

**Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela konané dne
4. 12. 2014 v Brně v Univerzitním kampusu v Bohunicích**

Přítomni: Doškař, Mašek, Nešvera, Relichová, Šmarda, Slaninová, Tomáška, Zelený, Knoll, Kočová

Omluveni: Šeda, Angelis, Zadražil, Miadoková, Malachová, Kormuťák

Program schůze:

1. Kontrola zápisu z minulé schůze výboru společnosti, zpráva o činnosti výboru za uplynulé období (červen – listopad 2014)
2. Zhodnocení posledního čísla IL, projednání obsahu následujícího čísla a příprava náplně dalších čísel
3. Zhodnocení konference GSGM
4. Schválení nových přihlášek za člena GSGM a zařazení nově přijatých členů do evidence
5. Projednání dalšího kola soutěže o cenu GSGM, případné změny pravidel udělování této ceny
6. Projednání výsledků voleb do výboru GSGM na období 2015-17
7. Plán akcí GSGM na další období
8. Různé

ad 1)

Schůzi zahájil prof. Doškař uvedením jednotlivých bodů programu. Nejprve stručně probral zápis z minulé schůze výboru a konstatoval, že úkoly, které byly na minulé schůzi stanoveny a formulovány v zápisu byly splněny. Jednalo se zejména o přípravu genetické konference, hodnocení prací přihlášených do soutěže o cenu GSGM, přípravu voleb do výboru společnosti na období 2015 – 2017 a dokončení a vydání nového čísla IL. Všechny tyto úkoly jsou zásadního významu pro činnost společnosti, představují značné časové a organizační nasazení jednotlivých členů společnosti, kteří je zajišťovali, a všechny byly beze zbytku splněny.

ad 2)

Tradičně byla velmi kladně hodnocena vysoká úroveň posledního čísla IL a maximální úsilí, které přípravě a konečné podobě věnuje prof. Šmarda. Ten poté představil nově připravené číslo IL, které bude obsahovat příspěvek Mgr. Ines Kováčikové, Ph.D., která vyhrála cenu GSGM, dva příspěvky Ph.D. studentů, kteří úspěšně obhájili svoje doktorské dizertační práce a některé další zajímavé příspěvky. Požádal přítomné členy výboru o náměty pro další čísla, zejména o upravené autoreferáty úspěšně obhájených doktorských dizertačních prací, které se staly nedílnou součástí IL a představují kvalitní odborné příspěvky v IL.

ad 3)

Prof. Doškař zhodnotil velmi pozitivně konferenci GSGM, která se uskutečnila v září v Průhonicích u Prahy. Konstatoval, že program konference s plenárními přednáškami a

kratšími příspěvky byl na vysoké úrovni. Plenární přednášky pronesli přední odborníci vědy a krátké přednášky představili zejména doktorandi a mladí vědečtí pracovníci. K celkovému úspěchu konference přispěla zejména vysoká účast a zájem mladých odborníků z různých oblastí genetiky. Doprovodný program, včetně udělení cen za nejlepší přednášky a postery a veškeré konferenční zázemí zhodnotil předseda společnosti jako nadstandardní. Obecně se konference těšila velkému zájmu odborníků a organizování těchto akcí bude patřit k prioritním činnostem společnosti i v budoucnu. Na závěr poděkoval prof. Doškař organizátorům za perfektní přípravu a zvládnutí konference, která byla nejdůležitější akcí genetické společnosti v roce 2014.

ad 4)

Prof. Knoll a doc. Slaninová informovali o stavu účtů společnosti a konstatovali, že příjmy a výdaje jsou vyrovnané, společnost hospodaří v souladu s pravidly hospodaření neziskových organizací. Stav účtu je pozitivní, finance budou využity na vydávání IL a na podporu připravovaných seminářů. Dále byly projednány nové přihlášky za člena genetické společnosti. Za období od minulé schůze výboru GSGM bylo doručeno 6 přihlášek z ČR a 2 přihlášky ze SR, které podali Mgr. Alexandr Sember, Ing. Matuš Hornáček, Mgr. Jiří Pergner, Ing. Alena Jurčková, Ing. Čeněk Horecký, Ing. Eliška Horecká, RNDr. Vladimíra Džugasová, Ph.D. a RNDr. Regina Sepšiová, Ph.D. Všechny přihlášky byly jednomyslně schváleny a nově přijatí členové budou zařazeni do evidence.

ad 5)

Výbor se dále zabýval vyhlášením dalšího kola soutěže o cenu GSGM, kterou tradičně věnuje firma M.G.P. Zlín. Dr. Zelený navrhl věnovat hned od počátku vyhlášení soutěže náležitou pozornost propagaci této akce, aby byl zajištěn co možná nejvyšší počet přihlášek. Byl diskutován návrh několika členů výboru na rozdělení ceny na 3 části, což by mohlo představovat další pozitivní motivaci pro vyšší účast v soutěži. Dr. Mašek dále navrhl změnu pravidel udělování této ceny tak, aby podmínkou nebylo členství v GSGM. Soutěž by byla otevřená i pro širší okruh mladých vědeckých pracovníků. Dr. Kočová navrhla v novém výboru jmenovat člena, který by byl koordinátorem soutěže a odpovídal za celý průběh příprav, propagaci a konečnou realizaci soutěže. Prof. Tomáška dále navrhl kromě stávající možnosti přihlášení se do soutěže také možnost nominace vhodného adepta na cenu. Návrh by pak mohl podávat nejen sám pracovník, který splňuje dané požadavky, ale také školitel, popř. vedoucí odborný pracovník. Všichni přítomní členové výboru souhlasili s navrženými změnami a na dalším jednání výboru GSGM bude vyhlášení nového kola soutěže dopracováno do konečného znění.

ad 6)

Předseda volební komise RNDr. Pavel Lízal, Ph.D. vyhlásil výsledky voleb do výboru GSGM na období 2015 – 2017. Do nového výboru byli, v pořadí podle počtu získaných hlasů, zvoleni: Doškař, Šmarda, Kočová, Zdražil, Relichová, Miadoková, Zelený, Tomáška, Slaninová, Knoll, Nešvera, Šeda, Holá, Mašek, Čellárová. Nový výbor bude uvedený do funkce na jarním zasedání, na kterém budou jednotliví členové zvoleni do svých funkcí. Do té doby bude vykonávat činnost stávající výbor.

ad 7)

Prof. Doškař připomněl nabídku Mendelova muzea v Brně týkající se možnosti využít prostory muzea pro organizování odborných seminářů genetické společnosti. V této souvislosti se prof. Tomáška vrátil ke svému návrhu z minulého jednání výboru GSGM uskutečnit seminář zástupců různých univerzit z ČR a SR, který by byl věnovaný formám a obsahu výuky genetiky na vysokých školách a výměně zkušeností v této oblasti. Termín semináře byl předběžně stanovený na druhou polovinu května 2015. Prof. Doškař osloví vedení Mendelova muzea a dohodne vhodný termín. Poté budou osloveni odborníci a zástupci jednotlivých univerzit, kteří by se podíleli na přípravě semináře. Jednalo by se zejména o prezentaci výuky genetiky na jednotlivých fakultách v magisterském stupni studia, z níž by v navazující moderované diskusi mohly vyplynout možnosti propojení výuky, hostující přednáškové kurzy na základě existujících nebo nových bilaterálních smluv, programu Erasmus, apod. Koordinátorem této akce byl pověřený prof. Tomáška ve spolupráci s doc. Slaninovou. Po ustavení nového výboru budou vytýčeny další cíle a úkoly pro nadcházející období.

ad 8)

Prof. Tomáška informoval výbor o přípravě slovenské publikace „Klasické experimenty v genetice“, která by studentům poskytla ucelený přehled klasických objevů v genetice, k nimž se dospělo na základě provedených experimentů. V této souvislosti požádal, zda by bylo možné pokrýt náklady spojené s vydáním této publikace ze slovenského účtu GSGM. Přítomní členové výboru s žádostí souhlasili.

Prof. Tomáška dále požádal výbor o zvážení skutečnosti, zda by bylo možné posunout termín konání další genetické konference, která by se měla uskutečnit v Bratislavě z původně plánovaného roku 2017 až na rok 2018. Důvodem je 50. výročí založení Katedry genetiky Univerzity Komenského v Bratislavě, které připadá na rok 2018. Pro organizátory by bylo přínosné a žádoucí, spojit s tímto výročím i pořádání genetické konference GSGM. Přítomní členové výboru souhlasili.

Zapsala: M. Kočová

Zpráva o činnosti výboru a aktivitách společnosti GSGM za uplynulé funkční období (2012 -2014) přednesená na Valném shromáždění konaném dne 26. 9. 2014 v rámci genetické konference v Průhonicích

Výbor GSGM pracoval v uplynulém volebním období ve složení: předseda – J. Doškař, místopředsedové – J. Relichová, S. Zadražil, L. Tomáška, tajemnice – M. Vojtíšková (do prosince 2013) a M. Kočová, hospodáři: za ČR A. Knoll, za SR M. Slaninová, hlavní redaktor IL – J. Šmarda, koredaktoři K. Malachová, E. Miadoková, O. Šeda, správce webových stránek A. Knoll, organizace soutěže GSGM o Cenu pro mladé věd. pracovníky – M. Vojtíšková, J. Doškař, členové výboru K. Zelený a K. J. Angelis, revizoři účtu – E. Čellárová, A. Kormuťák, T. Mašek a J. Nešvera. Výbor GSGM se scházel pravidelně 2x do roka v podzimním (listopad) a v jarním (květen) termínu. Za

poslední funkční období se výbor sešel celkem na 6 schůzích, na nichž projednal aktuální úkoly vztahující se k činnosti Společnosti. Na každé ze schůzí byl projednán a schválen obsah Informačních listů GSGM, kterých bylo v uplynulé období vydáno celkem 6 čísel (č. 38-43). Obsah a grafická úroveň všech čísel si udržely zásluhou redaktora J. Šmardy velmi dobrý standard, podařilo se zařadit hodnotné přehledné články českých a slovenských vědců zaměřené do různých oblastí genetiky, dále kratší sdělení o činnosti na vybraných genetických pracovištích v České a Slovenské republice a články, a pravidelné informace ze současnosti o konání výstav, vědeckých konferencí včetně podrobné informace o průběhu a hodnocení Genetické konference GSGM pořádané v září 2011 v Lednici. Pravidelně se objevovaly informace o činnosti a akcích pořádaných Mendelianem a Mendelovým muzeem MU v Brně. Součástí všech Informačních listů byly zápisy z jednání výborových schůzí a dále pak přehledy o hospodaření Společnosti, které i v minulém období vykazalo pozitivní bilanci.

Kladně lze hodnotit, že se daří průběžně aktualizovat v uplynulém období inovované webové stránky (<http://www.gsgm.cz>), na nichž jsou již vyvěšeny všechny podstatné informace o činnosti GSGM (zajišťuje správce těchto stránek A. Knoll). Díky M. Kočové je průběžně vedena evidence stávajících členů GSGM a doplňován seznam jejich elektronických adres, které se ukázaly jako velmi přínosné pro rozesílání informací týkajících se pořádání konference GSGM a při organizaci voleb do výboru pro příští období, které byly vyhlášeny v říjnu t.r. Členská základna Společnosti se za poslední období rozrostla o celkem 21 nově přijatých členů. Potěšitelné je, že zájem o členství mají především mladí vědečtí pracovníci a studenti

V prosinci 2012 bylo v IL č. 40 uveřejněno vyhlášení dalšího v pořadí již pátého kola soutěže o Cenu GSGM pro období 2012-2014 pro mladé vědecké pracovníky. Do uzávěrky (duben 2014) podalo přihlášky celkem 5 soutěžících, z nichž byla odbornou komisí sestavenou z členů výboru GSGM jako vítězka vyhodnocena Ines Kováčiková. Stejně jako v minulém kole byla Cena finančně dotována firmou M.G.P., s.r.o. Zlín (bližší informace o výsledku soutěže viz IL 43, červen 2014).

Během uplynulého období se intenzivněji rozvíjela spolupráce s Mendelovým muzeem MU, které se transformuje na instituci pořádající řadu akcí, které přibližují genetiku jak školní mládeži, tak i širší odborné i laické veřejnosti. Tyto aktivity se do značné míry ztotožňují s posláním GSGM a spolupráce obou těchto institucí je vítaná. V únoru 2014 bylo proto uzavřeno Memorandum o spolupráci, jehož smyslem je vedle propagace odkazu G. J. Mendela vzájemná informovanost o pořádaných akcích, sdílení webových stránek a uvádění informací o aktivitách v tiskovinách partnera. Na základě tohoto Memoranda obdrželi všichni stávající členové GSGM průkaz k volnému vstupu do Mendelova muzea a Společnosti byla nabídnuta možnost bezplatného využití (minimálně 1x ročně) prostor Mendelova muzea pro uspořádání jednodenních seminářů, konferencí a dalších akcí. Výbor se na svých příštích zasedáních bude zabývat využitím této nabídky. Jednou z možností je organizování přednášek pracovníků ze sesterských fakult, jejichž náplní by byly informace o výuce genetiky na jednotlivých fakultách, včetně přednášek zaměřených na konkrétní témata, na něž se vyučující jednotlivých univerzit specializují a s nimiž by mohli seznámit jak své kolegy, tak i studenty.

Od r. 2013 se výbor zaměřil na přípravu Genetické konference GSGM 2014. Organizační výbor konference, složený z členů výboru GSGM z pražských pracovišť, zajistil místo konání (Průhonice), finanční zabezpečení a odborný program, následně

pak veškerou agendu související s registrací a účastí přihlášených. Hodnocení konference bude zveřejněno v nadcházejícím čísle Informačních listů.

Výbor opakovaně v IL uveřejňoval výzvy a připomínal členům jejich základní povinnost, a to zaplacení členského příspěvku za kalendářní rok vždy nejpozději do února příslušného roku. Je potěšitelné, že platební morálka se v uplynulém období zlepšila. Současně však vzhledem k narůstajícím nákladům na tisk Informačních listů a jejich rozesílání a dále pak na přípravu akcí (seminářů, konferencí), které výbor pro příští období plánuje, byl předložen návrh na zvýšení příspěvku na 300 Kč a 100 Kč. Tento návrh byl schválen na Valném shromáždění dne 26. 9. 2014.

V říjnu 2014 byly vyhlášeny volby do výboru společnosti na období 2015-2017. V souladu se stanovami byly nejprve přijímány návrhy na kandidáty do nového výboru. Na základě získaných návrhů byla sestavena kandidátní listina, která byla rozeslána všem členům společnosti pro následnou volbu. Volební komise, která pracovala ve složení RNDr. Pavel Lízal, Ph.D. a Doc. RNDr. Jana Řepková, CSc., oznámila výsledek voleb na schůzi výboru. Výsledek bude zveřejněn v IL.

Celkově lze konstatovat, že v uplynulém období činnost Společnosti úspěšně pokračovala a rozvíjela se. Po zvolení nového výboru bude jeho úkolem vytýčit další směry činnosti, které by byly přínosné i pro širší genetickou veřejnost.

Zpráva byla schválena jednomyslně počtem 17 členů GSGM přítomných na Valném shromáždění.

Výbor GSGM

Ohlédnutí za Genetickou konferencí GSGM 2014 v Průhonicích

Dana Štveráková a Jiří Doškař

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 5, 625 00 Brno

V pořadí již osmá Genetická konference GSGM se uskutečnila ve dnech 24. - 26. 9. 2014 v prostorách kongresového centra Floret v Průhonicích. Konference se zúčastnilo více než 130 účastníků z České i Slovenské republiky, z nichž někteří t.č. působí v zahraničních institucích. Během čtyř přednáškových bloků vystoupilo 26 řečníků z vysokých škol a vědeckovýzkumných institucí včetně studentů doktorského studia.

Plenární přednášky byly zaměřeny na aktuální témata z rychle se rozvíjejících oblastí genetiky a molekulární biologie. Přednáška o RNA-interferenci zazněla v podání Doc. Petra Svobody, Dr. Michal Šmahel představil současné a perspektivní možnosti DNA vakcinace a Dr. Daniel Vaněk přiblížil poutavou formou současnou identifikační genetiku. Doc. Juraj Gregáň se ve své přednášce proslovené v angličtině zaměřil na mechanismy segregace chromozomů u kvasinek, Dr. Zuzana Storchová se věnovala vlivu abnormálního počtu chromozomů na osud buňky, Dr. Roman Hobza se zaměřil na evoluci pohlavních chromozomů a vzhledem k nepřítomnosti Prof. Jaroslava Doležela

do své přednášky zařadil též nové informace o genomice rostlin. Prof. Stanislav Zadražil připomněl poutavou formou historii vzniku genetiky a etapy jejího rozvoje na Přírodovědecké fakultě UK v Praze a Dr. Martina Putzová představila přínos sekvenování nové generace v prenatalní a preimplantační diagnostice. Do odborného programu bylo zařazeno též vystoupení zástupců společnosti Merci, která byla generálním sponzorem konference a významně přispěla k zajištění jejího uspořádání. Poslední přednáškový blok byl zakončen přehlednou přednáškou o roli proteinkináz v meiotické segregaci chromozomů u *Schizosaccharomyces pombe*, jejíž autorka Dr. Ines Kováčiková se stala vítězkou soutěže o cenu GSGM 2014.

V plakátové sekci bylo vystaveno více než 60 sdělení ze všech oblastí genetiky a molekulární biologie,

Součástí konference byla již tradičně soutěž o nejlepší plakátové sdělení a přednášku mladých vědeckých pracovníků a studentů. Porota složená z členů výboru GSGM neměla snadnou úlohu, neboť naprostá většina příspěvků byla po obsahové stránce velmi kvalitní a prezentovaná poutavou formou.

Z 35 plakátových sdělení přihlášených do soutěže získala nejlepší hodnocení práce Mgr. Matyáše Šímy z Ústavu molekulární genetiky AVČR, na druhém místě se umístil plakát Mgr. Dany Štverákové z Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU a třetí místo patřilo Bc. Janě Kráčmarové z Laboratoře biochemie RNA Přírodovědecké fakulty UK.

Z jedenácti přednášek byla nejlépe ohodnocena přednáška Dr. Petra Heneberga z 3. lékařské fakulty UK, druhou cenu získala Mgr. Petra Sudzinová z Mikrobiologického ústavu AVČR a jako třetí byl oceněn Mgr. Alexandr Sember z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AVČR.



RNDr. Marie Kočová, CSc. zahajuje konferenci

Bohatý program konference zahrnoval i seznámení účastníků s produkty sponzorů, které byly prezentovány během přestávek. Účastníci konference měli možnost také navštívit Průhonický park susedící s areálem kongresového centra Floret a Dendrologickou zahradu. Součástí programu byl i vydařený společenský večer, který se nesl jak ve znamení přátelských setkání, diskusí o vědecké práci a možnostech vzájemné spolupráce.



Mimořádné poděkování patří členům organizačního výboru, kteří se ujali veškerých organizačních záležitostí, připravili bohatý a hodnotný odborný i společenský program, zajistili vydání sborníku konference též její všestranně hladký průběh. Vysoká účast studentů a mladých vědeckých pracovníků prokázala, že konference pořádané GSGM jsou stále atraktivní díky své pestré skladbě přednášek i plakátových sdělení a mají velmi též dobrý zvuk v širší genetické veřejnosti. Můžeme se proto těšit, že příští konference, která se uskuteční v r. 2018 v Bratislavě, bude stejně úspěšná jako ta letošní.

RNDr. Karel Zelený, CSc. předává Mgr. Ines Kováčikové, Ph.D. cenu GSGM



Předseda Genetické společnosti GSGM, prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc., při svém vystoupení (vlevo) a pohled do auditoria (vpravo) v průběhu konference.

První Léto s vědou v Mendelově Brně úspěšně ukončeno

Eva Matalová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veverčí 97, 602 00 Brno

V minulém čísle IL GSGM jsme zveřejnili pozvánku na aktivity pod hlavičkou Léto s vědou v Mendelově Brně. Ochutnávka programu byla nabídnuta 18. června 2014 v sále Dietrichsteinského paláce, vlastní akce se však již konaly v nově vybudovaném návštěvnickém centru Mendelianum – Atraktivní svět genetiky. Prázdninové středy s genetikou byly realizovány od 2. 7. 2014 do 27. 8. 2014. Dopolední program byl zaměřen na praktickou činnost, odpolední část byla určena pro další vzdělávání a ověření získaných poznatků formou e-learningu. Důraz byl kladen na efektivitu a individuální přístup, proto byl limitován počet účastníků. Bezplatná registrace byla zaplněna během prvního dne otevření. Z důvodu úspěšnosti tohoto cyklu byl prázdninový program prodloužen a jeho modifikovaná verze dosud probíhá pod hlavičkou Středy s JGM. Nabízíme alespoň stručnou reportáž z tohoto programu.

První prázdninová středa s titulem **Mendel, Brno a atraktivní genetika** představila autentické prostory Mendelovy vědecké společnosti a zpřístupnila interaktivní prvky návštěvnického centra. V druhé části byla podpořena kreativita účastníků formou soutěží o věcné ceny. Druhá prázdninová středa **Seznámení s DNA** byla zaměřena na zapojení účastníků do praktické činnosti molekulárně-biologické laboratoře v návštěvnickém centru. Na programu byla izolace DNA z různých zdrojů a její purifikace. Další část se týkala restrikce DNA a jejího využití v dalších metodách. Pod hlavičkou **Geny a antigeny** se skrývalo seznámení s krevními skupinami a principy jejich stanovení. Diskutována byla dědičnost krevních skupin a také vybrané segmenty transfúzní medicíny. Účastníci se seznámili s aglutinační reakcí na principu vazby antigenu a protilátky a sami si vyzkoušeli stanovení krevní skupiny systému AB0. Další týden byl zaměřen na **Molekulární klonování**, kde byla představena především metoda polymerázové řetězové reakce. Účastníci si vyzkoušeli přípravu reakční směsi, nastavení jednotlivých kroků vlastní reakce i detekci PCR produktu. Téma **Genetika a tajemství krve** bylo příkladem cesty z laboratoře ke klinickým aplikacím, kdy byly ukázány možnosti laboratorní diagnostiky v oblasti krevních vzorků. Účastníci si nejenom vyzkoušeli některé metody, ale seznámili se také se základy interpretací výsledků krevní analýzy. Srpnové středy začaly pohledem do buněk. Že **není buňka jako buňka** se účastníci přesvědčili přípravou vlastních preparátů několika typů buněk se zaměřením na epitelové buňky bukalní sliznice a leukocyty, které jsou nejčastějším zdrojem DNA pro další analýzy. Nebyly opomenuty ani buňky kmenové a jejich potenciál. Dalším krokem v hierarchii mnohobuněčného organismu byly tkáně. Středa pod názvem **Molekuly, buňky a tkáně** propojila tyto tři úrovně a ukázala důležitost signálních molekul při tvorbě a funkci tkání. Účastníci si vyzkoušeli některé základní metody zaměřené na mezibuněčné komunikace. Jak probíhají genetické regulace na

úrovni orgánů, nastínila předposlední středa pod hlavičkou **Genetická regulace vývoje orgánů a jejich funkce**. Kromě ukázek týkajících se embryonálního vývoje orgánů byla pozornost zaměřena na funkční orgány na příkladu srdce. Praktické metody zahrnovaly neinvazivní techniky jako je auskultace srdce nebo EKG záznam. Poslední prázdninová středa s genetikou se vrátila k odkazu JGM a pod názvem **Věda Mendelovy a dnešní doby** seznámila s myšlenkami a výzkumem, který prováděl Mendel a jeho interpretacemi v dnešní vědě. Praktická část byla zaměřena na design Mendelových experimentů.



Středy s genetikou v laboratořích návštěvního centra Mendelianum – Atraktivní svět genetiky

Léto s vědou v Mendelově Brně nabídlo také intenzivní vzdělávací kurzy v rámci **Mendelovy letní školy**. Kurzy byly zaměřeny na témata: 1) Jak funguje gen (28. 7. – 1. 8. 2014), 2) Jak funguje buňka (4. 8. – 8. 8. 2014), 3) Jak funguje tkáň (11. 8. – 15. 8. 2014), 4) Jak funguje orgán (18. 8. – 22. 8. 2014), 5) Jak funguje organismus (25. 8. – 29. 8. 2014). Letní škola byla koncipována jako týdenní program simulující reálnou vědeckou práci od studia literatury, zvládnutí metod, formulování hypotéz, designování experimentů, získání výsledků, jejich diskuse a interpretace. Na závěr týdne zavítali účastníci do reálných laboratoří VaV spolupracujících institucí Mendeliana MZM Brno.

Přestože se jednalo o velmi náročný program, většina z 50 účastníků absolvovala Mendelovu letní školu úspěšně. Protože nezbytná limitace počtu neumožnila uspokojení všech zájemců, nabídlo Mendelianum se svými partnery a spolupracovníky ještě týdenní stáže na pracovištích VaV, které byly zahájeny v říjnu 2014 a budou ukončeny v dubnu 2015.

Součástí Mendelovy letní školy byl i Mendelův vzdělávací víkend, který se konal 18. – 20. července 2014 v rodném domě Johanna Mendela v Hynčicích (Vražném). Hlavním tématem bylo využití *genia loci* při popularizace vědy a rozvoj kulturního a vědeckého odkazu J. G. Mendela, kterému se Mendelianum systematicky věnuje již přes padesát let. Představena byla aktualizovaná koncepce Centra Mendelianum jako základny pro vědu, výzkum, popularizaci a vzdělávání. Program víkendu byl doplněn prezentacemi z oblasti využití animovaných programů a přístupů e-learningu. Účastníky víkendu přivítal starosta obce Vražné, Ing. V. Nippert, který poděkoval Mendelianu za klíčovou účast při rekonstrukci Mendelova rodného domu. Také pozval účastníky na právě probíhající slavnosti obce. Ty se konají každoročně u příležitosti připomenutí narození Johanna Mendela. Návrat z víkendu vedl po stopách JGM, které vedly z jeho rodného domu do Brna. Komentovaná prohlídka se týkala zejména Lipníku, kam byl Mendel doporučen učiteli z hynčické školy a Olomouce, kde se Mendelovi i přes finanční a zdravotní těžkosti podařilo dostudovat Filozofický ústav tehdejší univerzity. Poté, jak uvádí ve svém vlastním životopise, zvolil Johann Mendel cestu vyřešení těchto strastí vstupem do starobrněnského kláštera. Tam ho doporučil jeho učitel p. Franz jako studenta, který „měl skoro pořád vynikající známky a mimoto má velmi solidní charakter.“ V Brně byla nejenom účastníkům víkendu nabídnuta procházka místy, která souvisejí s Mendelovým mnohostranným působením v tomto městě. Víkend byl otevřen pro 25 účastníků z řad akademických pracovníků a studentů.



Mendelův vzdělávací víkend – u Mendelů na dvoře, seminář u Mendelů v domě, v Hynčicích na hřbitově, před krajskou hlavní školou v Lipníku.



Materiály k programu Mendelovy letní školy a Mendelova vzdělávacího víkendu byly vydány pod ISBN 9788026308010 a 9788026308003.



Projekt Mendelova interaktivní škola genetiky (CZ.1.07/2.3.00/45.0037) je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.



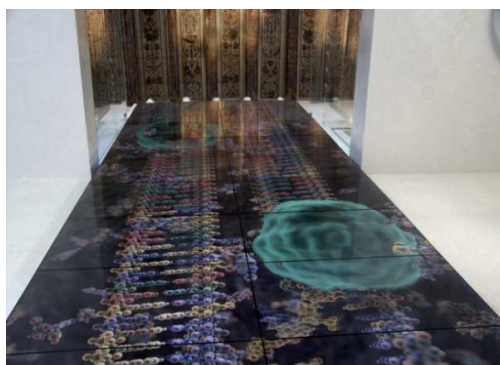
Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. (e-mail: matalova@iach.cz) je vědeckou pracovnící Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., profesorkou na Fakultě veterinárního lékařství VFU Brno) a dlouholetou spolupracovnicí Mendeliana MZM Brno. Aktuálně je odbornou garantkou projektu Mendelianum – atraktivní svět genetiky a Mendelova interaktivní škola genetiky.

Návštěvnícké centrum Mendelianum – Atraktivní svět genetiky zahajuje plný provoz

Jiří Sekerák

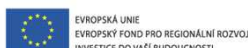
Mendelianum, Moravské zemské muzeum, Zelný trh 6, 659 37 Brno

Projekt Mendelianum – Atraktivní svět genetiky je realizován Moravským zemským muzeem ve spolupráci s dalšími regionálními i zahraničními institucemi. Moravské zemské muzeum je přímým pokračovatelem muzea Hospodářské společnosti. Tato Mendelova vědecká společnost sídlila v Biskupském dvoře v Brně, kde je od roku 2012 lokalizováno Centrum Mendelianum. Projekt návštěvníckého centra je podporován Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem ČR (CZ.1.05/3.2.00/09.0180). Projekt byl zahájen v roce 2012, v červenci 2014 vstoupil do pilotního provozu a 31. 10. 2014 byl úspěšně finalizován. V rámci pilotního provozu připravilo Mendelianum Prázdninové střeďy s genetikou, hostilo Mendelovu letní školu, poskytlo prostor pro konference a studentské aktivity. Do jednotlivých částí centra umožnily nahlédnout Dny otevřených dveří a komentované prohlídky, kterých se zúčastnilo několik set prvních návštěvníků.



Den otevřených dveří návštěvníckého centra 6. srpna 2014.

Nad rámec projektu aktuálně probíhá rekonstrukce dřevěného malovaného stropu v zasedacím sále Hospodářské společnosti, kam Mendel pravidelně docházel a kde je umístěna část návštěvnického centra. Od ledna 2015 je Atraktivní svět genetiky otevřen v režimu plného provozu. Přehled návštěvnických tras, jednotlivých segmentů, speciálních akcí, další informace a aktuality naleznete na www.mendelianum.cz.



Projekt Mendelianum – atraktivní svět genetiky (CZ.1.05/3.2.00/09.0180) je spolufinancován z Evropského fondu pro regionální rozvoj a státního rozpočtu České republiky.



PhDr. Jiří Sekerák, Ph.D. (e-mail: jsekerak@mzm.cz) je vedoucím Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně. Aktuálně působí jako garant expozic projektu Mendelianum - atraktivní svět genetiky.

Junior Mendel Forum 2014

Eva Janečková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veverří 97, 602 00 Brno

Konference pod hlavičkou Mendel Forum jsou každoroční stálíci aktivit Mendeliana Moravského zemského muzea Brno a spolupracujících institucí. V letošním roce byla zavedena novinka doplňující tento program. Jedná se o Junior Mendel Forum určené primárně studentům středních škol se zájmem o vědu a výzkum v oblasti genetiky, molekulární biologie, fyziologie a dalších oblastí. Nabízí nejenom pasivní účast, ale také aktivní prezentace této cílové skupiny. Junior Mendel Forum 2014 probíhalo v Brně ve dnech 10. – 12. září 2014 a bylo připraveno formou diskuse u kulatého stolu, interaktivních seminářů a popularizace vědy a výzkumu.

Informační listy GSGM, 2014, 44: 13 - 15

10. září 2014

**Mendelova mobilní škola
- prezentace programu**

14 - 18 h, Centrum Mendelianum

14 h

Round Table Discussion

(Dr. Abigail Tucker - King's College
London)

15 h

**Mendelova mobilní škola na
SŠ - organizace modulů**

(Dr. Iva Kubištová, Ph.D.)

16 h

**Mendelova mobilní škola v
Centru Mendelianum**

(Mgr. Bc. Eva Janečková)

11. září 2014

**Mendelova mobilní škola
- věda ke studentům**

9 - 15 h, pracoviště partnerských
středních škol projektu Mendelovy
interaktivní školy genetiky

**Interaktivní workshopy pro
studenty**



Představení koncepce Mendelovy
interaktivní školy genetiky a modulů
Mendelovy mobilní školy studentům
středních škol

12. září 2014

**Mendelova mobilní škola
v akci**

9 - 16 h, Festival vědy

9 h, 13 h

Přijďte se podívat na DNA!

10 h, 14 h

Co se dědí a jak: krevní skupiny

11 h, 15 h

**Od genů k funkčním orgánům:
srdce v akci**

12 h

**Mendel jako významná brněnská
osobnost**

Praktické ukázky z programu Mendelovy
mobilní školy pod vedením lektorů
jednotlivých modulů



Junior Mendel Forum 2014 – program, příprava lektorů, studentské semináře a prezentace na Festivalu vědy.



Mgr. Eva Janečková je doktorandkou oboru Molekulární a buněčná biologie PřF MU se školícím pracovištěm na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. Aktuálně je kmenovou lektorkou Mendelovy interaktivní školy genetiky.

Věda v akci: Nobelovská výročí 2014

Eva Matalová

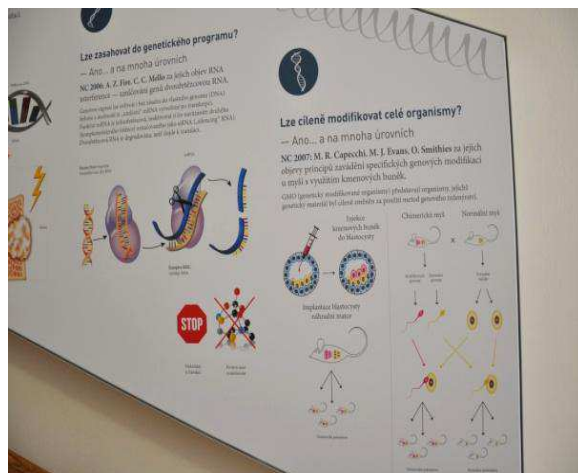
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veveří 97, 602 00 Brno

Cyklus Věda v akci zahrnuje každoročně dvě části. Odpoledne s DNA probíhají na jaře u příležitosti výročí objevu struktury DNA a Nobelovská výročí u příležitosti podzimního vyhlašování Nobelových cen.

Nobelovská výročí jsou zaměřena na ceny za fyziologii a medicínu, ale informují také o oceněných objevech z jiných oblastí, zejména chemie, pokud mají vztah k molekulární biologii a genetice. Letošní ročník, který proběhl ve dnech 4. – 6. listopadu 2014, seznámil s řadou zajímavostí v oblasti Nobelových cen, jejich historií, ale také s nejnovější Nobelovou cenou. Za fyziologii a medicínu ji v roce 2014 získali John O'Keefe, May-Britt Moser, Edvard I. Moser, a to za objev buněk, které tvoří poziční systém mozku. Jedná se o velice atraktivní téma, kdy lze funkce mozku přirovnat k systému GPS. Mozek totiž nějak dokáže řídit náš pohyb v prostoru a čase. Rozezná, kde jsme, navede, kam jdeme a kudy se tam dostaneme. Jak to ale dělá, to zajímalo už starověké myslitele a další vědce po celá staletí. John O'Keefe objevil už před 40 lety základy tohoto systému, při výzkumu funkcí hipokampu. O'Keefe zaznamenal, že určité části této mozkové struktury se aktivují vždy, když se pokusná zvířata nacházejí v daném místě prostoru. O'Keefe došel k závěru, že tyto „poziční buňky“ vytvářejí prostorové mapy. Na jeho práci navázali o dalších 30 let později manželé Moserovi. Ti prokázali další typ buněk, které vytvářejí koordinovaný systém, obdobu souřadnic u GPS. Poruchy této interní navigace mozku se projevují např. u Alzheimerovy choroby, kdy pacienti nejsou schopni poznat okolí, orientovat se v prostoru a najít cestu do dané pozice.

Program Věda v akci byl ale primárně zaměřen na Nobelovská výročí 2014. Ta se týkala připomenutí 5 let od udělení Nobelovy ceny za objev telomer a enzymu telomerázy a 10 let od ocenění objevu strukturní organizace čichového systému. Z těchto dvou témat vycházela praktická část Vědy v akci. Protože telomery úzce souvisejí s nádorovými transformacemi, byl první den akce realizován na pracovišti Masarykova onkologického ústavu. Poslední den pak nabídl pohled do tkání, včetně čichového epitelu, metod jejich zpracování a barvení na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky. Prostřední den Vědy v akci nabídl procházku genetickými příběhy v návštěvnickém centru Mendelianum – Atraktivní svět genetiky. První z příběhů nabízí cestu od

Mendelových experimentů k objasnění genetického kódu, druhý se zabývá procesy vedoucími od jedné buňky k mnohobuněčnému organismu a jeho fungování, třetí je zaměřen na život, smrt a nesmrtelnost. Genetické příběhy v návštěvnickém centru jsou prezentovány na pozadí objevů oceněných Nobelovými cenami za fyziologii a medicínu.



Genetické příběhy v návštěvnickém centru Mendelianum.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

Projekt Mendelova interaktivní škola genetiky (CZ.1.07/2.3.00/45.0037) je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Soutěž Mendelovy rostliny má své vítěze

Iva Kubištová

Gymnázium Brno, tř. Kapitána Jaroše 14, 658 70 Brno

Mendelianum MZM Brno se svými partnery a spolupracovníky připravilo vzdělávací cyklus Mendelovy rostliny. Johann Gregor Mendel, který je jako vědec většinou znám svými pokusy s hrachem a jeřábíčkem, se totiž během své práce zajímal o mnoho dalších rostlin. Rody, které Mendel uvádí ve svých pracích a v dopisech Nägelimu, byly zveřejněny v publikaci Matalová A 2007: G. Mendel: Pokusy s hybridy rostlin (ISBN 978-808-702-8025). Tento vzdělávací cyklus navazuje na dlouholetou prezentaci Mendelových rostlin Mendelianem MZM formou Mendelovy zahrádky v augustiniánském klášteře

Informační listy GSGM, 2014, 44: 16 - 18

na Starém Brně (1965 – 2000) a poté zahrádky Plantae Mendelianae v zahradě ombudsmana, který poskytl Mendelianu přechodné působiště (2001-2007) po vysídlení ze starobrněnského kláštera. Aktuální cyklus byl zahájen vyhlášením foto-grafické a výtvarné soutěže na téma Mendelovy rostliny. Z přihlášených děl bylo vybráno deset favoritů v každé kategorii a ti byli zveřejněni na webové stránce. Veřejné hlasování uzavření 30. 11. 2014 rozhodlo o třech vítězích v každé kategorii. Autoři budou odměněni u příležitosti Středy s genetikou dne 17. 12. 2014 a jejich díla budou zahrnuta do připravované výstavy. Výstava je dalším krokem aktivity Mendelovy rostliny, následovat bude vybudování terasy Mendelových rostlin v návštěvnickém centru Mendelianum s prezentací živých zástupců rodů, kterými se Mendel zabýval, ukázkou Mendelova experimentálního náčiní, metod a dalších prvků. Více informací na www.mendelianum.cz.



Vítězné fotografie soutěže Mendelovy rostliny: hrách, fazol, lichořeřišnice.



Vítězné výtvarné práce soutěže Mendelovy rostliny: 2x rozrazil, hvozdík.



RNDr. Iva Kubištová, Ph.D. působí jako pedagogický pracovník na gymnáziu na třídě Kpt. Jaroše v Brně. Aktuálně spolupracuje s Mendelianem MZM Brno na projektu Mendelianum - atraktivní svět genetiky a na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. je hlavní manažerkou projektu Mendelova interaktivní škola genetiky (e-mail: kubistova@jaroska.cz).

Pozvánka na Mendel Forum 2015

Anna Matalová

Mendelianum, Moravské zemské muzeum, Zelný trh 6, 659 37 Brno

Jubilejní Mendel Forum 2015 je organizováno u příležitosti oslav 150. výročí zveřejnění Mendelových přednášek o hybridních rostlin. Tyto přednášky prezentované 8. 2. a 8. 3. 2014 pro Přírodovědecký spolek na Státní vyšší reálce na Jánské ulici v Brně byly o rok později zveřejněny v časopise *Verhandlungen des naturforschenden Vereines*. Tento časopis vydával Přírodovědecký spolek, který se vznikl z přírodovědné sekce Hospodářské společnosti. Mendel byl jeho významným členem a cítil se v něm mezi svými. Členové Hospodářské společnosti jako jediní na světě ocenili Mendelovy experimenty a související závěry jako epochální ještě za jeho života. Druhým připomenutím v rámci Mendel Forum 2015 je 50. leté výročí otevření Mendeliana Moravského muzea. S tím souvisí inaugurace moderního komplexu Centra Mendelianum v prostorech Mendelovy vědecké společnosti lokalizovaných v Biskupském dvoře.

Mendel Forum 2015 je koncipováno jako dvě nezávislé akce. Weekend with JGM (6. – 8. 3. 2015) je určen především pro odborníky a vysokoškolské studenty, Týden s JGM (6. – 12. 3. 2015) pak nabízí program především pro střední školy a veřejnost.

Bezplatná registrace na Weekend s JGM je otevřena na www.mendel-brno.cz

Na téže adrese je zveřejněn aktualizovaný program Mendel Forum 2015.

Těšíme se na vaši účast!



PhDr. Anna Matalová je dlouholetou pracovnící Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně (do odchodu do důchodu působila jako vedoucí). Aktuálně je hlavním odborným konzultantem projektu Mendelianum – atraktivní svět genetiky a koordinátorkou projektu Mendelova interaktivní škola genetiky.

Informační listy GSGM, 2014, 44: 18 - 20

Mendel Forum 2015

Weekend with JGM

1st Announcement, Call for Abstracts

March 6 – 8, 2015

Centrum Mendelianum, Muzejni 1,
Brno – city centre, Czech Republic



Registration

- ✓ Free of charge, limited number of participants
- ✓ Deadline for abstract submission: Dec 31, 2014
- ✓ www.mendel-brno.cz, MF2015@email.cz

Topics

- ✓ Mendel as a scientist and multifaceted person
- ✓ Mendel's Scientific Society – a great variety of ideas in a small space
- ✓ Mendel's Scientific Collegium – Brno and the world
- ✓ Mendel's Discovery in modern scientific context
- ✓ Interpretations of Mendel's scientific work
- ✓ Multidisciplinary applications of Mendel's ideas
- ✓ Miscellaneous



- ✓ 150 years since the publication of Mendel's discovery in Brno
- ✓ 50 years since the opening of the Mendelianum of the Moravian Museum
- ✓ Opening of Centrum Mendelianum in the authentic rooms of Mendel's scientific society in Brno

Úloha proteín kináz v segregácii chromozómov počas meiózy u kvasiniek *Schizosaccharomyces pombe*

Ines Kováčiková

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Bratislava, Slovenská republika a Viedenská Univerzita, Max F. Perutz Laboratóriá, Oddelenie Chromozómovej Biológie, Viedeň, Rakúsko

Abstrakt

Fosforylácia proteínov pomocou proteín kináz je hlavným regulačným mechanizmom v bunke. Genóm kvasiniek *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) kóduje 106 proteín kináz, pričom ich funkcia bola charakterizovaná len asi u polovice z nich. U niektorých, ako je napr. Cdc2, Bub1 alebo Ark1, bola objavená ich dôležitá funkcia pri segregácii chromozómov počas meiózy (2,7,8).

S cieľom identifikovať proteín kinázy podieľajúce sa na meiotickej segregácii chromozómov, sme podrobili skríningu kolekciu haploidných delečných mutantov. Charakterizovali sme úlohu proteín kinázy Mph1, ktorá patrí do evolučne konzervovanej rodiny kináz Mps1 zodpovedných za reguláciu formovania deliaceho vretienka. Zistili sme, že táto kináza plní dôležitú úlohu pri segregácii homologických chromozómov počas prvého meiotického delenia. Ďalej sme objasnili novú funkciu proteín kinázy Spo4, ktorá je ortológom Dbf4-závislej Cdc7 kinázy u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Táto úloha spočíva v regulácii správnej dĺžky mikrotubulov deliaceho vretienka v anafáze II. V neprítomnosti Spo4 kinázy, sa abnormálne predĺžené mikrotubuly deliaceho vretienka anafázy II prekrývajú, a tým narúšajú lineárne usporiadanie jadier v asku. Tiež sme zistili, že tento defekt, spôsobený deléciou *spo4* génu, je čiastočne potlačený inhibíciou Cdc2-as kinázy, čo naznačuje, že porucha v regulácii aktivity tejto cyklín-závislej kinázy môže byť príčinou abnormálneho predlžovania mikrotubulov deliaceho vretienka v anafáze II u *spo4Δ* mutantných buniek.

Úvod

Poruchy segregácie chromozómov počas meiózy sú častou príčinou neplodnosti a genetických porúch u človeka. Najznámejšie z nich sú Downov syndróm, Patauov alebo Edwardsov syndróm. Spomenuté poruchy sú väčšinou dôsledkom aneuploidie, ktorá patrí k najčastejším chromozómovým abnormalitám. Aneuploidia sa tiež považuje za hlavnú príčinu spontánnych potratov. Z klinického hľadiska je preto diagnostika a prevencia neplodnosti a aneuploidie veľmi dôležitá.

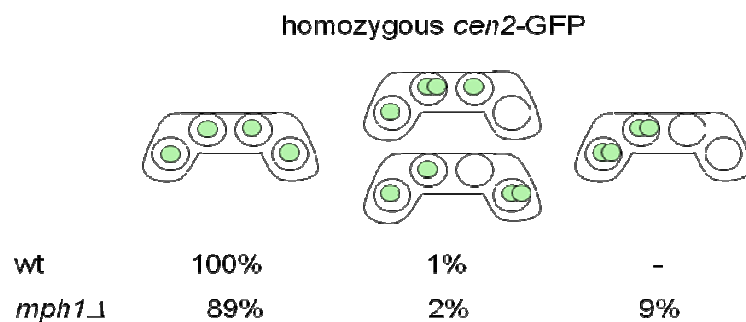
Informační listy GSGM, 2014, 44: 21 - 27

V našej práci sme sa zamerali na identifikáciu dosiaľ neznámych regulátorov meiotickej segregácie chromozómov s cieľom objasniť ich funkciu v tomto procese a prispieť tak k celkovému poznávaniu mechanizmov, ktoré sa podieľajú na non-disjunkcii chromozómov v meióze. Proteín kinázy patria k najdôležitejším regulátorom v bunke. Kontrolujú nespočetné množstvo procesov, vrátane rastu bunky, komunikácie s vonkajším a vnútorným prostredím, vývoja bunky a jej rozmnožovania. Sú schopné meniť elektrostatické vlastnosti proteínov tým, že prenášajú záporne nabitú fosfátovú skupinu z vysoko-energetickej molekuly ATP na nukleofilný atóm kyslíka (12). Tento mechanizmus, známy ako fosforylácia proteínov, je jedným z najviac využívaných v bunke.

Výsledky

Po uskutočnení skríningu neesenciálnych proteín kináz sme objavili dôležitú meiotickú funkciu dvoch proteín kináz Mph1 a Spo4. Okrem toho sme potvrdili, že kináza Bub1 hrá kľúčovú úlohu pri segregácii chromozómov počas meiózy (1,17). U mutantov, *hhp2Δ*, *ppk24Δ*, *mug27Δ* a *atg1Δ* (*ppk36Δ*), sme zaznamenali rôzne meiotické defekty, ako je určitá missegregácia chromozómov, tzv. lagging chromozómy alebo asky s chybnou morfológiou spór. Rovnaké poruchy boli pozorované u *hhp2Δ* a *mug27Δ* mutantov aj inou skupinou vedcov (10,15,16).

Ďalej sme charakterizovali funkciu serín-treonínovej proteín kinázy, Mph1, a to pri disjunkcii chromozómov počas meiotického delenia. Gén kódujúci proteín kinázu Mph1 je „upregulovaný“ počas meiózy a vykazuje sekvenčnú a funkčnú podobnosť s kinázou Mps1 kvasiniek *S. cerevisiae*, ktorá je súčasťou kontrolného bodu regulujúceho správne formovanie deliaceho vretienka. Tento kontrolný bod umožňuje formovanie deliaceho vretienka len v prípade, keď všetky mikrotubuly sú správne pripojené ku kinetochóm chromozómov. Bunky s defektným kontrolným bodom väčšinou vstupujú do bunkového delenia predčasne, čoho následkom je porucha rozchádzania sa chromozómov.



Obr. 1. Proteín kináza Mph1 zohráva dôležitú úlohu v procese homologickej segregácie chromozómov v prvom meiotickom delení buniek. Rozchádzanie sa chromozómu číslo II počas meiózy bolo pozorované u divého kmeňa *h⁹⁰ cen2*-GFP (12618) a u kmeňa *h⁹⁰ cen2*-GFP obsahujúceho mutantnú alelu *mph1* (*mph1Δ*) (15607). Segregácia chromozómov bola hodnotená fluorescenčným mikroskopom u najmenej 100 askov s označenou DNA bola pomocou farbiva Hoechst.

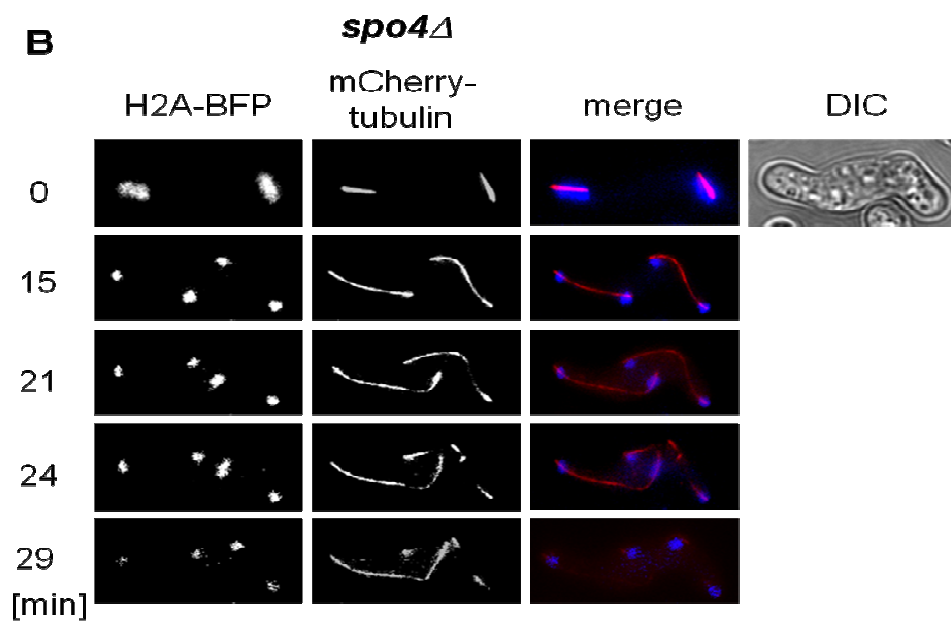
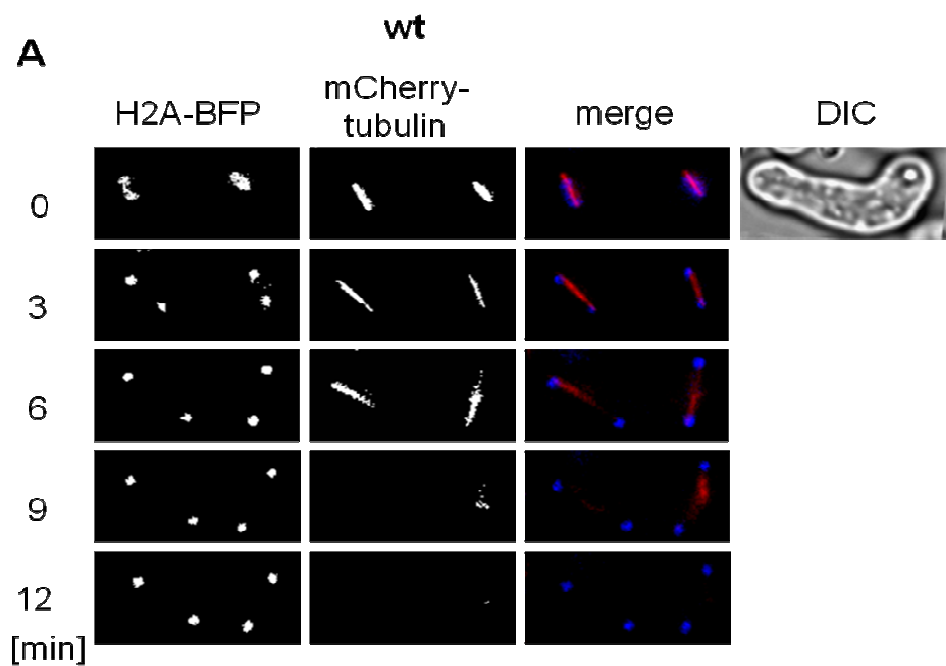
Naše výsledky ukázali, že proteín kináza Mph1 má dôležitú úlohu pri segregácii homologických chromozómov počas prvého meiotického delenia (obr. 1). Aj keď kontrolný bod regulujúci správne formovanie deliaceho vretienka predstavuje veľmi presný mechanizmus, jeho funkcia môže byť počas meiózy I redukovaná (9,15,18). V takomto prípade sú bunky schopné vstúpiť do anafázy I predčasne. Následkom toho je výskyt non-disjunkcie homologických chromozómov pozorovaný pri prvom meiotickom delení (1,7,11). Preto predpokladáme, že u *mph1Δ* buniek je tento defekt výsledkom zmenenej funkcie Mph1 kinázy pri kontrole správneho formovania deliaceho vretienka.

V našej práci sme tiež objasnili novú funkciu proteín kinázy Spo4, ktorá je ortológom Dbf4-závislej Cdc7 kinázy u kvasiniek *S. cerevisiae*. Všetky známe eukaryotické Cdc7-odvodené kinázy zohrávajú esenciálnu funkciu pri iniciácii replikácie DNA počas obidvoch bunkových delení, mitózy a meiózy (6,13). U *S. cerevisiae* je Dbf4-Cdc7 komplex taktiež zahrnutý do mono-orientácie sesterských kinetochórov počas prvého meiotického delenia (14). Kvasinky *S. pombe* obsahujú dva Cdc7 ortológy s názvom Spo4 a Hsk1. Proteín Hsk1, je dôležitý pre iniciáciu S fázy, rovnako ako jeho ortológ u *S. cerevisiae* (3,4). Jeho úloha nebola ešte pri štúdiu mono-orientácie sesterských chromatíd objavená. Prekvapujúco, Spo4 ako druhý Cdc7 ortológ u kvasiniek *S. pombe*, zohráva úplne odlišnú úlohu, a to pri iniciácii a progresii druhého meiotického delenia.

Pokúsili sme sa zistiť či Spo4 kináza je zahnutá v procese mono-orientácie sesterských kinetochórov počas meiózy I, rovnako ako jej ortológ (Dbf4-Cdc7 komplex) u *S. cerevisiae*. Po detailnej analýze segregácie chromozómov označených GFP značkou, sme zistili, že kináza nemá významnú úlohu v tomto procese. Objavili sme však jej novú funkciu pri regulácii správnej dĺžky mikrotubulov deliaceho vretienka v anafáze II. V neprítomnosti Spo4 kinázy, sa abnormálne predĺžené mikrotubuly deliaceho vretienka anafázy II prekrývajú, a tým narúšajú lineárne usporiadanie jadier v asku. Okolo 60% buniek obsahujúcich deletovaný *spo4* gén sa vyznačovalo extrémne dlhými mikrotubulami deliaceho vretienka pri druhom meiotickom delení (obr. 2). Taktiež sme pozorovali niekoľkonásobné predĺženie anafázy II v porovnaní s divým typom.


Správna dĺžka mikrotubulov deliaceho vretienka a jej regulácia je kritická pri oboch bunkových deleniach, v mitóze aj v meióze. Napriek tomu, molekulárne mechanizmy a proteíny podieľajúce sa kontrole tohto procesu, sú ešte málo charakterizované. Z tohto dôvodu sme sa pokúsili charakterizovať mechanizmus regulácie dĺžky mikrotubulov deliaceho vretienka a anafázy pri druhom meiotickom delení. Z literatúry je známe, že regulácia aktivity cyklín-závislých kináz je esenciálna pre progresiu rôznych štádií bunkového cyklu, vrátane anafázy. Preto sme rozhodli použiť analóg-senzitívnu Cdc2-as alelu, ktorú sme zablokovali špecifickým inhibítorom (1-NM-PP1). Predpokladali sme, že ak Cdc2 zohráva dôležitú úlohu pri regulácii dĺžky mikrotubulov deliaceho vretienka a anafázy pri druhom meiotickom delení, potom jej inhibícia potlačí *spo4Δ* defekt.

Naša hypotéza bola správna, pretože defekt spôsobený deléciou *spo4* génu, bol čiastočne redukovaný (zo 60% na 31%) inhibíciou Cdc2-as kinázy (obr. 3). Naznačuje to, že porucha v regulácii aktivity tejto cyklín-závislej kinázy môže byť príčinou abnormálneho predlžovania mikrotubulov deliaceho vretienka v anafáze II u *spo4Δ* mutantných buniek.



Obr. 2. „Live cell imaging“ mikroskopia mikrotubulov deliaceho vretienka v anafáze II u divého kmeňa *h⁻* mCherry-*atb2* *hta2*-TagBFP (wt) (JG16499), ktorý bol krížený s opačným párovacím typom kmeňa *h⁺* rovnaneho genotypu (JG16486). Rast mikrotubulov deliaceho vretienka počas meiózy II sme analyzovali pomocou „live cell imaging“ mikroskopie. Čísła vľavo indikujú čas v minútach.

heterozygous *cen2*-GFP



| | | | |
|------------|---------------------------------|-----|-----|
| | <i>spo4</i> Δ | 40% | 60% |
| | <i>spo4</i> Δ <i>cdc2-as</i> | 62% | 38% |
| + 1-NM-PP1 | <i>spo4</i> Δ | 42% | 58% |
| | <i>spo4</i> Δ <i>cdc2-as</i> | 69% | 31% |

Obr. 3. Inaktivácia Cdc2-as kinázy čiastočne potlačila mutantný fenotyp u *spo4*Δ buniek. Kmeň *h*⁻ *cen2*-GFP obsahujúci mutantnú alelu *spo4* (*spo4*Δ) (JG14873) bol krížený s kmeňom opačného párovacieho typu *h*⁺ s rovnakým genotypom bez *cen2*-GFP značky (JG14872). Taktiež kmeň s mutantnou alelou *spo4* a analóg-senzitívnou alelou *cdc2* (*spo4*Δ *cdc2-as*) (JG16848) bol krížený s kmeňom opačného párovacieho typu bez *cen2*-GFP značky (JG16858). Na indukciu sporulácie boli použité sporulačné misky (PMG-N). Po 24–43 hod inkubácii pri 25°C boli bunky premyté vodou a znovu inkubované v sporulačnom médiu PMG-N v prítomnosti alebo bez prítomnosti inhibítora (5μM 1-NM-PP1) pri 25°C po dobu 4–7 hod. DNA u buniek bola vizualizovaná pomocou Hoechst farbiva a segregácia *cen2*-GFP značiek bola hodnotená u najmenej 50 askov.

Záver

Naša práca potvrdila dôležitú úlohu reverzibilnej fosforylácie proteínov v segregácii chromozómov počas meiotického delenia buniek u kvasiniek *S. pombe*. Identifikovali sme úlohu proteín kinázy Mph1 v segregácii homologických chromozómov počas prvého meiotického delenia. Pozorovaný fenotyp homologickej nondisjunkcie u buniek s mutantným Mph1 génom je pravdepodobne spôsobený defektom v regulácii formovania deliaceho vretienka, čo má za následok predčasný vstup takto mutantných buniek do anafázy I.

Objavili sme tiež novú funkciu Spo4 proteín kinázy v regulácii meiotickej progresii a v kontrole správnej dĺžky mikrotubulov deliaceho vretienka v anafáze II. Táto funkcia nebola zatiaľ opísaná u žiadnej z Cdc7-príbuzných kináz. Spo4 kináza má ako jediná z tejto rodiny kináz úplne odlišnú funkciu a nie je zahrnutá v kontrole mono-orientácie sesterských kinetochórov v meióze I ako to bolo pozorované u kvasiniek *S. cerevisiae*.

Pomocou ďalších experimentov, v ktorých sme inhibovali analóg-senzitívnu Cdc2-as alelu bol defekt u *spo4* mutantných buniek čiastočne potlačený. Naznačuje to, že porucha v regulácii aktivity Cdc2 kinázy môže byť príčinou abnormálneho predlžovania mikrotubulov deliaceho vretienka v anafáze II u *spo4*Δ mutantných buniek.

V budúcnosti by bolo zaujímavé objasniť úlohu druhého ortológa u kvasiniek *S. pombe*, Hsk1, ktorý rovnako ako Spo4 patrí do rodiny Cdc7-odvodených kináz. Úloha

tejto kinázy nie je zatiaľ známa a na základe funkcie jej ortológa u kvasiniek *S. cerevisiae*, sa predpokladá, že má úlohu v kontrole mono-orientácie sesterských kinetochórov v meióze I.

Literatúra

1. Bernard, P., Maure, J. F., Javerzat, J. P. (2001). Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nat Cell Biol.* **3**(5): 522-526.
2. Bettencourt-Dias, M., Giet, R., Sinka, R., Mazumdar, A., Lock, W. G., Balloux, F., *et al.* (2004). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature.* **432**(7020): 980-987.
3. Brown, G. W., Kelly, T. J. (1998). Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem.* **273**(34): 22083-22090.
4. Brown, G. W., Kelly, T. J. (1999). Cell cycle regulation of Dfp1, an activator of the Hsk1 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(15): 8443-8448.
5. Chen, Y., Huang, J., Liu, P., Qiao, J. (2007). Analysis of meiotic segregation patterns and interchromosomal effects in sperm from six males with Robertsonian translocations. *J Assist Reprod Genet.* **24**(9): 406-411.
6. Donaldson, A. D., Fangman, W. L., Brewer, B. J. (1998). Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins. *Genes Dev.* **12**(4): 491-501.
7. Gilliland, W. D., Hughes, S. E., Cotitta, J. L., Takeo, S., Xiang, Y., Hawley, R. S. (2007). The multiple roles of mps1 in Drosophila female meiosis. *PLoS Genet.* **3**(7): e113.
8. Gregan, J., Rabitsch, P. K., Sakem, B., Csutak, O., Latypov, V., Lehmann, E., *et al.* (2005). Novel genes required for meiotic chromosome segregation are identified by a high-throughput knockout screen in fission yeast. *Curr Biol.* **15**(18): 1663-1669.
9. Hawley, R. S. (2011). Oogenesis: when most is good enough. *Curr Biol.* **21**(8): R288-290.
10. Ishiguro, T., Tanaka, K., Sakuno, T., Watanabe, Y. (2010). Shugoshin-PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nat Cell Biol.* **12**(5): 500-506.
11. Malmanche, N., Owen, S., Gegick, S., Steffensen, S., Tomkiel, J. E., Sunkel, C. E. (2007). Drosophila BubR1 is essential for meiotic sister-chromatid cohesion and maintenance of synaptonemal complex. *Curr Biol.* **17**(17): 1489-1497.
12. Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* **27**(10): 514-520.
13. Masai, H., Arai, K. (2002). Cdc7 kinase complex: a key regulator in the initiation of DNA replication. *J Cell Physiol.* **190**(3): 287-296.
14. Matos, J., Lipp, J. J., Bogdanova, A., Guillot, S., Okaz, E., Junqueira, M., *et al.* (2008). Dbf4-dependent CDC7 kinase links DNA replication to the segregation of homologous chromosomes in meiosis I. *Cell.* **135**(4): 662-678.
15. Rumpf, C., Cipak, L., Novatchkova, M., Li, Z., Polakova, S., Dudas, A., *et al.* (2010). High-throughput knockout screen in *Schizosaccharomyces pombe* identifies a novel gene required for efficient homolog disjunction during meiosis I. *Cell Cycle.* **9**(9): 1802-1808.
15. Sebestova, J., Danylevska, A., Novakova, L., Kubelka, M., Anger, M. (2012). Lack of response to unaligned chromosomes in mammalian female gametes. *Cell Cycle.* **11**(16): 3011-3018.
16. Tan, J. H., Wang, H. L., Sun, X. S., Liu, Y., Sui, H. S., Zhang, J. (2009). Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod.* **15**(1): 1-9.
17. Vaur, S., Cubizolles, F., Plane, G., Genier, S., Rabitsch, P. K., Gregan, J., *et al.* (2005). Control of Shugoshin function during fission-yeast meiosis. *Curr Biol.* **15**(24): 2263-2270.

18. Yin, L., Locovei, A. M., D'Urso, G. (2008). Activation of the DNA damage checkpoint in mutants defective in DNA replication initiation. *Mol Biol Cell*. **19**(10): 4374-4382.



Mgr. Ines Kováčiková, Ph.D. (e-mail: ines.kovacikova@gmail.com) je absolventkou Katedry genetiky Prirodovedeckej fakulty UK v Bratislave a její práce byla oceněna udělením Ceny Genetické společnosti Gregora Mendela v roce 2014.

Cílená léčba AML1-ETO pozitivní akutní myeloidní leukémie inhibitory deacetyláz histonů

Michal Zápotocký

Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Abstrakt

Akutní myeloidní leukémie (AML) je heterogenní skupina maligních onemocnění charakterizovaná blokem diferenciací myeloidních progenitorů, proliferační výhodou a ztrátou schopnosti apoptózy. Léčba AML se v průběhu posledních dekád vylepšila, přesto lze vyléčit pouze část pacientů kombinací toxických cytostatik. V leukemogenezi t(8;21) pozitivní leukémie se předpokládá, že represorový komplex asociovaný s chimérickým proteinem AML1-ETO váže deacetylázy histonů (HDAC), inhibuje expresi cílových genů AML1 a tím způsobuje blok v myeloidní diferenciaci. Valproová kyselina (VPA) je schopna inhibovat HDAC a proto by mohla být vhodným kandidátem v léčbě AML1-ETO pozitivní AML. Hlavním cílem práce bylo charakterizovat diferenciací efekt VPA na AML1-ETO pozitivní leukemické buňky a určit změny v expresi cílových genů AML1. Buňky Kasumi-1 (M2 AML1-ETO pozitivní), Kasumi-6 (M2 AML1-ETO negativní), MV4-11 (MLL-AF4 pozitivní) a K562 byly léčeny VPA a 12-O-tetra-decanoylforbol-13-acetátem (TPA), vyšetřeny průtokovou cytometrií a qRT-PCR. AML1-ETO pozitivní a negativní primární patientské blasty ze dne diagnózy byly ovlivněny VPA a TPA k potvrzení zjištění *in vitro*. VPA indukovala apoptózu u AML1-ETO pozitivních a MLL-AF4 pozitivních buněk. Změny v imunofenotypu prokazující diferenciaci byly pozorovány pouze u AML1-ETO pozitivních buněk (pokles exprese CD33/34/117 a nárůst CD11a/11b). Ukázalo se, že diferencované buňky jsou také Annexin V pozitivní, tudíž

Informační listy GSGM, 2014, 44: 27 - 37

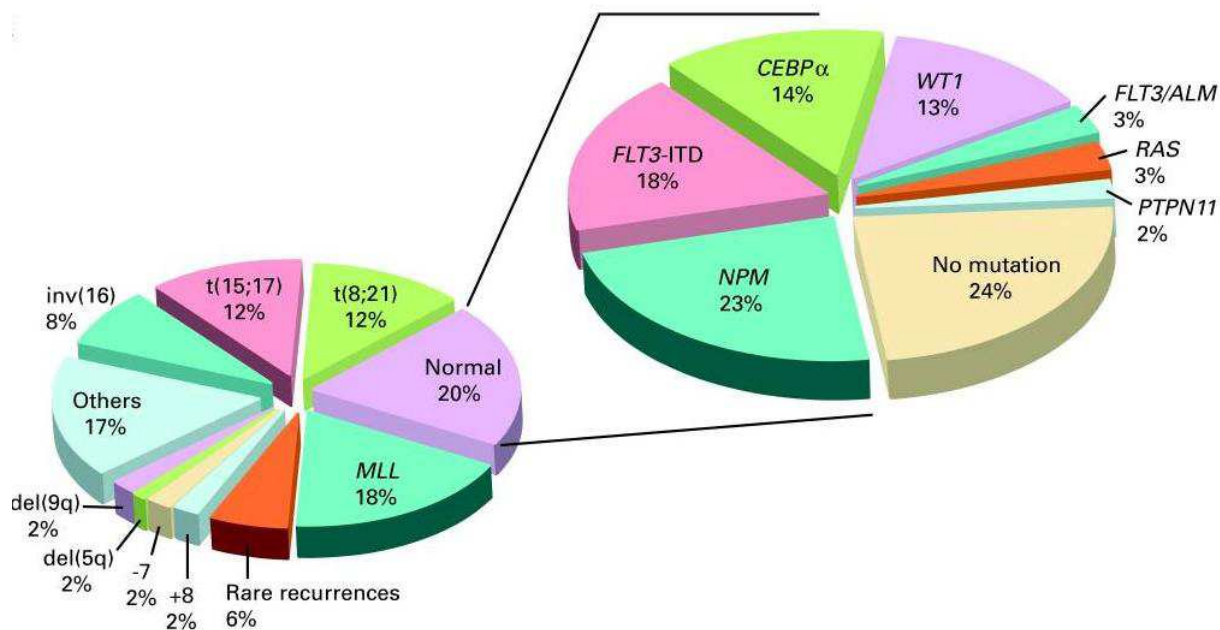
jsme dále zkoumali vztah mezi diferenciací a buněčnou smrtí. Apoptóza byla zablokována kaspázovým inhibitorem a přesto zůstala diferenciací nezměněna. TPA byl použit k vyloučení neschopnosti AML1-ETO negativní linie diferencovat a zjistili jsme, že tato linie podstoupí po léčbě TPA monocytární diferenciaci. Pomocí kvantifikace mRNA jsme prokázali, že léčba VPA zvýšila expresi genů *PU.1*, *IGFBP7*, *BPI* a *C/EBP α* pouze u AML1-ETO pozitivní linie a nikoliv u ostatních testovaných linií. U všech patientských vzorků z kostní dřeně byla indukována apoptóza bez ohledu na genotyp, ale změny v imunofenotypu ve smyslu diferenciací se ukázaly být specifické pouze pro blasty s fúzí AML1-ETO. Poskytli jsme validní důkaz diferenciací specifické pro AML1-ETO pozitivní buňky doprovázené vzestupem exprese původně epigeneticky umlčených genů. Naše zjištění týkající se diferenciací následované apoptózou vneslo nový pohled na mechanismus účinku starého léku. Navíc naše data podporují hypotézu, že AML1-ETO pozitivní pacienti by mohli mít z léčby VPA největší benefit.

Úvod

Nádorová onemocnění u dětí jsou vzácná, třebaže jejich incidence v posledních 30 letech narůstá (14). Leukémie jsou skupinou nejčastějších zhoubných nádorových onemocnění dětského věku, kdy představují celkem 25-30 % všech malignit. Většina leukémií u dětí připadá na akutní typ onemocnění, u kterého 80 % představuje ALL (akutní lymfoblastická leukémie) a v 20 % se jedná o AML (akutní myeloidní leukémie). AML zahrnuje heterogenní skupinu maligních onemocnění krvetvorby charakterizovanou zástavou diferenciací a maligní klonální transformací hematopoetické kmenové buňky nebo myeloidního progenitoru. Následkem je akumulace myeloidních leukemických blastů v kostní dřeni, jejich vyplavování do periferní krve a infiltrace extramedulárních orgánů (10). V současnosti lze vyléčit přibližně dvě třetiny dětských pacientů s AML s udávanou pravděpodobností pětiletého OS (celkového přežití) kolem 70% v závislosti na použitém léčebném protokolu. Konkrétně pracovní skupina BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), jejíž součástí jsou i dětská hematologická centra v ČR, publikovala výsledky léčby dětské AML s pravděpodobností celkového pětiletého OS 66 % (5). Obdobných výsledků dosahuje v léčbě dětských AML i protokol vyvinutý v SJRCH (Saint Jude Research Childrens Hospital) v USA s pravděpodobností pětiletého OS 70 % (16). Zatím nejlepší léčebné výsledky zaznamenala japonská pracovní skupina s protokolem AML99 a pravděpodobností pětiletého OS 75 % (18). V současné době lze u 90 % případů dětské AML detegovat alespoň jednu genomickou abnormalitu (15) (obr. 1).

Translokace t(8;21)(q22;q22), která je detegována u 10 – 15 % pacientů, je asociována s podtypem M2 AML a je spojena s dobrou prognózou (7, 19). Tato translokace se zlomy na chromozomech 8q22 a 21q22.3 vede ke vzniku fúzního genu *AML1-ETO*, který je možné v literatuře najít pod názvy *RUNX1-MTG8*, *AML1-MTG8* nebo *RUNX1-RUNX1T1*. Chimérický protein AML1-ETO obsahuje N-koncovou oblast AML1 s DNA vazebnou doménou, k němuž je fúzován téměř celý ETO (12). ETO asociuje s proteiny, které tvoří represorový komplex. Takovými proteiny jsou NCoR (nuclear corepressor), SMRT (silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor) a HDAC (histone deacetylase). Vazba AML1-ETO do genových regulačních

oblastí navozuje umlčení exprese cílových genů AML1. To má za následek blok v diferenciaci a iniciaci programu sebeobnovy (1,3).



Obr. 1: Zastoupení jednotlivých chromozomálních abnormalit a specifických genových mutací u dětské AML. Převzato z (15).

Remodelace chromatinu hraje důležitou roli v regulaci genové exprese. Jedním z remodelačních mechanismů je acetylace a deacetylace N-koncových histonových výběžků za katalytického působení enzymů histonové acetyl-transferázy (HAT) a HDAC. Přenesení acetylového negativně nabitého zbytku na lyzin neutralizuje kladný náboj a uvolní vazbu s DNA, což vede k relaxaci chromatinu a zvýšení přístupnosti transkripčních faktorů k promotorům cílových genů. Naopak HDAC odstraněním acetylového zbytku způsobí obnovení kladného náboje, posílí vazbu histonu k DNA v rámci daného nukleozomu a způsobí represi transkripce (17). Fenomén aberantní vazby HDAC a následné umlčení transkripce genů zodpovědných za diferenciaci a regulaci proliferace, byl popsán u řady nádorových onemocnění (13,22).

Inhibitory deacetyláz histonů (HDACi) jsou potentní protinádorové léky, které jsou schopny reaktivovat genovou expresi a obnovit schopnost maligních buněk podstoupit buněčnou smrt. Jelikož mají HDACi různou afinitu k různým HDAC, můžeme je rozdělit na neselektivní a selektivní inhibitory (2). Podle chemické struktury se rozdělují na hydroxamové kyseliny (trichostatin A, vorinostat, dacinostat, a panobinostat), pyroxamové kyseliny (PXD101 a CRA-026440), karboxylové kyseliny (VPA, butyrát sodný), benzoamidy (entinostat a mocetinostat) a cyklické tetrapeptidy (trapoxin, romidepsin, depsipeptid a spiruchostatin A) (11,21). Valproová kyselina (VPA) neboli 2-propyl-pentanová kyselina je mastná kyselina s krátkým řetězcem, která byla poprvé syntetizována Burtonem v roce 1882 (4). Na konci 90. let minulého století se ukázalo, že VPA je schopna inhibovat HDAC I. třídy (HDAC 1, 2, 3) a třídy IIa (HDAC 4, 5, 7) (6). Poté, co byla VPA prokázána jako potentní agens způsobující apoptózu u buněčných

linií odvozených od AML (8), byla testována v klinických studiích I. a II. fáze u myelodysplastického syndromu (MDS) a AML u starších pacientů (9).

Hypotézy a cíle práce

Akutní myeloidní leukémie s t(8;21) je pokládána za leukémii s dobrou prognózou. I přesto někteří pacienti s tímto podtypem AML prodělají relaps onemocnění, jak ukázaly výsledky léčby podle mezinárodního protokolu BFM AML 98, kde byla pozorována kumulativní incidence relapsu (CIR) 16 ± 5 % a pravděpodobnost pětiletého přežití bez události (EFS) 81 ± 5 %. Navíc v rámci protokolu BFM AML 2004 existovala snaha tento podtyp leukémie léčit méně intenzivně, což vedlo ke zhoršení léčebných výsledků se zvýšením CIR na 28 ± 6 % a pětiletý EFS poklesl na 66 ± 6 % (5). Tudíž excelentní prognóza tohoto podtypu AML je zachována pouze za předpokladu podání plné intenzivní chemoterapie. Z toho důvodu je nutné hledat nové, cílené léky, které přidáním do kombinace cytostatik umožní redukovat léčbu se zachováním dobrých léčebných výsledků. Jak již bylo popsáno v úvodu, t(8;21) dává vzniknout chimérickému proteinu AML1-ETO, který cestou aberantní vazby HDAC způsobuje zablokování myeloidní diference, tudíž by užití HDACi mohlo být efektivní léčbou.

Předpokládaným cílem této práce bylo modelování terapie pomocí VPA, která má vlastnosti inhibitoru deacetyláz histonů a jejíž účinek by měl vést k potlačení represivního vlivu proteinů AML1-ETO na expresi cílových genů. Předpokládali jsme také zvrácení patologického diferencečního bloku způsobeného přítomností proteinu AML1-ETO.

Cíle jsme rozdělili do těchto bodů:

- ověření efektu VPA na AML1-ETO pozitivní buňky sledováním změn exprese diferencečních znaků myeloidních buněk pomocí průtokové cytometrie a v porovnání s jinými podtypy AML. Porovnáním imunofenotypově identických buněčných linií s a bez přítomnosti chimérického proteinu AML1-ETO jsme chtěli prokázat specifitu účinku VPA danou inhibicí HDAC.
- analýza změn v buněčném cyklu buněčných linií odvozených od AML
- korelace změn v imunofenotypu indukovaných VPA s jednotlivými fázemi buněčného cyklu
- potvrzení předpokládané obnovy exprese známých a kandidátních AML1 cílových genů u AML1-ETO pozitivních buněk léčených VPA
- ověření účinnosti VPA na primárních patientských blastech získaných z kostní dřeně pacientů v den diagnózy.

Materiál a metodika

Buněčné linie odvozené z lidské akutní myeloidní leukémie Kasumi-1, MV4, K562 a Kasumi-6 byly léčeny valproovou kyselinou o koncentraci 0,5 mM a 1,0 mM a TPA

(12-O-tetra-tetradecanoylphorbol-13-acetate) o koncentraci 1,62 μM po dobu 24 a 48 hodin. TSA (Trichostatin A) byl použit jako pozitivní kontrola u linie Kasumi-1 o koncentraci 120 nM s délkou působení 24 a 48 hodin. Kaspázový inhibitor Z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone; Sigma) byl použit 1 hodinu před aplikací VPA k zablokování apoptózy u linie Kasumi-1 o koncentracích 20 μM a 100 μM . K validaci dat získaných z experimentů na buněčných liniích byly ve finálním experimentu použity blasty zamražené od dvou AML1-ETO negativních a dvou AML1-ETO pozitivních dětských pacientů s AML M2 podle FAB klasifikace. V době experimentu byly vzorky rychle rozmrazeny na teplotu 37°C a přidáním média IMDM (Iscoves Modified Dulbecco's medium (Sigma)) o teplotě 37°C byl odmytý dimethyl sulfoxid (DMSO, Sigma) centrifugací 1000 otáček za minutu (rpm) po dobu 5 minut. Vzorky byly kultivovány v médiu IMDM obohaceném o 30% FBS (Gibco) a směs cytokinů TPO, IL-6, SCF a FLT3-L o koncentraci 2 ng/ml. Po 24 hodinách kultivace byla přidána VPA o koncentraci 1,0 mM a TPA 1,62 μM .

K analýze množství DNA v jádře byl použit CycleTEST™ PLUS DNAREagent Kit fungující na principu vazby propidium jodidu k DNA. K detekci diferenciaci byly použity mnohobarevné kombinace s použitím protilátek proti povrchovým znakům CD11a, CD11b, CD15, CD38, CD33, CD34, CD117, CD14, HLA-DR, CD45 a glycophorin A (GPA). K odlišení mrtvých buněk byl přidán 2-(4-amidino-fenyl)-6-indolkarbamidin dihydrochlorid (DAPI; Sigma) bezprostředně před měřením. Vzorky byly takto měřeny v šesti barevných kombinacích pomocí LSR II. Analýza byla provedena pomocí softwaru FlowJo.

K ozřejmění změn v imunofenotypu v různých fázích buněčného cyklu u buněk Kasumi-1 po aplikaci VPA 1,0 mM jsme použili Vybrant DyeCycle Violet (DCV) společně s protilátkami proti povrchovým znakům CD33, CD117 a CD11b. Souběžně byly kultivovány buňky Kasumi-1 ovlivněné VPA 1,0 mM, ke kterým nebyl přidán DCV, a které byly značeny pomocí Annexin V podle návodu od výrobce a protilátkami proti povrchovým znakům CD33, CD117 a CD11B. Buňky připravené oběma způsoby byly změřeny průtokovým cytometrem LSR II.

Celková RNA byla izolována z léčených a kontrolních buněk Kasumi-1, Kasumi-6, K562 a Mv4;11 s použitím RNeasy Mini Kit s přidáním DNase Reaction Kit na odstranění zbytkové genomické DNA. Ke kvantifikaci cDNA v reálném čase byl použit systém SYBRGreen, který využívá vazby pouze do oblastí dvouvláknové DNA. V PCR reakcích byly použity primery pro geny *PU.1*, *CEBP α* , *BPI*, *IGFBP7* a housekeeping geny β 2-mikroglobulin a *GAPDH* (glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza). Vlastní kvantitativní PCR byla provedena přístrojem LightCycler480 s použitím výrobcem připraveného PCR mixu PowerSYBRGreen PCR Reagent Kit. Měření bylo prováděno v triplicátu a naměřené hodnoty genové exprese vyšetřovaných genů byly děleny naměřenými hodnotami exprese provozních genů k zajištění normalizace hodnot. Ke stanovení významnosti rozdílů mezi kontrolními a léčenými vzorky byl použit Mann-Whitney test a *t*-test. K provedení statistických testů byl použit software StatView.

Výsledky

Nejprve jsme studovali změny v buněčném cyklu po léčbě VPA o koncentracích 0,5 a 1,0 mM na buněčných liniích odvozených z myeloidních malignit: Kasumi-1 (M2 podle FAB, AML1-ETO pozitivní), Kasumi-6 (M2 podle FAB, AML1-ETO negativní),

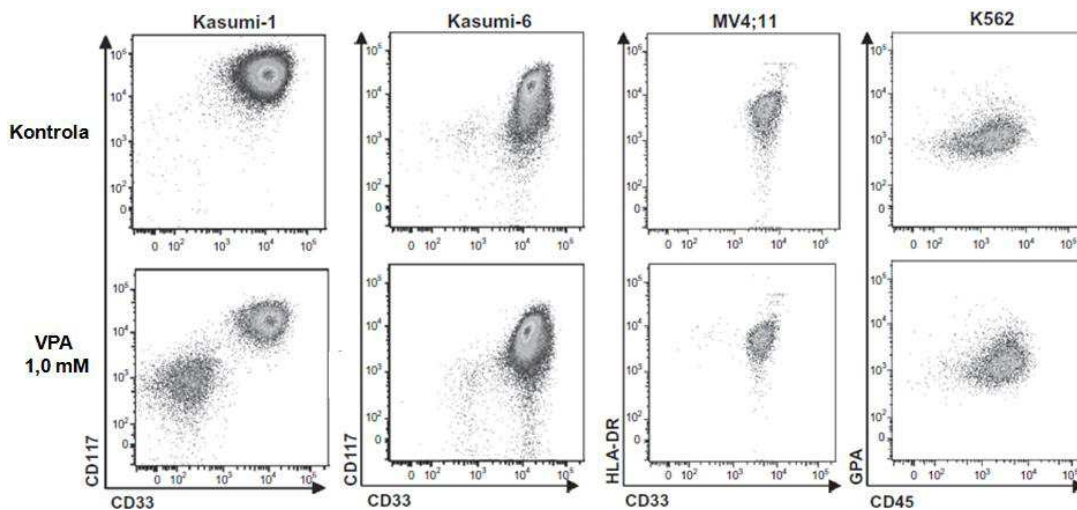
MV4;11 (M4 podle FAB, MLL-AF4 pozitivní) a K562 (erytroleukémie – blastický zvrát CML, BCR-ABL pozitivní). Nejvýraznější indukce buněčné smrti byla pozorována u Kasumi-1 linie po 48 hodinovém působení 1,0 mM VPA dosahující 56 % ± 3,2 % buněk v sub-G1 fázi buněčného cyklu. V MV4;11 linii bylo detekováno 43,0 % ± 1,0 % buněk v sub-G1 fázi. Pouze minimální indukce apoptózy byla detekována u linie K562, kde procento buněk v sub-G1 fázi bylo nalezeno na úrovni 6,1 % ± 1,1 %. U Kasumi-6 léčba VPA 1,0 mM vyvolala apoptózu u 20,8 % ± 0,4 % v porovnání s kontrolními vzorky.

Dále jsme hodnotili diferenciační účinek VPA na jednotlivé buněčné linie. Změny v imunofenotypu byly hodnoceny pouze na živých DAPI negativních buňkách. Buňky Kasumi-1 zareagovaly na léčbu VPA (1,0 mM po dobu 48 hodin) snížením exprese povrchových znaků typických pro myeloidní progenitory CD33 ($p < 0,001$), CD34 ($p = 0,003$), CD117 ($p < 0,001$), CD38 ($p = 0,005$) a zvýšením exprese znaků myeloidní diferenciace CD11a ($p = 0,001$) a CD11b ($p = 0,007$) v porovnání s kontrolními vzorky představovanými neléčenými buňkami Kasumi-1. Expresy znaků CD15 a CD14 nebyla působením VPA ovlivněna ($p = 0,09$ a $p = 0,32$). Takto vyjádřenou diferenciaci jsme detekovali u 38,2 % buněk Kasumi-1 po 24 hodinách a u 57 % po 48 hodinách. U fenotypově identické (M2 AML) buněčné linie Kasumi-6 bez přítomnosti AML1-ETO fúze jsme po ovlivnění VPA nepozorovali statisticky významné změny u žádného z vyšetřovaných povrchových znaků. Stejně tak u MV4;11 a K562 jsme nepozorovali změny, které by odpovídaly diferenciaci (obr. 2).

Po zjištění specifického efektu VPA na Kasumi-1 v porovnání s linií Kasumi-6 bylo nutné ověřit schopnost Kasumi-6 diferencovat. K tomuto účelu jsme použili diferenciační agens TPA o koncentraci 1,62 μM . Použití TPA způsobilo diferenciaci Kasumi-6, jak bylo ověřeno průtokovou cytometrií s poklesem exprese CD33, CD117 a CD34 a vzestupem exprese CD11B. Oproti tomu překvapivě TPA způsobilo pouze minimální změny v imunofenotypu Kasumi-1, kde byla diferenciace přítomna pouze u 17 % buněk v porovnání s 57 % po léčbě VPA. Při použití kombinace TPA a VPA u Kasumi-1 se procento diferencujících buněk vyšplhalo na úroveň 86 % ze všech DAPI negativních buněk.

Dále jsme se rozhodli zhodnotit vztah mezi diferenciací a jednotlivými fázemi buněčného cyklu a zároveň vztah mezi diferenciací a apoptózou. K ověření schopnosti diferenciace proliferujících a klidových buněk, jsme použili DyeCycle Violet barvení v kombinaci s protilátkami proti povrchovým CD znakům měřených průtokovým cytometrem. Tento postup nám umožnil analyzovat buňky v G1/G0 fázi a G2/M/S fázi odděleně a tím vyšetřit i jejich diferenciační status. Zjistili jsme, že 68 % proliferujících buněk a 29,3 % buněk v klidové fázi buněčného cyklu diferencovalo po podání VPA. Dále jsme použili značení Annexin V k detekci časných fází apoptózy a protilátky proti povrchovým znakům, abychom určili osud diferencovaných buněk. Tímto vyšetřením se ukázala být většina diferencovaných buněk Annexin V pozitivních oproti nediferencovaným buňkám Kasumi-1, které zůstaly Annexin V negativní.

Kombinované značení buněk pomocí Annexin V, DAPI a protilátkami proti povrchovým znakům (CD33, CD117 a CD11b) nám umožnilo analyzovat chování buněk po zablokování apoptózy (Z-VAD-fmk) po léčbě VPA 1,0 mM. Zjistili jsme, že i po zablokování apoptózy je VPA schopna indukovat diferenciaci u Kasumi-1. Diferencované buňky jsou navíc po konkomitantním podávání VPA a Z-VAD-fmk negativní při barvení Annexinem V.

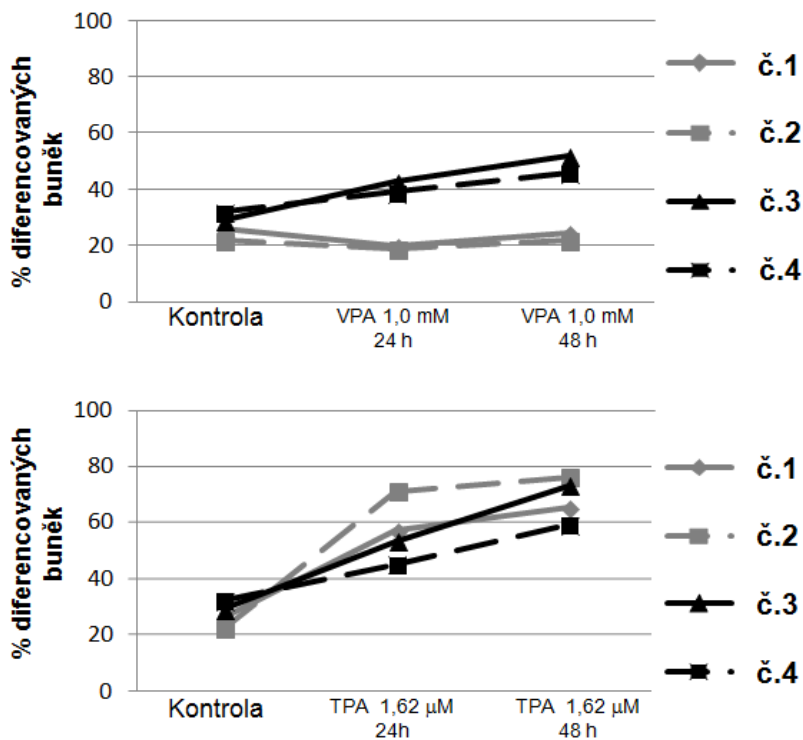


Obr. 2: Hodnocení diferenciacie průtokovým cytometrem. Grafy znázorňují míru exprese vybraných povrchových znaků u čtyř buněčných linií kultivovaných po dobu 48 hodin s VPA o koncentraci 1,0 mM. U linie Kasumi-1 je zřetelná diferencovaná populace buněk, která je charakterizovaná úbytkem exprese CD33 a CD117. U linií Kasumi-6, MV4;11, K562 nejsou detekovány změny v imunofenotypu charakteristické pro diferenciaci.

Dále jsme hodnotili, zda je VPA indukovaná diferenciacie doprovázená změnami exprese cílových genů AML1 a genů důležitých v myeloidní diferenciaci. Kvantifikovali jsme expresi následujících genů: *PU.1*, který je cílovým genem AML1, *C/EBPα* jako důležitý regulátor myeloidní diferenciacie, který je downregulován u AML1-ETO pozitivních pacientů, *BPI* a *IGFBP7*, u nichž je prokázána přímá inhibice exprese chimérickým proteinem AML1-ETO. U Kasumi-1 ovlivněných VPA 1,0 mM bylo naměřeno zvýšení exprese genu *PU.1* 6,2x ($p < 0,01$), zvýšení exprese *C/EBPα* 3,0x ($p < 0,01$), zvýšení exprese *BPI* 2,6x ($p < 0,01$) a zvýšení exprese *IGFBP7* 7,0x ($p < 0,01$). Oproti tomu u M2 AML AML1-ETO negativní buněčné linie (Kasumi-6) nebyla v porovnání s kontrolami pozorována změna exprese *C/EBPα* ($p = 0,26$) a *PU.1* ($p = 0,42$) a exprese genů *BPI* a *IGFBP7* byla po léčbě VPA snížena 1,3x ($p < 0,01$) a 1,7x ($p < 0,01$). U vzorků linie MV4;11 ovlivněných VPA byla v porovnání s kontrolou snížena exprese *PU.1* 2,5x ($p = 0,01$) a exprese *IGFBP7* snížena 2,4x ($p = 0,01$), exprese genů *C/EBPα* ($p = 0,32$) a *BPI* ($p = 0,75$) zůstala nezměněna. V linii K562 nebyla detegována exprese *BPI* na mRNA úrovni, exprese *PU.1* genu byla zvýšena 3,7x ($p < 0,01$) a exprese genů *C/EBPα* a *IGFBP7* zůstala nezměněna ($p = 0,46$ a $p = 0,1$).

K ověření výsledků získaných na buněčných liniích jsme kultivovali blasty od dvou AML1-ETO pozitivních a dvou AML1-ETO negativních pacientů v přítomnosti VPA 1,0 mM a TPA 1,62 μ M po dobu 24 a 48 hodin. Po léčbě VPA jsme detekovali pokles proliferační aktivity blastů a zvýšení procenta buněk podstupujících buněčnou smrt ve všech čtyřech patientských vzorcích. Diferenciační agens TPA indukovalo diferenciaci charakterizovanou poklesem CD33 a/nebo CD117 u všech čtyř vzorků bez ohledu na genotypové pozadí blastů. Jiná situace nastala po ovlivnění patientských blastů pomocí VPA, kdy se procento diferencujících buněk zvýšilo pouze u AML1-ETO pozitivních pacientů. U pacienta číslo 3 se zvýšilo zastoupení CD117-/CD33- a CD117- z 30 % na

52,5 % a u pacienta číslo 4 z 37 % na 46 %. Oproti tomu u AML1-ETO negativních pacientů (pacienti číslo 1 a 2) nezpůsobila VPA významné změny v imunofenotypu (obr. 3). Výsledky tohoto experimentu ukazují efekt VPA na patientské blasty a dále umocňují hypotézu o specifickém působení VPA na AML1-ETO pozitivní blasty. VPA indukovala diferenciaci pouze v blastech, které jsou charakterizované přítomností AML1-ETO.



Obr. 3: Kultivace AML1-ETO pozitivních (číslo 3 a 4) a negativních (číslo 1 a 2) primárních patientských blastů s VPA a TPA. Grafy znázorňují procento diferencovaných blastů po 48 hodinách kultivace s VPA 1,0 mM a TPA 1,62 μM. Blasty od AML1-ETO negativních pacientů diferencovaly po podání TPA, ale nikoliv po léčbě VPA. Oproti tomu AML1-ETO pozitivní blasty diferencovaly po TPA i VPA.

Diskuse a závěry

V této studii jsme testovali efekt VPA na AML buněčné linie a primární patientské blasty s různým genotypovým pozadím. Naše data potvrzují protinádorový efekt VPA u AML buněk a ukazují, že množství detekované apoptózy se liší mezi jednotlivými genotypově charakterizovanými AML podskupinami. V souladu s našimi výsledky byly publikovány práce, které potvrzují VPA indukovanou apoptózu u linií Kasumi-1 a MV4;11. V našem experimentu byla VPA schopna snížit proliferační aktivitu u Kasumi-6 a zároveň indukovat zástavu v G1/G0 fázi buněčného cyklu, ale bez známek indukce apoptózy. U linie K562 jsme nepozorovali navození apoptózy po léčbě. Diferenciaci jsme demonstrovali pomocí analýzy průtokovým cytometrem se značením buněk širokým panelem protilátek proti povrchovým myeloidním znakům. Toto pozorování bylo potvrzeno morfologicky sledováním změn v nukleární a nukleolární morfologii. Z

testovaných linií byla VPA indukovaná diferenciace detekována pouze u AML1-ETO pozitivní buněčné linie, což potvrzuje hypotézu o specifickém působení VPA na AML buňky s tímto genotypovým pozadím. Diferenciace u linie Kasumi-1 nesla identické změny v imunofenotypu jako diferenciace po použití TSA jako pozitivní kontroly. Specifitu účinku VPA působící přes patologický gen AML1-ETO jsme potvrdili pozorováním imunofenotypově identických buněčných liniích, které se liší pouze přítomností AML1-ETO (Kasumi-1 a Kasumi-6). Použití diferenciačního agens TPA potvrdilo, že linie Kasumi-6, ačkoliv nereagují na léčbu VPA, je schopna diferenciace po jiném stimulu. Překvapivě jsme pozorovali zcela minimální indukci diferenciace pomocí TPA u Kasumi-1, kdy pouze 17 % AML1-ETO pozitivních buněk diferencovalo. Naproti tomu léčba kombinací TPA a VPA indukovala diferenciaci ve vyšší míře, než vyplývá z pouhého součtu účinků těchto dvou látek, proto lze předpokládat synergistický efekt. Tento mechanismus může být vysvětlen tím, že při léčbě samotným TPA přetrvává diferenciační blok zprostředkovaný aberantní vazbou HDAC k AML1-ETO a proto je efekt TPA na diferenciaci minimální. Až v kombinaci TPA s VPA jsou inhibovány HDAC v korepresorovém komplexu asociovaném s AML1-ETO a diferenciace může proběhnout.

Dále jsme poskytli cenné informace o tom, že jak buňky v klidovém stádiu, tak i buňky proliferující, jsou schopné podstoupit diferenciaci. Navíc jsme demonstrovali, že diferenciace předchází apoptózu. Tato souslednost byla prokázána v experimentech se zablokováním apoptózy pomocí kaspázového inhibitoru Z-VAD-fmk. Inhibitor zablokoval buněčnou smrt, ale VPA indukovaná diferenciace u AML1-ETO pozitivních buněk nebyla ovlivněna. Specifický účinek VPA byl doprovázen vzestupem hladin mRNA AML1 cílových genů (*PU.1*, *IGFBP7*, *BPI*), což nastalo pouze u AML1-ETO pozitivních buněk. Exprese genu *CEBP α* , který je důležitým regulátorem myeloidní diferenciace a je výrazně downregulovaný u AML1-ETO pozitivní leukémie, také vzrostla po podání VPA. K ověření našich výsledků a přiblížení celého experimentálního designu k *in vivo* podmínkám jsme provedli experimenty na primárních patientských blastech odebraných z kostní dřeně v den diagnózy. Tím jsme vytvořili relevantní model léčby VPA u AML1-ETO pozitivních a AML1-ETO negativních pacientů a potvrdili jsme, že ač VPA indukuje apoptózu u všech testovaných vzorků, diferenciace závislá na VPA je jev specifický pouze pro AML1-ETO pozitivní blasty. TPA byl schopný navodit diferenciaci bez ohledu na přítomnost AML1-ETO fúze. Zároveň je nutno doplnit, že kapacita diferenciace u patientských blastů je nižší než v případě Kasumi-1 buněčné linie, čemuž odpovídá minimální změna s expresí CD11b.

U dětí je VPA běžně používána v léčbě epilepsie a terapeutické koncentrace dosahují hodnot použitých i v našich experimentech. Přestože byla VPA testována jako inhibitor HDAC v klinických studiích u dospělých, není myslitelné, aby byla použita v monoterapii či bez konvenční chemoterapie v moderních klinických studiích zabývajících se léčbou dětské AML. Existují data, která naznačují synergistický účinek VPA s konvenčními cytostatiky jako je cytarabin, což je důležité cytostatikum v léčbě AML. Xie *et al.* ukázal, že AML1-ETO pozitivní buňky jsou z testovaných podskupin AML nejvíce citlivé ke kombinaci VPA a cytarabin (20). Obecně je cílem velkých mezinárodních skupin pro léčbu dětské AML individualizovat terapii podle zjištěných genotypových změn v patientských blastech. Recentně byla spuštěna klinická studie fáze III zabývající se léčbou dětské AML v St. Jude Research Children's Hospital (SJCRH) (clinicaltrials.gov, NCT00703820). Pacienti zařazení do skupiny vysokého rizika bez

přítomnosti FLT3-ITD jsou randomizováni ke kombinované léčbě VPA a intenzivní chemoterapie (cytarabin, daunorubicine, etoposid) v rámci druhého indukčního bloku. Bohužel je velmi nepravděpodobné, že by AML1-ETO pozitivní pacienti byli do této podskupiny zařazeni. I v Evropě v rámci připravovaného mezinárodního protokolu pro léčbu dětské AML – BFM 2012 bude snaha implementovat cílenou terapii do léčebných schém. Jelikož naše výsledky jasně naznačují specifitu efektu inhibitoru HDAC VPA u AML1-ETO pozitivních blastů, předpokládáme, že přidání VPA k léčbě této podskupiny dětí s AML, by mohlo přinést významný benefit.

Literatura

1. Amann JM, Nip J, Strom DK, Lutterbach B, Harada H, Lenny N, et al. (2001). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol Cell Biol* 21: 6470-6483.
2. Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. (2009). Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer Lett* 280: 211-221.
3. Burel SA, Harakawa N, Zhou L, Pabst T, Tenen DG, Zhang DE (2001). Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. *Mol Cell Biol* 21: 5577-5590.
4. Burton B. (1882). On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *American Chemical Journal* 3: 385–395.
5. Creutzig U, Zimmermann M, Lehrnbecher T, Graf N, Hermann J, Niemeyer CM, et al. (2006). Less toxicity by optimizing chemotherapy, but not by addition of granulocyte colony-stimulating factor in children and adolescents with acute myeloid leukemia: results of AML-BFM 98. *J Clin Oncol* 24: 4499-4506.
6. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20: 6969-6978.
7. Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, Hann I, Webb DK, et al. (2010). Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol* 28: 2674-2681.
8. Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K. (2002). Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. *Leuk Res* 26: 495-502.
9. Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, et al. (2006). The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 106: 112-119.
10. Mayer J. (2002). *Leukémie*. Praha: Grada Publishing.
11. Marks PA, Xu WS (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 107: 600-608.
12. Meyers S, Downing JR, Hiebert SW (1993). Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 13: 6336-6345.

13. Minucci S, Pelicci PG (1999). Retinoid receptors in health and disease: co-regulators and the chromatin connection. *Semin Cell Dev Biol* 10: 215-225.
14. Orkin SH ND, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE. (2008). *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. Sanders.
15. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ (2011). Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 29: 551-565.
16. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. (2010). Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol* 11: 543-552.
17. Struhl K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12: 599-606.
18. Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tabuchi K, Kigasawa H, Tsuchida M, et al. (2009). Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute 18 myeloid leukemia: the AML99 trial from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *J Clin Oncol* 27:4007-4013.
19. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, Zimmermann M, Bradtke J, Betts DR, et al. (2010). Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol* 28: 2682-2689.
20. Xie C, Edwards H, Xu X, Zhou H, Buck SA, Stout ML, et al. (2010). Mechanisms of synergistic antileukemic interactions between valproic acid and cytarabine in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 16: 5499-5510.
21. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26: 5541-5552.
22. Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M. (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 5: 455-463.

Michal zápotocký

Uloha polymorfních markerů DNA v identifikaci osob a určování vybraných fenotypových znaků

Anastassiya Zidkova

Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze, Albertov 4, 1280 00 Praha

Abstrakt

V současné době probíhá intenzivní výzkum použití genetických polymorfizmů pro analýzu degradovaných vzorků, identifikaci a určení příbuznosti. Dalším výzkumným cílem je rozšíření možností forenzní genetiky směrem k determinaci biogeografického původu a s ním spojených fenotypových charakteristik, jako barva očí, vlasů a pleti. První část předkládané práce se zabývala zpracováním studie založené na vyšetření populačního vzorku z České republiky pomocí sady markerů Investigator DIP-plex (QIAGEN, Německo) obsahující 30 autozomálních inzerčně-delečních polymorfizmů. Diskriminační síla (Power of Discrimination - PD), která udává pravděpodobnost, že dvě náhodně vybrané osoby nebudou mít stejný genotyp, pro celou sadu dosáhla hodnoty 99,999999999 %. Tato část studie dospěla k výsledku, že uvedená sada markerů je vhodná jako doplňkový panel markerů pro forenzní identifikaci a určování příbuznosti v české populaci.

Druhá část předkládané práce představuje studii na středochorvatském populačním vzorku pomocí sady Mentype Argus X-8 (QIAGEN, Německo) obsahující 8 polymorfizmů krátkých tandemových repetic na chromozómu X (X-STR) rozdělených do 4 vazebných skupin. PD celé sady markerů bylo 99,9999 % u mužských vzorků a 99,99999999 % u ženských. Tato sada markerů může být použita ve středochorvatské populaci jako doplňující sada pro určení příbuznosti a identifikaci.

Další část práce byla věnována populační studii se sadou Decaplex X-STR obsahující 10 markerů X-STR, rovnoměrně lokalizovaných podél chromozómu X (kromě páru DXS6809-DXS6789). PD celé sady dosáhla 99,999 % u mužů a 99,99999999 % u žen. Dle výsledku této studie lze sadu Decaplex X-STR považovat za robustní a vhodnou pro použití ve forenzní genetice a příbuzenské analýze v České republice.

Poslední část předkládané práce se týkala výběru sady markerů pro určování biogeografického původu a barvy očí. Výsledkem populační studie a statistického modelování byl výběr 5 jednonukleotidových polymorfizmů: rs16891982, rs1426654, rs7495174, rs12913832, rs916977. Přesnost predikce barvy očí této sady SNP dosáhla 98,4%, biogeografický původ byl určen správně ve 100 % případů.

Úvod

Markery, které se používají ve forenzní genetice, jsou tyto: krátké tandemové repetice (Short Tandem Repeats Polymorphisms - STR), jednonukleotidové polymorfizmy (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) a inserčně-deleční polymorfizmy (Insertion-Deletion Polymorphism - INDEL). Polymorfizmy STR jsou v současné době nejpoužívanějšími markery ve forenzní praxi. Základní repetitivní jednotka se skládá z 2 až 7 nukleotidů. Obvyklá velikost analyzovaných fragmentů STR markerů je 100-400 bp [1]. Alely takovýchto markerů se liší počtem repetic, a proto lze jednoduše rozlišit pomocí kapilární elektroforézy. Pro zviditelnění alel se používají fluorescenčně značené primery, s nimiž probíhá amplifikace vybraných úseků DNA.

Velkou výhodou markerů STR je možnost vytvoření multiplexu, neboli amplifikace více úseků DNA v jedné reakci. Běžné vstupní množství DNA do reakce PCR je kolem 0,5 - 1 ng. Markery STR lokalizované na chromozómu X (X-STR) byly objeveny spolu s autozomálními markery, ale začaly se rutinně používat zhruba o deset let později [2]. Velké množství markerů na chromozómu X (ChrX) dovoluje používat jak vázané, tak i nezávislé markery. Rozdíl spočívá ve výpočtu frekvencí haplotypů. U nezávislých markerů se frekvence haplotypu rovná součinu frekvencí alel. Příkladem nezávislých markerů je sada Decaplex X-STR [3]. U vázaných markerů musí být frekvence haplotypu určena z populačních dat. Důvodem je omezená možnost rekombinace mezi markery, které se nacházejí v těsné blízkosti. Použití vázaných markerů je velmi vhodné při testování příbuznosti, protože rekombinace mezi těmito markery je velmi vzácná, tím je zvýšena informativita genetického vyšetření. Příkladem vázaných markerů je sada Mentype[®] Argus X-8 (QIAGEN, Německo). Markery XSTR mohou být využity jak pro identifikaci, tak i pro určování příbuznosti. Markery X-STR mohou být velmi užitečné, pokud je potřeba určit přítomnost ženské DNA v mužském vzorku. Příkladem takovéto situace může být vzorek ženských epiteliálních buněk pod nehty podezřelého [2]. Analýza X-STR může doplnit a v komplexních případech určování příbuznosti dokonce mnohonásobně zvýšit informační hodnotu genetické analýzy. Obecně lze říci, že X-STR mohou být použity pro řešení komplexních případů určování příbuznosti zahrnujících minimálně jednu ženu. Neboť dcera dostává od otce jeho jediný ChrX, použití X-STR je velmi vhodné, obzvláště pokud není k dispozici matka dcery. X-STR jsou užitečné i pro deficientní případy, jako je určování paternity u ženy, pokud je místo jejího údajného otce k dispozici pouze DNA jeho matky. Dalším případem využití X-STR je určování úplného sourozenectví, kde není použítí autozomální markery obecně nejsou vhodné. Důvodem je skutečnost, že výsledky analýzy podporují hypotézu sourozenectví oproti hypotéze neúplného sourozenectví nebo nepřibuznosti, pouze v případě přítomnosti stejného genotypu u obou osob. Tato pravděpodobnost je u úplných sourozenců 25 % (pokud jsou oba rodiče nestejně heterozygoti). Pokud mají dvě ženy stejného otce, potom od něj dostaly stejný ChrX, což lze zjistit pomocí analýzy X-STR. X-STR lze rovněž s výhodou využít při vyšetřování incestních vztahů.

Forenzně-genetický výzkum obrátil relativně nedávno svou pozornost k polymorfizmům typu INDEL. INDEL jsou hojně přítomny v lidském genomu a stejně jako většina markerů SNP jsou bialelické, neboli mají dvě možné alely. Tyto alely mohou být pojmenovány jako „dlouhé“, které mají inserci fragmentu, a jako „krátké“, které

zkoumaný fragment nemají. Velkou výhodou markerů INDEL je možnost jejich detekce pomocí kapilární elektroforézy. Postup detekce je obdobný postupu využívanému pro markery STR: amplifikace s fluorescenčně značenými primery a následné rozdělení amplifikovaných fragmentů na kapilární elektroforéze dle jejich barevného označení a velikosti. Investigator DIPplex (QIAGEN, Německo) představuje první a dosud jedinou komerční sadu INDEL. Bez ohledu na veškeré výhody použití analýzy INDEL pro identifikaci a určování příbuznosti, nejsou tyto markery zatím využívány ve forenzních laboratořích. Jedním z důvodů může být existence rozsáhlých databází genetických profilů vytvořených pomocí analýzy polymorfizmů STR. Protože je však tato problematika v současné době ve forenzní genetice intenzivně zkoumána, zavedení markerů typu INDEL pro rutinní použití je jenom otázkou času.

Ve forenzní genetice je relativně rozšířena analýza SNP, ovšem pouze u mtDNA. První z výhod použití SNP je malá velikost ampliconu, která nepřevyšuje 100 bp, což lze využít při analýze degradovaných vzorků. Další výhodou je možnost plně automatizované analýzy nevyžadující určování velikostí fragmentů díky bialeické povaze většiny SNP.

Pomocí SNP lze nejen provést forenzní identifikaci a příbuzenskou analýzu, ale také určit biogeografický původ a fenotypické charakteristiky (barva očí, vlasů a pleti). Výzkum autozomálních markerů SNP pro určování biogeografického původu (Ancestry Informative Markers - AIM) zkoumá alely, které dostala osoba od obou rodičů, na rozdíl od markerů lokalizovaných na chromozómu Y nebo mtDNA. Markery AIM jsou distribuovány po celém světě a mají různou frekvenci v různých populacích. I když mohou AIM nepřímo poskytnout informaci o fenotypových znacích, tato informace je vázaná na biogeografický původ. Jelikož je v bělošské populaci velká variabilita fenotypových znaků, jako jsou barva očí, vlasů a pleti, je vhodné doplnit analýzu použitím fenotypových SNP. Tyto SNP by mohly pomoci predikovat fenotypové znaky pachatele, jako jsou barva očí, vlasů a pleti. Fenotypové SNP mohou být také užitečné pro rekonstrukci vzhledu neznámé osoby na základě DNA z kosterních pozůstatků. SNP, které se používají pro určování fenotypových znaků, se nejčastěji nacházejí v genech zúčastňujících se procesu pigmentace.

Pigmentace očí, vlasů a pleti je především určena množstvím, typem a lokalizací melaninu, který se vytváří pomocí melanogeneze. V tomto procesu jsou vytvářeny váčky obsahující melanin, neboli melanozomy. Dle průběhu melanogeneze se melanozomy rozdělují do dvou typů: feomelanozomy, které produkují světlý (žlutý/červený) feomelanin a u kterých se proces zrání zastaví na prvním stupni, a eumelanozomy, které procházejí úplným procesem zrání a produkují tmavší (hnědý/černý) eumelanin. Proces melanogeneze začíná produkcí hormonů aktivujících MCR1 (Melanocortin-Receptor 1), které jsou stimulovány UV. MCR1 následně zvyšuje v bunce úroveň cyklického adenosinmonofosfátu (Cyclic Adenosine Monophosphate - cAMP), což aktivuje transkripční faktory, které stimulují expresi proteinů zúčastňujících se zrání melanozomů [4]. Protein tyrozináza (Tyrosinase - TYR) se zúčastňuje procesu melanogeneze obou typů melanozomů, zatímco proteiny TYRP1 (Tyrosine-Related Protein 1) a DCT (Dopachrome Tautomerase) jsou přítomny výhradně v eumelanozomech. Rozhodnutí o tom, který druh melaninu bude produkován, závisí hlavně na hladině aktivity enzymu TYR. Pokud má tento enzym bazální aktivitu, potom jsou produkovány jen feomelanozomy, v opačném případě jsou produkovány eumelanozomy. Aktivita TYR závisí na úrovni pH, která je regulována cAMP, a

samozřejmě na aktivačních a inaktivačních mutacích samotné TYR [4]. Další skupinou proteinů zúčastňujících se melanogeneze jsou membránové transportéry, které zajišťují transport iontů a malých molekul (jako např. tyrozinu) a regulaci pH, čímž také přispívají k regulaci tvorby melaninu. Jedná se například o protein P, což je transmembránový protein transportující malé molekuly, kódovaný genem pro okulokutánní albinismus II (OCA2). Iontové kanály, jako například TPCN2 (Two-Pore Segment Channel 2), SLC24A4 (Solute Carrier Family 24 Member 4) a SLC24A5 (Solute Carrier Family 24 Member 5), regulují koncentraci vápníku v melanozomech [5]. Jiný transportér SLC45A2 (Solute Carrier Family 45 Member 2) hraje pravděpodobně roli v transportu enzymů během maturace melanozomů [6]. Protein KITLG (Kit Ligand Protein) aktivuje receptor KITRT (Kit Receptor Tyrosine Kinase), a tím stimuluje proliferaci a migraci melanocytů. Na základě několika asociačních studií bylo zjištěno, že gen IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4), lokalizovaný na 6p25.3, je spojen s pigmentačními znaky, ovšem funkce tohoto genu zatím není jasná [7]. Nejrozsáhlejší studie zabývající se určováním fenotypových znaků - konkrétně barvy očí - vyvinula sadu Irisplex [8]. Tato sada obsahuje 6 SNP markerů ze 6 různých genů (HERC2, OCA2, SLC24A4, SLC45A2, TYR, IRF4). Sada markerů navržená skupinou Ruiz et al. [9] je modifikací Irisplexu obohaceného o jeden marker - rs1129038, který je ve vazbě s rs12913832. Další sadou je 7-plex [10] zaměřený na celosvětovou populaci a obsahující mimo jiné markery SNP specifické pro africkou (rs6119471) a asijskou populaci (rs1545397, rs885479). Další práce byly založeny na analýze jednotlivých populací: polské [11] a slovinské [12]. Výběr markerů se u jednotlivých studií liší, což je způsobeno rozdílnými populacemi, na kterých byl prováděn výzkum. Proto je velmi vhodné provést výzkum na populaci, pro níž se plánuje zavedení určování fenotypických znaků. Na základě takového výzkumu je pak možné vybrat soubor nejinformativnějších markerů, a tím zvýšit míru predikce u dotyčné populace.

Hypotézy a cíle

Předložená práce měla následující cíle a hypotézy:

- provést populační studii pomocí sady markerů Investigator DIPplex obsahující inzerčnědeleční polymorfizmy na populaci České republiky
- vyhodnotit zjištěné populační charakteristiky sady markerů Investigator DIPplex na české populaci a porovnat je s ostatními populacemi
- ověřit hypotézu, že sada markerů Investigator DIPplex je vhodná pro forenzní identifikaci a určování příbuznosti v České republice
- v yhodnotit zjištěné populační charakteristiky sady X-chromozomálních markerů Mentype[®] Argus X-8 na středo-chorvatské populaci a porovnat je s ostatními populacemi
- ověřit hypotézu, že sada markerů Mentype[®] Argus X-8 je vhodná pro forenzní identifikaci a určování příbuznosti ve středním Chorvatsku
- vyhodnotit zjištěné populační charakteristiky sady X-chromozomálních markerů Decaplex X-STR na středo-chorvatské populaci a porovnat je s ostatními populacemi

- ověřit hypotézu, že sada markerů Decaplex X-STR je vhodná pro forezní identifikaci a určování příbuznosti v České republice
- vytvořit soubor osob, u kterých bude dostupná informace o barvě očí a původu
- otestovat tento soubor osob pomocí markerů ve vybraných genech, které se účastní procesu pigmentace
- vybrat nejlepší model obsahující sadu markerů SNP, který může být použit pro predikci barvy očí v České republice
- validovat vybraný model a určit jeho míru predikce
- ověřit hypotézu, že použití kombinace markerů SNP souvisejících s barvou očí markerů SNP biogeografického původu zlepší predikci barvy očí u neznámých vzorků.

Materiál a metody

Soubor vzorků

Pro analýzu inzerčně-deleční sady markerů Investigator DIPplex (QIAGEN, Německo) byl použit soubor vzorků DNA od 55 nepříbuzných jedinců české populace. Pro stanovení forezních parametrů, které jsou důležité pro určování paternity, bylo vybráno 11 trií (matka - dítě - otec) s paternitou, která byla prokázána pomocí STR markerů. Pro studii sady X-STR markerů Mentype[®] Argus X-8 (QIAGEN, Německo) byly použity vzorky od 178 nepříbuzných osob (78 mužů a 99 žen) z oblastí středního Chorvatska. Pro populační studii sady X-STR markerů Decaplex byly použity vzorky 431 nepříbuzných osob z české populace, z toho 234 mužů a 197 žen.

Studie fenotypových SNP obsahovala dvě množiny dat: trénovací (N=131) a testovací (N=128). Vzorky pro trénovací sadu byly získány od dobrovolníků z České republiky (N=100) a z Kazachstánu (N=31). Testovací sada obsahovala bělošská a asijská data. Bělošské vzorky (N= 47) byly získány z Kriminologického ústavu Praha, asijská data (N=81) byla získána z projektu HapMap [13].

Zkoumané markery

Sada Investigator DIPplex obsahuje 30 markerů INDEL umístěných na 19 autozómech, vzdálenost mezi jednotlivými INDEL je minimálně 10 Mbp. Součástí této sady jsou následující markery: rs1610905, rs17878444, rs2307656, rs2307959, rs28369942, rs2308292, rs1610937, rs1610935, rs1305056, rs2307652, rs1611048, rs17879936, rs2308072, rs3081400, rs8190570, rs17174476, rs2307570, rs17238892, rs2308163, rs2307433, rs1305047, rs2307581, rs16438, rs8178524, rs6481, rs16388, rs2307924, rs1611001, rs2067235 a rs16363.

Sada markerů Mentype[®] Argus X-8 se skládá ze čtyř vazebných skupin, každá z nich obsahuje dvojice vázaných markerů: DXS10135 a DXS8378, DXS7132 a DXS10074, HPRTB a DXS10101, DXS10134 a DXS7423. Na rozdíl od předchozí sady markerů, Decaplex X-STR obsahuje STR markery, které jsou rovnoměrně rozmístěny

po celé délce chromozómu X: DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS6789, DXS7133, GATA172D05, GATA31E08 a DXS7423.

Studie fenotypových SNP zkoumala geny, jejichž polymorfizmy korelují s biogeografickým původem anebo s barvou očí: OCA2 (rs1800407, rs7495174, rs4778138, rs1545397, rs4778241), HERC2 (rs1667394, rs12913832, rs916977), MC1R (rs258322, rs1805007, rs885479), ASIP (rs4911414, rs1015362, rs6119471), SLC45A2 (rs16891982), IRF4 (rs12203592), TPCN2 (rs35264875), TYR (rs1393350), KITLG (rs12821256), DCT (rs2031526), SLC24A4 (rs12896399) a SLC24A5 (rs1426654).

Amplifikace DNA a určování genotypů

DNA byla izolována z bukalních stěrů pomocí sady Blood Mini Kit (QIAGEN, Německo) dle pokynů výrobce. Po izolaci byla DNA kvantifikována na přístroji Nanophotometer (Implen, USA). Pro amplifikaci fragmentů DNA s použitím značených primerů markerů sady Investigator DIPplex bylo použito vstupní množství 0,5 ng DNA. PCR reakce byla provedena v souladu s pokyny výrobce. Po ukončení amplifikace byla provedena fragmentační analýza na kapilární elektroforéze a následné určování genotypů.

Genotypy ve studii fenotypových SNP byly určeny pomocí metody alelické diskriminace s použitím fluorescenčně značených sond TaqMan[®] MGB[™] na přístroji 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Pro analýzu byly použity 2 μ l neředěného roztoku DNA o koncentraci přibližně 15-20 ng/ μ l. Amplifikace a analýza byly provedeny dle pokynů výrobce zvláště pro každý SNP marker.

Statistická analýza

U sady markerů Investigator DIPplex INDEL byla Hardy-Weinbergova rovnováha (Hardy-Wenber equilibrium - HWE) testována pomocí χ^2 testu. Vazebná nerovnováha (Linkage Disequilibrium - LD) byla testována u sady markerů Investigator DIPplex pomocí programu SNPalyzer v1.2 (Istech, Jižní Korea). Během testování HWE i jiných statistických testů na hodnotu hladiny významnosti byla aplikována Bonferroniho korekce. Důvod korekce spočívá v tom, že pokud testujeme více markerů najednou, existuje pravděpodobnost, že jeden test bude mít náhodně signifikantní výsledek. Při aplikaci Bonferroniho korekce se hodnota významnosti vydělí počtem provedených testování. Pokud bylo například provedeno testování HWE u 30 INDEL markerů ze sady Investigator DIPplex, hodnota významnosti po Bonferroniho korekci je 0,0017. Byly určeny některé forenzní parametry dovolující posoudit užitečnost zkoumaného markeru: pravděpodobnost shody (Probability of a match - PM) [14], diskriminační síla (Power of Discrimination - PD). Další parametry jsou důležité pro určování příbuznosti, například průměrný paternitní index (Average Paternity Index - API) [15]. U INDEL markerů byl vypočítán počet "powereffective", neboli účinných markerů. Počet účinných markerů se rovná dvojnásobku zkoumaných markerů vynásobených průměrnou genovou diverzitou [16]. Srovnání frekvencí INDEL obsažených v sadě Investigator DIPplex bylo provedeno ručně pomocí χ^2 testu. Srovnání frekvencí INDEL obsažených v sadě Investigator DIPplex bylo provedeno pomocí χ^2 testu.

U vzorků analyzovaných pomocí sady Mentype[®] Argus X-8 bylo testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy společně s odhadem genové diverzity a také testování LD provedeno pomocí programu Arlequin v3.5 [17]. Byly určeny následující forenzní para-

metry: informační obsah polymorfizmu (Polymorphism Informational Content - PIC) [18], PM [14], PD (vypočtena pro muže a ženy [19]), průměrná pravděpodobnost vyloučení (Mean Exclusion Chance - MEC). Výpočet MEC závisí na tom, které osoby byly testovány. MEC pro trio určuje pravděpodobnost vyloučení v případě standardního tria: matka - dítě (v případě určování otcovství pomocí XSTR se jedná vždy o dceru) - nařčený otec [19]. MEC pro deficientní případy se používá tehdy, pokud je v případě standardního tria místo nařčeného otce jeho matka [20].

MEC pro dvojici (dcera - otec) je používána v případech, kdy matka není testována [19]. Ve studii sady X-STR Mentype[®] Argus X-8 byly pro srovnání mezi populacemi použity buď frekvence haplotypů nebo alelické frekvence pomocí programu Arlequin v3.5 [17].

U sady Decaplex byl pro testování LD a HWE použit program Arlequin v3.5 [17]. Test LD proveden zvlášť pro mužské a ženské vzorky. Také byly vypočteny parametry PD, PM, PIC, MEC v případě dua, tria. Hodnota PD byla vypočtena pro muže a ženy [19]. Ve studii sady markerů X-STR Decaplex bylo mezipopulační srovnání provedeno pomocí porovnání hodnot mezipopulačního koeficientu inbreedingu F_{ST} pro každý marker pomocí programu Arlequin v3.5 [17].

U vzorků analyzovaných pomocí fenotypových SNP markerů byly zjišťovány odchylky od HWE pomocí programu PLINK v1.07 [21]. U fenotypových SNP markerů byl pro testování LD použit program Arlequin v3.5 [17].

Ve studii zabývající se výzkumem fenotypových SNP byla použita metoda rekonstrukce haplotypů v oblasti HERC2-OCA2. K určení haplotypů byl použit algoritmus Excoffier-Laval-Balding (ELB) [22] v programu Arlequin v3.5 [17]. Pro rekonstrukci haplotypů byl trénovací soubor rozdělen do dvou skupin dle původu. U každého souboru byla zvlášť provedena rekonstrukce haplotypů. Po provedení této analýzy byla data opět spojena a rozdělena dle barvy očí: světlá vs. tmavá.

Asociační test byl proveden u studie fenotypových SNP markerů. Byla provedena tři porovnání. Nejprve byla zkoumána asociace vybraných SNP s barvou očí u celého trénovacího vzorku. Poté byla asociace SNP s barvou očí testována jenom u bělošských vzorků. Poslední asociační test zkoumal korelaci vybraných SNP s biogeografickým původem a byl proveden na celém trénovacím vzorku. Asociační testy byly provedeny v programu PLINK v1.07 [21].

Multifaktorová dimenzionální redukční analýza (Multifactor dimensionality reduction - MDR) byla použita ve studii fenotypových SNP na vzorky rozdělené dle barvy očí (světlá *versus* tmavá barva očí) anebo dle původu (běloch *versus* asiát) v programu MDR (<http://www.epistasis.org>). Před provedením MDR byla data filtrována pomocí filtru ReliefF programu MDR (<http://www.epistasis.org>). Pět nejinformativnějších SNP bylo vybráno pro analýzu MDR. MDR testovalo modely obsahující od 1-4 SNP. Na základě této analýzy byl vybrán nejlepší model pro určování barvy očí a biogeografického původu. Oba modely byly následně testovány permutačním testem pomocí programu MDRpt package (www.epistasis.org). Pro praktickou implementaci získaných modelů byla navržena Bayesovská síť. Bayesovské síť (BS) pro studii fenotypových SNP byly vytvořeny v programu Hugin Lite v7.6 (Hugin Expert A/S, Aalborg, Dánsko). BS byla vytvořena po výběru nejlepšího modelu pro určování barvy očí a biogeografického původu a byla složena z následujících uzlů: barva očí, biogeografický původ a markery SNP, které byly vybrány v rámci analýzy MDR. Validační studie byla provedena na 128 vzorcích: 47 Cechů, 39 Japonců žijících v Tokiu

a 42 Han Číňanů žijících v Pekingu. Pro validaci vytvořených modelů byla použita vytvořená BS. Pro určení fenotypu byla stanovena hranice výsledné pravděpodobnosti 0,7. Po provedení určení fenotypu a biogeografického původu byly stanoveny parametry, které hodnotí robustnost BS: senzitivita a specificita. Postup statistické analýzy je schematicky znázorněn na Obrázku 3.1.

Výsledky a diskuse

Investigator DIPplex

Bylo zjištěno, že sada DIPplex je velmi citlivá a vyžaduje malé vstupní množství DNA (500 pg). Naopak, vyšší vstupní množství DNA způsobuje vytažené a abnormálně tvarované píky, což bylo doloženo také studii dalšími vědeckými skupinami [23]. Žádný ze 30 markerů INDEL obsažených v sadě DIPplex nevykazoval odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Vazebná rovnováha zkoumaných markerů svědčí o jejich nezávislosti. Toto zjištění umožňuje použít takzvané „produktové pravidlo“, dle kterého se průnik pravděpodobností nezávislých jevů (v tomto případě to jsou genotypy v jednotlivých lokusech) rovná součinu pravděpodobností těchto jevů. Průměrná heterozygotita zkoumaných markerů v české populaci byla 0,46, tedy relativně vysoká, což je velmi žádoucí pro identifikační markery. Téměř 50% průměrná heterozygotita svědčí o tom, že jsou zkoumané lokusy v české populaci vysoce polymorfní.

Diskriminační síla byla pro českou populaci stanovena v rozsahu od 0,554 do 0,656. PD pro celou sadu markerů byla u české populace 99,9999999999 %. Pravděpodobnost náhodné shody byla u české populace $1 \text{ z } 6,8 \times 10^{12}$, což je nižší hodnota, než u rutinně používaných sad STR markerů, ovšem tato hodnota je srovnatelná s ostatními studii sad markerů INDEL. Průměrný paternitní index v každém ze zkoumaných markerů přesahoval 1, což naznačuje relativní užitečnost pro testování paternity. Kombinovaný paternitní index pro všech 30 markerů byl přibližně 27 000, takže výsledná pravděpodobnost otcovství byla 99,99 % za předpokladu 50 % výchozí pravděpodobnosti. I když PI pro sadu DIPplex nedosahuje hodnot PI pro STR lokusy, je stále dostačující pro uznání otcovství prakticky prokázaným. Sada DIPplex může tedy sloužit jako doplňující sada markerů ke stávajícím hojně využívaným sadám markerů STR.

Žádné statisticky významné rozdíly nebyly nalezeny mezi českou a německou populací. Tyto výsledky jsou podporovány skutečností, že německá populace byla nejbližší české populaci ze všech testovaných populací. Relativně malý počet markerů, u nichž byly nalezeny statisticky významné odchylky, svědčí o robustnosti zkoumané sady markerů.

Mentype^R Argus X-8

Všechny zkoumané markery ze sady Argus X-8 byly v HWE. I přesto, že markery jsou ve vazebných skupinách blízko u sebe, nebyl nalezen žádný pár markerů, jejichž výskyt ve studovaných vzorcích by vykazoval vazebnou nerovnováhu. Vysvětlení těchto výsledků může být několik: malý počet zkoumaných vzorků, anebo vysoká mutační rychlost zkoumaných markerů STR [24].

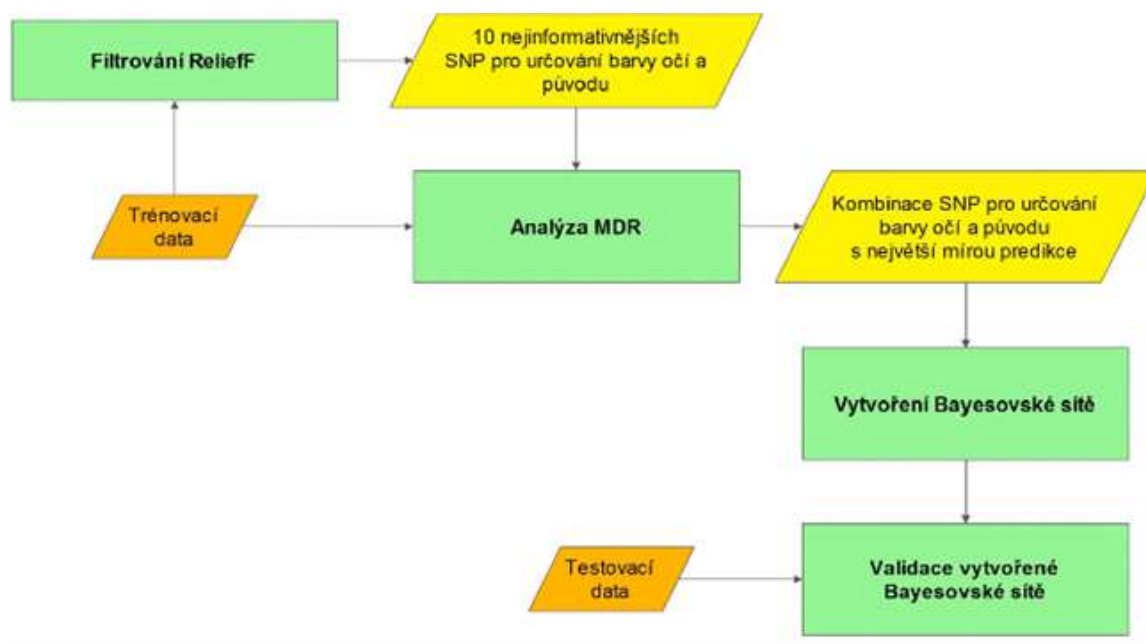


Schéma statistické analýzy dat pro predikci biogeografického původu a barvy očí

Zkoumané markery se ukázaly jako vysoce polymorfní ve středo-chorvatské populaci. Největší počet alel měl marker DXS10135 - 25, který dosáhl nejvyšší hodnoty informačního obsahu ($PIC=0,9306$) a diskriminační síly jak u žen ($PD_F=0,9918$), tak i u mužů ($PD_M=0,9345$). Byl to také marker s nejvyšší pozorovanou heterozygotitou ($0,9596$) a největším počtem alel.

Hodnoty průměrné síly vyloučení pro různé případy dovolují znázornit, jak je zkoumaný marker užitečný pro určování příbuznosti. Průměrná síla vyloučení je v deficientním případě, kdy je ve vyšetřovaném triu místo nařčeného otce jeho matka, určována hodnotou MEC. Nejvyšší hodnota tohoto parametru byla u markeru DXS10135 - 86,7 %. V případě určování síly vyloučení otcovství je u dua nebo standardního tria k dipozici více informací, a proto jsou tyto hodnoty vyšší, než výše zmíněná síla vyloučení, což je podloženo výsledky této studie. Například pro marker DXS10135 je hodnota síly vyloučení v deficientním případě 86,7 %, v případě dua 87,4% a v případě standardního tria 93 %. Pokud se jedná o případ s počtem meióz větším než jedna, jako například při určování úplného a neúplného sourozenectví, je velmi vhodné použít pro výpočet příbuznosti místo jednotlivých lokusů haplotypy. Používání haplotypové analýzy na X-chromozómu by mohlo pomoci nejen v určování příbuznosti, ale také pro určení biogeografického původu. Proto bylo provedeno srovnání haplotypových frekvencí, které odhalilo statisticky významné rozdíly nejen mezi populacemi středního Chorvatska, Japonska a Ghany, ale také mezi středo-chorvatskou a německou populací, které jsou si mnohem bližší. Bylo také provedeno porovnání genetické vzdálenosti populací pomocí alelických frekvencí. Byly vybrány dvě blízké populace - polská, u které byly známy alelické frekvence pro všech 8 markerů, a bosenská, která je velmi blízká chorvatské populaci a u které byly

známy frekvence 4 markerů. Porovnání genetických vzdáleností neodhalilo žádnou statisticky významnou odchylku.

Decaplex X-STR

Všechny zkoumané markery ze sady Decaplex X-STR byly v HWE. Testování vazebné nerovnováhy mělo u této sady markerů v české populaci rozdílné výsledky u mužských a ženských vzorků. Zatímco u mužských vzorků po testování všech párů lokusů nebyla zjištěna vazebná nerovnováha ani u jednoho páru, u ženských vzorků byla zjištěna vazebná nerovnováha mezi markery DXS6809 a DXS6789. Všechny markery ze sady Decaplex mají vzájemnou vzdálenost větší než 5 Mb [3], kromě již zmíněných DXS6809 a DXS6789, u kterých byla pozorována vazebná nerovnováha. Vzdálenost mezi touto dvojicí markerů je kolem 500 Kb. Na druhou stranu jsou výsledky vazebné nerovnováhy markerů na chromozómu X u mužských vzorků spolehlivější, než výsledky vazebné nerovnováhy u ženských vzorků. U mužských vzorků jsou haplotypy markerů na chromozómu X známy, protože muži mají pouze jeden chromozóm X, u ženských vzorků je potřeba nejprve provést rekonstrukci haplotypů, která má určitou míru přesnosti. Pokud se jedná o příbuzenskou analýzu, je dle doporučení mezinárodní společnosti pro forenzní genetiku potřeba počítat s frekvencí haplotypů pro markery DXS6809 a DXS6789 [3]. Pokud se jedná o identifikaci, mohou být frekvence haplotypů odhadnuty pomocí frekvencí jednotlivých alel [3].

Nejvíce alel měly markery DXS6809 a DXS6789 (12 alel). DXS6789 byl nejinformativnějším markerem, jehož diskriminační síla byla pro muže 82 % a pro ženy 95 %.

Porovnání genetické vzdálenosti pomocí alelických frekvencí mezi českou, ugandskou, severovýchodní španělskou, německou a polskou populací odpovídalo geografickému rozložení populací. Česká populace se nejvíce lišila od populace Ugandy, severovýchodního Španělska a populace německé. Porovnání s polskou populací nezjistilo žádné statisticky významné odchylky.

Mentype^R Argus X-8 a Decaplex X-STR představují dvě možné varianty navržení sady X-chromozomálních markerů. Obě možnosti mají své výhody a nevýhody. Použití vazebných skupin markerů je méně informativní v případě identifikace osob, ovšem je velmi vhodné pro určování příbuznosti, obzvláště u komplexních nebo deficientních případů. Sada Decaplex X-STR obsahující nezávislé markery je lepší pro účely identifikace. Pokud se použije pro určování příbuznosti, nenastává problém nulových frekvencí, který se často objevuje u haplotypové analýzy.

Fenotypové SNP

Provedená studie prokázala, že marker rs12913832 je velmi silně asociován s barvou očí, ale může být také použit jako marker biogeografického původu. Lze říci, že oblasti výskytu odvozené alely G v tomto markeru se shodují s oblastmi výskytu modré barvy očí. Výsledky asociační studie u souhrnných vzorků se shodovaly ve třech markerech, ale měly navíc další 4 statisticky významné markery, které asociovaly s barvou očí: rs1426654, rs16891982, rs4778241 a rs885479. Tato studie také potvrdila zjištění předešlých studií [25], že SNP rs1426654 a rs16891982 jsou vhodné markery pro určování biogeografického původu. Zajímavé je, že oba výše uvedené markery také

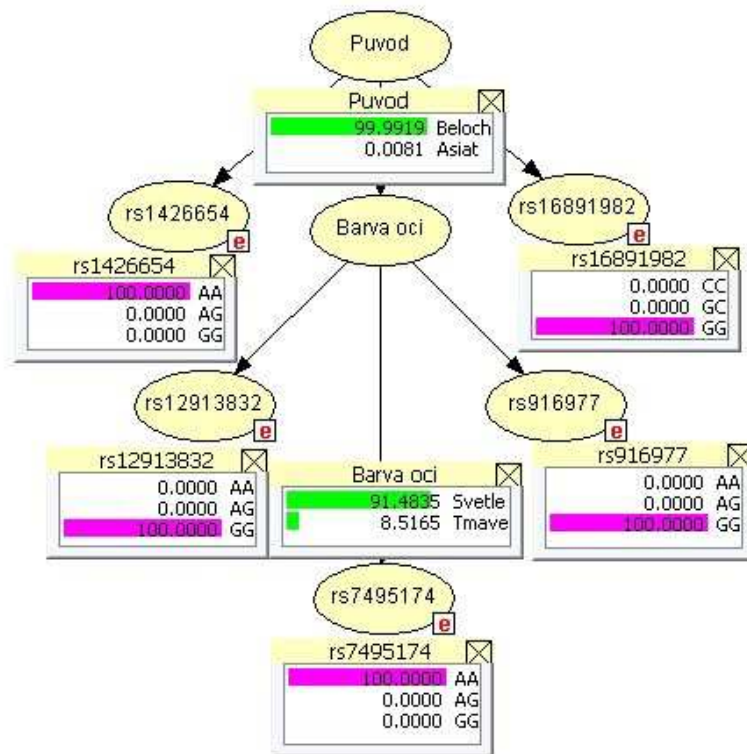
asociovaly s barvou očí, konkrétně přítomnost alely G u rs1426654 a alely C u rs16891982 s tmavou barvou očí. Naše domněnka je taková, že se silná asociace s nebělošským biogeografickým původem promítá i do asociace s tmavou barvou očí. Především studie vědecké skupiny Rana zjistila, že polymorfismus rs885479 v genu *MC1R* téměř není přítomen u bělochů, ale je naopak častý u asiátů [26]. Obdobné frekvence genotypů byly pozorovány pro marker rs1545397, který je asijskou specifickou mutací v genu *OCA2* [27].

Použití analýzy MDR odhalilo polymorfizmy, které by mohly optimalizovat predikci barvy očí, ovšem neměly by statisticky významnou asociaci s barvou očí během asociačního testu provedeného u jednotlivých markerů. Nejinformativnější marker pro určování barvy očí a biogeografického původu byl marker rs12913832. Nejlepší model pro souhrnné vzorky obsahoval 2 SNP: rs12913832 a rs916977. Nejlepší model pro bělošské vzorky obsahoval navíc jeden marker: rs7495174. Míra predikce byla v této studii pro určování světlé vs. tmavé barvy u souhrnných vzorků 0,8566, u bělošských vzorků 0,8369. Největší míra predikce (0,9255) byla zjištěna u modelu určování biogeografického původu, který obsahoval markery rs1426654 a rs16891982.

Z 8 možných haplotypů pro markery rs7495174, rs12913832 a rs916977 bylo jak u tmavookých osob, tak u světlookých osob pozorováno 6 haplotypů. Světlooké osoby byly z hlediska haplotypů relativně homogenní. Frekvence majoritního haplotypu (AGG) byla v této skupině 84% a frekvence ostatních haplotypů byla pod 10%.

Haplotypy tmavookých osob zdaleka nebyly tak homogenní. Tato skupina vykazovala 4 majoritní haplotypy: AGG (34 %), AAA (27 %), AAG (16 %) a GAG (12 %). Světloocí jedinci měli v 81 % diplotyp AGG/AGG, zatímco tmavoocí jedinci měli nejčastěji haplotyp AGG jenom na jednom chromozómu. Tyto výsledky podporují již dříve formulovanou hypotézu o tom, že modrá barva očí je nejčastěji děděna jako recesivní znak.

Výhodou analýzy MDR je tvorba třídícího algoritmu, který přisuzuje určitému multilokusovému genotypu fenotyp. Ovšem tato metoda opomíjí kvantifikaci nejistoty, která je nezbytná pro interpretaci výsledků ve forenzní genetice, například při určování fenotypu neznámého vzorku. Proto byly následně vytvořeny dvě Bayesovské sítě: s použitím markerů biogeografického původu (Model 1: rs7495174, rs12913832, rs916977, rs1426654 a rs16891982) a bez nich (Model 2: rs7495174, rs12913832, rs916977). Na Obrázku 4.1 je znázorněn Model 1. Spojení modelů pro určování barvy očí a biogeografického původu zlepšilo výsledky analýzy obzvláště u asijských vzorků, protože klesl počet vzorků, u nichž nebylo možné určit barvu očí (z 13,3 % na 1,6 %). Senzitivita určování světlé barvy očí dosáhla pomocí Modelu 1 hodnoty 0,96, specificita pro určování světlé barvy očí se dostala na hodnotu 0,98.



Model Bayesovské sítě obsahující jak markery spojené s barvou očí, tak i s biogeografickým původem.

Závěr

Studie zkoumající sadu markerů DIPplex obsahující 30 inzerčně-delečních polymorfizmů, které byly umístěny ve vzdálenosti nejméně 10 Mb od všech komerčně dostupných markerů STR. Po optimalizaci pufru může být tato sada použita pro analýzu inhibovaných vzorků. Mezi zkoumanými markery nebyla nalezena statisticky významná nerovnováha, proto mohou být tyto markery považovány za nezávislé. Tyto nové markery mohou být s výhodou analyzovány pomocí metod a přístrojů, které jsou běžně dostupné ve forenzní laboratoři. Díky relativně nízké mutační rychlosti jsou tyto markery velmi vhodné pro příbuzenskou analýzu, obzvláště pokud je podezření na výskyt mutace. Zjištěné hodnoty paternitního indexu ukazují, že sada DIPplex vede k několikanásobnému zvýšení paternitního indexu vytvořeného pomocí analýzy markerů STR. Sada DIPplex může být využita jak při forenzní identifikaci, tak i při testování příbuznosti. Tato studie prokázala, že sada DIPplex je robustní a že je její použití jako doplňkové sady markerů vhodné v České republice.

Studie zaměřená na sadu obsahující 8 vázaných markerů X-STR Argus X-8 prokázala vhodnost použití této sady pro forenzní účely ve středochovatské populaci. Tyto markery se nacházejí ve 4 vazebných skupinách a jsou tedy velmi užitečné pro příbuzenskou analýzu, i když může v některých případech nastat problém nulových frekvencí zkoumaných haplotypů. Proto jsou tyto markery velmi vhodné pro analýzu

příbuznosti kosterních vzorků, kde může jejich použití být více informativní než použití autozomálních markerů STR.

Studie zabývající se sadou Decaplex X-STR představuje návrh sady markerů, který je odlišný od předchozí sady Argus X-8. U všech párů markerů, vyjma páru DXS6809 a DXS6789, mezi kterými je vzdálenost 500 Kb, nebyla zjištěna vazebná nerovnováha. Proto si tyto markery zachovávají vlastnosti spojené s jejich lokalizací na gonozómu X, ale jejich vazebná nezávislost snižuje početní náročnost v případě výpočtu příbuznosti. Výpočet průměrné síly vyloučení poukázal na to, že je tato sada velmi vhodná pro komplexní a deficientní případy určování otcovství a sourozenectví. Protože se výsledky forenzních parametrů markerů obsažených v této sadě shodovaly s jinými studiemi, lze tuto sadu považovat za robustní a za vhodnou pro použití ve forenzní genetice a příbuzenské analýze v České republice.

Hlavním cílem studie fenotypových markerů SNP byla selekce nejlepšího modelu pro predikci barvy očí a s ní spojeného původu pro podmínky České republiky. Toto je nová oblast forenzní genetiky, může pomoci zúžit okruh možných podezřelých osob či nepřímo podpořit výpověď očitého svědka. Rekonstrukce haplotypů zkoumaných osob podpořila hypotézu, že barva očí se dědí jako recesivní znak. Porovnání výsledků studie s výsledky ostatních studií naznačilo, že existují markery, které mají velkou informativitu bez ohledu na populaci, ve které jsou zkoumány (například rs12913832). Existují také markery, které mají velkou informativitu ohledně predikce barvy očí, ale jenom v určitých populacích. Pomocí analýzy MDR bylo vybráno několik markerů, které nejlépe predikují barvu očí nebo původ. Z těchto výsledků byly následně vytvořeny 2 modely Bayesovských sítí, které byly následně validovány pomocí dalšího souborů vzorků. Kombinace analýzy MDR a Bayesovských sítí se ukázala jako elegantní řešení, které dovoluje zahrnout nejistotu do výpočtu predikce barvy očí a původu. Spojení fenotypových markerů a markerů biogeografického původu vedlo k vyšší míře predikce a nižšímu počtu analýz, u nichž nebylo možné udělat závěr. Doufáme, že poznatky zjištěné pomocí této studie podpoří zavedení metody molekulární fenotypizace v oblasti forenzní genetiky v České republice.

Literatura

1. Butler JM. (2009). *Fundamentals of forensic DNA typing*. Academic Press.
2. Szibor R. (2007). X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Sci Int Genet* 1 (2): 93–99.
3. Gusmão L, Sánchez-Diz P, Alves C, Gomes I, Zarrabeitia MT, et al. (2009). A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int J Leg Med*. 123 (3): 227–234.
4. Scherer R, Kumar R. (2010). Genetics of pigmentation in skin cancer — a review. *Mutat Res*. 705 (2): 141.
5. Sturm RA. (2006). A golden age of human pigmentation genetics. *Trends Genet*. 22 (9): 464–468.
6. Schnetkamp PPM. (2004) The SLC24 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger family: vision and beyond. *Pflügers Arch*. 447 (5):683–688.

7. Han J, Kraft P, Nan Q, Guo H, Chen C, et al.(2008). A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genet.* 4 (5): e1000074.
8. Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. (2011). IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Science International: Genetics* 5 (3): 170–180.
9. Ruiz Y, Phillips C, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Casares de Cal M, et al. (2013). Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Sci Int Genet.* 7 (1): 28–40.
10. Spichenok O, Budimlija ZM, Mitchell ZM, Jenny A, Kovacevic L, et al. (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Sci Int Genet.* 5 (5): 472–478.
11. Póspiech E, Draus-Barini J, Kupiec T, Wojas-Pelc A, Branicki W. (2011). Gene–gene interactions contribute to eye colour variation in humans. *J Hum Genet.* 56 (6): 447–455.
12. Kastelic V, Drobnič K. (2012). A single-nucleotide polymorphism (SNP) multiplex system: the association of five SNPs with human eye and hair color in the Slovenian population and comparison using a Bayesian network and logistic regression model. *Croat Med J.* 53 (5): 401–408.
13. Altshuler DM, Gibbs EA, Peltonen L, Dermitzakis E, Schaffner SF, et al. (2010). Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467 (7311): 52.
14. Fisher RA (1951). Standard calculations for evaluating a blood-group system. *Heredity* 5: 95–102.
15. Brenner CH. (1997). Symbolic kinship program. *Genetics* 145 (2): 535–542.
16. Krawczak M. (1999). Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms. *Electrophoresis* 20 (8): 1676–1681.
17. Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47.
18. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32 (3): 314.
19. Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L, et al. (1998). Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J Forensic Sci.* 43 (5): 1046–1049.
20. Krüger J, Fuhrmann W, Lichte K-H, Steffens C. (1968). Zur Verwendung des Polymorphismus der sauren Erythrocytenphosphatase bei der Vaterschaftsbegutachtung. *Int Journal Leg Med.* 64 (2): 127–146.
21. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, et al. (2007). Plink: a tool set for wholegenome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 81 (3): 559–575.
22. Excoffier L, Laval G, Balding D. (2003). Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Hum Genomics* 1(1): 7– 19.

23. Friis SL, Børsting C, Rockenbauer E, Poulsen L, Fredslund SF, Tomas C, Morling N. (2012). Typing of 30 insertion/deletions in Danes using the first commercial indel kit—Mentype[®] DIPplex. *Forensic Sci Int Genet.* 6 (2): e72–e74.
24. Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D. (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Leg Med.* 117 (2): 67–74.
25. Soejima M, Koda Y. (2007). Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2. *Int J Leg Med.* 121 (1): 36–39.
26. Rana BK, Hewett-Emmett D, Jin L, Chang BHJ, Sambuughin N, et al. (1999). High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. *Genetics*, 151 (4): 1547–1557.
27. Yuasa I, Umetsu K, Harihara S, Kido A, Miyoshi A et al. (2007). Distribution of two Asian-related coding SNPs in the MC1R and OCA2 genes. *Biochem Genet.* 45 (7): 535–542.

Anastassiya Zidkova

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.

„Oplozením při vyšší teplotě vzniká kluk.“

„U dvoudomých rostlin jsou mužské pohlavní orgány na stromě.“

(Otázka Potravní řetězce): „Malými muškami se živí větší mušky a tento potravní řetězec končí u člověka.“

„Jako lékařka v genetické poradně bych hlavně pracovala na genetické prognóze, a pak bych se věnovala otcovství.“

„Úkolem genetické poradny je doporučit těhotenství – a pokud už je, tak doporučit jeho zrušení.“