

# Individualita buniek v klonálnych populáciách: Stochastické procesy a ich adaptívny význam

Lubomír TOMÁŠKA & Jozef NOSEK

Katedry genetiky a biochémie, Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta  
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava  
tomaska@fns.uniba.sk, nosek@fns.uniba.sk

## Abstrakt

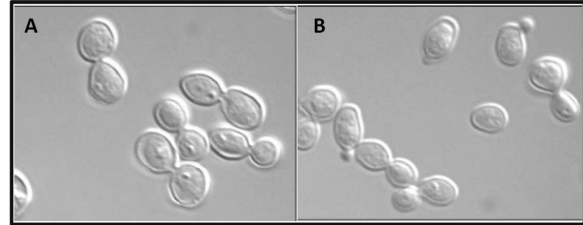
Bunkové populácie vykazujú fenotypovú variabilitu, ktorá je spôsobená genetickými a negenetickými príčinami. Dedičná variabilita, podmienená rozdielmi v genetickej výbave členov bunkovej populácie, vzniká následkom zmien na úrovni DNA a predstavuje substrát pre prírodný výber. Negenetická variabilita vzniká u príslušníkov klonálnych, geneticky identických populácií ako následok stochastických<sup>1</sup> procesov. Heterogenita pozorovaná na medzi- i vnútrobunkovej úrovni je výsledkom náhodných dejov (šumu; *noise*) v aktivácii/inaktivácii transkripčných faktorov, resp. prístupnosti regulačných sekvencií transkripčnému aparátu; aktivácii/inaktivácii bunkových signálnych dráh; v lokalizácii regulačných komponentov v rámci buniek; v stabilizácii/destabilizácii DNA- a proteín-proteínových interakcií, alebo príslušnej bunkovej štruktúry. Je stále viac evidentné, že architektúra genetických a signálnych sietí a regulačných obvodov je nastavená tak, že náhodné perturbácie sú často usmernené do konkrétnych bunkových výstupov, čo umožňuje transformovať šum do deterministických procesov. Na viacerých príkladoch demonštrujeme, že táto stratégia zvyšuje repertoár možností, ktoré individuálnym bunkám poskytuje ich genetická výbava a predstavuje elegantný spôsob zvyšovania biologickej komplexity s limitovaným počtom génov. Podľa našej hypotézy, rozpracovanej na základe analýzy dynamiky koncov (telomér) lineárnych chromozómov, selekcia v mnohých prípadoch preferuje mechanizmy založené na stochastických procesoch, pretože sú výhodným zdrojom variability umožňujúcej bunkovým populáciám flexibilne reagovať na náhle zmeny prostredia.

*Nedokonalosť bunkových zariadení, nepresnosti, prítomnosť šumu, sú pre bunku celkom nevyhnutné. Nevyhnutné sú nielen teleonomicky, ale aj kauzálne: za každé zvýšenie presnosti a redukciu šumu musí bunka energeticky platiť a čím je poznanie presnejšie a frekvencia chýb menšia, tým je energetická cena vyššia. Prílišná dokonalosť bola by prílišným luxusom, energeticky neúnosne drahým.*

L. Kováč (1986, 2004a)

## 1. Klonálne populácie buniek vykazujú v homogénnom prostredí heterogenitu\*

Obr. 1. Bunky kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*

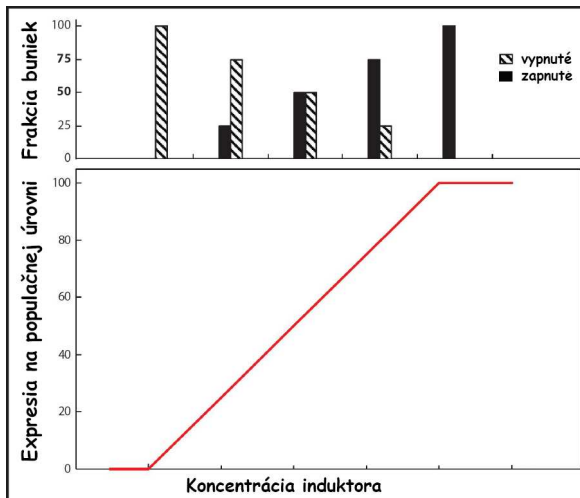


zastavené v G2 fáze bunkového cyklu vykazujú rovnakú morfológiu (A); po 4-5 bunkových deleniach dochádza k ich desynchronizácii (B) (Alberts a kol, 2008).

Bunky živých organizmov fungujú na základe genetických inštrukcií, ktorých výstupy závisia od podmienok prostredia, v ktorom sa konkrétne bunky vyskytujú. Takýto deterministický výklad je typický pre 'učebnicovú' biológiu. Každý biológ pritom vie, že klonálne populácie buniek (vzniknuté nepohlavným delením jednej bunky a teda geneticky uniformné) v homogénnom prostredí vykazujú značný stupeň fenotypovej variability. Je veľmi zložitá a často nemožné zabezpečiť homogenitu bunkových populácií. Napríklad, genetickým, prípadne farmakologickým trikom je možné synchronizovať bunky kvasiniek tak, že každá je

<sup>1</sup> V príspevku používame termín 'stochastický' ako ekvivalent k termínu 'náhodný'.

zablokovaná v tej istej fáze bunkového cyklu, čo sa prejavuje rovnakou morfológiou buniek (Obr. 1A). Po uvoľnení bloku však po 4-5 bunkových deleniach dochádza k desynchronizácii a obnoveniu medzibunkovej heterogenity (Obr. 1B). Heterogenita, ktorú vykazujú geneticky uniformné populácie buniek v homogénnom prostredí naznačuje, že bunky sa do istej miery správajú autonómne, resp. vykazujú v mnohých aspektoch veľký stupeň individuality, ktorá nie je zabezpečená ani génmi, ani vonkajším prostredím.

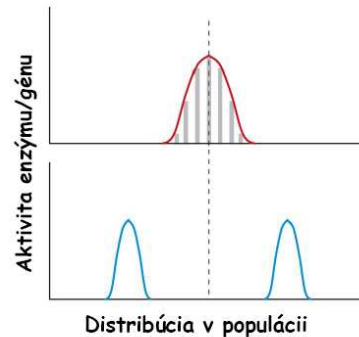


**Obr. 2.** Zvyšujúca sa koncentrácia induktora vedie v populácii baktérií k lineárnemu nárastu aktivity enzýmu  $\beta$ -galatozidázy (dolný graf). Analýza aktivity v jednotlivých bunkách dokazuje, že na individuálnej úrovni dochádza k odpovedi 'všetko-alebo-nič' (horný graf), poukazujúc na individualitu buniek v populácii.

Na fenomén individuality v klonálnych populáciách (bakteriálnych) buniek prvý krát explicitne upozornili Benzer (1953), Powell (1958) a Novick a Weiner (1957). V tom období sa na základe prác z laboratória Jacoba a Monoda vedelo, že bunky baktérií *Escherichia coli* sú schopné reagovať na prítomnosť laktózy v médiu indukciou syntézy *lac* enzýmov zapojených v metabolizme tohto cukru (napr.  $\beta$ -galatozidázy, ktorá katalyzuje štiepenie laktózy na glukózu a galaktózu; pre podrobný popis celej *lac* regulačnej siete aktivácie viď Kováč (2004)). Táto indukcia je dosiahnuteľná aj prídavkom nemetabolizovateľného analógu laktózy, izotiometyl- $\beta$ -D-galaktosidu (IPTG). V prípade, že sú k bunkám pridávané zvyšujúce sa koncentrácie induktora, a následne sa meria aktivita  $\beta$ -galatozidázy, celková aktivita enzýmu rastie lineárne až do saturácie (Obr. 2, dolný graf). Neznamená to však, že aktivita enzýmu v jednotlivých bunkách rastie s rovnakou kinetikou.

Naopak, bunky vykazujú odpoveď 'všetko-alebo-nič'; buď majú maximálnu aktivitu  $\beta$ -galatozidázy, alebo žiadnu (Obr. 2, horný graf).

Analogické autonómne správanie bolo popísané aj pre ďalšie bunkové charakteristiky. Dnes stále inšpiratívnu je práca Spudicha a Koshlanda (1976), v ktorej bola na základe výsledkov štúdia chemotaktického pohybu baktérií (Kováč, 2004) popísaná individualita buniek kultivovaných v homogénnom prostredí; individualita, ktorá pretrvávala počas celého obdobia existencie bunky. Táto práca bola v každom ohľade pionierska: bola prvá, v ktorej bola uskutočnená analýza na úrovni jednotlivých buniek (*single-cell* analýza) a zároveň bolo správanie individuálnych buniek matematicky formalizované. A, ako býva pravidlom pre pionierske práce, dlhé obdobie 'ležala v zásuvke', ktorá čakala na otvorenie do začiatku tohto desaťročia. Zároveň spolu s ďalšími klasickými prácami popisujúcimi bunkovú individualitu podčiarkla, že priemerné hodnoty (napr. aktivity enzýmu, génu) získané z analýzy celkových hodnôt delených počtom buniek sú neinformatívne pre predstavu o distribúcii príslušnej aktivity v jednotlivých členoch populácie (Obr. 3).



**Obr. 3.** Aktivita enzýmu, prípadne úroveň exprese génu môže mať pri rovnakých priemerných hodnotách (prerušovaná čiara) dramaticky odlišnú distribúciu v individuálnych bunkách. (Davidson a Surette, 2008).

## 2. O individuálnom osude buniek v klonálnych populáciách často rozhodujú stochastické procesy

*The Greek word stochastikos means 'skillful in aiming' and thus conveys the idea of using the laws of chance for personal benefit.*

I. Stewart (1997, str. 47-48)

Klasické štúdie klonálnych populácií baktérií kultivovaných v homogénnom prostredí poukázali na fenomén individuality zabezpečený negenetickými zdrojmi. Ako je táto individualita produkovaná? Základným východiskom odpovede na túto otázku je predpoklad, že molekuly, ktoré sa podieľajú na bunkových rozhodnutiach, sú nízkopočetné a tak podliehajú náhodným fluktuáciám v distribúcii *a*/alebo aktivite. Veľká frakcia bunkových makromolekúl (predovšetkým nukleových kyselín a bielkovín) je nízkopočetná. Baktérie *E. coli* disponujú iba približne 10-20 molekulami *lac* represora (negatívneho regulátora expície génov kódujúcich enzýmy metabolizmu laktózy) na bunku (Gilbert a Muller-Hill, 1967; Spudich a Koshland, 1976). Globálne analýzy transkriptov v bunkách modelových organizmov odhalili, že mnohé mRNA sú prítomné v počte <1 na bunku (Bon a kol., 2006). DNA je v bunkách prítomná v počte <100 molekúl. Ako sa s fluktuáciami vyplývajúcimi z nízkopočetnosti molekúl vysporiadať? Jednou z možností je vytvorenie sofistikovaného mechanizmu, ktorý eliminuje náhodnosť pri distribúcii nízkopočetných molekúl na minimum. Príkladom je ohromne komplexný mitotický aparát, ktorý zabezpečuje presné rozdelenie kópií DNA molekúl medzi bunky. Komplikovanosť mitotického aparátu podčiarkuje, ako je zložitá a energeticky náročná vyhnúť sa nástrahám nízkopočetných súborov v prípade, keď je presnosť ich distribúcie medzi bunky esenciálna pre prežitie potomstva.

Drvivá väčšina nízkopočetných bunkových makromolekúl však nie je distribuovaná *a*/alebo aktivovaná za asistencie komplexných systémov porovnateľných s mitotickým aparátom. Naopak, skôr sa zdá, že početnosť príslušných molekúl je výsledkom jemného nastavenia a že stochastickosť procesov vyplývajúca z nízkopočetnosti príslušných molekúl v bunke, má adaptívny význam. Inými slovami, stochastické procesy sú hlavným zdrojom negenetickje individuality buniek v klonálnych populáciách a vystavených homogénnemu prostrediu, pričom bunková individualita je esenciálna pre prežívanie bunkových populácií.

Teoretický scenár opäť poskytli Spudich a Koshland (1976). Predstavme si, že sa populácia baktérií vyskytuje v homogénnom prostredí. V dôsledku stochastických procesov dochádza k tvorbe malej frakcie buniek s inými vlastnosťami, ako majú bunky vo zvyšku populácie. V danej chvíli je odlišnosť týchto buniek bezvýznamná. Predstavme si však, že náhle dôjde k zmene prostredia, v ktorom malá frakcia buniek zrazu získa výhodu rastu. Vlastnosti, ktorými tieto bunky disponujú v dôsledku

stochastických procesov sa stávajú základom pre rýchlu adaptáciu v meniacom sa prostredí. Zatiaľ čo genetická variabilita je základom adaptácie v dlhodobej perspektíve, negenetická variabilita predstavuje pre bunkové populácie záchranu v premenlivom prostredí. Platí to pre mikroorganizmy vystavené náhlym zmenám prostredia, bunky mnohobunkových živočíchov počas ontogenézy, ale aj nádorové bunky vystavené chemo-, resp. rádioterapii.

## 2.1. Perzistencia, kompetencia a plávanie/retiazenie baktérií

U mnohých druhov baktérií (napr. *Escherichia coli*) dochádza k zaujímavému javu. Zatiaľ čo väčšina buniek sa v prostredí bohatom na živiny intenzívne delí, malá frakcia buniek ostáva v dormantnom (perzistentnom) stave (Lewis, 2007). Aký význam by mohlo mať pre nedeliace sa bunky vzdanie sa produkcie potomstva? Má tento bunkový altruizmus nejakú výhodu? Baktérie sa často dostávajú do styku s antibiotikami (napr. v prostredí mikroorganizmov, ktoré prostredníctvom nich likvidujú svojich ekologických kompetítorov). Mnohé antibiotiká (napr. ampicilín) selektívne zabíjajú deliace sa bunky bez toho, aby ovplyvňovali perzistentné bunky. V populácií baktérií, v ktorých sa vyskytuje jedno percento perzistentných buniek bude po odstránení antibiotika práve táto, zdanlivo zanedbateľná frakcia, základom novej populácie buniek. Obetovanie reprodukcie v dôsledku negenetickje variability a v duchu predstavy príbuzenského výberu sa tak môže stať základom pre prežitie populácie bakteriálnych buniek.

Analogickým príkladom je fenomén tzv. kompetencie baktérií (Maamar a Dubnau, 2005). Viaceré druhy rodu *Bacillus* sú schopné prijímať z prostredia exogénnu DNA, ktorá sa v ňom môže vyskytovať napr. následkom lýzy okolitých buniek. Prijatie exogénnej DNA a jej začlenenie do genómu zvyšuje genetickú variabilitu a tým sa účinne tvorí materiál pre prírodný výber. V rámci klonálnej populácie baktérií je schopných prijať exogénnu DNA iba približne 20% buniek. Od zvyšku populácie sa kompetentné bakteriálne bunky líšia (okrem aktivity asi 100 génov) tým, že sa nedelia. Podobne ako perzistentné baktérie, za zvýšenie šancí populácie na prežitie v meniacom sa prostredí kompetentné bunky platia stratou reprodukčnej schopnosti.

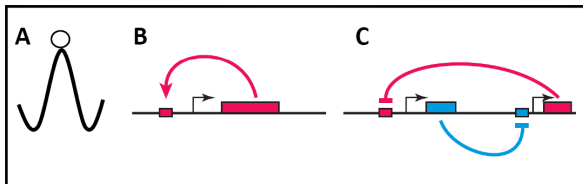
*Bacillus* disponuje ďalším zaujímavým fenoménom. Pri raste v bohatom médiu je možné v populácii buniek pozorovať oválne plávajúce bunky a retiazky spojených neplávajúcich baktérií (Kearns a Losick, 2005). Úlohou plávajúcich buniek je prieskum nevyužitého prostredia. Nepohyblivé bunky v retiazkach aktívne využívajú

aktuálne prostredie. Len malá frakcia plávajúcich buniek bude mať šťastie a narazí na nový zdroj živín. Tento bunkový altruizmus je však esenciálny pre prežitie populácie po tom, ako budú živiny v aktuálnom prostredí vyčerpané.

Okrem princípu životných stratégií (obetovanie reprodukčných možností v prospech ostatných členov klonálnej populácie) má perzistencia, kompetencia a plávanie/reťazenie baktérií spoločnú ešte jednu charakteristiku: o rozhodnutí vstúpiť do príslušného vývinového štádia rozhoduje náhoda (Desplan a Losick, 2008).

## 2.2. Molekulárny šum ako základ pri voľbe bunkového vývinového programu

Spoločnou charakteristikou príkladov spomenutých v kapitole 2.1 je, že demonštrujú princíp uvedený v úvode tohto príspevku: bunkové systémy sú nepresné, pričom časť tejto nepresnosti (šum, *noise*) je spôsobená nízkopočetnosťou molekúl, ktoré sa na regulácii príslušného vývinového programu podieľajú (*extrinsic noise*) a náhodnými mikroskopickými udalosťami, ktoré prebiehajú počas biochemických reakcií (*intrinsic noise*) (Elowitz a kol., 2002; McAdams a Arkin, 1999). Za konkrétnu voľbu bunky sú tak často zodpovedné stochastické procesy. Bistabilita (perzistencia/delenie, kompetencia/delenie, plávanie/reťazenie) je príkladom fenoménu, v ktorom je výber medzi dvomi relatívne stabilnými stavmi založený na náhode (Obr. 3A, Dubnau a Losick, 2006).



**Obr. 3.** Pri binárnej voľbe (perzistencia/delenie, kompetencia/delenie, plávanie/reťazenie) sa uplatňuje fenomén bistability (A). Za konkrétnu voľbu bunky sú zodpovedné stochastické procesy. Po spustení príslušného vývinového programu je konečný stav relatívne stabilný. Bistabilita môže byť zabezpečená rôznymi typmi regulačných sietí. Najjednoduchšími sú pozitívna spätná slučka (B) a dvojitá negatívna slučka (C). Podľa Losick a Desplan (2008).

Molekulárnym základom bunkových vývinových programov je diferenciálna transkripcia génov (génová expresia), ktoré sa na realizácii konkrétneho programu podieľajú. Génovú expresiu majú pod kontrolou

transkripčné faktory, ktoré väzbou na úsek DNA pred regulovaným génom buď pozitívne, alebo negatívne ovplyvňujú jeho prepis do RNA. V mnohých prípadoch je cieľovým génom transkripčného faktora jeho vlastná kódujúca sekvencia (Obr. 3B), prípadne gén pre konkurenčný transkripčný faktor (Obr. 3C). Pri nízkej koncentrácii transkripčného faktora je zapnutie, resp. vypnutie génu náhodnou udalosťou. Keď sa však v príslušnej bunke odohrá, môže pozitívna spätná slučka (Obr. 3B), alebo dvojitá negatívna slučka viesť k rýchlemu preklopeniu bunky do príslušnej vývinovej dráhy. Okrem toho, nedávne výsledky odhalili, že transkripcia a translácia neprebíha kontinuálne, ale vo 'výbuchoch' (*bursts*) s nepravidelnou periódou (pre prehľad viď Raj a van Oudenaarden, 2008). Takto sa rozširuje repertoár nástrojov na tvorbu negenetickej bunkovej variability.

Bunková individualita vyplývajúca zo stochastických procesov prebiehajúcich na úrovni regulácie génovej expresie nie je limitovaná iba na baktérie. Uvedieme dva príklady, ktoré sa týkajú zrakových a čuchových buniek.

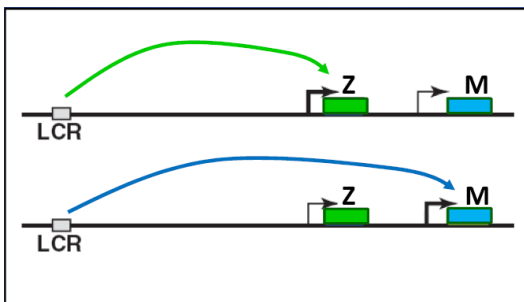
### 2.2.1. Výber pigmentu v svetlocitlivých bunkách je výsledkom náhodného výberu génu

Primáty sú schopné detegovať svetlo troch vlnových dĺžok: modré, zelené a červené. Je to vďaka tomu, že v svetlocitlivých bunkách sa nachádzajú tri typy proteínov (budeme ich pre zjednodušenie nazývať modrý, zelený, resp. červený pigment), ktoré v komplexe s derivátom vitamín A absorbujú fotóny príslušnej vlnovej dĺžky a stoja na začiatku neurónovej dráhy vedúcej signál do príslušného centra v mozgu. V porovnaní s ostatnými živočíchmi majú trichromatické primáty výhodu: väčšina ostatných druhov má dichromatické videnie (modré a zelené), a ich farebný svet je chudobnejší.

O tom, prečo prírodný výber u primátov preferoval trichromatické videnie, môžeme len špekulovať (Jacobs a Nathans, 2009). Každopádne mechanizmus, ako k prechodu od di- k trichromatickosti došlo je dobre popísaný. Hoci je zaujímavé, že u opíc Nového sveta (primáty z oblasti strednej a južnej Ameriky, napr. marmosety a tamaríny) je genetický základ trichromatickosti iný ako u opíc Starého sveta (jeho následkom je trichromatická iba jedna tretina samíc, samci a ostatné samice sú dichromatické), nás zaujíma situácia predovšetkým u skupiny primátov, medzi ktoré patrí aj človek.

Zatiaľ čo u opíc Starého sveta je gén kódujúci modrý pigment lokalizovaný na autozomálnom chromozóme, gény pre zelený a červený pigment sú lokalizované na

chromozóme X. Každá svetlocitlivá bunka na svojej membráne disponuje iba jedným pigmentom. Ako si vyberie gén, ktorý bude exprimovaný? (Pre jednoduchosť vynecháme reguláciu génu pre modrý pigment, ktorá je založená na inom mechanizme). Tak ako v prípade vývinových rozhodnutí bakteriálnych buniek o zapnutí príslušného génu v konkrétnej bunke rozhodujú stochastické procesy. Gény kódujúce zelený a červený pigment na chromozóme X sú pod kontrolou DNA sekvencií, vzdialených od otvoreného čítacieho rámca niekedy aj niekoľko kbp a označovaných LCR (*locus control region*). LCR v spolupráci s transkripčným aparátom spúšťa expresiu génu v prípade, že sa DNA ohne tak, že sa LCR s asociovanými proteínmi dostane do blízkosti regulovaného génu. To, ku ktorému génu sa LCR dostane je výsledkom stochastických pohybov chromatinu (Obr. 4). Akonáhle však asociuje s príslušným génom, trvá táto asociácia celý život bunky. (U samcov má každá bunka k dispozícii jeden chromozóm X a teda po jednej kópii z každého génu; u samíc je jeden z dvoch chromozómov X inaktívovaný (o tom, ktorý tiež rozhoduje náhoda) a tak ich zrkavé bunky majú k dispozícii rovnaký počet génov pre zelený,



resp. červený pigment.

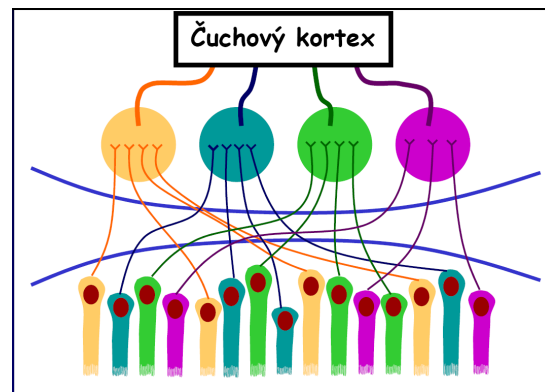
**Obr. 4.** Regulácia expresie génov kódujúcich pigment je pod kontrolou *locus control region* (LCR). V danej bunke je exprimovaný iba jeden gén. O tom, ktorý to bude rozhodujú stochastické procesy sprevádzajúce ohýbanie chromatinu. Gén, lokalizovaný bližšie k LCR, má väčšiu šancu, že sa k nemu regulačná oblasť dostane.

Analogicky prebieha voľba pigmentu svetlocitlivých buniek dvojkrídleho hmyzu, napr. *Drosophila melanogaster*. Drozofila je dichromatický živočích s modrým a zeleným pigmentom. Tak ako u primátov, každá svetlocitlivá bunka drozofily exprimuje vždy iba jeden z pigmentov. O výbere génu opäť rozhodujú stochastické procesy sprevádzajúce ohýbanie DNA a asociáciu LCR s príslušným génom. K optimálnemu videniu však drozofila potrebuje, aby 30% svetlocitlivých buniek malo na membráne modrý a 70% zelený pigment. Ako môže náhodný pohyb DNA produkovať nenáhodný

pomer výsledkov? Riešenie je triviálne: gény pre pigmety sa nachádzajú za sebou v tandeme a pravdepodobnosť, že sa LCR (náhodne) dostane k bližšiemu z nich je vyššia (Obr. 4). (Veľmi podobne je zabezpečené, že pri náhodnej voľbe medzi kompetenciou a delením u *Bacillus* je 'preferované' delenie.)

### 2.2.2. Výber génu pre olfaktický receptor v čuchových senzoričných bunkách je výsledkom stochastických procesov

Hoci nie sme v porovnaní s inými živočíchmi preborníkmi, sme stále schopní rozpoznávať niekoľko tisíc rôznych pachov. Molekulárnym nástrojom na rozpoznávanie pachov sú olfaktické receptory prítomné na membránach senzoričných buniek v čuchovom epitele (Obr. 5). V genóme cicavcov je takmer tisíc génov kódujúcich olfaktické receptory a tvoria jednu z najpočetnejších génových rodín (Buck a Axel, 1991).



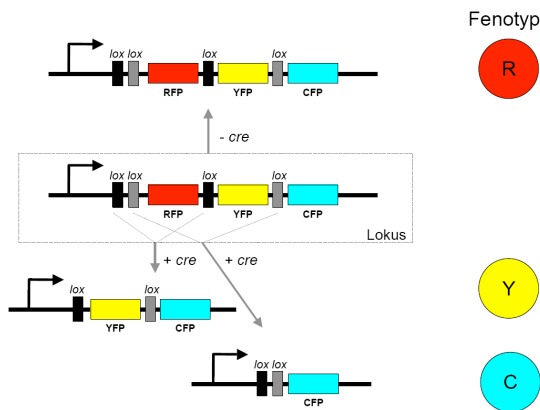
**Obr. 5.** Pachové signály sú detegované senzoričnými bunkami lokalizovanými v čuchovom epitele. Každá bunka má k dispozícii niekoľko stoviek génov kódujúcich olfaktické receptory, každá z nich exprimuje jediný (tzv. monoalelická expresia), čím sa stáva špecifická pre konkrétny typ ligandu (znázornené príslušnými farebnými odtieňmi). Zo senzoričných buniek detegujúcich rovnaké signály sa nervové dráhy zbiehajú v glomeruloch a z nich sú vedené do čuchového kortexu.

Každá senzoričná bunka má na svojom povrchu prítomný jeden typ olfaktického receptora. Znamená to, že z tisíc génov si každá bunka vyberá jediný, ktorý bude prepisovať. To, ktorý to bude, je opäť výsledok náhody (Lomvardas a kol., 2006). Mechanizmus je podobný, ako v prípade výberu génu pre pigment v zrkavých senzoričných bunkách (zatiaľ nie je jasné, ako dochádza k vypnutiu všetkých ostatných génov). Podstatné je, že v dôsledku stochastických procesov geneticky identickí

jedinci (napr. monozygotné dvojčatá) tak môžu mať odlišné vnímanie pachov.

### 3. Experimentovanie so stochastickými efektmi počas rekombinácie v syntetickom lokuse

Stochastické procesy súvisiace s transakciami na úrovni DNA je možné využiť aj pre výskumné účely, napríklad pri vizualizácii individuálnych buniek v tkanivách živočíchov. Príkladom je synteticky pripravený lokus (Obr. 6) s tromi kódujúcimi sekvenciami pre rôzne fluorescenčné proteíny: červený (RFP), žltý (YFP) a modrý (CFP). V tomto lokuse sú 2 páry sekvencií *lox* špecificky rozpoznávaných rekombinázou *cre*. Ak rekombináza nie je aktívna, exprimuje sa len prvá sekvencia kódujúca RFP. Ak je aktivovaná expresia rekombinázy, ktorá špecificky rozpoznáva sekvencie *lox*, môže sa z lokusu vyštiepiť sekvencia RFP alebo RFP spolu s YFP, pričom sa pod kontrolu promotóra dostane najbližšia nasledujúca sekvencia, teda YFP alebo CFP. Bunky, v ktorých k rekombinácii nedošlo ostanú červené, tie ktoré stratili sekvenciu RFP budú žlté a tie ktoré stratili dve prvé sekvencie (RFP a YFP) budú modré.



**Obr. 6.** Princíp využitia stochastických procesov počas rekombinácie v syntetickom lokuse pri fluorescenčnom značení individuálnych buniek. Podľa Livet a kol., 2007.

Koexpresiou viacerých fluorescenčných proteínov v tej istej bunke bolo možné vygenerovať až 90 odlišiteľných farebných odtieňov, ktorými je možné označiť jednotlivé bunky. To umožňuje skúmať ich osudy v bunkovej populácii. Táto experimentálna stratégia bola úspešne využitá pri značení individuálnych neurónov transgénnych myší označených *Brainbow* (Livet a kol., 2007).

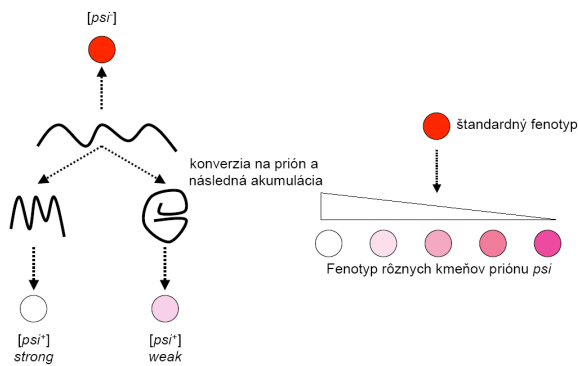
### 4. Konformačná zmena priónových proteínov je stochastickým fenoménom

Prióny (*prion*, *proteinaceous infection*) sú zodpovedné za vznik viacerých neurodegeneratívnych ochorení medzi ktoré patria Creutzfeld-Jakobova choroba (CJD), bovinná spongiformná encefalopatia (BSE) alebo chroba oviec nazvaná *scrapie*. Molekulárnou podstatou týchto ochorení je zbalenie polypeptidového reťazca bunkového priónového proteínu ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) do špecifickej priestorovej konformácie (ozn.  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ), ktorá má značne vyššiu stabilitu a zároveň katalyzuje konverziu ďalších molekúl  $\text{PrP}^{\text{C}}$  na  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  a tým aj ich akumuláciu spojenú s degeneráciou tkaniva. Proteín PrP sa pritom môže zbalit' do viacerých energeticky stabilných konformácií, ktoré boli označené ako priónové kmene (*strains*) vykazujúce rozdielne vlastnosti týkajúce sa napr. inkubačného času ochorenia, resp. rýchlosti akumulácie  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Zbalenie proteínu do jednej z viacerých stabilných konformácií je stochastickou udalosťou, hoci primárna štruktúra proteínu (t.j., sekvencia aminokyselín v polypeptidovom reťazci) do istej miery determinuje pravdepodobnosť s akou môžu vzniknúť jednotlivé varianty (napr. niektoré mutácie v sekvencii PrP dramaticky zvyšujú pravdepodobnosť konverzie  $\text{PrP}^{\text{C}}$  na  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ). Vznik jednotlivých kmeňov priónov je dobrou ilustráciou Waddingtonovej epigenetickej krajiny (viď nižšie; Obr. 9).

Experimentálne bol vznik priónových kmeňov testovaných na kvasinkách (Obr. 7), ktoré disponujú proteínmi s principiálne podobnými vlastnosťami aké majú priónové proteíny v mozgoch pacientov s CJD (King a Diaz-Avalos, 2004, Tuite, 2004). V kvasinkách má spontánna zmena konformácie bunkového proteínu Sup35 na prión *psi* významné dôsledky pre vznik genetickej a fenotypickej variability v bunkovej populácii. Proteín Sup35 je komponentom proteosyntetickej mašinerie a v priónovom stave umožňuje pokračovať v preklade mRNA do aminokyselinovej sekvencie proteínov aj za terminačným kodónom. Tým umožňuje využiť skryté genetické inštrukcie vedúce k vzniku širokej palety nových dedičných fenotypov (napr. morfologické varianty, tolerancia ku stresu alebo rezistencia voči antibiotikám), ktoré môžu byť v podmienkach meniaceho sa prostredia účinne selektované. Z tohto pohľadu, môže metastabilná povaha priónu *psi* viesť k evolučnej emergencii nových biologických vlastností (True a Lindquist, 2000). Prión *psi* sa tým sám stáva generátorom stochastických javov, ktorý mohol byť selektovaný počas evolúcie.

Priónové fenomény sú pravdepodobne oveľa bežnejšie ako sa pôvodne predpokladalo a nimi spôsobené

ochorenia sú len povestným vrcholom ľadovca. Pred nedávnym bolo zistené, že prióny sa podieľajú na globálnej kontrole expresie génov v kvasinkovom genóme. Proteíny Swi1, ktorý je súčasťou komplexu SWI-SNF remodelujúceho chromaín a Cyc8, ktorý je súčasťou represora Cyc8-Tup1, majú vlastnosti priónov (Du a kol., 2008, Patel a kol. 2009). Rovnako atraktívnym bol objav, že proteín CPEB v priónovom stave stimuluje transláciu mRNA v bunkách neurónov. To viedlo k hypotéze, že priónová konverzia CPEB v stimulovaných synapsiách je asociovaná s dlhodobým udržiavaním pamäti (Si a kol., 2003). Hypotéza, že prióny sú oveľa rozšírejšie prostriedky pre tvorbu negenetickej variability, je podporená najnovšími výsledkami systematickej analýzy potenciálnych priónových proteínov u kvasinky *S. cerevisiae* (Alberti a kol., 2009).

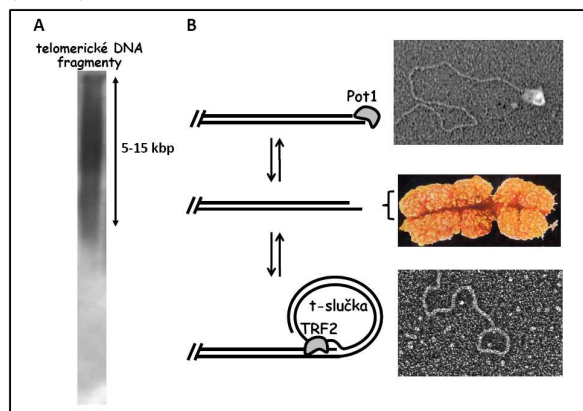


**Obr. 7.** Princíp vzniku kmeňov *strong* a *weak* kvasinkového priónu *psi* počas zbaľovania proteínu do rôznych priestorových konformácií. Variatívne zafarbenie kolónií kvasniiek korešponduje so „silou“ priónového kmeňa (sila klesá od bielej po červenú). Podľa King a Diaz-Avalos, 2004 a Tuite, 2004.

## 5. Stochastické procesy na koncoch chromozómov a ich adaptívny význam

Hoci o stochastické procesy a ich významu v biológii buniek sa platonicky zaujímate už dávnejšie, konkrétny záujem v nás nedávno vzbudil dávno známy, ale teoreticky relatívne zanedbávaný fakt týkajúci sa predmetu výskumu v našom laboratóriu: konce lineárnych DNA chromozómov disponujú vysokým stupňom vnútro- i medzibunkovej heterogenity na štruktúrnej a následne funkčnej úrovni. Zaujma nás, aké sú zdroje tejto variability a či má, tak ako v príkladoch uvedených vyššie, potenciálny adaptívny význam. Teoreticky sme túto problematiku nedávno spracovali (Tomáška a Nosek, 2009). Tu uvádzame stručný sumár.

Teloméry, DNA-proteínové komplexy na koncoch lineárnych chromozómov, stabilizujú terminálne sekvencie a ochraňujú ich pred degradáciou a vzájomnou fúziou. Okrem niekoľkých výnimiek teloméry eukaryotických jadrových chromozómov pozostávajú z krátkych tandemových opakovaní, ktoré sú vo vlákne smerom k 3' koncu bohaté na guanín. Ďalšou všeobecnou charakteristikou jadrových telomér je jednovláknové prečnievanie na 3' konci, ktoré je substrátom pre telomerázu, špeciálny ribonukleoproteín zodpovedný za predlžovanie telomér vo väčšine eukaryotických organizmov (McEachern a kol., 2000). Okrem telomerázy sa na udržiavaní dĺžky telomér podieľajú aj ďalšie mechanizmy (napr. homologická rekombinácia, génová konverzia), ktoré môžu operovať v tej istej bunke a môžu mať nezávislý evolučný pôvod (Nosek a kol., 2006). Podľa súčasného modelu teloméry existujú v dvoch funkčne a anatomicky odlišitných stavoch: „otvorenom“, ktorý zabezpečuje prístup telomerázy k telomerickému DNA a „uzavretom“, v ktorom sú konce chromozómov chránené pred nelegitímnou rekombináciou a systémami zúčastnenými v oprave dvojitých DNA zlomov (Blackburn, 2000). Prechod medzi oboma stavmi je zabezpečovaný špecifickými proteínovými komponentami telomerického chromaínu a telomerickými slučkami (t-slučky; *t-loops*), ktoré vznikajú inváziou jednovláknového telomerického prečnievania 3' konca do dvojitých DNA časti telomerického oblasti (Griffith a kol., 1999). Podľa aktuálnych predstáv t-slučky chránia koniec chromozómu a pravdepodobne predstavujú „uzavretý“ stav teloméry (Obr. 8).



**Obr. 8.** Teloméry vykazujú vysoký stupeň variability v dĺžke (A) a stave (B). Stav teloméry ovplyvňujú teloméru-viažuce proteíny (TBP). Niektoré ju udržiavajú v otvorenom stave (napr. Pot1), iné indukujú konformačné zmeny, napr. t-slučku (napr. TRF2), ktorá teloméru chráni pred prístupom enzýmov modifikujúcich DNA. Elektron-mikroskopické obrázky viď Tomáška a kol. (2001, 2002)

Dĺžka a stav telomér vykazujú vysoký stupeň variability. Konce individuálnych chromozómov v jednotlivých bunkách, ako aj konce kópií toho istého chromozómu v rôznych bunkách klonálnych populácií sa môžu dramaticky líšiť v rôznych aspektoch. Dĺžka telomér ľudských chromozómov sa pohybuje medzi 5-15 tisíc párov báz (kbp). Niektoré teloméry sú v konformácii t-slučky, iné nie. Usporiadanie individuálnych telomér, ich pohyb v jadre, či asociácia s jadrovou membránou, sa medzi bunkami líši. O tom, akú dĺžku, konformáciu, lokalizáciu bude mať individuálna teloméra do veľkej miery rozhodujú stochastické procesy. Veľa molekulárnych komponentov zodpovedných za dynamiku telomér sú nízkočetné molekuly. Telomeráza je enzým pozostávajúci z dvoch podjednotiek, templátovej RNA a katalytického proteínu. Zdá sa, že u mnohých organizmov je buď telomerázová RNA, alebo katalytická podjednotka prítomná vo veľmi nízkych koncentráciách. Okrem toho, k nízkočetnosti niektorých komponentov je potrebné pripočítať inheretnú nepresnosť niektorých reakcií. V kombinácii to má za následok vyššie uvedenú vnútro- a medzibunkovú heterogenitu (pre prehľad viď Tomáška a Nosek, 2009). Naša predstava je, že komponenty/mechanizmy zodpovedné za generovanie heterogenity telomér, boli selektované (aj) práve preto, že sú nepresné. Prečo napríklad nie je gén kódujúci podjednotku telomerázy o 2 rády aktívnejší, čím by sa znížil efekt stochastických javov? Jedna z interpretácií je, že práve nízkočetná populácia esenciálneho enzýmu, ktorá je zdrojom heterogenity koncov, je optimálnym riešením nastaveným v procese prírodného výberu. Uvedieme jeden príklad, ktorý túto predstavu podporuje.

V blízkosti koncov chromozómov u viacerých druhov organizmov sa nachádzajú gény, ktoré podliehajú tzv. telomerickému pozičnému efektu (TPE; Madignier a kol., 2008). TPE sa prejavuje tendenciou telomér 'umlčovať' expresiu génov, ktoré sú od nich vzdialené 1-5 kbp. Príčinou TPE je unikátna štruktúra nukleo-proteínového (chromatínového) komplexu v oblasti telomér, ktorá bráni prístupu transkripčnej mašinerii k regulačným sekvenciám pred príslušnými génmi. To, či na konkrétnej telomére k TPE dôjde, alebo nie, je výsledkom náhody. Pravdepodobnosť zrušenia TPE je nepriamo úmerná dĺžke príslušnej teloméry. Krátke teloméry majú vyššiu pravdepodobnosť, že u nich dôjde k zapnutiu príslušného génu. Gény, ktoré sú u mikroorganizmov lokalizované v blízkosti telomér a podliehajú TPE, kódujú proteíny určujúce povrchové vlastnosti buniek, prípadne enzýmy zúčastnené v metabolizme zriedkavo sa vyskytujúcich zdrojov živín (Halme a kol., 2004; Greid a Travisano, 2002). U väčšiny buniek je transkripcia týchto génov v dôsledku TPE vypnutá. U časti buniek, v dôsledku heterogenity dĺžky telomér je gén, ktorý je v ostatných

bunkách pod kontrolou TPE, zapnutý. Pokiaľ ide o gén, ktorý kóduje enzým zúčastnený v metabolizme cukru, ktorý sa v prostredí aktuálne nenachádza, nemajú tieto bunky žiadnu výhodu. Zároveň však, podobne ako v prípade perzistentných baktérií, predstavujú rezervoár populácie pre prípad, že sa náhle zmenia podmienky a cukor sa v prostredí objaví. Analogicky gény, kódujúce povrchové proteíny a lokalizované v blízkosti telomér môžu byť účinným nástrojom na prežitie v meniacom sa prostredí. Patogénny prvok, alebo kvasinka, je po infekcii cieľom imunitného systému hostiteľa, ktorý začne produkovať protilátky proti cudzorodým antigénom na povrchu mikrobiálnych buniek. U mnohých patogénov je v blízkosti každej teloméry gén pre iný povrchový proteín. V dôsledku stochastických procesov na teloméroch, ktoré ovplyvnia jej stav dochádza k častému zrušeniu TPE na jednej telomére a zapnutiu génu, ktorý sa nachádza v jej blízkosti. Zároveň dochádza (mechanizmom, ktorý nie je známy, ale ktorý je pravdepodobne analogický so spôsobom selektívneho zapínania jedného génu pre olfaktický receptor v čuchových senzorických bunkách) k vypnutiu všetkých ostatných génov kódujúcich povrchové antigény príslušnej rodiny. Takto je náhodne generovaná negenetická variabilita, ktorá má pre prežitie patogéna v súboji s imunitným systémom hostiteľa esenciálny význam. TPE je jedným z mechanizmov, ktorý využíva heterogenitu telomér generovanú stochastickými procesmi, ako zdroj bunkovej individuality, ktorá má vysokú adaptívnu hodnotu pre prežívanie klonálnych populácií. Bude zaujímavé študovať, aký bude mať následok na fitness populácie geneticky identických buniek artificiozne zníženie stupňa heterogenity telomér (napr. zvýšením koncentrácie normálne nízkočetných komponentov).

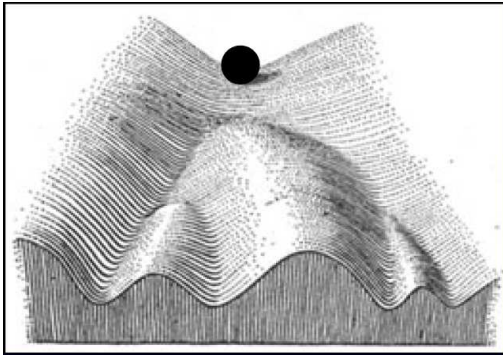
## 6. Záver

*Na rôznych úrovniach evolúcie je presnosť rozpoznávania optimalizovaná, pričom asi dostupnosť energie pre všetky funkcie bunky (rozpoznávanie je len jednou z nich) je rozhodujúca.*

L. Kováč (1986, 2004)

Presnosť procesov prebiehajúcich na rôznych úrovniach v živých systémoch, je dosiahnuteľná za cenu energetických výdavkov. Kopírovanie DNA, syntéza bielkovín, distribúcia bunkového materiálu do dcérskych buniek sú príklady procesov, ktoré musia byť relatívne presné, sú energeticky náročné vďaka potrebe rôznych typov korekčných mechanizmov, ktoré sú schopné eliminovať vzniknuté chyby (Kováč, 2004b).





**Obr. 9.** Waddingtonova epigenetická krajina (Waddington, 1940; Slack, 2002). Gulička reprezentuje bunku, ktorá (resp. jej potomstvo) sa pri zostupovaní dostáva do bodov, v ktorých dochádza k bifurkácii. O tom, do ktorej vývinovej 'doliny' sa konkrétna bunka vyberie vo veľkej miere rozhodujú stochastické procesy.

U mnohých procesov je úroveň nepresnosti oveľa vyššia. V prvom rade je to preto, že došlo ku kompromisu medzi mierou nepresnosti a energetickými výdavkami. Druhý (nie alternatívny, skôr komplementárny) pohľad je, že v niektorých prípadoch je nepresnosť, vyplývajúca zo stochastických procesov, pre bunku výhodná aj z iných ako energetických dôvodov a preto bola udržiavaná prírodným výberom. Niektoré príklady sme uviedli v našom príspevku. Stochastické procesy, generujúce negenetickú variabilitu v klonálnych bunkových populáciách umožňujú mikroorganizmom realizovať stratégie, ktoré je možné označiť ako *hedge-betting* (Losick a Desplan, 2008). Generovať varianty, ktoré v danom prostredí strácajú možnosť (alebo znižujú rýchlosť) reprodukcie, je ideálna pre mikroorganizmy vyskytujúce sa v často sa meniacom prostredí. Tak ako genetická variabilita umožňuje prostredníctvom prírodného výberu adaptovať sa na dlhodobé zmeny prostredia, negenetická bunková individualita, generovaná ako výsledok stochastických procesov, je veľmi účinným mechanizmom adaptácie buniek v prostredí s efemérnymi zdrojmi živín, náhlym nástupom antibiotík, alebo neustále adaptujúcim sa imunitným systémom produkujúcim protilátky. U mnohobunkových organizmov boli podobné mechanizmy využité pri realizácii vývinových trajektórií. Fenomén bistability (Obr. 3A) je vlastne len znovuobjavená Waddingtonova epigenetická krajina (*epigenetic landscape*; Waddington, 1940; Obr. 9). Je evidentné, že pri popisovaní biologických systémov, včítane buniek počas ontogenézy, začínajú čoraz viac prevládať stochastické modely nad deterministickými (Wilkinson, 2009). Genetici, ktorí sme zvyknutí uvažovať deterministicky (napr. gén kóduje proteín, ktorý je spolu s ďalšími proteínmi zodpovedný za realizáciu príslušnej bunkovej funkcie) začíname chápať,

že šum, náhoda a z nich vyplývajúca nepresnosť môžu byť pre prežívanie buniek rovnako dôležité, ako genetická inštrukcia (nech už je jej definícia akákoľvek).

### Pod'akovanie

Ďakujeme Ladislavovi Kováčovi za inšpirácie, rady a diskusie. Práca týkajúca sa telomér je v našom laboratóriu podporovaná grantami Howard Hughes Medical Institute (55005622 (J.N.)), Fogarty International Research Collaboration Award (2-R03-TW005654-04A1 (L.T.)), APVT (20-001604 (L.T.) a 0024-07 (J.N.)) a VEGA (1/0132/09 (L.T.) a 1/0219/08 (J.N.)).

### 7. Literatúra

- [1] S. Alberti, R. Halfmann, O. King, A. Kapila, S. Lindquist: A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell* 137 (2009) 146-158
- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, NY, 2008.
- [3] S. Benzer: Induced synthesis of enzymes in bacteria analyzed at the cellular level. *Biochim. Biophys. Acta* 11 (1953) 383
- [4] E.H. Blackburn: Telomere states and cell fates. *Nature* 408 (2000) 53-56
- [5] M. Bon, S.J. McGowan, P.R. Cook: Many expressed genes in bacteria and yeast are transcribed only once per cell cycle. *FASEB J.* 20 (2006) 1721-1723
- [6] L. Buck, R. Axel: A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65 (1991) 175-187
- [7] D. Carter, L. Chakalova, C.S. Osborne, Y.F. Dai, P. Fraser: Long-range chromatin regulatory interactions *in vivo*. *Nat. Genet.* 32 (2002) 623-626
- [8] C.J. Davidson, M.G. Surette: Individuality in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 42 (2008) 253-268
- [9] N. Dillon, T. Trimborn, J. Strouboulis, P. Fraser, F. Grosfeld: The effect of distance on long-range chromatin interactions. *Mol. Cell* 1 (1997) 131-139
- [10] Z. Du, K.W. Park, H. Yu, Q. Fan, L. Li: Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.* 40 (2008) 460-465
- [11] D. Dubnau, R. Losick: Bistability in bacteria. *Mol. Microbiol.* 61 (2006) 560-563
- [12] M.B. Elowitz, A.J. Levine, E.D. Siggia, P.S. Swain: Stochastic gene expression in single cell. *Science* 297 (2002) 1183-1186
- [13] A. Halme, S. Bumgarner, C. Styles, G.R. Fink: Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* 116 (2004) 405-415

- [14] W. Gilbert, B. Müller-Hill: The *lac* operator is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58 (1967) 2415-2421
- [15] D. Greig, M. Travisano: The Prisoner's dilemma and polymorphism in yeast *SUC* genes. *Proc. R. Soc. London B* 271 (2002) S25-S26
- [16] J.D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, T. de Lange: Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97 (1999) 503-514
- [17] G.H. Jacobs, J. Nathans: The evolution of primate color vision. *Sci. American* 300 (2009) 40-47
- [18] D.B. Kearns, R. Losick: Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 19 (2005) 3083-3094
- [19] C.Y. King, R. Diaz-Avalos: Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 428 (2004) 319-323
- [20] L. Kováč: Fundamental principles of cognitive biology. *Evol. Cognit.* 6 (2000) 51-69
- [21] L. Kováč: Úvod do kognitívnej biológie. *Biol. Listy* 51 (1986) 172-190.
- [22] L. Kováč: Komentovaný úvod do kognitívnej biológie. In: *Kognice a umělý život IV* (Kelemen, J., Kvasnička, V., Pospíchal, J., eds.). Slezská univerzita, Opava, 2004a: 233-258
- [23] L. Kováč: The inward struggle for life: a case of yeast. *Pansophia* 2 (2004b) 1-12
- [24] K. Lewis: Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 48-56
- [25] J. Livet, T.A. Weissman, H. Kang, R.W. Draft, J. Lu, R.A. Bennis, J.R. Sanes, J.W. Lichtman: Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450 (2007) 56-62.
- [26] S. Lomvardas, G. Barnea, D.J. Pisapia, M. Mendelsohn, J. Kirkland, R. Axel: Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* 126 (2006) 403-413
- [27] R. Losick, C. Desplan: Stochasticity and cell fate. *Science* 320 (2008) 65-68
- [28] H. Maamar, D. Dubnau: Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 615-624.
- [29] F. Magdinier, A. Ottaviani, E. Gilson: Telomere position effect and the evolution of the genome. In: *Origin and Evolution of Telomeres* (Nosek, J. Tomáška, L., eds.). Landes Bioscience, Austin, Texas, USA, 2008, 128-142
- [30] M.J. McEachern, A. Krauskopf, E.H. Blackburn: Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* 255 (2000) 331-358
- [31] H.H. McAdams, A. Arkin: It's a noisy business: genetic regulation at the nanomolecular scale. *Trends Genet.* 15 (1999) 65-69
- [32] J. Nosek, P. Kosa, L. Tomáška: On the origin of telomeres: A glimpse at the pre-telomerase world. *BioEssays* 28 (2006) 182-190
- [33] A. Novick, M. Weiner: Enzyme induction as an all-or-none phenomenon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43 (1975) 553-566
- [34] B.K. Patel, J. Gavin-Smyth, S.W. Liebman: The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 344-349
- [35] A. Raj, A. van Oudenaarden: Nature, nurture, or chance: Stochastic gene expression and its consequences. *Cell* 135 (2008) 216-226
- [36] J.M. Raser, E.K. O'Shea: Noise in gene expression: Origins, consequences, and control. *Science* 309 (2005) 2010-2013
- [37] K. Si, S. Lindquist, E.R. Kandel: A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* 115 (2003) 879-891
- [38] J.M.W. Slack: Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nat. Rev. Genet.* 3 (2002) 889-895
- [39] J.L. Spudich, D.E. Koshland, Jr.: Non-genetic individuality: chance in the single cell. *Nature* 262 (1976) 467-471
- [40] I. Stewart: Does God play dice? The new mathematics of chaos. Penguin Books, 1997.
- [41] L. Tomáška, J. Nosek, A. Makhov, A. Pastoráková, J.D. Griffith: Extragenomic double-stranded DNA circles in yeast with linear mitochondrial genomes: Novel players in the mitochondrial telomere maintenance? *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 4479-4487
- [42] L. Tomáška, A. Makhov, J. Nosek, B. Kucejová, J.D. Griffith: Electron-microscopic analysis supports a dual role for the mitochondrial telomere-binding protein of *Candida parapsilosis*. *J. Mol. Biol.* 305 (2001) 61-69
- [43] L. Tomáška, J. Nosek: Telomere heterogeneity: Taking advantage of stochastic events. *FEBS Lett.* 583 (2009) 1067-1071
- [44] H.L. True, S.L. Lindquist: A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* 407 (2000) 477-483
- [45] M.F. Tuite: Cell biology: the strain of being a prion. *Nature* 428 (2004) 265-267
- [46] C.H. Waddington: *Organisers & genes*. Cambridge University Press, 1940
- [47] D.J. Wilkinson: Stochastic modeling for quantitative description of heterogeneous biological systems. *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 122-132