Obr. 35 B). Zjistili jsme, že jaderná Rod inkluze je

preferenčně lokalizována do interchromatinového prostoru, což ve světelné mikroskopii odpovídá lokalizaci do oblasti jádra nebarvené DAPI barvičkou (Obr. 34 E a 36, černé šipky).



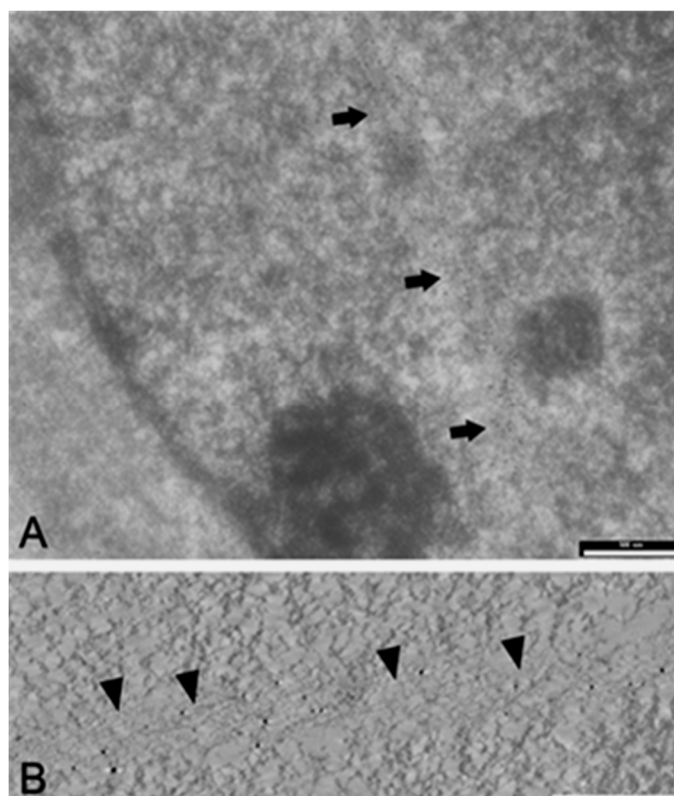
Obrázek č. 33: Imunofluorescenční lokalizace IMPDH2 proteinu v inhibitory neovlivněných Hep2 buňkách

Normální Hep2 buňky bez jakéhokoliv ovlivnění vykazují mírně zrnitý, převážně cytoplazmatický IMPDH2 signál. **(A-C)** Maximální Z projekce (pohled shora a ze strany) buněk fluorescenčně imunoznačených IMPDH2 protilátkou **(A)** nebo DAPI **(B)**. **(C)** Překryv obou kanálů. **(D)** Imunofluorescence IMPDH2 proteinu je v buněčném jádře výrazně slabší, ale nezanedbatelná. Obrázek reprezentuje jeden optický řez vedený středem jádra a jemu odpovídající ortogonální x-z a x-y řezy. **(E)** Intenzitní profily IMPDH2 a DAPI signálu podél zobrazené čáry (**Inzerty v E**) ukazují, že ačkoliv je signál IMPDH2 v jádře slabší než cytoplazmatický, je výrazně vyšší než signál mimo buňku, tj. než signál pozadí. Měrka odpovídá **7,5 μm** .



Obrázek č. 34: Změna lokalizace ribavirinem inhibovaného IMPDH2 proteinu

Hep2 buňky byly fixovány a imunozačeny protilátkou proti IMPDH2 proteinu a barveny DAPI jednu hodinu od přidání ribavirinu v koncentraci 4 μM . **(A-C)** Maximální Z projekce (pohled shora a ze strany). **(A)** IMPDH2 protein, **(B)** barvení DAPI a **(C)** překryv obou signálů. V ribavirinem ovlivněných buňkách je IMPDH2 protein přesunut do velkých makromolekulárních struktur nazývaných R&R inkluze. Většina těchto struktur je lokalizována do cytoplazmy (**bílé krátké šipky**), avšak téměř vždy je jedna Rod inkluze detekovatelná i v buněčném jádře (**bílá šipka**). Na rozdíl od cytoplazmatických inkluzí je tato nukleární Rod inkluze menší a přímější. **(D)** Jeden optický řez vedený jádrem v místě lokalizace jaderné Rod struktury a odpovídající ortogonální x-z a x-y řezy. **(E)** Intenzitní profily IMPDH2 a DAPI signálu podél zobrazené čáry (**Inzerty v E**). Na obrázku **(D, E)** je jasně vidět jadernou lokalizaci IMPDH2 Rod struktury. Zároveň je vidět praktické vymizení jak cytoplazmatického, tak jaderného difúzního signálu **(E)**. Veškerý detekovatelný signál vychází ze zformovaných R&R inkluzí a zbývající signál se rovná signálu pozadí. Jaderná Rod struktura je lokalizována v oblasti s nízkým signálem DAPI, což odpovídá interchromatinovému prostoru (**černé šipky**). Měrka odpovídá 7,5 μm .

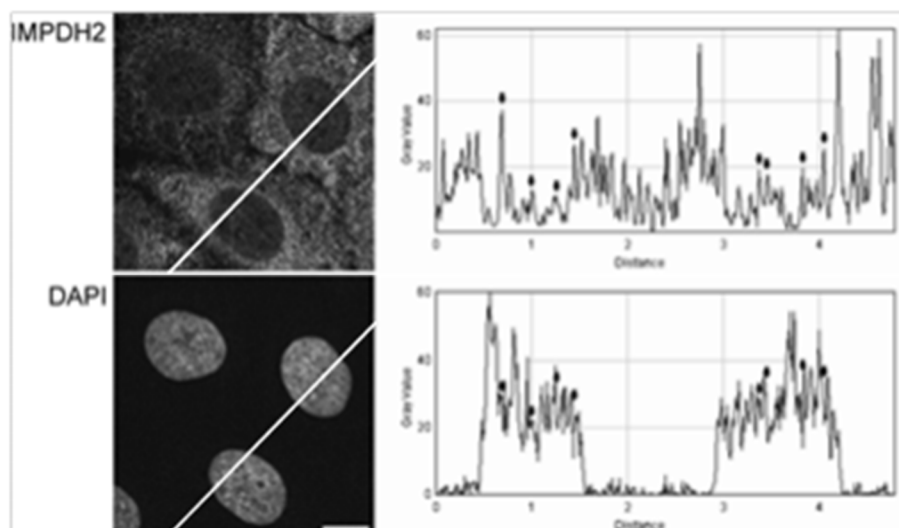


Obrázek č. 35: Elektronová mikroskopie jaderné Rod struktury

Jaderná Rod inkluze značená protilátkou proti IMPDH2 proteinu v ribavirinem ovlivněných Hep2 buňkách. Imunolokalizace byla provedena technikou imunoznačení před zalitím, která umožňuje značení v celém objemu řezu (**šipky v A**). Elektronová mikroskopie (**A**) s použitím elektronové tomografie (**B**) poskytuje přímý důkaz lokalizace IMPDH2 inkluze v jádře. (**B**) Jeden x-y řez vedený v objemu elektronové tomografie jaderné Rod inkluze zachycující jednotlivá IMPDH2 vlákna, ze kterých je struktura složena (**krátké šipky v B**). Měrka odpovídá 500 nm.

4.3.4. Western blot analýza cytoplazmatické a jaderné frakce IMPDH2 proteinu

Pro potvrzení jaderné lokalizace IMPDH2 proteinu jsme provedli analýzu pomocí Western blotu. Abychom zjistili, zda se množství nebo elektromobilita IMPDH2 proteinu mění v ribavirinem ovlivněných buňkách, provedli jsme Western blot analýzu celobuněčných lyzátů ribavirinem ovlivněných i neovlivněných buněk (Obr. 37 A). Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byly zjištěny BCA metodou (viz kap. 3.16.3). Do



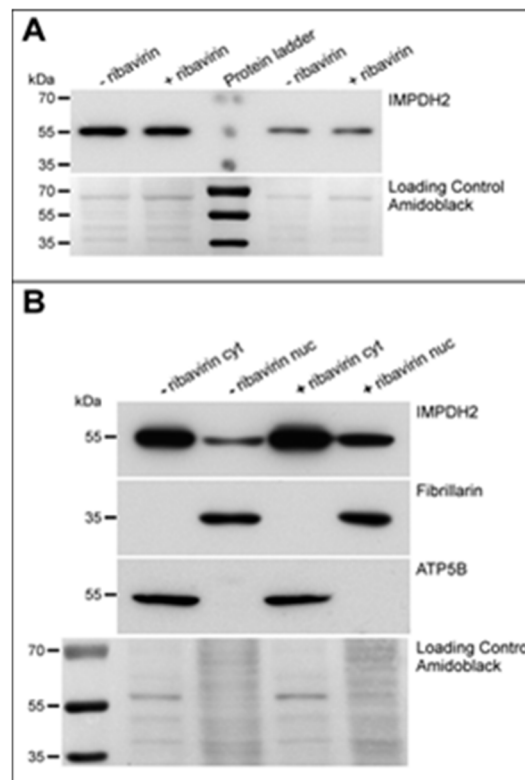
Obrázek č. 36: Intenzitní plot fluorescenčního IMPDH2 a DAPI signálu v neovlivněných Hep2 buňkách

Neovlivněné lidské Hep2 buňky byly imunoznačeny proti IMPDH2 proteinu a barveny pomocí DAPI. Obrázek ukazuje intenzitní profily fluorescence podél bílé čáry. Jaderný IMPDH2 signál je preferenčně lokalizován do oblastí s nízkým DAPI signálem. Maxima jaderného IMPDH2 signálu a jim odpovídající DAPI signály jsou označeny šipkami. Měrka odpovídá **10 μ m**.

každé dráhy na gelu pak bylo vždy nanášeno stejné množství proteinů. Zjistili jsme, že IMPDH2 z neovlivněných i ovlivněných buněk putuje stejnou rychlostí. Během inhibice ribavirinem tedy pravděpodobně nedochází k žádné detekovatelné posttranslační modifikaci IMPDH2 proteinu. Zároveň jsme zjistili, že po inhibici se nijak výrazně nemění ani množství proteinu. Když však byla data podrobena důkladnější analýze (např. normalizována vůči „loading control“, barvení membrány pomocí barvičky amidová čerň), ukázalo se, že v ribavirinem ovlivněných buňkách, v porovnání s buňkami neovlivněnými, množství IMPDH2 proteinu mírně (do 15 %), ale prokazatelně, stoupá (Obr. 37 A).

Provedli jsme Western blot analýzu cytoplazmatické a jaderné frakce u buněk neovlivněných i ovlivněných inhibitorem (Obr. 37 B). Jako kontrolu správného rozdělení buněčných frakcí jsme použili cytoplazmatický protein, jednu z podjednotek ATPázy,

ATP5B, a jaderný protein fibrillarin. Imunozačením jsme IMPDH2 protein detekovali jako pruh o velikosti 55 kDa v obou buněčných frakcích. Ačkoliv je cytoplazmatická frakce IMPDH2 proteinu výrazně vyšší, množství jaderně lokalizovaného IMPDH2 proteinu není zanedbatelné (Obr. 37 B). Zatímco však množství proteinu lokalizovaného v cytoplazmě je porovnatelné v ovlivněných i neovlivněných buňkách, množství jaderného proteinu je přibližně 2x vyšší v buňkách ribavirinem ovlivněných (Obr. 37 B). Patnácti procentní nárůst v množství proteinu u ovlivněných buněk detekovatelný v případě celobuněčných lyzátů je



Obrázek č. 37: Western blot analýza IMPDH2 proteinu včetně jeho rozdělení do buněčných frakcí

(A) Western blot celobuněčných lyzátů neovlivněných a ribavirinem ovlivněných Hep2 buněk. Množství proteinů nanášené do jedné dráhy nalevo od žebříčku bylo 20 µg, napravo 10 µg.

(B) Western blot cytoplazmatických a jaderných frakcí neovlivněných nebo ribavirinem ovlivněných Hep2 buněk. Vzorky byly imunozačeny pomocí protilátek proti **IMPDH2** proteinu,

podjednotce ATPázy (**ATP5B**) a **fibrillarinu**. Celkové množství proteinů v každé jamce odpovídá 40 µg. Jako kontrola naneseného množství proteinů byla membrána barvena amidovou černí. Pozice a odpovídající velikost hmotnostních standardů v kDa je vyznačena po levé straně obrázku. Použité zkratky: - **Ribavirin** – neovlivněné buňky, + **Ribavirin** – ribavirinem ovlivněné buňky, **cyt** – cytoplazmatická a **nuc** – jaderná frakce.

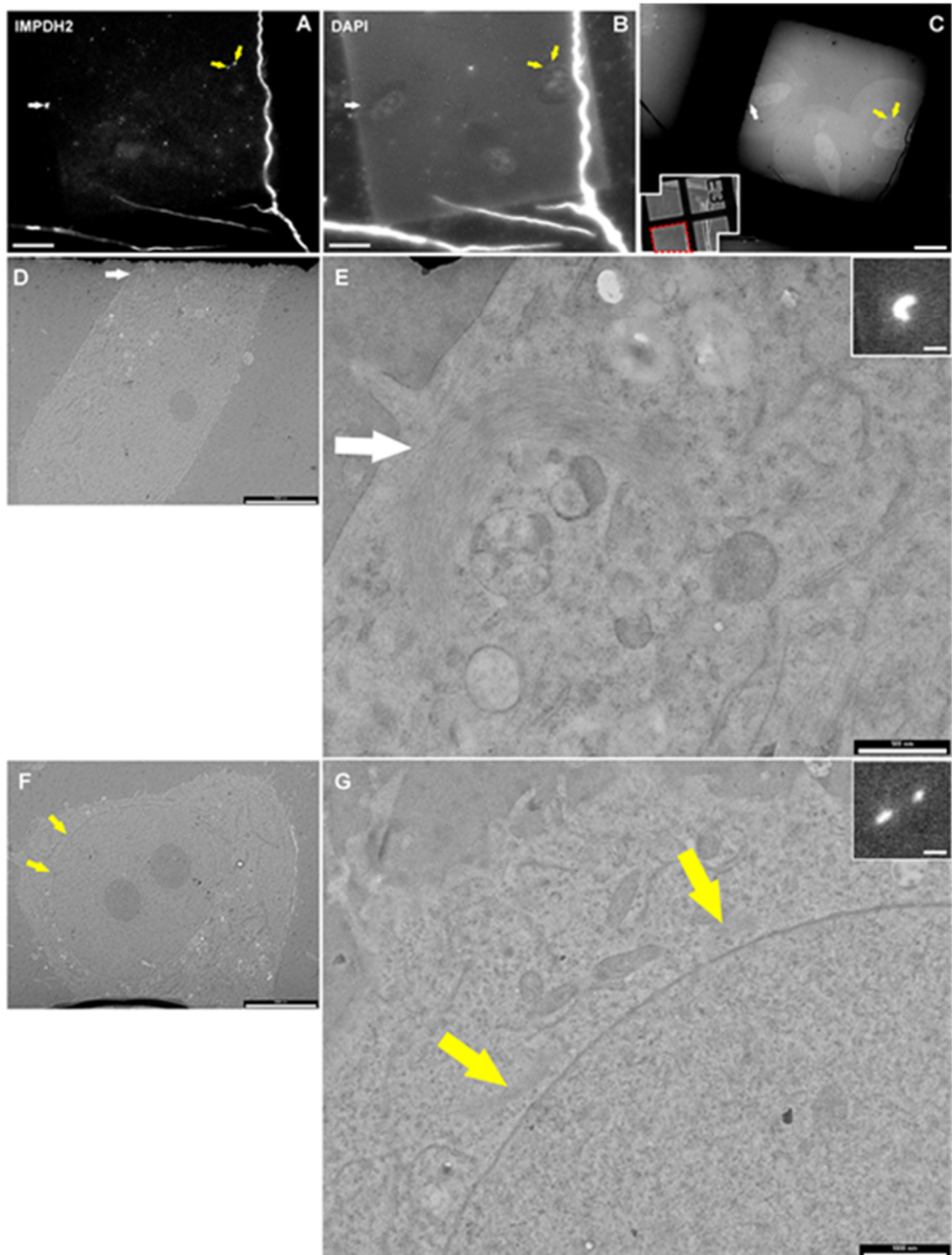
tedy pravděpodobně způsoben převážně nárůstem množství jeho jaderně lokalizované frakce.

4.3.5. Ultrastruktura R&R inkluzí

Pro určení ultrastruktury R&R inkluzí jsme použili metodu fyzikální fixace buněk zamrazením za vysokého tlaku (high pressure freezing, HPF) s následnou kryosubstitucí (freeze substitution, FS) a zalitím do Lowicrylu. Tato metoda představuje v současné době nejlepší způsob jak zachovat ultrastrukturu vzorku spolu s dobrým zachováním antigenicity pro následné imunoznačení.

Ačkoliv jsou R&R inkluze v poměru k buňce relativně velké, není jejich nalezení na ultratenkém řezu jednoduché, protože jejich kontrast se výrazně neliší od kontrastu okolních struktur. Proto jsme pro snazší nalezení R&R inkluzí v elektronovém mikroskopu použili metodu korelační světelné a elektronové mikroskopie (CLEM) na tenkých řezech. Po lokalizaci hledaných struktur pomocí imunofluorescenčního značení zobrazeného fluorescenčním mikroskopem (Obr. 38 A a inzert v 39 A) a buněčných jader pomocí DAPI značení (Obr. 38 B) bylo stejné místo vzorku studováno v elektronovém mikroskopu (Obr. 38 C-G a 39 A-C). K přesné identifikaci IMPDH2 makrostruktur nám také v některých případech pomohlo imunoznačení pomocí zlatých imunokomplexů (Obr. 39).

Ultratenké řezy byly umístěny na lokalizační mikroskopickou sítku s číselnými koordinátami. Mřížka je ukázána na přehledovém snímku v inzertu na obr. 38 C. Nejdříve byly inkluze lokalizovány ve světelném mikroskopu a to na řezech imunofluorescenčně



Obrázek č. 38: Korelační světelná a elektronová mikroskopie R&R inkluzí

Legenda na následující straně

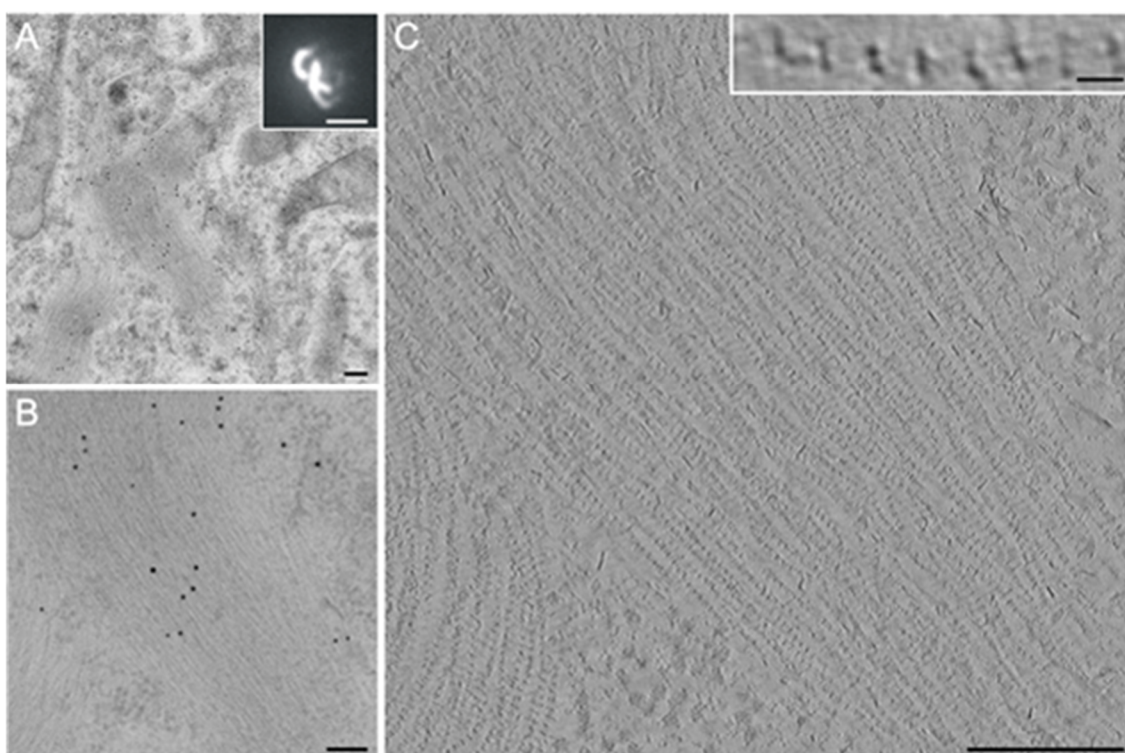
Ultrastruktura R&R inkluzí, zobrazených pomocí fluorescenčního imunoznačení na ultratenkých řezech. **(A, B)** Fluorescenční přehledové snímky oblasti ultratenkého řezu obsahující hledané R&R inkluze. **(A)** Imunofluorescenční značení IMPDH2 proteinu a **(B)** DAPI barvení. **(Šipky)** Bílé a žluté šipky označují na každém z obrázků odpovídající struktury. **(Bílé šipky)** Ring inkluze v jedné z buněk, **(žluté šipky)** dvě části (zachycené na tomto konkrétním ultratenkém řezu) Rod inkluze v druhé buňce. **(C)** Přehledový elektronmikroskopický snímek stejné oblasti, která byla lokalizována pomocí elektronmikroskopické sítě s koordinátami **(Inzert v C)**. Oblast zájmu se nachází v blízkosti pole E3 a je vyznačena červeným čtvercem s přerušovaným okrajem. **(D-G)** Větší zvětšení R&R inkluzí z elektronového mikroskopu. Naše výsledky ukazují, že vnitřní struktura Rod i Ring inkluzí je podobná. R&R inkluze jsou tvořeny podlouhlými jemnými vlákny, která běží navzájem více méně paralelně (v případě Rod struktury rovnoběžně s její dlouhou osou, u Ring struktury podél jejího obvodu) **(Inzerty v E a G)** Zvětšené fluorescenční obrázky odpovídajících struktur. Měry odpovídají: **A-C = 20 μ m, D, F a inzerty v E a G = 5 μ m, E = 500 nm and G = 1 μ m.**

značených pomocí IMPDH2 protilátky (Obr. 38 typické Rod nebo Ring inkluze, obr. 39 inkluze ve tvaru osmičky). Spolu s imunofluorescenčním signálem byl sledován i signál DAPI (Obr. 38 B) pro určení vzájemného vztahu nalezené inkluze k buněčnému jádru. Poté byla pomocí koordinát nalezena stejná oblast řezu v elektronovém mikroskopu a studována při různých zvětšeních (Obr. 38 C-G).

Elektronovou mikroskopií jsme ukázali, že R&R inkluze sestávají z vláken a že tato vnitřní ultrastruktura je shodná pro všechny tvarové modifikace R&R inkluzí. Vlákna tvořící IMPDH2 inkluze jsou vůči sobě téměř paralelní, ačkoliv v IMPDH2 makrostruktuře dochází k jejich vzájemnému nepravidelnému proplétání. Dále jsme pozorovali, že vlákna tvořící Rod inkluzi (žluté šipky v obr. 38) jsou rovnoběžná s její dlouhou osou, zatímco vlákna vytvářející Ring inkluzi (bílé šipky v obr. 38) probíhají podél jejího obvodu (Obr. 38 C-G). Ukázali jsme také, že cytoplazmatické R&R inkluze jsou uloženy volně v cytoplazmě a nejsou od cytozolu odděleny biologickou membránou.

4.3.6. Detailní ultrastruktura IMPDH2 inkluzí: elektronová tomografie

Pro určení jemné struktury IMPDH2 inkluzí v 3D prostoru jsme provedli elektronovou tomografii. Elektronová tomografie nám umožnila zobrazit vnitřní ultrastrukturu inkluzí a vzájemné vztahy jednotlivých vláken v prostoru. V obr. 39 je ukázána elektronová tomografie inkluze ve tvaru osmičky lokalizované opět pomocí imunofluorescenčního značení na řezu (inzert v obr. 39 A). Pro tomografii byla vybrána



Obrázek č. 39: Ultrastruktura R&R inkluzí zobrazená pomocí elektronové tomografie

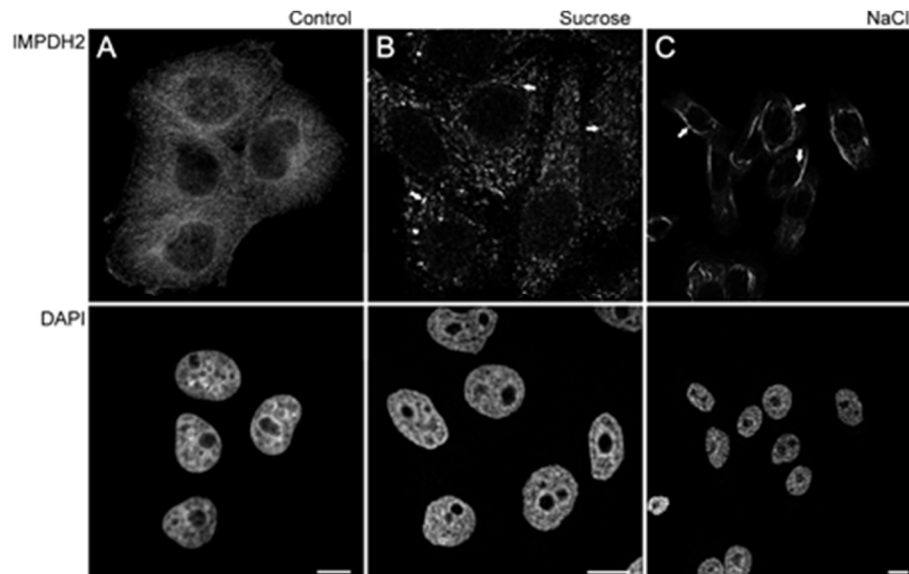
Elektronová tomografie centrální části IMPDH2 struktury ve tvaru osmičky. **(A)** Přehledový elektronmikroskopický snímek oblasti obsahující hledanou IMPDH2 strukturu spolu s fluorescenčním obrazem stejné oblasti (**inzert** v A). **(B)** ukazuje větší zvětšení rekonstruované oblasti s viditelným imunoznačením. **(C)** Obrázek představující jeden X-Y řez ze střední části elektrontomografické rekonstrukce zobrazuje jednotlivá IMPDH2 vlákna tvořící R&R inkluze. (**Inzert** v C) zachycuje jedno z těchto vláken v detailu. Video zobrazující celý rekonstruovaný objem je součástí Supplemental material k článku (Juda et al., 2014). Měrky odpovídají: A-C **200 nm**, inzert v A **5 μm** , inzert v C **10 nm**.

centrální oblast křížení vláken (standardní TEM v obr. 39 A, B). Obr. 39 C reprezentuje jeden řez z vytvořené tomografické rekonstrukce. Celý objem tomografické rekonstrukce je zachycen na videu stáhnutelném z portálu vydavatele (Juda et al., 2014, Supplemental material).

Pomocí elektronové tomografie jsme ukázali, že R&R inkluze jsou tvořeny téměř paralelními vlákny, která probíhají velice blízko jedno od druhého. Mezery mezi nimi jsou maximálně 15 nm a v prostoru mezi vlákny se nenacházely ribozomy ani jiné cytoplazmatické struktury, pouze elektron lucentní, více méně homogenní hmota (Obr. 39 B a C). Jednotlivá vlákna mají tloušťku přibližně 8,6 nm a jsou tvořena shodnými, pravidelně se opakujícími, podjednotkami, jejichž délka je $10,94 \pm 0,82$ nm.

4.3.7. Tvorba R&R inkluzí v hypertonickém prostředí

Pro zjištění vlivu zvýšené makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky (makromolekulárního crowdingu) na formování R&R inkluzí byly Hep2 buňky po dobu 1 h vystaveny hypertonickému prostředí vytvořeného přidáním sacharózy nebo NaCl do média. Po jedné hodině byly buňky fixovány, imunozačeny a barveny DAPI (Obr. 40). Naše výsledky ukazují, že IMPDH2 protein má schopnost tvorby inkluzí i bez působení specifických inhibitorů pouze vlivem zvýšeného makromolekulárního crowdingu. Výsledky svědčí o vysoké schopnosti IMPDH2 proteinu vytvářet buněčné makromolekulární inkluze ve změněných podmínkách vnitřního prostředí buňky.



Obrázek č. 40: Tvorba R&R inkluzí po vystavení buněk hypertonickému prostředí

Hep2 buňky byly pěstovány v normálním médiu **(A)** nebo po dobu 1 h v 2x hypertonickém médiu připraveném přidáním sacharózy **(B)** nebo NaCl **(C)** k normálnímu médiu. Po inkubaci v hypertonickém médiu byly buňky zafixovány 4 % formaldehydem, imunozačeny proti IMPDH2 proteinu a barveny DAPI. Po hypertonickém ovlivnění došlo k vytvoření makromolekulárních struktur podobných těm, které se vytvářejí po přidání specifického inhibitoru. Některé z vytvořených struktur jsou označeny šipkami. **(B a C)**. Měrky odpovídají **10 μm**.

5. Diskuze

5.1. MCM proteiny a DNA replikace

V poslední době došlo k velkému pokroku ve znalostech molekulárního mechanismu DNA replikace (Bochman and Schwacha, 2009; Costa and Onesti, 2009; Mechali; Sheu et al., 2014; Yeeles et al., 2015). Nicméně celostní pohled na proces replikace, hlavně co se prostorového a časového uspořádání týká, zatím chybí (Tanaka and Araki, 2013). K tomuto faktu též přispívá ohromné množství doprovodných procesů a faktorů, které v sobě DNA replikace jako komplexní proces zahrnuje (Yeeles et al., 2015). Komplexnost replikace v eukaryotických organizmech ji činí velmi náročnou pro experimentální studium.

V naší práci jsme se zaměřili na hlubší pochopení takzvaného „MCM paradoxu“ (Dimitrova et al., 1999), který byl popsán v souvislosti s DNA replikací. Jako MCM paradox byla označena neschopnost detekovat MCM proteiny v místě replikace světelnou mikroskopií (Dimitrova et al., 1999; Bochman and Schwacha, 2009; Das et al., 2014). Tento paradox byl o to výraznější, že MCM2-7 komplex vykazuje *in vitro* DNA helikázovou aktivitu a doposud není známa žádná jiná eukaryotická DNA helikáza, která by byla spojena s DNA replikací (Bell and Botchan, 2013).

Co se týká helikázové aktivity MCM proteinů, předpokládá se, že MCM proteiny plní funkci při uvolňování pnutí v DNA během replikace (Bochman and Schwacha, 2009; Costa and Onesti, 2009; Bell and Botchan, 2013; Sheu et al., 2014). Existují dva krajní modely možné vzájemné lokalizace MCM proteinů a probíhající replikace. Jeden lokalizuje MCM proteiny přímo do replikační vidličky, druhý předpokládá jejich působení na velkou vzdálenost (Aparicio et al., 1997; Ritzi et al., 1998; Claycomb et al., 2002; Laskey and Madine, 2003; Calzada et al., 2005; Pacek et al., 2006). Použitím extrakce před

fixací spolu s matematickou analýzou kolokalizace dvou fluorescenčních signálů využívající kros-korelační funkci jsme prokázali přítomnost MCM proteinů v místě replikace. Bohužel naše výsledky jsou limitovány rozlišením světelné mikroskopie, která se pohybuje v osách XY okolo 200 nm. V minulosti byla pomocí elektronové mikroskopie určena velikost jednotlivých replikačních ohnisek na přibližně 100 nm (Raska et al., 1989; Koberna et al., 2005). Tato velikost je sice menší než je maximální rozlišení klasické světelné mikroskopie, ale zároveň se průměrná velikost fluorescenčních replikačních oblastí pohybuje mezi 400-500 nm. Naše výsledky ukazují, že MCM komplex není od replikační vidličky lokalizován ve vzdálenosti větší, než je 200 nm a jsou tak v souladu s oběma výše uvedenými teoriemi popisujícími vzdálenost, na kterou uplatňuje svoji funkci DNA helikáza MCM2-7 komplexu.

5.2. Polycomb tělíska

Polycomb tělíska byla dosud popsána pouze na fluorescenční úrovni, kde se jeví jako místní nahromadění Polycomb proteinů skupiny PRC1 (Gunster et al., 1997; Satijn et al., 1997; Voncken et al., 1999), a to jak při imunofluorescenčním značení na fixovaných buňkách, tak v buňkách živých při použití fluorescenčních fúzních proteinů. Nám se s pomocí několika různých CLEM technik podařilo popsat ultrastrukturu Polycomb tělíska na elektronmikroskopické úrovni. Různými metodami imunoznačení před zalitím se nám podařilo jasně identifikovat Polycomb tělíska. Ultrastruktura dosažená těmito technikami však plně neodpovídala situaci v živé buňce z důvodu kompaktace chromatinových struktur a dalších strukturních změn způsobených použitým postupem. Pro co nejlepší zachování ultrastruktury a antigenicity vzorku jsme proto použili metodu zmrazení za vysokého tlaku následovanou mrazovou substitucí. Na takto zpracovaných vzorcích však nebylo snadné Polycomb tělíska lokalizovat. Proto jsme pro nalezení Polycomb tělísek použili korelační

techniku spojující konfokální mikroskopii živých buněk s fyzikální fixací zmrazením za vysokého tlaku následovanou mrazovou substitucí.

Ukázali jsme, že Polycomb tělíška nejsou tvořena nahromaděním Polycomb proteinů jako takových. Jaderná tělíška byla definována jako především proteinové elektronmikroskopicky detekovatelné oblasti lokalizované do interchromatinového prostoru, lišící se svou strukturou a složením (Raska, 1995; Matera et al., 2009; Dunder, 2012). Polycomb tělíška tedy nepředstavují jaderná tělíška, jak jsou definována. Podle našich výsledků Polycomb tělíška představují nahromadění heterochromatinových struktur obsahujících Polycomb proteiny v prostoru buněčného jádra. Heterochromatin obsažený v Polycomb tělíškách se však morfologicky neliší od jiných heterochromatinových struktur nacházejících se jinde v buněčném jádře. Příčiny prostorového nakupení chromatinu vytvářejícího Polycomb tělíško však nejsou známy.

Po barvení buněk pomocí samotného DAPI se Polycomb tělíška nacházejí spíše v oblastech s nižším signálem. Použili jsme tedy barvení distamycinem A/DAPI (DA/DAPI), které bylo původně používáno pouze pro tzv. C pruhování mitotických chromozomů (Schweizer and Ambros, 1994). Výsledky naší práce však ukázaly, že DA/DAPI signál věrně odpovídá lokalizaci Polycomb tělíšek v interfázních buňkách a zároveň odpovídá reálnému obsahu DNA v barvených oblastech. Distamycin A je látka, která se váže stejně jako DAPI do malého žlábků na dvoušroubovici DNA (Baraldi et al., 2004). Mezi těmito látkami tak dochází k jisté kompetici o místo. Není úplně jasné, jakým mechanismem DA/DAPI barvení umožňuje jadernou DNA lokalizovat více kvantitativně než samotné DAPI barvení, z našich výsledků však jasně vyplývá, že DA/DAPI barvení lépe odpovídá skutečnému rozložení DNA v jádře, než samotné DAPI barvení.

Dalším cílem naší práce bylo pomocí změn tonicity vnějšího prostředí a souvisejících změn makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky (crowdingu) potvrdit chromatinovou podstatu Polycomb tělísek. Experimenty s ovlivňováním makromolekulárního crowdingu představují vhodný způsob k rozlišení mezi chromatinovými a interchromatinovými subkompartmenty buněčného jádra (Albiez et al., 2006), ke studiu hyperkondenzace chromatinu (Robbins et al., 1970; Albiez et al., 2006; Martin and Cardoso, 2010) nebo udržování entity jaderných tělísek (Hancock, 2004).

Po vystavení buněk hypertonickému prostředí vytvořeného přidáním sacharózy do média dojde v buňce k vyvolání mnoha změn, mezi které patří také změna lokalizace Polycomb proteinů nebo kondenzace chromatinu. Pro vyloučení možnosti, že námi pozorované změny souvisejí s jedinečnými vlastnostmi sacharózy použité k vyvolání hypertonicity média jsme použili také sorbitol a NaCl. Ukázali jsme, že změny lokalizace PRC1 proteinů nebo kondenzace chromatinu souvisejí se samotnou hypertonicitou prostředí bez ohledu na to, jaké chemické látky je k jejímu dosažení použito. V případě NaCl však pozorované změny probíhaly rychleji. To může souviset s faktem, že různé látky způsobující hypertonicitu prostředí působí na buňku jiným způsobem. Zatímco látky jako sacharóza nebo sorbitol nepronikají přes biologické membrány a jejich hlavní účinek spočívá v tonickém nasávání vody z buňky, soli jako NaCl se ve formě jednotlivých iontů mohou dostávat přes bariéru tvořenou membránou skrze iontové kanály a jejich účinek může poté být komplexnější (Richter et al., 2007).

Pomocí experimentů v podmínkách změněné makromolekulární přeplněnosti prostředí (crowdingu) jsme ukázali, že chování Polycomb tělísek neodpovídá chování typických jaderných tělísek. Zatímco typická jaderná tělíska jako jsou PML tělíska a jadérka (Hancock, 2004; Hancock, 2004; Chen et al., 2008) nebo Cajalova tělíska (Obr. 27) jsou

zachovávána a vlivem hypertonického prostředí udržována (Hancock, 2004), proteiny PRC1 komplexu jsou v tomto prostředí uvolňovány z chromatinu a Polycomb tělíska jako nahromadění Polycomb proteinů mizí. Naše výsledky však současně ukazují, že chromatinová doména v místech původních Polycomb tělísek zůstává zachována, včetně zachování H3K27me3 histonové modifikace. Tato zjištění tak jasně dokumentují chromatinovou podstatu Polycomb tělísek.

Ukázali jsme také, že změny vyvolané hypertonicitou prostředí jsou reverzibilní. Obnovení původního Polycomb obrazu po návratu buněk do izotonického prostředí a jejich schopnost dlouhodobě přežít a proliferovat bez detekovatelných morfologických změn je v souladu s publikovanými výsledky, že vystavení buněk hyperosmolárnímu prostředí na omezený čas nezpůsobuje zjevné trvalé poškození buněk (např. Richter et al., 2007).

Uvolnění PRC1 proteinů z chromatinu se současným zachováním kompaktace dané chromatinové oblasti vyvolává otázku, zda jsou Polycomb proteiny nezbytné pro udržování kompaktace umlčeného chromatinu. Protože samo zvýšení makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky vyvolává kompaktaci chromatinových struktur (Hancock, 2004) a mohlo by tedy stát i za udržováním kompaktace chromatinu v místech původních Polycomb tělísek, provedli jsme experimenty využívající uvolnění PRC1 proteinů z chromatinu pomocí barvičky DRAQ5 (Mari et al., 2010; Richard et al., 2011). Tato DNA barvička uvolňuje na chromatin vázané proteiny do interchromatinového prostoru, aniž by měla vliv na kondenzaci chromatinových struktur. Skutečnost, že BMI1 protein je barvičkou DRAQ5 uvolňován z chromatinu jsme odhalili při výzkumu Polycomb proteinů. Schopnost DRAQ5 uvolňovat proteiny z chromatinu však byla popsána již dříve v literatuře (Mari et al., 2010; Richard et al., 2011). Původně slibná vitální DNA barvička, navíc s fluorescencí na pomezí červené a infračervené oblasti, se ukázala být nepoužitelnou pro *in vivo* barvení

z důvodu její schopnosti uvolňovat proteiny z chromatinu a zastavovat některé buněčné procesy, což v konečném důsledku vede až ke smrti buňky (Richard et al., 2011). To vše činí DRAQ5 barvičku nepoužitelnou ke sledování DNA v *in vivo* experimentech. V našich experimentech jsme naopak schopnosti DRAQ5 uvolňovat proteiny z chromatinu využili.

Ukázali jsme, že kompaktace chromatinu v původních Polycomb těliscích zůstává zachována i při uvolnění PRC1 proteinů pomocí DRAQ5. Na rozdíl od uvolnění PRC1 proteinů z chromatinu pomocí působení hypertonického prostředí, při použití DRAQ5 barvičky není hyperkondenzace chromatinu v místech původních Polycomb tělísek udržována zvýšenou makromolekulární přeplněností vnitřního prostředí buňky. Ačkoliv není známo, co udržuje tuto kompaktaci, naše výsledky naznačují, že pro udržování kompaktace chromatinu v Polycomb tělísku není bezpodmínečně nutná přítomnost Polycomb proteinů v dané oblasti. V této souvislosti je vhodné zmínit, že ani přítomnost H3K27me3 není nezbytná pro udržování chromatinu v kompaktovaném stavu, jak bylo ukázáno v *in vitro* experimentech (Chandra et al., 2012).

Vystavení buněk hypertonickému prostředí vede k výrazným změnám v organizaci buněčného jádra a ke zvýšení makromolekulární přeplněnosti buněčného prostředí. To obecně vede k posilování interakcí mezi různými makromolekulami (Minton, 2006; Bancaud et al., 2009). Pomocí Western blot analýzy jsme zjistili, že uvolnění BMI1 a RING1a proteinu z vazby na chromatin je spojeno s jejich současnou fosforylací. Vystavení buněk hypertonickému prostředí tedy pravděpodobně nepředstavuje bezprostřední příčinu uvolnění PRC1 proteinů z chromatinu. Pravděpodobnější se jeví hypotéza, podle které jsou proteiny uvolňovány v důsledku jejich hyperfosforylace, která je způsobena regulačními mechanismy buněk. Již v minulosti bylo prokázáno, že fosforylace představuje obecný buněčný mechanismus uvolňování na chromatin vázaných proteinů, včetně PRC1 proteinů

(Niessen et al., 2009). Fosforylace spojená s disociací BMI1 proteinu z chromatinu byla navíc pozorována v U-2 OS buněčné linii overexprimující MAPK aktivovanou kinázu 3 (Voncken et al., 2005) nebo v buňkách nacházejících se v mitóze (Voncken et al., 1999). Podobnost morfologických změn chromatinu mezi hypertonickým ovlivněním a mitózou byla rovněž ukázána skupinou profesora Robbinse (Pederson and Robbins, 1970; Robbins et al., 1970).

5.3. IMPDH2 inkluze

Inhibice IMPDH proteinů je rutinně používána v lidské medicíně (Petrelli et al., 2013). Přesto v této oblasti zůstává řada základních biologických procesů zatím nevyjasněna. S cílem přispět ke znalostem v této oblasti jsme pomocí mikroskopických a molekulárně biologických metod studovali změny v distribuci IMPDH2 proteinu v buňce po jeho inhibici specifickými inhibitory. Zaměřili jsme se také na určení ultrastruktury inkluzí tvořených inhibovaným IMPDH2 proteinem.

Zjistili jsme, že inkluze tvořené IMPDH2 proteinem po jeho inhibici jsou volně uloženy v cytoplazmě, tj. že nejsou obklopeny biologickou membránou. Jednotlivé R&R inkluze jsou tvořeny dlouhými, téměř paralelními vlákny. Prostory mezi vlákny jsou maximálně 15 nm široké a jsou vyplněny elektron lucentní, homogenní hmotou, která neobsahuje ribozomy nebo cytoplazmatické organely. Jednotlivá vlákna jsou široká přibližně 9 nm a jsou tvořena podjednotkami o přibližné délce 11 nm. V minulosti byly obdobné vláknité inkluze s tvarem podobným R&R inkluzím nalezeny pomocí monoklonální protilátky v savčích buňkách rozmražených bezprostředně před pokusem (Willingham et al., 1987). Antigen rozeznávaný touto protilátkou byl nazván „Nematin“, protože nalezené struktury svým tvarem připomínaly červy. Antigen však nebyl blíže

identifikován a protože původní monoklonální protilátka již není k dispozici, můžeme pouze spekulovat, zda se v případě antigenu „Nematin“ jednalo o IMPDH2 protein.

Schopnost různých metabolických enzymů vytvářet makromolekulární komplexy je stále více zdokumentována (shrnutí v O'Connell et al., 2012). Schopnost tvorby těchto makromolekulárních komplexů je navíc fylogeneticky velmi dobře zachována. Podobné komplexy a inkluze lze nalézt mezi fylogeneticky velmi vzdálenými organismy, od bakterií, přes červy a hmyz až k savcům (Ingerson-Mahar et al., 2010; Liu, 2010; Noree et al., 2010; Carcamo et al., 2011; Chen et al., 2011; Liu, 2011). Ačkoliv fylogenetické zachování schopnosti enzymů vytvářet makromolekulární struktury zjevně naznačuje důležitou funkci nebo regulační schopnost spojenou s jejich vytvářením, přesný účel tvorby těchto komplexů není dosud znám. Některé teorie pak předpokládají, že u některých proteinů, například aktinu, schopnost tvorby dlouhých vláken během evoluce postupně převážila a původní enzymatická funkce prakticky zanikla, zatímco u jiných enzymatická funkce dominuje a až v poslední době je odhalována jejich schopnost tvorby vláknitých struktur (O'Connell et al., 2012).

Naše výsledky ukazující schopnost IMPDH2 proteinu tvořit inkluze pod vlivem zvýšené makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky jsou zároveň v souladu s konceptem samoorganizace buněčných struktur (Minton, 2006; Dunder and Misteli, 2010). V buňkách vystavených hypertonickému prostředí došlo k vytvoření inkluzí IMPDH2 proteinu velmi podobných těm vytvořených po přidání specifického IMPDH inhibitoru. Tento fakt svědčí o samoorganizační schopnosti IMPDH2 proteinu, která není závislá na inhibici pomocí specifických IMPDH inhibitorů. Jde o přímou odpověď na změnu makromolekulární přeplněnosti prostředí (Ellis, 2001). Samotné zvýšení makromolekulární přeplněnosti prostředí je pak schopno vyvolat tvorbu IMPDH2 inkluzí.

Často se cytoplazmatické inkluze vytvářejí v buňce, ve které došlo k výraznému zvýšení exprese určitého proteinu oproti normálnímu stavu. Takto vytvořené akumulace proteinu jsou na rozdíl od R&R inkluzí většinou kulovitěho tvaru a v nich nahromaděný protein nemá zpravidla vláknité uspořádání (Kopito, 2000; Markossian and Kurganov, 2004). Pomocí Western blot analýzy jsme ukázali, že u IMPDH2 proteinu dochází po inhibici ribavirinem pouze k nevýraznému nárůstu jeho množství v buňce. Zároveň se v případě R&R inkluzí jedná o velmi organizované struktury s pravidelným uspořádáním jednotlivých podjednotek. Tyto výsledky svědčí o tom, že tvorba inkluzí IMPDH2 proteinem je zjevně základní a integrální vlastností tohoto proteinu a nejedná se pravděpodobně o nahromadění z jeho nadbytku.

Enzymatická funkce IMPDH2 proteinu, tj. syntéza guanosinu, probíhá v cytoplasmě. Naše výsledky však ukazují, že IMPDH2 protein je v nezanedbatelném množství přítomen i v buněčném jádře. Navíc tato jaderná frakce má po inhibici specifickými inhibitory schopnost vytvářet makromolekulární Rod inkluze. Přítomnost IMPDH proteinů v jádře je ve shodě s předchozími imunoprecipitačními experimenty (McLean et al., 2004), které ukazují schopnost IMPDH proteinů vázat RNA a DNA. Protože IMPDH proteiny mají schopnost vázat převážně jednořetězcové molekuly RNA nebo DNA, předpokládá se jejich funkce v procesech replikace nebo transkripce DNA (Cornuel et al., 2002; McLean et al., 2004; Kozhevnikova et al., 2012). Není však známo, jakým mechanismem se IMPDH proteiny dostávají do jádra, neboť neobsahují žádný známý jaderný lokalizační signál (McLean et al., 2004). Byla však ukázána asociace IMPDH proteinů s místy aktivní transkripce v *S. cerevisiae* (Park and Ahn, 2010). IMPDH se pravděpodobně váže k transkripčnímu komplexu pomocí fosforylace na serinu 2 C-terminální domény RNA polymerázy II (Park and Ahn, 2010). Ve většině článků o IMPDH proteinech není bohužel

přesněji specifikováno, které izoformy se dané zjištění týká. Nicméně schopnost IMPDH proteinů fungovat jako DNA-vázající transkripční inhibitor je spíše spojována s IMPDH1 izoenzymem (Kozhevnikova et al., 2012). Bylo také ukázáno, že funkční rozdíly mezi jednotlivými izoenzymy IMPDH 1 a 2 vycházejí pouze z jejich koncové domény, která nemá enzymatickou funkci (Thomas et al., 2012). V naší práci jsme ukázali, že změna lokalizace IMPDH proteinu po jeho inhibici se týká převážně jeho IMPDH2 formy. Z experimentů provedených za použití různých protilátek jak proti IMPDH1 tak IMPDH2 proteinu vyplývá, že jednotlivé námi použité protilátky vykazují minimální zkříženou reaktivitu (výsledky nejsou ukázány). Proto o těchto inkluzích hovoříme jako o IMPDH2 inkluzích.

Ukázali jsme, že ultrastruktura IMPDH2 inkluzí je shodná u cytoplazmatických Rods i Rings, jakož i jaderných Rod inkluzí. Jaderná inkluze je však přímější a téměř nikdy se nejedná o strukturu tvaru „Ring“, což je pravděpodobně způsobeno prostorovým uspořádáním molekulárně přeplněného buněčného jádra. Skutečnost, že vůbec IMPDH2 inkluze v buněčném jádře vzniká, svědčí pravděpodobně pro jistou dynamiku IMPDH2 proteinu uvnitř jádra. Ačkoliv se první cytoplazmatické inkluze objevují v průběhu jedné minuty po přidání inhibitoru do média, jaderná forma se objevuje vždy později. Je však málo pravděpodobné, že by toto časové opoždění tvorby jaderných struktur bylo způsobeno pomalým pronikáním inhibitoru do buněčného jádra, protože se jedná o membránově volně propustnou chemickou látku (Petrelli et al., 2013). Pravděpodobnější je, že jaderná frakce IMPDH2 proteinu je dočasně imobilizována vazbou na DNA nebo RNA (Kozhevnikova et al., 2012). Po jejím uvolnění se IMPDH2 dostává do nově tvořené inkluze, kde zůstává již dlouhodobě imobilizována.

Ačkoliv funkce IMPDH proteinů v jádře není zatím definitivně objasněna, změnou lokalizace IMPDH2 proteinu do inkluzí je jeho normální jaderná funkce prakticky

znemožněna. Funkce jaderné IMPDH2 se na základě našich výsledků z Western blot analýzy jeví být pro buňku důležitá, protože na pokles difúzní jaderné formy IMPDH2 proteinu buňka reaguje jeho zvýšeným importem do jádra. Mechanismus tohoto jevu však není znám.

Výsledky dosažené během řešení této dizertační práce rozšiřují naše znalosti organizace buněčného jádra. Jednotlivé hlavní výsledky jsou diskutovány v následující kapitole.

6. Závěrečná diskuze

Buněčné jádro je vysoce kompartmentalizovanou buněčnou organelou, která je členěna do strukturně a funkčně oddělených subkompartmentů. Jaderné subkompartmenty svým složením vytvářejí specifické mikroprostředí vhodné pro v něm probíhající procesy. Výzkum jaderné kompartmentalizace je klíčový pro pochopení procesů probíhajících v buněčném jádře, jako jsou replikace DNA, opravy DNA, genová exprese nebo její umlčování zahrnující vlastní transkripci nebo posttranskripční úpravy včetně sestřihu RNA. Buněčné jádro je bezpochyby nejsložitější buněčnou organelou, což zásadním způsobem ztěžuje výzkum jádra jako celku. Výzkum jednotlivých jaderných subkompartmentů, jejich struktury, složení a funkce však postupně napomáhají odkrytí komplexní organizace a fungování buněčného jádra.

V této práci byl největší důraz kladen na morfologickou charakteristiku vybraných jaderných subkompartmentů. Použitím moderních zobrazovacích metod, ale i dalších metod buněčné biologie, jsme řešili otázky související s funkcí MCM proteinů v procesu replikace DNA, s odhalováním strukturní podstaty Polycomb tělísek nebo s charakterizací inkluzí vytvářených IMPDH2 proteinem po jeho inhibici. Naše výsledky přispěly k rozšíření dosavadních znalostí o existenci, struktuře a uspořádání vybraných jaderných subkompartmentů a jejich vzájemném vztahu.

Naším důležitým výsledkem byl průkaz přítomnosti MCM2-7 komplexu v místech replikace DNA. Funkce MCM proteinů jako DNA helikázy byla na základě *in vitro* studií předpokládána již od jejich objevení (Tye, 1999; Forsburg, 2004; Bochman and Schwacha, 2009). Avšak aby MCM2-7 komplex mohl fungovat jako DNA helikáza během replikace DNA *in vivo*, musí se nacházet v blízkosti replikační vidličky. Před zveřejněním naší práce však nebyl MCM2-7 komplex fluorescenční mikroskopií nikdy detekován v místech aktivní

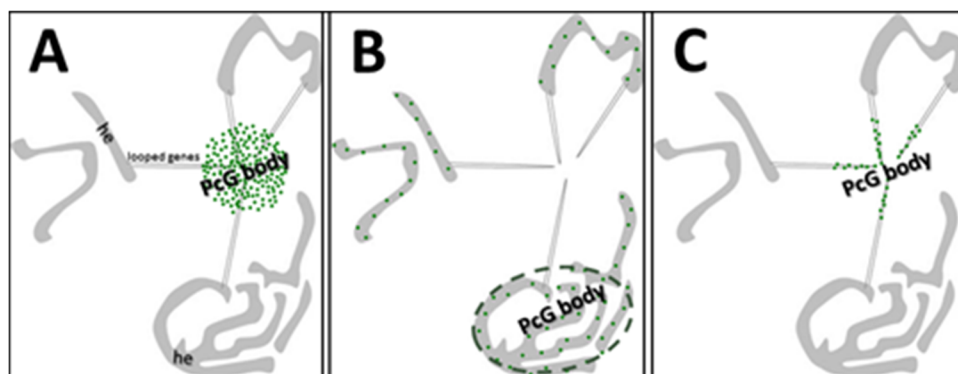
replikace. To vedlo k formulaci tzv. MCM paradoxu (Dimitrova et al., 1999; Das et al., 2014). V naší práci jsme fluorescenční mikroskopií spojenou s CCF analýzou na buňkách extrahovaných před fixací prokázali, že malá, avšak nezanedbatelná frakce MCM proteinů zůstává asociována s aktivní replikací, a to prakticky po celou dobu S fáze. Naše výsledky dokládají, že MCM proteiny jsou přítomny v blízkosti replikační vidličky a mohou tedy fungovat jako předpokládaná eukaryotická DNA helikáza. V minulosti byla také vyslovena hypotéza, podle které MCM2-7 komplex uplatňuje svoji helikázovou aktivitu na velkou vzdálenost (Aparicio et al., 1997; Ritzi et al., 1998; Claycomb et al., 2002; Laskey and Madine, 2003; Calzada et al., 2005; Pacek et al., 2006). Naše výsledky však naznačují, že tato vzdálenost nepřesahuje 200 nm.

Dalším studovaným subkompartmentem bylo Polycomb tělísko. Polycomb tělíska jsou některými autory, spolu s dalšími jadernými útvary, řazena mezi tzv. sirotčí tělíska, čímž je míněno opomíjené a málo prostudované jaderné subkompartmenty (Carmo-Fonseca et al., 2010). Ačkoliv nebyla známa jejich ultrastruktura, Polycomb tělíska byla považována za typická jaderná tělíska (Cavalli, 2007). Na základě těchto výsledků byl vytvořen model, ve kterém Polycomb tělísko představuje nakupení Polycomb proteinů v interchromatinovém prostoru a funguje jako tzv. umlčující továrna (Obr. 41 A, Bantignies and Cavalli, 2011; Bantignies et al., 2011). Do těchto umlčujících továren měly být podle tohoto modelu aktivně směřovány geny ve formě dlouhých smyček DNA, aby zde mohly být transkripčně umlčeny. Naše práce využívající korelační světelnou a elektronovou mikroskopii však ukázala, že Polycomb tělíska nejsou jadernými tělísky, ale jsou chromatinovými doménami tvořenými nakupením heterochromatinových struktur v určitém prostoru buněčného jádra (Smigova et al., 2011). Tento výsledek byl navíc podpořen našimi experimenty využívajícími změn makromolekulární přeplněnosti

prostředí. Ukázali jsme, že chování Polycomb tělísek se významně liší od chování typických jaderných tělísek a že Polycomb tělíska nepředstavují subkompartment založený na proteinové bázi (Smigova et al., 2013). Na základě našich výsledků jsme sestavili model, který předpokládá nahromadění heterochromatinových struktur s navázanými Polycomb proteiny v prostoru jádra (Obr. 41 B).

Později byl vytvořen další model Polycomb tělíska, který je modifikací modelu prvního (Obr. 41 C; Cheutin and Cavalli, 2012). V tomto modelu se geny s navázanými Polycomb proteiny sbíhají ve formě smyček chromatinu v Polycomb těliscích a tím vzniká nahromadění Polycomb proteinů v prostoru (Cheutin and Cavalli, 2012). Tento model však neodpovídá našemu zjištění, že Polycomb tělíska je na DNA velmi bohatý subkompartment. Příčiny nahromadění velkých svazků heterochromatinu v modelu B nebo tenkých smyček genů v modelu C (Obr. 41 B a C) však stále zůstávají neodhaleny.

Jedna z předpokládaných funkcí Polycomb proteinů je také kompaktace jimi umlčených úseků DNA (Wang et al., 2004; Cao et al., 2005; Martin-Perez et al., 2010).



Obrázek č. 41: Různé modely Polycomb tělíska

(A) Polycomb tělíska jako umlčující továrna je lokalizováno do interchromatinového prostoru a geny, které mají být umlčeny, se k němu sbíhají ve formě dlouhých chromatinových smyček. **(B)** Polycomb tělíska odpovídá nahromadění heterochromatinových struktur s navázanými Polycomb proteiny v prostoru. **(C)** Polycomb tělíska jako nahromadění jednotlivých Polycomb proteiny umlčených genů. Zdroj obrázku: (Smigova et al., 2014)

Schopnost Polycomb proteinů kompaktovat izolované chromatinové vlákno byla prokázána *in vitro* (Francis et al., 2004; Grau et al., 2011). Naše výsledky však ukazují, že pro udržování existující chromatinové kompaktace již nejsou Polycomb proteiny z PRC1 komplexu nezbytné.

Dále jsme pomocí korelační světelné a elektronové mikroskopie popsali ultrastrukturu buněčných inkluzí tvořených inhibovaným IMPDH2 proteinem (Juda et al., 2014). Zároveň jsme mikroskopickými metodami a Western blot analýzou lépe popsali jadernou frakci IMPDH2 proteinu a objevili novou jadernou inkluzi tvořenou inhibovaným IMPDH2 enzymem, lokalizovanou do interchromatinového prostoru jádra. Ukázali jsme, že cytoplazmatické i jaderné inkluze mají shodnou ultrastrukturu a jsou tvořeny jednotlivými vlákny složenými z IMPDH2 proteinu. Schopnost vytvářet nové subkompartmenty typu inkluzí s vláknitým charakterem se ukazuje jako typická pro stále větší počet proteinů (O'Connell et al., 2012). Význam tvorby těchto makromolekulárních struktur však není často jasný. Otázkou zejména je, zda IMPDH2 inkluze fungují jen jako úložiště inhibovaného enzymu nebo se naopak jedná o vysoce aktivní subkompartment, jehož účelem je regulace enzymatické funkce IMPDH2 proteinu podobně jako v případě urát oxidázy. Aktivita urát oxidázy se totiž vytvářením makromolekulárních struktur několikanásobně zvyšuje (Angermuller et al., 1987).

7. Závěry

- Robustní statistickou metodou využívající kros-korelační funkci jsme analyzovali imunofluorescenční výsledky lokalizace MCM2 proteinu a jejich vztah k replikačním ohniskům během S fáze. Ukázali jsme, že ačkoliv většina detekovatelného signálu na chromatin vázaného MCM2 proteinu není lokalizována v místech aktivní replikace DNA, existuje nezanedbatelná frakce MCM2 proteinu asociovaná s aktivní replikací po celou dobu trvání S fáze. Náš výsledek přispívá k vysvětlení tzv. MCM paradoxu.
- Korelační světelnou a elektronovou mikroskopií jsme určili ultrastrukturu Polycomb tělísek. Naše výsledky ukazují, že Polycomb tělíska nepředstavují jaderná tělíska v interchromatinovém prostoru. Polycomb tělíska jsou tvořena prostorovým nahromaděním heterochromatinových struktur obsahujících Polycomb proteiny.
- Použitím několika různých přístupů využívajících změn v makromolekulární přeplněnosti vnitřního prostředí buňky jsme potvrdili, že Polycomb tělíska mají chromatinovou a ne proteinovou podstatu.
- Detailně jsme v savčích buňkách popsali ultrastrukturu R&R inkluzí tvořených IMPDH2 proteinem po jeho inhibici. Ukázali jsme, že R&R inkluze mají vláknitý charakter s jednotlivými vlákny obsahujícími pravidelně se opakující podjednotky IMPDH2.
- Vizualizovali jsme jadernou frakci IMPDH2 proteinu v savčích buňkách. Zjistili jsme, že po inhibici IMPDH2 proteinu vytváří také tato jeho jaderná frakce dosud nepopsanou jadernou Rod inkluzi, kterou jsme popsali a určili její ultrastrukturu a zjistili jsme, že její vnitřní uspořádání je shodné s uspořádáním cytoplasmatických R&R inkluzí.

8. Seznam použité literatury

- Albiez H., Cremer M., Tiberi C., Vecchio L., Schermelleh L., Dittrich S., Kupper K., Joffe B., Thormeyer T., von Hase J., Yang S., Rohr K., Leonhardt H., Solovei I., Cremer C., Fakan S. and Cremer T. (2006). "Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks." *Chromosome Res* 14(7): 707-33.
- Alkema M. J., Bronk M., Verhoeven E., Otte A., van 't Veer L. J., Berns A. and van Lohuizen M. (1997). "Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex." *Genes Dev* 11(2): 226-40.
- Allison A. C. and Eugui E. M. (2000). "Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action." *Immunopharmacology* 47(2-3): 85-118.
- Allison A. C., Hovi T., Watts R. W. and Webster A. D. (1977). "The role of de novo purine synthesis in lymphocyte transformation." *Ciba Found Symp*(48): 207-24.
- Angermuller S., Bruder G., Volkl A., Wesch H. and Fahimi H. D. (1987). "Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study." *Eur J Cell Biol* 45(1): 137-44.
- Aparicio O. M., Weinstein D. M. and Bell S. P. (1997). "Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase." *Cell* 91(1): 59-69.
- Bancaud A., Huet S., Daigle N., Mozziconacci J., Beaudouin J. and Ellenberg J. (2009). "Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin." *EMBO J* 28(24): 3785-98.
- Bantignies F. and Cavalli G. (2011). "Polycomb group proteins: repression in 3D." *Trends Genet* 27(11): 454-64.
- Bantignies F., Roure V., Comet I., Leblanc B., Schuettengruber B., Bonnet J., Tixier V., Mas A. and Cavalli G. (2011). "Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*." *Cell* 144(2): 214-26.
- Baraldi P. G., Nunez Mdel C., Espinosa A. and Romagnoli R. (2004). "Distamycin A as stem of DNA minor groove alkylating agents." *Curr Top Med Chem* 4(2): 231-9.
- Bell S. D. and Botchan M. R. (2013). "The minichromosome maintenance replicative helicase." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(11): a012807.
- Bell S. P. and Dutta A. (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* 71: 333-74.
- Blow J. J. and Ge X. Q. (2008). "Replication forks, chromatin loops and dormant replication origins." *Genome Biol* 9(12): 244.

- Bochman M. L. and Schwacha A. (2009). "The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase." *Microbiol Mol Biol Rev* 73(4): 652-83.
- Calzada A., Hodgson B., Kanemaki M., Bueno A. and Labib K. (2005). "Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork." *Genes Dev* 19(16): 1905-19.
- Cao R., Tsukada Y. and Zhang Y. (2005). "Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing." *Mol Cell* 20(6): 845-54.
- Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R. S. and Zhang Y. (2002). "Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing." *Science* 298(5595): 1039-43.
- Cao R. and Zhang Y. (2004). "The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3." *Curr Opin Genet Dev* 14(2): 155-64.
- Carcamo W. C., Calise S. J., von Muhlen C. A., Satoh M. and Chan E. K. (2014). "Molecular cell biology and immunobiology of mammalian rod/ring structures." *Int Rev Cell Mol Biol* 308: 35-74.
- Carcamo W. C., Satoh M., Kasahara H., Terada N., Hamazaki T., Chan J. Y., Yao B., Tamayo S., Covini G., von Muhlen C. A. and Chan E. K. (2011). "Induction of cytoplasmic rods and rings structures by inhibition of the CTP and GTP synthetic pathway in mammalian cells." *PLoS One* 6(12): e29690.
- Carmo-Fonseca M., Berciano M. T. and Lafarga M. (2010). "Orphan nuclear bodies." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(9): a000703.
- Cavalli G. (2007). "Chromosome kissing." *Curr Opin Genet Dev* 17(5): 443-50.
- Claycomb J. M., MacAlpine D. M., Evans J. G., Bell S. P. and Orr-Weaver T. L. (2002). "Visualization of replication initiation and elongation in *Drosophila*." *J Cell Biol* 159(2): 225-36.
- Comet I., Schuettengruber B., Sexton T. and Cavalli G. (2011). "A chromatin insulator driving three-dimensional Polycomb response element (PRE) contacts and Polycomb association with the chromatin fiber." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2294-9.
- Cornuel J. F., Moraillon A. and Gueron M. (2002). "Participation of yeast inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in an in vitro complex with a fragment of the C-rich telomeric strand." *Biochimie* 84(4): 279-89.
- Costa A. and Onesti S. (2009). "Structural biology of MCM helicases." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44(5): 326-42.
- Cremer T. and Cremer C. (2001). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." *Nat Rev Genet* 2(4): 292-301.
- Cremer T. and Cremer M. (2010). "Chromosome territories." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(3): a003889.

- Cremer T., Kreth G., Koester H., Fink R. H., Heintzmann R., Cremer M., Solovei I., Zink D. and Cremer C. (2000). "Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10(2): 179-212.
- Cremer T., Kupper K., Dietzel S. and Fakan S. (2004). "Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function." *Biol Cell* 96(8): 555-67.
- Czermin B., Melfi R., McCabe D., Seitz V., Imhof A. and Pirrotta V. (2002). "Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites." *Cell* 111(2): 185-96.
- Das M., Singh S., Pradhan S. and Narayan G. (2014). "MCM Paradox: Abundance of Eukaryotic Replicative Helicases and Genomic Integrity." *Mol Biol Int* 2014: 574850.
- Davey M. J., Indiani C. and O'Donnell M. (2003). "Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexameric subunit arrangement, and ATP site architecture." *J Biol Chem* 278(7): 4491-9.
- Dellavance A., Gabriel Júnior A., Nuccitelli B., Taliberti B. H., von Mühlen C. A., Bichara C. D. A., Santos C. H. R. d., Bueno C., Yano C. M., Manguiera C. L. P., Carvalho D. G., Cardoso E., Bonfá E., Araújo F. I. e., Rassi G. G., Mundim H. M., Bendet I., Rego J., Vieira L. M. E. d. A., Andrade L. E. C., Barbosa M. O. F., Sugiyama M., Santiago M. B., Shessarenko N., Silva N. A. d., Francescantonio P. L. C., Jarach R., Suda R., Levy R. A., Sampaio S. O., Neves S. P. F., Cruvinel W. d. M., Santos W. S. d. and Nóbrega Y. K. d. M. (2009). "3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN): recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas." *Revista Brasileira de Reumatologia* 49: 89-98.
- Di Croce L. and Helin K. (2013). "Transcriptional regulation by Polycomb group proteins." *Nat Struct Mol Biol* 20(10): 1147-55.
- Dimitrova D. S., Todorov I. T., Melendy T. and Gilbert D. M. (1999). "Mcm2, but not RPA, is a component of the mammalian early G1-phase prereplication complex." *J Cell Biol* 146(4): 709-22.
- Dubochet J. and Noll M. (1978). "Nucleosome arcs and helices." *Science* 202(4365): 280-6.
- Dundr M. (2012). "Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome." *Curr Opin Cell Biol* 24(3): 415-22.
- Dundr M. and Misteli T. (2010). "Biogenesis of nuclear bodies." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12): a000711.
- Edward R. (2009). "Use of DNA-specific anthraquinone dyes to directly reveal cytoplasmic and nuclear boundaries in live and fixed cells." *Mol Cells* 27(4): 391-6.

- Edwards M. C., Tutter A. V., Cvetic C., Gilbert C. H., Prokhorova T. A. and Walter J. C. (2002). "MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts." *J Biol Chem* 277(36): 33049-57.
- Ellis R. J. (2001). "Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment." *Curr Opin Struct Biol* 11(1): 114-9.
- Enderle D., Beisel C., Stadler M. B., Gerstung M., Athri P. and Paro R. (2011). "Polycomb preferentially targets stalled promoters of coding and noncoding transcripts." *Genome Res* 21(2): 216-26.
- Everett R. D. (2013). "The spatial organization of DNA virus genomes in the nucleus." *PLoS Pathog* 9(6): e1003386.
- Fauvarque M. O. and Dura J. M. (1993). "polyhomeotic regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in *Drosophila*." *Genes Dev* 7(8): 1508-20.
- Fey E. G., Krochmalnic G. and Penman S. (1986). "The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy." *J Cell Biol* 102(5): 1654-65.
- Finch J. T., Lutter L. C., Rhodes D., Brown R. S., Rushton B., Levitt M. and Klug A. (1977). "Structure of nucleosome core particles of chromatin." *Nature* 269(5623): 29-36.
- Forsburg S. L. (2004). "Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(1): 109-31.
- Francescantonio P. L., Cruvinel Wde M., Dellavance A., Andrade L. E., Taliberti B. H., von Muhlen C. A., Bichara C. D., Bueno C., Mangueira C. L., Carvalho D. G., Bonfa E. S., Brito Fde A., Araujo F. I., Rego J., Pereira K. M., dos Anjos L. M., Bissoli Mde F., Santiago M. B., Maluf N. Z., Alvarenga R. R., Neves S. P., Valim V. and dos Santos W. S. (2014). "IV Brazilian guidelines for autoantibodies on HEP-2 cells." *Rev Bras Reumatol* 54(1): 44-50.
- Francis N. J., Kingston R. E. and Woodcock C. L. (2004). "Chromatin compaction by a polycomb group protein complex." *Science* 306(5701): 1574-7.
- Fricker M., Hollinshead M., White N. and Vaux D. (1997). "Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope." *J Cell Biol* 136(3): 531-44.
- Galal W. C., Kang Y. H. and Hurwitz J. (2012). "Establishing the human rolling circle reaction." *Cell Cycle* 11(15): 2771-2.
- Gambus A., Jones R. C., Sanchez-Diaz A., Kanemaki M., van Deursen F., Edmondson R. D. and Labib K. (2006). "GIN5 maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks." *Nat Cell Biol* 8(4): 358-66.

- Gibson S. I., Surosky R. T. and Tye B. K. (1990). "The phenotype of the minichromosome maintenance mutant *mcm3* is characteristic of mutants defective in DNA replication." *Mol Cell Biol* 10(11): 5707-20.
- Gilbert D. M. (2010). "Evaluating genome-scale approaches to eukaryotic DNA replication." *Nat Rev Genet* 11(10): 673-84.
- Grau D. J., Chapman B. A., Garlick J. D., Borowsky M., Francis N. J. and Kingston R. E. (2011). "Compaction of chromatin by diverse Polycomb group proteins requires localized regions of high charge." *Genes Dev* 25(20): 2210-21.
- Gunster M. J., Satijn D. P., Hamer K. M., den Blaauwen J. L., de Bruijn D., Alkema M. J., van Lohuizen M., van Driel R. and Otte A. P. (1997). "Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic." *Mol Cell Biol* 17(4): 2326-35.
- Gunter J. H., Thomas E. C., Lengefeld N., Kruger S. J., Worton L., Gardiner E. M., Jones A., Barnett N. L. and Whitehead J. P. (2008). "Characterisation of inosine monophosphate dehydrogenase expression during retinal development: differences between variants and isoforms." *Int J Biochem Cell Biol* 40(9): 1716-28.
- Gurard-Levin Z. A. and Almouzni G. (2014). "Histone modifications and a choice of variant: a language that helps the genome express itself." *F1000Prime Rep* 6: 76.
- Hancock R. (2004). "Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model." *Biol Cell* 96(8): 595-601.
- Hancock R. (2004). "A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus." *J Struct Biol* 146(3): 281-90.
- Hedstrom L. (2009). "IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition." *Chem Rev* 109(7): 2903-28.
- Hedstrom L. and Gan L. (2006). "IMP dehydrogenase: structural schizophrenia and an unusual base." *Curr Opin Chem Biol* 10(5): 520-5.
- Hennig L. and Derkacheva M. (2009). "Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players?" *Trends Genet* 25(9): 414-23.
- Hernandez-Munoz I., Taghavi P., Kuijl C., Neefjes J. and van Lohuizen M. (2005). "Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1." *Mol Cell Biol* 25(24): 11047-58.
- Hesketh E. L., Knight J. R., Wilson R. H., Chong J. P. and Coverley D. (2015). "Transient association of MCM complex proteins with the nuclear matrix during initiation of mammalian DNA replication." *Cell Cycle* 14(3): 333-41.
- Hofmann W. P., Herrmann E., Sarrazin C. and Zeuzem S. (2008). "Ribavirin mode of action in chronic hepatitis C: from clinical use back to molecular mechanisms." *Liver Int* 28(10): 1332-43.

- Huberman J. A. and Riggs A. D. (1966). "Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 55(3): 599-606.
- Hyrien O., Marheineke K. and Goldar A. (2003). "Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem." *Bioessays* 25(2): 116-25.
- Chandra T., Kirschner K., Thuret J. Y., Pope B. D., Ryba T., Newman S., Ahmed K., Samarajiwa S. A., Salama R., Carroll T., Stark R., Janky R., Narita M., Xue L., Chicas A., Nunez S., Janknecht R., Hayashi-Takanaka Y., Wilson M. D., Marshall A., Odom D. T., Babu M. M., Bazett-Jones D. P., Tavare S., Edwards P. A., Lowe S. W., Kimura H., Gilbert D. M. and Narita M. (2012). "Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation." *Mol Cell* 47(2): 203-14.
- Chen K., Zhang J., Tastan O. Y., Deussen Z. A., Siswick M. Y. and Liu J. L. (2011). "Glutamine analogs promote cytoophidium assembly in human and Drosophila cells." *J Genet Genomics* 38(9): 391-402.
- Chen T. R. (1988). "Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEP-2 karyotypes." *Cytogenet Cell Genet* 48(1): 19-24.
- Chen Y. C., Kappel C., Beaudouin J., Eils R. and Spector D. L. (2008). "Live cell dynamics of promyelocytic leukemia nuclear bodies upon entry into and exit from mitosis." *Mol Biol Cell* 19(7): 3147-62.
- Cheutin T. and Cavalli G. (2012). "Progressive polycomb assembly on H3K27me3 compartments generates polycomb bodies with developmentally regulated motion." *PLoS Genet* 8(1): e1002465.
- Chong J. P., Mahbubani H. M., Khoo C. Y. and Blow J. J. (1995). "Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system." *Nature* 375(6530): 418-21.
- Iborra F. J. (2007). "Can visco-elastic phase separation, macromolecular crowding and colloidal physics explain nuclear organisation?" *Theor Biol Med Model* 4: 15.
- Ilves I., Petojevic T., Pesavento J. J. and Botchan M. R. (2010). "Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins." *Mol Cell* 37(2): 247-58.
- Ingerson-Mahar M., Briegel A., Werner J. N., Jensen G. J. and Gitai Z. (2010). "The metabolic enzyme CTP synthase forms cytoskeletal filaments." *Nat Cell Biol* 12(8): 739-46.
- Juda P., Smigova J., Kovacik L., Bartova E. and Raska I. (2014). "Ultrastructure of cytoplasmic and nuclear inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 "rods and rings" inclusions." *J Histochem Cytochem* 62(10): 739-50.
- Kaufman D. B., Shapiro R., Lucey M. R., Cherikh W. S., R T. B. and Dyke D. B. (2004). "Immunosuppression: practice and trends." *Am J Transplant* 4 Suppl 9: 38-53.

- Keppeke G. D., Nunes E., Ferraz M. L., Silva E. A., Granato C., Chan E. K. and Andrade L. E. (2012). "Longitudinal study of a human drug-induced model of autoantibody to cytoplasmic rods/rings following HCV therapy with ribavirin and interferon-alpha." *PLoS One* 7(9): e45392.
- Koberna K., Ligasova A., Malinsky J., Pliss A., Siegel A. J., Cvackova Z., Fidlerova H., Masata M., Fialova M., Raska I. and Berezney R. (2005). "Electron microscopy of DNA replication in 3-D: evidence for similar-sized replication foci throughout S-phase." *J Cell Biochem* 94(1): 126-38.
- Konno Y., Natsumeda Y., Nagai M., Yamaji Y., Ohno S., Suzuki K. and Weber G. (1991). "Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines." *J Biol Chem* 266(1): 506-9.
- Kopito R. R. (2000). "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation." *Trends Cell Biol* 10(12): 524-30.
- Kornberg R. D. and Thomas J. O. (1974). "Chromatin structure; oligomers of the histones." *Science* 184(4139): 865-8.
- Kovacik L., Kereiche S., Hoog J. L., Juda P., Matula P. and Raska I. (2014). "A simple Fourier filter for suppression of the missing wedge ray artefacts in single-axis electron tomographic reconstructions." *J Struct Biol* 186(1): 141-52.
- Kozhevnikova E. N., van der Knaap J. A., Pindyurin A. V., Ozgur Z., van Ijcken W. F., Moshkin Y. M. and Verrijzer C. P. (2012). "Metabolic enzyme IMPDH is also a transcription factor regulated by cellular state." *Mol Cell* 47(1): 133-9.
- Kremer J. R., Mastronarde D. N. and McIntosh J. R. (1996). "Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD." *J Struct Biol* 116(1): 71-6.
- Krude T., Musahl C., Laskey R. A. and Knippers R. (1996). "Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication." *J Cell Sci* 109 (Pt 2): 309-18.
- Kumaran R. I., Thakar R. and Spector D. L. (2008). "Chromatin dynamics and gene positioning." *Cell* 132(6): 929-34.
- Kuzmichev A., Nishioka K., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Reinberg D. (2002). "Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein." *Genes Dev* 16(22): 2893-905.
- Labib K. and Diffley J. F. (2001). "Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase?" *Curr Opin Genet Dev* 11(1): 64-70.
- Lacroix M. (2008). "Persistent use of "false" cell lines." *Int J Cancer* 122(1): 1-4.
- Laskey R. A. and Madine M. A. (2003). "A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks." *EMBO Rep* 4(1): 26-30.

- Leduc E. H. and Wilson J. W. (1959). "An electron microscope study of intranuclear inclusions in mouse liver and hepatoma." *J Biophys Biochem Cytol* 6: 427-30.
- Leonhardt H., Rahn H. P., Weinzierl P., Sporbart A., Cremer T., Zink D. and Cardoso M. C. (2000). "Dynamics of DNA replication factories in living cells." *J Cell Biol* 149(2): 271-80.
- Liu J. L. (2010). "Intracellular compartmentation of CTP synthase in *Drosophila*." *J Genet Genomics* 37(5): 281-96.
- Liu J. L. (2011). "The enigmatic cytoophidium: compartmentation of CTP synthase via filament formation." *Bioessays* 33(3): 159-64.
- Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F. and Richmond T. J. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* 389(6648): 251-60.
- Lund A. H. and van Lohuizen M. (2004). "Polycomb complexes and silencing mechanisms." *Curr Opin Cell Biol* 16(3): 239-46.
- Magasanik B., Moyed H. S. and Gehring L. B. (1957). "Enzymes essential for the biosynthesis of nucleic acid guanine; inosine 5'-phosphate dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*." *J Biol Chem* 226(1): 339-50.
- Maine G. T., Sinha P. and Tye B. K. (1984). "Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes." *Genetics* 106(3): 365-85.
- Mari P. O., Verbiest V., Sabbioneda S., Gourdin A. M., Wijgers N., Dinant C., Lehmann A. R., Vermeulen W. and Giglia-Mari G. (2010). "Influence of the live cell DNA marker DRAQ5 on chromatin-associated processes." *DNA Repair (Amst)* 9(7): 848-55.
- Markland W., McQuaid T. J., Jain J. and Kwong A. D. (2000). "Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon." *Antimicrob Agents Chemother* 44(4): 859-66.
- Markossian K. A. and Kurganov B. I. (2004). "Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes." *Biochemistry (Mosc)* 69(9): 971-84.
- Marks P., Rifkind R. A., Richon V. M., Breslow R., Miller T. and Kelly W. K. (2001). "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies." *Nat Rev Cancer* 1(3): 194-202.
- Martin-Perez D., Piris M. A. and Sanchez-Beato M. (2010). "Polycomb proteins in hematologic malignancies." *Blood* 116(25): 5465-75.
- Martin R. M. and Cardoso M. C. (2010). "Chromatin condensation modulates access and binding of nuclear proteins." *FASEB J* 24(4): 1066-72.
- Martin R. M., Leonhardt H. and Cardoso M. C. (2005). "DNA labeling in living cells." *Cytometry A* 67(1): 45-52.

- Martinez A. M. and Cavalli G. (2006). "The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development." *Cell Cycle* 5(11): 1189-97.
- Masai H., Matsumoto S., You Z., Yoshizawa-Sugata N. and Oda M. (2010). "Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how?" *Annu Rev Biochem* 79: 89-130.
- Masata M., Malinsky J., Fidlerova H., Smirnov E. and Raska I. (2005). "Dynamics of replication foci in early S phase as visualized by cross-correlation function." *J Struct Biol* 151(1): 61-8.
- Mateos-Langerak J., Goetze S., Leonhardt H., Cremer T., van Driel R. and Lanctot C. (2007). "Nuclear architecture: Is it important for genome function and can we prove it?" *J Cell Biochem* 102(5): 1067-75.
- Matera A. G., Izaguirre-Sierra M., Praveen K. and Rajendra T. K. (2009). "Nuclear bodies: random aggregates of sticky proteins or crucibles of macromolecular assembly?" *Dev Cell* 17(5): 639-47.
- Matyugina E. S., Andreevskaya S. N., Smirnova T. G. and Khandazhinskaya A. L. (2012). "Carbocyclic analogues of inosine-5'-monophosphate: synthesis and biological activity." *Acta Naturae* 4(4): 73-7.
- McGarry T. J. and Kirschner M. W. (1998). "Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis." *Cell* 93(6): 1043-53.
- McIntosh D. and Blow J. J. (2012). "Dormant origins, the licensing checkpoint, and the response to replicative stresses." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(10).
- McLean J. E., Hamaguchi N., Belenky P., Mortimer S. E., Stanton M. and Hedstrom L. (2004). "Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids in vitro and in vivo." *Biochem J* 379(Pt 2): 243-51.
- Mechali M. (2010). "Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10): 728-38.
- Meldi L. and Brickner J. H. (2011). "Compartmentalization of the nucleus." *Trends Cell Biol* 21(12): 701-8.
- Merrill J. T. (2012). "Treatment of systemic lupus erythematosus: a 2012 update." *Bull NYU Hosp Jt Dis* 70(3): 172-6.
- Minton A. P. (2006). "Macromolecular crowding." *Curr Biol* 16(8): R269-71.
- Misteli T. (2008). "Physiological importance of RNA and protein mobility in the cell nucleus." *Histochem Cell Biol* 129(1): 5-11.
- Moshe A. and Gorovits R. (2012). "Virus-induced aggregates in infected cells." *Viruses* 4(10): 2218-32.

- Moyer S. E., Lewis P. W. and Botchan M. R. (2006). "Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27): 10236-41.
- Muller J., Hart C. M., Francis N. J., Vargas M. L., Sengupta A., Wild B., Miller E. L., O'Connor M. B., Kingston R. E. and Simon J. A. (2002). "Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex." *Cell* 111(2): 197-208.
- Nagele R. G., Freeman T., McMorrow L., Thomson Z., Kitson-Wind K. and Lee H. (1999). "Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells." *J Cell Sci* 112 (Pt 4): 525-35.
- Nair V. and Shu Q. (2007). "Inosine monophosphate dehydrogenase as a probe in antiviral drug discovery." *Antivir Chem Chemother* 18(5): 245-58.
- Natsumeda Y., Ohno S., Kawasaki H., Konno Y., Weber G. and Suzuki K. (1990). "Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase." *J Biol Chem* 265(9): 5292-5.
- Nguyen V. Q., Co C. and Li J. J. (2001). "Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms." *Nature* 411(6841): 1068-73.
- Niessen H. E., Demmers J. A. and Voncken J. W. (2009). "Talking to chromatin: post-translational modulation of polycomb group function." *Epigenetics Chromatin* 2(1): 10.
- Nishitani H. and Lygerou Z. (2002). "Control of DNA replication licensing in a cell cycle." *Genes Cells* 7(6): 523-34.
- Noree C., Sato B. K., Broyer R. M. and Wilhelm J. E. (2010). "Identification of novel filament-forming proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*." *J Cell Biol* 190(4): 541-51.
- O'Connell J. D., Zhao A., Ellington A. D. and Marcotte E. M. (2012). "Dynamic reorganization of metabolic enzymes into intracellular bodies." *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 89-111.
- Onesti S. and MacNeill S. A. (2013). "Structure and evolutionary origins of the CMG complex." *Chromosoma* 122(1-2): 47-53.
- Orlando V. and Paro R. (1995). "Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns." *Curr Opin Genet Dev* 5(2): 174-9.
- Pacek M., Tutter A. V., Kubota Y., Takisawa H. and Walter J. C. (2006). "Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication." *Mol Cell* 21(4): 581-7.
- Parada L. A., McQueen P. G. and Misteli T. (2004). "Tissue-specific spatial organization of genomes." *Genome Biol* 5(7): R44.
- Park J. H. and Ahn S. H. (2010). "IMP dehydrogenase is recruited to the transcription complex through serine 2 phosphorylation of RNA polymerase II." *Biochem Biophys Res Commun* 392(4): 588-92.

- Patton G. C., Stenmark P., Gollapalli D. R., Sevastik R., Kursula P., Flodin S., Schuler H., Swales C. T., Eklund H., Himo F., Nordlund P. and Hedstrom L. (2011). "Cofactor mobility determines reaction outcome in the IMPDH and GMPPR (beta-alpha)₈ barrel enzymes." *Nat Chem Biol* 7(12): 950-8.
- Pederson T. and Robbins E. (1970). "RNA synthesis in HeLa cells. Pattern in hypertonic medium and its similarity to synthesis during G₂-prophase." *J Cell Biol* 47(3): 734-44.
- Petrelli R., Vita P., Torquati I., Felczak K., Wilson D. J., Franchetti P. and Cappellacci L. (2013). "Novel inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase in patent literature of the last decade." *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 8(2): 103-25.
- Prasanth S. G., Mendez J., Prasanth K. V. and Stillman B. (2004). "Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1441): 7-16.
- Raska I. (1995). "Nuclear ultrastructures associated with the RNA synthesis and processing." *J Cell Biochem* 59(1): 11-26.
- Raska I., Andrade L. E., Ochs R. L., Chan E. K., Chang C. M., Roos G. and Tan E. M. (1991). "Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies." *Exp Cell Res* 195(1): 27-37.
- Raska I., Koberna K., Jarnik M., Petrasovicova V., Bednar J., Raska K., Jr. and Bravo R. (1989). "Ultrastructural immunolocalization of cyclin/PCNA in synchronized 3T3 cells." *Exp Cell Res* 184(1): 81-9.
- Raska I., Michel L. S., Jarnik M., Dundr M., Fakan S., Gasser S., Gassmann M., Hubscher U., Izaurralde E., Martinez E. and et al. (1991). "Ultrastructural cryoimmunocytochemistry is a convenient tool for the study of DNA replication in cultured cells." *J Electron Microscop Tech* 18(2): 91-105.
- Raska I., Ochs R. L., Andrade L. E., Chan E. K., Burlingame R., Peebles C., Gruol D. and Tan E. M. (1990). "Association between the nucleolus and the coiled body." *J Struct Biol* 104(1-3): 120-7.
- Richard E., Causse S., Spriet C., Fourre N., Trinel D., Darzacq X., Vandebunder B. and Heliot L. (2011). "Short exposure to the DNA intercalator DRAQ5 dislocates the transcription machinery and induces cell death." *Photochem Photobiol* 87(1): 256-61.
- Richter K., Nessling M. and Lichter P. (2007). "Experimental evidence for the influence of molecular crowding on nuclear architecture." *J Cell Sci* 120(Pt 9): 1673-80.
- Ritzi M., Baack M., Musahl C., Romanowski P., Laskey R. A. and Knippers R. (1998). "Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin." *J Biol Chem* 273(38): 24543-9.
- Robbins E., Pederson T. and Klein P. (1970). "Comparison of mitotic phenomena and effects induced by hypertonic solutions in HeLa cells." *J Cell Biol* 44(2): 400-16.

- Satijn D. P., Gunster M. J., van der Vlag J., Hamer K. M., Schul W., Alkema M. J., Saurin A. J., Freemont P. S., van Driel R. and Otte A. P. (1997). "RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor." *Mol Cell Biol* 17(7): 4105-13.
- Saurin A. J., Shiels C., Williamson J., Satijn D. P., Otte A. P., Sheer D. and Freemont P. S. (1998). "The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain." *J Cell Biol* 142(4): 887-98.
- Seelig H. P., Appelhans H., Bauer O., Bluthner M., Hartung K., Schranz P., Schultze D., Seelig C. A. and Volkmann M. (2011). "Autoantibodies against inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2--characteristics and prevalence in patients with HCV-infection." *Clin Lab* 57(9-10): 753-65.
- Sheu Y. J., Kinney J. B., Lengronne A., Pasero P. and Stillman B. (2014). "Domain within the helicase subunit Mcm4 integrates multiple kinase signals to control DNA replication initiation and fork progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(18): E1899-908.
- Shu Q. and Nair V. (2008). "Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery." *Med Res Rev* 28(2): 219-32.
- Schoorlemmer J., Marcos-Gutierrez C., Were F., Martinez R., Garcia E., Satijn D. P., Otte A. P. and Vidal M. (1997). "Ring1A is a transcriptional repressor that interacts with the Polycomb-M33 protein and is expressed at rhombomere boundaries in the mouse hindbrain." *EMBO J* 16(19): 5930-42.
- Schweizer D. and Ambros P. F. (1994). "Chromosome banding. Stain combinations for specific regions." *Methods Mol Biol* 29: 97-112.
- Simon J., Chiang A., Bender W., Shimell M. J. and O'Connor M. (1993). "Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products." *Dev Biol* 158(1): 131-44.
- Sinha P., Chang V. and Tye B. K. (1986). "A mutant that affects the function of autonomously replicating sequences in yeast." *J Mol Biol* 192(4): 805-14.
- Sintchak M. D. and Nimmesgern E. (2000). "The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors." *Immunopharmacology* 47(2-3): 163-84.
- Smigova J., Juda P., Bartova E. and Raska I. (2013). "Dynamics of Polycomb chromatin domains under conditions of increased molecular crowding." *Biol Cell* 105(11): 519-34.
- Smigova J., Juda P., Cmarko D. and Raska I. (2011). "Fine structure of the "PcG body" in human U-2 OS cells established by correlative light-electron microscopy." *Nucleus* 2(3): 219-28.
- Smigova J., Juda P., Krejci J. and Raska I. (2014). "Structural basis of polycomb bodies." *Folia Biol (Praha)* 60 Suppl 1: 13-20.

- Solovei I. and Joffe B. (2010). "Inverted nuclear architecture and its development during differentiation of mouse rod photoreceptor cells: a new model to study nuclear architecture." *Genetika* 46(9): 1159-63.
- Sparmann A. and van Lohuizen M. (2006). "Polycomb silencers control cell fate, development and cancer." *Nat Rev Cancer* 6(11): 846-56.
- Spector D. L. (2001). "Nuclear domains." *J Cell Sci* 114(Pt 16): 2891-3.
- Speicher M. R. and Carter N. P. (2005). "The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology." *Nat Rev Genet* 6(10): 782-92.
- Takahashi T. S., Wigley D. B. and Walter J. C. (2005). "Pumps, paradoxes and ploughshares: mechanism of the MCM2-7 DNA helicase." *Trends Biochem Sci* 30(8): 437-44.
- Takebe N., Cheng X., Wu S., Bauer K., Goloubeva O. G., Fenton R. G., Heyman M., Rapoport A. P., Badros A., Shaughnessy J., Ross D., Meisenberg B. and Tricot G. (2004). "Phase I clinical trial of the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil (cellcept) in advanced multiple myeloma patients." *Clin Cancer Res* 10(24): 8301-8.
- Tanaka S. and Araki H. (2013). "Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(12): a010371.
- Tao Y., Xi S., Briones V. and Muegge K. (2010). "Lsh mediated RNA polymerase II stalling at HoxC6 and HoxC8 involves DNA methylation." *PLoS One* 5(2): e9163.
- Thomas E. C., Gunter J. H., Webster J. A., Schieber N. L., Oorschot V., Parton R. G. and Whitehead J. P. (2012). "Different characteristics and nucleotide binding properties of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) isoforms." *PLoS One* 7(12): e51096.
- Tye B. K. (1999). "MCM proteins in DNA replication." *Annu Rev Biochem* 68: 649-86.
- van Steensel B., van Binnendijk E. P., Hornsby C. D., van der Voort H. T., Krozowski Z. S., de Kloet E. R. and van Driel R. (1996). "Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons." *J Cell Sci* 109 (Pt 4): 787-92.
- Vandamme J., Volkel P., Rosnoblet C., Le Faou P. and Angrand P. O. (2011). "Interaction proteomics analysis of polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells." *Mol Cell Proteomics* 10(4): M110 002642.
- Verkade P. (2008). "Moving EM: the Rapid Transfer System as a new tool for correlative light and electron microscopy and high throughput for high-pressure freezing." *J Microsc* 230(Pt 2): 317-28.

- Verschure P. J., Van Der Kraan I., Enserink J. M., Mone M. J., Manders E. M. and Van Driel R. (2002). "Large-scale chromatin organization and the localization of proteins involved in gene expression in human cells." *J Histochem Cytochem* 50(10): 1303-12.
- Visser A. E. and Aten J. A. (1999). "Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei." *J Cell Sci* 112 (Pt 19): 3353-60.
- Voncken J. W., Niessen H., Neufeld B., Rennefahrt U., Dahlmans V., Kubben N., Holzer B., Ludwig S. and Rapp U. R. (2005). "MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1." *J Biol Chem* 280(7): 5178-87.
- Voncken J. W., Schweizer D., Aagaard L., Sattler L., Jantsch M. F. and van Lohuizen M. (1999). "Chromatin-association of the Polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status." *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4627-39.
- Wang H., Wang L., Erdjument-Bromage H., Vidal M., Tempst P., Jones R. S. and Zhang Y. (2004). "Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing." *Nature* 431(7010): 873-8.
- Willingham M. C., Richert N. D. and Rutherford A. V. (1987). "A novel fibrillar structure in cultured cells detected by a monoclonal antibody." *Exp Cell Res* 171(2): 284-95.
- Xu M. and Zhu B. (2010). "Nucleosome assembly and epigenetic inheritance." *Protein Cell* 1(9): 820-9.
- Yang N., Wang J., Li J., Wang Q. H., Wang Y. and Cheng M. S. (2011). "A three-dimensional pharmacophore model for IMPDH inhibitors." *Chem Biol Drug Des* 78(1): 175-82.
- Yeeles J. T., Deegan T. D., Janska A., Early A. and Diffley J. F. (2015). "Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins." *Nature* 519(7544): 431-5.

Pavel Jůda

9. Seznam publikací autora dizertační práce

Tato dizertační práce je převážně založena na výsledcích zvýrazněných publikací:

Masata M, Juda P, Raska O, Cardoso MC, Raska I (2011). A fraction of MCM2 proteins remain associated with replication foci during a major part of S phase. Folia Biol 57:3-11 IF: 1,167

Smigova J, Juda P, Cmarko D, Raska I (2011). Fine structure of the "PcG body" in human U-2 OS cells established by correlative light-electron microscopy. Nucleus 2:219-228 IF: 3,14

Farkas R, Kucharova-Mahmood S, Mentelova L, Juda P, Raska I, Mechler BM (2011). Cytoskeletal proteins regulate chromatin access of BR-C transcription factor and Rpd3-Sin3A histone deacetylase complex in Drosophila salivary glands. Nucleus 2:489-499 IF: 3,14

Smigova J, Juda P, Bartova E, Raska I (2013). Dynamics of Polycomb chromatin domains under conditions of increased molecular crowding. Biol Cell, 105: 519-534, doi: 10.1111/boc.201300022 IF: 3,872

Kovacik L, Kereiche S, Hoog JL, Juda P, Matula P, Raska I (2014) A simple Fourier filter for suppression of the missing wedge ray artefacts in single-axis electron tomographic reconstructions. J Struct Biol 186:141-152 IF: 3,369

Juda P, Smigova J, Kovacik L, Bartova E, Raska I (2014). Ultrastructure of Cytoplasmic and Nuclear Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase 2 "Rods and Rings" Inclusions. J Histochem Cytochem 62(10): 739-750 IF: 2,403

Šmigová J, Juda P, Krejčí J, Raška I (2014). Structural Basis of Polycomb Bodies. Folia Biol 60:13-20 IF: 1,167

Smirnov E, Borkovec J, Kovacik L, Svidenska S, Schrofel A, Skalnikova M, Svindrych Z, Krizek P, Ovesny M, Hagen GM, Juda P, Michalova K, Cardoso MC, Cmarko D, Raska I (2014) Separation of replication and transcription domains in nucleoli. J Struct Biol 188:259-266 IF: 3,369