

INFORMAČNÍ LISTY



OBSAH

Zápis ze schůze výboru GSGM 25. 11. 2009	1
Magic lead (E. N. Trifonov)	2
Před sto lety byl Mendel poprvé vytesán do mramoru (A. Matalová)	4
Vzpomínka na profesora M. W. Nirenberga a jeho přínos k rozvoji Mendelova vědeckého odkazu (E. Matalová)	6
Úloha repetitivní DNA v evoluci pohlavních chromosomů (E. Kejnovský)	9
Genetika na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze (P. Pikálek)	13
Molekulární analýzy genomu psa (P. Vejl, D. Čílová)	14
Mendelovo muzeum – čtvrtým rokem součástí Masarykovy univerzity (O. Dostál, D. Vránová)	23
RNA klub 2009 (M. Pospíšek)	24
Perličky ze školních lavic (J. Šmarda)	25
Blíží se uzávěrka soutěže o Cenu GSGM (členové výboru GSGM)	26

INFORMAČNÍ LISTY

číslo 36, duben 2010

Vydává Genetická společnost Gregora Mendela

Redakční rada – Výbor GSGM

Výkonný redaktor – prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

Kotlářská 2, 611 37 Brno

ISSN 1210-6267

Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela, která se konala dne 25. 11. 2009 v Brně

Místo konání: Seminární místnost pavilonu A2, Univerzitní kampus MU Brno – Bohunice, Kamenice 5, 625 00 Brno
Přítomni (bez titulů): Doškař, Fajkus, Nešvera, Relichová, Slaninová, Šmarda, Vlček, Vojtíšková, Zadražil
Omluveni: Knoll, Kočová, Kormuťák, Malachová, Miadoková, Pikálek, Zelený

Program schůze:

1. Informace o činnosti výboru od poslední schůze
2. Stav přípravy dalšího čísla IL
3. Příprava akcí GSGM na příští období
4. Správa webových stránek GSGM
5. Stav placení členských příspěvků
6. Různé

Ad 1+4) Prof. Doškař ocenil zejména zajištění funkčnosti a aktuálnosti webových stránek společnosti, o které se postaral prof. Knoll. Dr. Slaninová upozornila na potřebu aktualizace seznamu členů ze Slovenské republiky, podklady zašle prof. Knollovi a paralelně doc. Fajkusovi (kvůli počtu výtisků IL zasílaných na Slovensko). Je třeba doplnit hromadnou e-mailovou adresu na členy společnosti pro účely zasílání aktuálních sdělení (oprávnění by měli mít členové výboru). V IL se rovněž objeví výzva členům, aby svoje aktuální e-mailové adresy zasílali prof. Knollovi.

Ad 2) Prof. Šmarda představil hotové nové číslo IL. Členové výboru se shodli na tom, že je velmi kvalitní po obsahové stránce i po stránce zpracování. Další číslo vyjde v květnu 2010, předpokládaná uzávěrka koncem března 2010. Přislíbeno několik příspěvků (doc. Kejnovský, prof. Zadražil - 50 let kat. genetiky a mikrobiologie na PřF UK, dr. Nešvera – informace o výzkumu na MBÚ AVČR a další možné příspěvky - genetiky psů, Nobelovy ceny za r. 2009, VpK projekty, RNA club 2009 (Pospíšek-Vaňáčková).

Ad 3) Na jaře 2010 by se měla uskutečnit první z plánovaných přednášek v refektáři Augustiniánského kláštera v Brně zajišťovaných GSGM a sponzorovaných firmou MGP Zlín. Na prvním místě je jako přednášející kandidátka navržena prof. Šmardou (prof. Helen Blau ze Stanford Univ.). Je třeba upřesnit náklady a odsouhlasit termín s přednášející, tak, aby se přednáška mohla konat v jarním semestru 2010. Část nákladů by mohla být hrazena z univerzitního projektu INNOLEC.

V r. 2011 bude další konference GSGM, tentokrát v Brně. S cílem omlazení společnosti a jejího výboru bylo navrženo, aby k přípravě konference byli do organizačního a přípravného výboru přizváni schopní zájemci z řad studentů. Přitom se předpokládá, že tito studenti se následně zapojí i do činnosti ve výboru společnosti.

Ad 5) Prof. Knoll zaslal přehledy o placení členských příspěvků, výběr příspěvků je neuspokojivý (jen asi 30 členů z ČR zaplatilo za r. 2009). Některé další platby nebyly identifikovány. Členové budou k platbě znovu vyzváni. Hospodaření české i slovenské části společnosti vykazuje aktivní bilanci, především díky sponzorským darům.

Zapsal: *Jiří Fajkus*, tajemník výboru GSGM

Magic lead

Edward N. Trifonov

My way to Brno can be traced through numerous small incidents, all gently pushing in one direction. Of course, it was the spirit of Mendel that whispered this directionality.

In 60's my mind was fascinated by physics that, of course, would be crucial in solving biological problems. We did not have any formal course of genetics, and only knew that this is something that does not go with socialist science. Yet, the spectacular coming of the DNA structure, which, of course, is all physics, inevitably pulled me towards a dissident thought that Gregor Mendel is not just idealistic friar, and some important truth, not for loyal ears, is hovering around his steadfast image.

In 1972 when I was still working in Soviet Union, heavily fortified against every Western influence, Soviet Academy of Science organized International Biophysical Congress in which few "real" foreigners took part. The countries of "people's democracy" have been well represented. That was the first time I have met in flesh somebody from Brno - Professor (or just Dr. at that time) Emil Paleček. Professor Yuri Lazurkin, Dr. Maxim Frank-Kamenetskii and myself had to get special permission for this meeting, as we worked in Kurchatov Institute of Atomic Energy, and every exposure to foreigners was a serious political and security issue. Encountering the people who worked and lived in Brno, city of Mendel, was surely an event to proudly describe in details to friends and colleagues in the years to come.

I had no slightest idea at that time, that already in 1976 smile of generous fate will carry me and my family out of the Soviet nightmare. One of my first travels out of reach of KGB was trip to Brno. These were happy days with friends - Mishka Vorlíčková, Jaroslav Kypr, Emil Paleček. I think, we did not go to Mendel's place at that time, but the aura of that great man already made it to my heart, in seemingly non-consequential way.

Consequential was my acquaintance with Dr. (now Associate Professor) Jiří Fajkus (Institute of Biophysics and Masaryk University). In mid 90's he became interested in chromatin structure of telomeres and other DNA repeats, and asked for my help in nucleosome mapping by the program developed in our group, at the Weizmann Institute. This collaboration soon developed in mutual visits, and joint publication on columnar structure of telomere chromatin. During one of these visits Jirka, following my inner call, brought me to the Museum of Gregor Mendel. Amongst many other things I learned there that Mendel was student of Doppler. As I am physicist by education myself (radioelectronics) that news was very moving. I also noticed that, apparently, Mendel did not respect so-called established scientific magazines, which is my point, too. And, obviously minor thing, - he had a title of Adjunct Professor. When in 1999 I was offered that very title by Moscow Lomonosov University, I accepted it before even listening to conditions, filled by a childish pride. Surely, it would be an unthinkable dream to get such position any close to the Mendel-city. The magic scene of events in the mean time started to turn in the subconsciously anticipated direction.

In 2003 I gave a talk about my work on early molecular evolution in Vienna. It happened that the talk was attended by Dr. Anna Nasmyth, member of Committee that organizes Mendel Lectures in Brno. One day the invitation followed, and here I am, lecturing in the hall of Augustinian Abbey (2004). Excitement of this event, probably, was visible in my presentation enthusiastically received by audience.

In the next turn of the magic scene, three years ago, I was suggested by Jirka to join to and to partake in organization of new Life Science Center (probably, even Mendel Institute).

Needless to say, my natural, though experienced, optimism jumped to a fanfaric level. I even proposed hastily a preliminary project of the bioinformatic laboratory.

Subsequent development was (as experience would suggest) and still is rather slow, and Jirka suggested to Masaryk University to offer me a part-time position of Professor, with teaching duties. I accepted this offer with open arms (as "in the mean time" solution), that, actually, became a fulfillment of my subconscious dream - to work in the City of Mendel.

Interestingly, time-wise it coincided with downgrading my position in University of Haifa. As if the gears of rotating magic scene clicked at a junction...



Edward N. Trifonov is Professor of Haifa University (Israel), Adjunct Professor of Moscow University (Russia), and Professor of Masaryk University, Faculty of Science, Department of Experimental Biology (Brno, Czech Republic).

Před 100 lety byl Mendel poprvé vytesán do mramoru

Anna Matalová

2. října 1910 byl Mendelův pomník z carrarského mramoru od Theodora Charlemonta (obrázek 1) slavnostně odhalen na tehdejším Klášterním náměstí vedle čelní budovy prelatury augustiniánů. Od té doby nese náměstí Mendelovo jméno. V místě, kde stával Mendelův monument, vedou dnes koleje tramvají, projíždějících Pekařskou ulicí.

Krátce po tzv. znovuobjevení Mendela dal výbor brněnského Přírodovědeckého spolku návrh na postavení Mendelova pomníku, kterým by projevil vysoké uznání, které se jeho zakládajícímu členovi a významnému funkcionáři dostávalo ze všech stran za jeho práci s hybridy rostlin. Sekretář Spolku Gustav Niessl, který v roce 1866 zajistil zveřejnění Mendelovy práce s *Pisum* ve spolkovém časopise, nesouhlasil s názorem, že Mendelovy myšlenky nebyly známé a proto došly ocenění až v roce 1900. Na výroční schůzi Přírodovědeckého spolku v lednu 1902 vyjádřil názor, že Mendelovy práce známé byly, ale že „byly přehlíženy v souvislosti s tehdy výhradně směrodatnými jinými názory. Z dlouhodobého osobního styku s Mendelem vím, že si nepřipouštěl pocit zklamání pramenící z toho, že jeho publikace z botaniky nedosáhly okamžitého ohlasu v době, která při vysvětlování vzniku nových forem rostlin téměř bezvýhradně uplatňovala zásady tehdy všeobecně uznávaných Darwinových hypotéz.“ Dnes se většinou uvádí, že Mendel předběhl svou dobu. Toto tvrzení může zahrnout i Niesslův úsudek, který Mendelovu práci hodnotí v souvislosti s Darwinovou provizorní teorií pangeneze a jiných lamarckistických tvrzení o dědičnosti.

Kompozice pomníku byla řešena ve dvou úrovních. Mendel v mnišském rouchu s hrachem a spodní část s mladým klečícím párem demonstruje platnost jeho objevu i pro vědu o člověku. Z hlediska současné genetiky, která přispívá k prevenci a léčbě humánních chorob, vnímáme tento mladý pár zcela jinak, než tomu bylo před 2. světovou válkou. Williamu Batesonovi, který se odhalení pomníku v Brně zúčastnil, se sošná těla manželské dvojice z celé mramorové kompozice líbila nejvíc. Bateson proslul jako znalec a sběratel umění a byl také členem správní rady Britského muzea, takže se dalo očekávat, že jeho úsudek o Charlemontovu uměleckém díle bude kritický. A. G. Cock (1982) doložil, že umělecká hodnotící kritéria Bateson použil i při popisu opulentního banketu, který následoval po odhalení pomníku. Bateson na banketu pronesl krátkou řeč, jejíž pointou bylo, že není

důvod mluvit s lítostí o Mendelově pozdním posmrtném uznání, protože když Mendel stanul tváří v tvář nové Pravdě, prožil nejsilnější zážitek blaženosti, jaký svět může člověku poskytnout. Svě vystoupení Bateson ukončil Schillerovým „alle Menschen werden Brüder“ a správně odhadl, že to se bude přítomným líbit. Jen tato jeho věta se dostala do oficiální zprávy o odhalení pomníku (ILTIS 1911). To, co se do oficiální zprávy nedostalo, sdělil Bateson v dopise své ženě Beatrice. Psal o extrémním napětí, které panovalo během slavnostního aktu a vyvrcholilo, když předseda Přírodovědného spolku Baron von Buchen-Rode vzdával Mendelovi poctu nejen jako přírodovědci, ale i jako svobodomyšlnému knězi. Bateson uvádí: „*The President, a Baron somebody, referred to Mendel as a liberal priest (Freisinniger) - somebody else - one of the Govt. Officials said that if such a thing occurred again in the proceedings, he should leave at once.*“

Vedle Batesona se odhalení zúčastnili Tschermak a Wettstein z Rakouska, Vilmorin z Francie, Hagedoorn a Lotsy z Holandska, Nielsson-Ehle ze Švédska, Baur z Německa a další významní hosté, kteří finančně přispěli do sbírky na Mendelův pomník, kterou vyhlásil Tschermak a Iltis v roce 1907. Ve své výzvě zdůraznili, že Mendelův objev a zákony dědičnosti zahájily a umožnily novou, mimořádně úspěšnou éru experimentálního výzkumu dědičnosti, systematiky rostlin a zvířat a v neposlední řadě mikrobiologie a praktického šlechtění. K výzvě se připojilo 150 vědců, kteří shromáždili značný finanční obnos, přispěl i Mendelův domovský klášter, město Brno, Ministerstvo kultury a školství ve Vídni, vévoda Josef z Liechtensteinu a další vůdčí osobnosti vědeckého, společenského a politického života.

Pomník zachycující stojícího Mendela u kamenné zídky, po které se pnou rostliny hrachu a fazole, vyvolávala u Batesona nepříznivý dojem: „*The peas climb up a rock. They have leaves on their peduncles!*“ V dolní části pomníku nad klečícím mladým párem byl umístěn nápis Dem Naturforscher P. Gregor Mendel 1822 – 1884. V podstavci pomníku bylo uvedeno Errichtet 1910 von Freunden der Wissenschaft. Pomník byl vyvýšen na piedestalu, ke kterému vedlo masivní mramorové schodiště. Na závěr ceremonie byl svěřen do péče starostovi města Brna.

Pro tuto slavnostní příležitost vystavil Iltis písemnosti, knihy, obrazy a fotografie, čímž dal základ sbírce mendelovských dokumentů a archivnímu výzkumu, kterému se věnoval až do své emigrace před Hitlerem do USA. Mendelův pomník žil svým životem. Nejdříve v roli titána ducha dominoval Mendlovu náměstí. Po válce pomník přišel o německý text. V padesátých letech musel uvolnit místo pro tramvajové koleje. Nebyl přemístěn, byl odstraněn. Přišel o podstavec z mramorových stupňů a ocitl se u popelnic ve dvoře kláštera, který Mendel v letech 1868-84 spravoval jako opat a prelát. Lysenkistické a antimendelistické nálady tehdejší doby se odrazily v hanlivých nápisech na jeho soše z bílého mramoru. Byla ohrožena sama existence pomníku, a proto doc. J. Šmarda pomník skryl do starých hadrů, což u popelnic nebudilo pozornost. Nového umístění v hospodářské zahradě augustiniánského kláštera, kde stojí dodnes, se pomník dočkal až v šedesátých letech. Nápis GREGOR MENDEL 1822-1884 provedla Technická a zahradní správa města Brna na objednávku Moravského muzea na podzim roku 1964, několik měsíců před konáním mezinárodního Mendelova vzpomínkového symposia ke stému výročí zveřejnění Mendelova objevu. Monumentální mramorové schodiště piedestalu se nezachovalo, jen mramorová postava Mendela s mladým manželským párem, která v zeleni klášterní zahrady působí skromně, jakoby odrážela Mendelovu tichou povahu.



Obrázek 1: Současná podoba a umístění Mendelova mramorového pomníku od T. Charlemonta.

Literatura

Iltis H. (1911). Vom Mendeldenkmal und von seiner Enthüllung. *Verh. Nat. For. Ver. Brünn* 49: 335-363.

Cock A. G. (1982). Bateson's impressions at the unveiling of the Mendel monument at Brno in 1910. *Fol. Mendel.* 17: 217-223.

Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn (1903), XLI: 20.



PhDr. Anna Matalová je dlouholetou pracovnící Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně. Působila zde od jeho založení a po roce 1989 až do odchodu do důchodu jako vedoucí.

Vzpomínka na profesora M. W. Nirenberga a jeho přínos k rozvoji Mendelova vědeckého odkazu

Eva Matalová

„Na podzim roku 1868 izoloval mladý švýcarský lékař jménem Friedrich Miescher novou složku buněčného jádra. Nazval ji nuklein a dnes jí říkáme nukleová kyselina. O dva roky později český mnich Gregor Mendel (Miescherovi neznámý) ukončil ve městě Brně sérii experimentů, jež se nakonec ukázaly úzce propojené s Miescherovým objevem. Na základě velmi jednoduchých pokusů s hrachem Mendel objevil, že naše dědičnost je obsažena v mnoha nezávislých jednotkách (genech). Mendelova práce byla začátkem genetiky jako vědy ... Během 19. století ještě nebyly Nobelovy ceny zavedeny. Pokud by existovaly, je málo pravděpodobné, že by byly uděleny za objevy nukleových kyselin a genů. Miescherovy výsledky byly v plném znění publikovány až po jeho smrti v roce 1890. Mendel tiskem zveřejnil svá pozorování v roce 1866, vzbudilo to však pramálo zájmu a brzy bylo zapomenuto“ ... tolik výňatek z proslovu u příležitosti udělování Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu o sto let později.

Nobelovu cenu v roce 1968 získali Robert W. Holley (Cornell University, New York), Har Gobind Khorana (University of Wisconsin in Madison, USA) a Marshall W. Nirenberg (National Institutes of Health in Bethesda, USA) za interpretaci genetického kódu a jeho funkce v syntéze proteinů.

Mezi milníky na cestě k rozluštění genetického kódu patří identifikace DNA jako genetického materiálu (O.T. Avery, C.M. MacLeod, M. McCarty), objev struktury DNA (F.H.C. Crick, J.D. Watson, M.H.F. Wilkins), koncept jeden gen = jeden enzym (G.W. Beadle, E.L. Tatum) a vztah RNA k proteosyntéze (J. Brachet, T. Caspersson) v padesátých letech minulého století. V dalších studiích byl stanoven koncept RNA jako templátu pro proteosyntézu, chyběl však přímý biochemický důkaz. M. W. Nirenberg vstoupil do této problematiky během svého postdoktorandského působení v National Institute of Health, kde začal studovat souvislosti propojující DNA, RNA a proteiny. Nejprve začal pracovat se syntézou penicilinázy mimo buňku, kde stavěl na poznacích M.R. Pollocka a jeho kolegů. Zaměřil se zejména na vliv reakčních podmínek, nukleových kyselin a dalších faktorů na syntézu proteinů. M.W. Nirenberg a H. Matthaei ukázali, že RNA připravená z ribozomů stimuluje inkorporaci aminokyselin do proteinu a že transferová tRNA nenahrazuje RNA templát. Pro další experimenty získali RNA z dalších zdrojů a určovali jejich aktivitu a specifitu jako templátu pro syntézu proteinů. Výsledky prokázaly, že RNA je templátem pro proteiny, že uridin (U) v poly-U-sekvenci odpovídá fenylalaninu v cílovém proteinu a že translace mRNA je ovlivněna strukturou RNA.

Genetický kód byl rozluštěn ve dvou experimentálních fázích. Nejprve byla určena kompozice kodónů a obecný princip genetického kódu. Dále bylo odhaleno pořadí bází v kodónu pro určení aminokyseliny. Sekvence založené na principu kodónů byly stanoveny vazbou AA-tRNA k ribozomům s trinukleotidy známé sekvence a také stimulací *in vitro* proteosyntézy na základě polyribonukleotidů obsahujících opakující se dublety, tripletty a tetrametry o známé sekvenci.

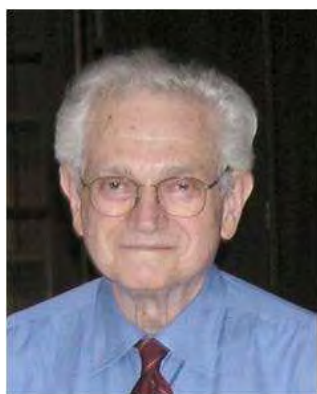
Další otázky, které zbývalo zodpovědět, byly spojeny s interpunkcí genetického kódu, iniciací a terminací transkripce a translace a také s redundancí kodónů. Výsledky mnoha studií ukázaly, že odlišné formy života využívají v podstatě tentýž genetický jazyk. Téměř identickou translaci nukleotidových sekvencí prokázali M.W. Nirenberg, R. Marshall a T. Caskey v experimentech s bakteriemi, obojživelníky i savci. Byla objevena univerzalita genetického kódu.



Profesor Nirenberg při pobytu v Brně v dubnu 2006: u Mendelovy sochy od Theodora Charlemonta (vlevo nahoře), při přebírání Mendelovy pamětní medaile v Dietrichsteinském paláci (vpravo nahoře), s manželkou před budovou vyšší státní reálky v Brně, kde měl sídlo Přírodovědecký ústav a kde Mendel přednášel o svých objevech (vlevo dole) a u hrobky augustiniánů na Ústředním hřbitově v Brně, kde je Mendel pohřben (vpravo dole).

V roce 2006 přijal profesor Nirenberg pozvání Mendeliana Moravského zemského muzea a převzal Mendelovu pamětní medaili udělovanou každoročně Mendelianem MZM v Brně. Ceremonie proběhla za účasti odborné i laické veřejnosti a sdělovacích prostředků dne 25. dubna 2006 v Dietrichsteinském paláci v Brně. Medaile byla profesoru Nirenbergovi udělena za jeho významný přínos k rozvoji Mendelova vědeckého odkazu a zdůrazněna byla také úloha Nirenbergovy práce v kontextu likvidace bariér ve vědě mezi Východem a Západem v šedesátých letech minulého století. Po slavnostním předání medaile proslovil laureát přednášku na téma: „Deciphering the Genetic Code“. Následně proběhla diskuse týkající se současné molekulární biologie, dosažených úspěchů a aplikací. Výsledky aktuální vědecké práce týmu profesora Nirenberga zaměřené například na homeoboxové geny byly den poté diskutovány také na Masarykově onkologickém ústavu v Brně a o několik dní později také na Karlově univerzitě v Praze. V Brně profesor Nirenberg s velkým zájmem navštívil tehdejší expozici Mendeliana MZM v budově veřejného ochránce práv a také místa spojená s působením J. G. Mendela.

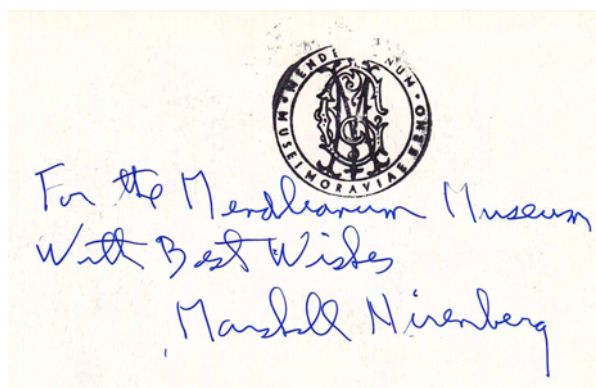
M. W. Nirenberg zemřel 15. ledna 2010.



Marshall Warren Nirenberg (1927 – 2010) se narodil ve městě New York, vzdělání v zoologii získal na University of Florida at Gainesville. Dále pokračoval ve studiích biochemie na University of Michigan (Department of Biological Chemistry), kde obhájil titul Ph.D. Postdoktorandské zkušenosti získával na National Institutes of Health (Bethesda, Maryland), kde obdržel stipendium jako biochemik (Section of Metabolic Enzymes). Tým profesora Nirenberga pracoval v National Institutes of Health zejména na objasnění mechanismů, které regulují genovou expresi během embryogeneze.

Profesor Nirenberg získal čestné tituly na University of Michigan, Yale University, University of Chicago, University of Windsor (Ontario) a Harvard University, byl členem American Academy of Arts and Sciences a National Academy of Sciences. Další ocenění zahrnují Molecular Biology Award of the National Academy of Sciences, Paul Lewis Award in Enzyme Chemistry of the American Chemical Society, National Medal of Science a mnoho dalších, v neposlední řadě Nobelovu cenu za fyziologii/medicínu.

Mendelianum MZM Brno si považuje za čest, že k dlouhému seznamu ocenění této významné osobnosti přibyla také Mendelova pamětní medaile z roku 2006.



Doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. je vědeckou pracovnící Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., docentkou fyziologie a farmakologie (Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno) a spolupracuje s Mendelianem MZM.

Úloha repetitivní DNA v evoluci pohlavních chromosomů

Eduard Kejnovský

Úvod

Původ a evoluce pohlavního rozmnožování a mechanismy **určení pohlaví** patří mezi základní otázky biologie. Zatímco většina živočichů jsou gonochoristé, mají oddělené samčí a samičí jedince, rostliny jsou převážně hermafroditní, výjimkou jsou pouze některé dvoudomé druhy. U některých druhů jako jsou želvy je pohlaví určeno environmentálními vlivy, jako jsou teplota, hustota populace či poměr pohlaví v populaci. Většina druhů má však genetické určení pohlaví, kde důležitou úlohu hrají pohlavní chromosomy. Pohlavní chromosomy jsou zvláštním párem chromosomů, který obsahuje dva více či méně (heteromorfní nebo homomorfní) divergované chromosomy, které nesou gen(y) determinující pohlaví. Pohlavní chromosomy se evolučně vyvinuly z jednoho páru autosomů. Pokud jsou dva různé pohlavní chromosomy u samců (samci jsou heterogametní), označují se tyto pohlavní chromosomy jako X a Y. Pokud je heterogametním pohlavím samička, mluvíme o chromosomech Z a W. Systém XY je běžný u savců a většiny dvoudomých rostlin, zatímco ZW systém je přítomný například u ptáků a motýlů.

Chromosom Y (analogicky také chromosom W v systému ZW) představuje unikátní část genomu, která při meióze nerekombinuje. Absence rekombinace vede ke dvěma důležitým procesům tvarujících chromosom Y – akumulaci repetitivních DNA sekvencí a degeneraci genů. Protože pohlavní chromosomy savců jsou evolučně staré (300 milionů let), je savčí chromosom Y značně zdegenerovaný, je malý a ztratil většinu ze svých původních genů. Proto jsou pro studium degenerativních procesů na chromosomu Y vhodné pohlavní chromosomy, které jsou v časnějších fázích své evoluce. Takové mladé pohlavní chromosomy má modelová dvoudomá rostlina silenka široolistá (*Silene latifolia*). Její pohlavní chromosomy jsou staré pouze asi 10 milionů let. Narozdíl od lidského chromosomu Y, který je velmi malý, je chromosom Y u *S. latifolia* největším chromosomem v genomu. Proč je chromosom Y tak velký?

Výsledky

V naší laboratoři jsme zjistili, že již u mladého pohlavního chromosomu Y u *S. latifolia* je možné sledovat obecné degenerační procesy. Srovnávali jsme **geny** nacházející se na chromosomu Y s jejich homology na chromosomu X. Zjistili jsme, že geny na chromosomu Y jsou méně transkribovány, obsahují ve svých intronech více různých repetitivních sekvencí DNA a jejich evoluce je rychlejší než v případě jejich partnerů na chromosomu X. Repetitivní DNA se však většinou hromadí v mezigenových oblastech. Kromě degenerace genů jsme sledovali akumulaci všech hlavních skupin repetitivní DNA na chromosomu Y. Z našich výsledků získaných v posledních letech jasně vyplývá, že repetitivní DNA přispívá ke značné velikosti chromosomu Y. Zůstává však otázkou, zda akumulace repetitivních sekvencí v genech a jejich okolí způsobuje degeneraci genů nebo naopak eroze genů je předpokladem akumulace repetitivních sekvencí v oblastech, jež se označují jako „genové pouště“.

Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) jsme zjistili, že na chromosomu Y u *S. latifolia* se akumuluje **plastidová DNA** (obrázek 1). Již dávno je znám fenomén tzv. „promiskuitní DNA“, kterou se označují úseky DNA přenesené mezi buněčnými genomy, zpravidla z organel do jádra. Porovnali jsme plastidové sekvence DNA pocházející z chromosomů Y a X získaných mikrodisekcí s jejich homologními sekvencemi pocházejícími přímo z chloroplastů (sekvenovali jsme BAC klon dlouhý 43kb nesoucí část plastidového genomu). Ukázalo se, že plastidové sekvence jaderného původu (promiskuitní DNA) jsou vysoce podobné homologickým sekvencím pocházejícím z organel. Podobnost byla nejvyšší v

případě genových oblastí, zatímco negenové úseky byly více divergované. Lze říci, že vysoká podobnost promiskuitní DNA s plastidovou DNA poukazuje na vysokou obměnu organelových sekvencí v jádře a na jejich nedávný přenos do jádra. Zůstává otázkou, zda-li obohacení chromosomu Y o plastidové úseky je výsledkem intenzivnějšího bombardování chromosomu Y promiskuitní DNA, nebo je až výsledkem selekčních procesů odstraňujících promiskuitní DNA. Lze předpokládat, že tyto procesy jsou méně účinné v nerekombinujících částech genomu.

Dalším typem sekvencí DNA, které jsou akumulovány na chromosomu Y u *S. latifolia* jsou **tandemové repetice**, někdy označované také jako „satelitní DNA“. U jedné z námi charakterizovaných tandemových repetic výrazně akumulovaných na chromosomu Y jsme zjistili, že má palindromickou sekvenci. Přítomnost palindromů je zajímavá ve světle nedávných objevů velkých palindromů na lidském chromosomu Y. Palindromy pravděpodobně představují jeden z obecných strukturních rysů chromosomu Y.

Systematicky jsme také studovali chromosomální distribuci krátkých jednoduchých sekvenčních motivů, tzv. **mikrosatelitů**. Zjistili jsme, že většina námi studovaných mono-, di- a trinukleotidových mikrosatelitů je akumulovaná na chromosomu Y. Nejsilnější akumulaci přitom vykazovaly mikrosatelity (CA, GA, CAA, GAA, CAG), u nichž je známo, že mohou nabývat neobvyklých konformací DNA, například tvořit tzv. „lepivou DNA“, nebo že jsou „horkými“ místy rekombinace. Spekulovali jsme proto, že mikrosatelity mohou dávat do kontaktu vzdálené oblasti DNA a tak pomáhat genové konverzi v její homogenizaci sekvenčních elementů nacházejících se na chromosomu Y. Úloha genové konverze v evoluci chromosomu Y byla navržena poté, co byly nalezeny velké palindromy u člověka a šimpanze. Genová konverze pravděpodobně homogenizuje homologické sekvence DNA včetně vícekopiových genů a tak představuje omlazující mechanismus, kterým se chromosom Y brání degeneraci.

Další velmi dynamickou složkou genomu jsou vedle mikrosatelitů také **transponovatelné elementy** (neboli transposony, TE). V naší laboratoři jsme izolovali a charakterizovali hlavní typy transposonů v genomu *S. latifolia*. Na počátku jsme postupovali pomalým tempem, kdy jsme byli schopni charakterizovat pouze jednotlivé elementy jeden po druhém s využitím plazmidových a BAC (bacterial artificial chromosome) knihoven. Naproti tomu v dnešní době používáme celogenomové přístupy založené na moderním masivním paralelním sekvenování (next generation sequencing) a charakterizujeme všechny hlavní repetitivní elementy v genomu najednou pomocí nástrojů bioinformatiky. U hlavních skupin TE jsme provedli chromosomální lokalizaci pomocí metody FISH. Zjistili jsme, že většina TE je rovnoměrně rozptýlena po všech chromosomech. Pouze retrotransposony typu *Copia* byly akumulovány na chromosomu Y (Obrázek1). Největším překvapením byl retrotransposon typu *Ogre*, který by přítomen na všech chromosomech s výjimkou chromosomu Y (tam je pouze v krátké koncové pseudoautosomální oblasti, která rekombinuje, tzv. PAR, viz Obrázek1). To bylo v rozporu se všemi modely predikujícími akumulaci TE na chromosomu Y. Absence *Ogre* elementu na chromosomu Y lze vysvětlit jeho aktivitou specifickou pro samičí jedince. Jiným vysvětlením neobvyklé lokalizace elementu, jež vlastně kolonizuje pouze rekombinující části genomu, by mohlo být hypotetické propojení jeho retrotranspozice s rekombinační mašinerií.

Evoluční síly tvarující pohlavní chromosomy jsou odlišné od sil působících na autosomech. Proto nás zajímalo porovnání struktury a sekvence TE nacházejících se na pohlavních chromosomech a autosomech. Pomocí mikrodisekce jsme separovali chromosomy Y, X a autosomy a použili je jako templát pro PCR amplifikaci různých typů TEs. Srovnání jejich sekvencí pak ukázalo, že elementy pocházející z různých chromosomů jsou odlišné. Tuto **intrachromosomální podobnost TE** vysvětlujeme působením procesu přednostní intrachromosomální homogenizace genovou konverzí. Homogenita byla přitom nejvyšší v

případě elementů pocházejících z chromosomu Y. To je v souladu s naší představou působení genové konverze na tomto chromosomu.

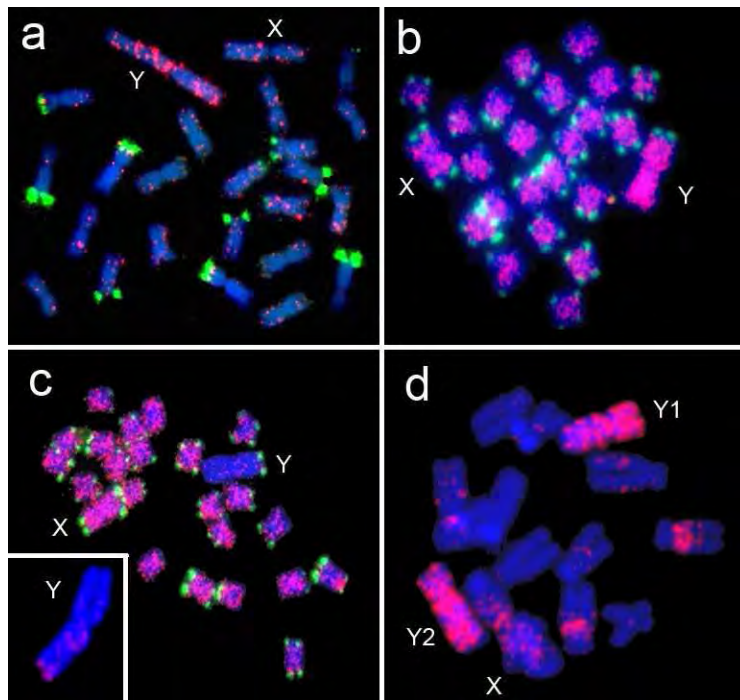
Stále je předmětem debat otázka, jaké procesy vedou k potlačení rekombinace mezi chromosomy X a Y. Obecně se předpokládá, že jsou za ni zodpovědné rozsáhlé **inverze** na chromosomu Y, které vedou k tomu, že původně homologické oblasti jsou zcela odlišné a proto nemohou rekombinovat. Původně homologické geny na chromosomech X a Y pak začnou divergovat a jejich divergence odráží různou dobu strávenou bez rekombinace. Geny s podobnou divergencí byly často předmětem jedné inverzní události a tvoří jakési evoluční „stratum“. Studiem pořadí genů na chromosomech X a Y a pomocí cytogenetických markerů jsme zkonstruovali nový model evoluce pohlavních chromosomů u *S. latifolia*. V tomto modelu předpokládáme, že v průběhu evoluce pohlavních chromosomů došlo k více inverzím na chromosomu Y. Náš model mimoto navrhuje umístění většiny genů blízko konců chromosomů.

Metodické zázemí

Při našich experimentech využíváme laserovou mikrodisekci chromosomů. Mikrodisektované chromosomy pak používáme buď k amplifikaci různých elementů nebo ke konstrukci chromosomově-specifických knihoven. Zkonstruovali jsme několik knihoven, jak genomových tak chromosomálních a to za použití jak plazmidových, tak i BAC vektorů. Elementy lokalizujeme na chromosomy pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Používáme její modifikace jako je například GISH (genomová *in situ* hybridizace), kdy je jako sonda použita celková genomová DNA, nebo BAC-FISH, kde jsou jako sondy použity BAC klony. Pro analýzu sekvencí DNA používáme nejrozličnější nástroje bioinformatiky. V současné době takto analyzujeme data z masivního paralelního sekvenování (454 a Solexa).

Naše plány

Snažíme se získat výsledky, které by nám umožnily vyvozovat co nejobecnější závěry týkající se evoluce pohlavních chromosomů i mobility transposonů na pohlavních chromosomech. Proto jsem započali práci na další dvoudomé rostlině – šťovíku kyselém (*Rumex acetosa*), který má starší a více degenerované pohlavní chromosomy Y a má unikátní systém XY₁Y₂. Kromě toho jsme zahájili experimenty na rybě trahira malá (*Hoplias malabaricus*), která naopak nese velmi mladé, téměř vznikající pohlavní chromosomy, kdy dokonce v rámci jediného druhu existují různé karyomorfy, např. XY, X₁X₂Y, nebYX. Studium více modelů nám umožní komparativní přístup, který zaměříme na procesy akumulace mikrosatelitů, homogenizaci a dynamiku tandemových repetič a transposonů i na kompenzaci dávky genů. U našich modelových systémů s pohlavními chromosomy máme v rámci jednoho genomu jak rekombinující (X a autosomy) tak i nerekombinující (Y) oblasti. Můžeme tudíž studovat evoluční význam rekombinačních procesů a jejich vliv na dynamiku genomu. Nedávno jsme zjistili, že u samčích a samičích jedinců *S. latifolia* jsou exprimovány odlišné transponovatelné elementy. Plánujeme porovnat exprimované elementy s elementy pocházejícími z chromosomů získaných mikrodisekcí, což by nám mělo umožnit vyvozovat závěry o transkripční aktivitě transposonů na chromosomech X a Y. Těmito a podobnými experimenty a analýzami můžeme přispět k hlubšímu pochopení vztahu mezi strukturou pohlavních chromosomů a jejich funkcí, ale i k prohloubení znalostí o dynamice repetitivní DNA, zejména transponovatelných elementů.



Obrázek 1. (a) plastidová DNA, (b) *Copia* retrotransposon, (c) *Ogre* retrotransposon a (d) mikrosatelit CAA. Signály červeně, zelené signály představují subtelomerickou tandemovou repetici. Samčí metafázní chromosomy *Silene latifolia* (a-c) a *Rumex acetosa* (d), chromosomy Y a X jsou označené.

Literatura

- Kejnovský E., Hobza R., Kubát Z., Čermák T., Vyskot B. (2009). The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* 102: 533-541.
- Kejnovský E., Leitch I., Leitch A. (2009). Contrasting evolutionary dynamics between angiosperm and mammalian genomes. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 572-582.
- Mariotti B., Manzano S., Kejnovský E., Vyskot B., Jamilena M. (2009). Accumulation of Y-specific satellite DNAs during the evolution of *Rumex acetosa* sex chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 249-259.
- Marais G.A.B., Nicolas M., Bergero R., Chambrier P., Kejnovský E., Moneger F., Hobza R., Widmer A., Charlesworth D. (2008). Evidence for degeneration of the Y chromosome in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Current Biology* 18: 1-5.
- Čermák T., Kubát Z., Hobza R., Koblížková A., Widmer A., Macas J., Vyskot B., Kejnovský E. (2008). Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. *Chromosome Research* 16: 961-976.
- Kubát Z., Hobza R., Vyskot B., Kejnovský E. (2008) Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome* 51: 350-356.
- Hobza R., Kejnovský E., Vyskot B., Widmer A. (2007). The role of chromosomal rearrangements in the evolution of *Silene latifolia* sex chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 633-638.

Kejnovský E., Hobza R., Kubát Z., Widmer A., Marais G.A.B., Vyskot B. (2007) High intrachromosomal similarity of retrotransposon long terminal repeats: Evidence for homogenization by gene conversion on plant sex chromosomes? *Gene* 390: 92-97.



Doc. RNDr. Eduard Kejnovský, CSc. je výzkumným pracovníkem Laboratoře vývojové genetiky rostlin Biofyzikálního ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně. Specializuje se na problematiku evoluce pohlavních chromozomů u rostlin (e-mail: kejnovsk@ibp.cz, tel 541517203).

Genetika na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze

Petr Pikálek

Katedra genetiky a šlechtění (KGŠ) je jednou z nejmladších a také nejmenších kateder Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů na pražské České zemědělské univerzitě (ČZU). Vznikla v roce 2008 rozdělením původní katedry genetiky a obecné zootechniky na dvě nové katedry, a to jednak KGŠ a jednak katedru obecné zootechniky a etologie. Na KGŠ v současné době pracuje 12 zaměstnanců, včetně 4 techniků a sekretářky. Na katedře působí jeden profesor (prof. Příbyl, v částečném úvazku, je kmenovým pracovníkem Ústavu živočišné výroby v Praze-Uhřetěvesi), tři docenti (doc. Mach, doc. Pikálek, doc. Vejl) a tři odborní asistenti (Ing. Sedlák, Ing. Sedláková, Ing. Vostrý). Jako externí pedagog s katedrou dlouhodobě spolupracuje také prof. Stratil (Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově). Na praktické výuce se úzce spolupodílí také současných šest prezenčních doktorandů katedry. Katedra je neformálně rozčleněna na dvě pracovní skupiny, které se věnují jednak populační genetice a šlechtění hospodářských zvířat, jednak molekulárně genetickému studiu a šlechtění užitkových plodin. „Třešničkou na dortu“ je výzkum v oblasti molekulární genetiky psů.

V **pedagogické oblasti** pracovníci KGŠ zajišťují výuku genetických a šlechtitelských předmětů na všech fakultách ČZU, i na všech stupních studia, tzn. jak bakalářském, tak magisterském i doktorském. Mezi stěžejní předměty patří *Obecná genetika*, *Genetika se základy biometrie*, *Genetika a šlechtění hospodářských zvířat*, *Šlechtění a semenářství*, *Tvorba a reprodukce odrůd*. Pro akademický rok 2009/10 byl připraven nový předmět *Základy genetiky* určený pro většinu studijních oborů bakalářských studijních programů fakulty. Předměty *Obecná molekulární biologie*, *Genetika rostlin*, *Biometrická genetika*, *Genetika populací*, *Šlechtění zvířat I a II*, *Cytologie a karyologie*, *Molekulární genetika zvířat a Genové technologie* umožňují profilaci ve šlechtění kulturních rostlin i hospodářských zvířat v magisterském i doktorském studiu, jak ve směru molekulárně genetickém tak biometrickém. Někdejší katedra genetiky původně zajišťovala i výuku etologie, chovu zvířat, obecné zootechniky či např. kynologie, od září 2008 však tuto výuku převzala nově vzniklá katedra obecné zootechniky a etologie, kam část pracovníků původní katedry odešla.

Výzkumná a odborná činnost je zaměřena zejména na

- studium variability primárních a sekundárních znaků hospodářských zvířat uvnitř populací a mezi populacemi a využití této variability ve šlechtění zvířat v malých i velkých populacích;
- studium vybraných chovatelských, ekonomických a genetických aspektů masné užitkovosti králíků (hybridizace masných plemen, hodnocení výkrmnosti a jateční hodnoty brojlerových králíků – testy hybridních populací);
- uchování genových rezerv hospodářských zvířat – regenerace a udržení České červinky, genetická analýza a šlechtění Starokladrubskeho koně;
- aplikace molekulárně genetických technik ve šlechtění hospodářských zvířat (detekce laktoproteinových genů a mikrosatelitů DNA u skotu a koní);
- využití genetických markerů (DNA markery) pro stanovení genetické struktury odrůd užitkových plodin, odrůdový fingerprinting a markerování hospodářsky významných znaků a vlastností (pšenice, jablň, brambory, chmel);
- studium markerů napomáhajících ve šlechtění rostlin, detekce genetických markerů rezistence vůči některým významným chorobám a škůdcům rostlin.

Pracovníci katedry se rovněž významně spolupodílejí na řešení dílčích projektů celofakultního výzkumného záměru „Setrvalé zemědělství, kvalita zemědělské produkce, krajinné a přírodní zdroje“. V oblasti celoživotního vzdělávání realizuje katedra postgraduální kurz Molekulárně genetické analýzy rostlinného genomu a na ČZU dále zajišťuje řadu jednorázových přednášek pro frekventanty Univerzity třetího věku.



Doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc., je vedoucím katedry genetiky a šlechtění na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze (e-mail: pikalek@af.czu.cz).

Molekulární analýzy genomu psa

Pavel Vejl a Daniela Čílová

Úvod

Pes domácí patří mezi nejstarší domestikovaná zvířata. První známky domestikace jsou patrné z kosterních nálezů pocházejících z Iráku a Iránu starých 10 000 – 15 000 let. Tato dlouhá doba vzájemného soužití člověka a psa byla klíčová pro podchycení řady spontánních mutací, které byly na základě plánovaného křížení vybraných jedinců a následné selekci zafixovány v podobě vlastností charakteristických pro historická i současná psí plemena. Psa lze tudíž považovat za jedno z domácích zvířat, které vykazuje nejvyšší variabilitu mezi plemeny. Vysoký stupeň meziplémenné variability se týká nejen znaků kvalitativních, jako je například barva, délka a struktura srsti, postavení a tvar boltců, nesení ocasu, ale rovněž i znaků kvantitativních – tělesná hmotnost, kohoutková výška nebo délka těla. Domestikace psa

se výrazně podílela rovněž i na značné variabilitě povahových rysů jednotlivých plemen, které mnohdy vyplývají z jejich původního i současného pracovního využití.

Všechny výše uvedené skutečnosti staví psa rovněž do pozice velice vhodného genetického modelu jak v oblasti klasické, populační i molekulární genetiky. **Výhody genetického výzkumu psů** je možné shrnout do následujících bodů:

- vysoký stupeň variability kvalitativních, kvantitativních i psychických vlastností
- čistokrevná plemenitba a vedení rodokmenů
- relativně snadný způsob získávání genetického materiálu plynoucí z velké frekvence chovaných psů v domácnostech
- dobrá úroveň zmapování psího genomu včetně řady dostupných bioinformatických dat
- doposud žijící předci – vlk a šakal.

Z těchto důvodů byl pes domácí vybrán jako modelový živočišný organismus pro výuku molekulárně genetických předmětů Katedry genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze. Aktivita, které budou následně detailněji popsány, byly podporovány jedním grantovým projektem GA FAPPZ ČZU v Praze a finančními prostředky katedry. V úvodu bych rád podotknul, že všechny vědecké aktivity jsou **realizovány přímo na pracovišti katedry**. V žádném případě se nejedná o molekulární analýzy prováděné jinými laboratořemi v rámci placených služeb. Během let 2008 – 2009 se na našem pracovišti podařilo vyvinout nebo optimalizovat řadu metod detekce alelických variant u několika významných psích genů. Hodnocené geny, respektive skupiny genů je možné rozdělit do následujících skupin:

- geny řídící barvu srsti
- geny zodpovědné za některé růstové parametry
- geny s předpokládaným efektem na psychické vlastnosti psů.

V následujících kapitolách bude pouze přehled těch vybraných vlastností, které jsou v současnosti studovány na naší katedře na úrovni molekulární genetiky.

Izolace genomové DNA

Katedra genetiky a šlechtění v současnosti plně zvládá izolaci genomické DNA ze stěrů bukalních sliznic, chlupových cibulek a krve. V současné době jsou pracovišti archivovány vzorky několika stovek DNA psů **řady plemen**: australský honácký pes, bearded kolie, belgický ovčák, československý vlčák, německý ovčák, Saarloosův vlčák, šarplaninský pastevecký pes, slovenský čuvač, velškorgi, anglický mastif, bernský salašnický pes, buldok, bulmastif, černý ruský teriér, dobrman, hovavart, kavkazský pastevecký pes, landseer, leonberger, knírač, neapolský mastin, německá doga, novofundlandský pes, svatobernardský pes, španělský mastin, tibetská doga, velký švýcarský salašnický pes, skotský teriér, west highland white teriér, jezevčík, lajka, basethund, bígl, rhodéský ridgeback, irský setr, maďarský krátkosrstý ohař, výmarský ohař, labradorský retrívr, zlatý retrívr, pudl, irský vlkodav a vipet. Nejpočetnější vzorky byly doposud získány u plemen československý vlčák, německý ovčák, bearded kolie a jezevčík. Tato plemena jsou prezentována soubory 120 – 150 jedinců chovaných v České republice i v zahraničí. V rámci kolekce je uchovávána rovněž DNA několika vlků šedých a jejich kříženců se psy F₁ a F₂ generace.

Molekulární analýzy genů řídících zbarvení psů

Variabilita zbarvení srsti psů patří zcela jistě mezi jedny z nejnápadnějších fenotypových rysů. Genetická determinace barvy srsti byla na základě klasické genetiky zkoumána již od poloviny 20. století. Mezi jedny z nejstarších pokusů charakterizovat alely související se zbarvením srsti lze považovat práci Little (1957). Tyto práce vycházejí ze studia segregačních analýz. Současné metody studia genetických mechanismů determinace barev vycházejí z molekulárních analýz DNA a z aminokyselinových charakteristik jednotlivých

pigmentů. Přehled o genech kódujících proteiny související se zbarvením srsti podávají Schmutz *et al.* (2007). Tučným textem jsou zvýrazněny proteinové produkty, respektive geny, které je kódují, a které jsou na našem pracovišti zkoumány:

- **melanocortin 1 receptor**
- **protein 1 spojený s tvorbou tyrosinázy**
- **agouti signální peptid**
- melanophilin
- SILV
- transkripční faktor spojený s mikrooftalmií
- **beta-defensin 103.**

Gen *MC1R* kódující melanocortin 1 receptor

Tento gen patří mezi první geny související se zbarvením srsti, které byly zkoumány na molekulární úrovni (Newton *et al.*, 2000). Jedná se zřejmě o gen, který Little (1957) označil jako E – extension. Gen je lokalizován na 5 páru autozómů psího karyotypu. Byla detekována bodová mutace 914C>T, která způsobuje zařazení STOP kodónu v molekule mRNA místo aminokyseliny arginin. V důsledku této mutace vzniká pre-mRNA, která je následně translací přeložena do podoby nefunkčního receptoru melanocortinu 1. Z hlediska klasické genetiky se jedná o recesivní mutaci, která se fenotypově projevuje neschopností tvořit tmavý pigment – melanin ve všech částech chlupů po celém těle. Výsledkem je jednotné žluté až červené zbarvení srsti typické pro žluté labradorské retrievery, meruňkově zbarvené pudly nebo pro irské setry. Jedinci s tímto zbarvením vykazují přítomnost mutací na obou homologních chromozómech. Z hlediska klasifikace alel podle Little (1957) se jedná zřejmě o psy s recesivně homozygotním genotypem ee. Na našem pracovišti byla optimalizována detekce této bodové mutace pomocí PCR-RFLP při použití primerů, které navrhnul Newton *et al.* (2000). Schmutz *et al.* (2003) detekoval další bodovou mutaci tohoto lokusu, která je zodpovědná za vznik melanistické masky u psů se základní plavou barvou srsti. Na základě bioinformatických studií nukleotidové sekvence této zmutované alely byly na našem pracovišti navrženy primery pro amplifikaci regionu *MC1R* genu nesoucího tuto mutaci. Detekce substituce je následně prováděna na základě restričního štěpení.

Gen *TYRP1* kódující protein 1 spojený s tvorbou tyrosinázy

Gen *TYRP1* zřejmě odpovídá genu B, který popsal Little (1957). Tento gen kontroluje vznik černého nebo hnědého zbarvení. Tento gen byl zmapován na 11 autozómu. Molekulárním analýzám tohoto genu se věnoval Schmutz *et al.* (2002), který identifikoval 3 typy bodových mutací v tomto lokusu. První z mutací zapříčiňuje vznik terminačního kodónu v exonu 5, druhá mutace způsobuje delecii tripletu kódujícího prolin rovněž v exonu 5. Tyto mutace jsou detekovány na základě PCR-RFLP analýzy, kterou navrhl Schmutz *et al.* (2002). Tato metodika byla na našem pracovišti úspěšně optimalizována a použita na genotypizaci psů s hnědým zbarvením. Třetí doposud známá mutace se týká exonu 2, kde 121T>C způsobuje, že ve výsledném peptidu je nahrazen serin cysteinem. Tuto bodovou mutaci nelze rozpoznat PCR-RFLP analýzou, protože změna nukleotidů nezasáhla žádné rozpoznávací místo restričních endonukleáz. Na našem pracovišti byly navrženy primery pro PCR amplifikaci úseku DNA nesoucí tuto bodovou mutaci poskytující ampikon do velikosti 200 bp, jehož polymorfismus je následně zkoumán metodou SSCP (Single Sequence Conformation Polymorphism).

Gen *ASIP* kódující agouti signální peptid

Gen *ASIP*, který byl zmapován na 24 chromozómu psa (Kerns *et al.*, 2004) odpovídá genu A, který charakterizoval Little (1957). U tohoto genu byly molekulárními analýzami

prokázány 4 alely vykazující postupnou úplnou dominanci ($a^y > a^w > a^t > a$). Dominantní alela A_s , která je dle Little (1957) zodpovědná za černé dominantní zbarvení srsti psů, nebyla doposud molekulárně prokázána. Je pravděpodobné, že dominantně dědičná černá barva je řízena lokusem pro beta defensin 103, který bude zmiňován dále. Všeobecně se předpokládá, že původní nezmutovaná alela a^w (wild) je zodpovědná za „přepínání“ exprese během růstu chlupů, která vede k vytváření typických pigmentovaných a nepigmentovaných zón na jednotlivých chlupech. Toto zbarvení je charakteristické pro vlky, šakaly, německé ovčáky, československé vlčáky a ostatní plemena vykazující původní nedomestikovanou formu agouti zbarvení. Alela a^y (yellow) vznikla jako dominantní mutace. Je charakteristická vznikem žluté a červené základní barvy chlup s tmavším zakončením a výskytem omezeného počtu tmavých chlupů v srsti. Zbarvení řízené touto alelou je označováno jako plavé nebo sobolí. Je charakteristické například pro zlatě zbarvené boxery, německé dogy, červené jezevčíky nebo pšeničně zbarvené rhodeské ridgebacky. Alela a^t (tan) je charakteristická vznikem světlého pálení u psů se základní černou, hnědou nebo modrou barvou srsti. Poslední z alelické série je alela a , která je v homozygotní sestavě zodpovědná za vznik černého zbarvení s recesivním způsobem dědičnosti. Tento způsob genetické determinace černé barvy srsti není u psích plemen příliš rozšířen. Je charakteristický například pro celočerné německé ovčáky, šeltie, belgické ovčáky, šiperky a puli. Pomocí molekulárních analýz byly odhaleny bodové mutace zodpovědné za vznik alel a^y a a . Na našem pracovišti byly úspěšně optimalizovány PCR-RFLP metody detekce a^y alely podle Berryere *et al.* (2005), a^w alely a a alely podle Schmutz *et al.* (2007). Touto analýzou bylo prokázáno, že například plavá barva u bearded kolíí není řízena alelou a^y , nýbrž se jedná o zředěný hnědý pigment řízeným genem *TYRP1*. Výskyt této alely byl námi naopak prokázán u jezevčíků s různou intenzitou žluté až červené barvy srsti.

Gen *K* kódující beta-defensin 103

Původní nemutovaná alela tohoto lokusu - k^Y kóduje vznik formy beta-defensinu, který se s velkou afinitou váže na produkt genu *MC1R* – receptor melanocortinu. Tento receptor je zabudován v cytoplazmatické membráně a ovlivňuje typické „přepínání“ tvorby pigmentu, které je charakteristické pro pruhované agouti chlupy (Candille *et al.*, 2007). Toto pruhování je charakteristické přepínáním mezi biosyntézou tmavě zbarveného eumelaninu a žlutě zbarveného pheomelaninu. Protein označovaný jako agouti, který je kódovaný výše zmíněným genem *ASIP* funguje jako extracelulární ligand, který se na principu kompetice váže na melanocortinový receptor 1 a reguluje tak přepínání mezi biosyntézou eumelaninu a pheomelaninu. Pokud v lokusu *MC1R* proběhla mutace vedoucí ke vzniku prematurního STOP kodónu, dochází k syntéze nefunkčního melanocortinového receptoru 1, který nevykazuje afinitu k proteinu agouti. V melanocytech tudíž probíhá pouze biosyntéza žlutě zbarveného pheomelaninu. Tato mutace již byla popsána v předchozí kapitole a odpovídá recesivní alele e . Candille *et al.* (2007) se věnoval výzkumu účinku proteinu CBD103 respektive dalšímu proteinu, který vznikl na základě zmutované alely označené jako K^B (black). Tato alela byla odhalena u psů, kteří vykazovali dominantní dědičnost černé barvy srsti. Candille *et al.* (2007) na základě sekvenací původní a zmutované alely zjistili rozdíl v deleci 3 nukleotidů, kódujících zařazení aminokyseliny glycinu. Ztráta glycinu změnila strukturu a funkčnost beta-defensinu 103, který se v této mutantní podobě navazuje na membránový melanocortinový receptor 1 a indukuje produkci eumelaninu.

Candille *et al.* (2007) však neuvádí, jak detekovat přítomnost alelického polymorfismu lokusu *K*. Za velice originální považují to, že v naší laboratoři se podařilo vyvinout metodu identifikace rozdílů mezi alelami k^Y a K^B . Na základě delece glycinu byl pomocí nukleotidové databáze NCBI nalezen sekvenční polymorfismus kódující sekvence DNA, který umožnil navržení dvou párů specifických PCR primerů.

Geny zodpovědné za některé růstové charakteristiky psů

Vlastnosti charakterizující růst, jako je například kohoutková výška, délka končetin nebo tělesná hmotnost, lze z pohledu klasické genetiky jednoznačně označit za znaky kvantitativní, u kterých se předpokládá polygenní způsob dědičnosti. Existují však známé kandidátní geny, u kterých je předpokládán majoritní efekt na některé typické znaky jednotlivých plemen. Pro tyto experimenty byla v naší laboratoři vybrána nízkonohá plemena psů – zejména jezevčík a basethund, která jsou charakterizována z hlediska výskytu mutovaných alel dvou lokusů:

- *COL10A1* řídící vznik chondrodysplazie (SMCD)
- *SOCS2* kódující supresor signalizační funkce cytokinů.

Variabilita genu *COL10A1*

Gen *COL10A1* kóduje vznik tak zvaného 10 typu alfa kolagenu, který patří mezi kolageny s krátkým řetězcem syntetizované v chondrocytech v průběhu růstu dlouhých kostí. Mutace tohoto genu u člověka je příčinou růstové poruchy označované jako SMCD (Schmid Metaphyseal Chondrodysplasia), která je charakteristická zejména výrazným zkrácením stehenních a lýtkových kostí (Pokharel *et al.*, 1995).

Gen *COL10A1* byl zjištěn rovněž i u psů. Young *et al.* (2006) považovala tento gen za kandidátní gen pro skeletální dysplazii u nízkonohých plemen psů. Tento gen byl sekvenován u vybraných plemen psů s variabilní délkou končetin. Young *et al.* (2006) identifikovala podové polymorfismy exonů 2 a 3, které byly charakteristické pro plemena s typickou skeletální dysplazií. V naší laboratoři jsme podle bioinformatických dat nukleotidové databáze NCBI navrhli 3 specifické PCR-RFLP markery, které postihují bodové mutace 241, 440 a 838 páru nukleotidů exonu 3. Všechny tyto mutace vedou ke změně aminokyselinového složení kódovaného peptidu. Z našich předběžných výsledků vyplývá, že bodová mutace v pozici 440 nevykazuje u širokého souboru jezevčíků homozygotní alelickou sestavu, jak uvádí Young *et al.* (2006). Z tohoto pohledu se nebude jednat o mutaci, která umožňuje zafixovat skeletální dysplazii jako plemenný znak. Mutace v pozici 838 nukleotidu byla opakovaně detekována u řady plemen, které postrádají jakékoliv rysy skeletální dysplazie. V současné době se v naší laboratoři zabýváme rovněž detekcí 4 a 9 bázevých delecí exonu 3 genu *COL10A1*, která mohou teoreticky zapříčinit zkrácení končetin psů.

Variabilita genu *SOCS2*

Produkt tohoto genu představuje supresor, který negativně reguluje signalizační účinek cytokinů. Cytokiny jsou sekreční proteiny, které se regulují celou řadu procesů. Účastní se například regulace růstu těla v postnatálním období, imunologické odpovědi, tlumení zánětů, hematopoézy (Greenhalg a Hilton, 2001). Supresory cytokinů patří mezi intracelulární peptidy, které negativně regulují intenzitu a dobu signalizace cytokiny. Inhibitor kódovaný genem *SOCS2* je schopen ovlivňovat signalizační aktivity řady cytokinů – například interleukinu 6, faktoru inhibujícího leukémii, růstového faktoru IGF-1, prolaktinu nebo růstového hormonu (Krebs a Hilton, 2001).

Mutace tohoto genu jsou z hlediska molekulární genetiky zkoumány nejen u člověka, ale u některých laboratorních zvířat. Corva a Medrano (2000) zjistili, že některé mutace tohoto genu u myši mohou zvyšovat o 30 – 50% postnatální intenzitu růstu těla. Analýzy prováděné v naší laboratoři vycházejí z hypotézy, kterou formuloval Rincón *et al.* (2007). Tento autor rozdělil vybraná plemena psů podle tělesného rámce na velká plemena a malá plemena. Podařilo se mu identifikovat polymorfismy lokusu, které byly charakteristické pro velká plemena, jako je například německá doga, rotvajler nebo bernský salašnický pes. Tento polymorfismus spočíval v substituci 326G>T, která ve finálním peptidu způsobila záměnu

kyseliny asparagové za tyrosin v SH doméně interagující s IGF-1 receptorem. Výsledky Rincón *et al.* (2007) plně korespondovaly se zařazením plemen do tříd podle tělesného vzrůstu s jednou výjimkou – plemeno jezevčák, které je rovněž naším modelovým plemenem. Rincón *et al.* (2007) u plemene jezevčák detekoval 6 % jedinců s výskytem zmutované alely typické pro plemena s obřím vzrůstem. Tento výsledek autor vysvětluje tím, že jezevčák je odvozen od honiče s velkým tělesným rámcem, u kterého došlo k mutaci vedoucí ke skeletální dysplazii.

V naší laboratoři byla optimalizována PCR-RFLP metoda detekce této alely podle primerů, které navrhnul Rincón *et al.* (2007). Výskyt zmutované alely byl potvrzen i u české populace jezevčáků. Doposud tato alela byla na našem pracovišti detekována u jezevčáků pouze v heterozygotní sestavě a pouze u standardního velikostního rázu.

Tyto analýzy jsme rovněž prováděli u široké škály plemen s velkým nebo obřím vzrůstem. Podařilo se nám detekovat potenciální nové alely lokusu *SOCS2* u plemen bernský salašnický pes a labradorský retrívr, která vykazují menší velikost PCR amplikonu a teoreticky mohou odpovídat alelám s delecí. Tyto nové alely byly nalezeny vždy v heterozygotní sestavě. V současné době probíhá izolace těchto amplikonů z gelového nosiče s cílem jejich následné sekvenace a potvrzení nebo vyvrácení hypotézy o jejich alelickém charakteru.

Geny zodpovědné za psychické vlastnosti psů

Mezi psychické vlastnosti psů jsou různými autory řazeny například impulzivita, agresivita, schopnost soustředit se při výcviku, schopnost navazovat kontakt s lidmi a ostatními psy, bázlivost, apatie, tendence k prozkoumávání nového prostředí, tendence k samostatnému jednání. Mnohé z těchto vlastností jsou považovány za typické rysy jednotlivých plemen. Pro kvantitativní znaky platí, že jejich projev je do značné míry ovlivněn negenetickými faktory. Pro psychické vlastnosti psů toto platí dle mého názoru ještě mnohem výrazněji. Průběh odchovu štěnat, socializační fáze, výcviku, zdravotní stav a celá řada dalších vlastností se jednoznačně odrážejí na psychice jednotlivých psů. Dalším významným faktorem, který může výrazně zkreslovat posouzení psychických vlastností je člověk – majitel nebo pozorovatel psů mající všeobecnou tendenci polidšťovat a mnohdy nepříliš objektivně hodnotit psychické vlastnosti zvířete. Tímto odstavcem jsem chtěl pouze naznačit, že spolehlivé “fenotypové hodnocení” psychických vlastností psa je zatíženo mnohonásobně větší chybou než jednoznačná identifikace barvy srsti nebo zkrácení končetin. Přesto i v této oblasti živočišné genetiky existují pilotní práce, které si kladou za cíl nalézt vztahy mezi expresí některých genů a výslednou psychickou charakteristikou psa jako jednotlivce nebo dokonce jako plemene.

Tyto experimenty vycházejí, jak je u savců obvyklé, ze sekvenčních podobností mezi lidským a psím genomem. Jedním z genů, který je v této souvislosti studován je *DRD4* kódující dopaminový receptor.

Polymorfismus genu *DRD4*

Dopamin patří mezi neurotransmitery, které u člověka navozují po navázání na dopaminové receptory určité druhy pocitů. Dopamin je sekretován v různých částech mozku a patří mezi ústřední látku v tak zvaném odměňovacím systému, který se projevuje pocitem uspokojení po dosažení vytýčených cílů. Dopamin bývá rovněž označován jako motivační hormon. Významnou roli hraje rovněž v poznávacích procesech, pohybové aktivitě, regulaci spánku, nálad, pozornosti a schopnosti se učit (Jelínek, 2008).

Psychické poruchy člověka, které souvisejí s výše uvedenými regulačními aktivitami dopaminu, byly sledovány rovněž na molekulární úrovni. Řada pracovišť zaměřených na humánní genetiku se věnuje studiu polymorfismů genů pro dopaminový receptor. Jedním z

těchto genů je gen *DRD4*, který patří mezi nejlépe prostudované. Molekulární výzkum je zaměřen zejména na exon 3, který kóduje peptid tvořící typickou doménu – smyčku, jež funguje jako vlastní receptor dopaminu. Pro exon 3 je charakteristická struktura tvořená variabilním počtem opakování specifických nukleotidových motivů – VNTR (Variability of Number Tandem Repeats). V rámci jednotlivých motivů byly u lidského *DRD4* genomu detekovány rovněž jednonukleotidové polymorfismy – SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) (Lichter *et al.*, 1993). Počet opakování jednotlivých motivů se u člověka pohybuje od 2 do 11, přičemž v lidské populaci je nejčetnější opakování 4 motivů (65,1% populace) a 7 motivů (19,2% populace). Předpokládá se, že repetice tvořená 7 motivy vznikla jako složitější typ mutace – duplikace přibližně před 40 000 lety v období paleolitu. V současnosti je pozitivní výskyt repetice 7 motivů spojován se zvýšeným rizikem výskytu ADHD (Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder). V této oblasti existuje celá řada prací, které prokazují korelaci mezi repeticí 7 motivů a výskytem ADHD. Přibližně stejné počty prací však tuto korelaci jednoznačně nepotvrzují. Zajímavou studii přináší Ding *et al.* (2002), který vyslovil hypotézu o pozitivní selekci lidí nesoucích již zmiňovanou repetici 7 motivů. Svou teorii opírá o skutečnost, že odhadovaný vznik této mutace spadá do období paleolitu, který je charakteristický rozvojem zemědělství a prvních výrobních technologií. Ding *et al.* (2002) se domnívá, že právě lidé s touto repeticí, kteří by dnes byli diagnostikováni jako ADHD, měli v důsledku poruchy vnitřního odměňovacího systému neustálý zájem o nové aktivity, činnosti a mohli tudíž stát u zrodu nových technologií. Autor předpokládá u těchto jedinců i zvýšenou promiskuitu v oblasti sexuálního života, která mohla být teoretickým pozitivním selekčním faktorem vedoucím k výraznému zvýšení frekvence této mutace v populaci.

V předchozím odstavci jsem se pokusil stručně shrnout základní aspekty vedoucí k výzkumu *DRD4* genu u člověka. Cílem komparativní molekulární biologie je vyhledávání sekvenčních a fenotypových podobností například mezi člověkem a zvířetem. Podobné trendy lze pozorovat i při výzkumu *DRD4* genu u myší, psů a koní. U psů v této oblasti dominují japonská vědecká pracoviště, která poprvé charakterizovala variabilitu psího *DRD4* genu (Niimi *et al.* 1999, Ito *et al.*, 2004). Výše citovaní autoři zjistili, že exon 3 psího *DRD4* genu vykazuje rovněž strukturu VNTR. Identifikovali celkem 7 alel, které se lišily rovněž počtem opakování jednotlivých motivů. Délka jednotlivých motivů není identická s VNTR lidského *DRD4* genu. SNP polymorfismus byl detekován pouze u alely s 8 opakováními. Tato alela patří mezi nejrozšířenější alely vyskytující se napříč různých psích plemen. Další japonský autor Maejima *et al.* (2007) se snaží statisticky prokázat vliv jednotlivých alel *DRD4* genu na psychické vlastnosti labradorských retrievrů, jako je například touha pracovat nebo roztěkanost psů během výcviku. Závislost mezi detekovaným genotypem v lokusu *DRD4* a vhodností psa pro všeobecný výcvik nebyla zjištěna. Maejima *et al.* (2007) stejně jako Ito *et al.* (2004) pouze potvrdili, že existují alely *DRD4* genu, které se u jednotlivých plemen vyskytují s vyšší frekvencí a jsou pro jednotlivá plemena respektive skupiny plemen obdobného geografického původu charakteristické. V Evropě se obdobné problematice věnuje pouze maďarské pracoviště (Hejjas *et al.* 2007), které se snaží prokázat vliv alel lokusu *DRD4* na aktivitu a impulzivitu u německých ovčáků chovaných v rodinách a v policejních útvarech. Dle mého názoru plemeno německý ovčák není z hlediska očekávané variability genu *DRD4* příliš vhodně zvoleno. Toto plemeno je charakteristické velice těsným stupněm příbuzenské plemenitby, který se nutně musí odrazit i na variabilitě alel studovaného lokusu *DRD4*. Toto prokázali samotní autoři článku, kteří u hodnocených zvířat našli pouze 2 typy alel a to alely, které jsou všeobecně rozšířené u většiny psích plemen.

V naší laboratoři byla úspěšně optimalizována detekce alel genu *DRD4* s využitím primerů publikovaných autory Niimi *et al.* (1999) a Ito *et al.* (2004). V současnosti jsme schopni identifikovat polymorfismy, jak exonu 3, tak i exonu 1. Doposud jsme analyzovali

zejména plemena různého geografického původu a různého pracovního využití. V úvodu bych rád konstatoval, že naším cílem není nalezení závislosti mezi konkrétní genotypizací jedince a více či méně přesnou charakterizací psychických vlastností konkrétního jedince. Naše hypotéza je spíše opačná. Předpokládáme výskyt specifických alel u jednotlivých plemen, ale nikoliv těsnou korelaci s psychickou charakteristikou jednotlivců. Proč jsme zvolili tuto hypotézu? Již řada studií humánní genetiky poukazuje na neprůkaznost závislosti, která byla stanovena u 6-7letých dětí, u kterých je mnohem jednodušší charakterizovat vnější faktory mající vliv na vývoj jejich psychiky. Rovněž realizace a vyhodnocení psychologických testů je u člověka mnohem jednoznačnější a reprodukovatelnější než u psů. Přesto jsme z hlediska variability alel *DRD4* genu hodnotili vybrané zástupce plemene československý vlčák s výraznou agresivitou a bázlivostí. Závislost mezi alelami a hodnocením povahy psů nebyla zjištěna.

V současné době připravujeme obdobnou analýzu u původně pracovního plemene bearded kolie. U tohoto plemene jsme identifikovali vyšší alelickou variabilitu exonu 3 lokusu *DRD4*. V rámci České republiky je u tohoto plemene realizován volný chov bez výrazné selekce na pracovní vlastnosti. Tento fakt by měl na rozdíl od pracovních linií německých ovčáků způsobit vyšší variabilitu, jak na úrovni alel, tak na úrovni psychických vlastností jednotlivých psů. Na základě dotazníkových hodnocení i na základě diskusí s chovateli je zřejmá značná variabilita v chování jednotlivých psů, která z lidského pohledu může být přirovnána k hyperaktivitě dětí trpících syndromem ADHD.

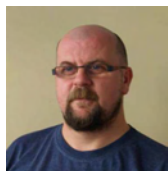
Další naše aktivity jsou zaměřeny na vyhledávání nových alel a SNP. Při hodnocení variability exonu 3 *DRD4* genu jsme u plemene Saarloosův vlčák identifikovali alelu, která při separaci v denaturačních podmínkách akrylamidového gelu vykazuje shodnou mobilitu jako jedna známá alela. Ale při separaci v nedenačním prostředí agarózového gelu migruje výrazně pomaleji. Tuto disproporci si zatím vysvětlujeme teorií sekvenční variability (SNP) této alely, která je způsobena vytvoření odlišné terciární struktury molekuly. Této hypotéze nasvědčuje i skutečnost, že PCR ampikon je bohatý na GC repetice a má značnou tendenci vytvářet vlásenkové struktury.

V závěru této podkapitoly bych velice rád poznamenal, že detekce polymorfismů *DRD4* genu nepatří mezi nejjednodušší a ani nejlevnější typy analýz, které provádíme. Příčinou je specifická sekvence amplifikované oblasti, která u templátové DNA i u jednotlivých amplifikovaných kopií má značnou tendenci vytvářet terciární struktury. Vysoký obsah GC párů bází způsobuje obtížnou denaturaci. Z těchto důvodů není možné pro amplifikace používat standardní *Taq* polymerázy. Rovněž reakční směs je nutno doplnit o řadu komponent napomáhajících denaturaci DNA. Detekce polymorfismů ampikonů vyžaduje použití speciálních typů agaróz nebo separaci na polyakrylamidovém gelovém nosiči.

Literatura

- Berryere, T. G., Kerns, J. A., Barsh, G. S., Schmutz, S. M. (2005). Association of an Agouti allele with fawn or sable chat color in domestic dogs. *Mammalian Genome* 16: 262 – 272.
- Candille, S. I., Kaelin, C. B., Cattanaach, B. M., Yu, b., Thompson, D. A., Nix, M. A., Kerns, J. A., Schmutz, S. M., Milhauser, G. L., Barsh, G. S. (2007). A β -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science* 318: 1418-1423.
- Corva, P. M., Medrano, J. F. (2000). Diet effects on weight gain and body composition in high growth (hg/hg) mice. *Physiol. Genomics* 3: 17 – 23.
- Ding, Y.C., Chi, H. C., Grady, D. L., Morishimam, A., Kidd, J. R., Kidd, K. K. (2002). Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 309 – 314.

- Greenhalgh, C. J., Hilton, D. J. (2001). Negative regulation of cytosine signaling. *J. Leukocyte Biol.*, 70: 348-356.
- Hejjas, K., Vas, J., Topal, J., Szantai, E., Ronai, Z., Szekely, A., Kubinyi, E., Horvath, Z., Sasvari-Szekely, M., Miklosi, A. (2007) Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Anim Genet* 38: 629–633.
- Ito, H., Nara, H., Inoue-Murayama, M., Shimada, M. K., Koshimura, A., Ueda, Y., Kitagawa, H., Taheuchi, Y., Mori, Y., Murayama, Y., Morita, M., Iwasaki, T., Ota, K., Tanabe, Y., Ito, S. (2004). Allele frequency distribution of the canine dopamine receptor D4 gene exon III and I in 23 breeds. *Journal of Veterinary Medicine Science* 66: 815 – 820.
- Jelínek, V. (2007). Dopamin, *Joalis Info*, 13.
- Kerns, J. A., Newton, J., Berryere, T. G., Rubin, E. M., Cheng, J. F., Schmutz, S. M., Barsh, G. S. (2004), Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti station in German shepherd dogs. *Mammalian Genome* 15: 798 – 808.
- Krebs, D. L., Hilton, D. J. (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytosine signaling. *Stem Cells* 19: 378-387.
- Lichter, J. B., Barr, C. L., Kennedy, J. L., Van Tol, H. M., Kidd, K. K., Livak, K. J. (1993). A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Human Molecular Genetics* 6: 767 – 773.
- Little, C. C. (1957). The inheritance of chat color in dogs. Comstock Publishing ass., 232.
- Maejima, M., Inoue-Murayama, M., Tonosaki, K., Matsuura, N., Kato, S., Saito, Y., Weiss, A., Murayama, Y., Ito, S. (2007). Traits and genotypes may predict the successful training of drug detection dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 107: 287–298.
- Newton, J., Wikie, H., He, L., Jordan, S., Metallinos, D. (2000). Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mammalian Genome* 11: 24 - 30.
- Niimi, Y., Inoue-Murayama, M., Murayama, Y., Ito, S., Iwasaki, T. (1999). Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphic region in two dog Breeds, Golden retriever and Shiba. *Journal of Veterinary Medicine Science* 61: 1281 – 1286.
- Pokharel, R. K., Alimsardjono, H., Uno, K., Fujii, S., Shiba, R., Matsuo, R. (1995). A novel station substituting tryptophan with arginine in the karboxyl-terminal non-collagenous domain of collagen X in a case of schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 1157-1162.
- Rincón, G., Zoung, A. E., Bannasch, D. L., Medrano, J. F. (2007). Characteriyation of variation in the canine suppressor of cztokine signaling-2 (SOCS2) gene. *Genetics and Molecular Research* 6: 144-151.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Barta, J. L., Reddick, K. D., Schmutz, J. K. (2007). Agouti Sequence Polymorphisms in Coyotes, Wolves and Dogs Suggest Hybridization. *Journal of Heredity* 36: 1 – 5.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Ellinwood, N. M., Kerns, J. A., Barsh, G. S. (2003). MC1R studies in dogs Wwth melanistic mask or brindle patterns. *Journal of Heredity* 94: 69 - 73.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Goldfinsch, A. D., (2002). TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on chat color in dogs. *Mammalian Genome* 13: 380 - 387.
- Young, A. E., Ryun, J. R., Bannasch, D. L. (2006). Deletions in the COL10A1 gene are not associated with skeletal changes in dogs. *Mammalian Genome* 17: 761-768.



Doc. Ing. Pavel Vejl, Dr. je pracovníkem Katedry genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze a vedoucím pracovní skupiny zaměřené na molekulární genetiku rostlin. Vedle toho se zabývá i molekulární genetikou psů.

Ing. Daniela Čílová je na katedře genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze členkou pracovní skupiny zaměřené na molekulární genetiku rostlin. Vedle toho se zabývá chovem a molekulárně genetickým studiem psů.



Mendelovo muzeum – čtvrtým rokem součástí Masarykovy univerzity

Masarykova univerzita převzala Mendelovo muzeum v Brně pod svoji správu v roce 2007. V té době ukončilo v muzeu činnost rakouské sdružení Vereinigung zur Förderung der Genomforschung (VFG) v čele s prof. Gustavem Ammererem. Převod muzea pod správu Masarykovy univerzity byl logickým vyústěním obtížného financování muzejní instituce. Muzeum, zaměřené ve velké míře na zahraničního návštěvníka s moderně pojatou expozicí, nebylo možné udržet v podmínkách utlumujících se zdrojů financování ze zahraničí. Muzeum bylo do té doby spravováno občanským sdružením za podpory společnosti s ručením omezeným. Pod správu Masarykovy univerzity bylo nově převedeno v souladu s rozhodnutím Akademického senátu MU. Mendelovo muzeum se tak stalo součástí Masarykovy univerzity a jejím dalším pracovištěm.

Statutem muzea je celouniverzitní muzeum, které má na starosti odkaz G. J. Mendela, pořádání výstav prezentujících vědu na MU, ale i významné kulturní fenomény v regionu. V poslední době přibyla muzeu starost o sbírku MU. Tři kmenoví zaměstnanci a až 20 externích spolupracovníků tvoří pracovní tým muzea. Činnost muzea se v počátku soustředila na pokračování již předem dohodnutých akcí a udržování stálé expozice. Po důkladné analýze byla původní expozice ukončena a v únoru roku 2009 byla otevřena nová stálá expozice s názvem “Gregor Johann Mendel – člověk, opat a vědec”. Nová stálá expozice, na jejíž tvorbě se podíleli zaměstnanci muzea s řadou konzultantů, vznikala téměř rok. Jedním z významných poradců při jejím vzniku byl i doc. RTDr. Vítězslav Orel, DrSc., náš asi největší znalec Mendelova díla. Stálá expozice se snaží představit Mendela jako komplexní osobnost s velkým zájmem o přírodní vědy. Postupem doby se výstavní činnost muzea rozrostla o další dva výstavní prostory. Krátkodobé výstavy, věnované různým žánrům, se konají v Křížové chodbě a probíhají souběžně se stálou expozicí. Délka trvání doprovodných, krátkodobých výstav je v průměru 3 měsíce. Témata jsou blízka vědě, univerzitnímu prostředí, dění v regionu a v kultuře.

Druhým výstavním prostorem je venkovní expozice v zahradě před muzeem. Prostor je poskytován převážně fotografickým výstavám a výstavám popularizačním. V letech 2008 a 2009 uspořádalo Mendelovo muzeum na 11 výstav. Pořádání výstav je pouze jednou z důležitých částí práce s veřejností, především s tou odbornou. Velmi dobře je znám cyklus přednášek Mendel lectures, který probíhá v prostoru Mendelova refektáře a Mendelovo muzeum se podílí na jeho pořádání s VFG, AV ČR a PřF a LF MU. O významu akce svědčí i několik uskutečněných přednášek, které vedli držitelé Nobelovy ceny. Novější cyklus přednášek s názvem Lékařská genetika pro veřejnost je věnován, jak napovídá název, spíše laické a školské veřejnosti. Autorkou cyklu a hlavní přednášející je MUDr. Renáta Gaillyová, Ph.D.

V roce 2010 se muzeum soustřeďuje na dva výstavní projekty. Prvním z nich je výstava věnovaná včelaření s názvem “Včela brněnská”. Kromě ukázek včelaření, představuje výstava G. J. Mendela jako významnou osobnost v počátcích moderního včelaření v Brně.

Druhý výstavní projekt vznikl z popudu profesorky Jiřiny Relichové. Výstava návštěvníkům přiblíží objevy T. H. Morgana a představí jeho “fly room”. Mezi nejprestižnější události lze zařadit návštěvy dvou držitelů Nobelovy ceny, profesora Kary Mullise a Guntera Blobela. První jmenovaný obdrží v prostorách muzea čestný doktorát MU, druhý jmenovaný přijíždí jako přednášející na Mendel lectures.

Muzeum je i členem oborových organizací jako je Asociace muzeí a galerií ČR, mezinárodní síť Univerzitních muzeí a sbírek (UMAC) při ICOM a Evropské síť univerzitních muzeí Universeum.

Ondřej Dostál, Daniela Vránová

RNA klub 2009

V roce 2009 se účastníci již sedmého ročníku RNA klubu sešli 30. října a poprvé v historii této konference v Brně. Svolavatelem a hlavním organizátorem sedmého ročníku RNA klubu byla Doc. Štěpánka Vaňáčová z Národního centra pro výzkum biomolekul při Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně a je nutno říci hned úvodem, že úkolu se zhostila opravdu výborně. Pro konání RNA klubu brněnští organizátoři zajistili důstojné prostory nádherně rekonstruovaného refektáře v Augustiniánském konventu svatého Tomáše na Starém Brně. Osmdesát pět registrovaných účastníků RNA klubu tak při diskusi nejnovějších poznatků vědy z různých oblastí výzkumu ribonukleové kyseliny mělo příležitost vstřebávat atmosféru místa, kde byly Gregorem Johannem Mendelem položeny základy genetiky a tím následně i molekulární biologie. Troufám si tvrdit, že toto setkání současné genetické vědy s prostředím prodchnutým jejími kořeny ovlivnilo většinu účastníků a dále se pozitivně podepsalo na celkovém vyznění konference. Většina účastníků setkání se rekrutovala, stejně jako v minulých letech, z akademických ústavů a vysokých škol v České republice. Počet zahraničních účastníků zaznamenal ve srovnání s minulými lety mírný nárůst. Bylo vidět, že příležitosti zúčastnit se využili zejména pracovníci a studenti z blízké Vídně, nicméně přijeli i účastníci z Regensburgu, Utrechtu, z Cambridge a Curychu.

Jednácím jazykem konference, jak již se stalo v posledních ročnících tradicí, byla angličtina. Vědecký program konference byl rozdělen do čtyř tematických sekcí. V sekci „Struktura a funkce nekódujících RNA“ zazněly dvě přednášky a v sekci „RNA, ontogenetický vývoj a nemoci“ byly proneseny tři přednášky, stejně jako v sekci „RNA-proteinové interakce a sítě“. Nejpočetněji, pět příspěvků, byla obsazena přednášková sekce „Transkripce, sestřih pre-mRNA a translace“ věnovaná různým aspektům posttranskripčních regulací genové exprese u prokaryont i eukaryont. V průběhu konference zazněly dvě čtyřicetiminutové plenární přednášky pronesené Gernotem Längstem z University v Regensburgu a André Gerberem ze Švýcarského technického institutu v Curychu (ETH Zurich) – první na téma „Chromatin interacting RNAs (ciRNA) maintain higher order structures of chromatin accessible“, druhá na téma „Global aspects of the RNA-protein interaction network“. Kromě přednesených přednášek bylo v průběhu konferenčního dne vystaveno 20 plakátových sdělení. Kvalita přednášek i posterů si nijak nezadala s kvalitou příspěvků na velkých mezinárodních odborných setkáních a i jejich témata odrážela současný vývoj příslušných vědních oborů ve světě. Žádný z příspěvků nebyl čistě metodický, což je významný rozdíl oproti prvním ročníkům RNA klubu. Jak již bývá na setkáních RNA klubu standardem, konference se nesla v přátelském duchu, ale na vysoké odborné úrovni. Žádná přednáška neproběhla bez diskuse, žádný poster nezůstal nepovšimnut. Abstrakta přednášek a plakátových sdělení byla uveřejněna již tradičně v dalším ročníku občasníku RNA Club (ISSN 1214-8598) vydávaného Přírodovědeckou fakultou Univerzity Karlovy v Praze.

Konference byla ukončena večeří servírovanou v restauraci blízkého pivovaru a pokračovala neformálním posezením do pozdních nočních hodin.

Osmý ročník RNA klubu se bude konat v Českých Budějovicích dne 5. listopadu 2010 v moderních prostorách nové budovy Filosofické fakulty Jihočeské univerzity. Hlavním organizátorem tohoto RNA klubu je Dr. Hassan Hashimi z týmu Prof. J. Lukeše z Parazitologického ústavu v.v.i., AV ČR. Novinkou bude, že nejlepší příspěvky studentů a mladých vědeckých pracovníků do 35 let budou oceněny. Předpokládanou první cenou bude úhrada nákladů na účast na konferenci RNA Society v Japonském Kjóto. Webové adresa RNA klubu 2010 je http://www.biologicals.cz/conferences/index.php?conference_id=10. Organizační tým se těší na Vaši účast.

Martin Pospíšek

Perličky ze školních lavic

Výroky zkoušených studentů tak, jak je zaznamenal během své pedagogické kariéry na Biologickém ústavu Lékařské fakulty MU (dříve UJEP) prof. MUDr. Jan Šmarda, DrSc.

„Tím, že užíval statistiky, se Mendel lišil od svých předků“.

„U pralidí byla žena hlavním stavebním kamenem tlupy“.

„Roku 1884 zemřel George Mendel“.

„Amfimixie je, myslím, na pustém ostrově, když dochází ke styku mezi bratrem a sestrou. Nebo by to mohlo být také mezi otcem a dcerou? Teď nevím“.

„Termofilní bakterie žijí v lázních“.

„Antigen jest gen, který má opačné vlastnosti danému genu“.

„Do vajíčka pronikne jen hlavička spermie, ocas zůstane venku“.

Oznámení

Blíží se uzávěrka soutěže o Cenu GSGM!

Připomínáme, že probíhá čtvrté kolo soutěže o Cenu GSGM 2008 - 2010. Podrobnosti jsou k dispozici v Informačních listech GSGM č. 34, 2009, které jsou v elektronické verzi dostupné na adrese <http://www.gsgm.cz>. Přihlášky do soutěže se přijímají do konce roku 2010.

Členové výboru GSGM

Toto číslo Informačních listů GSGM neprošlo jazykovou úpravou. Způsob psaní odborných termínů je ponechán na autorech článků.

GS Junior sekvenátor

„The next big thing in sequencing is small“

Stručná charakteristika sekvenátoru GS Junior :

- > 35 milionů bází na jeden běh
- 10 hodin doba sekvenace + 2 hodiny zpracování dat
- Průměrná délka čtení 400 bází (medián 500 bází)
- Průměrný počet čtení je 100 000 na jeden běh
- Vstupní materiál: gDNA, amplikony, cDNA, nebo BAC knihovny v závislosti na aplikaci
- Rozměry: 40 cm šířka x 60 cm hloubka x 40 cm výška

www.gsjunior.com



**Roche s.r.o., Diagnostická divize, Karlovo náměstí 17, 120 00 Praha 2,
tel.: +420 220 382 565 (564), fax: +420 220 382 595,
email: czech.appliedscience@roche.com**

454 LIFE
SCIENCES

Historie

Dr. Heinrich Netheler a Dr. Hans Hinz založili společnost v dílnách na zahradě nemocnice v hamburské čtvrti Eppendorf r. 1945. V poválečném Německu zprvu opravovali různé přístroje pro nemocnici a zároveň stavěli prototypy přístrojů pro budoucí tržní uplatnění.

Prvním prodávaným přístrojem byl r. 1946 **svalový stimulátor**. Tehdy měla firma již 16 stálých zaměstnanců a od spojenecké správy povolení odebrat několik hodin denně elektrický proud. Prvním milníkem byl r. 1950 první **spektrální fotometr**, postavený za přispění prof. Büchera. Vyráběl se až do sedmdesátých let. Roku 1955 vznikly první **plamenové fotometry** pro stanovení iontů v klinické diagnostice.

S využitím vynálezu Dr. Schnitgera z Univerzity v Marburgu začala roku 1958 výroba prvních **pipet** s pohyblivým písmem. Od nich vedla cesta k prvním mikrolitrovým systémům – zkumavkám eppendorfkám a odstředivkám pro ně určeným. Jejich výroba začala r. 1962 a znamenala skutečnou revoluci v laboratorní praxi. Pipety a mikrozukumavky určily další rozvoj firmy. V roce 1974 měla již 500 zaměstnanců a dnes je Eppendorf asi největším světovým výrobcem pipet, mikrozukumavek i dalšího příslušenství pro dávkování kapalin.



Dr. Heinrich Netheler



Dr. Hans Hinz

Historické milníky společnosti Eppendorf

V roce 1978 přišel na svět opakovací dávkovač **Multipette®**. Nyní, po 40 letech a několika modernizacích, dosud velmi oblíbený nástroj a spolu s elektronickou verzí stále nejrozšířenější systém pro opakované dávkování kapalin.

Mikromanipulace buněk pro asistovanou reprodukci stejně jako pro geneticky modifikovaná zvířata a obecně výzkum na buňkách prodělává velký rozmach. První **elektronický mikromanipulátor** s pamětí se vyráběl od r. 1985, současná verze z roku 2001 je nejmodernějším zařízením pro práci se suspenzemi i adherentními buňkami.

Rozvoj společnosti a výrobků

Sjednocení Německa znamenalo další výzvy. Eppendorf postupně přebírá firmu Janetzki ve východoněmeckém Lipsku, přestavuje ji a od r. 1996 zde vyrábí moderní odstředivky od nejmenších až po chlazené s celkovým objemem vzorků 1,6 litru. V tomto období také vedení firmy opouští oba původní zakladatelé. Jejich dědicové jsou však 100% vlastníky firmy dodnes.

Společnost se postupně mění z ryze německé, převážně klinicky orientované na globálně zaměřenou s větším důrazem na vědu a výzkum, na molekulární biologii a genetiku.

Milníkem v metodice PCR se r. 1996 stal první přístroj s gradientovým rozložením teploty napříč blokem – **Mastercycler® gradient**. Následovala škála plastových spotřebních materiálů pro PCR s různými vylepšeními, tj. zkumavky se speciální konstrukcí víčka proti odparům, destičky twin.tec PCR ze dvou materiálů pro vysokou pevnost destičky a současný ideální přenos teploty. Později přišel i přístroj pro **real-time PCR** a mimořádně nízkosumové plasty pro **real-time PCR**. Současný model klasického cycleru pak má od roku 2008 patentovaný systém zavírání vyhřívaného víka **vapo.protect™** – dále snižující odpar vzorků.

Od roku 2003 vyrábí Eppendorf první pipetovací automaty **epMotion® 5070** a o rok později větší verzi **epMotion® 5075**. Na konci roku 2007 převzal Eppendorf výrobce kvalitních **třpaček, fermentorů, hlubokomrazicích boxů a CO₂ inkubátorů** – americkou společnost **New Brunswick Scientific**.

Spolu s ní má dnes přes 2600 zaměstnanců a vyrábí v Německu, USA a Velké Británii. Má výhodu stále stejných a transparentních vlastníků a může se i po 64 letech existence řídit původním poválečným záměrem svých zakladatelů – být synonymem pro uživatelsky orientované procesy, inovativní a vysoce kvalitní produkty a služby, které mají sloužit při zlepšování životních podmínek lidí.

S přáním všeho dobrého v příštím roce.

Ing. David Čemohorský,
za společnost Eppendorf Czech & Slovakia s. r. o.

automatická pipetovací stanice
epMotion® 5070

víko vapo.protect™ přístroje Mastercycler® pro 5



eppendorf
— Czech & Slovakia —

Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.,
Kolovratská 1476, 251 01 Říčany u Prahy, Tel./Fax: +420 323 605 454,
E-mail: eppendorf@eppendorf.cz, http://www.eppendorf.cz