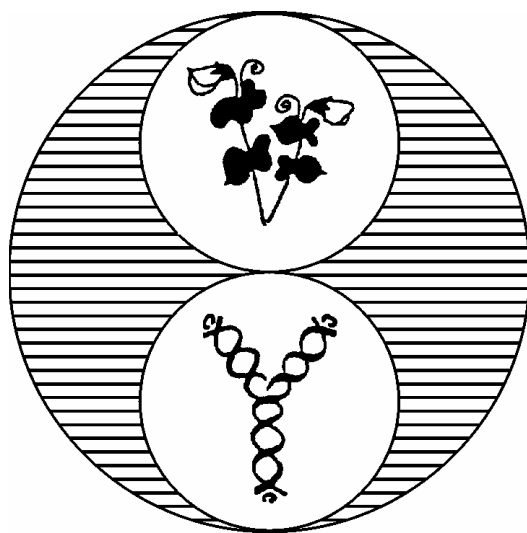


**GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA**

# **INFORMAČNÍ LISTY**



**Číslo 2:**

**—pqt '4227**

# Genetica

**Sponzor Ceny Genetické společnosti Gregora Mendela**

\*\*\*

---

Informační listy

číslo 2: , čísl '4227

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

# **Genetická konference**

## ***Virus a buňka***

**pořádaná Genetickou společností Gregora Mendela**

**ve spolupráci s**

**Katedrou genetiky a mikrobiologie  
Přírodovědecké fakulty UK v Praze**

**ve dnech 1. – 2. února 2005 v Praze**

---

***Místo konání:* Přírodovědecká fakulta UK v Praze,  
Praha 2, Viničná 7**

***Organizační výbor:* Stanislav Zadražil, předseda  
Jitka Forstová  
Petr Pikálek**

**PROGRAM**  
genetické konference

**VIRUS A BUŇKA (genetika a virologie)**

pořádané  
**1. a 2. února 2005 v Praze 2, Viničná 7**

Genetickou společností Gregora Mendela  
ve spolupráci  
s **Katedrou genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze**

---

**1.2.2005 (úterý)**

- 8.30-10.00 hod. Registrace účastníků  
10.00-10.30 Zahájení konference a úvodní slovo (předseda GSGM)  
10.30-11.20 RNDr. Roman **Pantůček**, Ph.D. (PřF MU, Brno): **Genomika bakteriofágů**  
11.20-12.10 RNDr. Jaroslav **Matoušek**, CSc. (ÚMBr AV ČR, České Budějovice): **Viroidy – vliv podmínek teplotního stresu na „životaschopnost“ a mikroevoluci viroidních genomů**

*Přestávka na oběd*

- 14.00-14.50 RNDr. Karel **Petrzik**, CSc. (ÚMBr AV ČR, České Budějovice): **Rostlinné viry jako vektory**  
14.50-15.40 Prof. Ing. Tomáš **Ruml**, CSc. (FPBT VŠCHT, Praha): **Retroviry – tvorba nezralých částic *in vitro***  
16.00 hod. Valné shromáždění členů Genetické společnosti Gregora Mendela

**2.2.2005 (středa)**

- 8.00- 9.30 Plakátová sdělení  
9.30-10.30 Vyhlášení výsledků soutěže o cenu GSGM a přednáška oceněných autorů

*Přestávka*

- 10.50-11.40 MVDr. Josef **Geryk**, CSc. (ÚMG AV ČR, Praha): **Identifikace nového retrovirového receptoru**  
11.40-12.30 Doc. RNDr. Jan **Konvalinka**, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha): **Vývoj rezistence u HIV pozitivních pacientů**

*Přestávka na oběd*

- 13.30-14.30 Plakátová sdělení  
14.30-15.20 Doc. RNDr. Jitka **Forstová**, CSc. (PřF UK, Praha): **Polyomaviry – molekulární a buněčné funkce, interakce a využití**  
15.20-16.10 RNDr. Šárka **Němečková**, DrSc. (ÚHKF, Praha): **Poxvirové inhibitory imunitní odpovědi a vývoj vakcín**  
16.10 hod. Závěr konference

## **Abstrakta vybraných přednášek a přihlášených plakátových sdělení**

(příspěvky jsou zveřejněny ve formě, v jaké byly dodány jejich autory, tzn. bez jejich případné jazykové úpravy; abstrakta některých zvaných přednášek neměli organizátoři předem k dispozici, znění všech zvaných přednášek bude proto publikováno později v dalším čísle Informačních Listů GSGM nebo v Biologických Listech)

M. Adam, M. Pídra

Ústav genetiky a šlechtění rostlin – Mendeleum, Zahradnická fakulta MZLU, Valtická 334,  
691 44 Lednice

ZJIŠŤOVÁNÍ PŘÍTOMNOSTI VIRŮ POMOCÍ IMUNOENZYMATICKÝCH A BIOLOGICKÝCH TESTŮ NA  
PRACOVIŠTI MENDELEUM - TECHNICKÝ IZOLÁT

Od roku 2002 probíhá na pracovišti Mendeleum testování na přítomnost základního souboru virů doporučených metodikou EPPO (European Plant Protection Organization) (ANONYMOUS 1997). V části teplomilné peckoviny bylo od roku 2001 do roku 2004 provedeno testování 6445 rostlinných vzorků na přítomnost virů ACLSV (Apple chlorotic leafspot virus) ApMV (Apple mosaic virus) PDV (Prune dwarf virus) PNRSV (Prunus necrotic ringspot virus) a PPV (Plum pox virus) pomocí metody DAS-ELISA (Clark, MF, Adams, AM. 1977), 990 vzorků bylo otestováno pomocí bylinných indikátorů (*Chenopodium foetidum*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima*, *Phaseolus vulgaris*, *Heliantum annuum*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana acuminata*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*) (Kegler, H. Verderevskaja, T. Bivol, T. 1977) a 603 vzorků pomocí dřevinných indikátorů (*Prunus persica* „GF 305“; *Prunus serulata* „Shirofugen“)(Jelkmann, W. 2001).

Za tři roky testování bylo zjištěno 41 rostlin podezřelých či pozitivních na přítomnost sledovaných virů, z toho ACLSV 2 rostliny; ApMV 19 rostlin; PDV 18 rostlin; PNRSV 4 rostliny; PPV 4 rostliny.

Poděkování: Práce byla podpořena projektem NAZV QC 1359;

#### Literatura:

Clark, MF, Adams AM, 1977: Characteristic of the method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34, 475-483

Anonymous, 1997. Certification schemes virus-free or virus-tested fruit trees and rootstock, EPPO/OEPP (00/7845 (99/7214) PCF Bod 4.2), 1997, p 29

Jelkmann, W. International Working Group on Fruit Tree Viruses. Detection of Virus and Virus Like Diseases of Fruit Trees. Proc. 18th. Int. Symp. On Fruit Tree Virus Diseases. Acta Hort. 550, ISHS 2001 ISBN – 90 6605 814 5 p 473-493

Kegler, H. Verderevskaja, T. Bivol, T.. Untersuchungen zur Schnell diagnose von Obstvirose. I. Biologische Testung durch Mechanische Virusübertragung. Arch. Gartenbau, 1977, Berlin 25 (4) p 171-178

V. Boháčová, H. Španielová, V. Ludvíková a J. Forstová

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Viničná 5, Praha 2

VYUŽITÍ POLYOMAVIROVÝCH STRUKTUR K VÝVOJI VAKCÍN PRO PODPŮRNOU LÉČBU CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE

Chronická myeloidní leukémie (CML) je myeloproliferativní onemocnění, které vzniká maligní transformací hemopoetické kmenové buňky. CML představuje 15-20% všech leukémií. Jedním z rysů CML je přítomnost fúzního genu bcr-abl, který vzniká reciprokou translokací mezi dlouhými rameny chromozómů 9 a 22. Fúzní část bcr je odpovědná za deregulaci kinázové aktivity abl. Tímto se stává buňka obsahující fúzní genový produkt maligní. Jednou z nejčastějších léčebných terapií je léčba syntetickou sloučeninou známou pod názvem Gleevec (STI 571). Tato látka má schopnost v mikromolárních koncentracích selektivně inhibovat tyrosin kinázovou aktivitu abl tím, že kompetuje o vazebné místo s ATP v katalytickém centru kinázy. Inhibice bcr-abl kinázové aktivity pomocí STI 571 vede k utlumení transkripce genů, jejichž genové produkty jsou zahrnuty v kontrole buněčného cyklu, buněčné adhezi a organizaci cytoskeletu, což vede buňky produkující bcr-abl k apoptotické smrti. Tento lék se zdál velmi slibný, nicméně řada pacientů k němu během léčby získává rezistenci.

Při konstrukci vakcín na bázi myšího polyomaviru využíváme vlastnosti hlavního kapsidového proteinu VP1 uspořádat se do struktur prázdných kapsid (VLPs, virus like particles). Výhodou virových kapsid je jejich vysoká imunogenicita stimulující imunitní systém. Indukci nespecifických imunitních odpovědí organismu na přítomnost virových kapsid je možno kombinovat se specifickou odpovědí na požadované epitopy tak, že se jejich sekvence stanou součástí kapsidových struktur. Vkládání epitopů kapsidových struktur je omezeno požadavkem, aby nová struktura vytvořila VLP. Pro vývoj vakcín proti BCR-ABL jsme navrhli tři řešení: 1) Vložit epitop vzniklý fúzí obou genů do HI smyčky proteinu VP1. 2) Připojit epitop k minoritnímu proteinu VP3. Tento protein interaguje svou C-koncovou částí s centrální prohlubní kapsomer, tvořených pěticí VP1 proteinu a jeho N konec je situován směrem dovnitř kapsidy. Epitop může být připojen na N konec části proteinu VP3, odpovědné za interakci VP3 s VP1 kapsomery. Pro přípravu rekombinantních kapsid obou typů jsme použili bakulovirový expresní systém. 3) Vytvořit též fúzní protein složený z GST (glutathion S-transferasa) a PyV proteinu VP1, za jehož konec byl připojen BCR-ABL epitop (GST-VP1-CML). Pokud by se ukázala vzniklá konstrukce dostatečně imunogenní, odpadla by omezení dána požadavky na potřebu samouspořádání se do kapsidových struktur. V současné době probíhá charakterisace a testování získaných struktur.

Daniel Elleder<sup>1</sup>, Deborah C. Melder<sup>2</sup>, Josef Geryk<sup>1</sup>, Kateřina Trejbalová<sup>1</sup>, Jiří Plachý, Jiří Hejnar, Jan Svoboda<sup>1</sup>, Mark J. Federspiel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oddělení buněčné a virové genetiky Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

<sup>2</sup>Molecular Medicine Program, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA.

#### CHARAKTERIZACE BUNĚČNÝCH RECEPTORŮ U INBREDNÍCH KUŘECÍCH LINIÍ REZISTENTNÍCH K INFEKCI PTAČÍMI LEUKÓZOVÝMI VIRY PODSKUPINY A A IDENTIFIKACE RECEPTORU PRO VIRY PODSKUPINY C.

Ptačí sarkomové a leukosní viry (ASLV) podskupiny A – E představují vysoce homogenní skupinu Alfaretrovirů. Mají pravděpodobně jednoho společného předchůdce. Diversifikace na jednotlivé podskupiny bude výrazem adaptace na resistantní hostitele, kdy využívání různých buněčných povrchových proteinů jako receptorů jim zajišťuje úspěšný vstup do buňky. Tři genetické lokusy determinují vnímavost kuřecích buněk k ASLV: *tva* (podskupina A), *tvb* (podskupina B, D, a E) a *tvc* (podskupina C). *tva* kóduje dvě formy Tva receptoru, které jsou výsledkem alternativního sestřihu mRNA. Normální buněčná funkce Tva receptoru je neznámá. Extracelulární doména Tva obsahuje oblast 40 aminokyselin bohatých na cystein, která je homologní k oblasti receptoru (LDLR) vázajícího nízkodenzitní lipoprotein (LDL). U savců byl identifikován 8D6 antigen jako ortolog Tva. Je to signální molekula exprimovaná folikulárními dendritickými buňkami, která stimuluje vývoj zárodečných center B buněk. Pomocí RT-PCR byly klonovány cDNA obou sestřižených verzí mRNA<sup>tva</sup> u linie H6 (citlivá k infekci viry podskupiny A) a u linií Rh-C a 7<sub>2</sub> (obě rezistentní k infekci). U linie Rh-C byla nalezena jednonukleotidová substituce, která mění ve vazebné doméně čtvrtý konzervovaný cystein na tryptofan. Tato mutace drasticky snižuje vazebnou affinitu Tva receptoru pro ASLV(A) obalový glykoprotein. Linie 7<sub>2</sub> obsahuje inserci čtyř nukleotidů v 1. exonu *tva*, jejímž výsledkem je změněný čtecí rámec a absence funkční Tva receptorové molekuly.

Genetickým mapováním s využitím zpětně křížené populace kuřat dvou linií (H6 -citlivá a L15 - resitentní k infekci k infekci ASLV-C) bylo určeno, že *tvc* se nachází na mikrochromozomu 28 v těsné blízkosti *tva*. Přítomnost *tvc* genu v BAC kloněch pokrývajících kandidátní oblast (BACPAC Resources, Oakland, Calif.) byla ověřena v transfekčních experimentech provedených na kuřecích fibroblastech L15 nebo savčích buňkách NIL2. Tvc receptorová molekula vykazuje vysoký stupeň homologie se savčími butyrofiliny a obsahuje stejné domény, IgV, IgC, TM a B30.2. Tvc je nejvíce exprimován v thymu, slezině a burse. U linie L15, rezistentní k infekci viry podskupiny C, došlo následkem bodové mutace ve třetím exonu, ke vzniku terminačního kodonu, který brání syntéze funkční receptorové molekuly.



L. Eyer<sup>1</sup>, R. Pantůček<sup>1</sup>, V. Růžičková<sup>1</sup>, P. Kašpárek<sup>1</sup>, H. Konečná<sup>2</sup>, Z. Zdráhal<sup>3</sup>, J. Preisler<sup>3</sup>, J. Doškař<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra genetiky a molekulární biologie, <sup>2</sup>Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, <sup>3</sup>Laboratoř hmotnostní spektrometrie Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno

#### ANALÝZA GENOMU A PROTEOMU POLYVALENTNÍHO STAFYLOKOKOVÉHO BAKTERIOFÁGA 812.

Bakteriofág 812, zástupce čeledi *Myoviridae*, je virulentní polyvalentní fág s širokým rozmezím hostitelů, zahrnujícím kmeny a druhy rodu *Staphylococcus*. Tyto vlastnosti jej činí vhodným kandidátem pro fágovou terapii stafylokokových infekcí.

Tato práce byla zaměřena na srovnání genomu a proteomu standardního typu fága 812, jeho mutant v rozmezí hostitele a příbuzných fágů U16, SK311, 131 a Twort s cílem objasnit molekulární základ jejich rozdílného rozmezí hostitele.

Genomy uvedených fágů tvořené lineární dvouřetězcovou DNA o velikosti 145 kb byly srovnávány pomocí restrikční analýzy. Úseky vykazující u jednotlivých fágů rozdíly byly pak charakterizovány detailně. Pro účely proteomických studií byla použita 1-D SDS-PAGE. Nalezené proteiny byly identifikovány metodou peptidového mapování s využitím MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Srovnáním fágových genomů byly zjištěny vedle nukleotidových substitucí též rozsáhlejší přestavby sekvencí DNA. Inzerce a delece o velikosti ~1 až 3 kb byly nalezeny převážně v nekódujících terminálních sekvencích DNA fágů s odlišným rozmezím hostitele. Nalezené změny v genomové DNA byly korelovány s proteinovým složením fágů.

Použitím 1-D SDS-PAGE bylo nalezeno více než 20 strukturních proteinů o velikosti cca 15 – 120 kDa. Metodou peptidového mapování bylo identifikováno 7 proteinů. Dva z nich byly určeny jako hlavní kapsidový protein (51,2 kDa) a protein bičíkové pochvy (64,4 kDa), funkce ostatních identifikovaných proteinů není dosud známa. Všechny tyto proteiny vykazují vysokou sekvenční shodu s odpovídajícími proteiny polyvalentních stafylokokových fágů Twort a K a také s fágy A511 *Listeria monocytogenes* a LP65 *Lactobacillus plantarum*. Pomocí SDS-PAGE byly prokázány rozdíly v molekulové hmotnosti proteinů bičíkové pochvy fágů 812, SK311 a U16. Dosažené výsledky ukazují, že za rozdílné rozmezí hostitelů polyvalentních bakteriofágů by mohly být odpovědné strukturní změny proteinů jejich bičíkové pochvy.

Práce byla podporována grantem č. 203/03/0515, GA ČR.

Šárka Haubová, Pavel Ulbrich, Michaela Rumlová a Tomáš Ruml

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

#### STUDIUM TVORBY RETROVIROVÝCH KAPSID *IN VITRO*

Naše práce je zaměřena na studium vlivu nukleových kyselin na tvorbu nezralých kapsid Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV) v *in vitro* systému. Mechanismus tvorby nezralých retrovirových částic není dosud zcela znám. Tyto částice jsou tvořeny v hostitelské buňce z retrovirového polyproteinového prekursoru Gag, který je po uvolnění virionu z buňky štěpen na jednotlivé strukturní proteiny, a to na matrixový protein (MA), kapsidový protein (CA) a nukleokapsidový protein (NC). Během tvorby kapsid jsou do vznikající částice vbaleny dvě molekuly genomové RNA.

Zaměřili jsme se na minimalizovanou doménu Gag, a to na fúzní kapsidový a nukleokapsidový protein, který obsahuje domény zodpovědné za interakce při skládání kapsidy. Sledovali jsme vlastnosti jak proteinu CANC, tak i proteinu CANC bez N-terminálního prolinu, jelikož bylo již dříve zjištěno, že N-koncový prolin má zásadní vliv na tvar vznikajících částic. Tyto proteiny byly purifikovány běžnými chromatografickými technikami. Čistota proteinů od reziduální RNA a DNA byla ověřena spektrofotometricky (OD 260/280) a pomocí RiboGreen<sup>®</sup> Quantitation kitu. Retrovirové kapsidy z proteinu a příslušné RNA nebo s DNA oligonukleotidem (GT8, GT16, GT22, GTAC22) byly tvořeny během dialýzy do pufru 100 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 1 μM ZnCl<sub>2</sub>, pH 8. Vytvořené částice byly analyzovány rovnovážnou ultracentrifugací v sacharosovém gradientu a bylo stanoveno množství proteinů a nukleových kyselin v jednotlivých frakcích gradientu. Velikost a tvar vzniklých kapsid byly studovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Z kvantifikací bylo zjištěno, že počet inkorporovaných oligonukleotidů je mnohem nižší než se předpokládalo podle dříve navrženého modelu tvorby retrovirových kapsid, kde jeden oligonukleotid o minimální délce 16-ti nukleotidů váže dvě molekuly proteinu a z těchto dimerů je dále vytvořena celá částice. Proto se domníváme, že tento model pro tvorbu M-PMV kapsid neplatí. Vazba oligonukleotidu na protein by mohla sloužit jako iniciační bod celého procesu, patrně změnou konformace navázaného proteinu a tím zvýšením afinity k dalším molekulám proteinů. Možnosti mechanismu tvorby nezralých retrovirových částic budou diskutovány.

V. Holleinová

Ústav genetiky a šlechtění rostlin – Mendeleum, Zahradnická fakulta MZLU, Valtická 334,  
691 44 Lednice

#### CERTIFIKACE ZDRAVOTNÍHO STAVU RÉVY V ČR - DIAGNOSTIKA VIROVÝCH ONEMOCNĚNÍ METODOU ELISA

Proces certifikace zdravotního stavu révy (*Vitis*) v České republice byl zahájen v roce 2002, kdy bylo v nově zbudovaném technickém izolátu na Zahradnické fakultě MZLU v Lednici shromážděno přes 120 odrůd a klonů révy pocházejících od udržovatelů odrůd (1). Cílem je nalézt pomocí testování na rostlinných indikátorech, metodou ELISA a RT – PCR zdravé rostliny, prosté nejvýznamnějších virových onemocnění révy, které budou sloužit jako výchozí materiál pro další množitelské stupně. V souladu s metodikou EPPO (European Plant Protect Organization) (2) byly rostliny testovány na pět až osm virů. Vzorky byly odebírány v době dormance z floemu a retesty negativních rostlin probíhaly za vegetace z listů.

Na základě negativních testů ELISA bylo během dvou let vybráno 33 perspektivních keřů šestnácti odrůd, které budou dále retestovány.

V roce 2004 bylo metodou ELISA otestováno 700 rostlin na 1 – 7 virů, což představuje asi 3 600 testů. Metodika testování byla dodržována dle návodu dodavatele komerčních diagnostik firmy Bioreba (3). Z podnožových rév bylo zahrnuto do testování 128 keřů osmi odrůd. Kober 5 BB, Kober 125 AA, Craciunel 2 (CR 2), Teleki 5 C (T 5C), Teleki 8 B (T 8B), SO - 4, LE - K – 1, Ferkal. Vzorky byly odebrány z pěti lokalit nacházejících se ve třech vinařských oblastech jižní Moravy. Byly testovány na 2 – 6 virů ( Grapevine fanleaf virus (GFLV), Arabis mosaic virus (ArMV), Grapevine virus A (GVA), Grapevine fleck virus (GFkV), Grapevine leafroll – associated virus 1 (GLRaV – 1) a Grapevine leafroll – associated virus 3 (GLRaV – 3). Bylo procenticky vyhodnoceno napadení každé odrůdy jednotlivými viry a zjištěno průměrné napadení daného souboru rostlin jednotlivými viry.

Průměrně byl nejčastěji diagnostikován v daném souboru podnožových rév GLRaV – 3 (83 % pozitivních a podezřelých rostlin). Dále ArMV (77 %), GLRaV – 1 (68 %), GFLV (63 %), GVA (56 %) a GFkV (45 %). Nebyla nalezena ani jedna rostlina s negativními výsledky testů na všech šest uvedených virů.

#### Literatura:

1. Sedlo J., Ševčík J., 2001. Přehled odrůd révy 2001
2. EPPO Standards, 1997. Certification schemes, Pathogen – tested material of grapevine varieties and rootstocks: s.13
3. Bioreba Catalogue 2000/01, 2001. General ELISA test Procedure, s. 8

Horníková L., Forstová J.

Katedra genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Viničná 5,  
Praha 2

#### VLIV pH NA ČASNOU FÁZI POLYOMAVIROVÉ INFEKCE

Myší polyomavirus (PyV) je neobalený DNA virus. O životním cyklu tohoto viru je již mnoho známo, ale události související se vstupem viru do buňky, jeho putování k jádru a způsob i místo rozvolnění virionů zůstává stále neznámo. PyV vstupuje do buňky doposud nepopsanou endocytickou drahou. Při vstupu do buňky nevyužívá, na rozdíl od lidského polyomaviru JC, dráhu klatrínem zprostředkované endocytózy, a jeho pohyb buňkami je rovněž odlišný od příbuzného viru SV40, který do buněk vstupuje prostřednictvím kaveol. Naše laboratoř se snaží o popsání neznámé dráhy využívané PyV. Jedna z otázek, která nás v souvislosti s tímto tématem zajímá je, zda změna pH endosomů má vliv na časnou fázi PyV infekce.

Použili jsme dvě látky – chlorid amonný a bafilomycin A1. Obě tyto látky posouvají hodnoty pH endosomů do alkalických hodnot. Chlorid amonný je schopen penetrovat endosomy, zatímco bafilomycin A1 je specifický inhibitor vakuolární vodíkové ATPázy. Ke studiu jsme použili dvě linie buněk – 3T6 a NMuMG. Prokázalo se (v rozporu s prací GILBERTOVÉ a BENJAMINA 2000) , že vstup PyV stejně jako JC viru je senzitivní ke zvyšujícímu se pH na rozdíl od viru SV40, jehož vstup senzitivní ke zvyšujícímu se pH není. To, že je ovlivněn změnami pH v endosomech vstup, případně pohyb PyV k jádru podporuje skutečnost, že k inhibici vstupu nedojde, pokud je inhibitor přidán v okamžiku, kdy virus do buňky již prokazatelně vstoupil a dostal se do perinukleárního prostoru (2 hod po infekci).

GILBERT, J.M., BENJAMIN, T.L. (2000): Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol* 74(18): 8582 - 8588

Evžen Bouřa, Vlastimil Jirásko a Jitka Forstová  
Katedra genetiky a mikrobiologie, PřF, UK Praha

#### STUDIUM MINORITNÍCH PROTEINŮ MYŠÍHO POLYOMAVIRU

Myší polyomavirus z čeledi Polyomaviridae je malý DNA virus s neobalenou ikosaedrální kapsidou. Ta je tvořena třemi proteiny VP1, VP2 a VP3.

VP1 je hlavní strukturní protein tvořící kapsidu o průměru 55 nm s triangulačním číslem  $T=7$ . 360 kopií proteinu VP1 tvoří 72 pentamerů, 12 pentavalentních a 60 hexavalentních, se schopností samouspořádání do virům podobných částic (virus-like particles). VP2 (34kDa) a VP3 (23 kDa) jsou minoritní proteiny, jejichž sekvence se zcela překrývají a proto C'koncová oblast VP2 obsahuje celou sekvenci proteinu VP3. Tyto proteiny se pomocí své společné C'koncové oblasti váží pomocí hydrofóbních interakcí na vnitřní stranu pentamer VP1 a tak se zabudovávají do virových kapsid. V této oblasti se také nachází jejich jaderný lokalizační signál. N'koncová část směřuje do vnitřku kapsidy. VP2 je na svém unikátním N'konci myristylován.

Prázdné, samovolně složené VP1 částice mají schopnost enkapsidovat volnou DNA a transportovat ji do buňky. Tato vlastnost činí z polyomaviru potencionální vektor pro genovou terapii. Transport DNA je účinný z hlediska úspěšné exprese vneseného genu, nikoli již kvantitou přenosu. Tyto částice vstupují do buňky patrně rozdílnou cestou než vlastní virus (s virem nekompetují o vazebné místo) a směřují převážně k degradaci.

Faktorem ovlivňující osud viru v buňce mohou být právě minoritní proteiny. O jejich funkci se mnoho neví. Jedna z hypotéz možné funkce, je jejich role při rozvolnění virionu a jeho uvolnění z endozomu s následným transportem do buněčného jádra. Proto je pochopení významu minoritních proteinů v životním cyklu viru nezbytným krokem pro konstrukci úspěšného terapeutického vektoru s klinickým využitím.

Pro studium interakcí minoritních proteinů VP2 a VP3 byla konstruována řada rekombinantních plasmidů zajišťující jejich samostatnou produkci v savčích buňkách. Virové proteiny byly také produkovány ve formě fúzních proterinů s EGFP. Během transienční exprese genů pro VP2 nebo VP3 se projevila cytotoxicita genových produktů. U mnoha buněk produkujících VP2 nebo VP3 byly pozorovány výrazné změny v distribuci histonu H1 a často také fragmentace jader.

B. Křižan, E. Ondrušiková, V. Holleinová, K. Laboňová, M. Pidra

Ústav genetiky a šlechtění rostlin - Mendeleum, Zahradnická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Valtická 337, 691 44, Lednice

#### ELIMINACE VIRŮ ARMV A GFLV U ZÁSTUPCŮ RODU *VITIS* L. POMOCÍ TERMOTERAPIE

V práci byl sledován vliv termoterapie na eliminaci virů v podmínkách *in vitro*. Do pokusu byly zahrnuty rostliny révy Gamay (*Vitis vinifera* L.), St. George (*Vitis rupestris* Scheele) a LN 33 (Couderc 1613 x *Vitis berlandieri* Planch.). Odrůdy Gamay a LN 33 byly pozitivní na ArMV a rostliny odrůdy St. George byly pozitivní na GFLV při testování metodou ELISA. Analyzovány byly vzorky listů.

Z rostlin byly odebrány nodální segmenty, tyto byly sterilizovány a kultivovány na médiu MS (Murashige Skoog, 1962) s 0,7 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IAA. Vždy po měsíci byly rostliny přeneseny na čerstvé médium. Doba kultivace na médiu byla 12 měsíců. Následně byly rostliny velikosti 3 cm podrobeny terapii při fotoperiodě 12/12 (světlo/tma), při střídání teplot 37°C (světlo) a 35°C (tma). Relativní vzdušná vlhkost nebyla upravována. Byly hodnoceny dvě doby trvání termoterapie, a to 25 dní a 45 dní. Z rostlin byly po termoterapii odebrány vrcholové části o velikosti 2-3 mm a kultivovány na médiu v celistvé rostliny, které byly po zakořenění převedeny do nesterilních podmínek. Testování na přítomnost virů bylo provedeno po 4 měsících. Rostlin LN 33 bylo ozdraveno 32% (ArMV), Gamay 24% (ArMV) a St. George 84% (GFLV). Ve variantách 25 a 45 dní bylo dosaženo shodných výsledků.

Z výsledků je patrné, že doba expozice v termokomoře může být zkrácena až na 25 dní. Valero *et al.* (2003) uvádí shodné výsledky s odrůdou Napoleon. Dále z výsledků testování, které bylo provedeno ve třech termínech vyplývá, že na jednotlivé viry má termoterapie nestejný účinek. Virus GFLV je k vyšším teplotám vnímavější než ArMV. V případě viru GFLV došlo k ozdravení většího počtu jedinců ve srovnání s rostlinami s ArMV. Testování rostlin po termoterapii bylo provedeno metodou ELISA a je nutné považovat výsledky za orientační. Testování metodou RT – PCR bude provedeno na jaře roku 2005. Metoda termoterapie *in vitro* materiálu je jednou z možností jak ozdravit viry napadené rostliny révy a získat zdravý rozmnožovací materiál.

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 – 497.

VALERO M., IBANEZ A., MORTE A., 2003. Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Scientia Horticulturae*, 97: 289-296.

David Liebl, Francesco Difato, Jiří Janeček<sup>1</sup>, Lucie Kubínová<sup>1</sup> a Jitka Forstová  
Katedra genetiky a mikrobiologie, PřF UK Praha a <sup>1</sup>Fyziologický ústav AV ČR Praha

#### DYNAMIKA CYTOPLAZMATICKÉHO TRANSPORTU VIRIONŮ POLYOMAVIRU

Umělé pseudokapsidy myšího polyomaviru, tvořené majoritním kapsidovým proteinem VP1, byly připraveny jako modelový vektor pro účely genové terapie a imunoterapie a pochopení mechanismů časně fáze infekce polyomavirem je proto hlavním cílem studia pro účinné zavedení a využití tohoto vektoru v aplikovaném výzkumu.

Studie cytoplazmatického transportu myšího polyomaviru v časně fázi infekce byly doposud vedeny pouze metodami konfokální a elektronové mikroskopie na fixovaných buňkách a testováním efektu selektivních drog ovlivňujících strukturu a funkci cytoskeletu nebo membránového transportu na účinnost virové infekce. Bylo zjištěno, že intaktní mikrotubuly jsou nezbytné pro dopravu genomu do jádra a tím pro infektivitu viru (4, 5). Kolokalizace kapsidového proteinu VP1 s Caveolinem (proteinem esenciálním pro funkční caveolární endocytózu), EEA1 (markerem časných endosomů), GTPázou Rab11 (markerem recyklujících endosomů) a s proteinem GRP78 (rezidentním proteinem endoplasmatického retikula) v časně fázi infekce ukazuje na endocytickou dráhu, kterou by viriony mohly využívat k dopravě genomu do buněčného jádra (1, 2). Mechanismus transportu virionů i cytoplazmatický kompartment, ve kterém dochází k uvolnění virového nukleocore, je však dosud neznámý.

V prostředí cytoplazmy, kde vysoká koncentrace proteinů dosahuje cca 300 mg/ml, je difúze komplexů větších než 500 kDa prakticky neefektivní (3) což pro transport virionů, respektive membránových vezikulů, automaticky znamená nutnost využití cytoskeletu a aktivního transportu pomocí molekulárních motorů, jak již bylo prokázáno pro celou řadu virů (6, 7) i membránových organel (8, 9).

Za účelem studia transportu virionů a dynamiky cytoskeletu na živých buňkách byla připravena buněčná linie exprimující Tubulin fúzovaný s proteinem GFP a další linie exprimující GFP-fúzované proteiny, hrající roli v membránovém transportu polyomaviru (caveolin, dynamin, aktin, GPI). Viriony polyomaviru byly označeny fluorescenčním markerem Alexa-594 a internalizace virionů do buněk a jejich pohyb v cytoplazmě byl monitorován pomocí metody „time-lapse live imaging“ a FRET fluorescenční konfokální mikroskopií. Data byly zpracovány s využitím IMAGE-J software.

Jana Macková, Jana Stašíková, Luďa Kutinová, Jiří Mašín, Petr Hainz, Marcela Šimšová,  
Pavel Gabriel, Peter Šebo a Šárka Němečková

Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2

#### POUŽITÍ ADENYLÁT CYKLÁZY CyaA *BORDETELLE PERTUSSIS* A VIRU MVA V IMUNOTERAPII NÁDORŮ INDUKOVANÝCH LIDSKÝM PAPILOMAVIREM 16 U MYŠÍHO MODELU

Adenylát cykláza CyaA pocházející z bakterie *Bordetella pertussis* je schopna dopravit do cytosolu profesionálních buněk prezentujících antigen heterologní epitopy rozpoznávané T lymfocyty, které byly vloženy do invazivní domény CyaA a vyvolat proti nim CD4+ i CD8+ specifickou buněčnou imunitní odpověď.

Rekombinantní toxoid CyaA jsme testovali jako vakcínu proti nádorům asociovaným s lidským papillomavirem 16 v myším modelovém systému, za použití nádorových buněk TC-1 exprimujících antigeny E6 a E7 viru HPV16. Infekce vysokorizikovými typy papillomavirů, zejména HPV16 a HPV18, je hlavní příčinou vzniku karcinomu děložního čípku, který patří v celosvětovém měřítku k nejčastějším příčinám úmrtí žen v důsledku nádorového onemocnění. K vývoji imunoterapeutické vakcíny proti papillomavirům jsou využívány zejména virové antigeny E6 a E7.

Připravili jsme sadu rekombinantních proteinů CyaA, fúzovaných v různých pozicích s kompletním antigenem E7 viru HPV16 nebo pouze s jeho částí (AK 40-58), obsahující epitopy rozpoznávané T lymfocyty. Testovali jsme in vitro i in vivo imunogenní vlastnosti rekombinantního proteinu CyaA a rovněž účinky kombinovaného podání s heterologní vakcínou, virem MVA, exprimujícím antigen E7 fúzovaný s LAMP1 (lysosome-associated membrane protein), který zlepšuje prezentaci E7 imunitnímu systému.

Zjistili jsme, že rekombinantní protein CyaA/E7 je schopen indukovat CD8+ buněčnou imunitní odpověď a v preventivním i terapeutickém schématu imunizace působit proti TC-1 modelovým nádorům. CD8+ odpověď i terapeutické účinky CyaA/E7 jsou dále zlepšeny po "boostu" virem MVA.



#### ANOTACE SOUBORU PRACÍ:

Myší polyomavirus (*Polyomaviridae*) je již po mnoho let významným modelovým virem pro studium dějů v eukaryotické buňce (včetně tumorogeneze). Detailní poznání interakcí tohoto viru s hostitelskou buňkou se v poslední době stalo důležité také z hlediska možnosti využití prázdných polyomavirových kapsid pro účely genové terapie. V průběhu svého postgraduálního studia na Katedře genetiky a mikrobiologie PŘF UK v Praze jsem pracovala ve virologické skupině Doc. Jitky Forstové, která se zabývá studiem životního cyklu polyomaviru. Podstatná část mé práce byla publikována v následujících publikacích.

#### I. Mannová, P. a Forstová, J. (Virologia 2003)

Jednotliví zástupci čeledi *Polyomaviridae* pravděpodobně využívají odlišné typy váčků a endocytických drah pro infekci buňky. Lidský polyomavirus JC vstupuje do buňky ve váčcích obalených klatrinem. Oproti tomu, virus SV40 využívá váčků obsahujících caveolin a je v těchto vesikulech transportován do nově popsané organely, tzv. caveozomu, odkud putuje do endoplazmatického retikula. Tato dráha je senzitivní k brefeldinu A, což napovídá, že se na transportu podílejí váčky obalené komplexem proteinu COPI, jehož sestavení je blokováno brefeldinem (Pelkmans et al., 2001, Norkin et al., 2002). Caveoly jsou důležité také pro vstup polyomaviru (Richterová et al., 2001). Předkládaná práce charakterizuje časnou fázi polyomavirové infekce a identifikuje buněčné struktury, které polyomavirus využívá pro infekci buňky. Zjistili jsme, že, na rozdíl od SV40, polyomavirová infekce není zastavena brefeldinem A a polyomavirus nekolokalizuje s COPI váčky. Z kolokalizačních experimentů také vyplynulo, že subpopulace polyomavirů vstupuje do časných a recyklujících endosomů. Obdobný rozsah kolokalizace byl pozorován také s proteinem BiP, který se nachází v endoplazmatickém retikulu a je součástí komplexu proteinů, podílejících se na transportu abnormálních proteinů z ER. Transport polyomaviru z ER do jádra, kde se virus replikuje, není doposud zcela objasněn. Pomocí značení polyomavirové DNA metodou hybridizace *in situ* jsme ukázali, že, nezávisle na multiplicitě infekce, pouze velmi malá frakce virionů je skutečně infekčních a dopraví virový genom do jádra. Je proto možné, že subpopulace polyomaviru využívá recyklujících endosomů, které jsou třídící organelou, pro svou dopravu do ER odkud mohou být viriony translokovány do cytosolu a jádra. Tato translokace může být spojena s degradací většiny vstupujících virionů.

#### II. Mannová, P. et al. (J. Gen. Virologia 2002)

Polyomavirové kapsidy jsou tvořeny hlavním kapsidovým proteinem VP1 a minoritními kapsidovými proteiny VP2 a VP3. VP2 je posttranslačně modifikován kyselinou myristovou. Minoritní proteiny nejsou nezbytné pro sestavení virionu, VP1 je schopen samouspořádání do kapsidových struktur bez přítomnosti dalších proteinů. Tato práce se zabývá charakterizací úlohy minoritních proteinů a myristylace VP2. Pro studium jsme připravili myr<sup>-</sup>, VP2<sup>-</sup> a VP3<sup>-</sup> mutanty viru. Zjistili jsme, že průběh časné fáze infekce myr<sup>-</sup> mutanty je srovnatelný s divokým typem. Rozdíly se projevují v průběhu dlouhodobé infekce, což ukazuje na defekt v pozdní fázi infekce a při reinfekci. Frakcionace buněk *in situ* ukázala rozdílnou vazbu mutantních partikulí na buněčné struktury v pozdní fázi infekce. Předpokládáme, že myristylace VP2 má ulohu v navození správné konformace virionu, která je důležitá pro interakci virionu a struktur hostitelské buňky v pozdní fázi infekce. Na rozdíl od myr<sup>-</sup> mutantů, viry s chybějícím VP2 nebo VP3 jsou výrazně méně infekční již v prvním cyklu infekce. Přítomnost minoritních proteinů jako takových v kapsidě viru je proto nezbytná pro vstup viru do buňky a/nebo časnou fázi infekce.

K. Mocová, V. Lučanský, L. Kutinová, D. Lesná, P. Hainz, M. Šmahel, V. Vonka,  
Š. Němečková (ÚHK Praha)

VYUŽITÍ REKOMBINANTNÍHO VIRU VAKCÍNIE A DNA VAKCÍNY V PREVENTIVNÍ IMUNIZACI  
PROTI BCR-ABL, ONKOGENU CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE.

Předmětem našeho zájmu je navození pozitivní imunitní odpovědi proti rakovinným buňkám exprimující onkogen Bcr-Abl. Onkogen vzniká v důsledku reciproké translokace t(9;22)(q34;q11) a charakterizuje pacienty s chronickou myeloidní leukémií. Námi používaný gen Bcr-Abl kóduje sekvenci antigenního epitopu z oblasti fúzního spojení Bcr-Abl onkogenu. Po degradaci onkogenu Bcr-Abl v proteazómech je sekvence oblasti fúze prezentována v komplexu MHC molekul I. i II. třídy na buněčném povrchu a vyvolává cytotoxickou T-buněčnou odpověď. Antigenní vlastnosti celého Bcr-Abl porovnáváme s antigenními vlastnostmi uměle vytvořených konstruktů genu fúzního spojení Bcr-Abl s antigeny HSP70, CP, L2 (Bcr-Abl-X). Vytváříme protinádorové rekombinantní vakcíny jednak na bázi DNA, kterou do buněk vnášíme metodou GENE GUN, a dále na bázi rekombinantního viru vakcínie, který vnáší gen do antigen prezentujících buněk cestou infekce, přičemž exprese Bcr-Abl je řízena různě časnými a rozdílně silnými, přirozenými (H5) i syntetickými (E/L) promotory. Pokusy provádíme na myším modelu v terapeutickém i preventivním uspořádání, s jednotlivými typy vakcín i jejich kombinacemi a s různou četností očkovacích dávek. Očkovací dávky virů podáváme intraperitoneálně a po subkutánním/intravenózním podání nádorových buněk exprimujících Bcr-Abl sledujeme růst nádorů/dynamiku přežívání. Dřívější pokusy se samotnou DNA vakcínou ukázaly, že imunizace plazmidy pBSC/bcr-abl<sub>25AA</sub>HSP70, pBSC/CPbcr-abl<sub>25AA</sub> a pBSC/L2CPbcr-abl<sub>25AA</sub> nevytvořila dostatečnou ochranu proti challenge buňkami B210. Použití těchto plazmidů v kombinaci s dendritickými buňkami však ukázalo, že tyto plazmidy jsou schopné se spolupodílet na modulaci imunologické odpovědi, neboť poskytly částečnou ochranu proti challenge buňkami 12B1. Pokus se samotným rekombinantním virem vakcínie oslabeného kmene P13 v terapeutickém uspořádání naznačuje pomalejší růst nádorů při vakcinaci virem s Bcr-Abl-X vloženým pod přirozeným silným časným promotorem H5. Dále se jako lepší ukázalo dvojí podání očkovací dávky. V prezentovaném pokusu nás zajímalo, zda se při kombinaci DNA vakcíny a virové vakcíny budou vakcíny v tvorbě imunitní odpovědi vzájemně podporovat a vyvolají významnější odpověď než v případech svého samostatného působení. V preventivním uspořádání pokusu kombinujeme dávku viru P13-H5-bcr/abl-HSP70 s dávkami jednotlivých typů plazmidů pBSC/bcr-abl<sub>25AA</sub>HSP70, pBSC/CPbcr-abl<sub>25AA</sub> a pBSC/L2CPbcr-abl<sub>25AA</sub>.

K. Moravcová, J. Kopecký, M. Baránek, M. Pidra

Ústav genetiky a šlechtění rostlin – Mendeleum, Zahradnická fakulta MZLU, Valtická 334,  
691 44 Lednice

#### VYUŽITÍ RT-PCR K DETEKCI ROSTLINNÝCH VIRŮ U TEPLOMILNÝCH PECKOVIN A RÉVY VINNÉ

V laboratoři molekulární genetiky na Mendeleu je testován rostlinný materiál pomocí metody RT-PCR na přítomnost virů teplomilných peckovin: *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV), *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) a révy vinné: *Grapevine virus A* (GVA), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine leafroll – associated virus* (GLRV) a *Grapevine fanleaf virus* (GFLV).

RNA je izolována metodou dle FOISSACA (2000), která je založena na vazbě nukleových kyselin na pevné fázi (oxid křemičitý) a to v zimním období z lýka, v letním období z listů, resp. listové žilnatiny. Pro reverzní transkripci je používán náhodný šestinukleotidový primer a reverzní transkriptáza M-MuLV. Získaná cDNA slouží jako matrice pro PCR, při které jsou využívány specifické primery pro jednotlivé viry. Teplotní profil PCR reakce je používán dle doporučení jednotlivých autorů primerů, případně mírně pozměněn v rámci optimalizace metodiky. Získané produkty jsou separovány na 1,5% agarózovém gelu, barveny ethidium bromidem a dokumentovány pomocí digitálního fotoaparátu. V případě pochybnosti o velikosti získaných produktů je provedena doplňující separace na polyakrylamidovém gelu. Pro odečtení velikosti získaných produktů je v obou případech používán velikostní standard pBR322 DNA/BsuRI Marker (51 – 587 pb). V současné době probíhá na Mendeleu optimalizace metodiky pro jednotlivé viry a to zejména co se týče nejvhodnějšího termínu odběru pletiva pro izolaci RNA.

#### Použitá literatura:

FOISSAC, X. SVANELLA-DUMAS, L., GENTIT, P. – Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers. 18th International symposium Virus and VVirus – like diseases of fruit trees, 9 – 15.7. 2000, Canterbury

#### PŘÍPRAVA BK-VP1 VIROVÝCH KAPSIDOVÝCH STRUKTUR A JEJICH CHARAKTARIZACE

Lidský BK virus (BKV) je členem čeledi Polyomaviridae, do které také patří lidský JC virus (JCV), opičí Simian virus (SV40), myší polyomavirus a další. BKV perzistuje u 85% populace na celém světě v buňkách ledvin. Velký vzrůst virové aktivity vedoucí k progresivní infekci se objevuje v kontextu se sníženou imunitou, např. u imunosuprimovaných pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledvin. Aktivní BKV infekce u ledvinového transplantátu, známá jako polyomavirová nefropatie, je spojena s progresivní nefunkčností transplantátu a poté jeho definitivní ztrátou. BKV je zkoumán především z medicínského hlediska, ale otázky mechanismu jednotlivých kroků virové infekce, zejména jeho vstup do buněk a pohyb buňkami jsou nejasné.

My jsme se zaměřili v první fázi studia buněčných interakcí BK viru na velmi časnou fázi virové infekce. Pro studium interakcí strukturních proteinů v průběhu vstupu virových částic do buněk a zkoumání endocytické dráhy virem zneužívané pro svůj pohyb směrem k buněčnému jádru jsme se rozhodli využít umělých virových částic produkovaných v hmyzích buňkách z rekombinantního bakuloviru. Pomocí expresního systému Bac-to-Bac jsme připravili rekombinantní bakulovirus nesoucí gen pro hlavní strukturní protein BK viru, VP1. Z infikovaných hmyzích buněk jsme gradientovou centrifugací izolovali VP1-částice (VLPs). Jejich pohyb buňkami v současné době sledujeme metodami konfokální mikroskopie. Rozpracována je také příprava VLPs obsahujících kromě hlavního strukturního proteinu také minoritní proteiny VP2 a VP3. Ve spolupráci s pracovníky Univerzity Würzburg připravujeme také infekční virus.

M. Pidra

Ústav genetiky a šlechtění rostlin – Mendeleum, Zahradnická fakulta MZLU, Valtická 334,  
691 44 Lednice

TECHNICKÝ IZOLÁT V LEDNICI – ZAŘÍZENÍ NA PODPORU PRODUKCE BEZVIRÓZNÍ SADBY RÉVY  
VINNÉ A TEPLOMILNÝCH PECKOVIN

Technický izolát je tvořen skleníky vybavenými sítěmi proti průniku hmyzích vektorů virových chorob révy vinné a teplomilných teplomilných peckovin a laboratorním zázemím. Objekt byl vybudován v Lednici jako součást sítě technických a prostorových izolátů v České republice. Koncepce budování izolátů byla podporována Ministerstvem zemědělství ČR v rámci přípravy ČR na vstup do Evropské unie.

Záměrem bylo zajištění výroby zdravého množitelského materiálu prostého hospodářsky významných virových onemocnění, na který obdrží množitel certifikační osvědčení. Bez tohoto certifikátu naši množitelé prakticky nemají šanci uplatnit se na společném evropském trhu. Systém fungování technických a na ně navazujících prostorových izolátů a způsob testování rostlin v těchto izolátech je dán tzv. certifikačním schématem. Schéma vychází z doporučení mezinárodní organizace EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).

Během prvního roku činnosti TI (2002) se podařilo soustředit kolekci všech odrůd a klonů révy, merunek a broskvoní registrovaných v ČR. Tento tzv. kandidátní materiál byl získán od udržovatelů případně majitelů odrůd. Cílem je získat alespoň jednu zdravou matečnou rostlinu každé odrůdy či klonu, která bude sloužit jako výchozí materiál pro namnožení tzv. předzákladního materiálu (prebasic). Množením předzákladního materiálu vznikne tzv. základní (basic) materiál, který bude dále přemnožen v tzv. prostorových izolátech. Z těchto izolátů budou brát množitelé - školkaři ke štěpování množitelský materiál (rouby a podnože).

K tomu, aby rostlina v technickém izolátu mohla být považována za zdravou matečnou rostlinu musí projít dvouletým testováním na dřevinných indikátorech, kde se projeví příznaky chorob nejen na listech, ale i na dřevě. Předběžné orientační testování se provádí imunoenzymatickými testy ELISA a současně pomocí RT-PCR (reverzní transkriptáza - PCR). Pokud se nepodaří u některé odrůdy získat zdravou rostlinu, může být použito ozdravování vysokými teplotami – tzv. termoterapie, množením a pasážováním vrcholových meristémů na živných agarových půdách *in vitro*, nebo jiné metody založené např. na chemoterapii.

J. Navrátilová, B. Vojtěšek, V. Horváth, J. Šmarda

Katedra genetiky a molekulární biologie, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

## NÁDOROVÝ SUPRESOR P53 ZASTAVUJE PROLIFERACI A INDUKUJE DIFERENCIACI MONOBLASTŮ BM2

Protoonkogen *c-myb*, který je konzervativní složkou genomu všech obratlovců, kóduje transkripční faktor, podílející se na řízení krvetvorby. Exprese *c-myb* je vysoká v nezralých buňkách hematopoietického systému a v průběhu diferenciaci postupně klesá. Zkrácenou variantu *c-myb*, tzv. onkogen *v-myb*, transdukuje akutně transformující virus ptačí myeloblastózy (AMV). Tento onkogen transformuje prekurzory monocytů a makrofágů a způsobuje tak akutní monoblastickou leukémii u infikovaných kuřat. Injekcí nezralých myeloidních buněk infikovaných AMV do kuřecích embryí a následnou izolací buněk kostní dřene byla získána linie monoblastů transformovaných onkogenem *v-myb* BM2, jejichž diferenciaci do stádia makrofágů brání vysoká konstitutivní exprese *v-myb*.

Protein p53 je nádorový supresor, jehož hladina se zvyšuje v buňkách působením stresových faktorů, poškozením DNA nebo aktivovanými onkogeny. Zároveň dochází k posílení jeho transkripčně aktivační funkce. p53 indukuje expresi genů ovlivňujících průběh buněčného cyklu. Mezi významné cílové geny patří gen  $p21^{WAF1/Cip1}$ , jehož exprese vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a geny 14-3-3 $\sigma$  a GADD45, jejichž exprese zastavuje cyklus ve fázi G2. Indukce programované buněčné smrti, apoptózy, je výsledkem aktivace promotoru genu *bax* a je obvykle doprovázena zastavením cyklu ve fázi G1. Přerušení cyklu ve fázi G2 je častěji doprovázeno diferenciací buněk než apoptózou.

Cílem naší práce bylo určit, zda transformační funkci onkoproteinu v-Myb lze eliminovat lidským proteinem p53. Za tímto účelem jsme v monoblastech BM2 exprimovali lidský gen p53 a vyhodnotili důsledky tohoto zásahu pro jejich fenotyp. Zvýšení hladiny p53 způsobilo zastavení proliferace leukemických monoblastů BM2 ve fázi G2 buněčného cyklu. Současně buňky BM2 exprimující p53 diferencovaly do stádia vykazujícího zvýšenou adhezenci, fagocytární aktivitu, produkci kyslíkových radikálů a aktivitu alfa-naftyl acetát esterázy. Tyto vlastnosti charakterizují dozrávání monoblastů do konečného stádia makrofágů. Naše výsledky dokumentují, že nádorový supresor p53 je dominantní vzhledem k onkoproteinu v-Myb, potlačuje jeho aktivitu v transformovaných buňkách a umožňuje tak obnovení jejich přirozené diferenciacní schopnosti.

Tato práce byla podporována výzkumným záměrem MSM143100008 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR a grantem 301/03/1055 GAČR.

Š. Němečková, L. Kutinová, J. Macková, K. Žůrková, V. Šroller, P. Gabriel, P. Otáhal, J.

Kryštofová and, P. Hainz

Oddělení experimentální virologie, Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1,  
128 20 Praha 2

#### POXVIROVÉ INHIBITORY IMUNITNÍ ODPOVĚDI A VÝVOJ VAKCÍN

Množení viru v organizmu hostitele vyžaduje překonání jeho přirozené i adaptivní imunity. Viry s velkým genomem jako jsou poxviry kódují rozmanité imunomodulační faktory, schopné inhibovat širokou škálu obranných mechanismů jako je apoptóza, produkce interferonů, chemokinů, prozánětlivých cytokinů, aktivitu komplementu i odpověď cytotoxických T lymfocytů, NK buněk i protilátek. Srovnání dvacetipěti dnes již téměř kompletně osekvenovaných poxvirových genomů odhalilo velmi početný arsenál genů, kde ani jeden imunomodulační gen není společný všem poxvirům. Mnohé viry inhibují stejný typ imunitní odpovědi a přitom zasahují na různém stupni a odlišným mechanismem. Studium virových imunomodulátorů přináší nový pohled na selekční tlaky, které působí během koevoluce viru a jeho hostitele a současně je zdrojem inspirace pro vývoj nových imunomodulačních proteinů k terapeutickému využití. Manipulace s geny kódujícími imunomodulační faktory v poxvirovém genomu umožňují přípravu virových vektorů a vakcín se změnou virulencí a imunogeností ve srovnání s rodičovskými viry. Pro přípravu experimentální terapeutické vakcíny proti nádorům asociovaným s lidským papillomavirem jsme využili viry vakcinie, které měly delecii v genu pro solubilní receptor interferonu gama, pro solubilní receptor CC chemokinů, delecii genu pro 3-beta hydroxysteroid dehydrogenázu nebo delecii genu hostitelského spektra. U rekombinantních virů s vloženým genem E7 z papilomaviru HPV16 jsme stanovili vliv delecí jednotlivých genů na jejich schopnost indukovat buněčnou imunitu proti E7 antigenu a vyvolávat ochranu před růstem nádorů TC-1.

I. Poláková, M. Šmahel

Oddělení experimentální virologie, Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1, 128 20, Praha 2

#### PRÍPRAVA PROTINÁDOROVÝCH VAKCÍN FÚZIOU ONKOGENU E6 HPV16 A ĽUDSKÉHO ONKOGENU H-RAS S GÉNOM B-GLUKURONIDÁZY E. COLI

Imunizácia pomocou plazmidovej DNA predstavuje nový smer vo vývoji vakcín. Očakáva sa, že DNA vakcíny by mohli mať vyššiu účinnosť a mali by byť bezpečnejšie než doteraz používané vakcíny. V súčasnej dobe prebiehajú pokusy využitia DNA vakcín aj pri liečbe cervikálneho karcinómu, ktorý je vyvolaný ľudským papillomavírusom HPV16. Na vzniku malígneho nádoru sa podieľajú vírusové onkoproteíny E6 a E7. Stali sa preto hlavným cieľom pre vývoj vakcín.

Imunogenicitu E6 proteínu sme sa snažili zvýšiť fúziou onkogénu s génom pre  $\beta$ -glukuronidázu (GUS) E. coli. Vychádzali sme pritom z výsledkov týkajúcich sa fúzneho génu E7GGG.GUS, ktoré ukázali, že  $\beta$ -glukuronidáza má vplyv na zvyšovanie účinnosti DNA vakcín. Podobným spôsobom sme pripravili aj fúzne gény obsahujúce sekvenciu kódujúcu 23 aminokyselín z N-konca ľudského protoonkogénu H-ras alebo onkogénu s mutáciou G12V. Správnosť fúzných konštruktov sme overili sekvenáciou. Po transfekcii 293T buniek príslušnými plazmidmi sme dokázali expresiu fúzných génov imunoblotingom, RT-PCR a stanovením enzymatickej aktivity GUS. Účinnosť DNA vakcín podaných génovou pištolou sme sledovali in vivo imunizáciou myší C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) a BALB/c (H-2<sup>d</sup>). Tvorbu nádorov sme u nich vyvolali inokuláciou nádorových buniek TC-1 resp. t(10)1rasE7E6 produkujúcich E6, E7 a H-ras. Údaje imunizačných pokusov sme porovnávali s výsledkami imunizácie s E7GGG.GUS. Kým v prípade myší C57BL/6 sa po imunizácii s vakcínou E7GGG.GUS ani u jednej myši nevytvoril nádor, tak účinnosť E6.GUS a Ras(G12V).GUS bola výrazne nižšia, ale navzájom sa nelíšila. Naopak, u myší BALB/c sme zaznamenali zvýšenú účinnosť vakcíny Ras(G12V).GUS, ale imunogenicitu fúzneho génu E6.GUS ostala nízka. Prekvapivo sa však výrazne znížila efektívnosť vakcíny E7GGG.GUS. Uvedené výsledky svedčia o významnej úlohe haplotypov pri vyvolaní imunity proti antigénom E6, E7 a H-ras.



Dana Průková<sup>1</sup>, Zdenka Vernerová<sup>2</sup>, Volodymir Stepanec<sup>1</sup>, Jiří Plachý<sup>1</sup>, Jiří Hejnar<sup>1</sup>, Josef Geryk<sup>1</sup>, Marie Indrová<sup>1</sup>, Roman Halouzka<sup>3</sup>, Vladimír Jurajda<sup>3</sup>, Jan Svoboda<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Ústav molekulární genetiky AV ČR, <sup>2</sup>Oddělení patologie, <sup>3</sup> Lékařská fakulta, Karlova universita, Praha, <sup>3</sup> Veterinární a farmaceutická universita, Brno.

#### PATOGENNÍ PŮSOBNÍ PTAČÍCH LEUKÓZOVÝCH VIRŮ PODSKUPINY A –D U KUŘAT INFIKOVANÝCH BĚHEM EMBRYOGENEZE.

Ptačí leukózoové viry (ALV), které nenesou onkogen, jsou schopny vyvolávat řadu nádorových i nenádorových onemocnění. Typickým nádorem je lymfóm, který vzniká po delší latenci (4–6 měsíců) a je způsoben monoklonální proliferací B lymfocytů. Karcinomy a sarkomy vznikají rovněž po několikaměsíční latenci. V důsledku porušení buněčných funkcí nebo přímo navození buněčné smrti dochází ke vzniku syndromu chorobného chřadnutí (wasting disease, WD), doprovázeného regenerativní anémií a imunosupresí nejspíše následkem snížené lymfoidní diferenciací. Ve snaze identifikovat rozdílnou aktivitu ALV kmenů v indukci WD, jsme v polovině embryogeneze infikovali kuřata outbrední linie Brown Leghorn viry podskupin A-D. Projevy WD jsme monitorovali v prvních 14 dnech po vylíhnutí. Došlo k signifikantnímu poklesu hmotnosti těla, thymu, bursy a naopak zvýšení hmotnosti sleziny. Změny byly nejvýraznější u virů podsk. C, mírnější změny produkovaly viry podsk. B a D. Zvířata infikovaná viry podsk. A se nelišila od kontrol. WD bylo možno indukovat pouze po intraembryonální infekci kuřat, v mírnější formě infekcí 1. den po vylíhnutí. U starších kuřat již nešlo WD navodit. Virus v dávce  $10^2 - 10^5$  spolehlivě navodí WD, nižší dávky přestože vyvolávají virémii, již nejsou tak účinné. U kuřat s WD indukovaným viry podskupiny C byla prokázána porucha humorální i celulární imunity. Po infekci viry podskupiny A je narušena pouze celulární imunita.

Morfologický obraz lymfatických orgánů odrážel makroskopické změny orgánů. Došlo k výrazné atrofii primárních lymfoidních orgánů (thymus, bursa Fabricii) a k reaktivním změnám sekundárních lymfoidních orgánů (hlavně slezina). Intenzita změn v lymfoidních orgánech odpovídala použitému virovému kmeni. Maximum změn bylo nalezeno opět po infekci viry podskupiny C.

Protože model WD indukovaný u kuřat ptačími leukózoovými viry je dostatečně citlivý pro odlišení patogenity jednotlivých virových kmenů, může být s výhodou využit pro přesnější funkční mapování virového genomu s cílem identifikovat virové sekvence, které hrají rozhodující úlohu v indukci WD.

D. Růžek (1), J. Kopecký (1,2), N. Rudenko (1,2), M. Golovchenko (1,2), L. Grubhoffer (1,2)

(1) Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

(2) Parazitologický ústav AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

#### FENOTYPOVÁ HETEROGENITA ATENUOVANÉHO KMENE VIRU KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

Virus klíšťové encefalitidy (rod *Flavivirus*, čeleď *Flaviviridae*) je významným lidským patogenem, který v našich podmínkách způsobuje ročně 300-500 klinicky manifestních onemocnění. V roce 1987 byl v jižních Čechách izolován z klíštěte *Ixodes ricinus* atenuovaný termosenzitivní kmen viru klíšťové encefalitidy ts263, který po subkutánní inokulaci laboratorní myši nevyvolává žádné klinické příznaky. Tento kmen vytváří v buněčné kultuře jen drobné, špatně rozeznatelné difúzní plaky. Atenuovaný fenotyp viru ts263 však není stabilní - při pasážování viru přes mozky sajících myšek dochází ke ztrátě termosenzitivního charakteru a ke kontinuálnímu nárůstu virulence.

V současné době se ukázalo, že tento kmen není tvořen homogenní virovou populací, nýbrž že v rámci „quasispecies“ tohoto kmenu je v malé míře přítomna termorezistentní varianta. Kultivací při nepermissivní teplotě (40°C) byla termorezistentní varianta selektována a následně byly určeny její základní biologické vlastnosti: termorezistentní varianta produkuje v buněčné kultuře velké a jasně viditelné plaky a vyznačuje se vysokou mírou neuroinvasivity (u dospělých laboratorních myší byla pozorována 90% letalita po subkutánní inokulaci 100 PFU viru).

Za účelem identifikace úseků virového genomu, jež jsou zodpovědné za odlišnou míru virulence a termosenzitivní charakter, byla provedena u termorezistentní varianty částečná sekvenční analýza a porovnána s dříve publikovanou kompletní genomovou sekvencí termosenzitivní varianty ts263. Byla pozorována úplná homologie v nukleotidové sekvenci 5' nekódující oblasti a v sekvenci aminokyselin všech strukturních proteinů. Nukleotidové rozdíly lokalizované v 3' nekódující oblasti spadají do variabilního úseku a tudíž nemají vliv na výsledný virový fenotyp. Tento výsledek poukazuje na to, že hledané determinanty termosenzitivity a odlišné úrovně virulence jsou zřejmě lokalizovány v sekvencích kódujících nestrukturní virové proteiny.

Financování projektu: Výzkumný záměr MSM 123100003, Grant GA ČR 524/03/1326.

Růžičková, V.(1), Pekarová, M.(1), Petráš, P.(2), Pantůček R.(1) a Doškař, J.(1)

(1) Katedra genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Kotlářská 2, 61137 Brno, CZ,

(2) Státní zdravotní ústav, Národní referenční laboratoř pro stafylokoky, Šrobárova 48, 10042 Praha

#### MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA LYZOGENIZUJÍCÍCH BAKTERIOFÁGŮ

Bakteriální druh *Staphylococcus aureus* produkuje exfoliativní toxiny, které způsobují u lidí a zejména u kojenců kožní puchýřnaté onemocnění, jehož nejtěžší formou je syndrom opařené kůže. Gen *eta* kódující toxin ETA se nachází v DNA profága, což je genom mírného fága začleněný do chromozomu hostitelské bakterie. Mírné stafylofágy lyzogenní konverzí mění genetické a fenotypové vlastnosti hostitelského kmene. V této práci byly izolovány bakteriofágy z osmi ETA-pozitivních kmenů *S. aureus*. Metodou multiplex PCR bylo pět fágů zařazeno do serologické skupiny A a tři fágy do serologické skupiny B. PCR detekcí byl u nich prokázán strukturní gen *eta*. Všechny fágy byly charakterizovány restriční analýzou DNA pomocí restriktázy *HindIII* takto: ve skupině A-fágů byly rozlišeny tři subtypy A-1, A-2 a A-3, zatímco u B-fágů byly rozlišeny dva subtypy, B-1a B-2. Tři fágy byly použity k přenosu genu *eta* do recipientního kmene. Jeden A-fág a dva B-fágy lyzogenizovaly ETA-negativní kmen *S. aureus*. Bylo zjištěno, že gen *eta* byl přenesen do recipientního kmene všemi třemi fágy, avšak pouze lyzogeny vzniklé po přenosu genu *eta* prostřednictvím B-fágů byly schopny produkovat exfoliativní toxin A. Lyzogenní kmene vzniklé přijetím DNA A-fága neprodukovaly toxin ETA, i když ve svém genomu obsahovaly jeho gen *eta*. Pulzní gelovou elektroforézou bylo zjištěno, že genom A-fága se začlenil do čtvrtého největšího restričního *SmaI* fragmentu chromozomové DNA, zatímco genomy obou B-fágů se vložily do druhého největšího *SmaI* fragmentu. Naše výsledky ukázaly, že B-fágy přenášejí gen *eta* do ETA-negativního kmene a navozují u něj schopnost produkovat exfoliativní toxin A. Je pravděpodobné, že i v přirozených podmínkách je gen *eta* přenášen mezi kmene *S. aureus* mírnými fágy, které lyzogenní konverzí přispívají k vzniku nových virulentních kmenů stafylokoků.

Práce byla podporována výzkumným záměrem MSM 143100008 a projektem grantové agentury GAČR 301/02/1505.

Martina Saláková<sup>1</sup>, Vratislav Němeček<sup>2</sup>, Jaroslav König<sup>2</sup>, Ruth Tachezy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1, Praha 2, <sup>2</sup>Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10

#### ZASTOUPENÍ TT VIRU V ČESKÉ REPUBLICE, VĚKOVÁ ZÁVISLOST TTV A ZPŮSOB PŘENOSU

TT virus byl objeven v roce 1997 u pacienta s potransfuzní hepatitidou nejasného původu. Jeho koncentrace v jaterních buňkách byla 10krát až 100krát vyšší a prevalence TTV byla významně zvýšena ve skupinách pacientů s jaterním onemocněním ve srovnání s kontrolní skupinou. Proto byl TT virus označen jako kandidát na původce virových hepatitid nejasného původu. Další studie však tento předpoklad nepotvrdily. TT virus je rozšířen po celém světě. Vysoká prevalence u jedinců podstupujících opakovaně transfuzi značí, že parenterální způsob přenosu je důležitým způsobem šíření TT viru. Další způsoby přenosu se pravděpodobně také podílí na šíření TT viru, jejich role však stále není jasná.

V této studii jsme zkoumali epidemiologii, způsob přenosu a zastoupení genotypů TTV v České republice. Přítomnost TTV DNA jsme zjišťovali pomocí PCR v kontrolní skupině 196 zdravých dárců, u 20 pacientů s hemofilií, u 49 narkomanů, u 100 prostitutek, u 50 vězňů, 208 dětí v letech 1 až 14, 54 vzorků pupečnickové krve, 52 pacientů s hepatitidou nejasného původu, 74 pacientů s hepatitidou C a 51 dárců krve se zvýšenou hladinou ALT. Genotypy byly stanoveny u 70 vzorků.

Prevalence TT viru v populaci zdravých dárců České republiky dosahuje 52,6%. Žádný vzorek pupečnickové krve nebyl pozitivní na TTV DNA, a proto můžeme vyloučit prenatální přenos TTV. Děti jsou infikovány brzy po porodu s maximem ve dvou letech dítěte, poté dochází k poklesu a opětovnému nárůstu po začátku školní docházky. Zdá se, že v prvních letech dítěte je zdrojem infekce matka, později se přidávají další mechanismy přenosu, jako fekálně-orální přenos či kontakt. U dospělých byl nalezen nárůst TTV infekce s věkem. Nejvyšší prevalence byla zjištěna u skupiny pacientů s hemofilií a narkomanů, což potvrzuje důležitost parenterálního způsobu přenosu TTV. U jedinců se zvýšeným rizikem sexuálního přenosu nebyla nalezena vyšší prevalence oproti kontrolní skupině. V České republice je nejvíce zastoupen genotyp G2c a G1a, následuje G8 a G3. Vyšetření části souboru na markery infekce HBV a HCV ukázalo, že jedinci pozitivní na anti-HBc a/nebo anti-HCV jsou signifikantně častěji pozitivní na TTV DNA. Tyto viry se mohou šířit stejným mechanismem. Tato studie stejně jako řada dalších studií nezjistila žádnou souvislost TTV s onemocněním jater.

Lenka Sedláčková, Jan Lipov, Tomáš Ruml

Ústav Biochemie a Mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 6  
Technická 5, 166 28

#### INTERAKCE OBALOVÝCH GLYKOPROTEINŮ S MATRIXOVÝM PROTEINEM MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU

Na povrchu všech retrovirů se nacházejí obalové glykoproteiny. Jsou translatovány ve formě polyproteinového prekursoru Env, který je v Golgiho aparátu štěpen buněčnou proteasou na podjednotky – povrchovou (SU) a transmembránovou (TM). SU zprostředkovává vazbu virové částice na receptory hostitelské buňky, zatímco TM se účastní fúze virové membrány s membránou hostitelskou a umožňuje tak vstup viru do buňky. Předpokládá se, že inkorporace glykoproteinů do virové membrány je umožněna specifickou interakcí cytoplasmatické domény TM s polyproteinovým prekursorem Gag, což je precursor strukturálních proteinů viru. Za tuto interakci je patrně odpovědná N-koncová část prekursoru Gag, která je tvořena matrixovým proteinem (MA). Ten se ve zralém virionu nachází těsně pod lipidovým obalem a tvoří obal virové kapsidy. Mason-Pfizerův opičí virus (M-PMV) patří mezi retroviry, které skládají nezralé částice v cytoplasmě a ty jsou poté transportovány k cytoplasmatické membráně, kde dojde k uvolnění virové částice.

Předmětem našeho studia je interakce cytoplasmatické domény TM s prekursorem Pr78<sup>Gag</sup>, resp. s MA M-PMV. Pro sledování lokalizace a případné interakce proteinů *in vivo* byly připraveny vektory pro expresi matrixového a transmembránového proteinu v tkáňových kulturách. Matrixový protein byl připraven ve fúzi s fluorescenčním proteinem DsRed, transmembránový protein ve fúzi s GFP. Kromě „wild type“ MA byl použit i R55F mutant MA. Tato mutace v matrixovém proteinu způsobuje, že viriony M-PMV jsou skládány u cytoplasmatické membrány a nikoliv v cytoplasmě. Proteiny byly exprimovány v COS-1 buňkách a byla sledována jejich lokalizace v živých a fixovaných buňkách. Byl zaznamenán rozdíl v lokalizaci MA(wt) a MA(R55F). Kolokalizace MA a TM je nyní intenzivně studována.

Ke studiu interakce TM s Pr78<sup>Gag</sup> jsou dále využívány nezralé viriony získané transfekcí tkáňové kultury COS-1. Získané viriony jsou ultracentrifugační „spin-thru“ metodou vystaveny detergentu, jehož působením dochází k rozpadu jejich lipidového obalu, nikoliv však celé virové částice. Je sledováno, zda je interakce TM s Pr78<sup>Gag</sup> natolik stabilní, aby vydržela působení detergentu.

E. Sýkorová

(Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno)

#### OBVYKLÉ A NEOBVYKLÉ TELOMERY ROSTLIN

Telomery eukaryotických organismů jsou nukleoproteinové struktury tvořeny krátkými repetitivními sekvencemi typickými pro určitou skupinu organismů, např. TTAGGG u obratlovců nebo TTTAGGG u rostlin. Výjimky jsou známy u hmyzu, např. u *Drosophila melanogaster* jsou typické sekvence (TTAGG) nahrazeny retroelementy (přehled viz (1)). U rostlin byla nepřítomnost typické telomerické sekvence poprvé popsána u cibule (2). Později byl výčet doplněn o celou skupinu rostlin ze řádu Asparagales (3), kam patří i cibule, a překvapivě rostliny z rodu *Cestrum* (Solanaceae) (4,5). Ačkoli jednotlivé typické telomerické sekvence se liší zdánlivě nepatrně, proteiny, které se bezprostředně váží na telomerickou DNA (telomere-binding-protein, TBP), bývají v rozpoznání DNA sekvence velice specifické. Společně s proteiny, které jsou na ně vázány prostřednictvím protein-proteinových interakcí, pak vytvářejí složitou strukturu, která zajišťuje funkce telomery jako je ochrana před rozpoznáním a degradací konců chromosomu nukleázami a jejich fúzí nebo vazba chromosomu na jadernou membránu.

Ve světle těchto poznatků je proto o to více překvapivé, že funkci telomerické sekvence u velké části rostlin z řádu Asparagales převzala sekvence TTAGGG typická např. pro lidské telomery. Tento evoluční zlom tak rozděluje Asparagales na ty čeledi, kde je zachována telomera tvořena typickou rostlinnou telomerickou sekvencí a ty, jejichž telomery jsou tvořeny sekvencí „lidskou“ (6). Typická telomerická sekvence u Asparagales však nebyla jednoduše plně nahrazena touto sekvencí, telomery obsahují kromě „pravé“ telomerické sekvence TTAGGG udržované telomerázou také další podobné sekvence, včetně původní rostlinné sekvence TTTAGGG (6,7). Náhrada jednoho typu telomerické sekvence jinou sekvencí musela být nutně doprovázena celou řadou dalších změn v organizaci telomer, včetně telomerázy a TBP proteinů. Periodicita telomerického chromatinu byla u dříve zkoumaných typických telomer, ať už typu rostlinného nebo lidského, vždy kratší než periodicita většinového chromatinu (bulk chromatin) (8,9). Kromě telomerických a několika subtelomerických sekvencí (10-12) nebylo podobné chování popsáno u žádné jiné sekvence či oblasti chromosomu. Naše výsledky naznačují, že chromatinová struktura telomer u Asparagales se chová atypicky. Pomocí EMSA (electromobility shift assay) byly částečně

charakterizovány TBP proteiny Asparagales, které jsou s různou afinitou schopny se vázat na rostlinnou a/nebo lidskou telomerickou jednořetězcovou DNA (8).

1. Biessmann H , Mason JM (1997) *Chromosoma*, 106, 63-9.
2. Fuchs J, Brandes A, Schubert I (1995) *Plant Systematics and Evolution*, 196, 227-241.
3. Adams SP, Hartman TP, Lim KY, Chase MW, Bennett MD, Leitch IJ, Leitch AR (2001) *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 268, 1541-6.
4. Sykorova E, Lim KY, Fajkus J, Leitch AR (2003) *Chromosoma*, 112, 164-172.
5. Sykorova E, Lim KY, Chase MW, Knapp S, Leitch IJ, Leitch AR, Fajkus J (2003) *Plant J.*, 34, 283-91.
6. Sykorova E, Lim KY, Kunicka Z, Chase MW, Bennett MD, Fajkus J, Leitch AR (2003) *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 270, 1893-1904.
7. Rotková G, Sklenickova M, Dvorackova M, Sykorova E, Leitch AR, Fajkus J (2004) *Cytogenet Genome Res*, 107, 132-138.
8. Fajkus J, Kovarik A, Kralovics R, Bezdek M (1995) *Mol Gen Genet*, 247, 633-8.
9. Lejnine S, Makarov VL, Langmore JP (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2393-
10. Sykorova E, Fajkus J, Ito M, Fukui K (2001) *Chromosome Res*, 9, 309-23.
11. Sykorova E, Cartagena J, Horakova M, Fukui K, Fajkus J (2003) *Mol Gen Genomics*, 269, 13-20.
12. Vershinin AV and Heslop-Harrison JS (1998) *Plant Mol Biol*, 36, 149-61.

J. Šmarda<sup>1</sup>, O. Benada<sup>2</sup> and M. Dufek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biologický ústav, Lékařská fakulta MU, Tomešova 12, 602 00 Brno,

<sup>2</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč

“PHAGE TAIL-LIKE“ (HMW) BAKTERIOCINY ENTEROBAKTERIACEÍ RODU *BUDVICIA* AND *PRAGIA*.

“Phage tail-like“ (HMW) bakteriociny ze tří kmenů *Pragia fontium* (24342, 24613 and 24647) a jednoho kmene *Budvicia aquatica* (24522) byly studovány šesti základními mikrobiologickými metodami. Indukcí mitomycinem c i UV zářením bylo u spontánně produkčních kmenů dosahováno zvýšení produkce o jeden až dva řády. HMW bakteriociny obou studovaných kmenů zabíjely senzitivní kmeny obou rodů a žádný z kmenů nebyl citlivý vůči vlastnímu bakteriocinu. Letální efekt HMW bakteriocinů je rodově specifický, právě tak jako je tomu u bakteriofágů i u nízkomolekulárních kolicinů. Výsledky testů mezidruhé activity bakteriocinů ukázaly, že z 52 kombinací byly pouze 3 pozitivní: kmen *Pragia* 24342 inhiboval jeden kmen *Klebsiella* a kmen *Escherichia coli*  $\phi$ ; kmen *Pragia* 24613 inhiboval kmen *Escherichia coli* K.

Všechny HMW bakteriociny ztrácely svoji aktivitu vystavením zvýšené teplotě v rozsahu 45-60 °C po dobu 10 min, na rozdíl od kolicinu E1, který vykazuje pouze mírné snížení své activity při vystavení teplotě 95 °C. Opačné výsledky byly získány pro rezistenci k trypsinu, kdy všechny kmeny HMW bakteriocinů vykazovaly vysoký stupeň resistance oproti nízkomolekulárním kolicinům.

Morfologické parametry izolovaných HMW bakteriocinů byly studovány pomocí elektronové mikroskopie. Všechny kmeny odpovídaly stejnému morfologickému typu: ocáskům T-sudých fágů. Typický nativní HMW bakteriocin je tvořen centrální trubičkou obklopenou kontraktilní pochvou a je zakončen na jedné straně bazální destičkou s hroty a vlákny. Na druhé straně je pochva kónicky ukončena. Pokud jsou HMW bakteriociny vystaveny fyzikálnímu stresu, dochází ke kontrakci pochvy, která je volně pohyblivá po centrální trubičce a v mnoha případech dochází ke kompletnímu oddělení obou komponent. Podle velikostních měření patří HMW bakteriociny kmene *B. aquatica* a kmenů *P. fontium* mezi nejmenší ve srovnání s velikostí HMW bakteriocinů popsanych u Gram-pozitivních i u Gram-negativních baktérií.



P.Tejklová, J. Šmahelová, R.Tachezy, I. Marinov, M.Šmahel

Oddělení experimentální virologie, Ústav hematologie a krevní transfúze, U nemocnice 1,  
128 20 Praha

#### CHARAKTERIZACE IMUNOREZISTENTNÍCH KLONŮ ODVOZENÝCH OD MYŠÍCH NÁDOROVÝCH BUNĚK TC-1 TRANSFORMOVANÝCH LIDSKÝM PAPILOMAVIREM TYPU 16

Tvorba nádorů je složitý několikakrokový proces zahrnující mimo jiné schopnost buněk unikat dozoru imunitního systému. Ke zvýšení účinnosti protinádorových vakcín je proto potřeba odvodit nádorové buněčné linie s různými mechanismy úniku imunitnímu systému. Buňky TC-1, které pro tyto účely používáme, byly připraveny transformací primárních myších plicních buněk onkogeny E6 a E7 lidského papillomaviru typu 16 (HPV16) a onkogenem H-ras aktivovaným mutací G12V. HPV16 se podílí na vzniku karcinomu děložního čípku u 50-60% pacientů. Onkoproteiny E6 a E7 přispívají k maligní transformaci buněk a jsou také nezbytné pro udržení stavu transformace. Po imunizaci myši C57BL/6 DNA vakcínou proti proteinu E7 a inokulaci buněk TC-1 se u části zvířat vyvinou nádory. Z nich jsme vyizolovali několik buněčných linií (TC-1/E7GGG III, TC-1/E7LAMP, TC-1/E7GGG IV) a které jsme klonovali in vitro. Získané klony jsme charakterizovali z různých hledisek. Sledovali jsme schopnost růstu v buněčné kultuře a měkkém agaru a schopnosti tvořit nádory a metastazovat. Onkogenicita některých klonů (odvozených především od linie TC-1/E7LAMP) byla snížena. U tří klonů jsme prokázali tvorbu spontánních metastáz v plicích. Stanovili jsme také expresi povrchových molekul MHC I. třídy a kostimulační molekuly B7.1 a produkci onkoproteinu E7. Nalezli jsme dva klony (TC-1/A9, TC-1/D11) s výrazně sníženou expresí molekul MHC I. třídy. Exprese E7 byla oproti buňkám TC-1 snížena u všech linií. Dále jsme testovali imunorezistenci jednotlivých klonů po imunizaci myši fúzním genem E7GGG.GUS vybraným pro jeho dobrou účinnost při zabránění tvorby nádorů z buněk TC-1. Nalezli jsme tak několik imunorezistentních klonů odvozených od linie TC-1/E7GGG IV. Účinnost DNA vakcíny jsme se u těchto imunorezistentních klonů pokusili zvýšit pomocí imunostimulačních genů GM-CSF, B7.1, IL-12 a Flt3L, avšak nedosáhli jsme žádné protinádorové ochrany. U všech imunorezistentních klonů jsme našli substituci v kotvící aminokyselině imunodominantního epitopu E7, která se u linie TC-1 ani u imunosenzitivních klonů nevyskytuje. Úloha této mutace v imunorezistenci nalezených klonů bude předmětem dalších studií.

Kamila Žurková, P. Otáhal, L. Kutinová, P. Hainz, Š. Němečková  
ÚHKT Praha

#### STUDIUM VIRU VAKCÍNIE EXPRIMUJÍCÍHO FLT3 LIGAND

Zkonstruovali jsme několik rekombinantních virů vakcínie kmene Praha 13 (P13), ve kterých je gen pro thymidinkinázu nahrazen genem pro solubilní isoformu lidského cytokinu Flt3 ligandu (FL). Lidský FL je velmi podobný myším ligandu stejně jako je tomu v případě jejich receptorů. Bylo prokázáno, že díky vysoké homologii je lidský FL schopen vázat se a aktivovat myší receptor a naopak.

Jeho exprese virem je podřízena přirozenému vakcíniovému H5 promotoru (promotor genu pro topoizomerázu) se silnou aktivitou v časně fázi infekce, nebo syntetickému časně-pozdnímu promotoru s převahou aktivity v pozdní fázi infekce. Zjistili jsme, že replikace těchto rekombinant je závislá na míře exprese FL a na typu buněčné linie (krevní buňky vs. fibroblasty). Exprese FL na linii myších makrofágů, na rozdíl od linie fibroblastů kočkodana zeleného, inhibuje množení rekombinant *in vitro*. Podobnou situaci jsme pozorovali také *in vivo* na myších kmene C57Bl/6. Tato vlastnost je žádoucí pro další použití při vývoji vakcín založených na atenuovaných virech vakcínie. Dále jsme předpokládali, že exprese FL v myším organismu pomocí viru povede ke zlepšení imunitní odpovědi a podpoří v našich experimentech eliminaci nádorových buněk linie TC-1. Tento předpoklad se však nepotvrdil.

Nyní jsme zjistili, že rekombinantní FL se během svého zpracování v infikované buňce zabudovává do virových obalů vakcínie. Budeme zkoumat, zda se tato modifikace viru podílí na atenuaci rekombinantního viru.

### **Účastníci konference:**

Ing. Michal Adam  
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno  
Valtická 334  
691 44 Lednice  
Česká Republika

RNDr. Oldřich Benada  
Mikrobiologický ústav AV ČR  
Laboratoř elektronové mikroskopie  
Výdeňská 1083  
142 20 Praha 4 – Krč  
Česká Republika

Veronika Boháčová  
Univerzita Karlova Praha,  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.  
Masarykova univerzita Brno  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a molekulární biologie  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
Česká Republika

Mgr. Luděk Eyer  
Masarykova univerzita Brno  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a molekulární biologie  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
Česká Republika

Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.,  
Univerzita Karlova Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

MVDr. Josef Geryk, CSc.  
ÚMG AV ČR  
Flemingovo nám.2  
166 37 Praha 6  
Česká Republika

Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.  
Jihočeská universita České Budějovice  
Biologická fakulta  
Braníšovská 31  
370 05 České Budějovice  
Česká Republika

Mgr. Lucia Gulášová  
Masarykova univerzita Brno  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a molekulární biologie  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
Česká Republika

Ing. Šárka Haubová  
VŠCHT Praha  
Fakulta potravinářské a biochemické technologie  
Ústav biochemie a mikrobiologie  
Technická 5  
166 28 Praha 6  
Česká Republika

RNDr. Dana Holá, Ph.D.  
Univerzita Karlova Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

Ing. Věra Holleínová  
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno  
Valtická 334  
691 44 Lednice  
Česká Republika

Lenka Horníková  
Univerzita Karlova Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

Ing. Jaroslav Hrabák  
Univerzita Karlova  
Lékařská fakulta Plzeň  
Ústav mikrobiologie  
Dr.E.Beneše 13  
305 99 Plzeň  
Česká Republika

Vlastimil Jirásko  
Univerzita Karlova Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

RNDr. Marie Kočová, CSc.  
Univerzita Karlova Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.  
ÚOCHB AV ČR Praha  
Flemingovo nám.2  
166 37 Praha 6  
Česká Republika

Ing. Jan Kopecký  
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno  
Valtická 334  
691 44 Lednice  
Česká Republika

Ing. Břetislav Křížan  
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno  
Valtická 334  
691 44 Lednice  
Česká Republika

Mgr. David Liebl  
Univerzita Karlova Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

Mgr. Jana Macková  
ÚHKT Praha  
Oddělení experimentální virologie  
U Nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
Česká Republika

Kateřina Malachová  
Ostravská univerzita  
Katedra biologie a ekologie  
Česká Republika

RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.  
ÚMBR AV ČR  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice  
Česká Republika

Kateřina Mocová  
ÚHKT Praha  
U Nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
Česká Republika

Ing. Kateřina Moravcová  
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno  
Valtická 334  
691 44 Lednice  
Česká Republika

Mgr. Jarmila Navrátilová  
Masarykova univerzita Brno  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a molekulární biologie  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
Česká Republika

RNDr. Šárka Němečková, DrSc.,  
ÚHKT Praha  
U Nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
Česká Republika

Ing. Eva Ondrušiková, CSc.  
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno  
Valtická 334  
691 44 Lednice  
Česká Republika

Mgr. Roman Pantůček, Ph.D.  
Masarykova universita Brno  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a molekulární biologie  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
Česká Republika

Mgr. Marianna Pappová  
Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

RNDr. Karel Petrzik, CSc.  
ÚMBR AV ČR  
Braníšovská 31  
370 05 České Budějovice  
Česká Republika

Doc. RNDr. Miroslav Pidra, CSc.  
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno  
Valtická 334  
691 44 Lednice  
Česká Republika

Doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc.,  
Univerzita Karlova Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

MUDr. Dana Pokorná  
ÚHKT Praha  
Oddělení experimentální virologie  
U nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
Česká Republika

Mgr. Ingrid Poláková  
ÚHKT Praha  
Oddělení experimentální virologie  
U nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
Česká Republika

Ing. Jitka Poláková  
Rymáňská 282  
252 10 Mníšek pod Brdy  
Česká Republika

Mgr. Dana Průková  
ÚMG AV ČR  
Flemingovo nám. 2  
166 37 Praha 6  
Česká Republika

Lukáš Rambousek  
Pod Bílou horou 962  
742 21 Kopřivnice  
Česká Republika

Prof. RNDr. Jiřina Relichová, CSc.,  
Masarykova univerzita Brno  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a molekulární biologie  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
Česká Republika

Prof. Ing. Tomáš Ruml, CSc.  
VŠCHT Praha  
Fakulta potravinářské a biochemické technologie  
Ústav biochemie a mikrobiologie  
Technická 5  
166 28 Praha 6  
Česká Republika

Bc. Daniel Růžek  
Jihočeská univerzita České Budějovice  
Biologická fakulta  
Katedra obecné biologie  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice  
Česká Republika

RNDr. Vladislava Růžičková, CSc.  
Masarykova Univerzita Brno  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a molekulární biologie  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
Česká Republika



Mgr. Martina Saláková  
ÚHKP Praha  
U nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
Česká Republika

Ing. Lenka Sedláčková  
VŠCHT Praha  
Fakulta potravinářské a biochemické technologie  
Ústav biochemie a mikrobiologie  
Technická 5  
166 28 Praha 6  
Česká Republika

Mgr. Miroslava Slaninová, Ph.D.  
Univerzita Komenského Bratislava  
Přírodovědecká fakulta  
Mlynská Dolina B1  
842 15 Bratislava  
Slovenská Republika

Mgr. Hana Slováčková  
Akademie věd České republiky  
Botanický ústav  
Květná 8  
603 65 Brno  
Česká Republika

Ing. Jiří Svoboda  
Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha  
Odbor rostlinolékařství - virologie  
Drnovská 507  
161 06 - Praha 6, Ruzyně  
Česká Republika

Michal Šimíček  
Trnávka 174  
745 58 Trnávka  
Česká Republika

Doc. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
Masarykova univerzita v Brně  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a molekulární biologie  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
Česká Republika

Ing. Pavla Tejklová  
ÚHKT Praha  
Oddělení experimentální virologie  
U nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
Česká Republika

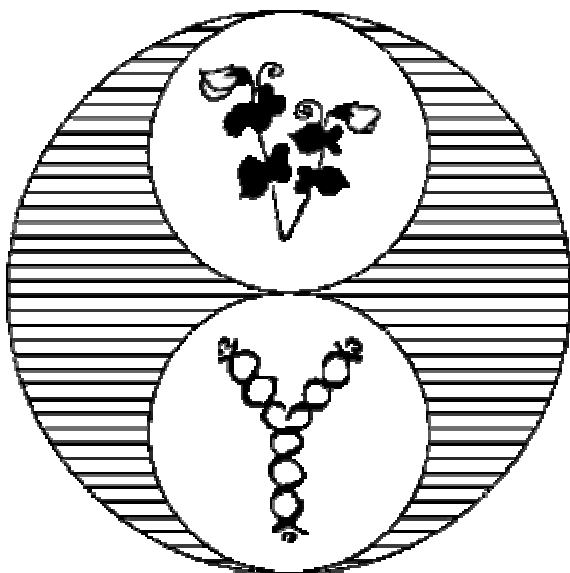
Ing. Kamila Trčková  
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno  
Valtická 334  
691 44 Lednice  
Česká Republika

Prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc.,  
Univerzita Komenského Bratislava  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky  
Mlynská Dolina B1  
842 15 Bratislava  
Slovenská Republika

Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.,  
Univerzita Karlova Praha  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Viničná 5  
128 44 Praha 2  
Česká Republika

Kamila Žurková  
ÚHKT Praha  
U Nemocnice 1  
12820 Praha 2  
Česká Republika

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](#)