

# INFORMAČNÍ LISTY



Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela, která se konala dne 22. 5. 2013 v Brně

---

*Místo konání:*

Pracovna ředitele Ústavu experimentální biologie (pavilon A17, místnost 431, Přírodovědecká fakulta MU v Brně - Bohunicích, Kamenice 753/5)

*Přítomni* (bez titulů): Doškař, Kočová, Malachová, Šmarda, Vojtišková, Zelený  
Dr. O. Dostál jako host

*Omluveni:* Angelis, Čellárová, Knoll, Kormuťák, Mašek, Miadoková, Nešvera, Relichová, Slaninová, Šeda, Tomáška, Zadražil

*Program schůze:*

1. Informace o činnosti výboru za uplynulé období
2. Zpráva o stavu účtu
3. Zhodnocení náplně posledního čísla IL a příprava obsahu dalšího čísla
4. Kontrola stavu členské základny
5. Příprava konference GSGM v roce 2014 a plán činnosti na další období
6. Stav přihlášek do soutěže o Cenu GSGM 2014
7. Návštěva dr. O. Dostála, ředitele Mendelova muzea MU v Brně
8. Různé

ad 1) Schůzi zahájil prof. Doškař, který přivítal přítomné a omluvil nepřítomné členy výboru pro nemoc, výuku a přednášky v zahraničí. V úvodu bylo vzpomenuo úmrtí dlouholeté spolupracovnice, členky GSGM, doc. RNDr. Jarmily Hendrychové, CSc. z UK Praha. Čest její památce!

Byla provedena kontrola úkolů z jednání poslední výborové schůze GSGM (listopad 2012):

a) Pořádání přednáškových cyklů na aktuální témata z genetiky by mohlo být realizováno v úzké spolupráci s Mendelovým muzeem v Brně (viz bod jednání s dr. Dostálem).

b) Byla provedena aktualizace seznamu členů GSGM (dr. Kočová). Seznam bude uveřejněn v připravovaném čísle 41 Informačních listů.

c) Výbor se zabýval dosud nevyužívanou možností uveřejnění informací o pořádání odborných akcí, přednášek, seminářů na jednotlivých genetických pracovištích na webových stránkách GSGM (knoll@mendelu.cz) pro širší odbornou veřejnost.

d) Příprava genetické konference 2014 v Praze (viz bod 5).

e) Výbor dosud neobdržel žádnou přihlášku do soutěže o Cenu GSGM. Navržená opatření viz bod 6.

ad 2) Prof. Knoll zaslal zprávu o stavu účtu a konstatoval, že se zlepšila aktivita členské základny v placení příspěvků. Na účtu společnosti za českou část GSGM je částka 27 804 Kč. Výbor souhlasil s využitím části těchto prostředků na zlepšení grafické úpravy IL. Za slovenskou část GSGM zprávu vypracuje doc. Slaninová a obě zprávy o hospodaření za GSGM budou součástí obsahu Informačních listů č. 42.

ad 3) Výbor kladně hodnotil stoupající odbornou a grafickou úroveň IL, zejména posledního č. 40, jehož hlavní náplní byly články týkající se odkazu J. G. Mendela pro současnost a zhodnocení odborných akcí, pořádaných při příležitosti 190. výročí jeho narození. Součástí IL byl odborný článek I. Kováčikové, informace o činnosti RNA klubu (T. Mašek) a představení historie a činnosti Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK (O. Seda). „Perličky ze školních lavic“ zaznamenané během pedagogické kariéry prof. J. Šmardou z Biologického ústavu LF MU byly úsměvnou tečkou za obsahově zdařilým číslem 40.

Připravované nové číslo IL, jak uvedl redaktor prof. Šmarda, bude sestaveno ze tří autoreferátů úspěšně obhájených disertačních prací na Ústavu experimentální biologie PŘF MU z oblasti genetiky a molekulární biologie. Zařazování autoreferátů jako odborných článků v IL bylo jedním z návrhů vzešlých z odpovědí členů na dotazník k činnosti GSGM v roce 2012. Dále bude v připravovaném čísle IL uveřejněn aktuální seznam členů s uvedením evidenčního čísla a pracoviště (zatím české části členské základny), výzva pro mladé vědecké pracovníky k účasti v soutěži o Cenu GSGM pro rok 2014, a článek prof. Matalové o činnosti Mendeliana. Redakční uzávěrka IL č. 41 je 31. 5. 2013.

ad 4) Výbor jednomyslně přijal nového člena GSGM Dr. A. Šípka, Jr. z Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK. Po zařazení do seznamu členů GSGM mu bude zasláno elektronicky členské číslo.

Výbor souhlasil s ukončením členství GSGM Dr. S. Rakouského na jeho vlastní žádost. Dr. M. Mokrejš musí požádat o ukončení členství v GSGM písemně (viz Stanovy GSGM) (dr. Mašek).

V roce 2012/13 bylo přijato 13 nových členů, ke dni 22. 5. 2013 má česká část GSGM 77 členů. Aktuální seznam zpracuje dr. Kočová a předá prof. Šmardovi, prof. Knollovi a členům výboru. Seznam členů slovenské části bude upřesněn doc. Slaniňovou.

ad 5) Dr. Kočová informovala výbor o stavu příprav Genetické konference v roce 2014. Termín konání konference – září 2014 (konkrétní datum bude upřesněno). Navrhovaný odborný program bude zahájen historií vzniku a přehledem činnosti Katedry genetiky a mikrobiologie PŘF UK za období padesáti let. Dále program bude sestaven z plenárních přednášek předních českých a slovenských odborníků na aktuální témata, týkajících se oblastí genetiky a molekulární biologie. Nedílnou součástí pak bude zařazení přednášky vítěze Soutěže o cenu GSGM.

Zatím je diskutován výběr místa konání v Praze tak, aby splňovalo kritéria pro přednáškovou činnost, ubytování, stravování a vyhovoval i po stránce ekonomické. Vytipováno je několik lokalit, v průběhu prázdninových měsíců bude provedeno poptávkové řízení a upřesněn výběr (dr. Kočová, dr. Pospíšek).

Výbor konstatoval, že organizace a příprava konference pracovníky pořádající Katedry genetiky a mikrobiologie PŘF UK probíhá podle plánu.

ad 6) Výbor dosud neobdržel žádnou přihlášku do Soutěže o cenu GSGM pro mladé vědecké pracovníky a domnívá se, že jednou z příčin tohoto stavu je nízká informovanost. Výbor navrhl, aby do připravovaných IL byla znovu vložena výzva k účasti v soutěži (dr. Vojtíšková, viz příloha k zápisu).

Dr. Zelený z M.G.P. Zlín nabídl pomoc při přípravě informačního letáku, který bude rozmístěn na potenciálně zainteresovaná pracoviště. Podmínky a Statut Ceny GSGM byl uveřejněn v IL č. 40 a je umístěn na [www.gsgm.cz](http://www.gsgm.cz).

Výbor vyzývá členy GSGM, aby o soutěži informovali na svých pracovištích a podpořili aktivní účast svých mladých kolegů.

ad 7) Pozvání prof. Doškaře k účasti na jednání výboru GSGM přijal dr. O. Dostál, ředitel Mendelova muzea MU. Výbor byl seznámen s pracovními návrhy týkajícími se spolupráce muzea s GSGM. Jednalo by se zejména o možnost pořádat semináře a přednášky v prostorách muzea (bez úhrady pronájmu). Ředitelství nabízí pro členy GSGM rovněž bezplatnou účast na výstavách pořádaných MM a současně vítá odbornou pomoc při přípravě speciálních výstav. V diskusi byly zmíněny možnosti pořádání kursů pro středoškolské učitele na aktuální témata genetiky, udělení certifikátů GSGM o účasti apod.

Výbor navrhl připravit „Smlouvu o spolupráci“ do podzimu 2013 tak, aby spolupráce mohla být oficiálně zahájena v příštím roce (prof. Doškař). Bylo konstatováno, že úzká spolupráce za účasti členů GSGM z řad pracovníků Ústavu experimentální biologie a dalších odborníků již řadu probíhá (viz zápis z jednání výboru GSGM ze dne 21. 11. 2012 - IL č. 40, str. 3-4).

Příští výborová schůze se bude konat v listopadu 2013. Pro zajištění maximální účasti členů výboru na jednání budou v delším časovém předstihu navrženy nejméně tři termíny tak, aby termín vyhovoval většině členů výboru.

Zapsala M. Vojtíšková

## **VÝZVA Soutěž o Cenu GSGM v roce 2014**

Vážené kolegyně a kolegové,

v září 2014 se uskuteční genetická konference v Praze, jejíž nedílnou součástí je prezentace odborných výsledků studentů a mladých vědeckých pracovníků. Výbor GSGM při této příležitosti vyhlásil již pátý ročník Soutěže o cenu GSGM dotovanou společností M.G.P. s.r.o. Zlín finanční částkou 2000 EUR. Statut Ceny GSGM a veškeré další informace jsou k dispozici na internetových stránkách společnosti ([www.gsgm.cz](http://www.gsgm.cz)).

Výbor vyzývá všechny své členy a další pedagogické a vědecké pracovníky, aby podpořili účast svých mladších kolegů v soutěži o cenu GSGM, kterým se tak nabízí možnost získat prestižní ocenění GSGM a prezentovat výsledky své výzkumné činnosti na genetické konferenci.

### **Přihlášky do soutěže se přijímají do 30. dubna 2014 na adrese:**

Výbor Genetické společnosti Gregora Mendela  
Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity  
Kotlářská 2  
611 37 Brno

*Výbor GSGM*

SEZNAM ČLENŮ GSGM K 31. 5. 2013 - ČESKÁ ČÁST

---

EVIDENČNÍ ČÍSLO	JMÉNO A PŘÍJMENÍ	PRACOVIŠTĚ
1	RNDr. Karel Angelis, CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6
118	Mgr. Zuzana Bayerová	Ústav genetiky, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
113	Mgr. Vítězslav Bryja, Ph.D.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno
99	Ing. Radka Burdychová, Ph.D.	Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta MENDELU, Zemědělská 1, 613 00 Brno
128	Mgr. Jiří Červeň	Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta OU, Chittussiho 10, 701 03 Ostrava
7	RNDr. Jarmila Číhalíková, CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Šokolovská 6, 772 00 Olomouc
8	Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Tvrdého 450/14, 602 00 Brno
9	RNDr. Petr Dráber, CSc.	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
10	Prof. Ing. Josef Dvořák, CSc.	Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta MENDELU, Zemědělská 1, 613 00 Brno
103	RNDr. Martin Falk, Ph.D.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno
104	Mgr. Zuzana Feketová	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
105	Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno
14	Prof. MUDr. Petr Goetz, CSc.	Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. Lékařská fakulta UK, V úvalu 84, 151 12 Praha 5 - Motol
126	Mgr. Igor Grekov, Ph.D.	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
100	Mgr. Petr Hanák, Ph.D.	Výzkumný ústav potravinářský, Radiová 7, 102 00 Praha 15
16	Prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.	Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta MENDELU, Zemědělská 1, 613 00 Brno
17	Doc. MUDr. Marie Havelková, CSc.	Katedra biologie, Pedagogická fakulta MU, Poříčí 7, 603 00 Brno (bydliště: Koniklecová 2, 634 00 Brno)
122	Helena Havelková	Biotechnologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
20	RNDr. Dana Holá, Ph.D.	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
82	Prof. RNDr. MVDr. Petr Hořín, CSc.	Fakulta veterinárního lékařství VFU, Palackého 1/3, 612 42 Brno
26	RNDr. Jana Kailerová, CSc.	Podlesí 24, 624 00 Brno
90	Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.	Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta MENDELU, Zemědělská 1, 613 00 Brno
124	Mgr. Tetyana Kobets, Ph.D.	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
28	RNDr. Marie Kočová, CSc.	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
31	RNDr. Blažena Koukalová, CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno
32	RNDr. Aleš Kovařík, CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno

34	Doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 753/5, 625 00 Brno
114	RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.	Oddělení laboratorní medicíny, Středomoravská nemocniční a.s., odštěpný závod Nemocnice Šternberk, Jívavská 1435/20, 785 01 Šternberk
120	Doc. Marie Lipoldová, CSc.	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
36	RNDr. Pavel Lízal, Ph.D.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 753/5, 625 00 Brno
38	Doc. MUDr. František Lošan, CSc.	Genetika Plzeň s.r.o., Nepomucká 159/A, Plzeň - Černice
130	Doc. Ing. Milan Lstibůrek, Ph.D.	Fakulta lesnická a dřevařská, Česká zemědělská univerzita, Kamýcká 1176, 165 21 Praha 6, Suchbát
102	Doc. Mgr. Martin Lysák, Ph.D.	Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 753/5, 625 00 Brno
39	Doc. RNDr. Kateřina Malachová, CSc.	Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta OU, Bráfova 7, 701 03 Ostrava 1
106	RNDr. Jitka Malčíková, Ph.D.	Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK, Fakultní nemocnice Brno, Černopolní 9, 616 00 Brno
40	prof. RNDr. František Marec, CSc.	Entomologický ústav AV ČR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
107	RNDr. Tomáš Mašek, Ph.D.	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
115	MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.	Centrum molekulární biologie a genové terapie, Dětská nemocnice Brno, Černopolní 9, 613 00 Brno
43	RNDr. Jan Nešvera, CSc.	Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
46	Doc. Ing. RNDr. V. Orel, DrSc.	Barvičova 51, 600 00 Brno
47	Doc. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Tvrdeho 450/14, 602 00 Brno
127	Doc. RNDr. Petr Pečinka, CSc.	Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta OU, Chittussiho 10, 701 03 Ostrava
51	Doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc.	Milánská 462, Horní Měcholupy, 109 00 Praha 10
52	RNDr. Jiří Plachý, DrSc.	Masarykova 884, 252 63 Roztoky u Prahy
109	RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
95	Prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D.	Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK, Fakultní nemocnice Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno
56	Prof. RNDr. Jiřina Relichová, CSc.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 753/5 (bud. A13/312), 625 00 Brno
85	Doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Tvrdeho 450/14, 602 00 Brno
117	RNDr. Olga Rothová	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
86	Doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Tvrdeho 450/14, 602 00 Brno
60	Doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 753/5, 625 00 Brno
129	Mgr. Hana Sezimová, Ph.D.	Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta OU, Chittussiho 10, 701 03 Ostrava
101	Doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.	Masarykův onkologický ústav, Oddělení klinické a experimentální patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
125	Mgr. Yahya Sohrabi	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.,

96	Mgr. Kamila Součková - Skalická, Ph.D.	Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 Masarykův onkologický ústav, Oddělení experimentální onkologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
74	Prof. Ing. Antonín Stratil, DrSc.	Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., 277 21 Liběchov
93	Mgr. Eva Sýkorová, CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno
12	Doc. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D.	Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. Lékařská fakulta UK, Albertov 4, 128 01 Praha 2
22	PharmDr. Lucie Šedová, Ph.D.	Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. Lékařská fakulta UK, Albertov 4, 128 01 Praha 2
119	Mgr. Matyáš Šíma	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
131	MUDr. Antonín Šípek Jr.	Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. Lékařská fakulta UK, Albertov 4, 128 01 Praha 2
63	Prof. MUDr. Jan Šmarda, DrSc.	Biologický ústav, Lékařská fakulta MU, Kamenice 753/5, 625 00 Brno
64	Prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 753/5, 625 00 Brno
116	Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.	Ústav patologie FN Brno, Jihlavská 20, 629 00 Brno
92	Doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.	Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta MENDELU, Zemědělská 1, 613 00 Brno
69	RNDr. Marie Vojtíšková, CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno
123	RNDr. Jarmila Vojtíšková, CSc.	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
121	Mgr. Valeriya Volkova	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
111	Václav Vopálenský, Ph.D.	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
112	RNDr. Vladimíra Vallová (Vranová)	Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 753/5, 625 00 Brno
88	Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.	Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta MENDELU, Zemědělská 1, 613 00 Brno
71	Prof. MUDr. Evžen Weigl, CSc.	Ústav klinické imunologie, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
73	Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
110	Mgr. Blanka Zámotná	Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2
77	RNDr. Karel Zelený, CSc.	M.G.P. spol. s r.o., Kvítková 1575, 760 01 Zlín

## Odpoledne s DNA k 60. výročí objevu struktury DNA

**Eva Matalová**

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Laboratoř embryologie živočichů,  
Veveří 97, 602 00 Brno

V letošním roce uplynulo 60 let od objevu struktury DNA. Za tento významný objev, který nastartoval éru molekulární biologie, byla udělena Nobelova cena za fyziologii/medicínu v roce 1962. Stěžejní práce D. J. Watsona a F. H. C. Cricka vyšla v časopise Nature 25. dubna 1953. O šedesát let později připravilo Mendelianum MZM Brno ve spolupráci s Mendelovou univerzitou na 25. duben 2013 další ročník vzdělávacího cyklu Odpoledne s DNA určeného pro studenty, pedagogy, ale i širokou veřejnost. Tyto akce jsou tradičně zaměřeny především na přímé praktické zkušenosti s vědou a výzkumem formou "hands-on experience" a jsou proto otevírány jen pro limitovaný počet účastníků. V letošním roce bylo jako hlavní téma vybráno sekvenování DNA. Mendelova univerzita ve svých molekulárních laboratořích nabídla jak seznámení s metodami sekvenování DNA, tak s jejich praktickým významem. Účastníci měli k dispozici protokoly a laboratorní odpoledne bylo uzavřeno diskusí výsledků získaných ze sekvenátoru. Součástí akce byla také přednáška doc. T. Urbana na téma genomika pro moderní šlechtění.



Informační listy GSGM, 2013, 41: 7



## Mendel Forum 2013

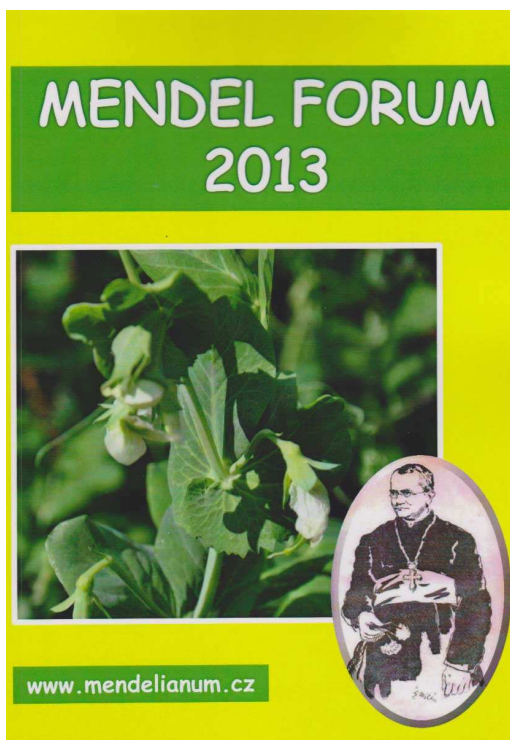
Eva Matalová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Laboratoř embryologie živočichů,  
Veveří 97, 602 00 Brno

Mendelianum MZM Brno v letošním roce opět nabídlo populárně-vědeckou konferenci z cyklu Mendel Forum. Tyto akce jsou určeny zejména pro studenty, pedagogy, ale také širokou veřejnost. Konference Mendel Forum 2013 se konala 26. dubna 2013, tentokrát na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno, která se na organizaci setkání podílela. Mendel Forum navazovalo na Odpoledne s DNA, které proběhlo 25. dubna 2013 na Mendelově univerzitě u příležitosti připomenutí 60 let od objevu struktury DNA.

Letošní ročník Mendel Forum byl zaměřen na indukované pluripotentní kmenové buňky, téma oceněné nejaktuálnější Nobelovou cenou za fyziologii/medicínu. Bohatá diskuse probíhala zejména po přednášce Dr. T. Bárty, který na uvedené problematice v současné době pracuje na univerzitě v Newcastlu ve Velké Británii. Během přednášky byl vysvětlen postup, jak lze somatické buňky „přeprogramovat“ na kmenové a z nich potom vytvořit libovolný buněčný typ (tkáň, orgán). Kromě zcela nových obzorů pro regenerativní medicínu byly zmíněny také limitace aplikace kmenových buněk a některá rizika, která jejich praktické využití zpomalují.

Součástí konference bylo také pracovní setkání základního expertního týmu projektu Mendelianum – atraktivní svět genetiky, který aktuálně připravuje prezentace brněnských pracovišť vědy a výzkumu v nově připravovaném návštěvnickém centru. Mendel Forum nabídlo také informace o probíhajících projektech z oblasti genetiky, fyziologie a laboratorní diagnostiky, do kterých se mohou účastníci zapojit. Sborník z konference a informace o dalších aktivitách Mendeliana jsou dostupné na [www.mendelianum.cz](http://www.mendelianum.cz).



## Mendelovo Brno ve čtyřech ročních obdobích - fotosoutěž

### Eva Matalová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Laboratoř embryologie živočichů,  
Veveří 97, 602 00 Brno

Mendelianum Moravského zemského muzea nabídlo v loňském roce výstavu Prázdninové toulky Mendelovým Brnem a publikaci Mendelovo Brno, které seznámily zájemce s řadou známých i méně známých míst spojených s vědeckou, kulturní a další činností J. G. Mendela v Brně z pohledu odborníka.

Letošní fotosoutěž je výzvou (nejen) pro Brňany, aby zachytili Mendelovo Brno z pozice široké veřejnosti, která jím denně prochází. Fotosoutěž je otevřena na stránkách [www.mendelianum.cz](http://www.mendelianum.cz) a probíhá ve čtyřech cyklech. Zima v Mendelově Brně je již uzavřena (obr. 1), do 21. 6. 2013 je možné zasílat fotografie do cyklu Jaro v Mendelově Brně. Fotografie jsou průběžně zveřejňovány na internetových stránkách. O vítězi rozhodují návštěvníci webových stránek, na kterých je k dispozici možnost hlasování o tři nejlepší snímky z každého cyklu. Pro (nejen) fotografickou inspiraci si Mendelianum dovoluje pozvat na virtuální procházku Mendelovým Brnem, která je společně s dalšími aktuálními informacemi dostupná na webových stránkách [www.mendelianum.cz](http://www.mendelianum.cz).



Obrázek 1. Vítězné snímky soutěže Zima v Mendelově Brně.



**Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.** (e-mail: [matalova@iach.cz](mailto:matalova@iach.cz)) je vědeckou pracovnící Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., profesorkou fyziologie a farmakologie (Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno) a spolupracuje s Mendelianem MZM.

## Úloha bakteriofágů v horizontálním přenosu genů u druhu *Staphylococcus aureus*

**Ivana Mašlaňová**

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity,  
Kotlářská 2, 641 37 Brno

### Abstrakt

Rychlá evoluce stafylokokových druhů přispívá ke značné variabilitě kmenů a ke vzniku nových klonů. Příčinou je především získávání nových genů odpovědných za vzrůstající virulenci a rezistenci k antibiotikům prostřednictvím horizontálního přenosu genů (HGT). Je obecně přijímáno, že v tomto procesu hrají hlavní roli temperované bakteriofágy a předpokládá se, že přispívají k šíření mobilních genetických elementů (MGE) včetně stafylokokové chromozomové kazety *mec* (*SCCmec*). Závažný medicínský problém představují kmeny druhu *Staphylococcus aureus* rezistentní k metilcinu (MRSA). V současné době je popsáno 11 různých typů *SCCmec* elementů, které nesou gen *mecA* odpovědný za rezistenci k metilcinu. Přesný mechanismus přenosu a evoluce tohoto elementu jsou stále diskutovány a jsou předmětem dalšího výzkumu. Tato práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci vhodné techniky pro detekci a kvantifikaci bakteriálních genů ve fágových částicích pomocí kvantitativní „real-time“ PCR (qPCR). Byla stanovena frekvence sbalování 12ti různých bakteriálních genů včetně genů lokalizovaných na *SCCmec*, stafylokokovém ostrově patogenity (SaPI) a genomických ostrovech. Hlavním a novým výsledkem je zjištění, že bakteriofágy sérologické skupiny B sbalují části *SCCmec* elementu (*ccrA1* a *mecA*) do svých kapsidů a mohou tak přispívat k evoluci a šíření nových klonů MRSA. Dosažené výsledky ukazují, že části *SCCmec* elementů je možné detekovat také ve virionech indukovaných bakteriofágů přirozeně se vyskytujících u klinických kmenů.

### Úvod

Rezistence k antibiotikům představuje v globálním měřítku narůstající problém, který je výsledkem nadměrného používání antimikrobiálních látek a rozsáhlé migrace lidské populace. Avšak celková odolnost a virulence bakterií je omezená jejich základní genetickou sestavou (Lindsay a Holden, 2004). Znaky, které určují schopnosti bakteriálních klonů stát se celosvětově rozšířenými, jsou dodnes z velké části neznámé. Multirezistentní grampozitivní koky jako stafylokoky, enterokoky a streptokoky, a také některé gramnegativní bakterie se stávají více a více rozšířenými. Způsoby šíření, přežívání a celosvětové rozšíření klonů těchto bakterií rezistentních k antibiotikům představují důležité problémy humánní medicíny. Mimořádnou důležitost má druh *S. aureus*, jelikož patří mezi hlavní původce infekcí související s nemoc-

niční péči (nozokomiální) a komunitních infekcí. Geny kódující rezistenci k antibiotikům se přirozeně vyskytují v populaci mikroorganismů a mohou být přenášeny mezi různými bakteriálními druhy prostřednictvím mobilních genetických elementů (MGE). Tento proces označovaný jako horizontální přenos genů (HGT) hraje významnou roli v evoluci mikrobiálních genomů a přispívá ke genetické variabilitě patogenních bakterií.

Předložená práce se zabývá studiem HGT zprostředkovaného bakteriofágy u kmenů MRSA. Bakteriální druh *S. aureus* je jeden z nejvýznamnějších a nejzávažnějších lidských a zvířecích patogenů. *S. aureus* je často součástí přirozené mikroflóry a nevyvolává žádné obtíže. Na druhé straně u jedinců se sníženou imunitou může vyvolat celou řadu onemocnění od běžných hnisavých kožních infekcí nebo abscesů až po osteomyelitidy, endokarditidy, pneumonie nebo celkové sepse. Patří k hlavním původcům závažných pooperačních komplikací u pacientů s ortopedickými implantáty a katétry, u nichž mohou mít významný podíl i další druhy stafylokoků. Nezanedbatelné jsou i stafylokokové toxikózy. Stafylokokové infekce, na nichž se mohou podílet i oportunistické koaguláza-negativní druhy, zaznamenaly dramatický nárůst také s používáním plastových pomůcek v medicíně, jako jsou umělé srdeční chlopně, klouby, srdeční stimulátory a katétry, jelikož bakterie jsou schopné velmi efektivní adheze k těmto umělým povrchům a tvoří mnohavrstvé biofilmy, které se obtížně odstraňují působením imunitního systému nebo léčí dostupnými antibiotiky (Gotz, 2002).

Rychlá evoluce přispívající k variabilitě a vzniku nových úspěšných klonů je závislá na získávání nových genů horizontálním přenosem, které jsou zodpovědné za virulenci, ATB rezistenci a šíření v prostředí. Všeobecně je přijímáno, že hlavní úlohu v přenosu genů hrají temperované bakteriofágy. Studium HGT u druhu *S. aureus* přispívá k objasnění evoluce kmenů rezistentních na meticilin, které představují závažný problém v léčbě nozokomiálních infekcí. Cílem práce je podat ucelený pohled na roli bakteriofágů v evoluci kmenů MRSA.

## Cíle

Tato práce je zaměřena na studium schopnosti stafylokokových bakteriofágů čeledi *Siphoviridae* sérologické skupiny B sbalovat chromozomální a plazmidové geny s využitím metody kvantitativní „real-time“ PCR (qPCR), která umožňuje stanovit nejen přítomnost různých genů přímo ve fágových částicích, ale i jejich kvantitu.

Hlavní cíle:

1. srovnání transdukčních schopností bakteriofágů z různých sérologických skupin s ohledem na přenos genů lokalizovaných na různých typech mobilních genetických elementů bakteriálního chromozomu a na plazmidech;
2. vývoj vhodné metody purifikace a extrakce DNA z transdukujících fágových částic s vyloučením přítomnosti exogenní bakteriální DNA;
3. vývoj a optimalizace metody qPCR pro přímou detekci a kvantifikaci bakteriálních genů ve fágových částicích;
4. navržení primerů pro kvantifikaci bakteriálních genů ve fágových částicích a statistická analýza schopností bakteriofágů sbalovat bakteriální geny (především mobilní genetické elementy).

## Materiál a metody

### Bakteriální kmeny a bakteriofágy

V práci bylo použito několik klinických a laboratorních kmenů druhu *S. aureus*, které se vyznačovaly známou sekvencí genomu, vysokým obsahem různých typů mobilních genetických elementů a citlivostí k vybraným bakteriofágům. V transdukčním systému byl jako donorový kmen vybrán kmen *S. aureus* COL. Do tohoto donorového kmene byl přenesen penicilinázový 28 kb plazmid pUSA300-HOUMR-like z kmene *S. aureus* NRL/St 07/759 (Kahánková et al., 2010). Jako recipientní kmen byl v experimentech využit restriktivně-deficientní kmen *S. aureus* RN4220. V transdukčním systému byla použita kontrolní DNA kmene *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140<sup>T</sup> (Mašlaňová et al., 2012). Jako další donorový kmen byl použit klinický meticilin-rezistentní kmen *S. aureus* UMCG-M4, a jako recipientní kmeny byly použity UMCG-M2, SH1000 a RN1HG (Chlebowicz et al., 2010). Pro transdukční a kvantifikační experimenty byly použity bakteriofágy čeledi *Siphoviridae*  $\phi$ 11,  $\phi$  80,  $\phi$ 80 $\alpha$ , a  $\phi$ 81 a *Myoviridae*  $\phi$ 812 a STAFAL<sup>®</sup>. Další skupinou bakteriofágů byly fágy indukované UV zářením z klinického kmene UMCG-M4.

### Propagace a purifikace bakteriofágů z transdukujících fágových lyzátů

V práci byly použity standardní mikrobiologické techniky pro kultivaci bakterií, přípravu fágových lyzátů a transdukční experimenty. Donorové kmeny pro transdukční experimenty byly inkubovány přes noc v Nutrient Broth CM1 (Oxoid, UK). Do takto narostlé kultury bylo přidáno 5 ml fágového lyzátu (přibližně 10<sup>8</sup> PFU/ml) a CaCl<sub>2</sub> do výsledné koncentrace 2mM. Směs byla inkubována při 37 °C, dokud nedošlo k úplné lyzi bakteriálních buněk. Pro odstranění zbytků buněk byly použity techniky diferenciální centrifugace a filtrace přes nylonový filtr 0,45  $\mu$ m. Takto ošetřený fágový lyzát byl následně purifikován ultracentrifugací (150 000  $\times$  g/3 h) v CsCl hustotním gradientu (1,4 – 1,7 g/ml) a dialyzován proti fágovému pufru (10 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl; pH 8,0). Pro transdukční experimenty byly stanoveny hodnoty PFU/ml titrací na recipientním restriktivně-deficientním kmeni RN4220 (Mašlaňová et al., 2012; Varga et al., 2012). Purifikovaný fágový lyzát byl skladován při 4 °C a jeho uniformita a čistota byla ověřena elektronovou mikroskopií. Viriony byly negativně barveny 2% molybdenanem amonným a fotografovány v transmisním elektronovém mikroskopu MORGAGNI 268D (Philips) (Mašlaňová et al., 2012). Kolonie transduktantů byly postupně pasážovány na miskách se selekčním médiem (tetracyklin 5  $\mu$ g/ml nebo 50  $\mu$ M Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O) a citronanem sodným, a následně na miskách bez selekčního media a citronanu sodného a nakonec byly očkovány na misky bez citronanu sodného a bez selekčního media. Genetické pozadí donorového, recipientního kmene a transduktantů bylo ověřeno pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) za použití restriktivní endonukleázy *Sma*I.

### Izolace a purifikace fágové DNA

Kontrolní DNA z kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* DSM 10140<sup>T</sup> byla přidána k fágovým vzorkům před purifikací v hustotním gradientu CsCl pro ověření, že vzorek neobsahuje exogenní bakteriální DNA. Případná exogenní DNA byla odstraněna RNázou A a DNázou I, které byly přidávány ke vzorkům do finální koncentrace 1  $\mu$ g/ml a 5  $\mu$ g/ml. Po enzymatickém ošetření bylo odstranění kontrolní DNA ověřeno pomocí PCR a qPCR (Mašlaňová et al., 2012). DNA z fágových částic byla izolována pomocí fenol-chloroformové extrakce. DNA ze supernatantu byla vysrážena 96% etanolem a 3 M octanem sodným.

### PCR a qPCR

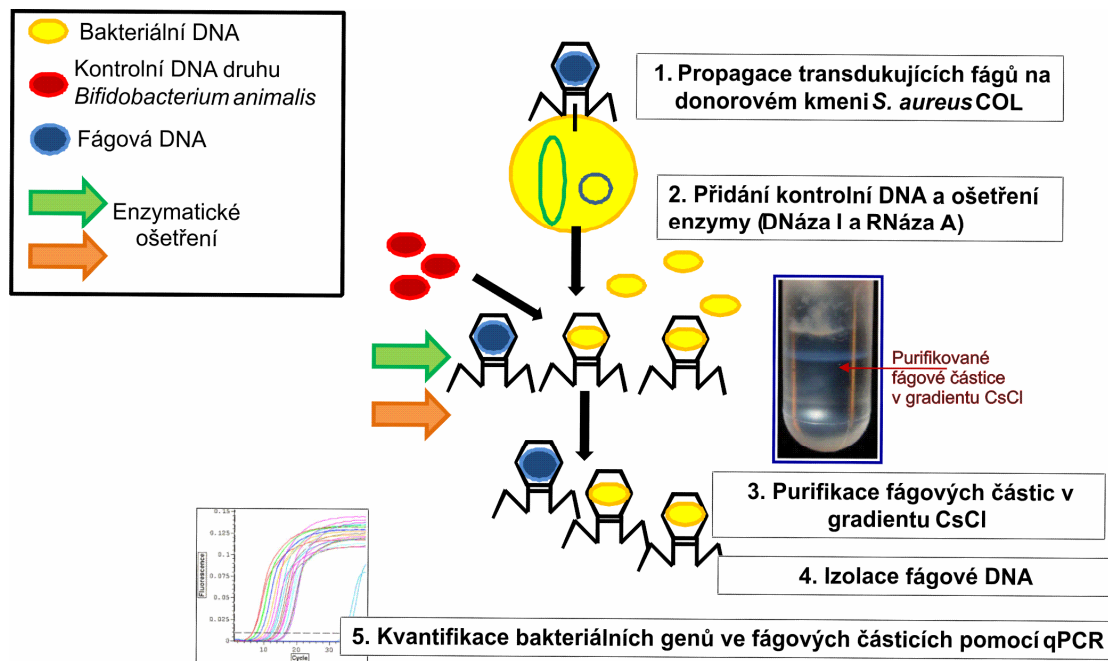
Uniformita fágových lyzátů byla testována prostřednictvím multiplex PCR (Kahánková et al., 2010). Přítomnost dlouhých fragmentů elementu *SCCmec* ve fágových částicích byla testována metodou „long“ PCR. Pro přípravu reakční směsi byl použit LongAmp Taq PCR Kit (New England Biolabs) (Chlebowicz et al., 2012; Mašlaňová et al., 2012). Bakteriální DNA donorového kmene, která byla použita jako standard pro qPCR reakce byla izolována pomocí PCR Template Isolation Kit (Roche Diagnostics, USA) dle přiloženého protokolu výrobce a s přidáním lyzostafinu. Plazmidová DNA z donorového, recipientního kmene a transduktantů byla izolována pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics) s drobnými modifikacemi (Kuntová et al., 2012). Pro qPCR byl používán přístroj značky Applied Biosystems ABI PRISM 7300. Všechny reakce byly připravovány v triplikátech v optických 96-jamkových destičkách MicroAmp®. Reakční směs byla připravována v objemu 25  $\mu$ l a obsahovala 12,5  $\mu$ l 2  $\times$  QuantiFast™ SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN), primery o koncentraci 300  $\mu$ M, 25 ng purifikované DNA z fágových částic v celkovém objemu 2,5  $\mu$ l. Standardní řada pro qPCR byla připravena desetinásobným ředěním celogenomové DNA donorového kmene (koncentrace od 10 ng do 0,1 pg). Pro určení počtu kopií genů rezistence lokalizovaných na plazmidech ve vzorcích fágové DNA bylo nezbytné stanovit počet kopií plazmidů (PCN – plasmid copy number) v donorových kmenech, jejichž DNA byla použita jako standardy pro qPCR (Lee et al., 2006).

## **Výsledky**

### Kvantifikace a detekce mobilních genetických elementů kmene *S. aureus* COL ve fágových částicích pomocí qPCR

V této studii jsme se zaměřili na detekci a kvantifikaci bakteriálních genů kmene *S. aureus* COL přímo ve fágových částicích prostřednictvím qPCR. Cílem bylo prokázat přítomnost různých bakteriálních genů kmene *S. aureus* COL, který ve svém genomu obsahuje řadu variabilních genetických elementů, přímo v částicích fágů a kvantifikovat frekvenci jejich zabalování. Pro důkaz přítomnosti bakteriální DNA ve fágových částicích a jejich kvantifikaci byla vyvinuta nová technika, která umožnila sledovat frekvenci zabalování plazmidů a chromozomových genů. Hlavním cílem bylo potvrdit schopnost fágů sbalovat do kapsidu vybrané geny pro virulenci a antibiotickou rezistenci lokalizované na různých částech genomu jako předpoklad pro jejich potenciální přenos transdukci. Neparametrickou statistickou analýzou bylo prokázáno, že transdukující bakteriofágy sérologické skupiny B  $\phi$ 11,  $\phi$ 80 a  $\phi$ 80 $\alpha$  na rozdíl od bakteriofága  $\phi$ 81 sérologické skupiny A účinně sbalují vybrané chromozomové geny lokalizované ve 4 různých lokusech chromozomu a dále geny nesené na variabilních elementech *SCCmec*, stafylokokovém ostrově patogenity SaPI1, genomických ostrovech *vSa $\alpha$*  a *vSa $\beta$*  a plazmidech s různou frekvencí.

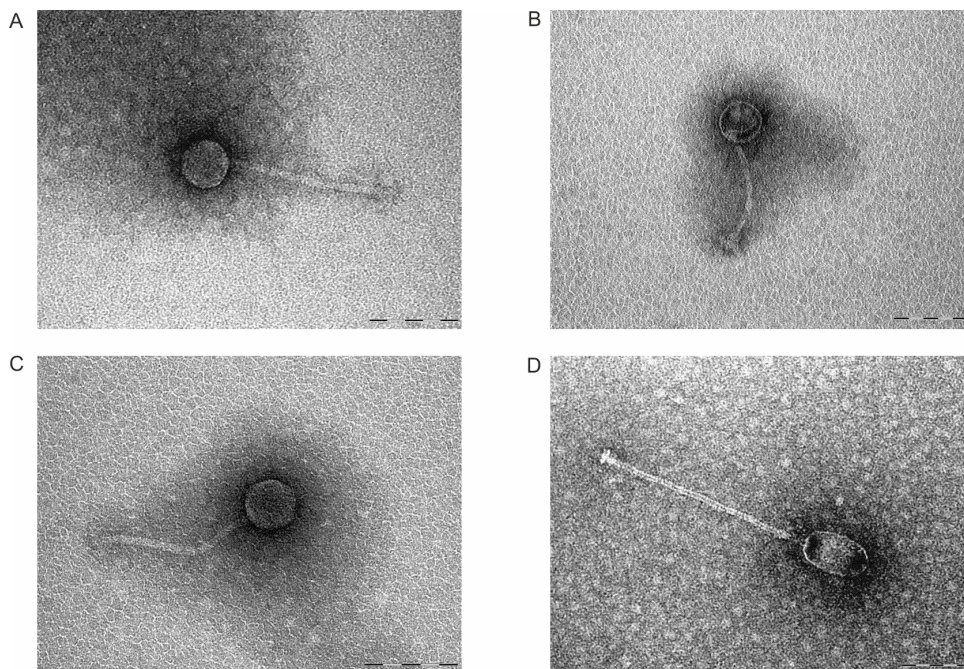
Před vlastní detekcí a kvantifikací bakteriálních genů ve fágových částicích bylo nezbytné ověřit homogenitu a čistotu fágových lyzátů a vyloučit přítomnost exogenní bakteriální DNA u jednotlivých vzorků. K tomuto účelu byla vyvinuta vhodná metodika (obr. 1). K fágovým lyzátům byla přidána kontrolní bakteriální DNA druhu *B. animalis* subsp. *lactis*. Minimální detekční koncentrace kontrolní DNA pro rodově specifickou DNA je 0,005 ng/ $\mu$ l. Ke každému vzorku fágového lyzátu byl přidáván 100 násobek této koncentrace a přítomnost kontrolní DNA byla ověřena pomocí PCR



**Obrázek 1:** Schéma extrakce fágové DNA

a qPCR. Následovala purifikace fágových lyzátů v gradientu CsCl a dialýza jednotlivých vzorků proti fágovému pufru. Elektronová mikroskopie (obr. 2) vyloučila přítomnost bakteriálních buněk, organel a ověřila homogenitu jednotlivých vzorků. QPCR byla použita pro důkaz sbalování různých bakteriálních genů kmene *S. aureus* COL bakteriofágy sérologické skupiny B. Tato metoda také umožnila přesnou kvantifikaci bakteriálních genů uvnitř virionů. Zaměřili jsme se na sledování mobilních genetických elementů včetně genů ovlivňujících virulenci a rezistenci k antimikrobiálním látkám. Sledované geny byly rozděleny do skupin na základě lokalizace na bakteriálním genomu: (1) plasmidové geny kódující tetracyklinový efluxní systém (*tetK*) a gen pro  $\beta$ -laktamázu (*blaZ*), (2) geny lokalizované na SCC*mec* elementu, včetně genu pro penicilin vázající protein (PBP2) a pro rekombinázu typu I (*ccrA*), (3) geny lokalizované na stafylokokovém ostrově patogenity (SaPI), gen pro integrázu (*Sa1int*) a gen pro stafylokokový enterotoxin B (*seb*), (4) stafylokokový gen pro enterotoxin (*set*) lokalizovaný na genomickém ostrově vSa a geny pro leukocidiny (*lukE-lukD*), (5) geny lokalizované na „core“ genomu – gen pro termonukleázu (*nuc*), gen pro serin V8 proteázu (*sspA*), gen pro putativní O-metyltransferázu lokalizovanou na konzervativním fragmentu Sa2052 (Štěpán et al., 2001) a gen pro koagulační faktor (clumping factor – *clfB*). U jednotlivých vzorků fágové DNA byl nejprve stanoven počet netransdukujících částic pomocí kvantifikace fágových konzervativních genů. Jako kontrolní vzorek byla použita DNA bakteriofága  $\phi 81$  patřící do sérologické skupiny A, která se nevyznačuje transdukčními schopnostmi (Dowell a Rosenblum, 1962). Počet virionů schopných infekce u fága  $\phi 81$  byl stanoven na základě amplifikace konzervativní oblasti pro sérologickou skupinu A. Jako standard pro kvantifikaci byla použita DNA fága  $\phi 81$ , který byl nejprve pomnožen na restriktivně deficientním a bezprofágovém kmeni RN4220. U bakteriofágů patřících do sérologické skupiny B ( $\phi 80$ ,  $\phi 80\alpha$  a  $\phi 11$ ) byla provedena amplifikace konzervativní oblasti jejich genomů. Standardem pro kvantifikaci byla ředící řada plasmidové DNA vektoru pUC18 s naklonovaným fragmentem DNA o velikosti 4867 bp (GenBank: AF513856), který zahrnuje oblast genomu bakteriofága  $\phi 53$  charakteristickou pro sérologickou skupinu B a 7716 bp fragment konzervativní sekvence DNA bakteriofága 3A společný pro fágy ze séro-

skupiny A (GenBank: AF513855) byl použit jako standard v případě bakteriofága  $\phi 81$  (Doškař et al., 2000).



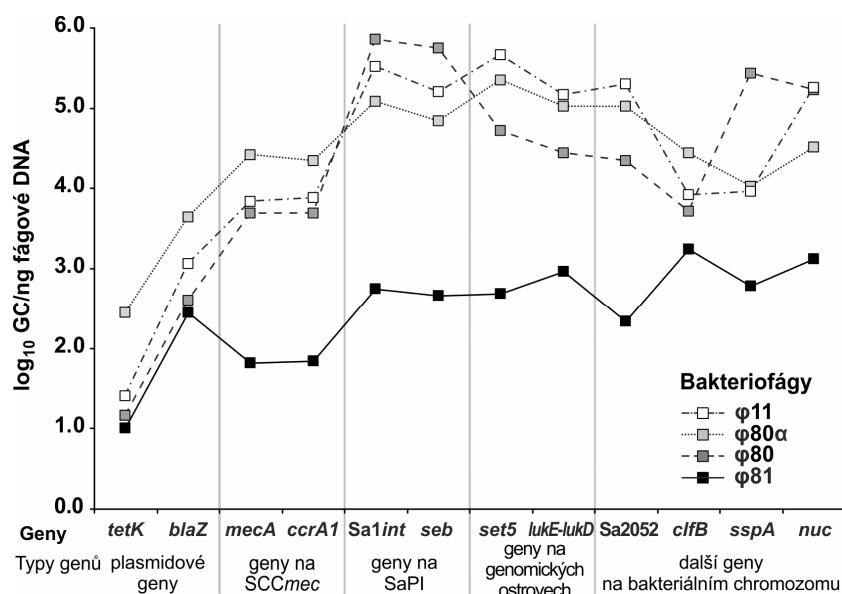
**Obrázek 2:** Transmisní elektronová mikroskopie bakteriofágů  $\phi 11$ ,  $\phi 80$ ,  $\phi 80\alpha$  a  $\phi 81$  propagovaných na donorovém kmeni *S. aureus* COL. (A)  $\phi 11$  (zvětšení 180 000 $\times$ ), (B)  $\phi 80$  (zvětšení 140 000 $\times$ ), (C)  $\phi 80\alpha$  (zvětšení 180 000 $\times$ ), (D)  $\phi 81$  (zvětšení 140 000 $\times$ ). Viriony byly negativně barveny 2% molybdenanem amonným  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ . Měřítka 100 nm.

Zjištěné absolutní hodnoty odpovídají molárnímu počtu kopií ve 25 ng fágové DNA. Tyto absolutní hodnoty byly přepočítány na 1 ng fágové DNA a transformovány pomocí  $\log_{10}$ . Tento přepočet byl použit pro všechny později kvantifikované geny a všechny analyzované vzorky fágové DNA, což umožňuje jejich vzájemné statistické srovnání. U všech sledovaných fágových vzorků byl vypočítán poměr mezi počtem kopií sledovaného bakteriálního genu v 1 ng fágové DNA (GC/ng) a počtem infekčních částic, který byl odvozen z GC/ng fágových konzervativních genů, které jsou popsány výše. Z vypočítaných poměrů je patrný rozdíl mezi transdukujícími bakteriofágy sérologické skupiny B, kdy tyto bakteriofágy obsahují bakteriální geny vzhledem k počtu infekčních částic s několikanásobně vyšší frekvencí než bakteriofág  $\phi 81$  patřící do sérologické skupiny A. I když plazmidové geny rezistence byly ve všech fágových vzorcích kvantifikovány v přibližně stejném počtu kopií (GC/ng), výsledný poměr mezi transdukujícími viriony a počtem infekčních částic byl v případě bakteriofága  $\phi 81$  nižší než u fágů séroskupiny B.

Počty kopií fágového konzervativního genu u bakteriofágů  $\phi 80\alpha$ ,  $\phi 11$  a  $\phi 80$  jsme porovnali s počtem infekčních částic bakteriofága  $\phi 81$ . Kvantita infekčních částic ve vzorku fága  $\phi 81$  je o 2 řády vyšší než u ostatních vzorků fágové DNA, které mají schopnost transdukce. V 1 ng DNA bakteriofága  $\phi 81$  se nachází přibližně  $10^9$  infekčních částic. U bakteriofága  $\phi 80$  bylo kvantifikováno  $10^7$  infekčních částic v 1 ng DNA. Stejný počet infekčních částic byl kvantifikován také v 1 ng DNA bakteriofágů  $\phi 80\alpha$  a  $\phi 11$ .

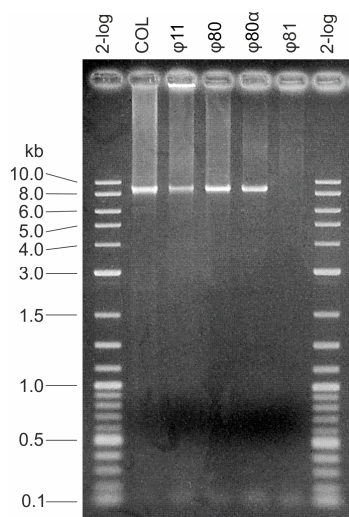
Celkový přehled kvantifikace všech sledovaných bakteriálních genů u 4 různých fágových vzorků je uveden na obr. 3, kde jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými





**Obrázek 3:** Kvantifikace bakteriální DNA ve fágových vzorcích propagovaných na donorovém kmeni *Staphylococcus aureus* COL (průměrné hodnoty tří měření transformované jako  $\log_{10}$  kopií bakteriálních genů v 1 ng fágové DNA).

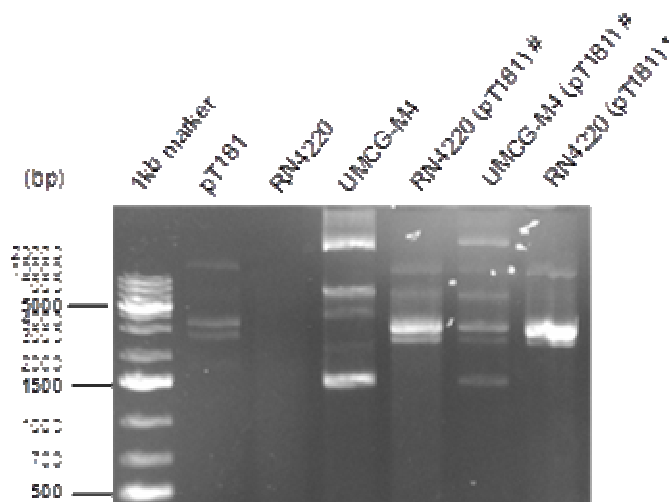
fágovými vzorky a skupinami monitorovaných bakteriálních genů. Počet kopií bakteriálních genů na 1 ng fágové DNA (GC/ng) bylo v rozmezí  $1,05 \times 10^2$  pro plasmidový gen rezistence *tetK* do  $3,86 \times 10^5$  pro gen kódující integrázu lokalizovaný na SaPI1. Z výsledků je patrný rozdíl ve sbalování bakteriální DNA mezi fágy  $\phi 80$ ,  $\phi 80\alpha$ ,  $\phi 11$  sérologické skupiny B a bakteriofágem  $\phi 81$  patřícím do sérologické skupiny A. Novým a stěžejním výsledkem byl důkaz přítomnosti genů nesených elementem SCCmec a kvantifikace těchto genů ve fágových částicích. Ačkoli horizontální přenos SCCmec se předpokládá, důkaz o přenosu kazety a mechanismus přenosu nebyl doposud popsán. Oba geny *mecA* a *ccrA1* byly detekovány ve fágových částicích séroskupiny B ve významně vyšším počtu kopií (od  $4,9 \times 10^3$  GC/ng pro fága  $\phi 80$  do  $2,6 \times 10^4$  GC/ng pro fága  $\phi 80\alpha$ ) než v případě netransdukcijního fága  $\phi 81$  ( $7 \times 10^1$  GC/ng). Srovnatelná kvantita dvou monitorovaných genů naznačuje možnost sbalování souvislých delších fragmentů tohoto MGE do virionů. Toto pozorování bylo podpořeno a ověřeno výsledkem „long“ PCR, kdy jsme ve vzorcích bakteriofágů sérologické skupiny B detekovali 8,7 kb oblast ohraničenou geny *mecA* a *ccrA1* (obr. 4).



**Obrázek 4:** Detekce 8,7 kb dlouhého regionu SCCmec ohraničeného geny *mecA* a *ccrA1* ve fágových částicích  $\phi 11$ ,  $\phi 80$ ,  $\phi 80\alpha$  a  $\phi 81$ . Jako pozitivní kontrola byla použita DNA donorového kmene *Staphylococcus aureus* COL. Jako hmotnostní standard byl použit 2-Log Ladder (New England Biolabs).

### Detekce stafylokokové chromozomové kazety mec typu V u Staphylococcus aureus ST398

Cílem této části bylo ověřit schopnost fágů sbalovat části SCCmec v přirozeném systému. Jako donorový kmen byl vybrán meticilin-rezistentní *S. aureus* UMCG-M4 zařazený do sekvenčního typu ST398. Sekvenování genomu tohoto kmene prokázala přítomnost 4 profágů patřících do sérologických skupin A, B a Fa s možným transdukčním potenciálem. Do kmene UMCG-M4 byl úspěšně elektroporací přenesen plazmid pT181, který byl následně přenesen transdukací do recipientního kmene RN4220 (obr. 5). Jako transdukující fágy byl použit fágový lyzát připravený indukci profágů UV zářením z kmene UMCG:M4. Výsledky naznačují možnost přenosu elementu SCCmec mezi kmeny patřícími do sekvenčního typu ST398 prostřednictvím přirozeně se vyskytujících bakteriofágů ve formě profágů u těchto klinických kmenů.



**Obrázek 5:** Analýza plazmidové DNA u derivátů kmenů připravených elektroporací a transdukci. pT181 – tetracyklinový plazmid, RN4220 – bezplazmidový recipientní kmen, neg. kontrola, UMCG-M4 – plazmidová DNA z kmene UMCG-M4, RN4220 (pT181)<sup>#</sup> – plazmid pT181 přenesený do kmene elektroporací, UMCG-M4 (pT181)<sup>#</sup> - plazmid pT181 přenesený do kmene elektroporací, RN4220 (pT181)<sup>\*</sup> - plazmid pT181 přenesený do kmene transdukci.

### Přenos plazmidů zodpovědných za rezistenci k antibiotikům transdukci v rámci kmenů patřících do klonu Staphylococcus aureus USA300

Dalším výsledkem studie byla kvantifikace plazmidů v transdukujících fágových částicích pomnožených na kmenech klonu USA300, kdy byla sledována vyšší frekvence přenosu plazmidů v rámci stejné klonální linie podobně jako u kmenů z klonální linie ST398. Komunitní klon *Staphylococcus aureus* USA300 rezistentní k meticilinu je hlavním zdrojem kožních infekcí a zahrnuje kmeny s obsahem různých genů rezistence. V této práci jsme se zaměřili na důkaz transdukce penicilinázového a tetracyklinového plazmidu bakteriofágy  $\phi 80\alpha$  a  $\phi JB$  mezi různými klinickými izoláty, které patří do klonu USA300. Prokázali jsme, že přirozeně se vyskytující profágy mohou být mediátorem HGT po indukci UV zářením. Vysoká frekvence transdukce ( $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  CFU/PFU) byla pozorována jak v případě bakteriofágů propagovaných na donorovém kmeni, tak v případě profágů indukovaných z donorového kmene UV zářením. Kvantitativní „real-time“ PCR jsme detekovali penicilinázový plazmid ve fágových částicích a určili poměr mezi transdukujícími bakteriofágy a počtem infekčních částic (poměr byl přibližně 1:1700). Úspěšný přenos plazmidů mezi kmeny klonu

USA300 prostřednictvím bakteriofágů ukazuje, že transdukce je efektivním mechanismem šíření plazmidů v rámci klonu USA300. Naše výsledky potvrzují, že transdukce je významným nástrojem v evoluci nových multirezistentních kmenů tohoto klonu.

### Charakterizace a distribuce plazmidů v MRSA kmenech patřících do různých klonálních linií

Charakterizovali jsme obsah plazmidů u kmenů MRSA izolovaných v patnácti českých nemocnicích v rozmezí let 2000 - 2008. Výsledky ukazují, že určité typy plazmidů se vyskytují s vyšší frekvencí ve specifických klonálních liniích, a naopak některé plazmidy byly detekovány u různých klonů. Plazmidová DNA byla detekována u 65 (89 %) kmenů, u 33 z nich obsahovaly kmeny více než jeden plazmidový typ. Bylo identifikováno celkem 24 různých typů plazmidů v rozmezí velikosti 1,3 až 55 kb. Pro jejich bližší charakterizaci byla využita restrikně-endonukleázová analýza, eliminace plazmidů, DNA hybridizace a sekvenování. Bylo zjištěno, že konjugativní plazmid kódující gen pro rezistenci k erytromycinu a gen pro enterotoxin D je nesen kmeny z různých CCs. Na druhou stranu plazmidy kódující geny pro rezistenci k chloramfenikolu a tetracyklinu, většina penicilinázových plazmidů a kryptických plazmidů byla detekována pouze v jednom CCs. Především plazmidy pUSA300-like byly nalezeny pouze u kmenů patřících do klonu USA300. Velká diverzita obsahu plazmidů detekovaných v této studii naznačuje, že plazmidy hrají důležitou roli v evoluci kmenů MRSA a mohou být přenášeny s vyšší frekvencí prostřednictvím HGT uvnitř klonálních linií.

### **Diskuse**

Bakteriofágy jsou nejvíce abundantními objekty v biosféře a hrají významnou úlohu v evoluci a adaptaci jejich hostitelů na prostředí. Z analýzy kompletních bakteriálních genomů vyplývá, že profágy mohou představovat 10 - 20 % bakteriálního genomu (Casjens, 2003). Současně se předpokládá, že bakteriofágy jsou významným mediátorem horizontálního přenosu genů prostřednictvím obecné a specializované transdukce a kromě vnitrodruhových transdukcí byly popsány i mezidruhové a mezirodové přenosy (Maiques et al., 2007). U druhu *S. aureus* je častým jevem integrace fágové DNA do bakteriálního chromozomu ve formě profágů. Mnoho kmenů obsahuje ve svém genomu jeden a více profágů, které tak představují potenciál pro HGT prostřednictvím transdukce během jejich indukce (Varga et al., 2012). Přestože transdukce u stafylokoků byla popsána jako jeden z mechanismů HGT a byla využívána pro studium přenosu determinant rezistence a při modifikacích genomu, přesná představa o sbalování různých bakteriálních elementů nebyla popsána a frekvence, s jakou jsou tyto elementy sbalovány do fágových virionů, nebyla dosud publikována. V této práci jsme se zaměřili na objasnění frekvence sbalování různých typů bakteriálních genů různými bakteriofágy u kmenů *S. aureus* rezistentních k metilicilinu. Stěžejním bodem práce byl vývoj vhodné metody umožňující detekci bakteriálních genů přímo ve fágových virionech.

V první části experimentů byly tři různé fágy serologické skupiny B srovnávány v kvantifikačních experimentech s fágem  $\phi 81$ , který byl na základě velmi nízké frekvence transdukce zařazen mezi fágy, které nemají schopnost obecné transdukce, podobně jako jiné fágy patřící do jiných sérologických skupin než B (Dowell, 1962). Přestože je tento fág považován za netransdukující, ve vzorcích DNA z fágových

částic jsme detekovali všechny sledované typy bakteriálních genů. Počet kopií genu specifického pro fágy séroskupiny A indikující počet infekčních částic byl přibližně o dva řády vyšší než počet kopií genu specifického pro fágy séroskupiny B u transdukujících fágů  $\phi 11$ ,  $\phi 80$  a  $\phi 80\alpha$ . Také počet většiny bakteriálních genů detekovaných uvnitř kapsidů fága  $\phi 81$  byl významně nižší než u transdukujících fágů. Výjimkou jsou počty kopií plazmidových genů rezistence (*tetK* a *blaZ*), které se výrazně nelišily mezi sledovanými fágovými vzorky, avšak poměr mezi těmito geny a fágovým konzervativním genem pro fága  $\phi 81$  byl v rámci sledovaných vzorků o dva až tři řády nižší pro gen *tetK* a o tři až čtyři řády nižší v případě genu *blaZ* než poměr mezi výše zmíněnými geny a fágovým konzervativním genem pro fágy séroskupiny B. Bakteriofág  $\phi 81$  tedy sbaluje do svého kapsidu bakteriální geny, ale transdukcce je méně pravděpodobná než u bakteriofágů séroskupiny B v důsledku nízké proporce transdukujících virionů ve fágovém lyzátu, což bylo potvrzeno transdukčními experimenty. Z transdukčních a kvantifikačních experimentů byla stanovena efektivita transdukcce penicilinázového plazmidu. U pT181 nebylo možné efektivitu transdukcce stanovit, vzhledem k tomu, že se předpokládá jeho sbalování ve formě konkatemerů (Novick et al., 1986), což neumožňuje stanovit přesný počet transdukujících virionů.

U dalších bakteriálních genů byla provedena kvantifikace bez transdukčních experimentů z důvodu obtížné selekce. Nejvyšší počet kopií (GC/ng) fágové DNA byl získán v případě genů lokalizovaných na SaPI a na genomických ostrovech. Ze stanovených poměrů mezi sledovanými bakteriálními geny a konzervativním fágovým genem vyplývá, že každá stá až tisíce částice bakteriofágů séroskupiny B sbaluje geny lokalizované na SaPI. Zároveň usuzujeme, že geny lokalizované na SaPI nebo genomických ostrovech *vSa $\alpha$*  a *vSa $\beta$*  jsou sbalovány do virionů společně, vzhledem k téměř shodným detekovaným GC/ng (obr. 3). Vysoká pravděpodobnost sbalování těchto genů koresponduje s dříve popsanou specializovanou transdukci SaPI (Chen a Novick, 2009). Také vysoké hodnoty GC/ng v případě genů na genomických ostrovech *vSa $\alpha$*  a *vSa $\beta$*  naznačují, že se takto lokalizované geny sbalují s vysokou frekvencí. Příčinou vysoké frekvence sbalování genů lokalizovaných na SaPI a genomických ostrovech může být společný evoluční původ s bakteriofágy. Částečná homologie SaPI k fágové DNA byla identifikována u 46-bp regulační sekvence vyskytující se u všech stafylokokových fágů; geny pro integrázu, nekódující regiony; a několik genů vyskytujících se u SaPI3 předpokládá společný fágový původ tohoto elementu (Yarwood et al., 2002). Novick et al. (1986) pozorovali až  $10^5$  násobné zvýšení transdukční frekvence plazmidů, do nichž byl naklonován fragment fága  $\phi 11$ , což podporuje hypotézu, že sekvence fágového původu jsou sbalovány s vyšší frekvencí než jiné oblasti genomu. Na druhé straně, přesný evoluční původ genomických ostrovů *vSa $\alpha$*  a *vSa $\beta$*  není známý. Jejich integrace do chromozomu může být evolučně velmi vzdálená a tento mobilní genetický element v průběhu evoluce ztratil mechanismus, který umožňoval jeho přenos (Hiramatsu et al., 2004).

Další skupinou sledovaných genů byly geny *mecA* a *ccrA1*, lokalizované na stafylokokové chromozomové kazetě *mec*. *SCCmec* je mobilní element v rozmezí velikosti od 21 kb do více než 64 kb, integrující se místně-specificky do bakteriálního chromozomu. Ačkoli mechanismus excize a integrace *SCCmec* do bakteriálního chromozomu byl popsán (Wang a Archer, 2010), přesný způsob přenosu tohoto elementu do bakteriálních buněk není známý a v úvahu přichází jak konjugace, tak transdukcce jako funkční mechanismy HGT u druhu *S. aureus*. Předpokládá se, že především elementy s velikostí menší než 45 kb, jako je např. *SCCmec* element typu I nebo typu IV, může být přenášen prostřednictvím obecné transdukcce. Naše výsledky potvrzují, že geny lokalizované na elementu *SCCmec* mohou být efektivně sbalo-

vány bakteriofágy  $\phi 11$ ,  $\phi 80$  a  $\phi 80\alpha$  a s velmi nízkou frekvencí také bakteriofágem  $\phi 81$ . Ze stanovených poměrů mezi sledovanými geny na elementu *SCCmec* a konzervativním fágovým genem vyplývá, že každá  $10^4$  ( $\phi 11$ ,  $\phi 80$  a  $\phi 80\alpha$ ) až  $10^8$  ( $\phi 81$ ) částice bakteriofágů sbaluje části *SCCmec*. Kvantifikace genů *mecA* a *ccrA1* umožnila stanovit rozdíly v kvantitě sledovaných genů u jednotlivých fágových vzorků. Zjistili jsme, že frekvence sledovaných genů v rámci jednoho vzorku jsou téměř totožné. Tento výsledek podporuje hypotézu, že bakteriofágy mohou sbalovat delší úseky *SCCmec* elementu, což souhlasí rovněž s výsledky long PCR (obr. 4). Ačkoli HGT zprostředkovaný bakteriofágy závisí na citlivosti recipientních kmenů k fágům, ukazuje se, že geny *SCCmec* mohou být přenášeny také mezidruhově, což potvrzuje výskyt sekvenčních homologů genů *mecA* a *ccr* u *S. aureus* a koaguláza-negativních stafylokoků (Bloemendaal et al., 2010; Hanssen et al., 2004).

Další část práce byla zaměřena na HGT zprostředkovaný bakteriofágy, které se vyskytují u klinických kmenů ve formě profágů. Kmen UMCG-M4 sekvenčního typu ST398 obsahuje ve svém genomu 4 profágy. První výsledky ukazují, že některé bakteriofágy indukované UV zářením z kmene UMCG-M4 mají transdukční potenciál, což dokazují úspěšně provedené transdukce plazmidu pT181. Protože v současné době není znám přesný mechanismus sbalování bakteriálních genů, je obtížné stanovit na základě dostupných sekvenčních dat, který z profágů je transdukující. Obecně se předpokládá, že bakteriální DNA je sbalována na základě specifity fágových sbalovacích proteinů k *pac* nebo *pseudopac* sekvencím kódovaných na bakteriálním chromozomu (Wirtz et al., 2010). *SCCmec* element typu V (5C2&5) u kmene UMCG-M4 byl popsán u kmenů *S. aureus* patřících do sekvenčního typu ST398 (Chlebowitz et al., 2010). Sekvenční analýzy naznačují, že tento typ kazety je přítomen i u dalších stafylokokových druhů jako *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis* a *S. haemolyticus* (Ruppe et al., 2009), což naznačuje možnost horizontálního přenosu tohoto elementu. První analýzy fágové DNA bakteriofága  $\phi 53$  prostřednictvím „long“ PCR naznačují přítomnost velkých částí tohoto elementu *SCCmec* ve virionech. Předmětem dalšího zkoumání bude kvantifikace částí *SCCmec* elementu ve fágových částicích získaných UV indukci z kmene UMCG-M4::pT181.

## Poděkování

Práce vznikla s finanční podporou grantu Grantové agentury ČR 310/09/0459, grantu IGA NT12395-5/2011, a grantu MŠMT MSM 0021622415.

## Literatura

- Bloemendaal A.L., Brouwer E.C., Fluit A.C. (2010) Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *PLoS One* 5: e11841.
- Casjens S. (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* 49: 277-300.
- Doškař J., Pallová P., Pantůček R., Rosypal S., Růžičková V., Pantůčková P., Kailerová J., Klepárník K., Malá Z., Boček P. (2000) Genomic relatedness of *Staphylococcus aureus* phages of the International Typing Set and detection of serogroup A, B, and F prophages in lysogenic strains. *Can J Microbiol* 46: 1066-1076.

Dowell C.E., Rosenblum E.D. (1962) Serology and Transduction in Staphylococcal Phage. *J Bacteriol* 84: 1071-1075.

Gotz F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43: 1367-1378.

Hanssen A.M., Kjeldsen G., Sollid J.U. (2004) Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother* 48: 285-296.

Hiramatsu K., Watanabe S., Takeuchi F., Ito T., Baba T. (2004) Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 22 (Suppl 1): S5-8.

Chen J., Novick R.P. (2009) Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science* 323: 139-141.

Chlebowicz M.A., Nganou K., Kozytska S., Arends J.P., Engelmann S., Grundmann H., Ohlsen K., van Dijk J.M., Buist G. (2010) Recombination between *ccrC* genes in a type V (5C2&5) staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) of *Staphylococcus aureus* ST398 leads to conversion from methicillin resistance to methicillin susceptibility in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 783-791.

Chlebowicz M.A., Mašlaňová I., Kuntová L., Holden M., Bentley S., Grundmann H., Pantůček R., Doškař J., van Dijk J.M., Buist G. (2012) The Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type V from *Staphylococcus aureus* ST398 is packaged into bacteriophages. *Manuscript in preparation*. Kahánková J., Pantůček R., Goerke C., Růžičková V., Holočová P., Doškař J. (2010) Multilocus PCR typing strategy for differentiation of *Staphylococcus aureus* siphoviruses reflecting their modular genome structure. *Environ Microbiol* 12: 2527-2538.

Kuntová L., Pantůček R., Rájová J., Růžičková V., Petráš P., Mašlaňová I., Doškař J. (2012) Characteristics and distribution of plasmids in a clonally diverse set of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Arch Microbiol* 194: 607-614.

Lee C.L., Ow D.S., Oh S.K. (2006) Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J Microbiol Methods* 65: 258-267.

Lindsay J.A., Holden M.T. (2004) *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol* 12: 378-385.

Maiques E., Ubeda C., Tormo M.A., Ferrer M.D., Lasa I., Novick R.P., Penades J.R. (2007) Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *J Bacteriol* 189: 5608-5616.

Mašlaňová I., Doškař J., Varga M., Kuntová L., Mužík J., Malúšková D., Růžičková V., Pantůček R. (2013) Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCC*mec* with different frequencies. *Environmental Microbiology Reports* 5: 66-73.

Novick R.P., Edelman I., Lofdahl S. (1986) Small *Staphylococcus aureus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *J Mol Biol* 192: 209-220.

Ruppe E., Barbier F., Mesli Y., Maiga A., Cojocar R., Benkhalfat M., Benchouk S., Hassaine H., Maiga I., Diallo A., Koumare A.K., Ouattara K., Soumare S., Dufourcq J.B., Nareth C., Sarthou J.L., Andremont A., Ruimy R. (2009) Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 442-449.

Štěpán J., Pantůček R., Růžičková V., Rosypal S., Hájek V., Doškař J. (2001) Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species

specific genomic 826 bp sequence derived from a common 44-kb *Sma* I restriction fragment. *Mol Cell Probes* 15: 249-257.

Varga M., Kuntová L., Pantůček R., Mašlaňová I., Růžičková V., Doškař J. (2012) Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol Lett* 332: 146-152.

Wang L., Archer G.L. (2010) Roles of CcrA and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome *mec*, a *Staphylococcus aureus* genomic island. *J Bacteriol* 192: 3204-3212.

Wirtz C., Witte W., Wolz C., Goerke C. (2010) Insertion of host DNA into PVL-encoding phages of the *Staphylococcus aureus* lineage ST80 by intra-chromosomal recombination. *Virology* 406: 322-327.

Yarwood J.M., McCormick J.K., Paustian M.L., Orwin P.M., Kapur V., Schlievert P.M. (2002) Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem* 277: 13138-13147.



**Mgr. Ivana Mašlaňová, Ph.D.** je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Svou doktorskou disertační práci (školitel Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.) obhájila v roce 2012.  
(E-mail: [106011@mail.muni.cz](mailto:106011@mail.muni.cz))

## Struktura a funkce plazmidů klinicky významných kmenů *Staphylococcus aureus*

Lucie Kuntová

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity,  
Kotlářská 2, 641 37 Brno

### Abstrakt

Mobilní genetické elementy (MGE) tvoří zásadní složku variabilní části bakteriálního genomu. U druhu *Staphylococcus aureus* se podílí na multirezistenci a virulenci kmenů a poskytují tak evoluční výhodu, která spolu s dalšími faktory vede k vytvoření vysoce klonálního charakteru populace *S. aureus*. Z hlediska přenosu genů rezistence k antimikrobiálním látkám jsou nejvýznamnějšími zástupci MGE plazmidy. Tato práce přináší ucelenou informaci o obsahu a charakteru plazmidů v populaci *S. aureus* v České republice. Reprezentativní soubor 73 kmenů byl získán z patnácti českých nemocnic v letech 2000-2008. Kombinací mikrobiologických a molekulárně biologických metod bylo zjištěno, že v analyzovaném souboru kmenů bylo 24 různých typů plazmidů o velikostech v rozmezí od 1,3 do 55 kb, přičemž 89 % kmenů obsahovalo jeden nebo více plazmidů. Obsah konkrétních typů plazmidů ve většině případů koreloval s příslušností kmene k určité klonální skupině (clonal cluster, CC), případně se plazmidy vyskytovaly u příbuzných klonů dle zásad variability restriktivně modifikačních (RM) systémů tak, jak je popsal Corvaglia a kol. (2010). Byla stanovena kompletní sekvence tří plazmidů pDLK1-3. Srovnávací analýza sekvencí plazmidů pDLK1 a pDLK2 v databázi GenBank ukázala, že tyto plazmidy existují v populaci *S. aureus* v téměř nezměněné podobě již desítky let, což svědčí o jejich strukturní a evoluční stabilitě. Naproti tomu plazmid pDLK3 byl kryptický, nesl geny pro několik replikačních proteinů a také analog *oriT* místa, které je zásadní pro iniciaci přenosu plazmidů. Jedná se tedy o plazmid s vysoce mozaikovitou strukturou, který pravděpodobně hraje roli v přenosu plazmidů. Dále byly v souboru zjištěny velké (>20 kb) penicilinázové plazmidy, malé plazmidy kódující rezistenci k erytromycinu, tetracyklinu nebo chloramfenikolu a řada malých kryptických plazmidů. Kromě genů kódujících rezistenci k antibiotikům, byl na jednom typu velkého plazmidu detekován gen pro enterotoxin D. V souboru kmenů epidemického klonu USA300 bylo prokázáno, že jedním z hlavních vektorů přenosu plazmidů jsou transdukující fágy, a to jak laboratorní, tak fágy přirozeně se vyskytující v kmenech. Metodou qPCR byla prokázána vysoká frekvence sbalování plazmidů do fágových částic  $10^5$  CFU/PFU. Rovněž bylo prokázáno, že geny rezistence nesené na plazmidech se transdukcí nejen přenesou do nové hostitelské buňky, ale je zachována i jejich exprese. Celkově práce přináší podrobnou informaci o výskytu, charakteru a přenosu plazmidů v české populaci *S. aureus*. Výsledky přispěly k bližšímu pochopení klonální struktury a evolučních vztahů mezi kmeny a mohou se stát podkladem pro vypracování systému kontroly šíření virulentních faktorů a genů rezistence k antimikrobiálním látkám, které významně zvyšují patogenitu těchto kmenů.

Informační listy GSGM, 2013, 41: 23 - 36



## Úvod

*Staphylococcus aureus* byl poprvé popsán a pojmenován roku 1884 F. Rosenbachem. Z klinického hlediska je významná jeho schopnost tvořit biofilm, afinita k pojivovým tkáním a schopnost tvořit abscesy. Tyto vlastnosti umožňují tomuto druhu lépe odolávat antibiotické terapii a rovněž významným způsobem ovlivňují horizontální přenos genů, a to jak v rámci druhu *S. aureus*, tak mezidruhově (Weigel et al., 2007; Cheng et al., 2011). *S. aureus* je mnohostranný patogen, a to jak humánní, tak zvířecí, který způsobuje infekce v rozsahu od relativně mírných zánětů kůže a měkkých tkání, až po život ohrožující sepse, nekrotizující pneumonie nebo syndrom toxického šoku a další toxikózy. Velkým problémem humánní medicíny jsou multirezistentní kmeny, a to zejména kmeny *S. aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA).

Za typický znak stafylokokové populace je považována existence klonů kmenů *S. aureus*. Robinson a Enright (2003) publikovali evoluční model vzniku pěti dominantních klonů nemocničních kmenů MRSA (CC5, CC8, CC22, CC30 a CC45), přičemž úspěch těchto typů CC jako vysoce patogenních kmenů je do jisté míry ovlivňován i jejich schopností přijímat mobilní genetické elementy (MGE) včetně plazmidů (Shearer et al., 2011). Genom *S. aureus* se skládá z konzervativní části (core genome, ~75 %), variabilní složky (core variable genome, ~10 %) a MGE jako jsou plazmidy, bakteriofágy, transpozony a ostrovy patogenity, které tvoří přibližně 15 % genomu (Lindsay et al., 2006b). Uvádí se, že většina otevřených čtecích rámců (ORF), ve kterých se jednotlivé kmeny mezi sebou liší, jsou součástí MGE (Ito et al., 1999).

Plazmidy, které jsou předmětem studia předkládané práce, jsou autonomně se replikující extrachromozomální elementy tvořené kružnicovou DNA o velikosti od 1,3 kbp po několik desítek kbp. Kromě genů zajišťujících jejich vlastní replikaci a u některých typů plazmidů také mobilitu, obsahují dále geny kódující faktory virulence a rezistence k antimikrobiálním látkám. Klasická klasifikace plazmidů na základě velikosti a způsobu replikace rozlišuje tři skupiny stafylokokových plazmidů a do čtvrté třídy jsou řazeny plazmidy, které svými charakteristikami nepatří do prvních tří skupin (Mlynarczyk et al., 1998; Novick, 1989). **(I)** Do první skupiny se řadí malé (1,3-4,6 kbp), vysokokopiové (10-55 kopií na buňku) plazmidy, které se zpravidla replikují mechanismem otáčivé kružnice (RCR). Iniclace RCR je zajištěna replikačním proteinem kódovaným plazmidovým genem *rep*, který specificky štěpí plazmidovou DNA a dochází k rozvolnění DNA v oblasti dvouřetězcového počátku replikace (*dso*). Dochází k syntéze dvouřetězcové DNA a zároveň je vytlačován jeden řetězec, který posléze slouží jako templát pro syntézu druhého dvouřetězce. Pro druhou syntézu je esenciální přítomnost tzv. jednořetězcového počátku replikace (*ssso*). Z hlediska přítomnosti dalších - neesenciálních - genů jde většinou o plazmidy kryptické nebo nesou jeden, vzácně dva geny pro rezistenci k antibiotikům. Tato skupina obsahuje čtyři rodiny plazmidů pojmenované podle prototypového plazmidu dané rodiny pT181, pC194, pSN2 a pE194. Plazmidy skupiny I jsou často součástí jiných MGE včetně *SCCmec* kazety. Jejich přenos se děje nejčastěji transdukcí (Ubelaker a Rosenblum, 1978) nebo mobilizací (Projan et al., 1989). **(II)** Druhou skupinu tvoří velké (15-46 kbp), nízkokopiové (4-6 kopií na buňku) plazmidy, které zpravidla využívají theta mechanismus replikace. Při theta mechanismu probíhá replikace po rozvolnění DNA v místě počátku replikace oběma směry až do vytvoření dvou výsledných plazmidů, které jsou od sebe na závěr odštěpeny. Tyto plazmidy zpravidla obsahují několik genů kódujících rezistenci k antibiotikům a genům virulence. Do skupiny je

řazena většina penicilinázových plazmidů (čtyři rodiny  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ ) (Mlynarczyk et al., 1998), pSK1 rodina aminoglykozid-trimetoprim rezistentních plazmidů a další dále neklasifikované plazmidy. Často jsou do nich integrovány další MGE (plazmidy z první skupiny, transpozony, inzerční sekvence) a jejich přeskupováním pak vznikají další varianty plazmidů druhé skupiny (Thomas et al., 1989). Tyto plazmidy se pravděpodobně převážně přenáší transdukujícími bakteriofágy (Smillie et al., 2010; Shearer et al., 2011). (III) Třetí skupina je zastoupena plazmidy konjugativními, které dosahují velikosti až 60 kb. Jejich základní charakteristika se neliší od skupiny II, až na přítomnost tzv. *tra* oblasti, která obsahuje geny esenciální pro vlastní konjugaci. Konjugativní plazmidy umožňují rovněž mobilizaci plazmidů, které mohou vytvářet relaxační komplexy. Tyto multiproteinové komplexy jsou kódovány geny operonu *mob* kódující relaxázy MobA, MobB a obsahují rozpoznávací místo MobS. K mobilizaci dochází se stokrát vyšší frekvencí než k přenosu konjugativního plazmidu (Novick, 1991). Tento typ plazmidů však není u *S. aureus* příliš častý. Shearer et al., (2011) ve své práci uvádí, že v databázi NCBI Ref Seq je uvedeno 195 kompletních sekvencí stafylokokových plazmidů, z nichž 45 % bylo větších než 20 kb a 22 % bylo větších než 30 kb a tedy dostatečně velkých na to, aby kódovaly konjugativní aparát a celkově jen 6 % obsahuje tzv. oblast *tra* nutnou pro konjugativní přenos. Obsah plazmidů kmenů *S. aureus* je velmi variabilní, což bylo potvrzeno i daty ze sekvenčních projektů, ze kterých vyplývá, že některé kmeny neobsahují žádný plazmid, zatímco jiné mají až tři plazmidy. Je známo, že obsah plazmidů je ovlivňován řadou procesů probíhajících v rámci hostitelské buňky samotné, jako je především inkompatibilita a přítomnost restriktivně modifikačních (RM) systémů a s tím související příslušnost k určité klonální skupině. Kmeny s defektivním RM systémem získávají MGE s vyšší frekvencí, a tím u nich dochází k akumulaci faktorů virulence a genů rezistence k antimikrobiálním látkám a mají tak větší potenciál stát se tzv. superbakterií (z angl. superbug) (Corvaglia et al., 2010; Sung a Lindsay, 2007; Waldron a Lindsay, 2006). Značný vliv má také prostředí, ve kterém se daná bakteriální buňka vyskytuje.

Horizontální přenos genů je u stafylokoků nejčastěji zprostředkován bakteriofágy. Tuto schopnost mají fágy *S. aureus* serologické skupiny B a některé fágy ze skupiny F. Za prototyp transdukujícího fága je považován temperovaný fág 11 ( $\phi$ 11) serologické skupiny B, který je schopen zabalovat plazmidovou nebo chromozomální DNA až do velikosti svého genomu, tj. 45 kbp. Přenos molekul plazmidové DNA a tím i genů na nich nesených je zajišťován také mechanismy nevyužívajících přítomnost transdukujících bakteriofágů, a to konjugací a mobilizací. Stafylokokové konjugativní plazmidy jsou charakterizovány přítomností oblasti *tra* skládající se z několika transkripčních jednotek, která je zodpovědná za vlastní přenos plazmidu. Kromě vlastního přenosu řídí konjugativní plazmidy *S. aureus* také mobilizaci dalších plazmidů, a to takových, které nesou rozpoznávací místo MobS a mohou vytvářet relaxační komplexy. K mobilizaci dochází se stokrát vyšší frekvencí než k přenosu konjugativního plazmidu (Novick, 1991). Přenos je možný jak mezi jednotlivými kmeny daného druhu, tak i mezidruhově. Mezidruhový přenos plazmidů *S. aureus* je často spojen s konjugativními plazmidy streptokoků a enterokoků, které vykazují široké rozmezí hostitelů. Přednostně však k výměně genetického materiálu dochází v rámci druhu a u *S. aureus* dokonce v rámci jednotlivých linií (Lindsay, 2008).

Závěrem lze tedy konstatovat, že MGE jsou významnou součástí variabilní části bakteriálního genomu, a to především jako vektory přenosu genů rezistence k antimikrobiálním látkám a genů virulence. U druhu *Staphylococcus aureus* se podílí na multirezistenci a zvýšené virulenci kmenů tohoto závažného humánního a veteri-

nárního patogena a také se spolupodílí na vysoké klonalitě stafylokokové populace. Z hlediska přenosu genů rezistence k antibiotikům jsou nejdůležitější plazmidy, jakožto autonomně se replikující MGE. Většina plazmidů *S. aureus* je přenášena mezi buňkami hostitele pomocí transdukujících bakteriofágů, některé plazmidy jako jsou např. plazmidy konjugativní nesou geny pro vlastní mobilitu.

## Cíle

Předkládaná práce studuje obsah a strukturu plazmidů kmenů *S. aureus* a také si klade za cíl postihnout základní vztahy mezi plazmidy a jejich hostitelskými kmeny populace *S. aureus* v České republice. V tomto směru studie navazuje na předchozí práce pracoviště zabývající se popisem genů rezistence k antimikrobiálním látkám nesených na plazmidech *S. aureus* a také studiem stafylokokových bakteriofágů a jejich transdukčních schopností.

Práce je zaměřena na charakterizaci plazmidů vyskytujících se v české populaci kmenů *S. aureus*, a to včetně kompletní sekvenace vybraných plazmidů. Pro tyto účely byl vytipován reprezentativní soubor kmenů, které byly podrobně genotypově popsány a bylo tak možné sledovat vztah mezi obsahem konkrétních plazmidů a příslušností kmene ke klonální skupině (CC). Část práce je také věnována optimalizaci metodiky obecné transdukce pro potřeby druhu *S. aureus*, a to za účelem studia možného způsobu přenosu plazmidů bakteriofágy.

Hlavní cíle práce:

1. stanovení obsahu a bližší charakterizace plazmidů u reprezentativního souboru kmenů české populace *S. aureus*;
2. sledování vzájemných vztahů mezi přítomností určitých typů plazmidů a příslušností kmenů *S. aureus* do jednotlivých klonálních skupin (CC);
3. experimentální průkaz přenosu vybraných plazmidů prostřednictvím transdukujících bakteriofágů u klinicky významných kmenů *S. aureus*.

## Materiál a metody

### Bakteriální kmeny

Pro účely práce byl vytvořen soubor více než 140 kmenů MRSA, které byly SZÚ v Praze získány z klinických mikrobiologických laboratoří patnácti nemocnic v České republice v letech 2000-2008. Izoláty byly selektovány pomocí *Sma*I makrorestrikčních spekter a obsahu plazmidů tak, aby byly vyloučeny duplikáty. Výsledný soubor pak obsahoval 73 izolátů pocházejících jak od pacientů (66), tak z nemocničního prostředí (7). Kmen *S.aureus* USA300 byl získán od prof. F. Götze (Univerzita v Tübingenu, Německo).

### Genotypizace kmenů

*Typ spa* byl stanoven dle dříve popsaného protokolu (Shopsin et al., 1999) a s využitím Ridom SpaType Software v.2.0.3 (Ridom). Pro PFGE byla DNA štěpena restriční endonukleázou *Sma*I (Roche Diagnostics) dle dříve popsaného protokolu (Pantůček et al., 1996). Klonální skupina (CC) byla odvozena na základě *spa* typů pomocí Based Upon Repeat Pattern (BURP) (Strommenger et al., 2006), PFGE spektra a typu *sau1hsdS* genu *Sau*I typu RM systému (Cockfield et al., 2007). Typ

SCC*mec* typ (I až VI) byl stanoven pomocí PCR dle dříve popsáního protokolu (Milheirico et al., 2007). Pro přiřazení kmenů ke klonu USA300 byl pomocí PCR stanoven element ACME a *lukF-PV-lukS-PV* gen dle dříve popsáního protokolu (Diep et al., 2006).

#### Izolace a analýza plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics) dle přiloženého manuálu s tím, že bakterie byly lyzovány v přítomnosti lyzostafinu (30 µg/ml, 20 min/37° C). Plazmidová DNA byla štěpena enzymy *AluI*, *EcoRI*, *HindII* a *HindIII* (Roche Diagnostics) a analyzována elektroforézou v 1,2% agarózovém gelu (Serva) v 1%TAE pufru při 4,5 V/cm s následnou vizualizací ethidium bromidem a UV-zářením. Velikost plazmidů byla stanovena jako součet velikostí získaných fragmentů ve třech nezávislých měřeních.

#### Eliminace plazmidů

Pro eliminaci plazmidů byly vybrané kmeny inkubovány s 0,004% SDS při 45 °C/24h a následně byly eliminanty selektovány na selekčním médiu pomocí tzv. razítkové metody (Sonstein a Baldwin, 1972). Ztráta plazmidu byla ověřena provedením elektroforézy plazmidové DNA (viz. výše) a PCR detekcí genu neseného příslušným plazmidem (viz níže).

#### Stanovení citlivosti k antibiotikům

Citlivost k antibiotikům byla stanovena diskovou difúzní metodou s následujícími disky (Oxoid): penicilin (10 IU), oxacilin (1 µg), ampicilin (10 µg), erytromycin (15 µg), ciprofloxacín (5 µg), gentamicin (10 µg), clindamycin (2 µg), tetracyklin (30 µg), chloramfenikol (30 µg), kotrimoxazol (25 µg), rifampicin (5 µg).

#### Detekce plazmidových genů

Plazmidové geny byly detekovány PCR, templátem byla plazmidová DNA. Primery pro geny *blaZ* (Martineau et al., 2000), *tetK* (Ng et al., 2001), *aac(6′)-aph(2′′)* (Strommenger et al., 2003), *ermC* (Martineau et al., 2000), *sed* (Johnson et al., 1991), *etb* (Růžicková et al., 2005) byly převzaty. Další primery byly navrženy pro tuto studii, jejich sekvence stejně jako podmínky reakce jsou uvedeny v publikaci (Kuntová et al., 2012). PCR produkty byly následně analyzovány elektroforézou v 2% agarózovém gelu, obarveny etidium bromidem a vizualizovány UV-zářením.

#### Hybridizace DNA

Z produktů PCR plazmidových genů *ermC*, *tetK* a *cat* byly připraveny sondy pro hybridizaci s plazmidovou DNA, která byla přenesena na nylonovou membránu Southernovým přenosem. Značení sond, vlastní hybridizace a vizualizace byla provedena s použitím Dig DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics).

#### Stanovení produkce β-laktamázy a enterotoxinu D

Produkce β-laktamázy byla stanovena pomocí nitrocefinových disků (ERBA-Lachema) a produkce enterotoxinu D metodou pasivní reverzní latexové aglutinace (Reverse Passive Latex Agglutination Kit SET-RPLA, Denka Seiken) v laboratoři SZÚ Praha.

### Sekvenování DNA

Plazmidová DNA byla klonována do vektoru pBluescript SK(-) (Stratagene). Vlastní sekvenování provedla laboratoř Eurofins MWG Operon Sequencing Department (Ebersberg, Německo). Gen-Bank/EMBL/DDBJ přístupová čísla pro plazmidy pDLK1, pDLK2 a pDLK3 jsou GU562624, GU562625, GU562626.

## Výsledky

### Charakterizace a distribuce plazmidů v MRSA kmenech patřících do různých klonálních linií

Cílem bylo charakterizovat obsah plazmidů u kmenů MRSA izolovaných z patnácti českých nemocnic v rozmezí let 2000-2008. Kmeny byly vybrány tak, aby jejich genotypové charakteristiky byly odlišné. Celkově se podařilo shromáždit reprezentativní soubor kmenů patřících do různých klonálních linií. V následujícím přehledu jsou uvedeny nejdůležitější výsledky a z nich vyplývající závěry, ke kterým jsme během studia výše uvedené tematiky dospěli.

Z hlediska obsahu plazmidů byl studován soubor více než stočtyřiceti kmenů MRSA. Po podrobné charakterizaci kmenů s využitím současných molekulárně biologických a mikrobiologických metod bylo vytipováno 73 izolátů s různým genetickým pozadím, u kterých byla provedena podrobná analýza plazmidové DNA. Bylo zjištěno, že 89 % kmenů obsahovalo alespoň jeden extrachromozomální plazmid. Celkově bylo určeno 24 různých typů plazmidů v rozmezí velikosti 1,3 až 55 kb., což představuje reprezentativní vzorek tohoto typu MGE u *S. aureus*. V souboru byla nalezena řada plazmidů, které nesly geny pro rezistenci k antibiotikům:

#### *Penicilinázové plazmidy*

Více než polovina kmenů (39/73) obsahovala velké plazmidy v rozmezí velikosti od 20 do 55 kb, a to jak samostatně, tak v kombinaci s různými typy malých plazmidů. U všech těchto kmenů byl detekován gen *blaZ* pro  $\beta$ -laktamázu a až na pět izolátů byla také potvrzena produkce tohoto enzymu. Celkově bylo popsáno pět různých typů penicilinázivých, tedy gen *blaZ* nesoucích plazmidů: (1) 38-kb konjugativní plazmid, který navíc nesl gen *cadD* pro rezistenci ke kadmiu a gen *traK* esenciální pro plazmidový transfer, (2) 27.6-kb plazmid (typ podobný plazmidu pIB485, Omoie et al., 2003), který navíc nesl gen *cadD* pro rezistenci ke kadmiu a gen *sed* pro enterotoxin D, přičemž u všech těchto plazmidů byla potvrzena i produkce tohoto enterotoxinu, (3) 26-kb plazmid, který navíc nesl gen *cadD* pro rezistenci ke kadmiu a gen *aacA-aphD* pro gentamicinovou rezistenci, (4) 30-kb plazmid, který navíc nesl gen *cadD* pro rezistenci ke kadmiu a gen *tetK* pro tetracyklinovou rezistenci, (5) 27-kb plazmid (typ podobný plazmidu pUSA-HOU-MR, CP000731), který navíc nesl gen *cadD* pro rezistenci ke kadmiu.

#### *Plazmid nesoucí gen pro rezistenci k erytromycinu*

Gen *ermC* zajišťující rezistenci k erytromycinu byl detekován u 31 % (17/55) kmenů nesoucích plazmid. Plazmid o velikosti 2,4 kb nesoucí gen pro rezistenci k erytromycinu byl sekvenován a označen pDLK1. Na základě 95% sekvenční homologie (100 % v replikační oblasti) byl plazmid přiřazen do skupiny plazmidů podobných pT48 (NC\_001395) z inkompatibilní skupiny Inc12.

#### *Plazmid nesoucí gen pro rezistenci k chloramfenikolu*

Gen *cat* zajišťující rezistenci k chloramfenikolu byl detekován u čtyř kmenů nesoucích stejný malý plazmid o velikosti 2,9 kb, který byl sekvenován a označen pDLK2. Na základě 99% sekvenční homologie byl plazmid přiřazen do skupiny plazmidů podobných pC194 (NC\_002013) z inkompatibilní skupiny Inc8.

#### *Plazmid nesoucí gen pro rezistenci k tetracyklinu*

Gen *tetK* zajišťující rezistenci k tetracyklinu, který je typicky nesen malými plazmidy, byl nalezen v plazmidu o velikosti 4 kb u jednoho izolátu. Na základě restričního spektra *HindIII* byl tento plazmid přiřazen k plazmidům skupiny pT181 (NC\_001393).

Byla stanovena kompletní sekvence tří plazmidů označených pDLK1, pDLK2 a pDLK3. Srovnávací analýza sekvencí vedla ke zjištění, že plazmidy pDLK1 a pDLK2 jsou analogy již dříve popsáných plazmidů, což ukazuje na strukturní stabilitu a evoluční významnost plazmidů MRSA. Plazmid pDLK3 je naopak vysoce mozaikový plazmid obsahující specifické sekvence esenciální pro plazmidový přenos, z čehož vyplývá jeho možná role při horizontálním transferu plazmidů a také jde o důkaz rekombinace stafylokokových plazmidů.

Sledována byla rovněž korelace mezi obsahem konkrétních typů plazmidů a příslušností kmene k CC. Bylo zjištěno, že většina plazmidů koreluje s typy CC. U plazmidů, které byly nalezeny u více typů CC, pak bylo zjištěno, že se vyskytují jen u omezeného množství konkrétních typů CC dle zásad variability v HsdS proteinu *SauI* RM systému tak, jak to popsal Corvaglia et al. (2010). Variabilní obsah v podstatě identických plazmidů kmenů klonu USA300 ukazuje jednak na nedávné klonální šíření těchto kmenů, a také na roli plazmidů v evoluci klonu USA300. Velká diverzita obsahu plazmidů detekovaných v této studii naznačuje, že plazmidy hrají důležitou roli v evoluci kmenů MRSA a mohou být přenášeny s vyšší frekvencí prostřednictvím HGT uvnitř klonálních linií.

#### *Detekce a kvantifikace mobilních genetických elementů kmene S. aureus COL ve fágových částicích pomocí qPCR*

V této části práce jsme se zabývali detekcí a kvantifikací bakteriálních genů kmene *S. aureus* COL, který obsahuje ve svém genomu řadu variabilních genetických elementů včetně plazmidu, přímo ve fágových částicích prostřednictvím qPCR. Pro tento účel byla vyvinuta nová metodika, která umožnila sledovat frekvenci zabalování plazmidů a chromozomových genů. Dále byl pro tuto studii připraven kmen *S. aureus* COL (pT181, pUSA300-HOUMR-like), což zahrnovalo transdukcí penicilinázového plazmidu pUSA300-HOUMR-like z původního hostitelského kmene *S. aureus* NRL/St 07/759 do kmene *S. aureus* COL (pT181) pomocí bakteriofága  $\phi 80\alpha$ .

Neparametrickou statistickou analýzou bylo prokázáno, že transdukující bakteriofágy  $\phi 11$ ,  $\phi 80$  a  $\phi 80\alpha$  patřící do sérologické skupiny B na rozdíl od bakteriofága  $\phi 81$  patřícího do sérologické skupiny A účinně sbalují vybrané chromozomové geny a dále geny nesené na variabilních elementech SCC*mec*, stafylokokovém ostrově patogenity SaPI1, genomických ostrovech *vSa $\alpha$*  a *vSa $\beta$*  a plazmidech s různou frekvencí. Sledované geny byly rozděleny do skupin na základě lokalizace na bakteriálním genomu: (1) plazmidové geny kódující tetracyklinový efluxní systém (*tetK*) a gen pro  $\beta$ -laktamázu (*blaZ*), (2) geny lokalizované na elementu SCC*mec*, včetně genu pro penicilin vázající protein (PBP2) a pro rekombinázu typu I (*ccrA*), (3) geny lokalizované na stafylokokovém ostrově patogenity (SaPI), gen pro integrázu (*Sa1int*) a gen pro stafylokokový enterotoxin B (*seb*), (4) stafylokokový gen pro enterotoxin

(set) lokalizovaný na genomickém ostrově *vSa* a geny pro leukocidiny (*lukE-lukD*), (5) poslední sledovanou skupinou jsou geny lokalizované na „core“ genomu – gen pro termonukleázu (*nuc*), gen pro serin V8 proteázu (*sspA*), gen pro putativní O-metyltransferázu lokalizovanou na konzervativním fragmentu Sa2052 (Štěpán et al., 2001) a gen pro koagulační faktor (clumping factor – *clfB*).

Počet kopií bakteriálních genů na 1 ng fágové DNA (GC/ng) byl v rozmezí od  $1,05 \times 10^2$  pro plazmidový gen rezistence *tetK* do  $3,86 \times 10^5$  pro gen kódující integrázu lokalizovaný na SaP11. Výsledky ukazují jasný rozdíl ve sbalování bakteriální DNA mezi fágy  $\phi 80$ ,  $\phi 80\alpha$ ,  $\phi 11$  sérologické skupiny B a bakteriofágem  $\phi 81$  patřícím do sérologické skupiny A.

Zásadním výsledkem byl důkaz přítomnosti genů nesených na elementu SCC*mec* a kvantifikace těchto genů ve fágových částicích. Oba geny *mecA* a *ccrA1* byly detekovány ve fágových částicích séroskupiny B ve významně vyšším počtu kopií (od  $4,9 \times 10^3$  GC/ng pro fága  $\phi 80$  do  $2,6 \times 10^4$  GC/ng pro fága  $\phi 80\alpha$ ) než v případě netransdukujícího fága  $\phi 81$  ( $7 \times 10^1$  GC/ng). Srovnatelná kvantita dvou monitorovaných genů a detekce 8,7 kb oblasti ohraničené geny *mecA* a *ccrA1* ve vzorcích bakteriofágů sérologické skupiny B metodou „long“ PCR naznačují možnost sbalování delších fragmentů tohoto MGE do virionů.

#### Přenos plazmidů zodpovědných za rezistenci k antibiotikům transdukci v rámci kmenů patřících do klonu *Staphylococcus aureus* USA300

Předmětem této studie byla kvantifikace plazmidů v transdukujících fágových částicích získaných pomnožením na kmenech klonu USA300. Komunitní klon *Staphylococcus aureus* USA300 rezistentní na meticilin je hlavním zdrojem kožních infekcí a zahrnuje kmeny s obsahem různých genů rezistence. V této práci byl proveden důkaz transdukce penicilinázového a tetracyklinového plazmidu bakteriofágy  $\phi 80\alpha$  a  $\phi JB$  mezi různými klinickými izoláty klonu USA300. Pro tento účel byl testován následující transdukční systém: donor - kmeny klonu USA300 (07/759, 98/019, 08/629, 08/986), recipient - laboratorní kmen RN4220; transdukující fág  $\phi 80\alpha$ . Po úspěšné optimalizaci přenosu plazmidů v tomto systému, byl proveden přenos penicilinázového plazmidu (27 resp. 31 kb) z kmenů klonu USA300 (07/759, 98/019, 08/629, 08/986) do klinického recipientního kmene 07/235 pomocí transdukujících bakteriofágů  $\phi 80\alpha$  a  $\phi JB$ . Důležitým výsledkem bylo zjištění, že přirozeně se vyskytující profágy mohou být po indukci UV zářením vektorem přenosu plazmidů. Vysoká frekvence transdukce ( $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  CFU/PFU) byla totiž pozorována jak v případě bakteriofágů propagovaných na donorovém kmeni, tak právě v případě profágů indukovaných z donorového kmene UV zářením. Metodou kvantitativní „real-time“ PCR bylo zjištěno, že poměr mezi transdukujícími bakteriofágy a počtem infekčních částic byl přibližně 1:1700.

Celkově bylo prokázáno, že transdukce je efektivním mechanismem šíření plazmidů v rámci klonu USA300 a zároveň je významným nástrojem evoluce nově vznikajících multirezistentních kmenů tohoto klonu.

## Diskuse

Analýza plazmidové DNA byla jedna z prvních molekulárně biologických metod používaných pro typizaci a bližší charakterizaci bakteriálních kmenů *S. aureus* (resp. MRSA) (Zuccarelli et al., 1990). Metoda je výhodná svou jednoduchostí a dostupností potřebného vybavení, ačkoliv v posledních letech se od prosté vizuali-

zace nativních nebo restričními endonukleázami štěpených molekul plazmidové DNA agarózovou elektroforézou přešlo spíše k detekci plazmidových genů pomocí PCR a sekvenování DNA, které přináší mnohem přesnější a ucelenější informaci o této části genomu. Metoda má však i určitá omezení plynoucí především z faktu, že plazmidy patří mezi mobilní genetické elementy (MGE) a mezi kmeny se přenášejí, i když, jak dokazuje i tato práce, horizontální přenos plazmidů *S. aureus* neprobíhá zcela nahodile, ale řídí se určitými pravidly. S rozvojem sofistikovanějších molekulárně biologických metod a dostupnosti kompletních sekvenací genomů *S. aureus* ustoupila tato metoda poněkud do pozadí. Je však nepostradatelnou při studiu a charakterizaci epidemických klonů, jejich šíření a rovněž při snaze postihnout šíření genů rezistence a také řady genů virulence nesených právě na plazmidech *S. aureus*. Analýzu plazmidové DNA je vhodné doplnit informací o počtu kopií v buňce, a to např. metodou qPCR, jak jsme ukázali v práci Mašlaňová et al. (2012).

Z dat dostupných v genomových databázích pro *S. aureus* vyplývá, že 11 z 18 genomů (61 %) MRSA obsahuje alespoň jeden extrachromozomální plazmid (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cg>). Stejný obsah plazmidů zjistili Cristino a Pereira (1989) ve své studii kmenů MRSA pocházejících z portugalské nemocnice. Naproti tomu Coia et al. (1988) a Caddick et al. (2005) nedetekovali ve svých souborech kmenů MRSA získaných z britských nemocnic i komunity žádný izolát bez plazmidu. V naší studii byl zjištěn podíl kmenů obsahujících plazmidy relativně vysoký, a to 89 %, což je hodnota, ke které dospěl ve své studii zahrnující analýzu plazmidů kmenů *S. aureus* z různých geografických oblastí (USA, Austrálie, Velká Británie) také Shearer et al. (2011). Zdá se tedy, že obsah plazmidů kmenů MRSA je značně variabilní. Podle studie Brady et al. (2007) však existuje spojitost mezi úspěšností určitého klonu a jeho plazmidovým profilem. Ve své práci dospěli k závěru, že kompatibilní plazmidy se podílí na celkové fitness daného klonu. O evoluční důležitosti a zároveň strukturní stabilitě plazmidů svědčí i fakt, že ačkoliv se populace *S. aureus* (MRSA) dynamicky vyvíjí a určitý klon je postupně nahrazován jiným, mnoho plazmidů cirkuluje v populaci řadu let v téměř nezměněné podobě. Dobře lze tento jev pozorovat například na výskytu plazmidu pT181, který byl detekován u prvního popsaného MRSA kmene COL (izolován v roce 1960 ve Velké Británii) a plazmid s téměř identickou sekvencí byl popsán u epidemického klonu USA300 o téměř padesát let později. V naší studii jsme tento fakt potvrdili sekvenční analýzou plazmidů pDLK1 a pDLK2 a také analýzou restričního profilu plazmidu kódujícího enterotoxin D, při které bylo zjištěno, že analogy těchto plazmidů jsou u kmenů *S. aureus* popisovány již desítky let, a to v geograficky různých populacích tohoto patogena (Omoe et al. 2003; Catchpole et al., 1988; Horinouchi a Weisblum, 1982). Námí popsané typy velkých plazmidů detekoval ve své studii zahrnující plazmidy kmenů získaných v různém čase i geografickém místě také Shearer et al. (2011).

Determinanty rezistence k antimikrobiálním látkám patří z hlediska výsledného fenotypu kmene k nejvýznamnějším a také nejsledovanějším plazmidovým genům. Ve většině námí analyzovaných izolátů rezistence kódovaná plazmidovými geny korespondovala s antibiogramem zjištěným u daného kmene. Výjimkou byly kmeny tzv. českého klonu (spa typ t037/ SCCmec kazeta typ IIIA), které i přes svou multirezistenci obsahovaly buď pouze kryptický plazmid nebo kryptický společně s plazmidem kódující determinantu rezistence k erytromycinu. V souladu s informacemi, které poskytují sekvenční projekty genomů *S. aureus*, předpokládáme, že relevantní geny jsou nesené na transpozonech nebo plazmidech integrovaných do bakteriálního chromozomu (Holden et al., 2004; Oliveira et al., 2000; Rolain et al.,



2009). U penicilinázových plazmidů jsme jejich eliminací z příslušného kmene zjistili, že spolu s plazmidy došlo ke ztrátě jak genu pro  $\beta$ -laktamázu, tak schopnosti produkovat tento enzym. Nijak se však nezměnila rezistence k oxacilinu ani penicilinu, což je pravděpodobně způsobeno produktem genu *mecA* přítomným na kazetě SCC*mec* (Hiramatsu et al., 1990). U poloviny kmenů jsme překvapivě detekovali plazmidy, jejichž fenotyp se nepodařilo objasnit a pravděpodobně se tedy jedná o plazmidy kryptické. Ačkoliv je známa kompletní sekvence DNA řady kryptických plazmidů *S. aureus*, stále chybí uspokojivé informace o tom, jaká je jejich role v evoluci stafylokoků a jakou výhodu poskytují své hostitelské bakterii.

Waldron a Lindsay (2006) ve své práci došli k závěru, že k výměně DNA mezi kmeny *S. aureus* z různých linií dochází v menší míře, než je tomu u kmenů ze stejné linie, a to především díky přítomnosti RM systémů. Toto zjištění je v souladu s naší studií, ve které jsme většinu typů plazmidů detekovali výhradně v rámci konkrétní CC. Corvaglia et al. (2010) s touto teorií dále pracoval a přinesl podrobná data o Saul RM systému, konkrétně upozornil na variabilitu v proteinové sekvenci HsdS mezi CC klastry. Následkem této variability dochází přednostně k přenosu plazmidové DNA z jednoho CC do jiného, avšak ne do kmenů CC jiného typu, např. přenos z kmenů CC8 je možný do kmenů CC5, ale ne do kmenů CC30. Tomuto přesně odpovídá námi popsáný výskyt plazmidů nesených napříč liniemi. Všechny tři typy takto detekovaných plazmidů byly nejdříve izolovány z kmenů CC8 a o dva roky později z kmenů CC5, žádný z nich nebyl popsán v kmeni CC30.

Tato práce dále přináší důkaz o tom, že obsah plazmidů se u genotypově příbuzných kmenů může měnit, a to v relativně krátkém časovém období. Konkrétně byla zjištěna variabilita obsažených plazmidů u kmenů patřících do českého, berlínského a USA300 klonu. Z hlediska kmenů klonu USA300 můžeme konstatovat, že variabilita plazmidové DNA přispívá k rychlé evoluci tohoto invazivního kmene, což je v souladu s prací Highlander et al. (2007). Analýza plazmidů dále přináší informaci o klonálním šíření kmenů. Podobně jako Kennedy et al. (2010) jsme zjistili, že kmeny klonu USA300 obsahují v podstatě identické plazmidy v různých kombinacích, a tedy, že se tyto kmeny rozšířily klonálně a v nedávné době.

Plazmidy disponují schopností přenosu z jedné hostitelské buňky do jiné. Bylo popsáno, že jedním z hlavních způsobů přenosu plazmidů u kmenů *S. aureus* je jejich obecná transdukce, tedy přenos zprostředkovaný bakteriofágem (Lindsay, 2008). Výjimku tvoří konjugativní a tzv. mobilizovatelné plazmidy, které nesou vlastní geny pro svůj přenos, u kmenů *S. aureus* však nejsou příliš frekventované. Ve studii Varga et al. (2012) jsme experimentálně prokázali přenos penicilinázového a tetracyklinového plazmidu transdukujícími fágy z kmene klonu USA300 do laboratorního kmene RN4220, ale také do bezplazmidového kmene ze stejného klonu. Pro potřeby studie Mašlaňová et al. (2012) byl rovněž úspěšně přenesen penicilinázový plazmid z kmene USA300 do kmene COL, který patří stejně jako všechny kmeny tohoto klonu do CC8. Všechny transdukce v rámci kmenů klonu USA300 vykazovaly vysokou frekvenci přenosu pohybující se kolem hodnoty  $10^{-5}$  CFU/PFU, což je průkazně vyšší hodnota než uvádějí původní práce Asheshov (1969) nebo Kayser et al. (1972). V naší studii Mašlaňová et al. (2012) bylo metodou qPCR jednoznačně prokázáno a také kvantifikováno, že transdukující bakteriofágy sbalují do svého virionu plazmidy resp. plazmidové geny, a to s relativně vysokou frekvencí. Je tedy zřejmé, že transdukující bakteriofágy jakožto vektory přenosu plazmidů hrají v evoluci kmenů MRSA významnou roli a rovněž přispívají k šíření a adaptabilitě invazivních epidemických klonů jakým je např. výše uvedený USA300.

Na závěr lze tedy shrnout, že plazmidy představují důležitou část genomu MRSA, a to tím, že přispívají k rezistenci k antibiotikům a také virulenci kmenů. Dále bylo zjištěno, že obsah plazmidů u kmenů MRSA zachycených v České republice ve velké míře koreluje s příslušností kmenů k CCs a jejich subklonům. V neposlední řadě přítomnost tolika různých typů plazmidů v různých kombinacích vede k závěru, že tyto autonomní molekuly DNA hrají významnou roli v evoluci klonálních linií MRSA a v jejich genotypové různorodosti. Zásadními mediátory horizontálního transferu plazmidů jsou transdukující bakteriofágy, a to včetně přirozených profágů daných kmenů (Varga et al., 2012; Mašlaňová et al., 2012).

## Poděkování

Práce vznikla s finanční podporou grantu EU LSHM-CT-2006019064 StaphDynamics, grantu Grantové agentury ČR 310/09/0459 a grantu MŠMT MSM 0021622415.

## Literatura

- Asheshov E. H. (1969) The genetics of penicillinase production in *Staphylococcus aureus* strain PS80. *J Gen Microbiol* 59: 289-301.
- Brady J. M., Stemper M. E., Weigel A., Chyou P. H., Reed K. D., Shukla S. K. (2007) Sporadic “transitional” community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from health care facilities in the United States. *J Clin Microbiol* 45: 2654–2661.
- Caddick J. M., Hilton A. C., Rollason J., Lambert P. A., Worthington T., Elliott T. S. (2005) Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals an absence of plasmid DNA in multidrug-resistant isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 44: 297–302.
- Catchpole I, Thomas C, Davies A, Dyke KG (1988) The nucleotide sequence of *Staphylococcus aureus* plasmid pT48 conferring inducible macrolide–lincosamide–streptogramin B resistance and comparison with similar plasmids expressing constitutive resistance. *J Gen Microbiol* 134: 697–709.
- Cockfield J. D., Pathak S., Edgeworth J. D., Lindsay J. A. (2007) Rapid determination of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *J Med Microbiol* 56: 614–619.
- Coia J. E., Noor-Hussain I., Platt D. J. (1988) Plasmid profiles and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin-sensitive and methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and the community. *J Med Microbiol* 27: 271–276.
- Corvaglia A. R., Francois P., Hernandez D., Perron K., Linder P., Schrenzel J. (2010) A type III-like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal gene transfer in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 11954–11958.
- Cristino J. A. G., Pereira A. T. (1989) Plasmid analysis of 219 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with uncommon profiles isolated in Lisbon. *J Hosp Infect* 13: 133–141.
- Diep B. A., Gill S. R., Chang R. F. a kol. (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367: 731–73.

- Highlander S. K., Hultén K. G., Qin X. a kol. (2007) Subtle genetic changes enhance virulence of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 7: 99.
- Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T. (1990) Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 600–604.
- Holden M. T., Feil E. J., Lindsay J. A., Peacock S. J., et al. (2004) Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9786-9791.
- Horinouchi S., Weisblum B. (1982) Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J Bacteriol* 150: 815–825.
- Cheng A. G., DeDent A. C., Schneewind O., Missiakas D. (2011) A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol* 19: 225-232.
- Ito T., Katayama Y., Hiramatsu K. (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1449-1458.
- Johnson W. M., Tyler S. D., Ewan E. P., Ashton F. E., Pollard D. R., Rozee K. R. (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29: 426–430.
- Kayser F. H., Wust J., Corrodi P. (1972) Transduction and elimination of resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2: 217-223.
- Kennedy A. D., Porcella S. F., Martens C. a kol. (2010) Complete nucleotide sequence analysis of plasmids in strains of *Staphylococcus aureus* clone USA300 reveals a high level of identity among isolates with closely related core genome sequences. *J Clin Microbiol* 48: 4504–4511.
- Kuntová L., Pantůček R., Rájová J., Růžičková V., Petráš P., Mašlaňová I., Doškař J. (2012) Characteristics and distribution of plasmids in a clonally diverse set of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Arch Microbiol* 194: 607-614.
- Lindsay J. A., Moore C. E., Day N. P., Peacock S. J., Witney A. A., Stabler R. A., Husain S. E., Butcher P. D., Hinds J. (2006) Microarrays reveal the each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol* 188: 669-676.
- Lindsay, J. (2008) *Staphylococcus: molecular genetics*. Caister Academics, Norfolk, United Kingdom.
- Martineau F., Picard F. J., Grenier L., Roy P. H., Ouellette M., Bergeron M. G. (2000) Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. *J Antimicrob Chemother* 46: 527–534.
- Mašlaňová I., Doškař J., Varga M., Kuntová L., Mužík J., Malúšková D., Růžičková V., Pantůček R. (2013) Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCC*mec* with different frequencies. *Environ Microbiol Reports* 5: 66–73.
- Milheirico C., Oliveira D. C., de Lencastre H. (2007) Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3374–3377.
- Mlynarczyk A., Mlynarczyk G., Jeljaszewicz J. (1998) The genome of *Staphylococcus aureus*: a review. *Zentralbl Bakteriologie* 287: 277-314.

- Ng L. K., Martin I., Alfa M., Mulvey M. (2001) Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes* 15: 209–215.
- Novick R. P. (1989) Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu Rev Microbiol* 43: 537–565.
- Novick R. P. (1991) Genetic systems in staphylococci. *Methods Enzymol* 204: 587-636.
- Oliveira D. C., Wu S. W., de Lencastre H. (2000) Genetic organization of the downstream region of the *mecA* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1906–1910.
- Omoe K., Hu D. L., Omoe H. T., Nakane A., Shinagawa K. (2003) Identification and characterisation of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun* 71: 6088-6094.
- Pantůček R., Gotz F., Doškař J., Rosypal S. (1996) Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive *Staphylococcus* species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 46: 216–222.
- Projan S.J., Archer G.L. (1989) Mobilization of the relaxable *Staphylococcus aureus* plasmid pC221 by the conjugative plasmid pGO1 involves three pC221 loci. *J Bacteriol* 171: 1841-1845.
- Robinson D A, Enright M. C. (2003) Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemo-ther* 47: 3926-3934.
- Rolain J. M., Francois P., Hernandez D. a kol. (2009) Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biol Direct* 4:1.
- Růžičková V., Voller J., Pantůček R., Petráš P., Doškař J. (2005) Multiplex PCR for detection of three exfoliative toxin serotype genes in *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol* 50: 499–502.
- Shearer J. E. S., Wireman J., Hostetler J., Forberger H., Borman J., et al. (2011) Major families of multiresistant plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci. *G3 (Bethesda)* 1:581–591.
- Shopsin B., Gomez M., Montgomery S. O. a kol. (1999) Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 37: 3556–3563.
- Smillie C., Garcillan-Barcia M. P., Francia M. V., Rocha E. P. C., De La Cruz F. (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 434–452.
- Sonstein S. A., Baldwin J. N. (1972) Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulfate. *J Bacteriol* 109: 262–265.
- Strommenger B., Kettlitz C., Weniger T., Harmsen D., Friedrich A. W., Witte W. (2006) Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing, *Sma*I macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 44: 2533–2540.
- Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41: 4089-4094.
- Sung J. M., Lindsay J. A. (2007) *Staphylococcus aureus* strains that are hypersusceptible to resistance gene transfer from enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2189–2191.

Štěpán J., Pantůček R., Růžičková V., Rosypal S., Hájek V., Doškař J. (2001) Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species specific genomic 826 bp sequence derived from a common 44-kb *Sma*I restriction fragment. *Mol Cell Probes* 15: 249-257.

Thomas W. D., JR., Archer G.L. (1989) Identification and cloning of the conjugative transfer region of *Staphylococcus aureus* plasmid pGO1. *J Bacteriol* 171: 684-691.

Ubelaker M. H., Rosenblum E.D. (1978) Transduction of plasmid determinants in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 133: 699-707.

Varga M., Kuntová L., Pantůček R., Mašlaňová I., Růžičková V., Doškař J. (2012) Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol Lett* 332: 146-152.

Waldron D. E., Lindsay J. A. (2006) *Sau*I: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *J Bacteriol* 188: 5578–5585.

Weigel L. M., Donlan R. M., Shin D. H., Jensen B., Clark N. C., et al. (2007) High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 231–238.

Zuccarelli A. J., Roy I., Harding G. P., Couperus J. J. (1990) Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 28: 97–102.



**Mgr. Lucie Kuntová, Ph.D.** je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Svou doktorskou disertační práci (školitel Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.) obhájila v roce 2013. (E-mail: [63917@mail.muni.cz](mailto:63917@mail.muni.cz))

## Funkce proteinu c-Myb ve vybraných aspektech kancerogeneze

Lucia Knopfová

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity,  
Kotlářská 2, 641 37 Brno

### Abstrakt

Protein c-Myb je klíčový transkripční faktor pro fyziologickou regulaci kmenových a progenitorových buněk v kostní dřeni, střevních kryptách a v neurogenních oblastech mozku. Jeho deregulace a aberantní funkce je spojena s různými typy nádorových onemocnění, včetně prsních karcinomů. Funkce proteinu c-Myb v nádorech prsu je však rozporuplná - byl klasifikován jako onkoprotein nezbytný pro mamární tumorigenezi i jako nádorový supresor. Tato práce se zabývá proteinem c-Myb v kontextu prsních karcinomů se zaměřením na jeho význam pro invazivitu a metastázování těchto nádorů. Pro studium funkce proteinu c-Myb v prsních karcinomech jsme jako modelový systém vytvořili varianty dvou buněčných linií odvozených z mamárních nádorů MDA-MB-231 a 4T1, které exprimují exogenní c-Myb (MYBup). Zkoumali jsme proliferaci, migrační a invazivní aktivitu těchto buněk *in vitro*, jejich tumorigenní a metastatický potenciál *in vivo* a vyhledávali jsme efekторы proteinu c-Myb v pozorovaných procesech. Zjistili jsme, že účinek ektopické exprese c-Myb na migraci a invazivitu buněk prsních nádorů *in vitro* je závislý na podmínkách, konkrétně na (ne)přítomnosti chemoatraktantu a složení extracelulární matrix. Protein c-Myb stimuluje chemotaktickou migraci a invazivitu buněk prsních nádorů v matrigelu, ale neovlivňuje chemokinetickou motilitu a penetraci kolagenu I. Ortotopicky implantované buňky 4T1MYBup tvoří v myších BALB/c pomaleji rostoucí nádory, které spontánně metastázuji do kostí a jater, nikoli do plic, na rozdíl od nádorů kontrolních, které zakládají metastázy v kostech, játrech i plicích. Snížená frekvence plicních metastáz nádorů MYBup může být důsledkem omezené schopnosti cirkulujících nádorových buněk exprimujících exogenní MYB vstupovat přes cévní stěnu s kontinuální bazální membránou do plicního parenchymu. Buňky MDA-MB-231MYBup up měly ve srovnání s kontrolními buňkami sníženou schopnost transendoteliální migrace *in vitro*. Identifikovali jsme několik genů, jejichž exprese je deregulovaná v buňkách MYBup. Katepsin D, matrixová metaloproteináza 1 a 9 (MMP1/9) jsou spolu se signální dráhou JNK (c-Jun NH2-terminální kináza) pravděpodobně určujícími faktory zprostředkujícími účinek proteinu c-Myb na migraci a invazivitu buněk MDA-MB-231 *in vitro*. Proteinem Myb řízená represe *Mmp1a* a *Msn* v buňkách 4T1 by mohla být alespoň částečně příčinou selektivní inhibice plicních metastáz nádorů MYBup v myším modelu *in vivo*. Analýza expresních dat klinických vzorků prsních karcinomů uložených v databázích Oncomine a GEO naznačila relevanci pozorované inhibice *MMP1/MSN* proteinem c-Myb pro metastázování karcinomů prsu onkologických pacientek. Výsledky této práce přispívají k poznání funkce proteinu c-Myb v biologii prsních karcinomů, nabízejí nový pohled na jeho rozporupl-

Informační listy GSGM, 2013, 41: 37 - 50

né působení jako onkoproteinu / nádorového supresoru v těchto nádorech a poukazují na podmíněnost jeho funkce s důsledky pro matrix-dependentní invazivitu, extravazaci a organotropismus buněk prsních karcinomů.

## Úvod

Protein c-Myb patří do rodiny transkripčních faktorů se specifickou DNA-vazebnou doménou, do níž patří proteiny B-Myb, A-Myb a virový derivát v-Myb. Lidský protoonkogen *c-myb* (*MYB*, „v-*myb* avian myeloblastosis viral oncogene homolog“) lokalizovaný na chromozomu 6 (6q22-q23) kóduje protein se třemi strukturálními doménami: N-koncovou DNA vazebnou doménou, centrální transaktivační doménou a C-koncovou doménou s negativní regulační funkcí. Fyziologicky c-Myb funguje jako regulátor progenitorových buněk v kostní dřeni, ve střevním epitelu a v mozku (Ramsay a Gonda, 2008). Transaktivací cílových genů se podílí na řízení procesů proliferace, diferenciaci a buněčné smrti. Vysokou expresí genu *MYB* se vyznačují nezralé proliferující hematopoetické progenitorové buňky, proliferačně aktivní buňky v bázi střevních krypt a pravděpodobně i progenitory neuronů v neurogenních „niche“ v dospělém mozku (Malaterre et al., 2008; Lorenzo et al., 2011).

Patologické důsledky aberantní exprese genu *MYB* byly nejdříve rozpoznány v ptačích modelech, kde onkogenní forma způsobuje hematologické malignity (myeloblastózu, odtud název genu), později byla amplifikace genu *MYB* spojena s leukemogenezí u člověka (Pattabiraman a Gonda, 2012), nově i v B-buněčné leukémii (Waldron et al., 2012). Dysfunkce proteinu c-Myb se prokázala i v epiteliálních nádorech, nejdříve v kolorektálních karcinomech, pak v nádorech prsu, pankreatu, hlavy a krku, v melanomech a dalších (Walker et al., 1998; Biroccio et al., 2001; Persson et al., 2009; Miao et al., 2011). Nově bylo zjištěno, že *MYB* působí jako onkogen v nádorech prostaty (Srivastava et al., 2012).

Donedávna byla jako mechanismus tumorigenní funkce proteinu c-Myb uvažována pouze deregulace proliferace, zástava diferenciaci a prevence buněčné smrti (Ramsay a Gonda, 2008). Během posledních let se objevily informace, že protein c-Myb se podílí také na migraci, resp. invazivitě nádorových buněk. Souvislost mezi proteinem Myb a invazivitou nádorů byla poprvé prezentována na konferenci týkající gastrointestinálních nádorů v roce 2009 (Weston et al., 2009). K. Weston a její kolegové zjistili, že vypnutí exprese protoonkogenu *MYB* redukuje migraci a invazivitu buněk adenokarcinomu jícnu *in vitro* a že Myb-pozitivní buňky se v nádorech jícnu *in vivo* nacházejí především v okrajových oblastech, kde dochází k lokální invazi okolní tkáně. První publikace představující protein c-Myb jako invazivní faktor vyšla v roce 2010 (Tanno et al., 2010). Vypnutí endogenní exprese *MYB* v buňkách kolorektálních nádorů a neuroblastomů vedlo k jejich snížené invazivitě *in vitro* a omezilo schopnost leukemických buněk usazovat se v kostní dřeni *in vivo*. Mechanismus indukce invazivity spočíval v aktivaci transkripčního faktoru Slug řízené proteinem Myb a následné epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT) (Tanno et al., 2010). Rok poté byl c-Myb identifikován jako regulátor EMT i v buňkách prsních karcinomů a byly naznačeny možné důsledky pro jeho funkci v invazivitě prsních nádorů (Cesi et al., 2011). Zatím poslední publikace zmiňující *MYB* a invazivitu nádorových buněk uvádí, že c-Myb podporuje EMT také v buňkách prostatických nádorů (Srivastava et al., 2012) a že tento protein může stimulovat invazivitu buněk hepatocelulárních karcinomů nezávisle na EMT (Chen et al., 2010).

Karcinomy prsu představují velmi heterogenní skupinu nádorů, jak z hlediska patogeneze, tak klinické prognózy a terapeutických možností. Přestože sporadické prsní nádory jsou často diagnostikovány v relativně častých stádiích lokálního onemocnění bez známek metastatického šíření, u 25 - 50 % pacientek dojde někdy i desítky let po prvotní diagnóze k rozvoji vzdálených metastáz (Lorusso a Rüegg, 2012). Zatímco pravděpodobnost doby přežití 5 let je pro pacientky s lokalizovaným primárním nádorem prsu 98 %, pro případy metastázujících prsních nádorů tato pravděpodobnost dramaticky klesá na pouhých 27 %. Prsní karcinomy zakládají metastázy nejčastěji v kostech, plicích, mozku a lymfatických uzlinách, využívají tedy lymfogenní i hematogenní šíření.

Protoonkogen *MYB* je jedním z cílových genů estrogenového receptoru (ER), jeho exprese je proto výrazně vyšší v prsních nádorech exprimujících ER (ER<sup>+</sup>) než v nádorech ER negativních (ER<sup>-</sup>). Nicméně i mezi nádory ER<sup>-</sup> existuje variabilita v expresi genu *MYB* (Thorner et al., 2010). Jedna z prvních funkčních studií proteinu c-Myb v prsních karcinomech konstatovala závislost buněčné proliferace prsních nádorových buněk na expresi protoonkogenu *MYB* (Drabsch et al., 2007). Ztráta jeho funkce přiměla buňky ER<sup>+</sup> zastavit buněčný cyklus, buňky ER<sup>-</sup> však nebyly k supresi *MYB* senzitivní. Během indukované diferenciaci ER<sup>+</sup> prsních nádorových buněk MCF7 dochází k vypnutí endogenní exprese *MYB* (Drabsch et al., 2010). Genetická inhibice *MYB* spouští diferenciaci a naopak jeho ektopická exprese diferenciaci i apoptózu buněčné linie MCF7 blokuje (Drabsch et al., 2010). Deplece *MYB* znemožňuje vznik nádorů v MMTV-*NEU* myším modelu *in vivo* (Miao et al., 2011). *MYB* byl takto definován v prsních nádorech jako onkogen s podobným účinkem, jaký byl popsán u leukémií a kolorektálních nádorů. Pokud jde o invazivitu a metastázování prsních nádorů, byl c-Myb zahrnut do regulační sítě spojené s EMT a jeho exprese se ukázala být nepostradatelnou pro změny indukované transformujícím růstovým faktorem  $\beta$  v buňkách prsního karcinomu MCF7 (Cesi et al., 2011).

Krátce po sobě v roce 2010 se však objevily články popisující nádorově supresivní funkci proteinu c-Myb v prsních karcinomech. Deisenroth a spolupracovníci překvapivě identifikovali novou funkci jednoho z dříve popsaných cílových genů proteinu c-Myb Hep27 (kódovaný genem *DHRS2*) (Deisenroth et al., 2010). Zjistili, že mitochondriální enzym Hep27 se může v důsledku aberantní exprese *MYB* translokovat do jádra, kde interakcí s Mdm2 stabilizuje protein p53 (Deisenroth et al., 2010). Takto by protein c-Myb mohl ovlivňovat charakter nádorů prsu s proteinem p53 wt. Přímý funkční průkaz nádorově supresivní funkce proteinu c-Myb byl podán krátce poté (Thorner et al., 2010). Vypnutí exprese *MYB* pomocí shRNA v buňkách MCF7 potencovalo tumorigenezi *in vitro* (růst kolonií nezávislý na podkladu, „anchorage-independent growth“) a urychloval růst ortotopicky implatovaných mamárních nádorů *in vivo*. Klinickou relevanci k těmto experimentálním výsledkům přidala další studie, která poukázala na to, že skupina pacientek s karcinomy prsu vyznačujícími se vysokou expresí *MYB* genu má výbornou prognózu a minimální pravděpodobnost výskytu distálních metastáz (Nicolau et al., 2011).

## Cíle

Cílem této studie je stanovení funkce transkripčního faktoru c-Myb regulaci tumorigenních vlastností buněk prsních karcinomů, s konkrétním zaměřením na invazivitu a metastázování nádorů:

1. stanovit funkci proteinu c-Myb v regulaci migrace buněk prsních karcinomů *in vitro*;



2. stanovit funkci proteinu c-Myb v řízení invazivity buněk prsních karcinomů *in vitro*;
3. určit význam proteinu c-Myb pro tumorigenezi a metastázování prsních karcinomů *in vivo*;
4. identifikovat molekulární efekторы Myb-řízených procesů v buňkách prsních karcinomů.

## **Materiál a metody**

### Buněčné linie

MDA-MB-231 – nádorová linie odvozená z pleurální efúze lidského adenokarcinomu prsu

4T1 – nádorová linie odvozená z tumoru mléčné žlázy myši kmene BALB/cfC3H (kmen s vysokou četností spontánních prsních nádorů způsobenou přítomností exogenního viru MMTV („mouse mammary tumor virus“)

HUVEC – lidské endoteliální buňky získané z pupečnickové žíly („Human Umbilical Vein Endothelial Cells“)

### Transfekce

Pro přípravu stabilních linií buněk MDA-MB-231/4T1 se zvýšenou expresí genu *MYB* byly buňky transfekovány expresním plazmidem nesoucím sekvenci cDNA lidského a myšího genu *MYB* s použitím činidla Lipofectamine 2000 (Invitrogen) podle návodu výrobce. Přechodného vypnutí genové exprese bylo docíleno transfekcí buněk MDA-MB-231MYBup specifickými siRNA s použitím xtremeGENE siRNA (Roche) podle návodu výrobce. Cílová koncentrace siRNA byla 30 nM.

### Transaktivační testy

Transaktivační funkce proteinu c-Myb byla testována s využitím luciferázových reportérových konstruktů. Vektory se zkoumanými regulačními úseky (umělý promotor s šesti vazebnými místy pro c-Myb, sekvence promotoru lidského genu pro *CTSD*, *MMP1* a *MMP9* o různé délce) byly transfekovány buňky MDA-MB-231/4T1 současně s plazmidem kódujícím  $\beta$ -galaktozidázu. Lyzát buněk byl použit k testování aktivity  $\beta$ -galaktozidázy a luciferázy.

### PCR array

K expresnímu profilování buněk MDA-MB-231MYBup jsme použili „RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Tumor Metastasis“ (PAHS-028A, SABiosciences). Získaná data jsme vyhodnotili softwarem PCR Array Data Analysis Template Excel (SABiosciences).

### „Transwell“ migrační/invazivní test

Chemotaktická migrace buněk byla testována sestavou „Cultrex Cell Invasion Assay“ (Trevigen). Kit využívá kultivační systém „transwell“ v 96-jamkovém formátu. Buňky MDA-MB-231 ( $5 \times 10^4$  buněk/jamku) byly přidány do horní části jamek, do dolní části jamek bylo přidáno médium s přídavkem 10% FCS, použitého jako chemoatraktantu. Po 16 hod byly migrující buňky obarveny Calceinem AM a emitovaná fluorescence byla změřena přístrojem Synergy HT. Pro testování buněčné invazivity byl tento postup modifikován přidáním extraktu bazální membrány (matrigel).

### Selekce migračně aktivních buněk linie MDA-MB-231 *in vitro*

Buňky s vysokou chemotaktickou migrační aktivitou (MIG4) jsme seletovali z buněk MDA-MB-231 čtyřmi cykly „transwell“ migrace a expanze získané subpopulace

buněk. Postupovali jsme jako při „transwell“ migračním testu, po čtyřhodinové inkubaci byly buňky uvolněny z filtru disociačním pufrém (součást kytu „Cultrex Cell Invasion Assay“) a přeneseny do kultivační misky s kompletním médiem. Cyklus migrace a expanze jsme opakovali čtyřikrát.

#### Analýza buněčné migrace/invazivity v reálném čase pomocí xCELLigence „Real-Time Cell Analyzer“

Pro kinetickou analýzu buněčné migrace/invazivity jsme využili systém „CIM-plates 16“ a měření impedance přístrojem xCELLigence „Real-Time Cell Analyzer“ (RTCA). Pro invazivní experimenty jsme membránu horní části destičky CIM 16 překryli vrstvou extraktu bazální membrány (matrigel) nebo kolagenu I, případně monovrstvou endoteliálních buněk HUVEC. V indikovaných případech jsme do média v dolní části jamky přidali inhibitor GM6001, SP600125 nebo metylester pepstatinu A.

#### Analýza chemokinetické motility buněk („wound healing assay“) v reálném čase

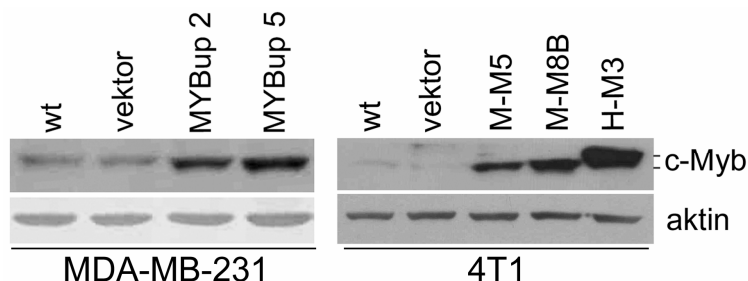
Buňky jsme kultivovali na misce upravené pro videomikroskopické pozorování, po dosažení 100% konfluence jsme mechanicky odstranili část buněk za vzniku bezbuněčné rýhy o šířce 240 nm (šířka rýhy byla změřena mikroskopicky pomocí software LAS („Leica Application Suite“)). Pro snímání v intervalu 10 minut po dobu 20 hodin jsme používali mikroskop Leica TCS SP5 X.

#### Analýza metastatické aktivity nádorových buněk 4T1 in vivo

Ortotopické mamární nádory byly indukovány injekcí buněk 4T1 (varianty MYBup M-M5 a vektor) do mléčných žláz samic myši kmene BALB/c (stáří 7 týdnů). Myši byly sledovány po dobu jednoho měsíce, růst nádoru pravidelně monitorován. Po dosažení průměru nádoru 1,2 cm, byly myši utráceny a přítomnost metastatických infiltrátů byla hodnocena ve fixovaných orgánech histologicky.

## Výsledky

Pro stanovení funkce proteinu c-Myb v řízení invazivity a metastázování prsních karcinomů byly vytvořeny varianty dvou buněčných linií (MDA-MB-231 a 4T1), které jsou rozsáhle využívány ke studiu invazivity nádorových buněk a metastázování prsních nádorů, produkující funkční exogenní transkripční faktor c-Myb (varianty MYBup, M-M a H-M; obr. 1).



**Obrázek 1:** Ektopická exprese genu *MYB/Myb* v buňkách MDA-MB-231 a 4T1. Imunodetekce proteinu c-Myb ve stabilních klonech konstitutivně exprimujících exogenní c-Myb.

Nejprve jsme testovali růstové, migrační a invazivní vlastnosti buněk MYBup *in vitro*. Zjistili jsme, že ektopická exprese c-Myb neovlivňuje proliferaci buněk MDA-MB-231 a 4T1 *in vitro*. Směřovaná migrace byla testována v uspořádání „transwell“ za podmínek chemoatrakce. Fluorimetrická detekce migrujících buněk i měření změn impedance v důsledku migrace v reálném čase systémem RTCA xCELLigence ukázaly zvýšenou chemotaktickou migrační aktivitu buněk MYBup obou linií. Buňky produkující exogenní c-Myb se ale neliší od buněk kontrolních v rychlosti chemokinetické migrace, což dokládají výsledky testu „scratch/wound-healing“, kdy se motilita buněk hodnotí v nepřítomnosti gradientu chemoatraktantu rychlostí zacelování mechanického „poranění“ konfluentní vrstvy buněk. Pokud buňky MDA-MB-231 chemotakticky procházejí v kultivačním systému „transwell“ přes vrstvu endoteliálních buněk HUVEC, je transmigrace v buňkách ektopicky exprimujících MYB ve srovnání s kontrolními liniemi dokonce zpomalena.

Invazivní aktivita buněk MYBup byla hodnocena podobně jako chemotaktická migrace, ale postup migračních testů „transwell“ byl modifikován a doplněn o fázi penetrace substrátu simulujícího prostředí extracelulární matrix (ECM). Jako bariéry buněčného pohybu jsme použili dva typy matrix: matrigel (extrakt bazální membrány) a kolagen I (abundantní protein intersticiální ECM). Zjistili jsme, že buňky MYBup linie MDA-MB-231 i 4T1 procházejí membránou pokrytou matrigelem, ale ne kolagenem I snáze než buňky kontrolní. c-Myb tedy aktivuje invazivitu buněk prsních karcinomů *in vitro* v závislosti na typu mimobuněčné matrix.

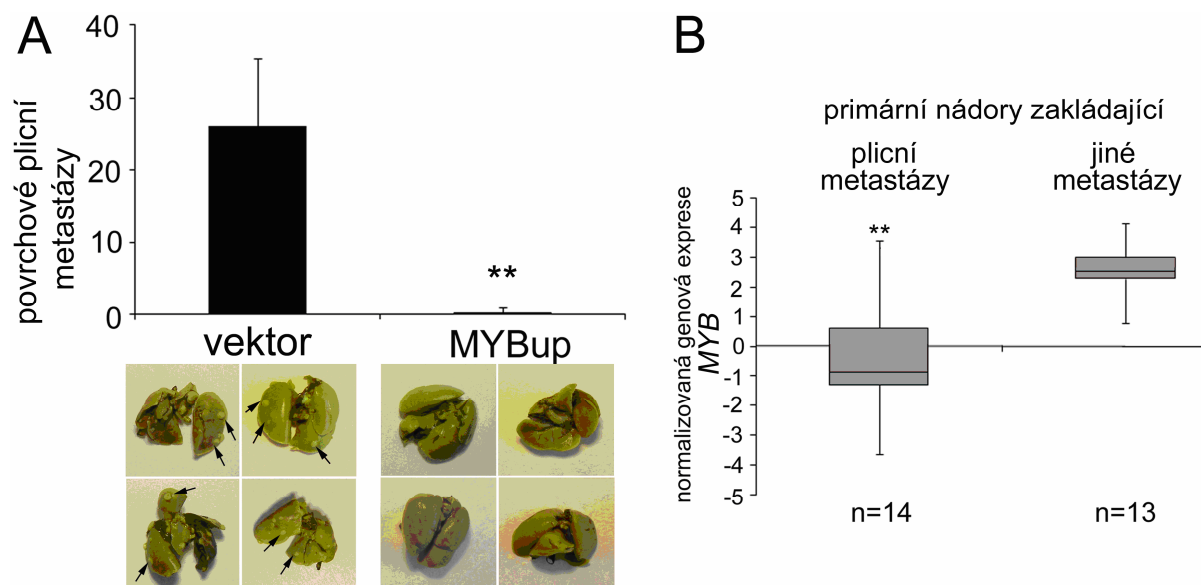
Dále jsme se zaměřili na identifikaci efektorů proteinu c-Myb v řízení migrace/invazivity buněk MDA-MB-231 *in vitro*. Použili jsme PCR array „RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Tumor Metastasis“ (SABiosciences) pro současnou analýzu panelu 84 genů relevantních pro metastázování nádorů. Identifikovali jsme šest genů (*CDH11*, *MCAM*, *ITGB3*, *MMP9*, *HTATIP2* a *IL18*) s významně deregulovanou expresí v buňkách MYBup. Deregulaci na úrovni proteinu jsme v buňkách s exogenním proteinem c-Myb potvrdili pro *CDH11* a *MMP9*. Kromě zvýšené hladiny kadherinu 11 a *MMP9*, jsme v buňkách MYBup zjistili nadprodukcii katepsinu D, transkripčního faktoru Slug a fosforylované formy (Ser73) proteinu c-Jun a naopak pokles exprese/sekrece proteinu MMP1 ve srovnání s kontrolními buňkami.

Funkční testy s využitím specifických siRNA a/nebo farmakologických inhibitorů a také porovnání s expresním profilem subpopulace buněk MIG4 linie MDA-MB-231 vybrané na základě své vysoké chemotaktické aktivity ukázaly, že katepsin D (kódovaný genem *CTSD*) alespoň částečně zprostředkovává účinek transkripčního faktoru c-Myb na buněčnou migraci, společně s aktivací signální dráhy JNK a možná také vypnutím exprese MMP. Schopnost buněk MDA-MB-231MYBup pronikat matrigelem je senzitivní k inhibici *CTSD* a MMP, genetické vypnutí *CTSD* a inhibice JNK blokuje jejich invazivitu v kolagenu I.

Pro studium invazivity/tumorigeneze/metastázování buněk MYBup *in vivo* jsme použili buňky 4T1 (a jejich varianty produkující exogenní c-Myb) v syngenním myším modelu nádoru prsní žlázy, kdy se buňky 4T1 ortotopicky implantují do myši BALB/c. Výsledky dokumentují, že nádory ektopicky exprimující *Myb* (MYBup) rostou pomaleji a metastázuji do plic s výrazně nižší frekvencí (obr. 2) než nádory kontrolní (pouze u 22 % myší s nádory MYBup byla zjištěna přítomnost nádorových infiltrátů v plicích), ale neliší se ve frekvenci a rozsahu nádorové infiltrace kostí a jater, jak ukázala histologická analýza.

Zjistili jsme, že buňky a nádory 4T1MYBup produkují méně intersticiální kolagenázy Mmp1a a moesinu než kontrolní vzorky. Analyzovali jsme proto expresi genu *MYB* a vybraných cílových genů (včetně *MMP1* a *MSN*, kódujících intersticiální kola-

genázu, resp. moesin) v klinických vzorcích karcinomů prsu nástroji databází Onco- mine a GEO a zjistili jsme nepřímou úměrnost mezi hladinou *MYB* a *MMP1/MSN* mRNA v prsních nádorech. Navíc jsme zaznamenali nízkou expresi *MYB* mRNA ve skupině primárních nádorů prsu metastazujících do plic v porovnání se skupinou nádorů metastazujících mimo plíce (obr. 2) a podobný expresní profil je zachován v sekundárních nádorech karcinomů prsu v plicích (nízká hladina mRNA *MYB*) ve srovnání se sekundárními nádory lokalizovanými mimo plíce (vysoká hladina mRNA *MYB*). Přitom exprese genů *MMP1* a *MSN* ve skupinách nádorů rozdělených na základě lokalizace metastáz má opačný profil než exprese genu *MYB* (vysoká hladina mRNA *MMP1* a *MSN* v nádorech metastazujících do plic).



**Obrázek 2:** (A) Frekvence plicních metastáz nádorů 4T1MYBup *in vivo*. (B) Expese *MYB* v souboru prsních karcinomů ze studie Minn et al., 2005 (databáze GEO, GSE2603).

## Diskuse

Testováním buněčné migrace dvěma odlišnými přístupy jsme zjistili, že ektopická exprese *MYB* navyšuje chemotaktickou pohyblivost buněk prsních karcinomů, ale neovlivňuje chemokinetický pohyb. Ačkoli chemotaxe i chemokineze se uplatňují při metastatickém šíření nádoru, nejsou funkčně ekvivalentní. Výhoda buněk snadno polarizovatelných pro směrovaný pohyb může být v podmínkách chemokinetických ztracena (Thou-Wong et al., 2006), je proto možné, že buňky MYBup, podobně jako MIG4 nejsou vybaveny pro chemokinetickou motilitu, ačkoli disponují účinnou směrovanou migrací,

Expresní profilování buněk MYBup v genech relevantních pro metastázování pomocí „Human Tumor Metastasis PCR array“ a testování dalších kandidátních genů poukázalo na několik potenciálních efektorů chemotaktické migrace indukované proteinem Myb: *CTSD*, *MMP9*, *MMP1*, *CDH11*, *SNAI2* a signální dráha *JNK/JUN*. Deregulace genu *CTSD* byla v buňkách MDA-MB-231MYBup zjištěna na úrovni produkce mRNA, proteinu i jeho sekrece z buňky. Transkripční testy ukázaly Myb-dependentní aktivaci promotoru lidského genu *CTSD* a *in silico* bylo nalezeno několik potenciálních vazebných míst pro Myb v promotoru tohoto genu. Přestože regulační

sekvence genu *CTSD* nebyly dosud funkčně charakterizovány s ohledem na transaktivaci řízenou proteinem Myb, mRNA *CTSD* byla identifikovaná mezi transkripty, jejichž hladina roste s exogenní expresí *MYB* v buňkách prsních karcinomů v celogenomové expresní studii (Rushton et al., 2003). Katepsin D je lysozomální aspartátová protéza a je považován za negativní prognostický marker pro pacientky s karcinomem prsu (Foekens et al., 1999). Naše funkční testy ukázaly závislost migrační aktivity buněk MYBup na expresi a/nebo enzymatické aktivitě katepsinu D. Katepsin D stimuluje chemotaktickou migraci buněk MDA-MB-231MYBup proteolytickým štěpením neznámého substrátu, nebo interakcí se svým povrchovým receptorem nebo jinými proteiny, nebo kombinací těchto mechanismů (Laurent-Matha et al., 2005; Benes et al., 2006; Beaujouin et al., 2010; Koch et al., 2013).

Ačkoli protonkogen *JUN* patří mezi charakterizované cílové geny transkripčního faktoru c-Myb (Quintana et al., 2011), v buňkách MDA-MB-231MYBup jsme nezjistili výraznou deregulaci hladiny mRNA/proteinu JUN, nicméně aktivita proteinu c-Jun reprezentovaná množstvím jeho fosforylované formy (Ser73) je v buňkách s exogenním proteinem c-Myb zvýšená. Fosforylaci proteinu c-Jun v místě Ser73 zajišťuje c-Jun N-terminalní kináza JNK/SAPK. Není nám známo, jakým způsobem c-Myb aktivuje JNK/Jun signální dráhu, hypotézou vysvětlující aktivaci JNK signální dráhy by mohla být Myb-řízená deregulace exprese/aktivity fosfatáz DUPS1/16 (Zhao et al., 2011; Zuber et al., 2011, SI). Zjistili jsme, že přítomnost inhibitoru kinázy JNK SP600125 snižuje schopnost účinné směrované migrace buněk MYBup. Schopnost remodelovat aktinový cytoskelet je klíčový faktor, kterým signalizace JNK/Jun uděluje buňkám migrační potenciál (Jiao et al., 2008; Jiao et al., 2010; Külshammer, Uhlirova, 2012). Pro potvrzení funkčního příspěvku proteinů c-Jun a JNK by byla nutná individuální inhibice *JUN/JNK* prostřednictvím siRNA, nicméně můžeme shrnout, že inhibice signální dráhy JNK prostřednictvím SP600125 blokuje chemotaktickou motilitu buněk MDA-MB-231MYBup.

Jako další z potenciálních efektorů buněčné migrace aktivované proteinem Myb byl identifikován transkripční faktor Slug (kódovaný genem *SNAI2*) a kadherin 11 (*CDH11*). Exprese obou těchto genů je v buňkách MDA-MB-231 produkujících exogenní c-Myb navýšena ve srovnání s kontrolní linií. Akumulace *SNAI2* mRNA a proteinu Slug vlivem zvýšené hladiny proteinu c-Myb byla zaznamenána už dříve (Tanno et al., 2010; Cesi et al., 2011), *CDH11*, pokud víme, dosud mezi cílové geny proteinu Myb zařazen nebyl. Slug je významný regulátor EMT (Peinado et al., 2007) a kadherin 11 (OB-kadherin) se používá jako jeden z mnoha mezenchymálních markerů v buňkách nádorů prsu (Hazan et al., 2004; Sarrió et al., 2008). Na funkci proteinu c-Myb v indukci EMT s důsledky pro buněčnou motilitu již bylo poukázáno (Tanno et al., 2010; Cesi et al., 2011). Jak jsme prokázali, exprese proteinů Slug a kadherinu 11 není pro chemotaktickou migraci buněk indukovanou proteinem Myb nezbytná, což naznačuje, že c-Myb pravděpodobně aktivuje chemotaktickou migraci buněk MDA-MB-231 nezávisle na EMT.

Při testování invazivity buněk s modifikovanou expresí genu *MYB* jsme použili dva typy náhrad ECM, matrigel a kolagen typu I. Složení těchto matrixových bariér odráží biologickou odlišnost bazální membrány a intersticiální ECM. Naše výsledky ukazují, že ačkoli buňky MYBup snáze procházejí bariérou tvořenou matrigelem než buňky kontrolní, nevykazují zvýšenou schopnost invadovat matrix tvořenou kolagenem I. Odlišná proteolytická výbava buněk MYBup může být příčinou matrix-specifické invazivity. V buňkách MYBup jsme pozorovali deregulovanou expresi proteáz MMP1 a MMP9: zatímco expresi genu *MMP9* protein c-Myb aktivuje, hladina mRNA *MMP1* a inter- i extracelulární množství proteinu MMP1 jsou v důsledku

ektopické exprese *MYB* sníženy. Naše data souhlasí s nedávno publikovanými údaji, že genetická manipulace exprese *MYB* způsobuje odpovídající změny v expresi *MMP9* (Bhattacharai et al., 2011). Pokud je nám známo, negativní regulace exprese *MMP1* řízená proteinem c-Myb ještě popsána nebyla. Hlavním substrátem *MMP9* je kolagen IV (obsažený v matrigelu), zatímco *MMP1* degraduje zejména kolagen I. Buňky MYBup tedy invadují matrigel účinněji než kontrolní linie navzdory nedostatku kolagenázy *MMP1* a *MMP9* může být efektozem přispívajícím k nárůstu invazivity buněk MYBup testované na „transwell“ filtrech pokrytých vrstvou matrigelu (Xu et al., 2010; Wang et al., 2011). Buňky MYBup však výhodu v invazivní aktivitě nad kontrolními buňkami ztrácejí v matrix tvořené kolagenem I, což může způsobeno absencí *MMP1* (Jiang et al., 2005; Foley et al., 2012).

Pro testování invazivního potenciálu buněk MYBup *in vivo* jsme využili buněčné linie 4T1 v syngenním myším modelu. Nádory vyvolané linií 4T1 jsou často používaným modelem pro studium metastázování, protože zakládají sekundární nádory s vysokou účinností, jejich distribuce je podobná jako u lidských karcinomů prsu a poloha sekundárních nádorů není předurčena místem inokulace nádorových buněk jako v případě experimentálních metastáz (Pulaski a Ostrand-Rosenberg, 2001; Tao et al., 2008; Francia et al., 2011). Výsledky ukazují, že *in vivo* je růst buněk 4T1 exprimujících exogenní Myb významně zpomalen ve srovnání s růstem kontrolní linie a schopnost nádorů MYBup zakládat sekundární nádory v plicích je významně omezena, aniž se změní účinnost infiltrace kostí a jater. Abychom zjistili, zda mají uvedená data odvozená z myšího modelu *in vivo* nějakou relevanci pro metastázování prsních karcinomů onkologických pacientek, využili jsme veřejně přístupných databází shromažďujících data z různých studií věnovaných celogenomové expresní analýze klinických vzorků. Z databází Oncomine a GEO jsme vybrali čtyři soubory vzorků primárních prsních karcinomů nebo jejich metastáz a analýzou expresních profilů genu *MYB* v klinických vzorcích primárních prsních nádorů s různým tropismem metastáz (Minn et al., 2005) jsme zjistili, že nádory metastázující do plic mají významně nižší relativní množství *MYB* mRNA než nádory metastázující mimo plíce. Zdá se, že vysoká hladina mRNA *MYB* v primárním nádoru neumožňuje účinnou metastatickou kolonizaci plic, ale umožňuje infiltraci a sekundární růst v jiných orgánech, což koresponduje s našimi výsledky. Pokud víme, funkce proteinu c-Myb jako faktoru determinujícího organotropismus metastáz prsních nádorů dosud nebyla popsána. Za pravděpodobnou příčinu Myb-indukované suprese plicních metastáz považujeme sníženou schopnost vstupu do plicního parenchymu. Poruchu transendoteliální migrace vlivem ektopické exprese *MYB* jsme zaznamenali v buňkách MDA-MB-231 a další data podporují hypotézu o funkci proteinu c-Myb v negativní regulaci extravazace v cílových místech s těsnými vazbami mezi endoteliálními buňkami a s kontinuální subendoteliální bazální membránou, jako jsou plíce (Bauer et al., 2007; Drake et al., 2009; Williams et al., 2009).

Ačkoli existují publikace dokládající, že c-Myb je důležitý pro proliferaci buněk prsních karcinomů *in vitro* a růst nádorů mléčné žlázy v myších *in vivo* (Drabsch et al., 2007; Miao et al., 2011), byla zaznamenána také nádorově supresivní funkce proteinu c-Myb v prsních nádorech (Deisenroth et al., 2010; Thorner et al., 2010). Nádorově supresivní účinek genu *MYB* byl zjištěn u ER<sup>+</sup> nádorů a jako mechanismus tohoto účinku byla navržena stabilizace proteinu p53 prostřednictvím cílového proteinu Hep27 (Deisenroth et al., 2010; Thorner et al., 2010). Jak ukazují naše výsledky, i v ER<sup>-</sup> nádorech s mutantní formou proteinu p53 může c-Myb nezávisle na Hep27 plnit funkci nádorového supresoru, případně orgánově specifického supresoru metastáz.

Na základě exprese v 4T1MYBup nádorech *in vivo* a buňkách *in vitro* a také vzhledem k jejich expresním profilům v lidských karcinomech prsu uloženým v databázích Oncomie a GEO, jsme jako molekulární efekторы organotropismu metastáz řízeného proteinem Myb navrhli intersticiální kolagenázu MMP1/Mmp1a a ERM protein moesin. Moesin se účastní připojení kortikálních aktinových vláken k cytoplazmatické membráně a umožňuje rychlou reorganizaci cytoskeletu v reakci na vnější signály (Niggli a Rossy, 2008). Moesin je nezbytný pro kolonizaci plic buňkami melanomu (Estechea et al., 2009) a v leukocytech se podílí na polarizaci buňky předcházející transendoteliální migraci (del Pozo et al., 1998). Je možné, že Myb-indukovaná represe moesinu blokuje procesy nutné pro polarizaci buňky po kontaktu s endotelem, a tedy účinnou transendoteliální migraci. *MMP1* je jedním z genů, které se výrazně exprimují v prsních nádorech preferenčně kolonizujících plíce (Minn et al., 2005; Gupta et al., 2007; Minn et al., 2007). Účinek MMP1 na plicní metastázování se přisuzuje schopnosti remodelovat cévní stěnu a zajistit účinnou extravazaci (Gupta et al., 2007). Domníváme se, že potlačení exprese *Mmp1a* vyvolané ektopickou expresí genu *Myb* v buňkách 4T1 může být příčinou zpomaleného růstu tumorů 4T1MYBup *in vivo* a také jejich neschopnosti zakládat metastázy selektivně v plicích kvůli ztížené extravazaci, přičemž v metastázování do kostí a jater nejsou omezeny.

## Závěr

Výsledky této práce přispívají k poznání funkce proteinu c-Myb v biologii prsních karcinomů a nabízejí nový pohled na jeho rozporuplné působení jako onkoproteinu/nádorového supresoru v těchto nádorech. Naše výsledky poukazují na skutečnost, že funkce proteinu c-Myb je v buňkách prsních karcinomů určována podmínkami a kontextem mikroprostředí, v němž je sledována.

Zjistili jsme, že protein c-Myb stimuluje chemotaktickou, ale ne chemokinetickou motilitu buněk prsního karcinomu MDA-MB-231. Vysoká chemotaktická aktivita těchto buněk ale není podmíněna jen vysokou expresí genu *MYB*. Naše výsledky ukazují, že c-Myb reguluje invazivitu buněk prsních nádorů v závislosti na složení matrix, která představuje bariéru buněčné migraci. Pokud je buňkám jako překážka pohybu ve směru koncentračního gradientu chemoatraktantu předložena vrstva matrigelu, zajišťuje protein c-Myb účinnou penetraci této bariéry. Pokud je však intersticiální matrix modelovaná *in vitro* vrstvou kolagenu I, je invazivita buněk na expresi genu *MYB* nezávislá. Účinek proteinu c-Myb na chemotaktickou migraci a invazivitu buněk linie MDA-MB-231 *in vitro* je rekapitulován v linii 4T1, není tedy buněčně ani druhově specifický.

Identifikovali jsme několik genů (*CDH11*, *MCAM*, *HTATIP2*, *IL18*, *MMP9*, *MMP1*, *CTSD*, *SNAI2*), jejichž exprese je deregulována v buňkách MDA-MB-231 v důsledku přítomnosti exogenního proteinu c-Myb. Mezi potenciální efekторы proteinu c-Myb v řízení buněčné migrace a invazivity jsme na základě funkčního testování zařadili katepsin D (kódovaný genem *CTSD*), matrixové metaloproteinázy 1/9 a signální dráhu JNK.

Dokumentovali jsme novou funkci proteinu c-Myb v řízení organotropismu metastáz mamárních karcinomů *in vivo*. c-Myb zpomaluje růst ortotopicky implantovaných nádorů 4T1 v syngenním myším modelu a zabraňuje jejich spontánnímu metastázování do plic, aniž by ovlivňoval formování metastáz v kostech a játrech. Jako hypotézu vysvětlující selektivní inhibici vzniku plicních metastáz řízenou protei-

nem c-Myb jsme navrhli omezenou schopnost extravazace buněk s exogenní expresí *MYB* v plicních kapilárách. Toto vysvětlení podporuje námi zjištěná skutečnost, že buňky MDA-MB-231MYBup mají poškozenou funkci transendoteliální migrace *in vitro*.

V buňkách 4T1MYBup jsme zaznamenali sníženou produkci intersticiální kolagenázy *Mmp1a* a ERM proteinu moesinu. Negativní korelaci mezi expresí *MYB* a *MMP1/MSN* mRNA jsme zjistili také v klinických vzorcích prsních karcinomů s využitím databází Oncomine a GEO. Klinická a expresní data z těchto databází ukázala, že vysoká exprese genu *MYB* v primárním nádoru prsu předznamenává nízkou pravděpodobnost vzniku metastáz v plicích. Naopak primární nádory metastázuující do plic, stejně jako sekundární nádorová ložiska v plicích, exprimují ve vysoké míře mRNA *MMP1/MSN*. Represe genů *Mmp1a* a *Msn* řízená proteinem Myb by mohla alespoň částečně vysvětlit nádorově supresivní funkci proteinu c-Myb a směřování metastáz prsních karcinomů mimo plíce v myších modelech *in vivo*. Je možné, že kontrola nad expresí genů *MMP1* a *MSN* zajištěná proteinem c-Myb je relevantní také pro prognózu a metastázování prsních karcinomů onkologických pacientek.

## Poděkování

Tato práce byla podporována granty č. 301/09/1115 a 204/08/H054 Grantové agentury České republiky, grantem NT 13441-4/2012 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví, grantem CZ.1.07/2.3.00/20.0183 Centrum experimentální biomedicíny MŠMT a grantem MUNI/C/0099/ 2009 rektora MU.

## Literatura

- Bauer K., Mierke C., Behrens J. (2007) Expression profiling reveals genes associated with transendothelial migration of tumor cells: a functional role for alphavbeta3 integrin. *Int J Cancer* 121:1910-1918.
- Beaujouin M., Prébois C., Derocq D., Laurent-Matha V., Masson O., et al. (2010) Pro-cathepsin D interacts with the extracellular domain of the beta chain of LRP1 and promotes LRP1-dependent fibroblast outgrowth. *J Cell Sci* 123:3336-3346.
- Benes P., Vashishta A., Saraswat-Ohri S., Fusek M., Pospisilova S., Tichy B., Vetvicka V. (2006) Effect of procathepsin D activation peptide on gene expression of breast cancer cells. *Cancer Lett.* 239: 46-54.
- Bhattarai G., Lee Y.H., Lee N.H., Yun J.S., Hwang P.H., Yi H.K. (2011) c-myb mediates inflammatory reaction against oxidative stress in human breast cancer cell line, MCF-7. *Cell Biochem Funct* 29:686-693.
- Biroccio A., Benassi B., D'Agnano I., D'Angelo C., Buglioni S., et al. (2001) c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am J Pathol* 158:1289-99.
- Cesi V., Casciati A., Sesti F., Tanno B., Calabretta B., Raschella G. (2011) TGFβ-induced c-Myb affects the expression of EMT-associated genes and promotes invasion of ER+ breast cancer cells. *Cell Cycle* 10:4149-4161.
- Deisenroth C., Thorner A.R., Enomoto T., Perou C.M., Zhang Y. (2010) Mitochondrial Hep27 is a c-Myb target gene that inhibits Mdm2 and stabilizes p53. *Mol Cell Biol* 30: 3981-3993.



del Pozo M.A., Nieto M., Serrador J.M., Sancho D., Vicente-Manzanares M., Martínez C., Sánchez-Madrid F. (1998) The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes Commun* 6:125-133.

Drabsch Y., Hugo H., Zhang R., Dowhan D.H., Miao Y.R., Gewirtz A.M., Barry S.C., Ramsay R.G., Gonda T.J. (2007) Mechanism of and requirement for estrogen-regulated MYB expression in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13762-13767.

Drabsch Y., Robert R.G., Gonda T.J. (2010) MYB suppresses differentiation and apoptosis of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 12:R55.

Drake J.M., Strohbehn G., Bair T.B., Moreland J.G., Henry M.D. (2009) ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell* 20:2207-2217.

Estecha A., Sánchez-Martín L., Puig-Kröger A., Bartolomé R.A., Teixidó J., Samaniego R., Sánchez-Mateos P. (2009) Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J Cell Sci* 122:3492-3501.

Foekens J.A., Look M.P., Bolt-de Vries J., Meijer-van Gelder M.E., van Putten W.L., Klijn J.G. (1999) Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 79:300-307.

Foley C.J., Luo C., O'Callaghan K., Hinds P.W., Covic L., Kuliopulos A. (2012). Matrix metalloprotease-1a promotes tumorigenesis and metastasis. *J Biol Chem.* 287:24330-24338.

Francia G., Cruz-Munoz W., Man S., Xu P., Kerbel R.S. (2011). Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 11: 135-141.

Gupta G.P., Nguyen D.X., Chiang A.C., Bos P.D., Kim J.Y., Nadal C., et al. (2007) Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446:765-770.

Hazan R.B., Qiao R., Keren R., Badano I., Suyama K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 1014:155-163.

Chen R.X., Xia Y.H., Xue T.C., Ye S.L. (2010) Transcription factor c-Myb promotes the invasion of hepatocellular carcinoma cells via increasing osteopontin expression. *J Exp Clin Cancer Res* 29:172.

Jiang X., Dutton C.M., Qi W.N., Block J.A., Garamszegi N., Scully S.P. (2005) siRNA mediated inhibition of MMP-1 reduces invasive potential of a human chondrosarcoma cell line. *J Cell Physiol* 202:723-730.

Jiao X., Katiyar S., Liu M., Mueller S.C., Lisanti M.P., Li A., et al. (2008). Disruption of c-Jun reduces cellular migration and invasion through inhibition of c-Src and hyperactivation of ROCK II kinase. *Mol Biol Cell* 19:1378-1390.

Jiao X., Katiyar S., Willmarth N.E., Liu M., Ma X., et al. (2010) c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion. *J Biol Chem* 285:8218-8226.

Koch S., Scifo E., Rokka A., Trippner P., Lindfors M., et al. (2013) Cathepsin D deficiency induces cytoskeletal changes and affects cell migration pathways in the brain. *Neurobiol Dis* 50:107-119.

Külshammer E., Uhlirova M. (2013) The actin cross-linker Filamin/Cheerio mediates tumor malignancy downstream of JNK signaling. *J Cell Sci* 126: 927-938.

Laurent-Matha V., Maruani-Herrmann S., Prébois C., Beaujouin M., Glondu M., et al. (2005) Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J Cell Biol.* 168:489-499.

Lorenzo P.I., Brendeford E.M., Gilfillan S., Gavrilov A.A., Leedsak M., Razin S.V., Eskeland R., Sæther T., Gabrielsen O.S. (2011) Identification of c-Myb Target Genes in K562 Cells Reveals a Role for c-Myb as a Master Regulator. *Genes Cancer* 2:805-817.

Lorusso G., Rüegg C. (2012) New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* 22:226-233.

Malaterre J., Mantamadiotis T., Dworkin S., Lightowler S., Yang Q., Ransome M.I., Turnley A.M., Nichols N.R., Emambokus N.R., Frampton J. Ramsay R.G. (2008) c-Myb is required for neural progenitor cell proliferation and maintenance of the neural stem cell niche in adult brain. *Stem Cells* 26:173-181.

Miao R.Y., Drabsch Y., Cross R.S, Cheasley D., Carpinteri S., et al. (2011) MYB is essential for mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 71:7029-7037.

Minn A.J., Gupta G.P., Padua D., Bos P., Nguyen D.X., et al. (2007). Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6740-6745.

Minn A.J., Gupta G.P., Siegel P.M., Bos P.D., Shu W., et al. (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436:518-524.

Nicolau M., Levine A.J., Carlsson G. (2011) Topology based data analysis identifies a subgroup of breast cancers with a unique mutational profile and excellent survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:7265-7270.

Niggli V., Rossy J. (2008) Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:344-349.

Pattabiraman D.R., Gonda T.J. (2013) Role and potential for therapeutic targeting of MYB in Leukemia. *Leukemia* 27: 269-277.

Peinado H., Olmeda D., Cano A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7:415-428.

Persson M., Andrén Y., Mark J., Horlings H.M., Persson F., Stenman G. (2009) Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18740-18744.

Pulaski B.A., Ostrand-Rosenberg S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* Chapter 20: Unit 20.2. doi: 10.1002/ 0471142735.im2002s39.

Quintana A.M., Liu F., O'Rourke J.P., Ness S.A. (2011). Identification and regulation of c-Myb target genes in MCF-7 cells. *BMC Cancer* 11: 30.

Ramsay R.G., Gonda T.J. (2008). MYB function in normal and cancer cells. *Nat Rev Cancer* 8: 523-534.

Rushton J.J., Davis L.M., Lei W., Mo X., Leutz A., Ness S.A. (2003) Distinct changes in gene expression induced by A-Myb, B-Myb and c-Myb proteins. *Oncogene* 22:308-313.

Sarrió D., Rodriguez-Pinilla S.M., Hardisson D., Cano A., Moreno-Bueno G., Palacios J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68:989-997.

Srivastava S.K., Bhardwaj A., Singh S., Arora S., McClellan S., et al. (2012). Myb overexpression overrides androgen depletion-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells, and confers aggressive malignant traits: potential role in castration resistance. *Carcinogenesis* 33:1149-1157.

Tanno B., Sesti F., Cesi V., Bossi G., Ferrari-Amorotti G., et al. (2010). Expression of Slug is regulated by c-Myb and is required for invasion and bone marrow homing of cancer cells of different origin. *J Biol Chem* 285:29434-29445.

- Tao K., Fang M., Alroy J., Sahagian G.G. (2008) Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 8: 228.
- Thorner A.R., Parker J.S., Hoadley K.A., Perou C.M. (2010) Potential tumor suppressor role for the c-Myb oncogene in luminal breast cancer. *PLoS One* 5(10):e13073.
- Tchou-Wong K.M., Fok S.Y., Rubin J.S., Pixley F., Condeelis J., Braet F., Rom W., Soon L.L. (2006) Rapid chemokinetic movement and the invasive potential of lung cancer cells; a functional molecular study. *BMC Cancer* 6:151.
- Thorner A.R., Parker J.S., Hoadley K.A., Perou C.M. (2010) Potential tumor suppressor role for the c-Myb oncogene in luminal breast cancer. *PLoS One* 5:e13073.
- Waldron T., De Dominici M., Soliera A.R., Audia A., Lacobucci I. et al. (2012). c-Myb and its target Bmi1 are required for p190BCR/ABL leukemogenesis in mouse and human cells. *Leukemia* 26:644-653.
- Walker M.J., Silliman E., Dayton M.A., Lang J.C. (1998). The expression of C-myb in human metastatic melanoma cell lines and specimens. *Anticancer Res* 18:1129-1135.
- Wang X., Lu H., Urvalek A.M., Li T., Yu L., et al. (2011) KLF8 promotes human breast cancer cell invasion and metastasis by transcriptional activation of MMP9. *Oncogene* 30:1901-1911.
- Weston K., Kraemer H., Roux R., Amon W., Darnton J., Dutton S., Harrison R., Jankowski J. (2009) Effect of MYB on invasion and migration in OE33 cells and use as a marker of prognosis in esophageal adenocarcinoma. *Gastrointestinal Cancers Symposium, ASCO*.
- Williams M.R., Sakurai Y., Zughair S.M., Eskin S.G., McIntire L.V. (2009) Transmigration across activated endothelium induces transcriptional changes, inhibits apoptosis, and decreases antimicrobial protein expression in human monocytes. *J Leukoc Biol* 86:1331-1343.
- Xu D., McKee C.M., Cao Y., Ding Y., Kessler B.M., Muschel R.J. (2010) Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1. *Cancer Res* 70:6988-6998.
- Zhao L., Glazov E.A., Pattabiraman D.R., Al-Owaidi F., Zhang P., Brown M.A., Leo P.J., Gonda T.J. (2011) Integrated genome-wide chromatin occupancy and expression analyses identify key myeloid pro-differentiation transcription factors repressed by Myb. *Nucleic Acids Res* 39:4664-4679.
- Zuber J., Rappaport A.R., Luo W., Wang E., Chen C., et al. (2011). An integrated approach to dissecting oncogene addiction implicates a Myb-coordinated self-renewal program as essential for leukemia maintenance. *Genes Dev* 25:1628-1640.



**Mgr. Lucia Knopfová, Ph.D.** je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Svou doktorskou disertační práci (školitel Prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.) obhájila v roce 2013.  
(E-mail: [knopfova@sci.muni.cz](mailto:knopfova@sci.muni.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.

(otázka na funkci genetické poradny): "Těm rodičům se energicky domluví, aby nezatěžovali lidstvo tou patologií."

\*\*\*

"Mediterraní rasa má lepší ochlupení."

\*\*\*

"Rozdíl mezi pokusem chemickým a biologickým je ten, že v chemii ten pokus probíhá tak, jak má probíhat."

\*\*\*

"Nejhlavnější součást mikroskopu je stojan, potom také stolek."

\*\*\*

"Z té nadledvinky se vyleje ten adrenalin a my z toho máme bušení."

\*\*\*

"Kolonie tvoří kouleč válivý - pardon, váleč koulový."

\*\*\*

"Dlouhý krk se vyvinul potřebou žirafy jíst listí ve vyšších polohách."

Nové příslušenství:  
Eppendorf  
ThermoTop®



## Všestranný talent

### Eppendorf ThermoMixer™ a Eppendorf ThermoStat™

Nová generace přístrojů Eppendorf s řízením teploty a mícháním Vám nabízí více, než se na první pohled zdá. Nejenže poskytují univerzální a přesné ovládání teploty, jak jste byli zvyklí, nyní také nabízí vyšší míchací výkon, vynikající ergonomické ovládání a jedinečné víko ThermoTop.

- > <sup>20</sup>Kontrola míchání: výborné výsledky míchání ve všech typech zkumavek.
- > Eppendorf QuickRelease™: ergonomická výměna bloků během 2 sekund bez použití nástroje.
- > Intuitivní ovládání: tlačítka s přednastavenými programy a teplotou.
- > Víko Eppendorf ThermoTop: chrání před kondenzací vzorků.



[www.eppendorf.com/thermomixer-c](http://www.eppendorf.com/thermomixer-c)

Zastoupení v České republice: [www.eppendorf.cz](http://www.eppendorf.cz)  
Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Kolovratská 1476, 251 01 Říčany u Prahy, Tel./Fax.: +420 323 605 454, E-mail: [eppendorf@eppendorf.cz](mailto:eppendorf@eppendorf.cz)

Zastoupení na Slovensku: [www.eppendorf.sk](http://www.eppendorf.sk)  
Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o. - org. zložka, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Tel.: +421 911 181 474, E-mail: [eppendorf@eppendorf.sk](mailto:eppendorf@eppendorf.sk)



## Nový real-time PCR přístroj **LightCycler® 96**

*Na základě více než 10 let zkušeností s Real-time PCR jsme vyvinuli zcela nový gradientový LightCycler® 96, který splňuje náročné požadavky moderní laboratoře na kvalitu, výkon, design a uživatelsky příjemný SW.*

- Nejpřesnější real-time PCR instrument na trhu – optická vlákna zaručují přesné snímání ze všech 96 jamek zároveň
- Gradientový stříbrný blok umožňuje velmi rychlé cyklování, délka trvání amplifikačního běhu < 40 min
- Moderní, uživatelsky příjemný SW Vám ušetří čas při analýze dat
- SW Vás informuje o ukončení běhu a naměřená data Vám odešle e-mailem
- Dotyková obrazovka Vám umožní spustit běh bez použití externího počítače
- Přístroj je velmi tichý, 43 dB (A), nebude Vás rušit, ani pokud ho budete mít přímo na Vašem pracovním stole
- Více na [www.lightcycler96.com](http://www.lightcycler96.com)

Máte-li zájem zdarma vyzkoušet LightCycler® 96 ve Vaší laboratoři, prosím kontaktujte nás na adrese [czech.appliedscience@roche.com](mailto:czech.appliedscience@roche.com).