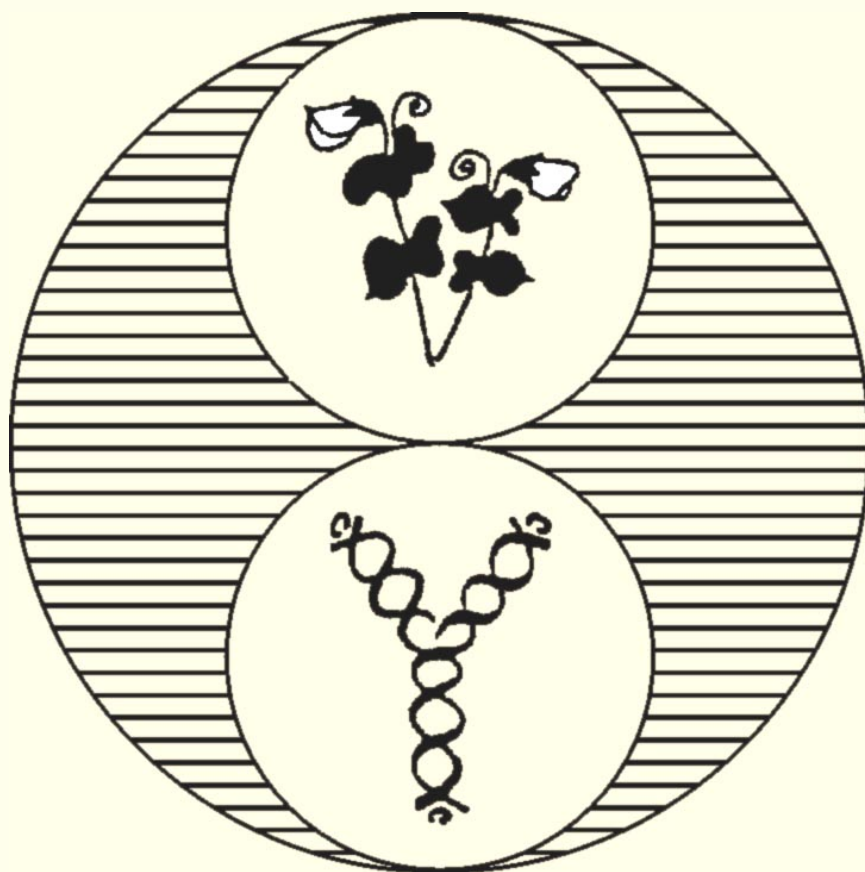


GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA

INFORMAČNÍ LISTY



Číslo 25

Červen 2002

OBSAH

Zápis ze schůze výboru GSGM konané dne 24. 10. 2001	1
Zápis ze schůze výboru GSGM konané dne 27. 5. 2002	2
Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2001	3
Výsledky voleb do výboru GSGM	5
Zprávy	6
Konference Genetické společnosti Gregora Mendela (GSGM) „Perspektivy genetiky - genomy a genová exprese“ 5. a 6. února 2002 v Brně (S. Zadražil)	6
Zpráva o zasedání výboru FECS (J. Relichová)	9
Mendel Forum Brno 2002	11
XX. Genetické dny, Brno 2002	13
Texty přednášek přednesených na Genetické konferenci GSGM	15
Lineárne mitochondriálne genómy kvasiniek (J. Nosek a Ľ. Tomáška)	16
Genomika v koncích - pokroky a perspektivy v biologii telomer (J. Fajkus)	20
Genom, proteom a priony u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (T. Cápál a V. Vondrejs)	30
Sekvencování genomu <i>Arabidopsis thaliana</i> (M. Ondřej)	38
Internetová stránka GSGM	45

Informační listy

číslo 25, červen 2002

Vydává Genetická společnost Gregora Mendela

Redakční rada - Výbor GSGM

Výkonný redaktor - Doc. 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 GSGM konané dne 24. 10. 2001

Přítomni: J. Doškař, E. Miadoková, M. Ondřej, P. Pikálek, J. Relichová, D. Vlček,
S. Rosypal, S. Zadražil,
Omluven: J. Dvořák

1. Po zahájení přivítal prof. Zadražil hosty, Mgr. Janu Markovou a Mgr. Radomila Bazalu, kteří informovali členy výboru o situaci se záchranou rodného domu JGM a o aktivitách, které v tomto směru vyvíjí Nadace zřízená k tomuto účelu ve spolupráci se zastupitelstvem města Odry a obce Vražné.

Výbor přislíbil plnou podporu těmto snahám a navrhl odborné poradenství zástupců čtyř VŠ (UK Pikálek, JČU Ondřej, MU Relichová a MZLU Dvořák).

Mgr. J. Marková dále informovala o organizaci celorepublikové genetické soutěže pro středoškoláky „Mendelovy Hynčice“, jejíž první ročník byl vyhlášen a finále soutěže se uskuteční 3. dubna 2002 v Hynčicích.

2. Prof. Relichová se zúčastní zasedání FEGS 10. listopadu v Londýně.

3. Organizace voleb nového výboru GSGM. Volba proběhne korespondenčně, na kandidátce se vyznačí přeškrtnutím osoby, se kterými volič nesouhlasí. Volby zajistí Doc. Doškař. Výsledky budou vyhlášeny na valném shromáždění GSGM, které se uskuteční v době konání genetické konference.

4. Náplň Informačních listů.

IL 24 – hlavní náplň: Abstrakta plakátových sdělení na genetické konferenci – vyjde a bude k dispozici účastníkům konference

IL 25 – hlavní náplň: vyžádané přednášky přednesené na genetické konferenci, info o schůzkách výboru, o složení výboru, zpráva o činnosti FEGS, vyúčtování apod. Vyjde v květnu.

IL 26 – hlavní náplň: Historie GSGM (S. Zadražil). Vyjde na podzim 2002.

5. Různé:

Byli přijati noví členové – aktualizovaný seznam členů GSGM bude k dispozici na Genetické konferenci.

Web stránky jsou v provozu a průběžně se aktualizují.

Zapsala: J. Relichová

Zápis ze schůze výboru GSGM konané dne 27. 5. 2002

Přítomni: J. Doškař, J. Dvořák, E. Miadoková, P. Pikálek, M. Slaninová, J. Šmarda, D. Vlček, M. Vojtíšková, S. Rosypal, S. Zadražil

Program:

1. Výsledky a hodnocení voleb nového výboru
2. Volba předsedy, místopředsedů a členů výboru do jednotlivých funkcí
3. Hodnocení únorové genetické konference
4. Příprava 25. čísla Informačních listů
5. Rámcový plán činnosti GSGM v letech 2002-2003
6. Různé

Ad 1. Volby nového výboru GSGM proběhly korespondenční formou, jejich platnost byla schválena valným shromážděním konaným při příležitosti únorové genetické konference (viz výsledky voleb na str. 5).

Ad 2. Do jednotlivých funkcí výboru byli navrženi a jednomyslně zvoleni:

Předseda: Prof. S. Zadražil

Čestný předseda: Prof. S. Rosypal

Místopředsedové: Prof. D. Vlček, Doc. P. Pikálek

Jednatelka: Prof. J. Relichová

Hospodáři: Prof. J. Dvořák, Dr. M. Slaninová

Redakce informačních listů: Doc. J. Doškař, Doc. J. Šmarda

Revizoři účtů: Dr. J. Fajkus, Dr. A. Kormuťák

Další členové výboru byli pověřeni sledováním aktivit v oblasti genetiky v okruhu své působnosti a zajišťováním příspěvků do IL: Prof. P. Ráb: Čechy, AV ČR; Dr. M. Vojtíšková: Morava, Brno, BFÚ AV ČR; Prof. E. Miadoková: Slovensko; Doc. M. Ondřej (JČU, AV ČR).

Ad 3. Zhodnocení genetické konference vypracované prof. S. Zadražilem bude zveřejněno v č. 25 Informačních listů.

Ad 4. Byla projednána náplň č. 25 Informačních listů, do nichž budou zařazeny výsledky voleb do výboru GSGM, zhodnocení genetické konference, 4 příspěvky autorů vyžádaných přednášek genetické konference, informace z jednání výboru FEGS, aktualizace seznamu členů GSGM (doplnění nových členů, uvedení evidenčních čísel členů a doplnění jejich e-mailových adres). Na vnitřní straně obálky bude uvedeno složení nového výboru GSGM a adresa WEB stránek GSGM.

Číslo 26 přinese informace o geneticky zaměřených laboratořích Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně a zbývající příspěvky autorů přednášek genetické konference.

Ad 5. Příští genetická konference GSGM se bude konat v období leden/únor 2004 v Českých Budějovicích nebo v Bratislavě. Kromě konferencí se výbor v dalším období zaměří na pořádání jednodenních seminářů orientovaných na různá témata z oblasti genetiky a molekulární biologie.

Zapsal: J. Doškař

Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2001

Zůstatek ke 31.12. 2000 **16 779,61 Kč.**

z toho:

na účtu KB 16 768,41 Kč.
v hotovosti 11,20 Kč.

Příjmy v roce 2001 **5 573,59 Kč.**

1. úroky z účtu u KB 73,59 Kč.

2. členské příspěvky:

placené na účet 5 300,- Kč.

placené hotově 200,- Kč.

Výdaje v roce 2001 **8 821,90 Kč.**

1. poplatky KB:

za vedení účtu 1 560,- Kč.

za položky 200,- Kč.

2. proplacení faktury (IL) 5 905,90 Kč.

3. ceniny v hotovosti (rozeslání IL) 1 134,- Kč.

Zůstatek ke dni 31.12.2001 **13 531,30 Kč.**

z toho:

na účtu KB 12 954,10 Kč.

v hotovosti 571,20 Kč.

Vyúčtoval J. Dvořák, pokladník

Vyúčtovanie hospodárenia slovenskej časti GSGM k 31.12. 2001

Zostatok k 1.1.2001	A- konto	6870,68 SK
	B- hotovosť	4327,80 SK

A

Bankové operácie (dok.1)	- 179,89 SK
Príjmy z členských poplatkov k 31.12. 2000 (dok.1)	+ 2000,00 SK

Zostatok na účte k 31.12.2001 (dok.1)	8690,79 SK
--	-------------------

B

Členské príspevky (dok.2)	+ 1100,00 SK
Príspevok na ŠVK (dok.3)	- 513,20 SK
Obálky (dok.4)	- 52,00 SK

Zostatok hotovosti k 31.12. 2001	+ 4327,80 SK
---	---------------------

Celkový finančný stav k 31. 12. 2001	+ 13 018,59 SK
---	-----------------------

Bratislava, 24. 5. 2002

Vyúčtovala: M. Slaninová

Výsledky voleb do výboru GSGM

Volební komise ve složení RNDr. J. Kailerová, CSc., RNDr. P. Lízal, Ph.D. a RNDr. J. Řepková, CSc. vyhodnotila dne 4. 1. 2002 výsledky voleb členů GSGM do výboru společnosti.

Komise obdržela 52 platných hlasovacích lístků a navržení kandidáti získali následující počty hlasů:

1.	Stanislav Zadražil	-	50 hlasů
2.-3.	Jiří Doškař	-	48 hlasů
	Stanislav Rosypal	-	48 hlasů
4.	Jiřina Relichová	-	47 hlasů
5.-7.	Miloš Ondřej	-	46 hlasů
5.-7.	Petr Pikálek	-	46 hlasů
5.-7.	Daniel Vlček	-	46 hlasů
8.	Eva Miadoková	-	42 hlasů
9.-10.	Miroslava Slaninová	-	41 hlasů
9.-10.	Marie Vojtíšková	-	41 hlasů
11.-12.	Petr Ráb	-	38 hlasů
11.-12.	Jan Šmarda, Jr.	-	38 hlasů
13.-15.	Josef Dvořák	-	37 hlasů
13.-15.	Ján Grolmus	-	37 hlasů
13.-15.	Andrej Kormuťák	-	37 hlasů
16.	Jiří Fajkus	-	35 hlasů
17.	Renata Gaillyová	-	30 hlasů

V Brně dne 4.1. 2002

RNDr. Jana Kailerová, CSc.
RNDr. Pavel Lízal, Ph. D.
RNDr. Jana Řepková, CSc.

Zprávy

Konference Genetické společnosti Gregora Mendela (GSGM)

„Perspektivy genetiky - genomy a genová exprese“

5. a 6. února 2002 v Brně

K 10. výročí osamostatnění sekce obecné genetiky Československé biologické společnosti se konala konference pořádaná GSGM ve spolupráci s katedrou genetiky a molekulární biologie přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Za dobu samostatné existence to byla již čtvrtá konference společnosti, tentokrát zaměřená na strukturu a analýzu genomů v období začínajícího 21. století, které lze jistě, z pohledu „věd o životě“, charakterizovat jako století postgenomové genetiky a biologie; proto i jednoznačné spojení tradičního hlavního tématu konferencí - perspektivy genetiky s genomovou a proteomovou problematikou dneška.

Pozvání k přednesení 9 hlavních přednášek, které směřovaly do klasických oblastí genetiky podle předmětu studia (prokaryotické mikroorganismy, kvasinky, rostliny, živočichové a člověk), přijali známé osobnosti české a slovenské experimentální genetiky, což jistě přispělo ke zvýšení zájmu o účast na dvoudenním jednání. Konference, na kterou se přihlásilo cca 90 posluchačů a autorů prací, měla kromě přednášek i sekci plakátových sdělení, kde bylo představeno 40 konkrétních témat, zpracovávaných v laboratořích akademií věd, vysokých škol a resortních ústavů ČR a SR.

Jednání konference zahájil předseda společnosti prof. Zadražil, který v úvodním slovu připomněl historii konferencí společnosti a jejich zaměření a charakterizoval současné postavení genetiky v biologických vědách i ve vztahu k velkému počtu nově vznikajících, často kontroverzních, oborů (genomika a proteomika s přívlastky, ale i transkriptomika, fenomika apod.). První přednášku na téma „Genomy, proteomy a priony kvasinek“ proslovil doc. V. Vondřejš (PrF UK v Praze), kde přehled současných poznatků o nejdůležitějším modelovém genomu nižších eukaryot doplnil vlastními experimentálními výsledky, vztahujícími se především k velmi aktuálním otázkám struktury, „replikace“ a funkce prionů ve fyziologických a patologických procesech kvasinek a živočichů. „Lineární genofory“ byly námětem vystoupení doc. J. Noska (PrF Komenského univerzity v Bratislavě), který se zabýval výskytem a střídáním populací lineárních a cirkulárních molekul DNA v mimochondriích a jejich vzájemných strukturních a funkčních vztahů. Třetí přednáška „Lidský genom“ doc. V. Feráka (PrF Komenského univerzity v Bratislavě) byla věnována

nanejvýš aktuálním problémům nedávno zveřejněných, téměř kompletních výsledků sekvenční analýzy genomu člověka (úplná sekvence nukleotidů dosud jen u chromosomů 20, 21 a 22). Přednášející popsal, velmi srozumitelnou a didaktickou formou, nejdůležitější poznatky o struktuře, analýze a vývoji našeho genomu a o jejich vlivu na ostatní biologické, ale i lékařské obory, sledující procesy a stav člověka ve zdraví i v nemoci. Bezprostřední návaznost na tuto problematiku neopomněla zdůraznit i prof. K. Michalová (VFN a I.LF UK v Praze), která se ve své přednášce „Současné trendy v klinické a onkologické cytogenetice“ zaměřila na přehled metodologie molekulární cytogenetiky, její návaznost na klasickou cytogenetiku a na jejich význam pro diagnostiku, terapii a prognostiku nejčastějších a z hlediska mechanismu procesu i nejkompexnějších nádorových onemocnění. Program prvního dne konference pak zakončila informace o produktech firmy Roche Molecular Biochemicals a valné shromáždění členů společnosti.

Druhý den jednání byl zahájen přednáškou doc. J. Doškaře (PřF MU v Brně) „Prokaryotický genom“, který se ve svém mimořádně zdařilém vystoupení úspěšně pokusil o obecnou charakteristiku tohoto předmětu studia, při sledování vztahu velikosti a uspořádání genomu k jeho funkční či metabolické komplexitě. Jistě se mu podařilo přesvědčit posluchače, že dnešní poznatky o rozmanitosti bakteriálních genomů postupně smazávají dříve přijímané základní odlišnosti od genomů eukaryotických. Pokusil se i o přiblížení současného stavu problematiky minimálního genomu. Hlavní savčí modelový organismus a charakteristiku jeho základního genetického materiálu představil ve své přednášce „Projekt myšího genomu“ dr. J. Forejt (Ústav molekulární genetiky AV ČR v Praze). Jako nejznámější osobnost „myší genetiky“ u nás nezklamal očekávání pořadatelů a účastníků konference a poskytl zajímavé informace o historii projektu a jeho vztahu k projektu lidského genomu, ale především informace o dosud nezveřejněných výsledcích analýzy myšího genomu, získaných rovněž na úrovni „dvou soupeřících společností - Celera Genomics a veřejného konsorcia“, a o jejich významu. Prof. P. Hořín (Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně) podal v přednášce „Analýza genomu hospodářských zvířat“ vyčerpávající přehled stavu znalostí o genomech domácích zvířat, tedy nejen nutně ekonomicky důležitých a významných, což samo o sobě svědčí o současném pokroku v této oblasti. Do problematiky genetiky rostlin pak posluchače uvedl doc. M. Ondřej (Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích), který představil při všestranném popisu „genom *Arabidopsis*“, první rostlinný genom modelu označovaného za *Escherichia coli* rostlinné genetiky. Závěrečná přednáška „Genomika v koncích - pokroky a perspektivy v biologii telomer“ dr. J. Fajkuse (Biofyzikální

ústav AV ČR v Brně) poskytla posluchačům mimořádnou příležitost sledovat vývoj studia a experimentálního řešení problémů spojených se strukturální specifikou a udržováním konců lineárních molekul DNA (chromosomů). Autor velmi poutavým způsobem přiblížil význam telomer, telomeras a mechanismu jejich přímé či nepřímé účasti v procesech replikace DNA, buněčného dělení, stárnutí a nádorového zvratu, kde se telomerasa pomalu stává, spolu s chemoterapií a chirurgií, základním terčem protinádorové léčby.

Sekce plakátových sdělení, které byly vystaveny po celou dobu jednání konference v bezprostředně přilehlých prostorách si zachovala tradiční klasické členění problematiky na genetiku člověka a živočichů (17 sdělení), genetiku rostlin (10), genetiku mikroorganismů (9) a obecnou genetiku (4) a v mnoha případech vhodně doplňovala, modelově, metodicky i problémově, přednášková témata. Plakáty často představovali mladší spolupracovníci a postgraduální studenti shora uvedených přednášejících, kteří významně poznamenali atmosféru konferenčního jednání. Po každé z přednášek následovaly diskusní debaty, které musely být pro svou rozsáhlost často pečlivě řízeny a diplomaticky převáděny předsedajícími na kuloárová jednání o přestávkách či po skončení denních programů, aby nedošlo ke zhroucení časového rozvrhu konference. K takovým rozhovorům byl dostatek příležitosti nejen v prostorách nově upraveného kongresového centra MU, kde se celá konference konala, ale bylo možno je pozorovat i při velmi příjemném přátelském posezení, připraveném organizátory na večer prvního dne jednání v univerzitním klubu.

Podle bezprostředních ohlasů účastníků byla konference po všech stránkách úspěšná, o čemž svědčilo i naplnění přednáškového sálu, kde počet míst značně převyšoval celkový počet přihlášených účastníků. Podaří-li se uskutečnit záměr pořadatelů uveřejnit úplné texty přednášek v Informačních listech GSGM, přispěje to nejen ke zvýraznění úspěšnosti konference, ale především k významnému rozšíření informovanosti naší genetické a biologické veřejnosti o nejrychleji se rozvíjejícím oboru biologie a jeho perspektivách.

Financování konference bylo vedle konferenčních poplatků významně podpořeno sponzorskými dary a bude vyúčtováno k 31. 12. 2002.

Stanislav Zadražil

Zpráva o zasedání výboru Federation of European Genetical Societies (FEFS)

FEFS byla založena v roce 1992 a naše genetická společnost byla jednou ze zakládajících členů spolu s dalšími třinácti evropskými genetickými společnostmi. FEFS vyvíjela určitou činnost až do roku 1994, která spočívala především v informování členů o genetických akcích pořádaných v Evropě i jinde. Od té doby byla činnost minimální, avšak mnohé společnosti (včetně naší) udržovaly kontakt alespoň přispíváním minimální částky jako členského příspěvku. Ale i to nebylo v posledních dvou letech ze strany FEFS vyžadováno. Poslední předsedkyní FEFS byla Jolanta Maluszynska z Polska, pokladníkem David Cove z Anglie a tajemníkem byl Dieter Schweizer z Rakouska.

10. listopadu 2001 se konalo v Londýně zasedání výboru FEFS, které si kladlo za cíl zvolit nový výbor a oživit činnost FEFS. Zasedání se zúčastnili kromě zástupce naší společnosti zástupci genetických společností z Německa, Anglie, Finska, Rakouska a Polska. Novým předsedou byl zvolen prof. D. J. Cove, jehož prohlášení přikládáme:

Who am I ?!

I first need to introduce myself. I have been Professor of Genetics at the University of Leeds since 1977. I am Vice- President of the UK Genetics Society having special responsibility for External Relations, and have been treasurer of FEFS from 1998 to 2001. I am a developmental geneticist and my research focuses on cellular aspects of morphogenesis and particularly plant cell polarity.

FEFS background.

FEFS was set up in 1992 at a meeting at which 14 different Societies were represented. This led to the drafting of its statutes. Although there was initially enthusiastic support for FEFS, this was not matched by the provision of subscriptions. Since its formation, only eight Societies have contributed funds to FEFS and more than half of these funds have come from the UK Genetics Society. I took over the post of Treasurer of FEFS three years ago, and established informally that some Societies were unhappy to contribute funds unless the objectives of FEFS were clarified better. This was a position with which I agreed and accordingly I have not sought to collect contributions.

The FEFS statutes envisaged holding regular FEFS meetings but none has been held in the past five years. The statutes also required member societies to exchange information and to allow a member of any FEFS society to attend a meeting of any other member society on the same basis as a member of that society. Neither of these policies seem to have been followed as enthusiastically as might have been hoped.

What next?

I have attached a copy of the FEFS statutes to this message, together with my own comments. Please let me know if you have difficulty in receiving this file (or the questionnaire, - see below -) and I will post hard copies to you hard copies.

The statutes define the objectives of FEES, but I wish to consult with Societies to determine what they believe are the most important priorities for FEES in the future. I am sure that if FEES is to continue and to flourish its statutes will need to be changed. You will see that to do this, it will be necessary to hold another meeting of the FEES Council at which delegates of at least half of the member societies are present. This leads me to my first problem. The Statutes state that "The Federation shall consist of Genetical Societies in Europe", but do not state how such societies may be identified, nor whether, as seems logical, it should only include those Societies that have expressed a desire to be included, or have paid a subscription. We discussed this at the Council meeting and decided that for the coming year, Member Societies would be identified as those societies that send a delegate to the next Council meeting. It will be a Society's responsibility to pay the expenses for its delegates attendance, but this would be the only financial support that FEES would expect during the next year. The timing and location of the next FEES Council Meeting will be part of my consultation exercise. The financial future of FEES is also a subject for consultation.

To assess this and other policy matters, I have devised a questionnaire which I have attached to this message.

Jak vyplývá z textu, vyplnili jsme za naši společnost dotazník s otázkami týkajícími se budoucnosti FEES a jejich aktivit.

Jakmile dostaneme od předsedy vyhodnocení, ze kterého vyplyne další směřování FEES, budeme o tom naše členy informovat.

Jiřina Relichová

MENDEL FORUM BRNO 2002

**To mark the 180th anniversary of birth of Gregor Johann Mendel
(1822-1884)**

Organized by

MENDELIANUM OF THE MORAVIAN MUSEUM BRNO

In cooperation with

THE CZECH COMMITTEE FOR THE HISTORY OF SCIENCE PRAGUE

GREGOR MENDEL SOCIETY OF GENETICS with its seat in BRNO

RESEARCH CENTER FOR THE HISTORY OF SCIENCES AND HUMANITIES, JOINT
WORKPLACE OF THE ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC AND
CHARLES UNIVERSITY PRAGUE

Place

THE DIETRICHSTEIN PALACE OF THE MORAVIAN MUSEUM IN BRNO

Time

SEPTEMBER 23 – 25, 2002

Preliminary Programme

September 23, 2002

9 a. m. Registration

11 a. m. MENDEL LECTURE

JAN KLEIN, THE MOLECULAR EVIDENCE FOR HUMAN DESCENT

3 p. m. HISTORY OF SCIENCE : Mendel-Darwin Concept for the 21st Century .

5 p. m. EXHIBITION ON THE SCIENTIFIC BACKGROUND OF MENDEL'S
DISCOVERY in the Dietrichstein Palace on Zelný trh Square in Brno

September 24, 2002

9 a. m.

IDEOLOGIZATION OF SCIENCE. Anti-Mendelism behind the Iron Curtain in the 1950s.

5 p. m. EXHIBITION titled GENIUS OF GENETICS celebrating Mendel through science and art in the Augustinian Monastery in Old Brno

September 25, 2002

A full-day excursion to Mendel's birthplace in Vražné-Hynčice through Olomouc and Lipník connected with Mendel's studies.

The scientific programme will be running in the conference hall in the Dietrichstein Palace of the Moravian Museum located in the historic center of Brno.

The official language is English.

CALL FOR PAPERS

(20 minutes' presentation, 10 minutes' discussion)

Name:

A. I intend to participate in the MENDEL FORUM BRNO 2002

- as author (name and address)
- title of my presentation
- contact address

B. I intend to participate as a discussant, observer, student, accompanying person

C. I intend to participate in the guided tour to Mendel's birthplace.

The full conference fee CASH 1500 Czech crowns or 50 Euros.

Reduced fee applications deadline July 31, 2002

Deadline for registration for the guided tour to Mendel's birthplace July 31, 2002

Please contact the Organizing Committee:

Anna Matalová, Jiří Sekerák (Head of the Mendelianum), Marcela Šohajková

The Mendelianum, Údolní 39, 60200 Brno

Tel.0042 5 42216216

FAX 0042 5 42212792

E-mail genetika@mzm.cz

www.vedy.cas.cz/komitet/mendel.htm

*Komise genetiky a šlechtění zvířat ČZV
Sekcia genetiky, šľachtenia a chovu zvierat SAPV
Mendelova zeměděľská a lesnická univerzita v Brně
Ústav genetiky, AF MZLU v Brně
Plemo a.s.*

pořádají

XX. Genetické dny BRNO 2002



12. a 13. září 2002

a zvou Vás k aktivní účasti a k získání
nových inspirací z

**mezinárodní vědecké konference,
kurzu a odborného semináře**

o nejnovějších genetických poznatcích
a jejich praktickém využití

Místo konání: MENDELOVA ZEMĚDĚĽSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ
Zeměděľská 1, 613 00 Brno, Česká republika

Program mezinárodní vědecké konference

Dne 12. září 2002 (čtvrtek)

8:00 – 9:00	Prezence účastníků a vystavení posterů
9:00 – 9:15	Zahájení konference
9:15 – 10:15	Genomika myši – využití a limitace pro studium genomu hospodářských zvířat (MUDr. J. Forejt, DrSc.)
10:15 - 11:15	Genový imprinting (Prof. RNDr. B. Vyskot, DrSc.)
11:15 – 11:45	Přestávka
11:45 – 12:45	Vývojová biologie a genetika zvířat (Doc. Ing. P. Dvořák, CSc.)
12:45 – 13:00	Diskuse
13:00 – 14:00	Oběd
14:00 – 18:00	<u>Workshopy</u>

1. Molekulární genetika a cytogenetika (moderátoři: Ing. S. Čepica, DrSc; MVDr. J. Rubeš, CSc.)
2. Odhad plemenné hodnoty, strategie a ekonomika šlechtění (moderátor: Prof. Ing. J. Příbyl, DrSc.)
3. Genetika zdraví a reprodukce (moderátoři: Prof. RNDr. MVDr. P. Hořín, CSc.; Doc. Ing. J. Říha, DrSc.)
4. Molekulární biologie v embryologii (moderátoři: Doc. Ing. P. Dvořák, CSc.; Ing. J. Fulka, Jr. CSc.)
5. Genetika a reprodukce kapra (moderátor: Doc. Ing. O. Linhart, DrSc.)
6. Výuka genetiky na univerzitách (moderátor: Dr. Ing. Tomáš Urban)

19:00 – 23:00 *Společenský program*

Dne 13. září 2002 (pátek)

- 8:30 – 12:00 Pokračování jednání workshopů z 12.9.
7. Genetika a reprodukce ryb (moderátor: Doc. Ing. O. Linhart, DrSc.)

**Texty přednášek
přednesených na Genetické konferenci GSGM
konané ve dnech 5.-6. února v Brně**

(I. část)

Lineárne mitochondriálne genómy kvasiniek: Model pre štúdium alternatívnych, na telomeráze nezávislých, mechanizmov replikácie telomér

Jozef Nosek a Lubomír Tomáška

Spoločné laboratórium katedier biochémie a genetiky,
Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava

Lineárne DNA genofóry akými sú chromozómy v jadrách eukaryotických buniek čelia problému erózie terminálnych sekvencií, ktorá je spôsobená neschopnosťou štandardnej replikačnej mašinerie vytvoriť kompletne kópie lineárnych molekúl DNA. Väčšina eukaryotických organizmov rieši problém replikácie koncov molekúl prostredníctvom špecifického enzýmu, nazývaného telomeráza, ktorý je schopný predlžovať 3' konce molekúl DNA. Hoci je telomeráza aktívna v zárodočných bunkových liniách, vo väčšine ľudských somatických buniek je jej aktivita v dôsledku diferenciácie reprimovaná. Inaktivácia telomerázy tak prispieva k procesu bunkovej senescencie. Naproti tomu, v bunkách väčšiny nádorov je aktivita telomerázy obnovená, čo má za následok vznik nesmrteľných bunkových línií. Inhibítory telomerázy tak predstavujú nádejný prostriedok v terapii nádorov. Avšak situácia je oveľa zložitejšia. Nedávne pokusy dokázali existenciu mechanizmov replikácie koncov lineárnych molekúl DNA, ktoré nie sú závislé na aktivite telomerázy. Kým v niektorých organizmoch (napr. *Drosophila*, *Chironomus*) tieto mechanizmy predstavujú primárne stratégie syntézy koncov chromozómov, v ľudských bunkách môžu alternatívne dráhy operovať paralelne s telomerázou alebo môžu byť špecificky indukované ak bola aktivita telomerázy vyradená mutáciou alebo pôsobením inhibítorov. Z tohto pohľadu predstavujú alternatívne mechanizmy replikácie telomér nielen zaujímavý biologický fenomén, ale zároveň aj závažný terapeutický problém.

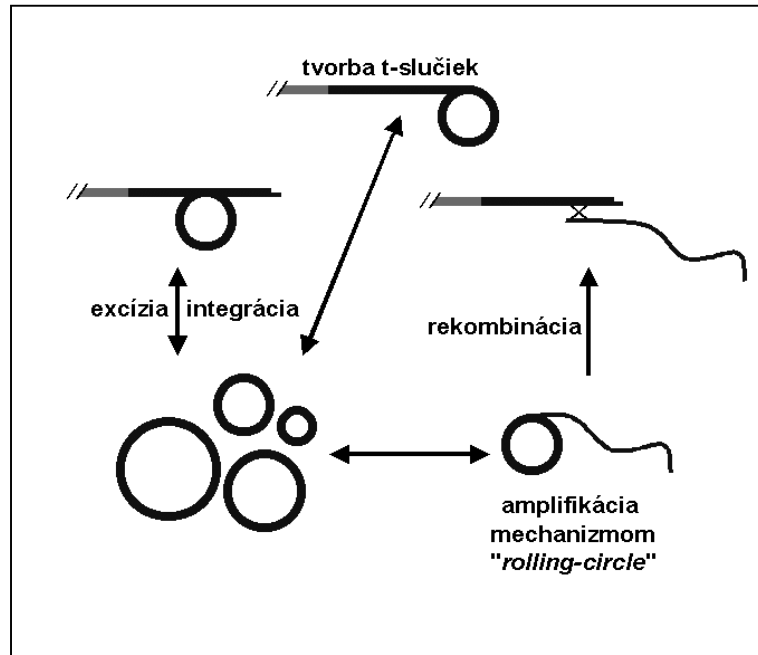
Vhodnými modelmi pre štúdium alternatívnych dráh však nie sú len chromozómy eukaryotických buniek, ale aj ďalšie lineárne DNA genofóry akými sú napríklad lineárne chromozómy niektorých druhov baktérií (*Streptomyces*, *Borrelia*), niektoré plazmidy alebo vírusy, ktoré boli zvlášť vynaliezavé v riešení problému replikácie koncov molekúl DNA. Rovnocennými modelmi sú aj lineárne mitochondriálne genómy.

Linearita mitochondriálnych genómov vyvoláva celý rad otázok súvisiacich s evolučnou históriou mitochondrií, mechanizmom vzniku a replikáciou lineárnych genofórov. Napriek tomu, že odpovede na mnohé z nich sú zatiaľ zahalené tajomstvom, dostupné argumenty nefavorizujú myšlienku, že lineárne mtDNA by mohli reprezentovať samostatnú evolučnú líniu, ale skôr podporujú predstavu, že počas evolúcie mohlo dochádzať k

interkonverzii cirkulárnych a lineárnych mtDNA relatívne jednoduchými mechanizmami. Súčasné výsledky ilustrujú, že evolúcia lineárnych genofórov v mitochondriách bola sprevádzaná (i) generovaním viacerých typov terminálnych štruktúr, ktoré pravdepodobne predstavujú nezávislé riešenia problému replikácie koncov molekúl a (ii) adaptáciou mitochondriálnej replikačnej mašínérie. Podobne ako v prípade telomér eukaryotických chromozómov aj ich mitochondriálne analógy chránia konce lineárnych molekúl pred degradáciou a vzájomnou fúziou (*capping* funkcia) a zároveň sa podieľajú na riešení problému replikácie terminálnych sekvencií. Vzhľadom k tomu, že mitochondrie nedisponujú telomerázovou aktivitou lineárne mtDNA sú odkázané na alternatívne mechanizmy replikácie telomér.

Mitochondriálne teloméry kvasinky *Candida parapsilosis* pozostávajú z tandemových repetícií 738 bp dlhého sekvenčného motívu, pričom variabilita počtu repetitívnych jednotiek vytvára populáciu molekúl mtDNA s heterogénnou dĺžkou terminálnych sekvencií. Na oboch koncoch molekuly mtDNA je prečnievajúce 5' vlákno, ktoré je rozpoznávané špecifickým mitochondriálnu teloméru viažúcim proteínom (mtTBP). Tento proteín chráni jednovláknový úsek molekuly pred enzymatickou degradáciou. Elektrón-mikroskopické analýzy tiež identifikovali štruktúry analogické telomérickým slučkám (*t-loops*) cicavčích chromozómov, ktoré vznikajú inváziou prečnievajúceho reťazca do dvojvláknovej oblasti telomér. Na ochrannej funkcii telomér sa tak pravdepodobne podieľa nielen mtTBP, ale aj t-slučky.

Nedávne analýzy replikácie lineárnej mtDNA kvasinky *Candida parapsilosis* technikami dvojrozmernej gélovej elektroforézy, Southernovej hybridizácie a elektrónovej mikroskopie odhalili existenciu sérií extragenomických minicirkulárnych molekúl derivovaných výlučne zo sekvencie mitochondriálnych telomér. Ďalšie štúdium ukázalo, že amplifikácia minicirkulárnych telomérických derivátov prebieha mechanizmom *rolling circle* a je pravdepodobne nezávislá na mitochondriálnom genóme. Na základe molekulárnej povahy extragenomických minikruhov bolo možné formulovať hypotézu o existencii nového, na telomeráze nezávislého, mechanizmu replikácie telomér (obr).



Literatúra

1. Nosek, J., Dinouël, N., Kováč, L., and Fukuhara, H. (1995): Linear mitochondrial DNAs from yeasts: Telomeres with large tandem repetitions. *Molecular and General Genetics* **247**: 61-72.
2. Tomáška, E., Nosek, J., and Fukuhara, H. (1997): Identification of a putative mitochondrial telomere-binding protein of the yeast *Candida parapsilosis*. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 3049-3056.
3. Nosek, J., Tomáška, E., Fukuhara, H., Suyama, Y., and Kováč, L. (1998): Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends in Genetics* **14**: 184-188.
4. Nosek, J., Tomáška, E., Pagáčová, B., and Fukuhara, H. (1999): Mitochondrial telomere-binding protein from *Candida parapsilosis* suggests an evolutionary adaptation of a nonspecific single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 8850-8857.
5. Tomáška, E., Nosek, J., Makhov, A.M., Pastoráková, A. and Griffith, J.D. (2000): Extragenomic double-stranded DNA circles in yeast with linear mitochondrial genomes: Potential involvement in telomere maintenance. *Nucleic Acids Research* **28**: 4479-4487.
6. Tomáška, E., Makhov, A.M., Nosek, J., Kucejová, B., and Griffith, J.D. (2001): Electron microscopic analysis supports a dual role for the mitochondrial telomere-binding protein of *Candida parapsilosis*. *Journal of Molecular Biology* **305**: 61-69.
7. Tomáška, E., Nosek, J., and Kucejová, B. (2001): Mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins: In search for new functions. *Biological Chemistry* **382**: 179-186.

8. Nosek, J., and Tomáška, L. (2002): Mitochondrial telomeres: Alternative solutions to the end-replication problem. *In: Krupp, G. and Parwaresch, R. (eds.) Telomeres and Telomerases: Cancer and Biology. Landes Bioscience (in press).*
9. Nosek, J., Tomáška, L., Ryčovská, A., and Fukuhara, H. (2002): Mitochondrial telomeres as a molecular marker for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology (in press).*

Genomika v koncích - pokroky a perspektivy v biologii telomer

Jiří Fajkus

Biofyzikální ústav AVČR & Laboratoř funkční genomiky a proteomiky Masarykovy univerzity v Brně

fajkus@ibp.cz

1. Úvod

V posledních deseti letech jsme mohli být svědky exploze poznatků o struktuře a funkci konců eukaryotických chromosomů - telomer. Současná biologie telomer pokročila od pouhého popisu jejich součástí přes elementární pochopení jejich funkcí v metabolismu telomer až ke slibným aplikacím v medicíně. Tyto aplikace můžeme formálně rozdělit na "pasivní", mezi nimiž je nejlépe známo využití analýzy telomer a telomerasy v diagnostice nádorových onemocnění, a "aktivní" aplikace, které zahrnují např. cílenou inhibici telomerasy, která vede k mortalizaci nádorových buněk, nebo naopak aktivaci telomerasy k obnově proliferační kapacity smrtelných somatických buněk a tkání např. pro transplantační účely. Ačkoli středem zájmu v biologii telomer jsou z pochopitelných důvodů telomery člověka, řada cenných impulsů vzešla ze studia telomer kvasinek, prvoků a rostlin. Realizace řady genomových sekvenačních projektů umožňuje v současné době poměrně rychlý přenos dílčích poznatků získaných v optimálním modelovém systému (např. u kvasinek) na systém, v němž má být poznatek aplikován (např. člověk), zejména při hledání funkčně analogických proteinů.

2. Struktura a funkce eukaryotických telomer

Telomery jsou nukleoproteinové komplexy na koncích lineárních chromosomů, kde zabraňují degradaci a fúzování chromosomů a zajišťují, že konec chromosomu není rozpoznáván jako neopravený zlom. Skládají se především z telomerové DNA, která je asociována s histony, nehistonovými proteiny a s řadou specifických telomera-vazebných proteinů. Telomerová DNA je u většiny eukaryot tvořena oligonukleotidovou repeticí (např. [TTAGGG] n u většiny živočichů včetně člověka, [TTTAGGG] n u většiny rostlinných druhů). Typickým rysem telomerové DNA je asymetrie v zastoupení G/C v komplementárních řetězcích DNA. G-bohaté vlákno tvoří na konci telomery jednovláknový přesah, který je substrátem telomerasy - ribonukleoproteinového enzymového komplexu s aktivitou reverzní transkriptasy, který uskutečňuje koncovou syntézu telomerových repetic podle templátové

domény vlastní molekuly RNA. Větší část telomerové DNA se vyskytuje ve dvouvláknové formě, jejíž délka se liší mezi různými druhy i mezi jednotlivými konci chromosomů až o několik řádů (10^2 bp u kvasinek *S. cerevisiae*, prvoků a jednobuněčných řas, až 10^5 bp např. u myši, tabáku, nebo rýže). Rozhraní mezi telomerou a subtelomerou tvoří telomera-asociované sekvence (TAS), které jsou charakteristické častým výskytem nepřesných telomerových repetit a jedinečných sekvencí. Dále směrem dovnitř chromosomu následuje subtelomera, která bývá složena z tandemových a rozptýlených repetit; často jsou zde lokalizovány repetice rDNA. Dále se zde vyskytují jedinečné kódující i nekódující sekvence. Vzhledem k neúplné replikaci konců lineárních chromozómů se telomerová sekvence na opožďujícím se řetězci při každé replikaci zkracuje. Zatímco částečná ztráta telomer je tolerována, zkrácení pod minimální kritickou délku (u člověka asi 1,5 kb, což je asi desetina původní délky) vede k zastavení buněčného dělení a buňka přechází do stavu známého jako senescence, charakteristického změnou expresního profilu proteinů, která vede k následným poruchám a zastavení růstu. Ačkoli role telomer jako "počítadla replikací" byla navržena již před 30 lety, přímý důkaz účasti telomer v buněčném stárnutí byl získán teprve v r. 1998, kdy bylo vnesením genu kódujícího katalytickou podjednotku lidské telomerasy dosaženo prodloužení telomer a neomezeného dělení buněk; podařilo se tak zřejmě obejít buněčné stárnutí. V normálních buňkách dochází k proliferativnímu bloku kvůli zkracování telomer ve dvou fázích. První stadium, M1 (*mortality stage 1*) nastává v době, kdy na většině chromosomů zbývá ještě několik kilobází telomerové DNA a je zřejmě zahájeno signalizací poškození DNA z jedné nebo několika nejkratších telomer. Zastavení růstu je způsobeno tumor-supresorovými geny p16/pRB a p53. Je-li účinek těchto faktorů blokován, buňka pokračuje v dělení a zkracování telomer se prohlubuje, dokud nezačne stadium M2 (*mortality stage 2*). V této fázi telomery již ztratily svoji ochrannou funkci a jsou rozpoznávány jako neopravené chromosomální zlomy. Další degradace telomer a pokusy opravit krátké telomery pak mají za následek chromosomální fúze, translokace a rozsáhlou nestabilitu genomu. V této fázi může někdy dojít k aktivaci telomerasy nebo v extrémně vzácných případech k alternativnímu (na telomerase nezávislému) prodlužování telomer (ALT - *Alternative Telomere Lengthening*).

Pro funkci telomerové DNA není zřejmě tolik podstatná její délka, jako spíše prostorová struktura. Jednovláknový přesah G-bohatého vlákna je schopen vytvářet *in vitro* čtyřvláknovou strukturu; ta byla teprve letos detegována imunochemicky *in situ*, přestože na její existenci v buňkách bylo možno usuzovat již předtím z nálezu specifických proteinů a protilátek rozpoznávajících tuto strukturu. Kromě čtyřvláknové struktury může být G-přesah

maskován v podobě tzv. telomerové smyčky (*t-loop*). Ta je tvořena ohybem dvouvláknové části telomerové DNA za tvorby lasovité struktury. Jednovláknový G-přesah přitom vstupuje do dvouvláknové části telomerové DNA, odkud možná vytěsňuje část původního G-řetězce za tvorby tzv. D-smyčky (*displacement loop*). V obou výše zmíněných typech struktury je G-přesah maskován před působením nukleas a nepřístupný pro působení telomerasy. Na tvorbě a stabilizaci těchto struktur se podílejí specifické telomera-vazebné proteiny charakterizované např. u prvoků *Oxytricha* a *Euplotes* (G4-specifické) nebo u člověka (TRF1, TRF2, hPot), kde se zřejmě účastní tvorby t-smyček. TRF1 se přitom váže na dvouvláknovou část smyčky a zřejmě usnadňuje její ohyb. Působí jako represor telomerasy. Jeho afinita k telomerové DNA může být snížena poly-ADP-ribosylací působením tankyrasy, což umožní činnost telomerasy. Protein TIN2 naopak vazbu TRF1 stabilizuje. TRF2 se zřejmě podílí na ochraně jednovláknových G-přesahů a při rekonstituci t-smyček z telomerové DNA a TRF2 se váže do oblasti vstupu G řetězce do D-smyčky. Zcela nedávno byl publikován nález koncově-specifického proteinu Pot1 u kvasinek *Schizosaccharomyces pombe* a jeho lidského analogu, hPot1. Oba proteiny byly získány z databází na základě dříve charakterizovaných proteinů *Oxytricha nova* a *Euplotes crassus*, což umožnilo a urychlilo jejich následnou charakterizaci. Tento příklad jednak dokumentuje možnosti současné genomiky a proteomiky (aneb kterák poměrně snadno a rychle dojít od jednoduchého průzkumu v databázích přes molekulární a funkční analýzu v *S. pombe* až k článku v Science), jednak ukazuje užitečnost práce na rozmanitých modelových systémech (k objevu tohoto biomedicínsky významného proteinu u člověka nevedly práce na lidských buňkách, nýbrž poznatky získané v tomto případě původně u prvoků a následně u *S. pombe*).

Kromě zmíněných proteinů byly jako lidské telomera-vazebné proteiny identifikovány další, původně známé jako rekombinační a reparační faktory (Rad50, Rad51, Rad52 a Ku70/Ku86 heterodimer). Jejich role v biologii telomer není dosud jasná, ale předpokládá se jejich účast při alternativním prodlužování telomer, ALT. U kvasinek *S. cerevisiae* jsou takové mechanismy známy dva: typ I je charakteristický amplifikací subtelomerových Y' elementů s krátkým úsekem telomerových repetic na konci, zatímco u typu II dochází k náhlému přidání dlouhých úseků telomerových repetic. Oba mechanismy jsou závislé na RAD52 a dále buď na RAD50 nebo RAD51. Typ II je závislý na přítomnosti helikázy SGS1, kvasinkovém homologu genových produktů Wernerova a Bloomova syndromu.

V lidských buňkách byl mechanismus ALT pozorován u malé frakce telomerasa-negativních buněk imortalizovaných *in vitro* a v 10-15% buněčných linií odvozených z nádorových tkání. Molekulární analýza těchto telomer ukazuje ve srovnání s telomerasa-

pozitivními buňkami vysokou heterogenitu v délce telomer. Ty dosahují zpravidla několikanásobku původní délky a podléhají postupnému zkracování, po němž následuje náhlá elongace, což odpovídá představě nerekiprokého rekombinačního mechanismu pozorovanému u kvasinek.

3. Lidská telomerasa a její regulace

Primárním mechanismem syntézy telomer u člověka je telomerasa, původně nazvaná svými objevitelkami (Greider & Blackburn, 1985) telomerová terminální transferasa. Nachází se ve fetálních tkáních, v zárodečných buňkách a v nádorových buňkách. Nižší aktivity jsou kromě toho přítomny v obnovujících se tkáních s vysokou proliferační kapacitou. Aktivita telomerasy je regulována během vývoje a ve většině somatických tkání je reprimována na téměř nedetegovatelnou úroveň. Nepřítomnost telomerasy v somatických buňkách má za následek jejich stárnutí, které následně přispívá k stárnutí tkání, orgánů a těla. Proto není divu, že se telomerasa stala žádoucím objektem ve výzkumu stárnutí a rakoviny.

Telomerasa je enzymový komplex tvořený katalytickou podjednotkou (hTERT) s aktivitou reverzní transkriptasy, a RNA podjednotkou (hTR), jejíž část slouží jako templát pro syntézu telomerové sekvence. Celá hTR je 451 nt dlouhá a není polyadenylována. Její templátovou oblast tvoří 11 nt sekvence 5'CUAACCCUAAC 3' komplementární k jedné úplné a jedné neúplné repetitivní jednotce telomerového G-přesahu. Gen pro hTR je umístěn na dlouhém raménku chromosomu 3 (3q26.3) a jeho promotorová oblast obsahuje CpG ostrůvky. Bylo nalezeno několik faktorů modulujících expresi hTR (viz Tab. 1).

Katalytická proteinová podjednotka hTERT obsahuje specifický telomerasový motiv (t-motiv) a dalších 7 motivů, které jsou konzervovány v reverzních transkriptasach retrotransposonových elementů. Gen pro hTERT měří 40 kb a je lokalizován v distální části chromosomu 5p (5p15.33). Jeho kódující sekvence je členěna do 16 exonů a je překládána do proteinu o mol. hmot. 127 kDa (1132 aminokyselinových zbytků). Ve většině normálních somatických buněk je gen pro hTERT reprimován a hTERT je proto považována za limitní komponentu holoenzymu telomerasy. Principy regulace hTERT jsou proto předmětem intenzivního studia.

Kromě příkladů regulace hTERT na transkripční, posttranskripční a posttranslační úrovni (tab. 1) hrají v regulaci syntézy telomer významnou úlohu proteiny asociované s oběma základními složkami telomerasy během sestavování funkční ribonukleoproteinové (RNP) částice enzymu (protein TEP1, komplex p23/hsp90, dyskerin) - viz tab. 1. Délka telomer je dále regulována samotnými telomerami - jejich délkou (celkovou, délkou dsDNA, přítomností

a délkou G-přesahu) a sekundární strukturou (např. G-tetraplex a t-smyčky) přes výše uvedené telomera-asociované proteiny.

4. Úloha telomerasy při stárnutí, proliferaci, diferenciaci a vzniku rakoviny

Kromě průkazu úlohy replikativní ztráty telomer jako časomíry buněčného stárnutí byla nedávno potvrzena možnost jejího "vynulování". Bylo např. ukázáno, že telomery somatických buněk jsou kratší než telomery zárodečných buněk a zkracují se s věkem jedince. U dětí s vrozeným syndromem časného stárnutí - progerií - jsou telomery zkráceny oproti stejně starým zdravým jedincům. Pokud je do buněk v kultuře vnesen konstrukt kódující a exprimující katalytickou podjednotku telomerasy, dojde k prodloužení telomer a zvýšení proliferací kapacity aniž by došlo k jejich maligní transformaci.

Aktivita telomerasy a hladiny podjednotek hTR a hTERT jsou spojeny s proliferací nádorových buněk a buněk v kultuře. V buňkách exprimujících telomerasu byla zjištěna silná korelace mezi úrovní telomerasy a buněčným růstem: např. *in situ* hybridizační studie lidských nádorů ukázaly, že hladiny hTR korelují s markerem proliferace MIB-1. Oproti původním očekáváním byla telomerasa nalezena i v některých normálních proliferujících somatických buňkách: např. mitogenní stimulace lymfocytů způsobuje aktivaci telomerasy, telomerasa byla dále detegována v buňkách bazální vrstvy kůže, děložní a střevní sliznice. Naopak řada primárních buněčných typů, jako jsou fibroblasty, buňky prsního epitelu nebo embryonální buňky ledvin neexprimují telomerasu ani když proliferují. K represí telomerasy dochází při diferenciaci, což lze pozorovat i u různých buněčných linií při indukci diferenciaci; to ukazuje protikladný vztah hladiny telomerasy k procesům proliferace a diferenciaci.

Hlavní úlohou telomerasy v nádorových buňkách je zajištění jejich nesmrtnosti (imortalizace), která umožňuje jednak akumulaci mutací vedoucích k maligní transformaci, jednak neomezený růst nádorového klonu. Reaktivace nebo zvýšení hladiny telomerasy může být způsobeno mutacemi faktorů podílejících se na represí telomerasy a má za následek stabilizaci délky telomer a buněčnou imortalizaci. Bylo však jasně prokázáno, že ačkoli exprese telomerasy je jedním ze znaků maligních buněk, není sama o sobě příčinou jejich maligní transformace.

Specifická aktivace telomerasy v nádorových buňkách je v současné době základem molekulární diagnostiky nádorů - dosavadní výzkum u přibližně 30 typů nádorů ukázal u jednotlivých typů výskyt telomerasy v rozmezí 70-96% případů, což z telomerasy činí nejuniverzálnější známý nádorový marker. V praxi se používá nejčastěji stanovení aktivity

telomerasy technikou TRAP (*Telomere repeat amplification protocol*) v buněčných extraktech. Její princip spočívá v elongaci substrátového (netelomerového) primeru ve zkoumaném extraktu a následné amplifikaci produktů pomocí PCR a k jejímu provedení jsou na trhu dostupné diagnostické soupravy. Kromě toho je možné analyzovat hladinu hTR a hTERT transkriptů pomocí kvantitativní RT-PCR, detegovat hTR podjednotku pomocí hybridizace *in situ* a katalytickou proteinovou podjednotku specifickými protilátkami na Western-blotu nebo *in situ* v buňkách a na tkáňových řezech. V některých případech je žádoucí analýza délky telomer, která se provádí běžně pomocí Southernovy hybridizace tzv. terminálních restrikčních fragmentů (telomerová DNA nemá cílová místa pro restrikční enzymy, proto zůstává po restrikčním štěpení ostatní genomové DNA neštěpená). Informativnější je ovšem analýza telomer *in situ*, která umožňuje detekci i kvantitativní vyhodnocení délky jednotlivých telomer, zejména pro zjištění případů jejich extrémního prodlužování mechanismem ALT. Vedle toho analýza délky telomer u většiny typů nádorů ukazuje přítomnost stabilních telomer zkrácených na zlomek jejich původní délky. To svědčí o tom, že k aktivaci telomerasy dochází zpravidla ve stadiu M2. Primární příčinou maligního zvrhnutí tedy bývá mutace v kontrolních systémech zajišťujících jinak replikační blok již ve stadiu M1 (p16/pRB, p53), takže klon buněk pokračuje v proliferaci až do kritického zkrácení telomer, a teprve v této fázi dochází v některých buňkách k aktivaci telomerasy a immortalizaci.

5. Protinádorová terapie založená na inhibici telomerasy

Z uvedeného rozboru problematiky je zřejmé, že telomerasa je téměř univerzální marker a immortalizující faktor nádorových buněk. Proto se stala žádoucím cílem nových léčebných přístupů v onkologii, které by mohly splnit kritéria požadovaného terapeutického efektu s minimálními vedlejšími účinky. Nicméně fakt, že telomerasa není přítomna pouze v nádorových buňkách, ale je potřebná v kmenových buňkách, regenerujících se tkáních a v zárodečných buňkách, vede k nutnosti řešit otázky nechtěných účinků "protitelomerasové" terapie.

Pro kmenové buňky je výhodou, že jejich telomery jsou několikanásobně delší než telomery nádorových buněk. Tento rozdíl by mohl představovat dostatečný prostor pro aplikaci protitelomerasové terapie. Navíc kmenové buňky proliferují s dlouhými přestávkami a během klidového období jsou jejich požadavky na syntézu telomer minimální.

Dalším možným problémem je prodleva v účinku této terapie: její účinek se dostaví až při úplné ztrátě funkčních telomer. Proto se předpokládá aplikace protitelomerasové terapie spíše

na malá množství buněk (typicky pro zabránění metastázám), zatímco u objemných nádorů je žádoucí jejich předchozí chirurgické nebo chemoterapeutické odstranění.

Snad posledním zatím uvažovaným problémem je existence nádorů využívajících na telomerase nezávislý ALT mechanismus (asi 10% případů), které by byly k protitelomerasové terapii rezistentní; řešení je v tomto případě v hledání účinných inhibitorů ALT pro dosažení úplné inhibice syntézy telomer.

Strategií rozpracovávaných pro inhibici telomerázy je v současné době celá řada; stručně uvedu příklady těch, které se jeví jako slibné alespoň v experimentech na buněčných kulturách a experimentálních zvířatech. Patří sem v první řadě aplikace **inhibitorů reverzní transkripce**, jako je ddGTP nebo AZT, které se používají i pro léčbu AIDS. U těchto činidel lze však ztěžší hovořit o specifitě účinku. Další možností je transformace buněk konstrukty exprimujícími **dominantně-negativní (mutantní) hTERT**, která postrádá katalytickou aktivitu, avšak váže hTR podjednotku, které se pak nedostává pro sestavení funkční telomerasy. Katalytickou podjednotku, resp. části její aminokyselinové sekvence, které obsahují vazebný motiv pro HLA-A2 alelu MHC (rozšířena u 50% populace) je možné použít jako antigenu pro stimulaci autologních dendritických buněk, které iniciují tvorbu cytotoxických T lymfocytů, které lyzují buňky hTERT+ nádorů. Možným problémem této **imunoterapie** založené na vakcinaci hTERT- peptidy je autoimunní odpověď proti vlastním kmenovým a zárodečným buňkám. V dosud publikovaných studiích k ní však nedošlo. Značnou výhodou tohoto přístupu je okamžitý účinek. Další možností je využít jako cíle **promotoru hTERT**, který je pro expresi telomerasy rozhodující. Na tomto poli se testuje genová terapie pomocí konstruktů, v nichž je umístěn sebevražedný gen (např. gen pro kaspasu-8, Bax, gen pro spouštění lytického cyklu adenoviru, gen pro A-řetězec difteria-toxinu), pod kontrolu hTERT promotoru. Výsledkem je specifická lýza nádorových buněk, v nichž je promotor hTERT aktivní. Jinou variantou tohoto přístupu je použití thymidinkinasy jako sebevražedného genu pod kontrolou hTERT. Exprimující buňky v tomto případě přímo nelyzují, ale stávají se citlivými na léčivo gancyklovir.

Další velká skupina protitelomerasových strategií je zaměřena proti RNA podjednotce telomerasy (hTR). Do ní patří konstrukty exprimující tzv. **hammerhead ribozymy**. Jsou to malé molekuly vykazující endoribonukleasovou aktivitu lokalizovanou ve své katalytické doméně a specifickou rozpoznávací sekvenci pro cílovou RNA - v tomto případě pro část hTR - ve zbytku své molekuly. Jiným, velmi přímočarým přístupem, jsou nejrůznější **antisense** strategie, při nichž se využívá buď konstruktů exprimujících antisense RNA, nebo

přímá aplikace nemodifikovaných nebo modifikovaných *antisense* oligonukleotidů, event. PNA (*peptide-nucleic acids*).

Nadějným směrem je dále využití nízkomolekulárních látek interagujících s telomerami, zejména **činidel stabilizujících kvadruplexovou strukturu G-přesahu** (deriváty antrachinonu, porfyriny, akridiny a fluorenony) a tím inhibujících činnost telomerasy. Bohužel však dosud testované látky vykazují rovněž určitou míru nespecifické vazby na DNA a RNA.

U řady jiných **nízkomolekulárních látek**, např. katechinů z čaje nebo berberinu a jeho derivátů syntetizovaných cíleně k zvýšení inhibičního efektu, není mechanismus zcela objasněn, avšak zřejmě interagují přímo s komplexem telomerasy. Výsledky jsou natolik povzbudivé, že některé z těchto derivátů jsou již ve stadiu klinických zkoušek.

Lze předpokládat, že kromě uvedených intervenčních strategií je snad optimální možností využít přímo buněčné faktory účastníci se přirozené regulace syntézy telomer v buňce. Kromě faktorů zmíněných v Tab.1 se může jednat např. o tzv. mortalizující geny které zastavují syntézu telomer. Jejich lokalizace (na chromosomech 3 a 7) byla zjištěna za pomoci hybridních linií nesoucích vždy po jednom lidském chromosomu, další údaje však zatím nebyly publikovány.

6. Buněčné a tkáňové inženýrství

Ačkoli by se z předchozího textu mohlo zdát, že telomerasa je úhlavním nepřitelem, proti němuž je třeba bojovat, může být obnova její aktivity velmi užitečná v řadě medicínských aplikací. Důkaz, že ektopická exprese hTERT stačí k obnově aktivity telomerasy (určitá nízká exprese hTR zpravidla v buňce je) a zvýšení jejich proliferační kapacity, umožnila immortalizovat normální buňky řady tkání, aniž by došlo k jejich maligní transformaci. Je tak možné vyvíjet lepší buněčné modely různých lidských onemocnění a produkovat v neomezené míře normální lidské buňky nejrůznějších tkáňových typů. Možnost "omlazení" dárcovských buněk nebo přímo buněk pacienta může být nesmírně významná na poli genových terapií a transplantací.

Bylo ukázáno, že nízká exprese hTERT stabilizuje přednostně krátké telomery. Transfekce buněk pomocí hTERT nemá za následek neoplastickou transformaci - kontrola buněčného cyklu a další charakteristiky jsou u transfekovaných buněk srovnatelné s kontrolními buňkami, a tyto buňky nezpůsobují nádory u imunosuprimovaných myší. Pro transplantační účely byl vyvinut systém pro přechodnou expresi hTERT na bázi Cre-lox rekombinačního systému; krátkodobá exprese hTERT s využitím tohoto systému v lidských fibroblastech je

dostatečná pro zachování funkčních telomer a pokrývá zvýšení jejich proliferační kapacity o 50%. Byly již provedeny první xenotransplantační pokusy s takto transfekovanými hovězími adrenokortikálními buňkami, které byly transplantovány SCID myším do ledvinové kapsuly. Myši transplantaci přežily a jejich glukokortikoid (kortikosteron) byl v plasmě zvířat nahrazen hovězím glukokortikoidem (kortisolem). Tkáň vytvořená z transplantovaných buněk nevykazovala znaky maligního fenotypu.

Tyto výsledky dokumentují současný stav buněčného a tkáňového inženýrství založeného na vnesení hTERT genu. Jeho budoucí perspektivy zahrnují přípravu medicínsky a komerčně významných proteinů, oddálení či zpomalení senescence určitých tkání, omlazování hematopoetických kmenových buněk pro zlepšení transplantací kostní dřeně nebo zvýšení imunity starších pacientů. Tato technologie může být dále využita k zvýšení proliferační kapacity buněk při chronických kožních vředech, k imortalizaci chondrocytů při nápravě poškozených kolenních kloubů, k přípravě osteoprogenitorových buněk pro kostní štěpy a endotheliálních buněk pro tvorbu cévních náhrad. Zvýšení replikační kapacity svalových satelitních buněk by bylo významné pro léčbu Duchennovy svalové dystrofie v kombinaci s genovou terapií těchto buněk. Obdobně by mohly být použity "telomerizované" buňky oční sítnice pro nápravu jejích degenerativních nebo poúrazových změn. Obecnou výhodou těchto přístupů by bylo použití vlastních buněk pacienta, a tím odstranění problémů s odvržením štěpu.

Naplnění perspektiv buněčného a tkáňového inženýrství, stejně jako účinné terapie nádorů na bázi inhibice telomerasy, závisí především na detailním porozumění biologii telomer; pokroky dosažené na tomto poli v poměrně krátké době od objevu telomer a telomerasy opravňují i přes množství zbývajících práce přinejmenším k opatrnému optimismu.

Za cenné rady, připomínky a zejména praktickou spolupráci na výzkumu telomer děkuji J. Maláskovi (FN Brno), M. Šimíčkové (MOÚ Brno) a svým spolupracovníkům z Lab. mol. komplexů DNA, BFÚ AVČR a Lab. FGP-ABVMK, PřF MU v Brně. Výzkum v lab. J.F. je financován z prostředků MSM J07/98:143100008, GAČR 301/98/0045 a GA AVČR S5004010.

Tab. 1. Příklady regulace syntézy telomer

Předmět regulace	Název faktoru	Mechanismus / účinek
promotor hTR genu	NF-Y	aktivace transkripce
	Sp1	aktivace transkripce
	pRB	aktivace transkripce
	Sp3	represor transkripce
	CpG methylace	represor transkripce
hTR RNA	dyskerin	úprava a stabilizace telomerasového RNP komplexu
promotor hTERT genu	CpG methylace, deacetylace histonů	represe transkripce
	MZF-2	represe transkripce
	estrogen	aktivace transkripce
	c-Myc	aktivace transkripce
	Sp1	aktivace transkripce
	Mad	represe transkripce (kompetice s c-Myc o faktor Max)
	IFN- α	represe přes snížení c-Myc
	p53 geny mortality na chromosomech 3 and 7	represe přes vazbu k Sp1 represe hTERT transkripce
hTERT pre-mRNA	hTERT α	alternativní sestřihová varianta / inhibice aktivity
hTERT mRNA	FGF-2	snížení hladiny hTERT mRNA
hTERT protein	c-Abl tyrosinkinasa	hTERT fosforylace / aktivace telomerasy
	PP2A	hTERT defosforylace / inhibice telomerasy
	p16 ^{INK4A} , p15 ^{INK4B}	inhibice cdk / inhibice telomerasy
	p23/hsp90	asociace s hTERT proteinem / nutná pro sestavení aktivní telomerasy
hTERT + hTR	TEP1	nutný pro sestavení telomerasového RNP a stabilitu hTR
Telomerová DNA	TRF1	vazba na telomerovou dsDNA a její ohyb / represor elongace telomer
	TRF2	ochrana G-přesahu, podpora tvorby t-smyčky
TRF1	tankyráza	poly-ADP-ribosylace TRF1 / represor vazby TRF1 k telomeře, zvýšení dostupnosti telomerové DNA pro telomerasu
	TIN2	interakce s TRF1 / opačný vliv než tankyrasa

Genom, proteom a priony u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Tomáš Cápál a Vladimír Vondrejs

Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha 2, 128 44, Viničná 5
vondr@natur.cuni.cz

1. Historie projektu sekvencování

Projekt sekvencování genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byl iniciován prof. Goffeau (1989) ve spolupráci s Evropskou komisí (EU). Celkový obsah DNA v haploidním genomu je u *S. cerevisiae* jen asi 3-4x vyšší než u bakterie *Escherichia coli*. Pro sekvencování byla důležitá i skutečnost, že haploidní buňky tohoto modelového eukaryotického mikroorganismu obsahují 16 chromosomů, jejichž velikost (obr. 1) se pohybuje v rozmezí od asi 200 Kbp do 1,6 Mbp. Molekuly DNA jednotlivých chromosomů lze tudíž separovat pomocí pulzní elektroforézy. Pro pilotní studii byl vybrán chromosom III. Práce byla založena na DNA knihovnách připravených M. Olsonem a C. Newlanem. Více než 30 evropských laboratoří obdrželo ke zpracování úseky o délce asi 11 Kb. Sekvence 315 Kb byla zveřejněna roku 1992 (Oliver et al.). Zbylé chromosomy byly distribuovány mezi členy sekvencovacího konsorcia EU a dále do vybraných laboratoří v Kanadě, Anglii, USA a Japonsku. Evropský sekvencovací projekt byl založen na spolupráci koordinačního centra MIPS (Martinsried Institute for Protein Sequences) s koordinátory sekvencování jednotlivých chromosomů a skupinami laboratoří, které sekvencování realizovaly. Postup byl rozdělen do několika kroků:

- příprava a distribuce uspořádaných knihoven pro jednotlivé chromosomy koordinátorem
- verifikace restrikčních map a sekvencování úseků DNA laboratořemi, včetně odesílání dat do MIPS
- uspořádání sekvencí, kontrola kvality a uložení dat do databáze (MIPS)

Ve výsledné verzi sekvence genomu se v celkové délce 12,1 Mb vyskytuje pouze asi 2000 chyb. Sekvence dokončená v dubnu 1996 zahrnuje téměř celý genom. Schází 120 opakování rRNA genů na chromosomu XII a úseky na koncích chromosomů. Poznatky o sekvenci, včetně počítačové analýzy primárních dat, byly shrnuty ve zvláštním čísle časopisu Nature (1997).

2. Počítačová analýza sekvence

Základní analýza sekvencí zahrnuje informace o celkovém rozložení hustoty GC resp. AT párů a o polohách ORF, genů pro RNA a různých genetických elementů, včetně

jejich opakování, které bylo sledováno rozbořením vnitřních homologických úseků. Celkový počet ORF, větších než 300 b, byl 6279, ORF menších, ale identifikovaných na základě podobnosti se známými geny, bylo 87. Pouze 220 ORF obsahovalo introny a 15 5'-UTR introny. Nejistých bylo asi 384 ORF. Na tRNA připadalo 277 genů, z toho 58 obsahovalo introny. Na rRNA (5 S; 5,8 S; 18 S a 25 S) připadalo 100 – 200 genů. Na snRNA 1 gen, SRP-asociovanou RNA 1, na Rnasa P-RNA 1, na telomerasovou templátovou RNA 368 a na různé LTR sekvence 368 elementů. Nejdůležitějšími genetickými elementy byla retrotransposony TY1 66, TY2 26, TY3 4, TY4 6 a TY5 2 elementy. Na základě analýzy kódujících sekvencí v rámci ORF bylo zaznamenáno původně 38 % proteinů již dříve známých na základě biochemické a genetické analýzy kvasinky *S. cerevisiae*. 6 % proteinů vykazovalo vysoký stupeň homologie s proteiny známými u jiných organismů. Nižší stupeň homologie vykazovalo 13 % proteinů. 11 % proteinů bylo homologních s dříve popsány proteiny o neznámých funkcích a žádnou homologii nevykazovalo 26 % proteinů. Zbyvající ORF byly nejisté. V současné době je pochopitelně zastoupení v prvních dvou skupinách podstatně vyšší. Z hlediska funkce je se značnou pravděpodobností popsáno téměř 60 % proteinů. Proteiny prvních dvou skupin byly klasifikovány podle funkce tak, aby byla získána hrubá představa o tom, kolik proteinů připadá na různé typy buněčných funkcí. Zhruba lze říci, že na metabolismus připadá asi 28 % proteinů, z toho na získávání energie 5 %. Na růst, dělení a syntézu DNA 19 %, transkripci 15 %, proteosyntézu 7 %, další osud proteinů 10 %, transportní zařízení 6 %, vnitrobuněčnou dopravu 7 % a přenos signálů 2 %. Je pochopitelné, že v této oblasti lze očekávat určité změny s přibýváním informací o dalších ORF.

3. Funkční analýza genomu

Počítačová analýza se stala základem pro hlubší funkční analýzu genomu, jejíž strategii rámcově popisuje schema na obr. 2. V současnosti lze zaznamenat dvě hlavní hlediska přístupu. Jako první se uplatňovalo hledisko charakterizované zaměřením na analýzu funkce jednotlivých genů. V poslední době se stále více uplatňuje přístup z hlediska celku, což umožnily nové technologie pro sledování kvantitativního zastoupení různých mRNA (projekt transkriptom), resp. různých proteinů (projekt proteom). Tyto celkové pohledy, založené na sledování změn obrazce exprese genů na úrovni zastoupení mRNA nebo proteinů, a to v závislosti na podmínkách, přinášejí informace o dynamice vztahů buněčných procesů v rámci buněčného cyklu, životních cyklů, po změně kultivačních podmínek, v souvislosti s působením různých stresových faktorů, anebo po inaktivaci jednotlivých genů. Kvasinka *S. cerevisiae* zaujímá v této oblasti mimořádné postavení, zejména proto, že metody cílené

inaktivace genů jsou u tohoto modelového organismu dokonale rozpracovány a jejich možnosti jsou mnohem větší než u jiných organismů. Také současný stav poznatků o transkripčních faktorech, asi 90 jich je v současnosti identifikováno, dovoluje velmi hlubokou analýzu regulace transkripce. Metody zařazování genů do širších souvislostí buněčných procesů tento typ analýzy ještě výrazně zhodnocují. Např. vysoký stupeň znalostí o metabolických řetězcích dovoluje vytypovat určité úseky mezi větvenými, pro které je charakteristický závěrečný produkt, kterým lze kompenzovat nedostatek proteinu, podílejícího se na realizaci příslušného předchozího úseku metabolického řetězce. Na tomto principu lze funkci jednotlivých proteinů metabolické skupiny zařazovat do širšího kontextu a dokonce provádět skupinové selekce klonů, které jsou poškozeny v genech, přináležejících k jednotlivým metabolickým úsekům. Podobné postupy, umožňující rychlé zařazování proteinů, resp. genů, které je kódují, do širšího funkčního kontextu, byly vypracovány i pro další funkční okruhy (přehled viz Brown a Tuite, 1998).

Projekt kvasinkový transkriptom byl historicky odstartován metodou sekvenční analýzy krátkých značkových úseků (tags), odvozených od cDNA, které byly specificky uspořádány do konkatemerů. Metoda se označuje SAGE (Seriál Analysis of Gene Expression). V současné době je nejperspektivnější v této oblasti metoda hybridizačních matic (hybridization assays), která je založena na vytváření matic imobilizovaných cílových sekvencí na pevném nosiči. V každé skvrně matrice je imobilizována DNA komplementární k jinému genu. Matrice je hybridizována s hybridizačními značkami, odvozenými od buněčné mRNA. Po připojení sond na matici lze odečíst relativní množství sond, vázaných na jednotlivé skvrny, a tím získat představu o profilu zastoupení transkriptů jednotlivých genů v rámci populace mRNA za určitých podmínek. V současné době matrice na 4 mikročipech stačí pro celý kvasinkový genom. Ve skvrnách se nacházejí buď krátké (20 – 25 b) reprezentativní oligonukleotidy, anebo PCR produkty.

Hlavně pokroky v hmotové spektroskopii otevírají nové možnosti detekce a rozlišení proteinů ve směsi přímo, anebo v kombinaci s dělením buněčných proteinů pomocí dvojrozměrné elektroforézy. Hmotová spektroskopie také otvírá nové možnosti pro analýzu složení buněčných lipidů (lipidom) a případně i polysacharidů. Začíná se uvažovat i o profilech metabolitů (metabilon).

Analýza individuálních genů a jejich produktů (obr. 2) pochopitelně čerpá z informací celkové analýzy a navíc přináší některé specifické výpovědi. Při analýze ORF resp. genu se vychází z možnosti inaktivace funkce genu, delecí, přerušením za pomoci vložení jiného genu, anebo menší mutací (např. bodovou mutací), případně mutací s podmíněným účinkem.

Hledá se fenotypový projev takové mutace. Druhý přístup je založen na zvýšení exprese genu nad obvyklou normu a hledání odpovídajícího fenotypového projevu za různých podmínek. V takovémto případě se obvykle gen zařazuje za silný regulovaný promotor a případně se umísťuje na plasmid s větším počtem kopií. Analýza na úrovni produktu, tj. RNA či proteinu, je dalším možným přístupem. V souvislosti s analýzou individuálních genů je třeba připomenout, že jsou k dispozici jak kompletní genomové, tak cDNA knihovny *S. cerevisiae*, kompletní sady mutantů s poškozenými jednotlivými geny a obrovské kolekce nejrůznějších typů mutantů jednotlivých genů. V podstatě lze říci, že díky přednostní a velmi výkonné homologní rekombinaci v *S. cerevisiae*, lze snadno připravit jakékoliv mutantní kmeny s cíleně upravenými geny a dokonce s reorganizovanými chromosomy (podrobněji viz kapitola 4).

Kvasinka *S. cerevisiae* je v současné době také jedním z nejlépe prostudovaných organismů z hlediska interakcí proteinů navzájem a interakcí proteinů s DNA i proteinů s RNA. K tomuto účelu jsou využívány tzv. hybridní systémy. Princip dvouhybridního systému, založeného na expresi reporterského genu (např. *lacZ*, anebo *his3*), respektive na aktivátoru transkripce *gal4*, je znázorněn na obr. 3. Dvouhybridní systém může odpovědět na otázku, s kterým, anebo s kterými buněčnými proteiny může interagovat testovaný protein, jehož kódující sekvence je fúzována se sekvencí DNA kódující vazebnou doménu aktivátoru transkripce na speciálním vektoru. Knihovna genů fúzovaných se sekvencí, kódující aktivační doménu *gal4* na speciálních vektorech, představuje druhý článek dvouhybridního systému.

4. Cílená mutagenese

Jak již bylo zmíněno výše, zvláštní výhody pro analýzu genomu plynou z metod cílené mutagenese *in vivo*, které jsou založeny na homologní rekombinaci. Na obr. 4 je např. znázorněn princip postupu pro cílené přerušení libovolného kvasinkového genu genem pro kanamycinovou rezistenci, která je sdružena s rezistencí proti geneticinu, účinnému antifungálnímu antibiotiku. Zacílení je zajištěno pomocí syntetických oligonukleotidů, které fungují také jako primery při PCR amplifikaci genu, pocházejícího z bakterií. Syntetické sekvence na okrajích amplifikovaných genů jsou homologní se sekvencemi, ve kterých má nastat rekombinantní vložení. Délka těchto sekvencí má být asi 50 b.

5. Priony

V kvasince *S. cerevisiae* existují kromě chromosomů ještě nemendelovské genetické elementy. Jsou to již sekvencovaná mitochondriální DNA, cytoplazmatické dsRNA ve virových partikulích, dsDNA jaderného cirkulárního plasmidu a nakonec několik typů

prionových proteinů. Nejznámější z nich jsou priony $[PSI^+]$ odvozené od *Sup 35p* a $[URE3]$ odvozené od *Ure 2p*. Na těchto prionových systémech se podařilo ukázat, že léčba od prionů je možná, alespoň u kvasinek, a dále, že priony mohou za určitých okolností buňkám přinášet výhody. Např. $[PSI^+]$ buňky lépe rostou za některých stresových podmínek než buňky $[psi^-]$, zatímco za příznivých podmínek nejsou mezi oběma typy buněk podstatné rozdíly. Objev kvasinkových prionů je důležitý hlavně proto, že umožňuje bezpečně experimentovat s „dědičnými“ elementy, které jsou jiného typu než DNA či RNA. Na mikrobiálním modelu lze metodami proteinového inženýrství zkoumat, čím je podmíněn vznik konformačního stavu, který je schopen vyvolat lavinovitou změnu u shodných proteinů, které prionovou konformaci a sklon k tvorbě amyloidních shluků nevykazovaly.

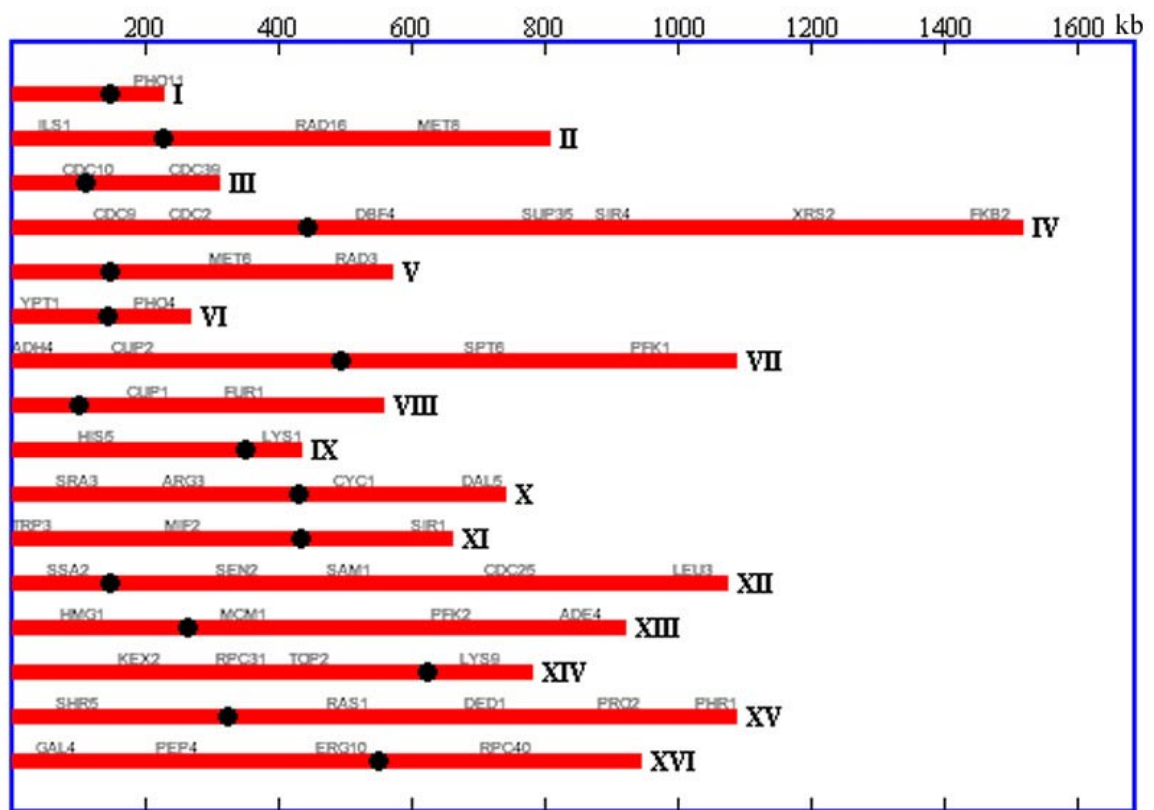
Literatura

Problematicke funkční analýzy sekvence genomu *S. cerevisiae* včetně metod celkových pohledů je věnována monografie *Yeast Gene Analysis*, *Methods in Microbiology* Vol. 26, eds.: Brown A. J. P., Tuite M. F., Acad Press, San Diego, London, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. Recentní informace jsou shrnuty na webových stránkách (viz tabulka). V těchto zdrojích čtenář nalezne množství dalších odkazů.

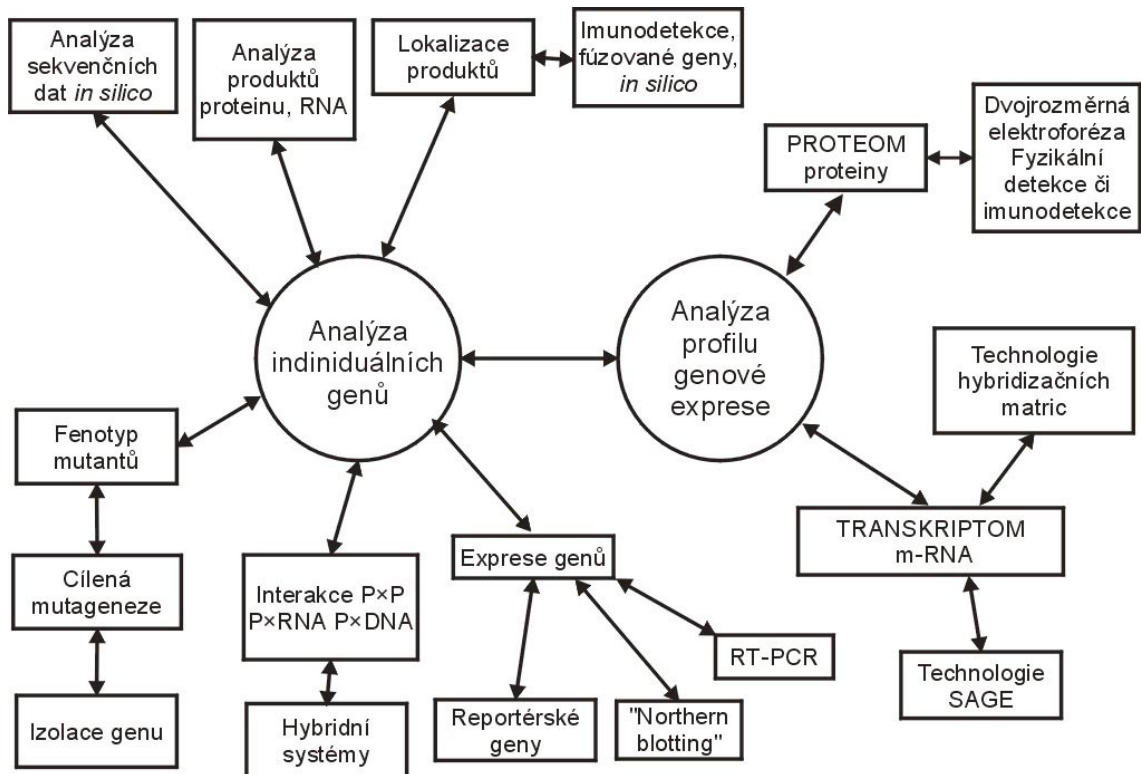
Tab. 1. Důležité adresy a jejich zaměření

<u>Název</u>	<u>Adresa</u>	<u>Popis</u>
<i>SGD</i>	http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/	genom, proteom
MIPS	http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/yeast/	proteom
YPD	http://www.proteome.com/	proteom
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	genom, proteom
Sanger institute	http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_cerevisiae/	genom
ExpASY	http://www.expasy.org/	
RSA Tools	http://www.ucmb.ulb.ac.be/bioinformatics/rsa-tools/	Regulatory Sequence Analysis Tools
Yeast resource center	http://depts.washington.edu/%7Eyeastrc/index.html	
PathCalling	http://portal.curagen.com/extpc/com.curagen.portal.servlet.Yeast	Yeast Interaction Database
MicroArray Informatics	http://www.ebi.ac.uk/microarray/index.html	
Gene Expression and Microarray Links	http://industry.ebi.ac.uk/~alan/MicroArray/	
PROSPECT: Promoter Inspection Tool	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Postdocs/Wataru/PROSPECT/	
SCP: The Promoter Database of Saccharomyces cerevisiae	http://cgsigma.cshl.org/jjan/	
Yeast Gene Duplications	http://acer.gen.tcd.ie/~khwolfe/yeast/topmenu.html	
Yeast Introns	http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/yeast_introns.html	
Yeast snoRNAs	http://www.bio.umass.edu/biochem/rna-sequence/Yeast_snoRNA_Database/snoRNA_DataBase.html	
Yeast tRNAs	http://biochimica.unipr.it/yeast/tRNA.html	
Yeast Telomeres	http://www.leicester.ac.uk/genetics/ejl12/Research.html	
Yeast Protein Linkage Map	http://depts.washington.edu/sfields/yp_project/index.html	
Yeast Membrane Protein Library	http://cbs.umn.edu/yeast	
Webminer Genomic Data Search Tool	http://webminer.ucsf.edu/cgi-bin/mkjavascript	
TRIPLES - a database of transposon-insertion phenotypes, localization and expression	http://ygac.med.yale.edu/triples/triples.htm	
Genome-Wide Protein Function Prediction	http://www.nature.com/server-java/Propub/nature/402083A0.frameset?context=toc	
Yeast Cell Cycle Analysis Projects	http://genome-www.stanford.edu/cellcycle/	
Yeast Microarray Global Viewer	http://www.transcriptome.ens.fr/ymgv/	
Yeast Deletion Strains	http://www-deletion.stanford.edu/cgi-bin/deletion/search3.pl	
NCRR Yeast Resource Center	http://depts.washington.edu/~yeastrc/index.html	
Gene Ontology	http://www.geneontology.org/	
Other Biological Links	http://genome-www.stanford.edu/other_biol.html	
Yeast Genome Directory	http://www.nature.com/genomics/papers/s_cerevisiae.html	

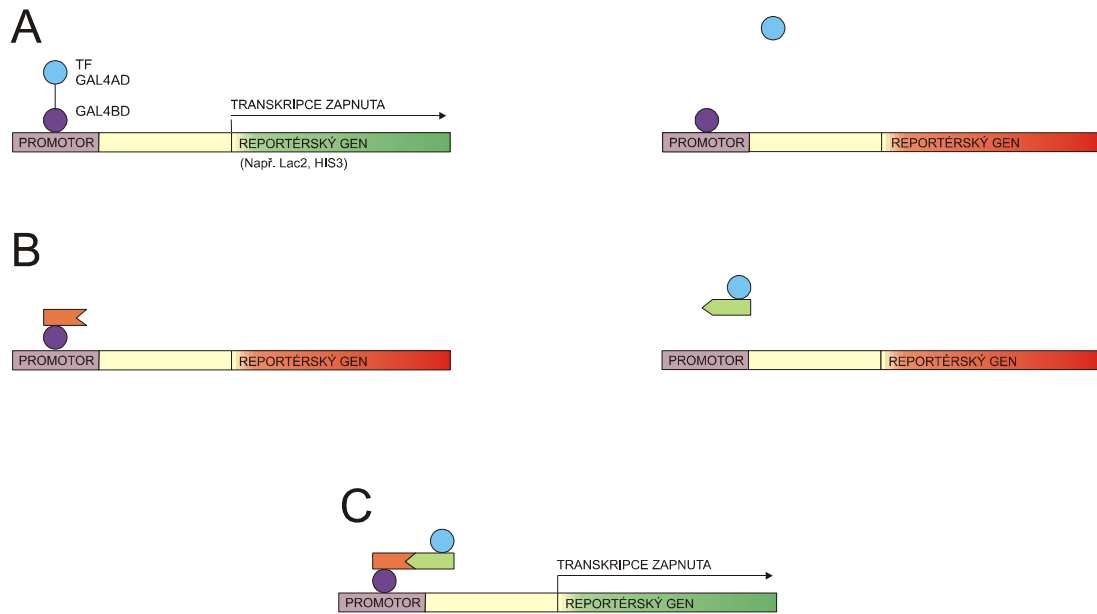
Obr. 1. Chromosomy *S. cerevisiae*



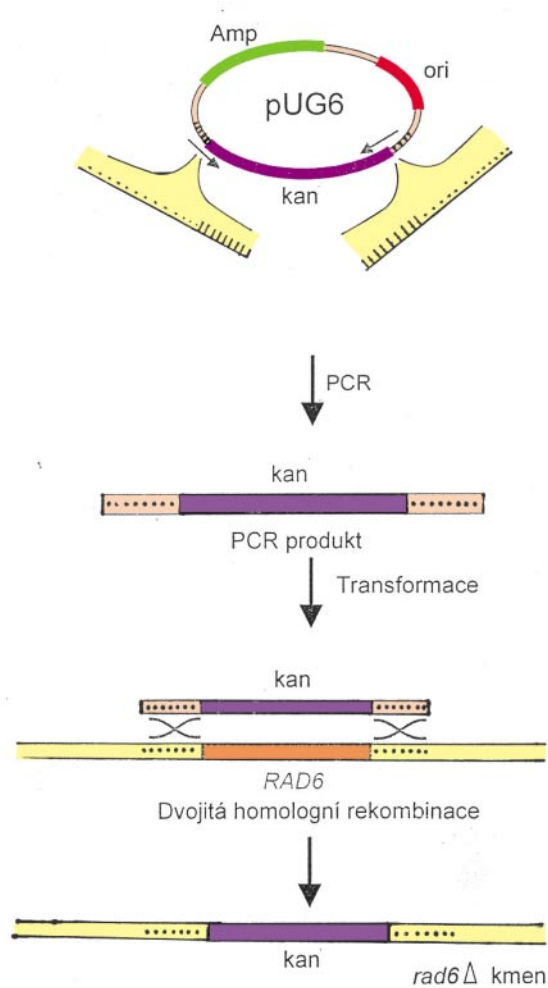
Obr. 2. Strategie funkční analýzy genomu *S. cerevisiae*



Obr. 3. Princip dvouhybridního systému u *S. cerevisiae*



Obr. 4. Princip inaktivace genu přerušením kódující sekvenec genem pro kanamycinovou rezistenci



Sekvencování genomu *Arabidopsis thaliana*

Miloš Ondřej

Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, České Budějovice

Je pravděpodobné, že bude snaha předejít námitkám veřejnosti proti transgenním rostlinám tím, že se budou jako transgeny kulturních rostlin využívat rostlinné geny. Podmínkou toho je dostatečně široký výběr rostlinných genů. První krok k němu byl učiněn. Je jím sekvencování genomu *Arabidopsis thaliana*. To bylo dokončeno a stále pokračuje funkční charakterizace jednotlivých genů v genomu, ve které rozhodující slovo má inserční mutagenese. Proto by měla i zde mít své místo kapitola o projektu genomu *Arabidopsis thaliana* a jeho zatím získaných výsledcích. Projekt genomu *A. thaliana* byl zahájen v roce 1992, kdy začaly pokusy s funkční charakteristikou jednotlivých genů rostlinného genomu klonováním mutací, získaných chemickou mutagenesí na základě „*map-based cloning*“ a charakteristika mutací, získaných inserční mutagenesí. V roce 1996 se začalo se systematickým sekvencováním genomu *A. thaliana*. Sekvence chromosomů 2 a 4 vyšla před Vánoce 1999 a sekvence dalších tří chromosomů před Vánoce 2000. Funkční charakteristika jednotlivých genů genomu a jejich hlavních interakcí pokračuje nepřetržitě.

Celkový pohled na genomovou sekvenci *Arabidopsis thaliana*

Na konci 2. tisíciletí bylo dokončeno sekvenování 15.4 Mb z celkových 125 Mb genomu *A. thaliana*. Je to první sekvence rostlinného genomu, která současně umožňuje rozšíření znalostí o struktuře všech eukaryontních genomů. Při jejím studiu bylo identifikováno mnoho genů genomu této rostliny a prostudovány jejich funkce.

Kódující sekvence

Funkce 69% genů byla klasifikována podle sekvenční podobnosti s proteiny, známými u všech organismů. Pouze 9% genů bylo charakterizováno experimentálně. Stejně vlastnosti byly předpokládány u proteinů, směřovaných do mitochondrií, a u 14 genových produktů se odhaduje, že je směřováno do chloroplastů. Asi 30 procentům z celkem 25 498 genových produktů (celkem 87427 exonů a 70 379 intronů), které zahrnují jak proteiny, specifické pro rostliny, tak i proteiny s podobností genům s neznámou funkcí z jiných organismů, nemohla být přisouzena funkce. Pouze 8-23% genů, zapojených v procesu transkripce (transkripčních

faktorů) má příbuzné geny u jiných organismů, což dokládá nezávislou evoluci mnoha rostlinných transkripčních faktorů. Naproti tomu, 48-60% genů, které se účastní na proteosyntéze má svoje protějšky u jiných organismů, což dokládá konservativnost genové evoluce. Poměrně vysoká frekvence shody mezi geny *A. thaliana* a bakteriálními geny je v kategoriích „metabolismus“ a „energie“ a ukazuje jak na získávání bakteriálních genů z předků chloroplastů, tak na vysokou konzervativnost sekvencí mezi druhy. Právě tak porovnání s jednobuněčnými a mnohobuněčnými eukaryoty ukazuje, že geny *Arabidopsis*, které kódují proteiny zapojené v buněčné komunikaci a přenosu signálů mají více společného s mnohobuněčnými eukaryoty než s kvasinkami.

Významná redundance genů *Arabidopsis thaliana* je zřejmá z duplikací segmentů a paralelně uspořádaných homologních úseků. Navíc je mnoho dalších duplikovaných genů, které jsou rozptýleny po celém genomu. Když se berou v úvahu duplikace, celkově se genom skládá z 11 601 genů pro různé proteiny. Jen 35% všech genů pro proteiny je v genomu přítomno v jedné kopii a 37,4% všech proteinů je kódováno více než pěti geny, což je daleko větší podíl, než u drosofilu (12.1%) nebo *C. elegans* (24%).

Z celkového počtu 2600 genů jich zatím jen 10% bylo podrobně prostudováno samostatně i v některých hlavních interakcích.. Na úrovni molekulární genetiky byly poznány některé základní mechanismy genové regulace, buněčné organizace, přenosu signálu, vývoje, metabolismu, fotomorforegulace, regulace kvetení a fotosyntézy nebo genetické reparace. Zajímavé je, že *Arabidopsis thaliana* obsahuje řadu genů, homologních lidským genům, které působí u člověka známé dědičné defekty.

Absolutní počet jednotlivých genů plus genových rodin *A. thaliana* je v rámci ostatních eukaryont 11000 - 15000, ale proporce genových rodin je u *A. thaliana* větší.

Většina funkcí, identifikovaných u genů na základě proteinových domén, je konzervována v podobných proporcích u *Arabidopsis*, *S. cerevisiae*, *Drosophila* a *Caenorhabditis elegans*. Byly hledány homologie 289 genů, odpovědných za dědičné choroby člověka a u *A. thaliana* jich bylo zjištěno 139 (48%). 17 z nich má u *A. thaliana* sekvenci podobnější lidským genům než kvasinkovým.

Tab. 1. Podíl genů různých organismů přítomných v jedné kopii nebo jako rodiny paralogních kopií

Organismus	Počet jednotlivých genů plus genových rodin	Jednotlivé	2 členy	3 členy	4 členy	5 členů	více členů
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 587	88.8%	6.8%	2.3%	0.7%	0.0	1.4%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5 105	71.4%	13.8%	3.5%	2.2%	0.7%	8.4%
<i>Drosophila melanogaster</i>	10 738	72.5%	8.5%	3.4%	1.9%	1.6%	12.1%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	14 177	55.2%	12.0%	4.5%	2.7%	1.6%	24.0%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	11 601	35.0%	12,5%	7.0%	4.4%	3.6%	37.4%

Celkem 150 genových rodin *A. thaliana* je unikátních. Zahrnují jak transkripční faktory, tak strukturní proteiny, enzymy a proteiny s neznámou funkcí. Členy rodiny genů, společné všem eukaryontům, prošly u *Arabidopsis* podstatnými změnami (zvýšením a snížením počtu). Došlo také k přenosu poměrně omezeného počtu genů ze sinic – od předpokládaných předchůdců chloroplastů.

Organizace genomu

V genomu *A. thaliana* je celkem 1528 tandemových úseků, duplikací až multiplikací, které zahrnují 4 140 genů s opakováním až 23 genů. Celkem 17% všech genů je v tandemech. Duplikace velkých segmentů počítaly se segmenty o délce nejméně 1000 bp a s identitou nejméně 50%. Takovýchto duplikovaných segmentů bylo nalezeno celkem 24, o skutečné velikosti 100 kb nebo větší, které zahrnovaly 65,6 Mb, tedy 58% genomu. V centromerických úsecích z toho byl zjištěn jen jeden duplikovaný úsek o celkové velikosti 375 kb, obě kopie na chromosomu 4. Mnoho duplikovaných segmentů vykazovalo další přestavby, jako například inverze uvnitř duplikovaného úseku. Protože většina genů genomu *A. thaliana* se vyskytuje v duplikovaných (ale ne triplikovaných) úsecích, je pravděpodobné, že *Arabidopsis* měla tetraploidního předka. Srovnávání sekvencí *A. thaliana* a rajčete ukázalo, že k duplikaci genomu za vzniku tetraploidu došlo před 112 miliony let. Je však také možné, že v průběhu evoluce došlo k několika nezávislým duplikacím.

Srovnávací analýza sekvencí *Arabidopsis* v databázích

Genotyp *A. thaliana*, který byl sekvencován, je označován jako rasa *Columbia 0*. Jiná často využívaná rasa *A. thaliana* je označována jako *Landsberg erecta*. V databázích se najdou dosti dlouhé sekvenované úseky této rasy a ty byly srovnávány s *Columbia 0*.

Srovnávání sekvence *A. thaliana* dané databáze se sekvencemi jiných databází umožňuje poznání mikrostruktury genomu tohoto druhu a dále umožňuje použití nových molekulárních sond pro mapování. V lokusech pro rezistenci k chorobám byl zjištěn vysoký polymorfismus. Takovéto lokusy jsou častými lokusy ilegální rekombinace. Při srovnávání delších úseků (asi 80 kb) mezi *Columbia 0* a *Landsberg erecta* byly zjištěny dvě třídy polymorfismu: polymorfie jednotlivých nukleotidů (SNP) a inserce-delece (InDels). Celkem bylo zjištěno 25 274 SNPs, tedy jedna na 3.3kb. Dále 14 570 InDels průměrné délky 6.1 kb. Jejich skutečná délka se lišila v rozmezí od 2 bp do 38kb, ale 50% jich bylo menších než 50bp a 10% z nich bylo na místech lokalizace mikrosatelitů. U větších insercí (nad 256 bp) 30% z nich mělo sekvenci, odpovídající transposase, takže jejich podstatná část vznikla v důsledku transposic. Mnoho z nich obsahovalo aktivní geny, které neměly vztah k transposonům. Mnohé z genů, které byly nalezeny jako inserce u jedné linie, byly u druhé nalezeny na jiném místě genomu. V průběhu evoluce tedy dochází k přenosu genů na různá místa. Polymorfismus postihuje přibližně stejně často kódující i nekódující úseky DNA.

Porovnání *A. thaliana* a ostatních rostlinných druhů

K oddělení genomů č. *Brassicaceae* *A. thaliana* a *Capsella rubella* došlo před 6.2-9.8 miliony let a oba genotypy jsou si stále velmi podobné, shodují se v 85% svých sekvencí. Hlavní rozdíly jsou rozsáhlé triplikace a přestavby v genomu *C. rubella*. Rozdíly mezi druhy *Arabidopsis thaliana* a *Brassica oleracea* jsou naopak značné, ačkoliv doba rozdělení obou rodů je jen asi dvojnásobná. K diferencím mezi oběma rody došlo hlavně v triplikovaných sekvencích, což ukazuje, že polyploidie urychluje evoluci.

Fylogenetické linie *Arabidopsis* a rajčete se rozdělily asi před 150 miliony lety a srovnávací analýza zjistila komplexní změny. Čtyři úseky genomu *A. thaliana* jsou vzájemně podobné a jsou také podobné jednomu úseku genomu rajčete, což vypadá, jakoby v genomu *A. thaliana* došlo ke dvěma za sebou následujícím duplikacím. Druhá z nich, před cca 112 miliony let, byla pravděpodobně spojena s polyploidií. Genomy *Arabidopsis* a rýže se rozlišily před 200 miliony let. V tomto případě se našly jiné tři úseky genomu *A. thaliana*, podobné vzájemně a současně podobné jednomu úseku rýže.

Integrace tří genomů rostlinné buňky

Genomy jádra, chloroplastů a mitochondrií se podstatně liší počtem genů, jejich organizací a stabilitou. Plastidové geny jsou těsně nahloučeny a plastidových genom je u všech rostlin velmi konzervativní, zatímco mitochondriální geny jsou v mitochondriálním

genomu daleko více rozptýleny, jejich složení je daleko méně konstantní a mitochondriální genomy podléhají častým rekombinacím. Je známo, že dochází k toku genů z organel do jádra. Aby bylo možno nalézt jaderné geny *A. thaliana*, které mohou být organelárního původu, byly porovnávány všechny proteiny *A. thaliana*, odvozené z jaderného genomu s těmi, které jsou u různých rostlinných druhů známy z chloroplastového a mitochondriálního genomu. Tím byly určeny proteiny, které jsou v genomu *A. thaliana* kódovány jaderným genomem, ale které jsou podobné proteinům, kódovaným v jiných druzích chloroplastovým nebo mitochondriálním genomem. Byly nalezeny 4 takovéto mitochondriální geny a 44 genů chloroplastových. *A. thaliana* má velké množství jaderných genů homologních s geny sinice *Synechocystis* (homologie byla nalezena s geny pro celkem 404 proteiny *Synechocystis*). Provádělo se hledání homologie v databázích s jinými sinicemi než *Synechocystis*. Bylo identifikováno 69 dalších proteinů *A. thaliana*, kódovaných geny buněčného jádra, které jsou pravděpodobně plastidového původu. 25% z nich však má signální sekvenci, která by zajišťovala transport do chloroplastů a je pravděpodobné, že v současné době jsou tyto proteiny aktivní v cytoplasmě. Přenos genů stále pokračuje. Celkem bylo nalezeno 17 insercí plastidové DNA v jádře o celkové délce 11 kb, které obsahovaly celé geny pro proteiny i tRNA, fragmenty genů, introny i mezigenové úseky. Následující přeskupování úseků v chloroplastech je možno demonstrovat na genu *atpH*, který byl původně celý přenesen a v současné době je na dvou místech oddělených úsekem 2kb. V jádře je také 13 krátkých insercí mitochondriální DNA o celkové délce 7kb kromě velké inserce v úseku centromery chromosomu 2.

Tab. 2. Obecné rysy genů kódovaných třemi genomy *Arabidopsis thaliana*

	Jádro	Chloroplasty	Mitochondrie
Velikost genomu	125 Mb	154 kb	367 kb
Ekvivalentů genomu/buňku	2	560	26
Duplikace	60%	17%	10%
Počet genů kód. proteiny	25 498	79	58
Pořadí genů	variabilní, ale syntenní	konzervativní	variabilní
Hustota (kb/gen)	4.5	1.2	6.25
Průměrný kodující úsek	1900 b	900 b	800 b
Geny s introny	79%	18.4%	12%
Geny/pseudogeny	1/0.03	1/0	1/0.2-0.5
Transposony	14%	0	4%

Transposony

Transposony *Arabidopsis* zaujímají asi 10% genomu a asi 20% nekodující DNA. Existuje tam jednak řada typů, známých z jiných organismů, jako elementy podobné *copia*, *gypsy*, samotné *LTR*, *retrotransposony*, *LINEs* (long interspersed nuclear elements), *SINEs* (short interspersed nuclear elements), *hobo*, *Activator*, *Tam* elementy a podobné *hAT*, *CACA*, *MITEs* (miniature inverted-repeat transposable elements). Dále jsou to některé specifické elementy, charakteristické pro *A. thaliana*, označované *MULE*, *MURA*, *CACTA*. Úseky bohaté na transposony jsou chudé na geny a mají nižší frekvenci rekombinací na fyzikální jednotku DNA. Vyznačují se nízkou expresí genů.

Telomery, centromery a rDNA

Geny pro 18S, 5,8S a 28S rRNA jsou lokalizovány v krátkých ramenech chromosomů 2 a 4. Oba úseky, které nebyly podrobně sekvenovány, tvoří 3.5-4 Mb a obsahují asi 350-400 vysoce methylovaných kopií, řady stejně orientovaných základních genů, každý o délce přibližně 10 kb. Geny pro 5S rRNA jsou v tandemových seriích v centromerových oblastech chromosomů 3,4 a 5.

Telomerové sekvence *A. thaliana* se skládají z opakování CCCTAAA a mají délku 2-3 kb. I jinde v genomu, ale často v centromerové oblasti, jsou řady této (někdy neúplné) sekvence, které mohou mít délku až 24 kb. Tyto sekvence jsou možná pozůstatky přestaveb, ke kterým došlo v průběhu dávné fylogeneze.

Centromerické sekvence se skládají především z mnohonásobného opakování základní sekvence 180 bp. Centromerické úseky v širším smyslu slova obsahují retroelementy, transposony, mikrosatelity a středně repetitivní sekvence. Tato opakování se vzácně vyskytují i v euchromatinové DNA. Protože tato opakování mají odlišnou afinitu k některým barvivům, sníženou frekvenci *crossing overu*, vysoký stupeň methylace a velmi nízkou expresi genů, jsou typickými heterochromatinovými úseky. Původně se předpokládalo, že jsou zcela bez genů, ale bylo tam nalezeno 47 genů, k jejichž, alespoň nízké, expresi dochází. V některých případech jsou tyto geny na ostrůvcích unikátních sekvencí, které jsou obklopeny repetitivní DNA., jako opakování 180 bp nebo geny tRNA. Centromerické úseky jednotlivých chromosomů mají jen nízký stupeň homologie (1-7%): bylo zjištěno 41 rodin krátkých konzervativních centromerických sekvencí (AtCCS). Kromě těchto sekvencí je většina centromerických sekvencí různých chromosomů odlišná.

Závěr

Ukončení analýzy genomu *A. thaliana* bylo dosaženo 4 roky před plánovaným termínem, který byl v r. 2004. Na projekt genomu *Arabidopsis thaliana*, který publikováním sekvence celého genomu skončil, bude navazovat projekt funkční genomiky tohoto objektu, který je plánován do roku 2010. Funkční genomika předpokládá mapování funkcí všech genů genomu a jejich hlavních interakcí.

Tab. 3. Velikost genomů některých rostlinných druhů

České jméno	Latinské jméno	Velikost genomu v bp
Brukvovité		
Huseníček	<i>Arabidopsis</i>	1.0×10^8
Řepka olejná	<i>Brassica napus</i>	1.2×10^9
Obiloviny		
Rýže	<i>Oryza sativa</i>	4.2×10^8
Ječmen	<i>Hordeum vulgare</i>	4.8×10^9
Pšenice	<i>Triticum aestivum</i>	1.6×10^{10}
Luštěniny		
Hrách	<i>Pisum sativum</i>	4.1×10^9
soja	<i>Glycine max</i>	1.1×10^9
Člověk	<i>Homo sapiens</i>	3.2×10^9

Hlavní internetové adresy:

Arabidopsis genome initiative:
www.arabidopsis.org/agl.html,

Arabidopsis 2010 project:
nasc.nott.ac.uk/garnet/2010.html

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. Daniel Vlček, DrSc.,
místopředseda**

Katedra genetiky PrF UKo
Mlynská dolina B I
842 15 Bratislava
vlcek@fns.uniba.sk

**Doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc.,
místopředseda**

Katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK
Viničná 5
128 44 Praha 2
pikalek@natur.cuni.cz

**Prof. RNDr. Jiřina Relichová, CSc.,
tajemnice**

Katedra genetiky a molekulární biologie
PřF MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
reli@sci.muni.cz

**Prof. Ing. Josef Dvořák, CSc.,
hospodář**

Ústav genetiky MZLU v Brně
Zemědělská I
613 00 Brno
dvorakJ@mendelu.cz

**Doc. RNDr. Jiří Doškař, CSc.,
redaktor II**

Katedra genetiky a molekulární biologie
PřF MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
doskar@sci.muni.cz

RNDr. Jiří Fajkus, CSc.

Biofyzikální ústav AVČR
Královopolská 135
612 65 Brno
fajkus@ibp.cz

RNDr. Andrej Kormuťák, DrSc.

Ústav genetiky a biotechnologií rostlín SAV
Akademická 2
950 07 Nitra
kormutak@savba.savba.sk

**Prof. RNDr. Eva Miadoková, DrSc.,
hospodářka**

katedra genetiky PrF UK
Mlynská dolina B I
842 15 Bratislava
Miadokova@fns.uniba.sk

Doc. RNDr. Miloš Ondřej, DrSc.,

Ústav molekulární biologie rostlin AVČR
Braníšovská 31
370 05 České Budějovice
ondrej@umbr.cas.cz

**Mgr. Miroslava Slaninová, Ph.D.,
hospodářka**

katedra genetiky PrF UK
Mlynská dolina B I
842 15 Bratislava
slaninova@fns.uniba.sk

Ing. Petr Ráb, DrSc.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR
277 21 Liběchov
rab@iapg.cas.cz

Doc. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

Katedra genetiky a molekulární biologie
PřF MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
smarda@sci.muni.cz

RNDr. Marie Vojtišková, CSc.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135
612 65 Brno
mavo@ibp.cz