



Prof. Jiří Drahoš při předávání medaile ocenil období od okamžiku, kdy Jana Suda poznal – při udělování cen časopisu Živa v akademické vile Lanna, kdy tehdy čerstvě nastoupivší docent do role předsedy redakční rady s vehemencí a se zvučným

hlasem, s energií sobě vlastní, provedl přítomné zahájením slavnostního aktu. Poté se setkávali i při dalších příležitostech.

Jan Suda ztělesňuje vzácný dar a odhodlanost biologii poutavě přibližovat laickým, leč vzdělaným zájemcům.

Z laudatia Petra Rába

V letošním roce slaví Živa 164 let od založení a 64 let nepřetržitého vydávání. Vznik časopisu přírodnického znamenal v prostředí probouzejícího se národního povědomí malého národa uprostřed Evropy významný počín a svědčil o světovém rozhledu svého zakladatele J. E. Purkyně. Na konci předlouhé štafety generací autorů a redaktorů Živy stojí naše laureátka.

RNDr. Jana Šrotová vystudovala na katedře obecné biologie a fyziologie živočichů Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Dlouhodobě a úspěšně působí v Živě, od r. 2000 jako odborná redaktorka, od r. 2006 je šéfredaktorkou. Pod jejím vedením se Živa stala moderním populárně-naučným periodikem, sdružujícím autory z ústavů Akademie věd, univerzit i dalších odborných institucí, přitom okruh témat i autorů je nyní výrazně širší, než býval v minulosti.

Četné její aktivity směřují k formování další generace biologů, velmi kladný ohlas zaznamenalo např. zavedení monotematických čísel. Mají značný edukační potenciál a jako výukový materiál jsou již využívány. Ze Živy a velkého kolektivu autorů a příznivců tak vzniklo dílo, které je více než důstojným odkazem svého zakladatele.

Více na www.avcr.cz

Vratislav Peška

Výlet na konec genomu

1. Jak se kopírují telomery

Na první pohled nás v krajině fascinují atraktivní scenérie, rozmanité tvary, barvy a vůně, a tak bychom mohli pokračovat dlouho. První a hlavně příjemný estetický dojem budí kladné emoce a zájem o hlubší poznání. Příroda má ale pěknou i druhou, skrytou tvář, tu vidíme až při nahlížení pod povrch, hledání souvislostí a příčin, rozmanitosti při řešení problémů, s nimiž se život vypořádává a vyvíjí se. Různá řešení jedné výzvy, která vzniká při replikaci konců lineární DNA, mohou být ukázkou pestrosti molekulárních variací na jediné téma, jež nazýváme problém replikace konců (End-Replication Problem – ERP). Následující text by měl tuto pestrost přiblížit, navázat na předchozí článek v Živě o telomerách, tedy terminálních částech chromozomů (2002, 6: 245–248), a připravit teoretický podklad pro další díl, věnovaný rostlinným telomerám.

Replikace DNA

Jde o efektivní, i když nikoli jedinou možnost kopírování dědičného materiálu, který má být předán z rodičů do potomstva a při dělení buněk. Zatím nebyl objeven buněčný organismus nezávislý na replikaci DNA. V případě některých nebuněčných forem života (akaryot) – RNA virů, retrovirů a retrotranspozonů nedochází ke zmnožení jejich dědičné informace pomocí replikace DNA, ale replikací RNA nebo reverzní transkripcí (přepisem z RNA do DNA; viz např. Živa 2006, 6: 242–244).

Je zajímavé, že na principu reverzní transkripce funguje i samotná telomeráza, enzym, jenž dokáže prodlužovat telomerní sekvenci a kompenzovat ztrátu DNA v důsledku neúplné replikace konců. Telomeráza představuje sama o sobě akaryotní formu. U octomilky *Drosophila melanogaster* její funkci zcela nahrazují retrotranspozony. To otevírá diskuzi, zda se nevyvinula z retroelementu. Za povšimnutí také stojí, že největší nezávislost pro kompletní replikaci genomu vykazují prokaryota s kružnicovým (cirkulárním) genomem.

Eukaryota a akaryota v tomto smyslu na sobě závisejí.

Model replikace DNA – obecný, ale poměrně detailní popis vzniku dvou dceřiných molekul DNA z jedné mateřské, jehož ústředním hráčem je enzym DNA polymeráza závislá na DNA templátu – byl intenzivně zpřesňován na konci 60. let 20. stol. Jeho zjednodušené schéma v podstatě platí i pro tak vzdálené životní formy, jakými jsou bakterie a lidské buňky. Zároveň však dodejme, že evolučně osvědčený replikační mechanismus dokáže sice vytvořit kompletní kopii z celé kružnicové molekuly – třeba bakteriálního genomu *Escherichia coli*, ale na úplných koncích lineárních molekul DNA – např. u lidských chromozomů, zůstává DNA polymeráza bezradná. Replikace lineárních molekul totiž zanechává dceřině molekuly o několik desítek až stovek nukleotidů kratší (obr. 4). Kdyby nevznikl ještě další mechanismus, který toto zkracování kompenzuje, lineární genomy by tak, jak je známe dnes, včetně lidského, neexistovaly.

Replikace konců lineární DNA

Problém replikace konců je mimo jiné zajímavý i tím, že byl formulován téměř současně a nezávisle na obou stranách železné opony. Poprvé tento nedostatek v replikačním modelu publikoval r. 1971 v ruštině sovětský vědec Alexej Olovnikov. Nezávisle na něm, ale o rok později, bylo na nedostatek upozorněno také v anglicky psané publikaci, a to jedním z objevitelů struktury DNA Jamesem D. Watsonem. Watson byl mnohem stručnější než Olovnikov, který předložil hned několik teoretických konstrukcí o zkracování molekuly DNA a jeho příčinách, z nichž jedna zohledňuje RNA primer potřebný pro start aktivní DNA polymerázy a nakonec se i prakticky potvrdila. Logickým propojením



zkracování konců DNA při replikaci a stárnutí somatických buněk, které po několika desítkách dělení dosahují tzv. Hayflickova limitu a již se dále nedělí, Olovnikov své současníky rozhodně předběhl. Leonard Hayflick a Paul S. Moorhead v r. 1961 konkrétně pozorovali, že lidské buňky kultivované *in vitro* mohou prodělat jen omezený počet dělení – nazváno Hayflickovým limitem – a pak už neproliferují, stárnou až nakonec umírají.

Do značné míry se realitě přiblížila v řadě ohledů sice nepřesná, ale správná předpověď existence speciální DNA polymerázy, která je u člověka přítomna jen v embryonálních, kmenových a rakovinných buňkách a dokáže replikační problém na koncích lineárních molekul řešit. Jde o telomerázu, jež umí zkracování konců napravit, ale která byla objevena až o 14 let později. V r. 2009 za objasnění způsobu, jak telomerická DNA a telomeráza chrání konce molekul DNA, získali Nobelovu cenu Elizabeth Blackburnová, Carol Greiderová a Jack Szostak (viz např. Vesmír 2010, 6: 357–359). Dnes je Olovnikov ve spojení s telomery citován běžně a celosvětově. Největší překážkou pro rychlé rozšíření jeho myšlenek byl zřejmě fakt, že původní práce nevyšla v angličtině. Nabízí se zajímavá otázka, jaká část informací zůstává v současnosti nesdílena mezi anglicky,

rusky anebo např. čínsky mluvící vědeckou komunitou. Druhým důvodem, proč Olovnikov zůstal stranou, je, že v biologických vědách mají větší kredit až experimentálně „ověřené hypotézy“, tedy důkazy.

Starší cirkulární a mladší lineární genomy?

Nejjednodušším řešením problematické replikace konců lineární DNA je konce tedy nemít. Tuto strategii nalézáme nejčastěji u kružnicových genomů prokaryotického typu (nikoli však bez výjimek a ještě se k nim později vrátíme) včetně těch, které se staly součástí eukaryotických buněk, tedy mitochondriální a chloroplastové DNA (mtDNA a cpDNA). Replikaci dvouřetězcové DNA uzavřené do kružnicové formy bezpochyby nekomplikuje dilema posledního RNA primeru, ale vlastně není úplně jisté, zda se dnešní životní formy s cirkulárními genomy prastarého problému zbavily tím, že se jejich DNA stala cirkulární, nebo zda se lineární genomy z cirkulárních forem vyvinuly s „vynálezem“ telomer. Telomery představují funkční komplexy bílkovin, DNA a RNA na koncích lineárních chromozomů, a bývají přirovnávány ke koncům tkanicek opatřených návlečkami. Když se tkanice s koncovými návlečkami přetrhne, je jasné, kde se má svázat – opravit.

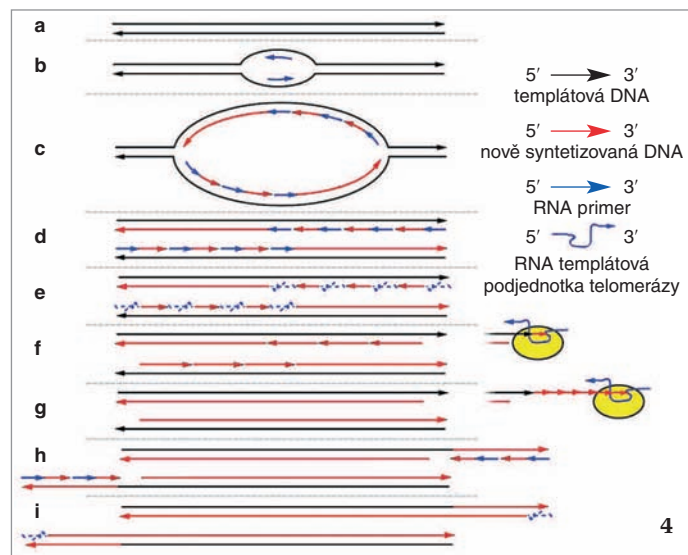
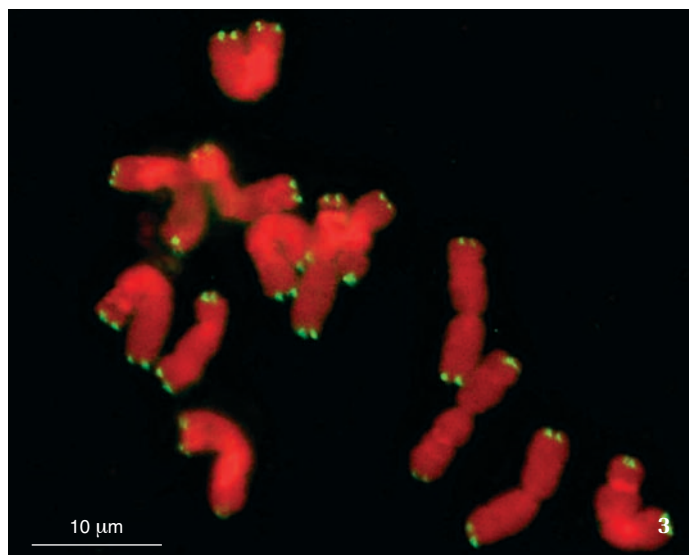


1 Jihoamerický keř kladivník *Cestrum elegans*. Dlouhou dobu byl mezi dvouděložnými rostlinami spolu s jeho dvěma blízké příbuznými rody z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) – *Vestia* a *Sessea* – jedinou známou výjimkou, u které jsme nevěděli, jaká sekvence tvoří jeho telomery a zda ji udržuje telomeráza. Foto M. Studnička

2 Detail květů česneku ozdobného (*Allium cristophii*) – středoasijského, u nás ale často pěstovaného druhu. Mezi jednoděložnými jsme od r. 1995 věděli o neznámých telomerech v rodu *Allium*. Tento hospodářsky významný rod se stovkami druhů patří do řádu chřestotvarých (*Asparagales*) – zajímavý ještě tím, že zahrnuje zástupce s klasickými rostlinnými telomery a telomery se sekvencí vyskytující se u člověka – např. *Aloe* spp.). Foto V. Motyčka

3 Chromozomy kladivníku *C. elegans* se signály telomerové sondy TTTTITAGGG. Na obr. vidíme výsledek fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH). Mitotické chromozomy jsou připraveny z roztlučených kořenových špiček na podložním skle a obarveny pomocí fluorescenční barvy specifické pro veškerou DNA (červený signál). Nezávisle na tom je telomerová sekvence zmnožena a označena ve zkumavce pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a např. zeleně fluoreskující značky. Při aplikaci takto připravené telomerové sondy na roztlučky dochází za určitých podmínek (teplota, koncentrace solí, pH atd.) k sekvencně specifické interakci mezi sondou a chromozomy. Sonda tak označí komplementární úseky a zůstane na nich navázaná. V mikroskopu pak můžeme pozorovat místa na chromozomech, kde se sonda váže, tedy kde se nachází daná sekvence. Foto V. Peška

4 Replikace DNA. Mateřské řetězce (a, černě) jsou uspořádány antiparalelně. V místě počátku replikace se oddělují (b) a vzniká místo pro nasedání prvních RNA primerů (modře). Replikace, tedy vznik antiparalelních dceřiných řetězců (c, červeně), probíhá na každém mateřském řetězci DNA v jednom směru. Pokud se nový řetězec prodlužuje po směru syntézy od 5' k 3' konci (např. horní červené vlákno směrem vlevo), probíhá vše spojitě z prvního RNA primeru. Jestliže se nová DNA prodlužuje v opačném směru (např. dolní červené fragmenty směrem vpravo), proces je nespojitý (pokračuje přerušovaně), protože polymeráza dokáže prodlužovat jen 3' konec, a tudíž je nutné nasedání nových RNA primerů s tím, jak se replikační bublina rozšiřuje. Nakonec se replikace dostane k oběma koncům (d), téměř celá molekula je semikonzervativním způsobem replikována (výsledně novou molekulu tvoří jedno nové – dceřiné a jedno staré – mateřské vlákno). Zbývá odbourat RNA primery a nahradit je úseky DNA (e), a to vždy od 3' konce již nasyntetizovaného fragmentu DNA. Nakonec se části nových řetězců syntézou spojí (f), ale nový řetězec je zkrácen na 5' konci, protože zde DNA polymeráza neměla k dispozici žádný primer. Toto zkrácení může být kompenzováno

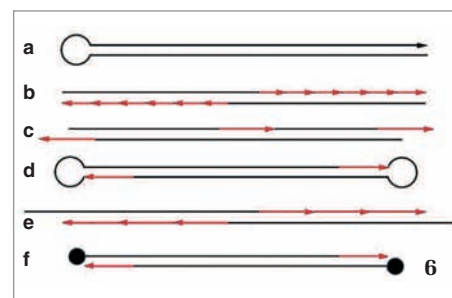
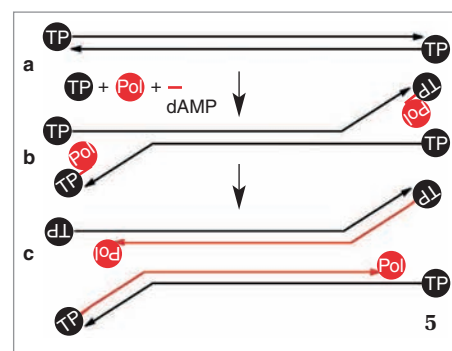


telomerázou (g, žlutě), která prodlouží 3' konec templátu podle vlastní RNA předlohy (zakřivená modrá šipka). Tím vzniká přesah pro nasedání dalších RNA primerů (h). Úplný konec molekuly DNA sice opět není tvořen dvěma řetězci, ale celkově byla lineární DNA prodloužena a neztratila žádnou informaci (i).

5 Terminální protein – proteinový priming u bakteriofága $\Phi 29$. Fágem kódovaná DNA polymeráza (Pol) se účastní vytváření kovalentní vazby (a) mezi prvním nukleotidem (dAMP) a serinem 232 koncového proteinu (TP). Proteinový komplex s dAMP specificky váže thymin na druhé pozici 3' konce templátové virové DNA (b). Potom se takto vytvořený primer posune na první pozici 3' konce templátové virové DNA, kde se rovněž nachází thymin, aby byla zachována informace na úplném konci 3' templátu. DNA polymeráza pak kopíruje celý templátový řetězec z tohoto nukleoproteinového primeru (c) a přibližně po 6 vložených nukleotidech se z TP uvolňuje. Primer-proteinová iniciace replikace probíhá na koncích obou řetězců DNA. Ve chvíli, kdy se polymerázy setkávají, dochází k oddělení dceřiných molekul dvouřetězcové DNA (double-stranded, dsDNA), obou replikovaných syntézou vedoucího řetězce. Výsledkem jsou lineární dsDNA s TP kovalentně vázaným na 5' koncích. Telomery $\Phi 29$ mají tupé konce o sekvenci 5'-TACTTT-3'. Stejný princip udržování konců DNA je pravděpodobně využíván u telomer chromozomů a plazmidů aktinomycet, ačkoli celý proces zde není prostudován tak detailně jako u fága $\Phi 29$. Další modely vysvětlující přítomnost TP a palindromických sekvencí (příkladem velmi krátkého palindromu je sekvence TTAA – komplementární vlákno, které když se čte z druhé strany ve směru 5'–3', dává opět TTAA) byly navrženy ještě u plazmidu pSLA2 izolovaného z bakterie *Streptomyces lividans*.

6 Schéma různého uspořádání telomerových sekvencí u lineárních mitochondriálních molekul DNA. Červené šipky vymezují jednotky telomerových repetit a jejich 5'–3' směr v lineárním mitochondriálním genomu, který je naznačen černou barvou. Velikost červených šipek

a černých úseků neodpovídá reálnému poměru telomerové DNA vůči zbytku genomu. Podle typu uspořádání lze telomerovou mtDNA rozdělit do 6 variant. U trepky luční (*Paramecium aurelia*, a) jeden z konců tvoří kovalentně uzavřená jednořetězcová (single-stranded), tedy ssDNA smyčka, ale druhý konec molekuly je otevřený s neznámým mechanismem udržování délky. U nálevníků rodu vejcovka (*Tetrahymena*, b) byly nalezeny tandemově uspořádané koncové repetice se základní jednotkou o velikosti 31–53 párů bází (bp) a jako hlavní mechanismus udržování délky koncové DNA jsou zde předpokládány rekombinační události. Zelená řasa *Chlamydomonas reinhardtii* (c) má na koncích mtDNA unikátní strukturu s 3' přesahy, jež neumožňují recirkularizaci, protože nejsou komplementární. Tato mtDNA nese ještě interní kopii koncových sekvencí, nejspíš klíčovou pro obnovování délky konců při replikaci. Další tři varianty lineární mtDNA byly popsány hlavně u kvasinek. Jako kvasinkový lineární typ I (d) nalezený u rodu *Pichia* a *Williopsis* označujeme obrácené terminální repetice s kovalentně uzavřenou vlásečkovou smyčkou, podobnou poxvirové DNA, chromozomům borelií a kvasinkovým typům ze skupiny II. Kvasinkový lineární typ II (e) je tvořen obrácenými koncovými repetitami, které se skládají z tandemově uspořádaných subrepetic s dlouhou základní jednotkou (např. 738 bp u *Candida parapsilosis*), včetně 5' ssDNA přesahu a struktury připomínající telomerickou smyčku (t-smyčku), umožňující amplifikaci DNA otáčivou kružnicí; t-smyčka (viz Živa 2002, 6: 245–248) je lasovitá struktura na konci telomer, která vzniká zanořením jednořetězcového přesahu do dvouřetězcové oblasti. Kvasinkový lineární typ III (f) je reprezentován mtDNA plazmidem pPK2 u *Pichia kluyveri*, jenž nese na 5' koncích kovalentně navázaný TP a podobá se tak adenovirové DNA, lineárním chromozomům streptomycet a fátu $\Phi 29$. Podobně je tomu u mitochondriálních plazmidů S1 a S2 kukuřice seté (*Zea mays*), které se vyznačují lineární dsDNA a nesou kovalentně navázané TP. Všechny orig. V. Peška



Je také zřejmé, které konce mají zůstat volné. Návlečky tak fungují jako značky přirozených konců, ale navíc zajišťují, aby se materiál netřepil (podrobněji ve zmiňované Živě 2002, 6: 245–248). K přetržení DNA (dvouřetězcovému zlomu) dochází v buňkách častěji, než bychom si mysleli. Udává se, že denně dojde v každé lidské buňce ke statisícům poškození DNA při replikaci – vlivem metabolické aktivity samotných buněk a působením vnějších faktorů, např. ionizujícího záření. Dvouřetězcové zlomy tvoří jen část těchto poškození, ale nejspíš jde o poměrně častý a hlavně nebezpečný jev, s nímž se každá buňka denně vypořádává. Tím, že se od zlomů odlišují, řeší telomery tzv. problém ochrany konců DNA (End-Protection Problem).

Nicméně zůstaňme zatím jen u toho, jak se konce replikují. Na 5' konci nově vznikajícího řetězce DNA je replikace v koncích, protože bez posledního RNA primeru nedokáže vytvořit úplnou kopii. Již jsme uvedli, že chromozomy se tak s každým replikačním cyklem zkracují (obr. 4a až 4g), dokud na scénu nevstoupí telomeráza (naznačeno na obr. 4f a 4g vpravo, telomeráza znázorněna jako žlutě vybarvená elipsa). V případě udržování délky telomer pomocí

telomerázy se prodlouží 3' konec templátového vlákna (předlohy) na principu reverzní transkripce pomocí telomerázy (DNA polymerázy závislé na RNA templátu), jejíž proteinová podjednotka cyklicky syntetizuje krátký telomerový motiv podle templátové oblasti ve své vlastní RNA podjednotce. Prodloužený řetězec potom slouží jako předloha pro syntézu komplementárního úseku za účasti polymerázy závislé na DNA (viz obr. 4h a 4i). Z tohoto důvodu telomerovou DNA eukaryot nejčastěji tvoří tandemová sekvence odvozená od konvenčního motivu $T_xA_yG_z$ (T – thymin, A – adenin, G – guanin), přičemž telomerázou prodloužované vlákno má bohaté zastoupení G. Komplementární C-bohaté vlákno (C – cytozin) je syntetizované za účasti RNA primerů. U obratlovců, včetně člověka, byl v telomerech nalezen zatím výhradně šestinukleotidový motiv TTAGGG a u většiny rostlin velmi podobná sedminukleotidová repetice TTTAGGG, u většiny hmyzu TTAGG atd. Kombinací různého počtu T, A a G a možných bodových záměn v konvenčním motivu můžeme odvodit všechny (tj. několik desítek) telomerových motivů identifikovaných u eukaryotických organismů.

Jako jednodušší a původnější způsob kompletní replikace se jeví (podle principu Ockhamovy břitvy, tedy že nejjednodušší možné vysvětlení má být považováno za správné) menší kružnicové genomy s obsahem řádově jednotek milionů párů bází. Nutno dodat, že existují pokusy na kvasinkách *Schizosaccharomyces pombe* naznačující opačnou cestu vývoje, od lineárních k cirkulárním genomům (nikoli od eukaryot k prokaryotům). Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy s typickými genomy eukaryotického typu o velikosti v řádech desítek milionů párů bází, mají lineární chromozomy opatřené telomery, jejichž údržbu zajišťuje telomeráza. Dojde-li u kvasinky ke ztrátě telomerázové aktivity kvůli mutaci v genu pro telomerázu, její potomstvo se po několika generacích nedokáže dále dělit a celá buněčná linie s touto mutací vymírá. Vzácně tomu osudu některý jedinec unikne pomocí nějakého vylepšení, kterým ztrátu telomerázové aktivity dokáže kompenzovat a dá vzniknout novému přeživšímu kmenu kvasinek. Jedním z takových postupů je cirkularizace pomocí fúze obou konců původně lineárních chromozomů, které se v dalších generacích replikují celé bez ztráty koncové DNA, protože žádné konce neunesou.

Tři účastníci ve hře o eukaryotické konce

Opačný proces k cirkularizaci, tedy vznik lineární formy DNA z kružnicové molekuly, byl v laboratorii pozorován dokonce u mnohobuněčných eukaryot. Konkrétně u octomilky *D. melanogaster*, která má v genomu čtyři páry lineárních chromozomů. V určitém laboratorním kmenu byl nejprve nalezen neobvyklý cirkulární chromozom, jenž vznikl fúzí obou konců a byl dále přenášený několik let z generace na generaci, až v jisté fázi došlo k jeho rozlomení – „otevření“ do lineární formy. Nově vzniklé konce byly opatřeny specifickými retrotranspozony, které se znovu a znovu



do chromozomových konců kopírovaly a vkládaly. Retrotranspozony (např. Živa 2011, 4: 151–154) tvoří součást eukaryotických genomů, představují „mobilní“ DNA sekvence dlouhé stovky párů bází až několik kilobází a zčásti se podobají retrovirům. Jsou schopné se amplifikovat (množit) pomocí RNA meziprojektu a reverzní transkripce a včleňovat se do nových míst v genomu. Někdy bývají považovány za genomové symbionty virového původu (případně parazity).

Mechanismus otevření neznáme. Mohlo jít o čistě náhodné poškození, ale také možná nastalo v důsledku opakované retrotranspozice do stejné oblasti kružnicového chromozomu tím, že integrace retrotranspozonů způsobí v cílové DNA zlomy. Zmíněné retrotranspozony se nazývají Het-A, TART a TAHRE a možná „otevřely“ výše popsaný cirkulární chromozom. Tyto retrotranspozony funkčně nahrazují telomerázu a její produkty, krátké tandemové repetice, u všech chromozomových konců octomilky. Reverzní transkriptázy dnešních retrotranspozonů a telomerázy jsou si v mnohém sekvencově a funkčně podobné a mají s velkou pravděpodobností společného předka, který připomínal spíše jednoduchý retrotranspozon a který svou cílenou retrotranspozici otevřel pradávny cirkulární genom a začal udržovat jeho konce. V tomto smyslu bychom telomerázu mohli označit za genom ohočeného parazita či genomového symbionta. Pokud to tak opravdu je, u octomilky jde patrně o návrat telomerových retroelementů, protože se k nim tento hmyz zřejmě vrátil sekundárně až po ztrátě telomerázy.

Na další možnost ukazuje situace u bource morušového (*Bombyx mori*). Má typicky hmyzí telomerovou DNA, obsahující tandemové repetice TTAGG, které jsou ale tu a tam přerušovány retrotranspozony TRAS1 a SART1. Gen pro samotnou telomerázu se v genomu bource sice nachází, ale na rozdíl od telomeráz cvrčků a švábů se nedaří detekovat její enzymatickou aktivitu. Je tedy možné, že telomerové retroelementy a telomeráza se původně společně podílely na udržování telomer, pak

7 *Aloe pulcherrima* – endemit střední a severní části Etiopie, kde roste na čedičových skalách a strmých svazích s nezapojenou vegetací. Lalibela v severní Etiopii (2 995 m n. m.). Aloe patří k zástupcům řádu chřestotvarých, u nichž byla nalezena lidská telomerová sekvence (viz také text k obr. 2). Tato skutečnost ale nemá nejspíše žádnou souvislost s blahodárnými účinky jejích extraktů používaných v kosmetice a léčitelství. Foto A. Horáček

8 Detailní pohled na část kolonie divokého kmene kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Divoké kmeny této kvasinky se od těch laboratorních tvořících hladké kolonie liší mimo jiné přítomností extracelulární mezibuněčné hmoty, ale i různou expresí řady genů. Zdá se, že část těchto genů je regulována strukturou chromatinu v blízkosti telomer. Foto M. Kuthan

se ale začaly navzájem vytlačovat, u octomilky zvítězily retrotranspozony, zatímco u většiny ostatního hmyzu a zbytku eukaryot převzala žezlo telomeráza. Fylogenetické studie však tuto možnost spíše vyvracejí. V drtivé většině prostudovaných eukaryotických druhů zůstává totiž telomeráza ústředním hráčem při řešení ERP (viz výše v textu), retroelementy se na řešení tohoto problému nepodílejí.

Do udržování délky telomerové DNA promlouvá, jako šedá eminence v pozadí, třetí účastník. Tím je alternativní prodloužování telomer (ALT, Alternative Lengthening of Telomeres). Jde o komplexní mechanismus, závislý na homologní rekombinaci. ALT dominuje u přibližně 15 % nádorových linií bez aktivní telomerázy. Podobným způsobem jsou udržovány konce DNA u dvoukřídlého hmyzu – pakomárů rodu *Chironomus* a komárů rodu *Anopheles*. Homologní rekombinace vychází z předpokladu, že v genomu existují nejméně dvě kopie úseku DNA, který má rekombinovat. Tyto kopie se k sobě dokážou fyzicky přiblížit, rozpojit své řetězce DNA a prohodit si je. Rozpojený řetězec může být nástrojem pro opravu poško-

zeného nebo chybějícího místa v druhé kopii. Telomerová DNA je tvořena desítkami tisíc krátkých kopií, ale za normálního stavu je na ní homologi rekombinace spíše potlačována. V případě, že se tato regulace vymkne kontrole, může se stát, že v závislosti na rekombinaci začne syntéza v konečném důsledku prodlužovat krátké telomery.

Retrotranspozony, rekombinující satelity a dokonce geny pro ribozomovou RNA byly poměrně dlouho považovány za možné telomerové sekvence u tří příbuzných rodů jihoamerických krásně kvetoucích keřů – tedy kladivníků (*Cestrum* spp., viz obr. 1 a 3), rodů *Sesaea* a *Vestia* z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), a také u hospodářsky významného rodu česnek (*Allium*) na vrcholu fylogenetického stromu řádu chřestotvarých (*Asparagales*; Vesmír 2006, 9: 542–546). Společně s masožravými rostlinami *Genlisea hispida* a *G. subglabra* se u všech v průběhu let 2015 a 2016 ukázalo, že došlo ke změně telomerové sekvence na nový, alternativní motiv, ale stále jde o telomerázový systém. Nynější poznatky ukazují, že v udržování telomer u rostlin se uplatňují telomerázy, a to na pozadí paralelně existujícího ALT, účast retrotranspozonů není doložena. O evoluci telomerové sekvence u rostlin se dozvíte více v druhém dílu tohoto seriálu v příštím čísle Živy.

Konce lineární virové DNA a prokaryotické telomery

Oprostíme-li se od přístupu zaměřeného na eukaryota a vrátíme se ke genomům prokaryotického typu, plastidové DNA, plazmidům a virům, zjistíme, že ERP může být řešen dalšími alternativami, a to častěji, než se předpokládalo. Konce lineárních genomů u prokaryot sice nazýváme telomery, nejsou ale eukaryotickým jaderným telomerům příbuzné. Známe dva základní odlišné způsoby udržování konců lineární DNA u „skutečných“ prokaryot, mtDNA a virů.

● Prvním způsobem řešení problému replikace konců u některých prokaryot, virů a mtDNA je zahájení replikace za účasti proteinového primeru (PP – protein priming) u chromozomů a plazmidů bakterií rodu *Streptomyces*, některých kvasinkových mitochondriálních plazmidů a bakteriofágů Φ29, B103, GA-1 (u druhu *Bacillus subtilis*), Cp-1 (u *Streptococcus pneumoniae*) a PRD1 (u *E. coli*). Rovněž adenoviry, které napadají i člověka a způsobují u něj poměrně běžné infekce dýchacího a trávicího traktu, využívají PP. Zatímco např. u lidských telomer je ERP spjat s vytvářením posledního RNA primeru, PP umožňuje replikaci celé molekuly od začátku do konce. Účast proteinového primeru tak představuje vhodný způsob zahájení replikace malých genomů, naproti tomu obrovské genomy v řádu několika miliard bází je z časových důvodů nutné replikovat pomocí RNA primerů z mnoha různých počátků zároveň. Dobře máme PP prostudován u fágů z *B. subtilis* (obr. 5).

● Druhý zásadní způsob udržování konců lineární DNA u některých prokaryot, virů a mtDNA představuje jejich opatření kovalentně uzavřenou vlásenkou, v níž se jeden řetězec otáčí a přechází v komplemen-

tární. Molekula je replikována z vnitřního počátku replikace a vzniklý meziprodukt, dvouřetězcová kružnicová DNA, se stává substrátem pro tzv. protelomerázu. Tento enzym odděluje dceřiné molekuly za vytvoření uzavřených vlásenek na koncích lineárních produktů a s eukaryotickou telomerázou nemá kromě podobného názvu nic společného. Tento systém nacházíme u všech lineárních genoform (plazmidů i chromozomů; genoform – souhrnné označení pro molekuly nukleových kyselin různého typu, které nesou geny a jsou schopny se replikovat) rodu *Borrelia* a dále u tří temperovaných bakteriofágů N15 (*E. coli*), YO54 (*Yersinia enterocolitica*), KO2 (*Klebsiella oxytoca*), u kterých nezačleněný profág existuje jako lineární plazmid s uzavřenými vlásenkami (temperované neboli mírné bakteriofágy jsou schopné existence v hostitelské buňce v podobě profágu integrovaného do jejího chromozomu). Protelomerázového homology byly nalezeny u původce kravských neštovic – *Vaccinia virus* a virů z čeledi *Phycodnaviridae* infikujících sladkovodní i mořské řasy. Dále systém uzavřené vlásenky funguje u bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která dokáže vnutit část své DNA rostlinám.

● Kromě PP a kovalentně uzavřené vlásenky s jednořetězcovou smyčkou byly objeveny ještě další principy řešení ERP u lineárních mitochondriálních genomů (obr. 6a až 6f). Lineární mtDNA jsou tak doslova lekcí pro řešení ERP (viz např. Vesmír 2001, 7 a 8). První lineární mtDNA byla popsána u nálevníka vejcovky hruškovité (*Tetrahymena pyriformis*) už v 60. letech 20. stol., tedy ještě před objevem první telomerové sekvence. V r. 1978 byl lineární mtDNA genom identifikován u fotosyntetizující řasy *Chlamydomonas reinhardtii*, dále v hlenkách, u oomycot, kvasinek a žahavců. Jak se okruh zástupců s lineární mtDNA rozšiřuje, ukazuje se také, že mitochondriální telomery nesdílejí jednotnou konsenzuální sekvenci nebo strukturu. Rekombinující tandemové repetice mtDNA vejcovky hruškovité a *C. reinhardtii* připomínají netelomerázový alternativní mechanismus prodlužování telomerové

DNA u pakomárů rodu *Chironomus* a komárů *Anopheles*. Ostatní mitochondriální „libůstky“ nebyly u jaderných telomer eukaryot nalezeny, což ale neznamená, že tam nejsou. Jen o nich možná nevíme nebo je neumíme najít.

Telomery v rámci endosymbiózy

Jednobuněčné skryténky *Guillardia theta*, eukaryota s nejasnou systematickou pozicí (blíže Živa 2016, 1: 27–30) obsahují čtyři genomy různého původu – dva prokaryotického typu (mtDNA a cpDNA) a dva eukaryotického typu (jejich vlastní genomová DNA a nukleomorf – redukované a nesoběstačné jádro eukaryotického typu). Nukleomorf a cpDNA získaly skryténky díky endosymbióze pohlcením ruduchy. Z pohledu telomerové biologie tak nastala zajímavá situace, protože *G. theta* udržuje dva sekvencně odlišné typy telomerické DNA. Sekvencí telomer ve svém původním jádře, TTTAGGG, se podobají rostlinám, ale nukleomorf má odlišný jednotkový motiv o délce 23 bp – (AG)₇AAG₆A. Eukaryotická buňka uvnitř jiné eukaryotické buňky byla ještě nalezena u jednobuněčných, fotosyntetizujících améboidních organismů ze superskupiny SAR – Chlorarachniophyta. Tentokrát došlo k pohlcení zelené jednobuněčné řasy. Jádro chlorarachniofyt má telomery s motivem TTAGGG a nukleomorf, původně jádro pohlcené zelené řasy, TCTAGGG.

Snad vás předložený výčet strategií pro řešení problému replikace konců v tomto článku přesvědčil, že telomerovou DNA mohou tvořit různé motivy, ačkoli přítomnost telomerázy téměř u všech eukaryot může vzbudit přesně opačný dojem. O této telomerázové „totalitě“ pojednáme v příštím dílu, a jak jsme již uvedli, zaměříme se v něm však přímo na rostliny.

Výzkum byl finančně podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601).

Seznam doporučené literatury najdete na webové stránce Živy.

