

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



Strukturně-funkční organizace buněčného jádra

Mikroskopická analýza jaderných subkompartmentů

MUDr. Pavel Jůda

Praha, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Ivan Raška DrSc.

Školící pracoviště: Ústav buněčné biologie a patologie 1. LF UK v Praze

Školitel: Doc. RNDr. Dušan Cmarko CSc.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Obsah	3
Abstrakt	4
Abstract	5
Teoretický úvod	6
1.1. <i>Buněčné jádro</i>	6
1.2. <i>Vnitřní členění jádra (subkompartmentalizace)</i>	6
1.2.1. Chromatin.....	6
1.2.1.1. Jaderná tělíška.....	6
1.2.1.2. Jaderné inkluze.....	7
1.3. <i>Replikace a MCM proteiny, MCM paradox</i>	7
1.3.1. MCM proteiny.....	7
1.4. <i>Genové umlčování; Polycomb proteiny; Polycomb tělíška</i>	8
1.4.1. Polycomb proteiny.....	8
1.4.2. Polycomb represivní komplex 2.....	8
1.4.3. Polycomb represivní komplex 1.....	8
1.4.4. Světelná mikroskopie – mikroskopický obraz PRC1 proteinů, Polycomb tělíška.....	8
1.5. <i>Buněčné „Rods and Rings“ inkluze tvořené enzymem inozin-5'-mofosfát dehydrogenázou</i>	9
1.5.1. Inozin-5'-mofosfát dehydrogenáza 2.....	9
1.5.2. Inhibice IMPDH pomocí specifických inhibitorů.....	9
1.5.3. Změna lokalizace IMPDH2 proteinu po jeho inhibici.....	9
2. Cíle práce	10
3. Materiál a metody - přehled	11
4. Výsledky	12
4.1. <i>Asociace MCM proteinů s replikačními oblastmi</i>	12
4.1.1. Vztah MCM proteinů k replikačním oblastem.....	12
4.2. <i>Polycomb tělíška</i>	13
4.2.1. Elektronová mikroskopie - fyzikálně fixované vzorky.....	13
4.2.1. CLEM na fyzikálně fixovaných vzorcích.....	13
4.2.2. Korelace BMI1 signálu s DNA.....	13
4.2.2.1. Korelace BMI1 signálu s DNA imunoznačením.....	13
4.2.2.2. Korelace BMI1 signálu s DA/DAPI barvením.....	13
4.2.3. Změna lokalizace BMI1 proteinu vlivem hypertonického prostředí.....	13
4.2.4. Vliv různých osmolárně aktivních látek na změnu lokalizace BMI1 proteinu.....	14
4.2.5. Reverzibilita změny lokalizace Polycomb proteinů.....	14
4.2.6. Chování Polycomb tělíšek v hypertonickém prostředí se liší od chování typických jaderných tělíšek.....	14
4.2.7. Uvolnění PRC1 proteinů z chromatinu je spojeno se změnami ve fosforylaci těchto proteinů.....	14
4.3. <i>IMPDH2 protein a jím tvořené „Rods a Rings“ inkluze</i>	15
4.3.1. Změna distribuce IMPDH2 proteinu v buňkách ovlivněných ribavirinem.....	15
4.3.2. Western blot analýza cytoplazmatické a jaderné IMPDH2.....	15
4.3.3. Ultrastruktura R&R inkluzí.....	15
5. Diskuze	16
5.1. <i>MCM proteiny a DNA replikace</i>	16
5.2. <i>Polycomb tělíška</i>	16
5.3. <i>IMPDH2 inkluze</i>	18
6. Závěry	21
7. Seznam použité literatury	22
8. Seznam publikací autora dizertační práce	24

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 změnil 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

Teoretický úvod

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. 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 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 prostředí¹⁻³. 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 vzájemnou preferenční interakcí¹.

1.2.1. Chromatin

Dvoušroubovice DNA je ve více méně pravidelných intervalech omotána kolem jádra tvořeného bazickými proteiny - histony. Histonové jádro je tvořeno osmi molekulami histonů, konkrétně dvěma od každého ze čtyř základních typů H2A, H2B, H3 a H4^{4,5}. Jednotka chromatinu tvořená 146 páry bazí DNA omotaných kolem heterooktameru tvořeného histony se nazývá nukleozom^{6,7}. 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. Změny v genové expresi nepodmíněné změnou sekvence nukleotidů jsou souhrně označovány jako epigenetické^{8,9}.

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 chromocentra¹⁰. Euchromatin je pak v jádře uložen preferenčně v oblasti mezi jadérkem a obálkou.

Kromě chromatinových oblastí se v jádře nacházejí oblasti, které obsahují málo nebo žádnou DNA. Tyto oblasti tvoří tzv. interchromatinový prostor¹¹⁻¹⁴, ve kterém se nachází jaderné subkompartmenty jako jsou jaderná tělíska nebo inkluze.

1.2.1.1. Jaderná tělíska

Mezi nejvýraznější struktury nacházející se v buněčném jádře patří tzv. jaderná tělíska^{15,16}. Jaderná tělíska jsou uložena v interchromatinovém prostoru a jsou v elektronovém mikroskopu morfologicky

odlišitelná od ostatních struktur¹² a jsou převážně proteinové nebo ribonukleoproteinové povahy^{12,15}. Mohou být asociována s konkrétními geny¹⁷, ale obecně obsahují pouze malé množství DNA.

1.2.1.2. Jaderné inkluze

Jaderné inkluze jsou útvary tvořené nahromaděním specifické substance 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^{18,19} nebo glykogenové a tukové jaderné inkluze jako důsledek chybného ukládání těchto buněčných komponent²⁰.

1.3. Replikace a MCM proteiny, MCM paradox

Replikace DNA patří mezi základní buněčné procesy. Dříve, než dojde k rozdělení jedné mateřské buňky na dvě buňky dceřiné, musí být její DNA zdvojena tak, aby každá z nově vznikajících buněk obsahovala stejnou genetickou informaci. Proces zdvojení DNA do dvou shodných kopií se nazývá replikace DNA shrnuto v²¹.

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. Replikace DNA začíná z míst, která jsou označována jako replikační počátky. Těch se v každé savčí buňce nachází několik desítek až stovek tisíc. Během jednoho buněčného cyklu je postupně aktivována replikace z 30 000 50 000 replikačních počátků^{22,23}, přičemž zbývající replikační počátky nejsou v daném buněčném cyklu aktivovány a jsou označovány jako tzv. spící počátky²⁴.

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.

1.3.1. MCM proteiny

Proteiny udržující minichromozomy byly poprvé identifikovány při hledání mutantů *Saccharomyces cerevisiae* s defekty v udržování minichromozomů²⁵⁻²⁸. Eukaryotických MCM proteinů je celkem šest a nazývají se MCM proteiny 2-7²⁸. Obecně se předpokládá, že v živých buňkách jsou proteiny MCM2-7 organizovány do heterohexamerního komplexu se stechiometrií 1:1:1:1:1:1²⁹⁻³¹.

K navázání MCM2-7 komplexů na chromatin dochází v pozdních fázích mitózy a v průběhu G1 fáze³². Na konci G1 fáze je na chromatin navázáno značné množství MCM2-7 komplexů. Role MCM komplexu v průběhu vlastní replikace však není úplně zřejmá³³. In vitro studie odhalily, že CMG komplex má DNA helikázovou aktivitu³⁴⁻³⁶, a je asociován s replikační vidličkou^{37,38}. 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 počátků³⁹⁻⁴³.

1.4. Genové umlčování; Polycomb proteiny; Polycomb tělíska

1.4.1. Polycomb proteiny

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 H2AK119Ub⁴⁴⁻⁴⁸ a následným sbalením (kompaktací) chromatinu.

Polycomb proteiny byly poprvé popsány u *D. melanogaster*. Typickým příkladem genů regulovaných Polycomb proteiny jsou Hox geny^{47,49}. Polycomb proteiny však umlčují expresi i mnoha dalších genů, jejichž proteinové produkty se účastní buněčných procesů jako je regulace buněčného cyklu, buněčná diferenciací, senescence nebo inaktivace X chromozomu⁵⁰. Polycomb proteiny tvoří minimálně dva funkčně oddělené, i když v procesu genového umlčování úzce spolupracující, komplexy^{51,52}.

1.4.2. Polycomb represivní komplex 2

Polycomb represivní komplex 2 je u *D. melanogaster* tvořen těmito proteiny: 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 a skládá z následujících homologních savčích proteinů: Suz12, Eed, Ezh1 nebo Ezh2 a RbAp48 proteinu. PRC2 komplex je zodpovědný za inicializaci genového umlčování prostřednictvím trimetylace na lyzinu 27 histonu H3 (H3K27me3), značky transkripčně neaktivního chromatinu^{44-46,53,54}.

1.4.3. Polycomb represivní komplex 1

Polycomb represivní komplex 1 (PRC1) nasedá na trimetylací lyzinu 27 histonu H3 vytvořenou PRC2 komplexem a monoubiquitinyluje lizin 119 na histonu H2A (H2AK119Ub)^{47,55,56}. Tato histonová modifikace je pravděpodobně zodpovědná za kompaktaci chromatinu^{47,55,56}. Schopnost PRC1 komplexu způsobovat kompaktaci chromatinu však byla prokázána pouze *in vitro* na izolovaném chromatinu^{57,58}.

Polycomb represivní komplex 1 je u *D. melanogaster* tvořen čtyřmi proteiny: RING protein, Pc - Polycomb protein, PH - Polyhomeotic a PSC - Posterior sex combs. V savčích buňkách má každý z těchto proteinů několik homologů. Jednotlivé analogy existující v savčích buňkách se mohou v Polycomb komplexu vzájemně zastupovat. Rozdílné heterokomplexy vykonávají různé funkce a způsobují represí různých genů⁵⁹.

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 proteinů⁶⁰⁻⁶³.

Velikost a počet Polycomb tělísek se mezi jednotlivými buněčnými typy výrazně liší⁵⁰. 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 dehydrogenázou

1.5.1. Inozin-5'-mofosfát dehydrogenáza 2

Inozin-5'-mofosfát dehydrogenáza (IMPDH) je klíčový enzym de novo tvorby nukleotidu guanosinu. IMPDH katalyzuje NAD-závislou oxidaci inozin-5'-monofosfátu na xantozin-5'-monofosfát.

1.5.2. Inhibice IMPDH pomocí specifických inhibitorů

Enzymatická funkce IMPDH proteinu může být specificky inhibována pomocí kompetitivních nebo nekompetitivních inhibitorů. Inhibice IMPDH proteinu vede ke snížení buněčné koncentrace guanozinových nukleotidů, a tím ke snížení proliferace eukaryotických buněk⁶⁴. IMPDH protein je častým terapeutickým cílem v humánní medicíně, protože IMPDH inhibitory obecně vykazují antivirové, antibakteriální, antiproliferativní a imunosupresivní účinky⁶⁵⁻⁶⁷. Mezi nejznámější a nejčastěji klinicky používané IMPDH inhibitory patří ribavirin, kyselina mykofenolová (MPA) a mizoribin⁶⁸. Ribavirin má nejdůležitější klinické uplatnění v kombinaci s interferonem α při léčbě virové hepatitidy typu C⁶⁹.

1.5.3. Změna lokalizace IMPDH2 proteinu po jeho inhibici

Ačkoliv IMPDH proteiny jsou předmětem intenzivního výzkumu již mnoho desetiletí, teprve v nedávné době bylo zjištěno, že tento enzym po své inhibici vytváří cytoplazmatické makromolekulární inkluze⁷⁰⁻⁷². Díky svému tvaru byly tyto inkluze nazvány „Rods and Rings“ R&R,^{73,74,75}. R&R inkluze byly po inhibici nalezeny u všech dosud zkoumaných immortalizovaných buněčných linií (Hep2, HeLa, CAL27, HCT116, THP-1 a 3T3) nebo primokultur (myší primární kardiomyocyty)⁷¹.

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). 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 vimentin⁷¹. Předpokládá se tedy, že R&R představují zcela nový buněčný subkompartment, zcela nové buněčné inkluze.

2. Cíle práce

Cílem této dizertační práce bylo rozšířit naše znalosti o morfologii buněčného jádra a jeho subkompartmentů za využití moderních mikroskopických metod světelné a transmisní elektronové mikroskopie a korelačních technik.

Cíle:

- Zjistit přítomnost MCM proteinů v místech replikace, a tak přispět k vysvětlení tzv. MCM paradoxu
- Popsat ultrastrukturu Polycomb tělísek
- Určit strukturní podstatu Polycomb tělísek– testovat proteinovou a chromatinovou podstatu Polycomb tělísek
- Studovat R&R inkluze tvořené IMPDH2 proteinem a dynamiku jejich tvorby
- Popsat ultrastrukturu R&R inkluzí
- Určit ultrastrukturu námi objevené jaderné IMPDH2 inkluze a porovnat ji s cytoplazmatickými R&R inkluzemi

3. Materiál a metody - přehled

Buněčné kultury, kultivace buněk

Příprava buněk pro světelnou mikroskopii

Extrakce buněk pomocí CSK pufru

Ovlivňování buněk před fixací

Kultivace buněk v hypertonickém médiu

Kultivace buněk v hypotonickém médiu

Inhibice IMPDH specifickými inhibitory, Indukování R&R inkluzí

Imunofluorescenční značení DNA

Značení replikace a transkripce

Fluorescenční barvení

Obrazová analýza – kros-korelační funkce

Elektronová mikroskopie

Chemická fixace, pre embedding

Fyzikální fixace, mrazová substituce

Imunoznačení vzorků pro elektronovou mikroskopii

Korelační světelná a elektronová mikroskopie (CLEM)

CLEM na řezech

CLEM Preembedding

CLEM Fyzikální fixace pomocí zamrazení za vysokého tlaku

Korelace na světelné úrovni

Kontrastování vzorků pro EM

Elektronová tomografie

Kvantitativní analýza elektronmikroskopického značení

Western blot

Příprava celobuněčných lyzátů

Příprava cytoplazmatické a jaderné buněčné frakce

Měření koncentrace proteinů

Gelová elektroforéza

Imunoznačení na nitrocelulózové membráně

Digitalizace a analýza dat

Seznam všech použitých zkratk je uveden v dizertační práci na straně 7.

4. Výsledky

V naší práci jsme postupně zkoumali tři jaderné subkompartmenty, přičemž hlavní důraz byl kladen na zjištění jejich morfologie.

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. Ve fixovaných a imunozačených HeLa buňkách se MCM2 protein nachází v celém jádře s výjimkou jadérek ve formě rovnoměrně rozptýlených drobných granul. Tento mikroskopický obraz je tvořen jak volným, tak na chromatin vázaným MCM2 proteinem. Proto jsme použili potup, který nám umožnil odstranit nenavázanou formu MCM2 proteinu. Metoda je založena na aplikaci detergentu Triton X 100 spolu se speciálním pufrem. Tato metoda se nazývá extrakce před fixací. Použití extrakce před fixací nám umožnilo odstranit volnou formu MCM2 proteinu a tak vizualizovat pouze na chromatin pevně navázaný MCM2 protein. 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. 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. 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 mikroskopie⁷⁶⁻⁷⁹. Neschopnost vizuálně prokázat přítomnost MCM2 proteinu na chromatinu během replikace byla ve shodě s předchozími výsledky^{80,81}.

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,^{82,83}. 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. CCF křivka kolokalizace MCM2 a EdU na počátku S fáze však vykazovala jasná, i když nízká, pozitivní maxima 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 s replikačními oblastmi. Navíc, tento typ CCF křivky je patrný také na přechodu mezi ranou a střední S fází. Naše výsledky jasně ukazují, že malá, ale nezanedbatelná frakce MCM proteinů zůstává asociována s replikačními oblastmi během celé S fáze.

4.2. Polycomb tělíska

Dalším subkompartmentem buněčného jádra, kterým se zabývá tato dizertační práce je Polycomb tělísko. Tento jaderný subkompartment byl nalezen fluorescenční mikroskopií a je charakterizován prostorovým nakupením proteinů PRC1 komplexu. Ultrastrukturní podoba tohoto subkompartmentu však nebyla známa.

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. Dobře zachovaná imunogenita vzorku nám zároveň umožnila imunodetekci BMI1 proteinu na řezech. BMI1 signál byl lokalizován téměř výhradně do heterochromatinových oblastí buněčného jádra. Žádné lokální nahromadění BMI1 signálu mimo snopce heterochromatinu nebylo pozorováno.

4.2.1. CLEM na fyzikálně fixovaných vzorcích

Použili jsme 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. Použití CLEM techniky a získání sériových řezů buňkou nám nakonec umožnilo lokalizovat a ultrastrukturně popsat Polycomb tělíska. V místě Polycomb tělíska 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. Naše výsledky jasně ukazují, že „Polycomb tělísko“ je tvořeno lokálním nahromaděním heterochromatinu.

4.2.2. Korelace BMI1 signálu s DNA

4.2.2.1. Korelace BMI1 signálu s DNA imunozačněním

Elektronovou mikroskopií jsme ukázali, že v místech Polycomb tělísek se nachází zvýšený obsah DNA. Pro ověření této skutečnosti na úrovni světelné mikroskopie jsme provedli imunozačnění pomocí anti-DNA protilátky. Získané výsledky jasně ukazují, že místa s nejvyšším obsahem DNA v buňce odpovídají Polycomb tělískům imunofluorescenčně značeným proti GFP proteinu.

4.2.2.2. 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, narozdíl od klasického barvení pouze pomocí DAPI, které se do vysoce kondenzovaných oblastí chromatinu nedostává. DA/DAPI barvení potvrdilo naše předchozí zjištění, že Polycomb tělíska jsou subkompartmenty s vysokým obsahem chromatinu.

4.2.3. Změna lokalizace BMI1 proteinu vlivem hypertonického prostředí

Abychom vyvrátili proteinovou podstatu Polycomb tělíska, provedli jsme sérii experimentů využívajících změn tonicita vnějšího prostředí.

Pro studium chování Polycomb tělísek v hypertonickém prostředí jsme použili normální kultivační médium, jehož tonicita však byla zvýšena na dvojnásobek, a to přidáním sacharózy, případně dalších

osmoticky aktivních látek. 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 komponent¹.

Zjistili jsme, že v buňkách pěstovaných v hypertonickém prostředí dochází ke změně lokalizace proteinů skupiny PRC1 z heterochromatinu do interchromatinového prostoru. Po 60 minutách inkubace buněk v hypertonickém prostředí již byly všechny PRC1 proteiny přemístěny do interchromatinového prostoru. 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 periférii buněčného jádra, tzv. perinukleárního lemu. Ten, stejně jako další interchromatinový prostor jádra, obsahoval proteiny PRC1 skupiny a naopak neobsahoval DNA.

4.2.4. 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 přítomností sacharózy samotné. K docílení hypertonicity prostředí jsme tedy použili dvě odlišné chemické látky: sorbitol, tj. alkohol odvozený z glukózy, a NaCl. Ke změně lokalizace BMI1 proteinu došlo ve všech hypertonických médiích.

4.2.5. 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 dochází k obnovení původního Polycomb obrazu a buňky jsou schopné normální proliferace. 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.

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^{84,85}. Pozorovali jsme, že po vystavení buněk hypertonickému prostředí Cajalova tělíska zůstávají zachována, zatímco nahromadění Polycomb proteinů v těliscích mizí. DA/DAPI signál zůstává nejsilnější v místech původních Polycomb tělísek. Pokud jsou buňky vystaveny prostředí s nižší tonicitou, Cajalova tělíska se v důsledku změněných protein-protein interakcí rozpadají, zatímco Polycomb tělíska zůstávají zachována v původním umístění. Chování Polycomb tělísek se tedy zásadně odlišuje od chování typických jaderných tělísek.

4.2.7. 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 lysátů neovlivněných a hypertonickému prostředí vystavených buněk jsme zjistili, že v hypertonickém prostředí dochází ke změně v migraci BMI1 proteinu. V obou typech lysátů 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. Obdobné výsledky jsme získali i při značení RING1a proteinu. Pomocí inkubace buněčných lysátů s alkalickou fosfatázou jsme ukázali, že změny v migraci BMI1 a RING1a proteinu jsou způsobeny jejich fosforylací.

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

4.3.1. Změna distribuce IMPDH2 proteinu v buňkách ovlivněných ribavirinem

Po ovlivnění buněk pomocí 4 μ M ribavirinu (nebo dalších IMPDH inhibitorů) dochází k rychlé změně lokalizace IMPDH2 proteinu. Tvorba R&R inkluzí je spojena se změnou lokalizace většiny buněčného IMPDH2 proteinu do vzniklých makromolekulárních struktur. Změna lokalizace IMPDH2 proteinu se týká i jeho jaderné formy. Jaderná Rod struktura je obvykle menší než cytoplazmatická a je lokalizována přednostně do oblastí s nižším DAPI značením.

4.3.2. Western blot analýza cytoplazmatické a jaderné IMPDH2

Provedli jsme Western blot analýzu cytoplazmatické a jaderné frakce u buněk neovlivněných i ovlivněných inhibitorem. 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. Zatímco však množství proteinu lokalizovaného v cytoplasmě je porovnatelné v ovlivněných i neovlivněných buňkách, množství jaderného proteinu je přibližně 2x vyšší v buňkách ribavirinem ovlivněných.

4.3.3. Ultrastruktura R&R inkluzí

Pro nalezení R&R inkluzí v elektronovém mikroskopu jsme použili metodu CLEM na ultratenkých řezech. Po lokalizaci hledaných struktur pomocí imunofluorescenčního značení zobrazeného fluorescenčním mikroskopem, bylo stejné místo vzorku studováno v elektronovém mikroskopu. Pomocí elektronové mikroskopie jsme ukázali, že R&R inkluze jsou tvořeny jednotlivými vlákny a že tato 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. Ukázali jsme také, že cytoplazmatické R&R inkluze jsou uloženy volně v cytoplasmě a nejsou od cytozolu odděleny biologickou membránou.

Mezery mezi jednotlivými vlákny jsou maximálně 15 nm a v prostoru mezi nimi se nenachází ribozomy ani jiné cytoplazmatické struktury, pouze elektron lucentní, více méně homogenní hmota. Jednotlivá vlákna jsou přibližně 8,6 nm silná a jsou tvořena shodnými podjednotkami s pravidelným opakováním. Délka jedné podjednotky je $10,94 \pm 0,82$ nm.

5. Diskuze

5.1. MCM proteiny a DNA replikace

V poslední době došlo k velkému pokroku ve znalostech molekulárního mechanismu DNA replikace^{23,31,86-88}. Nicméně celostní pohled na proces replikace, hlavně co se prostorového a časového uspořádání týká, zatím chybí⁸⁹. K tomuto faktu též přispívá ohromné množství doprovodných procesů a faktorů, které v sobě DNA replikace jako komplexní proces zahrnuje⁸⁷. Komplexnost replikace v eukaryotických organizmech ji činí velmi náročnou pro experimentální studium.

V naší práci jsme se zaměřili na hlubší pochopení takzvaného „MCM paradoxu“³⁹, který byl popsán v souvislosti s DNA replikací. Jako MCM paradox byla označena neschopnost detekovat MCM proteiny v místě replikace světelnou mikroskopií^{39,43,86}. 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 replikací⁹⁰.

Co se týká helikázové aktivity MCM proteinů, předpokládá se, že MCM proteiny plní funkci při uvolňování pnutí v DNA během replikace^{31,86,88,90}. 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^{37,38,91-94}. 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^{76,79}. 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^{60,61,95}, 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 tělíska nejsou tvořena nahromaděním Polycomb proteinů jako takových. Jaderná tělíska byla definována jako především proteinové elektronmikroskopicky

detekovatelné oblasti lokalizované do interchromatinového prostoru, liší se svou strukturou a složením^{15,16,96}. Polycomb tělíska tedy nepředstavují jaderná tělíska, jak jsou definována. Podle našich výsledků Polycomb tělíska představují nahromadění heterochromatinových struktur obsahujících Polycomb proteiny v prostoru buněčného jádra. Heterochromatin obsažený v Polycomb těliscích se však morfologicky neliší od jiných heterochromatinových struktur nacházejících se jinde v buněčném jádře. Příčiny prostorového nakupení chromatinu vytvářejícího Polycomb tělísko však nejsou známy.

Po barvení buněk pomocí samotného DAPI se Polycomb tělíska 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 chromozomů⁹⁷. Výsledky naší práce však ukázaly, že DA/DAPI signál věrně odpovídá lokalizaci Polycomb tělísek v interfázních buňkách a zároveň odpovídá reálnému obsahu DNA v barvených oblastech. Dystamycin A je látka, která se váže stejně jako DAPI do malého žlábků na dvoušroubovici DNA⁹⁸. Mezi těmito látkami tak dochází k jisté kompetici o místo. Ačkoliv 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 jádra⁹⁹, ke studiu hyperkondenzace chromatinu⁹⁹⁻¹⁰¹ nebo udržování entity jaderných tělísek¹.

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 komplexnější¹⁰².

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 jádérka^{1,2,103} nebo Cajalova tělíska (Obr. 27) jsou zachovávána a vlivem hypertonického prostředí udržována², 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

přežívat 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. ¹⁰².

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 ² 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 ^{104,105}. 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 ^{104,105}. 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 ¹⁰⁵. To vše činí DRAQ5 barvičku nepoužitelnou ke sledování DNA v dlouhotrvajících in vivo experimentech. V našem výzkumu jsme naopak schopnosti DRAQ5 uvolňovat proteiny z chromatinu využili.

Ukázali jsme, že kompaktace chromatinu v původních Polycomb tělískách 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 ¹⁰⁶.

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 ^{107,108}. 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 ⁴⁸. Fosforylace spojená s disociací BMI1 proteinu z chromatinu byla navíc pozorována v U-2 OS buněčné linii overexprimující MAPK aktivovanou kinázu 3 ¹⁰⁹ nebo v buňkách nacházejících se v mitóze ⁹⁵. Podobnost morfologických změn chromatinu mezi hypertonickým ovlivněním a mitózou byla rovněž ukázána skupinou profesora Robbinse ^{100,110}.

5.3. IMPDH2 inkluze

Ačkoliv je inhibice IMPDH proteinů rutinně používána v lidské medicíně ⁶⁷, řada aspektů základní biologie zůstává v tomto procesu zatím neznámá. 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 cytoplasmě, 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 pokusem¹¹¹. 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 shrnuto v¹¹². Schopnost tvorby těchto makromolekulárních komplexů je navíc fylogeneticky velmi dobře zachována. Podobné komplexy a inkluze lze nalézt mezi fylogeneticky velmi vzdálenými organizmy, od bakterií, přes červy a hmyz až k savcům^{71,113-117}. 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 struktur¹¹².

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^{108,118}. 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 prostředí¹¹⁹. 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 kulovitého tvaru a v nich nahromaděný protein nemá zpravidla vláknité uspořádání^{120,121}. Pomocí Western blot analýzy jsme ukázali, že u IMPDH2 proteinu dochází po inhibici ribavirinem pouze k nevýraznému nárůstu jeho množství. Zároveň se v případě R&R inkluzí jedná o vnitřně velmi organizované struktury s pravidelným uspořádáním jednotlivých podjednotek. Tyto výsledky svědčí o tom, že tvorba inkluzí IMPDH2 proteinem je základní a integrální vlastností tohoto proteinu a nejedná se 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 experimenty¹²², 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 DNA¹²²⁻¹²⁴. Není však známo, jakým mechanismem se IMPDH proteiny dostávají do jádra, neboť neobsahují žádný známý jaderný lokalizační signál¹²². Byla však ukázána asociace IMPDH proteinů s místy aktivní transkripce v *S. cerevisiae*¹²⁵. IMPDH se pravděpodobně váže k transkripčnímu komplexu pomocí fosforylace na serinu 2 C terminální domény RNA polymerázy II. 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 izoenzymem¹²³. Bylo také ukázáno, že funkční rozdíly mezi jednotlivými izoenzymy IMPDH 1 a 2 vycházejí pouze z jejich koncové domény, která nemá enzymatickou funkci⁷². V naší práci jsme ukázali, že změna lokalizace IMPDH proteinu po jeho inhibici se týká převážně jeho IMPDH2 formy. Nemůžeme však vyloučit případnou zkříženou reakci námi používaných protilátek, protože izoformy IMPDH proteinů vykazují velkou sekvenční podobnost⁶⁶. Z experimentů provedených za použití různých protilátek jak proti IMPDH1 tak IMPDH2 proteinu je však zřejmé, 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 jako i jaderných Rod inkluzí. Jaderná inkluze je však přímější a téměř nikdy se nejedná o strukturu tvaru „Ring“, což je pravděpodobně způsobeno prostorovými možnostmi uvnitř molekulárně přeplněného buněčného jádra. Skutečnost, že vůbec IMPDH2 inkluze v buněčném jádře vzniká, svědčí 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 prostupnou, málo rozměrnou chemickou látku⁶⁷. Pravděpodobnější je, že jaderná frakce IMPDH2 proteinu je dočasně imobilizována vazbou na DNA¹²³. Po jejím uvolnění se IMPDH2 dostává do nově tvořené inkluze, kde zůstává již dlouhodobě imobilizována.

Ačkoliv funkce IMPDH proteinů v jádře není zatím definitivně určena, změnou lokalizace IMPDH2 proteinu do inkluzí je jeho normální jaderná funkce fakticky znemožněna. Funkce jaderné IMPDH2 se na základě našich výsledků z Western blot analýzy jeví být pro buňku velice důležitá, protože na pokles difúzní jaderné formy IMPDH2 proteinu buňka reaguje jeho zvýšeným importem do jádra. Mechanismus tohoto jevu však není známý.

6. Závěry

- Robustní statistickou metodou využívající analýzu pomocí kros-korelační funkce jsme analyzovali imunofluorescenční data z 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.
- 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.

7. Seznam použité literatury

- 1 Hancock, R. (2004) *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96, 595-601.
- 2 Hancock, R. (2004) *Journal of structural biology* 146, 281-290.
- 3 Iborra, F. J. (2007) *Theoretical biology & medical modelling* 4, 15.
- 4 Dubochet, J. & Noll, M. (1978) *Science* 202, 280-286.
- 5 Finch, J. T. et al. (1977) *Nature* 269, 29-36.
- 6 Kornberg, R. D. & Thomas, J. O. (1974) *Science* 184, 865-868.
- 7 Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997) *Nature* 389, 251-260.
- 8 Xu, M. & Zhu, B. (2010) *Protein & cell* 1, 820-829.
- 9 Gurard-Levin, Z. A. & Almouzni, G. (2014) *F1000prime reports* 6, 76.
- 10 Mateos-Langerak, J. et al. (2007) *Journal of cellular biochemistry* 102, 1067-1075.
- 11 Misteli, T. (2008) *Histochemistry and cell biology* 129, 5-11.
- 12 Spector, D. L. (2001) *Journal of cell science* 114, 2891-2893.
- 13 Cremer, T., Kupper, K., Dietzel, S. & Fakan, S. (2004) *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96, 555-567.
- 14 Cremer, T. et al. (2000) *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 10, 179-212.
- 15 Matera, A. G., Izaguire-Sierra, M., Praveen, K. & Rajendra, T. K. (2009) *Developmental cell* 17, 639-647.
- 16 Dundr, M. (2012) *Current opinion in cell biology* 24, 415-422.
- 17 Verschure, P. J. et al. (2002) *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50, 1303-1312.
- 18 Everett, R. D. (2013) *PLoS pathogens* 9, e1003386.
- 19 Moshe, A. & Gorovits, R. (2012) *Viruses* 4, 2218-2232.
- 20 Leduc, E. H. & Wilson, J. W. (1959) *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 6, 427-430.
- 21 Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N. & Oda, M. (2010) *Annual review of biochemistry* 79, 89-130.
- 22 Huberman, J. A. & Riggs, A. D. (1966) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55, 599-606.
- 23 Mechali, M. (2010) *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 728-738.
- 24 McIntosh, D. & Blow, J. J. (2012) *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4
- 25 Gibson, S. I., Surosky, R. T. & Tye, B. K. (1990) *Molecular and cellular biology* 10, 5707-5720.
- 26 Maine, G. T., Sinha, P. & Tye, B. K. (1984) *Genetics* 106, 365-385.
- 27 Sinha, P., Chang, V. & Tye, B. K. (1986) *Journal of molecular biology* 192, 805-814.
- 28 Forsburg, S. L. (2004) *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68, 109-131.
- 29 Chong, J. P., Mahubani, H. M., Khoo, C. Y. & Blow, J. J. (1995) *Nature* 375, 418-421.
- 30 Davey, M. J., Indiani, C. & O'Donnell, M. (2003) *The Journal of biological chemistry* 278, 4491-4499.
- 31 Costa, A. & Onesti, S. (2009) *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 44, 326-342.
- 32 Hesketh, E. L., Knight, J. R., Wilson, R. H., Chong, J. P. & Coverley, D. (2015) *Cell cycle* 14, 333-341.
- 33 Labib, K. & Diffley, J. F. (2001) *Current opinion in genetics & development* 11, 64-70.
- 34 Gambus, A. et al. (2006) *Nature cell biology* 8, 358-366.
- 35 Moyer, S. E., Lewis, P. W. & Botchan, M. R. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10236-10241.
- 36 Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J. & Botchan, M. R. (2010) *Molecular cell* 37, 247-258.
- 37 Calzada, A., Hodgson, B., Kanemaki, M., Bueno, A. & Labib, K. (2005) *Genes & development* 19, 1905-1919.
- 38 Pacek, M., Tutter, A. V., Kubota, Y., Takisawa, H. & Walter, J. C. (2006) *Molecular cell* 21, 581-587.
- 39 Dimitrova, D. S., Todorov, I. T., Melendy, T. & Gilbert, D. M. (1999) *The Journal of cell biology* 146, 709-722.
- 40 Edwards, M. C. et al. (2002) *The Journal of biological chemistry* 277, 33049-33057.
- 41 Hyrien, O., Marheineke, K. & Goldar, A. (2003) *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25, 116-125.
- 42 Takahashi, T. S., Wigley, D. B. & Walter, J. C. (2005) *Trends in biochemical sciences* 30, 437-444.
- 43 Das, M., Singh, S., Pradhan, S. & Narayan, G. (2014) *Molecular biology international* 2014, 574850.
- 44 Cao, R. et al. (2002) *Science* 298, 1039-1043.
- 45 Cao, R. & Zhang, Y. (2004) *Current opinion in genetics & development* 14, 155-164.
- 46 Czermin, B. et al. (2002) *Cell* 111, 185-196.
- 47 Cao, R., Tsukada, Y. & Zhang, Y. (2005) *Molecular cell* 20, 845-854.
- 48 Niessen, H. E., Demmers, J. A. & Voncken, J. W. (2009) *Epigenetics & chromatin* 2, 10.
- 49 Bantignies, F. et al. (2011) *Cell* 144, 214-226.
- 50 Sparmann, A. & van Lohuizen, M. (2006) *Nature reviews. Cancer* 6, 846-856.
- 51 Martinez, A. M. & Cavalli, G. (2006) *Cell cycle* 5, 1189-1197.
- 52 Enderle, D. et al. (2011) *Genome research* 21, 216-226.
- 53 Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Reinberg, D. (2002) *Genes & development* 16, 2893-2905.
- 54 Muller, J. et al. (2002) *Cell* 111, 197-208.
- 55 Wang, H. et al. (2004) *Nature* 431, 873-878.
- 56 Martin-Perez, D., Piris, M. A. & Sanchez-Beato, M. (2010) *Blood* 116, 5465-5475.
- 57 Francis, N. J., Kingston, R. E. & Woodcock, C. L. (2004) *Science* 306, 1574-1577.
- 58 Grau, D. J. et al. (2011) *Genes & development* 25, 2210-2221.
- 59 Vandamme, J., Volkel, P., Rosnoblet, C., Le Faou, P. & Angrand, P. O. (2011) *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M110 002642.
- 60 Gunster, M. J. et al. (1997) *Molecular and cellular biology* 17, 2326-2335.
- 61 Satijn, D. P. et al. (1997) *Molecular and cellular biology* 17, 4105-4113.
- 62 Schoorlemmer, J. et al. (1997) *The EMBO journal* 16, 5930-5942.
- 63 Saurin, A. J. et al. (1998) *The Journal of cell biology* 142, 887-898.

- 64 Markland, W., McQuaid, T. J., Jain, J. & Kwong, A. D. (2000) *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 859-866.
- 65 Nair, V. & Shu, Q. (2007) *Antiviral chemistry & chemotherapy* 18, 245-258.
- 66 Shu, Q. & Nair, V. (2008) *Medicinal research reviews* 28, 219-232.
- 67 Petrelli, R. et al. (2013) *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 8, 103-125.
- 68 Matyugina, E. S., Andreevskaya, S. N., Smirnova, T. G. & Khandzhinskaya, A. L. (2012) *Acta naturae* 4, 73-77.
- 69 Hofmann, W. P., Herrmann, E., Sarrazin, C. & Zeuzem, S. (2008) *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 28, 1332-1343.
- 70 Gunter, J. H. et al. (2008) *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 1716-1728.
- 71 Carcamo, W. C. et al. (2011) *PloS one* 6, e29690.
- 72 Thomas, E. C. et al. (2012) *PloS one* 7, e51096.
- 73 Dellavance, A. et al. (2009) *Revista Brasileira de Reumatologia* 49, 89-98.
- 74 Seelig, H. P. et al. (2011) *Clinical laboratory* 57, 753-765.
- 75 Francescantonio, P. L. et al. (2014) *Revista brasileira de reumatologia* 54, 44-50.
- 76 Raska, I. et al. (1989) *Experimental cell research* 184, 81-89.
- 77 Raska, I. et al. (1991) *Journal of electron microscopy technique* 18, 91-105.
- 78 Leonhardt, H. et al. (2000) *The Journal of cell biology* 149, 271-280.
- 79 Koberna, K. et al. (2005) *Journal of cellular biochemistry* 94, 126-138.
- 80 Prasanth, S. G., Mendez, J., Prasanth, K. V. & Stillman, B. (2004) *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 359, 7-16.
- 81 Krude, T., Musahl, C., Laskey, R. A. & Knippers, R. (1996) *Journal of cell science* 109 (Pt 2), 309-318.
- 82 van Steensel, B. et al. (1996) *Journal of cell science* 109 (Pt 4), 787-792.
- 83 Masata, M., Malinsky, J., Fidlerova, H., Smirnov, E. & Raska, I. (2005) *Journal of structural biology* 151, 61-68.
- 84 Raska, I. et al. (1991) *Experimental cell research* 195, 27-37.
- 85 Raska, I. et al. (1990) *Journal of structural biology* 104, 120-127.
- 86 Bochman, M. L. & Schwacha, A. (2009) *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 73, 652-683.
- 87 Yeeles, J. T., Deegan, T. D., Janska, A., Early, A. & Diffley, J. F. (2015) *Nature* 519, 431-435.
- 88 Sheu, Y. J., Kinney, J. B., Lengronne, A., Pasero, P. & Stillman, B. (2014) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E1899-1908.
- 89 Tanaka, S. & Araki, H. (2013) *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a010371.
- 90 Bell, S. D. & Botchan, M. R. (2013) *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a012807.
- 91 Ritzl, M. et al. (1998) *The Journal of biological chemistry* 273, 24543-24549.
- 92 Aparicio, O. M., Weinstein, D. M. & Bell, S. P. (1997) *Cell* 91, 59-69.
- 93 Claycomb, J. M., MacAlpine, D. M., Evans, J. G., Bell, S. P. & Orr-Weaver, T. L. (2002) *The Journal of cell biology* 159, 225-236.
- 94 Laskey, R. A. & Madine, M. A. (2003) *EMBO reports* 4, 26-30.
- 95 Voncken, J. W. et al. (1999) *Journal of cell science* 112 (Pt 24), 4627-4639.
- 96 Raska, I. (1995) *Journal of cellular biochemistry* 59, 11-26.
- 97 Schweizer, D. & Ambros, P. F. (1994) *Methods in molecular biology* 29, 97-112.
- 98 Baraldi, P. G., Nunez Mdel, C., Espinosa, A. & Romagnoli, R. (2004) *Current topics in medicinal chemistry* 4, 231-239.
- 99 Albiez, H. et al. (2006) *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 14, 707-733.
- 100 Robbins, E., Pederson, T. & Klein, P. (1970) *The Journal of cell biology* 44, 400-416.
- 101 Martin, R. M. & Cardoso, M. C. (2010) *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 1066-1072.
- 102 Richter, K., Nessling, M. & Lichter, P. (2007) *Journal of cell science* 120, 1673-1680.
- 103 Chen, Y. C., Kappel, C., Beaudouin, J., Eils, R. & Spector, D. L. (2008) *Molecular biology of the cell* 19, 3147-3162.
- 104 Mari, P. O. et al. (2010) *DNA repair* 9, 848-855.
- 105 Richard, E. et al. (2011) *Photochemistry and photobiology* 87, 256-261.
- 106 Chandra, T. et al. (2012) *Molecular cell* 47, 203-214.
- 107 Bancaud, A. et al. (2009) *The EMBO journal* 28, 3785-3798.
- 108 Minton, A. P. (2006) *Current biology : CB* 16, R269-271.
- 109 Voncken, J. W. et al. (2005) *The Journal of biological chemistry* 280, 5178-5187.
- 110 Pederson, T. & Robbins, E. (1970) *The Journal of cell biology* 47, 734-744.
- 111 Willingham, M. C., Richert, N. D. & Rutherford, A. V. (1987) *Experimental cell research* 171, 284-295.
- 112 O'Connell, J. D., Zhao, A., Ellington, A. D. & Marcotte, E. M. (2012) *Annual review of cell and developmental biology* 28, 89-111.
- 113 Ingerson-Mahar, M., Briegel, A., Werner, J. N., Jensen, G. J. & Gitai, Z. (2010) *Nature cell biology* 12, 739-746.
- 114 Liu, J. L. (2010) *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 37, 281-296.
- 115 Noree, C., Sato, B. K., Broyer, R. M. & Wilhelm, J. E. (2010) *The Journal of cell biology* 190, 541-551.
- 116 Chen, K. et al. (2011) *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 38, 391-402.
- 117 Liu, J. L. (2011) *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 159-164.
- 118 Dundr, M. & Misteli, T. (2010) *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000711.
- 119 Ellis, R. J. (2001) *Current opinion in structural biology* 11, 114-119.
- 120 Markossian, K. A. & Kurganov, B. I. (2004) *Biochemistry. Biokhimiia* 69, 971-984.
- 121 Kopito, R. R. (2000) *Trends in cell biology* 10, 524-530.
- 122 McLean, J. E. et al. (2004) *The Biochemical journal* 379, 243-251.
- 123 Kozhevnikova, E. N. et al. (2012) *Molecular cell* 47, 133-139.
- 124 Cornuel, J. F., Morailon, A. & Gueron, M. (2002) *Biochimie* 84, 279-289.
- 125 Park, J. H. & Ahn, S. H. (2010) *Biochemical and biophysical research communications* 392, 588-592.

8. Seznam publikací autora dizertační práce

1. publikace, které jsou podkladem dizertace:

a) s impact factorem:

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*

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*

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*

2. publikace s impakt faktorem bez vztahu k tématu disertace:

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*

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*

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*