

INFORMAČNÍ LISTY



**Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela, z.s., konané dne
5. 12. 2019 v Brně**

Přítomni: Čellárová, Doškař, Holá, Knoll, Kočová, Lízal, Sember, Slaninová, Šeda, Ševčovičová, Šmarda, Tomáška, Urban

Omluveni: Mašek, Zelený

Program schůze:

1. Kontrola zápisu z minulé schůze výboru
2. Informace o činnosti výboru a aktivitách GSGM za uplynulé období, zhodnocení 4. ročníku EduWorkshopu
3. Informace o aktualizaci databáze členů GSGM a o stavu úhrady členských příspěvků
4. Zhodnocení posledního čísla IL a příprava dalšího vydání
5. Plán aktivit GSGM v nadcházejícím období, projednání návrhu na pokračování EduWorkshopů
6. Projednání způsobu předání diplomů pro čestné členy GSGM
7. Různé

Schůzi výboru zahájil předseda prof. Doškař a uvedl plánovaný program. Přítomní členové výboru s navrženým programem souhlasili. Předseda ještě upřesnil, že v závěru schůze se dostaví dr. Vařejka, který se účastnil 4. ročníku EduWorkshopu jako jeden ze zástupců pedagogů ze středních škol. Požádal o účast na schůzi výboru, kde by chtěl prodiskutovat, zda by se závěry semináře mohly nějakou přijatelnou formou realizovat např. v podobě tištěných materiálů při výuce genetiky na středních školách. Členové výboru s účastí dr. Vařejky a s diskuzí na dané téma souhlasili.

ad 1)

K zápisu z minulé schůze výboru GSGM z 31. 5. 2019 neměl nikdo z výboru připomínky a nebyly shledány žádné nesplněné úkoly z předchozího období.

ad 2)

Členům GSGM jsou průběžně zasílány informace o seminářích a akcích, kterých se mohou účastnit. Výbor se bude do budoucna snažit ještě více zvýšit informovanost členů spolku o akcích, které by mohly být zajímavé a přínosné. Hlavní aktivitou v uplynulém období byl EduWorkshop, jehož 4. ročník byl stejně jako předchozí ročníky velmi přínosný. Detailní a výstižné hodnocení, kterého se ujala doc. Holá, bylo zveřejněno v posledním čísle IL.

ad 3)

Prof. Doškař, dr. Kočová a prof. Knoll informovali, že aktualizace databáze členů GSGM na úložišti DropBox i na webových stránkách probíhá průběžně vždy bezprostředně po

přijetí nového člena, po doručení žádosti o zrušení členství nebo po zjištění změn v kontaktních údajích. Prof. Knoll dále informoval výbor o platební morálce členů a upozornil na významnější nedoplatky členských příspěvků některých členů spolku. Navrhl, v souladu se stanovami, písemně kontaktovat ty členy, kteří dosud neuhradili členské příspěvky za tři a více let a vyzvat je, aby tak neprodleně učinili. Výbor souhlasí s výzvou k uhrazení dlužné částky, pokud tito členové chtějí dále setrvat ve spolku. V případě, že tak neučiní, bude členství, v souladu se stanovami, ukončeno pro nedodržení základní povinnosti člena spolku (zodpovídá Knoll).

ad 4)

Výbor zhodnotil poslední vydání IL vysoce kladně. Toto v pořadí 53. číslo IL obsahovalo řadu zajímavých a přínosných příspěvků a byla konstatována tradiční vysoká obsahová a grafická úroveň. Hlavní redaktor prof. Šmarda vyzval redaktory a členy výboru k dodání příspěvků do připravovaného čísla. Dr. Lízal připraví příspěvek v souvislosti s představením a zahájením prodeje jeho nové publikace „DNA jako občanský průkaz“. Všechny příspěvky je nutné dodat nejpozději do konce prosince.

ad 5)

Výbor bude i nadále posílat členům spolku informace o akcích s genetickou tematikou, které se budou v nadcházejícím období konat. Hlavní akcí organizovanou přímo GSGM bude pokračování úspěšného cyklu Edukačních seminářů, jejichž předchodzí čtyři ročníky byly zaměřeny na výuku genetiky na českých a slovenských univerzitách a vysokých školách. Na dalším pokračování seminářů se jednomyslně shodli všichni přítomní členové výboru. Prof. Tomáška se spolupracovníky navrhl zaměřit seminář na formy prověřování znalostí studentů z absolvovaných kurzů zaměřených na genetiku a na jejich následné hodnocení a na zkušenosti s různými způsoby hodnocení na jednotlivých vysokých školách. Součástí semináře by byla i výměna zkušeností s hodnocením výsledků státních zkoušek všech stupňů studia. Zazněl i návrh na zařazení příspěvků týkajících se problematiky, zda se aktuální genetická témata, která mají celospolečenský dosah (např. GMO, a další) promítají do výuky genetiky tak, aby na ně absolventi dokázali správně a s příslušným vědeckým nadhledem reagovat. Semináře by se mohli účastnit opět i studenti. Bude vítaná rovněž účast pedagogů ze středních škol. Členové výboru s návrhem na konání souhlasili a další příprava bude probíhat emailovou formou. Stručnou náplň semináře a informaci o jeho konání připraví do nového čísla IL prof. Tomáška. Předpokládaný termín konání semináře je konec května 2020, dohodu s ředitelem Mendelova muzea zajistí prof. Doškař (zodpovídají Tomáška, Doškař).

ad 6)

Předseda připomněl, že v uplynulém období bylo navrženo a schváleno udělení čestného členství prof. RNDr. Stanislavovi Zadražilovi, DrSc., PhDr. Anně Matalové, prof. RNDr. Danielovi Vlčkovi, DrSc. a doc. RNDr. Vladimírovi Ferákovi, CSc., kteří se významným způsobem zasloužili o rozvoj genetiky. Dr. Zelený připravil a předal výboru diplomy pro navržené čestné členy. Předseda poděkoval dr. Zelenému za zdařilou grafickou formu a vyhotovení diplomů. Výbor se shodl, že diplomy by bylo vhodné předat osobně u příležitosti konání EduWorkshopu (v květnu 2020) v Mendelově muzeu v Brně. Všichni ocenění budou na seminář osobně pozváni. V případě, že se nebudou moci semináře

zúčastnit, budou jim diplomy předány při nejbližší vhodné příležitosti na jejich domovských pracovištích (zodpovídají Tomáška, Doškař, Kočová).

ad 7)

V bodu Různé zazněly následující příspěvky a komentáře:

Prof. Knoll připomněl, že je možné čerpat z účtu finanční prostředky pro potřeby fungování spolku. Prof. Šmarda využije tuto možnost při přípravě, tisku a distribuci IL.

Prof. Doškař informoval, že soutěž o Cenu GSGM bude vyhlášena i pro nadcházející období. Nový člen výboru Dr. Sember bude pomáhat s organizováním této akce.

Další dva noví členové výboru se rovněž aktivně zapojí do práce výboru. Dr. Lízal nabídl pomoc s agendou členských příspěvků, Prof. Urban nabídl pomoc s úpravou a vedením webových stránek GSGM. Na konkrétních detailech se oba domluví s prof. Knollem, který dosud zajišťoval veškerou tuto agendu. Výbor se všemi nabídkami souhlasí a výše uvedení noví členové výboru se zapojí tímto způsobem do práce.

V závěru schůze vystoupil pozvaný host středoškolský profesor dr. Vařejka a uvedl diskuzi k problematice výuky genetiky na středních školách, zejména o možnostech její modernizace a nezbytné průběžné aktualizace. Snaží se hledat možnosti, jak využít závěry posledního ročníku EduWorkshopu, který byl věnovaný této problematice pro přípravu materiálů přímo použitelných pro středoškolské pedagogy a následně pro studenty. Řešila se otázka, zda by bylo možné např. aktualizovat nějakou vhodnou formou stávající učebnice genetiky pro střední školy. Na toto téma proběhla rozsáhlá diskuze a zmiňovaly se otázky, týkající se toho, co by měl z genetiky a z biologie znát maturant, jaká by měla být „biologická gramotnost“, zda je nebo není vhodné a užitečné vymezovat nějaké standardy pro výuku genetiky a biologie, co by bylo možné udělat pro to, aby student uměl kriticky (biologicky) uvažovat, apod. Publikování vhodných výukových materiálů, v nichž by byly přijatelnou formou shrnuty současné poznatky moderní genetiky, se nejeví jako optimální a realizovatelná možnost. Nicméně, zazněl mimo jiné návrh na využívání elektronických databází, jako jsou stránky WikiSkripta, které v současné době představují vhodný prostor pro zjednodušení a aktualizaci učebních materiálů na lékařských fakultách v ČR i SR a jsou oblíbené a využívány studenty nejen z lékařských fakult. Dále se diskutovaly i obecnější otázky týkající se např. časových možností, které mají střední školy pro výuku genetiky. V diskuzi vystoupili se svými názory a podněty všichni přítomní členové výboru. V závěru bylo konstatováno, že vhodným prvním krokem by mohlo být vytvoření platformy zainteresovaných středoškolských a vysokoškolských pedagogů, kteří by definovali kritické oblasti pro zlepšení středoškolské výuky genetiky a iniciovali vznik odpovídajících materiálů a strategií pro komunikaci jak s učiteli, tak s odpovědnými orgány (MŠMT).

Zapsala: M. Kočová

5. edukačný seminár o univerzitnom vzdelávaní genetiky

29. mája 2020 sa v Mendelovom múzeu v Brne uskutoční 5. edukačný seminár o univerzitnom vzdelávaní genetiky, tentokrát venovaný hodnoteniu študentov. V rámci seminára sa chceme venovať rôznym typom úloh v písomných testoch, testovaniu prostredníctvom online nástrojov, hodnoteniu ústnych odpovedí, kolokviálnemu spôsobu hodnotenia kurzov, hodnoteniu obhajob záverečných prác a štátnych záverečných skúšok. V rámci jednotlivých sekcií vystúpia učitelia a doktorandi českých a slovenských vysokých škôl, ktorí odprezentujú svoje konkrétne skúsenosti s rôznym spôsobom hodnotenia kurzov. Priestor chceme dať aj stredoškolským učiteľom a didaktikom. Ústrednou otázkou panelovej diskusie bude, ako hodnotiť študentov objektívne a zároveň ich motivovať k maximálnemu využitiu ich schopností pre štúdium. Ako jeden z podkladov diskusie bude slúžiť aj text uvedený nižšie (str.21). Viac informácií o seminári, registrácii a pripravovnom programe nájdete na stránke:

https://fns.uniba.sk/univerzitie_vzdelavanie_genetiky/

Ľubomír Tomáška

Pozvánka prof. Johanna Vollmanna na Mezinárodní Mendelův den 2020

Dear colleagues and Mendel-Ambassadors,

this is a pre-information on the next International Gregor Mendel Day! Together with our dear friends from Mendelianum/Brno we have decided to celebrate the next International Gregor Mendel Day in the afternoon of Friday, March 6, 2020 in Vienna/Austria. On Saturday/Sunday we might visit Brno as well for a Mendel-walk!

Venue: BOKU University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Gregor Mendel Street 33, 1180 Vienna, Austria

We are working on a program / mini-symposium covering both historical and modern aspects of genetics. I will be happy to inform you about details early next year! Please share this information with your colleagues!

With best regards from Austria,

Johann

December 11, 2019

Dr. Johann Vollmann

University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU)

Institute of Plant Breeding / Dept. Crop Sci.

Konrad Lorenz Str. 24

3430 Tulln an der Donau / AUSTRIA

phone: ++43 1 47654-95717

johann.vollmann@boku.ac.at

Z Mendelovy korespondence

Anna Matalová

Centrum Mendelianum, Muzejní 1, 602 00 Brno

Gregor Mendel Anselmu Rambouskovi:

Znojmo 31.10. /1849/

Milý Anselme!

Tvůj dopis včetně vložených 15 zl. jsem obdržel. Děkuji Ti za laskavost a současně Tě prosím, aby jsi mě i nadále zastupoval v mých žádostech u veleváženého pana opata /F. C. Nappa/. Velmi by mě potěšilo, kdyby mi velevážený pan prelát mohl poskytnout měsíční výslužné a ošatné až do konce příštích prázdnin. Mám na mysli peníze za měsíce od dubna do září 42 zl. (za měsíc leden, únor a březen náležejí P. Matouši /Klácelovi/), dále peníze na ošacení, praní a hábity za 24 zl. Z těchto 66 fl. jsem vyčerpal 15 zl., z těchto 50 zl. náleží panu převorovi /P. Baptistu Vortheyovi/, který byl tak laskav, že mi sumu poskytl předem, když jsem mu vylíčil své nesnáze ve Znojmě. Jeden zlaták, který ještě zbývá, patří P. Chrysostomu /Cygánkovi/, kterého současně nechávám prosit, aby měl trpělivost s mou schopností splátky až po rozdělení peněz ze sbírek od věřících.

Prokaž mi laskavost s vyrovnáním 51 zl. v nejbližším možném čase, aby byl pan převor uklidněn. Bylo by dobré, kdyby ses před veleváženým panem prelátem o vypůjčených 50 zl. nezmiňoval, a jen jednoduše řekneš, že mi peníze, které tak naléhavě potřebuji, hned pošleš. Dotčených 50 zl. potom předáš s mým poděkováním p. převorovi a věc bude vyřízena.

Bedna s prádlem dorazí ve středu mezi 6. a 7. hodinou večer do hostince U tří kohoutů. Ať je paní Smekalová té dobroty a nechá pana Finka, aby ji ještě téhož večera odnesl. Při té příležitosti Vám také pošlu obtah tisku slovanské národní poezie ze Znojma. Ve Znojmě se neděje nic významného.

Poručím se veleváženému p. prelátovi a pozdravuji všechny pány bratry.

G. Mendel

Bydlím v horní Boehmgasse č. 50.

Dopis vznikl v Mendelově suplentském období na gymnáziu ve Znojmě, kam ho jeho opat Napp ustanovil jako ředitel gymnaziálních studií na Moravě a ve Slezsku poté, co se Mendel ze zdravotních důvodů neosvědčil jako kaplan na římskokatolické faře v Augustiniánském klášteře na Starém Brně. Ve Znojmě začala Mendelova složitá učitelská dráha, jež ho vysvobodila od celodenních návštěv nemocných a zaopatřování umírajících, které u něho vyvolávaly nebezpečné stavy jeho mysli a těla.



PhDr. Anna Matalová je emeritní pracovnící Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně. V Mendelianu působí již od jeho založení, po roce 1989 až do odchodu do důchodu pracovala jako jeho vedoucí. Je autorkou řady odborných publikací, má klíčový podíl na vytvoření Centra Mendelianum a představení Mendelovy osobnosti nejenom ve vědeckém kontextu, ale také v rámci jeho dalších aktivit ve vztahu k městu Brnu a dalším místům.

Sto let od založení Genetické společnosti*

Laurence D. Hurst

Milner Centre for Evolution, Department of Biology and Biochemistry, University of Bath,
Claverton Down, Bath, BA2 7AY, UK

Genetika nezačala Mendelem. Kromě poněkud neurčitého příběhu dědičnosti znaků Jakubových ovcí v knize Starého zákona pojmenované příznačně *Genesis* (kapitola 30), se tímto problémem intenzivně zabývali filozofové starého Řecka (Leroi, 2014). Hippokratés zastával teorii pangeneze, podle které se něco přenáší z každé části mužského těla do zásobního orgánu, varlat, a odtud do další generace (Leroi, 2014). Aristoteles však tomuto názoru oponoval a poukazoval na to, že semenáčky nebudou správně ořezány jenom proto, že byl ořezán rodičovský strom nebo že synové a dcery postižených rodičů nemusí být sami invalidní (Leroi, 2014). Přes Aristotelovy námitky byla pangeneze přijata učenici rozmanitých oborů, jako např. Galénem (130-200 před Kristem), svatým Tomášem Akvinským (1225-1274) a Herbertem Spencerem (1820-1903) (Zirkle, 1935). Darwin sice zpočátku nic netušil o Hippokratově názoru, bral však pangenezi vážně, a domníval se, že částicemi vysílanými ze všech tělních částí do gonád jsou gemule (Darwin, 1868b). Když se o Hippokratovi dověděl, vyjádřil se takto (Darwin, 1868a): *“Rád bych o těchto Hippokratových myšlenkách věděl dříve, než jsem publikoval ty své, které vypadají téměř identicky — jsou zde sotva terminologické odlišnosti — a aplikoval je na fakta, které tento starý filozof nemohl znát”*.

To, že jsme se dostali přes zákopy pangeneze dále, je do značné míry zásluhou obecně nedostatečně chápané osoby Gregora Mendela.

Termín „genetika“ navrhl v roce 1905, krátce po znovuoobjevení Mendelových zákonů, William Bateson. Použil jej ve svém dopisu adresovaném Adamu Sadgwickovi. Nedlouho poté Dán Wilhelm Johannsen navrhl zavedení užitečného termínu „gen“ (Johannsen, 1909). Podle jeho názoru výhodou tohoto termínu je to, že odráží řecký původ (*genesis, origins*) a zároveň se vzdává předpony „*pan*“ někdejšího pangenu, čímž se zbavuje hypotetické zátěže pangeneze (Johannsen, 1909). Zároveň nám rovněž zanechal termíny genotyp a fenotyp. O vztahu skandinávců ke genetice docela vypovídá, že pouhý rok po zrodu těchto termínů (1910) byla v Lundu, v jižním Švédsku, města, jen krátkou cestu lodí vzdáleného od Johannsenovy Kodaně, založena Mendelova společnost (Höglund a Bengtsson, 2014). O devět let později založili britští stoupenci mendelismu, konkrétně Bateson a Saundersová, Genetickou společnost v UK. Stalo se tak 25. června 1919, kdy William Bateson a Edith Saundersová v prostorách Linnéovy společnosti ohlásili její zrod. Po jednomyslném schválení se ustavující schůze uskutečnila

*Převzato s laskavým souhlasem autora a redakce z článku, který vyšel v angličtině v časopise *Folia Mendeliana*. Přeložil Jan Šmarda.

v Cambridge a to 12. července téhož roku. Rok 2019 tak přináší stoleté výročí Genetické společnosti.

Nabízí se zajímavé srovnání těchto dvou nových společností, které nám něco naznačuje o tehdejších intelektuálních prostředích. Obě zřídily časopisy pro internacionalizaci své práce. Mendelova společnost v Lundu stále vydává časopis *Hereditas*, jehož první číslo vyšlo v roce 1920. K jeho významným článkům patří práce dvojice lundských cyto-genetiků Tjioa a Levana z roku 1956, ve které definují počet lidských chromozomů (Tjio a Levan, 1956). Nám v současné době vychází časopis *Heredity*, jehož nejcitovanějším článkem je klasická práce Batemana o intrapohlavním výběru (Bateman, 1948). Časopis *Heredity* začal vycházet v roce 1947 a brzy jsme přijali *Journal of Genetics*, jeden z nejstarších anglicky psaných genetických časopisů založených Batesonem a Reginaldem Punnettem (po kterém je pojmenováno Punnettovo náměstí) v roce 1910. Nás bývalý prezident J.B.S. Haldane v roce 1957 tento časopis vyvezl do Indie, kde funguje dodnes. Jeho článek o tom, co je dnes známo jako Haldanovo pravidlo, patří k zásadním studiím tohoto časopisu (Haldane, 1922) stejně jako jeho první odhady mutační frekvence u člověka (Haldane, 1935). Někdy se objevuje názor, že *Journal of Genetics* je nejstarším anglicky psaným genetickým časopisem (redakce samotného časopisu to tvrdí zde: <https://link.springer.com/journal/12041>, viz rovněž oprava (Rao, 2017)). Nic z toho není pravda, stejně jako tvrzení, že Genetická společnost je první genetickou společností v UK.

V roce 1907 založila zámožná přírodovědkyně a chovatelka bažantů Rose Haigová Thomasová Mendelovu společnost. Poprvé byla svolána do hotelu Ritz a později se scházela u jednotlivých členů (Cock a Forsdyke, 2008). Od roku 1909 vydávala časopis *Mendel Journal* považovaný za první genetický časopis v angličtině a přispívali do něj např. samotná Haigová Thomasová nebo C.C. Hurst. Hurst (který podle mého nejlepšího vědomí není mým příbuzným) se do redakční rady tohoto časopisu pokusil získat Batesona, ale ten odmítl, protože již měl vážné plány s časopisem *Journal of Genetics* (Cock a Rorsdyke, 2008).

V Lundské Mendelově společnosti i v Genetické společnosti UK od počátku působili vlivné osobnosti. Prvním předsedou Lundské společnosti se stal Herman Nilsson-Ehle (Höglund a Bengtsson, 2014). V Genetické společnosti kromě pionýrů Batesona a Punnetta pracoval vševěd J.B.S. Haldane, jehož následná práce společně s budoucím prezidentem společnosti R.A. Fisherem byla zásadní pro moderní syntézu Darwina a Mendela do společného rámce.

Na rozdíl od genetiky a pěstitele rostlin Nilssona-Ehleho, se prvním prezidentem Genetické společnosti stal konzervativní politik Arthur J. Balfour, první hrabě z Balfouru, známější jako premiér UK v letech 1902-1905 a z Balfourovy deklaráce v roce 1917 (Bell, 1950). Může se to zdát jako zvláštní volba, ale tehdy odluka vědy od politiky nebyla tak zřejmá jako dnes. Navíc Balfour po celý život všestranně podporoval akademický svět a vědu. Byl prezidentem Britské asociace pro vědecký pokrok (*The British Association for the Advancement of Science*) (1904) a překvapivě i prezidentem Společnosti pro výzkum psychiky (*The Society for Psychical Research*) (1893). Po dvě funkční období pracoval v radě Královské společnosti (*The Royal Society*), nejprve v letech 1907-1908 a znovu v letech 1912-1914. Balfoura určitě ovlivnila četba Darwina a jeho názory na genetiku a evoluci ovlivňovaly jeho politické působení (Jacyna, 1980). V roce 1913 se stal čestným místopředsedou Společnosti pro vzdělávání v eugenicé (*The Eugenics Education Society*), kterou považoval v obdobné míře za politickou i vědeckou (Jacyna, 1980). Rovněž na základě Weismannových představ popřel teorii neomezeného pokroku pomocí

environmentálních změn. To se ve své době považovalo za typické propojení politicky významné záležitosti s genetickými argumenty (Jacyna, 1980).

Zpočátku se obě společnosti soustředily na genetiku rostlin. Rostlinní genetické představovali většinu prvních členů Lundské Společnosti (Höglund a Bengtsson, 2014). Samotný Nilsson-Ehle byl renomovaným rostlinářem, který se proslavil zřízením Švédské asociace pro semena (*Swedish Seed Association*) ve Svalöfu (Bell, 1950). Rovněž mnozí z 87 (Anon, 1944) zakládajících členů Genetické společnosti bylo ze Zahradnického ústavu Johna Innese (*The John Innes Horticultural Institute*) založeného v roce 1910 a vedeného Batesonem (Crew, 1969). Tyto dvě instituce zaměřené na křížení rostlin lze v mnoha ohledech považovat za sesterské. V Genetické společnosti působili jak akademikové, tak soukromé osoby, šlechtitelé a zemědělství odborníci (Lewis, 1969). Bateson byl vždy nadšený z toho, když akademičtí genetické diskutovali s neakademiky. (Crew, 1969). Šlechtitelskou kariéru Nilssona-Ehleho nelze oddělit od jeho kariéry jako genetika (Bell, 1950).

Pozoruhodná odlišnost byla v aspiracích těchto společností (Höglund a Bengtsson, 2014). Lundská společnost vznikla jako lokální a lokální zůstala. Soustředila se na jižní Švédsko (Höglund a Bengtsson, 2014). Genetická společnost UK, spojená především s Cambridge, naopak usilovala o to, aby se stala společností celonárodní. Cestování v tehdejší době však nebylo nikdy jednoduché. Crew si vzpomíná, jak skupina členů z Cambridge propásla konferenci v Londýně kvůli husté mlze (Crew, 1969).

Nyní své úponky posuneme dále, abychom dosáhli na evropské souvislosti. Dnes je to podstatnější záležitost než dříve, protože v současné době má společnost nejvyšší počet členů (více než 2000). Většinu členů tvoří aktivní profesionální genetické z UK, vědci, biotechnologové, studenti a učitelé. Zapojení rostlinářů během let postupně sláblo (Crew, 1969), ačkoliv křížení a genetika rostlin jsou stále důležité. Nemá však zřejmě tak ústřední postavení, jako tomu bylo dříve.

Založení Genetické společnosti Batesonem a Saundersovou může částečně odrážet boj o moc (Crew, 1969). Bateson a stoupenci mendelismu se dostali do příkrého sporu s biometriky (Pearsonem a Weldonem), kteří význam mendelismu zpochyňovali (viz však Magnello, 1998). Pro Batesona to znamenalo komplikaci pro výzkumnou práci, protože omezovalo ochotu ke spolupráci. Nedostávalo se mu podpory, prostředků ani prostoru (Crew, 1969). Jak podotýká Crew ve svých vzpomínkách na tehdejší dobu (Crew, 1969), skutečnost, že Bateson v červnu 1919 dokázal i za této situace dát dohromady 26 zainteresovaných osob, aby založili Genetickou společnost, dokazuje, že se mu nakonec zdařilo tuto obtížnou opozici zvládnout. V této souvislosti bylo pro mnohé překvapením, že se první konference zúčastnil stoupenec lamarckismu a okázalý Batesonův odpůrce E.W. MacBride, vezmeme-li v úvahu jeho neúnavné úsilí zabránit rozvoji genetiky (Crew, 1969).

Batesonův mendelismus získával převahu a navíc využíval nástrojů, které měl k dispozici pro vylepšení postavení své myšlenkové školy. Obzvláště Bateson a Punnett zdaleka nebyli přesvědčeni o pravdivosti chromozomové teorie dědičnosti (Coco, 1983). Při posuzování práce Morgana, Sturtevant, Mullera a Bridges *The Mechanism of Mendelian Heredity*, která chromozomovou teorii silně obhajovala, se Bateson (1916) vyjádřil, že *“je nepředstavitelné, aby částice chromatinu nebo jiné substance, ať už jakkoliv komplexní, mohla disponovat takovou mocí, kterou musí mít naše faktory a geny”*. Pro Batesona a Punnetta bylo správným přístupem k výzkumu dědičnosti studium poměrů a vzorců přenosu, nikoliv studium chromozomů. Bateson použil časopisu *Journal of*

Genetics jako nástroje pro odrazení mladších genetiků od toho, aby se vydali cestou cytologie a chromozomů (Crew, 1969). Vývoj Genetické společnosti lze do určité míry chápat jako způsob podpory jak mendelismu, tak opozici chromozomální teorie. Kolem Batesona a Saundersové se při vzniku společnosti seskupili z větší části právě vědci zaměřeni na mendelovské hybridizační poměry (Crew, 1969).

Zde znovu vidíme zvláštní paralelu mezi skandinávským a Batesonovým pohledem, protože Johannsen patřil k dalším významným odpůrcům chromozomové teorie, i když nesdílel Batesonovu antipatii k cytogenetice (Cock, 1983). V britské Genetické společnosti byli výjimky a někteří vědci, zvláště C. C. Hurst, s odpůrci chromozomové teorie nesouhlasili. Není mi nic známo o vzájemném vztahu mezi ranou Mendelovou společností a Genetickou společností, ale lze si představit, že Hurst jako přívrženec chromozomové teorie a důležitá osobnost Mendelovy společnosti vytvořil kontext, v rámci kterého si Bateson uvědomil potřebnost jiné společnosti. To svádí k otázce, proč se Hurst zapojil do sestavování Genetické společnosti. Možnou odpověď na tuto otázku poskytuje Crew, když uvádí, že Hurst nesnášel rozepře a proto byl schopen s Batesonem a Punnettem spolupracovat (Crew, 1969).

Odpor k chromozomové teorii trval relativně krátce. Genetická společnost se vždy soustředila na vědecké diskuse a přítomnost Morgana a Sturtevant na 11. konferenci v roce 1922 svědčí o jejích mezinárodních ambicích. Data, která zde prezentovali o chromozomové teorii, byla tak přesvědčivá, že Punnett svůj názor s nadhledem přehodnotil (Crew, 1969). Nicméně až v roce 1942 společnost zorganizovala první konferenci věnovanou cytogenetice (Crew, 1969). Takový byl dosah Batesonova anti-cytogenetického stínu.

Společnost dodnes slouží svým členům a šíření genetiky. Sponzorujeme vznik audio souborů (*DNAunzipped*) a organizaci veřejných přednášek (*the JBS Haldane Lecture*). Prostřednictvím grantových projektů podporujeme práci v terénu a programy pro zapojení našich členů do aktivit směrem k veřejnosti. Zprostředkování vědy veřejnosti je však uměním samo o sobě a jsme hrdí, že jsme nedávno zorganizovali velmi úspěšný workshop pro správnou praxi. Stejně jako v dávných pionýrských dobách je naší klíčovou úlohou podpora členů k vědeckým diskusím sponzorováním konferencí a podporou vědců, aby se jich účastnili. Udělíme rovněž sady medailí, přičemž každý vyznamenaný přednáší speciální přednášku. Je příznačné, že nejvyšším oceněním, o jehož udělení rozhoduje prezident, je Mendelova medaile.

Literatura

- Anon, 1944 Twenty-fifth Anniversary of the Genetical Society. *Nature* 154: 111-111.
- Bateman, A. J., 1948 Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349-368.
- Bateson, W., 1916 The Mechanism of Mendelian Heredity. *Science* 44: 536-543.
- Bell, G. D. H., 1950 Prof. N. Herman Nilsson-Ehle. *Nature* 165: 709-710.
- Cock, A. G., 1983 William Bateson's rejection and eventual acceptance of chromosome theory. *Annals of Science* 40: 19-59.
- Cock, A. G., and D. R. Forsdyke, 2008 Treasure your exceptions: The science and life of William Bateson. Springer, New York, USA.
- Crew, F. A. E., 1969 Recollections of the early days of the Genetical Society, pp. 9-15 in Fifty years of genetics, edited by J. Jinks. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Darwin, C. R., 1868a Darwin Correspondence Project, "Letter no. 5987," accessed 1 April 2019, pp.

- Darwin, C. R., 1868b *The Variation of Animals and Plants Under Domestication*. John Murray, London.
- Haldane, J. B. S., 1922 Sex-ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 12: 101-109.
- Haldane, J. B. S., 1935 The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J. Genet.* 31: 317-326.
- Höglund, M., and B. O. Bengtsson, 2014 The origin of the Mendelian Society in Lund and the start of *Hereditas*. *Hereditas* 151: 110-114.
- Jacyna, L. S., 1980 Science and Social-Order in the Thought of Balfour, *Aj. Isis* 71: 11-34.
- Johannsen, W. L., 1909 *Elemente der exakten Erblchkeitslehre*. Gustav Fischer, Jena.
- Leroi, A. M., 2014 *The Lagoon: How Aristotle Invented Science*. Bloomsbury Cicrus, London.
- Lewis, D. H., 1969 The Genetical Society—the first fifty years, pp. 1-8 in *Fifty Years of Genetics*, edited by J. Jinks. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Magnello, M. E., 1998 Karl pearson's mathematization of inheritance: From ancestral heredity to Mendelian genetics (1895–1909). *Annals of Science* 55: 35-94.
- Rao, V., 2017 J. B. S. Haldane and *Journal of Genetics*. *Journal of Genetics* 96: 855-864.
- Tjio, J.-H., and A. Levan, 1956 The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1-6.
- Zirkle, C., 1935 The Inheritance of Acquired Characters and the Provisional Hypothesis of Pangenesis. *Am Nat* 69: 417-445.

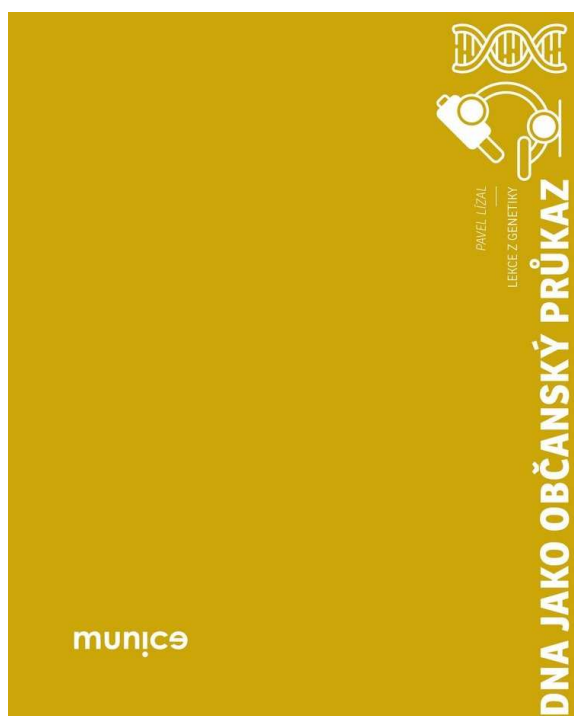


Dr. Laurence D. Hurst (e-mail: bssldh@bath.ac.uk) je prezidentem Genetické společnosti a profesorem evoluční genetiky a ředitelem Milnerova centra pro evoluci (Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, UK.). Specializuje se především na využití matematických technik pro pochopení způsobu evoluce genů a genomů.

“DNA jako občanský průkaz. Lekce z genetiky” (Munice, Munipress)

Pavel Lízal

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita,
Kamenice 5, 625 00 Brno



Tento článek je volným přepisem přednášky, která se konala u příležitosti slavnostního křtu popularizační knihy “DNA jako občanský průkaz”. Název přednášky byl “Jak vypadám? Zeptej se mé DNA.”

Zvolil jsem kapitolu, ve které popisují zcela fascinující možnosti předpovědi toho, jak vypadáme - tedy jakou máme barvu očí, vlasů, barvu kůže nebo dokonce i morfologii tváře - a to vše pouze na základě sekvencí naší DNA. Je to tedy kapitola, která nejvíce koresponduje s názvem knihy.

Samozřejmě můžete namítat, že je vhodnější k identifikaci osoby použít právě občanský průkaz. My se však budeme zabývat využitím těchto možností tam, kde danou osobu vůbec neznáme a jediné, co máme k dispozici, je pouze její DNA. Největší využití je proto zejména v kriminalistice, kde

se na základě zanechané biologické stopy, která obsahuje DNA (například krev, sperma, vlasy, sliny apod.), můžeme dozvědět, jak vypadá zejména pachatel trestného činu. Můžeme se však dozvědět i to, jak vypadá například i oběť trestného činu, které se pachatel zbavil (zakopal na neznámém místě, vhodil do řeky apod.), protože se například s obětí znal a mohl by být tak dříve dopaden. Na místě činu však zůstane například krev oběti, ze které může být získána DNA pro tuto analýzu. Podobně by se tak dalo vyhlásit pátrání i po svědcích, pokud na místě zanechali svoji DNA. Je zřejmé, že by se tímto dalo vyšetřování významně urychlit. V přednášce vám však také ukážu, že využití těchto metod může být velmi zajímavé i mimo kriminalistiku, kdy se například z DNA získané z kosterních pozůstatků můžeme dozvědět i to, jak vypadala určitá historická osobnost.

Jak je možné, že jsme schopni z DNA předpovídat tak komplikované znaky, jakými jsou například zmiňovaná barva očí a vlasů. Předpokládám, že již každý z vás ví, že molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která je nositelkou genetické informace, je tvořena ze 4 písmenek A (adenin), T (tymin), C (cytozin), G (guanin), jejichž pořadí pak kóduje konkrétní gen, například pro barvu očí. Zde si však musíme uvědomit, že barva očí, vlasů nebo kůže jsou znaky, které jsou kódovány velkým počtem genů, to znamená, že je musíme nejdříve najít, abychom pak následně mohli podobu těchto charakteristik předpovídat. K tomu se v posledních letech s velmi dobrými výsledky využívají populační studie, které jsou založeny na tom, že můžeme porovnávat sekvence DNA jak v rámci hnědookých, tak v rámci modroookých jedinců, ale také srovnávat tyto sekvence mezi hnědookými a modroookými navzájem. Takto můžeme například zjistit, že hnědoocí mají v určitém místě písmenko A, tedy adenin, zatímco modroocí mají ve stejném místě písmenko G, tedy guanin. Tato odlišnost mezi hnědookými a modroookými tak může být využita k předpovědi daného zbarvení očí. Odborně se těmto místům říká SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) a jedná se o odlišnost mezi jedinci v jednom konkrétním nukleotidu na konkrétním místě. Můžeme si ji představit jako jakousi značku v DNA, která nám říká, zda jedinec bude mít hnědou nebo modrou barvu očí. Samozřejmě jedna taková značka k předpovědi nestačí, pokud však takových značek máme více, tak na základě jejich konkrétní sestavy, můžeme statisticky předpovědět, s jakou pravděpodobností má daný jedinec danou barvu očí.

Pokud je pak na místě trestného činu nalezena nějaká biologická stopa, ze které můžeme získat DNA, pak na základě sestavy těchto značek můžeme učinit danou předpověď. Například, že nositel této analyzované DNA má na 99,7 % hnědé oči nebo naopak, že její nositel má na 96,8 % oči modré.

Pojďme se nyní letmo podívat do historie vzniku těchto předpovědních modelů pro jednotlivé zmiňované znaky. První pokusy o předpověď barvy očí se datují do roku 2008, kdy bylo nalezeno 13 značek, pomocí kterých bylo možné určit prozatím pouze modrookost. Od roku 2011 však již máme k dispozici dostatek značek, pomocí kterých lze předpovídat nejen modrou, ale i hnědou nebo zelenou barvu očí. Vzniká tak první předpovědní model s názvem IrisPlex, který je založen na 6 značkách v několika genech. Snahy předpovědět barvu vlasů začínají v roce 2007, kdy bylo objeveno 5 značek, pomocí kterých bylo možné předpovídat zrzavou barvu vlasů. V dalších letech byly nalezeny další značky, které umožnily předpovídat blondatou nebo hnědou barvu vlasů. Od roku 2013 tak existuje předpovědní model HIrisPlex, který vedle původních 6 značek pro předpověď barvy očí obsahuje i 18 značek pro předpověď barvy vlasů.

S hledáním značek pro určování barvy kůže se začíná v roce 2010, kdy byly vytipovány první 3 značky. Postupem času bylo získáno až současných 17 značek, které umožňují s vysokou pravděpodobností předpovídat zbarvení kůže a tyto byly přidány ke značkám předchozím. V roce 2018 tak vzniká nový předpovědní systém HIrisPlex-S, který v jedné analýze stanovuje trio uvedených znaků.

Před každým zavedením takového předpovědního modelu však bylo třeba ověřit jeho spolehlivost, zejména pokud má být na základě něho stanovena identita pachatele trestného činu, což může mít závažné následky pro danou osobu. Ve všech případech se tedy postupovalo tak, že ověřovací laboratoře dostaly vzorky neznámé DNA a na základě aplikace předpovědního modelu měly určit jakou barvu očí, vlasů a kůže daná osoba má. Na ukázkou si představíme analýzu dvou takových vzorků. Podle analýzy vzorku číslo jedna má daná osoba hnědé oči (pravděpodobnost 99,7 %), tmavé vlasy (91,9 %) a

tmavou barvu kůže (99,8 %). Fotografie reálné osoby potvrdila, že barva očí, vlasů i kůže je v souladu s touto předpovědí. Jiný vzorek DNA ukázal, že její nositel nebo nositelka má na 96,8 % modré oči, na 93,4 % zrzavé vlasy a na 98,7 % světlou barvu kůže, což opět potvrdila fotografie dané osoby. Na základě uvedeného je tedy zřejmé, že tato metoda je spolehlivě použitelná a to nejen v kriminalistické praxi. Pojďme se proto podívat na jeden příklad využití těchto přístupů pro identifikaci historických osobností.

Konkrétně se jedná o anglického krále Richarda III., jehož kosterní pozůstatky byly nalezeny v roce 2012. Na začátku bylo nutné potvrdit, že se opravdu jedná o kosterní pozůstatky Richarda III., k čemuž se vedle antropologických metod využila právě i analýza DNA, pomocí které bylo skutečně prokázáno, že jde o pozůstatky tohoto posledního anglického krále, který padl v boji. Pokud vás zajímá, jak tato analýza probíhala, pak si o ní můžete více přečíst v uvedené knize. Vzhledem k tomu, že tato identifikace probíhala v době, kdy byl již k dispozici předpovědní systém pro stanovení barvy očí a vlasů, byla tato metoda použita pro předpověď barvy očí a vlasů Richarda III. Analýza DNA byla za tímto účelem provedena v roce 2014 a bylo předpovězeno, že Richard III. měl na 96 % modré oči. Toto zjištění se však překvapivě neshodovalo s antropology provedenými rekonstrukcemi podoby, kde má Richard III. tmavě hnědé oči a neshodovalo se ani s jeho dobovými portréty. Bylo tedy nutné tento rozpor vysvětlit. Dle umělců mohla být tmavá barva očí na portrétech výsledkem uměleckého přístupu, při kterém byly známým osobnostem po jejich smrti často malovány tmavé oči a tmavé vlasy. Cílem bylo umocnit jejich charismatickou roli, kdy díky tmavé barvě měly vypadat dominantněji a silněji. Vědci se proto rozhodli pátrat po portrétech Richarda III. z doby, kdy ještě žil. Takové portréty se opravdu podařilo najít a Richard III. má na těchto obrazech opravdu světlé oči. Potvrdilo se tak, že DNA o barvě očí nelže. Dále bylo pomocí DNA předpovězeno, že Richard III. měl na 77 % světlé vlasy. To však opět bylo v rozporu a to nejen s portréty malovanými po jeho smrti, ale i s portréty malovanými za jeho života, kde má modré oči. Rozběhlo se proto pátrání po příčině toho dalšího nesouladu. Zde se jako výhoda ukázaly být populační studie. V populaci byly vyhledány osoby, které mají stejnou sestavu značek pro barvu očí a vlasů, jakou má Richard III. Ukázalo se, že všechny takové osoby mají modrou barvu očí, avšak liší se v barvě vlasů. Někteří měli vlasy světlé, ale někteří měli vlasy naopak tmavé. Nakonec se zjistilo, že tyto osoby s tmavými vlasy je v dětství měly blondaté a teprve v dospívání jim ztmavly. Je tedy zřejmé, že DNA ani v tomto případě nelhala a navíc nám přinesla nový poznatek, že Richard III. byl v dětství blondák a teprve postupem času mu vlasy ztmavly tak, jako to vidíme na zmiňovaných portrétech.

V další části bych vám chtěl představit pro mne samotného naprosto neuvěřitelnou možnost stanovit z DNA dokonce i to, jak daná osoba vypadá v obličeji, tedy jakou má tvář. Stanovení podoby tváře bych si dovolil nazvat svatým grálem forenzní genetiky vzhledem k tomu, že identifikace tváře by znamenala velmi významný posun například při pátrání po pachatelech trestných činů. Nicméně je zřejmé, že předpovídat tak komplikovaný znak, jakým je morfologie tváře, bude mnohem náročnější, než v případě barvy očí vlasů nebo kůže. Hledání značek a vytvoření statistického předpovědního modelu se proto ujaly komerční společnosti, z nichž asi nejznámější v tomto ohledu je firma *Parabon Nanolabs* se svým předpovědním systémem *Snapshot*. Tento je založen na zhruba 850 000 značkách v DNA, pomocí kterých lze předpovědět, jak daná osoba vypadá, tedy udělat něco, co bychom mohli nazvat jako genetických identikit. Opět i v tomto případě musely být provedeny ověřovací pokusy. V jednom z konkrétních případů poskytla svoji DNA např. redaktorka amerického televizního kanálu *Discovery*. Společnost

Parabon Nanolabs provedla z její DNA předpověď její tváře, aniž by tušila, o jakou osobu se jedná. Takto předpovězená tvář včetně barvy očí, vlasů a kůže byla naprosto šokujícím způsobem podobná její reálné fotografii a tedy její skutečné podobě. Série dalších ověřovacích pokusů potvrdila, že metoda je nejen dostatečně spolehlivá, ale zejména umí něco, o čemž bychom mohli pochybovat, že je vůbec možné. Rád bych vám proto popsal první úspěšné nasazení této metody v kriminalistické praxi.

Jedná se o případ hledání pachatele dvojnásobné vraždy manželů Frenchových, která se stala 4. února 2012 v severní Karolíně v USA. Osudné noci došlo ke vloupání do domu těchto manželů, při kterém lupič probudil v patře spící dceru. Pachatel přiložil ke krku křičící dcery nůž, čímž ji chtěl přimět k tomu, aby přestala křičet. Její křik však stačil probudit rodiče spící v přízemí domu, kteří k ní přiběhli na pomoc. Pachatel vytáhl pistoli, rodiče zastřelil a následně z domu utekl. Při manipulaci s nožem se však sám pořezal a na zábradlí schodiště zanechal krvavou stopu, ze které mohla být získána DNA pro jeho pozdější identifikaci. Dcera zavražděných vypověděla, že pachatel byl podobný jejímu příteli Johnu Alvarezovi, ale tvrdila, že o něj se nejednalo, protože by ho stoprocentně poznala. Tuto výpověď potvrdila i analýza DNA, konkrétně takzvané profilování DNA, metoda, která je dnes zcela standardně používána pro identifikaci osob nejen v kriminalistice. Tato analýza je založena na srovnání nekódujících úseků v DNA. Neumí nám tedy poskytnout žádnou informaci o tom, jak osoba vypadá, ale na základě shody v těchto sekvencích je možné s velmi vysokou spolehlivostí prokázat, že DNA získaná ze dvou různých biologických vzorků, např. DNA z místa činu a DNA podezřelé osoby, patří jedné a téže osobě. Této metodě je věnováno několik kapitol v představované knize. Provedené profilování pomocí DNA v tomto uvedeném případě však přineslo jeden zajímavý poznatek. Analýza DNA nasvědčovala, že DNA ze zábradlí by mohla být nějaké příbuzné osoby dívčina přítele, což bylo v souladu s její předchozí výpovědí. Proto vyšetřovatelé provedli analýzu příbuznosti, o které se opět můžete více dozvědět v knížce. Tato analýza však vyloučila, že by pachatelem mohl být někdo z rodiny Alvarezových (v úvahu připadal jeho bratr nebo otec). Vzhledem k tomu, že další vyšetřování k dopadení pachatele nevedlo, rozhodli se vyšetřovatelé v roce 2015 oslovit firmu *Parabon Nanolabs*, aby provedla předpověď podoby pachatele z DNA pomocí jejich předpovědního modelu *Snapshot*. Tato analýza byla provedena v květnu 2015 a ukázala, že pachatel má velmi světlou pleť, hnědé oči, tmavé vlasy a má smíšený původ – z jedné poloviny evropský a z jedné poloviny latinskoamerický, což vyšetřovatele opět navedlo k rodině Alvarezových, kteří jsou právě takovým smíšeným manželstvím. Vymodelována byla také podoba tváře, která byla velmi podobná bratru dívčina přítele José Alvarezovi mladšímu. José Alvarez mladší i José Alvarez starší následně dobrovolně poskytli svoji DNA pro profilování. To jednoznačně prokázalo, že pachatelem byl opravdu José Alvarez mladší. Na základě uvedených důkazů byl v srpnu 2015 zatčen a v červenci 2016 odsouzen ke dvěma po sobě jdoucím doživotním trestům bez možnosti podmíněčného propuštění. Možná se teď někteří ptáte, jak to, že předchozí analýza příbuznosti jej jako pachatele vyloučila. I na to odpovědělo provedené profilování, které ukázalo, že José Alvarez starší není skutečným biologickým otcem José Alvarez mladšího.

Tento případ tak ukázal, jak skvělá metoda předpovídání podoby na základě DNA je a že se může velmi dobře doplňovat se starší metodou DNA profilování. Na webu firmy *Parabon Nanolabs* se můžeme dočíst již o 34 zveřejněných případech, v nichž byl pomocí této metody dopaden pachatel.

Na závěr bych se ještě rád zmínil i o jednom uměleckém využití představených metod. Konkrétně se jedná o projekt "*Stranger Visions*" umělkyně Heather Dewey-Hagborgové, která sbírá biologické vzorky ve městech Brooklyn a New York, například žvýkačky, nedopalky cigaret, vlasy a další, z nichž izoluje DNA. Pomocí programu *Snapshot* pak předpovídá barvu očí, kůže a morfologii tváře. Na základě této předpovědi pak pomocí 3D tiskárny vytiskne prostorový model tváře a následně doplní barvu očí a kůže. Tímto postupem vytvořila výstavu s modely tváří osob, které zanechaly příslušné biologické stopy a s touto výstavou jezdí po světě a ukazuje tak, jaké jsou možnosti dnešní molekulární genetiky.

V knížce se můžete dočíst i o dalších možnostech, které nás čekají v budoucnosti. Aktuálně se například pracuje na předpovědním modelu pro výšku postavy, kudrnatost vlasů, předčasnou plešatost, pihovatost tváře nebo dokonce na šokující možnosti předpovědět z DNA i příjmení jejího nositele. Budoucnost zločinu je tedy díky pokrokům v genetice a molekulární biologii velmi černá.



RNDr. Pavel Lízal, Ph.D. (e-mail: lizal@sci.muni.cz) působí jako lektor na Ústavu experimentální biologie PŘF Masarykovy univerzity. Ve své výuce se zaměřuje především na populační genetiku a paleogenetiku člověka. Intenzivní přednáškovou činností nejen na Masarykově univerzitě, ale také například na gymnáziích nebo akcích pro širokou veřejnost se snaží popularizovat genetiku a vědecké poznatky v této oblasti.

Cenu dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej v roku 2019 získal Adam Tomašových z Ústavu vied o Zemi SAV

Ľubomír Tomáška

Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzity Komenského, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

Šestnástého decembra 2019 sa v Prezentačnom centre AMOS Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského (PriF UK) v Bratislave uskutočnil 4. ročník slávnostného odovzdávania Ceny dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej (viac o Cene a Štipendiu pozri: <http://www.natura.cz/LSR.html>). Slávnostný ceremoniál prebehol za účasti prorektora UK doc. Jozefa Tancera, dekana PriF UK prof. Petra Fedora, sponzora ocenení Ing. Viliama Sedlára, jeho zástupcu Ing. Petra Robla, predsedníčky občianskeho združenia Natura Ing. Marty Nyboháčovej a viac ako piatich desiatok príslušníkov akademickej obce.



Držiteľka Štipendia za rok 2019 Mgr. Miriam Pillerová s dekanom PriF UK prof. Petrom Fedorom (vpravo) a Mgr. Petrom Roblom. Foto: Vladimír Kuric, Univerzita Komenského v Bratislave.

Medzi účastníkmi boli aj traja doterajší držitelia Ceny, dr. Silvia Bágel'ová-Poláková (2016), doc. Peter Vďačný (2017) i minuloročná laureátka dr. Katarína Boďová. Je potešiteľné, že práve ona v roku 2018 začala vyučovať kurz venovaný populačnej a kvantitatívnej genetike na PriF UK. Unikátnu kombináciu vedomostí z matematiky a genetiky, za ktorú získala Cenu v roku 2018, tak môže odovzdávať poslucháčom biologických študijných programov.

Bilanciu uplynulého roku zavŕšili prezentácie držiteľov Štipendia za rok 2018. Dr. Filip Červenák (Katedra genetiky, PriF UK) strávil jeden mesiac na Stredoeurópskom technologickom inštitúte (*Central European Institute of Technology, CEITEC*) Masarykovej univerzity, kde sa v laboratóriu prof. Jiřího Fajkusa naučil niekoľko moderných techník zameraných na štúdium udržiavania koncov lineárnych molekúl DNA (telomér). Bc. Barbora Gromová (PriF UK a Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta UK) získala podporu na pobyt na *Harvard Medical School* (Boston, USA), kde sa venovala problematike terapie zápalových ochorení typu Crohnovej choroby degradáciou cirkulujúcej DNA. Posledná štipendistka z roku 2018, dr. Barbora Konečná, bola v čase konania ceremonie stále na zahraničnej ceste a o svojich výsledkoch bude informovať v roku 2020.

Štipendium dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej za rok 2019 získala **Mgr. Miriam Pillerová** z Ústavu molekulárnej biomedicíny (Lekárska fakulta UK) na finančnú podporu jej pobytu v laboratóriu prof. Karyn M. Frickovej (*Department of Psychology, University of Wisconsin-Milwaukee, USA*), kde sa bude venovať úlohe receptorov pre pohlavné hormóny v mozgu so zameraním na úzkosť, depresiu a kogníciu.

Z nominácií, ktoré boli poslané do súťaže o Cenu dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej sa päť dostalo do finále. Štyroch nominovaných ocenila komisia čestným uznaním. Dr. Kristína Hasáková (Katedra živočíšnej fyziológie a etológie PriF UK) ho získala za príspevok do oblasti štúdia úlohy malých nekódujúcich RNA v činnosti periférneho cirkadiálneho systému v nádorových tkanivách kolorektálneho karcinómu (Hasáková a kol., 2019); Mgr. Juraj Gazdarica (Katedra molekulárnej biológie PriF UK) za genomické štúdie venujúce sa metódam prenatalnej diagnostiky závažných chromozómových porúch (Gazdarica a kol., 2019; Budiš a kol., 2019); Mgr. Zuzana Kubiritová (Katedra molekulárnej biológie PriF UK) za prácu popisujúcu originálne prístupy k genetickej diagnostike založenej na dátach z celogenómových analýz (Kubiritová a kol., 2019) a doc. Čestmír Altaner (Biomedicínske centrum SAV) za práce venované novým možnostiam využitia kmeňových buniek pre génovú terapiu (Altanerová a kol., 2019; Altaner a kol., 2019; Altaner a Altanerová, 2019).

Cenu dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej za rok 2019 získal **dr. Adam Tomašových** z Ústavu vied o Zemi SAV za sériu 8 prác (pozri zoznam referencií) publikovaných v roku 2019. Adam Tomašových počas svojej relatívne krátkej vedeckej kariéry originálnymi výsledkami významnou mierou prispel do rozvoja oblastí, ktoré sú mu najbližšie: (1) empirické prístupy a modelovanie dynamiky fosilizovaných procesov; (2) biogeografia a makroekológia spoločentiev s morskými bezstavovcami; (3) evolučná ekológia druhohorných a treťohorných morských ekosystémov a masové vymierania na konci triasu; a (4) konzervačná paleobiológia morských ekosystémov na kontinentálnych šelfoch. V prácach publikovaných v roku 2019 do týchto oblastí prispel viacerými cennými pozorovaniami. Na základe paleoekologického výskumu holocénnych vrtoŕ odobraných v severnom Jadranskom mori zistil, že v tejto oblasti došlo k rozsiahlej degradácii bentických ekosystémov s morskou vegetáciou a k výraznému poklesu karbonátovej

produkcie ešte v prvej polovici 20. storočia, teda ešte pred nástupom silnej eutrofikácie a znečistenia po roku 1950. Toto zistenie je založené na stratigrafickej metodike ktorú dr. Tomašových so spoluautormi vyvinuli a publikovali v rokoch 2014-2018. Pozvaný komentár v *Nature Ecology & Evolution* ilustruje, že dr. Tomašových je medzinárodne uznávaným odborníkom s veľkým rešpektom v širokej vedeckej komunite odborníkov venujúcich sa evolučnej biológii.



Laureát Ceny za rok 2019 dr. Adam Tomašových (vpravo) s Mgr. Petrom Roblom. Foto: Vladimír Kuric, Univerzita Komenského v Bratislave.

Štvrtý ročník súťaže o Cenu dr. Ludmily Sedlárovej-Rabanovej opäť ilustroval, že aj v slovenských podmienkach sa dá robiť výskum prinášajúci veľmi kvalitné výsledky. Fakt, že doterajší laureáti sú z relatívne vzdialených oblastí (biochémia, genetika, zoológia, matematika, informatika, vedy o Zemi) ukazuje, že ceremoniál udeľovania ocenení je unikátnym miestom stretávania ľudí, ktorých vedecké zameranie je síce veľmi rôznorodé, ale má rovnaký cieľ: kvalitný výskum dôležitých prírodných fenoménov.

Referencie (tučným písmom sú zvýraznení ocenení):

1. **Altaner, Č.**, Altanerová, U. (2019). Mesenchymal stem cell exosome-mediated prodrug gene therapy for cancer. *Methods Mol. Biol.* **1895**: 75-85.
2. **Altaner, Č.**, Altanerová, U., Jakubechová, J. (2019). Intracellular acting tumor cell-targeted chemotherapy by MSC-suicide gene exosomes. *Oncotarget* **10**(54):5573-5575.

3. Altanerová, U., Jakubechová, J., Benejová, K., Priščáková, P., Pesta, M., Pitule, P., Topolčan, O., Kaušitz, J., Zdurienčíková, M., Repiská, V., **Altaner, Č.** (2019). *Int. J. Cancer* **144**(4) :897-908.
4. Buckeridge, J., Kočí, T., Schlögl, J., **Tomašových, A.**, Kočová Veselská, M. (2019). Deep-water cirripedes colonizing dead shells of the cephalopod *Nautilus macromphalus* from New Caledonian waters. *Integrative Zoology* **14**(6): 561-575.
5. Budiš, J., **Gazdarica, J.**, Radvanszký, J., Haršanyová, M., Gazdaricová, I., Striešková, L., Frno, R., Ďuriš, F., Minárik, G., Sekelská, M., Nagy, B., Szemes, T. (2019). Non-invasive prenatal testing as a valuable source of population specific allelic frequencies. *J Biotechnol.* **299**: 72-78.
6. Gallmetzer, I., Haselmair, A., **Tomašových, A.**, Mautner, A.K., Schnedl, S.M., Cassin, D., Zonta, R., Zuschin, M. (2019). Tracing origin and collapse of Holocene benthic baseline communities in the northern Adriatic Sea. *Palaios* **34**(3): 121-145.
7. **Gazdarica, J.**, Hekel, R., Budiš, J., Kucharík, M., Ďuriš, F., Radvanszký, J., Turňa, J., Szemes, T. (2019). Combination of fetal fraction estimators based on fragment lengths and fragment counts in non-invasive prenatal testing. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(16): pii: E3959.
8. **Hasáková, K.**, Reis, R., Vician, M., Zeman, M., Herichová, I. (2019). Expression of miR-34a-5p is up-regulated in human colorectal cancer and correlates with survival and clock gene *PER2* expression. *PLoS One* **14**(10): e0224396.
9. Ivanova, D.K., Schlögl, J., **Tomašových, A.**, Lathuiliere, B., Golej, M. (2019). Revisiting the age of Jurassic coral bioherms in the Pieniny Klippen Belt (Western Carpathians) on the basis of benthic foraminifers. *Geologica Carpathica* **70**(2): 113-134.
10. **Kubiritová, Z.**, Gyuraszová, M., Nagyová, E., Hyblová, M., Haršanyová, M., Budiš, J., Hekel, R., Gazdarica, J., Ďuriš, F., Kadáši, L., Szemes, T., Radvanszký, J. (2019). On the critical evaluation and confirmation of germline sequence variants identified using massively parallel sequencing. *J. Biotech.* **298**: 64-75.
11. Leonard-Pingel, J.S., Kidwell, S.M., **Tomašových, A.**, Alexander, C.R., Cadien, D.B. (2019). Gauging benthic recovery from 20th century pollution on the southern California continental shelf using bivalves from sediment cores. *Marine Ecology Progress Series* **615**: 101-119.
12. Rollion-Bard, C., Garcia, S.M., Burckel, P., Angiolini, L., Juríková, H., **Tomašových, A.**, Henkel, D. (2019). Assessing the biomineralization processes in the shell layers of modern brachiopods from oxygen isotopic composition and elemental ratios: Implications for their use as paleoenvironmental proxies. *Chemical Geology* **524**: 499-526.
13. **Tomašových, A.** (2019). Biodiversity gradients emerge. *Nature Ecology & Evolution* **3**(10): 1376-1377.
14. **Tomašových, A.**, Gallmetzer, I., Haselmair, A., Kaufman, D.S., Mavric, B., Zuschin, M. (2019). A decline in molluscan carbonate production driven by the loss of vegetated habitats encoded in the Holocene sedimentary record of the Gulf of Trieste. *Sedimentology* **66**(3): 781-807.
15. **Tomašových, A.**, Kidwell, S.M., Alexander, C.R., Kaufman, D.S. (2019). Millennial-scale age offsets within fossil assemblages: Result of bioturbation below the taphonomic active zone and out-of-phase production. *Paleoceanography & Paleoclimatology* **34**(6): 954-977.

O zmyslupnom hodnotení študentov

Lubomír Tomáška

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

Majstrovská sveta v atletike 2019, Doha, Saudská Arábia. Päťdesiat šprintérov sa v rozbehoch na 100 m pokúša kvalifikovať do semifinále. Najlepší čas (9,98 sekundy) dosahuje budúci majster sveta Američan Christian Coleman. Ďalšie poradie určujú časy, ktoré sa od najlepšieho líšia postupne o 3 až 42 stotín sekundy. Poradie je jednoznačne stanovené nameranými časmi a poradím atlétov v jednotlivých rozbehoch. Je teda objektívnym zhodnotením výkonov šprintérov.

Pokúsme sa na základe týchto nameraných výkonov všetkých atlétov ohodnotiť známkami od A-FX. Jedna z možností je, že všetkým, ktorí sa nekvalifikovali do semifinále, udelíme FX, keďže nespĺnili požiadavky nastavené pravidlami súťaže. Keď sa však pozrieme do tabuľky, rozdiel medzi posledným kvalifikovaným a prvým nekvalifikovaným šprintérom je presne nula sekúnd. O kvalifikácii šťastnejšieho atléta rozhodlo, že štartoval v rozbehu, v ktorom sa umiestnil s rovnakým časom na vyššej priečke, ako jeho kolega, ktorý v rozbehu súťažil s rýchlejšími borcami. Pritom stačilo, aby bolo na atletickom ovále o jednu dráhu navyše a kvalifikovať sa mohli ďalší traja atléti. Ilustruje to, že hranica určujúca, kto sa kvalifikuje do ďalšieho kola, je arbitrárna a má čisto technické dôvody. Fakt, že dvaja atléti s tým istým časom sú hodnotení dvomi odlišnými známkami zásadne ovplyvňujúcimi ich osud naznačuje, že s hodnotením FX šprintérov, ktorí nepostúpili do ďalšieho kola, je potrebné zaobchádzať nanajvýš opatrne.

Zatiaľ sme riešili iba otázku, kde postaviť hranicu medzi prosperel-neprosperel. Nech teda prospeli iba tí atléti, ktorí postúpili do semifinále. Ohodnotíme ich známkami na základe časov, ktoré dosiahli. Prvý Coleman zabehol rozbeh za 9,98 sekundy, dvadsiatyštvrtý (bežali sa tri semifinále po ôsmych bežcoch) Brit Ojie Edoburun 10,23 sekundy. Prvý scenár: rozdelíme 25 stotín sekundy, reprezentujúcich rozdiel medzi prvým a posledným kvalifikovaným šprintérom, po 5 stotínach a každému intervalu pridáme postupne A až E. Druhý scenár: A udelíme iba Colemanovi (bol najlepší a jediný bežal pod 10 sekúnd) a zvyšných 23 stotín rozdelíme na 4 intervaly (B-E) po 5 až 6 stotínach. Tretí scenár: neudelíme žiadne A, svetový rekord Usaina Bolta je 9,58 sekundy a A by mal dostať iba atlét, ktorý bude bežať na jeho úrovni (alebo rýchlejšie). Coleman si zaslúži B, alebo ešte lepšie C; záver behu odflákol a vie bežať aj rýchlejšie (v semifinále zabehol za 9,88 a vo finále 9,76 sekundy). Štvrtý scenár:...

Príklad so šprintérmi ilustruje, že aj v prípade, keď vieme zostaviť poradie súťažiacich podľa objektívne merateľných ukazovateľov, je ich rozdelenie do arbitrárnych skupín zaťažené subjektívnym určením hraníc medzi nimi. O to ťažšie je to v prípade, že objektívne merateľné ukazovatele nemáme k dispozícii. Tu je niekoľko príkladov, ktoré uvádza

Albert-Laszló Barabási vo svojej knižke *The Formula: The Universal Laws of Success*.¹

Súťaž vín je pre vinárov nielen možnosť predstaviť svoje produkty. Medaila na etikete zvyšuje cenu vína i prestíž vinárstva. Vína hodnotia skúsení someliéri, ktorých komunita vinárov akceptuje ako expertov na posúdenie kvality, a tak i stanovenie objektívneho poradia súťažiacich vín. Pritom, na základe výsledkov experimentu Roberta Hogsona vieme, že ak ten istý someliér ochutná to isté víno počas súťaže trikrát (náhodne zaradené medzi ostatné vzorky), v 82 percentách prípadov mu dá tri veľmi odlišné hodnotenia. To znamená, že okrem variability hodnotenia medzi jednotlivými someliérmi, ten istý someliér je nekonzistentný pri hodnotení toho istého nápoja. To isté víno hodnotené viackrát tým istým človekom sa tak ocitá raz v šedej zóne priemerných a o chvíľu medzi zlatými medailistami.²

Prestížna súťaž talentovaných interpretov klasickej hudby. Členmi poroty sú etablovaní odborníci, ktorí z desiatok hudobníkov vyberú tých najlepších, ktorí tak okrem finančnej odmeny získavajú cenný bonus pre úspešný štart ich kariéry. Okrem oficiálnej súťaže paralelne prebieha aj hlasovanie amatérov. Výsledok: poradie sa do veľkej miery prekrýva s poradím stanoveným expertami. A to napriek tomu, že amatérski porotcovia súťažiacich iba videli na videu, na ktorom bol vypnutý zvuk. Dokonca tí, ktorí nepočuli interpreta sa s profesionálnymi porotcami zhodovali viac ako tí, ktorí ho videli aj počuli.³ Parameter, na základe ktorého mali byť súťažiaci hodnotení, sa tak ukázal ako nedôležitý pre zostavenie poradia.

Zato poradie, v ktorom súťažiaci vystupujú, môže byť dôležité pre ich umiestnenie. Súťaž mladých interpretov klasickej hudby *Queen Elisabeth International Music Competition* sa uskutočňuje s krátkymi prestávkami od roku 1937. Má prísne pravidlá, ktoré zaručujú spravodlivé posúdenie súťažiacich. Napríklad všetci hrajú tú istú skladbu, ktorá bola zložená iba pre potreby súťaže a na jej nacvičenie majú ten istý čas. Aby bola zabezpečená rovnosť šancí, poradie, v ktorom vystúpia v priebehu šiestich dní, si vylosujú. Práve toto pravidlo však vedie k tomu, že za vyše 70 rokov nevyhral interpret, ktorý vystúpil prvý deň, dvaja víťazi vystúpili na druhý deň a iba jeden laureát predviedol svoje umenie posledný deň súťaže. Polovica víťazov vystúpila pred porotou v priebehu piateho dňa súťaže. Štatistická analýza výsledkov viedla k záveru, že viac ako kvalita vystúpení rozhodovalo poradie, v ktorom sa súťažiaci predstavili.⁴ A neplatí to iba pri hudobných súťažiach, ale napríklad aj pri krasokorčuľovaní, kde sa známky v kvalifikačnom kole systematicky zvyšujú podľa poradia, v ktorom nastupujú súťažiaci na ľad napriek tomu, že poradie si pred súťažou losujú.⁵ Podobne, výber sudcov v Španielsku prebieha počas jedného týždňa pred porotou, pričom poradie adeptov určuje los. Hlavným prediktorom ich úspechu je pritom deň, kedy predstúpia pred hodnotiteľov (pre zaujímavosť, pondelok je katastrofa, zatiaľ čo piatok poskytuje 75 percentnú šancu uspieť).¹

¹Barabási, A.-L. (2018). *The Formula: The Universal Laws of Success* (Little, Brown and Company).

²Derbyshire, D. (2013). Wine-tasting: it's junk science. *The Guardian*;

<https://www.theguardian.com/lifeandstyle/2013/jun/23/wine-tasting-junk-science-analysis>

³Tsay, C.J. (2013). Sight over sound in the judgment of music performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 14580–14585.

Ísť posledný je výhodou i pri ústnych prijímacích pohovoroch na postdoktorálny pobyt na prestížnych amerických univerzitách. Nie je to preto, že uchádzači, ktorí sa dostanú na rad neskôr, lepšie odpovedajú na otázky členov komisie, ale preto, lebo členovia komisie vďaka skúsenostiam, ktoré získali pri spovedaní predchádzajúcich adeptov, kladú lepšie otázky. Bonusom zvyšujúcim šancu na úspech môže byť zvláštne tetovanie, chytľavý smiech, či kriľavé tenisky, teda ukazovatele, ktoré síce vyčleňujú adepta spomedzi ostatných, vôbec však nesúvisia s parametrami, ktoré sú predmetom pohovorov.¹ Hodnotenie uchádzačov tak nereflektuje ich kvalitu, ale mentálne nastavenie hodnotiteľov.

Je potrebné dodať, že uvedené problémy s hodnotením nastávajú v prípadoch, že v posudzovanej množine sú kandidáti, ktorí prešli primárnym kolom selekcie. Do rozbehov na 100 metrov sa na majstrovstvách sveta dostanú iba atléti, ktorí splnia prísne časové limity; do prestížnej súťaže vín sa nedostanú vzorky, ktoré nespĺňajú všeobecne akceptovateľné kritériá; v hudobných súťažiach typu *Queen Elisabeth International Music Competition* nie sú účastníci, ktorí by výborne neovládali svoj nástroj; na ústne pohovory na postdoktorálnu pozíciu na špičkovú univerzitu sú pozývaní uchádzači vybraní na základe písomných materiálov.

V skupine, ktorej príslušníci sa v nej ocitli na základe prísneho výberu, tak nevyhnutne vznikajú problémy s ich odlišením podľa kvality. Zvlášť, keď nie je k dispozícii spôsob, ako ich objektívne zmerať: súťaže interpretov klasickej či populárnej hudby, literárne a filmové ceny, súťaže o najlepšie vína, meranie kvality učiteľov, hodnotenie grantových projektov [v tomto prípade sa ukazuje ako najlepšia stratégia losovanie] ... a známkovanie vysokoškolských študentov, ktorí boli vybratí na príslušný študijný program na základe prijímacích pohovorov (s predpokladom, že tieto prijímacie pohovory úspešne nezvládnu všetci zúčastnení).

Sme v zajatí našej ambície výkony ľudí v týchto činnostiach deliť do kategórií: vynikajúci-výborný-priemerný-podpriemerný-nevyhovujúci, A-B-C-D-E-FX, 1-2-3-4-5. Richard Dawkins v knihe *Príbeh predka* túto ambíciu nazýva *delusion of discontinuity* (ilúzia prerušovanosti), kde máme pocit, že spojitý rad je možné arbitrárne rozdeliť na diskkrétne skupiny. To, odvolávajúc sa na evolučného biológa Ernsta Mayra, bolo okrem iného dôvodom, prečo sa v duchu platónovského esencializmu druhý považovali za stále jednotky, pričom rozdielnosti ich individuálnych príslušníkov boli interpretované ako odchýlky od ideálu (esencie).

⁴Flôres, R.G., and Ginsburgh, V.A. (1996). The Queen Elisabeth Musical Competition: How fair is the final ranking? *Stat. R. Stat. Soc.* 45, 97–104.

⁵Bruine de Bruin, W. (2005). Save the last dance for me: Unwanted serial position effects injury evaluations. *Acta Psychol. (Amst)*. 118, 245–260.

⁶Adam, D. (2019). Science funders gamble on grant lotteries. *Nature* doi: 10.1038/d41586-019-03572-7.

⁷Dawkins, R., and Wong, Y. (2004). *The ancestor's tale: a pilgrimage to the dawn of evolution* (Houghton Mifflin Harcourt).

⁸Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M.J., Donati, C., Medini, D., Ward, N.L., Angiuoli, S. V., Crabtree, J., Jones, A.L., Durkin, A.S., et al. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13950–13955; ; Barras, C. (2019). Human or hybrid? The big debate over what a species really is. *New Scientist*, 23. január 2019; <https://www.newscientist.com/article/mg24132140-200-human-or-hybrid-the-big-debate-over-what-a-species-really-is/>.

Dnes vieme, že hranice medzi biologickými druhmi sú veľmi rozmazané a napríklad v prípade prokaryotických mikroorganizmov sa už od koncepcie druhu *sensu stricto* postupne upúšťa.⁸ Dawkins v *Príbehu predka* problém ilúzie prerušovanosti (ktorý neskôr nazval terorom prerušovanej mysle) ilustruje na hodnotení študentov známami. Zaradenie študentov do kategórií (napríklad A,B,C...FX) je praktickým nástrojom pri udeľovaní štipendií, ubytovania na internátoch, vyznamenaní pri promóciách, či pri posudzovaní žiadosti o prijatie na vyšší stupeň štúdia alebo do zamestnania. Výkony študentov na skúškach však predstavujú kontinuálny rad a aj keď máme kvantitatívne merateľné parametre (napríklad body zo skúšobného testu), z analogického príkladu so šprintermi je zrejmé, že objektívne rozdelenie tohto spojitého radu do nespojitých kategórií je prinajmenšom problematické. Kde je hranica medzi FX (neprospeš) a A-E (prospeš)? 20 percent, 50 percent, alebo 75 percent bodov? A chceme X percent zo všetkých otázok, alebo 100 percent z konkrétnych otázok, ktoré tvoria X percent testu? A keď sa rozhodneme, že napríklad stačí, aby študent ovládal polovicu skúšaného učiva, ako rozdeliť zvyšné hodnotenia? Paritne? Alebo A môže dostať študent iba za perfektný (100 percentný) výkon? Tieto otázky sú dokonca zložitejšie, ako v prípade príkladu so šprintermi, pretože zatiaľ čo všetci šprintéri majú prebehnúť rovnakých 100 metrov, rôzni študenti na tej istej skúške môžu mať rôzne náročné testy. Netriviálnosť týchto otázok podčiarkuje aj fakt, že pokiaľ by boli ľahko zodpovedateľné, tak všetci učitelia používajú rovnakú hodnotiacu škálu.

Ešte zložitejšie je hodnotenie esejí, ústnych skúšok alebo obhajob záverečných prác, pri ktorých (do istej miery alebo úplne) absentujú merateľné ukazovatele študentovho výkonu. Keď hudobní experti ohodnotia interpretov v hudobnej súťaži rovnako „dobré“ ako amatéri, ktorí muzikantov vôbec nepočujú, akú máme istotu, že pri skúšaní študentov nevedome nepoužívame rovnaké kritériá? Ak skúsení someliéri to isté víno v priebehu jednej ochutnávky vyhodnotia raz ako skvost a o chvíľu ako priemer, akú máme istotu, že sa táto nekonzistencia neprejavuje aj pri našom hodnotení študentov? Ak pri posudzovaní kvality krasokorčuliarov, adeptov na španielskych sudcov, či uchádzačov o akademický post je rozhodujúcejšie poradie, v ktorom sa dostanú pred komisiu, ako ich výkon, ako vieme skontrolovať, že všetkých študentov posudzujeme podľa rovnakých kritérií?

Tieto otázky nenaznačujú, že by sme mali prestať študentov hodnotiť; pri technike hodnotenia by sme sa mali zamyslieť, čo je jeho hlavným zmyslom. Pravdaže, známky sú užitočné z praktických dôvodov spomínaných vyššie (napr. štipendiá, internáty, prijímacie pohovory). Hlavným cieľom hodnotenia študentov by však mala byť pozitívna motivácia študentov k štúdiu. Inými slovami, hodnotenie by malo študenta emočne naladiť tak, aby mal zo štúdia potešenie. Akú úlohu v naplnení tohto cieľa zohrávajú známky?

Hoci môžeme mať pocit, že zlá známka môže študenta motivovať k lepším výkonom, empirické dáta túto úvahu nepodporujú. Naopak, dôraz na známky často znižuje motiváciu pre učenie a môže v konečnom dôsledku viesť k horším výsledkom tých ktorý sa venoval kognitívnemu vývinu študentov počas ich vysokoškolského štúdia, v študentov, ktorí sú najviac motivovaní získaním lepšej známky. [Psychológ William Perry, tomto kontexte citoval študenta: „*I cannot afford to get interested in this course because I*

⁸Dawkins, R. (2014). Essentialism. In *What Scientific Idea Is Ready for Retirement?*, J. Brockmann, ed., edge.org.

have to get a good grade“⁹. Naopak, ani najlepší študenti väčšinou neuvádzajú známky ako hlavnú motiváciu; skôr vykazujú vysokú mieru vnútornej motivácie niečo sa naučiť.¹⁰ Mimochodom, platí to aj v prípade hodnotenia učiteľov; zlé hodnotenie učiteľa študentami v anketách nevedie k pozitívnym, ale často skôr k negatívnym zmenám v jeho učiteľskom výkone.¹¹

Keď zlé známky neplnia úlohu, ktorú má hodnotenie študenta, ako je to s dobrými známkami? Tu do istej miery platí ekonomické pravidlo: ak je dobrá známka ťažko získateľná, je to cenená komodita. Ak je jej výskyt promiskuitný, stráca na hodnote. Dostávame sa do zdanlivo neriešiteľnej situácie: zlé známky ich držiteľov nemotivujú, dobré známky majú hodnotu iba v prípade, že sú zriedkavé.

Známkovanie univerzitných študentov, predovšetkým tých, ktorí sú poslucháčmi výberových študijných programov, tak predstavuje tri problémy v jednom: (1) známkuje skupinu ľudí, ktorých výkony predstavujú kontinuálny rad a napriek tomu ich rozdeľujeme do diskretných kategórií, ktoré tvoríme na základe vágnych pravidiel; (2) známky často nie sú odrazom reálnej kvality výkonu študenta, ale subjektívnych pocitov skúšajúcich alebo iných okolností, ktoré priamo nesúvisia s hodnoteným výkonom; a (3) známky nie sú ideálnym nástrojom na emočnú motiváciu študenta k štúdiu.

Tento trojediný problém sa dá vyriešiť vyslobodením z tyranie prerušovosti, znížením váhy známkovania a zvýšením váhy spätnej väzby.¹² Ak je to možné, zoradíme študentov do poradia podľa merateľných ukazovateľov (napr. body z testu); robme však časté priebežné testovanie a poradie zostavme zo všetkých testov. Federer, Nadal či Djokovič nie sú najlepší svetoví tenisti preto, lebo vyhrali jeden z turnajov *Grand Slam*, ale preto, že dlhodobo na všetkých turnajoch (včítane tých z Veľkej štvorky) postupujú do najvyšších kôl. Tam, kde nie sú k dispozícii kvantitatívne parametre (ústne skúšky, obhajoby, eseje), pokúsme sa takéto poradie urobiť s vedomím, že bude zaťažené subjektívnou chybou. Uvedomujúc si, že sa jej určite dopustíme, skúsme ju aspoň znížiť: ku každému študentovi si napíšme dôvody, prečo sa ocitol na tom mieste v poradí, ktoré sme mu prideliť. Študentov okrem známky vyhodnoťme aj slovne, v diskusii s nimi vyzdvihnime pozitíva, upozorníme na nedostatky. Nemusíme im povedať, na ktorom mieste v poradí sa ocitli; oveľa dôležitejšia spätná väzba je, že sme identifikovali silné i slabšie stránky ich výkonu. [To, že spätná väzba je pre študentov skutočne dôležitá, vyplýva aj z dotazníkového prieskumu medzi našimi študentami (**Príloha 1**)]¹³. Musíme byť pritom úprimní. Chválu nedevalujeme superlatívami („vynikajúci“, „úžasný“, „fantastický“), keď to nemyslíme vážne. Nepodliehajte ilúzii, že chválenie za každú cenu je vždy pozitívnou motiváciou. Študent túto falošnú pochvalu ľahko odhalí a tá bude mať úplne opačný efekt. A naopak, pri sumarizovaní negatív buďme prísni, ale majme ich podložené argumentmi a buďme ochotní o nich so študentom diskutovať. Nevymýšľajme si negatíva len preto, že máme pocit, že našou úlohou je nejaké uviesť. Spomeňme si, s

¹⁰Lin, Y.G., McKeachie, W.J., and Kim, Y.C. (2003). College student intrinsic and/or extrinsic motivation and learning. *Learn. Individ. Differ.* 13, 251–258.

¹¹Svinicky, M., and McKeachie, W.J. (2013). *McKeachie's Teaching Tips* (Cengage Learning).

¹²Hattie, J., Timperley, H. (2007). The power of feedback. *Rev. Educ. Res.* 77, 81–112.

¹³Detailné dáta a ich vyhodnotenie sú k dispozícii u autora.

akým pocitom sme čítali posledný posudok na náš ťažko odpracovaný článok, v ktorom posudzovateľ v snahe byť kritický dlhým zoznamom neopodstatnených negatívnych komentárov presvedčil editora, aby manuskript odmietol bez poskytnutia možnosti sa k posudku vyjadriť. Akú negatívnu emóciu, frustráciu sme po čítaní posudku prežili! Vyhnime sa podobnej chybe, byť kritický neznamená byť negativistický. Naším cieľom ako učiteľov je študentom pomôcť, nie ich poškodiť.

Známky môžu byť užitočné; na tom sa asi zhodne väčšina univerzitných učiteľov i študentov. Nemali by sme sa však nimi nechať uväzniť do ilúzie prerušovanosti, teda že výkony študentov je možné jednoznačne rozdeliť do diskrétnych kategórií. Pri ich hodnotení by sme nemali známkam dávať väčšiu váhu ako si reálne zaslúžia a na strane druhej využiť hodnotenie na skutočne pozitívnu motiváciu študentov k spoločnému potešeniu z ich (i nášho) vzdelávania.

Príloha 1. Výsledky dotazníkového prieskumu o postojoch študentov k spôsobu hodnotenia ich študijných aktivít. Dotazník bol anonymne vyplnený študentami ($n=41$) navštevujúcimi kurz *Molekulárna biológia bunky 1* (19.11.2019). Výber tejto skupiny bol založený na tom, že (1) ide o študentov, ktorí boli na študijné programy (genetika, biochémia, fyziológia rastlín, resp. mikrobiológia) vybraní a (2) majú za sebou celé bakalárske štúdium, t. j. skúsenosti s rôznym hodnotením všetkých typov kurzov (včítane obhajob záverečných prác). Študenti mali za úlohu krížikom označiť, či s príslušným výrokom súhlasia (ÁNO), nesúhlasia (NIE), alebo nemajú jednoznačný názor (NEV). Okrem toho mali do dotazníka uviesť hodnotenie základných kurzov Genetika a Biochémia, kurzu Metódy v molekulárnej a bunkovej biológii a Obhajoby bakalárskej práce. Z týchto hodnotení bol urobený pre každého študenta priemer (A-1; B-1,5; C-2; D-2,5; E-3); celkový priemer = 1,57731 \pm 0,3548, medián = 1,5. Pre grafické znázornenie výsledkov boli počítané percentá zo všetkých odpovedí, resp. z odpovedí študentov s nadpriemerným (1,00-1,25; $n=9$), resp. podpriemerným (2,00-2,33; $n=9$) priemerom (pre presné čísla vid' tabuľky pod grafmi). Cieľom bolo zistiť, či v jednotlivých odpovediach sa študenti s lepšimi, resp. horšími výsledkami odlišujú od celkovej distribúcie (pri porovnávaní je potrebné zohľadniť fakt, že percentá v jednotlivých skupinách sú počítané z rôznych základov (41 vs. 9).

Z uvedených dát (sú k dispozícii u autora), berúc do úvahy nízkočetnosť respondentov (zvlášť platí pre študentov s lepším a horším priemerom), je možné dedukovať, že:

- (1) Študenti považujú za hlavnú motiváciu študijného snaženia získať čo najlepšie vzdelanie (niektorí však evidentne ako hlavnú motiváciu uviedli aj známky aj vzdelanie).
- (2) Úloha známok (dobrých i zlých) pri motivácii k lepšiemu študijnému výkonu bola hodnotená veľmi heterogénne, úlohu zohráva u zhruba 1/3 študentov.
- (3) Študenti jednoznačne preferujú spätnú väzbu učiteľa (pozitívnu i negatívnu) pre známkou ako zhodnocovacím parametrom ich študijného výkonu.
- (4) Pre drvivú väčšinu študentov je známka menej dôležitá ako to, čo sa na kurze naučia.
- (5) Študenti (a prekvapivo ani tí nadpriemerní) nepovažujú za dôležité vyzdvihovanie tých, ktorí z kurzu získali tie najlepšie výsledky. Zároveň všetci (tentokrát asi

neprekvapivo) nechcú, aby učiteľ pri vyhodnocovaní kurzu explicitne poukazoval na tých ktorí dosiahli (pod)priemerné výsledky.

(6) Zo spôsobov hodnotenia kurzov sa študentom najobjektívnejšiou zdá byť ústna skúška (menej písomný test a najmenej esej).

(7) K hodnoteniu obhajob záverečných prác známami študenti nemajú vyhraný názor.

(8) Variant hodnotenia obhajob prospel/neprospel so slovným hodnotením sa zdá byť prijateľnejší pre väčšinu (2/3) študentov pričom cca a 1/4 k tomu nemá vyhraný názor). Najnerozhodnejšia je skupina študentov s lepším priemerom.

(9) Väčšina študentov by nebola za úplné zrušenie známok, zároveň však drvivá väčšina by privítala ich kombináciu so spätnou väzbou (vo forme slovného hodnotenia) učiteľa.



Prof. RNDr. Ľubomír Tomáška, DrSc. je vedúcim Katedry genetiky Prírodovedecké fakulty UK v Bratislave (<http://fns.uniba.sk/kge/>); (e-mail: lubomir.tomaska@uniba.sk). Zabýva sa molekulárnou genetikou kvasinek. Spolu s prof. Jozefom Nosekom vedie spoločné laboratórium katedier biochémie a genetiky PriF UK (<http://www.biocenter.sk/welcome1.html>).

Analýza genových produktů vznikajících v důsledku alternativního sestřihu pre-mRNA a jejich význam v onkogenezi karcinomu prsu

Jan Hojný

1. lékařská fakulta UK a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Ústav biologie a lékařské genetiky, Kateřinská 1660/32, 121 08 Praha 2

Abstrakt

Karcinom prsu je celosvětově nejčastěji diagnostikované nádorové onemocnění u žen. V 5-10 % všech případů je pozorována genetická souvislost, obvykle způsobená patogenní mutací v některém z predispozičních genů. Ačkoliv byla řada poškozujících mutací v kódující sekvenci těchto genů popsána, u velkého procenta familiárních případů (> 50 %) nebyla příčina dosud nalezena. Řada identifikovaných patogenních mutací byla lokalizována v konsenzních sestřihových místech, které mají za následek vznik aberantních sestřihových forem mRNA vedoucích k translaci poškozených proteinů. Málo je však známo o variantách poškozujících regulační sestřihová místa, která mohou vést k tvorbě obdobných forem mRNA. Pro nepřímou analýzu variant, ovlivňujících přirozený sestřih, jsme navrhli metodiku detekce sestřihových variant jakéhokoliv genu založenou na multiplexní PCR a následné analýze pomocí NGS s vysokou citlivostí. Ověření této metodiky na modelu *BRCA1* odhalila přítomnost 94 sestřihových variant v leukocytech periferní krve, zdravé prsní a přilehlé tukové tkáni, čímž byl vytvořen dosud nejpodrobnější katalog fyziologicky se vyskytujících mRNA variant *BRCA1*. Nejčastěji se vyskytující varianty, zachovávající čtecí rámec, byly přesně kvantifikovány pomocí RT-qPCR, která odhalila přítomnost 6 ubikvitně se vyskytujících alternativních transkriptů s relativní expresí > 1 % celkové exprese *BRCA1* ($\Delta 5$; $\Delta 9_{10}$; $\Delta 9_{10,11q}$; $\nabla 13$ a IRIS). Dále jsme prokázali tkáňově specifickou míru exprese u variant $\Delta 9_{10}$, $\nabla 13$ a IRIS. Většina ubikvitních variant si pravděpodobně zachovává charakter formy divokého typu, či vykazuje dosud neobjasněnou regulační funkci. Výsledky práce objasňují složení a množství mRNA variant *BRCA1* v relevantních zdravých tkáních. Na základě tohoto katalogu je např. možné okamžitě identifikovat aberantní sestřihové mRNA varianty, vyskytující se v nádorové tkáni, či prokázat přítomnost mutace, vedoucí k deregulaci sestřihu pre-mRNA, v případě negativního výsledku mutační analýzy *BRCA1*.

Úvod

Podle současného, obecně přijímaného modelu kancerogeneze, je pro rozvoj maligní transformace nutné nakumulovat několik konsekventních mutací v regionech genů regulujících základní buněčné procesy (Cahill et al., 1999). Úspěšná nádorová buňka musí pozměnit svoji fyziologii, aby byla schopna autonomní proliferace, potlačení apoptózy, rezistence k signálům růstových inhibitorů, neomezené možnosti replikačního potenciálu

a následně i možné angiogeneze, invaze a metastazování (Hanahan a Weinberg, 2000).

V průběhu kancerogeneze jsou tradičními cíli mutací tzv. nádorových supresorových genů, jejichž proteinové produkty jsou zapojeny v protinádorových procesech, jako jsou opravy DNA, zastavení buněčného cyklu, iniciace apoptózy atd. Avšak dle Knudsonovy teorie dvou zásahů je nutné alterovat sekvenci DNA na obou alelách genu, aby byla vyřazena funkce příslušného nádorového supresorového proteinu (Knudson, 1971). Většina nádorových onemocnění proto vzniká až v pokročilejší fázi života, ve chvíli, kdy se v buňce nahromadí dostatečné množství somaticky vzniklých mutací nejen v nádorových supresorových genech. Existuje však řada nádorových onemocnění, nebo jejich forem, které se projevují ve výrazně nižším věku. U mnoha z nich jsou predispozice k těmto onemocněním v rodině děděny. Důvodem je výskyt zárodečné mutace v jednom z nádorových supresorových genů, čímž je oslabena protinádorová „bariéra“ a usnadněn proces vzniku nádoru. Příkladem mohou být příčinné mutace v *BRCA1*, které ve většině případů způsobují dědičnou formu karcinomu prsu.

Identifikace příčinných mutací u dědičných nádorových onemocnění jsou v dnešní době prováděny pomocí masivního paralelního sekvenování, tzv. sekvenování nové generace – NGS (*New Generation Sequencing*), které nám umožňuje analyzovat genetickou informaci u rozsáhlých genových panelů, případně celých exomů či genomů jedinců. Stinnou stránkou takto mocného nástroje je detekce velkého množství často neznámých alterací s nejasným dopadem (VUS – *variant of uncertain significance*), které je obtížné rychle charakterizovat. Kromě relativně dobře popsaných změn v kódujících a přilehlých oblastech (bodové mutace, mutace konsenzních sestřihových míst, delece/inzerce nebo velké chromozomální přestavby) nebo epigenetických změn ovlivňujících expresi daného genu (hypermetylace tzv. CpG ostrůvků v promotorové oblasti genu, modifikace histonů a změna oblasti na transkripčně neaktivní heterochromatin), existuje celá řada mutací postihující intronové oblasti, o jejichž dopadu není dosud mnoho známo (Scholzova et al., 2007).

Pokud intronové mutace postihnou sekvenci, na kterou nasedají sestřihové nebo regulační faktory (ať už pozitivně nebo negativně působící), může dojít ke změně sestřihového vzorce pro dané geny, a tak k ovlivnění produktů genové exprese. Kvalitativní (i kvantitativní) změna na úrovni genové exprese může mít v řadě případů velice závažné důsledky. Například tvorba alternativních sestřihových variant (ASV) androgenního receptoru je úzce spjata se vznikem a vývojem metastatických karcinomů prostaty (Paschalis et al., 2018).

Ačkoliv se studium intronových sekvencí po nástupu NGS mnohonásobně zefektivnilo, charakterizovat dopad nalezených intronových odchylek od referenčního genomu u daného jednotlivce je vzhledem k obrovskému množství dat z celogenomových studií a k vysoké heterogenitě intronových sekvencí napříč populacemi a značnému množství privátních variant jednotlivce, stále velmi obtížné. Ke správné interpretaci mutací, postihující regulační sestřihové sekvence, je nezbytné tyto sekvence napříč introny identifikovat. I přes existenci řady různých prediktivních algoritmů detekce regulačních míst *in silico*, není identifikace těchto oblastí zcela spolehlivá.

Alternativní, v této práci navrhovaný, přístup pro odhalení variant postihující regulační místa sestřihu, vychází ze znalosti všech fyziologicky vznikajících sestřihových forem mRNA. Detekce různých sestřihových variant je v současných podmínkách RNA sekvenování nové generace (RNA-Seq) nepoměrně snazší, a proto je i relativně snadné

touto metodou odhalit aberantní sestřihovou variantu mRNA při znalosti souboru fyziologicky se vyskytujících sestřihových variant.

Předkládaná práce je proto zaměřena na problematiku vzniku fyziologicky se vyskytujících alternativních sestřihových variant, návrhu metodiky pro jejich komplexní identifikaci a kvantifikaci s vysokou přesností na modelu *BRCA1*, což je první a nezbytný krok pro odlišení fyziologicky se vyskytujících variant od variant vzniklých na základě poškození sestřihového vzorce na úrovni mutací DNA. Přes veškerý pokrok a znalosti tyto informace (kromě sporadických analýz) u většiny genů chybí.

Hypotézy a cíle práce

Jako modelový gen pro analýzu alternativních sestřihových variant, který predisponuje ke karcinomu prsu, byl vybrán gen *BRCA1*. Důvodem byla existence a precizní popsání řady jeho ASV, dlouhodobý výzkum tohoto genu v naší laboratoři, dostatečná komplexita (obsahuje 22 kódujících exonů) a v neposlední řadě velmi nízká exprese mRNA ve zdravých tkáních. RPKM se ve většině vyšetřovaných tkání pohybuje okolo 1 (*Reads Per Kilobase Million* – normalizovaná hodnota množství čtení na kilobázi transkriptu vztaženou k milionu čtení; Fagerberg et al., 2014). Z těchto důvodů je analýza ASV *BRCA1* obvyklými metodami nelehká.

Cíle práce

- a) vytvořit robustní systém s vysokou senzitivitou a reprodukovatelností pro rychlou a komplexní identifikaci přítomných alternativních sestřihových variant mRNA *BRCA1*, který by byl univerzální a aplikovatelný na jakýkoliv jiný gen našeho zájmu
- b) identifikovat tímto systémem alternativní sestřihové varianty mRNA *BRCA1* pomocí RT-qPCR s primery, nasedajícími do specifických exon-exonových spojení, kvantifikovat vybrané sestřihové varianty a vytvořit tak komplexní kvalitativní i kvantitativní katalog mRNA variant *BRCA1*, vyskytujících se v leukocytech periferní krve, nenádorové prsní tkáni a nenádorové perimamární tukové tkáni
- c) vytvořit a vyhodnotit expresní profil sestřihových variant mRNA *BRCA1* ve vyšetřovaných tkáních u pacientek s karcinomem prsu a zdravých kontrol.

Materiál a metodika

V přístupech pro kvalitativní a kvantitativní analýzu alternativních sestřihových variant byla navržena metodika využívající kombinaci jednoduchých, rutinně prováděných, dílčích technik tak, aby měl získaný přístup vysokou senzitivitu, byl jednoduše opakovatelný, a navíc cenově přijatelný. Jedná se o:

- a) Multiplexní PCR (mPCR) amplifikaci všech teoreticky možných exon-exonových spojení všech transkriptů požadovaného genu (model *BRCA1*) na úrovni komplementární DNA (cDNA) syntetizované z mRNA pomocí náhodných hexanukleotidů.
- b) Ekvimolární smísení mPCR produktů a velikostní selekce (obohacení) oblasti s krátkými amplicony našeho zájmu.

- c) Sekvenování na základě NGS metod s hlubokým pokrytím pro rychlou analýzu vzniklých amplikonů, které vykazuje vysokou citlivost a relativně snadnou přípravu vzorků. Analýza sekvenačních dat pomocí mapování získaných amplikonů na uměle vytvořený referenční soubor obsahující všechny možné kombinace sestřihových variant společně s variantami dosud identifikovanými.
- d) Zhodnocení míry exprese vybraných sestřihových variant zachovávajících čtecí rámec, u kterých předpokládáme vznik proteinového produktu, pomocí kvantitativní PCR v reálném čase s využitím primerů, které specificky nasedají do unikátních exon-exonových spojení.

Do projektu bylo zařazeno celkem 130 žen operovaných pro karcinom prsu na Gynekologicko-porodnické klinice 1. LF UK a VFN a 86 žen bez nádoru operovaných na Klinice plastické chirurgie 1. LF UK a FNB. Od všech účastnic byla získána relevantní data z osobní a rodinné anamnézy. Tkáňové vzorky byly odebírány během operací karcinomu prsu nebo během profylaktických mastektomií provedených na asymptomatických nosičkách s mutací *BRCA1*. Kontrolní tkáňové vzorky byly odebrány během kosmetických operací. Pokud to bylo možné, byly vzorky odebírány z obou prsních tkání. Od každé ženy byla získána periferní nesrážlivá krev. Ze všech vzorků byla izolována celková RNA a z ní syntetizována komplementární DNA za využití náhodných hexanukleotidů, která byla dále vyšetřována příslušnými metodami.

Výsledky

Identifikace alternativních sestřihových variant BRCA1 v biologických vzorcích

Cílem první části práce bylo zavedení robustního systému pro rychlou a citlivou analýzu alternativních sestřihových variant jakéhokoliv genu, na modelu *BRCA1*, za pomoci multiplexní PCR, obohacení vzorků o krátké amplikony s unikátními exon-exonovými spojeními, přípravy sekvenačních knihoven ze selektovaných vzorků, NGS s vysokým pokrytím a biostatistické analýzy sekvenačních dat.

Mapování veškerých sekvenačních dat s následnou kontrolou výsledků odhalila přítomnost 94 různých alternativních sestřihových variant *BRCA1* napříč všemi vyšetřovanými vzorky.

Nejčastěji zastoupenou sestřihovou událostí byl výpadek několika exonů v řadě (mCA – multikazetová delece), který byl samostatně identifikován v 32 případech a v 12 případech současně s delecí způsobenou volným sestřihovým místem.

Dalším častým případem alternativního sestřihu byl výpadek jednoho exonu (CA – kazetová delece) nebo zahrnutí alternativního exonu či vnitřní části intronu do transkriptu (C▼ – kazetová inserce). Tyto varianty byly detekovány v 16 (CA) a 11 (C▼) případech osamoceně, v jednom případě byla nalezena kombinace inserce a delece a v dalších 4 případech byly nalezeny jednotlivé inserce nebo delece v kombinaci s volným sestřihovým místem.

Samostatné využití volných sestřihových míst bylo identifikováno ve 12 případech a na závěr byly nalezeny tři případy intronizace vnitřní části exonu 11 a jeden případ kombinace multikazetové delece s kazetovou insercí.

V biologických vzorcích pacientů s karcinomem prsu a zdravých kontrol se nejširší spektrum exprimovaných ASV nacházelo v mamární tkáni (72). Leukocyty periferní krve exprimovaly 67 různých variant a přilehlá tuková tkáň 54. Ve všech vyšetřovaných cDNA syntetizovaných z lidského genetického materiálu bylo přítomno 29 variant, které jsou označeny jako ubikvitní / predominantní. V testovaných buněčných liniích bylo nalezeno 76 ASV, z nichž 11 bylo pro dané linie unikátní.

Nalezené kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi zdravými kontrolami, pacienty s karcinomem prsu a nosiči mutace *BRCA1* byly na úrovni semikvantitativního porovnání mapovaných výsledků malé.

Proteinový produkt *BRCA1* může potencionálně vznikat pouze z 25 identifikovaných variant, které zachovávají čtecí rámec („*in-frame*“). Jedenáct z těchto variant bylo označeno jako predominantní, tedy vyskytující se napříč vyšetřovanými soubory. Z těchto jedenácti variant je devět popsáno v předchozí literatuře ($\Delta 5$; 8p; $\Delta 9_{10}$; $\Delta 11$; 11q; 13p; ▼13A; ▼13A,14p; 14p) a dvě varianty byly identifikovány nově (6q; 10a). Další 4 „*in-frame*“ varianty ($\Delta 3_{5}$; $\Delta 9_{11}$; $\Delta 14_{15}$ a 23a) byly detekovány ve většině vyšetřovaných vzorků.

Zbylých 10 variant ($\Delta 5_{9}$; 5q, $\Delta 6$; $\Delta 8_{16}$; 11 $\Delta 3240$; $\Delta 14_{17}$; $\Delta 17_{19}$; $\Delta 17_{20}$; $\Delta 18$; $\Delta 20$; $\Delta 21-22$) vykazovalo na základě identifikace variant pomocí NGS spíše slabší míru exprese.

Použitý metodický přístup v identifikaci ASV nám umožňuje přímo kvantifikovat většinu variant lišících se na základě volných sestřihových míst bez další nutnosti kvantifikace pomocí RT-qPCR. Mapovací algoritmus čtení obsahující klasické sestřihové místo a čtení obsahující volné sestřihové místo ve většině případů namapoval na jednu sestřihovou událost. Pro kvantitativní posouzení bylo v prohlížeči mapovaných čtení potřeba odečíst poměr zastoupených frakcí. V případech čtení mapovaných na jednu sestřihovou událost byl rozdíl v délkách jednotlivých ampliconů (s a bez využití volného sestřihového místa) minimální, a proto preferenční míra amplifikace kratších ampliconů zanedbatelná. Ze všech nalezených SDS a SAS variant (Splice donor site / Splice acceptor site) bylo přímo kvantifikováno 22 případů s volným sestřihovým místem.

Varianty 1Aq; 8p; 10a; 13p; 14p a 1Aq, $\Delta 2$; byly detekovány ve většině vzorků lidských tkání s četností > 5 %. Varianty 2p; 6q; 23a; $\Delta 13,14p$ a ▼13A,14p se vyskytovaly napříč vzorky v míře nižší. Kombinované varianty 1Aq, $\Delta 2_{3}$; 1Aq, $\Delta 2_{5}$; 1Aq, $\Delta 2_{5,6p}$; 1Aq, $\Delta 2_{7,8p}$; 1Aq, $\Delta 2_{7}$; 1Aq, $\Delta 2_{10}$; 1Aq, $\Delta 2_{17}$; 1Aq, $\Delta 2_{19}$; $\Delta 5_{6,7p}$; $\Delta 5_{7,8p}$; $\Delta 11_{12,13p}$ byly detekovány pouze v některých případech.

Kvantifikace vybraných ASV v biologických vzorcích pomocí RT-qPCR

Po analýze hrubých RT-qPCR dat od 596 lidských vzorků, které prošly úspěšnou syntézou cDNA bylo z důvodu nízkého Cp referenčních oblastí mRNA *BRCA1* (Cp > 25) vyřazeno 19 % naměřených singletů vzorků (tj. 269 z celkových 1408 singletů). Vyhodnocena byla finální data od 115–145 žen (v závislosti na vyšetřované tkáni).

Před samotnými analýzami naměřených dat byla posouzena přesnost práce a reprodukovatelnosti výsledků celkového experimentu. Nezávisle naměřená hrubá data ve formě Cp referenčních genů byla otestována ve výběru 50 nejkvalitnějších vzorků ze souboru (RIN > 8; vstup do syntézy cDNA = 800 ng). Experiment prokázal nesignifikantní rozptyly hodnot Cp jednotlivých referenčních genů v jednotlivých tkáních (Kruskal-

Wallisův test pro porovnání více výběrů, $p = 0,545$). Maximální odchylka od průměrné hodnoty u UBC byla 5 %. U GAPDH a ATP5B pak 3 %.

Z pohledu absolutní kvantifikace nejlépe korelovaly exprese *GAPDH*, které jsou ve vyšetřovaných tkáních srovnatelné se získanými daty Illumina bodyMap2. Míry expresí UBC a ATP5B se s porovnávanými daty lišily, obzvláště v leukocytech periferní krve. Vzhledem k rozsáhlosti našeho souboru (přes 100 osob vs. 1 osoba v případě Illumina bodyMap2) a konzistence námi naměřených hrubých hodnot Cp jsme žádný RG z dalších analýz nevyřadili.

Celková exprese *BRCA1* ve vyšetřovaných tkáních

Celková míra exprese všech transkriptů *BRCA1* byla měřena pomocí dvou amplikonů lokalizovaných v různých částech referenčního transkriptu. Prvním byl amplikon zasahující do přechodu exonů 23 a 24, který byl vybrán z důvodu absence sestřihových variant postihujících tyto exony ve vyšetřovaných lidských tkáních. Druhý amplikon byl lokalizován do exonu 7, který zohledňuje variantu *BRCA1* IRIS (či případně jinou variantu s ukončenou transkripcí za exonem 7). Zároveň nebyla identifikována žádná významná sestřihová varianta postrádající exon 7 (v součtu bylo identifikováno pouze 1643 čtení různých minoritních sestřihových událostí postrádající exon 7).

Oba referenční amplikony reprezentující celkovou expresi *BRCA1* vykazují v porovnání se všemi referenčními geny velmi nízkou (100x až 1000x nižší) míru exprese napříč všemi vyšetřovanými vzorky.

Z výsledků vyplývá vyšší relativní exprese e7 proti exonu 23/24 prokazuje přítomnost jedné či více variant, které postrádají exony 23 a 24 (např. zmíněná *BRCA1* IRIS, či další). Zároveň je patrná různá tkáňově specifická míra exprese e7, která naznačuje kvantitativně odlišné složení ASV *BRCA1* v leukocytech oproti vyšetřovaným solidním tkáním. Z tohoto důvodu byla exprese jednotlivých ASV *BRCA1* (včetně *BRCA1* IRIS) porovnávána proti expresi *BRCA1* e7.

Relativní exprese ASV *BRCA1*

Z celkových 94 identifikovaných variant pomocí NGS bylo přímo kvantifikováno 22 variant z mapovaných dat. U zbývajících 72 variant nebyla přesně kvantifikována míra jejich exprese, protože nebylo možné reflektovat a zpětně spočítat rozdílnou efektivitu jednotlivých mPCR reakcí či ztrátu různě dlouhých produktů mPCR v promývacích krocích. Kvantifikace všech 72 variant pomocí přesné RT-qPCR metody byla kvůli omezenému biologickému materiálu nemožná, a proto byly pro další analýzu vybrány pouze varianty predominantní, zachovávající čtecí rámec – potencionálně vedoucí ke vzniku proteinového produktu ($\Delta 3$; $\Delta 5$; $\Delta 9_{10}$ s navazující krátkou i dlouhou formou exonu 11; 11q; $\Delta 11$; $\blacktriangledown 13A$). Do souboru byly dále přidány „*in-frame*“ varianty, které byly detekovány alespoň v 6 z 9 lidských tkání ve stabilní míře ($\Delta 3_{5}$ a $\Delta 9_{11}$) a popsaná varianta *BRCA1* IRIS. Po provedení RT-qPCR s primery navrženými do unikátních exon-exonových přechodů na tomto souboru mohla být dále statisticky vyhodnocena relativní exprese většiny variant. Varianty $\Delta 3_{5}$ a $\Delta 11$ nebylo možné hodnotit z důvodu hrubých hodnot Cp za detekčním limitem metody ($C_p > 33$) u většiny vzorků, i přes preamplifikaci cDNA, stejně jako varianty $\Delta 3$ a $\Delta 9_{11}$, které se exprimují ve všech tkáních ve velmi malé míře ($C_p = 31-33$) a u kterých je patrné, že jejich exprese naráží na detekční limit metody. Hodnoty relativní exprese vyšetřovaných variant ve vyšetřovaných tkáních jsou shrnuty v Tab. 1.

Tabulka 1: Relativní míra exprese vyšetřovaných variant *BRCA1*. Expresse jednotlivých variant je vyjádřena v % celkové exprese *BRCA1* (e7). SD = směrodatná odchylka; SEM = střední chyba průměru. Pro statistické porovnání tkáňových skupin byl použit neparametrický Mann-Whitney test. P hodnoty jsou označeny: **červeně** $p > 0,0085$ a **zeleně** $p < 0,0081$. Hodnota $p < 0,0085$ byla použita u důvodu eliminace chyby typu 1. Pozn.: tyto výsledky nezohledňují míru exprese celkové *BRCA1*, která je v jednotlivých tkáních odlišná.

Název		$\Delta 5$	$\Delta 9_{-10}; 11$	$\Delta 9_{-10}; 11q$	11q	$\nabla 13A$	IRIS
Leukocyty (L)	Expresse	1,13%	3,96%	1,22%	11,17%	6,70%	14,62%
	SD	0,44%	1,97%	0,55%	3,24%	3,14%	12,01%
	SEM	0,04%	0,18%	0,05%	0,29%	0,28%	1,09%
Mama (M)	Expresse	1,12%	10,21%	3,27%	12,95%	4,14%	7,16%
	SD	0,49%	3,67%	1,16%	2,93%	2,12%	2,75%
	SEM	0,03%	0,26%	0,08%	0,21%	0,15%	0,20%
	Poměr M vs. L	0,996	2,575	2,677	1,160	0,617	0,490
	P	0,5125	0	0	0,0000	0,0000	0
Tuková tk. (T)	Expresse	1,10%	9,11%	3,21%	13,91%	6,44%	6,24%
	SD	1,07%	3,37%	1,33%	3,19%	3,32%	2,11%
	SEM	0,08%	0,25%	0,10%	0,24%	0,25%	0,16%
	Poměr T vs. L	0,976	2,297	2,631	1,245	0,960	0,427
	P	0,0009	0	0	0,0000	0,1870	0
	Poměr T vs. M	0,980	0,892	0,983	1,074	1,555	0,872
	P	0,0018	0,0000	0,2330	0,0285	0,0000	0,0001

Souhrnná míra exprese vyšetřovaných variant z celkové *BRCA1* (e7) dosahuje 39,7 % v leukocytech; 37,9 % v prsní tkáni a 37,3 % v tukové tkáni. Ve vyšetřovaných tkáních je souhrnná exprese těchto ASV srovnatelná, avšak míra exprese jednotlivých ASV je tkáňově specifická.

Expresse jednotlivých variant v leukocytech periferní krve většinou individuálně nekoreluje (statisticky signifikantně) s expresí příslušných variant v mamární a přilehlé tukové tkáni. Výjimkou je korelace exprese varianty $\Delta 9_{-10}$ s dlouhou formou exonu 11 ve všech tkáních a varianty $\Delta 5$ v leukocytech a mamární tkáni (tato varianta nicméně vykazuje velmi nízkou relativní expresi). Korelační faktory jsou však v těchto případech nízké ($< 0,5$).

Naopak expresse jednotlivých variant v mamární tkáni statisticky signifikantně koreluje s expresí stejných variant ve tkáni tukové s výjimkou málo exprimované varianty $\Delta 5$ a zároveň jsou ve většině případů korelační faktory $> 0,5$.

Z výsledků popisovaných v předchozí kapitole je patrný velký rozptyl exprese některých variant ($\Delta 9-10$, 11q, $\nabla 13$ a IRIS), který může být způsoben odlišnou mírou exprese těchto variant v závislosti na vyšetřované podskupině. Proto bylo provedeno porovnání expresí zvláště u souboru zdravých kontrol (76 žen) a pacientek s karcinomem prsu (123 žen; Tab. 2).

Varianty s výpadkem exonů 9 a 10 v leukocytech periferní krve jsou jediné varianty, u kterých se významně liší míra jejich exprese o více než 20 %. Průměrný věk vyšetřovaných skupin je však odlišný (zdravé ženy – 41,1 let; pacientky s karcinomem prsu – 58,7 let). Z důvodu vyloučení faktoru rozdílného průměrného věku byl věk individuálně korelován na expresi souhrnné varianty $\Delta 9_{-10}$ u každé ženy z obou souborů a výsledky lineární regrese prokázaly statisticky nesignifikantní korelaci exprese ASV $\Delta 9_{-10}$ u skupiny zdravých kontrol ($y = 0,0573 - 0,0001 * x$; $r = -0,0918$; $r^2 = 0,0084$; $p = 0,5535$) i u skupiny pacientů s karcinomem prsu ($y = 0,0444 + 0,0002 * x$; $r = 0,1953$; $r^2 = 0,0381$; $p = 0,1611$).

Expresie variant s výpadkem exonů $\Delta 9_{-10}$ je v leukocytech periferní krve významně vyšší v souboru pacientek s karcinomem prsu o necelých 30 % a zároveň není závislá na věku vyšetřovaných žen

Laterálně specifická exprese jednotlivých variant

Od asymptomatických pacientek s mutacemi v *BRCA1*, které podstoupily profylaktické mastektomie a od zdravých kontrol, které podstoupily kosmetické operace, byl získán materiál z obou prsů (40 žen) a přilehlých tukových tkání (43 žen). Bylo provedeno porovnání laterálně specifické míry exprese jednotlivých sestřihových variant v obou vyšetřovaných tkáních i individuálně u každé ženy. Statistická analýza laterálně specifické exprese ASV *BRCA1* v porovnání pravé a levé mamární a přilehlé tukové tkáně neodhalila odlišnou expresi, která by byla spolehlivě významná. Expresie jednotlivých variant je obdobná.

Diskuze

S příchodem a zavedením sekvenování nové generace (NGS) se mnohonásobně zefektivnily možnosti rutinní diagnostiky nukleových kyselin u vzorků od pacientů. V jednom sekvenačním běhu je dnes možno sekvenovat celou řadu genů / transkriptů, exonů / transkriptomů, nebo celých genomů, epigenomů apod., a na základě těchto dat odhalovat řady odchylek napříč vyšetřovanou tkání. NGS se dále vyvíjí a s rostoucí přístrojovou kapacitou úměrně roste i množství identifikovaných odchylek / variant, ať už na úrovni sekvence DNA/RNA nebo na úrovni exprese. Interpretace velkého množství nově nalezených variant je přitom časově náročná, a tak se společně s NGS rozvíjí biostatistika zpracování a charakterizace dat, bez které by nebylo možné nalezené varianty třídit a řadit dle důležitosti a dopadu na organismus. I přes rostoucí databáze nalezených variant a veškeré pokroky v biostatistických nástrojích (hlavně v predikci významu variant vyskytujících se v kódující části genomu), je dnes stále velmi obtížné spolehlivě charakterizovat většinu intronových variant (nejen) z důvodu vysoké heterogenity genomu v těchto oblastech.

Tabulka 2: Statistické porovnání exprese jednotlivých variant souboru pacientek s karcinomem prsu proti zdravým kontrolám. Poměr exprese vyjadřuje násobek exprese u skupiny pacientek s karcinomem prsu proti zdravým kontrolám. Expresce jednotlivých variant je vyjádřena v % celkové exprese BRCA1 (e7). SD = směrodatná odchylka; SEM = střední chyba průměru. Pro statistické porovnání byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Vypočítané P hodnoty jsou označeny: **červeně** p > 0,0073 a **zeleně** p < 0,0073. Hodnota p < 0,0073 byla použita z důvodu eliminace chyby typu 1. Pozn.: tyto výsledky nezohledňují míru exprese celkové BRCA1, která je v jednotlivých tkáních odlišná).

Název		Δ5	Δ9_10; 11	Δ9_10; 11q	11q	▼13A	IRIS	Δ9_10 celkem *		
Leukocyty	Kontroly	Expres e	1,07%	3,26%	1,04%	10,45%	6,32%	17,69%	4,31%	
		SD	0,41%	1,88%	0,64%	3,63%	3,40%	19,46%	2,09%	
		SEM	0,07%	0,30%	0,10%	0,58%	0,54%	3,12%	0,33%	
	Pac. s karc. prsu	Expres e	1,12%	4,24%	1,31%	11,59%	6,91%	13,26%	5,55%	
		SD	0,41%	1,67%	0,48%	2,97%	3,09%	5,26%	1,84%	
		SEM	0,05%	0,19%	0,06%	0,35%	0,36%	0,61%	0,21%	
	Poměr exprese		1,047	1,298	1,259	1,109	1,093	0,750	1,288	
	P		0,6703	0,0012	0,0048	0,1115	0,2450	0,7375	0,0006	
	Mama	Kontroly	Expres e	1,18%	10,78%	3,25%	13,24%	4,04%	7,50%	14,04%
			SD	0,46%	3,27%	1,10%	2,70%	1,96%	2,61%	3,94%
SEM			0,05%	0,32%	0,11%	0,26%	0,19%	0,26%	0,39%	
Pac. s karc. prsu		Expres e	1,05%	9,18%	3,22%	12,72%	4,44%	6,34%	12,40%	
		SD	0,45%	3,03%	1,11%	2,77%	2,36%	1,86%	3,42%	
		SEM	0,05%	0,34%	0,12%	0,31%	0,27%	0,21%	0,39%	
Poměr exprese		0,893	0,851	0,990	0,960	1,099	0,846	0,883		
P		0,0317	0,0002	0,8381	0,1357	0,4527	0,0011	0,0047		
Tuková tk.		Kontroly	Expres e	1,24%	8,99%	3,26%	14,19%	6,42%	6,27%	12,25%
			SD	1,39%	3,09%	1,16%	3,23%	3,40%	2,01%	3,77%
	SEM		0,14%	0,31%	0,12%	0,32%	0,34%	0,20%	0,38%	
	Pac. s karc. prsu	Expres e	0,90%	8,89%	2,87%	13,52%	6,57%	5,77%	11,76%	
		SD	0,28%	3,52%	0,94%	2,72%	3,10%	1,96%	4,03%	
		SEM	0,03%	0,44%	0,12%	0,34%	0,39%	0,24%	0,50%	
	Poměr exprese		0,725	0,989	0,880	0,953	1,024	0,921	0,960	
	P		0,0579	0,5021	0,0619	0,1661	0,7250	0,1600	0,2031	

* Obě varianty s výpadkem exonů 9 a 10 byly sjednoceny a přidány do analýzy jako společná varianta, pro odstranění vlivu dlouhé či krátké formy exonu 11 a pro potvrzení significance dílčích výsledků.

Z těchto důvodů byly v předkládané práci vytyčeny cíle vytvořit robustní systém s vysokou senzitivitou a reprodukovatelností pro rychlou a komplexní identifikaci všech ASV mRNA jakéhokoliv zájmového genu a validovat ho na modelu *BRCA1*. Na základě takto vzniklého katalogu fyziologicky se vyskytujících ASV je možné, po vyšetření pacientů pomocí RNA-Seq metod, nepřímo odhalovat přítomnost (nejen) intronových mutací, které vedou ke kvalitativnímu či kvantitativnímu ovlivnění genové exprese na úrovni změny sestřihu pre-mRNA, a tím významně zjednodušit a zrychlit detekci a charakterizaci těchto mutací, anebo přímo, spolehlivě, identifikovat patogenní ASV, jak bylo ukázáno v pilotní studii konsorcia ENIGMA (Brandão et al., 2019).

Předkládaná metodika založená na mPCR amplifikaci krátkých exon-exonových spojení a jejich sekvenování pomocí NGS vychází ze zkušeností předchozí práce. Navržená a zavedená multiplexní PCR, u které jsou cílovým výsledkem unifikované amplicony o velikosti okolo 80 párů bází: a) eliminuje preferenční amplifikaci krátkých ASV v reakci; b) díky vynechanému primeru v následujícím kanonickém exonu eliminuje amplifikaci exon-exonových spojení, která se vyskytují ve wt variantách transkriptů *BRCA1*; c) výrazně snižuje náročnost na množství a kvalitu izolované RNA, protože pomocí hexanukleotidů se i v případě zlomy poškozeného mRNA transkriptu syntetizuje cDNA po celé jeho délce. Finální sekvenování mPCR produktů pomocí sekvenování nové generace s hlubokým pokrytím (s předchozím obohacením analyzovaného vzorku o požadované krátké amplicony pomocí velikostní selekce) zajišťuje vysokou citlivost metody.

Negativním aspektem zvolené metodiky je ztráta informace o vzájemné kombinaci nezávislých sestřihových událostí v transkriptu a ztížená komplexní identifikace intronových exonizací do transkriptu. Pomocí navržené metodiky je relativně snadné identifikovat krátké inserce přilehlé k exonům (např. varianty 1aA: c.-20+1_-20+89ins89; 10a: c.594-21_594-1ins21 či 16a: c.4986+1_4986+65ins65), nicméně exonizace vnitřních částí intronů mohou být touto metodou problematicky detekovatelné, zvláště pokud se bude jednat o exonizace dlouhých úseků DNA.

Funkčnost a vysoká senzitivita navržené metodiky byla ověřena na modelu ASV *BRCA1*. Ve vyšetřovaných tkáních bylo touto metodou identifikováno 94 různých alternativních sestřihových variant / událostí mRNA *BRCA1*, což je doposud nejvíce popsaných variant. Tato práce navíc jako první hodnotí ASV *BRCA1* ve fyziologických tkáních větších souborů žen. Souhrnná práce konsorcia ENIGMA z roku 2014, založená na PCR metodách v kombinaci s relativně citlivou fragmentační analýzou odhalila „pouze“ 63 ASV *BRCA1* (Colombo et al., 2014) a to většinou na imortalizovaných buněčných liniích či derivátech krevních buněk.

Ze všech variant, identifikovaných v této práci, jich dosud nebylo popsáno 42, přičemž pět z nich bylo vyhodnoceno jako predominantní – tři exonizace vnitřní části intronů ▼145bp intron 2; ▼97bp intron 8 a ▼129bp intron 21, které způsobují posun čtecího rámce a dvě varianty využívající volná sestřihová místa, které obě čtecí rámce zachovávají: 6q (SDSΔ – del 9 bp) a 10a (SAS▼ – inserce 21 bp). Míra exprese varianty 10a se v porovnání s odvozenou wt variantou, pohybovala ze všech nově identifikovaných predominantních variant nejvýše (3,7 % – 30,5 %). Zvláště vysoké hodnoty vykazovala v leukocytech zdravých kontrol (19,5 %) a leukocytech (30,5 %) i prsní tkáni (29,2 %) pacientů s karcinomem prsu. Tato ASV zapříčiní vložení 7 dodatečných aminokyselin mezi exony 9 a 10, a ačkoliv v této oblasti není kódována žádná známá funkční doména proteinu, vysoká exprese této varianty v prsní tkáni u pacientek s karcinomem prsu (29,2

% oproti 6,7 % u zdravých kontrol) je překvapivá a činí z této varianty vhodného kandidáta pro případné funkční analýzy ASV *BRCA1*.

V práci Colombo et al., 2014, je popsáno 11 variant, které nebyly v této práci zvolenou metodikou detekovány. Jedná se o 4 varianty s „alternativním“ nekódujícím exonem 1B, variantu *BRCA1* IRIS s alternativním ukončením transkriptu, čtyři varianty multikazetové delece $\Delta 14_{18}$; $\Delta 14_{19}$; $\Delta 21_{23}$ a $\Delta 22_{23}$ a dvě varianty s alternativně zkráceným exonem 1A v kombinaci s částečnou delecí exonu 2 ($\Delta 1Aq_{\Delta 2p}$) a delecí exonu 3 v kombinaci s inzercí alternativního exonu 4 ($\Delta 1Aq_3, \blacktriangledown 4$). Varianty s alternativním exonem 1B a „speciální“ transkript *BRCA1* IRIS nebyly na základě návrhu primerů pro mPCR pokryty, a proto nemohly být detekovány. Existence transkriptu s exonem 1B, který byl součástí sekvence NM_007295 (Orban a Olah, 2003), je pochybná – tato sekvence byla odstraněna z databází pro nedostatek důkazů transkripce, z tohoto důvodu nebyla tato varianta zahrnuta do návrhu mPCR primerů. O existenci zvláštní varianty *BRCA1* IRIS není sporu (ElShamy a Livingston 2004), a proto byla rovnou zahrnuta do navazujících RT-qPCR analýz. Zbývajících 6 nedetekovaných variant se, vzhledem k vysoké citlivosti metody a detekci řady obdobných variant, s nejvyšší pravděpodobností ve zkoumaných fyziologických vzorcích nenacházelo.

Odlisný proteinový produkt může potenciálně tvořit 11 z 29 identifikovaných, predominantních ASV. Pět z těchto variant bylo přímo kvantifikováno na základě NGS analýz. Varianta 10a, diskutovaná výše a čtyři další ASV vznikající na základě posunu sestřihového místa, vedou k výpadku několika AK z transkriptu: 6q (poslední 3 AK v exonu 6); 8p (první AK v e8); 13p (první AK v exonu 13) a 14p (první AK v exonu 14). Oblasti variant 6q a 8p nekódují žádnou známou funkční doménu a s nejvyšší pravděpodobností tyto delece nemají vliv na funkci proteinu *BRCA1*. Ačkoliv varianty 13p a 14p postihují oblast domény bohatou na serinové zbytky, která hraje významnou úlohu v signalizaci, konkrétní chybějící aminokyseliny nejsou lokalizovány v místech spojených s fosforylací *BRCA1* (Ouchi et al., 2006). Vzhledem k četnostem detekovaných variant, které se pohybují mezi 5,4 % až 12,4 % (13p) a 11,1 % až 26,6 % (14p) napříč všemi vyšetřovanými lidskými tkáněmi s podobnou mírou exprese u zdravých žen a pacientek s karcinomem prsu, nepředpokládáme negativní vliv u těchto variant na funkci *BRCA1*. Naopak, v těchto případech se může jednat o evolučně konzervovaný mechanismus, zajišťující tvorbu funkčního proteinu i přes mutaci konkrétního konsenzního sestřihového místa.

RT-qPCR analýzami bylo dále kvantifikováno 10 predominantních variant, či variant vyskytující se ve vysoké míře v 6 z 9 analyzovaných lidských tkání, které zachovávají čtecí rámec. Z těchto byly na základě hrubých Cp dat vyřazeny varianty $\Delta 3_5$ a $\Delta 11$, jejichž exprese může být odhadnuta na < 0,01% exprese celkové *BRCA1*. Na základě úvodních NGS analýz při identifikaci ASV *BRCA1* v lidských tkáních vykazovaly obě varianty do 500 identifikovaných čtení (normalizovaná čtení na celkový 1 milion čtení). Dále byly z RT-qPCR analýz vyřazeny varianty $\Delta 3$ a $\Delta 9_{11}$, které se pohybovaly mezi 0,01 % a 1 % exprese z celkové *BRCA1*, z důvodu překročení spolehlivého detekčního limitu metody, který se pohybuje okolo 1 % exprese celkové *BRCA1* (Hojný, 2012). Varianta $\Delta 3$ vykazovala v rámci prvotní NGS analýzy 2135 až 10293 normalizovaných čtení a varianta $\Delta 9_{11}$ pouze množství v řádu stovek čtení, přitom jejich reálná exprese odvozená z RT-qPCR na celém vyšetřovaném souboru je obdobná (avšak s velmi vysokým rozptylem).

BRCA1 transkripty $\Delta 3$ a $\Delta 3_5$ postrádají kódující sekvenci podstatné části N koncové RING domény, která je podstatná pro tvorbu E3-ubikvitinligázového heterokomplexu s proteinem BARD1, zodpovědného za ko-transport *BRCA1* do jádra (Morris a Solomon, 2004) a varianty $\Delta 9_11$ a $\Delta 11$ přicházejí kvůli výpadku dlouhého exonu 11 o více než polovinu sekvence referenčního transkriptu, společně s DNA vazebnou doménou, která je v exonu 11 kódována. Ačkoliv nám není známa práce, která by funkčně charakterizovala proteiny vznikající z těchto variant, můžeme se vzhledem k výraznému narušení struktury kanonického transkriptu domnívat, že vznikající izoformy mohou vykazovat výrazně odlišnou, pravděpodobně sníženou, funkční kapacitu v porovnání s popisovanými funkcemi wt *BRCA1*. Na základě této domněnky by pak nebylo překvapivé, že se tyto varianty ve zdravých tkáních vyskytují ve velmi nízkém procentu (< 1%).

Zbylé varianty zahrnuté do RT-qPCR analýzy $\Delta 5$; $\Delta 9_10$; $\Delta 9_10,11q$; $11q$; $\nabla 13A$ a IRIS vykazovaly relativní expresi vyšší než 1 % z celkového množství *BRCA1* transkriptu a byly plně zhodnoceny.

Z plně hodnocených variant byla nejméně exprimována ASV $\Delta 5$, která postrádá podstatnou část kódující sekvence RING domény. Vazebná RING doména s E3 ubikvitinyláčnickou aktivitou zajišťuje vazbu důležitého vazebného partnera *BRCA1* – proteinu BARD1, který je zásadní pro enzymatickou aktivitu komplexu, a zároveň pro lokalizaci proteinu *BRCA1* do jádra (vazba s BARD1 umocňuje lokalizaci a kryje jaderné exportní signály *BRCA1*; Rodríguez a Henderson, 2000; Fabbro et al., 2002). Vzhledem k předpokládanému funkčnímu omezení vzniklé izoformy je tedy překvapivé, že míra exprese této varianty odpovídá 1,10 % – 1,13 % celkové exprese *BRCA1* ve všech vyšetřovaných tkáních a neliší se signifikantně u souboru zdravých žen a žen s karcinomem prsu (NGS analýza této varianty identifikovala 4013 až 13043 normalizovaných čtení). Relativní exprese transkriptu *BRCA1* $\Delta 5$ je uniformní a nízká napříč všemi vyšetřovanými tkáněmi i skupinami, vykazuje velmi malý rozptyl naměřených hodnot a potencionálně vznikající proteinový produkt s nejvyšší pravděpodobností neplní funkci wt formy *BRCA1*, protože nemůže být lokalizován do jádra. Z těchto důvodů bychom se mohli domnívat, že varianta $\Delta 5$ může být vedlejším produktem sestřihu *BRCA1* na základě určitého, opakujícího se, vzorce sestřihového aparátu, který vyplývá z jeho značné robustnosti. Se svou mírou exprese 1 % z celkové *BRCA1* pravděpodobně nemá vliv na výslednou funkci *BRCA1* složenou ze všech identifikovaných transkriptů, či plní jinou, dosud neobjasněnou funkci v organismu.

Další variantou je známá *BRCA1* $11q$ (někdy také označována jako *BRCA1a*), která využívá alternativní sestřihové místo vzdálené 3309 bp od 3' konce exonu 11. *BRCA1* $11q$ byla jednou z prvních identifikovaných ASV *BRCA1* (Lu et al., 1996), protože se vyskytuje v relativně vysokém množství a zkrácený transkript o více než polovinu se při amplifikaci od 5' do 3' UTR obvykle lépe amplifikuje z důvodu nižších nároků na kvalitu izolované RNA (Hojný, 2012). Ačkoliv je v postrádané sekvenci exonu 11 lokalizována DNA vazebná doména, oba jaderné lokalizační signály a část domény bohaté na serinové, je tato varianta napříč vyšetřovanými tkáněmi exprimována ve vysoké míře 11,17 % (leukocyty), 12,95 % (mamární tkáň) a 13,91 % (tuková tkáň) z celkové *BRCA1*. Relativní míra exprese není signifikantně odlišná u skupiny zdravých žen a skupiny žen s karcinomem prsu. NGS analýza překvapivě identifikovala výrazně rozdílné množství čtení mezi 823 a 7879 napříč vyšetřovanými tkáněmi. Funkcí transkripční varianty *BRCA1* $11q$, respektive výsledného proteinu, se zabývala řada studií, převážně z laboratoře V.N.

Rao, které souhrnně naznačují mírně odlišné funkce této sestřihové varianty od wt proteinu BRCA1. Wang a kolektiv (1997) naznačují odlišnou lokalizaci 11q v cytoplazmě spojenou s vazbou E2F cyklinů a CDKs, která by mohla způsobovat důležitou inhibici buněčného cyklu a tím zabraňovat rozvoji tumorigeneze. Práce Chaie a kolektivu (1999 a 2001) popisují schopnost přímé vazby variant s exonem 11q k proteinům p53 a Elk-1 a díky tomu schopnost inhibice růstu buněčných linií odvozených z buněk karcinomu prsu. Následující práce (Maniccia et al., 2009) dokumentuje mitochondriální lokalizaci variant s exonem 11q a další antiproliferativní účinky na buněčné linie karcinomu prsu. Série dalších prací popisují odlišnou vazebnou kapacitu BRCA1 11q k E2 konjugačnímu enzymu Ubc9, která může mít dopad na aktivitu estrogenního receptoru alfa (Xu et al., 2009), regulaci růstu buněčných linií karcinomu ovaria (Qin et al., 2012; Xu et al., 2016) a lokalizaci Calveolinu 1 (Xu et al., 2014).

Většina prací, zmíněných v předchozím odstavci, zároveň zkoumá se stejnými nebo velmi podobnými výsledky i „odvozenou“ variantu $\Delta 9_{-10,11q}$, která navíc postrádá exony 9 a 10 a která je v literatuře často označována jako *BRCA1b* (Lu et al., 1996). Tato sestřihová varianta se vyskytuje v mamární a přilehlé tukové tkáni v signifikantně vyšším poměru celkové exprese *BRCA1* nežli v leukocytech periferní krve (3,27 % a 3,21 % vs 1,22 %; $p = 0$). Na rozdíl od mamární a přilehlé tukové tkáně vykazuje tato varianta v leukocytech periferní krve vyšší expresi u pacientů s karcinomem prsu oproti zdravým ženám o 25,9 % (s hraniční signifikancí $p = 0,048$). NGS analýza pro tuto konkrétní variantu není k dispozici, odráží pouze souhrnnou variantu $\Delta 9_{-10}$.

ASV $\Delta 9_{-10}$ s dlouhou formou exonu 11 se ve vyšetřovaných tkáních exprimuje ve vyšší míře než „příbuzná“ $\Delta 9_{-10,11q}$, nicméně opakuje podobný vzorec tkáňové specifické exprese (mamární tkáň 10,21 %; přilehlá tuková tkáň 9,11 % a leukocyty 3,96 %; $p = 0$ v obou případech). Navíc tato varianta vykazuje u leukocytů periferní krve vyšší relativní míru exprese o 29,8 % u pacientek s karcinomem prsu oproti zdravým kontrolám ($p < 0,0073$), zatímco v mamární tkáni je exprese u pacientek s karcinomem prsu o 14,9 % nižší, než u zdravých kontrol ($p < 0,001$). Tyto výsledky potvrzuje i statistické porovnání souhrnu obou variant s výpadkem exonů 9 a 10 (pacientky mají v leukocytech periferní krve vyšší expresi této varianty o 28,8 % než kontroly; $p < 0,0073$; a v prsní tkáni o 11,7 % nižší; $p < 0,0073$). NGS analýza pro souhrnné varianty $\Delta 9_{-10}$ vykazovala opět významný rozptyl 562 až 5109 normalizovaných čtení v závislosti na vyšetřované tkáni.

Nejčastěji detekovanou a popsanou exonizací intronové oblasti je varianta s inzercí popisovaného alternativního exonu $\nabla 13A$ (Fortin et al., 2005). Tato „*in-frame*“ varianta vykazovala významně odlišnou míru exprese v prsní tkáni (4,14 % z celkové *BRCA1* oproti 6,7 % v leukocytech a 6,44 % v tukové tkáni; $p = 0$) a relativní exprese se nelišila u pacientek s karcinomem prsu oproti zdravým kontrolám. NGS analýza identifikovala 703 až 7267 normalizovaných čtení napříč vyšetřovanými tkáněmi. Výsledkem inserce 66 bází dlouhého alternativního exonu 13 do transkriptu je přidání 22 AK do středu oblasti bohaté na serinové zbytky, která na základě fosforylací od signálních kináz pravděpodobně moduluje vazebnou kapacitu BRCT domén. Vliv takovéto inserce na funkčnost proteinu *BRCA1* je nejasný, funkční analýza proteinu této ASV by mohla objasnit vliv na funkci wt *BRCA1*.

Vzhledem k diskutované literatuře a na základě relativně vysoké míry fyziologického výskytu sestřihových variant s krátkou formou exonu 11, s výpadky exonů 9 a 10 či se zahrnutým alternativním exonem 13, se nedomníváme, že by izoformy vznikající z těchto variant měly významně negativní vliv na funkci *BRCA1* jako nádorového su-

presoru. Kromě vysoce konzervovaných C a N koncových domén nemá BRCA1 ve vnitřní části proteinu významně uspořádanou oblast. Vnitřní část BRCA1 pravděpodobně slouží hlavně jako spojník koncových domén, jak je tomu u celé řady proteinů zapojených v signalizačních procesech. Z tohoto pohledu by se dalo uvažovat jen o velmi málo omezené funkčnosti izoform, vznikajících ze zmiňovaných variant, protože všechny tyto izoformy konzervované RING, SCD a obě BRCT domény zachovávají. Struktura proteinů vznikajících z těchto variant se liší ve střední části délkou primárního řetězce, a vzhledem k tomu, že dosud není známa 3D struktura střední části BRCA1, se nedá vliv výpadků či inzercí jmenovaných ASV detailněji posoudit.

Důležitý význam variant 11q a $\Delta 9_{-10}$ se pravděpodobně projevuje až v případě výskytu „stop“ či „frameshift“ mutací lokalizovaných v úsecích exonů 9, 10 a dlouhé 11, které sestřihový aparát s využitím alternativního sestřihu, eliminuje. Seo a kolektiv (2018) prokázali ve dvou případech rodin, nesoucích mutace vedoucí k předčasnému STOP kodonu v dlouhé části exonu 11, zvýšený výskyt varianty 11q (společně se snížením exprese či nepřítomnosti transkriptu o plné délce obsahující terminační kodon, pravděpodobně na základě mechanismu nonsense-mediated decay), která byla do určité míry schopna nahradit funkci wt BRCA1, resp. výrazně omezit negativní efekt nepřítomnosti BRCA. Tento mechanismus se pravděpodobně může uplatnit i v případě variant s truncačními mutacemi v exonech 9 a 10.

Poslední kvantifikovanou variantou je neobvyklá varianta *BRCA1* IRIS, která na konec svého transkriptu inkorporuje přilehlou část intronu 11 s vlastním poly-A signálem, což vede k „předčasnému“ ukončení translace. Kvantifikace této varianty prokázala výrazně zvýšenou relativní míru exprese v leukocytech (14,62 %) oproti mamární (7,16 %, $p = 0$) a přilehlé tukové tkáni (6,24 %; $p = 0$). Dále byla prokázána signifikantně nižší míra exprese této varianty u pacientek s karcinomem prsu oproti zdravým kontrolám o 15,4 % ($p < 0,0073$). *BRCA1* IRIS byla popsána v roce 2004 (ElShamy a Livingston 2004), a od této doby je v laboratoři autorů intenzivně zkoumána. Autoři v řadě svých prací postupně prokazují pravděpodobně protumorigenní vlastnosti této varianty v případě její overexprese, která byla pozorována u karcinomů prsu a plic a také u akutní myeloidní leukémie. *BRCA1* IRIS má schopnost vazby na chromatin a ovlivnění transkripce řady genů. V případě vštěpení patientských nádorových buněk s overexprimovanou IRIS do myších modelů je pozorována schopnost metastazování těchto buněk na základě ovlivnění exprese na úrovni transkripce (inhibice PTEN vedoucí k aktivaci HIF1 α ; Li et al., 2017). Určení fyziologické míry exprese této ASV je tedy důležitým předpokladem pro správné posouzení overexprese, což by mohl být jeden z markerů určitých typů nádorových onemocnění.

Výsledky kvantifikací provedených v této práci potvrdily obecně nízkou expresi *BRCA1*. Ačkoliv experiment nebyl navržen pro absolutní kvantifikaci celkové BRCA mRNA, z porovnání s referenčními geny *GAPDH*, *UBC* a *ATP5B* vyplývá 100x až 1000x nižší exprese *BRCA1*, což vzhledem k tumor-supresivní úloze proteinového produktu není, v případě zdravých tkání dospělých jedinců překvapivé, a je ve shodě s RNA-seq daty databáze GTEx (<https://www.gtexportal.org>).

Z porovnání výsledků relativních expresí oblastí zastupujících veškerou *BRCA1* (v exonu 7 a v oblasti exonů 23-24) s referenčními geny, vyplývá vyšší relativní exprese amplikonu lokalizovaném v e7. Tato zvýšená exprese naznačuje přítomnost transkriptů, postrádajících exony 23 a 24, tedy pravděpodobně transkriptů s alternativně ukončenou translací, jako je například *BRCA1* IRIS. Samotná exprese ASV IRIS tyto značné rozdíly,

zvláště v leukocytech periferní krve (až dvojnásobné), nevysvětluje, protože je v leukocytech exprimována jen o cca 7–8 % více v porovnání s ostatními tkáněmi. Tento výsledek naznačuje přítomnost další varianty či variant postrádajících 3' koncovou část transkriptu. Tyto hypotetické varianty jsme nebyli schopni zvoleným NGS přístupem, zaměřeným na analýzu exon-exonových spojení, detekovat.

NGS přístup identifikace ASV variant umožnil omezeným způsobem kvantifikovat nalezené ASV varianty na základě množství identifikovaných čtení normalizovaných na celkový počet čtení ve vzorku. Při srovnání NGS „kvantifikace“ s přesnou RT-qPCR metodou vyšla najevo některá omezení NGS „kvantifikace“. Např. u ASV $\Delta 3$ a $\Delta 5$, s mírou exprese okolo 0,1 % a 1,1 % celkové *BRCA1*, bylo NGS přístupem identifikováno ve zdravých tkáních leukocytů 3120, v prsní tkáni 4141 a v tukové tkáni 2135 čtení ($\Delta 3$), resp. 8016, 5524, 4778 ($\Delta 5$). Přičemž u relativně hodně exprimovaných variant $\Delta 9_{10}$ a 11q s expresí až 10 a více % celkové *BRCA1*, bylo identifikováno v leukocytech 562, v prsní tkáni 998 a v tukové tkáni 940 čtení ($\Delta 9_{10}$), resp. 823, 2971 a 1048 čtení u 11q.

Na druhou stranu ostatní varianty, které byly z kvantifikace vyřazeny na základě Cp hodnot za spolehlivým detekčním limitem qPCR metody ($\Delta 3_5$, $\Delta 11$, $\Delta 9_{11}$) správně vykazovaly mnohem nižší hodnoty množství čtení identifikovaných NGS (> 500 čtení). Omezená kvantifikace ASV se dá na základě NGS analýz provést, ale pro přesné výsledky musí být použity metody kvantitativní PCR či ddPCR.

I přes zmiňované nedostatky v kvantifikaci byla navržena metodika identifikace ASV genu našeho zájmu v našich laboratořích již několikrát úspěšně využita a průběžná, či pre-finální, data těchto experimentů vykazují výborné výsledky.

Závěr

Alternativní sestřih a varianty vznikající na jeho základě jsou více než 30 let intenzivně zkoumány. Během této doby byla objasněna řada mechanismů, které alternativní sestřih způsobují nebo jinak ovlivňují. Současně byla na řadě konkrétních případů demonstrována důležitá a nezastupitelná role ASV v organismu. Nemálo ASV bylo popsáno v průběhu výzkumu genů predisponujících ke karcinomu prsu, zvláště u *BRCA1*, který byl v souvislosti s tímto onemocněním identifikován a intenzivně zkoumán jako první. První ASV *BRCA1* byly popsány už v roce 1996 a od té doby jich byly identifikovány desítky. Nedlouho po objevení ASV se začaly objevovat práce zkoumající funkci identifikovaných ASV *BRCA1*, přičemž byl prokázán nesporný patogenní efekt několika z nich. Přesto nebyla otázka složení a množství jednotlivých variant v lidských tkáních dosud uspokojivě zodpovězena. Z důvodu nedostatečných znalostí o principu fungování regulačních míst alternativního sestřihu také nebylo dlouhou dobu zcela zřejmé, jaké varianty se vyskytují přirozeně a jaké se vyskytují na základě mutací, postihujících tato místa. Taktéž neexistoval levný, jednoduchý a rychlý přístup k analýze a identifikaci ASV, který by měl dostatečnou citlivost. Proto se předkládaná práce pokusila tyto problémy vyřešit.

V rámci řešení této práce byl navržen přístup, který umožňuje s využitím sekvenování nové generace identifikovat na úrovni mRNA přítomné sestřihové varianty libovolného genu našeho zájmu. Zavedená metodika byla validována na modelovém genu *BRCA1*, pravděpodobně jediného takto komplexního genu, u kterého existuje katalog ASV z roku 2014. Porovnání s tímto katalogem prokázalo, že v práci předkládaný NGS přístup identifikace je citlivější, dle použité metodiky jednoznačně rychlejší a

bezesporu levnější. V návaznosti na tato zjištění je aktuálně používán s výbornými průběžnými výsledky pro analýzu dalších ASV jiných genů (dosud nepublikováno).

Na základě NGS identifikace ASV *BRCA1* bylo přesnou RT-qPCR kvantifikováno několik nejčastěji se vyskytujících „*in-frame*“ variant, poprvé na větším souboru zdravých tkání leukocytů periferní krve, prsní a přilehlé tukové tkáni u zdravých žen a žen, u kterých se v průběhu života vyvinul karcinom prsu. Výsledky prokázaly, že: a) exprese *BRCA1* ve zdravých tkáních je velmi nízká; b) z celkem deseti vyšetřovaných sestřihových variant nepostihující čtecí rámec, které byly detailněji kvantifikovány metodou RT-qPCR, jich šest bylo exprimováno ve > 1% celkové *BRCA1*; c) jejich relativní exprese se pohybovala kumulativně mezi 35 – 40 % všech transkriptů *BRCA1*, bez ohledu na vyšetřovaný typ tkáně; d) všech šest variant bylo přítomno ve všech třech vyšetřovaných tkáních, ale míra exprese některých z nich se lišila (u leukocytů periferní krve vykazuje $\Delta 9_{-10}$ více než 2x nižší a IRIS naopak 2x vyšší v porovnání s ostatními tkáněmi); e) exprese variant v prsní a přilehlé tukové tkáni spolu obvykle pozitivně, statisticky signifikantně korelují, zatímco v porovnání s leukocyty ne; f) rozdíly v expresi vyšetřovaných ASV u souboru zdravých žen a pacientek s karcinomem prsu jsou v relevantní prsní tkáni malé, statisticky signifikantně je o 15,4 % snížena exprese varianty IRIS, která má pravděpodobně odlišnou funkci než wt *BRCA1* či má funkci regulační, o 11,7 % je snížena exprese $\Delta 9_{-10}$, která má pravděpodobně velmi podobnou funkci jako wt *BRCA1*; g) exprese variant spolu laterálně pozitivně koreluje.

Výsledky předkládaných experimentů objasňují, vzhledem k citlivosti použitých metod, složení a množství alternativních sestřihových variant *BRCA1* v relevantních tkáních lidského těla – leukocytů periferní krve (ze kterých je materiál pro genetické vyšetření nejčastěji extrahován) a mamární (přilehlé tukové) tkáně, která je obvykle postižena případným karcinomem (nebo vyšetřována na aktuální somatický status *BRCA1*). Na základě kvalitativních i kvantitativních výsledků této práce, v porovnání s budoucími výsledky např. rutinních RNA-Seq analýz nádorové prsní tkáně, bude ihned možné identifikovat sestřihovou variantu vzniklou na základě aberantního sestřihu, tzn. nepřímo odhalit mutace vedoucí k aberantnímu sestřihu, anebo, na základě kvantitativní dysbalance fyziologicky se vyskytujících variant, identifikovat mutaci v regulačním sestřihovém místě.

Literatura

- Brandão RD, Mensaert K, López-Perolio I, Tserpelis D, Xenakis M, Lattimore V, Walker LC, Kvist A, Vega A, Gutiérrez-Enríquez S, Díez O; KConFaB Investigators, de la Hoya M, Spurdle AB, De Meyer T, Blok MJ. Targeted RNA-seq successfully identifies normal and pathogenic splicing events in breast/ovarian cancer susceptibility and Lynch syndrome genes. *Int J Cancer*. 2019 Jan 8.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol*. 1999 Dec;9(12):M57-60. Review.
- Chai Y, Chipitsyna G, Cui J, Liao B, Liu S, Aysola K, Yezdani M, Reddy ES, Rao VN. c-Fos oncogene regulator Elk-1 interacts with BRCA1 splice variants BRCA1a/1b and enhances BRCA1a/1b-mediated growth suppression in breast cancer cells. *Oncogene*. 2001 Mar 15;20(11):1357-67.

- Chai YL, Cui J, Shao N, Shyam E, Reddy P, Rao VN. The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene*. 1999 Jan 7;18(1):263-8.
- Colombo M, Blok MJ, Whiley P, Santamariña M, Gutiérrez-Enríquez S, Romero A, Garre P, Becker A, Smith LD, De Vecchi G, Brandão RD, Tserpelis D, Brown M, Blanco A, Bonache S, Menéndez M, Houdayer C, Foglia C, Fackenthal JD, Baralle D, Wappenschmidt B; kConFaB Investigators, Díaz-Rubio E, Caldés T, Walker L, Díez O, Vega A, Spurdle AB, Radice P, De La Hoya M. Comprehensive annotation of splice junctions supports pervasive alternative splicing at the BRCA1 locus: a report from the ENIGMA consortium. *Hum Mol Genet*. 2014 Jul 15;23(14):3666-80.
- EIshamy WM, Livingston DM. Identification of BRCA1-IRIS, a BRCA1 locus product. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):954-967.
- Fabbro M, Rodriguez JA, Baer R, Henderson BR. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21315-24.
- Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Feb;13(2):397-406.
- Fortin J, Moisan AM, Dumont M, Leblanc G, Labrie Y, Durocher F, Bessette P, Bridge P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Pichette R, Plante M, Provencher L, Voyer P, Simard J. A new alternative splice variant of BRCA1 containing an additional in-frame exon. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1731(1):57-65.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review.
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971 Apr;68(4):820-3.
- Li AG, Murphy EC, Culhane AC, Powell E, Wang H, Bronson RT, Von T, Giobbie-Hurder A, Gelman RS, Briggs KJ, Piwnica-Worms H, Zhao JJ, Kung AL, Kaelin WG Jr, Livingston DM. BRCA1-IRIS promotes human tumor progression through PTEN blockade and HIF-1 α activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 Oct 9;115(41):E9600-E9609.
- Lu M, Conzen SD, Cole CN, Arrick BA. Characterization of functional messenger RNA splice variants of BRCA1 expressed in nonmalignant and tumor-derived breast cells. *Cancer Res*. 1996;56(20):4578-81.
- Maniccia AW, Lewis C, Begum N, Xu J, Cui J, Chipitsyna G, Aysola K, Reddy V, Bhat G, Fujimura Y, Henderson B, Reddy ES, Rao VN. Mitochondrial localization, ELK-1 transcriptional regulation and growth inhibitory functions of BRCA1, BRCA1a, and BRCA1b proteins. *J Cell Physiol*. 2009 Jun;219(3):634-41.
- Morris JR, Solomon E. BRCA1: BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet*. 2004;13(8):807-817.

- Orban TI, Olah E. Expression profiles of BRCA1 splice variants in asynchronous and in G1/S synchronized tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(1):32-8.
- Ouchi T. BRCA1 phosphorylation: biological consequences. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(5):470-475.
- Paschalis A, Sharp A, Welte JC, Neeb A, Raj GV, Luo J, Plymate SR, de Bono JS. Alternative splicing in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018 Nov;15(11):663-675 Review.
- Qin Y, Xu J, Aysola K, Oprea G, Reddy A, Matthews R, Okoli J, Cantor A, Grizzle WE, Partridge EE, Reddy ES, Landen C, Rao VN. BRCA1 proteins regulate growth of ovarian cancer cells by tethering Ubc9. *Am J Cancer Res.* 2012;2(5):540-8.
- Rodríguez JA, Henderson BR. Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1. *J Biol Chem.* 2000;275(49):38589-96.
- Scholzová E, Malík R, Sevcík J, Kleibl Z. RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett.* 2007 Feb 8;246(1-2):12-23. Review.
- Seo A, Steinberg-Shemer O, Unal S, Casadei S, Walsh T, Gumruk F, Shalev S, Shimamura A, Akarsu NA, Tamary H, King MC. Mechanism for survival of homozygous nonsense mutations in the tumor suppressor gene BRCA1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018 May 15;115(20):5241-5246.
- Wang H, Shao N, Ding QM, Cui J, Reddy ES, Rao VN. BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene.* 1997;15(2):143-57.
- Xu J, Agyemang S, Qin Y, Aysola K, Giles M, Oprea G, O'Regan RM, Partridge EE, Harris-Hooker S, Rice VM, Reddy ES, Rao VN. A Novel Pathway that Links Caveolin-1 Down-Regulation to BRCA1 Dysfunction in Serous Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Environ Health Perspect.* 2014;122(1):104-111. pii: 004.
- Xu J, Footman A, Qin Y, Aysola K, Black S, Reddy V, Singh K, Grizzle W, You S, Moellering D, Reddy ES, Fu Y, Rao VN. BRCA1 Mutation Leads to Deregulated Ubc9 Levels which Triggers Proliferation and Migration of Patient-Derived High Grade Serous Ovarian Cancer and Triple Negative Breast Cancer Cells. *Int J Chronic Dis Ther.* 2016;2(3):31-38.
- Xu J, Watkins T, Reddy A, Reddy ES, Rao VN. A novel mechanism whereby BRCA1/1a/1b fine tunes the dynamic complex interplay between SUMO-dependent/independent activities of Ubc9 on E2-induced ERalpha activation/repression and degradation in breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2009 Apr;34(4):939-49.



Mgr. Jan Hojný, Ph.D. (e-mail: jan.hojny@lf1.cuni.cz) je absolventem doktorského studijního programu Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Svou doktorskou dizertační práci „Analýza genových produktů vznikajících v důsledku alternativního sestřihupre-mRNA a jejich význam v onkogenezi karcinomu prsu“ vypracoval pod vedením MUDr. Petry Kleiblové, Ph.D. na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty UK a úspěšně ji obhájil dne 19.9.2019.

Perličky ze školních lavic
(z písemných zkoušek z genetiky, PŘF UK, Praha, 2015 – 2017)
doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D., Katedra genetiky a mikrobiologie, PŘF UK, Praha

DNA je tvořena chromozomy.

Genetický kód je degradovaný.

Analogy bází mohou vystrnadit báze z jejich místa v genetické informaci.

Cytogenetická analýza se používá hlavně u organismů, které mají hodně potomků (u člověka je téměř k ničemu).

Princip PCR: pomocí polymerázi (*pravopis zachován*) se rozpustí látky, jejichž přebytek nebo nedostatek způsobí reakci dalšího polymeru.

Při genetické chorobě se v rodině dědí diagnostika i před otěhotněním.