

INFORMAČNÍ LISTY



**Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela, z.s., konané dne
26. 5. 2016 v Mendelově muzeu v Brně**

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

Omluveni: Zadražil

Program schůze:

1. Zpráva o činnosti výboru za uplynulé období
2. Zhodnocení posledního čísla IL, projednání příspěvků do následujícího čísla
3. Informace o stavu členské základny GSGM, schvalování nových přihlášek
4. Různé

ad 1)

Schůze výboru se uskutečnila během semináře o výuce genetiky na českých a slovenských univerzitách, který se konal v Mendelově muzeu v Brně. Zahájil ji prof. Doškař stručnou zprávou o činnosti výboru za uplynulé období. Informoval o přípravě semináře, jehož koordinátorem byl prof. Tomáška ve spolupráci se členy výboru, zejména prof. Doškařem, doc. Slaninovou, dr. Zeleným. Příspěvky na seminář připravili i někteří další členové výboru (dr. Holá, dr. Mašek) a společnosti (dr. Lízal, dr. Sepšiová, dr. Šafářová) a pedagogové a doktorandi z českých a slovenských univerzit. Dále předseda informoval, že hlavní činnost výboru v uplynulém období byla věnována změnám a úpravě stanov GSGM. Úprava nových stanov proběhla podle stanoveného harmonogramu a v souladu s dosud platnými stanovami. Příprava, za kterou zodpovídaly dr. Kočová a dr. Holá, byla zhodnocena velmi pozitivně a bylo oceněno úsilí, které obě členky výboru věnovaly naplni nových stanov a následné agendě pro jejich projednání a schvalování. Všichni členové společnosti měli možnost podat návrhy na změny a úpravy stanov a všechny tyto návrhy projednalo a schválilo na usnášeníschopném jednání valné shromáždění GSGM, které se konalo rovněž 26. 5. 2016 v Brně.

ad 2)

Byla pozitivně hodnocena vysoká úroveň posledního čísla IL a prof. Šmarda informoval o přípravě nového čísla, pro které má již připraveno nebo přislíbeno několik příspěvků. Prof. Šmarda požádal přítomné členy výboru a redaktory IL o průběžnou přípravu vhodných autoreferátů z úspěšně obhájených doktorských dizertačních prací, které se staly nedílnou součástí IL. Pro nadcházející číslo má zpracovaný jeden příspěvek z PŘF UK v Praze a další připraví zástupci PŘF MU v Brně. Přítomní členové výboru a redaktoři IL přislíbili v tomto směru maximální součinnost.

ad 3)

Výbor byl informován o aktuálním stavu členské základny. Od minulé schůze byly výboru doručeny dvě nové přihlášky za člena společnosti, které podaly RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D. a Mgr. Dana Šafářová, Ph.D. Obě přihlášky byly jednomyslně schvále-

ny. Dr. Daňková byla zařazena do databáze členů pod evidenčním číslem 141, dr. Šafářová pod evidenčním číslem 142. Výbor dále obdržel písemné prohlášení od Mgr. Matyáše Šímy, který požádal o vystoupení z GSGM. Řádné členství Mgr. Matyáše Šímy v GSGM tímto zaniklo. Profesor Knoll zveřejní aktuální seznam členů společnosti na webových stránkách GSGM.

ad 4)

Vzhledem k tomu, že schůze výboru se konala během semináře o výuce genetiky, diskutovaly se ještě některé postřehy z právě probíhajícího semináře. Hlavní organizátoři semináře připraví příspěvek do nadcházejícího čísla IL. Výstupy ze semináře a všechny užitečné odkazy budou, podobně jako v loňském roce, zveřejněny na webových stránkách semináře Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě (zodpovídá prof. Tomáška, doc. Slaninová).

Předseda společnosti informoval o výsledcích jednání týkajících se upřesnění adresy sídla GSGM, která probíhají s vedením Masarykovy univerzity v Brně.

Zapsala: M. Kočová

Zápis z valného shromáždění Genetické společnosti Gregora Mendela, z.s., konaného dne 26. 5. 2016 v Mendelově muzeu v Brně

Valného shromáždění se zúčastnilo 21 členů společnosti z České a Slovenské republiky, což představuje 17 % všech členů GSGM. V souladu s platnými stanovami bylo valné shromáždění usnášeníschopné s možností právoplatně hlasovat.

Dr. Kočová informovala přítomné o návrzích, které byly, v souvislosti s nezbytnou aktualizací stanov, postupně doručeny a zapracovány do prozatímního návrhu nových stanov, který byl poté rozeslán všem členům GSGM k dalším úpravám a doplňkům. Ve stanovené lhůtě nebyly žádné další pozměňovací návrhy doručeny.

Valné shromáždění projednalo a schválilo navrhované změny, úpravy a doplňky stávajících stanov, o nichž bude následně hlasovat plénum GSGM.

Zapsala: M. Kočová

VYÚČTOVÁNÍ HOSPODAŘENÍ GSGM OD 1.1.2015 DO 31.12.2015 ZA ČR

Zůstatek k 31.12.2014		33743,54 Kč
z toho	na účtu KB	33042,54
	v pokladně	701,-

Příjmy v roce 2015		9850,00 Kč
členské příspěvky (9850 Kč):		
z toho	placené na účet KB	8650,-
	placené hotově	1200,-

Výdaje v roce 2015		22882,00 Kč
poplatky bance za vedení účtu a položky		1956,-
drobné občerstvení - schůze výboru		336,-
kancelářské potřeby		390,-
faktura barevný tisk IL		17200,-
grafické úpravy IL		3000,-

Zůstatek k 31.12.2015		20711,54 Kč
z toho	na účtu KB	19536,54
	v pokladně	1175,-

Zpracoval: Aleš Knoll

VYÚČTOVANIE HOSPODÁRENIA GSGM OD 1.1.2015 DO 31.12.2015 ZA SR

Zostatok k 31.12.2014		1329,12 EUR
z toho	na účte Tatra banka	1238,54
	v pokladně	90,58

Příjmy v roce 2015		90,00 EUR
členské příspěvky (75 EUR):		
z toho	placené na účet Tatra banka	75,-
	placené hotově	15,-

Výdaje v roce 2015		273,64 EUR
poplatky bance za vedení účtu a položky		66,66
platba za monografiu		192,60
kancelářské potřeby		14,38

Zůstatek k 31.12.2015		1145,48 EUR
z toho	na účte Tatra Banka	1054,28
	v pokladně	91,2

Zpracovala: Miroslava Slaninová



Vzpomínka na paní RNDr. Marii Vojtíškovou, CSc.

S hlubokým zármutkem oznamujeme členům Genetické společnosti Gregora Mendela, že ve čtvrtek, dne 2. 6. 2016, ve věku 70 let zemřela dlouholetá členka výboru GSGM, paní RNDr. Marie Vojtíšková, CSc. Zpráva o jejím předčasném odchodu bolestně zasáhla všechny její kolegy a spolupracovníky na pracovištích, kde za svůj život působila. Její kariéra je spjata především s Biofyzikálním ústavem AV ČR, kde nastoupila již v r. 1969 a spolupracovala nejprve s oddělením RNDr. J. Pilicha, CSc. a později přešla do oddělení prof. E. Palečka, DrSc. Svou milou povahou, přátelským jednáním, zájmem o vědu a ochotou přizpůsobovat svou práci novým vědeckým cílům si velmi rychle získávala sympatie svých kolegyň a kolegů. Svoji práci zde, mimo jiné, přispěla k vyřešení problému struktury triplexů DNA stabilizovaných super-helikálním vinutím DNA, s využitím chemických sond DNA na úrovni rozlišení jednotlivých nukleotidů. V roce 1992 z Biofyzikálního ústavu AV ČR přešla do laboratoří Dětské nemocnice v Brně, kde pracovala do začátku r. 2001. Téměř po 10 letech se však na Biofyzikální ústav opět vrátila a až do r. 2013 zde pracovala v oddělení prof. V. Brabce. Zde úspěšně řešila problémy související s molekulárními mechanismy protinádorově účinných léčiv, zejména cytostatik odvozených od komplexů platiny v rámci projektů podporovaných domácími i zahraničními institucemi a podílela se na výchově studentů a mladých vědeckých pracovníků.

Kromě své vědecké práce se Dr. Vojtíšková často a ráda zapojovala do dalších činností souvisejících s vědeckou výchovou studentů na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Jako milou a přátelskou examinátorku si ji ve své paměti bude uchovávat řada studentů, kterým asistovala při státních doktorských zkouškách nebo obhajobách doktorských disertačních prací. Ve výboru Genetické společnosti Gregora Mendela pracovala v letech 2011-2013 jako tajemnice a významně se podílela na jeho činnosti. I zde svým způsobem jednání kolem sebe vždy šířila atmosféru přátelství a důvěry, která nám všem bude chybět. Čest její památce!



kolegové z Biofyzikálního ústavu AV ČR a výboru GSGM

EduWorkshop 2.0: Laboratórne cvičenia z genetiky na českých a slovenských univerzitách

Ľubomír Tomáška

Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina B-1, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovensko

Po úspešnom prvom ročníku "nekonferencie" (unconference; [1]), na ktorej sme si v máji 2015 vymenili skúsenosti s výučbou genetiky na českých a slovenských univerzitách [2], sme druhé stretnutie venovali praktickej výučbe genetiky (a molekulárnej biológie). Brnianski kolegovia vedení prof. Jiřím Doškařom, využijúc ústretovosť riaditeľa Mendelovho muzea dr. Ondřeje Dostála a s finančnou podporou GSGM a MGP s.r.o., opäť zabezpečili pre približne štyri desiatky účastníkov ideálne miesto pre prezentácie a formálne i neformálne diskusie.

Program seminára [3] bol rozdelený do dvoch častí: dopoludnia pedagógovia prezentovali základné informácie o aktuálnych praktických kurzoch, popoludní sa doktorandi venovali otázke ako by mohli vyzerat' ideálne praktické kurzy. Jedným zo všeobecných záverov dopoludňajšej sekcie je pomerne veľká variabilita v dizajne, organizácii, hodnotení i náplni praktických kurzov. Dr. Pavel Lízal (Masarykova univerzita, Brno) na príklade základného kurzu Praktikum z obecné genetiky ilustroval, ako sa dá veľmi pekne a užitočne spojiť experimentálne cvičenie s riešením teoretických úloh. Jednoduché experimenty na drozofile a arábovke sú medzi študentmi veľmi obľúbené okrem iného aj preto, že im umožňujú "dotknúť sa" skutočného biologického materiálu. Ukázal tiež niekoľko príkladov elektronických nástrojov umožňujúcich písanie protokolov (s možnosťou zdieľania experimentálnych dát) a interaktívneho precvičovania základných genetických konceptov. Učiteľ tak v reálnom čase môže vyhodnotiť úspešnosť (či neúspešnosť) svojho snaženia. Z diskusie k prednáške, ale i z neformálnych rozhovorov počas prestávok bolo zrejmé, že mnohých účastníkov seminára mnohé nápady prezentované dr. Lízalom veľmi inšpirovali. Konceptiu praktickej výučby genetiky prezentovala dr. Dana Holá z Univerzity Karlovej v Prahe. Kurz Praktikum z genetiky vyučovaný v 1-týždenných turnusoch pozostáva z riešenia komplexných teoretických príkladov. Každý deň turnusu je venovaný samostatnej téme, ktorá je preberaná striedaním výkladu a precvičovania úloh vychádzajúcich z reálnych výsledkov. V kontraste s pražskou prezentáciou Dr. Dana Šafářová (Univerzita Palackého, Olomouc) ilustrovala, akým spôsobom je možné realizovať praktickú výučbu tak, aby každý študent všetky úlohy realizoval samostatne. Z jej prezentácie bolo pritom evidentné, že v mnohých prípadoch išlo o finančne i prístrojovo náročné úlohy, vyžadujúce si značné časové investície pedagógov. Na druhej strane, študentom poskytli možnosti vlastnými rukami uskutočniť často aj relatívne náročné experimentálne úlohy. Počas seminára boli viackrát diskutované výhody i nevýhody vyplývajúce z praktík založených na riešení teoretických úloh, resp. z

Informační listy GSGM, 2016, 47: 5–7

experimentálnych laboratórnych cvičení. Dr. Regina Sepšiová a dr. Katarína Bruňáková ilustrovali, akým spôsobom sa s touto dilemou vysporadúvajú na Univerzite Komenského v Bratislave a na Univerzite P.J. Šafárika v Košiciach. Bratislavskí genetici absolvujú základné cvičenia, ktoré sú kombináciou teoretických a praktických úloh, košickí študenti sú zapojení do “myšlienkových” experimentov. Spoločnou charakteristikou všetkých študijných plánov je postupné zvyšovanie zastúpenia experimentálnych úloh vo vyšších ročníkoch bakalárskeho, resp. v magisterskom štúdiu. Dr. Petr Beneš (Masarykova univerzita, Brno) predstavil početný repertoár praktických kurzov, ktoré umožňujú študentom získať zručnosti v molekulárno-biologických technikách. Dr. Tomáš Mašek (Univerzita Karlova, Praha) ilustroval na príklade niekoľkých kurzov spôsob praktickej výučby molekulárnej genetiky, z ktorých predovšetkým 2-týždenný intenzívny kurz Praktikum z molekulárnej genetiky poskytuje študentom možnosť vyskúšať si veľké množstvo laboratórnych techník. V tejto súvislosti boli diskutované kapacitné možnosti, ktoré absolvovanie niektorých kurzov do istej miery obmedzujú.

Veľmi inšpiratívnou bola aj popoludňajšia sekcia zameraná na identifikáciu rezerv v súčasných praktických kurzoch a predstavenie “ideálneho” cvičenia. V nej najprv košické doktorandky Jana Henzelyová a Miroslava Bálintová prezentovali svoju predstavu praktického magisterského kurzu Génové manipulácie rastlín, kde by každý študent realizoval ucelený projekt začínajúci bioinformatickou analýzou génu, cez jeho klonovanie v expresnom vektore až po purifikáciu proteínového produktu. V súvislosti so spôsobom prezentácie výsledkov (formou posteru) boli diskutované možnosti, ako viac zapojiť študentov do formulovania hypotéz a interpretácie a prezentácie dát. Jiří Pergner (Univerzita Karlova, Praha) zhodnotil praktickú výučbu genetiky a molekulárnej biológie z pozície doktoranda-seniora. Medzi jeho odporúčania (viac v prezentácii [3]) patrí zaradenie úlohy zameraných na precvičenie moderných metód genetickej analýzy u modelových organizmov (napr. myš – Cre/LoxP systém; *Drosophila melanogaster* – balancérové chromozómy), vedenie študentov k väčšej samostatnosti, či poskytnutie študentovi možnosť zvoliť si metódu, ktorú by precvičoval. Diskutovanou bola aj otázka, či a v akej forme je možné pripraviť laboratórne úlohy využívajúce tzv. state-of-the-art technológie, ako sú napríklad techniky editovania genómu založené na systéme CRISPR-Cas9, prípadne TALEN, či zinc-finger nukleázach. Markéta Weyhelová (Masarykova univerzita, Brno) predstavila aktuálnu podobu Cvičenia z cytogenetiky, v ktorom identifikovala pozítiva i rezervy, ktoré spočívajú hlavne v možnostiach využitia niektorých modernejších experimentálnych a bioinformatických metód. Doktorandi z Univerzity Komenského v Bratislave pripravili podklady pre prezentáciu Filipa Červenáka [3], pričom s cieľom identifikovať hlavné parametre pre dizajn ideálneho praktického kurzu zisťovali (1) aká je náplň/štruktúra kurzov na vybaných zahraničných univerzitách, (2) aké sú ich vlastné skúsenosti s praktickou výučbou a (3) aký názor na praktickú výučbu majú súčasní poslucháči magisterského programu Genetika na Univerzite Komenského. Z tejto prezentácie vyplynulo viacero dôležitých otázok, ktoré boli diskutované aj v záverečnej panelovej diskusii. Napríklad, (1) je vhodnejšia pravidelná týždenná, alebo bloková (turnusová) forma cvičení?; (2) je lepšie, keď každú úlohu realizuje každý študent sám, alebo sú výhodnejšie menšie (2-3 členné) skupiny?; (3) sú výhodnejšie samostatné úlohy umožňujúce precvičiť jednotlivé metódy, alebo je lepšie, keď je kurz postavený ako ucelený projekt?; (4) akou formou sa študent môže podieľať na voľbe precvičovaných metód. Z diskusie vyplynulo, že na mnohé z týchto otázok neexistujú

jednoznačné odpovede. Skôr platí univerzálne pravidlo: existuje veľa možností, ako pripraviť dobrý praktický kurz a to, ktorá je úspešná závisí do veľkej miery od pedagóga, ktorý daný kurz vedie. Čo je najpodstatnejšie, tak ako v roku 2015, aj tohtoročný seminár v Mendelovom múzeu splnil svoj hlavný cieľ: poskytnúť učiteľom inšpirácie a umožniť im vytvoriť osobné kontakty s ľuďmi, ktorí majú spoločnú ambíciu: poskytnúť budúcim genetikom to najlepšie možné vzdelanie.

[1] <https://en.wikipedia.org/wiki/Unconference>

[2] Zeiselová, L. (2015). Seminár o univerzitnom vzdelávaní genetiky plný inšpirácií. Informační listy GSGM 45: 10-12.

[3] <http://fns.uniba.sk/pracoviska/biologicka-sekcia/kge/univerzitne-vzdelavanie-genetiky/>; na stránke sú prístupné všetky prezentácie a ďalšie užitočné linky.



Ve stínu Mendela: Skupinová fotografia účastníkov seminára venovaného praktické výuce genetiky na českých a slovenských vysokých školách, ktorý proběhl v Brně, dne 26.5. 2016.



Prof. RNDr. Ľubomír Tomáška, CSc. je vedúcim Katedry genetiky Přírodovědecké fakulty UK v Bratislavě (e-mail: tomaska@fns.uniba.sk). Zabýva sa mitochondriálnou genetikou, biológiou telomer, bioenergetikou a morfogenezou kvasiniek.

Mendel Forum 2016

Eva Matalová

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

Letošní ročník již tradiční konference Mendel Forum se konal od 14. do 17. června 2016 v Brně v prostorách návštěvnického centra Mendelianum Moravského zemského muzea v Biskupském dvoře. Hlavními tématy byly Mendel jako osamělý génius, Jednobuněčný život a Jak chutná genetika. Program byl doplněn o názorovou platformu mladých: Mendel podle mě.

První den představil čerstvý překlad prvního dílu anglicky psané knihy profesora Jana Kleina a jeho syna Normana: G. J. Mendel - Osamělost skromného génia. Jedná se o velmi rozsáhlé a jedinečné dílo. Kniha je věnována Mendelianu, které se rádo zhostilo možnosti její prezentace v českém jazyce.

Další den konference otevřela přednáška dr. Lenky Zdražilové Dubské, která se s účastníky podělila o nový objev v oblasti mikrobiologie, spjatý se jménem J. G. Mendela. Prezentace nazvaná „Jak objevit novou bakterii“ přiblížila výzkumnou práci, která vyšla vloni v časopise Ticks and Tick-borne Diseases. Autoři nazvali nový objev 'Candidatus Rickettsia mendelii', protože výskyt bakterie byl zaznamenán v místech, kde působil také Mendel. Dopoledne následovala ještě přednáška dr. Moniky Dvořákové Heroldové z Fakultní nemocnice u svaté Anny, která umožnila účastníkům nahlédnout do tajů mikrobiologické laboratoře. Teoretický úvod pod názvem „Bakterie na miskách a lékařská diagnostika“ byl poté doplněn praktickými úkoly v laboratoři. Účastníci se seznámili s kultivačními postupy, sami si vyzkoušeli křížový roztěr a také rozpoznání bakterií na miskách. Součástí praxe byly nejenom mikroorganismy běžné v lidském organismu, ale také třeba v batoru přežvýkavců. Získané znalosti si poté mohli zájemci ověřit v soutěžním kvízu. Zbytek odpoledne byl otevřen i pro neregistrované zájemce z řad široké veřejnosti.

Třetí den konference byl zasvěcen světu smyslů, především fyziologickým a genetickým aspektům vnímání chuti. Po vysvětlení teoretických základů a představení několika zajímavostí byli účastníci pozváni k praktické části do laboratoře. Tam si zkusili, jak je chuť propojena s čichem, k čemu potřebují sliny, jak jsou jejich chuťové receptory citlivé a také si mohli otestovat, zda patří mezi „chutnače“ či „nechutnače“. Prohlédnout si mohli jak makroskopickou, tak mikroskopickou stavbu jazyka u různých živočišných druhů. Den pod hlavičkou „Jak chutná genetika“ byl doplněn představením receptů, které shromáždila Luisa Ondráčková. Ta pracovala jako kuchařka ve starobrněnském klášteře, kde působil také Mendel. Na přestávku bylo připraveno občerstvení podle receptů z Mendelovy kuchařky, které se setkalo s velmi pozitivním ohlasem. Zájemci si také mohli prohlédnout doplňkovou výstavu, která představila nejenom tuto kuchařskou knihu, ale také chuť jako smyslový orgán. Součástí prezentace byl i příspěvek dr. Pavla

Lízala z Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, který se dlouhodobě věnuje výzkumu dědičnosti chuti. Výstava doplňuje stálé expozice Mendeliana MZM v Biskupském dvoře do konce června.

Letošní konference byla zakončena aktivní prezentací juniorů (Junior Mendel Forum), kterého se účastnili zástupci mladé generace, kteří představili své příspěvky na téma „Mendel podle mě“. V rozsahu 500 znaků měli účastníci za úkol představit J. G. Mendela, jak ho sami vnímají. Deset vybraných příspěvků bylo zveřejněno na webových stránkách, vítězové obdrželi knižní ceny. Více informací ke konferenci a sborník jsou k dispozici na stránkách www.mendelianum.cz.

Poděkování za spolupráci
Centrum Mendelianum



Organizace Mendel Forum
Centrum Mendelianum
Prof. Eva Matalová, Dr. Anna Matalová
matalova@iach.cz



Mendel Forum 2016



14. – 17. června
2016, Brno

Mendelianum MZM,
Muzejní 1, Brno - střed

Konference Mendel Forum pořádá Mendelianum od roku 1992. Mendel Forum 2016 je připraveno především formou interaktivních seminářů, na které navazuje praktická činnost v laboratořích.

Mendel Forum vytváří komunikační platformu pro sdílení poznatků v mendelovském bádání a propagaci vědy a výzkumu v oblasti genetiky a souvisejících oborů.

Účast je bezplatná,
registrace je nutná
z důvodu kapacitních limitů.

Registrace:
MendelForum@post.cz

Další informace:
www.mendelianum.cz
tel. 515910411
www.mzm.cz

14. června 2016

Mendel Team

14 h: Přípravované novinky Mendeliana pro školy a veřejnost, interní diskuse odborníků (uzavřené jednání).

Mendel - Osamělost skromného génia

16 h: Představení překladu knihy prof. Kleina, který připravilo Moravské zemské muzeum.

15. června 2016 Jednobuněčný život

10 - 10:30: Rickettsia mendelii - jak objevit novou bakterii (Dr. Lenka Zdražilová Dubská)

10:30 - 11: Bakterie na miskách a lékařská diagnostika (Dr. Monika Dvořáková Heroldová)

11 - 12: Mikrofarmy - mikroskopický pohled na jednobuněčné organismy (praktická část)

12 - 13: polední přestávka

Od 13 h: Jednobuněčný život v nás a kolem nás (Odpoledne s JGM)

16. června 2016 Jak chuťná genetika

10 - 10:45: Jak funguje chuť - fyziologie a genetika (Prof. Eva Matalová)

10:45 - 11: Recepty Mendelovy kuchařky (Dr. Lucie Tuzová)

11 - 12: Ochutnejte genetiku (praktická část)

12 - 13: polední přestávka

Od 13 h: výstava z cyklu Genetika všemi smysly na téma Jak chuťná genetika a doprovodný program

17. června 2016
Junior Mendel Forum

Názorová platforma pro žáky a studenty na téma

Mendel podle mě

Zašlete (do 31. 5. 2016, MendelForum@post.cz) vaše krátké sdělení, jak byste stručně a co nejzajímavěji představili Mendela svým přátelům, kteří ho ještě neznají (max. 500 znaků).

Vybrané příspěvky budou během konání Mendel Forum zveřejněny na webových stránkách Mendeliana (pod kódy) a zpřístupněny veřejnému hlasování. Vítězové budou odměněni formou knižních a dalších cen.



Obr. 1: Mendel Forum 2016 - program



Obr. 2: Mendel Forum 2016 – přednášky v Historickém sále a praktická činnost v laboratořích Mendeliana Moravského zemského muzea.

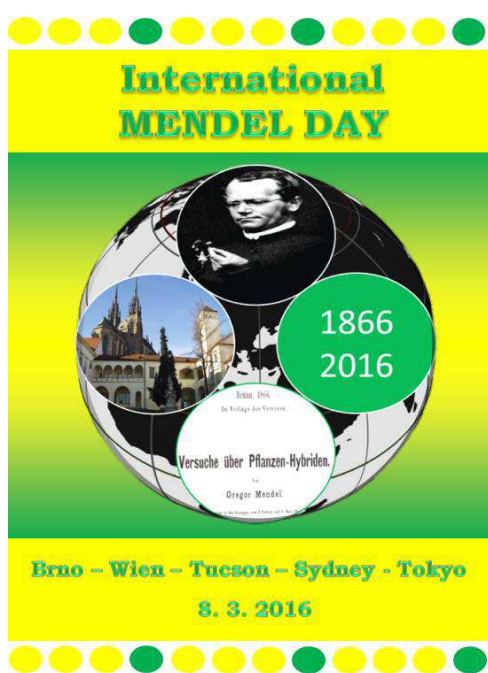


Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. (e-mail: matalova@iach.cz) je vědeckou pracovnící Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., profesorkou na Fakultě veterinárního lékařství VFU Brno a dlouholetou spolupracovnicí Mendeliana MZM Brno, kde je také odbornou garantkou projektů Mendelianum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

Mezinárodní Mendelův den

Anna Matalová

Centrum Mendelianum, Muzejní 1, 602 00 Brno



První ročník mezinárodního Mendelova dne se konal u příležitosti připomenutí 150 let Mendelově vědce v mezinárodním kontextu. 8. března 1865 proslovil Mendel v Brně závěrečnou část své přednášky Pokusy s hybridy rostlin (Versuche über Pflanzen-Hybriden), kde prezentoval unikátní data a jedinečné závěry vycházející z jeho experimentů s hybridy hrachu a dalších luštěnin. Následující rok byla Mendelova práce zveřejněna tiskem v časopise brněnského Přírodovědeckého spolku. Velkou zásluhu na publikaci Mendelovy práce má Gustav von Niessl, jeden ze členů Mendelova brněnského vědeckého kolegia. Gustav von Niessl předložil Mendelovu práci k posouzení členům výboru Přírodovědeckého spolku a 10. 2. 1866 byla práce přijata k tisku ve spolkovém časopise Verhandlungen des naturforschenden Vereines. Mendelův článek

je součástí 4. svazku časopisu, ve kterém byl rozeslán na více než stovku adres v Evropě i zámoří. Bez tištěné verze Mendelovy vědecké práce by zřejmě nikdy nebyla „znovuobjevena“ v roce 1900, kdy byly Mendelovy myšlenky a dedukce 16 let po jeho smrti vědeckým světem přijaty.

Po 150 letech, jež letos uplynuly od zveřejnění Mendelovy práce tiskem, zorganizovalo Mendelianum MZM Brno ve spolupráci s dalšími institucemi mezinárodní Mendelův den. Akce má podporu z celého světa a nabízí komunikaci v oblasti popularizace, propagace a rozvoje Mendelova vědeckého a kulturního odkazu, kterému se Mendelianum věnuje už přes půl století. Myšlenka na založení tradice Mendelova dne vykrystalizovala na mezinárodní konferenci Mendel Forum 2015, která se konala v nových prostorách Mendeliana ve dnech 6. – 8. 3. 2015 u příležitosti 150. výročí Mendelovy přednášky v Brně. Březnový termín Mendelova dne vhodně doplňuje únorový Darwinův den a dubnový Den DNA a symbolicky propojuje tradiční a moderní

Informační listy GSGM, 2016, 47: 11–18

vědu. Mendelianum oslovilo řadu odborníků s návrhem Mendelova dne, který se setkal s velmi pozitivním ohlasem, a získalo klíčové zahraniční partnery této akce pro první ročník. Mendel Day 2016 se konal pod záštitou UNESCO, epicentry této události v roce 2016 bylo Brno jako domovské město, Vídeň jako zástupce Evropy a navíc města, kde Mendel studoval, přednášel a často pobýval a kam byla také jeho práce v roce 1866 poslána. Spojené státy americké, kam byl časopis s Mendelovým příspěvkem také doručen, representoval Tucson. Za Austrálii se organizace Mendelova dne v roce 2016 zhostilo Sydney, ke kterému se přidala také Canberra. Za Asii podpořila Mendelův den Mendel Japan Society, která k připomenutí letošního výročí připravila výstavu, k níž přispělo i Mendelianum. Mendel Day pod hlavičkou „Connecting people through Mendel“ byl otevřen pro každého a na kulturní úrovni propojil také řadu dalších měst, která byla v adresáři brněnského Přírodovědeckého spolku. Časopis brněnského Přírodovědeckého spolku byl adresován do těchto (dnešních) zemí: Belgie, ČR, Finsko, Francie, Chorvatsko, Irsko, Itálie, Litva, Maďarsko, Německo, Nizozemí, Polsko, Rakousko, Rumunsko, Rusko, Slovensko, Spojené státy americké, Švédsko, Švýcarsko, Ukrajina, Velká Británie. Na Mendel Day pak navazovala řada dalších akcí, za zmínku stojí především konference v „Mendelově“ jazyce jako Gemeinsames Symposium 150 Jahre Mendelsche Regeln vom Erbsenzählen zum Gen-Editieren (17. – 18. 3. 2016, Vídeň) nebo J. G. Mendel-Tag (15. 6. 2016, Oldenburg).

Mendelianum děkuje za spolupráci všem, kdo se Mendelova dne zúčastnili, ale zejména našim ambasadurům, kterými jsou: prof. Johann Vollmann (Vídeň), dr. Christina Laukaitis (Tucson), prof. Frank Nicholas (Sydney), prof. Toshiuki Nagata (Tokyo), prof. Wilfried Wackernagel (Oldenburg). Nabízíme náhled do programu mezinárodního Mendelova dne 2016 a krátkou fotoreportáž.

MENDEL DAY 2016, Brno

Mendelianum (Prof. Eva Matalová, Dr. Anna Matalová)

9 - 12 h: Mendel - co víme o něm a díky němu (Prof. Tomáš Urban, Prof. Eva Matalová)

Seznámení s osobností Mendela, jeho experimenty, vědeckým přístupem a závěry, které se staly základem genetiky doplněné vzdělávacími kvízy a soutěžemi.

12 - 14 h: Hrátky s hrášky (Prof. Eva Matalová)

Premiéra nové interaktivní části expozice Mendeliana, kterou provází Mendelův zelený hrášek a nabízí seznámení nejenom s Mendelem a jeho objevy, ale také dnešní vědou včetně virtuálních i reálných vstupů do laboratoří, prezentace výtvarných prací studentů na téma Mendelův hrášek.

14 - 17 h: Setkání u Mendela

Odpoledne vyhrazené pro zástupce odborníků, učitelů, studentů, VIP a veřejnost

(14 h - Co nového u Mendela/Mendel Team meeting, 15 h - Přípitek u Mendela/VIP meeting,

16 h - Mendel a svět, 1866 - Velká věda s malými hrášky, vernisáž výstavy, Prof. Eva Matalová, Dr. Anna Matalová)

MENDEL DAY 2016, Vídeň, Rakousko

BOKU (Prof. Johann Vollmann)

14-18 h: Guided tour through Mendel's Vienna starting at the Department of Botany and Biodiversity Res.

14 h: Dr. Eva-Maria Mikschi-Marischler and Mag. Matthias Svojtka: Original reprint of Gregor Mendel's 1866 paper "Versuche über Pflanzen-Hybriden". This unique original reprint is preserved at the library of Department of Botany and Biodiversity Research. It is one of very few reprints with handwritten corrections in Mendel's own handwriting of printing errors.

15 h: Mendel's teachers and contemporaries at University of Vienna. In Vienna, Mendel was exposed to leading natural science professors and a vibrant scientific community including Christian Doppler (professor of physics) or Franz Unger (professor of physiology).

16 h: City walk. Walk to Old University of Vienna (now Austrian Academy of Sciences) and Landstrasse (Mendel's living place in Vienna), coffee and newspapers: A collection of Austrian newspaper reports about JGM from 1850 to 1884. This special biographical value will be presented, commented and discussed in Folia Mendeliana 2016.

MENDEL DAY 2016, Tucson, Arizona, USA

University of Arizona

Mendel Afternoons (Dr. Christina Laukaitis, Prof. Robert Karn)

16 h: Neurogenetics Data Blitz (Neuroscience Graduate Interdisciplinary Program)

17 h: Reception and discussion (Dr. Christina Laukaitis)

17:30 h: Mendel Day concept (Prof. Robert Karn)

Opening Remarks by Prof. Francisco Ayala

18 h: "Might of Destiny: Gregor Mendel's Powerful Yet Controversial Legacy" (Prof. Daniel Fairbanks)

Followed by the presentation on March 9

15 – 16 h: The scientific method: Darwin and Mendel (Prof. Francisco Ayala)

MENDEL DAY 2016, Sydney, Austrálie

University of Sydney

Mendel Sesquicentenary Celebrations (Prof. Frank Nicholas)

18 h: A brief history of Mendel's discovery (Prof. Frank Nicholas)

18:30: Mendel and animal genetics today (Prof. Claire Wade)

19: Mendel and honey bee genetics today (Prof. Ben Oldroyd)

19:30: Mendel and human genetics today (A/Prof. Jenny Donald)

20 h – onwards: discussion, celebration

With simultaneous programme in Canberra – key lectures:

Mendel's legacy: Forensic DNA profiling (Dr Dennis McNevin)

Epigenetics: Defying Mendelian genetics (Dr Janine Deakin)

MENDEL DAY 2016, Tokyo, Japonsko

The Japan Mendel Society, University of Tokyo (Prof. Toshiuki Nagata)

Exhibition: The Japan Mendel Society (JMS) is a non-profit organization founded on October 22, 1985 under the jurisdiction of the Nagano Prefectural Board of Education. JMS headquarters is located in Shimo-suwa-machi in Suwa-Gun, Nagano Prefecture, but the Tokyo Branch is in Bunkyo-ku, Tokyo. Mendel Day introduced an exhibition on J. G. Mendel and the 150th anniversary of his discovery publication held in Shimo-suwa-machi.

Mendel's grapevine, Brno and Tokyo connection: Mendel's Brno is connected with Tokyo not only thanks to contact with Mendelianum but also by the story of "Mendel's wine". More than a hundred years ago, a grapevine from the former "Mendel's garden" in Old Brno was relocated to Tokyo (Botanical Gardens of the University of Tokyo), the original plants were destroyed in Brno after the WWII and thus the Japan Society sent a graft back to Brno where the plant has still been grown.

Mendelův den v Brně se konal v Mendelianu, které sídlí v autentických prostorech, kde sídlila Mendelova vědecká společnost a kde Mendel získal inspiraci pro svůj výzkum.



Mendelův den zahájil prof. Tomáš Urban z Mendelovy univerzity v Brně, partnerské univerzity Mendelianu, a to prezentací na téma: Mendel – co víme o něm a díky němu.



Diskusní přestávka přešla v praktické ukázky v Mendelově i moderní molekulární laboratoři a také v soutěžní úkoly v několika oblastech, např. Osobnost JGM, Mendelovy rostliny, Pojmy z genetiky, Práce s DNA a další.



Vítězové byli samozřejmě odměněni.



Následovala část Mendelova dne pod názvem „Hrátky s hrášky“ určená zejména pro středoškoláky, zaměřená na nové interaktivní programy.



Hlavním hostem Mendelova dne v Brně byl profesor Jiří Drahoš, předseda Akademie věd ČR.



Mendelův den v Brně byl zakončen vernisáží výstavy Mendel a svět, která obsahovala také aktuální pozdravy zástupců „Mendelových měst“ a významných osobností.



A jak probíhal Mendel Day u našich klíčových zahraničních partnerů? Procházka Mendelovou Vídni vedla také do univerzitní knihovny s Mendelovými publikacemi.



Osobní seznámení se separátem Mendelovy práce a časopisem, ve kterém vyšla.



V USA se konal Mendelův den v Tucsonu v Arizoně.

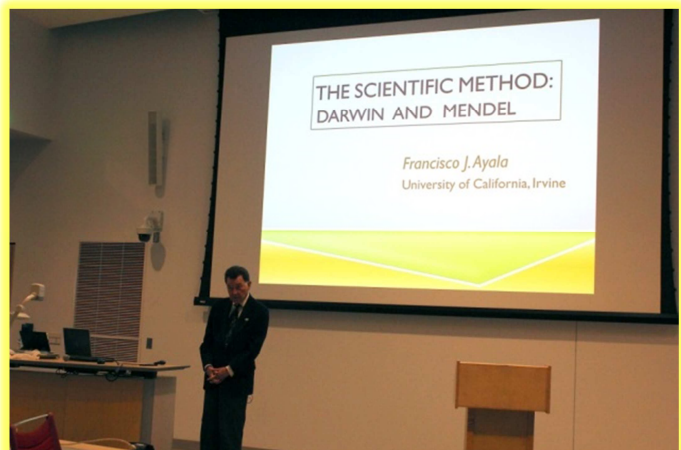
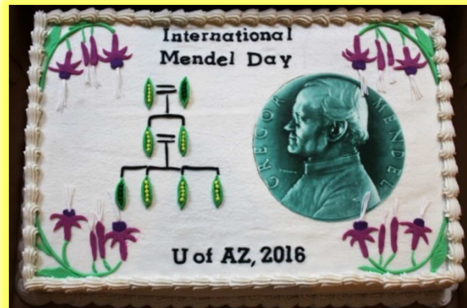


Na začátku programu Mendelova dne bylo pět krátkých přednášek významných odborníků, které se setkaly s velkým zájmem posluchačů.



Profesor Daniel Fairbanks nejenom přednášel o kontroverzi kolem Mendelovy práce, ale také Mendela v přímém přenosu vymodeloval.

Nsledovala diskusní přestávka, při které byl podáván punč a speciální dort pro Mendelův den!



Přednáška profesora F. Ayaly informovala o perspektivách v souvislosti s vědeckým prostředím, ve kterém Mendel pracoval, vznikem vědy založené na hypotézách, a jejího vlivu na Mendela a Darwina.



Děkujeme všem, kdo přispěli k úspěchu Mendelova dne 2016 a už se těšíme na další ročník. V roce 2017 slaví Moravské zemské muzeum 200 let své existence. V roce 1817 založila toto muzeum v Biskupském dvoře pod Petrovem Hospodářská společnost, která byla také Mendelovou vědeckou společností.



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.

Ocenění Mendeliana v soutěži Muzeum roku

Marcela Kusáková

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



V loňském roce byl otevřen první ročník nové soutěže pod názvem Muzeum roku, která byla založena jako součást mediální kampaně Národní soutěže muzeí Gloria musaealis. Soutěž probíhala od 14. května 2015 na portále domuzea.cz, vítězové byli zveřejněni v rámci slavnostního ceremoniálu Gloria musaealis, který se konal 18. května 2016 ve Smetanově síni Obecního domu v Praze.

Specifikem soutěže Muzeum roku je, že se zaměřuje na názory návštěvníků. Podle oficiálního sdělení vyhlášovatelů (<http://www.cz-museums.cz>) mohli uživatelé kvalitu navštívené instituce hodnotit po jednoduché registraci pomocí bodů ve čtyřech různých kategoriích: 1. Expozice a výstavy, 2. Lidé v muzeu, 3. Služby návštěvníkům, 4. Doprovodné programy. Všechny čtyři kategorie pak spoluvytvářely celkový dojem návštěvníků z muzea. Cílem kampaně bylo zvýraznění role návštěvníka v celém procesu fungování muzeí.

Mendelianum Moravského zemského muzea se umístilo na stříbrné pozici za zlatým Památníkem Karla Čapka ve Staré Huti u Dobříše a před bronzovým Památníkem Velké Moravy ve Starém Městě. Budování návštěvnického centra Mendelianum – Atraktivní svět genetiky bylo zahájeno v roce 2012, kdy uplynulo 50 let od založení Genetického oddělení G. Mendela v tehdejší Moravském, dnes Moravském zemském muzeu. Návštěvnické centrum je součástí Centra Mendelianum, které bylo slavnostně inaugurováno při mezinárodním setkání Mendel Forum dne 8. 3. 2015, V tento den uplynulo 150 let od prezentace závěrečné části Mendelovy přednášky v Brně, ve které referoval o svých epochálních objevech. V roce 2015 uplynulo také 50 let od otevření první expozice Mendeliana - památníku a muzea J. G. Mendela v Brně vytvořené Genetickým oddělením G. Mendela. Dnešní Mendelianum, lokalizované v centru Brna v prostorech, kde sídlila Mendelova vědecká společnost, prezentuje nejenom mnohostrannou osobnost J. G. Mendela a jeho dílo, ale také genetiku, molekulární biologii a související vědní obory. Díky padesátileté tradici mendelovského bádání, která vyústila v novou koncepci pro 3. tisíciletí, propojení historického a moderního konceptu a také zařazením řady interaktivních prvků včetně laboratoří patří mezi muzea nové generace.

Hlasy návštěvníků a stříbrná medaile v soutěži Muzeum roku jsou nejen oceněním práce týmu Mendeliana, jejich spolupracovníků z ČR i zahraničí, ale také oceněním osobnosti J. G. Mendela a jeho vědecké práce, kterou celosvětově proslavil naši zemi a která dala vznik novému vědnímu oboru – genetice.

CENA
MUZEUM ROKU
2015



Ministerstvo kultury České republiky, Asociace muzeí a galerií České republiky, z. s.,
a Český výbor ICOM udělují

II. místo

v soutěži Muzeum roku

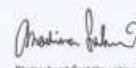
Moravskému zemskému muzeu – Mendelianu
za nejlepší hodnocení na návštěvnickém portálu do-muzea.cz



Minister kultury České republiky



Předseda Asociace muzeí a galerií České republiky, z. s.



Předseda Českého výboru ICOM



Mgr. Marcela Kusáková (e-mail: 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.

Zvýšení afinity receptoru 1 pro interferon gama k interferonu gama kombinací molekulárního modelování a experimentálních metod

Pavel Mikulecký

Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč

Abstrakt

Téměř ve všech dějích živých buněk hraje interakce mezi proteiny důležitou roli a funkce mnohých proteinů je závislá na jejich specifické interakci s ostatními biomolekulami. Pro vývoj molekul vhodných pro diagnostiku, medicínu a biotechnologie by bylo velmi přínosné, kdybychom měli k dispozici nástroje k ovlivňování interakcí mezi proteiny. Tato práce se zabývala specificitou interakcí mezi proteiny na modelovém příkladu receptoru 1 pro interferon gama (IFNgR1) a jeho přirozeném vazebném ligandu interferonu gama (IFNg), jehož funkce je důležitá pro přirozenou imunitu.

Při hledání mutací proteinu IFNgR1, které by měly měnit jeho vazbu (zvýšit nebo snížit) k IFNg, byla použita počítačová analýza dostupných krystalových struktur komplexu mezi IFNgR1 a IFNg *in silico*. Záměny aminokyselin byly počítačově modelovány a jejich vliv na interakci byl vyhodnocen programem FoldX. Všechny varianty receptoru 1, které vyhovovaly kritériím výběru, byly produkovány v bakterii *Escherichia coli*, dále purifikovány, charakterizovány a jejich interakce byla změřena na přístroji SPR, jenž měří povrchovou rezonanci plazmonů (Surface Plasmon Resonance).

První skupina variant IFNgR1 obsahovala mutace na interakčním rozhraní s IFNg. Z SPR měření vyplývá, že většina těchto variant vykazovala stejnou vazbu k IFNg jako nezměněný „wild-type“ receptor, několik variant mělo vazbu lehce zvýšenou, nicméně další varianty měly vazbu silnější. Druhá skupina variant obsahovala mutace, které se nacházely buď přímo, nebo v blízkém okolí kavit uvnitř molekuly IFNgR1. Tento přístup je méně obvyklý. Ačkoliv výsledky ukazovaly, že tyto mutace samy o sobě ovlivňují vazbu mezi receptorem a IFNg velmi málo, dvě varianty kombinující mutaci na rozhraní s mutací v kavitě měly výrazně zvýšenou vazbu.

Naše výsledky ukázaly, že lze získat varianty IFNgR1 s vyšší vazbou k IFNg pomocí kombinace experimentálních přístupů spolu s počítačovými návrhy, které využívají poměrně jednoduché a přístupné protokoly. Vývoj nových molekul s vysokou afinitou pomáhá k lepšímu pochopení sil, které se uplatňují při interakcích mezi proteiny. Tyto nově vyvinuté mutanty přirozených proteinů by se rovněž mohly stát základem pro nové diagnostické nástroje.

Úvod

Proteiny s uměle pozměněnými vazebnými vlastnostmi k jiným molekulám se staly důležitým nástrojem ve výzkumu, biotechnologii a biomedicíně. Při návrhu proteinů

s požadovanými změnami jsou stále častěji využívány počítačové metody a algoritmy (Karanicolas *et Kuhlman*, 2009; Kortemme *et Baker*, 2004; Kraemer-Pecore *et al.*, 2001; Mandell *et Kortemme*, 2009; Reichmann *et al.*, 2007), ačkoliv tyto metody stále ještě čelí problémům, které jsou spojené s přesností a důvěryhodností počítačových předpovědí. Tyto nepřesnosti vycházejí především ze stále ještě nedostatečného pochopení složitých strukturních a energetických složek, které se uplatňují při interakcích mezi proteiny. Tato práce představuje výsledky studií, které experimentálně potvrzují návrhy modifikací provedené pokročilými, avšak snadno dostupnými, výpočetními technikami, které jsou založené na práci s krystalovými strukturami. Jako modelový systém byla vybrána interakce mezi interferonem gama (IFNg) a jeho přirozeným receptorem 1 (IFNgR1). Hlavním cílem bylo na základě výpočtů metodami molekulárního modelování zvýšit sílu (afinitu) vazby IFNgR1 k IFNg. Výsledky pomohou lepšímu pochopení principů, které se uplatňují při specifickém rozpoznávání a vazbě mezi důležitými proteiny z lékařského pohledu.

Interferon gama je cytokin, jenž hraje roli při vrozené i získané imunitě, a dále udržuje imunitní rovnováhu v těle (Lin and Young, 2013). Signalizace IFNg začíná jeho vazbou na receptor 1 (IFNgR1) a receptor 2 (IFNgR2), které se nacházejí na buněčném povrchu. Vytvoření tohoto tzv. ternárního komplexu následně spouští signalizační dráhu nazývanou JAK/STAT, jež postupně vede k výsledné imunitní reakci. Například při diagnostice tuberkulózy se často využívá právě detekce interferonu gama, která je základem komerčních souprav s názvem QuantiFERON-TB Gold nebo T-SPOT.TB. Novější techniky pro detekci cytokinů, včetně IFNg, zahrnují biosenzory (Battaglia *et al.*, 2005; Chou *et al.*, 2010; Stigter *et al.*, 2005; Stybayeva *et al.*, 2010), které využívají různé typy rozpoznávacích molekul, jakými mohou být například pozměněný ligandy nebo nově vyvinuté molekuly, zejména protilátky či jejich části.

Cílem této práce bylo vytvořit proteinové molekuly s vysokou mírou vazby k interferonu gama, jejichž základem bude receptor 1 pro IFNg. Projekt začínal návrhem variant receptoru 1 se zvýšenou afinitou pomocí výpočetní techniky založené na analýze krystalových struktur a následném molekulárním modelování. Počítačově navrhované varianty IFNgR1 byly pak produkovány jako rekombinantní proteiny, purifikovány a jejich vlastnosti zjišťovány biofyzikálními metodami.

Změna vazebných vlastností IFNgR1 vůči IFNg byla založena na dvou komplementárních výpočetních přístupech. Při první strategii byly hledány aminokyseliny vhodné k mutování na interakčním rozhraní mezi receptorem a IFNg. Při druhé strategii byly vhodné aminokyselinové záměny hledány v tzv. kavity uvnitř molekuly receptoru a následně aminokyseliny, jež byly v blízkém sepetí s těmito kavitami. Výpočetní analýza odhalila několik aminokyselin vhodných k mutování a jejich afinity k IFNg byly změřeny metodou SPR, která měří povrchovou rezonanci plazmonů. Vypočítané a změřené afinity byly mezi sebou porovnány a celkový proces návrhu a testování receptorových variant byl shrnut do protokolu popisujícího výpočetní postupy, které vedou k předpovězení mutací zvyšující rozpoznání mezi IFNg a jeho receptorem 1.

Cíle práce

A) Počítačové modelování aminokyselinových záměn vedoucích ke zvýšení afinity IFNgR1 k IFNg

Tato část práce zahrnovala analýzu krystalových struktur komplexu mezi IFNg a IFNgR1, identifikaci kavit uvnitř IFNgR1, výpočetní návrh receptorových variant a analýzu sekvenční konzervovanosti aminokyselin receptoru. Snahou bylo vytvořit protokol, kterým by bylo možné navrhnout mutace, jenž ovlivňují afinitu mezi IFNgR1 a jeho ligandem IFNg.

B) Experimentální potvrzení navržených mutací

Tato část práce se zabývala hledáním podmínek pro produkci a purifikaci IFNg, IFNgR1 a jeho variant. Dále byly charakterizovány sekundární struktury a teplotní stability navržených receptorových variant, naměřeny afinity všech produkovaných variant a analyzovány jejich vazebné vlastnosti k IFNg.

C) Porovnání vypočítaných a naměřených afinit

Tato část práce se skládala z analýzy vnitřní dynamiky receptorových variant a diskuze vypočtených a naměřených afinit.

Materiál a metodika

Detailní výčet použitého materiálu, chemikálií a přístrojů se nachází v plné verzi dizertační práce. Nejdůležitější metody:

Výpočetní část

- Modelování chybějících aminokyselin v krystalových strukturách.
- Analýza interakčního rozhraní mezi proteiny v krystalových strukturách a návrh příslušných variant.
- Identifikace vnitřních kavit a návrh příslušných variant.
- Výpočet hodnot změny volné energie ($\Delta\Delta G$) pomocí programu FoldX.
- Analýza sekvenční konzervovanosti aminokyselin.

Experimentální část

- Práce s DNA, např. polymerázová řetězová reakce (PCR), vytvoření vektorů a místně-specifická mutagenese.
- Práce s buňkami, např. příprava a transformace/transfekce různých typů buněk a kultivace buněk.
- Purifikace proteinů, např. na NiNTA nebo SP kolonkách, „refolding“, gelová chromatografie.
- Měření teplotních stabilit pomocí metody nazývané „Thermal Shift Assay“ a spekter cirkulárního dichroismu.
- Zjištění afinit na přístroji, který měří povrchovou rezonanci plazmonů (SPR).

Výsledky a diskuze

Za účelem předpovídání mutací, které ovlivní interakci mezi proteiny požadovaným způsobem, byly využity výpočetní metody a tyto mutace byly následně charakterizovány biofyzikálními technikami. Výpočetní metody jsou poměrně rychlé a málo nákladné, čímž se stávají velmi zajímavou strategií při zkoumání mutací ovlivňujících vazbu mezi proteiny. V této práci byla vyvinuta nová výpočetní strategie hledání mutací v extracelulární části receptoru 1 pro interferon gama (IFNgR1), které mají za cíl zvýšit jeho vazbu k interferonu gama (IFNg). Afinita (síla vazby) navržených receptorových variant byla zjištěna metodou, která měří povrchovou rezonanci plazmonů (SPR), a dále byly popsány jejich vazebné vlastnosti.

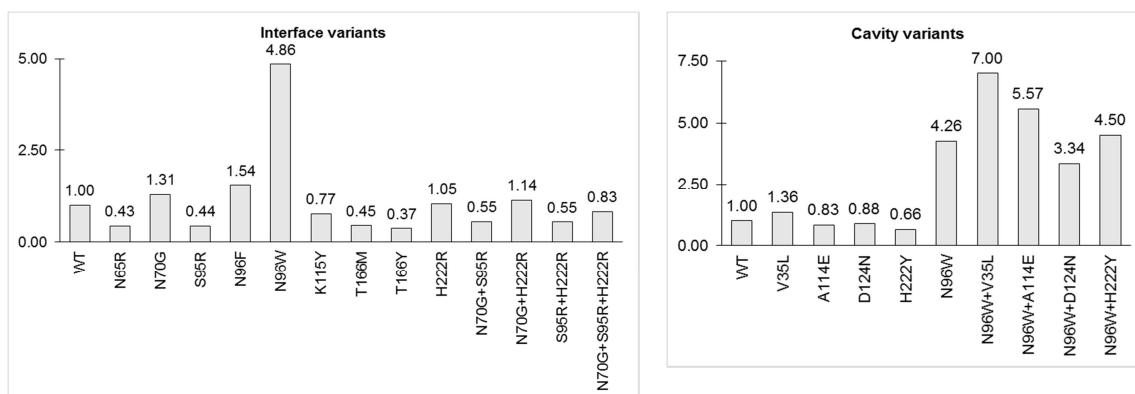
Výchozím bodem bylo hledání mutovatelných aminokyselin na rozhraní mezi proteiny IFNg a IFNgR1, jenž spolu tvoří komplex. Analýza byla založena na dvou krystalových strukturách komplexu mezi IFNg a IFNgR1, konkrétně se jedná o struktury v PDB databázi označené 1FG9 (Thiel *et al.*, 2000) a 1FYH (Randal *et al.*, 2001). Pro další postup byly hledány pouze ty aminokyseliny na receptoru, které byly vzdáleny maximálně 6 Å od IFNg, a to proto, aby nebyly vynechány žádné možné kontakty mezi těmito dvěma proteiny. Tímto výpočtem byl získán soubor 40 aminokyselin vhodných pro mutaci a každá aminokyselina byla zaměněna za zbylých 19. Následně byla programem FoldX (Schymkowitz *et al.*, 2005) dopočítána změna volné energie ($\Delta\Delta G$) pro každou záměnu a bylo zjištěno, že změny jsou poměrně malé. To znamená, že předpovězené jedno-aminokyselinové záměny nemusí mít ve skutečnosti výrazný vliv na afinitu. Vysvětlením tohoto výsledku by mohlo být, že afinita rozpustného receptoru k IFNg je v již nanomolárním rozmezí (Landar *et al.*, 2000; Marsters *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 1995) a další zvýšení afinity je proto obtížný úkol.

Záměny aminokyselin, které se nacházejí na rozhraní mezi proteiny a jsou tak v přímém kontaktu, se jeví jako přirozená strategie, nicméně tato práce se dále zabývala i alternativním přístupem. Tato alternativní strategie se zaměřila na kavity uvnitř jednoho z vazebných partnerů a záměny v těchto oblastech, které by mohly vést ke zvýšení vazby (Atwell *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 2010; Morellato-Castillo *et al.*, 2013). Kavity byly hledány v molekule IFNgR1 a aminokyseliny, které se nacházejí v blízkém okolí těchto kavit, byly dále analyzovány programem FoldX. Podobně jako v předchozím případě u mutací na rozhraní mezi proteiny, byla vypočítána změna volné energie ($\Delta\Delta G$) vazby způsobené záměnou aminokyselin. Výpočty vedly k výběru 12 konkrétních aminokyselinových záměn, které byly dále analyzovány metodou nazývanou „molecular dynamics relaxation“. Výsledkem byly 4 varianty, s kterými bylo dále experimentálně pracováno. Výpočetní výsledky opět ukazovaly pouze malý potenciál mutací, přičemž možnou příčinou mohou být malé objemy kavit a také skutečnost, že aminokyseliny poblíž kavit mají vysokou sekvenční konzervovanost.

Celkově bylo navrženo několik (devět) jedno-aminokyselinových záměn na rozhraní mezi proteiny, dále osm vícečetných mutací, kam se řadí také kombinace nejlepší jednobodové mutace N96W na rozhraní s mutacemi v kavitách. Všechny receptorové varianty byly produkovány v bakterii *Escherichia coli* podle protokolu, který byl vyvinut pro nezměněný „wild-type“ receptor po vyzkoušení několika expresních systémů a různých kombinací jeho produkce a purifikace. Každý pokus narážel na stále stejný problém, přítomnost rozpustné oligomerní formy receptoru a absenci nebo extrémně malé koncentrace monomerní formy. Po otestování velkého množství různých

refoldovacích strategií jsme se rozhodli používat protokol, jenž byl relativně málo pracný a který poskytoval množství proteinu dostatečné pro charakterizace a měření vazby SPR metodou.

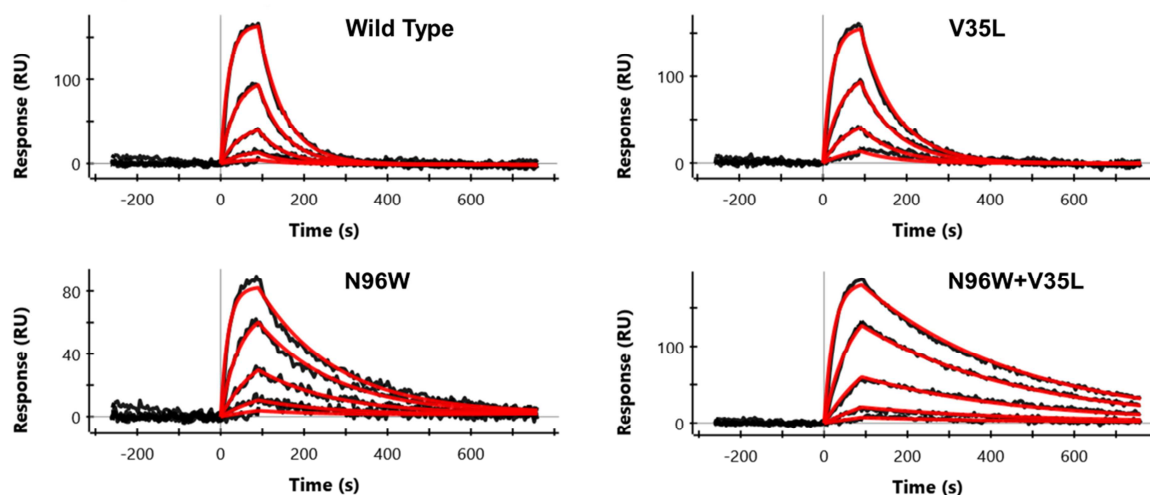
Významný úspěch způsobu předpovědi mutací výpočetní technikou lze spatřovat v tom, že veškeré předpovězené receptorové varianty mají afinitu k IFN γ v nanomolárním rozmezí. Nové varianty lze rozdělit do tří skupin podle toho, jakou mají afinitu vzhledem k nezměněnému „wild-type“ receptoru (WT) (Obrázek 1). Do *první* skupiny se řadí varianty s afinitou dva až třikrát vyšší než WT, například varianty N65R, S95R nebo T166Y nacházející se na interakčním rozhraní mezi proteiny. Většina variant spadá do druhé skupiny mutací, které nemají skoro žádný vliv na vazbu, sem patří například varianty N70G nebo N96F a dále mutace poblíž kavit. Třetí skupina zahrnuje varianty s výrazně vyšší afinitou v porovnání s WT receptorem. Nejvyšší, pětinasobné zvýšení afinity, bylo pozorováno u varianty N96W, pozice 96 se nalézá na rozhraní mezi proteiny. Kombinace této mutace s mutací V35L nacházející se v kavitě vedla až k sedminásobnému navýšení afinity. Ukázali jsme tak, že ačkoliv mutace poblíž kavit nejsou v přímém kontaktu s ligandem, celkově mohou zvýšit afinitu v kombinaci s mutacemi na interakčním rozhraní.



Obrázek 1. Porovnání vazby receptorových variant vzhledem k nezměněnému „wild-type“ receptoru. Afinity byly naměřeny SPR metodou. Grafy představují afinity variant s mutacemi nacházejícími se na rozhraní mezi dvěma proteiny (vlevo) a mutacemi poblíž kavit (vpravo).

Měření spekter cirkulárního dichroismu sloužilo k ověření sekundární struktury WT receptoru a jeho vybraných variant (V35L, N96W a N96W+V35L). Naměřená spektra vykazovala velmi vysokou podobnost u všech měřených proteinů, a tudíž lze říci, že mutace nezpůsobily velké změny v celkové struktuře (foldu) proteinů.

Metoda SPR má jedinečnou vlastnost měřit kinetické vlastnosti vazby v reálném čase. Bylo zjištěno, že většina receptorových variant vykazovala rychlou asociaci (k_{on}) s IFN γ , která byla následována rovněž rychlou disociací (k_{off}). Avšak u variant N96W a N96W+V35L byla pozorována pomalejší disociace, což je příčina vyšší afinity, která se vyjadřuje disociační konstantou (K_d) podle vztahu $K_d = k_{off}/k_{on}$, kdy nižší hodnota K_d znamená vyšší afinitu. Tyto jiné kinetické vlastnosti odlišují dvě varianty s nejvyšší afinitou od ostatních (Obrázek 2).



Obrázek 2. SPR sensorgramy ukazující interakci mezi IFN γ -SC a vybranými variantami receptoru. Varianta V35L se chová podobně jako WT, tudíž lze pozorovat rychlou asociaci (k_{on}) i disociaci (k_{off}). Dvě varianty (N96W a N96W+V35L) vykazují pomalejší disociaci v porovnání s WT receptorem, a tudíž jejich afinita (K_d) je vyšší.

Výsledky tak ukázaly, že výpočetní technikou je možno navrhnout mutace v rámci molekuly receptoru, jak na rozhraní s IFN γ , tak poblíž kavit. Tento přístup lze proto využít k dalšímu zvýšení vazby mezi dvěma proteiny, i když jejich interakce je již evolučně optimalizovaná s afinitou v nanomolárním rozmezí.

Závěry

Cílem této práce bylo najít aminokyselinové záměny v receptoru 1 pro interferon gama (IFN γ R1), které změní afinitu IFN γ R1 k jeho přirozenému ligandu interferonu gama (IFN γ). Důležitým rysem práce byla kombinace výpočetní techniky s experimentálními metodami.

Počítačové modelování aminokyselinových záměn vedoucích ke zvýšení afinity IFN γ R1 k IFN γ

Pro nalezení mutací, které ovlivňují vazbu mezi modelovými proteiny IFN γ R1 a IFN γ , byl vyvinut nový protokol založený na počítačové analýze krystalových struktur 1FG9 (Thiel *et al.*, 2000) and 1FYH (Randal *et al.*, 2001), sekvenční konzervovanosti a výpočtech volné energie programem FoldX (Schymkowitz *et al.*, 2005). Protokol byl využit při návrhu několika jedno-, dvoj-, i troj-aminokyselinových záměn v molekule receptoru. Byly kombinovány mutace na interakčním rozhraní mezi IFN γ R1 a IFN γ 1 a v kavitách IFN γ R1.

Experimentální potvrzení navržených mutací

Pro účely této práce byl vytvořen nový protokol pro produkci a purifikaci jak IFNg, tak „wild-type“ IFNgR1 a jeho variant. Bylo otestováno mnoho různých protokolů pro produkci IFNgR1 v různých expresních systémech, například v hmyzích buňkách S2, kvasinkových buňkách *Pichia pastoris* a bakterii *Escherichia coli*. Všechny vybrané receptorové varianty byly úspěšně produkovány v *E. coli*, refoldovány, purifikovány a jejich vazebné vlastnosti zjištěny pomocí metody, která měří povrchovou rezonanci plazmonů (SPR). Nejlepší varianta nacházející se na rozhraní mezi IFNgR1 a IFNg měla afinitu pětikrát vyšší než WT receptor. Tato afinita byla dále zvýšena na sedminásobek oproti WT mutací V35L nacházející se v kavitě uvnitř receptoru, ačkoliv tato mutace sama o sobě měla podobné vazebné vlastnosti jako WT receptor.

Dále byly naměřeny teplotní stability navržených receptorových variant a jejich sekundární struktury byly určeny na základě spekter cirkulárního dichroismu, aby bylo vyloučeno, že zvýšení afinity není způsobeno změnou ve struktuře proteinů. SPR měření ukázala, že zvýšení vazby bylo způsobeno především pomalejší disociací volného IFNg od receptoru, jenž byl navázán na povrchu SPR čipu.

Porovnání vypočítaných a naměřených afinit

Počítačově předpovězené změny afinit interakcí variant IFNgR1 s IFNg byly porovnány s experimentálními hodnotami. Vyhodnocení výpočtů molekulární dynamikou naznačuje, že pomalejší disociace N96W varianty, a tedy její vyšší afinita, je způsobena entropickou stabilizací nově zavedeného tryptofanu v komplexu relativně k volnému IFNgR1. Tryptofan je ve volném proteinu jako částečně hydrofobní residuum destabilizován a tím snižuje entropickou penalizaci tvorby komplexu. Ačkoliv varianty receptoru, které se nacházejí poblíž kavit, mají podobnou afinitu jako receptor WT, mohou zvyšovat vazbu mutací, jenž se nacházejí na rozhraní mezi IFNg a IFNgR1. Vysvětlením tohoto efektu by mohlo být omezení pohybu molekuly, což může souviset s entropickými změnami po vytvoření komplexu (Marlow *et al.*, 2010; Wand, 2013). Nicméně lepší pochopení vlivu mutací na vazbu mezi IFNgR1 a IFNg by vyžadovalo důkladnější termodynamickou charakterizaci a stanovení krystalových struktur variant ve volném stavu i v komplexu.

Shrnutí

Tato práce se zabývala úkolem výpočetní metodou navrhnout mutace v proteinu tak, aby tyto mutace dále zvýšily afinitu vazby k přirozenému vazebnému partneru proteinu z nanomolárních hodnot. Výsledky ukazují, že takové výpočetní návrhy podpořené experimentálními daty jsou použitelným přístupem pro ovlivnění vazby, který může dále pomoci k lepšímu pochopení strukturních a energetických složek uplatňujících se při interakcích mezi proteiny.

Literatura

- Atwell, S., Ultsch, M., De Vos, A.M., Wells, J.A. 1997. "Structural plasticity in a remodeled protein-protein interface." *Science* 278 (5340): 1125-1128.
- Battaglia, T.M., Masson, J.F., Sierks, M.R., Beaudoin, S.P., Rogers, J., Foster, K.N., Holloway, G.A., Booksh, K.S. 2005. "Quantification of cytokines involved in wound healing using surface plasmon resonance." *Anal Chem* 77(21): 7016-7023.
- Chou, T.H., Chuang, C.Y., Wu, C.M. 2010. "Quantification of Interleukin-6 in cell culture medium using surface plasmon resonance biosensors." *Cytokine* 51(1): 107-111.
- Karanicolas, J., Kuhlman, B. 2009. "Computational design of affinity and specificity at protein-protein interfaces." *Curr Opin Struct Biol* 19(4): 458-463.
- Kawasaki, Y., Chufan, E.E., Lafont, V., Hidaka, K., Kiso, Y., Mario Amzel, L., Freire, E. 2010. "How much binding affinity can be gained by filling a cavity?" *Chem Biol Drug Des* 75(2): 143-151.
- Kortemme, T., Baker, D. 2004. "Computational design of protein-protein interactions." *Curr Opin Chem Biol* 8(1): 91-97.
- Kraemer-Pecore, C.M., Wollacott, A.M., Desjarlais, J.R. 2001. "Computational protein design." *Curr Opin Chem Biol* 5(6): 690-695.
- Landar, A., Curry, B., Parker, M.H., DiGiacomo, R., Indelicato, S.R., Nagabhushan, T.L., Rizzi, G., Walter, M.R. 2000. "Design, characterization, and structure of a biologically active single-chain mutant of human IFN-gamma." *J Mol Biol* 299(1): 169-179.
- Lin, F.-C., Young, H.A. 2013. "The talented interferon-gamma." *Advances in Bioscience and Biotechnology* 04(07): 6-13.
- Mandell, D.J., Kortemme, T. 2009. "Computer-aided design of functional protein interactions." *Nat Chem Biol* 5(11): 797-807.
- Marlow, M.S., Dogan, J., Frederick, K.K., Valentine, K.G., Wand, A.J. 2010. "The role of conformational entropy in molecular recognition by calmodulin." *Nat Chem Biol* 6(5): 352-358.
- Marsters, S.A., Pennica, D., Bach, E., Schreiber, R.D., Ashkenazi, A. 1995. "Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12): 5401-5405.
- Morellato-Castillo, L., Acharya, P., Combes, O., Michiels, J., Descours, A., Ramos, O.H., Yang, Y., Vanham, G., Arien, K.K., Kwong, P.D., Martin, L., Kessler, P. 2013. "Interfacial cavity filling to optimize CD4-mimetic miniprotein interactions with HIV-1 surface glycoprotein." *J Med Chem* 56(12): 5033-5047.
- Randal, M., Kossiakoff, A.A. 2001. "The structure and activity of a monomeric interferon-gamma:alpha-chain receptor signaling complex." *Structure* 9(2): 155-163.
- Reichmann, D., Rahat, O., Cohen, M., Neuvirth, H., Schreiber, G. 2007. "The molecular architecture of protein-protein binding sites." *Curr Opin Struct Biol* 17(1): 67-76.
- Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., Serrano, L. 2005. "The FoldX web server: an online force field." *Nucleic Acids Res* 33(Web Server issue): W382-388.

- Stigter, E.C., de Jong, G.J., van Bennekom, W.P. 2005. "An improved coating for the isolation and quantitation of interferon-gamma in spiked plasma using surface plasmon resonance (SPR)." *Biosens Bioelectron* 21(3): 474-482.
- Stybayeva, G., Kairova, M., Ramanculov, E., Simonian, A.L., Revzin, A. 2010. "Detecting interferon-gamma release from human CD4 T-cells using surface plasmon resonance." *Colloids Surf B Biointerfaces* 80(2): 251-255.
- Thiel, D.J., le Du, M.H., Walter, R.L., D'Arcy, A., Chene, C., Fountoulakis, M., Garotta, G., Winkler, F.K., Ealick, S.E. 2000. "Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex." *Structure* 8(9): 927-936.
- Walter, M.R., Windsor, W.T., Nagabhushan, T.L., Lundell, D.J., Lunn, C.A., Zauodny, P.J., Narula, S.K. 1995. "Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor." *Nature* 376(6537): 230-235.
- Wand, A.J. 2013. "The dark energy of proteins comes to light: conformational entropy and its role in protein function revealed by NMR relaxation." *Curr Opin Struct Biol* 23(1): 75-81.



Mgr. Pavel Mikulecký, Ph.D., (e-mail: mikulecky@biomed.cas.cz) je absolventem oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Svou doktorskou dizertační práci „Zvýšení afinity receptoru 1 pro interferon gama k interferonu gama kombinací molekulárního modelování a experimentálních metod“ vypracoval pod vedením doc. ing. Bohdana Schneidera, CSc., v Laboratoři molekulárního rozpoznávání Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i., a úspěšně ji obhájil dne 22.10. 2015.

Molekulární faktory vývoje chlupových folikulů

Barbora Veselá

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veverí 97, 602 00 Brno
a Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita,
Kamenice 5, 625 00 Brno

Abstrakt

Chlupové folikuly jsou orgány odvozené z ektodermu, jejichž vývoj je řízen epitel-mesenchymovou interakcí. Během života organismu podstupují cyklické fáze růstu, programované buněčné smrti a klidu. Obnova chlupových folikulů je dána aktivací somatických kmenových buněk. Z klinického hlediska jsou chlupové folikuly významné díky pravidelnému stádiu fyziologické apoptózy a přítomností kmenových buněk ektodermálního původu.

Cílem této práce bylo metodami molekulární histologie vytvořit expresní analýzu molekulárních faktorů podílejících se na vývoji a růstu chlupových folikulů na modelovém organismu myši a detekovat nové molekuly, které dosud nebyly popsány v souvislosti s těmito procesy.

Práce se zaměřila na transkripční faktory z rodiny Myb a jejich souvislost s aktivací kmenových buněk a na apoptotickou i neapoptotickou expresi proteinů z rodiny Bcl-2, Fas-ligandu a kaspáz. U Myb proteinů bylo prokázáno, že se uplatňují při vývoji chlupových folikulů, ale jejich exprese není totožná s výskytem buněčné proliferace. Navíc byl protein c-Myb detekován i v nediferencovaných buňkách opouštějících niche kmenových buněk.

Při detekci exprese molekul spojených s apoptózou byly nalezeny nové faktory, které zatím nebyly u chlupových folikulů popsány. U proteinů sloužících jako apoptotické induktory (Bim, Puma, FasL, Bnip3L) byla objevena neapoptotická lokalizace v tkáni a byly nalezeny během morfogeneze chlupových folikulů. Z terapeutického hlediska může mít důležitou úlohu objev aktivace kaspázy-7 v neapoptotických keratinocytech chlupových folikulů a kožních mastocytech. Kaspáza-7 se podílí na exekučním stádiu apoptózy, ale má důležitou roli během zánětu a byla popsána také při procesech diferenciaci. Její významná úloha v kůži je podpořena faktem, že u deficientních jedinců bylo nalezeno signifikantně zvýšené množství mastocytů.

Směry aktuálního výzkumu chlupových folikulů si kladou za cíl vyvinout léčbu onemocnění způsobujících ztrátu vlasů a využít kmenových buněk v metodách tkáňového inženýrství. Nutným předpokladem pro indukci obnovy růstu vlasů u člověka je znalost komplexních molekulárních drah, které jsou v těchto strukturách aktivovány.

Úvod

Srst u zvířat plní mnoho fyziologických i sociálních funkcí, ať už jde o zajištění termoregulace, vnější izolace, sensorických vjemů, maskování nebo navazování vnitrodruhových interakcí. U člověka má v současné době přítomnost vlasů hlavně sociálně-kulturní kontext. Přestože předčasná či přechodná ztráta vlasů zásadně neovlivňuje kvalitu života po fyziologické stránce, je často přitěžujícím faktorem z hlediska psychiky. Blokování ztráty, nebo naopak indukce růstu vlasů tak v klinickém směru přesahuje hranice estetické dermatologie. Současné studium chlupových/vlasových folikulů se ubírá dvěma základními směry. Prvním z nich je výzkum somatických kmenových buněk, které mají schopnost indukovat růst folikulů a obnovovat poškozenou tkáň. Druhý směr je zaměřen na proces apoptózy, která u folikulů probíhá fyziologicky, její deregulace ovšem vede k patologickým stavům. Studium molekulárních faktorů zapojených v aktivaci kmenových buněk a v regulaci apoptózy je nezbytné k zajištění účinné terapie nejen pro pacienty trpící ztrátou vlasů.

Chlupové folikuly

Chlupové folikuly jsou orgány odvozené z ektodermu, jejichž vývoj je řízen interakcí mezi epidermis a buňkami mesenchymu (Schmidt-Ullrich *et al.*, 2005). Během vývoje prochází chlupové folikuly stádiem indukce, organogeneze a cytodiferenciace. Myší chlupové folikuly se začínají zakládat mezi čtrnáctým a patnáctým dnem embryonálního vývoje (ED), kdy dochází k indukci tvorby primárních folikulů (Schneider *et al.*, 2009). Fáze indukce začíná ztluštěním epidermis a vzniká plakoda, pod kterou se vytváří klastr dermálních fibroblastů, který dříve vznikne dermální papile. Během organogeneze chlupových folikulů dochází k masivní proliferaci keratinocytů, která zapříčiňuje prorůstání tvořícího se folikulu hlouběji do kůže. Pro stádium cytodiferenciace je charakteristický vznik a diferenciaci jednotlivých struktur, které tvoří maturovaný chlupový folikul. Vývoj chlupových folikulů je řízen proteiny Wnt, Fgf, Bmp, Shh, Lef-1, Eda a dalšími (Andl *et al.*, 2002; Botchkarev *et al.*, 1999; Chiang *et al.*, 1999; Jamora *et al.*, 2003; Millar, 2002).

Plně vyvinutý a funkční chlupový folikul se skládá z distální (permanentní) a proximální (cyklující) části. Spodní část folikulu je rozšířená a tvoří cibulku (bulb, **bu**), která obaluje fibroblasty tvořící dermální papilu (dermal papilla, **dp**). Uvnitř cibulky se nachází proliferující buňky matrix. Buňky matrix diferencují do jednotlivých linií vytvářejících chlupový stvol (hair shaft, **hf**). **Hf** je obalen vnitřní kořenovou pochvou (inner root sheath, **irs**) a vnější kořenovou pochvou (outer root sheath, **ors**). Ve vrchní části folikulu se nachází epitelové vyklenutí (bulge, **bg**), které slouží jako niche somatických kmenových buněk (Cotsarelis *et al.*, 1990). Nad **bg** je umístěna mazová žláza (sebaceous gland, **sg**) ústící do kanálku chlupového folikulu (Schneider *et al.*, 2009).

Během života organismu podstupují chlupové folikuly cyklicky se opakující stádia růstu, která jsou spojena s výraznou změnou morfologie a genové exprese (Muller-Rover *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2012). Cyklus chlupových folikulů lze rozdělit do tří základních stádií: anagen, katagen a telogen.

Anagen je stádium aktivního růstu chlupových folikulů. První anagen nastává u myši kolem čtyř týdnů věku (Muller-Rover *et al.*, 2001). Chlupové folikuly v anagenu se vyznačují proliferační aktivitou, diferenciací a celkovým růstem. Základním předpokladem pro progresi anagenu je aktivace kmenových buněk, které vycestovávají z **bg** a

v matrix zakládají populaci přechodně dělicích se (transit amplifying, **TA**) buněk (Blanpain *et al.*, 2004). Na regulaci anagenu se podílí dráhy Wnt/ β -catenin/Lef, Shh/Patched/Gli, nebo například proteiny rodiny Bmp (Paus *et Foitzik*, 2004). Progrese anagenu, a tím i regenerace folikulů postupující u myši ve vlnách, jsou řízeny dermální expresí proteinů Bmp-2 a Bmp-4 (Plikus *et al.*, 2008). Vliv na délku trvání anagenu má Wnt-7b (Kandyba *et Kobiela*, 2014).

Stádium katagenu je charakteristické řízeným zánikem spodní části folikulu. Pokud nedojde k poruše regulace, je katagen fyziologický proces, při kterém má zásadní úlohu apoptóza. Katagen nastupuje bezprostředně po stádiu anagenu. U myši se první katagen objevuje mezi postnatálním (P) dnem 14 a P18, po dokončení stádia morfogeneze, a postupuje směrem kraniokaudálním a dorsoventrálním (Alonso *et Fuchs*, 2006). Přechod do prvního katagenu je ovlivněn expresí Fgf-5 (Hebert *et al.*, 1994). Během katagenu dochází k výrazným morfologickým změnám. Spodní část folikulu zahrnující **ors**, **irs** a **bu** je eliminována apoptózou, velikost folikulu se zmenšuje, dermální papila se přibližuje k permanentní části folikulu (Muller-Rover *et al.*, 2001). Při apoptotické eliminaci buněk během katagenu se uplatňuje vnější i vnitřní apoptotická dráha s tím, že v jednotlivých částech folikulu probíhá apoptóza odlišně. V matrix folikulu je v období katagenu exprimován proapoptotický protein Bax, transkripční faktor p53 nebo p55-Tnfr (Lindner *et al.*, 1997; Botchkarev *et al.*, 2001). p53 je zapojen také v apoptóze buněk **ors**, které společně s **irs** exprimují Fas receptor. Ve folikulech při katagenu dochází i k regulaci exprese kaspáz (Botchkareva *et al.*, 2006).

Do fáze telogenu vstupují folikuly po dokončení katagenu. Morfologie folikulů v telogenu je tedy výrazně ovlivněna předchozím stádiem fyziologické regrese. Telogenní folikuly mají oproti růstové fázi malou velikost, jsou zanořené v dermis, **dp** není obklopena keratinocyty a nachází se těsně pod permanentní částí folikulu (Muller-Rover *et al.*, 2001). První telogen u myši nastává mezi P19 a P21 a trvá pouze jeden až dva dny, zatímco následující stádium telogenu se prodlužuje na zhruba dva týdny (Alonso *et Fuchs*, 2006).

Růst a obnova chlupových folikulů je dána přítomností somatických kmenových buněk. Niche kmenových buněk chlupových folikulů bylo identifikováno v **bg** (Cotsarelis *et al.*, 1990). Na aktivaci kmenových buněk se podílí například proteiny Fgf, Noggin, Tgf- β a dráha Wnt (Greco *et al.*, 2009; Oshimori *et Fuchs.*, 2012). Buňky bg exprimují specifické markery, které je odlišují od ostatních keratinocytů. U myši byly charakterizovány CD34 a keratin 15, u člověka pak například CD200 (Trempeus *et al.*, 2003)

Kůže je komplexní orgán, který se vyjma buněk kožních derivátů skládá z epidermálních keratinocytů, fibroblastů, adipocytů, buněk podílejících se na imunitní odpovědi (lymfocyty, mastocyty, dendritické buňky, makrofágy), buněk svalových, nervových a buněk tvořících cévy. Vývoj a cyklický růst chlupových folikulů je tak ovlivněn i okolními buňkami, jejich buněčným cyklem, vzájemnými interakcemi a signalizací.

Proteiny rodiny Myb

Rodina proteinů Myb je složena ze tří popsaných transkripčních faktorů: A-Myb (Myb1), B-Myb (Myb2) a c-Myb (buněčný homolog onkoproteinu v-Myb). Tyto proteiny jsou zapojeny v řízení zásadních buněčných procesů, jakými jsou růst, diferenciaci a apoptóza (Oh *et Reddy*, 1999).

mRNA genu *c-myb* byla detekována v různých typech tkání (Ess *et al.*, 1999). Expresi proteinu c-Myb je spojována s nediferencovaným stavem, novější poznatky ale

ukazují, že je přítomen i v diferencovaných buňkách (Lungova *et al.*, 2012). Na rozdíl od tkáňově specifických proteinů A-Myb a c-Myb, protein B-Myb je exprimován ve většině dělicích se buněk (Zhou *et Ness*, 2011).

Apoptóza

Apoptóza je jeden z typů programované buněčné smrti, který se uplatňuje v mnoha procesech probíhajících u živých organismů. Během apoptózy dochází k eliminaci buněk, které jsou pro organismus nepotřebné nebo potenciálně nebezpečné.

Morfologické změny buněk podstupujících apoptózu zahrnují zaškrcování plazmatické membrány, pyknózu jádra vyvolanou kondenzací chromatinu, smršťování buňky a zmenšování jejího objemu, a v konečné fázi pak rozpad buňky na apoptotická tělíska fagocytovaná okolními buňkami (Kerr *et al.*, 1972; Hacker, 2000). K apoptóze obecně dochází vnitřní (mitochondriální) a vnější (receptorovou) cestou.

Vnitřní apoptotická dráha je iniciována velkou řadou stimulů, které přichází zevnitř buňky. Zásadní podíl na jejím průběhu mají mitochondrie. Regulace vnitřní apoptotické cesty probíhá prostřednictvím proteinů rodiny Bcl-2, které plní apoptotické i antiapoptotické funkce. Podstupuje-li buňka apoptózu, jsou nejdříve aktivovány ty proteiny z rodiny Bcl-2, které mají pouze BH3 doménu, tzv. BH3-only proteiny. Mezi ně patří například Bid, Bim, Puma, Noxa, Bik, Hrk (Huang *et Strasser*, 2000). Aktivace BH3-only proteinů způsobí aktivaci proapoptotických efektorů (Bax, Bak), které vytváří oligomery a podílí se na průchodnosti vnější mitochondriální membrány. Proti nim působí antiapoptotické proteiny z Bcl-2 rodiny (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bfl-1, Bcl-w), které se mohou vázat jak k BH3-only proteinům, tak k proapoptotickým efektorům a inhibovat tím indukci apoptózy. O osudu buňky rozhoduje to, které z těchto proteinů jsou v převaze (Brunelle *et Letai*, 2009). Proteiny Bim a Puma patří mezi proapoptotické BH3-only členy rodiny Bcl-2. Přestože BH3-only proteiny plní funkci při indukci apoptózy, byla popsána jejich účast v neapoptotických událostech.

Vnější apoptotickou dráhu zprostředkovávají signály z vnějšího prostředí, které do buňky přichází přes membránové receptory, receptory smrti. Tyto receptory patří do nadrodiny Tnf (Gaur *et Aggarwal*, 2003). Aktivace vnější apoptotické dráhy začíná navázáním trimerního ligandu na odpovídající receptor. K přenosu signálu dochází pomocí adaptérových molekul (FADD nebo TRADD). Fas ligand (FasL) je protein z rodiny Tnf, který po navázání na svůj receptor (Fas) vyvolává apoptózu vnější cestou. Apoptóza vyvolaná FasL má důležitou úlohu v imunitní odpovědi, když je například využívána cytotoxickými T-lymfocyty (Kagi *et al.*, 1994). Apoptotická i neapoptotická signalizace prostřednictvím dráhy FasL/Fas se uplatňuje při mnoha procesech, jako je regenerace nervového systému, přestavba mléčné žlázy nebo udržování kostní hmoty (Song *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2015). Patologická aktivace FasL/Fas je spjata například se ztrátou vlasů indukovanou chemoterapií (Sharov *et al.*, 2004).

Kaspázy patří do rodiny evolučně konzervovaných cysteinových proteáz, které své substráty štěpí v místě za aspartátem. Kaspázy jsou molekuly s centrální úlohou při zprostředkování apoptózy a zánětvých procesů (Shalini *et al.*, 2015). Kaspázy lze podle jejich hlavní funkce rozdělit na zánětové (1, 4, 5, 11, 12) a apoptotické (2, 3, 6, 7, 8, 9, 10). Mimo tyto dvě skupiny se nachází kaspázy -14 a -16. Apoptotické kaspázy se dále rozdělují na iniciační (2, 8, 9, 10) a exekuční (3, 6, 7). Aktivované exekuční kaspázy štěpí řadu substrátů, mezi které patří cytoplazmatické proteiny (aktin), proteiny podílející

se na metabolismu a reparaci DNA (PARP), další enzymy, proteiny buněčného cyklu (p21, pRB) nebo jaderné proteiny (laminy), což vede k apoptotické eliminaci buňky (Poreba *et al.*, 2013). Kromě apoptózy a zánětu se v poslední době věnuje stále větší pozornost neapoptotickým funkcím kaspáz. Kaspázy se uplatňují při terminální diferenciaci buněk oční čočky, krevních destiček a keratinocytů, nebo při vývoji nervové soustavy (Lamkanfi *et al.*, 2007; Erturk *et al.*, 2014).

Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo rozšíření poznatků o molekulárních faktorech zapojených do vývoje a růstu chlupových folikulů. Práce byla zaměřena na molekuly, které nebyly dosud u chlupových folikulů popsány, a také na nové funkce již popsaných molekul. Experimentální část byla provedena na prenatalních i postnatalních stádiích myších chlupových folikulů. Dílčí cíle zahrnovaly:

- 1) Detekci proteinů z rodiny Myb během vývoje chlupových folikulů
- 2) Analýzu produkce proteinů Myb v souvislosti s regulací kmenových buněk chlupových folikulů
- 3) Analýzu exprese genů spojených s apoptózou během období prvního myšního katagenu
- 4) Tkáňovou lokalizaci nových kandidátních molekul detekovaných během katagenu
- 5) Detekci proteinů Bim a Puma během vývoje chlupových folikulů
- 6) Korelaci exprese proteinů Bim a Puma s výskytem apoptotických buněk
- 7) Detekci aktivované kaspázy-7 v chlupových folikulech
- 8) Korelaci výskytu aktivované kaspázy-7 s apoptózou
- 9) Vliv deficiencie kaspázy-7 na myší chlupové folikuly a okolní tkáň
- 10) Expresi FasL u chlupových folikulů.
- 11) Korelaci exprese molekul zapojených v signální dráze FasL
- 12) Vliv deficiencie a indukce FasL na chlupové folikuly a okolní tkáň

Materiál a metody

Biologický materiál

Pro studium chlupových folikulů byly použity albinotické myši kmene CD1 (*Mus musculus var. alba*) z chovu Masarykovy univerzity. Myši deficientní pro kaspázu-7 (*Casp7^{-/-}*) byly získány darem od Dr. Toma Vanden Berghe z Ghent University, Belgie. Linie byla připravena zpětným křížením minimálně 10 generací na genetickém pozadí C57BL6 (Duprez *et al.*, 2011). Myši exprimující nefunkční formu FasL (*gld*) s genetickým pozadím C57BL6 byly zakoupeny z The Jackson Laboratory, Maine, USA. Vzorky byly získány ve spolupráci s Université René Descartes, Paris, Francie.

Metody

1. Příprava histologických vzorků

Vzorky tkání byly odebrány, fixovány ve 4% pufovaném paraformaldehydu, odvodněny vzestupnou etanolovou řadou, převedeny do xylenu a zality do parafínu. Ze vzorků byly připraveny histologické řezy o tloušťce 5 μm .

2. Imunohistochemie a imunofluorescence

Imunohistochemie (IHC) a její fluorescenční varianta imunofluorescence (IF) byly využity k specifické detekci proteinů v tkáni. Histologické řezy byly zavodněny (xylen, sestupná řada etanolu, pufr PBS), u některých protilátek byla provedena revitalizace antigenů. Primární protilátky byly aplikovány na 1 hodinu při laboratorní teplotě (RT) nebo přes noc při 4 °C. Po inkubaci vzorku s primární protilátkou byla aplikována sekundární protilátka. V případě IF byly vzorky po primární protilátce inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem (Alexa Fluor[®] 594, Alexa Fluor[®] 488, Life Technologies, USA). Preparáty byly zhotoveny přidáním montovacího média s DAPI.

3. TUNEL

Metoda TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) byla využita k detekci zlomů DNA jako markeru apoptotických buněk. K detekci byla využita fluorescenční varianta metody (17-141, Merck Millipore, USA)

4. Izolace RNA

RNA byla izolována ze vzorků myši kůže z oblasti zad v kranální směru. Vzorky byly izolovány komerčními sadami RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) nebo RNeasy Micro Kit (Qiagen, USA) dle pokynů výrobce. V postupu byla zařazena inkubace s DNázou. Izoláty o koncentraci RNA vyšší než 40 ng/μl a vysoké čistotě byly převedeny do cDNA pomocí SuperScript[®] VILO cDNA Syntesis Kit (Life Technologies, USA).

5. PCR Array

Metoda PCR Arrays (Mouse apoptosis PCR array, Qiagen, USA) byla využita k analýze expresního profilu genů spojených s apoptózou. Metoda je založena na porovnání exprese 84 genů u testovaného a kontrolního vzorku, vždy ze tří biologických replikant. Nárůst/pokles exprese u testovaného vzorku oproti kontrolnímu vzorku je vyjádřen ve „fold change“.

Výsledky

Expese transkripčních faktorů Myb u chlupových folikulů

Expese proteinů Myb během vývoje chlupových folikulů byla sledována ve stádiích ED15 až P21. Protein A-Myb nebyl během vybraných vývojových stádií detekován. Ve stádiu ED15 bylo několik buněk pozitivních pro B-Myb pozorováno ve tvořícím se folikulu, v okolí folikulu a v epidermis. V dalších vývojových stádiích byl B-Myb detekován v několika dělících se buňkách převážně v matrix chlupového folikulu. Během prvního katagenu a prvního telogenu nebyly buňky exprimující B-Myb pozorovány.

c-Myb byl v časných vývojových stádiích detekován v epidermis, ale ne v zakládajícím se folikulu. V pozdějších stádiích byl c-Myb přítomen ve velkém množství proliferujících buněk v matrix folikulu, ale i v buňkách, které vstupují do diferenciace. Silná expese byla pozorována v **ors**. c-Myb, podobně jako B-Myb, nebyl přítomen ve folikulech ve stádiu katagenu a telogenu. Proliferující buňky byly značeny detekcí PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Během vývoje folikulů se expese proteinu c-Myb překrývala s proliferací jen částečně.

V stádiu P25 byly chlupové folikuly v období aktivního růstu, c-Myb byl detekován v souvislosti s výskytem kmenových buněk. Buňky **bg** byly detekovány pomocí CD34.

Expresse proteinů c-Myb a CD34 se nepřekrývala. Buňky pozitivní pro c-Myb byly pozorovány převážně pod **bg** v oblasti **ors**. Buňky pozitivní pro oba proteiny se vyskytovaly ojediněle. Expresse proteinu c-Myb byla patrná v **bu**, která byla CD34-negativní. Pozitivní korelace mezi B-Myb a CD34 nebyla pozorována.

Expresse genů spojených s apoptózou

Detekce exprese genů spojených s apoptózou v myší kůži byla provedena metodou PCR Arrays. Genová exprese byla studována ve stádiích P6 (stádium proliferace, apoptóza se vyskytuje ojediněle), P15 (časná stádium katagenu) a P17 (pozdní stádium katagenu). Během časná fáze katagenu byl detekován významný nárůst exprese genu *Bnip3l*. Významný pokles v genové expresi byl pozorován v případě genu kódujícího kaspázu-14, *Cradd* a *Tnf-α*. V P15 byla také pozorována rozdílná exprese u *Casp12*, *Naip1*, *CD40*, *CD70* a *Nme5*, nicméně bez požadované statistické významnosti.

V pozdním katagenu došlo proti P6 ke statisticky významnému zvýšení u *Api5*, *Bcl10*, *Bcl2l1*, *Birc5*, *Bnip3l*, *Casp2*, *Casp12*, *Dad1*, *Fadd*, *Pycard*, *Tnfrsf11b*, *Tnfrsf1a*, *Traf2* a *Trp63*. Naopak statisticky významné snížení genové exprese bylo pozorováno u *Apa1*, *Bak1*, *Bax*, *Birc3*, *Casp6*, *Casp9*, *Cideb*, *Traf1* a *Trp53*.

Dynamická změna genové exprese v průběhu katagenu byla sledována mezi stádii P15 a P17. V tomto období docházelo k významnému zvýšení *Api5*, *Bag3*, *Bcl10*, *Bcl2l1*, *Birc5*, *Card10*, *Casp2*, *Casp7*, *Casp12*, *Cd40*, *Dad1*, *Fadd*, *Nfkb1*, *Pycard*, *Tnfrsf11b*, *Tnfrsf1a*, *Traf2* a *Trp63*. Statisticky významný pokles v genové expresi byl pozorován u *Bak1*, *Bax*, *Birc3*, *Casp6*, *Casp9*, *Cideb*, *Il10*, *Traf1* a *Trp53*.

Jako nové kandidátní molekuly byly vybrány geny *Bnip3l* a *Casp12*. Expresse *Bnip3l* byla zvýšena v obou testovaných stádiích katagenu o 63 %. Expresse *Casp12* měla v P15 zvýšený trend a v P17 vykazovala významný nárůst s „fold change“ 25,63. Lokalizace proteinů Bnip3L a kaspázy-12 v tkáni byla detekována imunofluorescenčně. Ve stádiu P6 byla exprese proteinu Bnip3L pozorována v buňkách matrix chlupových folikulů a v **ors**. Ve stádiu P15 byl Bnip3L detekován v matrix folikulu a **ors**. Stádium P17 bylo charakteristické regresí spodní části folikulu. Bnip3L byl lokalizován ve spodní části folikulu a v **ors**. Expresse kaspázy-12 byla studována zároveň s lokalizací apoptotických buněk. Ve stádiu P6 byla kaspáza-12 detekována v **irs**, apoptóza se vyskytovala pouze ojediněle. V P15 byly apoptotické buňky přítomny v **irs**, kde byla kaspáza-12 detekována také. Podobná exprese kaspázy-12 byly pozorována v P17, kde její lokalizace v **irs** korelovala s výskytem apoptózy.

Lokalizace proteinů Bim a Puma byla sledována ve vývoji chlupových folikulů a během prvního katagenu. V ED15 Bim nebyl detekován, protein Puma byl pozorován v peridermu, bazálních buňkách epidermis a v epitelové části zakládajícího se folikulu. V ED17,5 nebyla exprese Bim detekována. Expresse proteinu Puma byla pozorována v bazálních buňkách epidermis a v epitelu chlupového folikulu. V pozdějších stádiích (P0 a P5) byly oba proteiny detekovány v **irs**. Ve stádiu P13 byla slabá exprese proteinu Bim patrná v **ors**, **irs** a matrix chlupového folikulu. Výraznější pozitivní signál byl pozorován v dermis. Protein Puma byl detekován ve stejných částech folikulu jako Bim. V tomto stádiu bylo pozorováno pouze několik apoptotických buněk, převážně v **irs**. Ve stádiu P15 byl Bim detekován ve spodní části folikulu a v dermis. Expresse proteinu Puma byla pozorována v **ors** a v **bu**. TUNEL-pozitivní buňky se objevovaly ojediněle a jejich výskyt nekoreloval s oblastmi pozitivními pro Bim a Puma. Stádium P18 bylo charakteristické

výskytem apoptotických buněk. U obou proteinů se exprese pouze částečně překrývala s lokalizací apoptózy.

Expres FasL byla studována během vývoje chlupových folikulů a během prvního stádia katagenu. FasL byl detekován ve vyvíjející se epidermis a v pozdějších stádiích i ve chlupových folikulech. Během prvního katagenu byl FasL lokalizován v **ors** a jeho exprese pozitivně korelovala s výskytem Fas a částečně i apoptózou. Vliv deficiencie funkční formy FasL na morfologii chlupových folikulů a okolní tkáň byl zkoumán u jedinců ve stádiu P29. Analyzovány byly tři myši *gld* (postrádající funkční FasL) a tři kontrolní myši. U *gld* myši byl pozorován rozdíl v morfologii kůže a posun cyklu chlupových folikulů.

Přítomnost štěpené (aktivované) kaspázy-7 při vývoji chlupových folikulů byla sledována mezi stádii ED15 až P15. Ve stádiu ED15 byla štěpená kaspáza-7 pozorována v epitelu zakládajících se chlupových folikulů. Během pozdějších stádií vývoje, ED17,5 a P0, se štěpená kaspáza-7 nacházela v epitelových buňkách chlupových folikulů. Ve stádiu P0 byla aktivní kaspáza-7 pozorována i v buňkách hematopoetického původu nacházejících se okolo folikulů. Stádium P5 bylo spojeno s výrazným detekčním signálem aktivované kaspázy-7 v bu, a to i v keratinocytech podstupujících diferenciaci. Ve stádiích P13 a P15 byla aktivovaná kaspáza-7 stále přítomná ve spodních částech folikulů, zatímco vrchní části folikulů byly negativní.

V návaznosti na detekci kaspázy-7 během utváření chlupových folikulů v ED15 bylo toto stádium vybráno k analýze změn genové exprese u jedinců deficientních pro kaspázu-7 oproti kontrolám. Metodou PCR Arrays byly detekovány změny genové exprese genů spojených s molekulárními dráhami kaspáz. Vzorky kůže postrádající kaspázu-7 vykazovaly statisticky signifikantní změny genové exprese v genech *Casp1*, *Casp12* a *Casp14*.

Aktivovaná kaspáza-7 byla detekovaná během prvního myšního katagenu. Její tkáňová distribuce korelovala s distribucí aktivované kaspázy-3. Během katagenu byla kaspáza-7 lokalizována v buněčných jádrech a apoptotických tělískách. Naopak v anagenu (P25) byly keratinocyty v matrix folikulu pozitivní pro aktivovanou kaspázu-7, která byla lokalizována v cytoplasmě. V tomto stádiu nebyla přítomná kaspáza-3 ani apoptóza.

Během vývoje a prvního cyklu chlupových folikulu byla pozorována aktivace kaspázy-7 v buňkách hematopoetického původu ležících okolo chlupových folikulů. Po imunofluorescenční detekci aktivní kaspázy-7 a následném barvení stejných preparátů toluidinovou modří bylo zjištěno, že tyto buňky jsou kožní mastocyty. Zároveň bylo prokázáno, že mastocyty v tomto stádiu nejsou apoptotické. Aktivovaná kaspáza-7 v mastocytech byla pozorována i v dalších stádiích. U dospělých jedinců postrádajících kaspázu-7 byl prokázán statisticky signifikantní ($P=0,000103$) nárůst v počtu kožních mastocytů.

Diskuse

Transkripční faktory Myb v chlupových folikulech (Veselá et al., 2014)

Během vývoje myších chlupových folikulů byla detekována přítomnost proteinů B-Myb a c-Myb. B-Myb byl exprimován v oblastech s proliferační aktivitou a nízkou mírou diferenciaci. Během prvního stádia katagenu a telogenu se B-Myb v chlupových folikulech nevyskytoval. Toto pozorování je v souladu s publikacemi, které popisují úlohu proteinu

B-Myb v buněčné proliferaci a indukci při přechodu buněk z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu (Sitzmann *et al.*, 1996). Nedávná studie navíc ukázala, že over-exprese B-Myb potlačuje keratinizaci epitelových buněk a naopak buňky udržuje v nediferencovaném stavu (Maruyama *et al.*, 2014). Přestože přítomnost proteinu c-Myb byla popsána u nediferencovaných a proliferujících buněk různých typů tkání, byl c-Myb detekován také v diferencovaných buňkách (Ess *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2007; Lungova *et al.*, 2012). K výrazné expresi proteinu c-Myb docházelo v postnatálních stádiích, navíc exprese c-Myb pouze částečně korelovala s výskytem proliferujících buněk. Detekce proteinu c-Myb v zónách keratinizace chlupu potvrdila předpoklad, že c-Myb je exprimován také v buňkách podstupujících diferenciaci do **irs** (Ess *et al.*, 1999).

U obou proteinů byly detekovány odlišné expresní profily, které indikují rozdílné funkce během vývoje chlupových folikulů. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že c-Myb je zapojen do regulace růstu chlupových folikulů v postnatálním vývoji.

Expres proteinů c-Myb a B-Myb v chlupových folikulech byla dále pozorována v souvislosti s lokalizací niche kmenových buněk. c-Myb má důležitou úlohu během hematopoézy, kdy se zásadně podílí na proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk (Zhou *et al.*, 2011). Dostupná data tak potvrzují, že c-Myb je důležitý regulátor buněčné diferenciaci a migrace. V *in vitro* systému bylo prokázáno, že c-Myb v tkáni tenkého střeva ovlivňuje sebeobnovu kmenových a progenitorových buněk a kontroluje expresi genů střevních kmenových buněk, například Lgr5 (Cheasley *et al.*, 2011). U chlupových folikulů nekorelovala exprese proteinů Myb s lokalizací niche kmenových buněk. c-Myb byl přítomen v buňkách ležících těsně pod **bg** v **ors**. Tato oblast byla popsána jako místo, ve kterém se vyskytují dělicí se a migrující buňky z **bg**, které následně vytváří v matrix folikulu populaci TA buněk (Nowak *et al.*, 2008). Výsledky naznačují, že exprese proteinu c-Myb není pravděpodobně nutná pro regulaci pomalu se dělicích kmenových buněk chlupových folikulů v niche, ale může mít úlohu v aktivaci buněk opouštějících niche. V dřívějších publikacích byly popsány podobné úlohy u proteinu c-Myc, který také funguje jako transkripční faktor (Watt *et al.*, 2008). Promotor *c-myc* je transkripčně aktivován proteinem c-Myb, jak bylo prokázáno u různých myších buněčných linií (Cogswell *et al.*, 1993). Udržování klidového stavu populace kmenových buněk chlupových folikulů je řízeno nízkými hladinami proteinu c-Myc, zatímco k aktivaci je potřeba zvýšená hladina tohoto proteinu (Watt *et al.*, 2008). Naše pozorování naznačuje možnou kooperaci mezi proteiny c-Myb a c-Myc při regulaci kmenových buněk chlupových folikulů. Podobný typ interakce byl prokázán v regulačních drahách ve střevě, kde jsou c-Myb a c-Myc spojeny se signalizací Wnt (Ciznadija *et al.*, 2009; Cheasley *et al.*, 2011).

Změny genové exprese během prvního myšího katagenu (Vesela *et al.*, 2015a)

Stádium prvního myšího katagenu je období dokončování vývoje chlupových folikulů. Během prvního katagenu jsou chlupové folikuly synchronizovány (Alonso *et al.*, 2006). Změny genové exprese byly sledovány za účelem specifikace nových molekul, které se mohou podílet na udržování fyziologické rovnováhy kůže. Fyziologicky řízená apoptóza během katagenu je komplexní proces, který je součástí homeostázy kůže a neovlivňuje pouze chlupové folikuly, ale také množství okolních buněk. Apoptóza chlupových folikulů je regulována souhrou proapoptotických i antiapoptotických faktorů. Některé molekuly primárně aktivované během apoptózy byly identifikovány také během fyziologického růstu chlupových folikulů (Botchkareva *et al.*, 2006). Aktivace apoptotic-

kých molekul v chlupových folikulech je provázána blokováním apoptózy v okolních buňkách, aby nedošlo k porušení homeostázy kůže jako celku. Navíc neapoptotické fáze cyklu chlupových folikulů probíhají současně s jiným typem buněčné smrti, kornifikací keratinocytů (Lippens *et al.*, 2009). Koordinace těchto procesů v tkáni může být spojena se zvyšující se hladinou exprese antiapoptotických (např. *Dad1*, *Birc5* a *Api5*) a snižující se hladinou exprese proapoptotických genů detekovaných během prvního katagenu.

Dad1, u kterého byla detekována extrémní změna exprese, nebyl dosud popsán u chlupových folikulů nebo kůže. Vysoký nárůst může být výsledkem obrany neapoptotických buněk proti eliminaci, podobně jako to bylo pozorováno u nádorových buněčných linií (Yoon *et al.*, 2010). Významné změny exprese byly detekovány u několika genů kódujících proteiny s TNF/TNFR doménami a asociované faktory, jako například pokles v expresi *Tnf-α* ve stádiu P15. *Tnf-α* může mít několik odlišných funkcí. Rychlý nárůst exprese *Tnf-α* v kožních keratinocytech a fibroblastech je spojován s odpovědí na ozáření UV (Bashir *et al.*, 2009). U člověka TNF-α podněcuje přechod folikulů ze stádia anagenu do katagenu v podmínkách *in vitro* (Hoffmann *et al.*, 1996). K indukci apoptózy vyvolané *Tnf-α* je potřebná účast dalších proteinů, jako je gasdermin (Lei *et al.*, 2012).

Naše výsledky dále ukázaly rozdílnou regulaci p53 a p63 ve stádiu P17, kdy transkripce *Trp53* klesala a transkripce *Trp63* stoupala. Oba proteiny mají v kůži odlišné úlohy (LeBoeuf *et al.*, 2010). Zatímco protein p63 je nutný pro správný epidermální vývoj a specifikaci kožních derivátů, p53 indukuje apoptózu keratinocytů matrix při fyziologickém stádiu katagenu (Botchkarev *et al.*, 2001; Truong *et al.*, 2006; LeBoeuf *et al.*, 2010). Nedávné studie prokázaly nové úlohy p53 v kůži, jako je například udržování proliferativního potenciálu kmenových buněk (Freije *et al.*, 2014). Nárůst v expresi p53 u chlupových folikulů je většinou spojen s indukcí patologických stavů, jako je například ztráta vlasů vyvolaná chemoterapií (Paus *et al.*, 2013). Oba proteiny, p53 i p63 jsou také aktivovány po ozáření UV (Ziegler *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1999). Rozdílná regulace obou genů během katagenu tak může být výsledkem rozdílných procesů probíhajících v kůži.

Samotné změny v expresi členů rodiny Bcl-2 nejsou většinou zásadní pro indukci apoptózy, protože jejich regulace je ovlivněna komplexními proteinovými interakcemi. Deregulace některých členů rodiny Bcl-2 se vyskytuje u nádorových onemocnění kůže (Nys *et al.*, 2012). V časném i pozdním katagenu byla detekována zvýšená exprese genu *Bnip3l*, a proto byla u této molekuly provedena tkáňová lokalizace na úrovni proteinu. *Bnip3L* patří do podrodiny BH3-only proteinů (Matsushima *et al.*, 1998). Přestože právě BH3-only proteiny rodiny Bcl-2 mají zásadní úlohu v indukci apoptózy, byly prokázány i neapoptotické funkce těchto molekul (Happo *et al.*, 2012). Přítomnost proteinu *Bnip3L* byla detekována v keratinocytech ve spodní části folikulu, a to i ve stádiu P6. U diferencujících buněk se exprese ztrácela. Výsledky naznačují, že *Bnip3L* by mohl mít zatím nespecifikované funkce v málo diferencovaných keratinocytech.

Během analýzy byly detekovány změny genové exprese u několika kaspáz. Výrazný pokles kaspázy-6 v P17 koreloval s její lokalizací, kdy štěpená kaspáza-6 byla pozorována v neapoptotických fibroblastech dermální papily ve stádiu P6. Fyziologické funkce kaspázy-6 nebyly zatím příliš prozkoumány, z neapoptotických funkcí byla diskutována úloha v hipokampu u potkanů (Narkilahti *et al.*, 2005). Zvýšená exprese genů *Casp2* a *Casp12* byla pozorována v P17. Úloha kaspázy-12 zatím není zcela objasněna. Kaspáza-12 byla popsána jako aktivátor apoptózy vyvolané stresovými

faktory pro endoplazmatické retikulum a byla nalezena během apoptózy v různých buněčných typech (Szegezdi *et al.*, 2003). U chlupových folikulů docházelo k nárůstu exprese kaspázy-12 v pozdějších stádiích katagenu a imunofluorescenčně byla lokalizována v **irs**. V této oblasti výskyt kaspázy-12 pozitivně koreloval s výskytem apoptotických buněk. Z dostupných výsledků lze předpokládat, že kaspáza-12 může být zapojena do fyziologické apoptózy chlupových folikulů. Kaspáza-12 byla u chlupových folikulů popsána poprvé.

Analýza genové exprese během prvního myšího katagenu prokázala, že dochází ke změnám exprese u různých skupin genů, a detekovala nové kandidátní molekuly, které by mohly být zapojeny v tomto procesu.

Bim a Puma jsou exprimovány při vývoji chlupových folikulů a jejich lokalizace nekoreluje s apoptózou (Vesela *et Matalova*, 2015b)

Proteiny Bim a Puma patří mezi iniciátory vnitřní apoptotické dráhy (Huang *et Strasser*, 2000). Bim má důležitou úlohu při vývoji různých orgánů, což bylo potvrzeno faktem, že myší embrya deficientní pro Bim umírají v časných vývojových stádiích (Bouillet *et al.*, 1999). Při vývoji chlupových folikulů byl Bim detekován ve vyvíjejícím se **irs** ve stádiu P0 a jeho exprese zůstala zachována i ve stádiu P5. Bim se uplatňuje při morfogenezi dalšího orgánu odvozeného z ektodermu, mléčné žlázy, kde funguje jako nezbytný regulátor apoptózy, a tím zajišťuje správný vývoj (Mailleux *et al.*, 2007). Úloha proteinu Puma nebyla zatím při vývoji tkání příliš popsána. V kůži byla exprese proteinu Puma detekována v bazální vrstvě vyvíjející se epidermis ve stádiích ED15 a ED17,5. Několik studií ukázalo, že Puma má zásadní úlohu v indukci epidermální apoptózy vyvolané dráhou p63 (Lee *et al.*, 2007; Pyati *et al.*, 2011). Dráha p63 se uplatňuje při vývoji a udržování růstu epidermis a protein p63 byl také dříve detekován v bazální vrstvě epidermis (Pellegrini *et al.*, 2001; Candi *et al.*, 2007). Proteiny Bim a Puma byly detekovány při vývoji chlupových folikulů a okolní tkáně, převážně v buňkách tvořících **irs**. Lokalizace proteinů nekorelovala s výskytem apoptózy, což naznačuje možné neapoptotické funkce těchto primárně apoptotických proteinů při formování chlupových folikulů a epidermis.

Podle naší analýzy byly Bim a Puma exprimovány v chlupových folikulech během prvního katagenu, ale jejich exprese nekorelovala s výskytem apoptózy. Pokud se Bim vyskytuje ve vyšších koncentracích, je pro buňku toxický a musí být neutralizován anti-apoptotickými členy rodiny Bcl-2 (O'Connor *et al.*, 1998). Exprese Bim korelovala s dříve popsaným výskytem proteinu Bcl-2 (Lindner *et al.*, 1997), který ho může neutralizovat a zabránit tak indukci apoptózy.

Analýza exprese proteinů Bim a Puma během prvního myšího stádia katagenu prokázala, že jejich lokalizace koreluje s výskytem apoptózy pouze v částech folikulů a objevuje se i v neapoptotických buňkách. Bim a Puma tak mohou mít v chlupových folikulech i jiné, zatím nedefinované funkce mimo apoptózu. Neapoptotické funkce proteinu Bim už byly prokázány při přežívání nádorových buněk (Gogada *et al.*, 2013). Vzhledem k vzájemným proteinovým interakcím v rámci rodiny Bcl-2 mohou být do regulace růstu chlupových folikulů zapojeny i další BH3-only proteiny, které zatím nebyly v této tkáni popsány.

FasL je exprimován v chlupových folikulech

Neúplná korelace exprese FasL s apoptózou ukazuje na možné neapoptotické funkce tohoto proteinu. Neapoptotické úlohy signalizace FasL/Fas byly dříve prokázány napří-

klad u erytropoézy (Carlile *et al.*, 2009). U keratinocytů byly pozorovány rozdíly v indukci apoptózy pomocí FasL v závislosti na jeho buněčné lokalizaci (Viard-Leveugle *et al.*, 2003). Solubilní forma FasL navíc pravděpodobně spouští neapoptotickou signalizaci přes Nf-κB vedoucí k buněčné proliferaci a tvorbě zánětu (O'Reilly *et al.*, 2009).

Významný vliv FasL signalizace na chlupové folikuly byl potvrzen u *gld* myší ve stádiu P29. *Gld* jedinci mají spontánní bodovou mutaci v genu pro FasL, která má za následek nefunkční formu proteinu (Takahashi *et al.*, 1994). Přítomnost nefunkčního FasL u chlupových folikulů vyvolala rozdíl v morfologii a stádiu růstového cyklu. Výsledky týkající se exprese a deficeince FasL u myších chlupových folikulů budou sloužit jako podklad pro funkční experiment sledující vliv up-regulace signální dráhy FasL na morfologii chlupových folikulů.

Lokalizace kaspázy-7 v chlupových folikulech a mastocytech (Veselá *et al.*, 2015)

Pravidelný zánik keratinocytů chlupových folikulů je proces, u kterého je vyžadována aktivace kaspáz (Botchkareva *et al.*, 2006). Kaspáza-7 patří mezi apoptotické exekuční kaspázy a má významnou úlohu při zánětových procesech (Lamkanfi *et Kanneganti*, 2010). Aktivní kaspáza-7 byla také popsána v neapoptotických a diferencujících buňkách (Matalova *et al.*, 2012; Svandova *et al.*, 2014).

V chlupových folikulech nebyla zatím aktivovaná kaspáza-7 popsána. V naší studii byl výskyt aktivované kaspázy-7 pozorován v období morfogeneze chlupových folikulů, během prvního stádia katagenu, a také v okolní tkáni.

Na rozdíl od kaspázy-3 nebyla kaspáza-7 popsána jako protein účastnící se terminální diferenciaci embryonálních epidermálních keratinocytů (Lippens *et al.*, 2000; Okuyama *et al.*, 2004). U chlupových folikulů byla aktivace kaspázy-7 pozorována ve vyvíjejícím se folikulu od stádia ED15. V souladu s dříve publikovanými výsledky (Magerl *et al.*, 2001) i našimi výsledky, nejsou raná stádia vývoje chlupových folikulů spojena s výskytem apoptózy a kaspáza-3 není v buňkách aktivní. Naše výsledky prokázaly, že nedostatek kaspázy-7 ovlivňuje genovou expresi v kůži a aktivovaná kaspáza-7 se nachází v proliferujících a diferencujících buňkách chlupových folikulů, což ukazuje na možné neapoptotické role tohoto enzymu. Tuto hypotézu podporuje i lokalizace aktivované kaspázy-7 v cytoplasmě a ne v jádře. Vliv subcelulární lokalizace kaspáz na jejich rozdílnou funkci byl popsán dříve (Zhitovskiy *et al.*, 1999; Yaoita, 2002; Ramuz *et al.*, 2003).

Během vývoje a prvního cyklu růstu chlupových folikulů byla patrná aktivace kaspázy-7 v buňkách hematopoetického původu v dermis a v okolí folikulů. Bylo potvrzeno, že tyto buňky jsou mastocyty. Přítomnost aktivované kaspázy-7 v neapoptotických mastocytech byla popsána poprvé. Podobně jako v případě našeho pozorování aktivní kaspázy-7 byla dříve v neapoptotických mastocytech popsána přítomnost aktivní kaspázy-3 (Garcia-Faroldi *et al.*, 2013). Navíc přestože u dospělých zvířat nebyla pozorována změna fenotypu kůže, vykazovaly jedinci deficientní pro kaspázu-7 statisticky významné zvýšení počtu mastocytů. Z výsledků tak vyplývá, že aktivní kaspáza-7 může mít neapoptotické funkce u mastocytů. Možným mechanismem může být regulace cytokinu interleukinu-33 (Il-33). Il-33 aktivuje mastocyty a bylo popsáno, že podporuje proliferaci mastocytů v dráze nezávislé na c-kit (Sabatino *et al.*, 2012; Saluja *et al.*, 2014). Kaspáza-7 může Il-33 štěpit s velkou účinností, a tímto proteolytickým štěpením potlačuje aktivitu Il-33 (Lüthi *et al.*, 2009). Nedostatek kaspázy-7 by tak zvyšoval aktivaci Il-33, a tím podporoval proliferaci mastocytů.

Závěr

Molekulární analýza genové exprese v chlupových folikulech se zaměřila na dva důležité procesy: aktivaci kmenových buněk a fyziologické stádium apoptózy. Do těchto procesů je zapojena celá řada molekul, část z nich nebyla dosud u chlupových folikulů popsána, nebo nebyla definována jejich přesná funkce. V první části této práce byla u modelového organismu myši porovnávána exprese transkripčních faktorů Myb s proliferací a výskytem kmenových buněk, v druhé části porovnávána lokalizace vybraných apoptotických molekul s apoptózou a neapoptotickými událostmi.

Transkripční faktory Myb byly nalezeny ve vyvíjejících se chlupových folikulech a jejich tkáňová lokalizace nebyla totožná s výskytem proliferace. c-Myb byl detekován také v diferencujících buňkách a v buňkách opouštějících niche.

Dále byla provedena analýza genové exprese molekul spojených s apoptózou během prvního myšího katagenu a byly nalezeny a lokalizovány nové kandidátní molekuly.

Proteiny Bim a Puma, molekuly vnitřní apoptotické dráhy, byly popsány během vývoje chlupových folikulů a jejich výskyt neodpovídal apoptóze.

Aktivovaná kaspáza-7 byla detekována během vývoje chlupových folikulů, a to i v buňkách, které nepodstupují apoptózu. V katagenu byla nalezena pozitivní korelace mezi výskytem štěpené kaspázy-7, kaspázy-3 a apoptózy. Navíc byla prokázána rozdílná apoptotická a neapoptotická buněčná lokalizace štěpené kaspázy-7. Aktivovaná kaspáza-7 byla identifikována také v kožních mastocytech, jejichž počet byl signifikantně zvýšen u jedinců deficientních pro kaspázu-7.

Expresí FasL byla popsána během morfogeneze chlupových folikulů a byla porovnávána s expresí Fas receptoru a výskytem apoptózy. U jedinců deficientních pro funkční formu FasL bylo pozorováno rozdílné časování cyklu chlupových folikulů.

Z výsledků vyplývá, že některé apoptotické induktory (Bim, Puma, Bnip3L, FasL) se během vývoje chlupových folikulů vyskytují i v buňkách nepodstupujících apoptózu a molekulární efektoři (kaspáza-7) mohou být neapoptoticky aktivováni. Na molekulární analýzu *in situ* tak mohou navázat funkční experimenty zaměřující se na konkrétní molekuly s cílem upřesnit jejich vliv na formování dané struktury a regulaci procesů s tím spojených.

Literatura

- Alonso L, Fuchs E. 2006. The hair cycle. *J Cell Sci.* 119(Pt 3):391-393.
- Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. 2002. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell* 2:643-653.
- Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. 2009. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF-alpha production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *J Invest Dermatol.* 129(4):994-1001.
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* 118(5):635-648.
- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, Lindner G, McMahon JA, Peters C, Lauster R, McMahon AP, Paus R. 1999. Noggin is a

- mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat. Cell Biol.* 1(3):158-164.
- Botchkarev VA, Komarova EA, Siebenhaar F, Botchkareva NV, Sharov AA, Komarov PG, Maurer M, Gudkov AV, Gilchrest BA. 2001. p53 Involvement in the control of murine hair follicle regression. *Am J Pathol.* 158(6):1913-1919.
- Botchkareva NV, Ahluwalia G, Shander D. 2006. Apoptosis in the hair follicle. *J Invest Dermatol.* 136(2):258-264.
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, Adams JM, Strasser A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 286(5445):1735-1738.
- Brunelle JK, Letai A. 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 122(Pt 4):437-441.
- Candi E, Dinsdale D, Rufini A, Salomoni P, Knight RA, Mueller M, Krammer PH, Melino G. 2007. TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle.* 6(3):274-285.
- Carlisle GW, Smith DH, Wiedmann M. 2009. A non-apoptotic role for Fas/FasL in erythropoiesis. *FEBS Lett.* 583(4):848-854.
- Ciznadija D, Tothill R, Waterman ML, Zhao L, Huynh D, Yu RM, Ernst M, Ishii S, Mantamadiotis T, Gonda TJ, Ramsay RG, Malaterre J. 2009. Intestinal adenoma formation and MYC activation are regulated by cooperation between MYB and Wnt signaling. *Cell Death Differ.* 16(11):1530-1538.
- Cogswell JP, Cogswell PC, Kuehl WM, Cuddihy AM, Bender TM, Engelke U, Marcu KB, Ting JP. 1993. Mechanism of c-myc regulation by c-Myb in different cell lineages. *Mol Cell Biol.* 13(5):2858-2865.
- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 61(7):1329-1337.
- Duprez L, Takahashi N, Van Hauwermeiren F, Vandendriessche B, Goossens V, Vanden Berghe T, Declercq W, Libert C, Cauwels A, Vandenabeele P. 2011. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity.* 35(6):908-918
- Ertürk A, Wang Y, Sheng M. 2014. Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms. *J Neurosci.* 34(5):1672-1688.
- Ess KC, Witte DP, Bascomb CP, Aronow BJ. 1999. Diverse developing mouse lineages exhibit high-level c-Myb expression in immature cells and loss of expression upon differentiation. *Oncogene.* 18(4):1103-1111.
- Freije A, Molinuevo R, Ceballos L, Cagigas M, Alonso-Lecue P, Rodriguez R, Menendez P, Aberdam D, De Diego E, Gandarillas A. 2014. Inactivation of p53 in human keratinocytes leads to squamous differentiation and shedding via replication stress and mitotic slippage. *Cell Rep.* 9(4):1349-1360.
- Garcia-Faroldi G, Melo FR, Rönnerberg E, Grujic M, Pejler G. 2013. Active caspase-3 is stored within secretory compartments of viable mast cells. *J Immunol.* 191(3):1445-1452.
- Gaur U, Aggarwal BB. 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol.* 66(8):1403-1408.

- Gogada R, Yadav N, Liu JW, Tang SH, Zhang DM, Schneider A, Seshadri A, Sun LM, Aldaz CM, Tang DG, Chandra D. 2013. Bim, a proapoptotic protein, up-regulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer. *J Biol Chem.* 288(1):368-381.
- Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, Dela Cruz-Racelis J, Fuchs E. 2009. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell.* 4(2):155-169.
- Häcker G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301(1):5-17.
- Happo L, Strasser A, Cory S. 2012. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci.* 125(Pt 5):1081-1087.
- Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. 1994. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell.* 78(6):1017-1025.
- Hoffmann R, Eicheler W, Huth A, Wenzel E, Happle R. 1996. Possible implications for the pathogenesis and treatment of alopecia areata. *Arch Dermatol Res.* 288(3):153-156.
- Huang DC, Strasser A. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell.* 103(6):839-842.
- Hwang IK, Moon SM, Yoo KY, Li H, Kwon HD, Hwang HS, Choi SK, Lee BH, Kim JD, Won MH. 2007. c-Myb immunoreactivity, protein and mRNA levels significantly increase in the aged hippocampus proper in gerbils. *Neurochem Res.* 32(6):1091-1097.
- Cheasley D, Pereira L, Lightowler S, Vincan E, Malaterre J, Ramsay RG. 2011. Myb controls intestinal stem cell genes and self-renewal. *Stem Cells.* 29(12):2042-2050.
- Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M, Bolinger M, Litingtung Y, Robertson EK, Cooper MK, Gaffield W, Westphal H, Beachy PA, Dlugosz AA. 1999. Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol.* 205(1):1-9.
- Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. 2003. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature.* 422(6929):317-322.
- Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 265(5171):528-530.
- Kandyba E, Kobiela K. 2014. Wnt7b is an important intrinsic regulator of hair follicle stem cell homeostasis and hair follicle cycling. *Stem Cells.* 32(4):886-901.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26(4):239-257.
- Lambert C, Landau AM, Desbarats J. 2003. Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis.* 8(6):551-562.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 14(1):44-55.
- Lamkanfi M, Kanneganti TD. 2010. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(1):21-24.

- LeBoeuf M, Terrell A, Trivedi S, Sinha S, Epstein JA, Olson EN, Morrisey EE, Millar SE. 2010. Hdac1 and Hdac2 act redundantly to control p63 and p53 functions in epidermal progenitor cells. *Dev Cell*. 19(6):807-818.
- Lee HO, Lee JH, Kim TY, Lee H. 2007. Regulation of DeltaNp63alpha by tumor necrosis factor alpha in epithelial homeostasis. *FEBS J*. 274(24):6511-6522.
- Lee J, Tumber T. 2012. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Semin Cell Dev Biol*. 23(8):906-916.
- Lei M, Bai X, Yang T, Lai X, Qiu W, Yang L, Lian X. 2012. Gsdma3 is a new factor needed for TNF- α -mediated apoptosis signal pathway in mouse skin keratinocytes. *Histochem Cell Biol*. 138(3):385-396.
- Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. 1997. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol*. 151(6):1601-1617.
- Lippens S, Kockx M, Knaepen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W. 2000. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ*. 7(12):1218-1224.
- Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. 2009. Cell death in the skin. *Apoptosis*. 14(4):549-569.
- Lungova V, Buchtova M, Janeckova E, Tucker AS, Knopfova L, Smarda J, Matalova E. 2012. Localization of c-MYB in differentiated cells during postnatal molar and alveolar bone development. *Eur J Oral Sci*. 120(6):495-504.
- Lüthi AU1, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. 2009. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 31(1):84-98.
- Magerl M, Tobin DJ, Müller-Röver S, Hagen E, Lindner G, McKay IA, Paus R. 2001. Patterns of proliferation and apoptosis during murine hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol*. 116(6):947-955.
- Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T, Bouillet P, Strasser A, Brugge JS. 2007. BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell*. 12(2):221-234.
- Maruyama H, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Sekido M, Kawachi Y. 2014. B-Myb enhances proliferation and suppresses differentiation of keratinocytes in three-dimensional cell culture. *Arch Dermatol Res*. 306(4):375-384.
- Matalova E, Vanden Berghe T, Svandova E, Vandenabeele P, Healy C, Sharpe PT, Tucker AS. 2012. Caspase-7 in molar tooth development. *Arch Oral Sci*. 57(11):1474-1481.
- Matsushima M, Fujiwara T, Takahashi E, Minaguchi T, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Suzumori K, Nakamura Y. 1998. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer*. 21(3):230-235.
- Millar SE. 2002. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol*. 118(2):216-225.

- Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. 2001. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol.* 117(1):3-15.
- Narkilahti S, Pitkänen A. 2005. Caspase 6 expression in the rat hippocampus during epileptogenesis and epilepsy. *Neuroscience.* 131(4):887-897.
- Nowak JA, Polak L, Pasolli HA, Fuchs E. 2008. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell.* 3(1):33-43.
- Nys K, Agostinis P. 2012. Bcl-2 family members: essential players in skin cancer. *Cancer Lett.* 320(1):1-13.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 17(2):384-395.
- Oh IH, Reddy EP. 1999. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene.* 18(19):3017-3033.
- Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, Ogawa E, Tommasi di Vignano A, Lioumi M, Chiorino G, Tagami H, Woo M, Dotto GP. 2004. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell.* 6(4):551-562.
- O'Reilly LA, Tai L, Lee L, Kruse EA, Grabow S, Fairlie WD, Haynes NM, Tarlinton DM, Zhang JG, Belz GT, Smyth MJ, Bouillet P, Robb L, Strasser A. 2009. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature.* 461(7264):659-663.
- Oshimori N, Fuchs E. 2012. Paracrine TGF- β signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. *Cell Stem Cell.* 10(1):63-75.
- Paus R, Foitzik K. 2004. In search of the "hair cycle clock": a guided tour. *Differentiation.* 72(9-10):489-511.
- Paus R, Haslam IS, Sharov AA, Botchkarev VA. 2013. Pathobiology of chemotherapy-induced hair loss. *Lancet Oncol.* 14(2):e50-59.
- Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(6):3156-3161.
- Plikus MV, Mayer JA, de la Cruz D, Baker RE, Maini PK, Maxson R, Chuong CM. 2008. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature.* 451(7176):340-344.
- Poreba M, Strózyk A, Salvesen GS, Drag M. 2013. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(8):a008680.
- Pyati UJ, Gjini E, Carbonneau S, Lee JS, Guo F, Jette CA, Kelsell DP, Look AT. 2011. p63 mediates an apoptotic response to pharmacological and disease-related ER stress in the developing epidermis. *Dev Cell.* 21(3):492-505.
- Ramuz O, Isnardon D, Devilard E, Charafe-Jauffret E, Hassoun J, Birg F, Xerri L. 2003. Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy. *Int J Exp Pathol.* 84(2):75-81.
- Sabatino G, Nicoletti M, Neri G, Saggini A, Rosati M, Conti F, Cianchetti E, Toniato E, Fulcheri M, Caraffa A, Antinolfi P, Frydas S, Pandolfi F, Potalivo G, Galzio R, Conti P, Theoharides TC. 2012. Impact of IL-9 and IL-33 in mast cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 26(4):577-586.

- Saluja R, Hawro T, Eberle J, Church MK, Maurer M. 2014. Interleukin-33 promotes the proliferation of mouse mast cells through ST2/MyD88 and p38 MAPK-dependent and Kit-independent pathways. *J Biol Regul Homeost Agents*. 28(4):575-585.
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. 2015. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 22(4):526-539.
- Sharov AA, Siebenhaar F, Sharova TY, Botchkareva NV, Gilchrest BA, Botchkarev VA. 2004. Fas signaling is involved in the control of hair follicle response to chemotherapy. *Cancer Res*. 64(17):6266-6270.
- Schmidt-Ullrich R, Paus R. 2005. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays*. 27:247-261.
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. 2009. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol*. 19(3):R132-42.
- Sitzmann J, Noben-Trauth K, Kamano H, Klempnauer KH. 1996. Expression of B-Myb during mouse embryogenesis. *Oncogene*. 12(9):1889-1894.
- Song J, Sapi E, Brown W, Nilsen J, Tartaro K, Kacinski BM, Craft J, Naftolin F, Mor G. 2000. Roles of Fas and Fas ligand during mammary gland remodeling. *J Clin Invest*. 106(10):1209-1220.
- Svandova E, Lesot H, Vanden Berghe T, Tucker AS, Sharpe PT, Vandenabeele P, Matalova E. 2014. Non-apoptotic functions of caspase-7 during osteogenesis. *Cell Death Dis*. 5:e1366.
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*. 1010:186-194.
- Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*. 76(6):969-976.
- Trempeus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW. 2003. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol*. 120(4):501-511.
- Truong AB, Kretz M, Ridky TW, Kimmel R, Khavari PA. 2006. p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev*. 20(22):3185-3197.
- Viard-Leveugle I, Bullani RR, Meda P, Micheau O, Limat A, Saurat JH, Tschopp J, French LE. 2003. Intracellular localization of keratinocyte Fas ligand explains lack of cytolytic activity under physiological conditions. *J Biol Chem*. 278(18):16183-16188.
- Wang L, Liu S, Zhao Y, Liu D, Liu Y, Chen C, Karray S, Shi S, Jin Y. 2015. Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Cell Death Differ*. doi: 10.1038/cdd.2015.14.
- Watt FM, Frye M, Benitah SA. 2008. MYC in mammalian epidermis: how can an oncogene stimulate differentiation? *Nat Rev Cancer*. 8(3):234-242.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 398(6729):714-718.
- Yaoita Y. 2002. Inhibition of nuclear transport of caspase-7 by its prodomain. *Biochem Biophys Res Commun*. 291(1):79-84.

- Yoon J, Kim ES, Lee SJ, Park CW, Cha HJ, Hong BH, Choi KY. 2010. Apoptosis-related mRNA expression profiles of ovarian cancer cell lines following cisplatin treatment. *J Gynecol Oncol.* 21(4):255-261.
- Zhou Y, Ness SA. 2011. Myb proteins: angels and demons in normal and transformed cells. *Front Biosci (Landmark Ed).* 16:1109-1131.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. 1994. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372(6508):773-776.
- Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(7):644-651.



Mgr. Barbora Veselá, Ph.D. (e-mail: 211413@mail.muni.cz) je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Svou doktorskou dizertační práci „Molekulární faktory vývoje chlupových folikulů“ vypracovala pod vedením prof. RNDr. Evy Matalové, Ph.D. v Laboratoři embryologie živočichů Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., v Brně a úspěšně ji obhájila dne 27.11. 2015.

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.

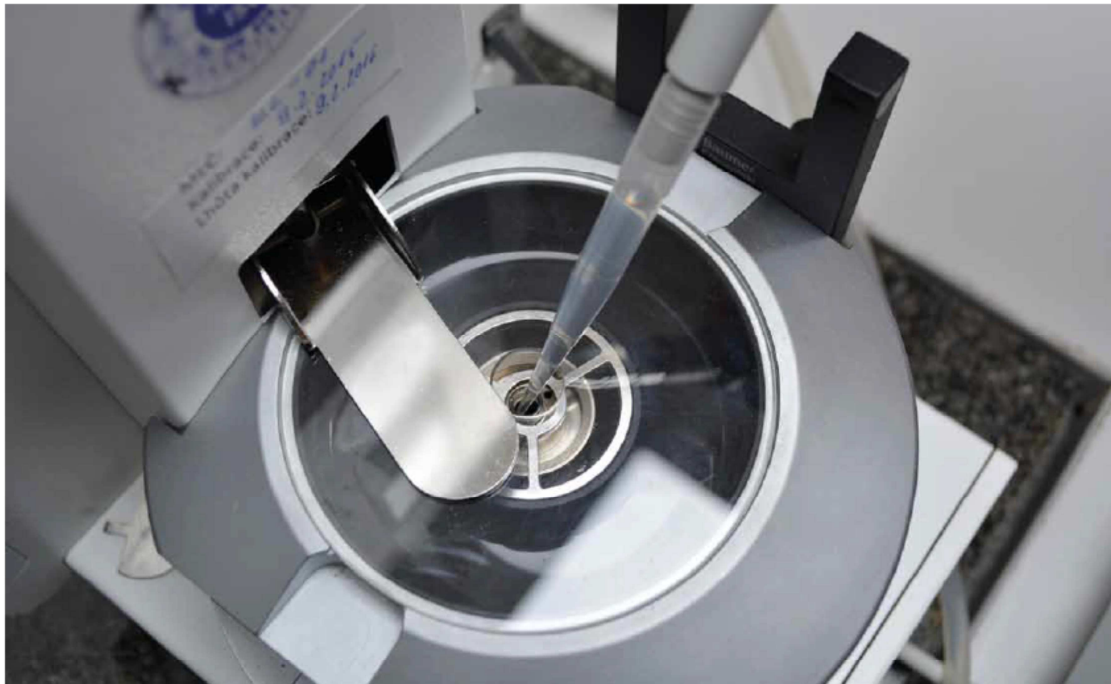
„Pohlavní výběr se projevuje i u člověka; muži se snaží ty samičky na sebe upozornit třeba tím, kde udělá lepší stojku.“

„Pračlověk žil v 7. – 9. století.“

„Výzkum citů, to je cytologie.“

„(na otázku „Variabilita znaků vlivem prostředí“ odpovídá studentka): „To je třeba, že nám na horách roste delší ochlupení.“

„Na DNA rozlišujeme introny a extrony.“



Kalibrace pipet

Pro kalibraci manuálních a elektronických pipet a dávkovačů s přesností 0,1 µl je potřeba správně stanovit hmotnost pipetované destilované vody s přesností 0,00001 gramu. Je třeba eliminovat vibrace a odpar v samotném průběhu pipetování.

Kalibrační laboratoř je vhodné umístit na klidném místě, např. ve sklepech budovy, kolem které nevedou tramvajové koleje či silnice pro nákladní vozidla. Sklep je vhodný také pro eliminaci změn odparu vlivem denního světla a průvanu. Stálá teplota, minimální proudění vzduchu, vysoká vlhkost a omezení vibrací jsou základem úspěchu. Ovšem nejdůležitějším parametrem jsou pravidelně kalibrované váhy s přesností na 6 desetinných míst, kvalitně odpružený vážní stůl s žulovou deskou, a veškerá opatření proti proměnlivému odparu. Proti

odparu je nutné mít v laboratoři zvlhčovač vzduchu (pobyt ve správné kalibrační laboratoři je výbornou přípravou před cestou do tropických krajín), vodní past na vahách, váhy s automatickým zavíráním, destilovanou vodu, předvhlčené špičky a pipetovat přímo na vážnici, aby se cesta vody vzduchem zkrátila na minimum.

Správná metodika je podmínkou dobrých výsledků: pipetu nejprve promáčknot, nasazenou špičku předvhlčit, nasávat kolmo a pipetovat pod úhlem 45°, pipetovat pomalu a měření zopakovat 10x.

Při nedodržení těchto postupů lze kalibraci provést i rychleji a docela levně. Pro správný výsledek jsou však trpělivost, soustředění a pokora podmínkou.

Více na www.eppendorf.cz -> Podpora a servis -> Kalibrace a servis pipet



www.eppendorf.cz

Obchodní zastoupení: Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o. - Vodňradská 2552/16 - 251 01 Říčany u Prahy - Tel.: +420 323 605 454 - E-mail: eppendorf@eppendorf.cz
Eppendorf © and the Eppendorf logo are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany. All rights reserved, including graphics and images.

cobas® EGFR Mutation Test v2 (CE-IVD)



cobas® EGFR Mutation Test v2 identifikuje mutace v exonech 18, 19, 20 a 21 EGFR genu



COBAS a LIFE NEEDS ANSWERS jsou ochranné známky společnosti Roche.

©2016 Roche

Roche s.r.o.,
Diagnostics Division
Karlovo náměstí 17
120 00 Praha 2

www.roche-diagnostics.cz



Představujeme nový produkt:

cobas® EGFR Mutation Test v2, certifikovaný pro in vitro diagnostiku (CE-IVD).

Nový **cobas®** EGFR Mutation Test v2 (CE-IVD) identifikuje ve vzorku DNA izolovaném z plazmy nebo tkáně pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem (NSCLC) gen receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Test je rovněž užitečným nástrojem pro výběr pacientů s NSCLC vhodných k léčbě inhibitory EGFR tyrosinkinázy (TKI).

Přednosti testu

- **Široké pokrytí mutací** — **cobas®** EGFR Mutation Test v2 (CE-IVD) je založen na PCR v reálném čase a identifikuje 42 mutací v exonech 18–21, včetně L858R, L861Q a mutace pro rezistenci na TKI, T790M.
- **Vhodný pro vzorky plazmy i tkáně** — **cobas®** test je určen jak pro testování vzorků plazmy, tak tkáně a umožňuje testovat současně oba druhy vzorků na jedné destičce. Firma Roche rovněž investovala do vývoje cell-free DNA (cfDNA) izolačního kitu optimalizovaného pro extrakci volné DNA z plazmy.
- **Kontinuální pracovní postup od izolace k výsledku** — Aby byla zajištěna plynulá integrace kitu **cobas®** EGFR Mutation Test v2 do již existujících laboratorních postupů, navázala firma Roche na úspěšný EGFR test první generace. Při testování DNA z plazmy trvá celý pracovní postup od izolace DNA k získání výsledku méně než čtyři hodiny. Při testování vzorku tkáně je celý proces hotový za méně než osm hodin.
- **Semi-Quantitative Index (SQI)** — pro testování vzorků plazmy jsme do výsledného reportu testu **cobas®** EGFR Mutation Test v2 zařadili novou hodnotu, tzv. semi-kvantitativní index (Semi-Quantitative Index — SQI). Tato hodnota vyjadřuje změnu množství mutované volné DNA (cfDNA) ve vzorku. Při opakovaném testování pomocí EGFR mutačního testu umožňuje hodnota SQI určit tendenci v progresi nádoru.

Pro více informací o produktech na detekci EGFR mutace

- navštivte <http://molecular.roche.com>,
- kontaktujte svého obchodního zástupce,
- napište nám na: prague_marketing.propagace@roche-diagnostics.cz.

cobas®
Life needs answers