Bakalářská práce

Téma: Isoformy těžkých řetězců myosinu kosterního svalu u člověka a laboratorního potkana

Autor: Ondřej Přenosil

Obor: Biologie odborná

Ročník: 3.

Školitel: RNDr. Jitka Žurmanová, Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Konzultanti: RNDr. Tomáš Soukup PhD., Fyziologický ústav Akademie věd ČR;

RNDr. Ivan Čepička PhD., Katedra zoologie

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Rok: 2005/2006

Poděkování

Rád bych poděkoval za pomoc při kompozici této práce i za podporu duševní a faktickou RNDr. Jitce Žurmanové, RNDr. Tomáši Soukupovi PhD., RNDr. Františku Půtovi CSc. a v neposlední řadě také RNDr. Ivanu Čepičkovi PhD. za odbornou konzultaci fylogenetických studií.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této bakalářské práce a že tato práce nebyla sepsána jinou osobou než mnou. Prohlašuji, že u všech níže uvedených citací jsou uvedeni autoři a že v této práci nebylo použito materiálu tak, aby poškozoval svého autora porušením zákona o autorských právech.

V Praze, dne 24. 4. 2006, Ondřej Přenosil v.r.

.....

I. OBSAH

I. OBSAH 4
II. SEZNAM ZKRATEK 5
III. ABSTRAKT 6
IV. ÚVOD 7
V. LITERÁRNÍ PŘEHLED 9
1. Obecné poznatky o myosinu třídy II 9
1.1 Struktura myosinového komplexu třídy II 9
1.2 Biochemické vlastnosti myosinů 10
2. Isoformy MyHC kosterního svalu a odlišnosti majoritních isoforem MyHC 11
2.1 Přechod isoforem MyHC 12
2.2 Úvod do genetiky isoforem MyHC člověka a laboratorního potkana 14
2.2.1 Genetika isoforem MyHC kosterního svalu člověka 15
2.2.2 Genetika isoforem MyHC kosterního svalu laboratorního potkana 16
VI. METODIKA A POSTUP TVORBY FYLOGENETICKÉHO STROMU 17
1. Fylogenetické porovnání isoforem MyHC kosterního svalu člověka a laboratorního potkana 17
1.1 Vyhledání sekvencí 17
1.2 Porovnávání sekvenčních identit 19
1.2.1 MEGA 3.1 19
1.2.1.1 Práce se softwarem MEGA 3.1 20
1.2.1.1.1 Postup porovnávání sekvenčních identit 20
1.3 Tvorba fylogenetického stromu 22
1.4 Výchozí nastavení parametrů programu 22
VII. DISKUSE A ZÁVĚR 24
VIII. ZDROJE 28
1. Citace 28
2. Internetové odkazy 31
IX. PŘÍLOHA 32

II. SEZNAM ZKRATEK

ADP	-	adenosin difosfát
ATP	-	adenosin trifosfát
ATPázová aktivita	-	adenosin trifosfatázová aktivita
Ca^{2+}	-	vápenatý kation
CLFS	-	chronická nízkofrekvenční stimulace
CNS	-	centrální nervový systém
Da	-	hmotnostní jednotka Dalton
DNA	-	deoxyribonukleová kyselina
eom	-	extraokulární isoforma těžkého řetězce myosinu
F-aktin	-	filamentární aktin
.fas	-	přípona souboru formátu FASTA
Gene ID	-	přístupové heslo do databáze NCBI
HMM	-	těžký meromyosin
JTT	-	typ modelu fylogenetického mapování
LMM	-	lehký meromyosin
.meg	-	přípona souboru programu MEGA 3.1
M_r	-	relativní molekulová hmotnost
mRNA	-	messenger RNA
MYH	-	gen kódující těžký řetězec myosinu
MyHC	-	těžký řetězce myosinu
MyLC	-	lehký řetězce myosinu
pH	-	záporný logaritmus koncentrace iontů vodíku
PHFS	-	fázická vysokofrekvenční stimulace
P_i	-	anorganický fosfát
PNS	-	periferní nervový systém
RGD ID	-	přístupové heslo do databáze RGD
RNA	-	ribonukleová kyselina
S-1	-	úsek 1 těžkého řetězce myosinu
S-2	-	úsek 2 těžkého řetězce myosinu
ton	-	tonická isoforma těžkého řetězce myosinu
.txt	-	přípona souboru programu NotePad

III. ABSTRAKT

V kosterním svalu savců se nacházejí čtyři hlavní a několik vedlejších isoforem těžkých řetězců myosinu (MyHC) s odlišnými biochemickými a fyziologickými vlastnostmi, jejichž zastoupení se ve svalu mění v závislosti na stupni vývoje jedince a na dalších podmínkách. Pro pochopení fyziologických odlišností těchto svalů je nezbytné znát základní rozdíly v jednotlivých isoformách MyHC.

Cílem této práce je porovnání stejných isoforem těžkých řetězců myosinu v kosterním svalu u člověka a laboratorního potkan a zároveň určit fylogenetickou příbuznost jednotlivých isoforem v rámci daného druhu na různém stupni vývoje. K vytvoření fylogenetických stromů byly použity dvě nezávislé metody „Minimum Evolution“ a „Maximum Parsimony“ za využití modelu JTT.

Metodami konstrukcí fylogenetických stromů byla potvrzena evoluční shoda mezi jednotlivými isoformami MyHC člověka a odpovídajícími proteiny laboratorního potkana s výjimkou isoforem IIa a IIb kódovaných geny MYH2 a MYH4 člověka. U laboratorního potkana není znám produkt genu MYH4 a rovněž sekvence isoforem IIa a IIb.

Z vytvořených fylogenetických stromů vyplývá, že isoforma kódovaná genem MYH4 laboratorního potkana náleží k isoformám dospělého svalu a je typu II. U člověka i laboratorního potkana je největší evoluční vzdálenost mezi majoritními isoformami MyHC dospělého svalu a srdečními isoformami I alfa a I beta.

IV. ÚVOD

V kosterním svalu savců se nacházejí 4 hlavní a několik vedlejších isoforem těžkých řetězců myosinu s odlišnými biochemickými a fyziologickými vlastnostmi (viz kapitola 2. Literárního přehledu), jejichž zastoupení se ve svalu mění v závislosti na stupni vývoje jedince a na dalších podmínkách, jimž může být jedinec vystaven (viz kapitola 2.1 Literárního přehledu). Isoformy těžkých řetězců myosinu jsou kódovány geny rodiny MYH.

Isoformy těžkých řetězců myosinu člověka, dále MyHC („myosin heavy chain"), jsou dlouhodobě v centru pozornosti výzkumu svalové fyziologie, jelikož tyto molekuly vykazují variabilitu v rámci různých typů svalů. Pro pochopení fyziologických odlišností těchto svalů je nezbytné znát základní rozdíly v jednotlivých isoformách MyHC.

Tyto proteiny nejsou zajímavé pouze z hlediska své funkce, ale také z hlediska své vzájemné evoluční podobnosti s MyHC dalších druhů včetně laboratorního potkana rodu Rattus norvegicus.

Rody Homo sapiens sapiens (dále Homo sapiens) a Rattus norvegicus patří mezi hlavní subjekty výzkumu savců snad ve všech možných oblastech biologického bádání. V rámci skupiny savců, a tedy i mezi těmito dvěma organismy, lze předpokládat vysokou homologii molekul MyHC. Utřídit základní dostupné údaje týkající se genů MYH a jimi kódovaných isoforem MyHC a porovnat odlišnosti a příbuznosti isoforem MyHC v kosterním svalu člověka a laboratorního potkana je předmětem této práce.

Cílem mé práce je nejen porovnání stejných isoforem těžkých řetězců myosinu v kosterním svalu v rámci mezidruhového srovnávání, ale také porovnání jednotlivých isoforem v rámci daného druhu, a to i mezi jedinci dospělými a nedospělými na různém stupni vývoje včetně embryonálního a perinatálního stádia fylogenetickými metodami. Toto fylogenetické porovnání by mohlo být zajímavé nejen jako porovnání myosinových struktur obou odlišných živočišných druhů, ale také proto, že myosinové molekuly jsou samy o sobě evolučně rigidní struktury a tudíž i malé změny nesou velkou výpovědní hodnotu o divergenci těchto molekul v rámci fylogenetického stromu.

S využitím databází a potřebného softwaru lze graficky popsat a statisticky zhodnotit potenciální podobnosti molekul těžkých řetězců myosinu v kosterním svalu. Získané výsledky pak mohou být využity jako výchozí podklady experimentální části mé diplomové práce.

Porovnávání jednotlivých isoforem těžkých řetězců myosinu bude vedeno na proteomové úrovni. Vstupními daty jsou tedy sekvence aminokyselin jednotlivých isoforem MyHC. Práce v oblasti proteomové byla zvolena z toho důvodu, že v ohnisku zájmu stojí

fenotyp isoforem MyHC zodpovědný za fyziologické vlastnosti svalových vláken, který bude dále experimentálně studován v mé diplomové práci.

V. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1. Obecné poznatky o myosinu třídy II

1.1 Struktura myosinového komplexu třídy II

Molekuly myosinu třídy II nacházející se ve svalové tkáni plní funkci molekulárních motorů zprostředkovávajících kontrakci svalových vláken.

Proteinový komplex myosinu třídy II je složený ze šesti proteinových řetězců, tvoří heterohexamerní strukturu. Přibližná relativní molekulová hmotnost (dále M_r) celého myosinového komplexu třídy II činí 460 000 (540 000 Da [d)]). Molekuly tohoto myosinového komplexu obsahují těžké řetězce (MyHC) a lehké řetězce označované jako MyLC („myosin light chain“). Těžké myosinové řetězce mají přibližnou M_r 200 000 (230 000 Da [d)]) a lehké řetězce vykazují M_r přibližně 15 000 – 27 000 [b)].

MyHC je v komplexu tohoto typu zastoupen dvakrát, MyLC čtyřikrát. Jeden MyHC a dva MyLC tvoří podjednotku, jejímž zdvojením vzniká celý myosinový komplex třídy II. Takový komplex je složen dohromady superhelikálním průpletem dvou MyHC. Celková délka komplexu činí 167 nm, z čehož 150 nm připadá na filamentární část a 17 nm na hlavičku s krčkem. Krček je krátké flexibilní filamentární spojení úseku S-1 (viz níže) s vláknitým základem molekuly. Štěpení trypsinem rozdělí molekulu myosinu třídy II na dva úseky – čistě filamentární superhelikální lehký meromyosin (LMM) a těžký meromyosin (HMM) složený z filamentárních superhelikálních krčků napojených na hlavičky [a)]. HMM je rozpustný filamentární polypeptid o přibližné M_r 340 000, který disponuje ATPázovou aktivitou, je schopen vázat F-aktin a obsahuje globulární i filamentární složku. LMM zůstává po štěpení agregován v roztoku jako nerozpustný polypeptid bez ATPázové aktivity a není schopen vázat se na F-aktin [b)]. Další štěpení prostřednictvím papainu vede k rozpadu HMM na úsek superhelikálního S-2 fragmentu označovaný jako „S-2 link“ a na dva úseky S-1 odpovídající dvěma globulárním hlavičkám. S-2 fragment plní funkci krčku spojujícího LMM s globulárními doménami [a)]. Hlavička, tedy S-1 fragment o přibližné M_r 115 000, obsahuje dvě vazebná místa, jedno pro ATP, respektive ADP a P_i vznikající hydrolýzou ATP a druhé pro aktin. S-1 fragment tedy nese ATPázovou aktivitu [b)]. Na krček se nekovalentně pojí dva krátké lehké myosinové řetězce. Jedná se o Ca^{2+}-vazebné proteiny ovlivňující vlastnosti vlastního těžkého řetězce v S-1 fragmentu v závislosti na tom, zda na sobě mají navázaný

vápenatý kation. Esenciální myosinový lehký řetězec je napojen na oblast těsně pod S-1 a pod ním se k MyHC poutá regulační myosinový lehký řetězec [a].

Jednotlivé molekuly myosinu třídy II agregují do velkých komplexů, tzv. tlustých filament (v anglickém originále označovaných jako „thick filaments“). Tlusté filamentum nese přibližně 150 jednotlivých molekul myosinu třídy II, čemuž odpovídá 300 úseků S-1 [f]. Tlustá filmenta savců jsou 12 nm silná a 1μm dlouhá [f], z čehož „nahá zóna“ (viz níže) zaujímá délku 160 nm. Globulární hlavičky v těchto tlustých filamentech vždy směřují od středu tlustého vlákna jak horizontálně tak vertikálně. Uprostřed celého komplexu tlustého vlákna se nachází „nahá zóna“ bez S-1 fragmentů, v originální literatuře pojmenovaná „bare zone“ [a]. Příčné můstky, v originální literatuře nazývané „cross-bridges“, tvořené S-1 fragmenty myosinu, jsou zodpovědné za navázání myosinu na F-aktin. Tyto jsou od sebe vzdálené 14 nm [b].

1.2 Biochemické vlastnosti myosinů

Myosiny tvoří skupinu aktin-dependentních molekulárních motorů s ATPázovou aktivitou schopných měnit energii chemické vazby molekuly ATP na energii mechanickou, která je využívána k pohybu. Myosin se tak posouvá podél vláken F-aktinu a to vždy směrem k jejich plus konci [f].

Pro pohyb jsou tedy nezbytné dvě domény, obě obsažené v S-1 fragmentu, a to doména vázající ATP/ADP a P_i a doména vázající F-aktin. F-aktin vazebná doména leží na samém vrcholu S-1 úseku a ATP/ADP + P_i vazebná doména naproti ní. Do jednoho vazebného místa pro ATP se naváže jen 1 molekula ATP [a]. ATPázová aktivita je za stavu nenavázaného aktinu velmi slabá, ale při navázání F-aktinu silně vzrůstá sto až dvěstěnásobně. A naopak, vazba F-aktinu s myosinem je velmi silná, dokud se na myosin nenaváže další molekula ATP [b].

Myosinový S-1 fragment sice může hydrolyzovat molekuly ATP, ale není již sám o sobě schopen produkty této hydrolýzy, tedy ADP a P_i, z vazebného místa uvolnit. S-1 fragment s navázanou dvojicí molekul ADP a P_i může prostřednictvím flexibilního krčku volně rotovat ve velkém rozmezí úhlů tak, aby byla umožněna vazba na F-aktin, což je klíčová interakce uvolňující ADP a P_i. Myosinová hlava je v tomto bodě navázána na F-aktin pod úhlem 90°. Jelikož nejnižší energetický stav zaujímá S-1 navázaný na F-aktin pod úhlem 45°, úsek S-1 mění původně devadesátistupňový úhel na úhel přibližně poloviční za současného tažení F-aktinu o 10 – 15 nm směrem k centru sarkomery. Teprve nyní se může

do nukleotid-vazebného místa myosinu navázat další ATP, čímž se myosinová hlavička uvolní z F-aktinu, neboť komplex myosin-ATP vykazuje nízkou afinitu k F-aktinu. Na tomto principu je založena svalová kontrakce, jejíž účinnost je odhadována na 50% [b)].

Studie rentgenovou difrakcí ukázaly, že myosin s navázanými molekulami ADP a P_i váže F-aktin zprvu slabě a po utvoření této vazby se uvolňuje molekula P_i z nukleotid-vazebného místa S-1 úseku. Uvolnění P_i je doprovázeno uvolněním energie, která je využita na posílení vazby mezi molekulou myosinu a F-aktinu a k otáčivému pohybu myosinové hlavy. Po tomto kroku následuje uvolnění molekuly ADP z myosinové hlavy, jež je v dalším kroku nahrazena novou molekulou ATP [c)].

Každá myosinová hlavička je schopna pěti cyklů připojení a uvolnění z F-aktinového filamenta za sekundu. To umožňuje rychlost posunu myosinu podél F-aktinu až 15 μm za sekundu [f)].

2. Isoformy MyHC kosterního svalu a odlišnosti majoritních isoforem MyHC

Histochemickými metodami barvení, jež odrážejí odlišnou pH stabilitu ATPázy myosinu [z)], spolu s fyziologickými měřeními rychlosti kontrakce [aa)] byly prokázány odlišné isoformy MyHC. Dnes je známo několik isoforem MyHC obsažených ve svalech dospělých jedinců. Velmi široce jsou zastoupeny v dospělých kosterních svalech pomalé isoformy MyHC I, jež jsou produktem stejného genu, který kóduje isoformu Iβ srdečního svalu [m)] a rychlé isoformy MyHC IIa, MyHC IIx (neboli IId nebo IIx/d) a MyHC IIb. Ačkoli gen pro isoformu IIb byl v lidském genomu nalezen [bb)], nebyla zjištěna jeho exprese [l)]. V některých databázích, jako například ExPaSy [1)], je tato lidská isoforma označována jako IIb/fetální (dále IIb) a je prezentována její primární struktura. Z tohoto důvodu byla tato isoforma použita pro fylogenetickou studii podobností isoforem MyHC člověka a laboratorního potkana (viz Metodika a postup tvorby fylogenetického stromu) a bude o ní uvažováno pro zjednodušení jako o isoformě dospělého svalu. Mezi méně zastoupené isoformy MyHC, které jsou specifické v závislosti na konkrétním typu svalu či druhu organismu, patří například superrychlá isoforma MyHC IIm žvýkacích svalů, extraokulární MyHC eom a pomalá tonická isoforma MyHC I ton v extraokulárních a laryngeálních svalech a srdeční isoforma MyHC Iα nacházející se mimo srdce v musculus masseter, v bránici či v extraokulárních svalech [cc)].

Zastoupení jednotlivých isoforem MyHC v daném svalovém vlákně určuje jeho typ.

Jednotlivé isoformy MyHC se liší velikostí ATPázové aktivity, s čímž souvisí míra rychlosti, s jakou dokáží svalové vlákno kontrahovat. Na základě míry této ATPázové aktivity se tak mluví o isoformách MyHC „rychlých“ a „pomalých“ a následně o „rychlých“ a „pomalých“ svalových vláknech a o „rychlých“ a „pomalých svalech“.

Základní isoformy MyHC kosterního svalu vykazují nejvyšší ATPázovou aktivitu v alkalickém pH s výjimkou isoformy MyHC IIx/d, u níž tato informace nebyla zjištěna [x)].

Nejpomalejší majoritní [e)] isoformou kosterního svalu je MyHC Iβ, rychlejší ATPázovou aktivitu vykazuje isoforma MyHC IIa. Dále následuje isoforma MyHC IIx/d a nejrychlejší ATPázovou aktivitou je vybavena isoforma MyHC IIb [e)].

Další isoformy MyHC jsou odlišovány především svým výskytem. Perinatální a embryonální isoformy MyHC se ponejvíce nacházejí ve vyvíjejících se svalech a v regenerujících svalových vláknech. Příležitostně je lze najít ve svalech hlavy dospělých savců, například v musculus masseter potkana [o)] a člověka [p)] či v extraokulární svalovině potkana [n)] . Zastoupeny jsou i v intrafusálních vláknech dospělých jedinců [i) r)].

Mezi superrychlé isoformy MyHC patří MyHC IIm [t) u)] svalů svírajících čelisti psa a kočky a MyHC eom ve velmi rychle kontrahujících vláknech extraokulárních svalů [v) w)].

V pomalých tonických vláknech svalů svírajících čelisti a ve vláknech extraokulárních byla u potkana nalezena pomalá tonická isoforma MyHC I ton [t) y)]. V ostatních typech vláken savců je tato isoforma vzácná a vyskytuje se spíše v polyinervovaných svalových vláknech [x)].

Isoforma MyHC Iα, která se běžně vyskytuje v srdečním svalu, byla nalezena také ve žvýkacích svalech králíka a člověka [q) s)] a v intrafusálních vláknech svalových vřetének. [j)]

2.1 Přechod isoforem MyHC

Exprese jednotlivých isoforem MyHC v kosterním svalu je ovlivnitelná mnoha faktory, které mohou být fyziologické nebo experimentální. K přednostní expresi určitých isoforem MyHC dochází v závislosti na formě zátěže a výchozím typu svalu, zatímco nevyhovující isoformy MyHC jsou proteolyticky degradovány.

Dosavadní znalosti předpokládají, že změny v obsahu isoforem MyHC ve svalových vláknech sledují obecné schéma postupného přechodu z rychlých isoforem na pomalé a z pomalých na rychlé dle následujícího znázornění: MyHC Iβ ↔ MHC IIa ↔ MHC IIx/d ↔ MHC IIb [e)]. Z tohoto schématu vyplývá, že při expresi nových isoforem dochází k expresi té isoformy, která je následující v pořadí dle rychlosti ATPázové aktivity.

Hlavními faktory, které ovlivňují přechod isoforem MyHC, jsou pozměněná nervosvalová činnost a inervace, což jsou experimentálně navozené stresory, a dále pak vlivy fyziologické, jako stárnutí organismu, působení hormonů, zvláště pak hormonů štítné žlázy, mechanické zatížení či fyzická zátěž [e)]. V následujících odstavcích budou tyto jednotlivé faktory stručně popsány.

Změna inervace a z ní vyplývající změna nervosvalové činnosti. Po přerušení inervace se pomalé svaly transformují v rychlejší a rychlé svaly se transformují v pomalejší. Denervace tedy způsobuje pokles relativní koncentrace pomalých isoforem MyHC v pomalých svalech a rychlých isoforem MyHC v rychlých svalech [dd) kk)].

Experimentálně navozená změna inervace, tzv. „cross-reinervation“ [ee)], velmi silně ovlivňuje přechod jednotlivých isoforem MyHC v kosterním svalu. V rychlém svalu po inervaci nervem, který původně inervoval sval pomalý, dochází k přechodu směrem k pomalým isoformám MyHC a naopak.

Podobný účinek má působení chronické elektrické stimulace simulující frekvenční vzor akčních potenciálů „rychlých“ a „pomalých“ nervových impulsů motoneuronu. Na tomto principu se vyvinuly dvě metody. Chronická nízkofrekvenční stimulace, neboli CLFS („chronic low-frequency stimulation“), simuluje vzor tonických nízkofrekvenčních impulsů, které fyziologicky aktivují pomalé svaly [ff)] a fázická vysokofrekvenční stimulace, neboli PHFS („phasic high-frequency stimulation“), jež imituje vzor impulsů stimulujících rychlé svaly [gg)]. Ve svalu ošetřeném pomocí CLFS se budou přednostně exprimovat pomalejší isoformy MyHC a ve svalu ošetřeném pomocí PHFS naopak isoformy rychlejší. Při obou těchto procesech se zachovává základní schéma přechodů MyHC, jež je uvedeno výše. Mimo vlastní fakt působení CLFS či PHFS má na přechod isoforem MyHC vliv i doba trvání CLFS či PHSF, tedy celková dávka těchto typů stimulů [hh) ss) tt)].

Fyzická zátěž. Adaptace svalu v podobě přechodu isoforem MyHC způsobená vyšší nervosvalovou činností (např. po odstranění synergisty nebo při vytrvalostním cvičení) je kvalitativně podobná CLFS, avšak kvantitativně méně účinná [e)]. Fyzická zátěž vytrvalostního typu, stejně jako CLFS, indukuje přechod isoforem MyHC směrem k pomalejším isoformám. Naproti tomu fyzická zátěž rychlostního typu indukuje přechod isoforem MyHC směrem k isoformám rychlejším. Pokles fyzické zátěže například odstraněním antagonisty vede k opačným změnám (ústní sdělení RNDr. Tomáše Soukupa PhD.).

Mechanická úleva/zátěž. Napínání a mechanická zátěž způsobuje přechod isoforem MyHC směrem k pomalejším podobně jako CLFS [e)]. Dlouhodobé natažení svalu

způsobené udržováním svalu v natažené pozici mechanickou blokací pohybu končetiny způsobuje nárůst pomalých isoforem MyHC ve svalovém vlákně [jj) oo)].

Naproti tomu mechanická úleva, jako je tenotomie, fixace končetiny v pokrčené poloze, mikrogravitace či zavěšení zadní končetiny [e)], způsobuje ve svalovém vlákně relativní nárůst obsahu rychlejších isoforem MyHC IIa, IIx/d [mm)] i IIb [ll)] vlivem poklesu počtu isoforem typu I [mm)]. Nástup a rozsah účinku těchto změn je urychlen hyperthyreózou [nn)]. Ve srovnání s pomalým svalem způsobuje mechanická úleva rychlého svalu méně zřetelné změny [ll)].

Hormony. Největší a nejrozsáhlejší efekt na přechod isoforem MyHC mají ze všech hormonů hormony thyreoidní [e)]. Hypothyreóza způsobuje přechod isoforem MyHC směrem k isoformám pomalejším. Hyperthyreóza naopak indukuje přechod isoforem MyHC směrem k isoformám rychlejším [pp) uu) ii)].

Thyreoidní hormony ovlivňují fenotypové zastoupení isoforem MyHC nejen ve svalu dospělého jedince, ale také ve svalu v průběhu vývoje a dospívání. Nízká hladina thyreoidních hormonů blokuje či opožďuje nástup isoforem MyHC svalů dospělého jedince. Vysoká hladina thyreoidních hormonů má účinek opačný [qq)].

Jiné hormony, jako je například testosteron, mají účinek na specifické svaly. Hormonální rozdíly právě například v hladině testosteronu mohou přispívat k pohlavním rozdílům ve velikosti specifických svalových vláken, jež postihují relativní koncentraci isoforem MyHC [rr)].

Dalším hormonem s obecně stimulačním účinkem je růstový hormon somatotropin (ústní sdělení RNDr. Tomáše Soukupa PhD.).

Stárnutí. V průběhu stárnutí může docházet k přechodu isoforem MyHC směrem k isoformám pomalým a ke svalové atrofii [e)]. To se děje patrně vlivem degenerativních procesů v CNS a PNS, změněné hladiny thyroidních hormonů a svalové nečinnosti. Plný funkční potenciál stárnoucího svalu může být udržován cvičením [e)].

2.2 Úvod do genetiky isoforem MyHC člověka a laboratorního potkana *

Pomocí vybraných internetových databází jsou zpracovány tabulky 1 až 4 (viz Příloha), ve kterých jsou shromážděny základní poznatky o isoformách MyHC a genech tyto isoformy kódujících. Na základě těchto tabulek lze porovnat podobnosti mezi jednotlivými

* Níže uvedené údaje o genetice isoforem MyHC obou organismů jsou uvedeny na podkladě informací dostupných v on-line databázích (viz kapitola 1.1 oddílu Metodika a postup tvorby fylogenetického stromu). Tyto jsou dále uváděny pod číselnými odkazy komentovanými v kapitole 2. oddílu Zdroje.

isoformami MyHC člověka a laboratorního potkana. V tabulkách jsou informace řazeny dle příslušnosti k odpovídajícímu genu MYH. Tyto jsou řazeny dle svého pořadového čísla.

Geny MYH kódují isoformy MyHC kosterního svalu člověka i laboratorního potkana. Rozložení těchto genů v rámci genomu se však u obou organismů liší, jak je uvedeno v tabulkách 1 a 3.

O isoformách MyHC II ton a MyHC IIm nebyly nalezeny žádné informace a není o nich rovněž známo, zda jsou kódovány vlastními geny (ústní sdělení RNDr. Tomáše Soukupa PhD.).

Ačkoli srdeční isoformy MyHC I alfa a I beta nejsou exprimovány výlučně v srdečním svalu, budou dále nazývány srdečními isoformami alfa a beta.

2.2.1 Genetika isoforem MyHC kosterního svalu člověka

V genomu člověka je známo osm kompletních genů MYH kódujících isoformy MyHC kosterního svalu. Jedná se o geny MYH 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 a 13 kódující isoformy MyHC IIx/d, IIa, embryonální, IIb, srdeční MyHC Iα, srdeční MyHC Iβ a MyHC eom (viz tabulka 1). Isoformy MyHC Iα a Iβ kódované geny MYH 6 a MYH7 jsou exprimovány ve svalu srdečním i kosterním.

Tabulka 1 shromažduje informace o poloze známých genů MYH na chromozómech lidského genomu a osahuje základní genetické informace osmi lidských genů MYH isoforem MyHC kosterního svalu, jako je číslo chromozómu, na kterém se daný gen nachází, raménko nesoucí tento gen, označení příslušného cytogenetického pruhu a isoformu MyHC daným genem kódovanou. Dle údajů v této tabulce jsou všechny geny MYH s výjimkou genů MYH6 a MYH7 kódujících srdeční isoformy umístěny na raménku p chromozómu 17. Srdeční isoformy jsou umístěny na raménku q chromozómu 14.

Tabulka 2 udává základní údaje osmi isoforem MyHC kosterního svalu. Lze v í nalézt údaje o počtu aminokyselin primární struktury příslušné isoformy MyHC, její hmotnost v jednotkách Daltonů a také přístupové heslo do databáze Swiss-Prot/ExPaSy [1)], z níž byly tyto údaje čerpány.

2.2.2 Genetika isoforem MyHC kosterního svalu laboratorního potkana

V genomu laboratorního potkana je známo osm kompletních genů MYH kódujících isoformy MyHC kosterního svalu. Jedná se o geny MYH stejného pořadového čísla a kódující tytéž isoformy MyHC jako geny MYH člověka (viz tabulka 3) s výjimkou genu MYH4, o kterém je znám pouze fakt, že kóduje isoformu MyHC typu II [10]. Tato isoforma bude nadále uváděna pod názvy „produkt genu MYH4“ či „isoforma kódovaná genem MYH4“. Dle údajů uvedených v tabulce 3 jsou všechny geny MYH s výjimkou genů MYH6 a MYH7 kódujících srdeční isoformy umístěny na raménku q chromozómu 10. Srdeční isoformy jsou umístěny na raménku p chromozómu 15.

Tabulka 3 shromažduje informace o poloze známých genů MYH na chromozómech genomu laboratorního potkana a obsahuje základní genetické informace osmi genů MYH isoforem MyHC kosterního svalu potkana, jako je číslo chromozómu, na kterém se daný gen nachází, raménko nesoucí tento gen, označení příslušného cytogenetického pruhu a isoformu MyHC daným genem MYH kódovanou.

Isoforma MyHC I beta kosterního svalu laboratorního potkana je též exprimována ve svalu srdečním.

Tabulka 4 udává základní údaje osmi isoforem MyHC kosterního svalu laboratorního potkana. Lze v ní nalézt údaje o počtu aminokyselin primární struktury příslušné isoformy MyHC, její relativní molekulovou hmotnost a také přístupové heslo do databáze RGD [10], z níž byly tyto údaje čerpány. Tabulka obsahuje i přístupová hesla k informacím o isoformách MyHC obsažených v databázi NCBI [2], ve které byly shromážděny informace o primární struktuře těchto isoforem.

VI. METODIKA A POSTUP TVORBY FYLOGENETICKÉHO STROMU

1. Fylogenetické porovnání isoforem MyHC kosterního svalu člověka a laboratorního potkana

Fylogenetická studie v této práci byla provedena pro isoformy MyHC IIa, IIx/d, IIb, II eom, perinatální, embryonální a srdeční isoformy Iα a Iβ. Jelikož o isoformách MyHC IIm a MyHC I ton nebyly získány žádné údaje včetně jejich sekvence aminokyselin, nebyly v této studii tyto isoformy zahrnuty. Rovněž ze stejného důvody nemohla být porovnána evoluční příbuznost isoformy MyHC IIa člověka a laboratorního potkana, neboť údaje o primární struktuře IIa laboratorního potkana nebyly nalezeny.

Sekvence aminokyselin jednotlivých lidských isoforem MyHC použitých ve fylogenetické studii byly vyhledány v databázi ExPaSy [1)] pod přístupovými hesly uvedenými v tabulce 2. Sekvence primární struktury isoforem MyHC laboratorního potkana byly vyhledány v databázi NCBI [2)] pod přístupovými hesly uvedenými v tabulce 4.

Pro zjištění evoluční příbuznosti isoforem MyHC je nutné zkonstruovat fylogenetický strom, který poskytuje přehledný grafický nástin jejich evolučního vývoje. Tvorba fylogenetického stromu vyžaduje tři základní kroky. Nejprve je třeba vyhledat potřebné sekvence, poté porovnat míru jejich identity – „alignment“ – pomocí vhodného programu a teprve na těchto podkladech lze zkonstruovat strom fylogenetické příbuznosti.

1.1 Vyhledání sekvencí

Sekvence primární struktury výše zmíněných isoforem MyHC, které jsou pro tuto práci podstatné, jsou (stejně jako sekvence DNA a RNA) shromažďovány v rozsáhlých databázích přístupných on-line. Kromě vlastních sekvencí zde nalezneme i základní údaje fyzikální, chemické i biologické a odkazy na další databáze a zdroje, seznamy publikací, stažitelné softwary a další informace.

V této práci byly použity tyto databáze:

- **Swiss – Prot / TrEMBL / ExPaSy** [1)]

Databáze je podporována a vytvořena švýcarským institutem Swiss Institute of Bioinformatics, jež zároveň spravuje server www.expasy.org. Je souhrnným serverem pro

mnoho dalších databází. Na těchto stánkách lze najít mimo dat i řadu drobných on-line programů pro výpočet určitých vlastností molekul vyplývajících z uvedených dat, jako například skripty pro výpočet isoelektrických bodů proteinů, pro úpravu dat a hledání homologických či identických sekvencí.

- **PubMed / NCBI** [2)]

Jako v případě databáze ExPaSy jde o server zastřešující více databází a zdrojů mezi sebou propojených. Organizací, jež vytvořila tento server, je The National Center for Biotechnology Information. Tento server disponuje také četnou softwarovou on-line výbavou pro vyhodnocování a úpravu získaných dat, jako například hledání sekvenčních homologií, porovnání homologií atd.

- **GeneCards** [3)]

Tyto webové stránky byly vyvinuty organizací Crown Human Geonome Center [4)] a Weizmann Institute of Science [5)]. Tato databanka je specializována na informace o genech, jsou zde k nalezení data o genech jednotlivých proteinů, jejich hlavní charakteristiky, tabulky expresí a také odkazy na související databáze.

- **Ratmap** [9)]

Databáze Ratmap, jež je spojena s databází RGD (Rat Genome Database) (viz níže) neposkytuje úplné informace o genech MYH laboratorního potkana a lze v ní nalézt pouze základní data o genech MYH; pro podrobnější údaje je nutné navštívit stránky RGD.

- **RGD** [10)]

Databáze RGD neboli Rat Genome Database je zastřešujícím serverem i databází, jež je podporována organizací NIH (National Health Institute [11)]). Poskytuje maximální dostupná data pro geny MYH potkana Rattus norvegicus.

- **UniProt** [14)]

Databáze UniProt spolupracující s jinými předními databázemi je specializována na proteinová data. Poskytuje též možnost využití nejrůznějších nástrojů pro práci s daty a odkazy na další databáze.

■ **Ensembl** [13)]

Databáze Ensembl shromažďuje rozsáhlé informace o genech a proteinech řady modelových organismů. Podporuje též mnoho on-line skriptů pro práci s údaji a je propojena s dalšími databázemi. Tuto databázi podporuje Sanger Institute [15)] zabývající se genetickými výzkumy a britský institut EBI (European Bioinformatics Institute) [6)].

1.2 Porovnávání sekvenčních identit

Pro tvorbu alignmentu je nutno použít některý ze specializovaných programů. Často užívaný a on-line volně dostupný je program CLUSTAL W [6)]. Algoritmus typu Clustal je též integrován v softwaru MEGA 3.1 (viz níže).

Pro tuto práci, a také pro tvorbu fylogenetických stromů, byl zvolen kompletní software MEGA 3.1.

1.2.1 MEGA 3.1

Software MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), který je na internetu volně stažitelný pro operační systémy Windows, DOS a Linux [7)], poskytuje řadu možností práce se sekvencemi ať už nukleotidů nebo aminokyselin.

Autoři tohoto projektu jsou Sudhir Kumar z Biodesign Institute v Arizoně, USA, dále pak Koichiro Tamura z Tokijské Metropolitní university a také Masatoshi Nei z Institutu molekulární evoluční genetiky v Penn State University, USA [7)].

MEGA 3.1 poskytuje mnoho funkcí, jako je porovnávání sekvencí, odhadování evolučních vzdáleností, konstrukce fylogenetických stromů a testování jejich spolehlivosti, seskupování sekvencí dle jejich identity, statistické hodnocení sekvencí a další algoritmy, ke kterým patří editor sekvencí umožňující vizuální práci se sekvencemi a jejich editaci a také převodník formátů sekvencí. Nechybí užitečná a přehledná nápověda pro jednotlivé funkce programu. Ta je v softwaru integrována a také dostupná on-line na příslušných internetových stránkách [12)].

V této práci byl užit tento software kompatibilní k operačnímu systému Windows.

1.2.1.1 Práce se softwarem MEGA 3.1

V této práci byly využity funkce pro posuzování identity sekvencí a tvorbu fylogenetických stromů. V následujících odstavcích bude stručně popsán postup pro vytváření fylogenetického stromu.

1.2.1.1.1 Postup porovnávání sekvenčních identit

Započetí vyhodnocování alignmentu vyžaduje dvě operace, jež s algoritmy programu přímo nesouvisí:

1) Příprava vstupních dat. Pro přípravu vstupních dat je nutné k dalšímu zpracování vybrané sekvence uložit do jednoho společného souboru *.txt programu NotePad. Sloučení sekvencí z více původních souborů lze provést prostým kopírováním sekvencí z jednotlivých souborů do cílového souboru, jak je obvyklé pro práci v operačním systému Windows.

Pro práci s programem MEGA 3.1 musí být vstupní údaje ve formátu FASTA (*.fas) nebo ve formátu *.txt, které jsou přijímány širokým spektrem programů pro práci v oblasti výpočetní fylogenetické biologie. Každá sekvence v tomto formátu zápisu je uvozena symbolem „>", pomocí něhož program rozliší přítomnost a začátek nové sekvence v souboru. Za tento symbol lze uvést název či jiné označení sekvence ukončené stiskem klávesy Enter. Poznámky zapsané za tímto symbolem poté budou zobrazeny v dalších fázích práce s programem pro identifikaci sekvencí.

2) Zadání vstupních dat programu. Vstupní data v této práci byla programu MEGA 3.1 zadávána dvěma způsoby. První způsob je jednodušší, avšak některé konfigurace operačních systémů tuto možnost nepodporují. Nelze však předem určit, zda na daném počítači bude možno tento postup aplikovat (zkušenost autora). Po vytvoření souboru obsahujícího všechny potřebné sekvence, jež je uložen v již zmíněném programu NotePad jako formát *.txt, lze formát FASTA získat jednoduše přepisem koncovky souboru z .txt na .fas. Poté se změní ikona programu NotePad na ikonu souboru programu MEGA 3.1. Po jejím aktivování se zobrazí okno „Alignment Explorer" se zobrazenými sekvencemi, čímž je umožněn další postup. Pokud tato možnost tvorby vstupního formátu není z výše uvedeného důvodu možná, je nutné užít druhého způsobu, jež je náročnější.

Druhá možnost zadání vstupních dat se odvíjí od utvoření souboru obsahujícího všechny požadované sekvence v programu NotePad ve formátu *.txt. Dále po otevření programu MEGA 3.1 postupujeme přes příkazy: „Alignment", „Alignment

Explorer/CLUSTAL“ a volbu „Create a New Alignment“ (následuje volba „No“ pro práci se sekvencemi aminokyselin). Tím aktivujeme okno pro tvorbu porovnání sekvenčních identit. V nabídce „Edit“ přes příkaz „Insert Sequence from File“ zvolíme požadovaný soubor *.txt, který jsme vytvořili. Zobrazí se seznam požadovaných sekvencí s barevným rozlišením aminokyselin dle jejich typu zapsaných jednopísmenným kódem.

Nyní je umožněn další postup a lze vybrat a zvolit požadované sekvence, jejichž názvy se aktivují. Výpočet je zahájen přes aktivaci příkazů „Alignment“, „Align by ClustalW“ a potvrzením volby. Parametry výpočtu, zobrazené v okně s nadpisem „ClustalW Parameters“, jsou navoleny co nejuniverzálněji a není potřeba ve většině případů je modifikovat. Hvězdičky zobrazené nad symboly aminokyselin určují 100% shodu aminokyseliny na dané pozici ve všech zkoumaných sekvencích.

Po výpočtu alignmentu následuje jeho nezbytná manuální úprava, která tkví v odstranění nadbytečných mezer. Tyto mezery jsou do sekvencí vloženy programem za účelem vyhovění maximální možné shodě všech sekvencí. Mezery pak mohou zdánlivě roztáhnout některé sekvence tak, že se opticky jeví delší než ostatní a z tohoto důvodu je nutné zarovnat kraje začátku a konce alignmentu odříznutím těchto na mezery bohatých oblastí. Tím nám alignmentová řada bude začínat u všech sekvencí od stejné pozice a bude končit na stejné pozici. Vyhneme se tak riziku, že by program zahrnul nestejnou délku sekvencí mezi znaky evolučního vývoje. Pokud se jedná o víceméně ojedinělé výskyty mezer, lze toto tolerovat. Pokud však narazíme na oblast s velkým počtem mezer, je empiricky používaným pravidlem tyto úseky raději smazat, neboť pravděpodobněji se jedná o úseky poskytující mylné informace. Obecně tedy platí pravidlo, že pokud si nejsme jisti nějakým úsekem v rámci porovnaných sekvencí, je lepší tuto oblast smazat. Bohužel s vymazáním takovýchto kontroverzních oblastí přicházíme o data poskytující informace pro další výpočty (ústní sdělení Mgr. Vladimíra Hampla, PhD.).

V této práci byl alignment upravován. Ačkoli v některých detailech, jako je délka fylogenetických větví, se stromy vytvořené na základě alignmentu upravovaného a neupraveného liší, odlišnosti jsou nepatrné a výsledná podobnost sekvencí je vypočtena pokaždé totožně. Úprava alignmentu pro tuto práci tedy není podstatným krokem.

Po tvorbě a úpravě alignmentu je nutno soubor uložit ve formátu *.meg přes příkazy „Export“ a „MEGA file“ v nabídce „Data“.

1.3 Tvorba fylogenetického stromu

V této práci byly voleny dvě odlišné metody pro tvorbu fylogenetického stromu. Metoda „Maximum Parsimony“ [h)] je založena na znakových datech, zatímco metoda „Minimum Evolution“ [h)] je algoritmem založeným na datech distálních [h)].

Otevřením souboru formátu *.meg se zobrazí okno s názvem „Sequence Data Explorer“. Podstatné je však základní okno programu se zvýrazněnou položkou „Data file“. V nabídce příkazů postupujeme přes příkazy „Phylogeny“, „Construct Phylogeny“ a dále volíme metodu konstrukce fylogenetického stromu.

Tyto metody byly zvoleny záměrně jako dvě naprosto odlišné metody pro konstrukci fylogenetických stromů. Pokud podle obou těchto metod budou zkonstruovány podobné či stejné stromy, bude zvýšena pravděpodobnost věrohodnosti získaných výsledků.

Vytvořený strom lze prezentovat v různých grafických formách.

1.4 Výchozí nastavení parametrů programu

Výše popsaný postup je základním načrtnutím práce s programem, ale při jeho následování získáme jako výstupní datový soubor pouze orientační fylogenetický strom, který může být zjednodušený a nepřesný. Pro zpřesnění je třeba programu upravit výchozí parametry pro jeho činnost.

Mimo níže uvedených parametrů byly všechny ostatní parametry ponechány v původním přednastavení.

Model. Jako vzorový model pro další postup výpočtů byl zvolen model JTT [k)], jakožto jeden z nepoužívanějších modelů matic pro počítačové zpracování fylogenetických dat (ústní sdělení Mgr. Ivana Čepičky, PhD.). Typ modelu je možno navolit v položce „Distances“ a poté „Choose model“; tato volba se zobrazí po otevření souboru typu *.meg. Jako základní má program MEGA 3.1 nastaven model „Amino: Poisson Correction“, tedy korekci dle poissonovského rozdělení, která však není příliš vhodná, neboť jde pouze o orientační model, ve kterém není například uvažována možnost zpětných mutací.

Kromě modelu byl změněn i parametr „Rates among sites“ vyjadřující tempo vzniku mutací z původního „Uniform rates“ (předpokládá se konstantní frekvence vzniku mutací) na „Different (Gamma Distributed)“, jež uvažuje různou mutační rychlost. K tomuto parametru se ještě vztahuje „Gamma Parameter“, který je ponechán v základním nastavení na hodnotě 1.0. U některých jiných programů lze hodnotu „Gamma Parametru“ dalšími výpočty zpřesnit,

software MEGA 3.1 tuto možnost ale neumožňuje. Ponecháním parametru Gamma na výchozí hodnotě však nebude výsledek této práce významně ovlivněn. Parametr „Rates among sites“ i „Gamma Parameter“ lze navolit ve stejném okně jako volbu modelu.

Bootstrap. Metoda „Bootstrap“ [g)] procentuálně hodnotí častost shodných výpočtů při opakování fylogenetického testu, jehož výsledkem je konečný fylogenetický strom. Čím vyšší číslo v rozmezí 1 – 100, odpovídající podílu shodných výsledků v procentech, tím je pravděpodobnost dané fylogenetické větve jistější. Použití metody „Bootstrap“ lze navolit při volbě metody výpočtu fylogenetického stromu. Poté, co se zobrazí okno „Analysis Preferences“, ve volbě „Test of Phylogeny“ je třeba navolit možnost „Bootstrap“ a dále ve vedlejší nabídce zvolit počet replikací v položce „Replications“ z od výrobce nastavených 500 na 1000 (ústní sdělení Mgr. Ivana Čepičky, PhD.). Je možné navolit i vyšší počet opakování, ale statistické odlišnosti by byly nedůležité v porovnání s počtem replikací 1000 a dále pak vyšší počet replikací klade nároky i na čas, neboť s rostoucím parametrem „Replications“ je počítač více vytížen.

VII. DISKUSE A ZÁVĚR

Údaje o isoformách MyHC kosterního svalu člověka se v různých databázích shodují. Informace o isoformách MyHC kosterního svalu laboratorního potkana jsou však v rámci různých databází odlišné. Liší se v mnoha parametrech, jako je dostupnost údajů primární sekvence, délka mRNA a genů MYH (tyto údaje v této práci nejsou uvedeny), délka některých isoforem MyHC či jejich relativní molekulová hmotnost (viz tabulka 4).

Z porovnání tabulek 2 a 4 vyplývá shoda značení genů MYH a jimi kódovaných isoforem MyHC u člověka a laboratorního potkana.

Použitím výše zmíněných metod a postupů evolučního porovnávání byly získány fylogenetické stromy isoforem těžkých řetězců myosinu kosterních svalů u organismů Homo sapiens a Rattus norvegicus (viz Příloha, obrázky 1; 2; 3; 4; 5 a 6) porovnávající isoformy MyHC nejen v rámci svých taxonů, ale i mezi těmito dvěma taxony.

Stromy takto získané nebylo možno zakořenit, neboť nelze ani odhadnout, která isoforma MyHC je fylogeneticky nejpůvodnější a využít ji tedy jako výchozí vývojovou linii. U fylogenetických stromů jsou zobrazeny pouze topologie těchto stromů, bez číselného a grafického vyjádření délek jednotlivých větví, neboť zjišťujeme vzájemnou příbuznost jednotlivých isoforem MyHC jako výsledek evoluce, nikoli průběh evoluce jako takový. Jelikož fylogenetické stromy zkonstruované podle dvou uvedených metod jsou si navzájem podobné, lze tyto stromy považovat za věrohodné.

Ukázalo se, že úprava alignmentu, použití modelu JTT a zavedení Gamma korekce nemělo podstatný vliv na výsledky fylogenetického srovnání v porovnání s fylogenetickým stromem sestrojeným při výchozím nastavení programu. Odchylky nejsou významné, přesto je však pro případné další fylogenetické studie vhodnější pro větší přesnost použít postup s využitím modelu a korekce možnosti různých mutačních rychlostí.

Pro fylogenetickou analýzu sekvencí MyHC Rattus norvegicus byla užita data shromážděna v databázi NCBI [2)]. Jelikož však údaje uvedené pro geny MYH a jejich produkty u laboratorního potkana neposkytují v žádné databázi spolehlivost vlivem neuniformity dat mezi databázemi, získaný fylogenetický strom je pouze orientační, přesto poskytuje použitelné výsledky.

Jak vyplývá z obrázků 1 a 2 uvádějících evoluční příbuznost isoforem MyHC v rámci člověka, topologie fylogenetických stromů lidských isoforem MyHC je velmi podobná. Lze tudíž usuzovat na jejich platnost. Na základě dat poskytnutých fylogenetickými stromy lze konstatovat vzájemnou příbuznost srdečních isoforem MyHC alfa a beta, jež jsou společně

evolučně vzdálené od ostatních isoforem kosterního svalu. Z obrázku 1 je zřetelná stejná vzájemná evoluční vzdálenost obou srdečních isoforem od isoforem ostatních. Tento fakt je podpořen výpočtem metodou „Bootstrap“, podle kterého byla u stromu konstruovaného metodou „Minimum Evolution“ vypočtena 100% jistota tohoto faktu. Z obrázku 2 je naopak patrná vetší příbuznost srdeční isoformy beta oproti srdeční isoformě alfa s ostatními isoformami MyHC. Oba typy fylogenetických stromů však prokazují evoluční odlehlost obou srdečních isoforem. Majoritní isoformy MyHC dospělého kosterního svalu jsou si navzájem příbuzné, stejně jako isoformy ontogenetické. Isoformě IIx/d je dle fylogenetických stromů konstruovaných oběma metodami více příbuzná isoforma IIb a isoforma IIa stojí na pomezí mezi isoformami vývojovými a majoritními isoformami dospělého svalu. Isoforma MyHC extraokulární je fylogeneticky na pomezí mezi skupinou isoforem kosterního svalu a srdečních isoforem MyHC.

Fylogenetické stromy isoforem MyHC laboratorního potkana znázorněné na obrázcích 3 a 4 nejsou totožné s fylogenetickými stromy konstruovanými pro lidské isoformy MyHC. Liší se situacemi pro isoformu MyHC extraokulární a srdeční isoformu alfa. Jak je patrné z fylogenetického stromu konstruovaného dle metody „Maximum Parsimony“ (obrázek 4), vykazuje srdeční isoforma alfa laboratorního potkana větší příbuznost s ostatními isoformami MyHC než lidská srdeční isoforma beta. Obě srdeční isoformy jsou však vůči jiným isoformám MyHC evolučně odlehlé. Výpočet metodou „Bootstrap“ uplatněný při konstrukci fylogenetického stromu metodou „Minimum Evolution“ (obrázek 3) však stejně jako u člověka prokázal jistotu blízké vzájemné příbuznosti obou srdečních isoforem. Dle fylogenetického stromu obrázku 3 je všem isoformám MyHC evolučně nejvzdálenější extraokulární isoforma MyHC, zatímco dle obrázku 4 stojí extraokulární isoforma na pomezí mezi isoformami embryonálními a dospělými a isoformami srdečními. Výpočet metodou „Bootstrap“ tomuto faktu přiřazuje 100% jistotu. Isoformě IIx/d dospělého svalu je dle obou metod konstrukcí fylogenetických stromů podobná isoforma kódovaná genem MYH4. Lze tedy tuto isoformu považovat též za isoformu dospělého svalu.

Fylogenetické stromy konstruované společně pro člověka i laboratorního potkana vykazují stejnou strukturu evoluce dospělých a vývojových isoforem.

Obrázky 5 a 6 vyobrazují fylogenetické stromy konstruované s cílem zjistit příbuznost jednotlivých isoforem MyHC člověka a laboratorního potkana. Zcela zřetelně prokazují jistou evoluční příbuznost většiny isoforem MyHC člověka a odpovídajících isoforem MyHC laboratorního potkana. Dle obou typů stromů nebyla isoformě IIb člověka přiřazena žádná isoforma MyHC laboratorního potkana a vykazuje velkou příbuznost isoformě IIx/d obou

organismů. Jelikož lidské isoformě IIa byla jako nejpříbuznější přiřazena isoforma laboratorního potkana kódovaná genem MYH4, lze tuto považovat též za isoformu rychlého typu. Perinatální isoformy obou organismů vykazují z obou typů vývojových isoforem větší příbuznost majoritním isoformám dospělého svalu. Extraokulární isoformy člověka a laboratorního potkana společně spadají evolučně mezi majoritní isoformy dospělého svalu a vývojové a isoformy srdeční. Z fylogenetického stromu konstruovaného metodou „Minimum Evolution“ (obrázek 5) lze uvažovat stejnou evoluční odlehlost srdečních isoforem mezi sebou od isoforem ostatních, což je v rozporu s fylogenetickým stromem konstruovaným metodou „Maximum Parsimony“. Dle něj jsou srdeční isoformy beta obou organismů odlehlé všem ostatním isoformám nejvíce a srdeční isoformy alfa člověka i laboratorního potkana mají mezi sebou od isoforem dospělého svalu a isoforem vývojových stejnou evoluční odlehlost. Srdeční isoforma beta laboratorního potkana je dle tohoto fylogenetického stromu vůči všem ostatním isoformám nejodlehlejší. Metodou „Bootstrap“ byla však u fylogenetického stromu dle metody „Minimum Evolution“ (obrázek 5) přiřazena stoprocentní jistota stejné vzájemné odlehlosti všech srdečních isoforem vůči isoformám ostatním.

Fylogenetické stromy potvrzují závěr vyplývající z porovnání tabulek 2 a 4, tedy že isoformy MyHC Homo sapiens a Rattus norvegicus jsou sobě fylogeneticky odpovídající a velice blízce příbuzné. Výjimku tvoří isoformy IIa a IIb kódované geny MYH2 a MYH4 člověka i laboratorního potkana, neboť typ isoformy kódované genem MYH4 a primární sekvence isoformy IIa laboratorního potkana nejsou známy. Z tohoto důvodu není evoluční návaznost těchto dvou typů isoforem MyHC mezi těmito dvěma organismy zřetelná.

Z výše uvedených faktů lze usuzovat vzájemnou příbuznost genů kódujících příslušné isoformy MyHC člověka i laboratorního potkana.

Závěrem bych chtěl říci, že poznatky o isoformách MyHC a jejich genech MYH člověka jsou ve všech užitých databázích shodné, zatímco různé databáze se liší ve svých informacích o isoformách MyHC laboratorního potkana a pro některé geny jsou informace dostupné pouze útržkovitě nebo neexistují vůbec. Na rozdíl od člověka, jehož genom byl zcela osekvenován, je genom laboratorního potkana osekvenován pouze z části a tudíž uveřejněná data představují pouze neúplné současné znalosti.

Metodami konstrukcí fylogenetických stromů byla potvrzena evoluční shoda mezi jednotlivými isoformami MyHC člověka a odpovídajícími proteiny laboratorního potkana s výjimkou isoforem IIa a IIb kódovaných geny MYH2 a MYH4 člověka a isoformy kódované genem MYH4 a IIa laboratorního potkana kódované genem MYH2.

U laboratorního potkana není znám typ isoformy kódované genem MYH4 a také primární sekvence isoforem MyHC IIa a IIb.

Z fylogenetických stromů obrázků 3, 4, 5 a 6 vyplývá, že isoforma kódovaná genem MYH4 laboratorního potkana náleží k isoformám dospělého svalu a je typu II.

Z podobnosti isoforem MyHC lze usuzovat i podobnost odpovídajících genů MYH.

VIII. ZDROJE

1. Citace

a) **Randall, D.; Burggren, W.; French, K.:** Eckert Animal Physiology. W. H. Freeman, New York, 2002; kapitola 10: Muscles and Animal Movement, str. 364 – 366.

b) **Murray, R. K. et al.:** Harperova biochemie. H&H, 2001; kapitola 58: Sval, str. 684 – 687.

c) **Randall, D.; Burggren, W.; French, K.:** Eckert Animal Physiology. W. H. Freeman, New York, 2002; kapitola 10: Muscles and Animal Movement, str. 374.

d) **McLachlan, A. D.:** Structural implications of the myosin amino acid sequence. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng*. 1984; str. 167 – 189.

e) **Pette, D.; Staron, R. S.:** Transition of muscle fibre phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* (2001); 115: 359 – 372.

f) **Alberts et al.:** Základy buněčné biologie. Espero Publishing, s r. o.; kapitola 16: Cytoskelet, str. 536 – 539.

g) **Felsenstein, J.:** Inferring Phylogenies. Sinauer Associates, Inc, 2004; kapitola 20: Bootstrap, jackknife, and permutation tests, str. 335 – 342.

h) **Felsenstein, J.:** Inferring Phylogenies. Sinauer Associates, Inc. 2004.

i) **Soukup, T.; Jirmanová, I.:** Regulation of Myosin Expression in Developing Regenerating Extrafusal and Intrafusal Muscle Fibres with Special Emphasis on the Role of Thyroid Hormones. *Physiol. Res.* 49, 2000; str. 617 – 633.

j) **Pedrosa, F.; Soukup, T.; Thornell, L.E.:** Expression of an alfa cardiac-like myosin heavy chain in muscle spindle fibres. *Histochem* 1990; 95: 105 – 113.

k) evolution.gs.washington.edu/gs541/2005/lecture27.pdf

l) **Pereira Sant'Ana, J.A.; Ennion, S.; Sargeant, A.J.; Moorman, A.F.; Goldspink, G.:** Comparison of the molecular, antigenic and ATPase determinants of fast myosin heavy chains in rat and human: a single-fibre study. *Pflugers Arch* 435: 151 – 163, 1997.

m) **Mahdavi, V.; Izumo, S.; Nadal-Ginard, B.:** Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Circ Res* 1987; 60: 804 – 814.

n) **Wieczorek, W.; Fitts, R.; Holloszy, J.; Kaiser, K.; Brooke, M.:** Effects of thyroid hormones on different types of skeletal muscle, in Pette D(ed): Plasticity of Muscle. Walter de Gruyter & Co Berlin, New York 1980; pp 581 – 591.

o) **d'Albis, A.; Janmot, C.; Béchet, J.J.:** Comparison of myosin from the masseter muscle of adult rat, mouse and guinea-pig. Persistence of neonatal-type isoforms in the murine muscle. *Eur J Biochem* 1986; 156: 291 – 296.

p) **Soussi-Yanicostas, N.; Barbet, J.P.; Laurent-Winter, C.; Barton, P.; Butler-Browne, G.S.:** Transition of myosin isozymes during development of human masseter muscle. Persistence of developmental isoforms during postnatal stage. *Development* 1990; 108: 239 – 249.

q) **Bredmann, J.J.; Wessels, A.; Weijs, W.A.; Korfage, J.A.M.; Soffers, C.A.S.; Moorman, A.F.M.:** Demonstration of "cardiac-specific" myosin heavy chain in masticatory muscles of human and rabbit. *Histochem J* 1991; 23: 160 – 170.

r) **Soukup et al.** 1995.

s) **d'Albis, A.; Anger, M.; Lompré, A.M.:** Rabbit masseter expresses the cardiac α myosin heavy chain gene. Evidence from mRNA sequence analysis. *FEBS Lett* 1993; 324: 178 – 180.

t) **Mascarello, F.; Carpené, E.; Veggetti, A.; Rowlerson, A.; Jenny, E.:** The tensor tympani muscle of cat and dog contains IIM and slow-tonic fibres: an unusual combination of fibre types. *J Muscles Res Cell Motil* 1982; 3: 363 – 374.

u) **Rowlerson, A.; Pope, B.; Murray, J.; Whalen, R.B.; Weeds, G.:** A novel myosin present in cat jaw-closing muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 1981; 2: 415 – 438.

v) **Sartore, S.; Marascello, F.; Rowlerson, A.; Gorza, L.; Ausoni, S.; Vianello, M.; Schiaffino, S.:** Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 1987; 8: 161 – 172.

w) **Wieczorek, D.F.; Periasamy, M.; Butler-Browne, G.S.; Whalen, R.G.; Nadal-Ginard, B.:** Co-expression of multiple myosin heavy chain genes, in addition to a tissue-specific one, in extraocular musculature. *J Cell Biol* 1985; 101: 618 – 629.

x) **d'Albis, A.; Butler-Browne, G.:** The Hormonal Control of Myosin Isoform Expression in Skeletal Muscle of Mammals: a Review. *BAM 3* 1993 (1): 7 – 16.

y) **Mascarello, F.; Rowlerson. A.M.:** Myosin isoform transition during development of extra-ocular and masticatory muscles in the fetal rat. *Anat Embryol* 1992; 185: 143 – 153.

z) **Brooke and Kaiser** 1970.

aa) **Close** 1967.

bb) **Weiss, A.; McDonough, D.; Wertman, B.; Ackapo-Satchivi, L.; Montgomery, K.; Kucherlapati, R.; Leinwand, L.; Krauter, K.:** Organization of human and mouse

skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2958 – 2963, 1999.

cc) **Pette and Staron** 2000.

dd) **d'Albis et al**. 1994.

ee) **Buller et al**. 1960.

ff) **Salmons and Vrbová** 1969.

gg) **Lömo et al.** 1974.

hh) **Conjard et al.** 1996.

ii) **Nwoye and Mommaerts** 1981.

jj) **Goldspink et al.** 1991, 1992.

kk) **Huey and Bodine** 1998.

ll) **Adams et al**. 2000.

mm) **Caiozzo et al.** 1994.

nn) **Caiozzo et al.** 1998.

oo) **Loughna and Morgan** 1999.

pp) **Fitts et al.** 1980.

qq) **Adams et al.** 1999.

rr) **Staron et al.** 2000.

ss) **Staron et al.** 1987.

tt) **Leeuw and Pette** 1993.

uu) **Ianuzzo et al.** 1977.

2. Internetové odkazy

1) www.expasy.org
2) www.ncbi.nih.gov
3) www.genecards.org
4) http://bioinformatics.weizmann.ac.il
5) www.weizmann.ac.il
6) www.ebi.ac.uk
7) www.megasoftware.net
8) www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/myosin.htm
9) http://ratmap.gen.gu.se
10) http://rgd.mcw.edu
11) www.nih.gov
12) www.megasoftware.net/WebHelp/helpfile.htm
13) www.ensembl.org/index.html
14) www.ebi.uniprot.org/index.shtml
15) www.sanger.ac.uk

IX. PŘÍLOHA

Tabulka 1. Přehled genů MyHC kosterních svalů člověka a jejich základní parametry. Tabulka byla sestavena na základě údajů dostupných v databázi ExPaSy [1)], Genecards [3)] a internetové adrese zabývající se problematikou myosinu [8)]. Tabulka uvádí seznam isoforem kosterního svalu člověka řazený dle pořadových čísel genů MYH kódujících odpovídající isoformy MyHC a lokalizaci daných genů v rámci genomu. Z tabulky je patrné, že s výjimkou genů MYH6 a MYH7, které jsou lokalizovány na raménku q chromozómu 14, jsou všechny ostatní geny MYH lokalizovány na raménku p chromozómu 17.

Gen	Isoforma MyHC	Ch	R	Pruh
MYH1	MyHC IIx/d	17	p	13.1
MYH2	MyHC IIa	17	p	13.1
MYH3	MyHC embryonální	17	p	13.1
MYH4	MyHC IIb / fetální	17	p	13.1
MYH6	MyHC srdeční isoforma alfa	14	q	11.2
MYH7	MyHC srdeční isoforma beta	14	q	11.2
MYH8	MyHC perinatální typ	17	p	13.1
MYH13	MyHC eom (extraokulární)	17	p	13.1

Pozn.: Ch – chromozóm; R – raménko chromozómu

Tabulka 2. Základní údaje isoforem MyHC kosterního svalu člověka. Tabulka byla sestavena na základě údajů uvedených v databázi ExPaSy [1)] a poskytuje údaje o délkách aminokyselinových sekvencí isoforem MyHC, jejich hmotnosti a přístupová hesla, pod kterými jsou isoformy v databázi dostupné.

Isoforma MyHC	Počet aminokyselin	Hmotnost isoformy (Da)	Přístupové heslo pro databázi ExPaSy [1)]
MyHC IIx/d	1939	223115 Da	P12882
MyHC IIa	1941	223004 Da	Q9UKX2
MyHC embryonální	1940	224036 Da	P11055
MyHC IIb / fetální	1939	223013 Da	Q9Y623
MyHC srdeční isoforma alfa	1939	223690 Da	P13533
MyHC srdeční isoforma beta	1935	223113 Da	P12883
MyHC perinatální	1937	222763 Da	P13535
MyHC extraokulární	1938	223680 Da	Q9UKX3

Tabulka 3. Přehled genů MyHC kosterních svalů laboratorního potkana a jejich základní parametry. Tabulka byla sestavena na základě údajů dostupných v databázi RGD [10)] a uvádí seznam isoforem kosterního svalu laboratorního potkana řazený dle pořadových čísel genů MYH kódujících odpovídající isoformy MyHC a lokalizaci daných genů v rámci genomu. Z tabulky je patrné, že s výjimkou genů MYH6 a MYH7, které jsou lokalizovány na raménku p chromozómu 15, jsou všechny ostatní geny MYH, u nichž je známa jejich lokalizace, lokalizovány na raménku q chromozómu 10.

Gen	**Isoforma MyHC**	**Ch**	**R**	**Pruh**
MYH1	MyHC 2x/d	10	q	q24
MYH2	MyHC IIa	*	*	*
MYH3	MyHC embryonální	10	q	q24
MYH4	produkt genu MYH4	10	q	q24
MYH6	MyHC srdeční isoforma alfa	15	p	p13
MYH7	MyHC srdeční isoforma beta	15	p	p13
MYH8	MyHC perinatální	10	q	q24
MYH13	MyHC extraokulární	10	q	q24

Pozn.: Ch - chromozóm; R – raménko

* - nezjištěno: údaj není dostupný nebo jsou známy jen fragmentární údaje, jež nemají význam pro tuto práci

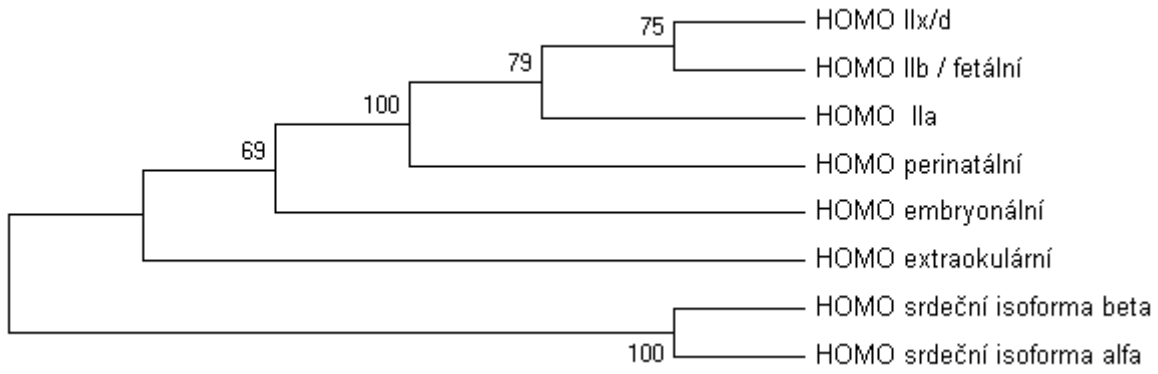
Tabulka 4. Základní údaje isoforem MyHC laboratorního potkana. Údaje v tabulce vedené byly shromážděny v databázi RGD [10]. Tabulka poskytuje údaje o délkách aminokyselinových sekvencí isoforem MyHC, jejich hmotnosti a přístupová hesla, pod kterými jsou informace o isoformách MyHC v databázi RGD [10] dostupné. Tato hesla jsou označena zkratkou RGD ID. Jsou též uvedena přístupová hesla pro databázi NCBI [2] pod označením Gene ID. V závorkách jsou uvedeny údaje, které jsou u databází Ensembl [13] a UniProt [14] odlišné oproti databázi RGD [10].

Isoforma MyHC	**Počet aminokyselin**	**Hmotnost isoformy (Mr)**	**RGD ID** [10]	**Gene ID** [2]
MyHC 2x/d	1942	*	735061	287408
MyHC IIa	*	*	620354	113994
MyHC embryonální	1939 (1933 [13]) (1930 [14])	223900 (222943 [13])	3138	24583
produkt genu MYH4	1959 [2]	*	3139	54274
MyHC srdeční isoforma alfa	1938 (1939 [13])	223378 (223508 [13])	62029	29556
MyHC srdeční isoforma beta	1935 (1930 [13])	222357 [13]	62030	29557
MyHC perinatální	1951	*	620356	252942
MyHC extraokulární	2268	*	3137	29605

* - nezjištěno: údaj není dostupný nebo jsou známy jen fragmentární údaje, jež nemají pro tuto práci význam

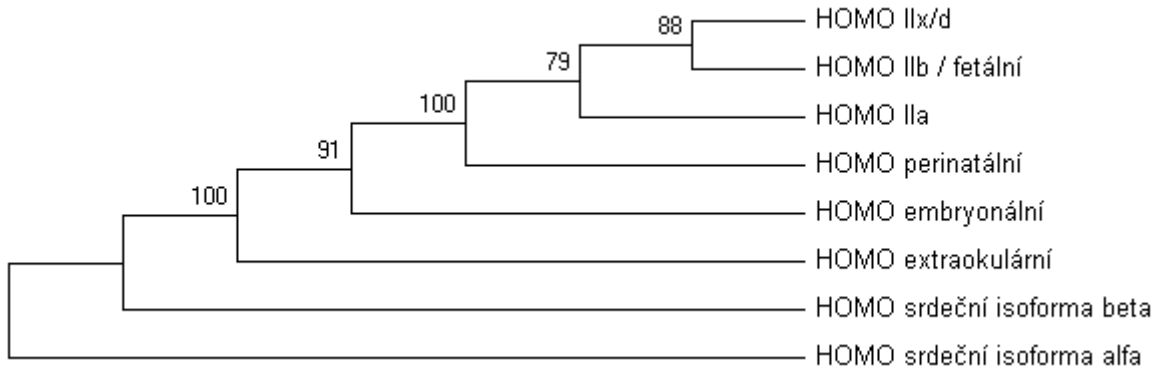
Obrázek 1. Fylogenetický strom lidských isoforem MyHC sestrojený metodou „Minimum Evolution“. Číselné údaje u jednotlivých větvení odpovídají výpočtům metody „Bootstrap“.

Z tohoto fylogenetického stromu je vidět vzájemná příbuznost srdečních isoforem MyHC alfa a beta, jež jsou vzájemně evolučně stejně vzdálené od isoforem ostatních se stoprocentní jistotou. Majoritní isoformy MyHC dospělého kosterního svalu jsou si navzájem příbuzné, stejně jako isoformy ontogenetické. Perinatální isoforma vykazuje oproti isoformě embryonální větší evoluční příbuznost majoritním isoformám dospělého svalu. Isoformě IIx/d byla jako nejpříbuznější přiřazena isoforma IIb. Této dvojici isoforem je příbuzná isoforma IIa stojící evolučně mezi vývojovými isoformami a majoritními isoformami dospělého svalu. Isoforma MyHC extraokulární je fylogeneticky na pomezí mezi skupinou kosterních a srdečních isoforem MyHC.



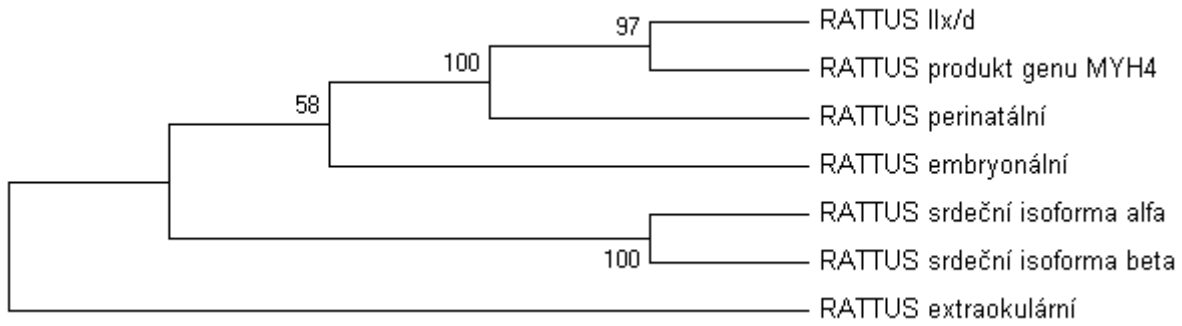
Obrázek 2. Fylogenetický strom lidských isoforem MyHC sestrojený metodou „Maximum Parsimony“. Číselné údaje u jednotlivých větvení odpovídají výpočtům metody „Bootstrap“.

Z tohoto fylogenetického stromu je vidět odlišná vzájemná evoluční vzdálenost srdečních isoforem MyHC alfa a beta k isoformám ostatním. Srdeční isoforma beta je ostatním isoformám více příbuzná, než srdeční isoforma alfa. Majoritní isoformy MyHC dospělého kosterního svalu jsou si navzájem příbuzné, stejně jako isoformy ontogenetické. Perinatální isoforma vykazuje oproti isoformě embryonální větší evoluční příbuznost majoritním isoformám dospělého svalu. Isoformě IIx/d byla jako nejpříbuznější přiřazena isoforma IIb. Této dvojici isoforem je příbuzná isoforma IIa stojící evolučně mezi vývojovými isoformami a majoritními isoformami dospělého svalu. Isoforma MyHC extraokulární je fylogeneticky na pomezí mezi skupinou isoforem kosterního svalu a srdečních isoforem MyHC.



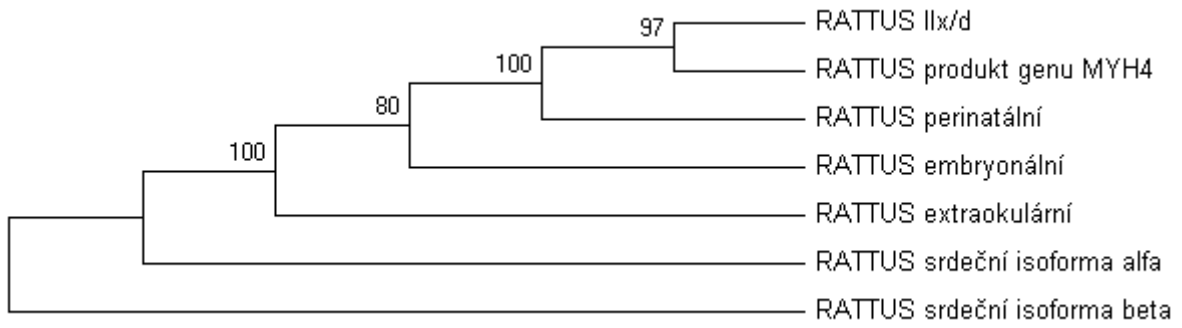
Obrázek 3. Fylogenetický strom isoforem MyHC laboratorního potkana sestrojený metodou „Minimum Evolution“. Číselné údaje u jednotlivých větvení odpovídají výpočtům metody „Bootstrap“.

Výpočet metodou „Bootstrap“ vykazuje jistotu blízké vzájemné příbuznosti obou srdečních isoforem. Srdeční isoformy MyHC jsou od ostatních isoforem MyHC evolučně vzájemně vzdálené ve stejné míře. Isoformě IIx/d dospělého svalu je podobná isoforma kódovaná genem MYH4. Perinatální isoforma MyHC vykazuje u obou organismů větší příbuznost k majoritním isoformám dospělého svalu než isoforma embryonální. Extraokulární isoforma MyHC je všem isoformám MyHC evolučně nejvzdálenější.



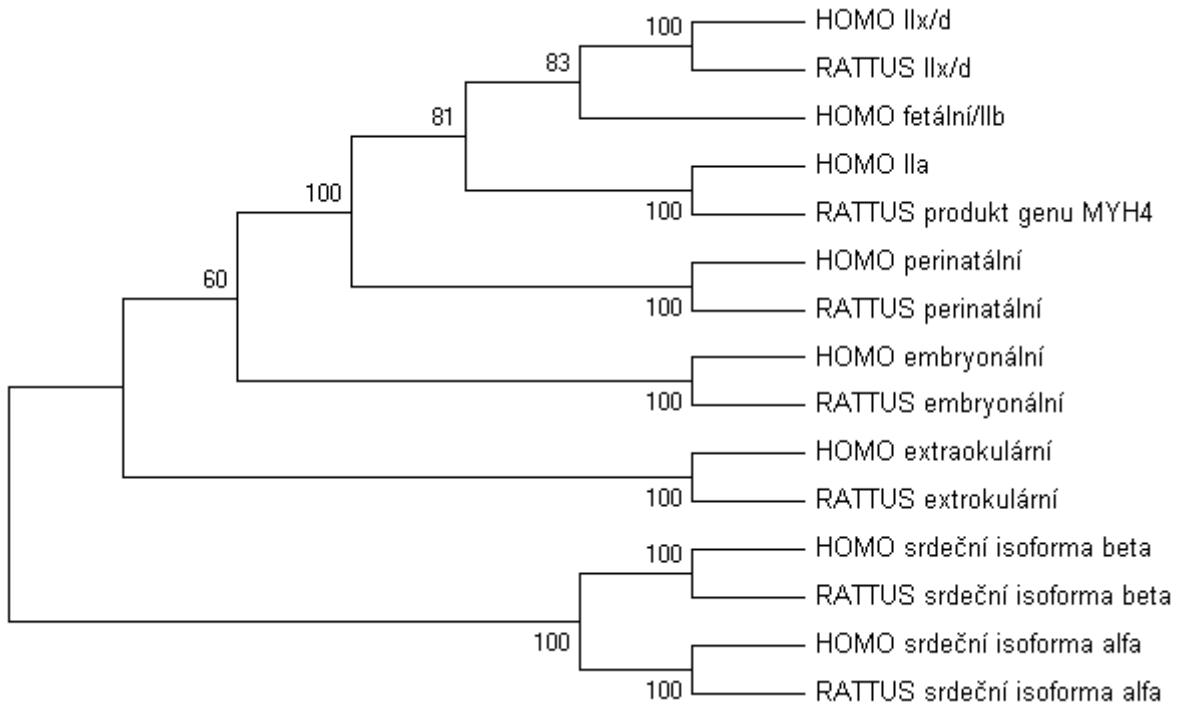
Obrázek 4. Fylogenetický strom isoforem MyHC laboratorního potkana sestrojený metodou „Maximum Parsimony“. Číselné údaje u jednotlivých větvení odpovídají výpočtům metody „Bootstrap“.

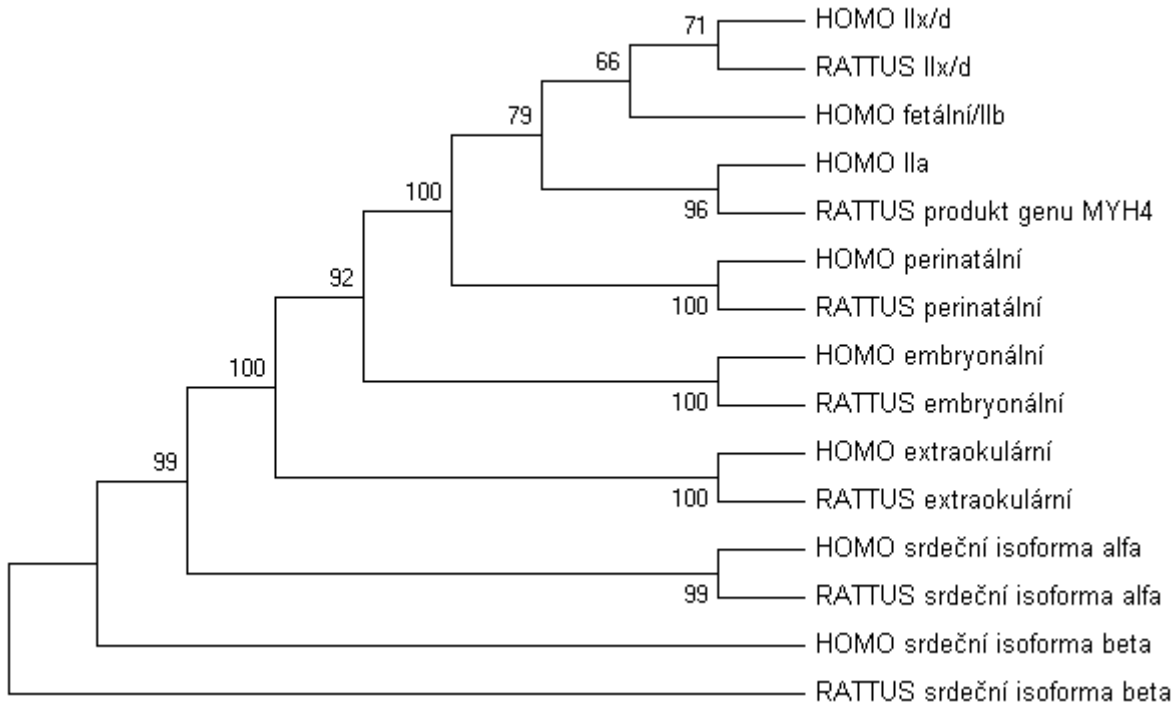
Srdeční isoforma alfa je ostatním isoformám MyHC evolučně vzdálená méně, než isoforma beta. Isoformě IIx/d dospělého svalu je příbuzná isoforma kódovaná genem MYH4. Perinatální isoforma MyHC vykazuje větší příbuznost k majoritním isoformám dospělého svalu než isoforma embryonální. Extraokulární isoforma MyHC leží evolučně mezi isoformami srdečními a isoformami majoritními v dospělém svalu a vývojovými.



Obrázek 5. Fylogenetický strom isoforem MyHC člověka a laboratorního potkana sestrojený metodou „Minimum Evolution“. Číselné údaje u jednotlivých větvení odpovídají výpočtům metody „Bootstrap“.

Zcela zřetelně je zde prokázána jistá evoluční příbuznost většiny isoforem MyHC člověka a odpovídajících isoforem MyHC laboratorního potkana. Srdeční isoformy vykazují vzájemnou stejnou evoluční odlehlost od isoforem ostatních. Isoformě IIb člověka nebyla přiřazena žádná isoforma MyHC laboratorního potkana a vykazuje velkou příbuznost isoformě IIx/d obou organismů. Lidské isoformě IIa byla jako nejpříbuznější přiřazena isoforma laboratorního potkana kódovaná genem MYH4. Perinatální isoformy obou organismů vykazují z obou typů vývojových isoforem větší příbuznost majoritním isoformám dospělého svalu. Extraokulární isoformy člověka a laboratorního potkana spadají evolučně mezi majoritní isoformy dospělého svalu a vývojové a isoformy srdeční.



Obrázek 6. Fylogenetický strom isoforem MyHC člověka a laboratorního potkana sestrojený metodou „Maximum Parsimony“. Číselné údaje u jednotlivých větvení odpovídají výpočtům metody „Bootstrap“.

Obrázek zcela zřetelně prokazuje jistou nebo velmi pravděpodobnou evoluční příbuznost většiny isoforem MyHC člověka a odpovídajících isoforem MyHC laboratorního potkana. Dle tohoto fylogenetického stromu jsou srdeční isoformy beta obou organismů odlehlé všem ostatním isoformám nejvíce, zatímco srdeční isoformy alfa člověka i laboratorního potkana mají mezi sebou od isoforem dospělého svalu a isoforem vývojových stejnou evoluční odlehlost. Srdeční isoforma beta laboratorního potkana je vůči všem ostatním isoformám nejodlehlejší. Isoformě IIb nebyla přiřazena žádná isoforma MyHC laboratorního potkana a vykazuje velkou příbuznost isoformě IIx/d obou organismů. Lidské isoformě IIa byla jako nejpříbuznější přiřazena isoforma laboratorního potkana kódovaná genem MYH4. Perinatální isoformy obou organismů vykazují z obou typů vývojových isoforem větší příbuznost majoritním isoformám dospělého svalu. Extraokulární isoformy člověka a laboratorního potkana spadají evolučně mezi majoritní isoformy vývojové a dospělého svalu a isoformy srdeční.