

Výlet na konec genomu

2. Suchozemské rostliny lpí na aktivitě telomerázy

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích chromozomů, o nichž se v současnosti čtenáři v *Živě* dozvídají řadu informací v různých souvislostech. Jejich základní funkcí je vypořádat se s dvěma problémy, které přináší jinak zřejmě výhodné lineární uspořádání genomu. Za prvé je to problém neúplné replikace konců lineární DNA (End-Replication Problem, ERP) a za druhé problém ochrany konců (End-Protection Problem, EPP). Podstata obou byla nastíněna v minulém čísle *Živy* (2017, 2: 53–57). Připomeňme si, že řešení ochrany přirozených konců chromozomů předpokládá jejich odlišení od dvouřetězcových zlomů (Double Strand Breaks, DSBs). Tato protektivní funkce byla popsána poměrně dávno (viz dále v textu), ale její molekulární podstata začala být zkoumána až o desítky let později – s objevem první telomerové sekvence DNA. V tomto dílu popíšeme, jak byly telomerové sekvence hledány. Zvláštní pozornost bude věnována suchozemským rostlinám (*Embryophyta*, viz *Živa* 2016, 2: 70–75), jejichž všichni zkoumaní zástupci používají k doplnění konců telomer enzym telomerázu, a to dokonce i v rodu česnek (*Allium*), kde se přes 20 let o existenci telomerázy pochybovalo.

Jak rostlinné a neobvyklé telomery předběhly dobu?

I když problém ochrany konců chromozomů byl odborné veřejnosti poprvé předložen rok před začátkem druhé světové války, první telomerové sekvence se podařilo charakterizovat až v r. 1978. Co tuto prodlevu způsobilo? Nejsou za tím ani výzkumné priority zemí ve válečném stavu, ani případný nezáměr o zdánlivě nevý-

znamnou otázku tehdejší cytogenetiky. Pouze chyběly znalosti a experimentální metody, které bylo potřeba teprve rozvinout. Když to vezmeme chronologicky, od začátku 20. stol. se kupily důkazy, že dědičnost znaků je uložena kdesi na chromozomech v tzv. vlohách – genech. Bylo známo, že geny jsou uspořádány jeden vedle druhého, a dokonce už tehdy se mezi nimi odhadovala relativní vzdálenost, aniž by někdo

přesně věděl, co jsou geny z materiálního pohledu. V tomto světle se jeví logické, že chování chromozomů při dělení zdravých a experimentálně poškozených buněk bylo pod tehdejší vědecký drobnohledem. V červenci 1938 Barbara McClintocková publikovala u kukuřice seté (*Zea mays*) poznatky o fúzích konců chromozomů ukončených zlomem, a o dva měsíce později vyšla práce Hermanna J. Mullera o chromozomových přestavbách u dvoukřídlého hmyzu octomilky *Drosophila melanogaster*. Obě studie dospěly ke stejným závěrům – indukované chromozomové zlomy vedou ke koncovým fúzím, kterých se přirozené konce chromozomů neúčastní. Muller ve své práci předložil hypotézu, že poslední gen na chromozomu musí být schopný vytvořit pečeť, a to právě jen jedním směrem – ke konci chromozomu. Hypotetický gen nazval telomera (anglicky telomere).

Podle této koncepce byla tedy lokalizace telomery na rozdíl od ostatních genů přesně známa – měla ležet na konci chromozomu. Ostatní geny měly být obklopeny jinými geny, a ve srovnání s telomerou bipolární, jejich poloha na chromozomu se jen odhadovala. Telomera měla být v tomto smyslu unipolární, s ostatními geny soustředěna pouze v jednom směru, proximálně (směrem dovnitř, k centroměře) a v druhém směru (distálně, od centromery ven) chromozom uzavírat tak, jak bipolární geny nemohou. Jen málokdo asi tušil, že od slibně vyhlížející hypotézy o bipolárních a unipolárních genech zbývá do objevu molekulární podstaty telomer a vyvrácení koncepce telomery jako genu ještě několik desítek let – přesně 40. Nejdříve bylo potřeba vyjasnit, čím jsou geny tvořeny z biochemického hlediska – že jsou uloženy v DNA, a nikoli třeba v proteinech, což r. 1944 prokázali Oswald Avery, Colin M. MacLeod a Maclyn McCarty. Ani z toho však nebylo jasné, jak jsou geny v DNA zaznamenány. To zůstávalo pro vědce asi tak stejně tajemné jako hudební záznam na CD pro každého, kdo už sice ví, že ten lesklý předmět je z plastu, kovu, laku a záznamového barviva, ale tím jeho znalost končí. Dalších několik let se odehrával závod o objasnění struktury DNA. Dvoušroubovice s komplementárními vlákny o čtyřech základních stavebních prvcích, jejíž model navrhli James Watson a Francis Crick v r. 1953, byla logickým klíčem k rozluštění způsobu zápisu, čtení a kopírování genetické informace. V průběhu následujících let nastal razantní rozvoj metod molekulární biologie, která konečně propojila informaci a hmotu – genetiku a chemii. Definice genu se dočasně zúžila z abstraktního popisu jednotky dědičnosti na konkrétní sekvenci nukleotidů v DNA kódující protein.

1 Cibuloviny z rodu česnek (*Allium*) byly zatím poslední nadějí na zástupce suchozemských rostlin s jiným způsobem udržování konců molekul DNA než pomocí telomerázy. Ale i u nich se nakonec telomeráza produkující zvláštní a neobvykle dlouhý motiv našla (telomerový motiv rodu česnek CTCGGTTATGGG byl poprvé popsán v článku P. Fajkuse, V. Pešky a kol. 2016). Foto T. Mandáková, Mendelovo centrum, CEITEC Masarykova univerzita



První telomerová sekvence odhalena u prvoků

Teprve přibližně po 30 letech od rozpoznání koncové funkce telomer (EPP) je jasné, že existuje i problém, jak udržovat správnou délku funkční telomery (ERP, viz minulý díl). Oba problémy vyvolaly základní otázku, jaká je vlastně terminální sekvence DNA lineárních chromozomů, neboť její znalost bude zřejmě podmínkou k pochopení řešení obou záležitostí. A tak se rozběhl „lov“ na sekvence telomerové DNA, v němž jako první uspěli v r. 1978 Elizabeth H. Blackburnová a Joseph Gall. Vypadá to, že si nemohli vybrat lepší modelový organismus než jednobuněčného prvoka vejcovky *Tetrahymena thermophila*, kterého charakterizuje výhodný poměr mezi velkým počtem telomer a relativně malým genomem. Buňky těchto prvoků nesou dvě odlišná jádra (obr. 2). Každá buňka obsahuje generativní diploidní jádro – mikronukleus, a z něj odvozené polyploidní somatické jádro – makronukleus. Mikronukleus je organizován do 10 chromozomů ($2n = 10$; 260 Mb; v článku jsou použity zkratky pro vyjádření délky fragmentu dvouřetězcové DNA: 1 bp – jeden pár bází, 1 kb – tisíc párů, 1 Mb – milion párů a 1 Gb – miliarda párů bází). Uvnitř somatického jádra dochází k řízené fragmentaci těchto původně 10 chromozomů na specifických místech a vzniká tak odhadem 200–300 minichromozomů o velikosti od 20 kb do 3 Mb. Další zvláštností vegetativního jádra je, že tyto minichromozomy nezůstávají v diploidním stavu, ale každý se namnoží v průměru do 50 kopií. Minichromozomy, které nesou geny pro ribozomovou RNA (rDNA), jsou namnoženy dokonce přibližně v 10 tisících kopiích. Každý minichromozom nesoucí rDNA je dobře definován restriční mapou společnou pro všechny jeho kopie (obr. 2c), přičemž všechny končí telomerami (restriční enzym/endonukleáza neboli restriktáza štěpí molekulu DNA v určité oblasti, dané konkrétní sekvencí – v restričním místě; používá se řada restriktáz pro fragmentaci DNA na přesně definované úseky – restriční mapa molekuly DNA pak popisuje umístění a vzdálenosti restričních míst, tedy i velikost fragmentů, jež po štěpení vznikají a lze je oddělit; blíže ve slovníku termínů na webové stránce Živy).

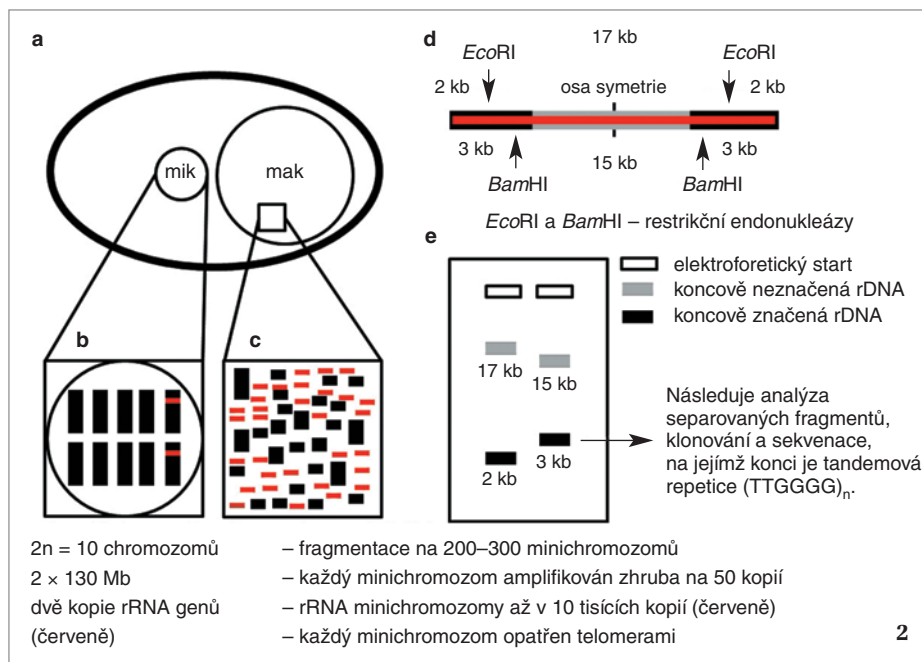
Konce rDNA se od vnitřních oblastí minichromozomů daly odlišit radioaktivní značkou. Po restričním štěpení se označené fragmenty separační metodou oddělily od zbytku genomu a podrobily se chemické analýze (např. depurinaci – odstranění purinových bází). Z kombinací radioaktivně značených nukleotidů, následné depurinace a opětovné separace výsledných produktů bylo možno deduktivně odvodit tandemovou sekvenci TTGGGG.

Octomilka již podruhé překvapuje

Ve stejném roce, kdy byla publikována první telomerová sekvence (1978), se podařilo charakterizovat i telomerovou DNA u octomilky *D. melanogaster*. Tvoří ji tandemově uspořádané repetice, každá o velikosti až několik tisíc párů bází. Terminální lokalizace a velikost jednotky repetice byly charakterizovány pomocí klonování genomových fragmentů, jejich hybridizací

Octomilka již podruhé překvapuje

Ve stejném roce, kdy byla publikována první telomerová sekvence (1978), se podařilo charakterizovat i telomerovou DNA u octomilky *D. melanogaster*. Tvoří ji tandemově uspořádané repetice, každá o velikosti až několik tisíc párů bází. Terminální lokalizace a velikost jednotky repetice byly charakterizovány pomocí klonování genomových fragmentů, jejich hybridizací



zací *in situ* na polytenních chromozomech (neobvykle velké chromozomy, u nichž proběhlo namnožení chromatid bez následného rozpadu na jednochromatidové) s radioaktivně značenými sondami DNA a pomocí Southernovy hybridizace; dnes se používají fluorescenčně značené sondy při fluorescenční hybridizaci *in situ* – FISH, jejich výhoda spočívá v možnosti kombinovat více sond na jednom preparátu (viz obr. 8 a 10; princip Southernovy hybridizace vysvětlen ve slovníku na webu Živy a v Živě 2009, 1: 44–45). Metody amplifikace DNA v polymerázové řetězové reakci (PCR) a sekvenace, které by umožnily přečtení fragmentu dlouhého několik set párů bází až několik málo kb, ještě nebyly v té době k dispozici a na tuto práci Geralda Rubina se pozapomnělo. Dokud se r. 1988 neukázalo, že kromě neobvyklé délky je tato repetice zajímavá také tím, že dokáže svou sekvenci v genomu množit a je specifickým způsobem mobilní. Přesněji řečeno, provádí retrotranspozici – přepisuje se nejdříve z DNA do RNA a následně RNA molekuly slouží jako templát pro vznik nové DNA, která se vkládá zpět do genomu téměř jako výsledek z procesu „copy-paste“. Dnes u octomilky známe dokonce tři telomerově specifické mobilní retroelementy – *TART*, *HeT-A* a *TAHRE*. Všechny tři prodlužují telomery tzv. cíleové retrotranspozicí, protože se na rozdíl od většiny ostatních mobilních elementů nevkládají do genomu náhodně, ale cíleně do oblastí chromozomových konců. Jejich autonomie však není stejná. *HeT-A*, i když je nejrozšířenější, nekóduje vlastní reverzní transkriptázu a nejspíš si ji vypůjčuje od *TART* nebo *TAHRE*. Vzdáleně tak *HeT-A* připomíná RNA podjednotku telomerázy.

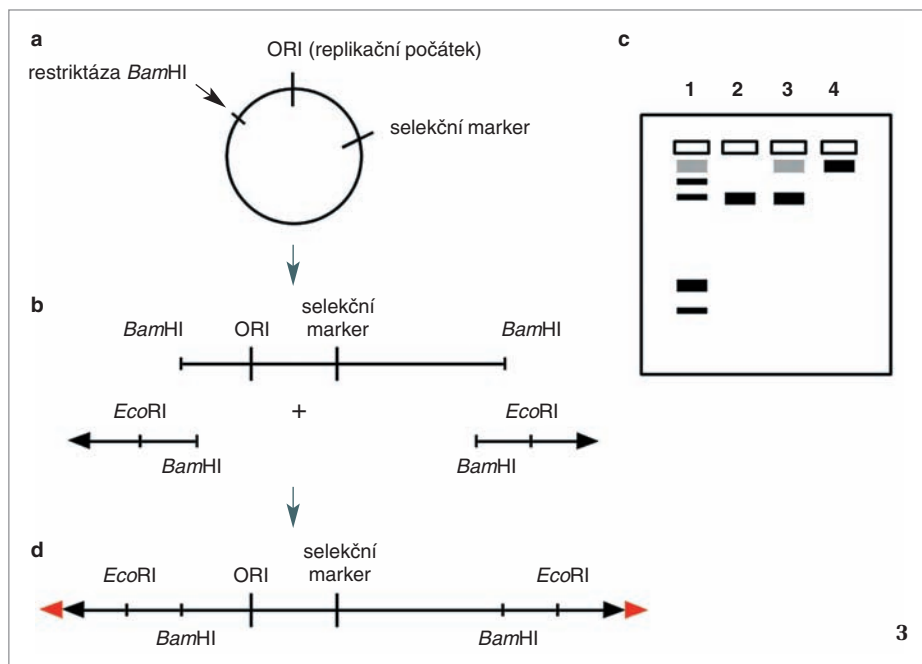
Od první sekvence prvoků k ostatním eukaryotům

Vraťme se však ještě na chvíli do 80. let minulého století. Po objevu první telomerové sekvence u *T. thermophila* se zpočátku pracovalo hlavně na příbuzných druzích prvoků. Mimo jiné se u nich prokázalo, že na samém konci dvouřetězcové DNA se nachází jednořetězcový přesah s 3' koncem,

2 Schematické znázornění identifikace první telomerové sekvence u prvoka vejcovky *Tetrahymena thermophila*. Tento druh vykazuje jaderný dimorfismus (a). Generativní jádro mikronukleus (mik) obsahuje $2n = 10$ chromozomů s jediným párem bloků rRNA genů – naznačeno červeně (b). Somatické jádro (makronukleus – mak) obsahuje desítky tisíc kopií rDNA (c), které mají jednotnou restriční mapu a jejich konce jsou opatřeny telomerami (d). Koncové restriční fragmenty rDNA lze poznat a oddělovat na základě velikosti a značení, což byl velký pokrok směrem k objasnění jejich sekvence (e). Blíže v textu

tvořený vláknem bohatým na guanin. Obecné závěry pro eukaryotické organismy ale bylo možné udělat až po objevu telomerových sekvencí vzdálenějších taxonů. Okolnosti přímo přály zkoumání telomerové problematiky v biologii hub, konkrétně pивních, pekařských nebo také vinných kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* ($2n = 32$; genom velikosti 24 Mb). Kvasinky byly a dodnes jsou oblíbeným modelovým organismem pro své kultivační výhody, rozumnou velikost genomu a možnost zobecnování principů vzhledem k člověku. Navíc patří k jednomu z prvních modelových eukaryot, u nichž se rozvinuly klonovací a biotechnologické postupy.

V laboratoři Jacka W. Szostaka s nimi udělali, jak on sám říká, výstřel na dlouhou vzdálenost. Myslel tím poměrně jednoduchý pokus z logického hlediska, ovšem s velice nejistým výsledkem, který měl podhalit, nakolik je telomerová sekvence (jako ústřední motiv celého systému údržby konců chromozomů) evolučně konzervativní a zda tato sekvence prvoků dokáže svou funkci zastávat i v prostředí kvasinkové buňky (obr. 3). Byl použit cirkulární kvasinkový plazmid (viz slovník na webu Živy), který nesl počátek replikace označovaný jako ORI, selekční marker (gen, bez něhož buňky na příslušném kultivačním médiu nepřežijí), a celý tento konstrukt byl převeden na lineární formu restričním enzymem. Na oba konce napřímeného



3 Strategie pro transplantaci telomer z *T. thermophila* do kvasinkových plazmidů a identifikace telomerové DNA u *Saccharomyces cerevisiae*. Běžně používaný plazmid byl napřímen restriktaázou *Bam*HI (a) a jeho konce spojeny s koncovými restrikčními fragmenty ribozomové DNA (rDNA) z prvoka s funkční telomerovou sekvencí (b, černé šipky na konci úseček). Schéma výsledku separace fragmentů DNA v gelu pomocí elektroforézy (c). Bílé obdélníky představují startovní jamky, kam se nanáší vzorek DNA. Po čase nejkratší fragmenty doputují od startu nejdále, nejdelší fragmenty zůstávají těsně za jamkami. Cirkulární plazmid izolovaný z buněk vytváří podle struktury a konformace v elektroforetickém gelu hned několik oddělených proužků (černé pruhy) – dráha 1. Genomová DNA hostitelské buňky zůstává v tzv. kompresní zóně (šedý pruh) – dráha 1 a 3. Izolovaný, dokonale přečištěný a natažený plazmid vytváří jediný proužek, který velikostně odpovídá jedné z konformací v dráze 1 – silný černý proužek v dráze 2. Plazmidy, které bylo možné i po mnoha generacích z kvasinek izolovat jako lineární formy, musely nést funkční telomery. Byly to právě plazmidy s transplantovanými telomery z prvoků. Při separaci v gelu stále vytvářely jediný pruh oddělený od genomové DNA, nevyskytovaly se v jiných, především cirkulárních konformacích – dráha 3. Buňky s plazmidy bez transplantovaných telomer nepřežily větší počet generací nebo se zachránily začleněním plazmidu, který má vlastní telomery, do svého genomu. Plazmidový signál pak byl ve stejné pozici jako genomová DNA hostitelské buňky. Dráha 4 – plazmid začleněný do genomu hostitelské buňky poskytuje signál odpovídající pozici DNA v kompresní zóně. Po několikaměsíčním udržování kultur s transplantovanými telomery se nakonec ukázalo, že tyto telomery zůstávají stabilní (d). Plazmid byl stále zjištěn jako fragment DNA v dráze 2 a dokonce i prodloužený o novou telomerovou

sekvenci, která už nepocházela z prvoků, ale patřila kvasinkám (červené šipky na konci konstruktů).

konstruktů vědci přilepili koncový telomerový fragment z *T. thermophila* a sledovali, zda se plazmid s „transplantovanými“ telomery v kvasinkách udrží, začlení do chromozomu, nebo opětovně spojí v kružnicovou DNA. Kupodivu se u některých buněk lineární konstrukty stabilizovaly a dokonce se v genomu udržely po mnoho generací. Z toho tenkrát W. Szostak a E. H. Blackburnová usoudili, že telomerové sekvence z prvoka mohou zastávat terminální funkci i u kvasinek a celý telomerový systém je nejspíš značně konzervativní.

Další překvapení přišlo, když si všimli, že se v dlouhodobě udržovaných kulturách konce plazmidů s „transplantovanými“ telomery nejen nezkracují, ale dokonce prodlužují. V té době, tedy kolem r. 1984, se už jeden rok využívala PCR a společně s o něco starší metodou Maxamovou-Gilbertovou sekvenací se rychle stávaly rutinními záležitostmi vědeckého výzkumu. Když Janis Shampay z týmu E. H. Blackburnové poprvé sekvenovala ony prodloužené telomery lineárních plazmidů, zjistila, že transplantované sekvence z *T. thermophila* jsou sice přítomny, ale prodlouženy jsou o něco složitější a s méně pravidelnou sekvencí, než jakou má samotná *Tetrahymena*. Nová sekvence $(TG_{1-3})_n$ vykazovala rovněž tandemový charakter a nerovnoměrnou distribuci guaninu a cytozinu mezi komplementárními vlákny, což je typický rys telomerové sekvence. Jak ze vzorců telomerových motivů vyplývá, jedno vlákno obsahuje spíše guanin a minimum nebo žádný cytozin, zatímco u komplementárního vlákna, které se do vzorce nezapisuje, platí přesný opak. Usoudilo se, že to musí být nová kvasinková sekvence, která byla přidána neznámým enzymem. Náhodným vyřazováním genů z funkce byl nalezen kandidát. Pokud tento gen nefunguje, kvasinky ztratí schopnost prodloužování a udržování délky telomer. Ze samotné sekvence genu bohužel nelze bez dalších vodítek stanovit jeho funkci, natož

přesnou enzymatickou aktivitu, tu bylo možné jen odhadovat. Enzymatická aktivita komplexu odpovědného za udržování délky telomer byla detekována a objasněna později Carol W. Greiderovou a enzym dostal název telomeráza. Za objev, jak jsou chromozomy chráněny telomery a telomerázou, byla v r. 2009 E. H. Blackburnové, C. W. Greiderové a J. W. Szostakovi udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství.

Hledání telomerové sekvence u dalších velkých taxonů včetně rostlin

Poté, co se stalo zřejmým, že telomerázový systém je konzervativní, nastal čas objasnit telomerovou sekvenci u obratlovců (hlavně u člověka) a dalších velkých skupin, jako jsou bezobratlí, řasy a rostliny.

U octomilky *D. melanogaster* z řádu dvoukřídlého hmyzu (Diptera) telomerázu nahradily retrotranspozony. Je pozoruhodné, že oba systémy mají společné rysy – např. reverzní transkripci. Jinak však u bezobratlých nacházíme hlavně minisatelitní repetici, odvozenou od společného bazálního motivu, kterým byl pravděpodobně motiv lidského typu $(TTAGGG)_n$. Bazální motiv byl později změněn na $(TGTTGG)_n$ u vířníků, $(TTAGGC)_n$ u hliatic a $(TTAGG)_n$ u mnoha skupin hmyzu. U brouků došlo ještě k řadě dalších diverzifikačních událostí, např. k výskytu $(TTAGC)_n$ a v jiných taxonech dosud telomerové motivy ani neznáme. Problematiku telomer u bezobratlých živočichů úspěšně v České republice objasňuje Laboratoř molekulární cytogenetiky Entomologického ústavu AV ČR, v. v. i., na pavoukovce se pak specializuje Laboratoř cytogenetiky pavoukovic u Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Podobně jako u bezobratlých došlo také u řas v několika evolučních větvích k pestřejšímu rozrůznění telomerového motivu. U ruduch byly popsány tři různé motivy – $(AATGGGGGG)_n$, $(TTTATT(T)AGGG)_n$ a $(TTAGGG)_n$, z nichž poslední dva jsou zatím spíše jen nepotvrzenými kandidáty vyhledání v databázích genomových sekvencí projektů. V evoluční větvi zelených řas máme na rozdíl od ruduch situaci lépe zmapovanou, nacházíme zde motivy $(TTTAGGG)_n$, $(TTTATAGG)_n$, $(TTAGGG)_n$ a $(TTTTAGG)_n$. Nutno však dodat, že některé čeledi stále zůstávají bez identifikované telomerové sekvence a prokázané aktivity telomerázy. Telomerový sekvencím řas se v Biofyziologickém ústavu AV ČR, v. v. i., věnují Eva Sýkorová a Jana Fulnečková. Rekonstrukci evoluce telomerového motivu prvoků, řas a rostlin založily na detekci aktivity telomerázy pomocí kandidátních sekvencí testovaných metodou TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol – spočívá v amplifikaci produktů telomerázové aktivity pomocí PCR; telomeráza sice dokáže syntetizovat telomerové repetice na substrátový primer, ale pro následnou amplifikaci PCR je potřeba ještě reverzní primer navržený podle známé nebo alespoň kandidátní telomerové sekvence).

Jak klonovat lidskou telomeru?

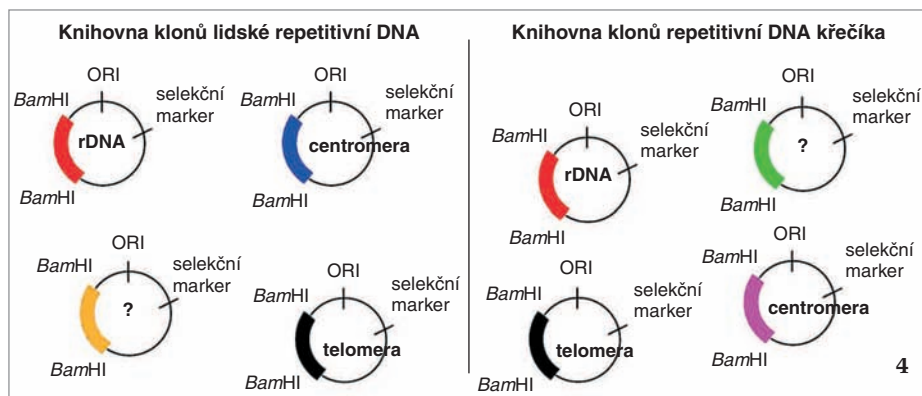
S obecnými znalostmi o telomerové DNA a aktivitě telomerázy se objevování nových telomerových sekvencí může jevit jako snazší záležitost, ale situace se komplikuje, když se výzkum dostane ke genomům,

kteří jsou i o několik řádů větší a zpravidla obsahují velký podíl repetice a malý počet chromozomových konců. V takových podmínkách také není vhodná metoda klonování telomer, použitá u prvoků a kvasinek. Nesmíme zapomenout, že existují výjimky, které telomerázový systém nahradily jiným (hlenky z řádu Dictyostelida, dvoukřídlý hmyz, kvasinkové mutantní kmeny bez telomerázy; viz minulý díl v Živě 2017, 1), a to si i dnes, v době genomiky a dalších -omik, vyžaduje robustnější přístup než jen hledání pozměněných telomerových motivů. Nejobecnějším rysem telomerové sekvence se od začátku jeví fakt, že prozatím vždy šlo o tandemovou repetitivní sekvenci. Předpoklad, že totéž platí u člověka ($2n = 46$, 6,4 Gb) a ostatních obratlovců, např. křečička čínské (*Cricetulus griseus*, $2n = 22$, 4,8 Gb), vedl ke konci 80. let minulého stol. k experimentu, v němž byly porovnávány klony s vysoce repetitivní DNA z obou organismů. Když se na závěr ze shodných klonů vyloučily ty, které odpovídaly ribozomovým genům, což jsou rovněž vysoce repetitivní sekvence, zůstalo k ověření pouze několik kandidátů. Z nich se pak jeden (obr. 4) ukázal jako skutečná telomerová sekvence s motivem $(TTAGGG)_n$.

Rostliny stále v minisatelitním tandemu

Téhož roku jako lidská sekvence byl identifikován také první rostlinný telomerový motiv, a to rovněž na základě předpokladu, že jde o repetitivní sekvenci. Tentokrát byl k dispozici i vhodný model s malým genomem – huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*, $2n = 10$, 240 Mb), jenž navíc obsahuje repetice pouze vzácně. Velikosti genomu a počtem chromozomů v základní sadě připomíná huseníček prvoka *T. thermophila*. Když ale porovnáme počty cílových chromozomových konců a velikost genomů u obou organismů, prvok nad huseníčkem jednoznačně vítězí, protože rostlina nevytváří žádný vegetativní makronukleus s desítkami tisíc kopií rDNA ve formě minichromozomů ani nic podobného. Cesta k telomerovému motivu huseníčku vedla skrze prohledávání knihovny repetitivních klonů pomocí Southernovy hybridizace těchto klonů s celkovou genomovou DNA štěpenou pomocí enzymu BAL31 – exonukleázy, která postupně odbourává dvouřetězcovou DNA od konce (toho se využívá právě v telomerové biologii, protože přirozené konce chromozomů vždy obsahují substrát pro BAL31, samotný konec DNA; zjednodušeně lze říct, že interní sekvence obsahují konce DNA jen vzácně, vlivem poškození nebo přípravou vzorku).

Oproti předchozím metodickým postupům znamená tento přístup myšlenkový zlom. Dříve byla telomerová DNA nejprve vytipována a pak teprve testována na citlivost k nukleáze BAL31. Zde se poprvé v širším okruhu kandidátních sekvencí nejdříve hledaly ty, které jsou k BAL31 citlivé, až poté následovaly dodatečné důkazy, např. FISH a TRAP (viz výše v textu a ve slovníku na webu Živy) a identifikace telomerázových genů. Ve skutečnosti byly otestovány stovky klonů, než byl nalezen ten správný kandidát se sekvencí $(TTTAGGG)_n$. Důkaz aktivity telomerázy a identifikace telomerázové RNA podjednotky přišly dokonce až o řadu let později (obr. 6).



U ostatních rostlin byla telomerová sekvence většinou potvrzena pomocí cytogenetické metody FISH. Ačkoli jde o spolehlivou metodu pro lokalizaci sekvencí na chromozomech, pro účely identifikace telomerové sekvence má limitovanou výpovědní hodnotu. Negativní výsledek může znamenat, že testovaná kandidátní sekvence není telomerová, anebo je pod prahem citlivosti detekce, např. v případě velmi krátkých telomer. Na druhou stranu, pozitivní výsledek může dokladat, že kandidátní sekvence je skutečně telomerová, ale také, že se té skutečné sekvenci jen velmi dobře podobá nebo leží v jejím sousedství – v subtelomeře. A už vůbec nelze říct nic o tom, do jaké míry je cílová tandemová repetice pravidelná, nebo zda obsahuje více či méně časté jednonukleotidové záměny atd. Z rozsáhlých cytogenetických screeningů prováděných v 90. letech 20. stol. na pracovišti Institutu pro rostlinnou genetiku a výzkum hospodářských plodin v Gatersleбену (Německo) byly zřejmě dva významné výsledky – naprostá většina rostlinných zástupců poskytuje pozitivní signál s testovanou sekvencí $(TTTAGGG)_n$. Výjimkou zůstaly jen některé taxony z řádu chřestotvarých (*Asparagales*). Přesněji, nebyl získán žádný telomerový signál u tehdejší čeledi česnekovitých (*Alliaceae*; dnes podčeď česnekové – *Allioideae* řazená mezi amarylkovité – *Amaryllidaceae*).

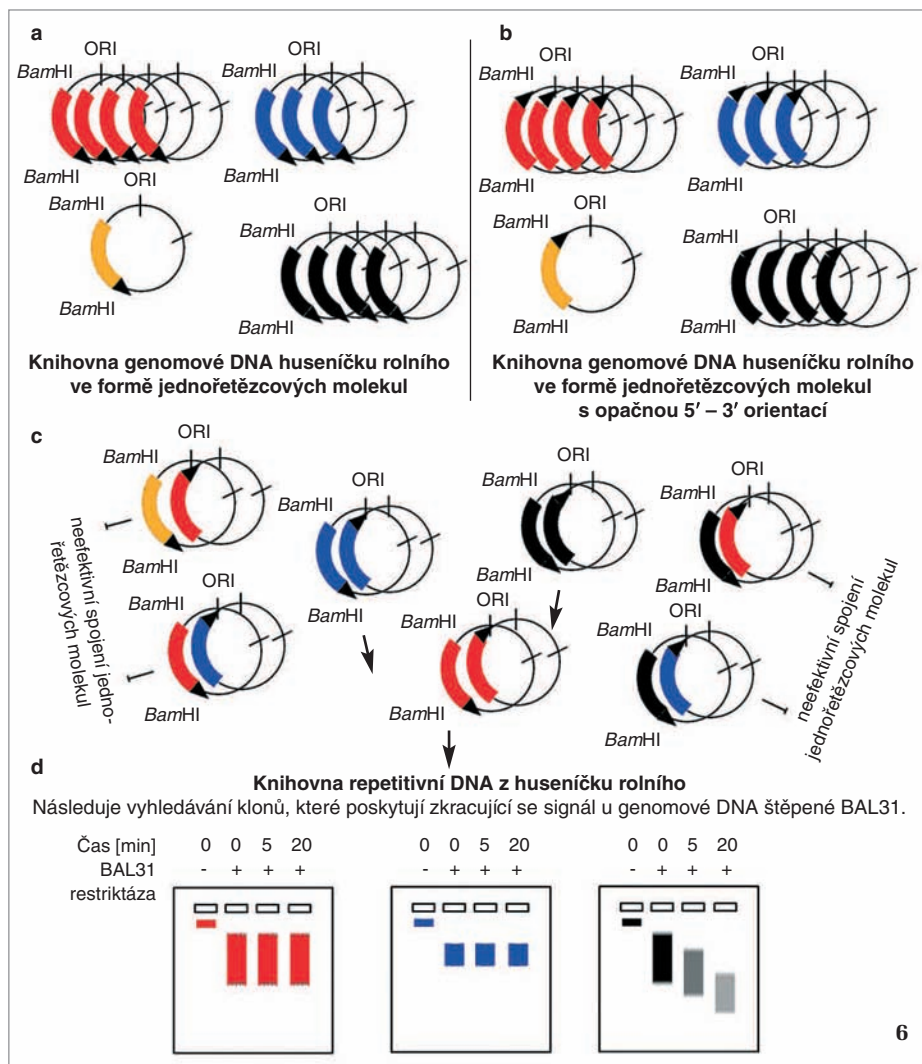
O několik let později, tentokrát z londýnské iniciativy (Queen Mary University of London, QMUL), se objevila další čeleď chřestotvarých bez známé telomerové

4 Porovnání klonů lidské genomové DNA a klonů z křečička čínské (*Cricetulus griseus*). Když ze shodných vyloučíme rDNA, zůstává pouze omezený počet kandidátních telomerových klonů.

5 Jeden z námi studovaných druhů česnek medvědí (*A. ursinum*) – vytrvalá bylina vysoká 10–40 cm, s přizemními řapíkatými listy, jejichž čepele jsou úzce eliptické až úzce vejčité, 10–20 cm dlouhé a 2–5 cm široké. Je oblíbený v lidovém léčitelství a používá se i při vaření. Nejčastěji se vyskytuje v lužních a listnatých lesích, kde vytváří souvislé porosty. Není chráněný, ale je třeba upozornit na možnost porušení zákonných ustanovení, hlavně při jeho sběru ve zvláště chráněných územích, např. v přírodních rezervacích.

sekvence. Řeč je o asfodelovitých (*Asphodelaceae*), kam patří např. rod *Aloe*. Bylo zjištěno, že rostliny aloe nesou lidskou telomerovou sekvenci, což se někdy nepřesně vykládá tak, že *Aloe* má lidské telomery. Ve skutečnosti jde o náhodnou sekvenci konvergenční, ale na druhou stranu tato shoda přibližuje rostlinné modely aplikací a hledání obecnějších principů společných s člověkem (viz např. Vesmír 2006, 9: 542–546). Při mapování situace v celém taxonu se chvíli zdálo, že se lidská a rostlinná telomerová sekvence v průběhu evoluce v řádu chřestotvarých ztrácela a zase objevovala. Jasně do celého případu vnesla spolupráce Královských botanických zahrad (Kew, Velká Británie), univerzity v Londýně (QMUL), PŘF Masarykovy univerzity a Biofyzikálního





6 Strategie klonování telomerové DNA u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Na začátku pokusu (a, b) byly připraveny dvě sady (molekulární biologové říkají knihovny) klonů genomové DNA huseníčku rolního. Tyto dvě knihovny byly sestaveny tak, že se po specifickém převedení fragmentů rostlinné DNA na jednořetězcové formy regenerovaly především molekuly obsahující repetitivní genomovou DNA (c). V knihovně obohacené o repetice byl dále hledán klon, který by poskytl signál typický pro telomerovou DNA v tzv. BAL31 testu. Test citlivosti kandidátní sekvence ke štěpení enzymem BAL31 (d) je modifikovanou verzí Southernovy hybridizace, ve které se před použitím restriktčního enzymu na vzorky genomové DNA působí BAL31 různě dlouhou dobu (např. 0 min, 5 min a 20 min). Preferenčně se tak zkracují telomerové sekvence. Ostatní genomová DNA je následně fragmentována a z telomerové sekvence odsekána restriktázou, která telomerovou sekvenci neštěpí. Při konečné hybridizaci s telomerovou sondou lze v závislosti na délce působení nukleázy BAL31 u telomerových fragmentů zaznamenat jejich zkracování a celkový úbytek signálu. Pokud se jako sonda použije netelomerová DNA, např. centromerová repetice, signál zůstává stejný ve všech vzorcích bez ohledu na délku štěpení pomocí BAL31. Blíže v textu. Klon, který poskytuje zkracující se signál, je tak dobrým kandidátem na telomerovou

DNA. Enzym exonukleáza BAL31 štěpí konce všech fragmentů (tj. telomerové i netelomerové DNA), ale pouze telomerová DNA je takto štěpena vždy a systematicky. Netelomerová DNA je zkracována pomocí BAL31 jen vzácně a náhodně, např. pokud došlo k náhodnému zlomu DNA při její izolaci. Z toho důvodu se netelomerové sekvence na rozdíl od telomerových s prodlužováním působení enzymu BAL31 nezkracují.

ústavu (BFÚ) AV ČR. V návaznosti na aktuální fylogenetické studie se zjistilo, že v tomto řádu nejspíš nedocházelo k žádnému opakovanému ztracení následovanému návraty k původnímu telomerovému motivu. Ve skutečnosti proběhly postupně nejméně dvě sekvenční změny, z rostlinné (TTTAGGG)_n na lidskou (TTAGGG)_n, a dále na neznámou telomerovou DNA u rodu česnek (*Allium*, obr. 1). První změna nastala v evoluci někde mezi hůlčovitými (*Doryanthaceae*) a kosatčovitými (*Iridaceae*). S lidskými motivy si rostliny vystačily až k rodu *Ipeion* (amarylkovité), ale u posledního rodu *Allium* došlo opět ke změně, přičemž dlouhou dobu zůstalo nejasné, co vlastně „cibulové“ telomery tvoří. Jsou tam retrotranspozony jako u octomilky, nebo rDNA či satelitní repetice jako u mutantních kvasinek bez telomerázy, uzavřené vlásenky jako u mitochondriální DNA nebo dokonce úplně náhodné sekvence? Zahrnuje vůbec funkční telomerázu? To lze ověřit pomocí výše zmíněné meto-

dy TRAP, když pracujeme se známou telomerovou sekvencí, ale bez ní stojíme před výzvou, kterou je snazší obejít tak, že si nejdříve opatříme nadějně telomerové kandidáty. Na druhou stranu, pokud existuje předpoklad pro funkci telomerázy, víme, že jejím produktem bývají více či méně pravidelné tandemové repetice s omezenou délkou sekvenční jednotky.

Nové tisíciletí, nové výjimky, nová technologie

Ve třetím roce třetího milénia byla v rostlinné říši nalezena třetí výjimka z konsenzuálního motivu (TTTAGGG)_n, a to v čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). U okrasných keřů Jižní a Střední Ameriky ze tří blízkých příbuzných rodů kladivník (*Cestrum*), *Vestia* a *Sessea* nebyl metodou FISH nalezen pozitivní signál žádné z dosud známých telomerových sekvencí. Následující pokusy o identifikaci telomer u kladivníků poskytovaly sice nadějně kandidátní sekvence – např. mikrosatelit (CTT)_n a minisatelit (TTTTTAGCAG)_n, ale zůstávaly nepotvrzeny, nebo přímo vyloučeny jako skutečně telomerové. S novým tisíciletím však také přišla nová technologie masivního paralelního sekvenování – sekvenování nové generace (NGS, Next Generation Sequencing). Metoda, kterou si ze začátku mohl dovolit málokdo, se během několika let stala rutinní diagnostickou a výzkumnou pomůckou. Zjednodušeně lze říci, že do nástupu NGS nebyl k dispozici nástroj, kterým neznámou telomerovou sekvenci s jistotou uchopit. Před NGS nebylo nikdy zaručeno, zda soubor sekvencí, vyprodukovaných byť sebelepším postupem, telomerovou sekvenci skutečně obsahuje. NGS je schopné obsáhnout – pokrýt (téměř) kompletní informaci i největších genomů hned několikrát.

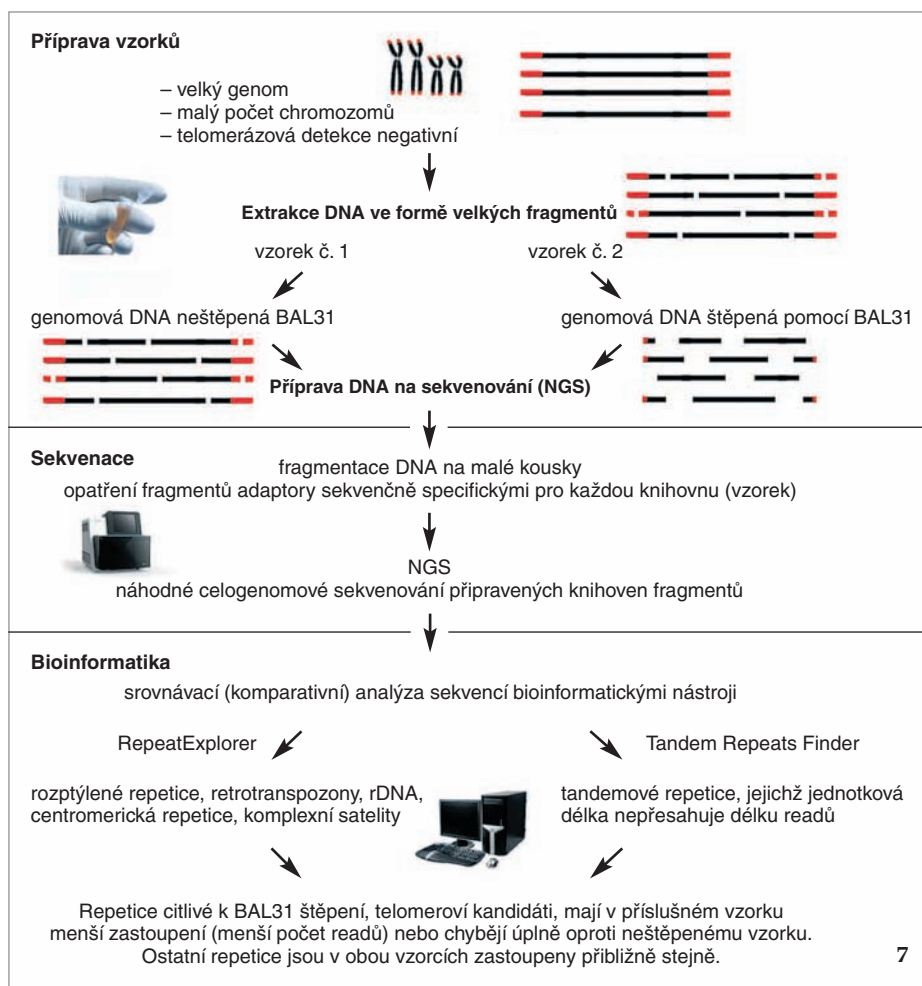
Můžeme také říct, že dříve bylo výzvou, jak informací velkého genomu, v řádu jednotek až desítek miliard párů bází, efektivně získat ve formě dostatečného množství krátkých sekvencí, tzv. readů – čtení (z anglického reads, o délce několik tisíc párů bází), a tato čtení díky překryvům správně seřadit tak, aby konečné sestavení (assembly) pokrylo celý genom a odpovídalo v detailu i v celochromozomovém měřítku skutečnosti. Jednoduché sestavování na základě překryvu sekvencí v krátkých readech brzy naráží na problém, který přináší komplexita velkých genomů. V rámci genomu se kromě jedinečných sekvencí (např. geny v jediné kopii) opakují repetitivní oblasti náhodně rozesté po celé jeho délce (např. retrotranspozony) nebo v uspořádaných blocích na specifických místech chromozomů (např. tandemové repetice telomer a centromer). A situace je o to zajímavější, že se mohou opakovat i obrovské chromozomové oblasti, celé chromozomy nebo dokonce chromozomové sady. Z biologického hlediska přitahují tyto informační amplifikace v rámci genomu velkou pozornost a přitahují se po jejich původu i významu. Z hlediska bioinformatiky jde ale o potíže, které znemožňují jednoduché celogenomové sestavování jen na základě dostatečného počtu krátkých readů.

Sekvenování nové generace sice dokonce překonalo problém se získáváním

potřebného množství kvalitních krátkých čtení, ale spolehlivé a kompletní sestavování velkých genomů *de novo* je pořád finančně a výpočetně náročné. Vyžaduje promyšlenou strategii spojenou s úsilím mezinárodních konsorcií, do kterých se zapojuje i Česká republika (viz např. Živa 2012, 4: 155–157 a článek o genomu obilovin na str. 111 v tomto čísle Živy). Pokud by rostliny s neznámými telomery byly v hledáčku těchto velkých sekvenačních projektů, dříve nebo později by se celogenomové sestavování pročetlo do nové telomerové sekvence, kterou by zbývalo ověřit hybridizačními technikami, metodou TRAP a testem BAL31 (obr. 6d). Pro menší vědecké projekty standardního typu je však dohledání telomerové sekvence sestavováním rozsáhlého genomu velké a zbytečně drahé sousto. Takřkajíc „všeobjímající“ výstup NGS, balík stovek milionů krátkých a kvalitních readů pokrývající celý genom dokonce několikrát, je stále lákavý odrazový můstek pro vymyšlení strategií, jak z nesestavených dat selektivně odlišovat sekvence určitého typu.

Brilantním příkladem je RepeatExplorer (RE), uživatelsky přívětivá sada nástrojů, která dokáže účinně rozpoznávat repetitivní sekvence *de novo* (bez hledání podobností s již známými repetitivy) na základě velmi nízkého pokrytí genomu daty NGS. Jestliže si spojíme předpoklad, že každá telomerová sekvence by měla být tandemová repetice citlivá ke štěpení nukleázou BAL31 a dostupnost nástrojů pro detekci repetitivní DNA v NGS datech, není divu, že RE byl nakonec úspěšně použit při odhalení telomerové DNA u kladivníků. Výhoda tohoto produktu spočívá mimo jiné v tom, že i průměrný počítačový uživatel se rychle dokáže zorientovat v jeho použití v rámci webového prostředí GALAXY, a může tak poměrně spolehlivě provádět dokonce kvantitativní a komparativní (srovnávací) sekvenční analýzu z různých druhů a vzorků. Právě komparativní analýza vzorků štěpené a neštěpené (BAL31) genomové DNA (obr. 7) konečně poskytla slibnou sekvenční (TTTTTTAGGG)_n pro kladivník nádherný (*C. elegans*). Následně pokusy včetně TRAP a FISH ji potvrdily (obr. 8). Klasický test citlivosti k BAL31 byl rovněž pro jistotu proveden, ale ve své podstatě se kandidátní sekvence ze senzitivních repetitivních již rekrutovaly.

Zcela ojedinelý nástroj, jakým je RepeatExplorer, vymysleli a vyvinuli vědci v Laboratoři molekulární cytogenetiky rostlin Biologického centra AV ČR. Ve spolupráci s kolegy z IPK Gatersleben, BFÚ AV ČR a Masarykovy univerzity dospěli na poli telomerové biologie k unikátnímu výsledku, když zjistili, že i v rámci jediného rodu, konkrétně rostlinného rodu genlisej (*Genlisea*), může dojít k diverzifikaci telomerové sekvence. U druhů s menším genomem, např. *G. nigrocaulis* (2n = 40, 172 Mb), se vyskytují konsenzuální rostlinné motivy (TTTTAGGG)_n, zatímco u *G. hispidula* s velkým genomem (2n = 40, 3,1 Gb) došlo ke změně na dva vzájemně se střídající motivy (TTCAGG/TTTCAGG)_n. U rostlin to bylo také poprvé, kdy někdo zaznamenal přítomnost cytozinu v motivu telomerového vlákna bohatého na guanin.



Poslední netelomerázoví kandidáti – česnek a cibule?

Nutno však připustit, že RepeatExplorer není nejvhodnější pro analýzu velmi málo komplexních repetitivních sekvencí, mezi které pravidelně patří minisatelitní tandemové, a tudíž i telomerové sekvence. Pro analýzu těchto dat jsou určeny jiné volně dostupné nástroje (např. TAREAN a Tandem Repeats Finder). Pravděpodobně z tohoto důvodu se nedařilo pomocí RE zopakovat úspěch z rodu *Cestrum* také u hospodářsky významného rodu *Allium*. Postupem času začalo převládat mínění, že „cibulové“ telomery musejí být opravdu zvláštní a nezávislé na telomeráze, protože jinak by přece jejich sekvence nedokázala tak dlouho odolávat identifikaci. Někdo sázel na rRNA geny včetně mezerníkových oblastí, tandemové repetice a jiný heterochromatin, další věřili spíše v retrotranspozony, kterými jsou až na výjimky rostlinné genomy doslova napěchované. (Pozn.: Osobně jsem podlehl představě, že k takové diverzifikaci v rodu *Allium* došlo, že např. česnek medvědí – *A. ursinum*, obr. 5, má na koncích chromozomů především bloky rRNA genů a vzdálenější druhy jako cibule kuchyňská – *A. cepa*, mají sekvenční druhotně odvozenou z části mezerníkové oblasti některého rRNA bloku. Tato mezerníková oblast může obsahovat různé repetitivní motivy včetně pozůstatků mobilních elementů, mikrosatelitů atd.) Ještě bizarnější možnosti – koncové kovalentně vázané proteiny a uzavřené smyčky – se nabízely při uvážení poměrně běžného horizontálního přenosu mezi prokaryoty a rostlinami (*Agrobacterium*). A konečně *Genlisea*

7 Schéma BAL31-NGS strategie pro získání telomerových kandidátů (NGS – Next Generation Sequencing). Postup má tři fáze. Nejprve je potřeba připravit DNA pro tvorbu sekvenačních knihoven. Paralelně se připraví dva vzorky vysokomolekulární DNA, z nichž jeden je čistá genomová DNA a druhý rovněž genomová DNA, ale ošetřená nukleázou BAL31. Následuje fáze sekvenace, která zahrnuje přípravu sekvenačních knihoven a samotnou sekvenaci. V třetí fázi se pomocí bioinformatických nástrojů ze získaných NGS dat identifikují repetice se sníženým výskytem v datasetu odpovídajícím vzorku štěpenému pomocí BAL31.

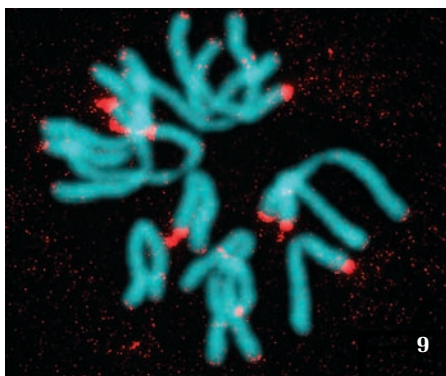
nás nedávno poučila, že i v rámci jednoho rodu může dojít k diverzifikaci telomerové sekvence, přičemž monofyletický rod *Allium* čítá stovky relativně vzdálených druhů (dokonce až 550–800 druhů podle různých zdrojů).

Metodou genomové hybridizace *in situ* (GISH) se dají rozlišit evolučně blízké od vzdálených genomů takových druhů a rodů. FISH a GISH jsou velmi podobné postupy. V obou případech se připravuje mikroskopický preparát nejčastěji s mitotickými chromozomy, na nich se následně pomocí fluorescenčně značené sondy lokalizují sekvence. Na rozdíl od FISH se u GISH nepoužívá jako sonda jediná sekvence nebo kombinace několika málo sekvencí, ale celá značená genomová DNA z jiného druhu. Sonda odvozená z velice blízkého a podobného genomu (např. sesterského druhu starého několik stovek či tisíc let) označí celé chromozomy cílového druhu. Je to

dáno hlavně přítomností hodně podobných repetitivních sekvencí v obou druzích. V evolučním měřítku však dochází k rozrůzněnosti v sekvencích (např. retrotranspozonů) a u velmi vzdálených příbuzných už se označí jen ty nejkonzervativnější repetice, jako jsou bloky rDNA a telomery. U vzdálených druhů, rodů a čeledí, u nichž se změnila i telomerová sekvence, poskytuje sonda se značenou genomovou DNA z rostlin s klasickými telomery signál odpovídající jen rDNA.

S cílem zjistit, zda i vzdálené druhy v rámci rodu *Allium* sdílejí stejnou telomerovou sekvenci, jsme provedli GISH, kde chromozomy byly připraveny z česneku medvědího a sondou tvořila značená genomová DNA cibule kuchyňské, tradiční odrůdy 'Všetana' (okrově žlutá cibule, která získala jméno podle městyse Všetať; obr. 9). K našemu překvapení byla z výsledku zřejmá přítomnost minimálně dvou odlišných typů signálů. Silné koncové signály odpovídající rDNA nikoho nepřekvapily a víceméně sloužily jako pozitivní kontrola dobře provedené GISH, ale slabé dvojité signály na koncích všech chromozomů poprvé poodhalily tajemství „cibulových“ telomer. Nebylo sice možné říct, o jakou sekvenci přesně jde a zda neleží jen těsně pod skutečnou telomerou, ale od této chvíle jsme mohli usuzovat alespoň o jejím charakteru. Nyní jsme věděli, že máme skutečně hledat repetici, která je navíc stejná nebo výrazně podobná v obou vzdálených genomech. A protože zmíněný dvoutečkový terminální signál z GISH silně připomínal výsledky telomerové FISH v druzích se známými telomery, pro jistotu jsme ještě jednou provedli hybridizaci chromozomů česneku medvědího s rostlinnou a lidskou sondou. Pouze jsme tím ale obě sekvence jako případné telomerové definitivně vyloučili, protože žádný signál neposkytly.

Tehdy nastal čas na komparativní analýzu dat získaných z NGS. Nejprve jsme porovnávali druhy použité při GISH (česnek medvědí a cibuli kuchyňskou) a později jsme analýzu rozšířili o dalších 9 dostupných druhů. K dispozici jsme tak měli celkem 22 souborů sekvencí dat (datasetů) z 11 různých druhů od česneku medvědího až po cibuli, přičemž pro každý druh šlo o dataset z BAL31-štěpeného a neštěpeného vzorku. První bioinformatické analýzy byly prováděny pomocí RepeatExplorer a z nich bylo zřejmé, že česnek medvědí a cibule kuchyňská sdílejí podobnost jen v rDNA a pouze v omezeném výčtu retrotranspozonů. Téměř žádnou podobnost jsme nenacházeli v souboru tandemových repetit. Sám o sobě by tento fakt nebyl na škodu. Bylo by skvělé mít u rostlin modelový druh s alternativním netelomerázovým systémem údržby konce chromozomů a rod *Allium* představoval v tomto směru velký příslib. Ale sdílené repetice česneku medvědího a cibule, které jsme ve výstupu RE našli, nebyly citlivé k BAL31 – jejich zastoupení v datasetech z BAL31-štěpených vzorků nevykazovalo jakýkoli významný úbytek. Naštěstí se do projektu zapojil doktorand – Petr Fajkus – který i přes lákavé hypotézy o netelomerázových systémech nepřestal ověřovat veřejně dostupná transkriptomická data. Tehdy v nově publiko-



vaném datasetu z cibule zimní (*A. fistulosum*) našel části sekvence homologní s geny pro katalytické podjednotky telomerázy TERT u vzdáleně příbuzných rostlin, a následně získal sekvenci kompletního genu *TERT*. V tu chvíli se celý tým vrhl na jediný úkol, vytipovat krátké tandemové sekvence (odhadem do 15 párů bází) pomocí nástroje Tandem Repeats Finder, které po štěpení BAL31 v příslušných datasetech oproti těm ze vzorků neštěpené DNA ubývají nebo mizí úplně. A konstrukce o netelomerázovém systému se začala bortit. Je to neuvěřitelné, ale mezi desítkami milionů readů z každého druhu, jež obsahují stovky různých krátkých tandemových motivů, se našel pouze jediný kandidát, který odpovídal zadaným kritériím pro telomerovou sekvenci u všech testovaných druhů.

8 Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) jako důkaz telomerové lokalizace kandidátní sekvence u kládvníku nádherného (*Cestrum elegans*). Červeně zobrazeny jeho mitotické chromozomy ($2n = 16, 20 \text{ Gb}$; obarvené pomocí fluorescenčního barviva DAPI specifického pro veškerou DNA) a zelené signály poskytnuté fluorescenčně značenou sondou odvozenou od motivu (TTTTTTAGGG)_n.

9 Genomová hybridizace *in situ* (GISH) slouží jako nástroj pro zjištění lokalizace společných repetit. Modře jsou zobrazeny mitotické chromozomy česneku medvědího (*A. ursinum*, $2n = 14, 64 \text{ Gb}$; obarvené DAPI) a červený signál pochází z genomové sondy cibule kuchyňské (*A. cepa*) odrůdy 'Všetana'. Velké červené bloky odpovídají rDNA a slabší dvojité signály na koncích chromozomů naznačují přítomnost neznámé, ale společné repetitivní telomerové sekvence pro oba druhy.

10 Výsledek získaný cytogenetickou metodou FISH – důkaz telomerové lokalizace kandidátní sekvence u česneku medvědího. Červeně mitotické chromozomy (obarveno DAPI) a zelené signály poskytnuté fluorescenčně značenou sondou odvozenou od motivu (CTCGGTTATGGG)_n. Všechny orig. a snímky V. Pešky, není-li uvedeno jinak

Ve všech jsme detekovali jedinou tandemovou repetici, která měla délku motivu nejméně 3 bp a nejvíce 15 bp, a vždy se jevila jako citlivá ke štěpení enzymem BAL31 – (CTCGGTTATGGG)_n. Následně jsme kritéria rozvolnili a vzali v úvahu i repetice, jež se až ve třech druzích nemusí jevit jako citlivé k BAL31, zároveň jsme připustili motivy, které se až u tří druhů nemusí vyskytovat vůbec. Takto jsme získali desítky motivů, z nichž se v TRAP testovaly ty obsahující alespoň dva sousedící guaniny (ca 17 sekvencí). Jediný pozitivní výsledek v TRAP jsme získali pro výše uvedený motiv. Zbývalo pomocí FISH ověřit, zda tato sekvence leží na koncích chromozomů, je skutečně citlivá k BAL31 a zda je produktem telomerázové reakce. Nikdo ale nemá rád, když je k dispozici jeden výstřel na trefu do černého. Proto jsme kritéria pro finální kandidáty poněkud rozvolnili a pomocí TRAP testovali 17 různých motivů, jen proto, aby nás výsledek utvrdil, že onen jediný kandidát s podivnou sekvencí (CTCGGTTATGGG)_n, ale jinak nejslibnější, je ten správný (obr. 10).

A tak skončily naděje, tedy prozatím, na objev netelomerázové výjimky v rámci suchozemských rostlin. U živočichů jsme si jisti, že alespoň občas je telomeráza vystřídána netelomerázovými systémy. U suchozemských rostlin začíná být v tomto smyslu zřejmá telomerázová totalita. Útěchou může být, že na odhalení prvního příkladu u tabáku virginického (*Nicotiana tabacum*, r. 1996) a zatím i poslední varianty z cibulovin (r. 2016) se podepsala česká pracoviště.

Tato práce vznikla za podpory projektu SYMBIT s registračním číslem CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477 financovaného z Evropského fondu pro regionální rozvoj.

Použitá literatura, internetové odkazy a slovník termínů uveřejněny na webu Živý.