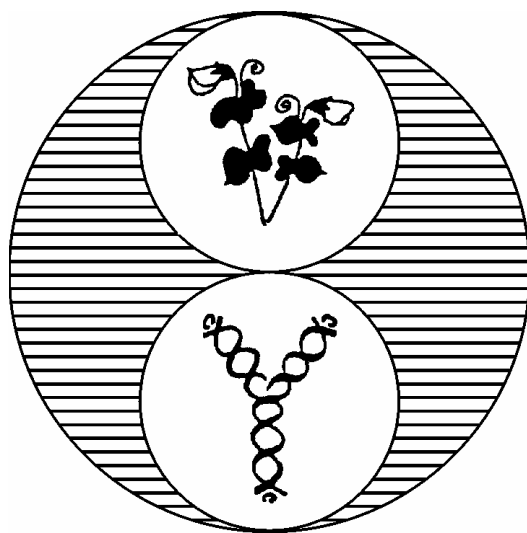


GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA

INFORMAČNÍ LISTY



Číslo 26

Květen 2003

OBSAH

Zápis ze schůze výboru GSGM konané dne 5. 12. 2002	1
Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2002	3
Minutes of the FEGS Council Meeting held on 9. 11.	5
Co nového v genetice	
Padesát let existence moderní molekulární biologie a genetiky; 50. výročí objevu dvoušroubovice DNA z roku 1953 (S. Zadražil)	9
Texty přednášek přednesených na Genetické konferenci GSGM	13
Analýza genomu domácích zvířat (P. Hořín)	14
Současné trendy klasické a molekulární cytogenetiky (K. Michalová)	17
Prokaryotický genom (J. Doškař)	26
Představujeme genetická pracoviště	
Přírodovědecká fakulta UK v Bratislave	32
Biofyzikální ústav AV ČR	46

Informační listy

číslo 26, květen 2003

Vydává Genetická společnost Gregora Mendela

Redakční rada - Výbor GSGM

Výkonný redaktor - Doc. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Katedra genetiky a molekulární biologie

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Kotlářská 2, 611 37 Brno

ISSN 1210-6267

Zápis ze schůze výboru GSGM konané dne 5. prosince 2002

Přítomni: S. Zadražil, J. Doškař, S. Rosypal, J. Dvořák, P. Pikálek, M. Slaninová, J. Relichová, J. Šmarda, J. Fajkus, M. Vojtíšková

Omluveni: E. Miadoková, M. Ondřej, A. Kormuťák, P. Ráb, D. Vlček

Program:

1. Informace o londýnském zasedání FEFS
2. Zaměření a náplň IL č. 26
3. Členská základna – aktuální stav
4. Finanční situace společnosti a členské příspěvky
5. Činnost – konkrétní informace a jednotlivé návrhy členů výboru
6. Různé

Ad 1.

Londýnského zasedání FEFSu se za naši společnost zúčastnily prof. J. Relichová a doc. J. Forstová (obě úhrada z jiných zdrojů než GSGM). Na zasedání byli přítomni zástupci dalších pěti evropských genetických společností. Ze zápisu z tohoto zasedání je zřejmé, že pro oživení činnosti FEFSu je zapotřebí dobrovolníků, kteří budou věnovat čas těmto aktivitám. J. Relichová se ujala úkolu zřídit web stránky, které budou provozovány pod www.fefs.info. Plné znění zápisu bude zveřejněno v IL. Z částky, kterou FEFS poskytne pro zřízení a udržování stránek, obdrží webmaster odměnu 2.000,- Kč.

Ad 2.

Náplň IL č. 26:

- a) uveřejnění zbývajících referátů z Genetické konference
- b) budou prezentována další genetická pracoviště, konkrétně z BFÚ AV ČR Brno a PřF UK Bratislava
- c) článek o vztahu VŠ a AV ČR (S. Zadražil)
- d) zápis ze zasedání FEFSu
- e) návrh na vyhlášení ceny fy GENETICA (návrh podal J. Fajkus, vypracuje statut a podmínky)

Ad 3.

V současné době máme 142 členů, 50 ze Slovenska a 92 z ČR podle seznamu, který vede tajemnice. J. Relichová a M. Slaninová si odsouhlasí členy ze SR.

Ad 4.

Platících členů jsou asi 2/3 z přihlášených.

J. Dvořák informoval o stavu hlavního účtu, kde je 14.358,-Kč + 1.000,- v hotovosti. Podrobné vyúčtování bude provedeno ke dni 31.12.2002, včetně účtu na Slovensku. Neplatiči budou při rozesílání příštího čísla IL na tuto skutečnost upozorněni. Současný členský příspěvek na rok je 150,- Kč/Sk (studenti a důchodci 100,-Kč/Sk)

Ad 5.

- v únoru 2004 se uskuteční další Genetická konference, zaměřená na genetiku virů. Konference se bude konat v Praze a organizaci zajistí členové GSGM z PřF UK Praha (S. Zadražil, P. Pikálek, J. Forstová a další)
- J. Relichová projedná z presidentem FEES uskutečnění příštího zasedání výboru FEES v Brně

Ad 6.

Web stránky GSGM je zapotřebí aktualizovat – konkrétně doplnit sídlo a kontaktní osobu (zajistí J. Doškař)

Zapsala: J. Relichová

Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2002

Zůstatek ke 31.12. 2001	13 525,30 Kč
z toho:	
na účtu KB	12 954,10 Kč
v hotovosti	571,20 Kč
<hr/>	
Příjmy v roce 2002	5 110,60 Kč.
1. úroky z účtu u KB	62,60 Kč.
2. členské příspěvky:	
placené na účet	3 100,- Kč.
placené hotově	1 950,- Kč.
<hr/>	
Výdaje v roce 2002	6 441,80 Kč.
1. poplatky KB:	
za vedení účtu	1 560,- Kč.
za položky	160,- Kč.
2. proplacení faktury (IL)	2 226,80 Kč.
3. ceniny v hotovosti (rozeslání IL)	2 495,- Kč.
<hr/>	
Zůstatek ke dni 31.12.2002	12 191,10 Kč.
z toho:	
na účtu KB	12 163,30 Kč.
v hotovosti	30,80 Kč.

Vyúčtoval J. Dvořák, pokladník

Vyúčtovanie hospodárenia slovenskej časti GSGM k 31.12.2002

<u>Zostatok k 1.1.2002</u>	A- konto	8 690,79 SK
	B- hotovosť	4 862,60 SK

A

Bankové operácie (dok.1)	- 619,11 SK
Príjmy z členských poplatkov k 31.12. 2002 (dok.1)	+ 1 300,00 SK

Zostatok na účte k 31.12.2002 (dok.1) 9 371,68 SK

B

Členské príspevky (dok.2)	+ 1 000,00 SK
Príspevok na ŠVK (dok.3)	- 520,50 SK

Zostatok hotovosti k 31.12.2002 + 5 342,10 SK

Celkový finančný stav k 31. 12.2002 + 14 713,78 SK

Bratislava, 11. 4. 2003

Vyúčtovala: *M. Slaninová*

Federation of European Genetical Societies (FEES)

Minutes of the FEES Council Meeting held at the Bonnington Hotel, London on 9th November, 2002

Present: Prof. Dr. Gérard Buttin (Société Française de Génétique), Prof. David Cove (President, FEES), Dr. Jitka Forstová (Czech and Slovak Genetical Society), Dr. Darren Monkton (UK Genetics Society), Prof. Dr. Alfred Nordheim (Germany Genetics Society), Prof. Dr. Isaak Rashal (Latvian Society of Geneticists and Breeders), Dr. Jiřina Relichová (Czech and Slovak Genetical Society), Prof. Dr. Dieter Schweizer (Austrian Genetical Society)

1. Minutes of the FEES Council Meeting held at the Bonnington Hotel, London on 10th November 2001.

These were approved (a copy of these is attached to these minutes at appendix 1)

2. Officers Reports

a) President

The President of FEES, David Cove, reported verbally on his activities in the previous year. As was agreed at the 2001 Council Meeting, he had consulted as widely as possible with potential member societies, to obtain their views on the future of FEES. As part of this exercise he had circulated a questionnaire. The responses are summarised at appendix 2. Only seven societies had responded, but these generated a consensus that the future activities on FEES should be directed at interacting with European Union bodies and national governments on matters relating to genetics. Better liaison between member societies was also ranked high. There was less support for the organisation and holding of scientific meetings, mini symposia and workshops. David Cove reported that although only seven societies had responded, a number of other societies had communicated with him and expressed similar views. The President's report was accepted, and it was agreed that discussion on it, would be deferred until item 4.

b) Treasurer and Secretary.

FEES has no treasurer or secretary at the present time. FEES accounts are being administered by the Treasurer of the UK Genetics Society. There had been no income in the past year, nor any significant expenditure.

3. Election of Officers

No nominations had been received for the positions on Secretary, Treasurer and Meetings Secretary. It was agreed that these positions might be filled, at least on a temporary basis, by co-option, should suitable volunteers emerge.

4. The future of FECS

Dieter Schweizer initiated discussions by reviewing the history of FECS. FECS was set up in 1992, and its statutes were approved at a Council Meeting, held in conjunction with the International Congress of Genetics in Birmingham in 1993. FECS was very active initially, organising two meetings (in collaboration with national societies). He was disappointed that this initial momentum had not been maintained. He highlighted that FECS had the potential to speak for at least one third of all the geneticists in the world.

David Cove said he was concerned that the image of Genetics was suffering as a result of media coverage of matters relating to the subject, that was often misinformed. He feared that in the UK this was resulting in a down-turn in support for the subject. As a result, both the funding of basic genetics and the recruiting of students to study the subject had become more difficult. He believed that there was a role for FECS in improving the image of genetics both with government and with the public.

Gérard Buttin echoed these concerns, which he believed applied in France as well. He feared that if FECS did not prosper, then national genetical societies would also find difficulty in continuing. For FECS to be active, funding needed to be secure.

In a general discussion on funding, **it was agreed that for 2003, member societies should pay €1 (one Euro) per member (census date 1st January 2003)**. It was acknowledged that this level of funding would not generate sufficient money to carry out any ambitious plans, for example funding a lobbyist based in Brussels, but it would be sufficient for a further year of development. It was also agreed that it was essential for FECS to work with other European organisations, including FEBS, EMBO and ELSF.

Darren Monckton reported that the UK Genetics Society would be willing to subscribe, at least for 2003, at the rate of €1 per member, but the Society believed that there would be no long term future for FECS unless a majority of the genetical societies in Europe belonged. Although several of the larger societies were represented at the meeting, many were not.

Alfred Nordheim believed that FECS aims needed to be better defined. To do this member societies would need to work more actively together, and he suggested that each member society, should identify a member whose priority was to participate in FECS affairs. This person would not necessarily be the society's President, who usually had too many other commitments.

This proposal received general support. **It was therefore agreed, that all societies that wished to belong to FEES, would identify a person willing participate actively in FEES affairs.** It was envisaged that such participation should generally be via email. The contact person would be responsible for passing on information to the member society, and for relaying the society's views to the other members of FEES.

Immediate priorities that received general support were:

- a) All potential member societies should be circulated with a report of this meeting, to see if they wished to subscribe to FEES and if so, to identify their contact person. **It was agreed that societies that wished to be members of FEES, but which believed that the subscription of €1 per member could not be afforded, should make an application for membership with a reduced subscription. FEES members would then be balloted to determine if the application should be approved.**
- b) **It was agreed that sum of €1000 from FEES funds should be provided to Dieter Schweizer and the Gregor Mendel Genetical Society (J Relichova and J Forstová) to update the FEES website.** The website should contain links to those of members societies as well as providing information about FEES. It should be capable of development, so that information relevant to genetics could be accessed on the site and might have other facilities including discussion and question and answer pages.
- c) **It was agreed that David Cove should explore the availability of domain names.**
- d) Until more people were identified who would be willing to participate actively in FEES affairs, it would be difficult to plan how the priorities identified in the questionnaire that had been circulated, could be acted upon. It was likely that a larger number of active participants would also identify further priorities.
- e) **It was agreed that it would be desirable for future Council meetings to be attended not only by a society's contact person but also by its president.** There was some support that the next Council meeting should be held earlier than a year's time and **it was generally agreed that an appropriate location for this meeting would be Brno.**
- f) Since it was agreed that FEES must work in partnership with other European bodies, **it was agreed that David Cove should contact FEBS, EMBO and ELS to canvass their opinions on the usefulness of FEES, and its future relationship with them.**
- g) A number of possible initiatives in which FEES might be involved were considered. There was a need for a European-based stock centre for some experimental organisms used for genetical research, and the problem of maintaining mutant mouse lines was particularly highlighted. This represented the sort of project, which might be aided by a strong input from FEES.
- h) Student mobility in Europe was believed to be valuable. Transfer of genetics students between universities was sometimes difficult because syllabuses were very different. However, in some countries, e.g. the UK, there was great variation

in genetics degree programmes between universities, and so pan-European co-ordination was likely to be very difficult. FECS might provide a database that would allow universities to identify partner universities having compatible genetics programme, with which student exchange might therefore be possible.

- i) A high priority was to identify a secretary and treasurer for FECS. David Cove believed it was impractical for him to attempt to run FECS on his own, and the lack of progress in the past year was largely due to him being the only person actively involved. **It was agreed, that when he circulated potential member societies, he would make clear that it was a high priority to identify a secretary and treasurer, and he would encourage societies to put forward nominations.** It was hoped that an early task for a treasurer was to identify further sources of income possible from commercial sponsorship.

Co nového v genetice

Padesát let existence moderní molekulární biologie a genetiky; 50. výročí objevu dvoušroubovice DNA z roku 1953 (k diskusi o genomice)

Stanislav Zadražil

V dubnu letošního roku uplynulo již 50 let od největšího vědeckého objevu 20. století, který poukázal na samotný základ existence života na této planetě. Přesto, že při všech dosavadních (uplynulých) výročí jsou zmiňovány pouze 2 základní práce J.D. Watsona a F.H.C. Cricka v časopise *Nature* z 25. dubna a 30. května 1953 (A Structure of Deoxyribose Nucleic Acid a Genetical Duplication of the Structure of Deoxyribonucleic Acid), byl objev dvoušroubovice DNA detailně a nesporně představen minimálně v 6 originálních vědeckých sděleních, z nichž 2 další (M.H.F. Wilkinse, A.R. Stokese a H.R. Wilsona – Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acids, a R. Franklinové a R.G. Goslinga – Molecular Configuration of Sodium Thymonucleate) doprovodily a zhodnocením mimořádně zdařilých X-difrakčních spekter různě strukturovaných vzorků DNA „nezávisle podpořily“ první Watsonovo a Crickovo sdělení (všechna z 25. dubna). Květnový článek v *Nature*, podle slov druhého z autorů, měl jen rozvinout genetické (biologické) důsledky, které z navrženého modelu očividně vyplývaly a zajistit prioritu i z tohoto hlediska, a byl tedy již více spekulativní. Zbývající 2 práce pak představovaly určitý přehled o stavu struktury DNA, předneseny a publikovány v červnu 1953 na 18. Cold Spring Harbor Symposium o kvantitativní biologii (W.-C.-The Structure of DNA), a o strukturních detailech modelu DNA zveřejněny v roce 1954 v *Proceedings of the Royal Society* (C.-W.- The Complementary Structure of Deoxyribonucleic Acid), a byly považovány za určitý program molekulárně biologického výzkumu v následujícím desetiletí.

Tyto skutečnosti poukazují minimálně na to, že Watsonův a Crickův objev, který následoval jen 7 let, resp. 1 rok, po „předběžném“ potvrzení genetické funkce DNA (mechanismy genetické transformace a fágové infekce bakterií), byl geniálním završením hodnocení výsledků nejen dlouhodobého studia vlastností nejdůležitějších biopolymerů proteinů a nukleových kyselin (веду jen některá z mnoha důležitých jmen – C.B. Anfinsen, W.T. Astbury, R.B. Corey, S. Furberg, E. Chargaff, J. Kendrew, L. Pauling, M. Perutz, A.R. Todd, atd. atd.), ale i velmi čerstvých poznatků jejich současníků, z nichž W. a C. mohli čerpat a kteří se podíleli (kromě „nepřehlédnutelného, ale opominutého“ L. Paulinga) jako autoři na shora uvedených publikacích. O veřejných, ale i zákulisních, vztazích v daném období toho bylo napsáno již velmi mnoho (např. J.D. Watson „The Double Helix“, G.S. Stent (ed.) „The Double Helix“ – a Norton critical edition, H.F. Judson „The Eighth Day of Creation – Makers of the Revolution in Biology“) a bylo by jistě zbytečné vracet se k nim i při tomto výročí; je však jasné, že např. Pauling se právě v této situaci ocitl zcela mimo hru a že hlavní úlohu přitom hrála Watsonova aktivita během pobytu v Cambridge. Přesto i v tomto případě, jako konečně při všech velkých objevech, vycházejících nutně z úrovně vědního oboru v dané době, byl jednoznačně naplněn smysl známého výroku I. Newtona „Jestliže vidím dále, pak je to proto, že stojím na ramenech obrů“.

Mnohem důležitější se mi však zdá připomenout, co následovalo po objevu dvoušroubovice DNA v molekulární biologii a jak se mohl model DNA projevit v jejím

rozvoji. „Stavitelé modelů“, jak někteří současníci popisovali činnost W. a C., kterou se výrazně odlišovali právě od „pouhých vykladačů“ obrázků difrakce X-paprsků, totiž skutečně zasáhli celou oblast molekulárně biologických studií nukleových kyselin a proteinů, považovanou dnes za éru DNA. Veškeré úsilí, které bylo vynaloženo na návrh a potvrzení výhradní existence vzájemného pravotočivého šroubovicového vinutí dvou komplementárních, antiparalelních polydeoxynukleotidů s 3'-5' fosfodiesterovou vazbou, umožňující semikonservativní, symetrickou replikační syntézu DNA a transkripční asymetrickou syntézu RNA, se mohlo postupně pozitivně i negativně projevit v dalším vývoji molekulární biologie a genetiky, přičemž teprve formulace Crickova ústředního dogmatu v roce 1958 dostatečně přesvědčivě poukázala na vzájemné vztahy mezi strukturou, obecně podmíněnou syntézou a funkcí DNA, RNA a proteinů. V téže roce získali G.W. Beadle, E.L. Tatum a J. Lederberg Nobelovu cenu za zavedení a vysvětlení biochemické genetiky, genetické rekombinace a za charakterizaci struktur genetického materiálu bakterií, kterážto problematika mohla představovat jen počátky ovlivněné strukturou DNA, protože většina odpovídajících studií byla provedena před objevem dvoušroubovice. Nedostatečný projev vlivu W. a C. objevu se ukázal i v následujícím roce, kdy další Nobelova cena byla udělena S. Ochoovi a A. Kornbergovi za syntézu RNA a DNA *in vitro* pod vlivem spíše katabolického enzymu polynukleotidfosforylasy, resp. reparačního enzymu DNA-polymerasy I. Tento nedostatečný vliv mohl vycházet i z představy, že k syntéze stačí rozvinutí dvoušroubovice, komplementarita bazí matrice a prekursoru s makroergickou esterovou vazbou (deoxynukleosidtrifosfát), aniž by byla zřetelná potřeba nějaké specifické enzymové funkce („spontánní polymerace“). Přesto i tyto práce sehrály důležitou úlohu při konečném objasnění mechanismu replikační a reparační syntézy DNA a při odhalování genetického kódu (umělé mRNA syntetizované polynukleotidfosforylasou).

Přijmeme-li tento princip pohledu na historii rozvoje molekulární biologie, kdy závislost vývoje na nové metodologii oboru (viz Informační listy č. 21 – Výzkum a analýza genomu) nahradíme důsledkem pokračujícího rozvoje, tj. hodnocením dosažených výsledků udělením Nobelovy ceny, jako nejprestižnějšího vědeckého ocenění, dostáváme se, z hlediska molekulární biologie, k nejurodnějšímu roku 1962. Tehdy právě byla oceněna, v oboru fyziologie a lékařství, molekulární struktura nukleových kyselin a její význam pro přenos genetické informace (J.D. Watson, F.H.C. Crick a M.H.F. Wilkins). Současně však byly uděleny ceny v oboru chemie za strukturu a konformaci globulárních proteinů (M.F. Perutz a J.C. Kendrew) a dokonce i za mír L.C. Paulingovi (varování před nebezpečím radioaktivního spadu při zkouškách jaderných zbraní, když svou první Nobelovu cenu získal již v chemii 1954 za úlohu slabých chemických vazeb ve struktuře proteinů – neocenitelná informace pro všechny pracovníky v oblasti struktury nukleových kyselin). V 60. letech dosáhli na stejné ocenění F. Jacob, A. Lwoff a J. Monod za genetickou regulaci proteosyntézy, závislou na specifickém uspořádání genů (operonová teorie – 1965), R.W. Holley, H.G. Khorana a M.W. Nirenberg za objasnění genetického kódu a jeho funkce při translaci (1968) a M. Delbrück, A.D. Hershey a S. Luria za genetickou strukturu a replikaci virů (1969), které se později staly základem klasifikace ve virologii.

Na začátku 70. let objevili H.M. Temin a D. Baltimore, nezávisle na sobě, retrovirový enzym reversní transkriptasu umožňující integraci genomu RNA v infikované buňce, čímž potvrdili jeden z předpokládaných stupňů ústředního dogmatu molekulární biologie a podpořili hypotézu primární existence RNA světa ve vývoji života na Zemi. Nemalou úlohu sehrál tento objev rovněž v biotechnologiích založených na rekombinantní DNA (využití cDNA knihoven v nehomologní genové expresi). Spolu s R. Dulbecem obdrželi v roce 1975 Nobelovu cenu za interakce nádorových virů s genomem buňky. Důležitým objevem pro rekombinantní technologii DNA se v tomto období prezentovali i W. Arber, D. Nathans a H.O. Smith, kteří v roce 1978 získali stejné ocenění za charakterizaci a izolaci restričních

endonukleas, nejspecifičtějších katabolických enzymů DNA, a za jejich aplikaci v genetice. Poznání mechanismu rekombinace DNA *in vitro* znamenalo i neobvyklý rozvoj metod pro sekvenční analýzu DNA (degradační Maxama a Gilberta a syntetické Sangera). Nejdůležitější úlohu tu sehrál F. Sanger, nositel Nobelovy ceny za analýzu aminokyselinové sekvence insulinu (1958), kterému patří i zásluha za primární strukturu jedné z prvních tRNA („fingerprintová“ technika) a prvních velkých DNA (lambda fága a mitochondriové DNA – plus a minus techniky a dideoxynukleotidová stop metoda). Svou druhou Nobelovu cenu z oboru chemie tak získal v roce 1980 spolu s P. Bergem a W. Gilbertem za rozvoj metod stanovení nukleotidových sekvencí DNA. Význam krystalografické analýzy, která byla základem pro studium konformace proteinů i pro objev dvoušroubovice DNA, byl potvrzen A. Klugem také pro studium komplexů nukleoproteinů, když v roce 1982 obdržel Nobelovu cenu (rovněž v oboru chemie) za objasnění nukleosomové struktury chromatinu.

Úloha mobilních genetických elementů v kukuřici, objevených B. McClintockovou ještě před objevem dvoušroubovice DNA, byla mnohem později potvrzena jako výsledek zvláštní transposiční rekombinace DNA, vyvolávající nestabilitu genomu u všech organismů; mimořádný význam objevu autorky byl po mnoha letech oceněn samostatnou Nobelovou cenou z roku 1983. Nedávno ukončená analýza genomu člověka potvrdila, že je z celé poloviny odvozen od transposibilních elementů, které jsou však převážně inaktivovány. Rok 1989 přinesl, z pohledu udělených Nobelových cen, významný pokrok v retrovirologii, když J.M. Bishop a H.E. Warmus byli oceněni za objasnění buněčného původu retroviróvé onkogenese. Ve stejném roce pak S. Altman a T. Cech získali stejné ocenění za další podporu existence RNA světa jako primární vývojové etapy molekulární evoluce, když prokázali katalytické vlastnosti RNA (ribozomy), které byly až do té doby připisovány pouze proteinům. Mimořádný metodický pokrok byl základem pro udělení ceny v roce 1993. K.B. Mullis, spolu s M. Smithem (pravděpodobným zakladatelem principů „farmakogenetiky“), navrhl a ověřil, po dlouhodobé všeobecné známosti mechanismu replikace DNA, způsob „klonování DNA molekul“ metodou polymerasové řetězové reakce (automatizovatelná replikace fragmentů DNA *in vitro*).

Závěr 20. století byl na úrovni Nobelových cen věnován ocenění nového principu infekce – prionům (S.P. Prusiner 1997), zodpovědným za BSE, vCJD apod., a rozpoznání sekvencí genů kódujících spolu s produktem i jeho signální aminokyselinovou sekvenci rozhodující o transmembránovém transportu proteinu v buňce i mimo ni (G. Blobel 1999). V souladu s rozvojem genomiky, ve smyslu úplné analýzy genomů modelových eukaryotických organismů, byly první Nobelovy ceny 21. století uděleny pracovníkům studujícím buněčný cyklus těchto organismů, jako základ jejich růstu, vývoje a genetické stability, např. *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* (L. Hartwell, P. Nurse a T. Hunt 2001), a *Caenorhabditis elegans*, jako mimořádně vhodného modelu pro neurobiologii a molekulární biologii (S. Brenner, L. Sulston a R. Horvitz 2002).

Přesto, že nebyly ohodnoceny udělením Nobelovy ceny, je ze strukturního i funkčního hlediska důležité připomenout, že dříve nepřijatelné struktury při vytvoření modelu dvoušroubovice byly v průběhu uplynulých 50 let studia nukleových kyselin prokázány i levotočivá Z-konformace DNA, stabilní P-konformace DNA s cukr-fosfátovou páteří uvnitř molekuly DNA, třívláknové a čtyřvláknové šroubovice DNA (H konformace, resp. telomerové struktury), paralelní uspořádání vláken šroubovic DNA, 2'-5' a 5'-5' internukleotidové vazby v RNA a mnoho neobvyklých, ale existujících struktur RNA, zabezpečujících především jejich regulační funkci v genové expresi (další funkce připisovaná dříve jen proteinům) atd. atd., které musely být nejdříve složitě vylučovány, aby mohly být později velmi obtížně experimentálně znovuobjevovány.

Z dnešního hlediska by bylo možné i značnou část zde neuvedených Nobelových cen, udělených za fyziologii a lékařství a částečně i chemii, považovat za ceny z oblasti

molekulární a buněčné biologie, a to bez ohledu na dobu jejich udělení (i před W.-C. objevem). To jen potvrzuje skutečnost, že molekulární biologie se dnes stala základem všech biologických disciplin a do jisté míry již dříve postupně ztrácela svou, často zpochybňovanou samostatnou existenci (ústřední molekulární metodologie biologie) vstupem do povědomí biologů, kteří všechna svá bádání a objevy vedou a objasňují na základě projevu a interakcí složek genomů, proteomů, transkriptomů a metabolomů, jak se dnes obecně nazývají soubory všech specifických molekul přítomných v buňce a řídících všechny její projevy uvnitř i navenek (nukleové kyseliny, proteiny a metabolity jimi kódované, syntetizované a všestranně upravované). Je tedy molekulární biologie dnes mrtvá nebo „se převtělila“ jako základní princip biologie a myšlení biologů (ale i lékařů, technologů a dalších, objasňujících nové interdisciplinární vztahy v biomedicině, biotechnologiích apod.) do všech oborů? Budeme se tedy všichni pokorně vracet ke „klasickým“ oborům, k jejichž názvu nebudeme muset přidávat přívlastek „molekulární“, protože molekulární úroveň studia v nich bude organicky obsažena? I tak bychom se mohli na dnešní situaci jistě dívat a genetika by mohla být přímo exemplárním příkladem.

Genetika jako experimentální obor studující a objasňující dědičnost a proměnlivost organismů byla, stejně jako všechny biologické vědní disciplíny, vždy závislá na úrovni odpovídající metodologie. Její počáteční dělení podle předmětu studia (mikrobiální, rostlinná, živočišná, populační atd.) začalo pomalu ztrácet svůj význam právě s výraznějším uplatňováním molekulárních postupů, jak v oblasti používaných metod, tak pozorovaného objektu – „molekulární genetika“. S postupujícím nárůstem informací o sekvenčním uspořádání genomů a jejich částí (rozhodujících o genotypu) a o jejich uplatňování na buněčné úrovni prostřednictvím transkripce a proteosyntézy (rozhodujících o fenotypu) se začalo prosazovat označení genomika, opět s použitím většího množství přívlastků (strukturní, srovnávací, funkční, počítačová apod.) vlastně pro zaměření celé genetiky. I toto nové označení, stejně jako obdobná transkriptomika, proteomika a metabolomika (převážně části biochemie a molekulární biologie), lze asi považovat za dočasné a přechodné, před opětovným návratem k původní „pouhé“ genetice (dědičnost a proměnlivost organismů na základě struktury a funkce genů a jejich produktů vytvářejících odpovídající rodiny a rozsáhlé interakční sítě). Ke druhému extrému ve smyslu současného označování a členění genetiky by mohl vést výrok nedávného laureáta Nobelovy ceny prof. S. Brennera, který s jistou nadsázkou navrhuje považovat všechny biology 21. století za genetiky (struktura a funkce genů je základem celé biologie).

Bez ohledu na to, jak budeme my a naši pokračovatelé označovat vlastní badatelskou aktivitu v oblasti, kterou před 50 lety nesporně nastartoval objev Watsona a Cricka, můžeme být hrdi a vděční, že jsme mohli být svědky i součástí dosud největšího a nejrychlejšího rozvoje biologie v období mezi objevem dvoušroubovice DNA a stanovením úplného sekvenčního uspořádání lidského genomu, nejpodrobnější genetické mapy, kterou je možno sestavit, s perspektivou jejího úplného funkčního naplnění, jehož rychlost bude závislá na vhodném uplatňování stávajících a nových, molekulárních metodických přístupů.

23. 4. 2003

**Texty přednášek
přednesených na Genetické konferenci GSGM
konané ve dnech 5.-6. února 2002 v Brně**

(II. část)

Analýza genomu domácích zvířat

Petr Hořín

Ústav genetiky FVL VFU Brno

Druhy domácích zvířat jsou ve své existenci, včetně reprodukce, plně závislé na člověku. Populace domácích zvířat podléhají procesu šlechtění, který využívá selekce vhodných rodičovských zvířat a následně jejich řízeného rozmnožování – plemenitby. Souhrn požadavků na užitkové, morfologické a další významné znaky u konkrétních druhů, respektive plemen se nazývá chovný cíl. V konkrétní etapě šlechtění jsou tyto požadavky vyjádřené plemenným standardem.

Chovný cíl zahrnuje především ty vlastnosti, pro které je daný druh nebo plemeno chováno. Samostatnou skupinu tvoří hospodářská zvířata, jejichž chovem a šlechtěním vzniká významný ekonomický efekt, protože se chovají zejména k produkci potravin nebo jiných produktů živočišného původu. Jiné druhy zvířat jsou chovány například pro účely pracovní, sportovní, vědecké, estetické nebo citové. Cílevědomý výběr zvířat, který vede ke genetické fixaci významných vlastností je založený na existenci jejich genetické variability. Souborně se tyto vlastnosti, zejména u hospodářských zvířat, nazývají *ekonomicky významné znaky*. Patří mezi ně primárně vlastnosti užitkové v širším slova smyslu, ale také znaky zdraví. Většina významných užitkových vlastností má kvantitativní a komplexní povahu a je zpravidla ovlivňována větším počtem genů. Dobrý zdravotní stav je předpokladem plné a efektivní realizace genetického potenciálu užitkovosti, čili předpokladem realizace chovného cíle, ale je také neoddělitelnou součástí chovného cíle.

Vzhledem k tomu, že většina významných vlastností, které jsou součástí chovného cíle má kvantitativní povahu a nízkou heritabilitu, je proces šlechtění efektivní zejména tehdy, využíváme-li v něm kromě selekce fenotypové také selekci genotypovou. Poznání genetického založení selektovaných rodičovských jedinců nebo populací (například linií) je možné buď na základě cílevědomé produkce testovací skupiny potomků nebo přímým určením genotypu v genech, které daný znak ovlivňují (markery 1. typu), případně jsou s ním v těsné vazbě a genotyp v těchto genech nepřímo signalizují (markery 2. typu). Odhad genotypového založení na základě potomků je tradiční součástí šlechtění hospodářských zvířat a nazývá se odhad plemenné hodnoty. Jeho princip je statistický. V současné post-genomické éře je možno ve šlechtění stále efektivněji využívat molekulárních metod identifikace genů významných pro užitkovost a zdraví a určení jejich funkce v realizaci znaku. Po éře redukcionismu, kdy bylo možno identifikovat významné majorgeny v definovaných modelových situacích (například gen ovlivňující vnímavost prasat k prasečímu stresovému syndromu a zároveň ovlivňující kvalitu masa), je možno díky metodologickým přístupům genomiky a proteomiky tyto geny systematicky vyhledávat a analyzovat jejich expresi v rámci komplexní analýzy celého genomu.

Mapování genů domácích zvířat využívá všech přístupů známých u člověka a laboratorních modelů. Geny, které mohou ovlivňovat významné znaky - kandidátní geny - se dají systematicky vyhledávat metodou genomového „*scanu*“, která je založena na analýze velkého počtu neexprimovaných markerů 2. typu, zejména mikrosatelitů, vybraných tak, aby rovnoměrně pokrývaly celý genom v dostatečně malých vazebných vzdálenostech. Vazebná a asociační analýza následně odhalí na definované hladině statistické významnosti případnou souvislost určitých chromosomálních oblastí vymezených konkrétními markery s fenotypovou variabilitou zkoumaného komplexního znaku. Tyto oblasti je možno dále analyzovat metodami jemného mapování a odhalovat tak kandidátní geny 1. typu, které by se

mohly podílet na vzniku pozorované fenotypové variability. Metodami funkční genomiky je pak možno studovat jejich expresi ve vztahu k této variabilitě.

Z metod mapování genů u domácích zvířat se využívá jak vazebné analýzy, například i v kombinaci s metodami molekulární biologie (typování jednotlivých spermií, *single sperm typing*), tak metod cytogenetického mapování. Z nich se nejčastěji využívá fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s využitím homologních i heterologních sond (ZOO-FISH), hybridů somatických buněk, zejména panelů radiačních hybridů (RH panely), dále mikrodisekce chromosomů a standardních postupů, jako například bakteriálních umělých chromosomů (BACs). Velmi účinným nástrojem při mapování genů domácích zvířat je využívání světových počítačových databází (GenBank, SwissProt) s jejich obslužným softwarem a využívání mezidruhových homologií (srovnávací genomika). Integrované mapy všech významných druhů domácích zvířat jsou k dispozici na Internetu a jejich nalezení pomocí běžných vyhledávačů je velmi rychlé.

Do dnešní doby byla identifikována řada chromosomálních oblastí jako tzv. QTLs, (*quantitative trait loci*, lokusy kvantitativních znaků), které ovlivňují významné užitkové vlastnosti hospodářských zvířat. U skotu jde zejména o chromosomální oblasti ovlivňující mléčnou produkci, u prasat masnou produkci a reprodukční kapacitu. U prasat bylo například zjištěno, že prakticky na každém chromozomu leží oblast, ovlivňující kvalitu masa. Pomocí genetického mapování byly dále identifikovány významné majorgeny, které ovlivňují užitkové vlastnosti. U skotu byl identifikován vliv lokusu kódujícího mléčnou bílkovinu kappa kasein na kvalitu produkovaných sýrů, u prasat byly mapovány konkrétní geny ovlivňující kvalitu masa, včetně genu pro vnímavost ke stresu původně označovaného jako Hal, geny ovlivňující velikost vrhu, jako například gen pro estrogenový receptor. Tyto geny jsou geneticky polymorfní a různé genotypy mají různé účinky na danou užitkovou vlastnost. V současné době jsou některé z těchto genů rutinně genotypizovány a výsledků je využíváno v tzv. selekci podporované markery – MAS (*marker-assisted selection*). Součástí genových map jsou také geny kódující významné kvalitativní znaky, zejména některé morfologické znaky – znaky exteriéru, které jsou tradičním předmětem šlechtění. Intenzivní pozornost je například věnována molekulární podstatě zbarvení zvířat, kde rychle narůstající počet identifikovaných genů přispívá mimo jiné nejen k pochopení metabolické podstaty fenotypové variability, ale například i ke studiu úlohy některých protoonkogenů.

Genové mapy zvířat obsahují také řadu genů, které ovlivňují různými způsoby zdravotní stav zvířat. Jde o geny, které jsou příčinou dědičných onemocnění, jako například syndrom deficiencie adhezní schopnosti leukocytů skotu (BLAD), jehož homolog je znám u psů (CLAD) a lidí (*human LAD*) nebo mutace způsobující vážnou kombinovanou imunodeficienci u arabských koní (SCID), jejíž homolog byl objeven již dříve u laboratorních myší. U zvířat byly mapovány i geny způsobující dědičné vrozené vývojové vady, jako například syndaktylie skotu. Podobně jako pro lidskou populaci, existuje také u domácích zvířat elektronická databáze významných mutací ovlivňujících zdravotní stav (OMIA – *Online Mendelian Inheritance in Animals*).

Významnou skupinou genů u zvířat jsou geny, které ovlivňují genetickou resistenci k nemocem. Vzhledem k heterogenitě mechanismů resistance jsou tyto geny vícerého typu. Patří sem jak geny podílející se na genetickém řízení imunitní odpovědi a její variability (geny hlavního histokompatibilitního komplexu, geny kódující povrchové znaky leukocytů, geny kódující cytokiny, geny kódující proteiny zúčastněné v mechanismech buněčné antimikrobiální obrany), tak geny hrající úlohu v neimunitních mechanismech genetické resistance, například geny kódující receptory významných patogenů. Příkladem je gen ECF88, jehož genetický polymorfismus je jedním z faktorů, které přispívají k variabilitě v resistenci prasat k infekci K88 pozitivními kmeny *Escherichia coli*. Vzhledem k tomu, že

genetická resistance je z hlediska formální genetiky často komplexním znakem, genomický přístup se zdá být velmi vhodným nástrojem k jeho molekulární disekci.

V naší práci se například věnujeme problematice genetické resistance k intracelulárním bakteriím v rámci studia mechanismů patogenese infekčních nemocí domácích zvířat. Cílem je identifikace genů účastnících se procesů fagocytosy u koně. Po dekompozici komplexního znaku na jednotlivé funkční okruhy byly identifikovány kandidátní geny a ty identifikovány a následně studovány u koně. Pracovní postup je demonstrován na příkladu genu *NRAMP1*, který byl u myši identifikován jako kandidátní gen lokusu *Bcg*, ovlivňující resistenci k intracelulárním patogenům. Tento byl v naší laboratoři identifikován, klonován, sekvencován, byla určena jeho genomová exon-intron organizace, byl fyzicky mapován, byly nalezeny intraintronové a promotorové polymorfismy a vypracovány metody jejich genotypizace. Předběžně byla potvrzena jeho exprese v leukocytech periferní krve (Matiašovic et al: *Characterization of the NRAMP1 (SLC11A1) gene in the horse (Equus caballus L.)* (European Journal of Immunogenetics 29, 2002: 423-429). Jako součást genomického přístupu byly studovány i další významné geny (například Hořin, P., Matiašovic, J.: *A second locus and new alleles in the major histocompatibility complex class II (ELA-DQB) region in the horse*. Animal Genetics 33, 2002: 196-200, Matiašovic, J., Lukeszová, L., Hořin, P.: *Two bi-allelic single nucleotide polymorphisms within the promoter region of the horse TNF-A gene*. European Journal of Immunogenetics 29, 2002: 285-286) a řada dalších genů je studována jako součást přípravy cDNA mikročipu, který by umožnil definovat jejich specifickou roli v procesu resistance.

Shrme-li možnosti praktických aplikací analýzy genomu u domácích zvířat zjistíme, že v současné době se využívají zejména v negativní i pozitivní selekci, ale i v produkci aktivních látek, například léčiv nebo vakcín, dále jsou aplikovány v biotechnikách reprodukce, jako je umělá inseminace, embryotransfer a různé typy klonování, zejména na buněčné úrovni.

Jak je patrné, jsou základní metodické přístupy k analýze genomů domácích zvířat shodné s přístupy používanými u člověka a laboratorních modelů, i když snaha o intenzivní praktické využití výsledků a v některých případech i různá definice etických omezení jsou příčinou určitých specifík v celkové filosofii využití genetiky a genomiky ve šlechtění domácích zvířat.

Současné trendy klasické a molekulární cytogenetiky

Kyra Michalová

e-mail: kyra@vfn.cz

Centrum nádorové cytogenetiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty

Univerzity Karlovy, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky,

U nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Úvod

Přesný počet lidských chromosomů známe teprve od roku 1956. Avšak množství poznatků, které byly získány v prvním desetiletí od stanovení lidského karyotypu, nové techniky barvení a studia chromosomů člověka, zavedené v letech sedmdesátých spolu s využitím metod molekulární biologie v letech osmdesátých, potvrdily pevné místo, které tento obor má, především v lékařské genetice.

V České republice jsou cytogenetické laboratoře součástí Oddělení lékařské genetiky, která jsou ve všech velkých městech a zabývají se genetickým poradenstvím. Dále vznikají cytogenetické laboratoře, které vyšetřují změny chromosomů u hematologických onemocnění. Cytogenetické vyšetření slouží především ke stanovení karyotypu nemocných s vrozenými vývojovými vadami, v prenatální diagnostice k určení chromosomového vybavení plodů, k zpřesnění diagnózy a určení prognózy některých nádorových onemocnění. V laboratořích hygienické služby se testují mutagenní účinky chemických látek na lidský organismus na chromosomové úrovni.

Klasická cytogenetika

Cytogenetické preparáty byly barveny až do r. 1969 konvenčními metodami barvení, tj. Giemsovým barvivem nebo orceinem. Od roku 1970 se ve všech laboratořích začaly používat techniky pruhování chromosomů, které jsou v současnosti zcela bezpodmínečnou součástí každého vyšetření karyotypu. Pruhy na savčích chromosomech umožnily identifikaci každého jednotlivého autosomu i heterochromosomů. Zdokonalil se tím i systém řazení v karyotypu. V roce 1971 byla uznána závazná Pařížská nomenklatura pro řazení lidských chromosomů, která pak byla doplněna mezinárodním systémem pro lidskou cytogenetickou nomenklaturu (ISCN - *International system for human cytogenetic nomenclature* 1985). Poslední vydání ISCN je z roku 1995 a uvádí i nomenklaturu chromosomových změn zjištěných metodami molekulární cytogenetiky tj. *in situ* hybridizací. Podobné nomenklatury jsou také zavedeny pro řazení chromosomů laboratorních či hospodářských zvířat.

Kromě pruhovacích barvicích metod přispělo k dalšímu rychlému rozvoji klinické cytogenetiky zavedení nových systémů kultivace a synchronizace buněčného dělení somatických i nádorových buněk *in vitro*. Výrazně se zlepšila kvalita chromosomových preparátů, našly se nové metody pruhování chromosomů a tím se i zvýšila citlivost cytogenetických metod. Důsledkem jsou nálezy dalších, dříve neidentifikovaných přestaveb, jako jsou translokace malých částí chromosomů, inverze, duplikace, delece a inserce, z nichž mnohé se ukázaly být zcela specifickým markerem určitého syndromu, pokud jsou vrozené. Získané změny chromosomů u nádorů můžeme rozdělit na specifické a náhodné; ty specifické, které jsou v mnoha případech identifikovatelné jen molekulárně cytogenetickými metodami, se staly důležitými diagnostickými ukazateli.

Pruhy, které se tvoří na chromosomech obsahují 5 - 10 megabází DNA. Tkáňově specifické geny mění načasování replikace DNA v závislosti na stavu transkripce. Různé typy buněk mohou mít různý replikační čas pro specifické geny. Tato skutečnost však není pozorovatelná podle změny ve sledu pruhů na chromosomech. Sled pruhů totiž odráží průměr replikačních časů několika megabází DNA a nemůže proto rozlišit replikaci individuálního genu od replikace DNA, která tento gen obklopuje. Toto je základní problém, který poznamenává rozlišovací možnosti současných klasických cytogenetických metod.

Molekulární cytogenetika

Základní metodou molekulární cytogenetiky je hybridizace *in situ*, která se používá v různých metodických obměnách podle použitých typů sond DNA. Metody hybridizace *in situ* jsou postaveny na schopnosti vazby jednořetězcové DNA s komplementárními úseky cílové DNA, která je fixovaná na mikroskopickém preparátu. Sondy DNA byly v dřívější době značeny radioaktivně, většinou kombinací tří nukleotidů označených tritiem nebo isotopy jodu nebo síry. V současnosti jsou většinou používány neradioaktivně značené sondy a průkaz navázání sondy se provádí nepřímou nebo přímou imunofluorescencí ve fluorescenčním mikroskopu. Molekulárními metodami studované fragmenty DNA jsou přibližně 200 - 300 kb velké. Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je úspěšně v klinické cytogenetice využívána při:

- Studiu karyotypu buněk v metafázi nebo interfázi a lokalizaci genů.
- Určování početních a přesná identifikace strukturních chromosomových odchylek a markerových chromosomů.
- Detekci minimální reziduální choroby nebo časného relapsu u leukémií a zhoubných nádorů.
- Detekci typu buněk, které jsou zahrnuty v neoplastickém procesu.
- Určení zda se jedná o maligní proces, klonální evoluci nebo benigní proliferaci.

Princip metody

Zahříváním dvoušroubovicové molekuly DNA na vyšší teplotu (70° C) zanikají vodíkové vazby a vlákna DNA se od sebe oddělují (denaturace). Pokud se jednotlivá vlákna setkají se svými komplementárními partnery, mohou za příznivých podmínek (teplota, vlhkost, molarita) vytvořit zpětně dvojitou šroubovici DNA. Je-li komplementární vlákno DNA (sonda DNA) označeno radioaktivní látkou nebo neradioaktivně jiným způsobem (biotin, digoxigenin, přímé značení nukleotidů fluorochromy), můžeme vzniklou molekulu DNA prokázat autoradiograficky nebo ve fluorescenčním mikroskopu, který je vybaven odpovídajícími filtry. Schéma FISH je na obr. č. 1.

Další možnost identifikace signálu přináší počítačová analýza obrazu mikroskopu vybaveného velmi výkonnou CCD (*charge coupled device*) kamerou, napojenou na počítač se speciálním programem pro FISH. Citlivost metody se zvyšuje o několik řádů. Obraz získaný na monitoru je kvalitnější než ten, který vidíme v mikroskopu, protože CCD kamera je pro zachycení signálu citlivější než lidské oko a počítačový program dovoluje úpravu obrazu ve smyslu zesílení signálu a potlačení nespecifického pozadí. Počítačová analýza obrazu umožňuje kvantitativní zpracování získaných dat, měření vzdáleností jednotlivých signálů a vytváření jednoho obrazu z více záznamů.

Sondy

Sondy používané k určení vrozených a získaných chromosomových odchylek můžeme rozdělit do tří hlavních skupin a jsou schematicky znázorněny na obr. č. 2.

1. Sondy, které hybridizují se **specifickými chromosomovými strukturami**, což jsou obvykle centromerické oblasti obsahující alfa a beta satelitní sekvence DNA. Satelitní DNA přítomná v centromerické oblasti je pro většinu chromosomů specifická, je vysoce repetitivní a tandemové uspořádání zasahuje oblast až 4000 kb velkou. Kromě centromerických sond existují také sondy na telomerické oblasti lidských chromosomů.

2. Sondy, které hybridizují s **jedinečnými sekvencemi DNA**. Jsou to obvykle genomické klony, které se liší velikostí v závislosti na klonovacím vektoru, kterým může být plasmid (500bp - 5kb), kosmid (20-50kb), bakteriofág lambda (8 - 15kb) nebo umělé kvasinkové chromosomy (YAC klony 50 - 1000 kb), umělé bakteriální chromosomy (BAC), P1 klony a další.

3. Sondy, které hybridizují s **mnohočetnými chromosomovými sekvencemi**. Tyto sondy jsou obvykle připraveny ze specifických knihoven DNA, lze jimi označit celý chromosom (tzv. *chromosome painting* - malování chromosomů), nebo jsou získány mikrodisekcí určité části chromosomu, cíleně odebranou pod mikroskopem pomocí mikromanipulátoru z fixovaných preparátů a získaná DNA je pak dále amplifikovaná metodou DOP-PCR.

Srovnávací genomová hybridizace (CGH)

Molekulární cytogenetická metoda, která je schopná degekovat a mapovat relativní počet kopií jednotlivých sekvencí mezi různými genomy se nazývá srovnávací genomová hybridizace (CGH - z angl. *comparative genomic hybridization*) a byla popsána KALLIONIEMIM a kol. v roce 1992. Normální a studovaná DNA jsou odlišně označeny některými z haptenu a jsou simultánně kohybridizovány na normální metafazické chromosomy. Oblasti zmnožení nebo ztráty DNA sekvencí jako jsou delece, duplikace nebo amplifikace jsou zvýrazněny rozdílnou barvou homologů. To je způsobeno změnou poměru intenzity signálu obou fluorochromů měřené podél cílových, normálních chromosomů. Poměr intenzit signálů je zpracován nejméně u 10 mitos pomocí počítačového programu, který určí místa v nichž pak nalezneme příslušnou změnu ve smyslu delece nebo amplifikace. Schematické znázornění CGH je na obr. č. 3. CGH detekuje změny, které jsou přítomny ve více než 50% nádorových buněk (t.j. klonální aberace). Má vysokou vypovídací hodnotu pro delece, komplexní změny karyotypu a pro identifikaci markerových chromosomů. CGH nelze využít u jednoduchých translokací, inverzí a inzercí, při kterých se nemění poměr počtu kopií sekvencí DNA. Na stejném principu jako CGH je založena metoda mikročipů.

Matrix CGH

Konvenční CGH analýza využívá jako cíl pro hybridizaci připravený preparát s chromosomy buněk v metafasi. Snaha o zvýšení citlivosti cytogenetických metod vedla k vývoji nové koncepce metody tzv. matrix CGH, u které jsou chromosomy nahrazeny imobilizovanými DNA fragmenty umístěnými na pevném, nejčastěji skleněném podkladu (Lichter a spol. 2000). Předpokládáme, že matrix CGH bude stále více pronikat do diagnostiky zhoubných nádorů.

Multibarevné karyotypování lidských chromosomů (mFISH a mBAND)

Od r. 1996 je možné rozlišit každý jednotlivý pár autosomů a pohlavní chromosomy barevně a to tak, že každý chromosom má svou přidělenou barvu. Jde o další variantu FISH metody, při které jsou pěti fluorochromy kombinatoriálním způsobem označeny jednotlivé páry autosomů, výsledný obraz je analyzován pomocí počítače a podle barev a intenzity fluorescence dále zpracován přiřazením pseudobarev. Na podobném principu je postavena i metoda mnohobarevného pruhování s vysokou rozlišovací schopností mBAND. Metody mnohobarevné analýzy jednotlivých chromosomů slibují využití především v nádorové cytogenetice, stejně jako i v klinické cytogenetice při studiu komplexních změn karyotypu. Schéma kombinatoriálního značení jednotlivými fluorochromy je na obr. č. 4.

Budoucnost nádorové cytogenetiky

V Národním ústavu pro výzkum rakoviny v USA (*National Cancer Institute* - NCI) byl započat projekt, který se nazývá *Cancer Chromosome Aberration Project* (CCAP), který má za úkol připravit fyzikální a genetické mapy lidského genomu založené na cytogenetických datech zjištěných při sledování chromosomových přestaveb v buňkách zhoubných nádorů člověka. Cíle bude dosaženo mapováním genů, které byly lokalizovány v lidském genomu na základě lokalizace pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s klony bakteriálních umělých chromosomů (BAC) umístěných ve vzdálenostech 1 - 2 Mb po celé délce lidského genomu. Mapa bude volně přístupná a bude dobře srovnatelná s dalšími genomovými databazemi jako např. s odchylkami uváděnými v Katalogu chromosomových aberací prof. Mitelmana, který je volně přístupný na Internetu na adrese <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman/recurrent/aberrations>. Výsledky tohoto projektu umožní mapování zlomových míst na chromosomech, které přímo souvisí se vznikem maligního procesu u hematologických nebo solidních nádorů. Předpokládá se, že lokalizace přibližně 3000 CCAP BAC sond umožní přípravu DNA čipů pro tzv. matrix srovnávací genomovou hybridizaci, kterými bude možné lokalizovat geny, důležité v kancerogenezi. Dalším produktem by pak mohly být sondy DNA, které by byly důležitým pomocníkem diagnostiky v interfazické cytogenetice při určování chromosomových aberací na cytologických a histologických preparátech. Bližší údaje může zájemce získat na Internetové adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP>.

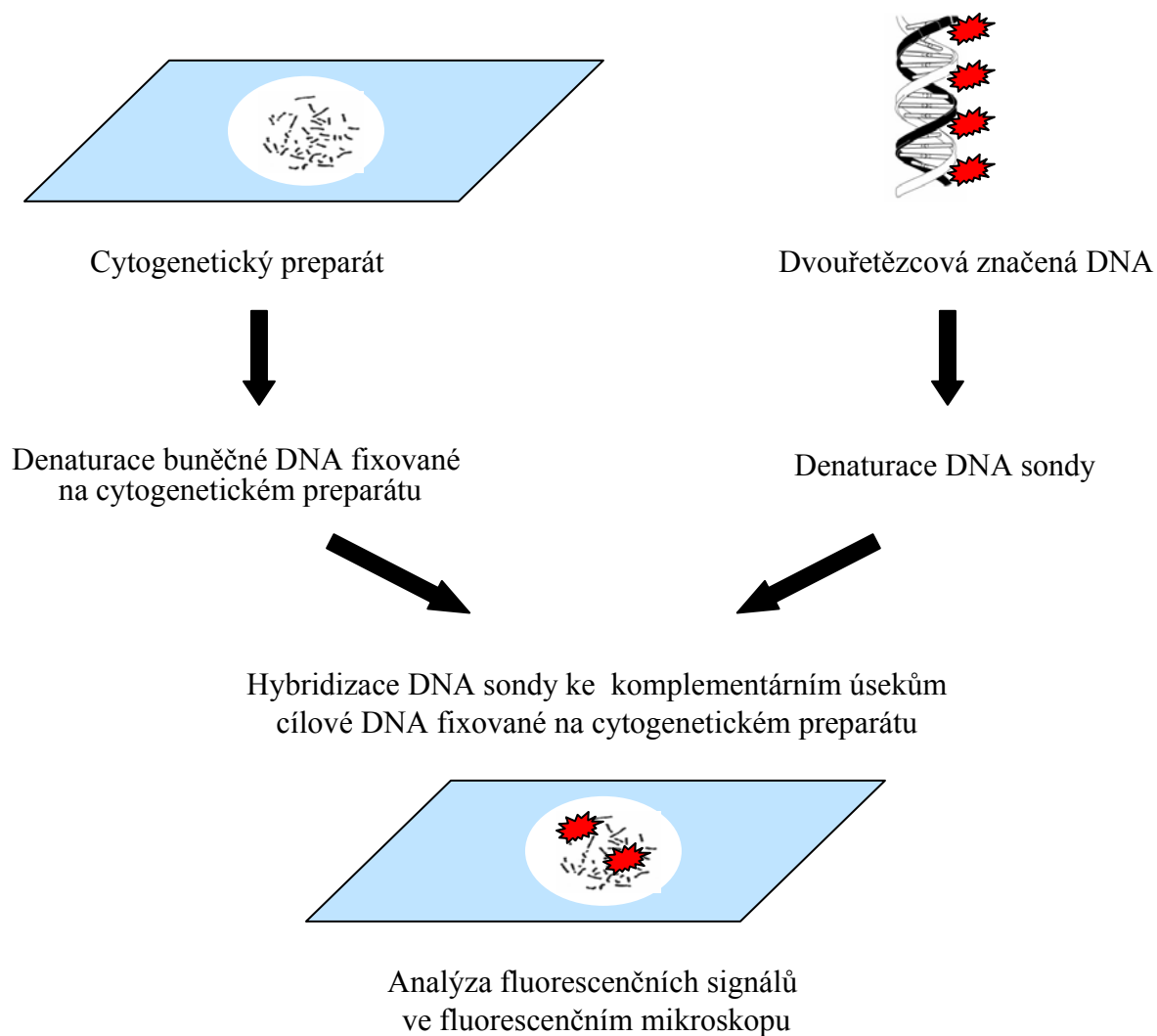
Od r. 1970, kdy se začaly chromosomy barvit pruhovacími technikami, bylo u nádorů popsáno více než 1800 zlomových míst na chromosomech. Jde o chromosomové změny, které se opakují a nejsou náhodné. Dá se proto předpokládat, že jsou zahrnuty v procesu iniciace nádorového bujení i v rozvoji onemocnění. Počet zjištěných chromosomových odchylek u malignit narůstá takovou měrou, že není možné si je dále pamatovat, zvláště s ohledem na jejich klinické a biologické charakteristiky. Proto vznikl Atlas genetiky a cytogenetiky v onkologii a hematologii (<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer>) jako další volně přístupná databáze na internetu, která přináší cytogenetické a klinické nálezy u maligních onemocnění, a je připravená pro volné použití cytogenetiky, molekulární genetiky a lékaři ve všech lékařských odvětvích, která jsou zainteresována v onkologii. Od doby kdy byly zavedeny metody FISH, u solidních nádorů především metoda, kterou nazýváme srovnávací genomová hybridizace (CGH), bylo zjištěno mnoho nových poznatků o delecích a amplifikacích genů nebo celých částí chromosomů. Malovacími celochromosomovými sondami pak byly identifikovány dosud neznámé translokace. Všechny cytogenetické skriningové metody jsou limitovány citlivostí, která je udávána okolo 2 - 10 Mb. I při tak nízké sensitivitě byla cytogenetika vytypována řada míst zlomů na chromosomech, které pak byly dále molekulárně-biologickými metodami klonovány. Dále byly připraveny sondy DNA,

kteře jsou jednak dŕležitŕ při diagnostice zhoubnŕch nŕdorŕ, ale jsou vyuŕivŕny i ve vŕzkumu při integraci cytogenetickŕch map do fyzikŕlnŕch map lidskŕho genomu.

Prvnŕ dva chromosomy jejichŕ BAC klony byly mapovŕny jsou autosomy ŕ. 7 a 22. Byly pŕipraveny bakteriŕlnŕ umŕlŕ chromosomy o dŕlce pŕibliŕnŕ 1 - 2 Mb, kteře pak po klonovŕnŕ byly metodami dvojbarevnŕ FISH s vysokou rozliŕovacŕ schopnostŕ mapovŕny na chromosomech bunŕk v prometafasi a metafasi.

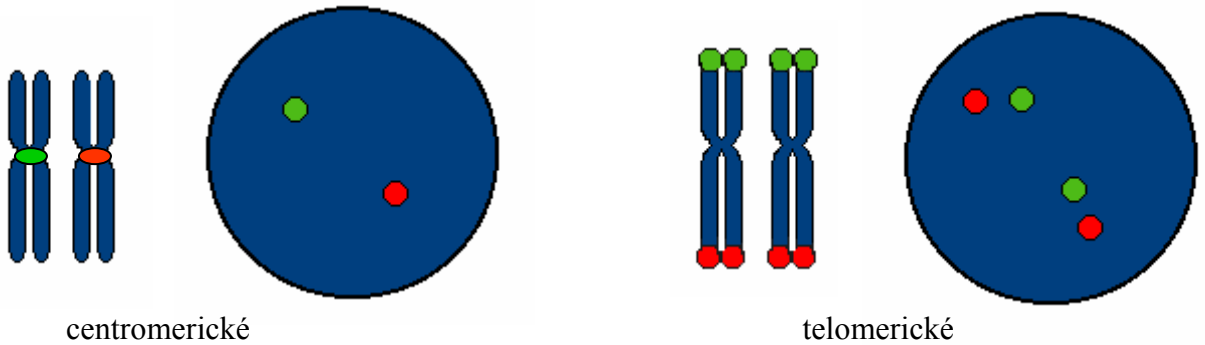
V budoucnosti budeme kombinovat informace, kteře poskytnou nejrŕznŕjŕŕ databŕze chromosomovŕch zmŕn u vrozenŕch syndromŕ, hematologickŕch malignit a u solidnŕch nŕdorŕ ve formŕ translokacŕ, inzercŕ, inverzŕ a delecŕ a s nimi souvisejŕcŕch zlomovŕch mŕst na chromosomech, pŕŕpadnŕ zmŕn v poŕtu genovŕch kopiŕ. Pŕispŕjeme tak k pŕesnŕjŕŕ diagnostice onemocnŕnŕ a rozŕŕŕme poznatky o vzniku řady chorob.

Obr. 1. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

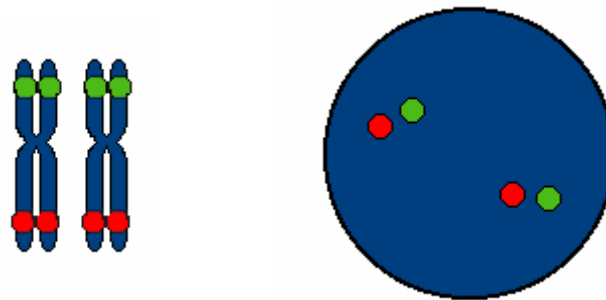


Obr. 2. Typy sond

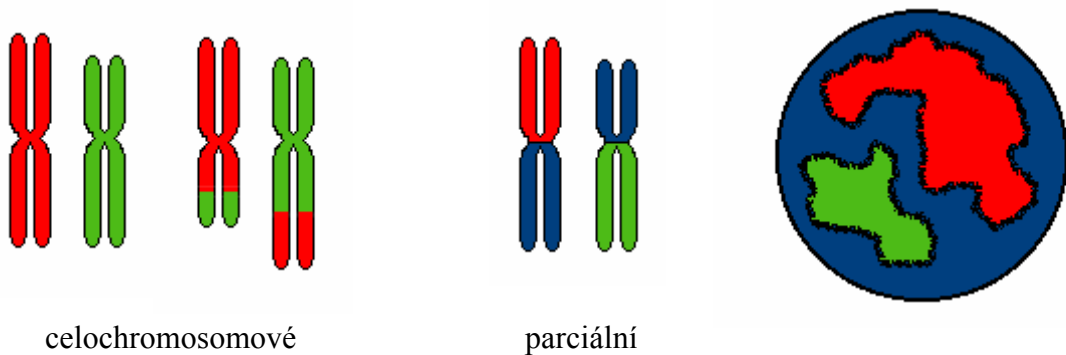
(a) Sondy pro specifické chromosomové struktury



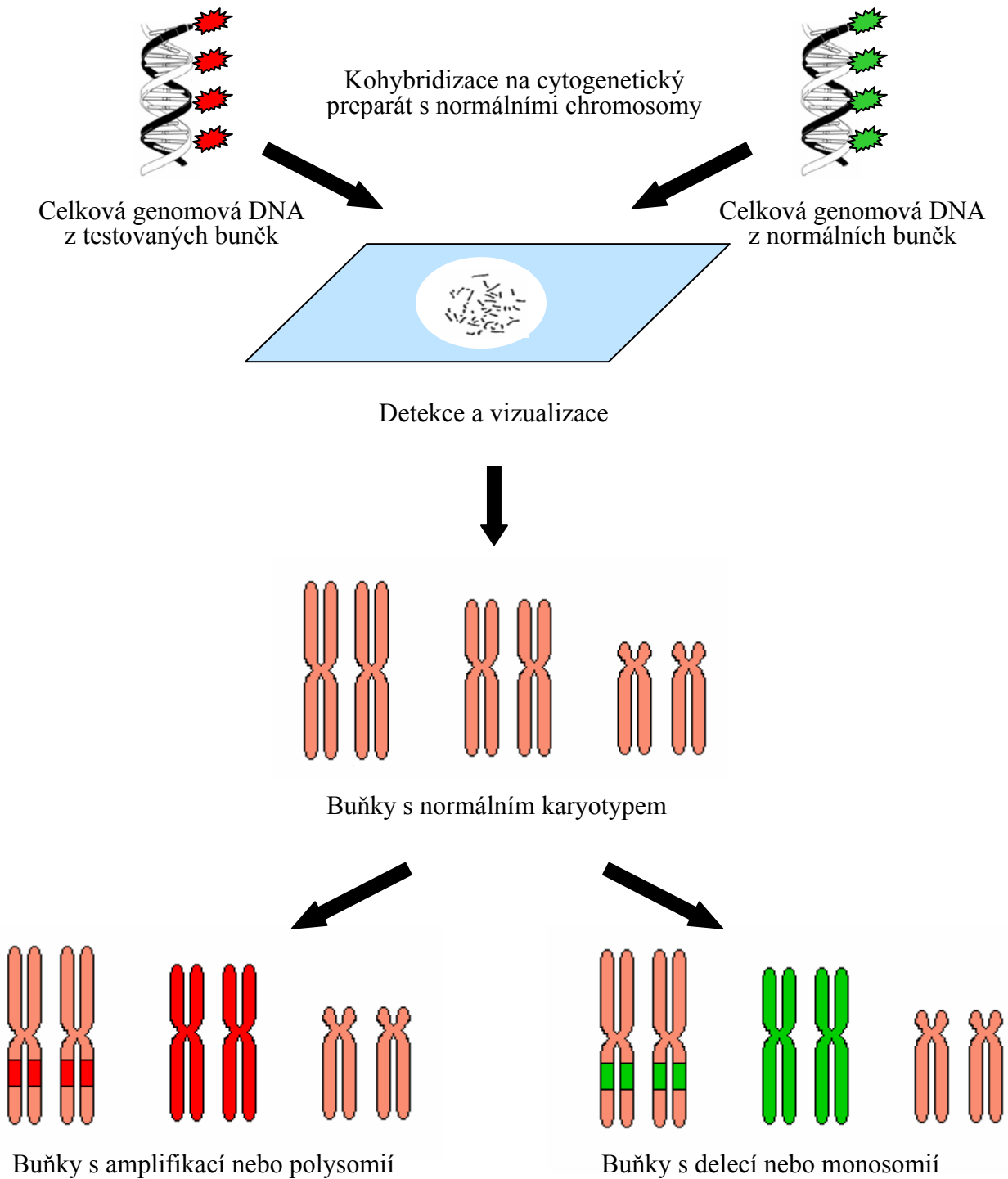
(b) Sondy pro jedinečné DNA sekvence (lokus-specifické):



(c) Sondy pro mnohočetné chromosomové sekvence (malovací):



Obr. 3. Srovnávací genomová hybridizace (CGH)



Obr. 4. Kombinatoriální značení DNA sond pro mFISH:

smícháním n fluorochromů získáme 2^{n-1} různých barevných kombinací

#	FITC	SpeOra	TexRed	Cy5	DEAC
1				žlutá	
2					modrá
3			fialová		
4	zelená				
5		červená			
6	zelená			žlutá	
7				žlutá	modrá
8			fialová	žlutá	
9		červená		žlutá	
10	zelená				modrá
11	zelená		fialová		
12	zelená	červená			
13			fialová		modrá
14		červená			modrá
15		červená	fialová		
16	zelená			žlutá	modrá
17	zelená		fialová	žlutá	
18	zelená	červená		žlutá	
19			fialová	žlutá	modrá
20		červená		žlutá	modrá
21		červená	fialová	žlutá	
22	zelená		fialová		modrá
X	zelená	červená			modrá
Y		červená	fialová		modrá

zelená červená fialová žlutá modrá

Prokaryotický genom

Jiří Doškař

Katedra genetiky a molekulární biologie, PřF MU v Brně

Úvod

Analýza kompletní genomové sekvence více než 100 bakteriálních a archeálních druhů vedla k revizi ustálené představy o jednoduché organizaci genetické informace prokaryot. Genom prokaryot se vyznačuje vysokou plasticitou, která se promítá ve značných rozdílech jak do jeho velikosti, tak i do informačního obsahu u blízce příbuzných druhů i jednotlivých kmenů. Jeho značná část bývá tvořena variabilními genetickými elementy, které jsou zpravidla postradatelné a mnohdy se udržují jen pod selekčním tlakem prostředí. Charakteristickým rysem těchto elementů je jejich horizontální přenos, k němuž dochází s vysokou frekvencí a může probíhat i mezi zástupci taxonomicky vzdálených skupin. Důsledkem tohoto přenosu jsou pak výrazné a dynamické změny ve struktuře prokaryotických genomů, které zodpovídají za jejich mozaikový charakter.

Velikost a struktura prokaryotického genomu

Velikost genomu se u prokaryot pohybuje v poměrně velkém rozmezí hodnot od 580 kbp (*Mycoplasma genitalium*) až po zhruba 10 Mbp u myxobakterií. Paradox hodnoty C u nich však neplatí a velikost genomu je proporcionální jejich metabolické a morfologické komplexitě. Všechny organismy s velikostí genomu menší než 1,5 Mbp jsou buď obligátní intracelulární parazité anebo vykazují vysoké nároky na kultivaci (tzv. specialisté: mykoplasmata, borelie, riketsie). U druhů, které využívají více zdrojů uhlíku a energie a mají obvykle málo růstových požadavků (tzv. generalisté), činí průměrná velikost genomu zhruba 5 Mbp. Ze současných údajů vyplývá, že u volně žijících prokaryot je spodním limitem velikost genomu okolo 1,6 Mbp.

Velikost genomu značně kolísá jak uvnitř rodu (např. u treponem téměř třikrát, u mykoplasmat více než dvakrát), tak i druhu (např. u přírodních izolátů *E. coli* se pohybuje zhruba od 4600 do 5300 kbp). Tyto variace jsou často způsobeny různým počtem plasmidů a dalších variabilních složek genomu (viz dále).

Topologie genomu je známa více než u 50 prokaryotických druhů. I když většina bakterií a archeí obsahuje kružnicové replikony, byly již u řady rodů prokázány jak lineární chromosomy tak i plasmidy (např. u *Streptomyces*, *Borrelia*, *Thiobacillus*, *Klebsiella*, *Coxiella burneti*, *Agrobacterium tumefaciens*). U *Str. lividans* může docházet k reverzibilní linearizaci kružnicového chromosomu bez negativního dopadu na reprodukci buněk, z čehož plyne, že forma replikonu není pro jeho zachování rozhodující a replikační aparát je schopen se jí přizpůsobit. Struktura telomer se však u jednotlivých druhů liší. U borelií a *A. tumefaciens* jsou telomery chromosomu i lineárních plasmidů tvořeny kovalentně uzavřenými vlásenkami, zatímco u streptomycet jsou konce telomer otevřené s kovalentně navázanými proteiny, které se zřejmě podílejí na jejich replikaci. Existují náznaky, že linearizace chromosomů může být důsledkem začlenění lineárních plasmidů nebo bakteriofágů.

Z hlediska současných poznatků o struktuře prokaryotických genomů a funkci jeho složek se jeví jako značně zjednodušený tradiční pohled definující bakteriální chromosom jako replikon vyžadovaný pro základní životní funkce a plasmidy jako postradatelné extrachromosomální elementy. Svědčí o tom např. struktura genomu a jeho uspořádání u *Borrelia burgdorferi*, jejíž lineární chromosom má velikost 910 kbp a nese 853 genů, dále obsahuje alespoň 17 lineárních nebo kružnicových plasmidů, které dohromady představují

533 kbp a minimálně 430 genů. Většina plasmidů je postradatelných pro růst *in vitro*, ale jsou vyžadovány pro velmi specializovaný růst v členovcích a obratlovcích, tj. jsou nezbytné pro parazitický způsob života a tvoří tudíž esenciální složku genomu. Je proto zřejmé, že u některých prokaryot je genom složen z několika nezávislých molekul DNA a rozdělení genetické informace do více replikonů spíše odráží dynamickou povahu bakteriálních genomů. Bylo prokázáno, že homologní rekombinace může vytvořit jeden replikon ze dvou nebo z jednoho dva, jak je tomu např. u *Bacillus cereus*; jeho genom o velikosti zhruba 5 Mbp je u některých kmenů soustředěn do jednoho chromosomu, u jiných je rozložen do chromosomu o velikosti 2,4 Mbp a zbývajících 2,6 Mbp připadá na několik menších plasmidů (replikonů). Z uvedených fakt vyplývá, že alespoň v některých případech by bylo vhodnější takové plasmidy označovat spíše jako minichromosomy.

Genetická organizace a informační obsah prokaryotického genomu

Genetická informace je v genomech prokaryot uložena velmi úsporně s malými prostory mezi jednotlivými geny. Charakteristickým rysem prokaryot je uspořádání jejich genů do operonů, kde jsou odděleny obvykle jen několika nukleotidy. U *E. coli* je asi 600 operonů, z nichž každý má 2 nebo více genů. Ve většině případů kódují geny operonu sadu proteinů týkajících se téže biochemické aktivity, což umožňuje její velmi účinnou regulaci (např. při metabolismu cukrů nebo biosyntéze aminokyselin). U některých druhů archeí (*Methanococcus jannaschii*) i bakterií (*Aquiflex sp.*) však existují operony s geny bez zřejmých biochemických vztahů (např. u *Aquiflex* je znám operon se 6 geny, z nichž dva kódují proteiny pro rekombinaci, další pak proteiny pro motilitu a enzymy pro syntézu nukleotidů a lipidů). Důvody pro takové uspořádání nejsou zatím jasné.

Po stanovení sekvence genomů prvních mikrobů nebylo překvapující, že se nepodařilo ke zhruba polovině identifikovaných ORF přiřadit žádnou ze známých funkcí (Tab. 1). Tento počet se však podstatně nesnížil ani po stanovení sekvence dalších desítek genomů. Navíc je zhruba jedna čtvrtina potenciálních genů u každého druhu jedinečná a nemá signifikantní homologii k žádné známé proteinové sekvenci.

Funkce již známých ORF u jednotlivých prokaryotických druhů byly odvozeny z odpovídajících proteinových sekvencí. Na základě srovnání dosud známých genomových sekvencí lze dojít k závěru, že počet operačních genů (např. genů pro transkripci a translaci) je v každém genomu zhruba stejný, i když se jejich velikosti podstatně liší. Počet proteinů v jiných funkčních kategoriích (kódovaných tzv. operačními geny), jako je biosyntéza aminokyselin, tvorba energie, transport a regulační funkce, je naproti tomu mnohem variabilnější a zvětšuje se se vzrůstající velikostí genomu. Jednou z příčin zvětšování genomů je zvyšování počtu paralogních genů, které jsou zejména výsledkem genových duplikací. Proporce paralogů u genomů s velikostí 1 Mbp činí 12-15%, zatímco u genomů s velikostí větší než 3 Mbp je to již 50%. V řadě případů kódují paralogní geny funkčně příbuzné enzymy, které katalyzují v zásadě tytéž reakce, avšak jejich mírné odlišnosti zajišťují větší šíři odpovědi organismu v různých prostředích a výrazně tak zvětšují jeho schopnost adaptace. V tomto ohledu bude zajímavé zjistit, zda bakterie s menšími genomy mají skutečně pro každou metabolickou dráhu jen jedinečnou sadu enzymů.

Výsledky sekvencování vyvrátily dřívější předpoklad, že kompaktní genomy prokaryot budou obsahovat jen málo repetitivní DNA. Prakticky u všech prokaryotických druhů jsou repetice pravidelnou součástí genomu. Z kódujících sekvencí jsou to rDNA, inzerční elementy a další transposony, které se obvykle vyskytují v menším počtu kopií. Fascinující je rozmanitost a celkový počet mnohokopiových elementů, mezi něž patří desítky různých typů kratších i dlouhých repeticí. Stručně lze uvést jen jejich základní přehled a některé příklady.

Tandemově opakované krátké sekvence typu polytrinukleotidů (GTG nebo GCC) jsou vysoce repetitivní v genomech *E. coli*, *S. typhimurium* a *Shigella sp.* Heptanukleotidová krátká opakování (STRR) byla zjištěna u sinice *Calothrix*. Polymorfní přímá tandemová opakování (MPTR) o délce 10 bp u *Mycobacterium tuberculosis* a dalších mykobakterií vykazují podobnost s místy *Chi* u *E. coli*. Patří sem i nonamer AAGTGCGGT („uptake signal sequence“) nezbytný pro rozpoznání exogenní transformující DNA u *H. influenzae* (vyskytuje v počtu 1465 kopií). Prototypem **krátkých roztroušených repetitivních sekvencí** jsou REP-elementy (repetitivní extragenové palindromové sekvence) s délkou 38 bp, vyskytující se v počtu 500 kopií u *E. coli*. Sekvence jim podobné se vyskytují u mnoha dalších bakteriálních druhů. **Dlouhé roztroušené repetitivní elementy** (větší než 50 bp) se vyskytují v menším počtu kopií v nekódujících oblastech genomu. Příkladem jsou intergenové opakující se jednotky (**IRU**) nebo sekvence **ERIC** (*enterococcal repetitive intergenic consensus*) s délkou 126 bp nebo kratšími analogy, které se vyskytují v celé bakteriální říši. Rozdílů v jejich počtu a lokalizaci se s výhodou využívá jako jedné z genotypizačních metod k identifikaci druhů a diferenciaci kmenů. **Mozaikové repetitivní elementy (BIME)** jsou tvořeny kombinacemi různých repetitivních elementů. U *E. coli* jich je asi 500 a jsou složeny z REP-elementů a sedmi dalších repetitivních motivů.

Repetitivní sekvence jsou substrátem pro homologní a místně specifické rekombinace, jejichž důsledkem jsou rozsáhlé genomové přestavby (viz dále). Mohou však navozovat též změny exprese genů, jak je tomu např. u *S. pneumoniae*, kde přítomnost BOX-elementu zodpovídá za fázové variace projevující se změnou morfologie kolonií. **Tandemová opakování jednoduchých sekvencí** (mono-, di- a trinukleotidů) se vyskytují uvnitř nebo poblíž genů virulence a změna jejich počtu často mění expresi těchto genů a projevuje se např. variacemi antigenů.

Variabilní složka prokaryotického genomu

Vedle základní sady genů jsou pravidelnou složkou genomu téměř všech skupin prokaryot variabilní genetické elementy, mezi něž se řadí plasmidy, transposony, integrony, retrony, profágy a genomické ostrovy. Charakteristickým rysem všech těchto elementů je jejich mobilita (v rámci genomu i mimo buňku) a výskyt omezený jen na určité kmeny daného druhu, u nichž však mohou mít zásadní význam pro přežití (faktory virulence, rezistence k antibiotikům atd). Pokud dojde k inaktivaci genů pro mobilitu, stává se element imobilní a geny, které nejsou pro hostitele přínosné, postupně mutují nebo jsou deletovány. Geny pro hostitele prospěšné se mohou udržet a dále evolučně vyvíjet (např. geny pro virulenci u defektních profágů) a stávají se tak během evoluce stabilní součástí genomu.

Chromosomové přestavby

Genom prokaryot se podrobuje rychlým změnám. Příčinou velmi četných vnitřních přestaveb replikonů je přítomnost různých typů repeticí, které jsou substrátem pro rekombinace navozující inverze, delece nebo duplikace. Jelikož vzdálenost repeticí může být značná, postihují tyto mutační změny mnohdy rozsáhlé úseky genomu. Duplikace a jejich reverze byly prokázány u mnoha druhů. U *E. coli* byly zjištěny duplikace o délce až 320 kbp (7% délky chromosomu), u salmonel dokonce až 22% (např. duplikace laktosového operonu po selekci na rychlejší růst na laktose). Frekvence vzniku duplikací je vysoká: u salmonel byla u vybraných populací prokázána přítomnost duplikací některé z oblastí chromosomu až u 10% buněk, což svědčí o jejich zásadním významu pro evoluci genomů. Patří tak zřejmě k nejvýznamnějším mechanismům, kterými prokaryota mohou zvýšit dávku genů anebo vytvořit redundantní DNA pro následnou genetickou divergenci, znásobovat nebo

pozměňovat jednotlivé funkce a adaptovat se tak na nové podmínky, aniž by se však musely současně podrobit ireversibilní ztrátě genů.

Horizontální přenos genů

Složení prokaryotických genomů (zejména jeho variabilní složka) se může velmi rychle a dramaticky měnit horizontálním přenosem genů zprostředkovaným procesy transdukce, transformace a konjugace včetně konjugativní transposice (a patrně i dalšími mechanismy, které nejsou dosud přesně známy). Horizontální přenos genů výrazně přispívá k vytváření mozaikové struktury prokaryotických genomů a zodpovídá za jejich klíčové evoluční změny a speciaci. Proporce horizontálně přenesených genů odhadovaná z analýzy kompletní sekvence genomů může dosahovat až 20%, z nichž převažující část tvoří geny operační (Tab. 1). Od zbyvající části genomu se liší obsahem GC, odlišným využíváním kodonů a přítomností sekvencí, které mají vztah k mobilitě DNA. V bezprostřední blízkosti horizontálně přenesené DNA se často vyskytují inzerční sekvence, které se pravděpodobně podílejí na její integraci do genomu. U *E. coli* se horizontálně přenesené geny velmi často nacházejí též v blízkosti genů pro tRNA, které jsou preferenčními místy pro začleňování mírných bakteriofágů.

Některé genetické elementy přenesené z jiných organismů tvoří v genomu dobře odlišitelné oblasti, označované jako genomické ostrovy (podle funkce označované za ekologické, saprofytické, symbiosové a na ostrovy patogenity, kam lze přiřadit i integrony, které mají podobné rysy; definice genomických ostrovů není zatím vzhledem k jejich značné variabilitě ustálena). Jejich potenciální mobilita je podmíněná inzerčními sekvencemi, transposony, integrasovými geny nebo přípojovacími místy (*att*) pro mírné fágy. Byly zjištěny v genomech mnoha druhů prokaryot, přičemž charakteristickým rysem je jejich omezení pouze na některé z přírodních izolátů. Typické jsou zejména ostrovy patogenity představující oblasti na chromosomu patogenních bakterií s velikostí až 200 kb a obsahující shluky genů kódujících faktory virulence (toxiny, proteiny pro adsorpci a invazivitu, aj.) a geny pro rezistenci k antibiotikům. Jiné genomické ostrovy nesou např. geny pro nové metabolické aktivity nebo pro obranu proti imunitnímu systému hostitele, čímž umožňují frakci kmenů daného bakteriálního druhu osídlit další, často velmi specializovaná prostředí.

Odhad minimálního počtu genů prokaryotického genomu

Stanovení kompletní sekvence genomů *H. influenzae* a *M. genitalium* iniciovalo pokusy o odhad minimální genové sady schopné zajistit autonomní život prokaryotické buňky. Pro stanovení tohoto odhadu byly uvedené organismy vybrány velmi příhodně, neboť patří ke vzdáleným větvím bakterií a je proto pravděpodobné, že geny konzervované u obou druhů budou představovat právě ty, které jsou nezbytné pro život jakékoliv buňky. Další výhodou může být zjednodušení jejich genomu během adaptace na parazitický život, která vedla ke ztrátě řady metabolických a regulačních drah. Oba druhy si ale zachovávají schopnost růstu *in vitro*, byť v bohatých mediích.

Nejdříve bylo v databázích srovnáno 469 genů *M. genitalium* s 1703 geny *H. influenzae*, což umožnilo vymezit 240 ortologních genů (tj. genů odvozených vertikálně ze společného předka). Proteiny kódované těmito geny byly zařazeny do funkčních kategorií a ze znalosti metabolických drah vyhodnocených ze známých nutričních požadavků obou druhů bylo asi 10% genů *M. genitalium* funkčně přeraženo. Sada ortologů byla pak doplněna o chybějící enzymy pro esenciální metabolické dráhy vhodnými kandidáty ze zatím málo prostudovaných ortologů a těmi, které vznikly neortologní náhradou. To vedlo k definici minimálního genomu sestávajícího asi z 250 genů. Tato minimální sada genů kóduje celý

translační aparát a redukované, ale funkční systémy pro replikaci DNA, reparaci a transkripci. Aplikací principu parsimonie bylo pak vybráno 128 genů, které by mohly představovat sadu základních genů předchůdců současných organismů.

Při druhém, experimentálním přístupu, byly v genomech *M. genitalium* a *M. pneumoniae* vytvářeny transposonové mutace a za postradatelné geny byly pak považovány ty, v nichž byly v životaschopných buňkách lokalizovány transposony. Tento přístup vedl k odhadu 285 genů nezbytných pro přežití. Ukazuje se však nepravděpodobné, že některá buňka v populaci ponese více než 100 funkčně nulových mutací, neboť počet postradatelných genů se liší při postupné eliminaci jednotlivých genů a při současné inaktivaci genů zajišťujících redundantní nebo částečně redundantní funkce, kdy může být tolerována inaktivace jednoho genu, ne však obou. Navíc se ukazuje, že eliminace „postradatelných“ genů vede ke snížení fitness buněk, kterou však lze kompenzovat změnami ve složení růstového media. Nezbytnost kvantifikovat snížení fitness ve vztahu k prostředí ukazuje na obtížnost definice pojmu „minimální genom“.

Zarážející je skutečnost, že u třetiny esenciálních genů (tj. těch, které se nepodařilo inaktivovat) není známa jejich funkce. Tento fakt silně zasahuje do vžité představy o našich znalostech o fundamentálních funkcích života; je však též možné, že řada genů s neznámou funkcí u *M. genitalium* představuje nerozpoznatelné ortology, které zajišťují dobře známé funkce u *E. coli*.

Výsledky obou analýz spolu s poznatky o informačním obsahu ostatních analyzovaných genomů vedou k závěru, že v prokaryotických genomech lze nalézt dva typy genů:

1. Geny zodpovědné za základní životní funkce, tj. zajišťující procesy replikace, transkripce a translace, produkci energie, transport živin a udržení buněčné homeostase. Tyto geny jsou esenciální v každém prostředí a je nepravděpodobné, že budou zjištěny organismy, u kterých z této sady bude větší počet genů chybět.
2. Geny, které rozšiřují metabolické dráhy nebo biosyntetický potenciál a slouží tak k dosažení selektivních výhod nebo umožňují adaptovat se na nová prostředí. Počet těchto genů je u jednotlivých druhů (resp. kmenů) značně variabilní, odráží jejich způsob života i prostředí, ve kterém žijí.

Další směry ve studiu prokaryotických genomů a perspektivy jejich využití

Očekává se, že hlavní pozornost bude tak jako dosud zaměřena především na analýzu genomů patogenních bakterií, které představují stálou hrozbu pro zdraví i životy lidí a zvířat. Cílem bude vyhledání nových terčů (genů nebo jejich produktů) pro přípravu účinných léčiv. V tomto směru se již nyní využívají genomické a proteomické přístupy, které umožňují vedle rychlé identifikace dosud neznámých genů objasňovat i jejich funkce a způsob regulace exprese. S tím úzce souvisí snahy o přípravu vakcinačních kmenů, kde se počítá s intenzivnějším využitím genomického inženýrství (např. při přípravě DNA-vakcín). Slibně se rozvíjí též využití bakterií při léčbě nádorových onemocnění, např. aplikací bakteriálních toxinů k destrukci nádorů nebo jejich použití jako vektorů pro genovou terapii.

Další perspektivní oblastí je příprava nových produkčních kmenů pro biotechnologické postupy při výrobě potravin, surovin pro chemický průmysl anebo farmak připravovaných heterologní expresí eukaryotických genů v bakteriích. Naděje se vkládají též do extrémofilních bakterií a archeí, jejichž metabolický potenciál a dosud málo prostudované biochemické dráhy mohou umožnit získávání nových produktů nebo zpracování netradičních substrátů.

Nové poznatky o struktuře genomů přispějí též k dalšímu zpřesnění diagnostiky mikroorganismů. V této oblasti lze počítat zejména s rozvojem technologie DNA-čipů pro

vyhledání genů a sekvencí specifických pro jednotlivé druhy (druhov \acute{a} identifikace) stejně jako pro detekci vnitrodruhových rozdílů podmíněných variabilními genetickými elementy při typizaci kmenů.

Tab. 1. Základní parametry genomu a odhadovaný počet horizontálně přenesených genů u vybraných druhů bakterií a archeí

Druh	Velikost genomu (Mbp)	Počet ORF	Horizontálně přenesené ORF	
			počet	%
Proteobacteria				
<i>Escherichia coli</i>	4,64	4289	381	9,6
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,83	96	96	6,2
<i>Helicobacter pylori</i>	1,67	1553	89	6,4
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1,11	834	28	3,6
Gram-pozitivní bakterie				
<i>Bacillus subtilis</i>	4,21	4100	537	14,5
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58	480	67	14,5
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,82	677	39	5,9
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4,41	3918	187	5,0
Spirochaetae				
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0,91	850	12	1,56
<i>Treponema pallidum</i>	1,14	1031	77	8,3
Chlamydiae				
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,04	894	36	4,3
<i>Deinococcus radiodurans</i>	2,65	2580	95	3,92
<i>Synechocystis sp.</i>	3,57	3169	219	7,5
<i>Thermotoga maritima</i>	1,86	1846	198	11,63
Archaea				
<i>Aeropyrum pernix</i>	1,67	2694	370	14,0
<i>Methanobacterium therm.</i>	1,75	1869	179	10,3
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1,66	1715	77	5,0
<i>Pyrococcus abyssi</i>	1,76	1765	124	7,35

Představujeme genetická pracoviště

**Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave
Mlynská dolina , 842 15 Bratislava**

Katedra genetiky

Katedra genetiky Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave bola založená v roku 1968. Neskôr bola vytvorená katedra genetiky a molekulárnej biológie spojením pôvodnej katedry genetiky s katedrou molekulárnej biológie. V roku 1993 sa katedra rozdelila na samostatné katedry genetiky a molekulárnej biológie. V čase vzniku katedry genetiky a potom katedry genetiky a molekulárnej biológie bol jej vedúcim prof. Ján Dubovský, neskôr bol vedúcim katedry prof. Daniel Vlček a v súčasnosti je vedúcim katedry prof. Ján Grolmus. Vedúcim katedry molekulárnej biológie bol v jej začiatkoch (do zlučenia s katedrou genetiky) prof. Vladimír Sekerka. Po osamostatnení katedry v r. 1993 bol jej vedúcim doc. Vladimír Ferák a v súčasnosti je vedúcim doc. Ján Turňa. Katedry genetiky a molekulárnej biológie zabezpečujú výuku genetiky a molekulárnej biológie na odbornom štúdiu biológie, na učiteľskom štúdiu (kombinácie s biológiou) a na odbore biotechnológia. Výskum so zameraním na genetiku sa popri katedrách genetiky a molekulárnej biológie ešte robí na fakulte v spoločnom laboratóriu katedier genetiky a biochémie, ďalej na Ústave bunkovej biológie PRIF UK a časť výskumnej problematiky je venovaná genetike aj na Katedre mikrobiológie PRIF UK v Bratislave.

Výskum na katedre genetiky je zameraný na tieto problémové okruhy:

Genetika mikroorganizmov

(prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc., doc. RNDr. Viera Vlčková, CSc., RNDr. Miroslava Slaninová, PhD., RNDr. Andrea Ševčovičová, PhD., prof. RNDr. Eva Miadoková, DrSc.)

V rámci genetiky mikroorganizmov je výskum zameraný na reparačné systémy opravujúce poškodenia molekuly deoxyribonukleovej kyseliny. Ako modelové objekty sa používajú fotoautotrofné a heterotrofné mikroorganizmy (*Chlamydomonas reinhardtii* a *Saccharomyces cerevisiae*). Hlavným cieľom výskumu u fotoautotrofných mikroorganizmov je skompletizovať poznatky o základných reparačných dráhach (excízných, rekombinačnej a mutagénnej) cestou genetickej a molekulárnobiologickej analýzy mutantných (reparačne-deficitných) kmeňov izolovaných v našom laboratóriu, ako aj tých, ktoré boli izolované na zahraničných pracoviskách a v súčasnosti sú sústredené v našom laboratóriu. Využívajúc genetické a molekulárnobiologické metodické postupy bol doteraz u väčšiny mutantných kmeňov špecifikovaný typ poruchy opravy DNA a mutantné kmene boli zaradené do príslušných opravných dráh; preštudovali sa interakcie medzi opravou DNA na svetle (fotolyza) a opravnými procesmi, ktoré môžu prebiehať v tme, pričom sa zistil iný typ interakcií v porovnaní s heterotrofnými baktériami a kvasinkami; boli zmapované a lokalizované prvé reparačné gény v génovej mape fotoautotrofných mikroorganizmov. V súčasnosti je pozornosť zameraná na štúdium regulačného prepojenia medzi opravou DNA a priebehom bunkového cyklu. U heterotrofných mikroorganizmov spolupracujeme pri riešení výskumných úloh s oddelením molekulárnej genetiky Ústavu experimentálnej onkológie SAV, s Ing. Jelou Brozmanovou, DrSc.. Hlavná pozornosť sa venuje funkčnej analógii reparačných génov prokaryotov (*E. coli*) a nižších eukaryotov (*S. cerevisiae*) za účelom

detailnejšieho pochopenia reparačných procesov u *S. cerevisiae* a následnej extrapolácie výsledkov aj na vyššie eukaryoty. Pozornosť je tiež venovaná objasneniu opravy oxidačných poškodení rôznymi opravnými dráhami. Na základe analýzy komplementácie porúch opravy u *S. cerevisiae* s reparačnými génmi *E. coli* (*ada*, *recA*, *nth*) na autonómne sa replikujúcich kyvadlových vektoroch alebo integratívnych vektoroch sme prispeli k objasneniu funkcie reparačných génov *S. cerevisiae* podieľajúcich sa na rekombinačnej oprave poškodenej DNA (*RAD51*, *RAD52*) ako aj na oprave oxidačných poškodení DNA (*PSO3*). Podobným postupom sme zistili komplementáciu poruchy opravy alkylačných poškodení v mutantných kmeňoch kvasiniek v nukleotidovej excíznej oprave a transléznej mutagénnej oprave a tak upresnili rozsah poškodení opravovaných týmito reparačnými dráhami. V súčasnosti je pozornosť venovaná prepojeniu rôznych reparačných dráh pri oprave oxidačných poškodení DNA u *S. cerevisiae*.

Výskum bol, resp. je podporovaný zahraničnými a domácimi grantami: medzinárodný grant v programe Copernicus, bilaterálne granty s pracoviskami v Nemecku a v Českej republike a domáce grantové agentúry.

Spolupráca:

Department of Biochemistry, School of Medicine, University of South Dakota, Vermillion, USA (prof. G.D. Small)

Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, Anglicko (Dr. G.P. Margison)

Federal University Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazília (prof. J.A.P. Henriques)

Lehrstuhl für Genetik, Regensburg, Nemcko (Dr. Wolfgang Mages)

Laboratoř buněčných cyklů, Mikrobiologický ústav AVČR, Třeboň, Česká republika (Dr. Vilém Zachleder)

Vybrané publikácie:

Podstavková, S., D. Vlček, E. Miadoková: New DNA repair-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mutation Research, 293, 1992, 65-60.

Vlčková, V., L. Černáková, E. Farkašová, J. Brozmanová: The *Escherichia coli recA* gene increases UV-induced mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics, 25, 1994, 472-474.

Vlček, D., S. Podstavková, E. Miadoková: Interaction between photolyase and dark repair processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Mutation Research, 336, 1995, 251-256.

Podstavková, S., D. Vlček, E. Miadoková, A. Slivková: The localization of *Chlamydomonas reinhardtii* repair genes. Arch. Hydrobiol., Algol. Stud., 82, 1996, 97-102.

Vlček, D., A. Slivková, S. Podstavková, E. Miadoková: A *Chlamydomonas reinhardtii* UV-sensitive mutant *uvs15* is impaired in a gene involved in several repair pathways. Mutation Research., 385, 1997, 243-249.

Morais Jr., M.A., V. Vlčková, I. Fridrichová, M. Slaninová, J. Brozmanová, J. Henriques: Effect of bacterial *recA* expression on DNA repair in the *rad51* and *rad52* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Gen. Mol. Biol., 21, 1998, 3-9.

Vlček, D., K. Závacká, M. Dušinská: Detection of DNA oxidation and alkylation in *Chlamydomonas reinhardtii* by the comet assay. Different sensitivity of wild type and DNA repair mutants. Neoplasma, 46, 1999, 90-92.

Farkašová, E., M. Chovanec, D. Vlasáková, V. Vlčková, G.P. Margison, J. Brozmanová: Effect of stable integration of the *Escherichia coli ada* gene on the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to the toxic and mutagenic effects of alkylating agents. Environ. Mol. Mutagen., 35, 2000, 66-69.

- Brozmanová J., V. Vlčková, E. Farkašová, A. Dudáš, D. Vlasáková, M. Chovanec, Ž. Mikulovská, I. Fridrichová, J. Saffi, J.A.P. Henriques: Increased DNA double strand breakage is responsible for sensitivity of the *psb3-1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide. *Mutation Research*, 485, 2001, 345-355.
- Slaninová, M., A. Ševčovičová, B. Nagyová, E. Miadoková, V. Vlčková, D. Vlček: *Chlamydomonas reinhardtii* *UVS11* gene is required for cell cycle arrest in response to DNA damage. *Arch. Hydrobiol., Algol. Stud.*, 107, 2002, 97-107.

Genetika rastlín

(RNDr. Miroslav Švec, CSc., RNDr. Marta Miklovičová, CSc., RNDr. Elena Hlinková, CSc. doc. RNDr. Viola Dúhová, CSc., RNDr. Svetozár Plesník)

Hlavný akcent je v rámci genetiky rastlín kladený na štúdium genetickej podmienenosti hostiteľsko-parazitických vzťahov v patosystémoch *Triticum (Hordeum)* – *Blumeria graminis* f.spp. a to na úrovni populačnej (fungicídna senzitivita a analýza virulencie regionálnych populácií múčnatky trávovej) i molekulárno-biochemickej (štúdium proteínov spojených s patogenézou – PR-proteíny 3.typu, chitinázy, glukánázy). Sledujeme mechanizmy rezistencie rastlín (tvorba halo efektov, papíl, hypersenzitívne reakcie) a sme schopní identifikovať gény špecifickej rezistencie aj stanoviť stupeň nešpecifickej rezistencie genotypov hostiteľa. Okrajovo sa venujeme aj indukcii mutácií u hospodársky dôležitých plodín a štúdiu expresie génov pre syntézu auxínu a cytokinínov v rastlinách tabaku transformovaných pomocou *Agrobacterium tumefaciens*.

Vybrané publikácie:

- Švec M., Szunics L., Miklovičová M., Slovákova T., Tisová V., Hauptvogel P.: Identification of genes for resistance to powdery mildew in Hungarian, Polish and Slovak Wheat Cultivars. *Plant Prot.Sci.* **38**: 2002, 64-72.
- Szunics L., Szunics Lu., Vida G., Bedo Z., Švec M.: Dynamics of changes in the races and virulence of wheat powdery mildew in Hungary between 1971 and 1999. *Euphytica* **119**: 2001, 143-147
- Švec M., Gregová E., Miklovičová M., Kraic J.: Changes in expression of HMW glutenins of wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by nitrosoethylurea. *Plant Breed.* **118**: 1999, 272-74.
- Švec M., Miklovičová M.: Structure of populations of wheat powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC f.sp.*tritici* Marchal) in Central Europe in 1993-1996:I.Dynamics of virulence. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 1998, 537-544.
- Švec M., Miklovičová M., Čaputa F.: Chemically induced dwarf mutant line in triticale. *Cereal Res.Comm.* **26**(4): 1998, 391-396.
- Hlinková E., Obert B., Filipp D.: Phenotypes of tobacco plants expressing genes for the synthesis of growth regulators. *Biol.Plant.* **41**(1): 1998, 25-37.
- Sýkora, M., Krippel, E., Plesník, S., Limpert, E.: Barley mildew in Slovakia: Evolution of pathogen virulence from 1989 - 1994. Integrated control of cereal mildews and rusts: Towards coordination of research across Europe. (COST 817), Zurich 1996, 21-27.
- Hovmoller M. S., Caffier V., Jalli M., Andersen O., Besenhofer G., Czembor J. H., Dreiseitl, Felsenstein F., Fleck A., Heinricks F., Jonsson R., Limpert E., Mercer P., Plesnik S., Rashal., Skinnes H., Slater S., Vronska O.: The European barley powdery mildew virulence survey and disease nursery 1993 – 1999. *Agronomie* 20, 2000, p. 729 – 743.

Genetická toxikológia

(prof. RNDr. Eva Miadoková, DrSc., doc. RNDr. Viera Vlčková, CSc., doc. RNDr. Viola Dúhová, CSc., doc. RNDr. Mária Trebatická, CSc., prof. Ing. Ján Grolmus, CSc., prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc.)

Práca v oblasti genetickej toxikológie je zameraná na detekciu genotoxických účinkov rôznych exogénnych a endogénnych environmentálnych agensov (chemické mutagény/karcinogény, promutagény/prokarcinogény) aplikovaných na rôzne genetické modelové systémy s akcentom na objasnenie molekulárneho mechanizmu ich účinku. Náležitá pozornosť sa venuje štúdiu bioprotektívnych, predovšetkým antimutagénnych účinkov látok prírodného charakteru na rôznych genetických objektoch a na rôznych stupňoch organizácie genetického materiálu (molekulárna, subcelulárna až populačná). Využitie rôznych prokaryotických a eukaryotických modelových objektov umožňuje jednak uskutočniť komparatívnu mutagenézu, jednak antimutagenézu na mikroorganizmoch, rastlinách a živočíchoch a zamerať sa na determináciu celej škály genetických zmien (endpoints). Jedným z cieľov práce je aj optimalizácia a štandardizácia medzinárodne akceptovateľných metód a modelových systémov na stanovenie genotoxicity priamych mutagénov/karcinogénov a promutagénov/prokarcinogénov, ako aj na detekciu antimutagénov/antikarcinogénov. Experimentálnu prácu realizujeme v rámci výskumných grantových projektov.

Vybrané publikácie:

- Miadoková, E., V. Vlčková, S. Podstavková, M. Slaninová, Vlček, D.: Unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an activation system for 2-aminofluorene. *Environ. Mol. Mut.*, 31, 1998, 383-389.
- Miadoková, E., V. Dúhová, M. Režná, A. Králiková, V. Šucha, D. Vlček: Genotoxicological research on the waste drainage water. *J. Trace Microp. Tech.*, 16, 1998, 453-463.
- Vlček, D., E. Miadoková, V. Vlčková, M. Slaninová: Metabolic activation of meta-phenylenediamine by the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutation Res.*, 391, 1997, 143-151.
- Vlčková, V., M. Slaninová, E. Miadoková, S. Podstavková, M. Závodná, D. Vlček: Comparison of the phenylenediamine isomers bioactivation by green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 18, 1999, 191-201.
- Miadoková E., V. Vlčková, N. Jendraššáková, D. Vlček, V. Šucha: Mutagenic and comutagenic effects of acid-mine water containing heavy metals. *J. Trace Microp. Tech.*, 18, 2000, 201-207.
- Vlčková, V., S. Podstavková, M. Slaninová, E. Miadoková, D. Vlček: The green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: bioactivator of nitrosoamines. *Archiv Hydrobiol. Suppl. V.136, Algol. Stud.*, 100, 2000, 181-193.
- Miadoková E., Vlčková V., Dúhová V.: Antimutagenic effect of α -lipoic acid on three model test systems. *Pharmazie*, 55, 2000, 862-863.
- Čipák, L., Miadoková, E., Dingová, H., Kogan, G., Novotný, L., Rauko, P.: Comparative DNA protectivity and antimutagenicity studies using DNA-topology and Ames assays. *Toxicol. In Vitro*, 15, 2001, 667-681.

- Miadoková, E., H. Dingová, G. Kogan, D. Liszeková, P. Rauko: Different genotoxicological responses of mine waters containing heavy metals. J. Trace Microp. Tech., 20, 2002, 429-437.
- Miadoková, E., I. Mašterová, V. Vlčková, V. Dúhová, J. Tóth: Antimutagenic potential of homoisoflavonoids from *Muscari racemosum*. J. Ethnopharmacology, 18, 2002, 381-386.
- Miadoková, E., I. Mašterová, V. Vlčková, V. Dúhová, J. Tóth: Antimutagenic potential of homoisoflavonoids from *Muscari racemosum*. J. Ethnopharmacology, 18, 2002, 381-386.

Genetika Drosophila melanogaster

(prof. Ing. Ján Grolmus, CSc., doc. RNDr. Mária Trebatická, CSc., RNDr. Lúcia Medveďová)

Výskum je zameraný na dva okruhy problémov:

1. Analýzu mutagénnych a karcinogénnych účinkov chemických látok v životnom prostredí z hľadiska výskumu procesu genetických zmien a prínosu v prevencii a pri odhade zdravotných a všeobecne biologických rizík.
2. V spolupráci s RNDr. Robertom Farkašom, CSc. z Ústavu experimentálnej endokrinológie SAV sa skúma genetická regulácia procesov diferenciácie v ontogenéze drozofily. Pozornosť je venovaná detekcii spoločných molekulárnych mechanizmov vo funkcii nukleárných receptorov medzi drozofilou a cicavcami; identifikácii mechanizmov regulácie na úrovni transkripcie v jednotlivých tkanivách organizmu pomocou molekulárnej a genetickej analýzy špecifických úsekov hormonálne responzívnych génov u drozofily a ich ortológov u cicavcov, so zreteľom na koordináciu a špecifitu hormonálnej odozvy.

Vybrané publikácie:

- Miadoková, E., Vlčková, V., Dúhová, V., Trebatická, M., Grolmus, J., Bohmová, B., Podstavková, S., Rauko, P., Plesníková, I., Vlček, D.: The comparative genotoxicological study of new local anesthetics 3-(2-alkoxyphenylcarmboxyloxy) chinuclidium chlorides, on *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Vicia faba*, *Hordeum vulgare* and *Drosophila melanogaster*. Cell Biol. Toxicol., 12, 1996, 135-145.
- Trebatická, M., Grolmus, J.: Toxic and mutagenic effect of pesticide fire products on *Drosophila melanogaster*. Proc. of Int. Conf. FIRECO, 1996, 137-140.
- Grolmus, J., Trebatická, M., Talapková, D., Gressnerová, S., Krippel, E.: The effect of pesticide fire products on *Mus musculus*. Proc. of Int. Conf. FIRECO, 1996, 135-145.
- Miadoková, E., Vlčková, V., Dúhová, V., Trebatická, M., Grolmus, J., Fislova, T., Dankova, A., Keckesová, Z., Baborová, J.: Potential genotoxicity assessment of a new environment-friendly repellent preparation. Biologia, 56, 2001, 699-703.
- Farkaš, R., Šuťáková, G., Daniš, P., Medveďová, L.: Antifungal effects of borate in *Drosophila* cultures. Dros. Inf. Serv., 81, 1998, 205-206.
- Farkaš, R., Daniš, P., Medveďová, L., Mechler, B.M., Knopp, J.: Regulation of cytosolic Malate dehydrogenase by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. Cell Biochem. Biophys., 37, 2002, 37-52.
- Kuchárová-Mahmood, S., I. Raska, B.M. Mechler, R. Farkaš: Temporal regulation of *Drosophila* salivary gland degeneration by the broad - complex transcription factors. J. Struct. Biol., 140, 2002, 67-78.
- Kuchárová, S., R. Farkaš: Hormone nuclear receptors and their ligands: role in programmed cell death. Endocr. Regul., 36, 2002, 37-60.

Doktorandi katedry: RNDr. Regina Weisenpacherová, RNDr. Denisa Lyszeková, RNDr. Barbara Nagyová, Mgr. Judita Sádovská, RNDr. Robert Petrovič, Mgr. Alena Žákovičová.
PDS: RNDr. Silvia Kuchárová-Mahmood, RNDr. Peter Daniš.

***Biocentrum: Spoločné laboratórium katedier genetiky a biochémie Prírodovedeckej fakulty
Univerzity Komenského v Bratislave***

(doc. RNDr. Ľubo Tomáška, CSc., doc. RNDr. Jozef Nosek, CSc.)

Laboratórium, zriadené spoločným úsilím katedier biologickej a chemickej sekcie PriF UK v roku 1993, sa zameriava na riešenie dvoch problémov:

1. Ako sú replikované a stabilizované teloméry mitochondriálnych a jadrových genómov kvasiniek?
2. Aké sú molekulárne mechanizmy komunikácie jadra a mitochondrií eukaryotickej bunky vo vzťahu k jej morfogénze?

1. Problém replikácie a stabilizácie koncov lineárnych DNA je jednou z najvzrušujúcejších oblastí súčasnej molekulárnej biológie, predovšetkým v dôsledku vzťahu replikácie telomér k mitotickej nestabilite spojenej s nádorovou transformáciou na jednej strane a bunkovým starnutím (senescenciou) na strane druhej. Hoci je replikácia telomér jadrových chromozómov často realizovaná špeciálnym enzýmom, telomerázou, tento ribonukleoproteín nie je jediným nástrojom udržiavania koncov chromozómov. Práve alternatívne, od telomerázy-nezávislé, mechanizmy replikácie telomér sú predmetom záujmu laboratória. Projekty spojené s touto problematikou vychádzajú z univerzálnosti problému replikácie telomér pre všetky lineárne DNA genofóry, vrátane lineárnych mitochondriálnych genómov kvasiniek, na ktorých objavení sa laboratórium podieľalo. U rôznych druhov kvasiniek boli identifikované odlišné typy mitochondriálnych telomér, ktoré naznačujú pomerne široký repertoár riešenia problémov spojených so stabilizáciou koncov lineárnych molekúl DNA. Bola zahájená charakterizácia mitochondriálneho „telozómu“, ktorá viedla k identifikácii jeho prvého proteínového komponentu. Pred nedávnom boli v mitochondriách niektorých druhov kvasiniek s lineárnou mitochondriálnou DNA identifikované cirkulárne molekuly DNA pozostávajúce exkluzívne z telomerických sekvencií. Fakt, že o niekoľko mesiacov neskôr boli podobné extrachromozomálne telomerické DNA identifikované v jadrách rôznych druhov organizmov dokazuje všeobecný význam štúdia lineárnych mitochondriálnych genofórov. Výsledky z posledného obdobia zároveň naznačujú isté trendy v evolúcii mitochondrií a ich genómov, pričom tieto implikácie sú v súčasnosti experimentálne testované. Zároveň bola pred nedávnom iniciovaná elektrón-mikroskopická analýza chromatinovej štruktúry jadrových telomér kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* s cieľom identifikovať analógie a odlišnosti kvasinkových a cicavčích jadrových telomér. Predpokladá sa, že zo získaných výsledkov bude opäť možné vyvodit' univerzálne platné závery s významom pre evolučnú biológiu i klinickú medicínu.

2. Jednou z najzaujímavejších biologických tém už od čias D'Arcy W. Thompsona je vzťah medzi formou a funkciou. Molekulárne mechanizmy zodpovedné za definovanú morfológiu organizmov a ich buniek nie sú zatiaľ detailne preskúmané. Regulácia bunkovej diferenciácie nie je pritom len fenoménom spojeným s ontogénzou vyšších organizmov, ale prejavuje sa aj na úrovni mikroorganizmov, ktoré zmenou tvaru buniek reagujú na zmeny vonkajšieho

prostredia. Rôzne druhy kvasiniek sú schopné za definovaných podmienok rásť v kvasinkovej a hýfálnej forme. Prechod medzi oboma formami (dimorfická tranzícia) je okrem iného v úzkom vzťahu s virulenciou kvasinkových patogénov a štúdium má preto aj potenciálny klinický význam. Morfológické prepínanie je pomerne komplikovaný a energeticky náročný proces, vyžadujúci precíznu koordináciu všetkých bunkových organel. Ústrednú úlohu pritom plní predovšetkým komunikácia bunkového jadra a mitochondrií. Na štúdium kvasinkovej morfogénézy sú v laboratóriu využívané viaceré druhy kvasiniek. U kvasinky *Yarrowia lipolytica*, bolo izolovaných niekoľko mutantov neschopných dimorfickej tranzície a bola zahájená analýza príslušných génov a proteínových produktov. Laboratórium sa podieľalo na odhalení prítomnosti komplexu I respiračného reťazca v mitochondriách *Y. lipolytica* a následne na zavedení tejto kvasinky ako modelu pre štúdium úlohy komplexu I v bunkovej morfogénéze, ako aj pre analýzu princípov biogénézy mitochondriálnej NADH dehydrogenázy s potenciálnym významom odhalenie molekulárnej podstaty niektorých ľudských mitochondriálnych ochorení. Paralelne so štúdiom dimorfizmu a bioenergetiky *Y. lipolytica* sú podobným smerom využívané ďalšie kvasinkové modely, vrátane *S. cerevisiae*, „gigantickej“ kvasinky *Dipodascus magnusii* a patogénnej kvasinky *Candida parapsilosis*. Každý z týchto modelov umožňuje študovať špecifické aspekty nukleo-mitochondriálnej komunikácie a preto sa očakávajú navzájom sa komplementujúce výsledky, umožňujúce získanie komplexného pohľadu na eukaryotickú bunku.

Emeritný profesor: Ladislav Kováč

Doktorandi: Mgr. Martin Kucej, Mgr. Blanka Kucejová, Mgr. Adriana Ryčovská, Mgr. Júlia Zemanová, Mgr. Judita Sadovská

Výskum v laboratóriu je podporovaný zahraničnými grantmi *Howard Hughes Medical Institute* (USA) a *Fogarty International Research Collaboration Award* (USA) a slovenskými grantovými agentúrami VEGA a APVT.

Spolupráca:

Dr. Monique Bolotin-Fukuhara, Institut de Génétique et Microbiologie, Université de Paris XI, Orsay, Francúzsko.

Dr. Hiroshi Fukuhara, Institut Curie, Centre Universitaire Paris XI, Orsay, Francúzsko.

Dr. Jack D. Griffith, Lineberger Cancer Center, University of North Carolina, Chapel Hill, USA.

Dr. Jiří Fajkus, Biofyzikální ústav AVČR a Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika.

Dr. H. Yde Steensma, Institute for Molecular Plant Sciences, Leiden University, Holandsko.

Dr. Ullrich Brandt, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt am Main, Nemecko.

Dr. Choukri Ben Mamoun, Center for Microbial Pathogenesis, University of Connecticut Health Center, Farmington, USA.

Dr. Françoise Foury, Unité de Biochimie Physiologique, Louvain-la-Neuve, Belgicko.

Dr. Claude Gaillardin, INRA, Paris-Grignon, Francúzsko.

Dr. Gennadi I. Naumov, State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Ruská federácia.

Vybrané publikácie:

- Adamíková, E., Griač, P., Tomáška, E., and Nosek, J. (1998). Development of a transformation system for the multinuclear yeast *Dipodascus (Endomyces) magnusii*. *Yeast* **14**, 805-812.
- Foury, F., and Kucej, M. (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 106-111.
- Kucej, M., Kosa, P., Adamíková, E., and Nosek, J. (2002). Isolation of genes coding for Ade2 and Ura3 homologues from the multicellular yeast *Dipodascus magnusii*. *Current Genetics* **41**, 20-24.
- Nosek, J., Adamíková, E., Zemanová, J., Tomáška, E., Zufferey, R., and Ben Mamoun, C. (2002). Genetic manipulation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetics* **42**, 27-35.
- Nosek, J., and Fukuhara, H. (1994) NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts. *Journal of Bacteriology* **176**, 5622-5630.
- Nosek, J., and Tomáška, E. (2002) Mitochondrial telomeres: Alternative solutions to the end-replication problem. In: Krupp, G. and Parwaresch, R. (eds.) *Telomeres and Telomerases: Cancer and Biology*. Landes Bioscience and Kluwer Academic Press [ISBN 0-306-47437-9].
- Nosek, J., Dinouël, N., Kováč, L., and Fukuhara, H. (1995) Linear mitochondrial DNAs from yeasts: Telomeres with large tandem repetitions. *Molecular and General Genetics* **247**, 61-72.
- Nosek, J., Tomáška, E., Fukuhara, H., Suyama, Y., and Kováč, L. (1998). Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends in Genetics* **14**, 183-188.
- Nosek, J., Tomáška, E., Pagáčová, B., and Fukuhara, H. (1999). Mitochondrial telomere-binding protein of a yeast *Candida parapsilosis* suggests an evolutionary adaptation of a nonspecific single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 8850-8857.
- Nosek, J., Tomáška, E., Ryčovská, A., and Fukuhara, H. (2002). Mitochondrial telomeres as molecular marker for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1283-1289.
- Ryčovská, A., Szabo, R., Tomáška, E., and Nosek, J. (2000). The respiratory complex I in yeast: Isolation of a gene *NUO51* coding for the nucleotide-binding subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase from obligately aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Folia Microbiologica* **45**, 429-433.
- Szabo, R. (1999). Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: Filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiologica* **44**, 19-24.
- Szabo, R. (2001). Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Molecular Genetics and Genomics* **265**, 172-179.
- Szabo, R., and Štofániková, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiological Letters* **206**, 45-50.
- Tomáška, E. (2000). Mitochondrial protein phosphorylation: Lessons from yeasts. *Gene* **255**, 59-64.
- Tomáška, E., Makhov, A., Nosek, J., Kucejová, B., and Griffith, J.D. (2001). Electron-microscopic analysis supports a dual role for the mitochondrial telomere-binding protein of *Candida parapsilosis*. *Journal of Molecular Biology* **305**, 61-69.
- Tomáška, E., Makhov, A.M., Griffith, J.D., and Nosek, J. (2002). t-loops in yeast mitochondria. *Mitochondrion* **1**, 455-459.
- Tomáška, E., Nosek, J., and Fukuhara, H. (1997). Identification of a putative mitochondrial telomere-binding protein of the yeast *Candida parapsilosis*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 3049-3056.

- Tomáška, L., Nosek, J., and Kucejová, B. (2001). Mitochondrial single-stranded DNA binding proteins: In search for new functions. *Biological Chemistry* **382**, 179-186.
- Tomáška, L., Nosek, J., Makhov, A., Pastoráková, A., and Griffith, J.D. (2000). Extragenomic double-stranded DNA circles in yeast with linear mitochondrial genomes: Novel players in the mitochondrial telomere maintenance? *Nucleic Acids Research* **28**, 4479-4487.

Katedra molekulárnej biológie

Laboratórium molekulárnej genetiky človeka

(doc.RNDr. Vladimír Ferák, CSc., RNDr. Ludovít Kádasi, CSc.)

Toto laboratórium je spoločným pracoviskom Prírodovedeckej fakulty UK a Ústavu molekulárnej fyziológie a genetiky SAV. Jeho hlavnou pracovnou náplňou je štúdium genetických ochorení na úrovni DNA a štúdium polymorfizmu ľudskej DNA. V tejto súvislosti pracovisko preštudovalo spektrum mutácií na génoch, zodpovedných za najzávažnejšie a najčastejšie monogénne ochorenia v slovenskej populácii, predovšetkým cystickej fibrózy, fenylketonúrie, alkaptonúrie, hemofílie A a B, spinálnej svalovej atrofie, Duchenneovej svalovej dystrofie a niektorých ďalších, s cieľom optimalizovať postup priamej DNA-diagnostiky týchto ochorení. Na DNA-diagnostike týchto (a ďalších) ochorení pre potreby zdravotníckej praxe sa pracovisko aj priamo zúčastňuje.

Zvláštna pozornosť sa venuje molekulárnemu štúdiu genetických ochorení, častých v rómskej populácii. Keďže ide o genetický izolát s mimoriadne vysokým koeficientom inbrídingu, u väčšiny preštudovaných monogénnych ochorení sa v tejto populácii našla lokusová aj alelová homogenita, čo uľahčuje identifikáciu zodpovedných génov a kauzatívnych mutácií. Pracovisko identifikovalo lokus a mutáciu na tomto lokuse, zapríčiňujúcu autozomálne recesívnu formu primárneho kongenitálneho glaukómu - závažného ochorenia s mimoriadne vysokou incidenciou v rómskej populácii, a vypracovalo jednoduchý skriningový test na detekciu tejto mutácie. V súčasnosti sa venuje molekulárnemu štúdiu nesyndrómovej formy straty sluchu a autozómovo recesívnej formy retinitis pigmentosa v rómskej populácii, v ktorej sú tieto ochorenia nadpriemerne časté.

Ďalšou sférou výskumného záujmu pracoviska je polymorfizmus ľudskej DNA a jeho využitie jednak pri nepriamej diagnóze genetických ochorení a pri hľadaní asociácií medzi polymorfizmom DNA a genetickými ochoreniami, jednak pri identifikácii osôb v kriminalistickej a forenznej praxi.

Spolupráca: viaceré oddelenia lekárskej genetiky a ďalšie klinické pracoviská; Unidad de Patología Molecular CSIC, Madrid, Španielsko; Genetic Laboratory, Univ. Of Connecticut, Farmington, USA

Doktorandi: Mgr. Andrej Ficek, Mgr. Gabriel Minárik, Mgr. Iveta Zmetáková

Vybrané publikácie:

Kádasi, L., Gécz, J., Matúšek, J., Krivušová, T., Ferák, V., Devoto M., Hruškovič, I., Romeo, G.: Deletion delta508 and haplotype analysis of CFTR gene region in Slovak cystic fibrosis patients. *Human Genet.* 89: 305-306, 1992.

- Saksová, L., Gécz, J., Kádasi, L., Ferák, V.: TaqI digestion of the PCR product increases the informativity of St14 VNTR polymorphism for the diagnosis of hemophilia A. *Disease Markers*, 11:139-141, 1993.
- Kádasi, L., Poláková, H., Feráková, E., Hudecová, S., Bohušová, T., Hruškovič, I., Moschonas, N., Ferák, V.: Phenylketonuria in Slovakia: Mutation screening and haplotype analysis. *Human Genet.* 95: 112-114, 1995.
- Varon, R., Stuhmann, M., Macek, M., Ferák, V., Kayserová, H., Kalaydjieva, L.: Pancreatic insufficiency and pulmonary disease in German and Slavic cystic fibrosis patients with the R347P mutation. *Human Mutation*, 6: 219-225, 1995.
- Estivill, X., Bancells, C., Piazza, A., Macek, M., Ferák, V., Kádasi, L., Kayserova, H., Kere, J.: Geographic distribution and origin of 272 cystic fibrosis in European populations. *Human Mutation*, 10: 135-154, 1997.
- Plášilová, M., Feráková, E., Kádasi, L., Poláková, H., Gerinec A., Ott, J., Ferák, V.: Linkage of the autosomal recessive primary congenital glaucoma to the GLC3A locus in Roms (Gypsies) from Slovakia. *Human Heredity*, 48: 30-33, 1998.
- Plášilová, M., Stoilov, I., Sarfarazi, M., Kádasi, L., Feráková, E., Ferák, V.: Identification of a single ancestral CYB1B1 mutation in Slovak Roms affected with primary congenital glaucoma. *J. Med. Genet.*, 36: 290-294, 1999.
- Zaťková, A., deBarnabe, DBV, Poláková, H., Zvarík M, Feráková E, Bošák V, Ferák, V, Kádasi L, deCordoba SR: High frequency of alkaptonuria in Slovakia: Evidence for the appearance of multiple mutations in HGO involving different mutational hot spots. *Am.J.hum.Genet.*, 67:1333-1339, 2000.
- Zaťková A, Poláková H, Mičutková L, Zvarík M, Bošák V, Feráková E, Matúšek J, Ferák V, Kádasi L: Novel mutations in the homogentisase-1,2-dioxygenase gene identified in Slovak patients with alkaptonuria. *J. Med. Genet.*, 37: 539-542, 2000.
- Zaťková, A., Chmelíková, A., Poláková, H., Feráková, E., Kádasi, L.: Rapid detection method for five HGO gene mutations causing alkaptonuria. *Clinical Genetics*, 63: 145-149, 2003.

Laboratórium molekulárnej biológie prokaryotov

(doc. RNDr. Ján Turňa, CSc., Doc. RNDr. Jozef Grones, CSc.)

Laboratórium je zamerané na štúdium regulácie génovej expresie v prokaryotoch, štúdium plazmidov a ich využitie v biotechnológiách. Ako modelové systémy sa najčastejšie využívajú *Escherichia coli* a rod *Acetobacter*. V octových baktériách boli popísané nové restriktčné endonukleázy a bližšie charakterizované ich plazmidové vybavenie. Vo vybraných plazmidoch boli študované ich počiatky replikácie a na základe získaných poznatkov sa konštruovali nové vektory vhodné pre klonovanie v octových baktériách a ďalších gram negatívnych baktériách. Pracovisko rozpracovalo metódy *in vivo* klonovania s využitím bakteriofága Mu a nových vektorových systémov, ktoré boli úspešne využité pre štúdium viacerých génov (*sdh*, *pac*, *fnr*, *ter* a ďalších). Ako pokračovanie týchto prác sa v súčasnosti venuje kolektív otázkam horizontálneho transferu genetickej informácie.

V ostatných rokoch sa pozornosť venuje aj aplikácii DNA metód do oblasti typizácie a diagnostiky bakteriálnych patogénov. V rámci domácej a medzinárodnej spolupráce sú študované možnosti rýchlej diagnostiky patogénov a molekulárnej epidemiológie.

Spolupráca: viaceré pracoviská SAV, Biotika a.s., Imuna Pharm Holding; IRC Biomedical Materials, Queen Mary and Wesfield College, Dept. Molecular Genet. Leiden University.

Doktorandi: Mgr. M. Kretová, Mgr. S. Vávrová, Mgr. E. Mikasová

Vybrané publikácie:

- Grones, J., Turňa, J.: *ApaCI*, an isoschimer of *BamHI* isolated from *Acetobacter pasteurianus*. Nucl. Acid. Res., 20, 13, 1992.
- Grones, J., Turňa, J.: Purification restriction endonuclease *ApaBI* from *Acetobacter pasteurianus*. Biochim. Biophys. Acta 1162, 323-325, 1993.
- Grones J., Kráľová A., Turňa, J. Characterisation of replication from pAC1 plasmid from *Acetobacter pasteurianus*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 26-31, 1993.
- Osuský, S., Stuchlík, S., Zámocký, M., Dubaová, M., Janitorová, V., Turňa, J.: Vectors with the fd replicon for *in vivo* cloning and analysis of genes. Gene **151**, 103-108, 1994.
- Laczaová, A., Pechan, T., Stuchlík, S., Kormuťáková R., Turňa, J.: Cloning of *E. coli* penicillin G acylase gene with mini-Mu containing a plasmid replicon. Biotechnology Letters 17, 13-18, 1995.
- Grones, J., Turňa, J.: Transformation of microorganism with the plasmid vector with the replicon from pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 206, 942-947, 1995.
- Drahovská, H. Turňa, J.: Construction of Lactose-Utilizing *Xantomonas campestris* with a Mini-Mu Derivative, Appl Environm. Microbiology, 61,2, 1995.
- Mačor, M. Turňa, J. Grones, J.: Cloning and transfer of Sucrase Operon in *Escherichia coli*. J. Microbiol. Methods, 26, 119-124, 1996.
- Stuchlík S., Turňa J.: (1998). Overexpression of the FNR protein of *Escherichia coli* with the T7 expression system. Folia Microbiologica, 43, 601-604.
- Vizváryová, M., Stuchlík, S., Grones, J., Mačor, M., Turňa, J.: The *Escherichia coli* strain with the deletion of the chromosomal *ampC* gene marked with TCR suitable for production of penicillin G acylase. Folia Microbiologica, 4-5, 1999.
- Kormuťáková R, Kľučár L, Turňa J.: DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of *Escherichia coli* and identification of essential genes. Biometals, 135-139, 2000.
- Drahovská H, Kocíncová D, Seman M, Turňa J.: PCR-based methods for identification of *Enterococcus* species. Folia Microbiol., 47, 649-653, 2002.
- Čamajová, J, Čamaj P, Minárik P, Timko J, Turňa J.: Stabilization of threonine production in an *Escherichia coli* overproducing strain using tightly regulated T7 promoter system. Biotechnology Letters 24, 1893-1897, 2002.

Ústav bunkovej biológie PriF UK v Bratislave

(doc. RNDr. Juraj Krajčovič, CSc. - riaditeľ, prof. RNDr. Libor Ebringer, DrSc. – zástupca riaditeľa, RNDr. Anna Belicová, CSc., Ing. Jozef Dobias, CSc., RNDr. Roman Dušínský, CSc., RNDr. Pavlína Foltínová, CSc., RNDr. Lívia Križková, CSc., RNDr. Gustáv Murín, CSc., RNDr. Milan Seman, CSc., RNDr. Rostislav Vacula, PhD., Mgr. Silvia Sláviková)

Vedecko-výskumný profil pracoviska:

Výskum sa sústreďuje na štúdium mechanizmov mutagenézy a antimutagenézy na eukaryotickom modeli *Euglena gracilis* versus niektoré prokaryotické objekty, s aplikáciou pri detekcii biohazardných xenobiótík v životnom prostredí. Ďalšou problematikou výskumu je cieleňé vyhľadávanie antimutagénnych látok prírodného, predovšetkým rastlinného pôvodu

a štúdium antimutagénneho a imunostimulačného účinku mliečnych baktérií. V spolupráci s Katedrou botaniky PriF UK (doc. RNDr. Karol Mičieta, CSc.) sa vyvíjajú a štandardizujú bioindikačné metódy na monitorovanie genotoxicity pomocou rastlín. K základným výskumným úlohám ďalej patrí štúdium chloroplastových génov a ich transkriptov v priebehu vybielovania euglén, regulácia expresie chloroplastových génov, signálne sekvencie jadrom kódovaných chloroplastových bielkovín a komunikácia chloroplastu s jadrom. Súčasťou výskumu je tiež DNA identifikácia vybraných organizmov (najmä techniky na báze PCR), ich klasifikácia a analyzovanie príbuzenských vzťahov (hlavne enterokoky a muchy z čeľade *Simulidae*) ako aj otázky pôvodu a evolúcie eukaryotickej bunky, problematika strácania a nadobúdania organel (najmä chloroplastov a mitochondrií) v evolúcii a v ontogenéze.

Spolupráca:

University of Vienna, Institute of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Vienna, Austria, (*Wolfgang Löffelhardt*).

University of Memphis, Department of Microbiology and Cell Biology, Memphis, TN, USA (*Steven D. Schwartzbach*).

Ludwig-Maximilians University, Institute of Botany, Munich, Germany (*Reinhold G. Herrmann*).

Masarykova univerzita v Brně, Katedra genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta, Brno, Česká Republika (*Jiří Doškař*).

Vybrané publikácie:

Krajčovič, J., Vacula, R., Steiner, J., Löffelhardt, W., Belicová, A., Sláviková, S., Ebringer, L., Stutz, E.: Molecular effects of some stress factors on the chloroplast genetic apparatus of the flagellate *Euglena gracilis*. In: J. Argyroudi-Akoyunoglou and H. Senger (Eds.): *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology*, NATO ASI Series, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 121-128, 1999, ISBN 0-7923-5577-6

Belicová A., Krajčovič J., Dobias J., Ebringer L.: Antimutagenicity of milk fermented by *Enterococcus faecium*. *Folia Microbiol.* 44, 512-517, 1999.

Vacula R., Steiner J., Krajčovič J., Ebringer L., Löffelhardt W.: Nuclear-encoded precursors to thylakoid lumen proteins of *Euglena gracilis* possess tripartite presequences. *DNA Res.* 6, 45-49, 1999.

Belicová A., Krajčovič J., Krizková L., Ebringer L., Košíková B.: Anti-u.v. activity of lignin biopolymers on *Euglena gracilis*. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 16, 91-93, 2000.

Križková L., Polónyi J., Košíková B., Dobias J., Belicová A., Krajčovič J., Ebringer L.: Lignin reduces ofloxacin-induced mutagenicity in *Euglena* assay. *Anticancer Res.* 20, 833-836, 2000.

Križková, L., Polónyi, J., Košíková, B., Dobias, J., Belicová, A., Krajčovič, J., Ebringer, L.: Lignin reduces ofloxacin-induced mutagenicity in *Euglena* assay. *Anticancer Res.* 20, 833-836, 2000.

Belicová, A., Ebringer, L., Krajčovič, J., Hromádková, Z., Ebringerová, A.: Antimutagenic effect of heteroxylans, arabinogalactans, pectins and mannans in the *Euglena* assay. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 17, 293-299, 2001.

- Krajčovič, J., Ebringer, L., Schwartzbach, S.: Reversion of Endosymbiosis? The Case of Bleaching in *Euglena*. In: J. Seckbach (Ed.): *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 185-206, 2001, ISBN 1-4020-0189-4
- Križková, L., Ďuračková, Z., Šandula, J., Sasinková, V., Krajčovič, J.: Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans. *Mutation Res.* 497, 213-222, 2001.
- Vacula, R., Steiner, J.M., Krajčovič, J., Ebringer, L., Löffelhardt, W.: Plastid state- and light-dependent regulation of the expression of nuclear-encoded genes for chloroplast proteins in the flagellate *Euglena gracilis*. *Folia Microbiol.* 46, 433-441, 2001.
- Vacula, R., Krajčovič, J.: Interakcia jadro – chloroplast: signalizácia a import. *Biologické listy* 66, 81-111, 2001.
- Križková L., Belicová A., Dobias J., Krajčovič J., Ebringer L.: Selenium enhances the antimutagenic activity of probiotic bacterium *Enterococcus faecium* M-74. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 18, 867-873, 2002.

Katedra mikrobiológie

(prof. RNDr. Július Šubík, DrSc., doc. RNDr. Iveta Gbelská, CSc., doc. RNDr. Margita Obernauerová, CSc.)

Naša skupina sa venuje výskumu v oblasti funkčnej a komparatívnej genomiky kvasiniek. Zameriavame sa na štruktúru, funkciu a evolučnú príbuznosť génov, ktorých produkty sa podieľajú na biogenéze a funkcii mitochondrií, resp. na odpovedi buniek na stres vyvolaný teplom alebo cytotoxickými látkami. Ako modelové eukaryotické mikroorganizmy využívame kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*. Izolovali, klonovali a molekulárne sme charakterizovali gény *Sc-PEL1* (synonymum *PGS1*) a *Kl-PGS1* špecifikujúce fosfatidylglycerolfosfátsyntázu u *S. cerevisiae* a *K. lactis*. Tento enzým je esenciálny pre schopnosť mitochondrií syntetizovať fosfatidylglycerol a kardiolipín. Mutácia v tomto géne u petite-pozitívnych kvasiniek *S. cerevisiae* vyvoláva citlivosť buniek k teplote a stratu ich životaschopnosti po kombinácii s delečnými mutáciami (*rho*⁻) v mitochondriálnom genóme. U petite-negatívnych kvasiniek *K. lactis* sme izolovali, klonovali molekulárne charakterizovali a fyzikálne mapovali aj gény špecifikujúce štruktúru respiračného reťazca mitochondrií (*Kl-CYCI*, *Kl-CYTI* a *Kl-COX18*), proteínu zahrnutého v transkripčnej elongácii (*Kl-SPT4*) a proteínu veľkej podjednotky cytoplazmatických ribozómov (*Kl-RPL28*) zahrnutej v rezistencii proti cykloheximidu. S cieľom objasniť molekulárne mechanizmy rezistencie kvasiniek proti antimykotikám používaným v klinickej praxi, resp. iným antifungálnym látkam študujeme štruktúru, funkciu a reguláciu expresie génov funkčných sietí PDR a YAP zahrnutých v mnohonásobnej rezistencii voči cytoxickým látkam u laboratórných kmeňov a klinických izolátov kvasiniek. Odhalili sme centrálnu úlohu génu *PDR3* v mnohonásobnej rezistencii u *S. cerevisiae*. Mutačnou analýzou sme identifikovali regulačnú doménu v Pdr3p a ukázali sme, že mutácie v N-terminálnej ako aj v C-terminálnej doméne tohto transkripčného faktora zvyšujú jeho transaktivačný potenciál a vedú k nadexpresii membránových púmp zodpovedných za eflux cytotoxických látok z bunky. Niektoré homológy génov pekárskych kvasiniek zahrnuté v mnohonásobnej rezistencii sa nám podarilo izolovať, klonovať a charakterizovať aj u *K. lactis* (*Kl-PDR5*, *Kl-ATR1*). V súčasnosti študujeme expresiu génov špecifikujúcich efluxné pumpy mnohonásobnej rezistencie u klinických izolátov kvasiniek a vyvíjame citlivé skríningové systémy umožňujúce identifikáciu chemických zlúčenín, ktoré by interferovali s mechanizmami mnohonásobnej rezistencie a scitlivovali tak bunky kvasiniek na antifungálne látky používané v súčasnosti. Výskum v uvedených oblastiach bol, resp. je finančne podporovaný zahraničnými

grantami z Howard Hughes Medical Institute, USA, 5. Rámcového programu Európskej únie a domácich grantových agentúr.

Doktorandi - Mgr. Zuzka Kozovska, Mgr. Maria Tkáčová.

PDS - RNDr. Imrich Hikkek, PhD.

Vybrané publikácie:

Július Šubík, Vladimír Vondrejs. Molecular biology and genetics. In: Forty Years of Activity in Czech and Slovak Yeast Research, Period 1990-1999, P. Biely (Editor), VEDA, Bratislava (1999), 32-55.

Daniela Lacková, Július Šubík. Use of mutated *PDR3* gene as a dominant selectable marker in transformation of prototrophic yeast strains. *Folia Microbiologica* 44(2), (1999), 171-176

Dana Michalková-Papajová, Július Šubík. Mucidin - klinicky používané antifungálne antibiotikum a nástroj biologického výskumu. *Biologické listy* 64 (2) (1999), 137-156.

Yveta Gbelská, Margita Obernauerová, Július Šubík. Growth of eukaryotic cells in relation to the structure of mitochondrial membranes and mitochondrial genome. *Folia Microbiologica* 44(6), (1999), 697-702.

Tibor Simonics, Zuzana Kozovská, Dana Michalková-Papajová, Agnes Delahodde, Claude Jacq, Július Šubík. Isolation and molecular characterization of the carboxy-terminal *pdr3* mutants in *Saccharomyces cerevisiae* *Current Genetics* 38, (2000), 248-255.

Dana Michalková-Papajová, Margita Obernauerová, Július Šubík. Role of the *PDR* gene in yeast susceptibility to the antifungal antibiotic mucidin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, (2000), 418-420.

Zuzana Kozovská, Anna Maráz, Ildiko Magyar, Július Šubík. Multidrug resistance as a dominant molecular marker in transformation of wine yeast. *Journal of Biotechnology* 92/1, (2001), 27-35.

Dana Michalková-Papajová, Július Šubík. Molekulárne mechanizmy v mnohonásobnej rezistencii kvasiniek. Regulačná sieť YAP. *Biologické listy* 66(4), (2001), 253-282.

Mária Takáčová, Peter Sklenář, Yveta Gbelská, Karin Breuning, Július Šubík, Isolation, heterological cloning and sequencing of the *RPL28* gene in *Kluyveromyces lactis*. *Current Genetics* 42, (2002), 21-26.

Dana Michalková-Papajová, Július Šubík. Regulačná sieť *PDR* v mnohonásobnej rezistencii kvasiniek. *Biologické listy* 67(2), (2002), 101-136.

Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky (BFÚ AV ČR)

Královopolská 135, 612 65 Brno
tel.: 541517 111 fax : 541211293
ředitelka: RNDr. Jana Šlotová, CSc.
e-mail: ibp@ibp.cz
web stránka: <http://www.ibp.cz>

Biofyzikální ústav jako součást Československé akademie věd vznikl v roce 1955 z Biofyzikální laboratoře ČSAV pod vedením prof. MUDr. Ferdinanda Herčíka, DrSc. a vtiskl pečeť hlavnímu směru studia: účinků záření na živé systémy. V následujících letech byl sledován rozvoj metod, umožňujících studium na molekulární úrovni. Biofyzikální ústav se stal nejen moderním pracovištěm základního výzkumu, ale současně i významným centrem nových metod molekulární biologie a genetiky pod vedením ředitelů prof. MUDr. Zdeňka Karpfela, DrSc. v letech 1967 - 1990, v následujícím období do roku 1997 doc. RNDr. Milana Bezděka, CSc., a RNDr. Jany Šlotové, CSc. v současnosti.

Hlavní směr vědeckého výzkumu je zaměřen na experimentální i teoretické studium fyzikálních a chemických vlastností, struktury a interakcí biomakromolekul, výzkum biofyzikálních vlastností živých systémů na úrovni molekulární, buněčné i celých organismů, který v sobě zahrnuje působení vlivu externích faktorů prostředí.

Vědecká činnost pracoviště spočívá v zajištění výzkumných záměrů, které jsou řešeny jednotlivými Laboratořemi, sdruženými do pěti Programů:

- I. **Biofyzikální chemie makromolekul**
Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie
(*prof. RNDr. Emil Paleček, DrSc.*)
Laboratoř fyziky biomakromolekul
(*prof. RNDr. Vladimír Vetterl, DrSc.*)
Laboratoř struktury a dynamiky nukleových kyselin
(*doc. RNDr. Jiří Šponer, DrSc.*)

- II. **Biofyzika komplexů nukleových kyselin**
Laboratoř molekulární biofyziky a farmakologie
(*prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.*)
Laboratoř analýzy molekulárních komplexů DNA
(*RNDr. Jiří Fajkus, CSc.*)
Laboratoř analýzy chromosomálních proteinů
(*RNDr. Michal Štros, CSc.*)

- III. **Biofyzika a bioinformatika genomů**
Laboratoř CD spektroskopie nukleových kyselin
(*doc. RNDr. Michaela Vorlíčková, DrSc.*)
Laboratoř biofyziky DNA a bioinformatiky genomů
(*RNDr. Jaroslav Kypr, CSc.*)
Laboratoř molekulární epigenetiky
(*RNDr. Aleš Kovařík, CSc.*)

IV. Molekulární cytologie a cytogenetika
Laboratoř molekulární cytologie a cytometrie
(*RNDr. Stanislav Kozubek, DrSc.*)
Laboratoř vývojové genetiky rostlin
(*prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.*)
Laboratoř molekulární analýzy vývoje rostlin
(*RNDr. Břetislav Brzobohatý, CSc.*)

V. Kinetika buněčných populací
Laboratoř cytokinetiky
(*doc. RNDr. Alois Kozubík, CSc.*)
Laboratoř patofyziologie volných radikálů
(*RNDr. Antonín Lojek, CSc.*)
Laboratoř experimentální hematologie
(*MUDr. Michal Hofer, CSc.*)

Z oblasti genetiky má pracoviště Iví podíl na výsledcích analýzy rostlinného genomu v rámci řešení programů II, III, IV, ať se jedná o studium úlohy methylační DNA v ontogenezi rostlin nebo o výzkum struktury a evoluce genomů rodu *Silene*, nebo při studiu strukturně-funkčních vztahů v komplexech nukleových kyselin s proteiny, uplatňujících se v dynamice rostlinných genomů nebo genomu člověka.

V rámci řešení programů I, II, týkající se struktury, funkce genetického materiálu, jeho interakcí s chemickými a protinádorově účinnými látkami a mechanismu reparačních procesů proteinů je výzkum veden na mezinárodní úrovni. Experimentální techniky *in vivo* a *in vitro* jsou uplatňovány při výzkumu farmakologické stimulace krvetvorby poškozené ionizujícím zářením, kombinovaným s cytostatickou terapií v rámci programu V.

Mimo badatelskou činnost ústavu je věnována pozornost spolupráci s vysokými školami, a to zejména s Přírodovědeckou fakultou a Fakultou informatiky MU v Brně jak při výuce, tak i při tvorbě nových počítačových programů pro analýzu obrazu, studia prostorového uspořádání, lokalizace a aktivity genů humánního genomu v interfázním jádře.

Pro ilustraci jsou dále uvedeny statistické údaje BFÚ AV ČR z roku 2001:

Počet VŠ pracovníků: 80
Studenti DSP: 57
Zahraniční studenti DSP: 5

Vědecká činnost: 5 programů (uvedeno výše)

Grantová podpora vědeckých projektů:

GA AV ČR: celkem 22 grantů

GA ČR: celkem 37 grantů

Grantové agentury ministerstev České republiky

Mzd ČR - 5 grantů, MPO ČR 2 granty spolunositelé, MŠMT ČR - Program "Výzkumná centra" BFÚ se účastní 2 jako spolunositel, Program "Fond rozvoje vysokých škol" BFÚ se účastní 4 jako spolunositel, 4 granty Programu "COST", 3 granty Programu "Kontakt".

Grantové agentury zahraniční: 10 grantů

Publikační a přednášková činnost:

Práce otištěné v odborných časopisech a vydané knižně: celkem 73

Práce přednesené na konferencích a ve vědeckých společnostech: celkem 216

Zahraniční styky:

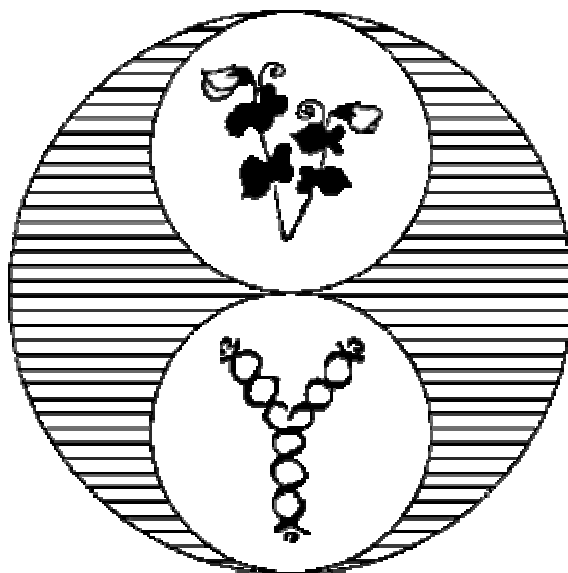
Výjezdy pracovníků BFÚ do zahraničí: celkem 140

Přijetí zahraničních hostů: celkem 73

Stručný výčet činnosti a aktivit BFÚ uvedený pouze za rok 2001 není vyčerpávající. "Vyčerpávající" byl výběr, co uvést z výsledků práce tohoto badatelského pracoviště s dlouholetou tradicí úzce spjatého s brněnským vysokým školstvím a ostatními výzkumnými pracovišti, laboratořemi a jeho významným podílem na výuce a výchově mladých vědeckých pracovníků, s jeho nezastupitelným místem i na poli mezinárodní vědy. Pro podrobnější údaje odkazují čtenáře na web stránku: <http://www.ibp.cz> nebo každoročně publikovanou "Výroční zprávu" BFÚ AV ČR, Brno.

Marie Vojtíšková

Adresa Internetových stránek GSGM: <http://orion.sci.muni.cz/gsgm/>



GSGM

Genetická společnost Gregora Mendela

[Sídlo společnosti](#)

[Stanovy společnosti](#)

[Výbor společnosti](#)

[Seznam členů z České republiky a Slovenské republiky](#)

[Přihláška a evidenční list ve formátu PDF](#)

[Informační listy Genetické společnosti Gregora Mendela](#)

[Konference pořádané GSGM](#)

[Zápisy ze schůzí výboru GSGM](#)

[Genetické společnosti ve světě](#)