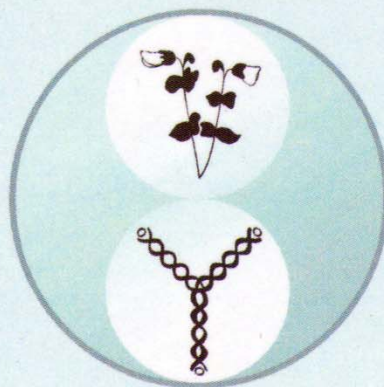


únor 2011

Genetická společnost Gregora Mendela



INFORMAČNÍ LISTY



číslo 37

Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela, která se konala dne 25.5. 2010 v Brně

Místo konání:

Zasedací místnost botanické zahrady, PŘF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Přítomni (bez titulů): Doškař, Knoll, Kočová, Miadoková, Relichová, Slaninová, Šmarda, Vojtíšková

Omluveni: Malachová, Pikálek, Vlček, Zadražil, Zelený

Program schůze:

1. Informace o činnosti výboru od minulé schůze
2. Projednání rezignace tajemníka výboru GSGM
3. Zhodnocení náplně posledního čísla IL a příprava dalšího čísla
4. Plán činnosti pro další období a příprava genetické konference GSGM v roce 2011
5. Ekonomické záležitosti (placení členských příspěvků, stav na účtu)
6. Různé

Ad 1) Schůzi zahájil prof. Doškař a omluvil nepřítomné členy výboru.

- prof. Miadoková navrhla doplnit seznam členů výboru GSGM, který je uveden na zadní straně IL o revizory účtů (Nešvera, Angelis, Čellárová, Kormuťák). Návrh byl schválen.
- Probíhá aktualizace seznamu členů GSGM a jejich e-mailových adres (dr. Slaninová, dr. Kočová). Dokončení aktualizace by mělo být uzavřeno do příští schůze výboru.

Ad 2) Prof. Doškař informoval o žádosti prof. Fajkuse o uvolnění z funkce tajemníka výboru z důvodu náročných úkolů a časového zaneprázdnění. Přítomní členové výboru s předloženým návrhem po krátké diskusi souhlasili. Do funkce tajemníka byla následně jednomyslně zvolena dr. Vojtíšková.

Ad 3) Prof. Šmarda představil nové číslo IL, připravené k rozeslání. Členové výboru kladně hodnotili kvalitu příspěvků i rozmanitost obsahu IL č. 36. Některé plánované příspěvky, např. 50 let kat. genetiky a mikrobiologie na PŘF UK, informace o výzkumu na MBÚ AV ČR, udělení Nobelovy ceny za rok 2009, příp. zajímavé autoreferáty doktorandů, budou zařazeny do podzimního čísla IL, jejichž součástí také bude podrobná informace o přípravách a programu genetické konference GSGM v roce 2011. Uzávěrka příspěvků následujícího čísla IL 15. 10. 2010. Prof. Knoll doporučil vložit do IL před jejich rozesláním výzvu k placení členských příspěvků za rok 2010 s uvedením čísla bankovního účtu.

Ad 4) Prof. Doškař řídil diskusi o přípravě genetické konference GSGM v roce 2011.

Předběžně navržený termín: konec září 2011.
Místo konání v blízkém okolí Brna (bude upřesněno).

Program konference: přibližně 10 plenárních přehledných přednášek předních odborníků na aktuální témata z genetiky v délce 45 min., a dále sekce plakátových sdělení, na jejíž organizaci se bude spolupodílet skupina mladých pracovníků z PŘF MU (zajistí prof. Doškař). Jako přednášející byli navrženi přední odborníci z jednotlivých oblastí genetiky (Pospíšek, Bártová, Tomáška, Hampl, Vyskot, Kejnovský, Šmardová, Krajčovič, Piršel, Hořínová). Pozvání navržených přednášejících zajistí členové výboru do konce září 2010.

Členové výboru byli vyzváni, aby zveřejnili na svých pracovištích informace o soutěži o Cenu GSGM pro mladé vědecké pracovníky, která bude vyhodnocena na konferenci v roce 2011. Dosud se nikdo nepřihlásil.

Ad 5) Prof. Knoll a Dr. Slaninová informovali o placení příspěvků v ČR a SR a stavu na účtech. V ČR je stav k 31.12.2009: 11616 Kč, příjmy v roce 2009: 8520 Kč (členské příspěvky), výdaje: 5334 Kč (tisk IL, poplatky za účet). Ve SR je finanční stav k 31. 12. 2009 1257, 88 EUR. Placení příspěvků probíhá průběžně.

Ad 6) Dr. Kočová informovala výbor o vyhledání a doplnění e-mailových adres členů GSGM. Tyto adresy budou využity k zaslání aktuálních informací členům GSGM.

Zapsala: M. Vojtíšková

Zápis ze schůze výboru genetické společnosti Gregora Mendela, která se konala dne 24.11. 2010 v Brně

Místo konání:

Zasedací místnost Ústavu experimentální biologie, PŘF MU Brno, Kamenice

Přítomni (bez titulů): Doškař, Knoll, Kočová, Malachová, Nešvera, Relichová, Šmarda, Vojtíšková, Zadražil, Zelený

Omluveni: Miadoková, Pikálek, Slaninová, Vlček

Program schůze:

1. Informace o činnosti výboru za uplynulé období
2. Zhodnocení náplně posledního čísla IL č. 36
3. Příprava dalšího čísla IL, projednání a schválení obsahu
4. Příprava genetické konference GSGM v roce 2011
5. Ekonomické záležitosti (placení členských příspěvků, stav na účtu)
6. Cena GSGM
7. Různé

Ad 1) Schůzi zahájil prof. Doškař a omluvil nepřítomné členy výboru. Aktualizace seznamu členů výboru (odstoupil prof. Fajkus, projednáno na výborové schůzi 25.5. 2010).

Činnost výboru v uplynulém období: Členové výboru požádali vytipované odborníky o plenární přednášky pro nadcházející konferenci v roce 2011 (podrobně v bodu 4), byly zajištěny příspěvky do IL č. 37 (prof. Šmarda), pokračovala úspěšná spolupráce s Mendelovým muzeem (prof. Relichová připravila ideový návrh výstavy k výročí Morganových objevů) a byl navržen cyklus přednášek, týkajících se současných výzkumů genomů v prostorách Mendelova muzea začátkem roku 2011 (prof. Doškař).

Ad 2) Členové výboru velmi kladně hodnotili uveřejněné články v posledním čísle IL, jejich vysokou odbornou úroveň a aktuálnost. Kvalitní grafická úprava, uvedení fotografií autorů a stručný profesní profil pak vytvořily důstojnou tištěnou prezentaci o činnosti Genetické společnosti Gregora Mendela.

Ad 3) Prof. Šmarda představil návrh obsahu nového čísla IL a to č. 37. Z dosud zaslanych příspěvků uvedl odborný článek doc. Slaninové, týkající se významu homologické rekombinace, další příspěvek od dr. Cíváně se týká Výzkumu rezistentních kmenů pšenice, dále dr. Nešvera přislíbil připravit informaci o vědeckém výzkumu na Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze, prof. Zadražil a doc. Pospíšek zajistí zprávu o činnosti RNA klubu, a prof. Relichová příspěvek o významu Morganových objevů.

Informační listy č. 37 budou také obsahovat recenzi na skripta prof. Vyskota, zápisy ze schůzí výboru GSGM z 25.5. a 24.11. t.r., zprávu o hospodaření (stav placení členských příspěvků). O příspěvek o udělení Nobelových cen v letech 2009 a 2010 bude požádán prof. Fajkus, příp. zajímavé autoreferáty doktorandů (po příslušné úpravě pro uveřejnění v IL) budou zařazeny do následujícího čísla IL (členové výboru osloví vhodné autory).

Součástí obsahu IL č. 37 bude první oznámení o konání a programu genetické konference GSGM v roce 2011. Redakční uzávěrka připravovaného čísla IL č. 37 bude 20.12. 2010 (prof. Šmarda).

Ad 4) Byla projednána příprava a organizace genetické konference GSGM v roce 2011.

Organizační výbor: brněnští členové výboru GSGM

Vědecký výbor konference: členové výboru GSGM

Navržený termín 14. – 16. září 2011

Místo konání: Mikulov, hotel Galant nebo jiné vhodné místo na jižní Moravě

Program konference: 10 plenárních přednášek předních odborníků na aktuální témata z genetiky v délce 40 min., a sekce plakátových sdělení. Organizací posterové sekce bude pověřena skupina mladých pracovníků (zajistí prof. Doškař).

Pozvaní přednášejících, kteří již vyjádřili svůj předběžný souhlas: doc. Pospíšek, doc. Bártová, doc. Hampl, prof. Vyskot, doc. Kejnovský, prof. Šmardová, prof. Krajčovič, doc. Piršel, dr. Hořinová, prof. Tomáška. Členové výboru, kteří jsou v kontaktu s výše

uvedenými přednášejícími, zašlou prof. Šmardovi do redakční uzávěrky konečné názvy přednášek.

Dr. Zelený přislíbil vypracování poptávkové nabídky na vytipovaná ubytovací zařízení. Na základě výsledků nabídky se bude odvíjet ekonomická kalkulace nákladů konferenčního poplatku a ceny za ubytování.

Do IL č. 37 bude zařazena informace o konání Konference GSGM v roce 2011 a výzva ke sledování aktualit na <http://www.gsgm.cz>.

ad 5) Prof. Knoll předložil výboru zprávu o hospodaření za rok 2009 a doporučil vložit do IL č. 37 urgentní výzvu k placení členských příspěvků pro příslušný rok s uvedením čísla bankovního účtu a k uhrazení nedoplatků za uplynulá období. Výbor konstatoval, na základě vypracovaného přehledu placení, že úhrada je velmi liknavá a počet zaplacených příspěvků pro rok 2010 do listopadu t.r. je velmi nízký.

ad 6) Do soutěže o Cenu GSGM s plenární přednáškou vítěze na konferenci v roce 2011 je zatím evidována pouze jedna přihláška.

Výbor GSGM prodloužil termín uzávěrky do 15. dubna 2011 a vyzývá členy k účasti v této soutěži pro mladé vědecké pracovníky do 35 let. Přihlášky do soutěže je nutné zaslat co nejdříve na adresu: Výbor Genetické společnosti Gregora Mendela, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno.

Bližší informace v elektronické verzi jsou dostupné na adrese <http://www.gsgm.cz>.

ad 7) Dr. Kočová informovala výbor o doplnění seznamu elektronických adres členů GSGM.

Zapsala: M. Vojtíšková

K členským příspěvkům

Žádáme všechny členy GSGM o uhrazení členského příspěvku za rok 2011. Příspěvek slouží především k pokrytí nákladů na tisk a distribuci Informačních listů a zůstává již několik let nezměněn. I v roce 2011 činí **150 Kč** na člena (pro studenty a důchodce je příspěvek snížen na 50 Kč). Prosíme o úhradu příspěvku **do konce února 2011** převodem na účet GSGM u Komerční banky č. **19-9096530217/0100** s doplněním variabilního symbolu, tj. členského čísla uvedeného na adrese http://www.gsgm.cz/clen_CZ.html.

Prosíme rovněž ty členy, kteří zapomněli uhradit příspěvek za rok 2010, aby tak učinili nyní.

Děkujeme!

členové výboru GSGM

VYÚČTOVÁNÍ HOSPODAŘENÍ GSGM ZA ROK 2010 (ČR)

Zůstatek k 31.12.2009		11616,45 Kč
z toho	na účtu KB	9600,45 Kč
	v pokladně	2016,- Kč

Příjmy v roce 2010		5601,60 Kč
1. úroky z účtu u KB		1,60 Kč
2. členské příspěvky (5600 Kč):		
z toho	placené na účet KB	4800,- Kč
	placené hotově	800,- Kč

Výdaje v roce 2010		5747,- Kč
1. faktura za obálku k IL		3000,- Kč
2. poštovné za IL 2010		930,- Kč
3. občerstvení jednání komise GSGM		174,- Kč
4. poplatky bance za vedení účtu a položky		1643,- Kč

Zůstatek k 31.12.2010		11471,11 Kč
z toho	na účtu KB	9759,11 Kč
	v pokladně	1712,00 Kč

VYÚČTOVANIE HOSPODÁRENIA GSGM ZA ROK 2010 (SR)

Zostatok k 31.12.2009		1257,88 EUR
z toho	na účte Tatra banka	1250,80 EUR
	v hotovosti	7,08 EUR

Príjmy v roku 2010		0 EUR
---------------------------	--	--------------

Výdavky v roku 2010		0 EUR
1. poplatky banke za vedenie účtu		44,22 EUR

Zostatok k 31.12.2010		1220,74 EUR
z toho	na účte Tatra banka	1213,66 EUR
	v hotovosti	7,08 EUR

GENETICKÁ KONFERENCE 2011

organizovaná Genetickou společností Gregora Mendela

<http://www.gsgm.cz/>

Termín

14. – 16. 9. 2011

Místo konání

Zámecký hotel, Zámecké náměstí 66, Lednice

Organizátor

Genetická společnost Gregora Mendela

Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Prof. RNDr. Jan Šmarda CSc.

Prof. RNDr. Jiřina Relichová, CSc.

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

RNDr. Marie Vojtíšková, CSc.

Biomania – sdružení studentů PŘF a LF MU

Registrace

Online registrace bude spuštěna v březnu 2011 na internetových stránkách Genetické společnosti Gregora Mendela <http://www.gsgm.cz/>

Program

Přednášky předních odborníků z vysokých škol a dalších akademických pracovišť, tematicky zaměřené na aktuální problematiku v oblasti genetiky a molekulární biologie.

Sekce mladých

Prezentace výsledků jednotlivých pracovišť formou plakátových sdělení určená zejména mladším a začínajícím vědeckým pracovníkům.

Seznam přednášejících

Doc. Eva Bártová: Úloha proteinů vázaných na chromatin při DNA reparaci.

Doc. Aleš Hampel: Budeme se množit kmenovými buňkami?"

MUDr. Věra Hořínová: Genetická diagnostika v lékařské praxi.

Doc. Eduard Kejnovský: Skákající geny- parazité nebo pomocníci?

Prof. Juraj Krajčovič: Prečo si organely zachovávajú svoje genómy?

RNDr. Miroslav Piršel: Oprava DNA a jej úloha v ontogeneze.

RNDr. Martin Pospíšek: Překvapivé role translačních iniciačních faktorů z rodiny 4E v regulaci eukaryontní genové exprese.

Prof. Jana Šmardová: Mutace p53 - krok na cestě k rakovině.

Prof. Ľubomír Tomáška: Evolučné kutilstvo na koncoch chromozómov.

Prof. Boris Vyskot: Epigenetika.

První dekáda nového tisíciletí v Nobelových cenách za fyziologii/medicínu

Eva Matalová

Nobelovy ceny za fyziologii/medicínu zahájily 21. století oceněním objevů týkajících se **mechanismů řídicích buněčný cyklus** (L. Hartwell - USA, P. Nurse - UK, T. Hunt - UK). V první fázi (G1) buněčného cyklu buňka zvětšuje svůj objem, pak podstupuje syntézu DNA (S), připravuje se na dělení (G2) a projde mitózou (M). Správné časování a pořadí jednotlivých fází, které je nezbytné pro zajištění hladkého průběhu cyklu, musí být nějak řízeno. Leland Hartwell použil buňku kvasinky jako modelový systém pro genetické studie buněčného cyklu a objevil geny zodpovědné za jeho řízení (CDC-genes – cell division cycle genes). Tyto geny se uplatňují v kontrolních bodech buněčného cyklu G1 a G2/M. Paul Nurse identifikoval klíčový regulátor buněčného cyklu u kvasinek – gen *cdc2* a izoloval odpovídající gen také u lidských buněk – CDK1. Tento gen kóduje protein, který je členem rodiny cyklin - dependentních kináz (CDK), tedy enzymů schopných fosforylovat proteiny a řídit tak jejich funkčnost (inhibovat, resp. aktivovat). Hladina proteinu CDK je během cyklu stálá, ale jeho aktivita výrazně kolísá působením cyklinů. Cykliny objevil Tim Hunt a pojmenoval je podle jejich charakteristického kolísání v různých fázích buněčného cyklu. Periodická syntéza a degradace cyklinů během buněčného cyklu je tedy klíčovým mechanismem podílejícím se na regulaci buněčné proliferace.

K masivnímu buněčnému dělení dochází nejen během embryonálního vývoje, ale i u dospělého organismu při obnově tkání. Pro udržování homeostáze je nutné balancovat tento vysoký nárůst buněk jejich kontinuální eliminací. Sydney Brenner použil hlístici *Caenorhabditis elegans* jako ideální model pro studium buněčné diferenciaci a vývoje orgánů. Tělo tohoto asi 1 mm velkého tvora totiž sestává z 959 buněk, přičemž tohoto počtu je docíleno přesně řízeným buněčným dělením a specifickou likvidací určitých buněk. Robert Horvitz využil tento model pro výzkum genetického programu řídicího buněčnou smrti, identifikoval první „geny buněčné smrti“, označené jako *ced-3* a *ced-4* a ukázal, že jsou nezbytné pro její průběh. Následně objevil také gen zabraňující buněčné smrti – *ced-9*. Obdobné geny byly později nalezeny také u člověka (např. *ced-9* odpovídá *bcl-2*) a ukazují vysokou evoluční konzervativnost genetických mechanismů programované buněčné smrti. John Sulston vyvinul techniku studia buněčných linií u *C. elegans* a potvrdil přesné řízení buněčné smrti. Za objevy týkající se genetické podstaty **řízení embryonálního vývoje a uplatnění programované smrti buněk** byla udělena Nobelova cena za fyziologii/medicínu v roce 2002 (S. Brenner - USA, R. Horvitz - USA, John Sulston - UK).

Princip magnetické rezonance (MRI) byl popsán již v polovině 20. století, kdy bylo ukázáno možnost zobrazení různých struktur s využitím této metody. Silné elektromagnety vytvářejí magnetické gradienty ve třech dimenzích, dojde k synchronizaci molekul a k odlišení jednotlivých struktur v rámci orgánů. Tyto objevy jsou základem pro široké **využití magnetické rezonance pro potřeby medicíny** a byly oceněny Nobelovou cenou v roce 2003 (P. Lauterbur - USA, P. Mansfield - UK). Paul Lauterbur objevil, že vytvořením gradientu magnetického pole lze dosáhnout

dvourozměrného zobrazení struktur. Dále ukázal, že přidání dalšího magnetického gradientu umožňuje vizualizaci řezu zkumavkou s běžnou vodou a s těžkou vodou. Žádná jiná metoda nedokáže tyto dva druhy vody vizuálně odlišit. Voda je součástí každé buňky, každá tkáň má však odlišný obsah vody. Silné magnetické pole ovlivňuje pohyb vodíkových atomů v molekulách vody a dokáže je srovnat jedním směrem. Elektromagnetický signál vychýlí směr magnetického momentu jádra vodíku a detekční přístroj tyto změny zaznamenává.

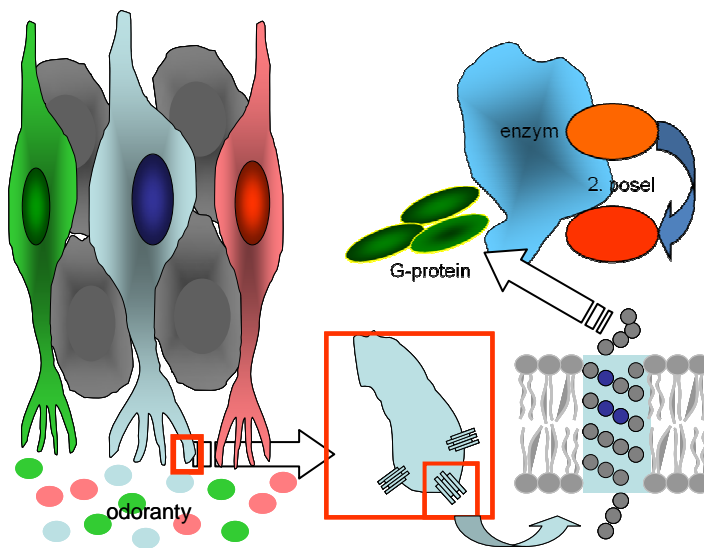


Peter Mansfield (na obrázku) ukázal, že gradienty magnetického pole dávají signály, které mohou být rychle a efektivně analyzovány a převedeny v zobrazení. MR vlastně dokáže vytvořit trojrozměrný obraz vnitřních struktur bez fyzického kontaktu. V současnosti je zobrazování s využitím magnetické rezonance aplikováno při vyšetřování řady orgánů, přičemž tato metoda je nezastupitelná zejména u mozku a míchy. Umožňuje včasnou diagnostiku, ale také průběžné sledování průběhu nemocí a účinnosti terapie. MRI může např. ukázat rozsah nádorového bujení, což umožňuje přesnější chirurgický zákrok a cílení následné radioterapie. Přestože je MRI již běžnou technikou, podléhá stále dalšímu vývoji. MRI

nahradila řadu invazivních metod, výrazně snížila riziko komplikací vyšetřovaných pacientů a zvýšila jejich komfort.

Objevy týkající se **receptorů pro odoranty**, které umožňují čichové vjemy, byly oceněny v roce 2004 (R. Axel – USA, L. Buck – USA). Čichové receptory jsou zakončením nervových buněk, čichový epitel je tedy unikátním místem přímého styku nervového systému s vnějším prostředím. Přestože čich u člověka není nepostradatelným smyslem, dokáže rozlišit asi 10 000 různých vůní a pachů. Čichové vnímání navíc umocňuje přes limbický systém kvalitu dalších vjemů, zejména chuti a může ovlivnit i sociální chování.

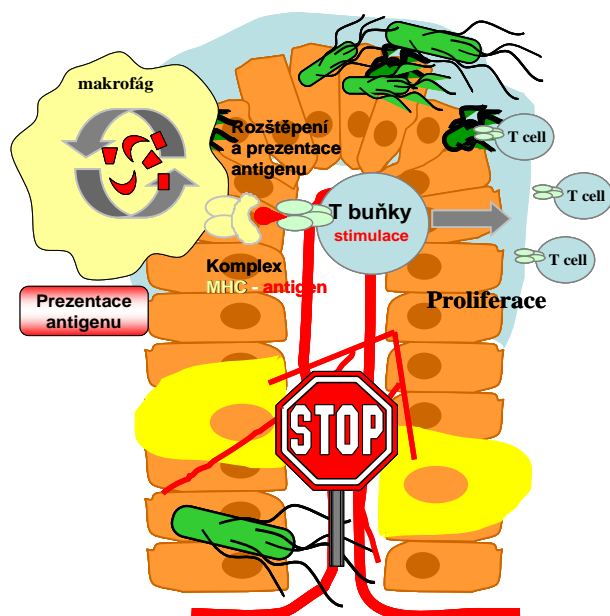
Richard Axel a Linda Buck studovali receptorové čichové buňky a popsali geny, které kódují specifickou rodinu receptorů – receptory vázající odoranty. Tyto receptory jsou lokalizovány na buněčných membránách nervových receptorových buněk (viz obrázek). Každý receptor sestává z proteinové řetězce a je pevně ukotven v cytoplazmatické membráně. Po vazbě chemické látky (odorantu) na tento receptor dojde k aktivaci vnitrobuněčného přenosu signálu přes membránově vázané G-proteiny (Nobelova cena za fyziologii/medicínu z roku 1994). Elektrický signál vytvořený v receptorových buňkách je přenášen čichovými nervovými drahami do mozku (Nobelova cena za fyziologii/medicínu z roku 2000).



Stovky genů kódujících tyto proteinové receptory tvoří asi 3 % lidského genomu. Rozlišení vůní probíhá v několika krocích. Proteinové řetězce receptorů pro odoranty se liší v několika málo aminokyselinách, což umožňuje první rozlišení vůní. Druhé

rozlišení pak probíhá v čichových glomerulech, kde se scházejí nervová vlákna z více receptorů. Finální čichový vjem je vytvořen v mozku (čichová kůra, amygdala atd.), který se podílí i na vytváření čichové paměti (vyvolání čichového vjemu spojeného s určitým zážitkem nebo událostí). Potenciální obnovitelnost čichových buněk (neuronů) přitahuje stále více zájem regenerativní medicíny. Dosud se pro experimentální regenerace nervového systému využívá především kmenových buněk, které jsou prekurzory buněk gliových.

Další Nobelova cena nového tisíciletí byla udělena za objev bakterie *Helicobacter pylori* a její role v **zánětlivých a vředových onemocněních žaludku** (B. J. Marshall - Austrálie, J. R. Warren - Austrálie). Tato onemocnění byla dlouhodobě řazena mezi chronické stavy, které jsou vyvolány především stresem a následnou autodegradací žaludeční sliznice kyselou žaludeční šťávou. Z tohoto hodnocení vycházely i následné terapie založené na inhibici produkce žaludeční kyseliny, které však mají pouze krátkodobý léčebný efekt. Barry J. Marshall a J. Robin Warren ukázali, že zánětlivá a vředová onemocnění žaludku lze trvale vyléčit. Objevili totiž, že na rozvoji těchto chorobných stavů se výrazně podílí bakterie *Helicobacter pylori*. Tato bakterie je v lidské populaci běžná, ale pouze asi u 10–15 % lidí jde o infekci symptomatickou.

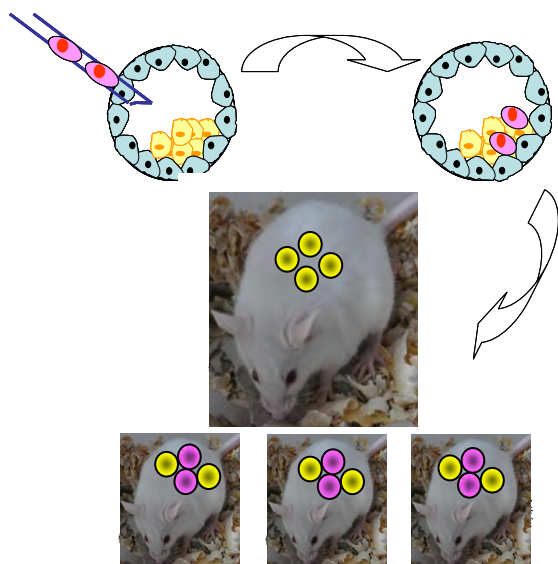


H. pylori je vysoce variabilní a kolonizuje žaludeční mukózu člověka, kde může způsobit rozsáhlé záněty. Hlavním příznakem je krvácení, může dojít až ke vzniku nádorů. *H. pylori* navíc produkuje enzym, který neutralizuje žaludeční kyseliny a umožňuje tak jeho přežití v extrémních podmínkách. Bakterie penetruje sliznici a díky produkci adhezivních molekul dochází k jejímu pevnému přichycení. Invaze bakterií vede k imunitní odpovědi organismu, bakterie však mají mechanismy, které této reakci zabraňují. Vylučují například toxin, který zabíjí T-lymfocyty (viz obrázek). *H. pylori* byl izolován v roce 1982 na základě rozsáhlého studia vzorků pacientů podstupujících gastrokopii, což umožnilo korelaci výskytu této bakterie s vředovými onemocněními trávicího traktu.

V současnosti se pátrá po možné bakteriální spoluúčasti u dalších chronických zánětlivých onemocnění (např. revmatických zánětů).

Nový princip regulace genové exprese, a to na úrovni RNA interferencí je tématem Nobelovy ceny z roku 2006 (A. Fire - USA, C. Mello - USA). Andrew Fire a Craig Mello objevili, že základním mechanismem řídicím tok genetické informace je dvouřetězcová RNA. Jejich klíčový experiment představoval injekci RNA různých genů, a to jak jednořetězcové, tak dvouřetězcové. Zatímco jednořetězcová RNA neměla žádný vliv, dvouřetězcová RNA vedla k fenotypu odpovídajícímu vyřazení daného genu na úrovni DNA. Tím bylo prokázáno, že dvouřetězcová RNA eliminuje cílovou mRNA. K RNA interferenci (RNAi) dochází v každém typu buňky u živočichů i rostlin. Dvouřetězcová RNA (dsRNA) se váže k proteinovému komplexu Dicer, který štěpí dsRNA na malé fragmenty. Jeden z řetězců RNA reaguje s dalším proteinovým komplexem RISC a váže se na mRNA mechanismem párování bází. mRNA je poté rozštěpena a nemůže dojít k syntéze odpovídajícího proteinu. RNA interference se

tedy mohou stát slibnou cestou pro řadu terapií, protože umožňují „umlčení genů“ bez riskantních zásahů do genomu buněk pacientů. Tyto postupy se aktuálně testují např. pro makulární degenerace oka, kdy dochází k nadměrné produkci cév v sítnici, které snižují schopnost vidění. RNAi je zacílena např. na vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), což vede k omezení růstu cév v postižené oblasti oka. Další oblasti uplatnění RNAi se otevírají u virových onemocnění, ale také aterosklerózy, kde dvouřetězcová RNA umožní zablokování produkce LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou), které se usazují v aterosklerotických plátech.



Kmenové buňky jsou základem embryonálního vývoje a nezbytné pro obnovu orgánů a tkání. Tyto buňky se dokážou nejenom sebeobnovovat, ale současně diferencovat v rozmanité typy tkání na základě mezibuněčných komunikací v určité tkáni. Takové buňky jsou tedy i lákavým cílem pro terapie s řízenou diferenciací kmenových buněk. **Specifické genové modifikace s využitím kmenových buněk**, za jejichž aplikace u myších modelů byla udělena Nobelova cena v roce 2007 (M. Capecchi - USA, M. J. Evans - UK, O. Smithies - USA), představují důležitý krok ve výzkumu těchto strategií. Martin Evans izoloval embryonální kmenové buňky, v buněčné kultuře je geneticky pozměnil a injikoval do blastocysty, kterou zavedl do „náhradní“ matky pro vytvoření geneticky upraveného potomstva (viz obrázek).

Kultivované embryonální kmenové buňky tak byly využity pro vytvoření transgenních zvířat.

Mario Capecchi (na obrázku) a Oliver Smithies nezávisle použili metodu homologické rekombinace, která umožňuje obdobné modifikace embrya. Znalosti týkající se biologie kmenových buněk a technologie tzv. genově modifikovaných myší umožňují rychlé pokroky v pochopení normálního embryonálního vývoje, souvisejících abnormalit a onemocnění a také navržení účinných prevencí a terapií. Genom myší i člověka má obdobný počet genů a genetickou manipulací embryonálních kmenových buněk lze vytvářet i myší modely lidských onemocnění. Příkladem je zavedení mutovaného genu HPRT (kódujícího hypoxantinguanin fosforibozyltransferázu), který je příčinou Lesch-Nyhanova syndromu. Dalším cílem je cystická fibróza, dědičné kardiovaskulární defekty (hypertenze, ateroskleróza) a v neposlední řadě také různé typy nádorů.

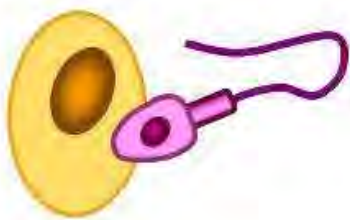


Znalost původce nakažlivé choroby je klíčovou podmínkou včasné terapie. V roce 2008 byly oceněny objevy týkající se **lidského papilomaviru** (H. zur Hausen – Německo) a **viru lidské imunodeficiencie** (HIV)(F. Barré-Sinoussi - Francie, L. Montagnier - Francie). Harald zur Hausen se zabýval karcinomem děložního krčku, který je u žen jedním z nejčastějších nádorových onemocnění. Ačkoliv nenalezl u těchto nádorů přímo viry, s využitím krátkých úseků DNA prokázal, že papilomavírové geny, které se integrují do genomu cervikálních buněk, souvisejí s rozvojem nádorového onemocnění. Během desetiletí izoloval celou řadu virových agens, které se podílejí na více než 70 % lidských karcinomů děložního krčku. Z těchto závěrů

vycházejí metody pro časnou diagnostiku a je na nich založena vakcinace výrazně omezující rozvoj tohoto nádorového onemocnění. Françoise Barré-Sinoussi a Luc Montagnier se domnívali, že AIDS způsobuje retrovirus, ale bylo obtížné vysvětlit, jak tento virus souvisí s různými klinickými příznaky této nemoci. HIV objevili v lymfatických uzlinách infikovaných pacientů, byl ve velké míře zastoupen v bílých krvinkách a způsoboval smrt jejich populací. V důsledku toho byl umožněn rozvoj řady sekundárních onemocnění, které oslabený imunitní systém nezvládne. Propojením příčiny a důsledku, tedy HIV/AIDS bylo umožněno zahájit dlouhou cestu k efektivní terapii.

Se smrtelností souvisí také stárnutí, které je předmětem Nobelovy ceny z roku 2009 udělené za objevy, **jak jsou chromozomy chráněny telomerami a enzym telomerázou** (E. H. Blackburn – USA, C. W. Greider – USA, J. W. Szostak – USA). Elizabeth Blackburn a Jack Szostak se potkali v roce 1980 a započali úspěšnou spolupráci vedoucí k objasnění funkce telomer, tedy koncových částí chromozomů. Telomery, pojmenovány již v roce 1938 (G. Muller), chrání kódující DNA před účinky endonukleáz. Protože se telomery při každé replikaci DNA zkracují, je jejich délka ukazatelem replikativního stárnutí buňky. Molekulární mechanismy související s telomerami byly studovány s využitím prvoků *Tetrahymena*. Tento organismus obsahuje krátké lineární chromozomy (minichromozomy) kódující zejména ribozomální RNA a byl proto vhodným modelem pro výzkum koncových úseků DNA. Na koncích chromozomů byly nalezeny opakující se hexamerové sekvence, které jsou druhově specifické. Na druhou stranu ale také strukturně konzervativní, což bylo prokázáno experimentálním přenosem, kdy telomerové úseky získané z prvoka plnily svoji funkci i v kvasinkových buňkách. U prvoků bylo navíc zjištěno, že telomery se mohou prodlužovat, čímž začala cesta k hledání odpovídajícího enzymu, na kterou se vydala Carol Greider. Trpělivou kombinací různých enzymů získaných z extraktu prvoků, substrátů a stavebních prvků byla objevena telomeráza. Později bylo prokázáno, že telomeráza je podstatou replikační nesmrtnosti buněk. Kromě vysoké aktivity telomerázy v embryonálních buňkách a využití pro lákovou nesmrtnost je druhou stranou mince její přítomnost v buňkách nádorových.

První desetiletí Nobelových cen nového tisíciletí v oblasti fyziologie a medicíny uzavírá vysoce aktuální, ale mnohdy kontroverzní téma **fertilizací *in vitro***. Během posledních padesáti let byly odhaleny důležité principy reprodukce člověka a provedena první úspěšná oplodnění „ve zkumavce“. Mnohaletá práce byla věnována výzkumu maturace lidských oocytů, principům hormonálních regulací a vlastnímu procesu splynutí vajíčka a spermie. Toto úsilí bylo korunováno narozením prvního takto počatého dítěte v roce 1978. V následujících letech R. G. Edwards a jeho kolegové tuto technologii zdokonalovali a pomáhali s jejím rozšířením ve světě. Dosud se *in vitro* počatých dětí narodilo na milion a zrodilo se nové odvětví medicíny. Objevy R. G. Edwardse (UK), oceněné Nobelovou cenou v roce 2010, se staly milníkem v moderní reprodukční medicíně.



Nobelovy ceny za fyziologii/medicínu jsou s některými výjimkami týkajícími se zejména válečných let udělovány každoročně již od roku 1901. Co přinese jejich 111. ročník, se dozvíme letos v říjnu, kdy se bude také konat Mendel Forum 2011 věnované tomuto výročí.

Mendel Forum 2010

Eva Matalová

Konference Mendel Forum jsou od roku 1992 organizovány Mendelianem MZM ve spolupráci s dalšími vědeckými a vzdělávacími institucemi. Místem konání je nejenom Brno, ale také další místa spojená s působením J. G. Mendela. V roce 2008 se Mendel Forum konalo v nově rekonstruovaném Mendelově rodném domě Hynčicích. Populárně-vědecká konference Mendel Forum 2010 probíhala ve dnech 19. a 20. října v Olomouci, kde Mendel strávil část svého studentského života. Dopolední přednáškový program organizovaný v nových prostorách Univerzity Palackého Olomouc (obr. 1) byl doplněn vědomostní soutěží a exkurzemi v odpoledních sekcích.



Obr. 1: Mendel Forum 2010 – pohled do posluchárny před zahájením.

První den konference byl zahájen představením projektu *Od fyziologie k medicíně* (CZ.1.07/2.3.00/09.0219), který se v roce 2010 realizoval v regionu Brno a v letošním roce je otevřen pro zájemce v Olomouci. Součástí prezentace Mendel Forum 2010 byla komentovaná fotoreportáž ke kurzům, které probíhaly formou diskusních seminářů s navazující praxí na vybraných brněnských pracovištích vědy, výzkumu a vzdělávání.

První příspěvek v sekci *Mendel a genetika* byl věnován historickému ohlédnutí za cestou k rozluštění genetického kódu, a to zejména ve spojitosti s nositeli

Nobelových cen (NC) za fyziologii/medicínu. V souvislosti s historií Mendelových experimentů byly nastíněny milníky spojené s rolí chromozomů v dědičnosti a přínosem T. H. Morgana (nositel NC 1933), koncepcí jeden gen - jeden enzym a jmény G. W. Beadle a E. L. Tatum (nositelé NC 1958), dále klíčový objev struktury DNA známé trojice Crick-Watson-Wilkins (NC 1962). Zvláštní část přednášky byla věnována vzpomínce na nositele NC M. W. Nirenberga (NC 1968), který v loňském roce zemřel, ale jeho přínos k rozluštění genetického kódu, zejména zákonitostí translace, zůstává nesmrtelný. Objev restričních enzymů oceněný NC 1978 (W. Arber, D. Nathans, H. O. Smith) výrazně urychlil „čtení“ genetické informace, stejně jako sekvenování DNA (NC 1980 za chemii, P. Berg, W. Gilbert) a polymerázová řetězová reakce (NC za chemii 1993, K. B. Mullis). Rapidní rozkvět molekulárních technik směřující v posledních desetiletích k modifikacím kódu a jeho exprese byl demonstrován na přístupech RNA interference (NC 2006, A. Z. Fire, C. C. Mello) a genových modifikací u myši s využitím kmenových buněk (NC 2007, M. R. Capecchi, Sir M. J. Evans, O. Smithies). Přednáška byla uzavřena nejaktuálnější Nobelovou cenou týkající se technik *in vitro* fertilizací (NC 2010, G. Edwards), tedy vlastně také vertikálního přenosu genetického kódu do dalších generací.

Další přednáška v této sekci doložila propojení Mendela s Brnem a Olomoucí, které začíná studiem J. Mendela na Filosofickém ústavu tehdejší univerzity v Olomouci v letech 1840-1843 a pokračuje vlivem olomouckých profesorů F. Franze a jeho předchůdce A. Baumgartnera na Mendelovu volbu profesní kariéry (jednak při jeho rozhodování pro vstup do starobrněnského augustiniánského kláštera nebo při jeho přijetí ke studiu fyziky na vídeňskou univerzitu). Vazba Brna a Olomouce je dále posílena aktem, při kterém hlavní představitel moravského duchovenstva Maria T. hrabě Trauttmansdorff-Weinsberg z Olomouce věnoval své budovy Biskupského dvora v Brně pro účely vědeckého výzkumu a muzejní dokumentace Moravsko-slezské hospodářské společnosti. V ideovém rámci této společnosti Mendel uskutečnil podstatnou část svých hybridizačních pokusů, o kterých v roce 1865 přednášel v jejím Přírodovědném spolku a o rok později své *Pokusy s hybridy rostlin* zveřejnil ve spolkovém časopise. První den konference byl zakončen odpolední procházkou Mendelovou Olomoucí s odborným výkladem v místech, kde Mendel žil a studoval.

Druhý den byl zaměřen na aktuální poznatky a znalosti v oblasti nádorové biologie, imunohematologie a experimentální molekulární biologie. V prvním příspěvku této sekce byl představen současný koncept původu nádorů, zejména nádorové kmenové buňky a to s ohledem na heterogenitu nádorů a metastatické procesy. Toto téma dále rozvíjela i následující přednáška zaměřená na nové strategie v prevenci, diagnostice a léčbě nádorových onemocnění. Vzhledem k tomu, že nádorové transformace souvisejí se čtvrtinou předčasných úmrtí v lidské populaci a incidence těchto onemocnění stále narůstá, bohatá diskuze probíhala také během přestávky. Další sekce otevřela téma genetické variability v imunitním systému, kde bylo referováno zejména o poznatcích týkajících se struktury a významu molekul hlavního histokompatibilního systému (MHC). Animovaná prezentace objasňující genetické základy konzervovanosti vs. variability MHC molekul byla doplněna klinickými aspekty se zřetelem zejména na transplantace tkání a orgánů. Na toto téma vhodně navázal další příspěvek, který představil transplantaci kostní dřeně s využitím komentovaných videozáznamů přímo z lékařské praxe.

Poslední sekce závěrečného dne konference zaměřená na experimentální molekulární biologii byla otevřena přednáškovou částí, která představila zejména molekulu COP-1 coby strážce buňky. COP-1 protein má totiž enzymatické funkce

ovlivňující vývoj rostlin v závislosti na světelných podmínkách. COP-1 je tak klíčový pro jejich fotomorfogenezi, kdy z půdy pučící rostlina musí zahájit fotosyntézu. Přednáška se zabývala propojením světelného stimulu a genové exprese a ukázala úlohu COP-1 jako ubikvitin ligázy při degradaci proteinů. Teoretické poznatky z této sekce byly doplněny praktickými zkušenostmi během odpolední exkurze do Laboratoře molekulární fyziologie rostlin, která Mendel Forum 2010 uzavřela. Sborník konferenčních příspěvků byl vydán pod ISBN 978-80-7305-117-4 a poskytnut všem 170 registrovaným účastníkům konference. Elektronicky je dostupný společně s fotogalerií na webové stránce <http://cit.vfu.cz/fyziolmed>.

Mendel Forum 2010 – prezentace a přednášející

Sekce: Od fyziologie k medicíně

Projekt ESF „Od fyziologie k medicíně“ (prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.)

Reportáž ze seminářů a exkurzí projektu v regionu Brno 2010 (doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.)

Zapojte se do projektu v regionu Olomouc v roce 2011! (RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.)

Kreativní fyziologické modely baví a vzdělávají (A. Fellnerová)

Sekce: Genetika-Mendel

Genetický kód v Nobelových cenách (doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.)

Mendel-Brno-Olomouc (PhDr. Anna Matalová)

Sekce: Aktuální poznatky z nádorové biologie

O původu nádorů (Mgr. Zuzana Koledová, Ph.D.)

Antabus – nový lék proti rakovině? (Mgr. Boris Cvek, Ph.D.)

Sekce: Zajímavosti z imuno hematologie

Genetická variabilita v imunitním systému (RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.)

Molekulární biologie krve (MUDr. Vladimír Horák)

Sekce: Experimentální molekulární biologie

COP 1 – buněčný „strážce“ (doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.)



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.

Mendelovo muzeum – výstavy roku 2010

Ondřej Dostál, Daniela Vránová

Rok 2010 byl pro Mendelovo muzeum náročným, ale zároveň nadmíru vydařeným. Muzeum připravilo dva výstavní projekty úzce vázané s osobností Gregora Mendela. První výstava se jmenovala **Včela brněnská**. Jak již název napovídá, jejím cílem bylo přiblížit návštěvníkům včelaření a život včel. Autorem výstavy byl doc. RNDr. Vladimír Ptáček, CSc. Nemohli jsme najít vhodnějšího autora. Pan docent Ptáček se již léta stará o původní Mendelův včelín; zná nejen zdejší včelařskou historii, ale i dnešní včelaření, a to i díky včelstvům, které u včelína chová.

Druhou výstavou, ovšem v pohledu náročnosti i prestiže jistě první, byla **výstava T. H. Morgan – velké pokusy na malých muškách** (obr. 1). Připravili jsme výstavu o významném genetikovi, který sice nikdy nenavštívil Brno, ale byl zásadní postavou v počátcích genetiky. Návaznost jeho práce na práci Mendela je více než jasná. Ideovou autorkou a autorkou textů byla prof. Jiřina Relichová, která navíc přednesla při zahájení výstavy přednášku věnovanou Mendelovi a historii genetiky. Role kurátorky se zhostila Bc. Zuzana Hanzelková, která, sice bez větších zkušeností, dokázala svoji erudici a preciznost při finálních úpravách textů a aranžmá výstavy. Aktivním partnerem celé výstavy bylo o.s. Biomania v čele s Mgr. Pavlem Reichmanem. Díky Mgr. Janu Škodovi, jednomu z členů tohoto sdružení, vznikl interaktivní výukový software umožňující návštěvníkům zkusit si křížit octomilky. Návštěvníky z řad odborné veřejnosti jistě potěší dva originální zápisky Morgana a originální obrázek octomilky nakreslený E. Wallace, které zapůjčil Caltech Archives. Akci podpořil Jihomoravský kraj.



Obr. 1: Pohled na tzv "Fly room" výstavy "T.H. Morgan - velké pokusy na malých muškách", kde jsou vystaveny Morganovy originální zápisky

Muzeum se však podílelo i na dalších výstavách. Počátkem roku představilo výstavu **Darwin**, která vznikla ve spolupráci s univerzitou v Lublani. Přes letní měsíce jsme hostili dvě umělecké výstavy autorů Pavla Herynka a Miloše Šejna. Mimo prostory opatství se muzeum podílelo na instalaci fotografické výstavy o práci našich vědců na antarktické stanici Johanna Gregora Mendela. Výstavní projekty, které byly realizovány ukazují na vzrůstající zájem o naše aktivity.

Muzeum pokračuje i ve spolupřádání prestižních **Mendel Lectures**. Pro letošní rok jsme připravili novou grafiku přednášek. Na této akci kromě PřF MU, LF MU podílí i rakouské VFG, IMP a akce je podporována statutárním městem Brno. Potěšitelný je i zvyšující se zájem o přednášky Lékařské genetiky zajištěné MUDr. Renatou Gaillyovou, Ph.D. Narůstající zájem dokazují i záštity nad akcí, které nám předal Jan Husák, poslanec PSP ČR, MUDr. Milena Černá, ředitelka Výboru Dobré vůle Nadace Olgy Havlové a Výbor Společnosti lékařské genetiky ČLS J. E. Purkyně.

Autentický prostor Mendelova refektáře se letos stal místem udělení čestného doktorátu MU významné osobnosti a držiteli Nobelovy ceny Karry B. Mullisovi (obr. 2).



Obr. 2: Karry B. Mullis, držitel Nobelovy ceny, při prohlídce Mendelova muzea MU s Ondřejem Dostálem, ředitelem muzea.

Mgr. Ondřej Dostál je ředitelem a **Mgr. Daniela Vránová** zástupkyní ředitele Mendelova muzea v Brně (e-mail: dostal@rect.muni.cz a vranova@rect.muni.cz).

RNA klub 2010

Martin Pospíšek

Není tomu tak dávno, kdy jsem podával na tomto místě zprávu o 7. ročníku RNA klubu a dnes mohu říci, že již i osmý ročník jest minulostí a rozbíhají se přípravy na ročník devátý. Však přistupme k jednotlivým událostem popořadě. Zdá se, že začíná být již tradicí, že výroční setkání českého RNA klubu se posouvají do pozdního podzimu, do měsíců října a listopadu. Také 8. ročník se konal na začátku listopadu minulého roku, tentokrát v Českých Budějovicích. Hlavním organizátorem byl Dr. Hassan Hashimi ze skupiny Prof. Julia Lukeše, kterému zdatně asistoval Mgr. Jiří Černý a řada dalších kolegů a studentů. Organizátorům se podařilo pro symposium zajistit reprezentativní prostory nově postavené budovy Filosofické fakulty Jihočeské univerzity. Počet registrovaných účastníků se stejně jako minulý rok přehoupnul přes osmdesátku. Na rozdíl od brněnského RNA klubu, kde jsme byli svědky zatím nejvyšší účasti ze zahraničí v historii RNA klubů, se tentokrát naprostá většina účastníků rekrutovala z českých a moravských laboratoří. Lze říci, že každá pořadatelská laboratoř vtiskla dosud RNA klubu nezaměnitelnou podobu a každé symposium tak bylo, při zachování hlavní myšlenky, originální, odlišující se svým zaměřením a skladbou účastníků od RNA klubů předcházejících. Pokud bychom chtěli sledovat vývoj, zaznamenané, že každým rokem v průměru stoupá kvalita příspěvků a zvyšuje se obsazení a závažnost plakátové sekce. Dalším trendem je zvyšující se počet příspěvků zabývajících se detailně prostorovým uspořádáním konkrétních ribonukleových kyselin a ribonukleoproteinových komplexů a odpovídajícími vztahy mezi strukturou a funkcí. Pokud bychom chtěli soudit podle letošního ročníku, je velmi příjemné, že RNA klub objevili i virologové. Přitažlivost symposia zvyšovali, jak již se stalo též dobrou tradicí, zvaní zahraniční řečníci. V osmém ročníku RNA klubu jimi byli Prof. Frédéric Allain z Ústavu molekulární biologie a biofyziky Spolkového technického institutu v Curychu a Dr. Jernej Ule z Cambridžské MRC Laboratoře molekulární biologie, kteří v průběhu svých čtyřicetiminutových plenárních přednášek předvedli své nejnovější výsledky v kontextu současného vědění v oboru. Prof. Allain promluvil na téma „Insight into RNA splicing and editing mechanism from the NMR structures of protein-RNA complexes“. Dr. Ule přednesl příspěvek nazvaný „The interplay between the RNA-binding proteins and the non-coding RNA elements“. Toto však nebyly jediné povinnosti letošních plenárních řečníků. Oba byli organizátory požádáni, aby byli tak laskaví a ohodnotili příspěvky studentů a mladých vědeckých pracovníků a vybrali pět nejlepších u nichž určí pořadí. Oba pozvaní hosté se svého úkolu zhostili velice zodpovědně. Důvodem pro takovou novinku bylo, že se nám letos podařilo získat podporu pro ocenění mladých vědců, jejichž příspěvky zaujmou nejvíce svojí kvalitou i způsobem presentace. Všech pět oceněných mladých vědců a vědkyň získalo zdarma roční členství v RNA Society a s tím i předplatné špičkového vědeckého časopisu RNA. Ocenění Hana Černá z Masarykovy Univerzity, NCBR, Brno (příspěvek „NMR study of Nrd1 CID in complex with Ser5-phosphorylated CTD of RNA polymerase II“), Zdeněk Paris z Parazitologického ústavu AV ČR v.v.i. v Českých Budějovicích (příspěvek „Mitochondrial thiolation and tRNA editing: One

modification, two different outcomes“) a Petr Hlubuček z Přírodovědecké fakulty, UK Praha (příspěvek „NA2Dsearch: fast and easy tool for secondary structure searches through large datasets in parallel“), kteří se umístili na třetím až pátém místě, navíc získali finanční prémii ve výši 3000 Kč. Na druhém místě, oceněným navíc odpuštěním registrace na výroční konferenci The RNA Society v japonském Kjoto a finančním příspěvkem na cestu ve výši 1000 USD se těsně umístil Petr Holub z NCBR Masarykovy Univerzity v Brně s příspěvkem "About the TRAMP: Structural and functional characterization of RNA surveillance complex". Na prvním místě se umístila Anna Lounková z Ústavu molekulární genetiky, AV ČR v.v.i. v Praze s příspěvkem "Splicing of avian retrovirus in permissive and non-permissive cells". První cena pokrývá náklady na cestu na konferenci v Kjoto a vložné na tuto konferenci. Finanční i nefinanční ceny byly získány za podpory The RNA Society a Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR (projekt INGO LA10023 řešený M. Pospíškem). V závěru bych chtěl touto cestou spolu s organizátory poděkovat všem institucionálním i firemním sponzorům, bez jejichž stálé podpory by konání této konference nebylo možné. Další ročník RNA klubu proběhne pravděpodobně v Praze a informace o jeho organizaci lze získat na tradiční adrese rna_club@natur.cuni.cz.

RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D. je vedoucím Laboratoře biochemie RNA na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (e-mail: martin@natur.cuni.cz).

Genetika v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

Jan Nešvera



Studium genetiky mikroorganismů je nedílnou součástí vědecké práce v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze 4-Krči. Z 28 laboratoří MBÚ AV ČR mají tři laboratoře slovo genetika (nebo genový) přímo v názvu. Jedná se o Laboratoř molekulární genetiky bakterií (vedoucí dr. J. Nešvera), Laboratoř genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub (vedoucí dr. M. Flieger) a Laboratoř regulace genové exprese (vedoucí dr. L. Valášek). Studium genetického materiálu mikroorganismů a různých aspektů jeho funkcí a jejich regulací se ve větší či menší míře zabývá i většina ostatních laboratoří MBÚ. Sekvenování DNA pro laboratoře MBÚ i pro další pracoviště zajišťuje Středisko sekvenování DNA vedené dr. J. Felsbergem.

Vědecký program Laboratoře molekulární genetiky bakterií je zaměřen na čtyři směry výzkumu. Jedná se (1) o studium funkce restriktivně-modifikačních systémů typu I, (2) o studium regulace exprese genů u bacilů a (3) u prakticky významných korynebakterií a rhodokoků a (4) o genetickou charakterizaci mikrobiálních společenstev v kontaminovaných lokalitách. Laboratoř regulace genové exprese se zabývá detailním studiem mechanismů regulace translace u kvasinek. Genetické

přístupy používají i další laboratoře Sektoru buněčné a molekulární mikrobiologie, jejichž práce je zaměřena na studium kvasinek (Laboratoř reprodukce buňky - vedoucí ing. J. Hašek; Laboratoř buněčné biologie - vedoucí dr. L. Váchová). Jedná se například o studium mechanismů redistribuce proteinů účastnících se translace v buňce kvasinek a regulace exprese genů kódujících exportéry amoniaku. Používání metod molekulární genetiky přispělo k získání významných výsledků při studiu patogenních bakterií v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů (vedoucí ing. P. Šebo) a v Laboratoři buněčné signalizace (vedoucí dr. P. Branny). Modelovými bakteriemi studovanými v těchto laboratořích jsou *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae*. Analýzou bakteriálních proteomů a vytvářením matematických modelů regulace transkripce a translace u mikroorganismů se zabývá Laboratoř bioinformatiky (vedoucí ing. J. Vohradský).

Laboratoř genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub je zaměřena zejména na studium fylogeneze vztahů symbiotických a parazitických hub s jejich hostiteli (vyšší rostliny, hmyz). Tradičními modelovými organismy, dlouhodobě studovanými v MBÚ AV ČR, jsou streptomycety. Studium genetických základů biosyntézy sekundárních metabolitů u streptomycet, zejména antibiotik, se zabývají Laboratoř biologie sekundárního metabolismu (vedoucí ing. J. Janata), Laboratoř molekulární biologie aktinomycet (vedoucí ing. M. Petříček) a Laboratoř mikrobiální proteomiky (vedoucí dr. J. Weiser). Genetické přístupy jsou využívány i v Laboratoři biotransformací (vedoucí prof. V. Křen), například pro dosažení účinné exprese genů z různých druhů hub, kódujících nitrilasy, v bakteriích. Praktickými aplikacemi bakteriální genetiky se zabývá v laboratorním měřítku Laboratoř enzymových technologií (vedoucí dr. P. Kyslík). Získané produkční kmeny mikroorganismů jsou pak v Laboratoři fermentačních technologií (vedoucí ing. M. Sobotka) testovány v provozních podmínkách. Pro detailní charakterizaci produktů mikrobiálního metabolismu slouží metody hmotnostní spektrometrie a spektroskopie nukleární magnetické resonance zavedené a používané v Laboratoři charakterizace molekulární struktury (vedoucí doc. V. Havlíček). Součástí této laboratoře je i pracovní skupina zabývající se elektronovou mikroskopií. V poslední době jsou genetické přístupy zaváděny i v Sektoru ekologie, zejména v Laboratoři environmentální mikrobiologie (vedoucí dr. P. Baldrian) a v Laboratoři biologie hub (vedoucí doc. M. Gryndler). Jedná se zejména o genetickou charakterizaci izolátů bakterií a hub z půdy.

Genetické přístupy jsou využívány i na detašovaném pracovišti MBÚ AV ČR, v Sektoru autotrofních mikroorganismů v Třeboni. Jsou studovány zejména mechanismy regulace fotosyntézy u sinic (Laboratoř fotosyntézy - vedoucí prof. O. Prášil) a regulace buněčného cyklu řas (Laboratoř buněčných cyklů řas - vedoucí dr. K. Bišová). Výsledky získané studiem genetiky a fyziologie řas a sinic v laboratorních podmínkách jsou pak využívány v provozním měřítku v Laboratoři řasových biotechnologií (vedoucí doc. J. Masojídek).

Na závěr lze říci, že výsledky genetické analýzy různých druhů prokaryontních i eukaryontních mikroorganismů, získané v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, představují značný objem poznatků, komplementárních k výsledkům studia genetiky rostlin a živočichů (včetně člověka) získaných na jiných vědeckých pracovištích v České republice.



RNDr. Jan Nešvera, CSc. je vedoucím Sektoru buněčné a molekulární mikrobiologie a Laboratoře molekulární genetiky bakterií Mikrobiologického ústavu AV ČR (e-mail: nesvera@biomed.cas.cz)

Nový gén rezistencie pšenice voči *B. graminis* Nové stratégie v mapovaní génov rezistencie pšenice

Peter Civiň

Úvod

Pšenica (*Triticum* L.) je jednou z najvýznamnejších poľnohospodárskych plodín v celosvetovom meradle, a to z hľadiska plochy výsevu, ako aj kalorickej spotreby ľudstva. Jej allopolyploidný genóm s komplikovanou organizáciou chromozómov v homeologických skupinách a s dĺžkou päť krát väčšou ako je genóm človeka (*T. aestivum* L. $\sim 1,7 \times 10^{10}$ bp) však predstavuje veľkú prekážku v molekulárno-genetickej charakterizácii tejto dôležitej plodiny. Až približne 80% genómovej dĺžky pšenice zaberajú transpozabilné elementy (TE), a to predovšetkým LTR-retrotranspozóny, (Long Terminal Repeat) ktoré sú hlavnou príčinou expanzie genómu. Gény sú preto riedko roztrúsené v obrovskom mori repetitívnych sekvencií, čo robí ich molekulárnu charakterizáciu extrémne obtiažnou.

Dôležitým krokom v genetickej charakterizácii pšenice je tzv. molekulárne mapovanie génov – intrachromozomálna lokalizácia génov a identifikácia molekulárnych markerov v tesnej väzbe so skúmanými génmi. Okrem toho, že molekulárne markery sprostredkovávajú informáciu o chromozomálnej a subchromozomálnej lokalizácii génov a v ideálnom prípade aj umožňujú ich klonovanie a sekvenovanie, predstavujú tiež cenný nástroj v šľachtiteľských programoch. Molekulárne markery pomáhajú detegovať a identifikovať prítomnosť génov bez potreby skúmania fenotypu rastliny, a môžu zefektívniť šľachtenie nových kultivarov prostredníctvom MAS (Marker-Assisted Selection). Kvôli veľkosti a kompozícii genómu pšenice sú však stratégie chromozomálnej lokalizácie génov zdĺhavé a často problematické; techniky molekulárnych markerov zas nespĺňajú mnohé požiadavky na optimálny markerový systém. Je preto dôležité venovať veľkú pozornosť vývoju efektívnych laboratórnych postupov, ktoré by urýchlili získavanie poznatkov o genómoch obilnín a ich praktické aplikácie v poľnohospodárskej produkcii.

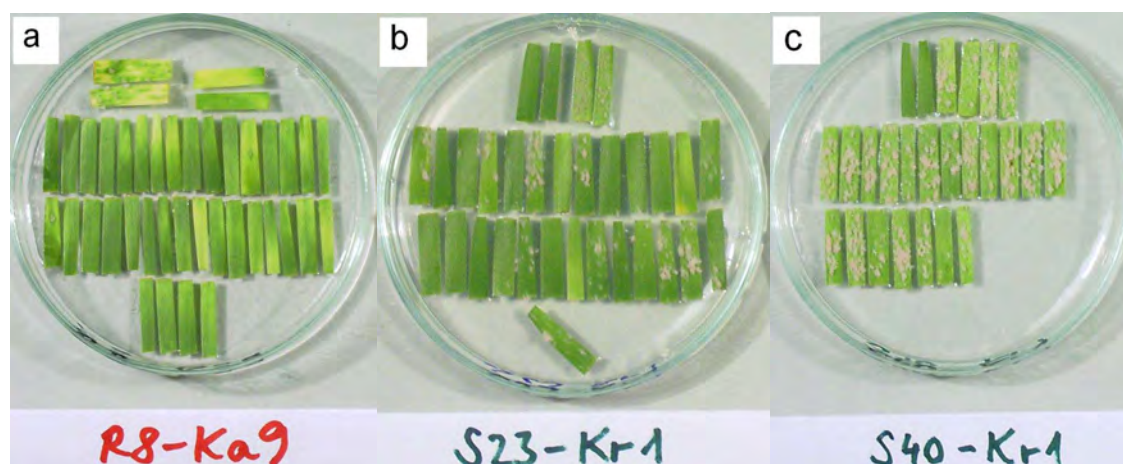
K agronomicky najdôležitejším génom pšenice patria tie, ktoré zabezpečujú rezistenciu voči biotickým stresovým faktorom prostredia, ako sú napr. fungálne ochorenia. Tieto gény zdieľajú niektoré spoločné znaky na úrovni DNA sekvencie a vytvárajú tak veľmi širokú skupinu tzv. R-génov (Resistance genes), resp. im podobných RGA (Resistance Gene Analogues). Doposiaľ osekvenované R-gény rastlín často kódujú proteíny so štruktúrou NBS-LRR (Nucleotide Binding Site – Leucine-Rich Repeat), ktoré obsahujú pomerne konzervované sekvenčné motívy (napr. P-slučka, kináza-2 a GLPL motívy v NBS doméne). Predpokladaná funkcia týchto proteínov je v špecifickom rozpoznávaní prítomnosti patogéna, resp. jeho produktov v cytoplazme bunky, a v transdukcii signálu, ktorý vyvolá obrannú odpoveď rastliny. Povaha väčšiny patosystémov rastlín a parazitov však vedie k ich ko-evolúcii, v dôsledku ktorej sa neustále selektujú rastliny s účinnými génmi rezistencie a virulentné rasy patogénov schopné túto rezistenciu hostiteľa prekonať. Tieto Rydleyovské preteky Červenej kráľovnej sa v prírodných podmienkach ustália v rovnovážnom stave vďaka genetickej diverzite populácií hostiteľa a patogéna. No v podmienkach moderného poľnohospodárstva s geneticky

uniformnými monokultúrami sú gény rezistencie frekventovaných kultivarov rýchlo prekonané virulentnými rasami patogéna. Ak chceme bojovať s parazitickými ochoreniami poľnohospodárskych plodín ekonomicky výhodne a ekologicky bezpečne, je potrebné neustále hľadať nové genetické zdroje s účinnými génmi rezistencie. Subchromozomálnemu mapovaniu týchto génov a ich následnej inkorporácii do genetickej výbavy výkonných kultivarov musia asistovať vhodné typy molekulárnych markerov.

Nový gén rezistencie

Nášmu tímu sa podarilo identifikovať nový genetický zdroj rezistencie pšenice voči múčnatke trávovej (*Blumeria graminis* (DC) E.O. Speer f. sp. *tritici*). Týmto genetickým zdrojom (označili sme ho ako GZ1) je tetraploidná krajová odroda *Triticum turgidum* subsp. *dicoccum*, ktorá bola v minulosti lokálne využívaná v tradičnom poľnohospodárstve. Skutočnosť, že GZ1 vlastní doposiaľ neznámy a nevyužívaný gén rezistencie, sme preukázali na viacerých úrovniach: (i) GZ1 prejavil v juvenilnom štádiu (primárny list) úplnú rezistenciu voči sade izolátov *B. graminis*, ktoré vďaka ich špecifickej virulencii umožňujú diferencovať väčšinu známych *Pm* génov (Powdery Mildew – gény rezistencie voči múčnatke trávovej). (ii) GZ1 prejavil tiež úplnú rezistenciu voči všetkým izolátom *B. graminis* zozbieraných v rôznych lokalitách Slovenska v rokoch 2006-2007. (iii) Na cytologickej úrovni sme pozorovali výnimočnú rezistenciu GZ1 aj v adultívnom štádiu (sekundárny a terciárny list), kde sa do hyfálnej formy vyvinulo len 0,1% spór *B. graminis* (ESH/App = 0,1). (iv) Rezistenciu sme pozorovali počas niekoľkých rokov aj v poľných podmienkach, kde si GZ1 zachovával úplnú odolnosť voči múčnatke trávovej počas celého vegetačného obdobia, a to aj pri vysokom infekčnom tlaku.

Pre mendelistickú charakterizáciu rezistencie sme uskutočnili kríženia GZ1 s náchylnou odrodou. F₁ generácia kríženia GZ1 s CGN08354 neprejavila rezistenciu odolného rodiča. F₂ generácia štiepila náchylné a odolné rastliny v pomere 265:96 (obr. 1). Výsledky kríženia teda poukazujú na monogénne podmienenú rezistenciu zabezpečovanú recesívnym génom (χ^2 -test: 0,50 > P > 0,30).



Obr. 1: Reakcie F_{2:3} rodín kríženia CGN08354 × GZ1 na múčnatku trávovú. Poradie listových segmentov: **(a)** – 1. riadok (horizontálne) 2 × náchylný rodič; 2 × GZ1; v ďalších riadkoch nasleduje 36 jedincov z F₃ generácie odvodenej z F₂ jedinca R8; **(b)** – 1. riadok 2 × GZ1; 2 × náchylný rodič; v ďalších riadkoch nasleduje 27 jedincov z F₃ generácie odvodenej z F₂ jedinca S23; **(c)** – 1. riadok 2 × GZ1; 2 × náchylný rodič; 2 × NT-10; v ďalších riadkoch nasleduje 19 jedincov z F₃ generácie odvodenej z F₂ jedinca S40. F₃ generácia umožnila identifikovať genotyp príslušných F₂ rastlín – R8 je recesívny homozygot; S23 je heterozygot; S40 je dominantný homozygot. Takto je možné vyberať do BSA len homozygotné jedince.

Recesivita je u *Pm* génov skôr výnimočná – 9/10 známych génov rezistencie voči múčnatke je dominantných. Jeden z využívaných recesívnych *Pm* génov je multialelický *pm5*, ktorého pôvod taktiež siaha k *T. turgidum* subsp. *dicoccum*. Bolo preto potrebné prešetriť, či rezistencia GZ1 je alebo nie je podmienená novou alelou *pm5* lokusu. Dávnejšie boli popísané dva mikrosatelitové markery (*Xgwm1267* a *Xgwm783*), ktoré sú v genetickej väzbe s *pm5* lokusom. Ak majú GZ1 a náchylný rodič odlišné varianty týchto mikrosatelitov, je možné sledovať distribúciu mikrosatelitových variant v potomstve ich kríženia. Analýzy ukázali, že varianty *Xgwm1267* a *Xgwm783* sú distribuované v potomstve kríženia CGN08354 × GZ1 náhodne vo vzťahu k rezistencii voči múčnatke (oba rodičovské typy sa objavujú u rezistentných aj náchylných jedincov). A keďže mikrosatelity *Xgwm1267* a *Xgwm783* sú vo väzbe s *pm5* lokusom, sú aj varianty *pm5* génu distribuované v potomstve bez súvislosti s pozorovanou rezistenciou. Rezistencia GZ1 teda nie je podmienená alelou lokusu *pm5*, a s veľkou pravdepodobnosťou ju zabezpečuje nový gén s neznámou lokalizáciou.

Samotná identifikácia genetického zdroja rezistencie a charakterizácia génu na mendelistickej úrovni však nemá pre praktické využitie bezprostredný význam. Genetickým zdrojom je totiž tetraploid – plevnatá pšenica dvojzrnová, kým hlavnou poľnohospodárskou plodinou je hexaploidná pšenica letná (*T. aestivum*). Pre praktické využitie novej rezistencie jej inkorporáciou do genetickej výbavy výkonných kultivarov *T. aestivum* by bolo žiaduce lokalizovať zodpovedný gén a identifikovať molekulárne markery v jeho tesnej väzbe. Prenos novej rezistencie by sa tak mohol zjednodušiť a zefektívniť pomocou metód tzv. molekulárneho šľachtenia.

Stratégie mapovania

Aké sú teda súčasné možnosti molekulárneho mapovania génov pšenice?

a) Populácia, ktorá štiepy sledovaný znak (napríklad F_2 generácia kríženia) sa rozdelí do skupín podľa pozorovaného fenotypu (v našom prípade rezistentné jedince a náchylné jedince), a tieto skupiny sa podrobia skríningu čo najväčším počtom mikrosatelitových markerov z genetickej mapy pšenice. Cieľom je identifikácia mikrosatelitov, ktoré sa v jednej fenotypovej skupine vyskytujú častejšie (alebo vždy) a v druhej fenotypovej skupine zriedkavejšie (alebo vôbec) v porovnaní s náhodnou distribúciou. Tento skrínig je výrazne zefektívnený metódou BSA (Bulked Segregant Analysis), a vedie k identifikácii mikrosatelitných markerov geneticky viazaných k sledovanému génu. Keďže chromozomálna lokalizácia viazaných mikrosatelitov je známa z genetickej mapy pšenice, odhalí sa tak aj chromozomálna lokalizácia hľadaného génu. Následne je možné testovať štiepiacu populáciu všetkými známymi markermi z určeného chromozómu alebo jeho ramienka, a tým odhaliť relatívne presnú genetickú vzdialenosť sledovaného génu od okolitých markerov.

Nevýhodou tejto stratégie je veľká finančná náročnosť. Pre úvodný skrínig je zväčša potrebné, vzhľadom na veľkosť pšeničného genómu, testovať viac ako stovky mikrosatelitových markerov, čo v súčasnosti predstavuje investíciu často presahujúcu 10 000 € len na nákup oligonukleotidov. Keďže spravidla len frakcia mikrosatelitov produkuje polymorfizmus medzi rodičmi štiepiacej populácie (tzn. je potenciálne informatívna pri testovaní potomstva), nemusí ani takto vysoký počet mikrosatelitových markerov viesť k úspešnému zmapovaniu hľadaného génu. V prípade, že dané pracovisko plánuje využiť tieto markery na mapovanie len jedného génu, je takáto investícia značne nevhodná.

b) Druhá stratégia molekulárneho mapovania génov pšenice je založená na tom, že chromozomálna lokalizácia sledovaného génu sa determinuje ešte pred mapovaním, a to s využitím nuli-tetrazomických línií pšenice. Syntézia homologických chromozómov pšenice totiž umožňuje pripraviť línie, v ktorých je nulizomický stav jedného chromozómu kompenzovaný tetrazomickým stavom iného chromozómu tej istej homeologickej skupiny (napr. línia nuli7B-tetra7D). Po krížení nositeľa sledovaného génu s kompletnou sadou nuli-tetrazomikov (ktorá obsahuje nulizomikov pre všetky pšeničné chromozómy) je tak možné princípom monozomickej analýzy identifikovať chromozóm, na ktorom sa daný gén nachádza. V prípade recesívneho génu bude F_1 generácia jedného z krížení neštandardne obsahovať aj jedince s recesívnym fenotypom, pretože chromozóm s mapovaným génom bude v monozomickom stave. V prípade mapovania dominantného génu sa chromozomálna lokalizácia odhalí neštandardným štiepením F_2 populácie. Po identifikácii chromozómu, na ktorom sa hľadaný gén nachádza, sa na účely jemného mapovania testujú už len molekulárne markery tohto chromozómu, čím sa výrazne redukuje množstvo molekulárnych analýz.

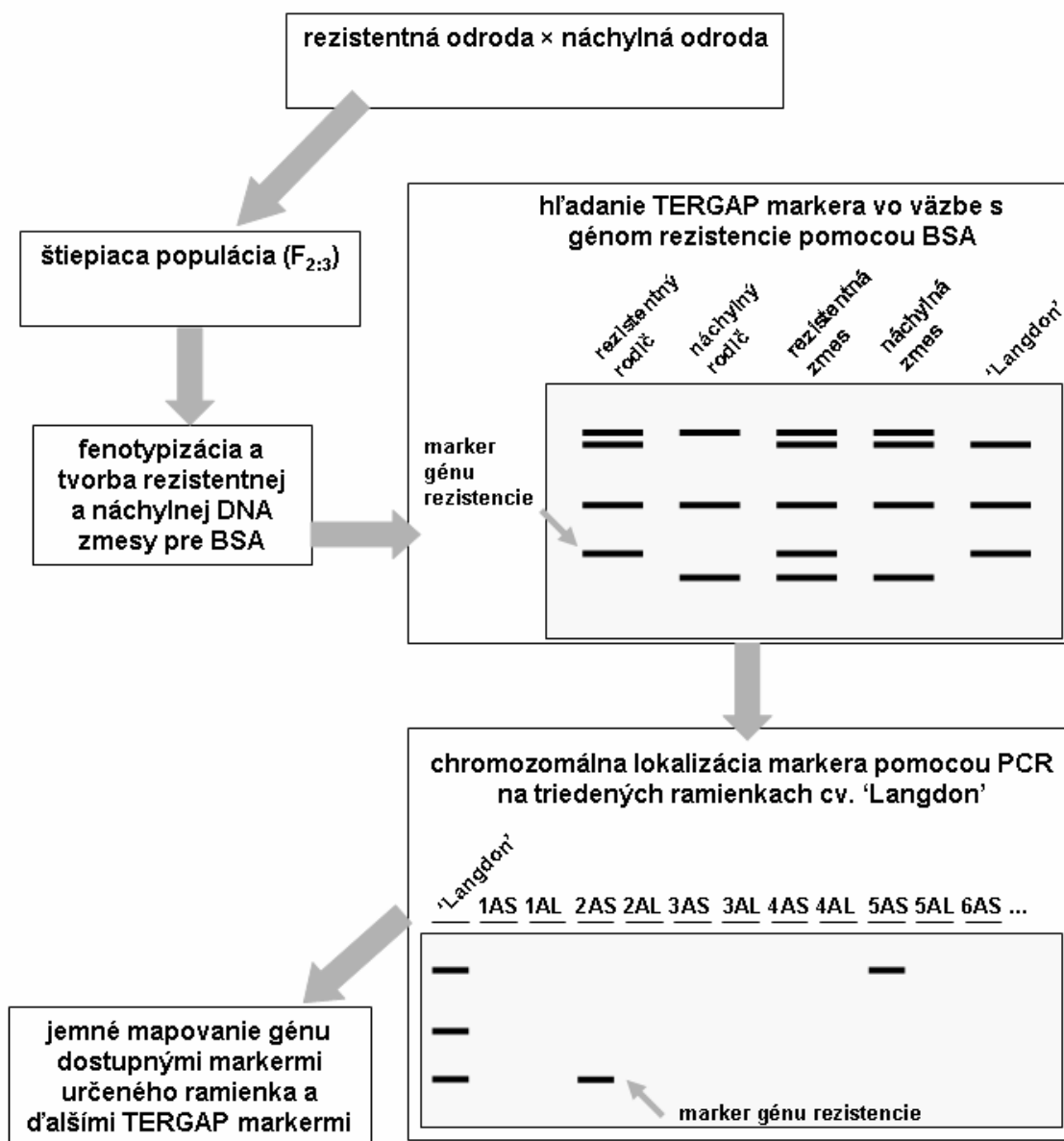
Nuli-tetrazomické línie pšenice sú však ťažko dostupné; nuli-tetrazomici tetraploidných pšeníc boli dokonca vyvinuté len nedávno v USA. A hoci analýza potomstva krížení vybraného genotypu s aneuploidnými líniami pšenice je relatívne presným a spoľahlivým nástrojom chromozomálnej lokalizácie génov pšenice, jeho hlavnými nevýhodami sú časová náročnosť a prácnosť experimentov. Je totiž nevyhnutné uskutočniť 21 hybridizácií (resp. 14 v prípade tetraploidných pšeníc) s kompletnou sadou nuli-tetrazomikov, a závery je možné robiť až po zhodnotení fenotypu dostatočne veľkých populácií F_1 , resp. F_2 generácie. Životaschopnosť a fertilita aneuploidov je navyše značne znížená a hybridné zrná majú slabú klíčivosť, preto je nutné krížiť viacero jedincov každej aneuploidnej línie.

Nové možnosti

Nedávne úspechy v separácii pšeničných chromozómov pomocou prietokového cytometra, dosiahnuté v skupine prof. Doležela v Laboratóriách experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci, znamenajú veľký progres predovšetkým v sekvenovaní genómu pšenice. No metodiky vyvinuté týmto tímom otvárajú viacero dverí v genomike pšenice. Je napríklad možné relatívne rýchlo separovať jednotlivé chromozomálne ramienka tetraploidného kultivaru 'Langdon', a to v čistote a kvantite vyhovujúcej pre štandardný PCR skrining. (Ramienka je možné separovať práve z cv. 'Langdon' vďaka tomu, že z tohto kultivaru boli vytvorené ditelozomické línie s aberantnými chromozómami.) V našej pracovnej skupine vznikla myšlienka využiť cytometricky triedené ramienka na chromozomálnu lokalizáciu génu rezistencie GZ1. PCR na separovaných ramienkach cv. 'Langdon' môže byť priamo zakomponovaná do projektu mapovania, a nahradiť tak analýzy nuli-tetrazomických krížení (obr. 2).

Idea je založená na rýchlej identifikácii anonymného markera, ktorý je vo väzbe s génom rezistencie GZ1 a zároveň je prítomný u cv. 'Langdon'. Prítomnosť takéhoto markera je potom zisťovaná pomocou PCR na jeho cytometricky separovaných ramienkach, čím sa odhalí chromozomálne ramienko viazaného génu. Na rýchlu identifikáciu markera vo väzbe je možné využiť cenovo efektívne markerové techniky, ktoré produkujú množstvo anonymných markerov (s neznámou lokalizáciou). Tomuto účelu v súčasnosti slúžia hlavne metódy AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) a RGAP (Resistance Gene Analogue Polymorphism), ktoré sú však pomerne technicky náročné, s nevysokým percentom polymorfných markerov.

Navyše, AFLP markery je pre účely mapovania potrebné konvertovať na SCAR markery (Sequence-Characterised Amplified Region), no väčšina konvertovaných SCAR markerov si nezachováva špecificitu pôvodného AFLP markera a nemôže byť teda využitá na mapovanie. Na tento problém sme narazili aj v prípade rezistencie GZ1. Podarilo sa nám identifikovať AFLP marker v *repulsion* fáze ku génu rezistencie, no SCAR marker z neho odvodený amplifikoval repetíciu roztrúsenú po genóme.

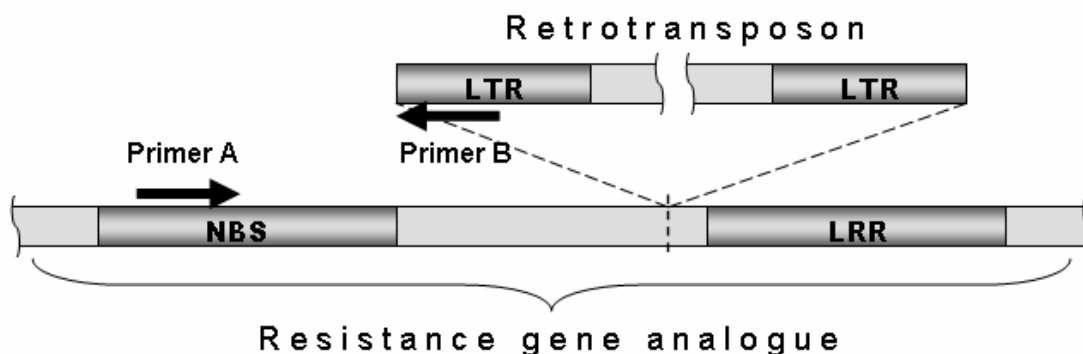


Obr. 2: Schéma navrhutej stratégie mapovania génov rezistencie tetraploidných pšeníc, ktorá zaŕňa novú techniku Tergap a využíva prietokovým cytometrom separované chromozomálne ramienka.

TERGAP

Na účely rýchlej identifikácie anonymných markerov génov rezistencie pšenice sme preto vyvinuli originálnu metódu Tergap (Transposable Element – Resistance Gene Analogue Polymorphism; obr. 3), ktorá využíva dynamiku všadeprítomných

retrotranspozónov v genóme pšenice a skutočnosť, že konzervované motívy RGA sú relatívne početné a často sa zhlukujú s aktívnymi génmi rezistencie. Technika je založená na štandardnej PCR, v ktorej sú kombinované primery komplementárne k LTR určitých retrotranspozónov s primermi rozpoznávajúcimi konzervované motívy NBS- LRR génov. PCR zväčša produkuje viacero produktov v dĺžkovom spektre, ktoré je ľahko odlišiteľné na agarózových géloch.



Obr. 3: Princíp TERGAP-PCR. *Primer A* je komplementárny ku konzervatívnym motívom NBS domény NBS-LRR génov, ktorých sú v genóme pšenice pravdepodobne tisíce. *Primer B* rozpoznáva úseky dlhých koncových repetícií určitej triedy LTR-retrotranspozónov a smeruje od retroelementu. Polymorfizmy sú podmienené predovšetkým dynamikou aktívnych retroelementov, ktoré sa diferenciálne inzertujú v blízkosti NBS domén.

Výsledky

Pomocou PCR zacielenej na náhodne vybraný zmapovaný mikrosatelit pšenice sa nám podarilo demonštrovať, že chromozomálne ramienka triedené na prietokovom cytometri sú spoľahlivým nástrojom na chromozomálnu lokalizáciu jedno-kópiových DNA markerov. Pri použití 50-100 ramienok v PCR bol zaznamenaný mikrosatelitový produkt iba v reakcii s príslušným ramienkom.

Ukázalo sa tiež, že metóda TERGAP je aplikovateľná bez zložitej optimalizácie priamo na separované ramienka, a umožňuje tak rýchlu a jednoduchú chromozomálnu lokalizáciu anonymných TERGAP markerov.

V štiepiacej populácii kríženia CGN08354 × GZ1 sa nám podarilo identifikovať jeden TERGAP marker v *coupling* fáze s génom rezistencie. Po aplikácii danej kombinácie primerov na chromozomálne ramienka cv. 'Langdon' bol amplifikovaný veľkostne zhodný produkt z ramienka 2AS. Tento výsledok označuje 2AS ramienko za miesto lokalizácie nového génu rezistencie GZ1, no kvôli možnosti homoplázie je potrebné potvrdiť lokalizáciu viacerými markermi a ich sekvenáciou. (veľkostne zhodné TERGAP produkty Langdonu a GZ1 nemusia byť ortológmi. Môže ísť o PCR produkty s rôznou lokalizáciou a sekvenciou, ktoré majú rovnakú veľkosť len vplyvom náhody.)

V súčasnosti pracujeme na vývoji sady NBS- a LTR-primerov, vďaka ktorým sa môže metóda TERGAP stať plnohodnotným a užitočným nástrojom identifikácie molekulárnych markerov rastlinných R-génov. Touto sadou primerov plánujeme identifikovať ďalšie markery rezistencie GZ1 a potvrdiť tak lokalizáciu tohto génu. Naším dlhodobým cieľom je klonovanie génu rezistencie GZ1. Totálna účinnosť tohto génu voči rasám *B. graminis* totiž naznačuje, že by mohlo ísť o výnimočnú

rezistenciu zabezpečovanú mechanizmom, ktorý je odlišný v porovnaní so známymi génmi rezistencie pšenice voči múčnatke.

Literatúra

- Charles, M., Belcram, H., Just, J., Huneau, C., Viollet, A., Couloux, A., Segurens, B., Carter, M., Huteau V., Coriton O., Appels, R., Samain, S., Chalhou, B. (2008). Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat. *Genetics* 180: 1071-1086.
- Huang, X.Q., Röder, M.S. (2004). Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica* 137: 203-223.
- Huang, X.Q., Wang, L.X., Xu, M.X., Röder M.S. (2003). Microsatellite mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm5e* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 858-865.
- Kubaláková, M., Kovářová, P., Suchánková, P., Číhalíková, J., Bartoš, J., Lucretti, S., Watanabe, N., Kianian, S.F., Doležel J. (2005). Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics* 170: 823-829.
- Li, G., Fang, T., Zhang H. (2009). Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene *Pm41* on chromosome 3BL derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). *Theor. Appl. Genet.* 119: 531-539.
- Lin, F., Chen, X.M. (2007). Genetics and molecular mapping of genes for race-specific all-stage resistance and non-race-specific high-temperature adult-plant resistance to stripe rust in spring wheat cultivar Alpowa. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1277-1287.
- Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
- Sears, E.R. (1953). Nullisomic analysis in common wheat. *Am. Nat.* 87: 245-252.
- Zhou, T., Wang, Y., Chen, J.-Q., Araki, H., Jing, Z., Jiang, K., Shen, J., Tian, D. (2004). Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Mol. Gen. Genomics* 271: 402-415.



Mgr. Peter Civiň, Ph.D. je vedeckým pracovníkom Katedry genetiky, Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Pracuje v laboratóriu Doc. RNDr. Miroslava Šveca, CSc., kde sa zaoberá molekulárnou genetikou obilnín a fylogenetickou analýzou pšenice. Dizertačnú prácu obhájil v roku 2010.

Význam homologickej rekombinácie v rôznych bunkových procesoch

Miroslava Slaninová

Úvod

Udržanie integrity genómu a jeho presná replikácia sú základnými požiadavkami v živote buniek a organizmov. Tieto esenciálne požiadavky sú zabezpečované a kontrolované sériou prepojených metabolických procesov, ktorých základné komponenty sú väčšinou konzervované vo všetkých ríšach organizmov. Všetky životné procesy sú však napriek ich viacúrovňovej kontrole spojené s chybami. Okrem rizika chýb v mechanizmoch zabezpečujúcich život bunky, sú organizmy vystavené množstvu vonkajších vplyvov, ktoré spôsobujú poškodenia buniek. Pokiaľ je poškodená DNA, nastáva riziko nielen pre samotnú bunku a jej životné funkcie, ale aj riziko prenosu poškodenej alebo zmenenej DNA do dcérskych buniek a s tým často spojené následky pre celý organizmus. Pokiaľ zmeny nastanú v pohlavných bunkách, následky sa prenású na potomstvo.

Význam homologickej rekombinácie

Výmena genetickej informácie medzi dvoma molekulami DNA, nazývaná homologická rekombinácia, je esenciálny proces nevyhnutný k správne mu priebehu rôznych životných dejov v bunke. V meióze sa uplatňuje pri vytváraní pohlavných buniek, kde dochádza k výmene úsekov materských a otcovských chromozómov a tak vzniku diverzity v potomstve tých istých rodičov. V prvom meiotickom delení sa významnou mierou podieľa na správnej segregácii chromozómov vytvorením prekrížení, crossing-overov medzi homologickými chromozómami. Prispieva tak ku zachovaniu stability genómu každého druhu. V mitotických bunkách má veľký význam pri rekonštrukcii replikácie, kde opravuje hlavne dvojvláknové zlomy (DSB) vznikajúce často kolapsom replikačnej vidlice. Okrem toho opravuje DSB vzniknuté vplyvom látok vonkajšieho prostredia ako je ionizujúce žiarenie, ultrafialové žiarenie (UV) a takisto poškodenia typu križových väzieb, ktoré spôsobujú niektoré agensy. Pri nefunkčnej telomeráze je dôležitá pri údržbe telomér. Neopravené DSB, ktoré vznikajú buď priamo alebo ako medziprodukt pri úprave iných poškodení môžu spôsobiť mutagénne procesy ako je strata chromozómov, delécie, duplikácie alebo translokácie, čo sú procesy často vedúce ku karcinogéneze (Mimitou a Symington, 2009 A). HR je preto významným procesom, ktorý prispieva k zachovaniu integrity genómu. Mutanty v génoch, nevyhnutných pre HR sú v nižších organizmoch ako napr. kvasinky *S. cerevisiae* extrémne citlivé na poškodenia spôsobené ionizujúcim žiarením, majú narušenú sporuláciu a meiózu, a takisto majú poruchu v prepínaní párovacieho typu, čo sú štandardné bunkové procesy, pri ktorých prirodzene vznikajú DSB (Game a Mortimer, 1974; Krogh a Symington, 2004; San Filippo a kol., 2008). Pri vyšších eukaryotoch, hlavne stavovcoch, sú mutácie vzniknuté v dôležitých génoch HR takmer vždy letálne (Sonoda a kol., 2001), preto je nemožné detegovať mutanty v týchto génoch. U stavovcov sa na procese HR podieľa množstvo ďalších faktorov, v ktorých mutácie boli identifikované pri niektorých dedičných chorobách ako je Fanconioho anémia, rakovina prsníkov u žien a pod.

Homologická rekombinácia v meióze

Crossing-over je kľúčovým procesom pri meiotickej segregácii, pretože fyzickou väzbou homologických chromozómov napomáha ich orientácii a pripojení na vretienko v prvom meiotickom delení. Množstvo crossing-overov sa nedá presne odhadnúť podľa veľkosti genómu, existujú dokonca vnútrodruhové rozdiely napr. medzi samcami a samičkami, a takisto medzidruhové rozdiely v počte crossing-overov na Mb DNA (Lenormand a Dutheil, 2005). Navyše crossing-overu nie sú rovnomerne distribuované po genóme, existujú tzv. rekombinačné *hot-spots* (horúce miesta), ktoré sú hypersenzitívne na nukleázy a naopak niekde sú inhibované, napr. v centromerických oblastiach, kde by mohli ohroziť chromozómovú segregáciu (Rockmill a kol., 2006). Lokálna chromatinová štruktúra sa zdá byť dôležitá pre vytvorenie crossing-overu, napr. v kvasinkách *S. cerevisiae* je trimetylácia H3 histónu na lyzíne 4 (H3K4me3) epigenetickým markerom spájaným s aktívnym chromatinom a zdá sa, že je prepojená aj so vznikom DSB. Mapovanie genómu naznačuje, že väčšina DSB vzniká v medzigénových regiónoch, vrátane promotorov a 20-120 kb od telomér (Blitzblau a kol., 2007). Množstvo DSB však nezodpovedá reálnemu počtu crossing-overov, napr. v kukurici je možné detegovať až okolo 560 DSB vo včasnej meiotickej fáze, ale neskôr reálne vznikne iba okolo 20 crossing-overov (Franklin a kol., 1999). Molekulárna analýza *hot-spots* v kvasinkách, ľudských a myších bunkách ukázala, že DSB nie je vždy predpokladom vzniku crossing-overu a môže byť opravený aj bez jeho vzniku vplyvom zložitejších regulačných mechanizmov (Martinez-Perez a Colaiacovo, 2009).

Najviac poznatkov o HR v meióze je u modelového organizmu *S. cerevisiae*, pretože má najprístupnejšiu analýzu meiózy a existuje množstvo mutantov, ktoré majú viac menej narušenú sporuláciu alebo rekombináciu v mitotických bunkách a keďže je známy kompletný genóm a bezproblémovo funguje HR, je možné indukovať nové mutanty v génoch, o ktorých predpokladáme, že by mohli mať funkciu v HR a sledovať vplyv mutácie na fenotyp.

Pri meiotickej rekombinácii sa vytvorí približne 150-200 DSB a je spustená dráha závislá na *SPO11* géne. Spo11 proteín bol identifikovaný v *rad50* mutantoch ako kovalentne naviazaný na koncoch DNA pri DSB, vzniknutých v meióze (Keeney a Neale, 2006). Znamenalo to, že je zapojený do spracovania koncov DNA pri HR. Kóduje endonukleázu, špecifickú pre meiózu. Súčasný model predpokladá, že Spo11 dimér vytvorí DSB a monoméry ostanú naviazané na oboch koncoch DNA cez tyrozínový zvyšok. Bol identifikovaný v mnohých eukaryotoch od kvasiniek až po cicavce, čo znamená, že jeho funkcia je veľmi konzervovaná. Mutácia v ďalších deviatich génoch však spôsobuje podobný fenotyp, zrejme sa na vytvorení a úprave DSB podieľa komplex proteínov, kde Spo11 má katalytickú aktivitu (Keeney, 2001). Spo11 musí byť odstránený z konca DNA, aby umožnil ďalšiu úpravu zlomu a začiatok HR. Pri *rad50* mutantoch ale aj *mre11* mutantoch ostáva Spo11 naviazaný na konci DNA, čo opäť naznačuje komplex proteínov, ktorý sa podieľa na resekcii a ďalšej úprave zlomu. Je to MRX komplex, ktorý tvoria 3 proteíny Mre11, Rad50 a Xrs2, pri ľudských bunkách sa tento komplex nazýva MRN a tvoria ho proteíny Mre11, Rad50 a Nbs1. Komplex je silne konzervovaný a funguje ako senzor DSB, lokalizátor DSB, aktivuje kontrolný bod bunkového cyklu súvisiaci s poškodením DNA a reguluje resekciu DNA koncov (review Mimitou a Symington, 2009 B). Najdôležitejším proteínom v komplexe je Mre11, ktorý má endonukleázovú aj 3'-5' exonukleázovú aktivitu. Rad50 a Xrs2 umožňujú naväzovanie MRX komplexu na DNA a zvyšujú nukleázovú aktivitu Mre11 (Trujillo a kol., 2003). C-terminálny koniec

Mre11 má dve väzbové miesta, z ktorých jedno je zodpovedné za vytvorenie Spo11-DSB štruktúry (Nairiz a Klein, 1997; Furuze a kol., 1998). Rad50 proteín patrí do SMC *structure maintenance of chromosome* skupiny proteínov a obsahuje *coiled-coil* doménu. Mre11 sa viaže na túto doménu a vytvára heterotetramér, čo má zrejme význam pri vytvorení mostíka medzi sesterskými chromatidami a ich správne rozštiepenie (review Mimitou a Symington, 2009 B). Tretí proteín je v kvasinkách Xrs2 a v ľudských bunkách Nbs1. Oba proteíny majú N-terminálnu FHA doménu, ktorá umožňuje proteín-proteín interakciu a väzbu na fosforylovaný H2A, ďalej konzervovanú C-terminálnu doménu, ktorá je dôležitá pre väzbu s Mre11 proteínom a fosforylačné miesto pre regulačný proteín bunkového cyklu ATM/Tel1. Väzba s Mre11 je kľúčová pre funkciu MRX komplexu (Tsukamoto a kol., 2005). Všetky tri spomínané proteíny sú potrebné pre reguláciu DSB v meióze spolu so Spo11 proteínom. Aj keď je komplex konzervovaný, jeho funkcia v regulácii DSB v meióze nie je konzervovaná. V dvoch genetických experimentoch, ktoré mali za úlohu izolovať mutantov v meióze v kroku po Spo11 indukciu DSB, ale pred rozštiepením rekombinačných intermediátov, bol izolovaný mutant v géne *SAE2/COM1*, ktorý má podobný fenotyp ako *rad50S* mutant a *mre11S*, čo znamená neresektované DSB, absencia HR a redukovaná synapsia (McKee a Kleckner, 1997; Prinz a kol., 1997). Je zrejme, že *Sae2* funguje ako štvrtý člen MRX komplexu (review Mimitou a Symington, 2009 B). Nedávno boli podobné proteíny identifikované aj u ľudí, rastlín, červov a pod. Ako funguje úprava zlomu po naviazaní Spo11 ešte nie je úplne jasné, bolo však dokázané, že nukleolytické štiepenie nie je symetrické a neštiepi sa kovalentná väzba medzi Spo11 a DNA, ale naštiepi sa celý reťazec DNA približne 10-40 nukleotidov od DSB a odstráni sa oligonukleotid spolu s Spo11 na konci (Neale a kol., 2005). Pri analýze mutantov v spomínaných génoch napr. pri HO endonukleázou indukovaných zlomoch vo vegetatívnych bunkách sa zistilo, že zlomy sú normálne upravované aj v mutaných kmeňoch, čo znamená, že pri úprave nefunguje výlučne MRX/MRN komplex, ale existujú ďalšie alternatívy pre túto funkciu (review Mimitou a Symington, 2009 B).

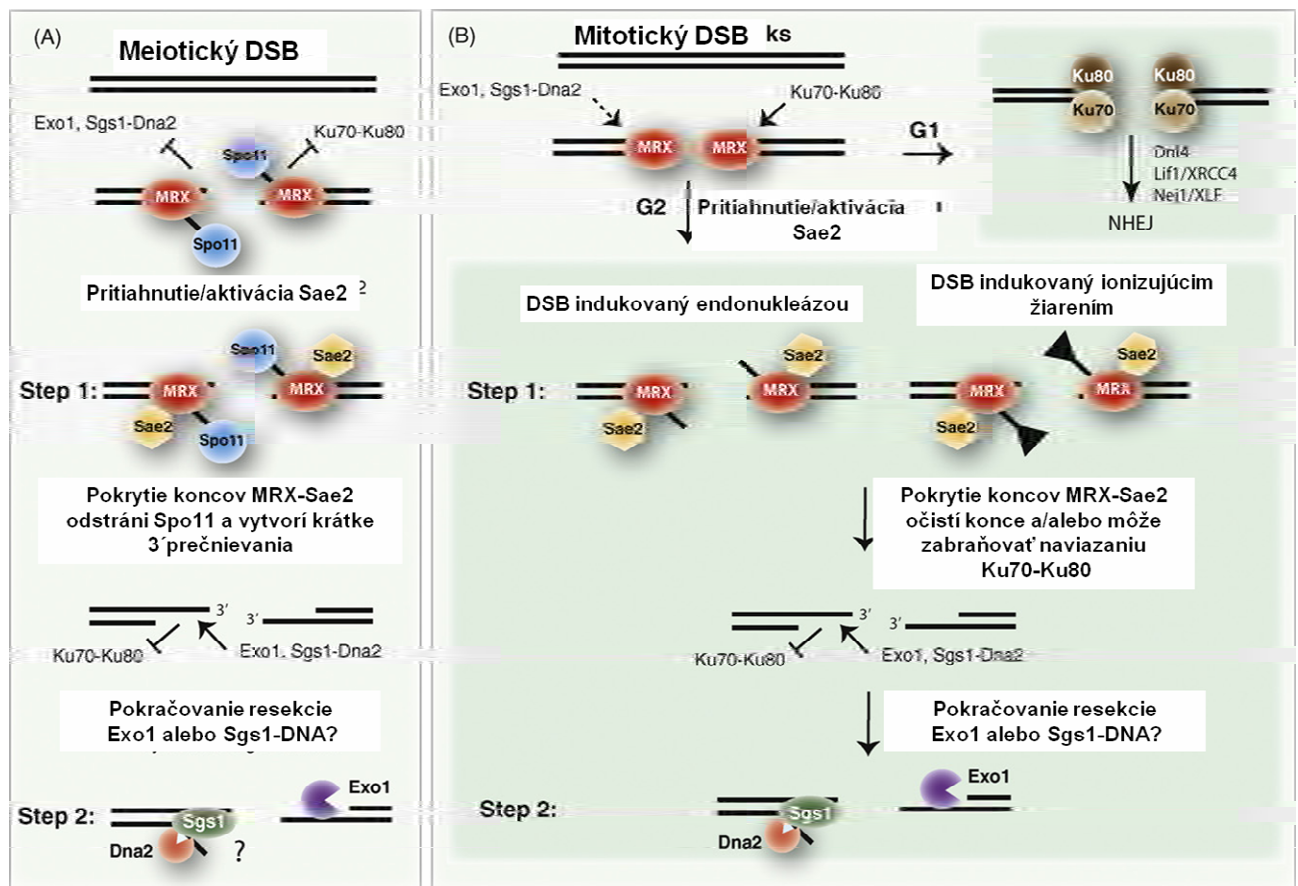
Ďalší proteín s endonukleázovou aktivitou Exo1 bol identifikovaný u kvasiniek. Môže vytvárať 3' prečnievajúce konce. Je konzervovaný v eukaryotoch a okrem rekombinácie má úlohu aj v mismatch oprave a podľa defektného fenotypu v sporulácii kvasiniek je pravdepodobné, že má úlohu v regulácii DSB v meióze. Zdá sa, že tento proces je nezávislý od MRX komplexu (Mimitou a Symington, 2008). Z výsledkov však vyplýva, že v mutantoch je redukovaná génová konverzia iba v niektorých lokusoch, čo znamená, že má opäť ďalšiu alternatívu, alebo funguje lokusovo špecificky (Kirkpatrick a kol., 2000; Khazanehdari a Borts, 2000). Predpokladaný model resekcie a úpravy DSB v meióze je na obr. 1A.

Homologická rekombinácia v mitóze

Oprava DSB v mitóze je skúmaná jednak použitím rôznych endonukleáz, ktoré spôsobujú DSB v presne stanovenej sekvencii (HO endonukleáza, I-SceI endonukleáza), alebo po pôsobení rôznych agensov ako je ionizujúce žiarenie, bleomycín a rôzne metylujúce látky. DSB vznikajúce po pôsobení endonukleáz tvoria presne definované konce, ktoré sa nazývajú aj čisté konce, sú charakteristické 3'prečnievaním a sú pripravené pre ligáciu alebo syntézu DNA. DSB vznikajúce po pôsobení ionizujúceho žiarenia, bleomycínu a pod. vytvárajú tzv. špinavé konce, veľmi rôznorodé, mnohokrát s aduktami na koncoch v závislosti od pôsobiacej látky. Tieto nevyhnutne potrebujú úpravu, aby boli vhodné na začatie HR alebo NHEJ.

Gény MRX komplexu *RAD50* a *XRS2* boli identifikované pri hľadaní mutantov, citlivých na žiarenie. Tieto mutanty boli na rozdiel od ostatných rekombinačných mutantov rezistentné na žiarenie a prejavovali hyper-rekombinačný fenotyp. Aj bez pôsobenia látok spôsobujúcich DSB bola u nich pozorovaná zvýšená spontánna reorganizácia genómu, čo znamenalo defekt v regulácii DSB a narušenú reguláciu bunkového cyklu po poškodení DNA (Chen a Kolodner, 1999). Neskôr bolo zistené, že *RAD50* gén zrejme kontroluje 5' → 3' úpravu mitotických DSB. Takisto *mrx* mutanty majú problém s resekciou DSB po pôsobení HO endonukleázy a komplex pravdepodobne interaguje s ďalšími komplexmi s chromaín-remodelujúcou aktivitou (review Mimitou a Symington, 2009 B). Z výsledkov vyplýva, že pre mitotické DSB v *S. cerevisiae* je dôležitejšia integrita celého MRX komplexu, ako nukleázová aktivita Mre11 proteínu, ktorá nie je potrebná vôbec pre tzv. čisté konce iba pre konce s aduktami, alebo po ionizujúcom žiarení (Llorente a Symington, 2004). Nie je to však všeobecný proces, pretože v *S. pombe* a v ľudských bunkách je nukleázová aktivita Mre11 veľmi dôležitá, čo môže byť zaujímavé z evolučného hľadiska (Mimitou a Symington, 2008). Niektoré štúdie naznačujú rovnakú účasť Sae2 endonukleázy a Mre11 nukleázy v úprave DSB koncov, vzhľadom k analyzovanej kinetike je však pravdepodobné, že Mre11 je potrebná hlavne pri iniciácii úpravy DSB a Sae2 je zrejme dôležitejšia pre ďalšie kroky resekcie, prípadne pre pritiahtie ďalších faktorov (Mimitou a Symington, 2009 A). Ako už bolo viackrát naznačené, úprava a oprava DSB je regulovaná bunkovým cyklom. HR sa prevažne uplatňuje v S a G2 fáze, keď je DNA zreplikovaná a umožní opravu DSB pomocou výmeny sesterských chromatíd, ktoré si navzájom poskytnú templátovú DNA. Na rozdiel od HR sa NHEJ uplatňuje počas celého bunkového cyklu, ale jej úloha stúpa v G1 fáze. Výber medzi dvoma dráhami opravy DSB je regulovaný cyklín závislými kinázami. Sae2 bola identifikovaná ako jeden z možných sprostredkovateľov regulácie úpravy DSB s bunkovým cyklom, je fosforylovaná na dvoch serínových zvyškoch za normálnych okolností, ale mutácie v týchto miestach redukovujú rekombináciu, úpravu DSB a spomaľujú pritiahtie Rad52 proteínu na miesto DSB (Huertas a kol., 2008). Exo1 nukleáza so svojou 5' → 3' exonukleázovou aktivitou je výborným kandidátom na úpravu 3' konca po resekcii. Niektoré práce naznačujú alternatívnu úlohu Mre11 a Exo1 v úprave DSB. Nadexpresia Exo1 spôsobí supresiu defektu v DNA oprave a čiastočne aj defektu v úprave HO indukovaných DSB v *mre11*, *rad50* aj *xrs2* mutantoch, to znamená, že má aj podobnú úlohu ako MRX komplex (Moreau a kol., 2001). Navyše dvojité mutanty *rad50* a *exo1* spôsobia, že 3' konce sú príliš krátke na to aby na ne nasadol Rad51 proteín (Tomita a kol., 2003). Napriek týmto výsledkom je HR stále funkčná aj pri mutácii v *EXO1* aj v *SAE2*, čo znamená, že existuje ďalšia exonukleáza participujúca na tomto procese.

Kvasinková Sgs1 helikáza je podobná RecQ helikáze z *E. coli*, má teda predpoklad, že bude dôležitá pri resekcii DSB. Delécia *EXO1* a *SGS1* génu spôsobí úplný defekt SSA mechanizmu, ale génová konverzia je naďalej funkčná. Kondicionálny mutant ešte navyše v *SAE2* však vedie ku kompletnému blokovaniu resekcie a začatia HR naviazaním Rad51 (Mimitou a Symington, 2008). Predpokladá sa mechanizmus, kde v prvom kroku MRX a Sae2 odštiepia približne 50-100 nukleotidov z 5' konca, čím vzniká 3' koniec ssDNA, tento je rýchlo upravený pôsobením Exo1 a Sgs1 (Mimitou a Symington, 2009 B). Ďalšia nukleáza, ktorá zrejme spolupracuje s Sgs1 je Dna2 nukleáza. Je to konzervovaná endonukleáza/helikáza, ktorá má úlohu v úprave Okazakiho fragmentov a postreplikačnej dráhy (Zhu a kol., 2008). Predpokladaný model resekcie DSB v mitóze je na obr. 1B.



Obr. 1: Modely resekcie DSB v meióze A a v mitóze B. (Upravené podľa Mimitou a Symington, 2009 B).

Homologická rekombinácia pri oprave replikačnej vidlice

Replikácia DNA je mnohonásobne kontrolovaný proces rôznymi kontrolnými signálnymi dráhami, či už spojenými s bunkovým cyklom, detekciou poškodenia DNA, *mismatch* kontrolnou dráhou a v neposlednom rade aj rekombinačnými mechanizmami. Pri pohybe polymerázy a helikázy po templáte sa môže stať, že pokiaľ polymeráza natrafí na prekážku, je helikáza odpojená od polymerázy. Nastáva replikačný blok, ktorý zanecháva jednovláknovú DNA, čo môže byť substrát pre endonukleolytické štiepenie, ktoré vytvorí DSB s jedným koncom alebo vytvorí v DNA medzeru *gap*. Podobná situácia môže nastať, pokiaľ nie je dobre zosynchronizovaný vedúci a zaostávajúci reťazec. Samozrejme zlom alebo iné poškodenie môže nastať aj vplyvom vonkajších faktorov, pôsobením NER, BER a iných procesov. Bolo dokonca zistené, že v niektorých DNA sekvenciách, ktoré sa ťažko replikujú, pomerne často nastáva kolaps replikačnej vidlice. Pokiaľ zahŕňajú fragilné časti chromozómov, sú takéto miesta predpokladom pre vznik chorôb, pretože spôsobujú nestabilitu genómu (Freudenreich, 2007). Blok polymerázy na oboch reťazcoch môže byť odstránený špeciálnou TLS polymerázou, ktorá je schopná zaradiť do reťazca aj nekomplementárnu bázu, alebo polymerizovať aj z neštandardného primeru na reťazci. Obnovenie vidlice znamená presmerovanie 3' konca do sesterského reťazca a vytvorenie špeciálnej štruktúry tzv. kuracej nohy, ktorá je analogická Hollidayovému spoju. Toto presmerovanie templátu nie je spojené s inváziou reťazca a je nezávislé na Rad51, pričom RPA a Rad52 sú zrejme potrebné spolu so zatiaľ neznámym tzv. motor proteínom (akým je aj Rad54), ktorý katalyzuje vytvorenie a rozštiepenie tejto

štruktúry (Li a Heyer, 2008). Rekonštrukcia DNA syntézy môže nastať na oboch reťazcoch, vedúcom aj zaostávajúcom reťazci (Heller a Mariani, 2006). DSB s jedným koncom môže byť následkom priamej endonukleolytickej reakcie pri zastavenej vidlici, alebo nepriamo ak vidlica natrafí na *nick* v DNA. Ak má byť opravený DSB s jedným koncom, jedinou dráhou, ktorá je schopná toto zrekonštruovať je HR, konkrétne mechanizmus podobný BIR, keď je reťazec štiepený tak, že vytvorí 3' koniec a za účasti Rad51 aparátu prebehne invázia do druhého reťazca. Predpokladaný mechanizmus rekonštrukcie replikačnej vidlice zahŕňa prídavné faktory, ktoré nie sú potrebné na DSB opravu, niektoré boli určené do RAD52 epistatickej skupiny (Li a Heyer, 2008). Bol identifikovaný komplex Shu1-Psy3-Shu2-Csm2, ktorý je schopný suprimovať defekt spomaleného rastu, spôsobeného mutáciou v *TOP3* géne. Genetická analýza predpokladá, že Shu komplex sa zúčastňuje formovania rekombinačných intermediátov, ktoré potrebujú úpravu pôsobením Sgs1-Top3-Rmi1. Proteíny Shu komplexu majú štruktúrnú aj funkčnú homológiu s Rad51 paralogmi. Komplex môže mať špeciálnu úlohu vo vytváraní Rad51 filamentu (Mankouri a kol., 2007; Martin a kol., 2006). Ďalšími faktormi sú Mus81-Mms4 komplex, ktoré sú takisto epistatické s RAD52 skupinou génov, ktoré boli detegované aj v ľudských bunkách.

Z poskladaných poznatkov vyplýva, že rôzne prístupy k poruchám replikácie alebo poškodeniu DNA majú svoju hierarchiu a sú regulované kontrolnými bodmi bunkového cyklu. Uplatňuje sa tu Srs2 helikáza, ktorá má antirekombinázovú aktivitu a disociuje Rad51 z ssDNA, aby nedochádzalo k invázii reťazcov. Potrebná je funkcia Rad55-Rad57 mediátorov, ktoré sú fosforylované kinázou, zodpovednou za reguláciu kontrolného bodu po poškodení DNA (review Li a Heyer, 2008).

Používanie HR a NHEJ pri oprave DSB v rôznych fázach bunkového cyklu

Aj keď celý súhrn poznatkov v tejto práci má byť hlavne o HR, nedá sa vyhnúť ani NHEJ, pretože je to rovnocenná dráha opravy DSB, ktorej regulácia musí byť v rovnováhe s HR. V eukaryotických bunkách sú obe tieto dráhy konzervované, vyskytujú sa v bunkách súčasne a ich podiel na oprave DSB je regulovaný viacerými mechanizmami. Ako si teda bunka vyberá, ktorou dráhou opraví DSB?

Keď sa v bunke vyskytne DSB, prvý komplex ktorý sa na zlom viaže, je MRX v kvasinkách *S. cerevisiae* a MRN v *S. pombe* a v cicavčích bunkách, ktorý zahájí úpravu koncov zlomu, aby sa mohla rozbehnúť niektorá reparačná dráha. Záleží na fáze bunkového cyklu, ktorá dráha sa zapojí do jeho opravy. Zjednodušene povedané, NHEJ sa u vyšších eukaryotoch využíva hlavne v G1 fáze a interfáze, HR je naopak preferovaná v S až G2 fáze. Je to logické z hľadiska mechanizmu, keď NHEJ na rozdiel od HR nepotrebuje homologickú sekvenciu na opravu DSB, ktorá môže byť prístupná len počas a po replikácii. A takisto poškodenia DNA spojené s replikáciou môžu byť jednoduchšie opravované pomocou homologickej rekombinácie, pretože môžu ako templát využiť blízku sesterskú chromatidu. Pri NHEJ je zlom jednoducho spojený za možného rizika, že pri úprave koncov DNA sa nejaká časť sekvencie stratí. Väčšinou je spájaný s *error prone* opravou, čo nemusí byť pravidlo a záleží od príslušných koncov DNA v DSB, či ich treba nukleolyticky upraviť, alebo jednoducho spojiť. Hlavnými komponentami NHEJ sú Ku70, Ku80, ktoré vytvárajú heterodimér. Ten sa viaže na konce DNA, stabilizuje ich a zároveň zabraňuje resekcii koncov. Konce sú religované za účasti MRX proteínov (v kvasinkách *S. cerevisiae*) a ligázovej aktivity Dnl4-Lif1/XRCC4 heterodiméru a proteínu Nej1/XLF. V ľudských bunkách v tejto dráhe neparticipuje MRN komplex, sú tam však navyše komponenty, ktoré zrejme túto funkciu nahrádzajú, Ligáza 4,

XRCC4, DNA-PKCS a proteín ARTEMIS (Bernstein a Rothstein, 2009). Okrem toho výber dráhy závisí aj od typu poškodenia. Ak vzniknú zlomy v G1 fáze pôsobením endonukleázy, opravuje ich preferenčne NHEJ. Ak vznikne zlom pôsobením ionizujúceho žiarenia, väčšinou je opravovaný HR bez ohľadu na štádium bunkového cyklu (Barlow a kol., 2008). Je zaujímavé, že ak sú bunky vystavené ionizujúcemu v G1 fáze, odsunú väčšinou opravu až do S/G2 fázy, keď majú k dispozícii homologický templát (Bernstein a Rothstein, 2009).

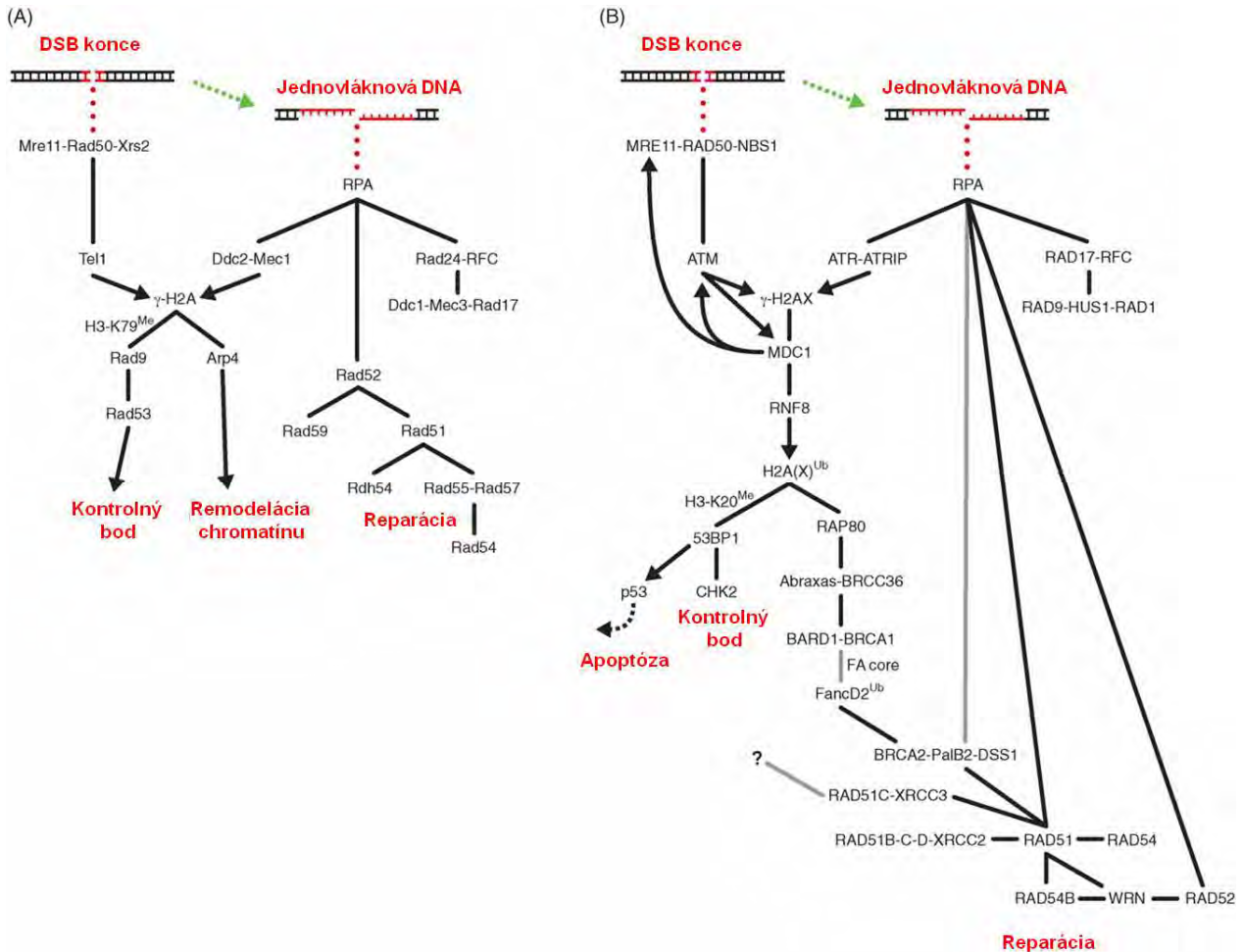
Využívanie HR a NHEJ sa líši aj podľa toho, či je DSB spôsobený replikačným blokom alebo vznikol náhodne v kondenzovanej chromatinovej štruktúre vplyvom ionizačného žiarenia. Náhodné DSB sú u vyšších eukaryotov prevažne opravované cez NHEJ hlavne kvôli tomu, že v G1 a G2 fáze bunkového cyklu je ťažké nájsť homologické sekvencie vďaka kondenzácii chromozómov (Sonoda a kol., 2006). NHEJ je rýchly proces, ktorý v ľudských bunkách trvá iba 30 minút, naopak celý proces HR je pomalý a na úplné dokončenie je potrebných najmenej 7 hod. Pri zisťovaní účasti oboch procesov na oprave DSB bolo zistené, že pomer medzi NHEJ-C (s čistými koncami) NHEJ-I (s koncami vyžadujúcimi úpravu) a HR bol 6:3:1 (Mao a kol., 2008).

Oprava DSB v bunkách kvasiniek *S. cerevisiae* (obr. 2 A) začína väzbou na konce DSB, čo sa deje nezávisle od seba dvoma komplexmi Ku70-Ku80 a MRX komplexom, ktoré sa priamo viažu na DNA konce. Vzťah a interakcie medzi týmito komplexmi nie sú zatiaľ známe, ale predpokladá sa, že Ku komplex v prvom kroku chráni konce pred nukleolytickou úpravou a naopak MRX komplex začína resekciu použitím endonukleázovej a exonukleázovej activity (Lisby a Rothstein, 2009). Súperenie o väzbu na DNA konce je dôležitým aspektom výberu medzi HR a NHEJ. Keďže v kvasinkách je preferenčnou opravou HR, oprava väčšinou pokračuje cez MRX komplex, ktorý spolu so Sae2 endonukleázou udržia spolu oba konce zlomu. Sae je dôležitá pre rekombinačný proces, nielen v úprave konca DNA na 3' prečnievajúci koniec, ale aj z hľadiska regulácie v závislosti od bunkového cyklu, pretože obsahuje CDK fosforylačné miesto a jej fosforylácia je nevyhnutná pre správnu resekciu koncov DNA (Huertas a kol., 2008). Je možné, že táto endonukleáza zabezpečuje určitú rovnováhu medzi HR a NHEJ (Bernstein a Rothstein, 2009). MRX komplex interaguje s Tel1 kinázou a navedie ju na DSB. Tel1 kináza fosforyluje histón H2A, čo je chromatinová značka pre poškodenú DNA vo väčšine eukaryotov (Rogakou a kol., 1998). Rozpoznanie DSB je však nezávislé od fázy bunkového cyklu a iných faktorov, pretože komplex nasadá priamo na voľné DSB konce. Modifikácia chromatinu fosforyláciou histónu H2A umožňuje väzbu Rad9 na histón H3 metylovaný na lyzíne a následnú väzbu a aktiváciu Rad53 (Lisby a kol., 2004). Pokiaľ nie je DSB opravované NHEJ, proces pokračuje resekciou 5' → 3' konca, čo jednoznačne predurčí opravu HR. Tento proces už bol opisovaný v inej kapitole, takže iba v skratke, je to dvojkrokový proces, ktorý zahŕňa množstvo alternatívnych nukleáz ako Mre11, Sae2, Dna2 a Exo1. Prvá resekcia je iniciovaná Sae2 a MRX komplexom, ktoré sú dôležité aj pre odstránenie sekundárnych štruktúr a rôznych aduktov. Druhý krok je oveľa výraznejšia resekcia, ktorú zabezpečuje Exo1 a Dna2 v spolupráci s Sgs1 helikázou (Mimitou a Symington, 2008; Zhu a kol., 2008; Lisby a Rothstein, 2009). Resekcia pokračuje disociáciou MRX, Sae2 a Tel1 z DSB a naviazanie RPA, ktoré navedie na DSB ďalšie komplexy vrátane Mec1-Ddc2, Rad24-RFC a Ddc1-Mec3-Rad17. Mec1 a Tel1 fosforylujú podobné substráty, vrátane H2A histónu a pokrytie DNA. Ddc1 a Ddc2 je signálom pre aktiváciu kontrolného bodu (Bonilla a kol., 2008). Neskôr v S a G2 fáze Ddc1-Mec3-Rad17 komplex a Cdc28 kináza prispievajú ku stabilizácii DNA poškodenia, čo naznačuje

kontrolu závislú od fázy bunkového cyklu (Barlow a kol., 2008). V S a G2 fáze sa cez RPA naviaže na DSB Rad52 proteín, ktorý interaguje s Rad51 proteínom a navedie ho spolu s Rad59 na miesto zlomu (Lisby a kol., 2004). Významnú funkciu zohráva Rdh54, homológ Rad54, ktorý má úlohu na začiatku HR na rozdiel od Rad54, ktorý má úlohu na konci procesu HR, keď pomáha disociovať Rad51 z DNA a tak umožňuje jeho cirkuláciu (Lisby a kol., 2004).

Oprava DSB v cicavčích bunkách (obr. 2 B) má niektoré procesy a proteínové komplexy podobné ako u kvasiniek, pretože mnohé z nich sú z evolučného hľadiska konzervované. Má však aj niektoré významné odlišnosti. Podobne ako v kvasinkách MRN komplex a KU70-KU80 sú naviazané na DSB nezávisle od seba a od bunkového cyklu. Ku navedie na DSB DNA-PKcs kinázu do pozície aby boli pritiažené aj ostatné faktory NHEJ. Podstatný rozdiel je, že kvasinky potrebujú MRX komplex aj pre HR aj pre NHEJ a nevlastnia homológ ani ortológ DNA-PKcs kinázy. V cicavčích bunkách je MRN komplex potrebný iba pre HR. Je možné, že práve táto kináza je čiastočne zodpovedná za vysokú efektívnosť NHEJ v cicavčích bunkách v porovnaní s kvasinkami (review Lisby a Rothstein, 2009). Počas procesu HR MRN navedie na DSB ATM kinázu, ktorá fosforyluje podobne ako Tel1 histón H2AX a vytvorí značku γ -H2AX podobne ako Tel1 v kvasinkách. V cicavčích bunkách sa fosforylovaný γ -H2AX viaže na hlavný regulátor rekombinačnej reparácie MDC1, ktorý interaguje s ATM cez FHA doménu a takisto interaguje s NBS1 (Lou a kol., 2006). MDC1 sa fosforyluje a táto modifikácia pomôže naviazať E3 ubiquitín ligázu a RNF8 faktor. Navedenie MRN a ATM na DSB, fosforylácia H2AX a takisto pritiaženie MDC1 a RNF8 prebieha veľmi rýchlo ako odpoveď na DSB. Ubiquitinované H2A a H2AX sa viažu na RAP8 v druhej vlne navádzania komplexov na DSB (Mailand a kol., 2007). Nasleduje interakcia s Abraxas a s BRCT doménou BRCA1, ktorý zase môže interagovať s BACH1 helikázou a CtlP nukleázou. Tieto tri proteíny zrejme súťažia o väzbu s BRCT doménou BRCA1 (Cantor a kol., 2001; Kim a kol., 2007). Nasleduje séria modifikácií proteínov a histónov. V ďalšom kroku sú upravené konce DSB, do tohto procesu je v cicavčích bunkách zapojených niekoľko nukleáz, ktoré k tomuto prispievajú a často môžu fungovať alternatívne, sú to Mre1, Exo1 a CtlP. Mre a CtlP vytvoria komplex, ale vytvárajú lokusy nezávisle od BRCA1, čo je podobné aj u kvasiniek, kde sa Mre11 a Sae2 takisto naviažu na DSB nezávisle (Lisby a kol., 2004). V *S. pombe* je proces naviazania CtlP závislý od Mre11 (Limbo a kol. 2007). Tretia vlna proteínov je pri resekcii konca DNA, kedy dochádza ku vymiznutiu faktorov NHEJ, avšak MRN ostáva vo väzbe s DSB. Ďalší postup je podobný ostatným organizmom, priamo na ssDNA sa naviaže RPA, ktorý pritiahne ďalšie kinázy bunkového cyklu a alternatívne fungujúci Rad17-RFC. Výsledkom je fosforylácia CHK2 a H2AX, čo sú opäť interakcie nevyhnutné pre aktiváciu kontrolného bodu (Ward a Chen, 2001). Na začatie samotného procesu rekombinácie je nevyhnutné navedenie rekombinázy Rad51 na miesto DSB. Tu je ďalší rozdiel medzi kvasinkami a cicavčiami bunkami, pretože v kvasinkách Rad52 proteín pritiahne na miesto zlomu rekombinázu Rad51, u cicavčích buniek je to BRCA2 (Davies a kol., 2001; Tarsounas a kol., 2003), hoci Rad52 sa takisto nachádza na mieste DSB. Nie je presne známe ako je BRCA2 navedené na miesto DSB. Známe je, že BRCA2 sa viaže priamo na DNA a priamo interaguje s RPA a okrem toho fokusy BRCA2 v komplexe s PALB2 sú na tom istom mieste ako ako fokusy BRCA1, čo znamená, že je to regulačne prepojené so zmenou chromatinu (Xia a kol., 2006). Pri DSB vzniknutých ionizujúcim žiarením je tu potrebný ďalší proteín a to chromatin remodelujúci tzv. motor proteín Rad54 a päť Rad51 paralógov, ktoré tvoria dva rôzne komplexy (Masson a kol. 2001). Pri kvasinkách existujúce

paralógy Rad55 a Rad57 nie sú potrebné na vytvorenie Rad51 fokusov (Lisby a kol., 2004). Takisto vznikajú XRCC3 fokusy nezávisle na Rad51 fokusoch. Počas S fázy je Rad51 pritiažené na DNA nezávisle od BRCA2 a zrejme sa pri prepojení replikácie a reparácie naviaže na DNA priamo cez RPA interakciu (Sleeth a kol., 2007). Ľudské homológy Rad54A a Rad54B sú oba pritiažené na DSB a interagujú s WRN helikázou, ktorá má funkciu po NBS1. Je zaujímavé, že Rad52 fokusy sa tvoria nezávisle od Rad51 fokusov, kde je zároveň BRCA2 a Rad51 paralógy. Zrejme je pritiažené priamo interakciou s RPA, táto interakcia sa v ľudských bunkách nedokázala na rozdiel od kvasiniek (review Lisby a Rothstein, 2009).



Obr. 2: Rekombinačná dráha opravy DSB v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (A) a v cicavčích bunkách (B). (upravené podľa Lisby a Rothstein, 2009)

Z predchádzajúcich opisov mechanizmu opravy DSB v kvasinkách aj v cicavčích bunkách je síce jasná prepojenosť HR a NHEJ v niektorých krokoch, náznaky, ktoré gény môžu spôsobovať rozdiely v účinnosti oboch typov mechanizmov, prepojenosť s bunkovým cyklom, regulácia výberu mechanizmu na opravu konkrétneho DSB však stále nie je jasná. Príspevok jednotlivých typov proteínov sa počas evolúcie zmenil. Mutanty v *RAD51*, *RAD52* a *RAD54* génoch v kvasinkách majú podobný fenotyp na rozdiel od stavovcov kde mutácia v *RAD51* vedie k letalite, pričom v *RAD52* a *RAD54* napr. v myšiach nemá výrazný vplyv na fenotyp (Sonoda a kol., 2006). NHEJ opravuje v myších bunkách asi 60 % exogénne

indukovaných DSB a až vtedy sa začína exprimovať *RAD51* a *RAD54*, v nedeliacich bunkách sa vôbec neexprimuje. V kvasinkách je prvý krok (naviazanie sa na konce zlomu) dôležitý pri výbere rekombinačnej dráhy, resekcia konca automaticky navodzuje HR. Cicavčie bunky majú presne lokalizovanú fázu pre určitý typ opravy a aj keď nie sú známe všetky proteíny, ktoré by mohli regulovať tento proces, existujú už určité náznaky interakcií CDK s niektorými proteínmi HR a NHEJ. V G1 fáze by pre HR bol prístupný iba homologický chromozóm, čo by mohlo spôsobiť stratu heterozygoty. V G2 fáze však oba mechanizmy fungujú súčasne aj keď je preferovaná HR. Výsledky s delečnými mutantami v oboch dráhach ukázali vyššiu senzitivitu k ionizujúcemu žiareniu ako pri mutantovi iba z HR napriek tomu, že jednoduchý mutant v NHEJ nebol v G2 fáze na žiarenie citlivý (Sonoda a kol., 2006). Výsledok naznačuje, že existuje aj v G2 fáze cesta späť ku NHEJ oprave napriek tomu, že podľa doterajších výsledkov bola NHEJ po úprave 3' koncov inhibovaná. Čo teda spôsobí, že pri vzniku DSB pôjde oprava jednou alebo druhou cestou? Naviazanie Ku komplexu na konce DSB je oveľa rýchlejšie ako naviazanie HR faktorov a navyše množstvo Ku molekúl je oveľa vyššie ako molekúl proteínov HR, znamená to, že Ku musí byť nejakým spôsobom blokovaný v bunke v tom čase keď má prebiehať HR. Podľa súčasných výsledkov by to v ľudských bunkách mohol byť Bcl2 proteín, čo je proto-onkogén, ktorý inhibuje opravu DSB cestou NHEJ tak, že zabraňuje väzbe Ku na DNA priamou deštrukciou Ku komplexu in vitro aj in vivo. Zabraňuje tak potenciálne zvýšenej instabilite genómu (Wang a kol., 2008). To neznamena, že nadmerné fungovanie HR je pre bunku prospešné. Výsledky s nadexpresiou Rad51 proteínu v bunkách rôznych organizmov ukazujú, že v nádorových bunkách dochádza k zvýšenej HR, rezistencii na žiarenie a látky používané v chemoterapii. Taktiež dochádza k zvýšenej instabilite genómu nadmernou frekvenciou HR. Na druhej strane je to zaujímavé z hľadiska diagnostiky a určenia terapie rakoviny, pretože niektoré nádory vykazujú vyššiu hladinu HR. V *S. pombe* dochádza ku kolapsu bunkového cyklu, pri drozofile má nadexpresia endogénnej rekombinázy podobný účinok (Klein, 2008).

Posledné roky nastal obrovský pokrok v pochopení mechanizmu HR a NHEJ a ich regulácie a používania v rôznych organizmoch, ale aj v rámci jedného organizmu v rôznych fázach bunkového cyklu. Stále však ostávajú otvorené otázky ohľadom regulácie rovnováhy medzi týmito dvoma dráhami s perspektívou možného využitia v génovej terapii ale aj v liečbe rakoviny.

Literatúra

- Barlow, J.H., Lisby, M., Rothstein, R. (2008). Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Molecular Cell* 30: 73-85.
- Bernstein, K.A., Rothstein, R. (2009). At loose ends: Resecting a double-strand break. *Cell* 137: 807-810.
- Blitzblau, H.G., Bell, G.W., Rodriguez, J., Bell, S.P., Hochwagen, A. (2007). Mapping of meiotic single-stranded DNA reveals double-stranded-break hotspots near centromeres and telomeres. *Current Biol.* 17: 2003-12.
- Bonilla, C.Y., Melo, J.A., Toczyski, D.P. (2008). Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage. *Mol. Cell.* 30: 267-76.
- Cantor, S.B., Bell, D.W., Ganesan, S., Kass, E.M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D.C., Sgroi, D.C., Lane, W.S., Haber, D.A., Livingston, D.M. (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105: 149-60.

- Chen, C., Kolodner, R.D. (1999). Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet.* 23: 81–85.
- Davies, A.A., Masson, J.-Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Ventikaraman, A.R., West, S.C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Molecular Cell* 7: 273-282.
- Franklin, A.E., McElver, J., Sunjevaric, I., Rothstein, R., Bowen, B., Cande, W.Z. (1999). Three-dimensional microscopy of the Rad51 recombination protein during meiotic prophase. *Plant Cell* 11: 809–824.
- Freudenreich, C.H. (2007). Chromosome fragility: molecular mechanisms and cellular consequences. *Front Biosci.* 12: 4911-24.
- Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T., Ohta, K. (1998). Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J.* 17: 6412-6425.
- Game, J.C., Mortimer, R.K. (1974). A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.* 24: 281-292.
- Heller, R.C., Mariani, K.J. (2006). Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature* 439: 557-562.
- Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., Jackson, S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455: 689-92.
- Keeney, S., Neale, M.J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 523-525.
- Keeney, S. (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52: 1-53.
- Khazanehdari, K. A., Borts, R. H. (2000). EXO1 and MSH4 differentially affect crossing-over and segregation. *Chromosoma* 109: 94-102.
- Kim, H., Huang, J., Chen, J. (2007). CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 710-715.
- Kirkpatrick, D. T., Ferguson, J. R., Petes, T. D., Symington, L.S. (2000). Decreased meiotic intergenic recombination and increased meiosis I nondisjunction in *exo1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156: 1549-1557.
- Klein, H.L. (2008). The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair* 7: 686-693.
- Krogh, B.O., Symington, L.S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* 38: 233-271.
- Lenormand, T., Dutheil, J. (2005). Recombination difference between sexes: a role for haploid selection. *PLoS Biol.* 3: e63.
- Li, X., Heyer, W.-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 18: 99-113.
- Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A.M., Wittenberg, C., Russell, P. (2007). Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol. Cell.* 28: 134-46.
- Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118: 699-713.

- Lisby, M., Rothstein, R. (2009). Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair* 8: 1068-1076.
- Llorente, B., Symington, L.S. (2004). The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks *Mol. Cell. Biol.* 24: 9682- 9694.
- Lou, Z, Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., Alt, F.W., Chen, J. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell.* 21: 187-200.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones and promotes assembly of BRCA1 and 53BP1 at DNA damage-modified chromatin. *Cell* 131: 887-900.
- Mankouri, H.W., Ngo, H.P., Hickson, I.D. (2007). Shu proteins promote the formation of homologous recombination intermediates that are processed by sgs1-rmi1-top3. *Mol. Biol. Cell.* 18: 4062-4073.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair* 7: 1765-1771.
- Martin, V., Chahwan, C., Gao, H. *et al.* (2006). Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *EMBO J.* 25: 2564-2574.
- Martinez-Perez, E., Colaiácovo, M.P. (2009). Distribution of meiotic recombination events: talking to your neighbors. *Curr. Op. Genet. Dev.* 19: 105-112.
- Masson, J.Y., Tarsounas, M.C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M.J., Benson, F.E., West, S.C. (2001). Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes. Dev.* 15: 3296-3307.
- McKee, A.H., Kleckner, N. (1997). A general method for identifying recessive diploid-specific mutations in *Saccharomyces cerevisiae*, its application to the isolation of mutants blocked at intermediate stages of meiotic prophase and characterization of a new gene SAE2. *Genetics* 146: 797-816.
- Mimitou, E.P., Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770-774.
- Mimitou, E.P., Symington, L.S. (2009A). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* 34: 264-272.
- Mimitou, E.P., Symington, L.S. (2009B). DNA end resection: Many nucleases make light work. *DNA Repair* 8: 983-995.
- Moreau, S., Morgan, E.A., Symington, L.S. (2001). Overlapping functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism. *Genetics* 159: 1423–1433.
- Nairz, K., Klein, F. (1997). mre11S—a yeast mutation that blocks double-strand-break processing and permits nonhomologous synapsis in meiosis. *Genes Dev.* 11: 2272–2290.
- Neale, M.J., Pan, J., Keeney, S. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* 436: 1053-1057.
- Prinz, S., Amon, A., Klein, F. (1997). Isolation of COM1, a new gene required to complete meiotic double strand break induced recombination in *S. cerevisiae*. *Genetics* 146: 781-795.
- Rockmill, B., Voelkel-Meiman, K., Shirleen, R.G. (2006). Centromere-proximal crossovers are associated with precocious separation of sister chromatids during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174:1745-54.

- Rogakou, E. P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273: 5858-5868.
- San Filippo, J.S., Sung, P., Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 229-257.
- Sleeth, K.M., Sørensen, C.S., Issaeva, N., Dziegielewska, J., Bartek, J., Helleday, T. (2007). RPA mediates recombination repair during replication stress and is displaced from DNA by checkpoint signalling in human cells. *J. Mol. Biol.* 373: 38-47.
- Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., Nojima, K., Fukagawa, T., Waizenegger, I.C., Peters, J.M., Earnshaw, W.C., Takeda, S. (2001). Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev. Cell.* 1: 759-770.
- Tarsounas, M., Davies, D., West, S.C. (2003). BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* 22: 1115-1123.
- Tomita, K., Matsuura, A., Caspari, T., Carr, A.M., Akamatsu, Y., Iwasaki, H., Mizuno, K., Ohta, K. (2003). Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 23: 5186-5197.
- Trujillo, K.M., Roh, D.H., Chen, L., Van Komen, S., Tomkinson, S., Sung, P. (2003). Yeast Xrs2 binds DNA and helps target Rad50 and Mre11 to DNA ends. *J. Biol. Chem.* 278: 48957-48964.
- Tsukamoto, Y., Mitsuoka, C., Terasawa, M., Ogawa, H., Ogawa, T. (2005). Xrs2p regulates Mre11p translocation to the nucleus and plays a role in telomere elongation and meiotic recombination. *Mol Biol Cell.* 16: 597-608.
- Wang, Q., Gao, F., May, W.S., Zhang, Y., Flagg, T., Deng, X. (2008). Bcl2 negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway. *Mol. Cell.* 29: 488-498.
- Ward, I.M., Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276: 47759-47762.
- Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol. Cell.* 22: 719-729.
- Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* 134: 981-94.



Doc. Mgr. Miroslava Slaninová, Ph.D. je pracovníkom Katedry genetiky, Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Zaoberá sa rekombinačnými procesmi riasy *Chlamydomonas reinhardtii*. (e-mail: slaninova@fns.uniba.sk)



**Prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc. : „Epigenetika“
Vydala Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2010, ISBN 978-80-
244-2534-4, 1. vydání**

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci vydala v letošním roce text Borise Vyskota „Epigenetika“. Prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc. je vedoucím Oddělení vývojové genetiky rostlin Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR a dlouholetým, zkušeným učitelem Přírodovědecké fakulty MU v Brně, UP v Olomouci a Ostravské Univerzity. Učí Vývojovou genetiku, Vývojovou biologii a Epigenetiku. Skripta jsou primárně určena studentům magisterského navazujícího programu Molekulární a buněčné biologie a Biochemie PŘF UP

jako doprovodný text k přednášce z Epigenetiky.

Skripta mají 150 stran. Po krátkém (1) Úvodu a (2) Historickém přehledu, následuje kapitola (3) Mechanizmy epigenetických procesů (methylace DNA, modifikace histonových proteinů, RNA interference, chromatin nemodelující komplexy, priony) v rozsahu asi 30 stran. Necelých 10 stran je pak věnováno (4) přehledu základních metod, které se užívají ke studiu epigenetiky. Na dalších 40 stranách autor představuje hlavní modely, na kterých se studují nejrůznější epigenetické jevy. Od (5) jednoduchých eukaryotických modelů (trepka, kvasinky, Neurospora) a (6) bezobratlých (hlístice, drozofila) až po (7) krytosemenné rostliny. Poslední třetina textu (asi 40 stran) je pak věnována (8) epigenetice savců včetně člověka a (9) medicínským aspektům lidské epigenetiky (asi 40 stran). Text je ukončen (10) shrnutím, (11) slovníčkem termínů, (12) odkazy na internetové stránky a (13) seznamem použité a doporučené literatury.

Historie epigenetiky je dlouhá, nejstarší pozorování sahají až k přelomu 18. a 19. století. Ovšem moderní epigenetika, která odhalila molekulární mechanismy a dokázala tak vysvětlit řadu epigenetických jevů, patří k mladým a prudce se rozvíjejícím oblastem moderní biologie a genetiky. Zároveň je to oblast, která nepatří k nejsnadnějším a k jejímu plnému pochopení je nezbytná znalost z mnoha různých oblastí, o čemž nakonec dobře vypovídá i jen stručný pohled do obsahu textu. I proto není čtení/studium textu právě snadné a studentům, kterým je text primárně určen, lze proto účast na doprovodných přednáškách prof. Vyskota jednak vřele doporučit a jednak upřímně závidět. Ačkoliv mají skripta sloužit především studentům, kteří si zapíší přednášky z epigenetiky, lze je rozhodně doporučit každému zájemci o získání systematického a komplexního vhledu do této moderní oblasti biologie. Právě široký záběr a komplexní zpracování patří k největším přednostem textu. Ten je napsán a uspořádán tak, že i čtenář, který se sám zabývá jen velmi specifickou oblastí epigenetiky (podobně jako autorka této recenze), získá mnohem komplexnější a úplnější pohled nejenom na epigenetiku jako takovou, ale i na její úlohu jak ve fylogenezi tak v onkogenezi člověka. Kapitola o medicínských aspektech lidské epigenetiky pak dokládá nezpochybnitelný význam důkladných znalostí epigenetiky

pro celou řadu praktických oblastí současné biologie a medicíny jakými jsou klinická genetika, reprodukční a terapeutické klonování a využití kmenových buněk, onkologie, neurobiologie a další. Skripta prof. Borise Vyskota se tak mohou stát užitečným zdrojem informací nejenom pro studenty, ale také pro řadu již profilovaných odborníků z různých oborů biologie a medicíny.



Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc. je vedoucí Laboratoře molekulární patologie Ústavu patologie Fakultní nemocnice v Brně a členkou Laboratoře buněčné diferenciaci Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU v Brně.
(e-mail: janasmarda@seznam.cz)

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.

„U motýlů je mužské pohlaví monogamické“.

„Uvnitř druhu probíhá třídní boj“.

Názor studentky: „Kastrace je odnětí pohlavních orgánů. U ženy je tato operace složitější než u muže“.

„Pračlověk se živil sběratelstvím...“

„Pohlavní výběr, to je, že vůdce stáda si může vybrat tu samici a ti ostatní musí počkat“.

(Otázka studentce v rámci probírání bičíkového pohybu): „Pohybují se nějaké buňky ve Vašem těle bičíkovým pohybem?“ (Její odpověď): "Ano, spermie".

„Vědec se musí vyvarovat citů; např. nesmí ho rušit myšlenka stát se otcem“.



...because now I can sequence on my bench-top

We think you're going to like the new GS Junior System. And not simply because it's new and exciting. It's much more than that. The GS Junior System allows you to perform next-generation sequencing in your lab, on your bench, when you're ready. And because it is based on proven 454 Sequencing Systems, it delivers results you can trust time and time again. The GS Junior System also comes with a desktop PC equipped with user-friendly bioinformatic tools, so you don't need to be an IT expert to assemble, map or analyze your genome, transcriptome or metagenome. And what's not to love about that? To learn more about the GS Junior System and how it can help you and your laboratory succeed, get in touch via our website: www.gsjunior.com. It could be the start of a beautiful friendship.

GS Junior System

The power of next-generation sequencing in your hands

**For life science research only.
Not for use in diagnostic procedures.**

454
SEQUENCING

454, 454 SEQUENCING, GS JUNIOR and GS FLX are trademarks of Roche.
© 2010 Roche Diagnostics GmbH. All rights reserved.

WWW.GSJUNIOR.COM

ROCHE s.r.o.
Karlovo náměstí 17
120 00 Prague 2

Jaroslav.Vohanka@roche.com
00420 724 483 607





NOVÁ pipeta!

Už jsi o ní také slyšela?

Eppendorf Xplorer® – nová elektronická pipeta.

Jednoduché pipetování:

- Intuitivní ovládání
- Optimální ergonomie
- Vysoká reprodukovatelnost

www.eppendorf.de/xplorer

eppendorf
—Czech & Slovakia—

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

eppendorf® a Eppendorf Xplorer® jsou registrované ochranné známky Eppendorf AG. Všechna práva vyhrazena, včetně grafiky a zobrazení. Copyright © 2009 by Eppendorf AG.



NOVINKA!

Tak to je ona? Tu musíme mít!

Eppendorf Xplorer® – nová elektronická pipeta.

V prodeji od 1. dubna 2010!

- Intuitivní ovládání a optimální ergonomie
- Sleva 15 % na prvních 15 kusů při uvedení kódu "ep-Xp" ve Vaší objednávce

www.eppendorf.de/xplorer

eppendorf
—Czech & Slovakia—

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

eppendorf® a Eppendorf Xplorer® jsou registrované ochranné známky Eppendorf AG. Všechna práva vyhrazena, včetně grafiky a zobrazení. Copyright © 2009 by Eppendorf AG.