

Chromozomová teritoria

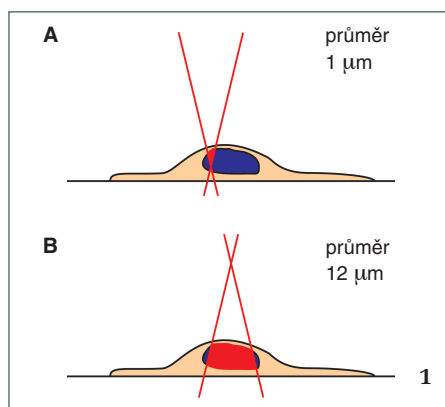
Pod pojmem chromozom si řada lidí většinou představí drobná tělíska ve tvaru X nebo V, která nesou dědičnou informaci ve formě DNA a která lze obarvit některým z vhodných barviv. Takovou morfologií se však chromozomy vyznačují jen během dělení jader, tedy po krátký časový úsek. Po většinu času bývají despiralizovány v buněčném jádře ve formě dlouhých vláken. Dlouho platil předpoklad, že chromozomy jsou v jádře značně rozvolněné a umístěné víceméně náhodně, vyskytující se jako zřetelně ohraničená tělíska jen během dělení buňky. Představa náhodného chaotického uspořádání chromozomů v jádře však byla během posledních několika let do základů vyvrácena.

Mikrolaser

První pokusy naznačující existenci chromozomových teritorií byly publikovány již r. 1885 Carlem Rablem, který při mikroskopickém zkoumání dělicích se buněk mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) a mararáta jeskynního (*Proteus anguinus*) zjistil, že poloha chromozomů v anafázi odpovídá jejich umístění v pozdějších fázích buněčného dělení a usoudil, že v interfázi musí chromozomy zaujímat určité specifické oblasti. Vzápětí se podařilo prokázat, že se telomery (koncové části chromozomů) většinou nacházejí v blízkosti jaderné membrány (Boveri 1888, 1909), ale poté dlouhou dobu nedošlo v této oblasti k výraznějšímu pokroku. Až na přelomu 70. a 80. let 20. stol. bratři Thomas a Christoph Cremerovi provedli experiment za použití tehdy nového unikátního zařízení – mikrolaseru, jímž narušili strukturu části jaderné DNA. Toto zařízení bylo již tak přesné, že porušilo DNA jen v určité oblasti jádra, zatímco zbytek zůstal netknut (viz obr. 1). Pokud by DNA jednotlivých chromozomů byla v jádře umístěna chaoticky a propletena (jak tvrdil tehdejší většinový názor), ovlivnili by mikrolaserem většinu chromozomů přítomných v jádře. Destrukce DNA v části jádra však vedla k narušení jen některých z nich. Získané výsledky tedy ukazovaly, že DNA jednotlivých chromozomů zaujímá v jádře odlišné oblasti – teritoria. Teprve po několika desetiletích byly tyto výsledky potvrzeny, a to tím, že různé chromozomy (přesněji jejich DNA) se specificky označily fluorescenčními látkami (vícebarevná fluorescenční hybridizace *in vivo*), což umožnilo další výzkum lokalizace chromozomů v interfázním jádře, tedy v době mezi dělením buňky.

Jak vypadá chromozomové teritorium?

Ve světle nejnovějších poznatků se zdá, že jednotlivé chromozomy zaujímají v jádře buňky určitou ohraničenou a předem danou oblast – chromozomové teritorium. Za použití fluorescenčního značení DNA *in vivo* se podařilo prokázat, že chromozomová teritoria jsou víceméně kulovitého tva-



ru a mají přibližně dva mikrometry v průměru. Byla zjištěna u celé řady vyšších eukaryot včetně člověka a běžných laboratorních zvířat. Naproti tomu chromozomy některých nižších eukaryot, třeba kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, jsou uspořádány poněkud volněji.

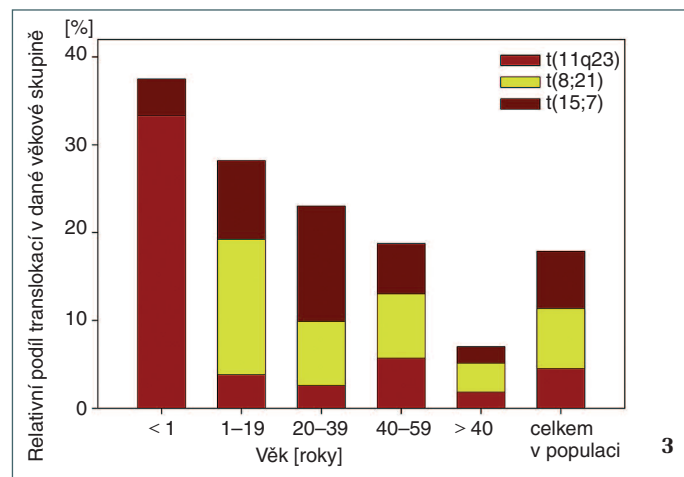
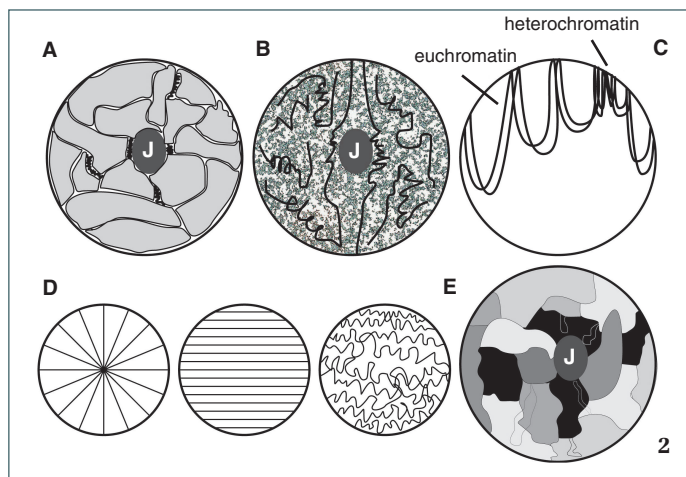
Také vnitřní uspořádání chromozomových teritorií je do značné míry pravidelné. Existuje zde síť kanálků, které se často větví a slouží jako přístupové cesty pro látky stimulující, nebo naopak potlačující genovou expresi. Uspořádání chromozomu není v rámci chromozomového teritoria náhodné. Chromozomová raménka bývají držena daleko od sebe a oblasti bohaté na geny bývají odděleny od úseků na geny chudých. Tento systém patrně přispívá ke strukturálnímu uspořádání chromozomu a soudí se, že by mohl napomáhat koordinované regulaci jednotlivých shluků genů.

U rostlin, hmyzu a některých dalších bezobratlých mají chromozomy tendenci být polarizovány. To znamená, že konce jejich ramének (telomery) jsou na jednom okraji buněčného jádra a centromera (oblast doteku chromatid) na konci opačném. V savčích buňkách je ale organizace chromozomů poněkud komplexnější (obr. 2). Každý chromozom se v jádře vyskytuje v předem dané oblasti, kterou lze vyjádřit souřadnicemi vůči středu buněčného jádra. Některé nacházíme pravidelně na okrajích jádra, zatímco jiné jsou vždy uvnitř. Protože DNA

1 Schematické zobrazení pokusu využívajícího mikrolaser a dokazujícího existenci chromozomových teritorií. A – Paprsek UV záření byl zaostřen na oblast, jejíž průměr nepřesahuje 1 μm, což je plocha výrazně menší, než je průměr jádra většiny savčích buněk. UV záření tak poškodilo DNA jen v části jádra. Na později zhotoveném chromozomovém preparátu bylo znatelné poškození jen několika málo chromozomů, z toho vyplývá, že nejsou umístěny náhodně. B – Paprsek UV záření byl rozostřen tak, že dopadal na plochu o průměru 12 μm, tedy na plochu, kterou na preparátu zabíralo téměř celé jádro ozařované buňky. Množství energie dopadajícího na jednotku plochy bylo samozřejmě řádově nižší, přesto došlo k plošnému poškození chromozomové sádky. Podle: T. Cremer a Ch. Cremer (2006), orig. P. Heneberg 2 Vývoj představ o organizaci jádra.

A, B – V r. 1952 byli schopni cytologové v jádře zaznamenat jen jádérko (J) a několik oblastí bohatých heterochromatinem, tzv. chromocentra (zde černé řetězce). Zbytek jádra obsahoval chromatin s nejasnou organizací, přičemž jedna z hypotéz (A) tvrdila, že tuto masu téměř kompletně tvoří euchromatin, druhá pak (B), že euchromatin tvoří malé shluky, které plavou ve velkém objemu jaderné tekutiny (Pollister 1952). C – D. E. Comings (1968) postuloval hypotézu tvrdící, že interfázní chromozomy jsou rozprostřeny přes víceméně celé jádro. Chromozomy měly být přichyceny k membráně, přičemž heterochromatin v kratších intervalech než euchromatin; homologní chromozomy měly být ukotveny blízko sebe. D – O několik let později F. Vogel a T. M. Schroeder (1974) ve třech modelech navrhli hypotetické uspořádání interfázních 30 nm chromatinových vláken. Hypotéza předpokládala uchycení vláken k jaderným pólům a navrhovala tři modely, jak by toto uspořádání mohlo vypadat. E – Jeden z novějších modelů zahrnující existenci chromozomových teritorií – model interchromozomální sítě (Branco a Pomo 2006). Ten předpokládá, že chromatin jednotlivých chromozomů není od sebe oddělen volnými prostory, přesto chromatinovým vláknům je umožněno expandovat do teritorií sousedních chromozomů. Orig. P. Heneberg 3 Frekvence výskytu jednotlivých chromozomálních translokací (přesunu částí DNA) je vysoce specifická v závislosti na typu buňky i jejím stáří. Zde je zobrazena frekvence výskytu nejčastějších chromozomálních translokací u pacientů s akutní myeloidní leukémií, rozdělených do pěti věkových skupin. Velmi výrazná je např. převaha translokací zahrnujících oblasti 11q23 u dětí do jednoho roku věku (n = 660 pacientů). Podle: M. Sakurai a G. J. Swansbury (1984), orig. P. Heneberg

jednotlivých chromozomů není oddělena žádnými pevnými hranicemi, je pozice jednotlivých chromozomových teritorií spíše pravděpodobnostního než absolutního rázu a teritoria se mohou mírně lišit polohou dokonce i mezi dvěma kopiemi stejného chromozomu v jednom jádře. Poloha určitého chromozomu se liší mezi různými



nými typy buněk a tkání a mění se i v procesu diferenciaci a vývoje. Např. během diferenciaci myších T buněk (buňky imunitního systému) se chromozom 6 pohybuje z pozice uvnitř jádra směrem k jeho okraji. Fyziologický význam těchto pravidelně se objevujících změn zůstává zatím nejasný. Nějaký důvod však tyto změny určitě budou mít, neboť zůstávají velmi stabilní v průběhu evoluce a zároveň jsou velmi podobné u buněk, které mají společný vývojový základ.

K čemu slouží chromozomová teritoria?

Chromozomová teritoria zajišťují patrně několik důležitých funkcí. Prozatím je asi nejlépe prokázáno (např. Zirbel a kol. 1993), že umožňují oddělení aktivních a neaktivních oblastí genomu. To znamená, že prostorově oddělují ty části chromozomů, v nichž dochází k intenzivní transkripci (přepis DNA do RNA) od těch, kde je transkripce minimální a z pohledu buňky nežádoucí. Pro buňku je tedy energeticky méně náročné stimulovat nebo naopak potlačit určitý shluk genů. Asi nejznámějším příkladem umístění více genů do jedné skupiny je jadérko – jaderná struktura zahrnující shluky genů kódujících ribozomovou RNA. Jsou ale známy i jiné případy, např. u některých krevních buněk bylo pozorováno shlukování různých genů regulovaných navzájem podobným způsobem poté, co byly buňky aktivovány vnějším podnětem.

Co organizuje chromozomy v interfázním jádře?

Odpověď na tuto otázku stále čeká na své objasnění. Existují dvě hypotézy. První tvrdí, že v jádře se nachází lešení složené z jaderných proteinů – ekvivalent dobře známých a pro buňku vysoce důležitých aktivních vláken v cytoplazmě. Takové lešení by dobře vysvětlovalo stabilitu polohy jednotlivých chromozomů během buněčného cyklu. Obtížnější je vysvětlit, jak chromozom pozná, na jaké konkrétní místo se má zařadit – je ale možné, že se poloha chromozomu řídí třeba pozicí centrioly (v živočišných buňkách odpovídá za organizaci mitotického vřetenka), popř. jiných míst s unikátní pozicí v buňce. Inspirací pro takové hypotézy mohou být nedávno objevené vlastnosti některých bakteriálních proteinů, které se uloží na správné místo pouhým rozpoznáním zakřivení buněčné membrány (Ramamurthi a Losick 2009).

Druhá hypotéza tvrdí, že se chromozomy rozmisťují v jádře podle profilu aktivity svých genů. Hypotéza předpokládá, že míra exprese jednotlivých genů v dané části chromozomu totiž ovlivňuje strukturu chromatinu, přičemž neaktivní regiony jsou více spiralizovány, aktivní despiralizovány. V závislosti na rozložení aktivních míst se předpokládá, že různé chromozomy by mohly zaujímat odlišný tvar a lišit se i v dalších fyzikálních vlastnostech. Protože jádro je prostorově omezené, chromozomy by se do něj snažily naskládat tak, jak je to pro ně energeticky nejvýhodnější, shlukovala by se místa s větší nebo naopak menším stupněm spiralizace apod. Je ale nutno podotknout, že obě tyto hypotézy jsou dodnes velmi spekulativní.

Co na to jednotlivé geny?

Nyní se dostáváme na nižší úroveň organizace genomu, k jednotlivým genům, tj. základním funkčním jednotkám každého genomu. U kvasinek je známo, že aktivace některých genů vede k jejich přemístění blíže jaderné membráně. V savčích buňkách naopak některé geny putují po své aktivaci ke středu jádra. Také víme, že některé velmi intenzivně přepisované oblasti savčího genomu, např. geny lokusu MHC třídy II (kódují proteiny klíčové pro imunitní systém organismu) se dostávají z teritoria svého chromozomu ihned poté, co jsou aktivovány. Na druhou stranu známe mnoho genů, které po aktivaci svou pozici nemění, čili nejde o univerzální mechanismus aktivace genu, ale spíše o jednu z metod podpory jeho aktivity.

Podstatná je relativní pozice genu k jiným genům nebo sekvencím. Jejich změna může přenést regulační elementy do blízkosti určitých genů. Již dlouho známe nespočetná pozorování, že takový přesun aktivního genu vede k utlumení exprese původně aktivního genu. Ukazuje se, že nemusí jít o přenos v rámci stejného chromozomu, postačuje, když se gen dostane do blízkosti heterochromatinového bloku na sousedním chromozomu. Dobrým příkladem jsou geny pro pachové receptory v myši. Každý čichový neuron myši exprimuje jen jeden z přibližně tisícovky možných čichových receptorů. Který gen bude exprimován, určuje asociace regulačního elementu na jednom chromozomu s genem pro receptor na chromozomu jiném. Existují spekulace, že podobný mechanismus se používá pro imprinting rodičov-

ských genů, tj. pro proces, kdy se rozhoduje, zda bude v organismu potlačena exprese alely genu pocházející od matky, nebo od otce. Jinou možností ovlivnění je přesun genu do blízkosti heterochromatinu.

Nádorové bujení

Existence chromozomových teritorií vysvětluje i jednu skutečnost, která zůstávala dlouhou dobu záhadou, a sice proč v organismu dochází s vysokou frekvencí k chromozomovým translokacím (přenosům) mezi stále stejnými chromozomovými úseky. Po zlomu v chromozomové DNA může dojít k translokaci odlomené části na jiný chromozom. Pokud platí uvedená definice, mělo by docházet k translokacím mezi různými chromozomy víceméně náhodně. Většinou se přenos DNA ale odehrává mezi stále stejnými chromozomy nebo dokonce mezi stejnými částmi chromozomů. V rámci jednoho druhu organismu a jednoho typu buněk existuje vždy jen několik translokací vyskytujících se s vysokou frekvencí, a mnoho dalších, které se objevují velmi vzácně. Tyto přesuny části DNA mívají často za následek změnu normálního buňky v nádorovou. Známým příkladem je fúze genů zvaných *BCR* a *Abl*, nacházejících se původně na 9. a 22. chromozomu a spojených následkem reciproké translokace mezi těmito chromozomy, která vede ke vzniku chronické myeloidní leukemie.

Jak translokace vznikne? V DNA dochází s určitou frekvencí k jedno- nebo dvouřetězcovým zlomům. Pokud není dvouřetězcový zlom dostatečně rychle a správně opraven, mají nově vzniklé konce chromozomu tendenci připojit se k jiné DNA nacházející se poblíž. Spojení s chromozomem, jehož teritorium je blízko, je pravděpodobnější než spojení s chromozomem na opačném konci jádra.

V nedávné době byl popsán ještě jeden náleze – v nádorových buňkách (vyjma nádorů prostaty) se jednotlivé geny většinou přesouvají k okraji jádra. Důvod není znám, patrně jde o problém s replikací v těchto buňkách – nádorové buňky mívají nepravděpodobně zmoženě sady chromozomů.

Existují snahy o využití existence chromozomových teritorií v preventivní medicíně. Konkrétně identifikace změn pozice jednotlivých chromozomů nebo jejich částí jako signálu, že v daném genomu dochází k nesprávnému přepisu některých genů a následně k manifestaci nemocí spojených s těmito geny.