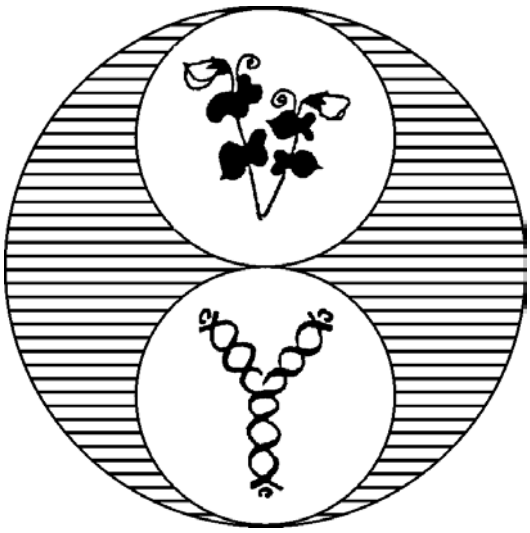
GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA

INFORMAČNÍ LISTY



Číslo 29 Září 2005

OBSAH

Zápis ze schůze výboru GSGM konané dne 12. 5. 2005 ……. 1
Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2004 ……. 3
Texty přednášek z Genetické konference GSGM „Virus a buňka“ ……..….... 5
Genomika bakteriofágů (R. Pantůček) …….. 6
Biotechnologické využití rostlinných virů a jeho perspektivy (K. Petrzik) ……. 16
Zprávy
K nedožitým osmdesátinám doc. RNDr. Jana Nečáska, CSc. (V. Pešina) ……..……. 28
Předseda GSGM prof. Stanislav Zadražil sedmdesátiletý (P. Pikálek) …… 30
RNA klub 2004 (S. Zadražil) …… 34
Pozvánka na RNA klub 2005 …… 36

***

Informační listy
číslo 29, září 2005
Vydává Genetická společnost Gregora Mendela
Redakční rada - Výbor GSGM
Výkonný redaktor - Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.
Katedra genetiky a molekulární biologie
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně
Kotlářská 2, 611 37 Brno

ISSN 1210-6267

Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela,
která se konala dne 12.května 2005

Místo konání: Katedra genetiky a molekulární biologie PřF MU Brno, Kotlářská 2

Přítomni (bez titulů): S. Zadražil, D. Vlček, J. Doškař, J. Relichová, E. Miadoková, J.Dvořák, M. Vojtíšková, K. Malachová, A. Knoll, K. Zelený, P. Pikálek

Omluveni (bez titulů): M. Slaninová, J. Šmarda, J. Fajkus

1/ Kontrola zápisu z minulé schůze výboru GSGM (Zadražil):
- bez připomínek.

2/ Zhodnocení Genetické konference uspořádané ve dnech 1.-2.2.2005 v Praze (Zadražil):
- proč tentokrát zaměřena na virologii, jakým způsobem byl proveden

výběr zvaných přednášejících, přínosy, ale i problémy organizace konference; celkový počet účastníků 55, velký podíl z nich studenti postgraduálního doktorského studia (hodnoceno velmi pozitivně).

3/ Cena GSGM pro mladé vědecké pracovníky za období 2002-2004 (Zadražil):
- vítězky byly vyhlášeny na únorové Genetické konferenci, cena byla rozdělena a dvě laureátky této ceny (finančně sponzorované firmou GENETICA, s.r.o., Praha), Mgr. Eva Sýkorová, Ph.D. (BFÚ AV ČR Brno) a Mgr. Petra Mannová, Ph.D. (katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK Praha) byly na tuto konferenci pozvány k 30minutovým přednáškám, zúčastnila se však jen Mgr. Sýkorová (Mgr. Mannová se omluvila pro svůj dlouhodobý pobyt na zahraničním pracovišti v USA, na konferenci poslala k vystavení alespoň plakátové sdělení shrnující výsledky ze souboru jejích oceněných prací). Shodou nešťastných okolností a vinou nedorozumění mezi organizátory konference nebyla k účasti na konferenci a k předávání ceny pozvána sponzorující firma Genetica. Prof.Zadražil konstatoval, že představiteli firmy Dr. Kvapilovi okamžitě zaslal omluvný a vysvětlující dopis s prosbou o osobní schůzku, na nějž však dosud nedostal žádnou odpověď. Prof. Zadražil bude dál v této záležitosti nejprve kontaktovat člena výboru doc. Fajkuse, který s firmou Genetica udělení ceny osobně projednával, a poté se pokusí znovu navázat spojení s Dr. Kvapilem. Vzniklé nedorozumění bylo později uspokojivě vyřešeno a celá záležitost podle doc. Fajkuse kladně uzavřena.

4/ Výsledky voleb nového výboru GSGM (Zadražil, Doškař):
- valné shromáždění GSGM, které se sešlo v průběhu Genetické konference v Praze 1.2.2005, schválilo jako platný následující výsledek korespondenčních voleb (hlasovalo celkem 49 členů GSGM):

49 hlasů – Zadražil, Vlček, Doškař
47 hlasů – Relichová
46 hlasů – Miadoková
45 hlasů – Dvořák, Pikálek
44 hlasy – Slaninová, Šmarda
43 hlasy – Fajkus

40 hlasů - Vojtíšková
34 hlasy – Malachová, Zelený
31 hlas – Knoll.

Všech 14 kandidátů se stalo členy nového výboru GSGM. Hlasováním členů výboru došlo k následujícímu rozdělení funkcí:
Zadražil – předseda; Vlček, Relichová – místopředsedové; Pikálek – tajemník; Dvořák, Slaninová – hospodáři; Doškař – redaktor Informačních listů GSGM; Miadoková, Šmarda, Vojtíšková, Zelený, Knoll – členové výboru. Členové výboru Knoll a Miadoková byli zároveň pověřeni funkcí revizorů účtů GSGM.

5/ Příprava dalšího čísla IL (Doškař, Zadražil):

- 29. číslo IL vyjde do 15.7.2005, bude obsahovat texty některých zvaných přednášek z Genetické konference 2005 (Pantůček, Petrzik, Matoušek), zhodnocení Genetické konference 2005 (Vlček), informaci o 2.ročníku konference „RNA klub“ v roce 2004 v Praze a o pořádání dalšího ročníku konference „RNA klub“ na podzim 2005 v Českých Budějovicích s pozvánkou (Zadražil), zápisy z posledních schůzí výboru GSGM (Doškař, Relichová, Pikálek) a aktualizovaný seznam členů GSGM (prof. Dvořák a Dr. Slaninová provedou revizi plateb členských příspěvků, neplatící členové budou ze seznamu vyřazeni).

6/ Kontrola hospodaření společnosti (Dvořák, Pikálek-Slaninová):

- za českou část GSGM přednesl zprávu prof. Dvořák, na účtu společnosti u KB je aktuálně 11.893,-Kč, v pokladně je momentální deficit 250,-Kč; pro zprávu o stavu účtu slovenské části GSGM bylo dohodnuto, že doc. Pikálek vyzve Dr. Slaninovou (která se schůze výboru GSGM nemohla osobně zúčastnit) o její zprávu elektronicky, a tuto její zprávu začlení do zápisu ze schůze výboru (podle následného sdělení Dr. Slaninové je na bankovním účtu slovenské části GSGM aktuálně 10.552,- Sk a v pokladně na hotovosti je k dispozici 7.421, -Sk).

7/ Různé:

- valné shromáždění GSGM na únorové konferenci 2005 odhlasovalo, že se doc. Ondřej stává čestným členem výboru GSGM, ten se však mezitím dopisem svého členství v GSGM zřekl, doc. Pikálek ho proto bude osobně kontaktovat k vyjasnění situace
- vyžádanou korekturu údajů o GSGM pro World Guide to Scientific Associations and Learned Societies provede a odešle doc. Pikálek
- příští Genetická konference GSGM se bude konat v roce 2007 – 2008 v Bratislavě
- příští schůze výboru GSGM se bude konat opět v Brně zhruba začátkem listopadu t.r.

Zapsali: *Relichová, Pikálek* Schválil: *Zadražil*

Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2004

Zůstatek ke 31.12. 2003		**20 357,28 Kč**
z toho:		
	na účtu KB	19 366,88 Kč
	v pokladně	990,40 Kč
Příjmy v roce 2004		**5 634,58 Kč**
z toho		
1. úroky z účtu u KB		9,58 Kč
2. členské příspěvky: z toho	placené na účet KB	5 175,- Kč
	placené hotově	450,- Kč
	celkem	5 625,- Kč
Výdaje v roce 2004		**12 516,50 Kč**
z toho		
1. poštovné za IL 2004:		1 310,- Kč
2. faktura tisk IL		8 865,- Kč
3. občerstvení pro výbor		403,50 Kč
4. poplatky KB: z toho	za vedení účtu	1 630,- Kč
	za položky	258,- Kč
	provize	50,- Kč
	celkem	1 938,- Kč
Zůstatek ke dni 31.12.2004		**13 475,36 Kč**
z toho:		
	na účtu KB 20.12.2004	11 748,46 Kč
	v pokladně k 31.12.2004	1 726,90 Kč

Vyúčtoval J. Dvořák, pokladník

Vyúčtovanie hospodárenia slovenskej časti GSGM k 31.12. 2004

Zostatok k 1.1.2004	**A- konto**	**9727.29 SK**
	B- hotovosť	**6445.90 SK**

A

Bankové operácie (dok.1)	- 925,14 SK
Príjmy z členských poplatkov k 31.12. 2004 (dok.1)	+ 1 750,00 SK
Zostatok na účte k 31.12.2004 (dok.1)	**10 552,15 SK**

B

Členské príspevky (dok.2)	+ 1 500,00 SK
Kancelárske potreby (dok.3)	- 525,00 SK
Zostatok hotovosti k 31.12. 2004	**+ 7 420,90 SK**

Celkový finančný stav k 31. 12. 2004 **+ 17 973,05 SK**

Bratislava, 13. 5. 2005

Vyúčtovala: M. Slaninová

Texty přednášek přednesených na

Genetické konferenci GSGM

konané v Praze ve dnech 1. - 2. února 2005

Genomika bakteriofágů

Roman Pantůček

Katedra genetiky a molekulární biologie, PřF MU v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Bakteriofágy (zkráceně fágy) jsou viry prokaryot, jejichž hostiteli jsou mikroorganismy ze skupiny bakterií a archeí. Vyskytují se v nejrůznějších prostředích, nejčastěji ve vodách a sedimentech oceánů, ústí řek, v půdě, v intestinálním traktu živočichů, v odpadních vodách, v prostředí biotechnologických provozů a v neposlední řadě ve stavu profágů v lyzogenních bakteriálních kmenech. Předpokládá se, že každý bakteriální druh má v průměru 10 druhů fágů. Fágy jsou tedy nejpočetnějšími biologickými objekty v biosféře a jejich počet se odhaduje až na 10^{31} (Chibani-Chennoufi *et al.* 2004).

Bakteriofágy byly objeveny počátkem minulého století nezávisle dvěma badately, britským bakteriologem Frederickem W. Twortem (1915) a francouzským bakteriologem Felixem H. d'Herelle (1917), jako agens neschopné tvořit definované jednotlivé buňky, způsobující lyzi bakterií. Díky své jednoduché stavbě se fágy staly vděčným modelem pro studium základních biologických procesů, které významně přispělo k rozvoji molekulární biologie a genetiky. Mezi základní práce, při nichž byly fágy použity patří studium mutací u bakterií (Luria a Delbrück 1943), důkaz, že DNA je genetický materiál (Hershey a Chase 1952), koncept transdukce (Zinder a Lederberg 1952), deleční mapování genů (Benzer 1961), objasnění genetického kódu (Crick *et al.* 1961) a vývoj mnoha rutinních technik molekulární biologie, z nichž nejvýznamnější je využití DNA polymeráz (de Waard *et al.* 1965), restrikčních endonukleáz (Linn a Arber 1968), DNA ligáz (Weiss *et al.* 1968), RNA ligáz (Silber *et al.* 1972),

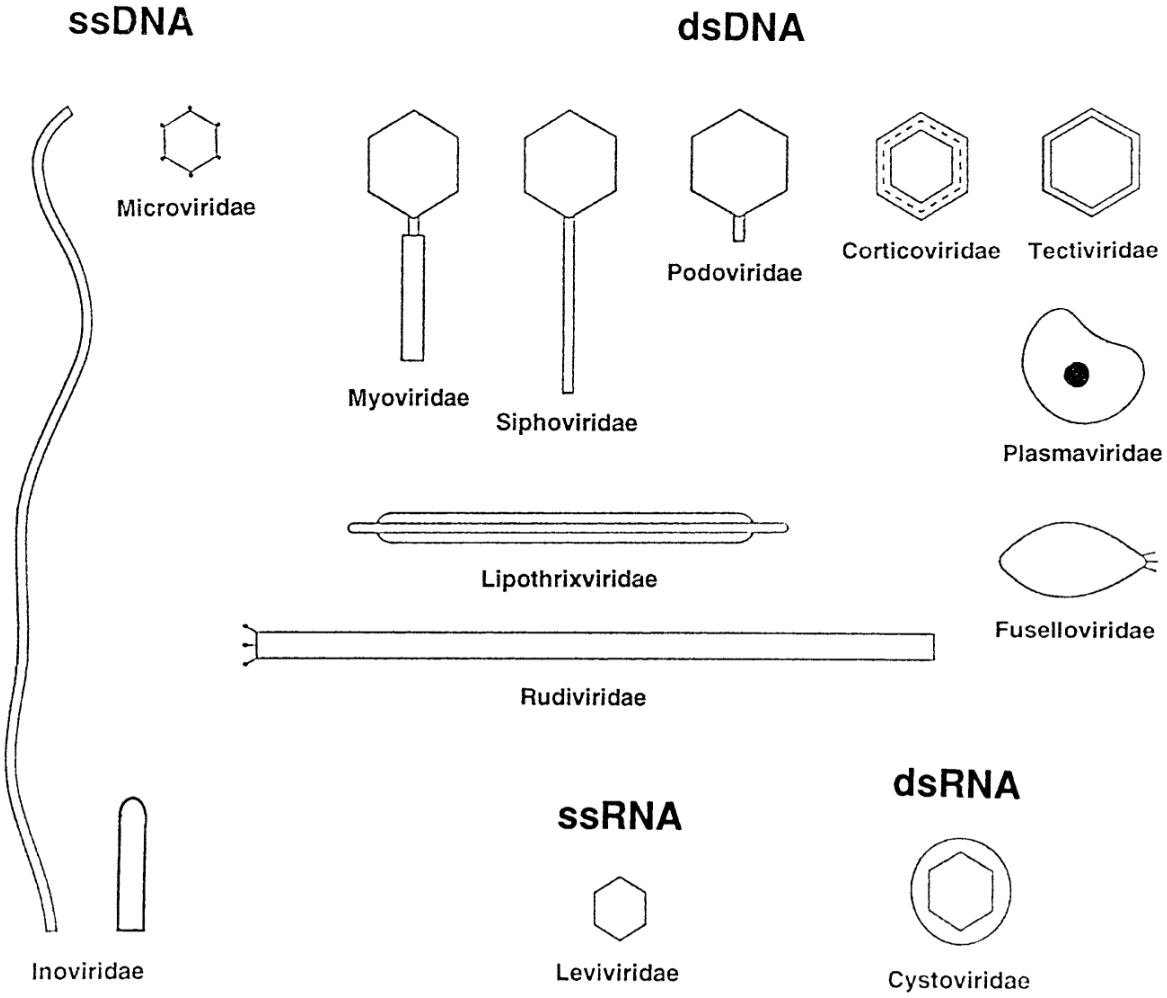
Tabulka 1. Taxonomická klasifikace bakteriofágů a základní charakteristiky čeledí

Čeleď	**Genom**	**Morfotyp**	**Tvar**
Myoviridae	dsDNA, L; 30-285 kb	A1 až A3	Bičíkaté
Siphoviridae	dsDNA, L; 14-135 kb	B1 až B3	*dtto*
Podoviridae	dsDNA, L; 12-64 kb	C1 až C3	*dtto*
Microviridae	ssDNA, K; 4,4-6,1 kb	D1	Mnohostěnné
Corticoviridae	dsDNA, K; 10 kb	D3	*dtto*
Tectiviridae	dsDNA, L; 15 kb	D4	*dtto*
Leviviridae	ssRNA, L; 3,5-4,6 kb	E1	*dtto*
Cystoviridae	dsRNAseg., L; 13-15 kb	E2	*dtto*
Inoviridae	ssDNA, K; 4,5-8,8 kb	F1 a F2	Vláknité
Lipothrixviridae	dsDNA, L; 21-40 kb	F3	*dtto*
Rudiviridae	dsDNA, L; 35 kb	F4	*dtto*
Plasmaviridae	dsDNA, K; 12 kb	G1	Pleomorfní
Fuselloviridae	dsDNA, K; 15-75 kb	G2	*dtto*

Poznámka: L – lineární genom, K – kružnicový genom

příprava ssDNA pro sekvencování využívající fága M13 (Schreier 1979), fágový display (Smith 1985), místně specifická mutageneze (Kunkel *et al.* 1985) a klonovací vektory odvozené z fága λ (Chauthaiwale *et al.* 1992).

V současné době je popsáno asi 5 100 fágů, které jsou klasifikovány do 13 čeledí (Tabulka 1), 30 rodů a asi 650 druhů. Nejpočetnější a současně nejlépe prostudovanou skupinu tvoří bičíkaté fágy reprezentované zhruba 4 950 izoláty, což je 96 % všech dosud známých fágů (Ackermann 2003). Základními kriterii používanými v taxonomii fágů jsou typ nukleové kyseliny, morfologie (Obr. 1) a struktura kapsidu, imunologické vlastnosti bílkovin kapsidu a vztah k hostiteli. Zařazení fágů do nižších taxonů jako jsou rody a druhy se řídí pravidly Mezinárodní komise pro taxonomii virů (ICTV) a není mnohdy jednoznačné. Řada údajů týkající se taxonomie a biologických charakteristik bakteriofágů je dostupná prostřednictvím internetu (Tabulka 2).



Obr. 1. Morfotypy 13 fágových čeledí

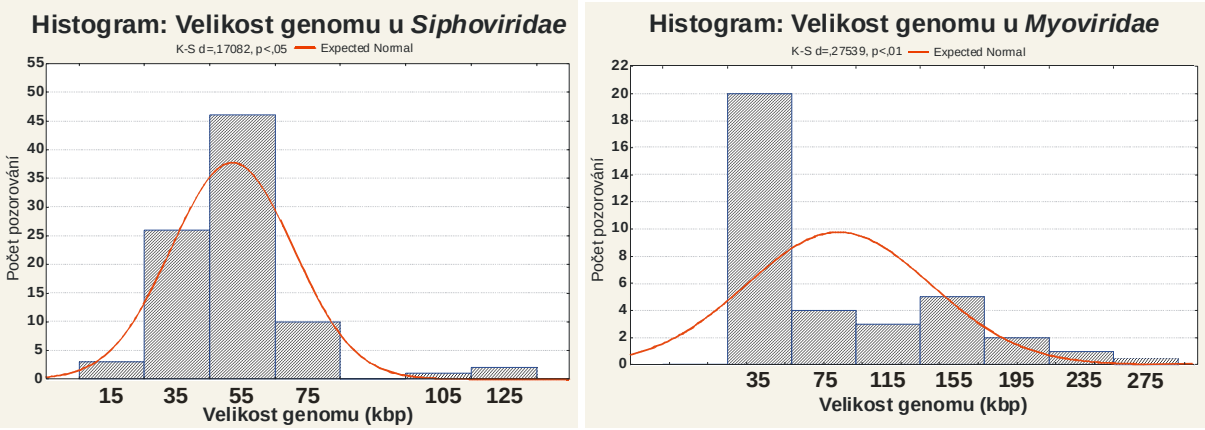
V databázi GenBank bylo v polovině roku 2005 publikováno přibližně 300 dokončených fágových genomů a dalších 250 bylo odhaleno ve stavu profága v sekvencovaných bakteriálních genomech. Profágy tedy zaujímají 10-20 % bakteriálního genomu. Na jeden bakteriální genom tak připadá průměrně 2,8 profágů.

Z hlediska morfologických pozorování jsou fágy nejčastěji zastoupeny u enterobakterií (820), *Lactococcus* (660), *Bacillus* (420), *Pseudomonas* (400), *Staphylococcus* (250), *Streptococcus* (200), *Vibrio* (190), *Clostridium* (170), *Lactobacillus* (150), *Rhizobium* (150) a *Listeria* (200) (Ackermann 2001).

Tabulka 2. Informační zdroje na internetu týkající se bakteriofágů

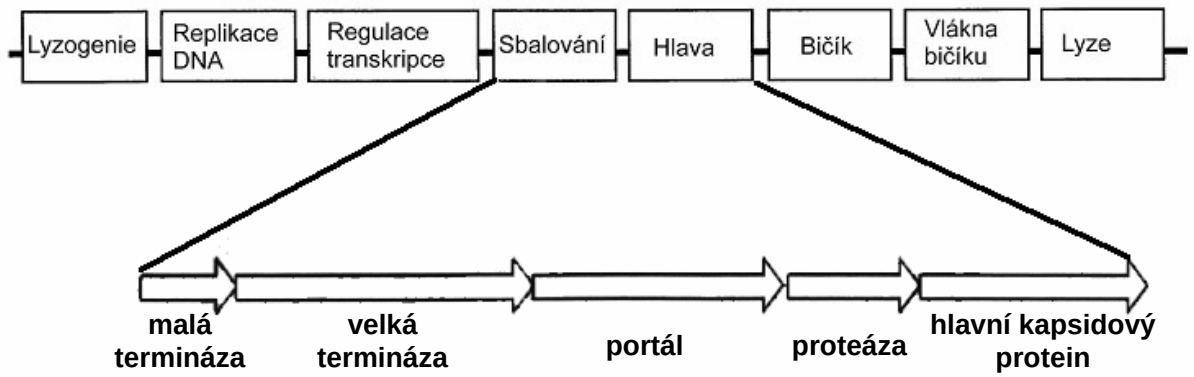
Název	**Problematika**	**URL**
Universal Virus Database ICTVdb	Taxonomie	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/
Bacteriophage Names 2000	Kompilace známých fágů	http://www.phage.org/names.htm
NCBI Genomes	Fágové genomy	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/phg.html
Bacteriophage Ecology Group (BEG)	Ekologie a evoluční biologie, bibliografie	http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/

Fágy jsou řazeny mezi variabilní genetické elementy a jejich genom je mozaikou složenou z genových úseků - modulů, které dohromady představují společnou zásobárnu genů, z níž může populace fágů čerpat (Botstein 1980). Zatímco u fágů s mnohostěnným, vláknitým nebo pleomorfním kapsidem je velikost genomu poměrně konzervativní, bičíkaté fágy se vyznačují značně variabilní velikostí genomu (Obr. 2). Úseky genů pro jednotlivé funkce (lyzogenie, replikace, regulace transkripce, sbalování, struktura hlavy, struktura bičíku, vlákna bičíku a lyze) mohou být

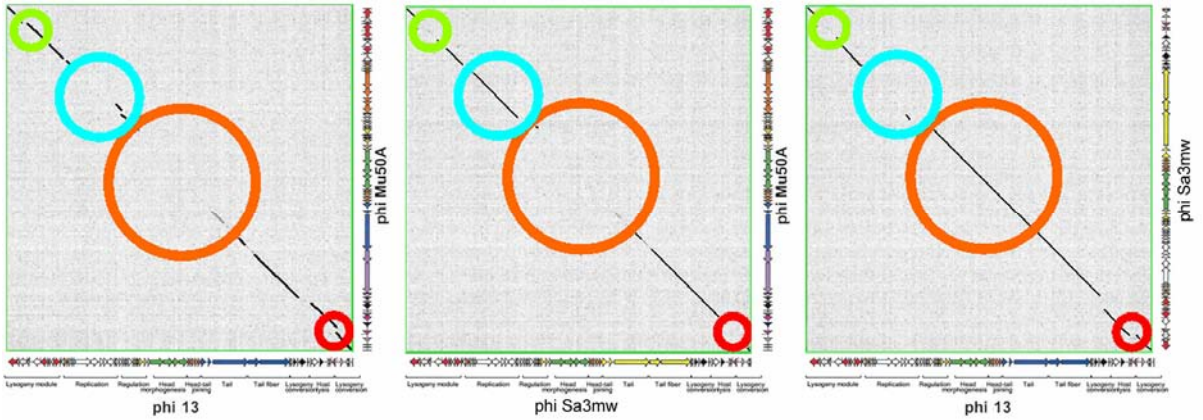


Obr. 2. Variabilní velikost genomu bičíkatých fágů čeledí *Siphoviridae* a *Myoviridae*.

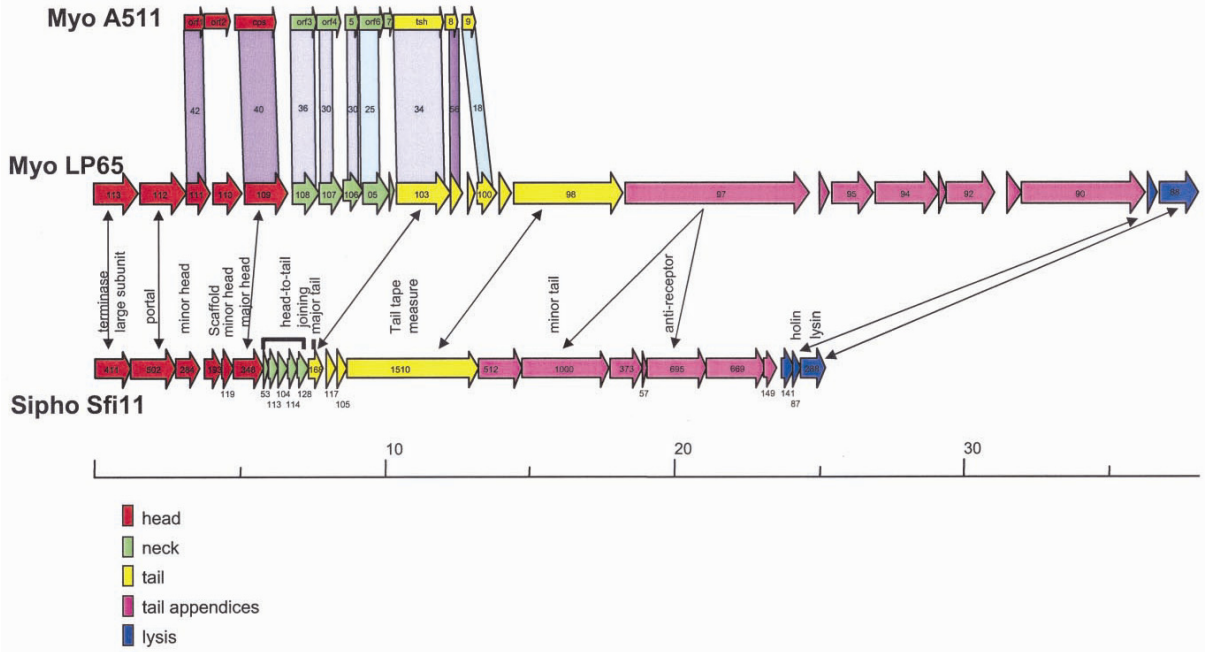
u příbuzných fágů prostřednictvím rekombinace mezi konzervativními sekvencemi oddělujícími jednotlivé moduly téměř libovolně zaměňovány, avšak pořadí jednotlivých modulů zůstává zpravidla zachováno (Obr. 3 a 4). Mezi nejvíce konzervativní fágové geny patří geny kódující fágovou terminázu, portálový protein, fágovou proteázu, jeden z proteinů bičíkových vláken a fágový endolyzin (Casjens



Obr. 3. Charakteristické uspořádání genů u fágů čeledi *Siphoviridae*.



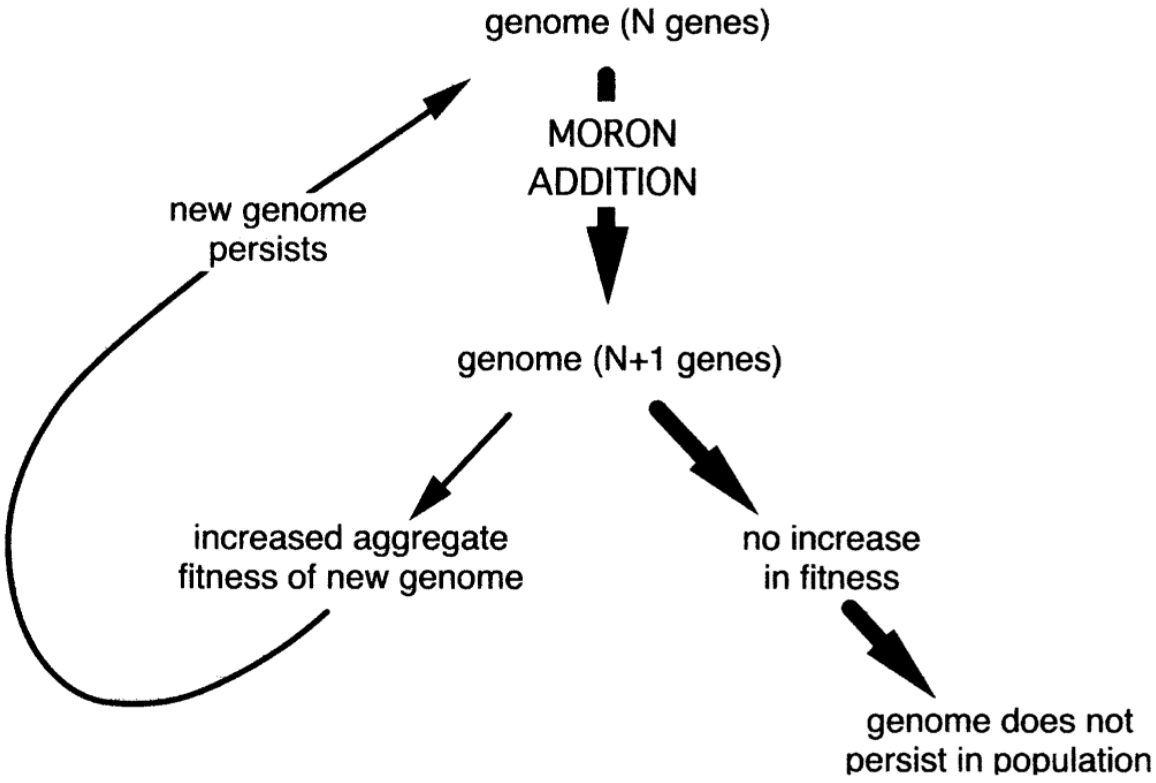
Obr. 4. Příklad modulární struktury stafylokokových fágů čeledi *Siphoviridae*. Pro analýzu byla použita metoda tečkových matic, ve kterých je každý zbytek z jedné sekvence DNA srovnáván s každým zbytkem ve druhé sekvenci. První sekvence tvoří osu *x* a druhá sekvence osu *y*. V oblastech, kde jsou si obě sekvence navzájem podobné tvoří řádek vysokých skóre diagonální linii přes tečkovou matici. Kružnicemi jsou označeny odpovídající si moduly pro lyzogenii, regulaci transripce, hlavní strukturní modul a lytický modul.



Obr. 5. Znázornění podobností aminokyselinových sekvencí proteinů mezi fágy čeledí *Siphoviridae* a *Myoviridae* nepříbuzných hostitelů (podle Chibani-Chennoufi *et al.* 2004).

2003). Podobnost bakteriofágových genů je přitom mnohem více patrná na úrovni sekvencí proteinů než na úrovni DNA a může se vyskytovat i u velmi vzdálených fágů klasifikovaných do různých čeledí (Obr. 5). To nasvědčuje skutečnosti, že bičíkaté fágy mohly vzniknout během evoluce v několika nezávislých událostech (Rohwer *et al.* 2002).

Analýza genomů bičíkatých fágů s dsDNA ukázala, že během jejich evoluce dochází kromě přeskupení genů v důsledku častých rekombinačních událostí také k získání nových genů jako jednoduchých genetických elementů nazývaných morony. Tento proces svědčí o modelu časné evoluce virů, ve kterém jsou viry považovány spíše za partnery vzájemné ko-evoluce s jejich hostitely než za elementy odvozené z buněk (Hendrix *et al.* 2000). Morony jsou horizontálně přenesené geny v důsledku nehomologní rekombinace, zpravidla obsahují vlastní promotor a terminátor a mají odlišný obsah G+C od fágového genomu. Mají původ v bakteriálním genomu a přinášejí nové funkce do fágového genomu jako je stabilizace kapsidu, zamezení infekci lyzogenu dalšími fágy, rozšíření rozmezí hostitele nebo přinášejí jiné selekční výhody hostiteli (Obr. 6.).



Obr. 6. Princip stabilizace moronu v populaci fágových částic v důsledku jejich selektivního zvýhodnění (podle Hendrix *et al.* 2003).

Dalšími genetickými elementy fágového genomu jsou fágové introny skupiny I. Byly detegovány v mnoha odlišných genech a to i u nepříbuzných fágů, zejména

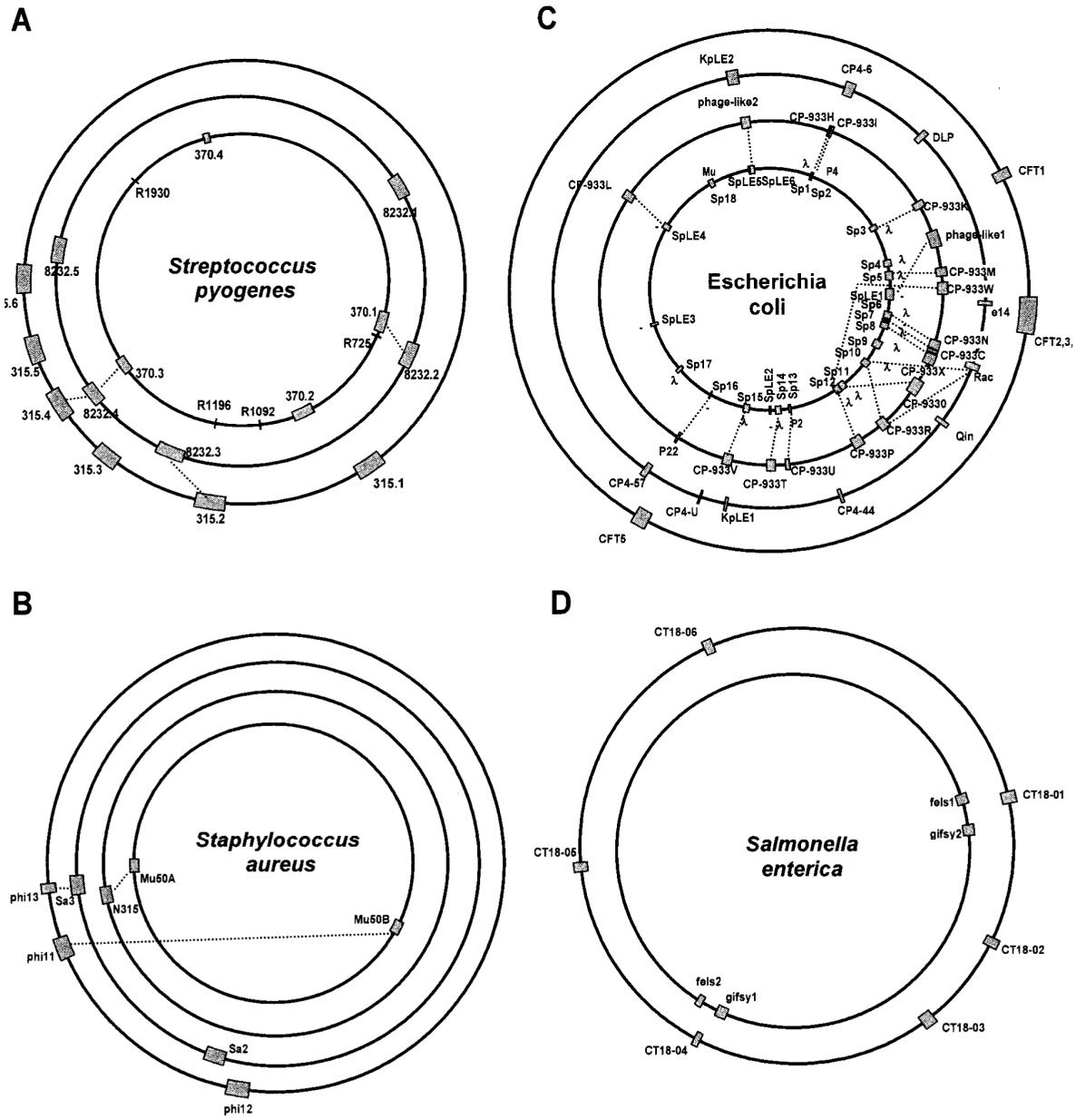
u fágů čeledi *Myoviridae* a fágů infikůjících bakterie s nízkým obsahem G+C. Sekvence intronů se vyznačují charakteristickou sekundární srtukturou umožňující jejich samosestřih prostřednictvím série guanosinem iniciovaných transesterifikací. Obvykle se chovají jako mobilní elementy a kódují vlastní „homing“ endonukleázu katalyzující jejich integraci.

Životní cyklus bakteriofágů může probíhat formou lytické infekce (virulentní a mírné fágy) nebo lyzogenizace (mírné fágy). Při lytické infekci dochází k adsorpci virionu na povrch buňky, vstupu DNA do buňky a její replikaci, syntéze proteinů fágového kapsidu, sestavování virionů a lyzi buňky. Při lyzogenizaci virion adsorbuje na povrch buňky, DNA vstupuje do buňky a dochází k integraci (začlenění) fágového genomu do specifického *att*-místa na chromosomu bakteriální buňky (změna na profága). Profág se replikuje a dědí jako součást chromosomu lyzogenní bakteriální buňky do jejího potomstva. Lyzogenie je vhodná strategie pro přežití jak fágů, tak jejich hostitelů. Změny fenotypových vlastností bakterií navozené fágy se obecně označují jako fágové nebo též lyzogenní konverze. Buňka získává po lyzogenizaci nové vlastnosti, které ji mohou v určitém prostředí poskytnout selekční výhodu (Brüssow *et al.* 2004). U patogenních baktérií známe řadu příkladů lyzogenní konverze ovlivňující zejména virulenci podmíněnou různými mechanismy jako je tvorba extracelulárních toxinů, schopnost adheze, tvorba enzymů pro invazivitu, tvorba enzymů pro intracelulární přežívání, změna povrchových antigenů, zvýšení rezistence k séru, získání genů pro reparaci mutačních poškození nebo tvorba bakteriocinů (Tabulka 3).

Tabulka 3. Nejvýznamnější faktory virulence kódované fágy.

Protein	**Gen**	**Fág**	**Bakteriální hostitel**
Difterický toxin	*tox*	ß-phage	*Corynebacterium diphtheriae*
Neurotoxin	*C1*	Phage C1	*Clostridium botulinum*
Shiga toxin	*stx1-2*	H19B	*Escherichia coli*
Stafylokokové enterotoxiny A, E, G, K, L, P	*sea, see, seg, sek, sel, sep*	ϕN315, ϕ42, ϕMu50A	*Staphylococcus aureus*
Exfoliativní toxin A	*eta*	ϕETA	*Staphylococcus aureus*
Erytrogenní toxiny typu A1, A3, C, I, H, M, L a K	*speA1, A3, C, I, H, M, L, K*	T12, CS112, 8232.x,315.x	*Streptococcus pyogenes*
Cholera toxin	*ctxAB*	CTXf	*Vibrio cholerae*
Leukocidin	*lukS, lukF*	ϕPVL, ϕSLT	*Staphylococcus aureus*
O-antigen acetyláza	*oac*	Sf6	*Shigella flexneri*
Membránový protein		Mu-podobné	*Neisseria meningitidis*
Glukosylace	*rfb, gtr*	P22, e34	*Salmonella enterica*
Superoxid dismutáza	*sodC*	GIFSY-2	*Salmonella enterica*
Neuraminidáza	*nanH*	Fels-1	*Salmonella enterica*
Hyaluronidáza	*hylP*	H4489A	*Streptococcus pyogenes*
Stafylokináza	*sak*	ϕ13, ϕ42	*Staphylococcus aureus*
Adhesin	*vir*	MAV1	*Mycoplasma arthritidis*

Bakteriofágy tedy hrají významnou úlohu v biologii svých hostitelů. Kromě toho, že lyzují nebo lyzogenizují různé kmeny jednotlivých bakteriálních druhů se podstatně podílejí na jejich genetické variabilitě (Obr. 7). Řada fágů uskutečňuje přenos chromosomových a plasmidových genů mezi svými hostiteli transdukcí a fágem zprostředkovanou konjugací a přispívá tak k rychlému výskytu a šíření kmenů rezistentních k nově zaváděným antibiotikům a k dalším antibakteriálním látkám.



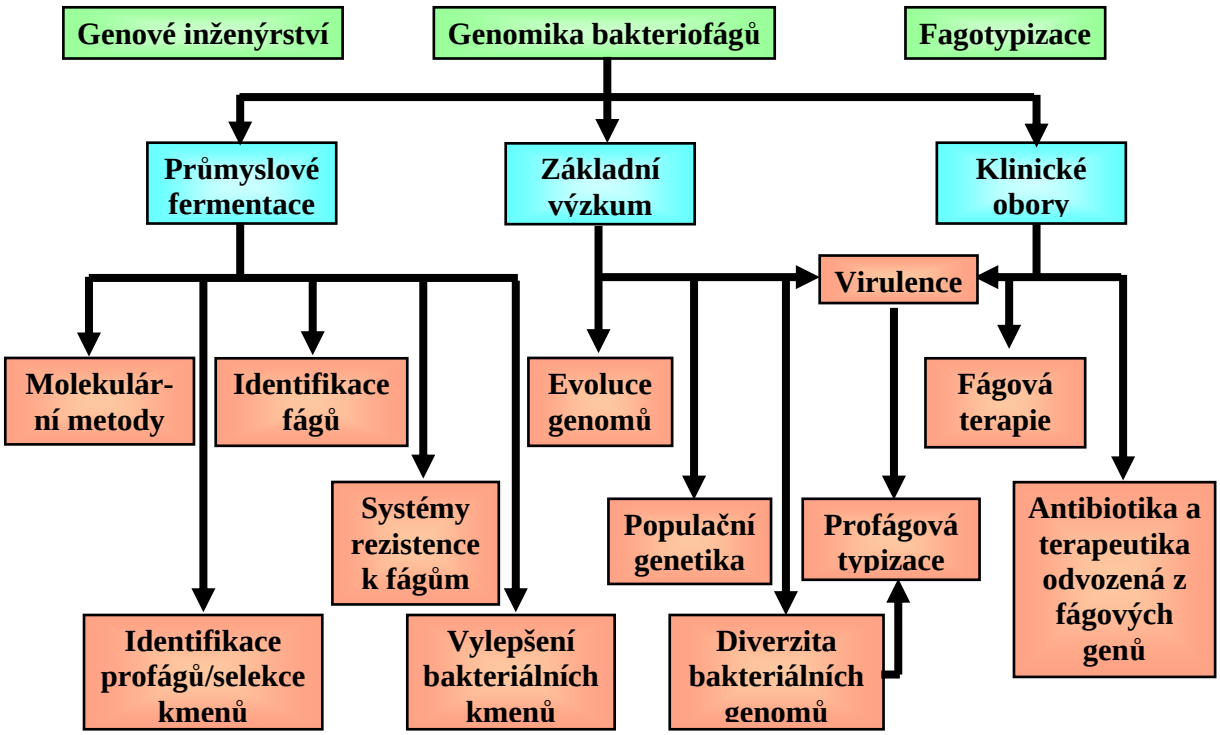
Obr. 7. Variabilita v obsahu profágů na příkladu některých bakteriálních druhů (podle Canchaya *et al.* 2003).

Kromě využití fágů jako modelových systémů v základním výzkumu existuje celá řada dalších oblastí, kde mají bakteriofágy uplatnění (Obr. 8).

Schopnost fágů lyzovat jen určité kmeny bakterií se stala základem fágové typizace, která je v širokém měřítku využívána k charakterizaci kmenů rodů

Staphylococcus, *Salmonella* aj. způsobujících infekce v humánní i veterinární klinické oblasti.

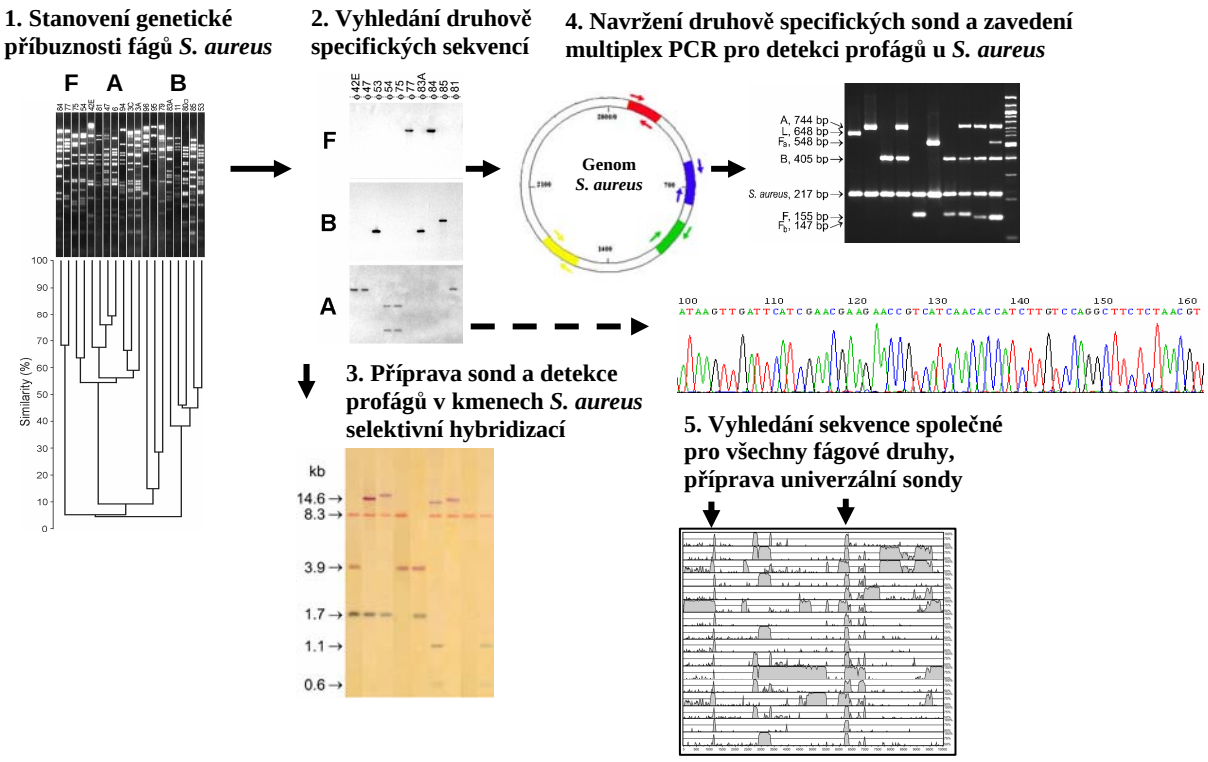
Dalším způsobem využití bakteriofágů (zejména virulentních a polyvalentních) je tzv. bakteriofágová terapie používaná jako alternativní způsob léčby stafylokokových onemocnění, zejména infekcí způsobených kmeny vyznačujícími se rezistencí k antibiotikům. Výhodou fágové terapie je cílené usmrcování buněk patogenního kmene, na rozdíl od jiných léčiv, která působí nespecificky i na přirozenou mikroflóru makroorganismu. Fágovou terapii lze rozdělit do následujících kategorií: (a) aplikace fágových částic ve formě purifikovaných lyzátů připravovaných *in vitro*, jejichž lytickým působením vzniká autovakcina; (b) aplikace fágových konstruktů s definovanou genetickou informací, bez nežádoucích genů, a navíc se zvýšenou lytickou schopností; (c) lokální aplikace lytických enzymů produkovaných bakteriofágy nebo enzymů se zvýšenou lytickou aktivitou upravených metodami proteinového inženýrství (spreje, kapky, masti); (d) aplikace *in vitro* připravených transdukujících fágových částic nesoucích vektor s geny s letálním účinkem pro bakteriální buňku; (e) využití antibiotik inspirovaných fágovými proteiny, které mají inhibiční účinky na replikaci bakteriálních buněk (Liu *et al.* 2004). Výzkum bakteriofágů v souvislosti s jejich využitím pro terapeutické účely je velmi perspektivní, o čemž svědčí zvyšující se světový trend nárůstu počtu publikací zabývajících se touto problematikou a vznik nejméně 20 specializovaných firem.



Obr. 8. Schematický diagram znázorňující význam bakteriofágů v základním výzkumu a klinické a biotechnologické praxi (upraveno podle McGrath *et al*. 2004).

Negativní působení bakteriofágů je významné v oblasti průmyslových fermentací založených na biochemických aktivitách mikroorganismů jako např. velkokapacitní výroba aminokyselin, antibiotik a nejrůznějších enzymů, mlékárenský průmysl (jogurty, sýry, atd.) a masný průmysl (salámy). Ztráty způsobené působením fágů mají značný negativní ekonomický dopad. Lytická aktivita fágů nebo uvolněných profágů vede k výraznému poklesu bakteriální biomasy, snížení množství žádaného produktu a k ovlivnění chutě a vůně potravin. Velká pozornost ve výzkumu fágů je proto věnována přípravě produkčních kmenů, u nichž je necitlivost k fágům navozena cílenou úpravou jejich genetické informace. Metodami genového inženýrství se modifikují bakteriální kmeny tak, aby postrádaly receptory pro adsorpci fágů, jsou vnášeny geny pro restrikční endonukleázy, geny zabraňující vyjádření fágových genů (*ori*, antisens RNA) a geny zabraňující infekci fágů (represory, gen *sie*).

Na závěr je uveden příklad využití profágů při molekulární typizaci druhu *Staphylococcus aureus* (Obr. 9). Perspektivní metoda profágové typizace vyvinutá na pracovišti autora (Pantůček *et al.* 2004) má rozlišovací schopnosti vyšší nebo srovnatelné se stávajícími metodami pro DNA „fingerprinting“ a může být vhodným doplňkem např. k makrorestrikční analýze prováděné pulzní gelovou elektroforézou. Pro identifikaci fágů a profágů byly v této studii připraveny z genomových sekvencí jednotlivých druhů stafylokokových bakteriofágů specifické molekulární sondy, pomocí nichž lze v bakteriích stafylokoků přítomnost profágů prokázat. V genomech fágů mezinárodní standardní řady byly identifikovány a stanoveny DNA-sekvence,



Obr. 9. Schematické znázornění vývoje metody molekulární typizace kmenů *Staphylococcus aureus* založené na rozdílech v obsahu profágů.

specifické současně pro séroskupiny a fágové druhy: séroskupina A (ϕ3A), B (P11-M15), F (ϕ77) a L (ϕ187). Optimalizací sady primerů navržených ve specifických sekvencích byla vyvinuta a zavedena multiplex PCR pro identifikaci fágů jednotlivých sérologických skupin a přímý důkaz přítomnosti profágů jednotlivých druhů v genomu kmenů *S. aureus* v jediné reakci PCR, umožňující získat pro každý fágový druh amplifikační produkt charakteristické velikosti (Obr. 9). Metoda detekce profágů byla ověřena jak na uměle lyzogenizovaných kmenech, tak na kmenech z klinického materiálu. Pomocí této metody lze do výše zmíněných druhů klasifikovat také všechny další stafylokokové fágy a profágy, u kterých byly již popsány genomy. Jelikož se obsahem profágů liší i velmi blízce příbuzné stafylokokové kmeny, lze „profágový profil" kmenů využít též jako novou genotypizační metodu k jejich odlišení a k velmi spolehlivé identifikaci, např. při epidemiologických studiích. Na rozdíl od klasické fagotypizace má uvedený postup výhodu především v tom, že je nezávislý na citlivosti testovaných kmenů k fágům. Identifikace profágů pomocí multiplex PCR je snazší než pomocí konvenčních metod jako je indukce UV-světlem nebo mitomycinem C; navíc je specifická a umožňuje současně provést jejich zařazení do fágových druhů.

Literatura:

Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch Virol* 2001; 146:843-857.

Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* 2003; 154:245-251.

Botstein D. A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 354:484-490.

Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68:560-602.

Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brussow H. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:238-276.

Casjens S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* 2003; 49:277-300.

Fouts DE. Bacteriophage bioinformatics. In C M Fraser, TD Read and KE Nelson (eds.), Microbial genomes, p. 71-91.Humana press, Totowa, New Yersey, 2004.

Hendrix RW, Hatfull GF, Smith MC. Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution. *Res Microbiol* 2003; 154:253-257.

Hendrix RW, Lawrence JG, Hatfull GF, Casjens S. The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends Microbiol* 2000; 8:504-508.

Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann ML, Brussow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol* 2004; 186:3677-3686.

Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Marvin-Guy L, Rami-Shojaei S, Brussow H. *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family *Myoviridae*. *J Bacteriol* 2004; 186:7069-7083.

Liu J, Dehbi M, Moeck G, Arhin F, Bauda P, Bergeron D, Callejo M, Ferretti V, Ha N, Kwan T, McCarty J, Srikumar R, Williams D, Wu JJ, Gros P, Pelletier J, DuBow M. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nat Biotechnol* 2004; 22:185-191.

McGrath S, Fitzgerald GF, van Sinderen D. The impact of bacteriophage genomics. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15:94-99.

Pantůček R, Doškař J, Růžičková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardová V, Rosypal S. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. *Arch Virol* 2004; 149:1689-1703.

Rohwer F, Edwards R. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol* 2002; 184:4529-4535.

Biotechnologické využití rostlinných virů a jeho perspektivy

Karel Petrzik

Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, Oddělení rostlinné virologie, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, petrzik@umbr.cas.cz

Pojem „virus“ u většiny lidí asociuje nemoc, nebezpečí, nebezpečné infekce, problematickou léčbu, u poučenějších pak i konkrétně HIV nebo ebola. V hlubokém stínu těchto témat stojí rostlinná virologie. Ta se ani zdaleka nemůže pyšnit tak atraktivními viry s podobným dramatickým dopadem na lidské zdraví, přesto se v ní rozvíjejí zajímavé oblasti, které by mohly za krátký čas podstatně ovlivnit kvalitu našeho života. Rostlinné viry se stávají totiž zajímavé i pro virology zabývajícími se viry patogenními pro člověka a živočichy a to právě pro to, že jsou patogenní pouze pro rostliny. U lidských a jiných infekčních virů je totiž velkým problémem množení těchto virů v hostitelských organismech nebo tkáňových kulturách, které je nezbytné pro získání dostatečného množství viru pro výzkum ale i pro přípravu protilátek a rovněž i bezpečnost práce výzkumníků. V současnosti jsou již zvládnuty technologie produkce nejen peptidů, ale i celé řady (i velkých) proteinů ve vektorech na bázi rostlinných virů. I proteiny viru HIV tak mohou být produkovány a získány velmi bezpečným způsobem, který nepředstavuje pro toho, kdo s takovýmto vektorem pracuje, významné nebezpečí.

Jaké vlastnosti máme k dispozici při práci s rostlinnými viry? Především celou škálu typů a velikostí genomů (jedno i dvojřetězcový, DNA i RNA, segmentovaný i jednomolekulový, o velikosti několika set nukleotidů až po téměř půlmegabasové), které umožňují zvolit si strategii exprese a upravit celou řadu vlastností virového vektoru podle konkrétních požadavků. Významnou vlastností je snadný mechanický přenos řady virů – stačí „šťávou“ infikované rostliny lehce potřít povrch listu citlivé rostliny. Místy infekce se stanou poškozené trichomy nebo jiné povrchové vrstvy epidermálních buněk, ze kterých se virová infekce během jednoho až dvou týdnů rozšíří do celé rostliny. Existují rostlinné viry s velmi úzkým ale i jiné s velmi širokým rozmezím hostitelů. Pokud by bylo žádoucí vytvořenou konstrukci rozšířit do populace, zřejmě by byl použit virus s širokým rozmezím hostitelů. Pokud bychom potřebovali co největší bezpečnost a izolaci vytvořeného konstruktu, zvolili bychom virus s omezeným rozmezím hostitelů. Neméně důležitý je výtěžek virových částic: jsou známy kombinace virus-hostitel, kde můžeme z 1 kg rostlinných pletiv izolovat až

gramová množství virionů. Toto množství stačí na několik tisíc imunizací (lidí, zvířat…) a potřebnou hmotu rostlin je přitom možné vyprodukovat na několika metrech čtverečních. Podobnou efektivitou se dosud nemůže pochlubit žádná jiná biotechnologie.

Izolace virionů je přitom velmi jednoduchá a levná – z homogenátu infikovaných rostlin jsou extrakcí chloroformem odstraněna listová barviva a makromolekuly jsou za chladu vysráženy polyetylenglykolem (např. PEG 6000) v přítomnosti několika procent chloridu sodného. Po centrifugaci získáme již hrubý purifikát virionů, který se přečistí další centrifugací. Celý proces trvá méně než jeden den a náklady na chemikálie jsou v řádu několika korun (vyjma centrifugy). Výhod popsaného způsobu izolace můžeme využít i v tom případě, kdy modifikujeme pouze gen pro kapsidový protein těch isometrických virů, které jsou schopné tvořit virové částice i bez přítomnosti nukleové kyseliny, jako jsou např. Comoviry, a izolovat prázdné viriony. U tyčkovitých a vláknitých virů se budou virové částice tvořit vždy jen v přítomnosti nukleové kyseliny.

Vytvoření efektivního virového vektoru však není triviální záležitostí. Musí být zajištěna funkce řady *cis*-působících elementů, které zajistí adekvátní replikaci a šíření v hostiteli se současnou vysokou expresí cizího genu. Tady jde pokrok ruku v ruce s poznáváním detailů uspořádání genomů, jejich expresí a způsobů regulace. U některých virů je známo více detailů, u jiných méně. Úspěšnost modifikací se pak projeví v závislosti podle toho, jak moc nebo jak málo se podařilo zachovat nebo napodobit přirozené regulační motivy a strategii exprese viru. Důležitou vlastností vektoru musí být i jeho stabilita: vektor musí být natolik stabilní, aby vytvářel žádoucí produkt (peptid, antigen, protilátku ale třeba i viriony), ale současně i tak nestabilní, aby byl jen velmi málo konkurenceschopný ve srovnání s divokou formou viru a pravděpodobnost jeho přežití v prostředí při nechtěném úniku byla tak co nejnižší. Pro biotechnologické účely je postačující, když je možné vektoru pasážovat 3-4x bez změny vlastností. Pokud mají být exprimovány geny jiné než rostlinné, bývá výhodné optimalizovat využití kodónů tak, aby bylo co nejbližší použitému rostlinnému hostiteli (např. tabáku). Samozřejmostí již je odstranění těch genů z genomu virů, které u jejich divokých forem zajišťují přenos hmyzími přenašeči.

Proč se snažíme vytvářet umělé konstrukce a generovat řady mutací? Důvodů je několik: především tyto konstrukce slouží ke

- zjišťování funkcí virových genů
- zjišťování interagujících proteinů a genomových segmentů hostitele

- navozování rezistence (odolnosti) rostlin proti virům
- produkci epitopů (antigenů) pro vakcinaci včetně tzv. „jedlých“ vakcín
- produkci kompletních genů
- využití kapsidu virů jako „lešení“ pro nanotechnologie.

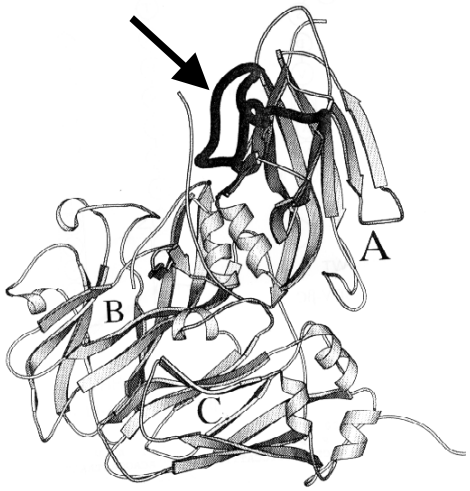
Jaké geny je nejvhodnější modifikovat? Pokud není vhodné exprimovat gen samostatně, pak jednoznačně gen pro kapsidový protein (CP).

- Viriony většiny virů obsahují jen kapsidový protein (a genom)
- Nejčastěji exprimovaným genem je právě CP
- Ostatní virové proteiny jsou syntetizovány v mnohem menší míře – musely by se izolovat z hostitele
- U většiny virů sekvenci CP genu známe

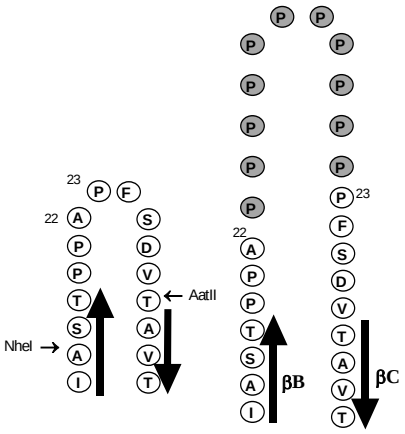
Exprese epitopů (peptidů)

Z hlediska velikosti vnášených inzercí se jedná o relativně nejsnazší úkol. Na druhou stranu, aby byla exprese úspěšná a konstrukt fungoval podle zadání, to jest, aby virus na povrchu svých částic nesl vložené antigenní determinanty, je nutné splnit minimálně jeden předpoklad: musíme umístit inzerce do těch míst genů, která jsou po expresi a složení umístěna na povrchu virionů. Jinými slovy, je třeba znát sekundární uspořádání kapsidového proteinu. V současnosti jsou k dispozici rentgenstrukturní data o stavbě šesti kulovitých virů a jednoho s tyčkovitými viriony – TMV.

Z isometrických virů se pro tyto účely nejčastěji používá **virus mozaiky vigny** (Cowpea mosaic virus - CPMV). Tento virus má kapsid složený z dvou různých proteinů, pro modifikace se používá gen pro menší protein (viz obr.1). Geny pro epitopy jsou vkládány do povrchové smyčky βB - βC, která má u originálních izolátů délku 8 aminokyselin, mezi aminokyseliny 22 a 23 (obr.2).



Obr.1. Model uspořádání malé (A) a velké (B) podjednotky kapsidového proteinu comoviru. Šipka ukazuje na inzerční místo. Upraveno podle Johnson et al. Annu. Rev. Phytopathol. 1997. 35:67-86



Obr.2. Detail smyčky βB-βC. Vlevo je smyčka normální formy, vpravo smyčka s inzercí 11 aminokyselin

Do uvedeného místa bylo v posledních letech vloženo více než 50 různých genů. Ve většině případů nebyla ovlivněna životaschopnost ani schopnost mechanického přenosu viru. Konstrukce, pokud nebyly delší než 30 aminokyselin, byly stabilní i po deseti pasážích a zachovávaly si imunogenní vlastnosti. Příkladem úspěšné technologie může být exprese lineárního epitopu viru enteritidy norků (Mink enteritis parvovirus) a použití takto upraveného viru k vakcinaci zvířat. (Dalsgaard *et al.*, 1997)

Příklady konstrukcí v kapsidovém proteinu CPMV

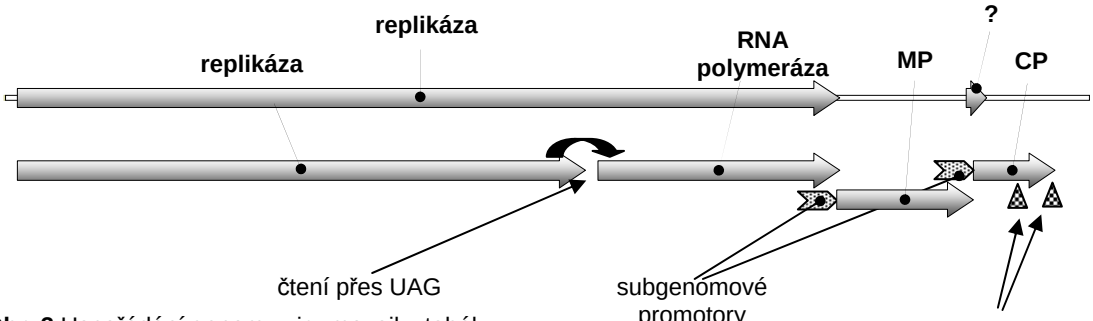
Konstrukce	sekvence smyčky			infekčnost	systémové šíření	výtěžek
Wt	MIAST		PPAPFSDVT	+	+	wt
FMDV-I	MIAST	**YSRNAVPNLRGDLQVLAQKVARLP**	STPPAPFSDVT	+	-	1% wt
FMDV-II	MIAST	**VPNLRGDLQVLAQKVARTLP**	DVT	-	-	-
HIV-III	MIASTPPA	**PRGPDRPEGIEEEGGERDRDRS**	PFSDVT	+	+	wt
HRV-II	MIASTPPA	**KDATGIDNHREAKL**	PFSDVT	+	+	wt

wt-normální forma viru, FMDV-foot-and-mouth disease virus, HIV-human immunodeficiency virus, HRV-human rhinovirus

Data převzata z: Lomonossoff &Johnson 1995 Seminars in virology 6: 257-267

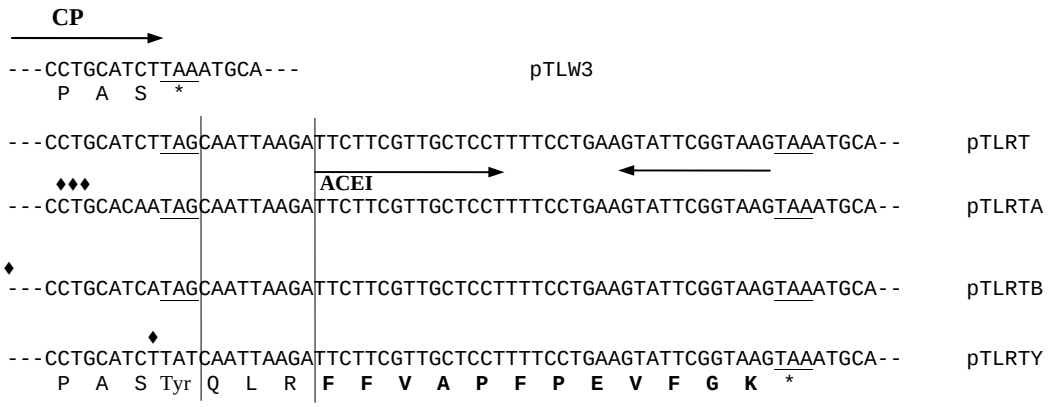
Druhým vektorem, který je používán pro expresi epitopů, je **virus mozaiky tabáku** (TMV). Genom TMV je kolem 6400 nukleotidů dlouhý a geny pro replikázu, RNA polymerázu, transportní protein (MP - zajišťuje šíření z buňky do buňky), a kapsidový protein (je rovněž nezbytný pro šíření viru v hostiteli) jsou umístěny ve třech ORF (obr. 3).

Jeho kapsidový protein je relativně malý – tvoří ho jen 158 aminokyselin. Na povrchu virionů jsou umístěny oba konce jednotlivých podjednotek a jedna vnitřní smyčka za aminokyselinou 63. Tento virus vyniká především snadným mechanickým přenosem a velmi vysokými výtěžky. Příkladem začlenění a exprese epitopu ve vnitřní smyčce TMV je sekvence malariálního epitopu „AGDR“ krvinkovky *Plasmodium vivax* (Turpen *et al.*, 1995).



Obr. 3 Uspořádání genomu viru mozaiky tabáku

Postup řešení při modifikaci C-konce kapsidového proteinu TMV demonstruje série experimentů Hamamota *et al.* (1993) na konstrukci pro tvorbu *angiotensin-I-converting enzyme* inhibitoru (ACEI). ACEI je peptid složený z 12 aminokyselin, který má při orálním podávání antihypertenzní účinek.



Konstrukce TMV vektoru s vloženým genem pro ACEI. Terminační kodón je podtržen, mutace před prvním terminačním kodónem jsou označeny klínkem

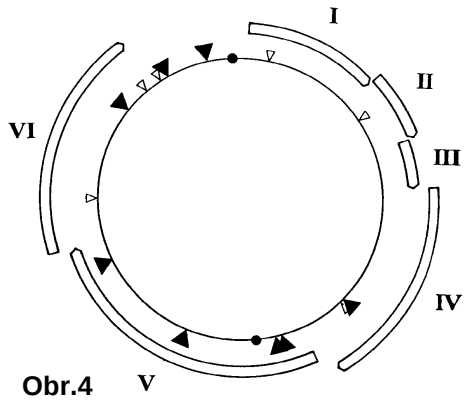
Bylo zjištěno, že pokud jsou modifikovány všechny molekuly CP vložením genu před terminační kodón, nedochází k tvorbě virionů. Proto byl původní terminační kodón TAA změněn na TAG, který je v rostlinné buňce z 5% suprimován (konstrukce pTLRT). Mutací

TCT na CAA (konstrukce pTLRTA) a mutací T→A před TAG terminačním kodónem (konstrukce pTLRTB) byla vytvořena místa, která jsou identická se suprimovaným místem na jiném místě genomu TMV (viz obr.3). Tyto změny způsobily, že se zvýšila suprese TAG terminačního kodónu CP až 10x na 50%. Peptid ACEI je umístěn za tripeptidem QLR, od kterého je možné ACEI odštěpit trypsinem. Nejvyšší výtěžek však měla konstrukce pTLRTY, kde byl terminační kodón nahrazen kodónem pro tyrosin.

Jak bylo naznačeno na předchozím příkladu, v případě exprese peptidů je někdy žádoucí, aby je bylo možné co nejsnadněji z hostitele izolovat a získat v čisté podobě. To se zajistí nejčastěji tak, že peptid je exprimován jako fůzní protein s proteinem (proteiny) tvořícím kapsid, a po izolaci virionů je pak z fůzního proteinu odštěpen vhodnou proteázou. V případě, že se viriony netvoří, využívá se afinitní vychytávání. Tento postup byl demonstrován vektorem na bázi TMV, do jehož genu pro kapsidový protein byl přidán epitop sedmi aminokyselin rozeznávaný streptavidinem. Viriony byly použity pak pro afinitní vychytání streptavidinu z kultury *Streptomyces avidinii*. Streptavidin byl pak uvolněn z částic změnou pH a čistý získán filtrací přes membránový filtr (Negrouk *et al.*, 2004).

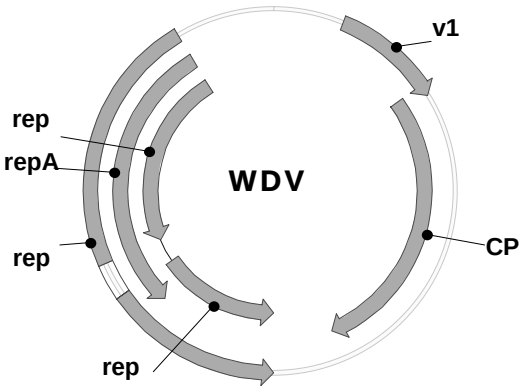
Exprese proteinů

První modifikace virů byly prováděny z důvodu snazší manipulace s DNA především s **caulimoviry**, z jehož typového zástupce – viru žilkové mozaiky květáku (Cauliflower mosaic virus - CaMV) pochází v biotechnologiích velmi populární promotor 35S. Tyto viry mají kruhový genom tvořený dsDNA a kódující 4-6 proteinů (obr.4). První tři geny se u caulimovirů překrývají o přesný počet nukleotidů a jejich exprese je podmíněna přítomností složitých struktur v nekódujících oblastech. Navíc, jediný gen, který je možné bez následků na životaschopnost viru zaměnit a který je nezbytný pro přenos viru mšicemi, je relativně malý gen II (470 párů basí - pb). Byly vytvořeny viry se substitucí tohoto genu za geny podobně veliké - gen pro dihydrofolátreduktázu (234 pb) a gen pro metalothionein (204 pb). Ukázalo se však, že u tohoto viru jsou mutanty mimořádně



Obr.4 Schema genomu caulimoviru. Geny jsou označeny I-VI. Trojúhelníky ukazují pozice promotorů a zesilovačů transkripce.

nestabilní díky rekombinacím a konstrukce komplikuje nutný požadavek na přesnost spojení genů I-III. Ani typový virus, ani jeho modifikace se v hostitelích nevyskytují ve větších koncentracích a proto se v současnosti již tyto viry pro biotechnologie nepoužívají.



Obr.5.
Schéma genomu viru zakrslosti ječmene

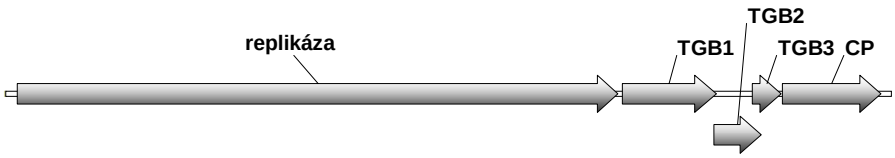
Další pokusy byly prováděny s **geminiviry** – viry s jednořetězcovým cirkulárním DNA genomem. Tyto viry však mají jeden z nejmenších a nejkompaktnějších genomů: dlouhé úseky kódují překrývající se geny, téměř unikátně se u nich objevuje intron, geny jsou umístěny v *sense* i *antisense* orientaci, zachovány rovněž musí zůstat intergenní oblasti, které obsahují regulační sekvence a promotory (obr.5). Jelikož mutace zvětšující genom geminivirů jsou nestabilní, možným řešením byla substituce genu V1, který zajišťuje šíření viru vektory a systémové šíření v rostlině, nebo substituce celého či části genu pro kapsidový protein (CP).

Těmito přístupy byly do různých geminivirů začleněny geny pro β–glukuronidázu, neomycinfosfotransferázu, nebo chloramfenikolacetyltransferázu. Tyto konstrukty produkovaly vložené geny v protoplastech anebo v listových discích, ale vzhledem k poškození genu V1 nebo CP bylo jejich šíření do systému hostitele znemožněno. Tím je rozsah použití geminivirů jako vektorů silně omezen, i když jsou jednou z mála čeledí virů infikujících jednoděložné rostliny.

Další pokrok byl podmíněn úspěchy v přípravách **infekčních cDNA** klonů a *in vitro* **infekčních transkriptů** virů s původně RNA genomem. Infekční DNA klony RNA virů jsou řízené zpravidla promotorem 35S. Infekční RNA přepisované *in vitro* z kompletních DNA klonů, jsou řízené promotory T7, T3 nebo λ fágů a pro dosažení infekčnosti obvykle potřebují připojit na 5´ konec strukturu čepičky. Z více než dvaceti infekčních transkriptů a cDNA klonů různých virů se nejčastěji modifikují TMV a X virus bramboru (Potato virus X – PVX, obr. 6).

Protože **virus mozaiky tabáku** translatuje MP a CP ze subgenomových RNA s vlastním subgenomovým promotorem (viz obr. 3), je nutné zajistit expresi vloženého genu rovněž subgenomovým promotorem. Protože přítomnost dvou identických promotorů by vedla k brzké rekombinaci a vyštěpení vloženého genu, osvědčilo se použít pro konstrukci promotor s příbuzného viru. Pomocí subgenomových promotorů a vektoru na bázi TMV byly v rostlinách exprimovány např. kompletní monoklonální protilátky (Verch *et al.*, 1998).

Genom vláknitého viru **PVX** toleruje začleňování velkých inzercí a to nejen jako samostatné geny řízené subgenomovým promotorem CP PVX, ale i jako fúzované konstrukce s kapsidovým proteinem. Přestože nejsou dosud známé krystalografické údaje o uspořádání CP tohoto viru, ví se, že na povrchu virionů je lokalizován C-konec tohoto proteinu. Nejlepší konstrukce schopné šíření do systému hostitele obsahovaly žádaný gen, gen pro proteázu 2A viru slintavky a kulhavky spojený s 5´-koncem genu pro kapsidový protein. V infikovaných rostlinách se tvořil fůzní protein a malé množství samostatného CP, který byl odštěpován proteázou 2A, a který je nezbytný pro šíření PVX do systému. Proteáza 2A je peptid o délce jen 16 aminokyselin a proto významně nezvětšuje celou konstrukci (Chapman *et al.* 1992).



Obr. 6. Uspořádání genomu PVX. TGB1-3 – proteiny zajišťující šíření viru

Slibný expresní systém představuje použití **satelitních RNA,** jejichž replikace závisí na pomocném viru. Některé kódují nestrukturní geny, které je možné zaměnit za požadovaný gen, netvoří však viriony a replikují se účinněji než pomocný virus. Pro účinnou replikaci stačí přitom zachování jen minimální délky původních 5´a 3´ konců satelitní RNA, které jsou rozeznávané replikázou pomocného viru (Lin *et al.* 1995).

Využití kapsidu virů jako „lešení“ pro nanotechnologie

Současná chemie se snaží připravovat struktury typu fulerenů vhodné pro katalytické účely, jako nové elektronické konstrukční prostředky, pro usměrňované podávání léčiv, a mnoho jiných aplikací. V přírodě se však podobné molekuly již vyskytují ve formě nejrůznějších virových částic. Přitom viriony mají vlastnosti, které jsou zatím mimo

schopnosti současné chemie: v závislosti na pH a dalších parametrech mohou měnit svou velikost, prostupnost pro různě velké molekuly a dostupnost funkčních skupin. Změnou těchto parametrů je tak možné např. dosáhnout uvolňování látek enkapsidovaných v jinak prázdných virionech např. CPMV (Douglas and Young, 1999, Wang *et al.*, 2002).

Jinou oblast využití představuje pokovování virionů. Pokovené viriony TMV se podařilo agregovat a vytvořit dutá nanovlákna o délce až několika mikrometrů. Technologická využití těchto struktur jsou již mimo můj záběr virologa a zájemce odkazuji na specializovanou literaturu.

Jak dále?

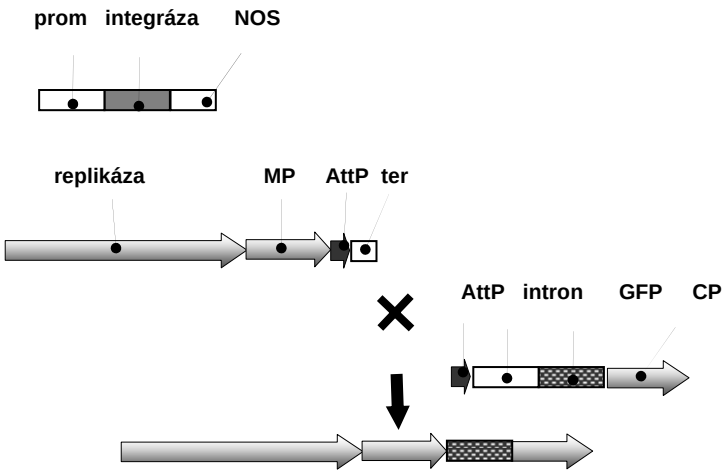
V současnosti máme několik fungujících metodik, jak dosáhnout toho, aby se v rostlinách tvořily proteiny podle našich potřeb: je to především transformace genomu hostitele nebo jeho plastidů, vyvinutá do 80. let 20. století, přechodná exprese genů zprostředkovaná *Agrobacterium tumefaciens*, a virová transfekce.

Stabilní transformace je časově velmi náročný experiment a výtěžky požadovaných proteinů u transformantů nejsou nijak vysoké – obvykle v rozmezí 0,1-0,5% rozpustných proteinů. Transformace plastidů poskytuje řádově vyšší výtěžky, překážkou však bývají některé posttranslační modifikace, které metabolismus plastidů nedokáže provést. Rovněž proces transformace plastidů je zdlouhavý a je prakticky nemožné získat gramová množství proteinu v kratší době než je jeden rok. Transformace agrobakteriem tuto poslední překážku odstraňuje, ale proces agroinfekce většího množství rostlin je technicky stále značně obtížný. Navíc listy infiltrované agrobakteriem exprimují proteiny opět ve srovnatelně nízkém množství, jako při stabilní transformaci. Z hlediska průmyslové produkce významných množství proteinů se tak jeví nejslibnější technologií virová transfekce. Existující produkční vektory jsou neustále modifikovány umělou evolucí tak, aby se v hostitelích šířily rychleji, vyměňují se MP a CP geny, aby bylo dosaženo jiného spektra hostitelů, upravují se hostitelské rostliny tak, aby neumlčovaly expresi virových genů, mezi mezidruhovými kříženci se hledají noví hostitelé virových vektorů, vše s cílem co nejekonomičtější produkce požadovaných proteinů.

Na výše uvedených příkladech byla demonstrována řada vektorů, které i přes složitost a použití řady elementů vylepšujících expresi, přece jen více méně kopírovaly stavbu divokých forem virů. Vektorem byl vždy kompletní virus, který dokázal infikovat buňku, šířit se do okolních buněk a do celé rostliny, exprimovat proteiny, skládat virové částice. Infekce hostitele byla prováděna buď přímo virem, nebo jeho infekční RNA nebo DNA, rozšíření viru

v rostlině trvalo 2-3 týdny a exprese požadovaného proteinu byla v nejlepším případě srovnatelná s expresí CP (asi 10% rozpustných proteinů). S použitím těchto takzvaných „kompletních“ virových vektorů je spojeno riziko možné rekombinace zpět do divoké formy viru a ztráty vložené konstrukce, v horším případě zrychlená evoluce viru nebo neočekávaná rekombinace do podoby agresivnějšího viru, protože vektor musí tvořit infekční částice a musí mít schopnost šířit se do systému hostitele.

V současnosti však vzniká nová generace virových vektorů, které jsou založeny na filosofii „dekonstruovaných“ virů: virové funkce, které jsou omezující, (např. virus je příliš specifický), nebo zbytné (tvorba infekčních virových částic) jsou delegovány na transgenního hostitele, který je pak poskytuje *trans*, nebo jsou nahrazovány elementy, které nepochází z virů (viz. http). Inokulace hostitele se neprovádí lokální infekcí virem, ale systémově agroinfekcí (Gleba *et al.*, 2005). Primární infekci a systémovou distribuci zajišťuje agrobakterium, virový vektor pak amplifikaci, vysokou hladinu exprese a šíření z buňky do buňky.

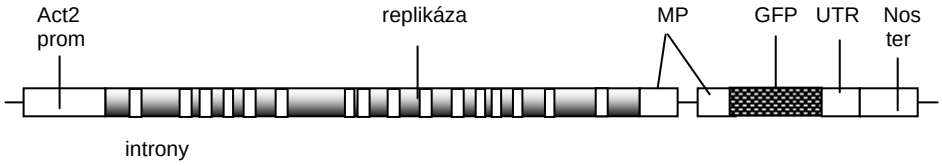


Obr. 7 Systém expresního vektora TMV řízeného integrázou

Pro úspěšnost konstrukcí je důležité, že je možné současně agroinfikovat buňky několika konstrukty. V experimentu schematicky znázorněném na obr. 7 byly použity tři konstrukty. K rekonstrukci virového vektoru dochází po rekombinaci v lokusech Att řízené integrázou a po vyštěpení intronu. Systémové šíření vektora zajišťuje CP viru (Marillonnet *et al.*, 2004). Tato metoda má ještě jednu podstatnou přednost: virový vektor je vkládán do hostitele ve dvou segmentech, z nich ale jen jeden nese gen pro požadovaný protein. Druhý

zajišťuje množení a šíření vektoru a je pro různé konstrukce univerzální. Podstatně kratší úsek virového genomu se tak modifikuje mnohem snadněji a rychleji.

Stejná skupina nedávno (květen 2005) představila ještě jiný, až 1000x účinnější, způsob exprese virového replikonu vnášeného do rostlin agroinfekcí (obr.8). Přes nepopiratelné úspěchy s předchozím typem vektorů a jeho expresí byly nové konstrukce modifikovány tak, aby se zvýšila tvorba aktivních replikonů z primárních transkriptů, které vznikají v jádře buněk hostitele. Vektor, opět na bázi viru mozaiky tabáku, má deletovaný úsek MP, neobsahuje CP gen a nevytváří proto viriony ani není schopen se šířit do systému, ale jen z buňky do buňky mezibuněčnými spoji. Tato nevýhoda je kompenzována masivní agroinfekcí všech nadzemních částí při inokulaci bakteriální suspenzí. V sekvenci pro virovou replikázu byly mutacemi neměnícími smysl kodódů odstraněny motivy připomínající kryptická sestřihová místa. Dále byly 54 a 43 substitucemi mutovány úseky bohaté na thymin. Vytvořený vektor se replikoval 30x účinněji, než původní. Dalšími modifikacemi bylo do stejného genu přidáno až 15 intronů z *Arabidopsis thaliana*, které usnadňují transport pre-mRNA z jádra. Nejúspěšnější konstrukt se replikoval v téměř všech infikovaných buňkách a požadovaný protein tvořil 25-40% všech rozpustných proteinů. Autoři spočítali, že pole o rozloze 1 ha by mohlo produkovat ročně 280-400 kg požadovaných proteinů (Marillonnet *et al.*, 2005).



Obr.8 Konstrukční mapa TMV vektoru. Act2 prom – promotor z *A.thaliana*, UTR-3´konec genomu TMV

Za čtvrtstoletí snah o využití rostlin pro levnou produkci požadovaných proteinů bylo dosaženo velmi významných výsledků. Stabilní transgeny kukuřice, sóji a bavlníku dobývají svět, ale o „pravé“ biotechnologie u nich nejde, je to „jen“ vylepšení některých vlastností rostlin. Cestou od malých inzercí v kompletních virových vektorech jsme se naučili posuzovat vztahy virus-hostitel komplexněji. Výsledkem je zatím nejúčinnější metoda kombinující agroinfekci a virovou infekci spolu s modifikací hostitele. Tento přístup „dekonstruovaného“ virového vektoru zvyšuje ekologickou bezpečnost konstrukcí a účinnost exprese systému.

Celý proces přípravy konstruktu je díky systému segmentů podstatně zkrácen a průmyslově (farmaceuticky, lékařsky) významná množství rekombinovaného proteinu je možné získat již během 3-4 týdnů. Cena jedné dávky vakcíny produkované tímto způsobem byla vypočtena na méně než 0,01 USD. Budoucnost ukáže, zda dojde k většímu rozšíření této technologie a zda se nedočkáme i takové „šílenosti“ jako vakcinace mrkvovým salátem.

Příklady vektorů, některé jejich vlastnosti a použití

virus (rod)	genom	nevýhody	výhody, použití	
Caulimoviry	dscDNA	nízký výtěžek, úzký okruh hostitelů, velký genom	DNA genom	
Geminiviry	sscDNA	malý kompaktní genom, oemezené systémové šíření	DNA genom	Timmermans 1994 Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol. 45: 79-112
Virus mozaiky vigny (Comovirus)	sslRNA	segmentovaný RNA genom	vysoký výtěžek, exprese peptidů v CP,	Usha 1993 Virology 197: 366-374 Gopinath 2000 Virology 267: 159-173
Virus mozaiky okurky (Cucumovirus)	sslRNA		vysoký výtěžek	Natilla 2004 Arch.Virol. 149: 137-154
Virus mozaiky vojtěšky (Alfamovirus)	sslRNA	málo informací o použití	Toleruje velké inzerce v CP	Yusibov 1997 PNAS 94: 5784-5788
Potyviry	sslRNA	ekvimolární exprese	široký i úzký okruh hostitelů, exprese peptidů i genů	Jagadish 1993 BioTechnology 11: 1166-1170
Virus mozaiky tabáku (Tobamovirus)	sslRNA		velmi vysoký výtěžek, exprese peptidů i genů, existuje modulární systém využívající transgenní rostliny	Sugiyama 1995 FEBS Lett. 359: 247-250 Haynes 1986 BioTechnology 4: 637-641 Kumagai 1993 PNAS 90: 427-430 Bendahmane 1999 J.Mol.Biol. 290: 9-20
X virus bramboru (Potexvirus)	sslRNA	patentované použití proteázy 2A v konstrukci	vysoký výtěžek, exprese genů	Santa Cruz 1996 PNAS 93: 6286-6290 Hendy 1999 J.Imm.Meth. 231: 137-146
Satelitní RNA	sslRNA	málo informací o použití	toleruje velké inzerce, exprese genů	Lin 1996 PNAS 93: 3138-3142
c-cirkulární, l-lineární genom, CP-kapsidový protein				

Reference

http://www.icongenetics.com/

Dalsgaard *et al.* (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease *Nature Biotech.* 15: 248-252

Douglas & Young (1999) Virus Particles as Templates for Materials Synthesis *Advanced Materials* 11: 679-681

Gleba *et al.* (2005) Magnifection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants *Vaccine* 23: 2042-2048

Hamamoto *et al.* (1993) A new tobaco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato *Bio/Technology* 11: 930-932

Chapman *et al.* (1992) Potato virus X as a vector for gene expression in plants *Plant J.* 2: 549-557

Lin *et al.* (1995) The open reading frame of bamboo mosaic potexvirus satellite RNA is not essential for its replication and can be replaced with a bacterial gene *PNAS* 93: 3138-3142

Marillonnet *et al.* (2004) In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by Agrobacterium *PNAS* 101: 6852-6857

Marillonnet *et al.* (2005) Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants *Nature Biotechnology* 23: 718-723

Negrouk *et al.* (2004) Affinity purification of streptavidin using tobacco mosaic virus particles as a purification tag *Anal. Biochem.* 333: 230-235

Smolenska *et al.* (1998) Production of functional single chain antibody attached to the surface of a plant virus *FEBS Lett.* 441: 379-382

Turpen *et al.* (1995) Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus *Bio/Technology* 13: 53-57

Verch *et al.* (1998) Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector *J.Immunol. Meth.* 220: 69-75

Wang *et al.* (2002) Natural Supramolecular Building Blocks: Wild-Type Cowpea Mosaic Virus *Chem. and Biol.* 9: 805-811

Z P R Á V Y

K nedožitým osmdesátinám doc. RNDr. Jana Nečáska, CSc.

V letošním roce by se dožil osmdesáti let genetik dr. Jan Nečásek, docent Přírodovědecké fakulty UK (* 1925, + 1998). Žák a pokračovatel prof. Karla Hrubého promoval v r. 1948. Po krátkém působení v ústavu na fakultě odchází do Výzkumného ústavu antibiotik v Roztokách u Prahy, jako genetik a mykolog. Zde se setkává s průmyslovou mikrobiologií. Brzy se stal vedoucím oddělení mikrobiologie. Spolu se svými spolupracovníky využívá poznatků fyziologie a genetiky ke zvyšování produkce antibiotik. Zvláště pomocí mutací a následné selekce. Zabýval se i produkcí antibiotik jako doplňku výživy hospodářských zvířat.

V r. 1961 se dr. Nečásek vrací zpět na fakultu. Zprvu jako asistent. Po tragickém skonu profesora Hrubého a následné habilitaci jako docent obecné a mikrobiální genetiky a vedoucí ústavu genetiky. Zatímco jeho učitel pěstoval genetiku v celé šíři, bylo na jeho žáku, aby zavedl do ústavu moderní směry. Ty v 60.tých letech představovala genetika mikrobiální a mutace. V experimentální práci na fakultě doznívala ještě průmyslová mikrobiologie – indukce auxotrofních mutantů u *Corynebacterium* (průmyslová produkce aminokyselin). Ostatně se věnoval genetice hub rouškatých (Hymenomycetes), které uvažoval jako genetický

model. Experimentoval zejména s druhy *Coprinus cinereus* a *Coprinus sterquilinus*. Studoval hereditární podklad pro mutanty pomalu rostoucí a sterilitu plodnic. Druhým objektem mu byla klanolístka (*Schizophyllum commune*), u které řešil hereditární podklad rezistence, resp. inaktivace účinku cykloheximidu. Nemalou pozornost věnoval mutagenezi.

Jeho činnost na Přírodovědecké fakultě UK končí v roce 1980, kdy přechází do Ústavu experimentální botaniky ČSAV (později Ústav molekul. biologie rostlin AV ČR) v Českých Budějovicích. Zde se věnuje genetické transformaci rostlin. Mimo jiné sledoval štěpící generace transformantů řepky olejné a genetický podklad štěpení, hospodářskou kvalitu a odolnost transformovaných rostlin vůči virům.

Významná byla jeho činnost společenská a pedagogická. Byl členem Čsl. mikrobiol. spol., členem výboru Čsl. vědecké spol. pro mykologii. Houby byly jeho velkou láskou. Zasedal v redakci Biologických listů a České mykologie. Byl zakladatelem a dlouholetým předsedou Genetické společnosti (t.č. čestným členem Genetické spol. G. Mendela). Pořádal postgraduální kurzy na Přírodovědecké fakultě. Jezdil na instruktáže genetiky do středních škol. To bylo zvláště důležité po několikaleté vládě Lysenkových teorií a Mičurinské biologie, aby středoškolští profesoři odlišili skutečnou genetickou vědu od Lysenkovských zmatků. Byl vždy a to aktivně u toho, když se něco dělo v genetice. S generačně starším druhem prof. Seklou byly přátelé. Za své zásluhy byl dr. Nečásek vyznamenán zlatou medailí J.G. Mendela ČSAV a zlatou medailí Přírodovědecké fakulty UK. Jeho vědědecké práce přesahují číslo 70. Bibliografie viz P. Pikálek: Czech Mycology 49(1), 1996. Popularizoval genetiku v rozhlase. Byl autorem nebo spoluautorem devíti knižních publikací. Nejvýznamnější je Obecná genetika (J. Nečásek, I. Cetl a kol., SPN Praha, 1974). Po svém otci mistru zednickém a staviteli zdědil nesmírnou pracovitost, po své matce smysl pro společenskou angažovanost. Obojí uplatnil dr. Nečásek ve své vědecké, pedagogické a společenské činnosti plnou měrou. Za to zasluhuje naše vzpomenutí a dík.

RNDr. Karel Pešina, CSc.
České Budějovice

Předseda GSGM prof. Stanislav Zadražil sedmdesátiletý

Dne 31. března 2005 oslavil předseda Genetické společnosti Gregora Mendela a její dlouholetý člen, prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc., v plné aktivitě již sedmdesáté výročí svého narození – pro naprostou většinu svých spolupracovníků, přátel, známých i studentů výročí doslova neuvěřitelné.

Prof.Zadražil vystudoval Matematicko-fyzikální fakultu Univerzity Karlovy v Praze (1953-1958, obor chemie se specializací biochemie) jako žák profesorů Koštíře a Jindry na katedře biochemie. Bezprostředně po ukončení svého studia nastoupil jako vědecký aspirant u prof. Šormové na Ústavu chemie a biochemie ČSAV. Zde se začal zabývat biochemií nukleových kyselin, tedy oblastí, která ho v průběhu jeho studia na MFF UK nejvíce poznamenala, a to, přinejmenším, dvěma zcela mimořádnými vědeckými událostmi – objevem dvoušroubovicovité stavby molekuly DNA (1953) a formulací tzv. ústředního dogmatu molekulární biologie o jednosměrném přenosu genetické informace (1958). Na ÚOCHB ČSAV působil až do roku 1977 při řešení problémů vztahu struktury a funkce nukleových kyselin, spojených s vlivem nukleosidových antimetabolitů, s lokalizací minoritních nukleotidů v tRNA, s úlohou opravné syntézy DNA u rostlin ovlivněných alkylačními mutageny a s pokusy o separaci a frakcionaci DNA se specifickou transformační a transdukční aktivitou u *B. subtilis* a u Rousova sarkomového viru. Nejdůležitějším obdobím tehdy pro něho byly roky 1966-67, kdy jako první stážista The Royal Society ve Velké Británii z Československa pracoval v oddělení profesorů F.H.C.Cricka a F. Sangera v MRC Laboratory of Molecular Biology v Cambridge a profesora W. Hayese v MRC Microbial Genetics Unit v Londýně, kde měl možnost seznámit se se špičkovými světovými genetiky a molekulárními biology a proniknout do „tajů“ předních molekulárně-biologických a bakteriálně-genetických pracovišť v Evropě. Tehdy se podílel především na sekvenačních projektech tRNA s využitím Sangerovy „fingerprintové“ techniky pro separaci oligonukleotidů.

V roce 1977 přešel spolu s několika svými spolupracovníky do Ústavu molekulární genetiky ČSAV, kde se věnoval charakterizaci fágu PZA ze skupiny fágů fí29 u *B. subtilis* (objeveném ve vlastní laboratoři, společně s Dr. V. Fučíkem) a zavádění technik a metod genového inženýrství s modelem klonování a exprese cDNA pro telecí chymosin v *E. coli* (pro biotechnologickou produkci syřidla, společně s Ing. J. Sedláčkem, Dr. M. Fábrym a doc. F. Kaprálkem). Model prochymosinové cDNA byl později využit pro studium exprese cizorodých genů v kvasinkách, což vyústilo v založení společné laboratoře genových manipulací mezi ÚMG ČSAV a katedrou genetiky a mikrobiologii Přírodovědecké fakulty UK (spolu s Dr. V. Vondrejsem).

Založení společné laboratoře bezprostředně předznamenalo jeho přechod z AV ČR na Přírodovědeckou fakultu UK (v roce 1991), kam byl přijat v odpovídajícím výběrovém řízení a na základě výsledku tohoto řízení ustanoven vedoucím katedry genetiky a mikrobiologie. Bylo tím završeno jeho dlouholeté působení jako externího učitele molekulární biologie a genetiky PřF UK na katedře biochemie (od roku 1966) a na katedře genetiky a mikrobiologie (od roku 1982). V roce 1992 byl St. Zadražil jmenován vůbec prvním profesorem molekulární biologie na UK. Jeho pedagogické působení ve všech formách jak teoretické, tak praktické výuky, a na všech úrovních (bakalářské, magisterské i postgraduální doktorské studium), původně iniciované prof. Koštířem a později ještě rozšířené podle požadavků doc. J. Nečáska a prof. O. Bendové, bylo v první řadě zaměřeno na metodiku studia nukleových kyselin, ale obecně především na molekulární úroveň biologie a genetiky, která do té doby nebyla na PřF UK dostatečně výukově zajištěna a k jejíž výuce měl prof. Zadražil svým původním studijním zaměřením i svou širokou experimentální zkušeností optimální vazbu i předpoklady.

S pedagogickou aktivitou, spočívající mj. i v přednáškách pro různé informační, doškolovací a vzdělávací akce v rámci lékařských a zemědělských vysokých škol a institucí, byla bezprostředně spojena i jubilantova rozsáhlá činnost vědecko-organizační. Jako hlavní organizátor připravil např. 7 specializovaných mezinárodních konferencí, věnovaných problematice nukleových kyselin (mezi nimi nejznámější „liblické konference o DNA“, podporované FEBS), které měly kromě vlastního vědeckého přínosu obzvláštní význam především v systematickém setkávání českých a slovenských vědců s předními „západními“ molekulárními biology a genetiky. K dalším „seznamovacím“ aktivitám obdobného typu měl prof. Zadražil ostatně dostatek příležitostí i jako dlouholetý zástupce ředitele ÚMG ČSAV pro vědu (později jako 1. náměstek ředitele). Byl členem redakční rady a od roku 1981 je vedoucím redaktorem časopisu Biologické listy, byl členem mnohých poradních sborů a „akreditačních subkomisí“ různých ministerstev, pravidelným členem nesčetného počtu vědeckých a oborových rad, komisí a grémií pro pre- i postgraduální vzdělávání, pro evaluace vědeckých ústavů, pro habilitační a profesorská řízení na vysokých školách apod.

Rozsah a tématickou šíři působení prof. Zadražila lze vysledovat i z přehledu jeho publikační aktivity, která v souhrnu čítá na 200 prací. Zhruba okolo 70 původních vědeckých článků a sdělení bylo publikováno ve významných mezinárodních vědeckých časopisech s IF či v mezinárodně uznávaných sbornících (jejich citovanost dosahuje více než 400 položek). Prof. Zadražil se také podílel na přípravě několika vědeckých monografií obsáhlými statěmi a kapitolami o chromatografii a elektroforéze nukleových kyselin a jejich složek, dále je autorem řady učebních textů (především pro postgraduální studium), byl členem pracovních

kolektivů, které zpracovávaly základní českou odbornou terminologii molekulární genetiky a biotechnologií, z angličtiny přeložil první vysokoškolskou příručku molekulární biologie u nás. Byl editorem dvou speciálních knižních publikací o DNA v nakladatelstvích Pergamon Press Oxford a Academia Praha.

Pravděpodobně nejvýznamnější přínos prof. Zadražila vědeckému poznání představuje jeho podstatný podíl na zjištění mutagenních účinků 5-azacytidinu a jeho inkorporace do DNA, a dále na sekvenční analýze první supresorové tRNA a na potvrzení mechanismu jejího působení, na stanovení limitní velikosti transfekčně aktivních molekul buněčné DNA, odpovídající celému genomu Rousova sarkomového viru integrovanému do DNA savčího hostitele, na objasnění molekulárního mechanismu tzv. skladovacího efektu u obilovin, ovlivněných alkylačními činidly, spočívajícího v modulaci reparace DNA (v těchto experimentech poprvé potvrzené u vyšších rostlin), na charakterizaci, restrikčním mapování a sekvenční analýze fágu PZA u *B. subtilis*, a konečně na experimentální přípravě rekombinantního telecího chymosinu v bakteriálních a v kvasinkových buňkách.

Výsledky vědecké práce prof. Zadražila i jeho ostatní vědecko-společenské aktivity byly oceněny třemi cenami ČSAV, státní cenou za vědu a cenou MŠMT ČR, udělenými pracovním kolektivům, které prof. Zadražil vedl nebo byl jejich členem, a dále i osobním udělením stříbrné plakety Gregora Mendela, kterou AV ČR vyznamenává přední vědecké pracovníky za jejich zásluhy v biologických vědách, udělením stříbrné medaile UJEP v Brně, udělením pamětní medaile Jana Evangelisty Purkyně, a konečně i udělením pamětní medaile Univerzity Karlovy k 650. výročí jejího založení.

Stručný příspěvek k připomenutí sedmdesátin prof. Zadražila nemůže, samozřejmě, zahrnout a podchytit všechny aktivity, vědecké výsledky, přínosy a zásluhy jubilanta. Právě proto bych však rád na závěr svého příspěvku chtěl vyzdvihnout a zdůraznit ještě alespoň jedno zásadní konstatování, a to, že současný předseda naší česko-slovenské Genetické společnosti Gregora Mendela, prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc., patří k zakladatelům molekulární biologie a molekulární genetiky a jejich soustavného rozvoje jako exaktních experimentálních vědních disciplin i jako moderních předmětů biologické a biochemické výuky na UK v Praze, kde rovněž stál - jako představitel těchto oborů - u „kolébky“ koordinovaného programu integrované postgraduální doktorské výuky biomedicíny. Všechny svoje dosavadní zkušenosti z vědecké, pedagogické i organizační činnosti se vždy snažil uplatňovat i v rámci svého působení v GSGM, v jejímž čele stojí již od roku 1997.

Horní Poříčí u Strakonic 1.9.2005 *Petr Pikálek*

RNA klub

Téměř přesně jeden rok po první konferenci RNA klubu v Praze (25. 9. 2003 - viz zprávu IL (červenec 2004) 27: 36; Biol. listy (2004) 69: 322) byli zájemci o výzkum RNA pozváni na 2. pražské "zasedání klubu" (23. 9. 2004). Pořadatelé, pracovníci laboratoře biochemie RNA dr. Martina Pospíška z katedry genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze, povzbuzeni zájmem účastníků a úspěchem předcházejícího jednání, využili celosvětově se rozšiřujícího konkrétního studia RNA k tomu, aby v relativně krátké době připravili v prostorách PřF ve Viničné ul. další setkání aktivních experimentátorů v této oblasti.

28 registrovaných účastníků a velký počet "náhodných" zájemců o jednotlivá vystoupení přednášejících, podle předem zveřejněného programu, předneslo a vyslechlo 17 ústních sdělení s výsledky získanými na 10 pracovištích, zaměřených mimo jiné právě na problematiku spojenou se strukturou, funkcí a významem RNA v základním a "aplikovaném" molekulárně biologickém, genetickém a biomedicinském výzkumu.

Převážná část přednáškových, plakátových a diskusních vystoupení byla věnována metodickým přístupům k práci s RNA, jejich popisu, uspořádání, optimalizaci a využití u různých předmětů studia od virů přes prvoky a rostliny až k savcům a člověku. Nejčastěji se autoři věnovali uplatnění RNA v analytických postupech "*microarrays*", které byly použity v moderní onkologické diagnostice v rámci funkční genomiky, při paralelním sledování velkého počtu genů u chronické lymfatické leukemie a karcinomu prsu (FN Brno); v analytickém sledování interakce patogen-hostitel v lidských buňkách po infekci *N. meningitidis*, pomocí čipů firmy Afflymetrix (MBÚ AV ČR Praha) a v popisu a hodnocení působení terapeutických postupů u bércových vředů, popálenin a "diabetických" nohou, jakož i sledování angiogenese při léčení odpovídajících poranění (CPN s.r.o. Dolní Dobrouč).

Druhou základní metodou, v přednáškách nejčastěji zmiňovanou a používanou, byla polymerasová řetězová reakce (PCR) v různém uspořádání. Kvantitativní RT-PCR posloužila k monitorování průběhu leukemických onemocnění (AML, CML) pomocí sledování exprese genu Wilmsova tumoru jako "panleukemického" markeru (ÚHKT Praha). Podobně byla RT-PCR doporučena jako nejvhodnější rutinní diagnostická metoda pro stanovení a sledování infekce virem hepatitidy C (Zdrav. ústav Ostrava), jakož i pro detekci fúzního transkriptu SYT-SSX diagnostického markeru v synoviálních sarkomech, po chromosomové translokaci t(X;18) (p11.2;q11.2), usnadňujících reklasifikaci onkologických klinických případů (1. LF UK a VFN Praha). Běžné používaní PCR, jako základního molekulárně biologického laboratorního přístupu, bylo dále dokumentováno i při analýze chybného sestřihu vlivem intronové mutace u pacientů s homocystinurií (ÚDMP 1. LF UK Praha). K výrazně

metodicky zaměřeným vystoupením patřila rovněž "propagace" denaturační elektroforesy RNA v TAE-agarosových gelech (PřF UK Praha), doporučující TAE/formamidovou agarosovou metodu jako jednoduchou, rychlou a levnou elektroforetickou charakterizaci RNA.

Tradičně byla do programu zařazena a stejně příznivě přijata i informační přednáška o novinkách ve výzkumu RNA (nahradila historicky zaměřené vystoupení z roku 2003 v souvislosti s 50. výročím modelu dsDNA), tentokrát o interakci aptamerů RNA s malými molekulami, s upozorněním na vývoj "zeleně fluoreskující RNA", která by mohla v budoucnu když ne nahradit, tak alespoň významně doplnit dnes nejčastěji používaný GFP (PřF UK Praha). Podobně "teoreticky" zaměřená přednáška byla věnována přípravě kurátorové databáze experimentálně studovaných IRES struktur mRNA, umožňujících zahájit translaci nezávisle na 5´-čepičce, tj. "uprostřed" eukaryotické mRNA (PřF UK Praha a TU Liberec).

Stejně zajímavá byla i další vystoupení, kde metodika experimentů nebyla preferována, zaměřená na charakterizaci různých typů RNA a jejich zásah do genové exprese a dalších procesů vývoje a chování buněk a organismů. Patřila mezi ně posttranskripční regulace onkosupresoru p53 s využitím siRNA (FN Brno), úloha malých snRNA u transsestřihu mRNA trypanosom (PaÚ AV ČR Č. Budějovice), význam transkripční regulace genové exprese ve vývoji samčího gametofytu *Arabidopsis*, jakož i charakterizace skladovacích komplexů mRNP (ÚEB AV ČR Praha) a strukturní a funkční úloha 3´ nepřekládané oblasti chloroplastových mRNA v rostlinném organismu (ÚEB AV ČR Praha). Translační úrovni genové exprese pak byl věnován podobný příspěvek o vlivu pre-ATG tripletu v 5´ nepřekládané části mRNA kinetoplastid na účinnost iniciace translace, s využitím genu kódujícího GFP (PaÚ AV ČR Č. Budějovice).

Všechny přednesené příspěvky, spolu se seznamem účastníků, byly zahrnuty do předem vydaného konferenčního sborníku abstraktů "RNA club 2004" (ISSN 1214-8598). Texty usnadnily diskusi jednotlivých témat i kontakty účastníků bezprostředně po vystoupení, ale i při neformálních setkáních v prostorách fakulty a v rámci večerního posezení v pivovarské restauraci, připraveného organizátory konference za podpory sponzorů, jejichž reklamní stránky jsou rovněž součástí sborníku.

Zájem a spokojenost účastníků konference s jejím obsahem a průběhem se projevil i v přání pokračovat v organizování obdobných setkání. 3. RNA klub bude proto uspořádán v tomto roce, tentokrát v Českých Budějovicích. Podrobnější pozvánku organizátorů viz v tomto čísle Informačních listů.

S. Zadražil

RNA CLUB

BIOLOGICKÁ KONFERENCE NEJEN O RNA

3. ročník

3. října 2005

České Budějovice

Vážení kolegové, studenti, přátelé !!!

S potěšením vám oznamujeme, že také letos se bude konat **RNA Club**, jednodenní biologická konference nejen o RNA. Rádi bychom vás pozvali a v co nejhojnějším počtu přivítali, tentokrát na jihu Čech. Motivací je nám potřeba osobního setkávání naší nevelké, zato různorodé komunity, kde občas ani týmy zaměřené na související otázky neprofitují z výměny informací, neboť se neznají. Chceme, aby **RNA Club** přispíval k vyrovnávání tohoto komunikačního deficitu.

Program bude sestávat ze tří tematických sekcí:

Struktura a funkce RNA
Buněčná a vývojová biologie
RNAi a jiné přístupy v biologii

Každou sekci uvede 30-minutová přednáška domácího nebo zahraničního hosta. Následovat budou 15-minutové příspěvky vybrané ze zaslaných abstraktů; ostatní příspěvky budou presentovány formou posterů. Přestávky doprovodí prezentace firem.

Večeře, která zakončí vědecký program, sborník abstraktů (s vlastním ISSN) a malý dárek pro každého účastníka, jsou zahrnuty **v ceně registračního poplatku**.

Ubytování zajistíme na požádání, případné zájemce však prosíme o sdělení **do 30. 6. 2005**.

Registrační poplatek 350 Kč prosím uhraďte na účet č. 161484456/0300, variabilní symbol 0100054, a to **nejpozději do 15. 8. 2005**.

Registrační formulář a další info naleznete na: **http://www.natur.cuni.cz/~rna_club/**

Své abstrakty zasílejte a registrujte se nejpozději do 15. 8. 2005 !!

Kontakt: **rna_club@natur.cuni.cz**
Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta
Katedra molekulární biologie
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Na vaši účast se těší **organizační tým**:
Marek Jindra, Martin Pospíšek, Petra Sekyrová, Lukáš Trantírek

Členové výboru GSGM

Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc., předseda
Katedra genetiky a mikrobiologie, PřF UK
Viničná 5
128 44 Praha 2

Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., čestný předseda
Katedra genetiky a molekulární biologie
PřF MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
rosypal@sci.muni.cz

Prof. RNDr. Jiřina Relichová, CSc., místopředsedkyně
Katedra genetiky a molekulární biologie
PřF MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
reli@sci.muni.cz

Prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc., místopředseda
Katedra genetiky PrF UKo
Mlynská dolina B l
842 15 Bratislava
vlcek@fns.uniba.sk

Doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc., tajemník
Katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK
Viničná 5
128 44 Praha 2
pikalek@natur.cuni.cz

Prof. Ing. Josef Dvořák, CSc., hospodář
Ústav genetiky MZLU v Brně
Zemědělská l
613 00 Brno
dvorakJ@mendelu.cz

Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc., redaktor IL
Katedra genetiky a molekulární biologie
PřF MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
doskar@sci.muni,cz

Doc. RNDr. Jiří Fajkus, CSc.,
Biofyzikální ústav AVČR
Královopolská 135
612 65 Brno
fajkus@ibp.cz

Prof. RNDr. Eva Miadoková, DrSc. hospodářka
katedra genetiky PrF UK
Mlynská dolina B l
842 15 Bratislava
Miadokova@fns.uniba.sk

Mgr. Miroslava Slaninová, Ph.D., hospodářka
katedra genetiky PrF UK
Mlynská dolina B l
842 15 Bratislava
slaninova@fns.uniba.sk

Prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
Katedra genetiky a molekulární biologie
PřF MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
smarda@sci.muni.cz

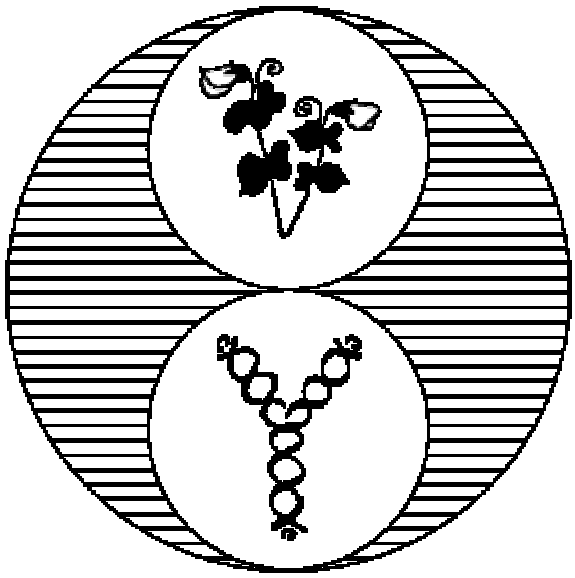
RNDr. Marie Vojtíšková, CSc.
Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135
612 65 Brno
mavo@ibp.cz

Doc. RNDr. Kateřina Malachová, CSc.
Katedra biologie a ekologie
Přírodovědecká fakulta
Ostravská univerzita
Bráfova 7
701 03 Ostrava 1
Katerina.Malachova@osu.cz

RNDr. Aleš Knoll, PhD.
Ústav genetiky
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita
Zemědělská 1
613 00 Brno
knoll@mendelu.cz

RNDr. Karel Zelený, CSc.
M.G.P. spol. s.r.o.
Kvítková 1575
760 01 Zlín

Adresa Internetových stránek GSGM: http://orion.sci.muni.cz/gsgm/



GSGM

Genetická společnost Gregora Mendela

Sídlo společnosti

Stanovy společnosti

Výbor společnosti

Seznam členů z České republiky a Slovenské republiky

Přihláška a evidenční list ve formátu PDF

Informační listy Genetické společnosti Gregora Mendela

Konference pořádané GSGM

Zápisy ze schůzí výboru GSGM

Genetické společnosti ve světě