

# INFORMAČNÍ LISTY



## **Zápis ze schůze výboru GSGM, z. s., konané dne 9. 12. 2015 v Brně**

Přítomni: Doškař, Holá, Kočová, Mašek, Nešvera, Relichová, Šeda, Šmarda, Zadražil, Zelený

Omluveni: Čellárová, Knoll, Miadoková, Slaninová, Tomáška

Program schůze:

1. Zhodnocení činnosti společnosti za období od minulé schůze výboru
2. Projednání záležitostí spojených s přejmenováním společnosti
3. Projednání postupu pro úpravu stanov společnosti tak, aby odpovídaly požadavkům NOZ
4. Zhodnocení náplně posledního čísla IL a projednání obsahu připravovaného čísla
5. Schválení nových přihlášek za člena GSGM a zařazení nově přijatých členů do evidence, informace o stavu členské základny
6. Plán akcí GSGM na další období
7. Různé

ad 1)

Předseda informoval o akcích, které se uskutečnily v Brně v uplynulém období zejména v souvislosti s odkazem J. G. Mendela, kterých se účastnili někteří členové společnosti. Bylo konstatováno, že tyto akce se těší velkému zájmu odborné i širší veřejnosti a GSGM je bude nadále propagovat a podporovat.

ad 2)

Předseda informoval o provedené změně zapsaných údajů ve spolkovém rejstříku místně příslušného rejstříkového soudu. Změna se týká názvu společnosti tak, aby byl v souladu s požadavky NOZ a obsahoval slovo spolek. Příslušná změna byla provedena a nový název je Genetická společnost Gregora Mendela, z. s. (zapsaný spolek), ve zkratce GSGM, z. s.

ad 3)

Přítomní členové výboru diskutovali o nejvhodnějším postupu pro úpravy znění stanov společnosti tak, jak vyžaduje NOZ, a o přípravě návrhů na případné další změny a jejich schvalování. Termín pro přizpůsobení stanov úpravě NOZ je do 1. 1. 2017. Současně s těmito povinnými úpravami bude vhodné provést i další změny, pokud budou navrženy a schváleny. Přítomní členové výboru se shodli na potřebě některých zjednodušení a aktualizací ve stávajících stanovách. Členové společnosti budou informováni a vyzváni k přípravě návrhů na změny, které budou následně projednány na valném shromáždění, jehož svolání je předběžně plánováno na jaro 2016. O projednaných návrzích by poté hlasovalo plénum společnosti. Za přípravu a koordinaci aktualizace stanov zodpovídají Kočová, Holá, Mašek; kontrolují členové výboru (termín pro první fázi příprav změn stanov je do konce února 2016).

ad 4)

Velice pozitivně byla hodnocena úroveň posledního čísla IL. Prof. Šmarda informoval o materiálech, které dosud obdržel pro nadcházející číslo. Příspěvky týkající se různých výročí spojených s osobností J. G. Mendela dodali a připravují někteří členové společnosti (Lízal, Matalová E., Matalová A., Dostál). Další příspěvky týkající se úspěšně obhájených doktorských dizertačních prací připravili jednotliví redaktoři. Členové výboru se shodli na tom, že tyto vědecké příspěvky mohou být v českém nebo anglickém jazyce tak, jak je ve spolupráci s redaktory poskytnou jednotliví oslovení absolventi (termín dodání všech příspěvků do 23. 12. 2015). Dr. Holá navrhla, že by pravidelnou součástí IL mohly být informace o proběhlých vědeckých konferencích a akcích v oblasti teoretické i praktické genetiky, pořádaných v ČR/SR nejen GSGM, ale i dalšími společnostmi. Dále navrhla, že by v každém budoucím čísle IL mohly být postupně představovány jednotlivé výzkumné skupiny a laboratoře členů GSGM. Přítomní členové výboru konstatovali, že podobné příspěvky byly v minulosti v IL publikovány a souhlasili s postupným představováním vědeckých týmů.

ad 5)

Za uplynulé období byla výboru doručena jedna nová přihláška za člena společnosti od RNDr. Magdy Zrzavé, Ph.D., z Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Výbor žádost schválil a dr. Zrzavá byla přijata za členku GSGM a je zařazena do databáze pod evidenčním číslem 140. Výbor byl informovaný o stavu členské základny, opravách a doplněných údajích v databázi členů GSGM (změna zásilací adresy, oprava údajů, aktualizace členů). Aktualizovaný seznam členů GSGM bude zveřejněn na webových stránkách. Přítomní členové výboru se tichou vzpomínkou rozloučili se zesnulým dlouholetým a čestným členem společnosti doc. V. Orlem.

ad 6)

Prof. Tomáška se spolupracovníky navrhuje uspořádat další seminář zaměřený na výuku na českých a slovenských univerzitách, tentokrát na téma: Praktická cvičení z genetiky a molekulární biologie v bakalářském a magisterském stupni studia. Cílem semináře by bylo vzájemně se informovat o formě a náročnosti praktických cvičení, logistice a zájmu studentů o tuto výuku. Prostor by byl věnován významu praktických cvičení pro rozšíření znalostí a dovedností studentů a v neposlední řadě i podmínkám pro jejich absolvování a způsobu hodnocení. Předchozí výukový seminář byl velice kladně hodnocený a členové výboru se jednoznačně shodli na tom, že by takovéto semináře mohly patřit mezi pravidelné akce GSGM. Další seminář by v budoucnu mohl být zaměřen na to, jak jsou na jednotlivých univerzitách do výuky zařazeny pokroky a novinky v genetice (návrh prof. Zadražila). Plánovaný seminář byl předběžně navržen na poslední květnový týden 2016. Termín bude upřesněn po projednání s ředitelem Mendelova muzea, kde by bylo vhodné seminář opět uskutečnit (zodpovídají prof. Tomáška, prof. Doškař).

ad 7)

Byly diskutovány některé otázky týkající se případných změn stanov GSGM. Dále se diskutovala možná náplň plánovaného výukového semináře. Zazněl návrh na vložení přímých odkazů na Mendelovo muzeum, Mendelianum a další užitečné instituce na webové stránky GSGM.

Zapsala: M. Kočová

### Vítězslav Orel zasvětil život bádání o Mendelovi



Dne 13. srpna 2015 nás opustil doc. RTDr. Vítězslav Orel, DrSc. Společně s prof. Jaroslavem Kříženeckým byl nejvýznamnějším poválečným badatelem věnujícím se G. Mendelovi. Narodil se 29. května 1926 v Lískovci u Koryčan. Jeho otec v něm pěstoval zájem o přírodu a chov zvířat, a proto se po studiu a maturitě na kyjovském gymnáziu stal řádným studentem Vysoké školy zemědělské v Brně, kde získal titul RTDr. Během studia navštěvoval přednášky z genetiky ve šlechtitelství zvířat prof. Jaroslava Kříženeckého, kde se seznámil s rolí J. G. Mendela v počátcích tohoto oboru. Vliv profesora Kříženeckého byl na Orla zcela zásadní a ovlivnil jeho zájem o vědu a vědecké postupy. Mendelismus však nebyl oficiálně povoleným směrem bádání a oběma způsoboval komplikace. Po studiích Orel nastoupil do Výzkumného ústavu drůbežářského průmyslu v Brně, kde pracoval jako výzkumný pracovník. Pro svoje názory byl koncem 50. let přesunut do výroby mimo Brno. Roku 1963 byl rehabilitován prof. Kříženecký, který tou dobou pracoval na znovuoživení Mendelova muzea - Mendeliana pod hlavičkou Moravského zemského muzea v prostoru Opatství na Starém Brně. Společně se tak stali ochránci odkazu G. Mendela a postarali se o vytyčení vědeckých cílů této muzejní instituce. V jeho čele Orel stanul roku 1965, po náhlém úmrtí prof. Kříženeckého koncem roku 1964, a vedl jej až do roku 1991, kdy byl nucen se vzdát veřejných funkcí kvůli zdravotním komplikacím. Roku 1969 mu byla na Vysoké škole veterinární udělena akademická hodnost docenta. O dvacet let později byl oceněn Univerzitou Karlovou, kde získal titul DrSc.

Docent Vítězslav Orel zaměřil svoji vědeckou práci na výzkum odkazu Gregora Mendela a souvislostí s vědeckým bádáním na Moravě. Zcela jednoznačně prokázal roli opata Nappa v Mendelových výzkumech a ovlivnění Mendela historickým vývojem šlechtitelství na Moravě. Orel byl tak jedním z prvních, kdo interpretoval Mendela v širším kontextu. Za svůj život publikoval přes 200 vědeckých prací, stál u zrodu časopisu Folia Mendeliana, který ve své době představoval základní informační zdroj o Mendelovi a jeho práci. Zhoršující se zdravotní stav však nebyl docentu Orlovi limitem. Jako jeden z mála českých autorů byl zařazen do publikací prestižního nakladatelství Oxford University Press a jeho kniha o Mendelovi vydaná zmíněným nakladatelstvím patří mezi špičkové monografie věnované historicky významné vědecké osobnosti.

Doc. Orel žil plný život s manželkou Olgou, synem Markem a později i vnoučaty. S jeho odchodem jsme přišli o světově uznávanou vědeckou osobnost na poli historie vědy, a jedinečný zdroj informací k Mendelovu životu a pozadí jeho výzkumů. Zbylo nám dílo, které si dovolím nazvat jako nesmrtelné. Čest jeho památce.

Mgr. Ondřej Dostál, Ph.D.

**Katedra genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy  
v Praze: historie a současnost  
(upraveno a doplněno na základě přednášky na genetické konferenci GSGM 2014)**

**Dana Holá, Stanislav Zadražil**

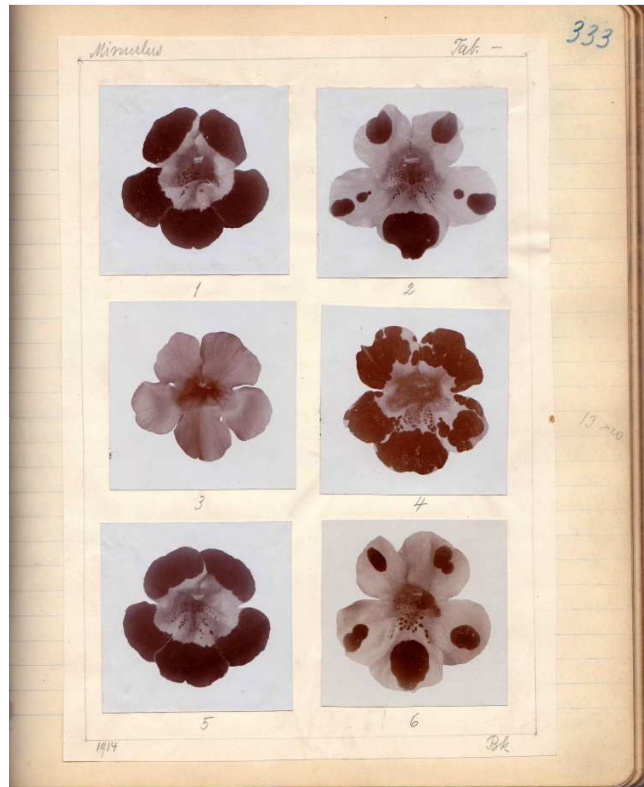
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra genetiky a mikrobiologie,  
Viničná 5, 128 43 Praha 2 – Nové Město

## **Historie**

Katedra genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (PřF UK) slavila v roce 2014 55 let od svého založení. Přestože to jistě není zanedbatelné číslo, historie genetiky na pražské Univerzitě Karlově je ještě mnohem starší. Její počátek můžeme datovat téměř do r. 1900, kdy došlo ke znovuobjevení Mendelových pravidel o dědičnosti znaků a genetika se postupně začala etablovat jako nový, nesmírně důležitý vědní obor. Jak je známo, jako první umožnily dokázat platnost Mendelových pravidel pokusy s různými rostlinnými druhy. Není tedy divu, že i v Praze se genetika začala rozvíjet nejprve v rámci výzkumu prováděného na rostlinách. V té době se přírodní vědy v rámci tehdejší české i německé části Karlo-Ferdinandovy univerzity přednášely na Filosofických fakultách, a to včetně botaniky a s ní souvisejících oborů. Na přelomu 19. a 20. století získaly přírodovědecké obory obou pražských Filosofických fakult nové univerzitní budovy v Benátské (německá část) a Viničné (česká část) ulici na Novém Městě. Při této příležitosti byl tehdejší asistent profesorů Čelakovského a Vejdovského na české Karlo-Ferdinandově univerzitě a čerstvě jmenovaný docent Bohumil Němec pověřen v letech 1899-1901 vybudováním Ústavu pro fyziologii rostlin, v jehož rámci se výzkum a posléze i výuka v oblasti genetiky na UK poprvé začaly prakticky provádět.

Bohumil Němec (1873-1966) se zabýval téměř všemi oblastmi biologie rostlin (cytologie, karyologie, anatomie, fyziologie, imunita, parazitismus, symbiosa, patologie aj.), které byly i zaměřením ústavu, a byl v nich skutečně vynikajícím, celosvětově známým odborníkem. Především díky němu byl přes finanční i materiální problémy pražský Ústav pro fyziologii rostlin již před 1. světovou válkou mezinárodně uznáván. I když Němec nebyl svým zaměřením přímo genetik, o tuto nově vznikající disciplínu se živě zajímal, předpovídal jí velkou budoucnost a značné praktické uplatnění. Byl to právě on, kdo jako první informoval českou vědeckou veřejnost o studiích Huga de Vriese, Carla Corrense, Ericha von Tschermak-Seysenegg a dalších vědců, kteří na začátku 20. století pravidla dědičnosti studovali. Mnoho studentů genetiky ještě o téměř dvě generace později s potěšením vzpomínalo na Němcovu účast na genetických seminářích, jeho živé zapojování do diskuzí a skvěle vyprávěné příběhy a vzpomínky. V roce 1903 byl Němec jmenován mimořádným profesorem a v r. 1907 řádným profesorem. Krátce po vzniku samostatné Československé republiky se stal děkanem Filosofické fa-

kulty UK a velmi se angažoval v oddělení přírodních věd od humanitních oborů a vzniku samostatné Přírodovědecké fakulty, k němuž došlo v r. 1920. Ústav pro fyziologii rostlin tehdy přešel na tuto fakultu a dva Němcovi žáci – Jan Kořínek a Artur Brožek – vytvořili a vedli v ústavu mikrobiologické, resp. genetické oddělení, z kterých se stalo druhé a třetí hlavní oddělení ústavu.



*Artur Brožek (1892-1934) a jeho vlastnoruční protokol o hybridizacích s kejkličkou*

Právě Artura Brožka lze považovat za skutečného zakladatele genetiky na pražské UK. Brožkova úloha v rozvoji genetiky v naší zemi bohužel dodnes není plně doceňována, možná díky nesmírné skromnosti, kterou se vyznačoval. I když doktorát získal už r. 1907, nemohl na univerzitě zůstat (nebylo zde tehdy pro něj volné místo) a musel se živit jako středoškolský profesor. I přesto však našel čas k tomu, aby se věnoval pokračování svých výzkumů, které zahájil během svého vysokoškolského studia a které se týkaly biometrie a statistických pravidel ve studiu bezobratlých (měl vynikající matematické vzdělání). To ho přirozeně dovedlo ke genetice a k Mendelovým pravidlům dědičnosti. Později, když se jeho osobní situace poněkud vylepšila, začal znovu spolupracovat s univerzitou a zahájil své komplexní, rozsáhlé a velice pracné pokusy na kejkličce (*Mimulus*). Jejich výsledky odhalily celou řadu zajímavých aspektů souvisejících s dědičností barvy květů u tohoto druhu, mimojadernou dědičností aj. Částečně i na jejich základě později napsal učebnici „Nauka o dědičnosti“, která byla publikována v r. 1930. Brožek sám se v r. 1920 stal vysokoškolským pedagogem a o sedm let později prvním profesorem genetiky na UK v Praze (a prvním profesorem genetiky v Československu!). V letech 1924-1925 také vyjel na stáž do USA, kde pracoval v laboratořích

již tehdy světoznámých genetiků C.B. Davenporta a T.H. Morgana. Z Morganovy laboratoře si domů do Prahy dovezl kolekci mutantních octomilek (*Drosophila melanogaster*), kterou potom používal jako demonstrační materiál při svých přednáškách a praktických cvičeních. Brožek byl také prvním překladatelem původní Mendelovy studie z němčiny do češtiny a neúnavným popularizátorem genetiky mezi odbornou i neodbornou veřejností.



Brožkovým nástupcem v čele genetického oddělení Ústavu pro fyziologii rostlin se po jeho úmrtí v r. 1934 stal Karel Hrubý (1910-1962). Ten se sice považoval spíše za žáka prof. Němce než Brožka, ale pokračoval v práci obou svých předchůdců a zabýval se různými biometricko-genetickými a cytologickými problémy, zejména u rostlin (i když byl také zároveň velmi aktivním entomologem). V oblasti genetiky je znám především svými pracemi týkajícími se taxonomie různých druhů šalvějí (*Salvia*) a dědičnosti některých morfologických a biochemických znaků u tohoto rodu i u dalších rostlin. V této tématice potom na univerzitě pokračovala i řada jeho žáků. R. 1937 byl jmenován docentem a následujícího roku absolvoval stáž v Anglii na tehdy (a dodnes) velmi prestižním genetickém pracovišti John Innes Horticultural Institution, v laboratoři C.D. Darlingtona.

Tato stáž významně přispěla k jeho zájmu o pomologické studie a praktické křížení ovocných stromů; někteří z jeho kříženců jabloní, hrušní nebo třešní dodnes přežívají v experimentální zahradě PřF UK na pražském Albertově. Jeho vědecká a pedagogická kariéra bohužel velmi utrpěla německou okupací v letech 1939-1945; po zavření českých vysokých škol pracoval nejprve krátce jako středoškolský profesor, poté byl nasazen jako dělník v Junkersu. Přesto genetice zůstal věrný a r. 1943 uveřejnil populárně-naučnou publikaci „Tvoříme s přírodou“, která se stala inspirací a přivedla k biologii a genetice mnoho mladých lidí v poválečných generacích.

Po skončení druhé světové války r. 1945 se profesor Hrubý velmi angažoval v propagaci genetiky a lze ho právem považovat za jednoho z nejvýznamnějších zakladatelů poválečné české genetiky se značným vlivem i na slovenská pracoviště. Vrátil se ke svému povolání vysokoškolského pedagoga (r. 1945 byl jmenován profesorem) a pracoval jako vedoucí genetického oddělení Ústavu anatomie a fyziologie rostlin (tehdy sídlícího již plně ve Viničné 5). 1947 byl pro něj velmi úspěšným rokem – byl reprezentantem UK na VII. mezinárodním genetickém kongresu ve Stockholmu, založil a otevřel Brožkovu genetickou zahradu na Albertově a především osamostatnil genetické oddělení Ústavu anatomie a fyziologie rostlin jako Genetický ústav (ze zbývajících oddělení vznikl Mikrobiologický ústav vedený Janem Kořínkem a Ústav anatomie a fyziologie rostlin vedený Sylvestrem Prátem). R. 1948 vydal prof. Hrubý další vědecky-populární knihu „Eugenika“. Příznivý rozvoj nově vzniklého ústavu však netrval dlouho. „Vítězný únor“ r. 1948 znamenal počátek řady reorganizací vysokých škol na základě sovětských zkušeností a zejména nastupující lisenkismus a boj proti genetice jako „buržoazní pavědě“. Prof. Hrubý však přesto i v této nelehké době v neoficiální výuce genetiky pokračoval a z výzkumného hlediska u nás položil základy studia

mutageneze rostlin, většinou s aplikačním přínosem (odolnost brambor vůči rakovině, zvyšování obsahu alkaloidů v léčivých rostlinách, schopnosti opylování ovocných stromů).

R. 1950 byly samostatné ústavy vzniklé o tři roky dříve opět zrušeny a ve Viničné a Benátské vznikla ze všech těchto ústavů jediná Katedra botaniky (alespoň že vedoucí oddělení byli zachováni a odborná zaměření pokračovala). Značná nesourodost a obtížná ovladatelnost tohoto kolosu vedla ovšem již r. 1952 k jejímu rozpadu na dvě katedry – katedru botaniky (se sídlem v Benátské) a katedru fyziologie rostlin, mikrobiologie a genetiky (se sídlem ve Viničné). Tehdy se slovo genetiky poprvé objevilo v oficiálním názvu jedné z kateder fakulty. Ta slučovala původní odborná zaměření genetiku, mikrobiologii a anatomii a fyziologii rostlin, a navíc měla i čtvrté oddělení půdní mikrobiologie. Kromě krátké existence těchto různých organizačních útvarů a nutnosti zabezpečit především teoretickou a praktickou výuku studentů (tehdy většinou učitelského směru) došlo v letech 1953-1958 k další nesmyslné reorganizaci, tentokrát na úrovni fakulty – PŘF zanikla a vytvořily se tři samostatné fakulty: Biologická, Matematicko-fyzikální (jejíž součástí byla i chemie) a Geologicko-geografická. Naštěstí fakultní představitelé zachovávali alespoň základní výukovou spolupráci. Zvláště odtržení biologie od chemie znehodnotilo výhodu každé přírodovědecké fakulty, proto po r. 1958 došlo opět k obnovení PŘF (při zachování Matematicko-fyzikální fakulty tentokrát bez chemie).

Po znovuoobnovení PŘF v jejím plnohodnotném uspořádání r. 1959 došlo mj. k další reorganizaci kateder a tehdy vznikla samostatná katedra fyziologie rostlin a půdní mikrobiologie, a konečně i první samostatná katedra mikrobiologie a genetiky, která (byť v následujících letech doznala několika přejmenování), zůstává zachována dodnes. Bylo nesrovnalou zásluhou prof. Hrubého, že genetiku na PŘF UK v Praze převedl přes tato bouřlivá období bez zvláštních karambolů a zajistil se svými spolupracovníky u studentů dostatečné povědomí o existenci genetiky a jejím významu pro biologické vědy a společnost. V r. 1958 znovu reprezentoval tehdejší československou genetiku na X. mezinárodním genetickém kongresu v Montrealu a právě zde navrhl, aby se sté výročí Mendelova objevu oslavilo uspořádáním mezinárodního kongresu v Mendelově mateřské zemi, což se posléze o sedm let později skutečně podařilo. I když byl Hrubý mezinárodně uznávaným vědcem, pro tehdejší vedení socialistického Československa nebyl dostatečným „kádrem“ vhodným pro vedení nové katedry. Zůstal tak na postu vedoucího oddělení genetiky a vedoucím katedry se stal Jiří Stárka (1919-2003), který si vzhledem ke svému zaměření na fyziologii a biochemii mikroorganismů ponechal i vedení mikrobiologického oddělení katedry. Doc. Stárka, zaměřený vědecky na růst a dělení bakteriální buňky, věnoval velkou pozornost výuce a postgraduálnímu studiu, konání seminářů (mikrobiologický i genetický) a poprvé i úzké spolupráci s vedoucími pracovníky Mikrobiologického ústavu (MbU) tehdejší Československé akademie věd (ČSAV) a Potravinářské fakulty Vysoké školy chemicko-technologické – tehdy došlo k prvnímu pokusu o jakousi integraci mikrobiologických pracovišť v Praze.

R. 1959 tedy katedra vstoupila do relativně stabilního a odborně klidného období. Přispělo k tomu zkušené personální obsazení z bouřlivých dřívějších let (Karel Hrubý, Jan Nečásek, Zdena Hlaváčková, František Kaprálek, Jiří Stárka, Vojtěch Závada, Naděžda Avratovščuková, Bohumil Kníže, Jaroslav Drobník, Jarmila Tomková, Eva Koutecká aj.). Z hlediska genetiky se stále uplatňovala Hrubého úspěšná taktika zařazování specializačních „praktických“ přednášek (zaměřených např. na šlechtitelskou ochranu rostlin, plemena hospodářských zvířat, hodnocení pokusů, odrůdy kulturních



roślin), zatímco obecná genetika ve výuce částečně chyběla. V té době musela být stále v určitém utajení, ale r. 1961 (na počátku uvolňování genetické recese v socialistických zemích) vyšla významná Hrubého učebnice „Genetika“, která byla na dlouhou dobu naší základní genetickou encyklopedií a vysokoškolskou učebnicí. Následujícího roku se podařilo zakotvit Hrubého přednášku Obecná genetika i do základní výuky. Bohužel, v témže roce prof. Hrubý tragicky zahynul při havárii exkurzního autobusu. Jeho přednášku i vedení genetického oddělení okamžitě převzal Jan Nečásek, Zdena Hlaváčková převzala vedení seminářů z genetiky a Naděžda Avratovščuková Brožkovu genetickou zahradu. Tyto skutečnosti svědčily o vysokém stupni sebranosti a zastupitelnosti pracovníků v kolektivu katedry.

V první polovině 60. let se na katedře zformovala pracovní skupina biofyziky vedená Jaroslavem Drobníkem (1929-2012) s podporou Vladimíra Vondrejse (\*1937), zaměřená na studium nukleových kyselin, vlivu ionizujícího a radioaktivního záření, beztyminovou smrt a replikaci DNA. Mohla těžit již z výsledků určité rehabilitace genetiky (r. 1965 mendelovský kongres v Brně ke 100. výročí zveřejnění Mendelových genetických experimentů; Usnesení vlády ČSSR k rozvoji genetiky) a v r. 1967 se přeměnit na samostatné oddělení biofyziky. V tomto roce došlo také ke změně názvu katedry na katedru genetiky, mikrobiologie a biofyziky. Jaroslav Drobník však byl r. 1969 (tehdy fungoval i jako proděkan fakulty) z politických důvodů zbaven vedení a r. 1970 propuštěn z PŘF (získal místo v Ústavu makromolekulární chemie ČSAV). Biofyzika byla posléze převedena pod katedru ochrany životního prostředí, kde se později rozpadla. Podobný osud postihl i genetiku živočichů, tentokrát převedenou na katedru zoologie.

Doc. Stárka za dobu svého úspěšného působení na katedře vydal vynikající učebnici „Fyziologie a biochemie mikrobů“. V r. 1968 ale odjel na studijní pobyt do Francie, z něhož se 1970 už nevrátil a byl ve vedení mikrobiologického oddělení nahrazen Františkem Kaprálkem a Vojtěchem Závadou. Vedení katedry převzal Jan Nečásek (1925-1998), genetik-mykolog. Kromě důležité pedagogické činnosti (autor učebnice „Obecná genetika“ vydané r. 1979) se experimentálně věnoval mutagenезi u bakterií a vlivu zevního prostředí. 1971 byl spolu s Vítězslavem Orlem z Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně iniciátorem, zakladatelem a prvním předsedou sekce obecné genetiky Československé biologické společnosti, která byla předchůdcem naší Genetické společnosti Gregora Mendela. Za jeho vedení byly rovněž zavedeny nové přednášky typu „Pokroky v ...“, „Vybrané kapitoly z ...“ apod. Podobně jako Stárka se ani Nečásek nestal v době svého působení profesorem (Stárka se pak stal profesorem ve Francii) a i když to nebylo jistě hlavním důvodem, z Prahy posléze odešel, sice ne do emigrace, ale do Českých Budějovic, čímž vyřešil i určité rodinné potřeby. Tam se v Ústavu molekulární biologie rostlin ČSAV zabýval rostlinnými genovými manipulacemi a biotechnologiemi. Jeho pedagogické i výzkumné úkoly v Praze ihned převzal Petr Pikálek.

R. 1978 převzala po Nečáskovi vedení katedry Olga Bendová (1929-2010), téhož roku jmenovaná profesorkou mikrobiologie, která byla pracovně zaměřena na biologii kvasinek. Ta s definitivní platností vyřešila situaci kolem biofyziky a katedra se vrátila k původnímu názvu s mutací pořadí oborů – katedra genetiky a mikrobiologie. Tento název už se udržel až dodnes. Dr. Bendová iniciovala po konzultacích s Vladimírem Vondrejsem, Vojtěchem Závadou a Stanislavem Zadražilem vznik pracovní skupiny biologie kvasinek a jejich genových manipulací, což předznamenalo trvalou katedrovou aktivitu tehdy externího učitele molekulární biologie a genetiky Stanislava Zadražila, a

uzavření dohody s Ústavem molekulární genetiky (ÚMG) ČSAV o vytvoření společného výzkumného pracoviště obou institucí, Laboratoře genových manipulací, vedené Vondřejsem a Zadražilem (1985). Nové vedení katedry věnovalo pozornost i stavebním úpravám v budově Viničná 5 pro potřeby katedry.

V r. 1989 se stal vedoucím katedry (spíše na nátlak volby akademické obce, protože sám na to nikdy neaspiroval) mikrobiolog a virolog Vojtěch Závada (\*1929), zapálený učitel s vynikajícími virologickými přednáškami a zásluhami o moderní výuku molekulární biologie a virologie a nositel pedagogického „velemloka“ (nejlepší pedagog podle hodnocení studentů). V tomto období byly především odčiněny politické křivdy z minulosti na některých pracovnících katedry, kteří nyní konečně mohli získat tituly docentů, které jim již dávno náležely (Vondrejs, Avratovšćuková, Hendrychová). Po krátké době, začátkem r. 1991, Závada předal vedení katedry Stanislavu Zadražilovi (\*1935), biochemikovi a molekulárnímu biologovi z ÚMG ČSAV, dlouholetému externímu učiteli molekulární biologie na PŘF UK v Praze. Kromě jiných výrazných zásluh o výuku molekulární biologie na UK Zadražil také už dříve přeložil dvě učebnice molekulární biologie, ve své době značně chválené jako vysokoškolské učební příručky. V r. 1992 byl jmenován prvním profesorem molekulární biologie v historii UK v Praze. Byl prvním, kdo byl vybrán ve skutečně regulérním konkurzu na vedoucí pracovníky fakulty a na katedru genetiky a mikrobiologie s sebou přivedl i další zaměstnance s praxí ze společného pracoviště s ČSAV (Jitka Forstová, Zdena Palková, Martin Pospíšek). Ti po dohodě s novým ředitelem Biotechnologického ústavu UK v Praze (navráťivším se prof. Drobníkem) zaplnili dočasně i některá volná místa na jeho pracovišti a v současnosti jsou vedoucími výzkumných skupin katedry (viz dále). Velmi rychle tak bylo vytvořeno opět třetí oddělení katedry, tentokrát zaměřené na molekulární biologii a molekulární genetikou (buněčné a genové manipulace s mikrobiálními buňkami, transgenní mikroorganismy s heterologní expresí cizorodých genů, poprvé v historii katedry i experimentální virologie s modelem polyomaviru). Tím také byla na jednom pracovišti definitivně sjednocena výuka molekulární biologie a genetiky, zahájená v šedesátých letech 20. století na fakultních katedrách biochemie (Zadražil) a genetiky a mikrobiologie (Vondrejs, Závada, Drobník).

Velmi významným impulsem pro výuku a výzkum v tomto období bylo i nové nastartování postgraduálního doktorského studia na úrovni oborové rady Molekulární a buněčné biologie, genetiky a virologie, která se stala organizačním jádrem koordinovaného studia biomedicíny na PŘF a lékařských fakultách UK v Praze za spolupráce ústavů ČSAV (po r. 1993 Akademie věd České republiky – AV ČR) na základě dohody mezi UK a AV. Déle než dvacetileté trvání této koordinace (celkem 21 oborových rad) je považováno Akreditační komisí Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT) za nejúspěšnější formu doktorského studia v České republice.

R. 1998 vystřídal ve vedení katedry Stanislava Zadražila Petr Pikálek (\*1943), Nečáskův žák, zaměřený mnohem více pedagogicky. Velmi známé byly především jeho přednášky obecné genetiky pro nebiologické obory na fakultě. Právě pod jeho vlivem přestala existovat oborová oddělení, která se změnila na čtyři specializační zaměření (genetika, molekulární biologie, virologie a mikrobiologie). Na přelomu století (a tisíciletí) byl pro organizaci a mezinárodní hodnocení studia zaveden i kreditní systém. V období 2004-2010 se ujala vedení katedry Zdena Palková (\*1962), v r. 2008 jmenovaná profesorkou genetiky, molekulární biologie a virologie. Pod jejím vedením došlo z administrativního hlediska k definitivnímu ustálení počtu magisterských studijních

zaměření ve dvou katedrových oborech (Genetika, molekulární biologie a virologie, Mikrobiologie) na 6 + 1 (viz dále). Bezprostředně následujícím vedoucím katedry byl od r. 2010 mikrobiolog Ivo Konopásek (\*1958), který se soustředil na stabilizaci mikrobiologické části katedry a na řízení a činnost druhé oborové rady situované na katedře (Mikrobiologie, rovněž zahrnutá do koordinace doktorských studijních programů v biomedicině). Katedra v té době experimentálně velmi úzce spolupracovala především s MbÚ AV ČR, ale i s dalšími akademickými nebo rezortními výzkumnými ústavu.

V r. 2013 nastoupil jako zatím poslední vedoucí katedry Ivan Hirsch (\*1946), absolvent biofyzikálního postgraduálního studia na katedře, který se na pracovištích doma i v zahraničí (v letech 1989-2013 pracoval jako výzkumný ředitel v INSERM, Marseille, Francie) věnoval virologii, především retrovirům. Po návratu na fakultu zahájil další intenzivní výzkumnou spolupráci s AV ČR (ÚMG, Ústav organické chemie a biochemie). Pod jeho vedením část výzkumných týmů katedry právě v současnosti prochází stěhováním do nově postaveného výzkumného centra excelence BIOCEV ve Vestci u Prahy, společného pracoviště vybraných fakult UK v Praze a ústavů AV ČR. Hlavním zdrojem finančních prostředků na vybudování centra je Evropský fond regionálního rozvoje. Katedra tím rozšiřuje experimentální prostory (přičemž si zachovává i laboratoře a seminární místnosti ve svém tradičním sídle ve Viničné 5, které v posledních deseti letech také prošly náročnou rekonstrukcí a modernizací) a nabízí svým studentům možnost práce se skutečně špičkovým přístrojovým vybavením.

## Současnost

Katedra genetiky a mikrobiologie je v současné době jednou z největších kateder biologické sekce PŘF UK v Praze, s více než 70 zaměstnanci. V r. 2015 bylo složení katedry následující: 2 profesori, 3 docenti, 16 odborných asistentů, 3 lektori, 35 výzkumných pracovníků a 17 technických pracovníků. Na katedře nyní existuje několik výzkumných skupin, které se zabývají výzkumem v různých oblastech molekulární a buněčné biologie, genetiky, mikrobiologie a virologie.

V Laboratoři virologie (*vedoucí Jitka Forstová*) je výzkum orientován především na malé DNA viry z čeledi *Polyomaviridae* a *Hepadnaviridae*. Členové laboratoře studují interakce virů a jejich produktů s různými strukturami hostitelských buněk a funkční důsledky těchto interakcí. Zabývají se rovněž možnostmi využití virových kapsid a pseudokapsid v genové terapii a/nebo importu biologicky aktivních látek do savčích buněk, stejně jako výzkumem vedoucím k přípravě veterinárních vakcín proti prasečím cirkovirům a bovinním papillomavirům. Skupina Ivana Hirsche studuje v rámci této Laboratoře roli přirozené imunity při eliminaci genomu viru Hepatitidy B z jader infikovaných buněk. Tato skupina se rovněž dlouhodobě zabývá možnostmi eradikace rezervoáru HIV rezistentního na léčbu kombinovanou terapií. Jsou zároveň členy výzkumného projektu společného biotechnologického a biomedicínského centra AV ČR a UK v Praze BIOCEV, a to v rámci programu Buněčná biologie a virologie.

Nedávno se katedra rozšířila o dva další výzkumné týmy (*vedoucí Ruth Tachezy, Michal Šmahel*) zabývající se výzkumem v oblasti virologie, a to lidskými papillomaviry. Jejich členové jsou rovněž aktivně zapojeni do centra BIOCEV (program Buněčná biologie a virologie) a kromě katedry jsou současně asociováni i s Ústavem hematologie a krevní transfúze. Věnují se charakterizaci a imunoprofilování nádorů asociovaných s



*Současný pohled na budovu a Laboratoř virologie na adrese Viničná 5, kde sídlí Katedra genetiky a mikrobiologie.*

lidskými papilomaviry, identifikaci cílů pro jejich diagnostiku a terapii a optimalizaci DNA imunizace proti těmto nádorům.

Laboratoř fyziologie bakterií (*vedoucí Ivo Konopásek*) se zabývá funkcí bakteriálních toxinů, které působí na cytoplazmatickou membránu cílové buňky. Dále se věnuje adaptaci bakteriální membrány ke stresům a její interakci s povrchově aktivními látkami, a také interakci bakteriálních buněk s nanomateriály. Skupina využívá kromě tradičních mikrobiologických přístupů také pestrou škálu biofyzikálních metod: metody založené na

fluorescenční spektroskopii a mikroskopii, vodivostní měření na lipidových dvojrstvách, rentgenostrukturní analýzu, metody analytické chemie (plynová a kapalinová chromatografie) a výpočetní metody pro stanovení struktur proteinů.

Výzkumná problematika Laboratoře genetiky bakterií (*vedoucí Irena Lichá*) je zaměřena na regulaci obecné stresové odpovědi u modelové bakterie *Bacillus subtilis* a adaptivní mutagenezi v důsledku působení fyzikálních stresorů. Další tematikou, kterou se členové laboratoře zabývají, je studium fyziologických mechanismů, které půdním bakteriím dovolují vyrovnávat se s účinky chemických látek kontaminujících v důsledku lidské činnosti půdní prostředí.

Hlavními tématy výzkumu v Laboratoři biologie kvasinkových kolonií (*vedoucí Zdena Palková*) jsou molekulární aspekty vývoje a extracelulární signalizace u kolonií kvasinek jakožto modelu mnohobuněčné organizované struktury. Také tento tým je plně zapojen do biotechnologického a biomedicínského centra BIOCEV v rámci programu Buněčná biologie a virologie. Mezi základní výzkumné směry patří studium rozdílů mezi mechanismy tvorby kolonií v přírodních a laboratorních podmínkách, studium role amoniaku jako signální molekuly při dlouhodobém přežívání a adaptaci kolonií, a studium horizontální i vertikální diferenciac buněk kolonií, přičemž některé parametry této diferenciac souvisejí s přežíváním, resp. s programovanou buněčnou smrtí buněk ve specifických oblastech.

Tým pracovníků a studentů Laboratoře biochemie RNA (*vedoucí Martin Pospíšek*) zkoumá základní principy syntézy bílkovin v eukaryotických buňkách. Cílem je pomocí vybraných modelů odhalit pravidla hry mezi viry a buněčnou protivirovou obranou, či použít získané poznatky základního výzkumu pro pochopení vzniku některých (zejména nádorových) onemocnění. Hlavními modely, které laboratoř využívá, jsou lidské buněčné linie, varianty viru žloutenky typu C a v neposlední řadě jednobuněčný modelový eukaryotický organismus – kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. M. Pospíšek je zároveň zakladatelem tradice RNA klubů v České republice (od r. 2003), které jsou aktivní součástí mezinárodní organizace RNA klubů.

Laboratoř genetiky rostlin (*vedoucí Dana Holá*) je dlouhodobě zaměřena na výzkum vnitrodruhové variability v různých funkčních a strukturních charakteristikách hospodářsky významných rostlin, především s ohledem na možné příčiny heterozního efektu. Členové laboratoře se v současnosti věnují zejména studiu příčin odlišné odolnosti inbredních a hybridních genotypů k různým abiotickým stresovým faktorům, a dále studiu působení brassinosteroidů a ekdysteroidů na rostlinný organizmus, zejména na fotosyntetický aparát. Spolupracují také s dalšími vysokoškolskými a akademickými pracovišti v rámci výzkumu fotosyntetických charakteristik jehličnanů.

Laboratoř cytogenetiky pavoukovic (*vedoucí Jiří Král*) je celosvětově jedinou laboratoří specializující se na chromozomální analýzy této skupiny členovců, která je velmi vhodným modelovým objektem např. pro studium evoluce pohlavních či holocentrických chromozómů, achiasmatické meiózy nebo polyploidizace živočišného genomu, jakož i modifikací karyotypu spojených s různými způsoby partenogeneze.

Členové jednotlivých laboratoří katedry výsledky svého výzkumu běžně publikují v prestižních vědeckých časopisech a monografiích a prezentují na mezinárodních i národních konferencích. Publikační aktivita členů a studentů katedry genetiky a mikrobiologie je na vysoké úrovni. Těžištěm jsou pochopitelně původní články v impaktovaných časopisech, často s velmi vysokým impakt faktorem (viz <https://www.natur.cuni.cz/biologie/genetika/veda-a-vyzkum-1/publikace-clenu-katedry>).

Členové katedry jsou také autory kapitol v několika zahraničních monografiích, vytvořili či modifikovali počítačová software využitelná v biologických disciplínách a napsali několik vysokoškolských skriptů aj. výukových textů (např. Kaprálek – Základy bakteriologie; Bendová, Janderová – Vybrané kapitoly z biotechnologie; Úvod do biologie kvasinek; Kočová, Nováková – Vybrané úlohy ke cvičením z genetiky; Vondřejš – Genové inženýrství I – IV). Neodřikají se ani popularizace vědy a s jejich články se občas můžete setkat např. v časopisech Živa nebo Vesmír. V tomto ohledu je nutno vyzdvihnout zejména činnost bývalého člena katedry Vladimíra Vondřejse, který je autorem popularizační knihy Otazníky kolem genového inženýrství a řady článků ve Vesmíru.

Výzkumné projekty řešené na katedře byly již od počátku zavedení grantového systému v ČR podporovány mnoha domácími granty a katedra v tomto trendu úspěšně pokračuje i nadále. Jedná se především o řadu projektů Grantové agentury České republiky, Technologické agentury České republiky, případně Grantové agentury AV ČR, ale také o projekty řešené v rámci různých programů vypisovaných MŠMT včetně tzv. center základního výzkumu a výzkumných záměrů. Další projekty jsou podporovány Ministerstvem zdravotnictví ČR, Ministerstvem zemědělství ČR či Ministerstvem vnitra ČR. V rámci systému financování vědy na UK v Praze se členové katedry intenzivně zapojují do systému Univerzitních výzkumných center, projektů Specifického vysokoškolského výzkumu a Programů rozvoje vědních oblastí na Univerzitě Karlově. Především doktorandi katedry jsou rovněž velmi úspěšní v získávání grantů podporovaných Grantovou agenturou UK v Praze.

Výzkumné týmy katedry jsou však v získávání grantových projektů úspěšné nejen na poli domácím, ale i v zahraniční konkurenci. Zdeně Palkové byly uděleny dva granty nadace Howard Hughes Medical Institute a aktuálně je i hlavní řešitelkou projektu Česko-norského výzkumného programu CZ09, při jehož výběru byl její projekt hodnocen jako druhý nejlepší na celostátní úrovni a jako vůbec nejlepší na UK v Praze. Laboratoř Jitky Forstové byla rovněž řešitelským pracovištěm projektu americké nadace Howard Hughes Medical Institute a spoluřešitelským pracovištěm projektu Biotechnologického programu Evropské komise. Výzkumná skupina Iva Konopáska se v minulosti zapojila do řešení mezinárodního projektu v rámci V. rámcového programu Evropské unie, Jiří Král se podílel na výzkumném projektu podporovaném US National Science Foundation.

Výuková činnost katedry spočívá v zajišťování základních i specializačních přednášek a praktických cvičení pro studenty bakalářského, magisterského i doktorského stupně vysokoškolského vzdělávání (každoročně přibližně 70 přednášek a cvičení, kurzů a seminářů). Tříleté bakalářské studium v bakalářských studijních programech Biologie, Speciální chemicko-biologické obory a Bioinformatika (které se dále dělí na různé studijní obory) je realizováno ve spolupráci všech kateder biologické sekce PŘF UK v Praze, případně dalších sekcí PŘF UK (v případě bakalářského studijního programu/oboru Bioinformatika i ve spolupráci s Matematicko-fyzikální fakultou UK v Praze). Až v posledním roce tohoto studia jsou studenti povinni se zapsat přímo na jednotlivé katedry v rámci přípravy své bakalářské práce (řada z nich nicméně začne na katedře pracovat již mnohem dříve). V rámci modulového systému studijních plánů, který na biologické sekci PŘF UK v Praze již řadu let existuje a který studentům umožňuje sestavit si zcela individuální vlastní studijní plán (viz <https://www.natur.cuni.cz/biologie/studium/uchazec-o-studium>), zajišťuje katedra geneti-

ky a mikrobiologie řadu základních přednášek a cvičení z oblastí genetiky, molekulární biologie, mikrobiologie a virologie. Další přednášky a praktická cvičení nejsou sice zařazeny do modulů, přesto jsou primárně určeny právě pro studenty bakalářského stupně studia.

Absolventům bakalářského studia (pochopitelně nejen z PřF UK v Praze) nabízí katedra genetiky a mikrobiologie možnost pokračovat ve dvouletém navazujícím magisterském studiu, a to ve dvou oborech v rámci studijního programu Biologie. Jedná se o studijní obor Genetika, molekulární biologie a virologie s šesti studijními specializacemi (Virologie, Molekulární biologie a genetiky prokaryot, Molekulární biologie a genetiky eukaryot, Buněčná a molekulární biologie mikrobiálních populací, Cytogenetika a Genetika rostlin) a studijní obor Mikrobiologie se stejnojmennou specializací. V rámci tohoto studia katedra opět zajišťuje celou řadu specializačních přednášek, cvičení, kurzů a seminářů. Těžištěm magisterského studia na PřF UK v Praze je ale především zpracování a obhájení diplomové práce. Na rozdíl od bakalářské práce mají diplomové práce na katedře genetiky a mikrobiologie především experimentální charakter, tzn. student pod vedením svého školitele samostatně pracuje na zadaném odborném tématu a získává původní vědecké výsledky, které specifickou formou zpracuje a interpretuje. Studenti se mohou experimentálně věnovat výzkumným tématům, na kterých pracují jednotlivé laboratoře katedry, katedra však díky své široké spolupráci s různými ústavu AV ČR, výzkumnými laboratořemi lékařských fakult UK i dalších institucí v oblasti zdravotnictví, případně výzkumnými ústavu rezortu zemědělství, umožňuje svým studentům magisterského studia zaměřit téma jejich diplomové práce prakticky jakýmkoli směrem. V rámci rigorózního řízení lze složením státní rigorózní zkoušky a obhajobou rigorózní práce, která je podmíněna alespoň jednou publikací v časopise s impakt faktorem (shrnuje vlastní experimentální výsledky zvolené problematiky) získat titul RNDr. – doktor přírodních věd.

Doktorské (postgraduální) studium na katedře genetiky a mikrobiologie lze realizovat ve dvou čtyřletých studijních programech/oborech: Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie a Mikrobiologie. Podle předchozího vzdělání a zaměření doktorandů jsou v rámci jejich studijních plánů katedrou nabízeny různé specializované přednášky, kurzy a semináře jako specifické aktivity seznamující jak s novými poznatky, metodami a technikami v oblastech genetiky, molekulární biologie, mikrobiologie a virologie, tak se širším oborovým a specializačním základem, poskytujícím nezbytný přehled a přispívajícím ke schopnosti studenta orientovat se v rychle se rozvíjejících a náročných směrech biologických věd obecně. Další kurzy jsou nabízeny v rámci oborových rad doktorských studijních programů v biomedicíně, do nichž oba výše uvedené studijní programy/obory patří. Absolvování minimálně dvou takových předmětů/kurzů v rámci doktorského studia je spolu s potvrzením o jazykové zkoušce z angličtiny (v případě Molekulární a buněčné biologie, genetiky a virologie) nebo zahraniční stáží (v případě Mikrobiologie) podmínkou pro přihlášení se ke státní doktorské zkoušce. Nejdůležitější součástí doktorského studia je ovšem dizertační práce, doklad schopnosti studenta samostatně vědecky pracovat a publikovat výsledky svojí práce jasnou a srozumitelnou formou. Předpokladem předložení dizertační práce k obhajobě na katedře genetiky a mikrobiologie PřF UK jsou minimálně dvě původní práce (z toho alespoň jedna prvoautorská) publikované nebo přijaté k publikaci v mezinárodně uznávaných vědeckých časopisech s impakt faktorem. Dizertační práce může být předložena v plném znění („klasická forma“) nebo ve zkráceném znění (soubor tří až

pěti publikovaných článků, opatřený stručným propojujícím textem; konkrétní požadavky závisí na příslušné oborové radě). Stejně jako v případě magisterských studentů i zde katedra aktivně spolupracuje s mnoha dalšími fakultami a pracovišti UK, ústavy AV ČR a rezortními ústavy jako školícími pracovišti postgraduálního doktorského studia (nejčastěji se jedná o ÚMG a MbÚ AV ČR, případně Ústav hematologie a krevní tranfúze, ale i další pracoviště především v oblasti medicíny). Během svého studia se doktorandi aktivně účastní vědeckých konferencí, na nichž prezentují své výsledky, časté jsou rovněž zahraniční stáže a získání zkušeností s mezinárodní spoluprací.

Každoročně na katedře úspěšně ukončí své vysokoškolské studium získáním příslušného titulu průměrně 23 bakalářských studentů, 26 magisterských studentů a 14 doktorských studentů. Absolventi nacházejí uplatnění jako odborníci a vědečtí pracovníci a badatelé v základním a aplikovaném biologickém výzkumu na vysokých školách, v AV ČR a resortních výzkumných pracovištích doma i v zahraničí, dále jako odborníci pracovníci ve výzkumných a vědeckých laboratořích státních institucí i soukromých firem, případně i jako učitelé biologie.

Další informace o katedře genetiky a mikrobiologie PŘF UK v Praze lze získat na jejich webových stránkách: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/genetika>.



**RNDr. Dana Holá, Ph.D.** ([dana.hola@natur.cuni.cz](mailto:dana.hola@natur.cuni.cz)), je členkou Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Na této katedře přednáší obecnou genetiku a genetiku rostlin a vede cvičení z genetiky. Zabývá se výzkumem v oblasti genetiky rostlin, aktuálně především vnitrodruhovou variabilitou v reakci rostlin na stresové faktory a vlivem rostlinných steroidů na fotosyntetický aparát.



**Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.**, ([molbio@natur.cuni.cz](mailto:molbio@natur.cuni.cz)) je jedním ze zakladatelů GSGM a prvním profesorem molekulární biologie na UK v Praze. Aktuálně je členem Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze a předsedou oborové rady doktorského studia v programu Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na této fakultě.



## Mendelovo muzeum a 150 let od Mendelových přednášek

### Ondřej Dostál

Mendelovo muzeum, Masarykova univerzita, Mendlovo nám. 1a, 603 00 Brno

Celý rok 2015 patřil oslavám 150 let od Mendelových přednášek. Význam tohoto výročí byl oceněn na nejvyšší úrovni a jeho oslavy proběhly pod záštitou premiéra ČR - pana Bohuslava Sobotky, rektora MU - pana docenta Mikuláše Beka a ČK UNESCO. Celý rok oficiálně zahájila přednáška Sira Michaela Strattona, FRS, ředitele Wellcome Trust Sanger Institute a Cancer Genome Project ve Velké Británii. Přednáška, včetně oficiálních zdravic zástupců MU, AV ČR a dalších, proběhla na střední škole na Jánské ulici v Brně dne 8. 2. 2015, kde Mendel přednesl výsledky svého bádání na rostlinných hybridech. Akce pokračovala v Mendelově Starobrněnském opatství přednáškou otce opata L. E. Martince, OSA a koncertem. Tento den byla zahájena i výstava "Dlouhá léta neviděno". Jednalo se o představení originálních dokumentů a rukopisů psaných buď Mendelem, či spojených s Mendelovým životem. Originály jsou uloženy v University of Illinois Archive, USA a Mendelovu muzeu byly zapůjčeny na dobu téměř 4 měsíců. Dokumenty byly k vidění na našem území naposledy v Mendelově muzeu založeném Hugo Iltisem, které bylo uzavřeno v roce 1937.

V dubnu se pak Mendelovo muzeum podílelo na výstavě "The Construction Set Of Life. For the 150th anniversary of Mendel's laws", které připravilo State Darwin Museum v Moskvě. Činnost muzea se však nesoustředila jen na výstavy. Další formou Mendelovských oslav byly konference pořádané muzeem, či za účasti zástupců Mendelova muzea. První z nich věnovaná Mendelovské tematice a za účasti zástupce Mendelova muzea byl Darwin day 2015 s tématem "The changing views on genetics: Darwin vs. Mendel, the synthesis, and synthetic biology" v norském Oslo. Muzeum se pak pilně připravovalo na dvě vlastní konference konané na podzim roku 2015. První byla konference "Research in plant genetics (From Mendel's peas to the present)", která proběhla od 7. do 10.9. v prostorách Mendelova muzea, kina Scala a SŠ a SOU na Jánské ulici. Konference byla věnována odkazu díla doc. RTDr. Vítězslava Orla, DrSc., neúnavnému propagátorovi Mendelova díla a přivítala zástupce z celého světa. Mezi hlavní přednášející patřili Noel Ellis s přednáškou Mendel's factors today a Gregory Radick s přednáškou What happens in Mendel's paper. Druhá konference byla součástí široké aktivity s názvem Týden lékařské genetiky, která se konala v Brně od 21.9. do 26.9. Týden se skládal ze 4 akcí: Human Genetics from Mendel to the Present Day, Odhalená tajemství lidského genomu, The Student Scientific Conference on Biomedicine 2015 a Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČSL JEP a 48. výroční cytogenetická konference. Rozsah akcí byl nadstandardní a konal se od VIDA! Science Centra, přes Hvězdárnu Brno, MU až po Mendelovo muzeum. Poslední konferencí s

Informační listy GSGM, 2015, 46: 16-17

účastí zástupce Mendelova muzea pak byla konference Villanova University v USA s názvem Gregor Mendel Symposium, která proběhla dne 7.12.2015.

Společensky nejvýznamnější akcí se stal "Mendelův odkaz" dne 20. července 2015. Mendelovo muzeum společně s TIC Brno, SunDrive s.r.o., Jihomoravským krajem, Statutárním městem Brno a dalším partnery připravilo akci, která překonala naše hranice. Startem byly koncerty skupin Progres 2 a Stromboli. Po nich následovaly proslovy vzácných hostů, a to především patrona akce Sira Paula Nurse, držitele Nobelovy ceny a tou dobou i předsedy The Royal Society, a Vicki Chandler, emeritní prezidentky Genetics Society of America. Vše doplnili zástupci Jihomoravského kraje, Města Brna a rektora MU. Vyvrcholením celého dne byla stejnojmenná projekce na budovu opatství, kterou připravil Drew Berry, světoznámý bioanimátor z University of Melbourne, doplněná živou hudbou autora Duncana Hendy v provedení Filharmonie Brno. Akce byla on-line natáčena a přístupná z internetu. Přímo na místě akci sledovalo na 2500 návštěvníků. Hlavní partner akce - firma Kentico - připravila schránku, kam lidé během akce, ale i po ní mohli nechávat vzkazy pro následující generace. Schránka bude otevřena za 50 let.

Gregor Johann Mendel byl géniem doceněným až dlouho po své smrti. Zůstává proto trvalým úkolem si jej neustále připomínat a ukazovat genialitu jeho díla. Celý jeho život i úsilí na poli vědy směřující k pomoci společnosti dokládá jeho vysoce lidský a křesťanský přístup. Již těžko můžeme zjistit některé informace o jeho pohnutkách a detailech jeho práce, nicméně to, co zůstalo, zásadně vybočuje z běžných vědeckých výsledků a i po 150 letech jednoduše musíme smeknout.



**Mgr. Ondřej Dostál, Ph.D.** (e-mail: [dostal@rect.muni.cz](mailto:dostal@rect.muni.cz)) je ředitelem Mendelova muzea v Brně.

## Půl století od otevření Mendeliana pro veřejnost

Eva Matalová

Centrum Mendelianum, Muzejní 1, Brno

Mendelianum, muzeum a památník Mendela, bylo otevřeno pro veřejnost 31. 7. 1965. Za jeho založení vdčíme Genetickému oddělení G. Mendela, které vzniklo na půdě tehdejšího Moravského muzea v roce 1962. Podnětem bylo zejména udělení Nobelovy ceny za objev struktury DNA, což postupně vedlo k oslabení lisenkismu jako nosné ideologie potírající mendelovskou genetiku coby reakční pavědu. Moravské zemské muzeum, které má přímou historickou návaznost na Mendelovu vědeckou společnost (*Ackerbaugesellschaft*, Hospodářskou společnost), začlenilo jako první muzeum na světě do svého výzkumného a dokumentačního programu genetiky. Už v roce 1965, kdy se toho u nás o genetice mnoho nevědělo, uspořádalo v prostorách bývalé Hospodářské společnosti velkou výstavu o genetice ve spolupráci se zahraničními institucemi. Genetické oddělení G. Mendela založil Jaroslav Kříženecký z podnětu tehdejší Československé akademie věd s cílem vytvořit jedinečné místo pro výzkum, dokumentaci a prezentaci vzniku a vývoje genetiky, Mendelovy pozůstalosti a zejména vědeckého a kulturního odkazu pro mezinárodní veřejnost v souvislosti s celosvětovým vzpomínkovým sympoziem v roce 1965 v Brně (G. Mendel Memorial Symposium). Během období represe genetiky v Československu byly sbírky, vztahující se k Mendelovi, uchovávány v depozitáři Botanického oddělení Moravského muzea ve vile na Preslově ulici v Brně-Pisárkách. Dřívější ředitel Moravského muzea, Jan Šmarda, byl současně vedoucím botanického oddělení a důležitým podporovatelem Mendela. Jemu vdčíme také za uchování mramorové sochy Mendela zhotovené T. Charlemonem, jejíž vznik v roce 1910 finančně umožnili vědci z celého světa a která dříve stála v centru dnešního Mendlova (dříve Klášterního) náměstí. Po odstranění z centra náměstí sdílela socha prostor s popelnicemi ve vnitřním dvoře starobrněnského kláštera. V roce 1962 byla Mendelova socha přesunuta do blízkosti bývalého Mendeliana, kde se nachází dodnes. Chyběl piedestal, stejně jako původní nápisy, socha byla zcela anonymní. Na podzim roku 1964 proto zajistilo Genetické oddělení G. Mendela Moravského muzea prostřednictvím Technické a zahradní správy města Brna uvedení alespoň Mendelova jména s letopočty jeho narození a úmrtí. Původní německý nápis uváděl, že ji vybudovali přátelé vědy (*von den Freunden der Wissenschaft*).

Jaroslav Kříženecký, politický vězeň padesátých let, vyzýval k rehabilitaci Mendela a jeho vědecké práce. Jako první vedoucí se výrazně podílel na výzkumném programu Genetického oddělení G. Mendela, ale otevření Mendeliana se bohužel v důsledku podlomeného zdraví nedožil. Zemřel v prosinci roku 1964, vzpomínkové symposium se konalo v srpnu 1965. O několik měsíců se minul s genetiky z Východu, kteří přežili období lisenkismu, ale i s genetiky ze Západu, se kterými před svým uvězněním živě spolupracoval. Jeho pečlivá práce týkající se shromažďování dokladů a stu-

dia Mendelova života a díla byla vydána knižně v roce 1965 tiskem německé akademie Leopoldina v edici Rudolfa Zaunicka pod názvem *Gregor Johann Mendel 1822-1884 Texte und Quellen zu seinem Wirken und Leben*. V roce 1965 vyšla také jím připravená kniha *Fundamenta genetica*. Rozpracovanou publikaci *Iconographia Mendeliana* dokončili Vítězslav Orel, Ludmila Marvanová a Josef Sajner.

Je třeba zmínit také jméno antropologa Jana Jelínka, tehdejšího ředitele Moravského muzea, a botanika Valentina Pospíšila, kteří se zasloužili o malou výstavu dokumentů lokalizovanou v prvním patře Mendelovy bývalé prelatury. Ta byla přístupná pouze po individuální domluvě. Pro rok 1965, kdy uplynulo 100 let od zveřejnění Mendelovy práce formou přednášky v Brně na Jánské ulici, byla realizována rekonstrukce klášterního refektáře a komplexní expozice o Mendelově životě a díle. Do té doby klášter sloužil různým účelům; byly v něm studentské koleje Masarykovy univerzity, sklad Adamovských strojů nebo sídlo Geografického ústavu ČSAV. První expozice Mendeliana byla v tomto kontextu unikátní, navíc byla organizací UNESCO vyhlášena expozicí roku 1965. Externí částí expozice byla Mendelova zahrádka před vstupem do Mendeliana, kterou do výstavního prostoru zapracoval architekt B. Fuchs.



Stálá výstava Mendeliana v refektáři starobrněnského kláštera, kterou UNESCO vyhlásilo Expozicí roku 1965 (archiv Mendeliana).

Založením genetického oddělení a otevřením Mendeliana iniciovalo Moravské muzeum kontinuální činnost v oblasti rozsáhlého výzkumu odkazu J. G. Mendela. Výsledky svého bádání Mendelianum pravidelně zveřejňuje, vydává také mezinárodní recenzovaný časopis *Folia Mendeliana – Acta Musei Moraviae*. Mendelianum se postupně stalo pracovním místem pro výzkum a studium, nejen v souvislosti s Mendelem, ale i historií genetiky. Činnost Mendeliana zahrnovala také správu archivu a knihovny, která byla rozšířena o cennou literaturu v angličtině a doplněna několika tituly v autorství Vítězslava Orla, který převzal genetické oddělení po smrti J. Kříženeckého. Ještě před

sametovou revolucí byla aktualizována a rozšířena stálá expozice Mendeliana v refektáři kláštera. Toto období Mendeliana je spjato i se vznikem Česko-slovenské genetické společnosti. Do roku 1989 pracovalo Mendelianum pod vedením Vítězslava Orla, který díky důvěře politického aparátu mohl navázat důležité osobní kontakty i v zahraničí. Na mezinárodních akcích Mendeliana se díky němu vždy podařilo zajistit výraznou zahraniční účast (např. *Gregor Mendel Colloquium* v Kupařovicích).

Po změně režimu v roce 1989 převzala vedení Mendeliana Anna Matalová a kromě odborníků zaměřila činnost Mendeliana také na české studenty a veřejnost. Proběhlo rozšíření a inovace hlavní expozice, ale také prezentace aktuálních témat (např. Transgenní rostliny, Klonování živočichů, DNA) formou výstav a diskusí. Současně byl vybudován památník vědcům, kteří v nepřátelské atmosféře lysenkismu hájili mendelismus i za cenu ztráty kariéry a svobody, příp. života. Toto období Mendelianum zpracovalo na základě svých sbírkových fondů a publikovalo pod názvem Genetika za železnou oponou v českém a anglickém jazyce. V roce 1992 uspořádalo Mendelianum mezinárodní konferenci Mendel Forum, která zahájila celou sérii dalších setkávání probíhajících dodnes. Od tohoto roku také Mendelianum každoročně uděluje Mendelovu pamětní medaili (Mendel Memorial Medal) významným osobnostem, které prezentují svoji práci formou Mendel Lecture.



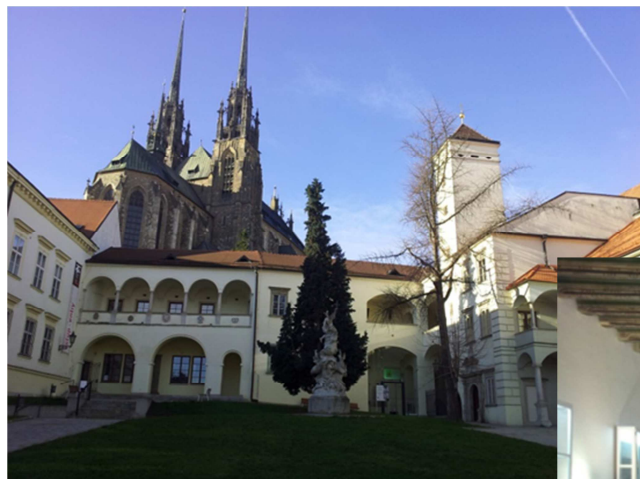
*Expozice Mendeliana v budově ombudsmana, kde přechodně rozvíjelo svou činnost.*



V roce 2001 odešla Anna Matalová do důchodu, rozvoji a aktivitám Mendeliana se však nepřestala věnovat (nyní jako emeritní pracovník). Vedení Mendeliana převzal Jiří Sekerák, kterého nový opat Lukáš Evžen Martinec, OSA (v roce 1995 zemřel augustiniánský opat Tomáš Josef Martinec, OSA, který Mendelianum podporoval,

podílel se na jeho aktivitách a zúčastňoval se řady vč. mezinárodních setkání až do své smrti), vyzval, aby urychleně uvolnil prostory Mendeliana pro „nový subjekt“. Velké poděkování za podporu a přechodný azyl Mendeliana patří Otakaru Motejlovi, tehdejšímu ombudsmanovi. Během sedmi let, kdy Mendelianum pracovalo v jeho budově, tak mohlo plně pokračovat ve své činnosti. Mendelianum připravilo novou stálou expozici, která byla zaměřena jednak na J. G. Mendela, ale také na propojení jeho práce s moderní vědou. Expozici Kód pro rozmanitost životů navštěvovali jak studenti, tak odborníci a široká veřejnost.

Stálá výstava byla doplněna dalšími tematickými celky, např. Ze života buněk, Věda v Nobelových cenách, Mendelovo Brno. Výstavy byly provázeny diskusními pořady, které se konaly v zasedacím sále budovy ombudsmana. Mendelianum se zaměřilo také na představení praktické stránky Mendelovy a dnešní vědecké práce široké veřejnosti, např. akcí Přijďte se podívat na DNA. V roce 2008 vydala Anna Matalová ve spolupráci s Ivem Cetlem komentovaný český překlad Mendelovy práce, který obsahuje i překlad Mendelových dopisů Nägelimu. Mendelovy dopisy domů byly vydány o rok později, vycházely i další publikace, např. Gregor Johann Mendel Anny Matalové nebo Mendel v černé skříňce J. Sekeráka. Také ve svém přechodném působišti pokračovalo Mendelianum ve své mnohaleté tradici prezentace a studia Mendelových živých rostlin. V novém století otevřela Anna Matalová tradici Procházek Mendelovým Brnem, která pokračovala vydáním publikace Mendelovo Brno v roce 2012, realizací výstav (Brno v Mendelově době, Mendelova stezka, Po stopách JGM) a vyústila v aktuální komentované obrazové zpracování Stezky Mendelovým Brnem v několika jazycích. Tato činnost definitivně vyvedla Mendela z uzavřenosti kláštera a na základě historických pramenů představila jeho osobnost a činnost v kontextu města Brna.



*Nyní je Mendelianum lokalizováno v autentických prostorech Mendelovy vědecké společnosti v Biskupském dvoře v historickém centru Brna.*



Již na začátku nového tisíciletí pracovalo Mendelianum na unikátní koncepci, která zdůrazňuje Mendelovu mnohostrannou osobnost, představuje všechna místa a aktivity, na kterých se Mendel (nejenom v Brně) podílel, ale zejména prezentuje Mendela jako moderního vědce, který v této oblasti dosáhl světové proslulosti. Součástí je uvedení Mendela zpět do autentického prostředí jeho vědecké společnosti, jejíž hlavní sídlo bylo v Biskupském dvoře tehdejšího Františkova, později Moravského a dnešního Moravského zemského muzea. Zrodil se projekt Centrum Mendelianum. Ten byl realizován v několika krocích, od ideového námětu, přes získání prostor, finančních prostředků, vlastní výstavby, realizace exteriérů a interiérů ... konsolidaci týmu, vědeckého a návštěvnického centra, založení Mendelovy školy ... až po slavnostní mezinárodní inauguraci celku přesně 150 let po odeznění závěrečné části Mendelovy přednášky, která znamenala počátek historie dnešní genetiky. Poděkování patří všem, kteří se práce na „novém“ Mendelianu zúčastnili, pozvání všem, kdo je mají zájem navštívit ([www.mendelianum.cz](http://www.mendelianum.cz)).



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

**50 let od otevření Mendelova rodného domu pro veřejnost,  
50 let spolupráce s Mendelianem**

**Jiří Sekerák**

Centrum Mendelianum, Muzejní 1, Brno

Památník J. G. Mendela v Hynčicích vybudovalo Genetické oddělení Gregora Mendela Moravského muzea v Brně v roce 1965. Památník byl lokalizován v přízemí bývalého výměnku, na které je umístěna pamětní deska. Budova byla tehdy zrekonstruována podle projektu Krajského památkového střediska v Ostravě. Scénář expozice připravila PhDr. L. Marvanová z Genetického oddělení G. Mendela Moravského muzea. Expozici vyrobily ve svých dílnách Brněnské veletrhy a výstavy. Genetické oddělení Gregora Mendela založil doc. Ing. Jaroslav Kříženecký. Oficiálně začalo pracovat po udělení Nobelovy ceny Watsonovi a Crickovi za objev struktury DNA v roce 1962. Mendelovské aktivity koordinovala Československé akademie věd, která pořádala světové sympozium ke 100. výročí zveřejnění Mendelova objevu.

Milníkem v historii Mendelova rodného domu bylo založení nadačního fondu Rodný dům J. G. Mendela, který inicioval starosta obce Vražné Ing. Vladimír Nippert ve spolupráci s místním spolkem Mendel a Mendelianem Moravského zemského muzea. Projekt se stal modelovým příkladem spolupráce mezi současnými obyvateli vysídleného pohraničí a těch, kteří museli své domovy po Druhé světové válce opustit. Až do vyhnání Němců obývala Mendelův rodný dům rodina Sturmů v linii Mendelovy starší sestry Veroniky. V koncepci projektu ji zastupoval augustinián P. Clemens Richter, který v roce 1992 ve spolupráci s příbuznými linie Mendelovy mladší sestry Veroniky přispěl k vydání faksimile Mendelova rukopisu v edici profesora Walthera Manna v Darmstadtu. Oba Mendelovi příbuzní se účastnili otevření Mendelova rodného domu, který od rodiny Chudých odkoupil Mendelův nadační fond a provedl jeho kompletní rekonstrukci. V domě vybudoval velký a malý shromažďovací sál s promítacím zařízením, vybudoval ubytovací kapacity a zřídil expozici o životě a díle J. G. Mendela v češtině a němčině, jejímiž autory jsou Anna Matalová a Jiří Sekerák.

Dnes Mendelův rodný dům slouží jako kulturní klenot kraje, který šíří Mendelův věhlas doma i v zahraničí. Trvalý pomník Mendelovi a jeho rodnému kraji představuje objemná kniha prof. Jana Kleina, našeho nejvýznamnějšího vědce v oboru imunogenetiky, která vyšla anglicky v Berlíně v nakladatelství Julius Springer pod názvem *Solitude of a Humble Genius Gregor Johann Mendel*. Kniha věnovaná Mendelianu byla prezentována v Kongresové knihovně ve Washingtonu a v současné době ji Mendelianum Moravského zemského muzea připravuje pro vydání v češtině. Autoři doplnili knihu o nádherné ilustrace, které nasbírali i v Mendelově rodném kraji. Vražné Hynčice jsou majákem na kulturní mapě světa a právem vstupují do světového turistického ruchu.

Informační listy GSGM, 2015, 46: 23-24



Tato stručná historie, zpracovaná Dr. Annou Matalovou, je prezentována ve výstavě, kterou Mendelianum v letošním roce připravilo pro Mendelův rodný dům ve spolupráci se starostou obce Vražné. Výstava vhodně doplňuje stávající expozice připravené Mendelianem MZM Brno. Design výstavy je dílem AÑO Agency v Brně. Vernisáž měla výstava v den Valné hromady Spolku Mendel, v sobotu 20. června 2015 v rodném domě JGM v Hynčicích.



*Pozvánka na otevření památníku J. G. Mendela 13. 6. 1965 (dokument z výstavy).*



*Mendelův rodný dům před rekonstrukcí a dnes (foto z výstavy).*



**PhDr. Jiří Sekerák, Ph.D.** (e-mail: [jsekerak@mzm.cz](mailto:jsekerak@mzm.cz)) je vedoucím Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně a garantem expozic projektu Mendelianum - atraktivní svět genetiky.

## Mendelovy rostliny a Mendelova stezka Brnem právě vyšly v knižním zpracování

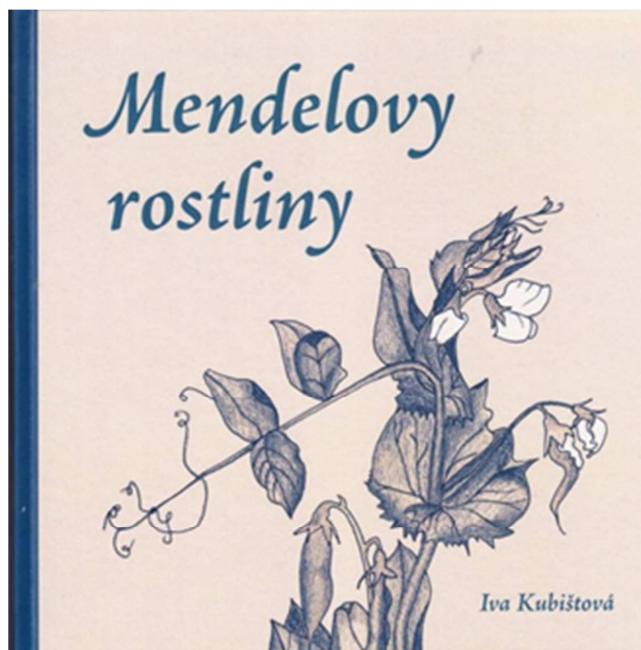
**Marcela Kusáková**

Univerzita Tomáše Bati, nám T.G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín

V roce, kdy jsme si připomněli 150 let od Mendelovy přednášky v Brně a s ní počátek historie genetiky, připravilo Mendelianum MZM celou řadu akcí, ale také publikací. Kromě populárně-vzdělávacích materiálů (např. Co vlastně kódují geny, Jak fungují geny, buňky, tkáně etc.) se jedná o dvě knižní novinky, které oslovují jak odbornou, tak laickou veřejnost.

### **Iva Kubištová: Mendelovy rostliny.**

Text a ilustrace RNDr. Iva Kubištová, Ph.D., Tribun s. r. o., Brno, 2015, 104 stran, ISBN 978-80-263-0957-4



Mendelovy rostliny se poprvé dočkaly souborného obrazového vydání v roce 2015 v barevných kresbách Ivy Kubištové. Od tzv. znovuobjevení Mendelova objevu v roce 1900 byla jeho práce spojována především s hrachem. Pouze výjimečně byly pokusy s hybridy hrachu hodnoceny v souvislosti s Mendelovou druhou hybridizační prací o některých křížencích ječmínku. V sedmdesátých letech podrobně problematiku Mendelových pokusů s jinými rostlinami než *Pisum* řešil prof. Ivo Cetl, editor komentovaného českého vydání obou Mendelových prací z roku 2007 v překladu Anny Matalové.

Autorka kreseb Mendelových experimentálních rostlin čerpala z tohoto čes-

kého vydání, opatřeného bohatým poznámkovým aparátem, komentářem a Mendelovou vědeckou korespondencí z let 1866-1873 včetně fragmentů dopisů od C. Nägeliho. Na s. 117 mezi poznámkami k českému překladu je uveden abecední seznam latinských názvů rostlinných rodů (s českými ekvivalenty), které Mendel uvádí ve svých pracích anebo v korespondenci. Iva Kubištová je ve své knize vyjádřila barevnými ilustracemi doplněnými popisem.

Informační listy GSGM, 2015, 46: 25-28

Mendelovy rostliny zahrnují:

*Antirrhinum* hledík  
*Aquilegia* orlíček  
*Calceolaria* pantoflíček  
*Carex* ostřice  
*Cirsium* pcháč  
*Dianthus* hvozdík  
*Geum* kuklík  
*Hieracium* jestřábník  
*Cheiranthus cheir* (*Matthiola* – fiala)  
*Ipomoea* povíjice (*Pharbitis* – povíjník)  
*Lathyrus* hrachor  
*Lavatera* slézovec  
*Lens* čočka  
*Linaria* lnice  
*Lychnis* kohoutek (*Melandrium* – knotovka)  
*Malva* sléz  
*Matthiola* fiala  
*Mirabilis* nocenka  
*Nicotiana* tabák  
*Oenothera* pupalka  
*Phaseolus* fazol  
*Pisum* hrách  
*Potentilla* mochna  
*Salix* vrba  
*Tropaeolum* lichořeřišnice  
*Verbascum* divizna  
*Veronica* rozrazil  
*Viola* violka  
*Zea* kukuřice

Informaci o Mendelových rostlinách jiných než *Pisum* a *Hieracium* šířilo Mendelianum nejen výsadbou živých rostlin na klášterní zahradě, které prezentovalo již od roku 1962, ale také širší propagací, např. vypisováním fotografických soutěží a dalšími formami zachycování fenotypů rostlin. Toto úsilí se nakonec promítlo do vzniku ilustračního souboru Mendelových rostlin I. Kubištové, která svou knihou přispěla k dosavadním aktivitám Mendeliana.

Logicky by se měla na shora uvedeném seznamu objevit také fuchsie, se kterou je Mendel zachycen na dvou skupinových fotografiích z počátku šedesátých let 19. století. Mendelova práce s fuchsiemi je zmiňována v knize L. Křivánka a T. Suchánka z roku 1898, která pojednává o historii moravského ovocnářství, vinohradnictví a zahradnictví a uvádí, že Mendel měl úspěch s fuchsiemi a peckovicemi. Seznam, ze kterého vycházela Iva Kubištová, obsahuje pouze rostliny z primárních zdrojů, tedy na základě Mendelových vlastních údajů. Proto fuchsie do seznamu zařazena nebyla, i když se s jejím květem v ruce Mendel nechal dvakrát fotografovat v době, kdy vrcholily jeho experimenty s hrachem.

## Anna Matalová, Eva Matalová: Stezka Mendelovým Brnem.

Barevné fotografie s doprovodnými texty k jednotlivým historickým místům. Tribun Brno, 2015, 80 stran, ISBN 978-80-263-0964-2



Stezka Mendelovým Brnem provází místy, kde Mendel získával vědomosti a čerpal inspiraci u významných osobností, hledal své uplatnění ve společnosti, rozvíjel svou touhu po vzdělání a využití pro svůj učitelský talent, své organizační schopnosti, systémový přístup při řešení odborných problémů, experimentální dovednosti, kritické myšlení a cit pro svobodu a spravedlnost.

Na přebalu knihy je zachycena brněnská katedrála s přilehlým muzejním komplexem v podhůří Petrova a nejstaršími muzejními budovami Biskupského dvora s bývalou Merkurovou kašnou, která vyzvedá důležitost obchodu pro Brno a Moravu. Za Merkurovým sousoším se novým proskleným portálem vstupuje do autentických

prostor Mendelovy Hospodářské společnosti, která ve své době představovala vědeckou akademii pro Moravu a snažila se vědecky řešit aktuální problémy (budování středního a vysokého školství založeného na přírodních vědách a technice). Představitelé Hospodářské společnosti založili moravské muzeum, ve kterém rozvíjeli své plány o bohatší společnosti. F. Diebl, kustod moravského muzea a profesor na Filozofickém učilišti v Brně, vystavil Mendelovi certifikát ze zemědělství. Tato kvalifikace opravňovala Mendela k práci ve Společnosti a jejím muzeu, kde Mendel pracoval od roku 1851 krátce poté, co se ukázalo, že není fyzicky ani psychicky schopen vykonávat duchovní službu na starobrněnské faře.

Mendel se proto vydal na učitelskou dráhu. Po návratu z vídeňské univerzity získal formální dekret o členství v přírodovědné sekci Hospodářské společnosti. Aktivně se podílel na agendě Hospodářské společnosti jako člen jejího hlavního výboru. Zakladatelé Hospodářské společnosti mají svůj „panteon“ ve vstupní hale Dietrichsteinského paláce. Na květinové výstavě Hospodářské společnosti upomínají prostory divadla Reduty, Nové radnice a pavilon v Lužánkách. Mendelova počáteční studia v Brně jsou spojena se starobrněnským klášterem augustiniánů, Teologickým studijním ústavem u sv. Michala a Filozofickým studijním ústavem u minoritů. Mendelova učitelská léta v Brně se připomínají v souvislosti s jeho zastupováním přednášek Jana Helceleta na Technickém studijním ústavu. Na státní vyšší reálné škole se Mendel podílel na transformaci klasického rozvrhu ve prospěch zvyšování podílu fyziky a přírodovědy, které na reálce vyučoval.

Na státní vyšší reálné škole Mendel v roce 1860 spoluzakládal Přírodovědný spolek, ve kterém Mendel přednášel o svých experimentech s hybridy hrachu v roce

1865. V roce 1866 vydal Přírodovědecký spolek jeho Pokusy s hybridy rostlin tiskem. V roce 1869, kdy reálnou školu opustily významné osobnosti včetně Mendela, který se stal opatem, se spolek stěhoval do Městského dvora. V novém sídle spolek neměl takové zázemí jako na reálce a ke svým přednáškovým schůzím, kterým Mendel předsedal, musel využívat prostory nové budovy technického učení.

Po zvolení opatem a prelátem kláštera v roce 1868 Mendel ve svém slibu věrnosti sliboval poslušnost a podřízenost brněnskému biskupovi a jeho kapitule. Jako opat Mendel volil v roce 1871 Liberální stranu, s jejíž podporou se stal místoředitelem a později generálním ředitelem Hypotéční banky Markrabství moravského.

Nemocnice u sv. Anny se dotýká Mendelových úzkostí ze styku s nemocnými a umírajícími v nemocnici u sv. Anny. Ředitel špitálu v něm probudil aktivní zájem o meteorologii a poradatelskou činnost při výstavách květin a zeleniny. Pro výstavy připravoval k prodeji ovocné stromky, které sám vypěstoval. V ovocném sadu postavil moderní včelín a prováděl pokusy s aklimatizací bezžihadlové včely z Brazílie a experimenty s pářením včelí matky v uzavřeném prostoru.

Po své smrti na Tři krále 1884 byl Mendel uložen do nově zřízené hrobky augustiniánů na Ústředním hřbitově v Brně.



**Mgr. Marcela Kusáková** (e-mail: [kusakova@knihovna.utb.cz](mailto:kusakova@knihovna.utb.cz)) působila jako kurátorka v Mendelianu MZM Brno, kde se také věnovala výzkumu v rámci své diplomové práce. Aktuálně pracuje v knihovně Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

## Mendelovo brněnské vědecké kolegium představené v zasedacím sále Hospodářské společnosti

### Anna Matalová

Centrum Mendelianum, Muzejní 1, Brno

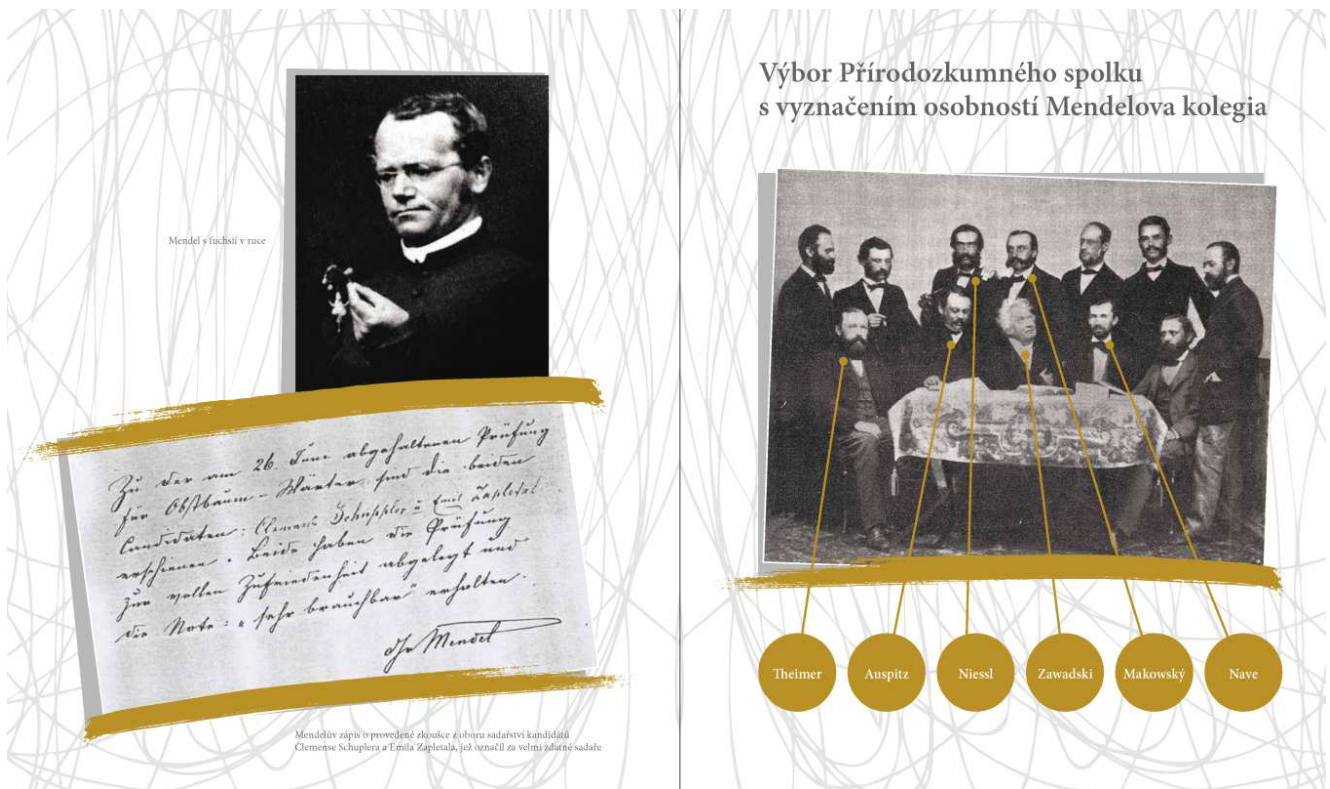
Autentické prostředí Mendelovy vědecké společnosti (*Ackerbaugesellschaft*) prezentované v prostorech Mendeliana bylo v letošním roce doplněno o výstavu představující brněnské osobnosti, se kterými byl Mendel v odborném kontaktu.

Do Hospodářské společnosti přivedl Mendela doktor **Pavel Olexík**, ředitel nemocnice u svaté Anny. Tam se s ním Mendel seznámil během své krátké pastorační činnosti, po které následoval jeho psychický a fyzický kolaps a oficiální zproštění těchto povinností. Olexík také získal Mendela pro meteorologii a věnoval mu některé svoje přístroje. Důležitou kvalifikací pro přijetí do Hospodářské společnosti získal Mendel od Františka Diebla. **František Diebl** byl kustodem tehdejšího Františkova muzea (dnes Moravského zemského), ale také vyučoval zemědělství na brněnském Filozofickém studijním ústavu. Mendel u Diebla složil zkoušky ze zemědělství, ovocnářství a vinařství v roce 1846. V roce 1851 se Mendel začal zajímat o práci v Hospodářské společnosti, o tři roky později se stal jejím řádným členem. **Jan Tvrdý**, významný šlechtitel rostlin, je přímo spojován s Mendelovou motivací pro pokusy s hrachem a rostlinnými hybridy. Informace o nových odrůdách zveřejňoval Tvrdý i v zahraničních specializovaných časopisech. Tvrdý vynikal jako šlechtitel fuchsií, jednu z nich dokonce nazval po svém příteli „prelát Mendel“. Významným brněnským zahradníkem, se kterým byl Mendel v úzkém kontaktu, byl **Hans Molisch**. S Molischem Mendela pojal zájem o šlechtění ovocných stromů a révy vinné. Mendel nabízel ovocné stromky k prodeji na výstavách Hospodářské společnosti, která dokonce jmenovala Mendela oficiálním examínátorem v oboru sadařství. Profesor **Alexander Zawadski** vedl od jeho založení Přírodovědecký spolek, filiální organizaci Hospodářské společnosti. Na půdě tohoto spolku zazněla v roce 1865 Mendelova přednáška a díky spolkovému časopisu vyšla o rok později tiskem a dostala se také do zahraničí. O vydání Mendelovy práce tiskem se výrazně zasloužil profesor **Gustav Niessl**; bez této publikace bychom dnes o Mendelově objevu stěží věděli. Za zmínku jistě stojí také **Karel Theimer**, botanik a člen výboru Přírodovědeckého spolku, který předsedal Mendelově přednášce. S Mendelovou učitelskou a vědeckou kariérou úzce souvisí i **Josef Auspitz**, který poskytl prostor pro Přírodovědecký spolek. Auspitz byl znám svou angažovaností v boji za svobodu během bouří v roce 1848 a nesl následky svých radikálních postojů ztrátou naděje na univerzitní kariéru ve Vídni. Brno, kde se právě formovala vyšší reálná škola (*Staatstoberrealschule*) ho uvítalo s otevřenou náručí. Na této reálce na Johannesgasse (dnešní Jánská ulice) Mendel nejenom učil, ale i přednášel o svých objevech. Na zasedání spolku předcházejícím Mendelově přednášce O pokusech s hybridy rostlin,

Informační listy GSGM, 2015, 46: 29-31

referoval **Alexander Makowský** o darwinismu. Makowský, podobně jako Mendel, studoval vznik hybridů. Mendelovým blízkým přítelem ze studií na vídeňské univerzitě byl **Johann Nave**, který se zabýval oplozením u řas.

V souvislosti s Mendelovou včelařskou činností je třeba zmínit jméno **František Xaver Živanský**. Živanský byl členem Včelařského spolku Hospodářské společnosti a odmítal úvahy o tom, že by se včely mohly pářit s vybranými trubci v uzavřeném prostoru, jak se o to marně pokoušel Mendel. Mendelovy aklimatizační pokusy se včelou *Trigona lineata* zaujaly profesora Antonína Tomáška z brněnské techniky. **Antonín Tomášek** zajistil, aby se zprávy o Mendelových aklimatizačních pokusech s tropickou včelou dostaly do specializovaného časopisu v Německu. Zpráva o nich vyšla i rusky. S nárůstem přírodovědných expedic do exotických zemí rostl zájem o aklimatizaci cizokrajných rostlin a zvířat.



### Náhled do výstavy Mendelovo brněnské vědecké kolegium

Zástupci Mendelova kolegia jsou doplněni o jeho blízkého přítele, **Matouše Klácela**. Klácel, stejně jako Mendel, působil v augustiniánském klášteře na Starém Brně, byl členem Přírodovědného spolku a okruhu liberálů kolem Josefa Auspitze. Na základě obvinění ze šíření nebezpečných idejí byl Klácel zbaven profesorského místa na brněnském Filozofickém studijním ústavu. Později Klácel tajně opustil klášter a ve svém exilu v USA vzpomínal na Mendela jako na svého svobodomyšlného přítele.

Jednotlivé osobnosti a jejich vztah k Mendelovi dávají nahlédnout do ideového kontextu Mendelova vědeckého díla, jehož těžiště bylo v učené Hospodářské společnosti, která je v Ottově slovníku naučném označována jako moravská vědecká akademie, která podporovala vědu, výzkum a vzdělanost.

*Výstava byla připravena v rámci projektu ESF Mendelova interaktivní škola genetiky (CZ.1.07/2.3.00/45.0037). Design: AŇO Agency, Brno.*



**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.



## Formování sestřihového komplexu v kontextu buněčného jádra

**Eva Stejskalová**

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč

### Abstrakt

Většina genů kódujících proteiny vyšších eukaryot obsahuje introny, které musí být odstraněny z primárních transkriptů. Vznikající mRNA může být poté použita jako templát pro syntézu proteinů. Sestřih intronů probíhá za pomoci složitého sestřihového komplexu, který se skládá z malých jaderných ribonukleoproteinových částic (snRNPs). snRNPs vznikají během složitých drah odehrávajících se jak v jádře, tak v cytoplasmě. Sestřihový komplex se poté postupně skládá na molekule pre-mRNA. Jedná se o velmi dynamický a přesně regulovaný proces, který je řízen nejenom sekvencí samotné pre-mRNA, ale záleží i na stavu celého jádra, např. na modifikacích chromatinu. Mezi základní nezodpovězené biologické otázky patří například: Jak buňky řídí, kdy a kde se sestřihový komplex poskládá? Co předurčuje, které introny budou vystřiženy? V této práci byl zkoumán sestřihový komplex a jeho skládání v kontextu buněčného jádra z několika různých úhlů pohledu. Za prvé se práce věnovala neočekávané souvislosti mezi sestřihovým faktorem U1-70K a komplexem SMN (z angl. *survival of motor neurons*), který je hlavním účastníkem biosyntetické dráhy malých jaderných ribonukleoproteinových částic. Podařilo se odhalit, že protein U1-70K interaguje s komplexem SMN a že tato interakce je klíčová pro stabilitu gem, malých nemembránových jaderných organel, jejichž absence souvisí se vznikem neurodegenerativních onemocnění. Za druhé byla zkoumána úloha proteinu RBM39 (z angl. *RNA binding motif 39*) v regulaci alternativního sestřihu genu pro vaskulární endoteliální růstový faktor. Ukázalo se, že RBM39 je součástí časného sestřihového komplexu, kde interaguje s proteiny U1-70K a U2AF35. Nakonec byly popsány interakce proteinu Brd2, který váže acetylované histony, s acetylovaným chromatinem *in vivo*.

### Úvod

Geny vyšších eukaryot jsou tvořeny exprimovanými sekvencemi (exony), mezi kterými se nachází intervenující sekvence (introny). Aby mohla vzniknout maturovaná messenger RNA (mRNA), musí dojít k odstranění intronů z nascentních transkriptů pre-mRNA a spojení exonů. Tento pro expresi genů klíčový proces se označuje jako sestřih pre-mRNA a je vykonáván složitým makromolekulárním sestřihovým komplexem, který se skládá z pěti malých jaderných ribonukleoproteinových částic (snRNPs), bohatých na uridin. Každá snRNP se skládá z malé jaderné RNA (U1, U2, U5 a U4/U6 snRNA) a sady specifických proteinů. U všech snRNP se však vyskytuje jeden společný motiv –

kruh sedmi malých Sm proteinů (v případě U6 jsou to LSm proteiny) navázaných na konzervovaný sekvenční motiv bohatý na uridin. Všechny snRNA jsou přepisovány RNA polymerázou II, s výjimkou U6 snRNA, která je přepisována RNA polymerázou III (shrnutí v [1]). Po transkripci jsou nascentní snRNA exportovány do cytoplazmy, kde jsou navázány komplexem SMN, který nakládá kruh Sm proteinů na jejich rozpoznávací sekvenci (tzv. Sm místo). Kruh Sm proteinů chrání snRNA před degradací nukleázami a jeho navázání spouští další úpravy, po kterých jsou nascentní snRNP transportovány zpět do jádra. SMN komplex je pravděpodobně importován spolu s snRNPs a soudí se, že se od nich odpojuje krátce po příchodu do jádra (shrnutí v [2]).

Nově importované snRNPs se nacházejí v Cajalových tělíscích (CB), bezmembránových jaderných organelách, kde jsou dále modifikovány. CB hrají roli jak v *de novo* skládání, tak v recyklaci U4/U6 di-snRNP a U4/U6-U5 tri-snRNP (shrnutí v [3]). Další důležitá bezmembránová tělíska, zvaná gemy, se často vyskytují v blízkosti CB a jsou bohatá na proteiny účastníci se transkripce a úprav RNA. Také v nich se nachází jaderná populace komplexu SMN. Fyziologická funkce gem dosud nebyla plně objasněna, ale ví se, že jejich ztráta z jádra koreluje se závažností neurodegenerativních chorob, jako je například spinální svalová atrofie nebo amyotrofická laterální skleróza (shrnutí v [4]).

Plně zralé snRNP jsou připraveny účastnit se sestřihu pre-mRNA. Sestřihový komplex se postupně skládá přímo na molekule pre-mRNA a poté katalyzuje dvě transesterifikační reakce vedoucí k odstranění intronu a spojení přilehlých exonů. Skládání sestřihového komplexu (shrnutí v [5]) začíná interakcí U1 snRNP s 5' sestřihovým místem, čímž se vytvoří časný sestřihový komplex (E-komplex). 3' sestřihové místo je rozpoznáno heterodimerním proteinem U2AF a sestřihovým faktorem 1. Helikázové proteiny DexD/H poté katalyzují připojení U2 snRNP k E-komplexu za spotřeby ATP a dochází k ustavení sestřihového A-komplexu. Připojením předem složeného U4/U6-U5 tri-snRNPu se vytvoří B-komplex. Poté dochází k několika konformačním přesmykům, U1 a U4 snRNP opouští sestřihový komplex a ustaví se katalyticky aktivní B\*-komplex, který následně katalyzuje první transesterifikační reakci. Po jejím proběhnutí vzniká sestřihový C-komplex a během druhé trans-esterifikace dochází k ligaci exonů a vyštěpení intronu ve formě lasovité smyčky. Maturovaná mRNA poté opouští sestřihový komplex a U2, U5 a U6 snRNP disociují z lasovité smyčky a jsou recyklovány pro další použití.

Rozpoznávání intronů (shrnutí v [6]) nezávisí pouze na konsenzuálních sekvencích sestřihových míst, ale je zpřesňováno pomocí dalších cis-elementů v sekvenci pre-mRNA. Tyto elementy jsou vázány regulačními proteiny, které dále váží různé součásti sestřihového komplexu. Na zesilující sekvence se obvykle váží proteiny z rodiny bohaté na serin/arginin (SR), kdežto umlčující sekvence jsou vázány heterogenními jadernými ribonukleoproteiny (hnRNP).

Pokud jde o krátké introny (do cca 250 nukleotidů), ustavuje se E-komplex mezi 5' a 3' sestřihovými místy stejného intronu. Většina pre-mRNA vyšších eukaryot ovšem obsahuje mnoho intronů různých délek (až tisíce nukleotidů), kdežto délka exonů je poměrně stabilní (průměrně cca 120 nukleotidů). Proto se v případě dlouhých intronů sestřihový E-komplex ustavuje nejprve mezi sestřihovými místy na stejném exonu. Takováto definice exonu je umožněna sítí protein-proteinových interakcí mezi SR proteiny, které stabilizují E-komplex definovaný přes exon. Exon-definovaný E-komplex

se poté přesmykuje na sestřihový komplex mezi sestřihovými místy na stejném intronu. Mechanismus tohoto přesmyku není znám.

Nedávno byla popsána síť protein-proteinových interakcí, která podmiňuje rozpoznávání intronů v kvasince *S. pombe* [7]. Autoři studie identifikovali protein Rsd1 jako můstkující faktor mezi U1 a U2 snRNP. Lidský homolog proteinu Rsd1, RNA-vazebný protein 39 (RBM39), se účastní sestřihových aktivit [8]. RBM39 byl detegován v sestřihovém E-komplexu pomocí hmotnostní spektrometrie [9] a bylo popsáno, že reguluje alternativní sestřih genu pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) [10, 11]. Molekulární mechanismus této regulace však není znám.

Většina genů vyšších eukaryot (téměř 95 % u savčích genů) podléhá alternativnímu sestřihu, pomocí kterého vznikají různé isoformy mRNA dávající vznik proteinům s různými funkcemi (shrnuje v [12]). Regulace skládání sestřihového komplexu je zajištěna spoluprací mnoha faktorů (sekvence pre-mRNA, proteinové faktory, vazba sestřihu a transkripce a epigenetické faktory). Modifikace histonů také ovlivňují výsledek alternativního sestřihu daného genu, neboť jsou schopny vychytávat adaptérové proteiny, které dále vychytávají sestřihové faktory. Zdá se, že modifikace histonů nepodmiňují výsledky alternativního sestřihu, ale slouží spíše k jejich jemnému ladění [13].

Je známo, že acetylace histonů reguluje alternativní sestřih [14], nicméně neví se, jakou roli hrají v tomto procesu proteiny rozpoznávající acetylaci histonů. Proteinová rodina BET (z angl. *Bromodomain extra-terminal*) patří mezi proteiny rozpoznávající acetylaci pomocí dvou konzervovaných bromodomén [15]. Proteiny rodiny BET se účastní regulace transkripce a možná i sestřihu [16]. Jeden ze členů rodiny BET, protein Brd2, je produktem esenciálního genu, jehož delece vede k závažným poškozením vývoje mozku u myši [17, 18]. Brd2 je členem mnoha různých proteinových komplexů, asociuje např. s RNA polymerázou II, acetylázami histonů a chromatin-remodelujícími faktory [19]. Je také známo, že Brd2 usnadňuje průchod RNA polymerázy II acetylovaným chromatinem *in vitro* [16]. Vzhledem k těmto poznatkům jsme se v naší laboratoři rozhodli otestovat chromatin-vazebné vlastnosti proteinu Brd2 jakožto možného regulátoru alternativního sestřihu.

## Cíle práce

Práce byla zaměřena na studium formování sestřihového komplexu. Studovány byly interakce mezi složkami sestřihového komplexu a procesy odehrávající se při regulaci sestřihu. Přitom byly používány různé biochemické a mikroskopické přístupy, aby bylo možné zodpovědět tyto hlavní otázky:

- jakou úlohu hraje sestřihový faktor U1-70K v tvorbě a udržování jaderných gem? Jaké jsou jeho interakce s komplexem SMN?
- jakou roli hraje protein RBM39 v regulaci alternativního sestřihu a jaké jsou jeho interakce?
- jak protein Brd2 interaguje s acetylovaným chromatinem v živých buňkách?

## Materiál a metody

V této práci byly použity biochemické metody jako ko-imunoprecipitace a westernový přenos, a techniky molekulárního klonování pro charakterizaci protein-proteinových a

RNA-proteinových interakcí. Mikroskopicky byly sledovány interakce proteinů *in situ* ve fixovaných buňkách pomocí Försterova rezonančního přenosu energie. Pro výzkum fyziologických funkcí proteinů našeho zájmu byla využita RNA interference s použitím siRNA. Analýza alternativního sestřihu byla prováděna s využitím izolace RNA následované reverzní transkripcí a polymerázovou řetězovou reakcí. Tyto metody byly doplněny pokročilou fluorescenční mikroskopií, jako například strukturní iluminací, rastrovací korelační mikroskopií a kinetickými metodami, jako je např. FRAP (z angl. *Fluorescence recovery after photo-bleaching*).

## Výsledky

V první části práce byla ukázána nová interakce mezi proteinem U1-70K a komplexem SMN, a také důležitost této interakce pro integritu jaderných gem. Bylo zjištěno, že sestřihový faktor U1-70K směřuje do jaderných gem pomocí své N-koncové domény (aminokyseliny 1-60). Dále bylo ukázáno, že právě tato doména zprostředkovává interakci s komplexem SMN. Po depleci proteinu U1-70K dochází ke ztrátě jaderných gem. Tento fenotyp je zachráněn exogenní expresí N-koncové domény proteinu U1-70K nebo proteinu SMN.

V rámci druhé části byly zkoumány interakce proteinu RBM39 a jeho úloha v regulaci alternativního sestřihu. Bylo potvrzeno, že RBM39 reguluje alternativní sestřih pre-mRNA vaskulárního endoteliálního růstového faktoru. Bylo dokázáno, že RBM39 asociuje se sestřihovým komplexem E a interaguje s proteiny U2AF35 a U1-70K. Tyto interakce jsou zprostředkovány doménou RS proteinu RBM39.

Ve třetí části byly popsány interakce proteinu Brd2 s chromatinem pomocí technik pokročilé fluorescenční mikroskopie a matematického modelování. Bylo ukázáno, že mutace, které byly publikovány jako zničující pro interakci proteinu Brd2 s acetylovaným histonem H4 [15], úplně nebrání interakci bromodomén s acetylovaným chromatinem, ale spíše snižují jejich vazebný potenciál. Naše analýzy ukázaly, že za normálních podmínek je dynamické chování proteinu Brd2 podmíněno zejména interakcemi jeho C-koncové domény, která se podílí i na vazbě na chromatin. Za normálních okolností se na chromatin váže pouze přibližně 40 % přítomných bromodomén. V případě hyperacetylace histonů se tento podíl zvýší na téměř 85 % a vazebný čas se prodlouží téměř sedmkrát.

## Diskuze

Primární transkripty většiny genů vyšších eukaryot obsahují množství intronů, které se však v maturované mRNA nevyskytují. Vystřížení těchto intronů z pre-mRNA zajišťuje dynamická síť sestřihových snRNP, které se skládají během složitých drah. Klíčovým prvkem těchto drah je multiproteinový komplex SMN, v jehož centru se nachází stejnojmenný protein. Nedostatek proteinu SMN v organismu způsobuje neurodegenerativní onemocnění, spinální svalovou atrofii, která se projevuje progresivním odumíráním motorických neuronů. V současné době není známo, co způsobuje tkáňově specifické projevy této nemoci.

Počet jaderných gem v buňkách pacientů se spinální svalovou atrofií je všeobecně přijímaným indikátorem hladiny proteinu SMN v těchto buňkách a pokles počtu gem koreluje se závažností spinální svalové atrofie. Nedávno se ukázalo, že ztráta gem je

buněčným markerem i jiného neurodegenerativního onemocnění, amyotrofické laterální sklerózy (ALS). Velká část pacientů s ALS má mutace v genech pro proteiny účastnící se zpracování pre-mRNA. Tato práce ukázala, že sestřihový faktor U1-70K patří k proteinům, jejichž deplece vede ke ztrátě jaderných gem. Pokud víme, mutace v genu pro protein U1-70K nebyly dosud u pacientů ALS identifikovány [20]. Nicméně, výsledky naší práce nasvědčují tomu, že právě protein U1-70K by mohl být zajímavým kandidátem pro screening mutací v případech ALS s dosud neidentifikovanou genetickou příčinou.

Naše výsledky také identifikují U1-70K jako dosud neznámého interakčního partnera komplexu SMN. Komplex SMN byl nedávno objeven v časných sestřihových komplexech v lidských buňkách [21] a soudí se, že napomáhá recyklaci post-sestřihových komplexů a přímo se účastní sestřihu v podmínkách *in vitro* [22]. Vzhledem k tomu, že sestřihový faktor U1-70K se vyskytuje právě v časných sestřihových komplexech, naše data mohou vysvětlit, jakým způsobem komplex SMN asociuje se sestřihovým komplexem.

Sestřihový komplex se postupně skládá přímo na molekule pre-mRNA. Toto skládání musí být přísně kontrolováno, protože využívání správných sestřihových míst je klíčové pro přežití organismu. Proteiny překládané ze špatně sestřihovaných transkriptů by byly vadné nebo nefunkční. Sestřihový komplex proto musí být schopen vystřihovat introny zároveň rychle a velmi přesně, což představuje nelehký úkol, vzhledem k tomu, že introny obvykle bývají o mnoho delší než exony a že genom obsahuje velké množství kryptických sestřihových míst.

Na počátku genomické éry se soudilo, že introny patří do skupiny tzv. „odpadní“ DNA. K nezodpovězeným otázkám proto patřilo, proč si buňka ponechává v genomu nekódující sekvence, které je třeba replikovat, přepisovat, sestřihovat a odbourávat se značnými metabolickými náklady. Později začalo být zjevné, že složité organismy získaly evoluční výhodu díky možnosti vyrábět pomocí jednoho transkriptu různé proteinové produkty s využitím alternativního sestřihu. Alternativní sestřih umožňuje významné obohacení transkriptomu a proteomu bez nutnosti rozšiřování genomu a také umožňuje regulovat expresi proteinů v závislosti na buněčném typu, vývojovém stádiu a dalších signálech.

V této práci bylo dokázáno, že protein RBM39 reguluje alternativní sestřih pre-mRNA vaskulárního endoteliálního růstového faktoru v buněčných liniích odvozených z nádorových buněk. Protein RBM39 byl detegován v lidských časných sestřihových komplexech [9, 23, 24] a bylo objeveno, že se účastní sestřihu v kvasinkách [7], *Drosophila* [25] a u lidí [10]. Kvasinkový homolog RBM39, protein Rsd1, spojuje U1 a U2 snRNP pomocí sítě interakcí probíhající přes proteiny U1A, Rsd1, SpPrp5 a podjednotku b sestřihového faktoru SF3 [7]. Byla popsána interakce mezi lidským proteinem RBM39 a heterodimerním proteinem U2AF [26] a také mezi RBM 39 a sestřihovým faktorem SF3b155 [27]. Potenciální interakční partner RBM39 v U1 snRNP ovšem není znám.

Naše práce ukázala, že RBM39 interaguje s proteinem U1-70K a že tato interakce je zprostředkována C-koncovou RS doménou proteinu RBM39. Nedávno bylo popsáno, že N-koncová UHM doména proteinu RBM39 je klíčová pro jeho interakci s proteinem SF3b155 z U2 snRNP [27]. Bylo by lákavé spekulovat, že RBM39 interaguje s proteiny U1-70K a SF3b155 zároveň a funguje tedy jako můstek mezi U1 a

U2 snRNP ve vznikajícím sestřihovém komplexu. Nicméně pro bližší prozkoumání interakcí RBM39 v čase a prostoru je třeba dalších experimentů.

Vzhledem k tomu, že sestřih většiny pre-mRNA se odehrává za podmínek stále probíhající transkripce, výsledek sestřihu neovlivňují jenom regulační elementy v sekvenci pre-mRNA, ale i chromatinové modifikace. Nedávno bylo popsáno úzké spojení mezi modifikacemi histonů a regulací alternativního sestřihu [28]. Zatím však bylo identifikováno jen několik chromatin vazebných proteinů, které by přímo ovlivňovaly alternativní sestřih (shrnutí v [13]).

Bylo popsáno, že acetylace histonů reguluje alternativní sestřih [14], nicméně, jak se tohoto procesu účastní proteiny, které vážou acetylované histony, není známo. V této práci je charakterizován potenciální regulátor alternativního sestřihu, protein z rodiny BET, Brd2. Brd2 interaguje s acetylovanými histony a asociuje s mnoha různými proteinovými komplexy, např. s RNA polymerázou II, transkripčními faktory, acetylázami histonů a chromatin-remodelujícími komplexy. Bromodomény proteinu Brd2 selektivně rozpoznávají specifické acetylované lysiny na histonu H4. C-koncová ET doména proteinů rodiny BET interaguje s proteiny remodelujícími chromatin, např. methyltransferázou NSD3 a hydroxylázou JMJD6 [29, 30].

V práci bylo ukázáno, že vazba proteinu Brd2 na chromatin není řízena jen bromodomény, ale je modulována C-koncovou doménou, která pravděpodobně interaguje buď přímo s chromatinem, nebo s jinými proteiny vázajícími chromatin. Nicméně, v případě hyperacetylace chromatinu převládne interakce bromodomén s acetylovanými histony, která poté podmiňuje celkovou interakci Brd2 s chromatinem. Protein Brd2 ovlivňuje jak transkripci, tak alternativní sestřih, a tím se zařazuje do sítě funkčně propojující transkripci a sestřih. Gen pro protein Brd2 je esenciální a jeho mutace jsou u lidí spojovány s epilepsií. Jedno z možných vysvětlení by mohlo být, že nedostatek proteinu Brd2 v neuronech, které jsou silně závislé právě na alternativním sestřihu, se projeví nefunkčností regulačních proteinů nutných pro komunikaci mezi neurony.

## Závěr

Tato dizertační práce byla zaměřena na formování sestřihového komplexu v kontextu buněčného jádra z několika různých úhlů pohledu. V rámci prvního projektu byla popsána neočekávaná interakce mezi proteinem U1-70K a komplexem SMN. Tato interakce byla zmapována, byla identifikována N-koncová doména U1-70K jako klíčová pro tuto interakci a pro cílení proteinu U1-70K do jaderných gem. Bylo ukázáno, že po depleci U1-70K dochází ke ztrátě jaderných gem, čemuž lze předejít exogenní expresí N-koncové domény U1-70K. Naše pozorování nasvědčují tomu, že protein U1-70K má kromě funkce v sestřihu pre-mRNA také úlohu ve vzniku a/nebo udržování jaderných gem. Během druhého projektu bylo potvrzeno, že protein RBM39 reguluje alternativní sestřih genu pro vaskulární endoteliální růstový faktor. Byly popsány interakce RBM39 a proteiny U2AF a U1-70K v časném sestřihovém komplexu. Obě tyto interakce jsou zprostředkovány RS doménou RBM39. Naše výsledky nasvědčují tomu, že RBM39 reguluje alternativní sestřih prostřednictvím interakcí se sestřihovým komplexem E. Ve třetím projektu byla zkoumána regulace alternativního sestřihu. Popsány byly interakce chromatin-vázajícího proteinu Brd2 s chromatinem. Ukázalo se, že dynamika proteinu Brd2 je za normálních podmínek řízena interakcemi zprostředkovanými C-koncovou

doménou a že mutace, které byly publikovány jako destruktivní pro interakci Brd2 s acetylovanými histony, pouze snižují afinitu bromodomén proteinu Brd2 k chromatinu v podmínkách *in vivo*. Také bylo ukázáno, že jednotlivé bromodomény jsou schopny interagovat s acetylovaným chromatinem nezávisle a tato interakce je silnější u bromodomény 1.

## Použitá literatura

1. Matera, A.G. and Z. Wang, *A day in the life of the spliceosome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(2): p. 108-21.
2. Battle, D.J., et al., *The SMN complex: an assembly machine for RNPs*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 313-20.
3. Machyna, M., P. Heyn, and K.M. Neugebauer, *Cajal bodies: where form meets function*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(1): p. 17-34.
4. Achsel, T., et al., *The intriguing case of motor neuron disease: ALS and SMA come closer*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(6): p. 1593-7.
5. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosome structure and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
6. Matlin, A.J., F. Clark, and C.W. Smith, *Understanding alternative splicing: towards a cellular code*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 386-98.
7. Shao, W., et al., *A U1-U2 snRNP interaction network during intron definition*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(2): p. 470-8.
8. Imai, H., et al., *Novel nuclear autoantigen with splicing factor motifs identified with antibody from hepatocellular carcinoma*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2419-26.
9. Hartmuth, K., et al., *Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16719-24.
10. Dowhan, D.H., et al., *Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 429-39.
11. Huang, G., et al., *CAPER-alpha alternative splicing regulates the expression of vascular endothelial growth factor(1)(6)(5) in Ewing sarcoma cells*. Cancer, 2012. **118**(8): p. 2106-16.
12. Kornblihtt, A.R., et al., *Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(3): p. 153-65.
13. Luco, R.F., et al., *Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing*. Cell, 2011. **144**(1): p. 16-26.
14. Hnilicova, J., et al., *Histone deacetylase activity modulates alternative splicing*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16727.
15. Kanno, T., et al., *Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells*. Mol Cell, 2004. **13**(1): p. 33-43.
16. LeRoy, G., B. Rickards, and S.J. Flint, *The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription*. Mol Cell, 2008. **30**(1): p. 51-60.
17. Gyuris, A., et al., *The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(5): p. 413-21.

18. Shang, E., et al., *Double bromodomain-containing gene Brd2 is essential for embryonic development in mouse*. Dev Dyn, 2009. **238**(4): p. 908-17.
19. Denis, G.V., et al., *Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines*. J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 502-11.
20. Finsterer, J. and J.M. Burgunder, *Recent progress in the genetics of motor neuron disease*. Eur J Med Genet, 2014. **57**(2-3): p. 103-12.
21. Makarov, E.M., et al., *Functional mammalian spliceosomal complex E contains SMN complex proteins in addition to U1 and U2 snRNPs*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(6): p. 2639-52.
22. Meister, G., et al., *Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(13): p. 1977-86.
23. Behzadnia, N., et al., *Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes*. Embo j, 2007. **26**(6): p. 1737-48.
24. Bessonov, S., et al., *Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core*. Nature, 2008. **452**(7189): p. 846-50.
25. Park, J.W., et al., *Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15974-9.
26. Ellis, J.D., et al., *Spatial mapping of splicing factor complexes involved in exon and intron definition*. J Cell Biol, 2008. **181**(6): p. 921-34.
27. Loerch, S., et al., *Cancer-relevant Splicing Factor CAPER $\alpha$  Engages the Essential Splicing Factor SF3b155 in a Specific Ternary Complex*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(25): p. 17325-17337.
28. Hnilicova, J. and D. Stanek, *Where splicing joins chromatin*. Nucleus, 2011. **2**(3): p. 182-8.
29. Webby, C.J., et al., *Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing*. Science, 2009. **325**(5936): p. 90-3.
30. Rahman, S., et al., *The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(13): p. 2641-52.



**Mgr. Eva Stejskalová, Ph.D.**, je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Svou doktorskou dizertační práci „Formování sestřihového komplexu v kontextu buněčného jádra“ vypracovala pod vedením doc. Mgr. Davida Staňka, Ph.D. na Oddělení biologie RNA Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., a úspěšně ji obhájila 18. 3. 2015.



## Vlastnosti specifických protilátek prionových chorob a možnosti jejich využití

**Eva Šafaříková**

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. Lékařská fakulta UK, Studničkova 7, 128 00 Praha

### Abstrakt

Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) jsou neurodegenerativní onemocnění charakterizovaná ukládáním patologické formy prionového proteinu (PrP<sup>TSE</sup>) v mozku. V současnosti je PrP<sup>TSE</sup> jediný specifický biochemický marker lidských a zvířecích TSE. Laboratorní diagnostika je založena na průkazu rezistentního jádra PrP<sup>TSE</sup> (PrPres) po štěpení vzorku mozkového homogenátu proteinázou K. PrPres je posléze detegován pomocí western blotu nebo imunometodami. Obě metody jsou však obtížně standardizovatelné, časově náročné a nejsou schopné zachytit k proteolytickému štěpení senzitivní formy PrP<sup>TSE</sup>. V této práci jsme se zaměřili na přípravu nového typu testů založených na průkazu PrP<sup>TSE</sup> bez nutnosti štěpení proteinázou K či jiným enzymem. Působením glukózy a jiných redukujících cukrů v organismu vzniká spektrum produktů zvaných koncové produkty glykace. Vzhledem k dlouhodobému ukládání prionových depozit v mozku dochází ke glykaci i u PrP<sup>TSE</sup>. Detekce glykovaného PrP<sup>TSE</sup> by tak mohla sehrát roli diagnostického markeru. V rámci první části studie jsme se zaměřili na přípravu monoklonálních protilátek specifických pro glykovaný prionový protein. Připravili jsme bakteriálně exprimovaný rekombinantní lidský prionový protein (rhPrP). Na rhPrP jsme působili kyselinou glyoxalovou za vzniku karboxymethyl modifikovaného rhPrP (rhPrP-CML), který představuje hlavní složku koncových produktů glykace v organismu. rhPrP-CML byl použit k imunizaci myši a přípravě hybridomových buněk. Screeningem buněčných supernatantů byly vybrány 4 slibné klony. Jeden z nich (EM-31) silně reaguje s lidským a myším rekombinantním PrP-CML a tři další klony navíc reagují s CML *in vitro* modifikovaným lidským a myším mozkem. V další části studie jsme vyvinuli sendvičovou DELFIA imunoesej pro detekci prionového fragmentu PrP226\* v lidských mozkových homogenátech. Zjistili jsme, že fragment PrP226\* se hromadí v prionových agregátech a po jeho uvolnění denaturací jej lze specifickou protilátkou V5B2 detegovat bez nutnosti štěpení proteinázou K. Podíl množství PrP226\* měřeného v nativních a denaturovaných vzorcích byl signifikantně odlišný u vzorků mozků pacientů postižených TSE a vzorků kontrolních.

### Úvod

Prionové choroby, neboli transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE), jsou neurodegenerativní onemocnění spojená s úbytkem neuronů, spongiformními změnami,

gliózou a ukládáním patologické formy prionového proteinu v mozku [1]. Onemocnění se projevuje například jako klusavka („scrapie“) ovcí a koz, bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) skotu nebo chronické chřadnutí (CWD) jelenovitých. První lidská prionová choroba byla popsána v roce 1920 – 21 Hansem Creutzfeldtem a Alfonsem Jakobem [2, 3]. V padesátých letech 20. stol. došlo na Nové Guinei k epidemii kuru, která se rozšířila u příslušníků domorodého kmene Fore během rituálního kanibalismu [4]. Celosvětově je nejčastější lidskou prionovou chorobou Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJN) s incidencí onemocnění 1 – 2 případy na milion obyvatel ročně. Onemocnění většinou vzniká bez známých příčin (85% případů), může ale být i dědičné (10 – 15% případů) nebo získané (2 – 3% případů). Vzácněji se vyskytuje dědičný Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom (GSS) a fatální familiární insomnie (FFI) [5]. V současnosti velkou pozornost poutá variantní CJN (vCJN), která vznikla s největší pravděpodobností alimentárním přenosem BSE prionů na člověka. Na rozdíl od klasické CJN postihuje především mladé lidi, vCJN priony se akumulují i v orgánech imunitního systému a choroba je přenosná krevní transfuzí [6, 7].

Podle prionové hypotézy je infekčním agens prionových chorob patologicky složený prionový protein ( $\text{PrP}^{\text{TSE}}$ , někdy též značený  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ), který se množí přímým kontaktem s buněčným prionovým proteinem ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), jemuž dokáže vnutit svoji patologickou, na struktury  $\beta$ -skládaného listu bohatou konformaci [1].  $\text{PrP}^{\text{C}}$  se vyskytuje na povrchu většiny buněk v těle [1, 8] a jeho fyziologická funkce zatím nebyla objasněna. Uvažuje se například o jeho úloze v metabolismu mědi, regulaci apoptózy, v procesu učení a paměti, signální transdukci, přenosu vzruchu na synaptické membráně, ovlivnění cirkadiálního rytmu, buněčné diferenciaci, antioxidační ochraně, neuroprotektivních procesech a dalších buněčných dějích [9]. Molekula  $\text{PrP}^{\text{C}}$  obsahuje ve své sekundární struktuře vysoký podíl  $\alpha$ -šroubovice, což ji činí dobře štěpitelnou proteázami. Poločas života molekuly  $\text{PrP}^{\text{C}}$  v buňce se odhaduje na 3 – 6 hodin [10, 11]. Oproti tomu molekula  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  je v průběhu konformačních změn obohacena o strukturu  $\beta$ -skládaného listu (z pouhých 3% u  $\text{PrP}^{\text{C}}$  na 34% u  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$ ) [12, 13], která ji činí částečně odolnou vůči proteolýze.  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  navíc agreguje za tvorby amyloidových fibril a vytváří v mozku depozita, která se podílí na rozvoji onemocnění. V současnosti neexistují protilátky specifické pro  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$ , které by byly klinicky využívány a diagnostické testy jsou založeny na průkazu rezistentního jádra  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  po štěpení vzorku proteinázou K pomocí western blotu nebo imunohistochemie fixované mozkové tkáně. Tento krok je však pracný a časově náročný a obtížně standardizovatelný. Řešením problému by mohl být zcela nový typ diagnostických testů založených na jiném principu než je detekce  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$ , kde by nutnost kroku štěpení proteinázou K odpadla. V prvním případě jsme se zaměřili na detekci glykovaného prionového proteinu monoklonální protilátkou, ve druhém případě jsme využili protilátky specifické pro prionový protein bez C-koncového ukotvení.

Glykovaný protein by mohl podle naší hypotézy představovat nový typ markeru pro TSE, který by bylo možné přímo prokázat specifickou monoklonální protilátkou bez potřeby štěpení proteinázou K. Působením glukózy a jiných redukujících cukrů v organismu vzniká spektrum produktů zvaných koncové produkty glykace (advanced glycation end products, AGEs). AGEs hrají klíčovou roli např. při patogenezi komplikací u chronického diabetu mellitus [14] a glykovaný hemoglobin  $\text{HbA}_{1c}$  je nejdůležitějším diagnostickým markerem při sledování kompenzace diabetiků. Ve snížené míře dochází ke glykaci membránových proteinů senescentních erytrocytů u jedinců s normální

hladinou glukózy v krvi [15], včetně buněčného prionového proteinu [16]. Glykace byla ve zvýšené míře pozorována i na depozitech proteinových agregátů v mozcích pacientů s neurodegenerativními onemocněními, jako jsou Alzheimerova a Parkinsonova choroba, amyloidózy a prionová onemocnění [17]. Ke glykaci v těchto případech dochází z důvodu dlouhodobého výskytu proteinových depozit v organismu a jejich vystavení účinkům glukózy. V mozcích CJN pacientů byla za pomoci nespecifické protilátky proti AGEs opakovaně prokázána depozita glykovaného PrP<sup>TSE</sup> [18, 19], absence monoklonální protilátky specifické pro glykovaný PrP však brání možnosti zavedení specifického diagnostického testu pro tento typ depozit. Absence protilátky též znemožňuje zabývat se podrobnějšími studii role glykace na iniciaci patologie v *in vitro* i *in vivo* systémech. V této části studie jsme se zaměřili na přípravu monoklonálních protilátek proti glykovanému prionovému proteinu a na charakterizaci jejich vlastností.

V dřívějších studiích byla popsána příprava a vlastnosti monoklonální protilátky V5B2, specifické proti lidskému peptidu PrP<sub>214-226</sub> [20]. V5B2 specificky rozeznává C-koncový fragment prionového proteinu zakončeného tyrosinem 226, který byl nazván PrP226\* [21]. Monoklonální protilátka V5B2 tak představuje jedinečný nástroj pro studium lokalizace a chování tohoto C-koncově neukotveného fragmentu prionového proteinu v různých biologických vzorcích. V současných publikacích se objevují zprávy o různých zkrácených formách abnormálního prionového proteinu identifikovaných v prionových depozitech [22-26]. Jedním z identifikovaných fragmentů je PrP bez glykosylfosfatidylinositolové kotvy, tj. PrP( $\Delta$ GPI), zkrácený na úplném C konci [26-28]. Přestože úloha GPI kotvy v replikaci PrP<sup>TSE</sup> a šíření onemocnění zůstává nejasná [29-31], PrP( $\Delta$ GPI) působí ve smyslu urychlení tvorby a šíření prionů [32-34]. V této části studie jsme se zaměřili na vývoj sendvičové DELFIA imunoeseje pro detekci fragmentu PrP226\* v lidských mozkových homogenátech, s využitím monoklonální protilátky V5B2. Metoda je založená na porovnání množství PrP226\* měřených v nativních a denaturovaných vzorcích. Princp metody je podobný konformačně-dependentní imunoeseji prvně popsané Šafářem a kol. [35]. Testovali jsme 20 sCJN, 3 fCJN, 1 GSS a 10 non-CJN mozkových homogenátů a zjistili jsme, že fragment PrP226\* se hromadí v mozcích postižených TSE, v nejvyšší míře pak v případě GSS. Množství PrP226\* bylo obecně úměrné množství PrP<sup>TSE</sup> a PrPres přítomných v prionových agregátech.

## Hypotézy a cíle práce

Cílem této práce bylo přispět k vývoji diagnostického testu prionových chorob založeného na jiném principu, než je průkaz k proteolýze rezistentního PrPres, který by umožnil jednodušší a lépe standardizovaný průkaz lidských i zvířecích TSE.

Konkrétní cíle práce byly následující:

1. připravit glykovaný rekombinantní prionový protein a využít ho jako imunogenu pro přípravu monoklonálních protilátek
2. provést výběr hybridomů produkujících protilátky specificky reagující s glykovaným prionovým proteinem
3. provést charakterizaci připravených vybraných a ve spolupráci získaných monoklonálních protilátek na biologickém materiálu
4. optimalizovat metodu DELFIA pro detekci prionového fragmentu PrP226\* v mozcích jedinců postižených TSE
5. provést studii hladiny PrP226\* ve vzorcích mozkové tkáně CJD pacientů

## Materiál a metodika

**Expres a purifikace rhPrP:** rhPrP byl připraven v expresních *E. coli* BL21(DE3). Buňky byly stočeny a sonikovány, inkluzní tělíska byla následně rozpuštěna v 50 mM fosfátovém pufru pH 8,0 s 8 M močovinou a 5 mM 2-merkapt ethanol. Redukovaný protein byl přečištěn chromatografií na afinitní Ni-NTA matici, oxidován glutathionem a přečištěn na RP-HPLC.

**Modifikace rPrP kyselinou glyoxalovou:** Přečištěný rhPrP byl modifikován 45 mM kyselinou glyoxalovou s 1 mM kyanoborohydridem sodným přes noc na kývačce při 4°C. Modifikovaný protein byl analyzován na western blotu a použit k imunizaci myší.

**Imunizace myší:** Šest *Prnp*<sup>0/0</sup> (Zürich I) myší (EMMA, Monterondo, Itálie) bylo imunizováno s.c. 30 µg rhPrP-CML v PBS s Freundovým adjuvans ve dnech 0, 14 a 28. Titry protilátek proti hPrP a hPrP-CML v myším séru byly měřeny metodou ELISA ve dnech 21 a 35. V den 64 byl dvěma myším s nejvyšším titrem protilátek i.v. podán finální booster 5 µg antigenu v PBS a myši byly usmrceny 68. den. Bylo připraveno 960 hybridomových buněk (EXBIO, Praha), které byly primárně screenovány metodou ELISA, vybrané klony pak sekundárně western blotem a dot blotem.

**DELFA lidských mozkových homogenátů:** Vzorky pro měření V5B2 testem byly připraveny denaturací 10% lidských mozkových homogenátů (MH) s 3 M Gdn-SCN v poměru 1:1 (v/v) a následným zředěním TBS-T na 0,25% MH. Nedenaturované MH byly zředěny TBS-T na 0,25% MH. Vzorky byly detegovány v destičkách (NUNC U96 MaxiSorp) s ukotvenými protilátkami V5B2 nebo EM-20. K detekci byl použit streptavidinem konjugovaný s europiem (Eu-SA, PE), signál uvolněného Eu byl měřen „time-resolved“ fluorescencí při 613 nm po excitaci vzorku při 340 nm, časová prodleva mezi excitací a měřením emisní fluorescence byla 400 µs.

**Konformačně-dependentní imunoesej (CDI):** Vzorky byly připraveny dle Safar a kol. [35] a CDI byla provedena v sendvičovém uspořádání dle McCutcheon a kol. [36] s využitím Eu-SA (PE). DELFIA (viz výše) byla provedena s použitím monoklonální protilátky FH11 jako kotvící protilátky a biotinylované 3F4 jako sekundární protilátky.

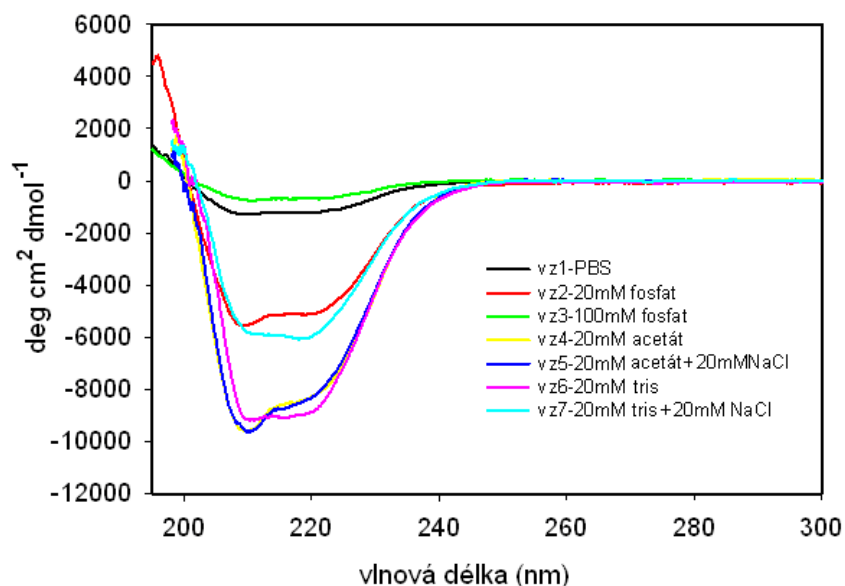
**Štěpení mozkových homogenátů proteinázou K:** 5% lidské mozkové homogenáty v PBS byly štěpeny proteinázou K (finální koncentrace 0, 10 a 50 µg/ml). Štěpení probíhalo 30 min. při 37°C, poté bylo ukončeno varem. Vzorky štěpeného prionového proteinu byly analyzovány western blotem, membrány a densitometricky vyhodnoceny.

## Výsledky

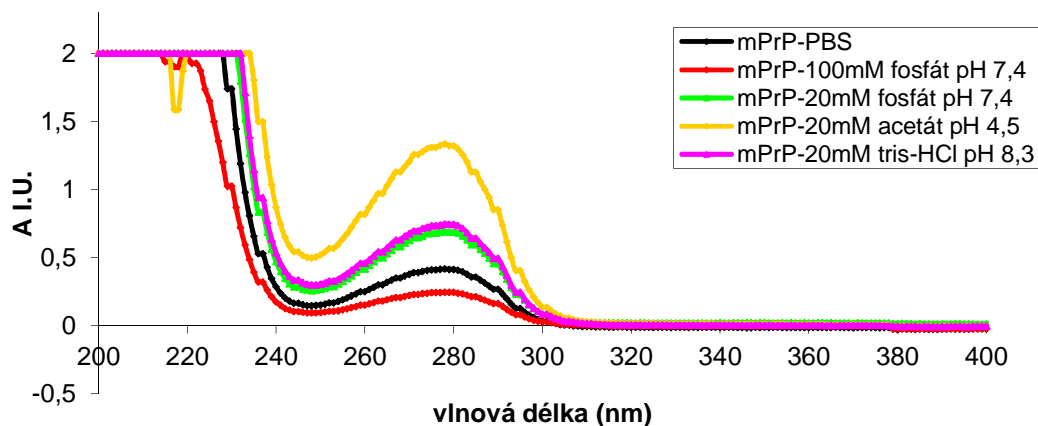
### Příprava rekombinantního prionového proteinu

K přípravě rekombinantního myšního PrP (rmPrP) byl použit plazmid pET-15b (Novagen), který umožňuje expresi požadovaného proteinu v hostitelských *E. coli* obsahujících chromozomální kopii genu pro T7 RNA polymerázu (kmen *E. coli* BL21(DE3)), který je

kontrolován bakteriálním laktózovým promotorem. Jako předloha byla použita cDNA pro myší prionový protein 23-230 varianta A (*mPrnpa*), tj. varianta genu pro mPrP s krátkou inkubační dobou. K přípravě rekombinantního lidského prionového proteinu byly použity plasmidy pRSET A s geneticky upraveným klonovacím místem pro odštěpení N-koncové His kotvy thrombinem [37], které byly získány od prof. Wüthricha z Ústavu molekulární biologie a biofyziky v Zürichu, Švýcarsko. Plasmidy obsahují sekvence pro lidský prionový protein 23-231 nebo pro prionové fragmenty 81-231, 90-231 a 121-231 [38]. Bakteriálně exprimované rPrP byly v redukovaném stavu přečištěny afinitní chromatografií na Ni-NTA pryskyřici, následně oxidovány glutathionem a sbaleny do nativní konformace. Jak je patrné z obr. 1, ideálním pufrům pro renaturaci je 20 mM Tris-HCl pH 8,3, rPrP vykazují maximální  $\alpha$ -helix (výskyt dvojitého minima elipticity při cca. 210 a 220 nm a nejsilnější intenzita spektra: - 9000 deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>, —). Čistota proteinu a jeho stabilita byla kontrolována pomocí spektrofotometrie proměřením UV spekter. Z obr. 2 je patrné, že vzorky jsou stabilnější v pufrch s nízkou koncentrací solí (20 mM), než ve vzorcích s vyšší koncentrací solí (100 mM a vyšší).

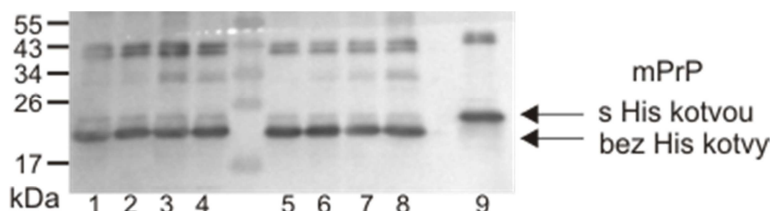


**Obr. 1:** CD spektra rmPrP<sub>23-230</sub> měřená v daleké UV oblasti při pH 4,5 – 8,3. Spektra jsou barevně odlišena podle použitých pufrů, lyofilizovaný rmPrP byl přidán v množství 1 mg/ml pufru. Spektra byla měřena ihned po renaturaci a centrifugaci agregátu na spektropolarimetru Jasco 815 (Japonsko) při laboratorní teplotě. — PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4; — 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4; — 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4; — 20 mM acetát, pH 4,5; — 20 mM acetát, 20 mM NaCl, pH 4,5; — 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; — 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,3.



**Obr. 2:** Absorbance mPrP v pufrách o různém pH. Vzorky mPrP (1 mg/ml) byly po rozpuštění v pufrách ponechány 4 týdny při 4°C. Případné agregáty byly z roztoku odstraněny centrifugací. Absorbční spektra byla proměřena v oblasti 200 – 400 nm.

Oba rekombinantní PrP byly připraveny jako fúzní proteiny obsahující N-koncový His-tag se štěpným místem pro thrombin. Množství thrombinu i doba štěpení byly optimalizovány (obr. 3). Štěpení probíhalo při pH 8,3, což je pH optimální k dosažení nejvyšší aktivity thrombinu i pro dosažení vysoké rozpustnosti mPrP ve vodném prostředí. K odštěpení > 90% kotvy dojde již po 1 hod. při použití 0,5 U/ml thrombinu a se zvyšující koncentrací použitého thrombinu ani při delší době štěpení se efektivita štěpení nemění (obr. 3). Naopak dochází k přibývání nespecificky naštěpených fragmentů mPrP (na obr. 3) fragmenty v oblasti 34 kDa), což je jev nežádoucí. Jako optimální bylo vyhodnoceno štěpení fúzního proteinu 0,5 U thrombinu / ml vzorku mPrP po dobu 1 – 2 hod. při 37°C.

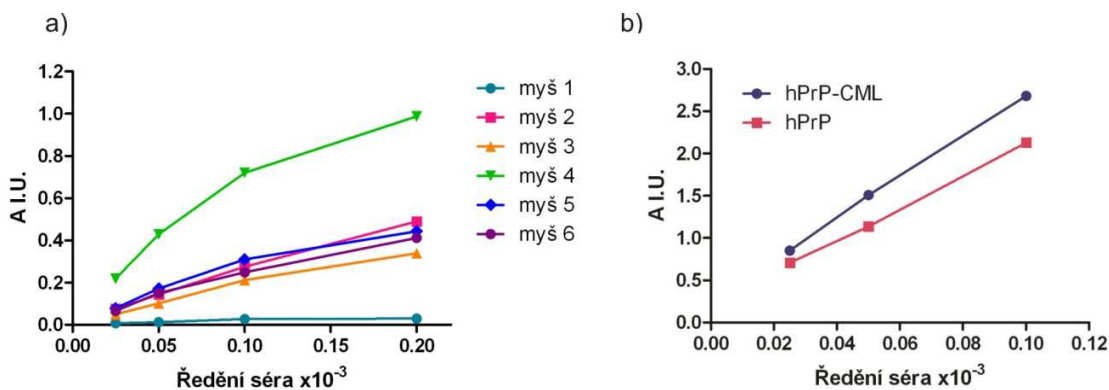


**Obr. 3:** Štěpení His-mPrP o koncentraci 0,1 mg/ml probíhalo v 50 mM acetátu amonném pH 8,3 různým množstvím thrombinu (0,5; 1; 2,5 a 5 U/ml) po dobu 1 hod. (pozice 1 – 4, resp.) a 2 hod. (pozice 5 – 8, resp.) Na pozici 9 je neštěpený mPrP s His kotvou. Western blot byl obarven protilátkou 6H4 (0,125 µg/ml).

### Příprava a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu

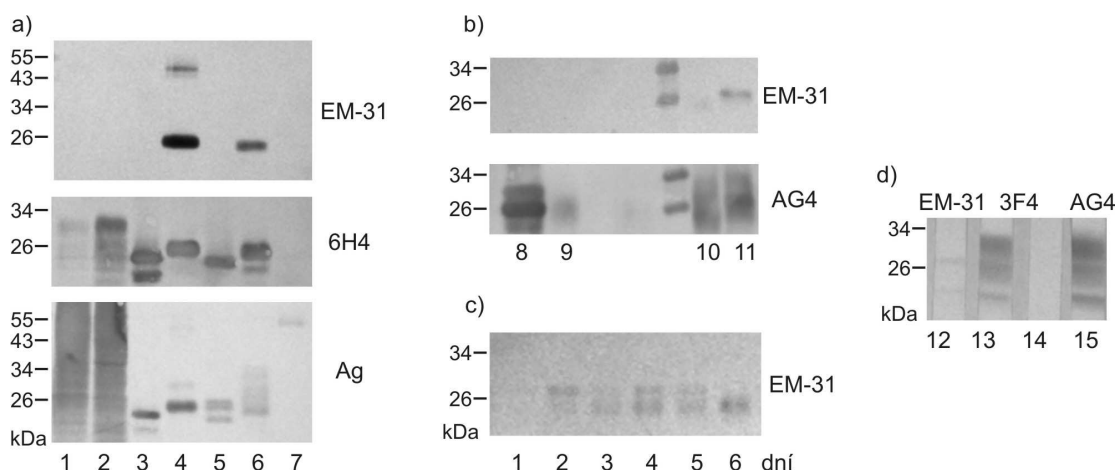
Pro přípravu protilátek proti glykovanému prionovému proteinu byl jako antigen vybrán rekombinantní lidský PrP modifikovaný na postranních řetězcích lysinu na karboxymethyl-lysin (CML). CML představuje koncový produkt glykace proteinů a je nej-

četněji zastoupeným antigenem AGE *in vivo* [39]. K imunizaci byly použity geneticky modifikované myši bez genu pro prionový protein (*Prnp*<sup>0/0</sup>), imunizace byla provedena rhPrP-CML. Jedna ze šesti imunizovaných myší měla vysokou, čtyři střední a jedna nízkou odpověď na imunizaci (obr. 4a). Reaktivita protilátek proti rhPrP-CML v sérech obou myší s nejvyšší imunitní odpovědí (myš č. 4 a 2) byla mírně vyšší než reaktivita k nemodifikovanému rhPrP (tj.  $A_{405} = 1,5$  oproti  $A_{405} = 1,1$  při ředění séra  $5 \times 10^{-5}$  u myši č. 4, Obr. 4b).



**Obr. 4:** Šest *Prnp*<sup>0/0</sup> myší bylo imunizováno s.c. 30  $\mu$ g rhPrP-CML v PBS s Freundovým adjuvans ve dnech 0, 14 a 28. **a)** Titry protilátek proti rhPrP-CML v myším séru byly měřeny 7 dní po 3. imunizaci. V mikrotitrační destičce byl ukotven rhPrP-CML, jednotlivá myší séra byla přidávána v rostoucí koncentraci. Myš č. 4 (—▼) vykazovala zvýšenou imunitní odpověď oproti ostatním, myš č. 1 (—●) zůstala téměř bez odpovědi. **b)** 6 týdnů po 3. imunizaci byl myši č. 4 i.v. podán finální booster 5  $\mu$ g antigenu v PBS, za další 4 dny byly v séru stanoveny titry protilátek proti hPrP. V mikrotitrační destičce byly ukotveny rhPrP a rhPrP-CML, myší sérum bylo přidáváno v rostoucí koncentraci.

Během sekundárního screeningu western blotem bylo vybráno 12 klonů s nejvyšší afinitou k rhPrP-CML, mezi nimiž 4 klony (7A8, 1C3, 1C12 a 1F3) vykazovaly vysokou afinitu k rhPrP-CML. Nejprve jsme se zaměřili na charakterizaci MAb EM-31 produkovanou klonem 7A8 s nejvyšší reaktivitou proti rhPrP-CML. MAb EM-31 vykazovala silnou vazbu na rhPrP-CML, zatímco její vazba na nemodifikovaný rhPrP byla zanedbatelná (obr. 5a). EM-31 se nevázala na BSA-CML na WB (obr. 5a) ani na ELISA. Protilátka smíšeně reagovala i s rmPrP-CML (obr. 5a) a s rmPrP-AGE připraveným glykací proteinu D-ribózou (obr. 5b, c). To potvrzuje schopnost protilátky rozeznat i rPrP glykovaný v mírnějších a fyziologičtějších podmínkách. EM-31 se nevázala na redukovaný rhPrP-CML ani na redukovaný rmPrP-CML nebo rmPrP-AGE (obr. 5b). Na western blotu nevykazovala EM-31 reaktivitu k proteinům normálního lidského nebo myšího MH (obr. 5a) a pouze slabou afinitu k PrP v glykovaném lidském MH (obr. 5d).



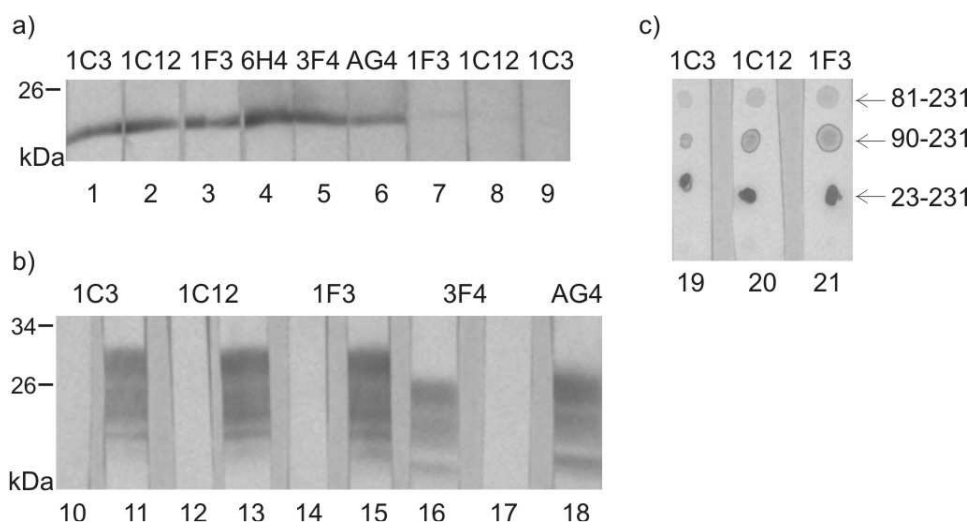
**Obr. 5:** **a)** Tři identické bloty byly obarveny protilátkou EM-31, kontrolní anti-prionovou protilátkou 6H4 a celkový protein byl obarven koloidním stříbrem (Ag). Zleva nanosené vzorky: normální myši MH (1); normální lidský MH (2); rekombinantní myši PrP (rmPrP, 3); glykovaný rmPrP (rmPrP-CML, 4); rekombinantní lidský PrP (rhPrP, 5); glykovaný rhPrP (rhPrP-CML, 6); glykovaný BSA (BSA-CML, 7). EM-31 reaguje pouze s glykovanými rPrP. **b)** Dva identické bloty byly obarveny protilátkou EM-31 a kontrolní anti-prionovou protilátkou AG4. Zleva nanosené vzorky: redukovaný rmPrP-CML (8); redukovaný rmPrP-AGE (glykovaný inkubací s ribózou, 9); neredukovaný rmPrP po inkubaci s ribózou v Tris-HCl pufru (glykace byla inhibována, 10); glykovaný neredukovaný rmPrP po inkubaci s ribózou ve fosfátovém pufru (11). Reaktivita EM-31 s rmPrP-CML a rmPrP-AGE byla zrušena po redukci vzorků dithiothreitem. **c)** Časový průběh modifikace rmPrP inkubací s 1 M D-ribózou detegován pomocí EM-31. **d)** EM-31 vykazuje pouze slabou afinitu k PrP v glykovaném lidském MH (12). Pro kontrolu glykace byla použita anti-prionová protilátka 3F4, která se váže na neglykovaný lidský MH (13), ale neváže se na glykovaný lidský MH (14). Anti-prionová protilátka AG4 je ke glykaci necitlivá a byla použita jako kontrola detegující PrP v glykovaném lidském MH (15).

Vzhledem k tomu, že EM-31 má pouze slabou afinitu k PrP v glykovaném lidském MH (obr. 5d), zaměřili jsme se na analýzu vlastností MAb produkovaných klonu 1C3, 1C12 a 1F3, i když jejich afinita vůči rhPrP-CML nebyla tak vysoká jako u EM-31. Protilátky obecně vykazují stejné vlastnosti jako EM-31, se dvěma důležitými rozdíly: dokážou rozeznat nejen rhPrP-CML (obr. 6a), ale i glykosylovaný PrP<sup>C</sup>-CML na western blotech *in vitro* modifikovaných lidských MH (obr. 6b) a myších MH. Jejich vazba navíc není citlivá k redukci proteinů dithiothreitem (data neuvedena). Specifita MAb ke glykovanému rhPrP byla potvrzena i metodou ELISA.

### Detekce fragmentu prionového proteinu PrP226\* v lidském mozku

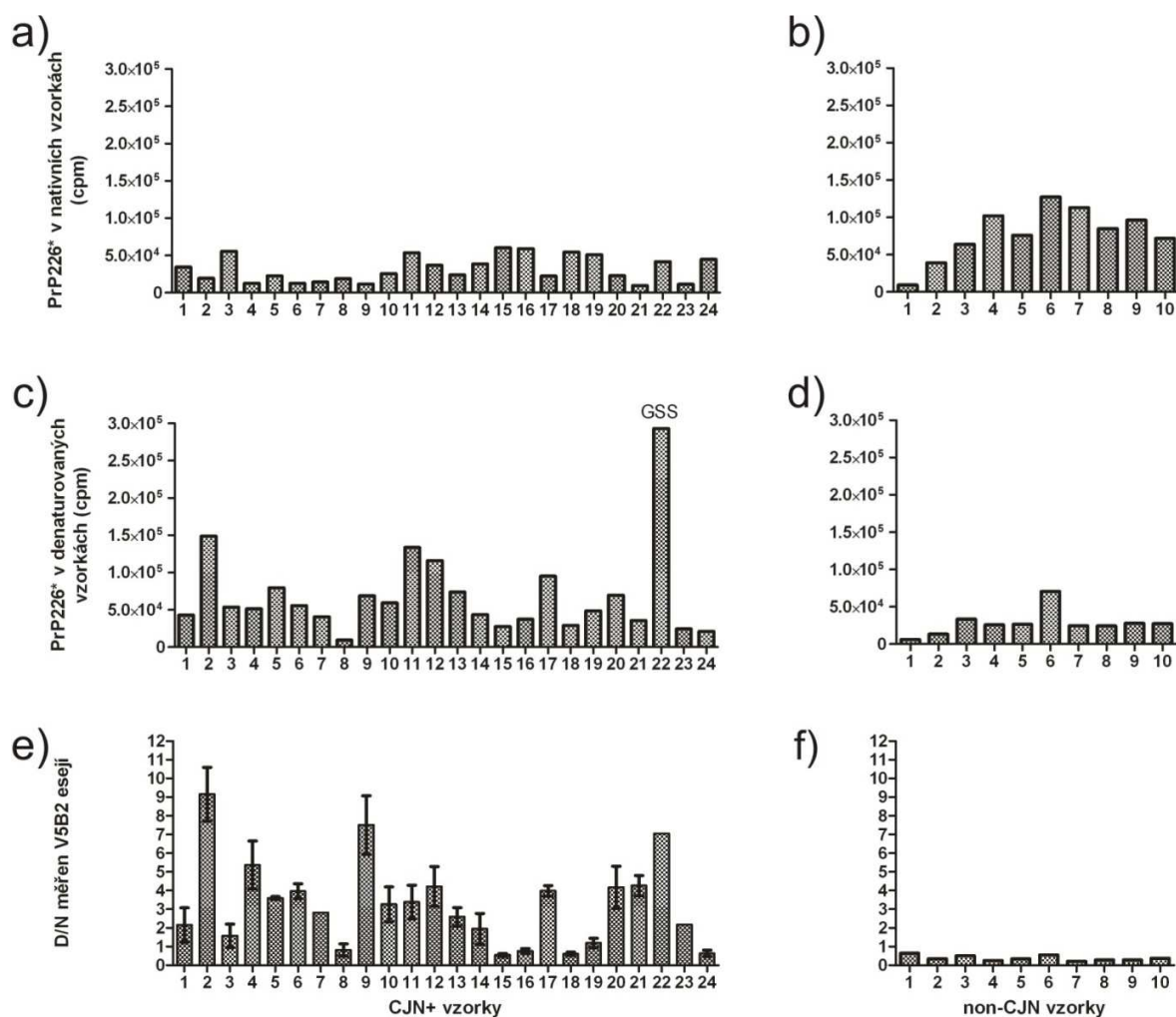
Přítomnost prionového proteinu bez GPI kotvy, tj. PrP( $\Delta$ GPI), v mozkových homogenátech jedinců s TSE byla v minulosti opakovaně prokázána [21, 26-28]. V této studii jsme k detekci PrP( $\Delta$ GPI) použili protilátku V5B2 namířenou proti fragmentu PrP226\*, který je zakončen Tyr<sub>226</sub> a neobsahuje tedy GPI kotvu. Změřili jsme signál celkového PrP226\* v nativním i denaturovaném stavu u 10 non-CJN, 23 CJN a 1 GSS mozkových homogenátů pomocí "Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay" (DELFI).





**Obr. 6:** **a)** Western blot rhPrP byl nastříhán na proužky a proužky 1-3 byly glykované kyselinou glyoxalovou, zatímco proužky 4-9 zůstaly nemodifikovány. Supernatanty 1C3, 1C12 a 1F3 vykazují silnou reaktivitu k PrP na glykovaných membránách (1 – 3), ale jen velmi slabou nebo žádnou reaktivitu k nemodifikovanému rhPrP (7 – 9). Přítomnost rhPrP byla ověřena protilátkami 6H4, 3F4 a AG4 (4 – 6). **b)** Klony 1C3, 1C12 a 1F3 rozeznávají PrP v *in vitro* glykovaném lidském mozgovém homogenátu (lidský MH-CML, 11, 13, 15), ale ne v lidském MH (10, 12, 14). Protilátka 3F4 byla použita jako kontrola glykace, váže se na PrP v neglykovaném lidském MH (16), ale ne v lidském MH-CML (17). Protilátka AG4 je pozitivní kontrola pro PrP v lidském MH-CML (18). **c)** Reaktivita všech tří klonů ke glykovaným C-koncovým fragmentům rhPrP<sub>81-231</sub> a rhPrP<sub>90-231</sub> na dot blotech je slabší, než k rhPrP<sub>23-231</sub>-CML.

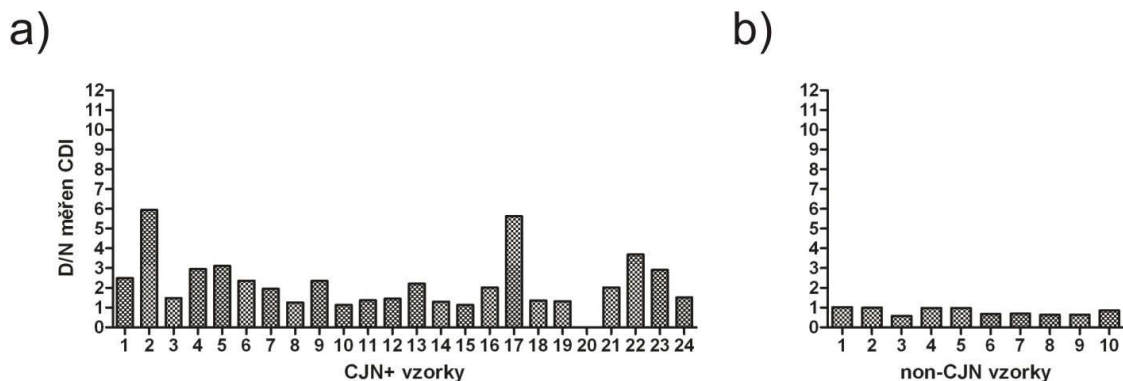
Hodnoty časově rozlišené fluorescence (Time Resolved Fluorescence, TRF) byly průměrně vyšší u CJN/GSS případů než u non-CJN, 7 CJN/GSS vzorků (č. 1, 5, 11, 12, 13, 17, 22, obr. 7e) vykazovalo vyšší signál pro PrP226\* než non-CJN vzorek č. 6 (70 684 cpm, obr. 7f). Tyto výsledky však neudávají informaci o stavu GPI-PrP v jednotlivých vzorcích. Abychom zjistili, zda se fragment PrP226\* vyskytuje v mozcích v monomerní “rozpustné” formě, nebo zda se podílí na tvorbě agregátů, změřili jsme poměr signálů PrP226\* v denaturovaném MH ku nativnímu MH (D/N poměr) pro každý CJN/GSS a non-CJN vzorek. Hodnoty D/N všech 10 non-CJN vzorků byly  $\leq 0,65$  (obr. 7f) a hodnoty D/N 24 CJN/GSS vzorků se pohybovaly ve dvou rozmezích. První skupina s  $D/N < 1,6$  (vzorky č. 3, 8, 15, 16, 18, 19, 24) obsahovala podobné hodnoty PrP226\* v MH před i po denaturaci (obr. 7a, c, resp.), zatímco druhá skupina s poměrem  $D/N \geq 2,0$  (zbývající CJN/GSS vzorky) obsahovala významné množství PrP226\* dostupného pouze po denaturaci (obr. 7a, c, resp.). Data byla ověřena ve dvou nezávislých experimentech za použití protilátek V5B2 a biotinylované EM-20 v sendvičovém uspořádání. Podobná data byla naměřena i při použití protilátek V5B2 a biotinylované E12/2 (data neuvedena). Abychom zjistili, zda nízké hodnoty D/N u vzorků č. 1, 3, 8, 15, 16, 18, 19, 24 nebyly zapříčiněny nedostatečnou homogenizací či nedostatečnou denaturací, opakovali jsme měření po dodatečné homogenizaci vzorků inzulinovou jehlou i po denaturaci vzorků 1,5 M Gdn-SCN po dobu 10 min. při 90°C. Žádné změny v distribuci hodnot D/N jsme nepozorovali.



**Obr. 7:** 23 CJN a 1 GSS mozkových homogenátů (a, c, e) a 10 non-CJN mozkových homogenátů (b, d, f) bylo analyzováno metodou DELFIA ve V5B2/EM-20-bio uspořádání u nedenaturovaných vzorků (a, b) a u vzorků denaturovaných 3M Gdn-SCN (15 min., 60°C) (c, d). Absolutní hodnoty jsou vyneseny jako počet za minutu („counts per minute“, cpm), měřeno časově rozlišenou fluorescencí (TRF). Hodnoty poměrů D/N jsou znázorněny v (e) a (f). Vymezení chyby je udáno jako průměrná hodnota z 2 nezávislých pokusů.

Zároveň jsme změřili signály celkového PrP v CJN/GSS i non-CJN vzorků metodou DELFIA za použití protilátek EM-20 a biotinylované EF2. Množství PrP226\* v denaturovaných vzorcích nekoreluje s množstvím celkového PrP, hladina PrP226\* tedy není pouze úměrná celkovému PrP, ale je individuální v každém vzorku.

Následně jsme porovnali výsledky V5B2 esejí s konformačně-dependentní imunoesejí (Conformation-Dependent Immunoassay, CDI), prvně popsanou Šafářem a kol. [35]. CDI esej je založena na schopnosti denaturačního činidla (běžně používaného guanidin hydrochloridu, Gdn-HCl) odhalit epitopy v molekule PrP, které se v průběhu strukturálních změn při tvorbě PrP<sup>TSE</sup> staly nedostupnými. V našem uspořádání byly vzorky mozkových homogenátů detegovány sendvičovou metodou za použití monoklonální protilátky FH11 ukotvené k povrchu jamek mikrotitračních destiček a biotinylované protilátky 3F4 s následným použitím streptavidinu značeného europiem jako detegující-



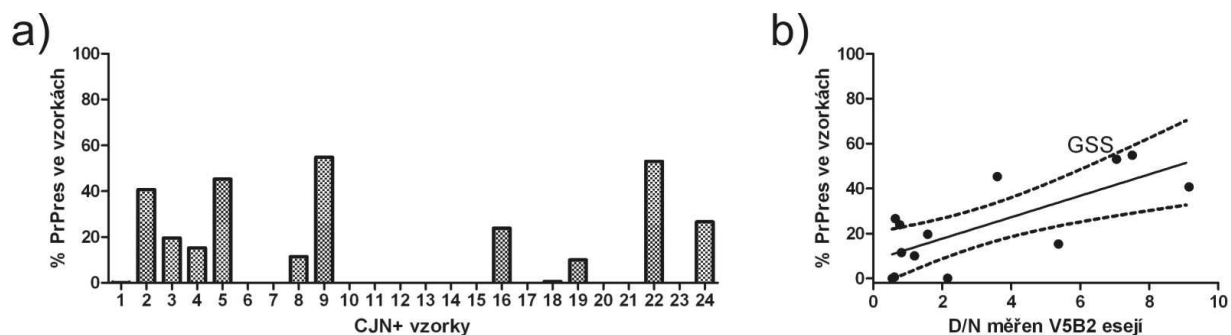
**Obr 8:** 23 z 24 CJN/GSS a 10 non-CJN vzorků mozkových homogenátů (pozn.: vzorek č. 20 nebyl k dispozici) bylo analyzováno metodou CDI. Vzorky byly denaturovány 8 M Gdn-HCl (5 min., 80°C) a analyzovány metodou DELFIA v FH11/3F4-bio uspořádání. Hodnoty D/N CJN/GSS vzorků jsou znázorněny v (a) a non-CJN vzorků v (b).

ho systému. Byly proměřeny denaturované i nedenaturované CJN/GSS a non-CJN vzorky v CDI uspořádání a vypočteny jejich D/N hodnoty (obr. 8a, b, resp.). Hraniční hodnota D/N mezi pozitivními a negativními vzorky byla stanovena jako 1,0, tj.  $D/N > 1,0$  u CJN/GSS a  $D/N < 1,0$  u non-CJN.

Statistická korelace mezi hodnotami D/N vzorků CJD/GSS měřenými esejí V5B2 a hodnotami D/N měřenými CDI byla vyhodnocena jako vysoce významná v 95% intervalu spolehlivosti. Výsledky analýzy naznačují, že množství fragmentu PrP226\* obsažené v prionových depozitech je proporcionální množství celkového PrP v depozitech.

Pro lepší pochopení rozdílů hodnot D/N naměřených pomocí V5B2 eseje jsme stanovili podíl PrP rezistentního ke štěpení proteinázou K (PrPres) u vzorků s hodnotami nejvzdálenějšími od průměru. Vybrali jsme 12 z 24 CJN/GSS vzorků s nejvyššími (vz. č. 2, 4, 5, 9 a 22) a nejnižšími (vz. č. 1, 3, 8, 16, 18, 19 a 24) hodnotami PrP226\* D/N. Vzorky byly za standardních podmínek štěpeny proteinázou K. Přestože působení proteinázy K vedlo k podstatnému naštěpení většiny vzorků, množství PrPres detegované v jednotlivých vzorcích bylo značně rozdílné. Hodnoty rezistence PK vyjádřené jako procento signálu PrPres vztaženého k signálu PrP v neštěpených vzorcích se pohybovalo v rozmezí 0 – 60% (obr. 9a). Statistická korelace mezi hodnotami D/N měřenými esejí V5B2 a rezistencí PK (obr. 9b) byla vyhodnocena jako významná v 95% intervalu spolehlivosti. Lze tedy usuzovat, že vzorky s vyššími poměry PrP226\* D/N jsou zároveň i více odolné ke štěpení proteinázou K. Pozn.: všechny CJN/GSS vzorky byly původně western bloty potvrzeny jako pozitivní na CJN/GSS v Národní referenční laboratoři pro TSE/CJD za použití monoklonálních protilátek 12F10, 3F4 a EM-20.

Abychom zjistili, zda poměr nerozpustného PrP226\* (tj. poměr D/N) koreluje s klasickou typizací CJN vzorků, porovnali jsme hodnoty D/N naměřené esejí V5B2 s typizací vzorků western blotem, s polymorfismem Met/Val na kodonu 129, s výskytem nebo absencí proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku a s imunohistochemickými (IHC) preparáty frontální mozkové kůry CJN/GSS vzorků. Hodnoty D/N nekorelovaly s žádnou s uvedených hodnot.



**Obr. 9:** 12 z 24 CJD/GSS mozkových homogenátů bylo štěpeno proteinázou K o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  30 min. při 37°C, okamžitě nanášeno na SDS-PAGE 12% gel a přebíleno. Membrány byly vyvolány protilátkou 3F4 (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ). Western bloty byly denzitometricky vyhodnoceny a PK rezistence vyjádřena jako procento množství rezistentního PrP vztáženého k množství neštěpeného PrP (a). Korelační diagram mezi hodnotami poměru D/N měřenými V5B2 esejí a PK rezistencí je znázorněn v (b).

## Diskuze

### Diskuze k přípravě rekombinantního prionového proteinu

Kritickým krokem při přípravě nativního, tedy na  $\alpha$ -helix bohatého PrP, je oxidace cysteinů. Oxidaci je třeba provést ve správném ředění proteinu, aby docházelo přednostně ke tvorbě intramolekulárních, nikoli intermolekulárních disulfidických můstků. Při tvorbě dimerů a oligomerů PrP dochází k masivní agregaci proteinu ve vodných pufrch [40]. Proto jsme zvolili koncentraci rPrP v roztoku 0,1 mg/ml, což je v souladu s postupem jiných laboratoří [40, 41].

Samotné sbalení rPrP do nativní konformace lze ovlivnit několika faktory, nejčastěji pH vodného pufru a přítomností chaotropních činidel, popř. koncentrací solí nebo teplotou [40, 42-44]. My jsme pro renaturaci rPrP použili v souladu s jinými laboratořemi pufr o pH 8,0 [40, 44] a vyhnuli jsme se současné oxidaci s renaturací, která byla problematická. Lepších výsledků jsme dosáhli při oxidaci v denaturujících podmínkách a teprve poté následné dialýze do vodného pufru o pH 8,0.

### Diskuze k přípravě a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu

Příprava protilátek proti prionovému proteinu byla často ztížena slabou imunogenicitou PrP, jež je dána vysoce mezidruhově konzervovanou primární strukturou prionového proteinu. Tento problém často neumožňuje obejít ani xenogenní imunizace. Abychom se tomuto potenciálnímu problému vyhnuli, použili jsme *Prnp*<sup>0/0</sup> myši, které jsme imunizovali karboxymethylovaným rekombinantním hPrP (rhPrP-CML).

Screeningem vybrané monoklonální protilátky, tj. purifikovaná EM-31 i supernatanty klonů 1C3, 1C12 a 1F3, byly opakovaně testovány na 12 mozkových homogenátech pacientů s CJD. Ani jedna z protilátek nebyla schopna zachytit hPrP-CML na žádném ze vzorků homogenátů (MH), i když byly nanášeny v desetinasobném množství než obvykle, tj. 10% MH místo 1% MH. Protilátky nereagovaly specificky ani na imunohistochemických preparátech zhotovených Dr. Matějem ve FTN. Během přípravy antigenu došlo zřejmě ke tvorbě celého spektra hPrP-CML a antigen pravděpodobně obsahoval hPrP modifikovaný na všech lysinech molekuly. Během imunizace *Prnp*<sup>0/0</sup>

myší tak mohlo dojít preferenčně ke tvorbě protilátek namířených proti jinému epitopu glykovaného PrP, než jaký/jaké se vyskytuje/í v *in vivo* systémech. *In vivo* může docházet majoritně ke glykaci určité (např. na povrchu exponované) části prionového proteinu a jen minoritně nebo vůbec na jiných částech. Maturovaný lidský PrP obsahuje 10 lysinů a 10 argininů, v jejichž postranním řetězci může teoreticky docházet ke glykaci. Předchozí studie prokázaly přítomnost glykace na jednom nebo více lysinech N-koncové části PrP<sup>TSE</sup> [19]. Dochází-li v průběhu onemocnění k modifikaci dalších možných glykačních míst zatím není známo.

Roli může hrát i použití rekombinantního PrP jako antigenu při imunizaci. Na rozdíl od PrP<sup>C</sup> není rPrP posttranslačně modifikován a není tudíž glykosylován. Tím je možno vysvětlit i velmi nízkou afinitu EM-31 k *in vitro* CML modifikovanému lidskému MH (obr. 5d), oproti vysoké afinitě k rhPrP-CML (obr. 5a). Slabá reakce nevznikla v důsledku nedostatečné modifikace PrP v MH, neboť protilátka 3F4 ztratila reaktivitu [16], zatímco ke glykaci necitlivá kontrolní protilátka AG4 stále s PrP reagovala (obr. 5 a 6). Tento jev lze vysvětlit například sterickým bráněním glykosylačních míst na asparaginech N<sub>181</sub> a N<sub>197</sub> v molekule PrP<sup>C</sup>, které není přítomno u rekombinantního proteinu. Tato skutečnost může limitovat použitelnost EM-31 pro detekci *in vivo* glykovaných glykosylovaných isoform PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup>, zároveň však lze protilátku použít pro studium glykace neglykosylované isoformy proteinu.

### **Diskuse k detekci fragmentu prionového proteinu PrP226\* v lidském mozku**

Přestože význam GPI kotvy při replikaci PrP<sup>TSE</sup> a propagaci prionových onemocnění zůstává nejasný [29-31], prionový protein bez GPI kotvy, tj. PrP( $\Delta$ GPI), působí ve smyslu urychlení propagace a tvorby prionových depozit [32-34].

Esej V5B2 umožňuje měřit poměr D/N u PrP226\* přítomného v mozковém homogenátu, tj. signál měřený v denaturovaném vzorku dělený signálem měřeným ve vzorku za nativních podmínek. Esej V5B2 byla vyhodnocena za použití lidských mozkových homogenátů 23 CJN, 1 GSS a 10 non-CJN vzorků. Závěrem lze říci, že hodnoty D/N pro PrP226\* jsou nižší než 0,7 v non-CJN vzorcích mozků a vyšší než 1,0 v 80% případech CJN/GSS patientských vzorků mozků (obr. 7). Navíc jsme prokázali, že PrP226\* je relativně stabilní; *post-mortem* nebo *post-homogenizační* procesy degradace PrP uvolněnými mozkovými proteázami ovlivňují hladinu PrP226\* jen minimálně. Většina fragmentu PrP226\* je tedy v mozku přítomna již v čase úmrtí. Naše studie tak ukazuje, že PrP226\* se akumuluje v depozitech prionového proteinu již v průběhu onemocnění a může tedy být použit jako biomarker pro lidské TSE.

Abychom lépe porozuměli výkyvům v hodnotách D/N mezi jednotlivými vzorky zahrnutými ve studii, změřili jsme obsah frakce PrP rezistentního ke štěpení proteinázou K (PrPres) ve vzorcích s velmi vysokými nebo velmi nízkými hodnotami D/N (obr. 9a) a našli jsme obecnou korelaci mezi proporcí PrP226\* a PrPres v prionových agregátech jednotlivých měřených vzorků. Přesto nás ale znepokojilo, že jsme byli schopni jasně stanovit jako pozitivní jeden ze dvou vzorků CJN, které byly zcela rozštěpeny proteinázou K o koncentraci 50  $\mu$ g/ml (viz. č. 1: obr. 9a, v porovnání s obr. 7e, D/N = 2,16). Hodnoty D/N naměřené esejí V5B2 korelovaly s hodnotami D/N naměřenými esejí CDI, což naznačuje, že množství PrP226\* v agregátech je přímo úměrné množství celkového misfoldovaného PrP v nich přítomného (obr. 8).

## Závěry

Tato práce byla zaměřena na přípravu a detailní studii vlastností monoklonálních protilátek proti novým potencionálním biomarkerům prionových chorob než je běžně používaný PrP<sup>TSE</sup>. Naše výsledky lze využít k vývoji nových typů diagnostických testů a v širším pojetí k hledání nových biomarkerů a zjednodušení diagnostiky TSE.

Shrnutí výsledků:

1. Připravili jsme rekombinantní prionový protein ve velkém množství, vysoké čistotě a stabilitě.
2. Připravili jsme 4 monoklonální protilátky (EM-31, 1C3, 1C12 a 1F3) proti glykovanému prionovému proteinu (rhPrP-CML).
3. EM-31 vykazuje nejvyšší reaktivitu k rhPrP-CML, její vazba na nemodifikovaný rhPrP je zanedbatelná a vazba na BSA-CML nulová. Epitop EM-31 se nachází v C-koncové části molekuly hPrP mezi AK 121 a 231 a je citlivý k redukci hPrP dithiothreitem.
4. 1C3, 1C12 a 1F3 jsou schopny rozeznat nejenom rhPrP-CML, ale i glykosylovaný PrP<sup>C</sup>-CML na blotech *in vitro* modifikovaných lidských a myších mozkových homogenátů.
5. Připravili jsme antigen pro cílenou imunizaci a přípravu monoklonální protilátky reagující s *in vivo* glykovaným PrP.
6. Prionový fragment bez GPI ukotvení (PrP226\*) je v mozkových homogenátech stabilní.
7. Vyvinuli jsme sendvičovou imunoesej (DELFIJA), která umožňuje měřit poměr D/N u PrP226\* v mozковém homogenátu, tj. signál měřený v denaturovaném vzorku dělený signálem měřeným ve vzorku za nativních podmínek.
8. Fragment PrP226\* je součástí prionových agregátů v mozcích CJN/GSS pacientů a jeho množství je proporcionální k celkovému PrP<sup>TSE</sup>.
9. Vzorky s vysokým poměrem D/N obecně obsahují více PrP rezistentního ke štěpení proteinázou K.
10. Nenalezli jsme korelaci mezi množstvím PrP226\* a parametry standardní klasifikace CJN.

## Použitá literatura

1. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
2. Creutzfeldt, H.G., *Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. Vorläufige Mitteilung*. . Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie, 1920. **57**: p. 1-18.
3. Jakob, A., *Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Vorläufige Mitteilung*. . Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkund, 1921. **70**: p. 132–146.
4. Gajdusek, D.C. and V. Zigas, *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population*. N Engl J Med, 1957. **257**(20): p. 974-8.

5. Matěj, R., R. Rusina, and F. Koukolík, *5 let činnosti Národní referenční laboratoře lidských prionových onemocnění při Oddělení patologie a molekulární medicíny FTNsP: naše zkušenosti a přehled literatury*. *Cesk Slov Neurol N*, 2007. **70/103**(6): p. 637–642.
6. Will, R.G., et al., *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK*. *Lancet*, 1996. **347**(9006): p. 921-5.
7. Hewitt, P.E., et al., *Three reported cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission following transfusion of labile blood components*. *Vox Sang*, 2006. **91**(4): p. 348.
8. Holada, K., et al., *Divergent expression of cellular prion protein on blood cells of human and nonhuman primates*. *Transfusion*, 2007. **47**(12): p. 2223-32.
9. Aguzzi, A., F. Baumann, and J. Bremer, *The prion's elusive reason for being*. *Annu Rev Neurosci*, 2008. **31**: p. 439-77.
10. Borchelt, D.R., et al., *Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells*. *J Cell Biol*, 1990. **110**(3): p. 743-52.
11. Caughey, B., et al., *Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells*. *J Virol*, 1989. **63**(1): p. 175-81.
12. Pan, K.M., et al., *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(23): p. 10962-6.
13. Safar, J., et al., *Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(27): p. 20276-84.
14. Brownlee, M., H. Vlassara, and A. Cerami, *Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications*. *Ann Intern Med*, 1984. **101**(4): p. 527-37.
15. Ando, K., et al., *Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **258**(1): p. 123-7.
16. Panigaj, M., et al., *Underestimation of the expression of cellular prion protein on human red blood cells*. *Transfusion*, 2011. **51**(5): p. 1012-21.
17. Miranda, H.V. and T.F. Outeiro, *The sour side of neurodegenerative disorders: The effects of protein glycation*. *J. Pathol.*, 2010. **221**: p. 13–25.
18. Sasaki, N., et al., *Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques*. *Neurosci Lett*, 2002. **326**(2): p. 117-20.
19. Choi, Y.G., et al., *Nonenzymatic glycation at the N terminus of pathogenic prion protein in transmissible spongiform encephalopathies*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(29): p. 30402-9.
20. Curin Serbec, V., et al., *Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(5): p. 3694-8.
21. Kosmac, M., et al., *Epitope mapping of a PrP(Sc)-specific monoclonal antibody: identification of a novel C-terminally truncated prion fragment*. *Mol Immunol*, 2011. **48**(5): p. 746-50.
22. Piccardo, P., et al., *Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998. **57**(10): p. 979-88.

23. Zou, W.Q., et al., *Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40429-36.
24. Zanusso, G., et al., *Identification of distinct N-terminal truncated forms of prion protein in different Creutzfeldt-Jakob disease subtypes*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38936-42.
25. Pan, T., et al., *Biochemical fingerprints of prion diseases: scrapie prion protein in human prion diseases that share prion genotype and type*. J Neurochem, 2005. **92**(1): p. 132-42.
26. Notari, S., et al., *Characterization of truncated forms of abnormal prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 30557-65.
27. Stahl, N., et al., *Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing*. Biochemistry, 1993. **32**(8): p. 1991-2002.
28. Parkin, E.T., et al., *Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11170-8.
29. Kim, J.I., et al., *The role of glycoposphatidylinositol anchor in the amplification of the scrapie isoform of prion protein in vitro*. FEBS Lett, 2009. **583**(22): p. 3671-5.
30. Bate, C., M. Tayebi, and A. Williams, *The glycosylphosphatidylinositol anchor is a major determinant of prion binding and replication*. Biochem J, 2010. **428**(1): p. 95-101.
31. McNally, K.L., A.E. Ward, and S.A. Priola, *Cells expressing anchorless prion protein are resistant to scrapie infection*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4469-75.
32. Chesebro, B., et al., *Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie*. Science, 2005. **308**(5727): p. 1435-9.
33. Stohr, J., et al., *Spontaneous generation of anchorless prions in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(52): p. 21223-8.
34. Jansen, C., et al., *Prion protein amyloidosis with divergent phenotype associated with two novel nonsense mutations in PRNP*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(2): p. 189-97.
35. Safar, J., et al., *Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations*. Nat Med, 1998. **4**(10): p. 1157-65.
36. McCutcheon, S., N. Hunter, and F. Houston, *Use of a new immunoassay to measure PrP Sc levels in scrapie-infected sheep brains reveals PrP genotype-specific differences*. J Immunol Methods, 2005. **298**(1-2): p. 119-28.
37. Zahn, R., et al., *Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15024-9.
38. Zahn, R., C. von Schroetter, and K. Wuthrich, *Human prion proteins expressed in Escherichia coli and purified by high-affinity column refolding*. FEBS Lett, 1997. **417**(3): p. 400-4.
39. Reddy, S., et al., *N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins*. Biochemistry, 1995. **34**(34): p. 10872-8.
40. Alvarez-Martinez, M.T., et al., *Optimized overproduction, purification, characterization and high-pressure sensitivity of the prion protein in the native (PrP(C)-like) or amyloid (PrP(Sc)-like) conformation*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1645**(2): p. 228-40.



41. Hornemann, S., et al., *Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization*. FEBS Lett, 1997. **413**(2): p. 277-81.
42. Swietnicki, W., et al., *Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231*. Biochemistry, 2000. **39**(2): p. 424-31.
43. Baskakov, I.V., et al., *The peculiar nature of unfolding of the human prion protein*. Protein Sci, 2004. **13**(3): p. 586-95.
44. Jackson, G.S., et al., *Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1431**(1): p. 1-13.



**Mgr. Eva Šafaříková, PhD.** (e-mail: [eva.dvorakova@lf1.cuni.cz](mailto:eva.dvorakova@lf1.cuni.cz)) je zaměstnána v Prionové laboratoři Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. Lékařské fakulty UK v Praze. Svou doktorskou disertační práci v oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie obhájila v březnu 2015.

## Unikátne javy v priebehu segregácie chromozómov v meióze

**Lucia Molnarová**

Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave,  
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4

### Úvod

U sexuálne rozmnožujúcich sa organizmov prebieha špecifický typ bunkového delenia, pri ktorom vznikajú haploidné pohlavné bunky z diploidných prekursorových buniek v procese nazývanom meióza. Zatiaľ čo počas mitózy segregujú sesterské chromatidy, v meióze dochádza k dvom kolám segregácie chromozómov. Existujú tri hlavné znaky meiotických chromozómov, ktoré sú zodpovedné za ich segregáciu. Prvým je homologická rekombinácia, počas ktorej dochádza k reciprokej výmene homologických úsekov medzi chromozómami. Druhým znakom typickým pre meiózu je mono-orientácia sesterských kinetochórov v meióze I a tretím je ochrana centromerického kohezínu (Hauf and Watanabe, 2004; Watanabe, 2012). Koordinácia týchto procesov je kritická pre správnu segregáciu chromozómov počas meiózy a poruchy v týchto procesoch môžu viesť k meiotickej aneuploidii, ktorá je hlavnou príčinou spontánnych potratov a genetických ochorení akým je napríklad Downov syndróm u ľudí. Preto je dôležité hlbšie porozumieť tomuto procesu bunkového delenia, ktoré je základom pohlavného rozmnožovania organizmov. Pre lepšie objasnenie podstaty týchto syndrémov je nevyhnutné štúdium mechanizmov zabezpečujúcich správnu segregáciu chromozómov v meióze, na ktoré sa zameriavame aj v našej skupine pod vedením doc. Gregáňa.

### Charakteristika meiotických chromozómov

#### Homologická rekombinácia

Homologická rekombinácia (HR) sa podieľa na oprave dvojlákových zlomov (DSBs) jednak v bunkách vegetatívnych ale taktiež aj v bunkách, ktoré podstupujú meiotické delenie. Väčšina DSBs vzniká vo vegetatívnych bunkách náhodne a môžu byť výsledkom stretu replikačnej vidlice s ssDNA léziami alebo vystavenia sa DNA poškodzujúcim agensom, akým je napríklad ionizačné žiarenie. HR poskytuje účinnú možnosť opravy DSBs s použitím nepoškodenej sesterskej chromatidy ako templátu a týmto spôsobom umožňuje opraviť poškodený úsek DNA aby nedošlo k strate genetickej informácie. V diploidných bunkách, môžu ako templát k oprave poškodení slúžiť homologické chromozómy, čo ale v niektorých prípadoch môže byť príčinou straty heterozygotnosti (LOH) (Lorenz *et al.*, 2006). Na rozdiel od vegetatívnych buniek, väč-

Informační listy GSGM, 2015, 46: 57-61

šina DSBs v meiotických bunkách je výsledkom programovaného pôsobenia vysoko konzervovaného proteínu Spo11 (Rec12 u *S. pombe*). Tieto meiotické DSBs sú opravované buď s použitím sesterskej chromatidy alebo homologického chromozómu ako templátu. Správna segregácia chromozómov počas meiózy je zabezpečená HR medzi homologickými chromozómami pri ktorej dochádza ku vzniku crossing-overu. V priebehu formovania DSBs zostáva Rec12 kovalentne naviazaný na 5' konce DNA. V ďalšom kroku je pôsobením endonukleázy, Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), odstránený. MRN katalyzuje úpravu koncov DSBs z oboch strán za vzniku 3' prečnievaní, ktoré sú následne rozpoznávané RPA proteínom a ktorý slúži ako senzor pre kontrolný bod poškodenia DNA (Lee Zou *et al.*, 2003). RPA proteín je v nasledujúcom kroku vymenený za hlavnú rekombinázu, Rad51 proteín a (u niektorých druhov) za meioticky špecifický Dmc1 proteín (Grishchuk *et al.*, 2003), pričom oba proteíny sú homológmi bakteriálneho RecA proteínu (Bishop *et al.*, 1992). Rad51 rekombináza iniciuje reciproknú výmenu DNA vlákien formovaním nukleoproteínového filamentu na ssDNA. V procese formovania a stabilizovania nukleoproteínového filamentu na ssDNA sa zúčastňujú tzv. mediátorové proteíny: Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Sfr1, Swi5 a Rdh54 (Brown *et al.*, 2015; Haruta *et al.*, 2006). Na druhej strane, existujú aj negatívne regulátory Rad51 filamentu, ako napríklad F-box DNA helikáza Fbh1 alebo Srs2 helikáza (Veaute *et al.*, 2003; Krejci *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2009). Proteíny Rad54 a Rdh54, ktoré patria do rodiny Swi2/Snf2 proteínov, stabilizujú formovanie Rad51 nukleofilamentov na ssDNA, ale zároveň sa podieľajú na destabilizácii tohto filamentu v neskorších fázach HR (Catlett and Forsburg 2003). Stabilizované Rad51-ssDNA nukleofilamenty v ďalšom kroku invadujú vlákna homologickej dsDNA za vzniku štruktúry známej ako D-slučka. Rekombinačná reakcia po invadovaní homologického vlákna a následnej syntéze môže ďalej pokračovať dvomi dráhami HR (Szostak *et al.* 1983; Allers and Lichten, 2001). Predlžujúce invadujúce vlákno môže byť rozpletené k druhému koncu dvojvláknového zlomu za vzniku rekombinačných produktov v dráhe SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*). V prípade, že rekombinačná reakcia pokračuje druhou dráhou tzv. DSBR (*double-strand break repair*), je invadované vlákno spojené s druhým vláknom konca dvojvláknového zlomu za vzniku Hollidayových spojení, ktoré môžu byť následne rozpojené dvomi cestami. Prvou cestou vzniká produkt bez crossing-overu a druhou cestou vzniká crossoverový produkt, ktorý je nevyhnutný pre správnu segregáciu chromozómov počas prvého meiotického delenia.

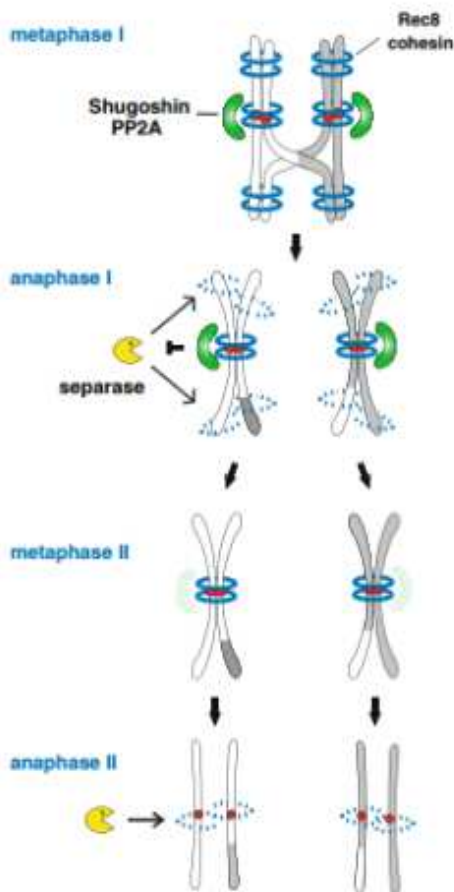
#### Monoorientácia sesterských kinetochórov v meióze I

V priebehu bunkového delenia sú sesterské chromatidy pripojené k mikrotubulom prostredníctvom proteínového komplexu - kinetochór, ktoré sú lokalizované v oblasti centromér chromozómov. V porovnaní s mitózou a meiózou II, kde sesterské chromatidy sú pripojené k mikrotubulom vychádzajúc z oboch deliacich vretienok, v meióze I sú pripojené k mikrotubulom z jedného deliaceho vretienka a tento jav sa nazýva monoorientácia alebo monopolárne pripojenie. K docieleniu správnej segregácie chromozómov musí bunka v priebehu delenia zabezpečiť kontrolu tohto pripojenia mikrotubulov ku kinetochórom. Mechanizmus, ktorý monitoruje pripojenie mikrotubulov ku kinetochórom v mitóze a meióze II je založený na kontrolne pnutia, ktoré je medzi sesterskými chromatidami (Nicklas *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2002). Počas meiózy I je pnutie

medzi homologickými chromozómami dosiahnuté prítomnosťou chiazmat, ktoré sú výsledkom HR (Petronczki et al., 2003). Ak však HR počas meiózy I je potlačená, sesterské chromatidy segregujú k jednému deliacemu vretienku. To znamená, že existuje iný mechanizmus, ktorý reguluje monoorientáciu kinetochór a pravdepodobne bude o čosi viac komplexnejší. Je známe, že na regulácii monoorientácie kinetochór sa podieľajú proteíny meiotického kohezínového komplexu (Watanabe and Nurse, 1999), proteíny kinetochór a mnohé ďalšie (Yokobayashi and Watanabe, 2005). Regulácia tohto procesu sa líši od organizmu k organizmu a v súčasnosti presný mechanizmus regulácie mono-orientácie ešte stále nie je jasný.

#### Ochrana centromerického kohezínu

Kohezín plní esenciálnu rolu počas bunkového delenia. Jeho úlohou je držať sesterské chromatidy v tesnom spojení a taktiež sa podieľa na regulácii mono-orientácie kinetochór. Kohezín je zložený zo 4 podjednotiek, ktorých zloženie sa líši podľa toho, či ide o mitotický alebo meiotický kohezín. V priebehu mitózy u kvasiniek je kohezín z pozdĺž celej dĺžky chromozómov odstraňovaný na začiatku anafázy po aktivácii APC/C komplexu. Keďže meióza pozostáva z dvoch po sebe nasledujúcich dejov segregácie chromozómov (meióza I a meióza II), muselo dôjsť k modifikácii odstraňovania kohezínu z chromozómov. Kohezín je odstraňovaný v dvoch krokoch. Na začiatku anafázy I je odstránený kohezín z oblasti ramien chromozómov. Kohezín v oblasti centroméry zostáva intaktný až do začiatku anafázy II (Petronczki et al., 2003; Ishiguro et al., 2007; Lee et al., 2006). Dodatočné odstránenie kohezínu z oblasti centromér počas anafázy II umožní separáciu sesterských chromatíd. Z uvedeného vyplýva, že centromerický kohezín musí byť počas anafázy I chránený pred štiepením separázou. Túto funkciu plní proteín s príznačným názvom *shugoshin* (v japončine ochranný duch), ktorý sa podieľa na ochrane centromerického kohezínu v komplexe s proteín fosfatázou PP2A (Kitajima a kol., 2004; Marston et al. 2004; Rabitsch et al. 2004). Komplex Sgo1/PP2A sa podieľa na ochrane centromerického kohezínu pravdepodobne prostredníctvom defosforylácie kohezínovej podjednotky Rec8 (Brar et al., 2006; Gregan et al., 2008; Sakuno et al., 2009; Kudo et al., 2009).



## Záver

Meiotické bunkové delenie je evolučne mladším spôsobom delenia buniek, ktorého vznik bol esenciálny pre existenciu pohlavného rozmnožovania. Aj keď je meióza v súčasnosti intenzívne študovaná, regulácia jednotlivých mechanizmov zatiaľ nie je známa. Výsledky zo základného výskumu meiózy by mohli v budúcnosti priniesť riešenia aplikovateľné v klinickej praxi. Štúdium a identifikácia nových proteínov, ktoré regulujú tieto procesy môže pomôcť k lepšiemu objasneniu mechanizmov segregácie chromozómov. V našej skupine sa zameriavame na objasnenie regulácie týchto mechanizmov a preto sme uskutočnili systematický skrining zbierky knockout mutácií v kvasinke *Schizosaccharomyces pombe*. Doteraz sme identifikovali 30 nových mutantov, ktoré vykazovali chybnú segregáciu chromozómov počas meiózy a ktoré sa snažíme bližšie charakterizovať.

## Použitá literatúra

- Allers, T., Lichten, M. (2001). *Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis*. Cell **106**:47–57.
- Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N (1992). *DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression*. Cell **69**: 439-456
- Brar, G.A., Kiburz, B.M., Zhang, Y., Kim, J.E., White, F., Amon, A. (2006). *Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis*. Nature **441**:532-6
- Brown MS, Bishop DK (2015). *DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis*. Cold Spring Harb Perspect Biol **7**: a016659.
- Catlett, M.G., Forsburg, S.L. (2003). *Schizosaccharomyces pombe Rdh54 (TID1) acts with Rhp54 (RAD54) to repair meiotic double-strand breaks*. Mol Biol Cell. **14**:4707–4720.
- Gregan, J., Spirek, M., Rumpf, C. (2008). *Solving the shugoshin puzzle*. Trends Genet. **24**:205-207.
- Grishchuk, A. L., R. Kraehenbuehl, M. Molnar, O. Fleck, J. Kohli. (2003). *Genetic and cytological characterization of the RecA-homologous proteins Rad51 and Dmc1 of Schizosaccharomyces pombe*. Curr. Genet. **165**:1031–1043.
- Haruta N, Kurokawa Y, Murayama Y, Akamatsu Y, Unzai S, et al. (2006) *The Swi5-Sfr1 complex stimulates Rhp51/Rad51- and Dmc1-mediated DNA strand exchange in vitro*. Nat Struct Mol Biol **13**: 823-830.
- Ishiguro, K., Watanabe, Y. (2007). *Chromosome cohesion in mitosis and meiosis*. J Cell Sci. **120**:367.
- Kitajima, T.S., Kawashima, S.A., Watanabe, Y. (2004). *The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis*. Nature **427**:510–517.
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., Klein, H., Ellenberger, T. and Sung, P. (2003). *DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament*. Nature **423**:305–309.

- Kudo, N.R., Anger, M., Peters, A.H., Stemmann, O., Theussl, H.C., Helmhart, W., *et al.* (2009). *Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I.* J Cell Sci. **122**:2686-98.
- Lee Zou and Stephen J. Elledge (2003). *Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes.* Science: 300.
- Lee, J., Okada, K., Ogushi, S., Miyano, T., Miyake, M., Yamashita, M. (2006). *Loss of Rec8 from chromosome arm and centromere region is required for homologous chromosome separation and sister chromatid separation, respectively, in mammalian meiosis.* Cell Cycle **5**:1448–1455.
- Lorenz A, Whitby MC. (2006). *Crossover promotion and prevention.* Biochem. Soc. Trans. **34**:537-541.
- Lorenz, A., Osman, F., Folklyte, V., Sofueva, S., Whitby, M.C. (2009). *Fbh1 Limits Rad51-dependent Recombination at Blocked Replication Forks.* Mol. Cell Biol. **29**:4742–4756.
- Marston, A.L., Tham, W.H., Shah, H., Amon, A. (2004). *A genome wide screen identifies genes required for centromeric cohesion.* Science **303**:1367–1370.
- Nicklas, R. B. (1997). *How cells get the right chromosomes.* Science **275**:632–637.
- Petronczki, M., Siomos, M. F., Nasmyth, K. (2003). *Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis.* Cell **112**:423–440.
- Rabitsch, K.P., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J.P., Eisenhaber, F., Nasmyth, K. (2004). *Two fission yeast homologs of Drosophila Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II.* Curr Biol. **14**:287–301.
- Sakuno, T., Tada, K., Watanabe, Y. (2009). *Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere.* Nature **458**:852–858.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., Stahl, F.W. (1983). *The double-strand-break repair model for recombination.* Cell **33**:25–35.
- Tanaka, T. U. (2002). *Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle.* Curr Opin Cel Biol. **14**:365–371.
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S.C., Le Cam, E., Fabre, F. (2003). *The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments.* Nature **423**:309–312.
- Yokobayashi, S., Watanabe, Y. (2005). *The kinetochore protein Moa1 enables cohesion mediated monopolar attachment at meiosis I.* Cell **123**:803–817.



**Mgr. Lucia Molnárová rod. Karvaiová** je doktorandkou tretieho ročníka PhD. štúdia na Katedre genetiky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Jej dizertačná práca je zameraná na štúdium segregácie chromozómov počas meiotického delenia kvasiniek.

### 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.

„Při pohlavním rozmnožování dochází také k omlazování buněk. Třeba když člověk má často pohlavní styk, nezačne stárnout tak brzo, jako když se tomu vyhýbá.“

\*\*\*

„Sourozenci s krevními skupinami A, B, 0 nemohou mít rodiče žádné.“

\*\*\*

„Chromosom Y je vždy dominantní, takže člověk s tímto chromosomem bude vždy samec.“

\*\*\*

„Manželství mohou být krátkodobá nebo sezónní – třeba ptáků.“

\*\*\*

(Při probírání evoluce člověka): „Člověku zůstaly z té doby určité vlastnosti, např. přijímání potravy, sexuální chování a hravost.“

NOVINKA: CryoCube®  
Hlubokomrazicí boxy



# Mrazivý komfort

## Spolehlivé řešení pro ukládání vzorků

Eppendorf přichází s novými hlubokomrazicími boxy CryoCube® zajišťujícími maximální ochranu vzorků spolu s dosud nevídaným úsporným provozem.

- > Hlavní předností je extrémně **nízká spotřeba elektrické energie**
- > Tradiční kvalita zpracování znamená roky bezporuchového provozu a spolehlivou logistickou podporu
- > **Nižší spotřeba o 25 % přináší pro Vás úsporu peněz** a lepší životní prostředí pro všechny

A navíc:

- > Automatický ventilační port na vyrovnávání vakua přemístěn na čelo hlavních dveří
- > Nová ergonomie madla umožní snížení sil potřebných na otevření a zavření dveří
- > Vnitřní izolované dveře jsou zajištěny magnetickými bezpečnostními uzávěry



[www.eppendorf.cz](http://www.eppendorf.cz)

Bližší informace Vám rádi sdělíme na vyžádání.  
Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Vodňanská 2552/16, 251 01 Říčany u Prahy, E-mail: [eppendorf@eppendorf.cz](mailto:eppendorf@eppendorf.cz), Tel.: +420 323 605 454  
Eppendorf®, the Eppendorf logo, and CryoCube® are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany. All rights reserved, including graphics and photos. Copyright © 2014 by Eppendorf.





## Produkty NimbleGen Sequence Capture

*Spolehněte se na kvalitní cílené obohacení DNA nebo RNA před NGS sekvenováním.*

**SeqCap EZ System** – objevte více sekvenačních variant a snižte potřebnou sekvenační kapacitu v případě ověřování mutací. Navrhněte si panel genů a oblastí dle svých potřeb nebo využijte nabídky již vybraných oblastí či obohacení celého exomu.

**SeqCap Epi System** – využijte obohacovací techniku pro analýzu methylace gDNA na úrovni jednotlivých nukleotidů. Otevřete si nové možnosti epigenomického výzkumu.

**SeqCap RNA System** – vyzkoušejte nový nástroj pro sekvenování celého transkriptomu nebo jednotlivých vybraných transkriptů. Obohacení RNA před sekvenováním zahrnuje přesně daný obsah lncRNA doplněný o zákaznický design.

[www.nimblegen.com](http://www.nimblegen.com)  
[czech.appliedscience@roche.com](mailto:czech.appliedscience@roche.com)

**Roche s.r.o., Diagnostická divize, Karlovo nám. 17, 128 00 Praha 2**