

INFORMAČNÍ LISTY



**Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela, z.s., konané dne
29. 11. 2017 v Brně**

Přítomni: Doškař, Holá, Knoll, Kočová, Mašek, Nešvera, Relichová, Slaninová, Šeda, Ševčovičová, Šmarda, Tomáška, Zadražil

Omluveni: Čellárová, Zelený

Program schůze:

1. Projednání přípravy konference GSGM, která se uskuteční v září 2018 v Bratislavě.
2. Projednání přípravy voleb výboru GSGM pro nadcházející funkční období.
3. Informace o činnosti spolku v uplynulém období.
4. Zhodnocení 3. ročníku Edukačního semináře a náměty na další podobně zaměřené akce.
5. Informace o stavu členské základny a projednání nových přihlášek.
6. Členské příspěvky a platební morálka členů GSGM.
7. Zhodnocení náplně posledního čísla IL a projednání obsahu dalších čísel.
8. Různé.

ad 1)

Prof. Tomáška, doc. Slaninová a doc. Ševčovičová informovali o přípravě genetické konference, která se uskuteční 12.-14. září 2018 v Bratislavě. Představili webové stránky konference, které prozatím nejsou otevřené pro přihlašování, ale obsahují již téměř kompletní informace pro budoucí zájemce a účastníky konference. Diskutovalo se o programu konference, který je v hlavních bodech rovněž připravený. Upřesněny budou ještě některé zvané přednášky a některé organizační záležitosti. Na stránkách konference jsou již uvedeny možnosti dopravy a spojení do místa konání, možnosti ubytování, konferenční poplatky a všechny další nezbytné detaily. Přítomní členové výboru konstatovali, že konference je výborně připravená a organizačně zajištěná. Stránky konference budou zpřístupněny a otevřeny pro přihlášení začátkem roku a členové výboru byli požádáni, aby konferenci propagovali na svých domovských i dalších pracovištích. Začátkem roku 2018 budou všichni členové GSGM informováni o konání konference mailem s odkazem na webové stránky konference a přihlašovací formulář. Součástí konference je slavnostní oznámení výsledků a předání Ceny GSGM, která byla vyhlášena a zveřejněna v IL 2016. Cena je tradičně sponzorována firmou MGP Zlín. Členové výboru budou propagovat soutěž mezi mladými vědeckými pracovníky a doktorandy na svých pracovištích a spolupracujících institucích. Všichni členové společnosti obdrží mailem připomínku o vyhlášení soutěže včetně detailů pro přihlášení.

ad 2)

Přítomní členové diskutovali přípravu voleb výboru spolku pro příští volební období. Návrhy na kandidáty do nového výboru budou projednány a schváleny na valném shromáždění GSGM, které bude svoláno u příležitosti konference GSGM v Bratislavě. V předstihu budou všichni členové vyzváni k podávání návrhů kandidátů do nového výboru. Organizační zajištění a způsob voleb budou projednány na jarním zasedání výboru spolku.

ad 3)

Předseda informoval o činnosti spolku v uplynulém období, zejména o různých seminářích a akcích, které proběhly především v Brně. Všichni členové GSGM jsou o akcích předem informováni a zájemci jsou zváni a mohou se jich účastnit. Výbor doporučuje podporovat a spoluorganizovat podobné aktivity a propagovat je mezi členy spolku. Předseda dále informoval o procesu zápisu změn do spolkového rejstříku a o registraci aktualizovaných stanov spolku. Poděkoval dr. Kočové a dr. Holé za vypracování a revizi všech dokumentů, které bylo třeba předložit soudu pro registraci spolku. Přítomní členové výboru vyjádřili poděkování předsedovi za značné úsilí, které věnoval schválení sídla spolku a za opakovaná jednání s rejstříkovým soudem. Celý proces byl, i přes komplikace, které bylo nutné průběžně řešit, úspěšně dokončen a spolek včetně sídla a stanov je řádně registrován.

ad 4)

Přítomní členové výboru zhodnotili velmi pozitivně 3. ročník Edukačního semináře, který se uskutečnil v květnu v Mendelově muzeu MU v Brně. Seminář, který organizoval a řídil prof. Tomáška se svými kolegy, se tradičně těšil zájmu členů i nečlenů GSGM z různých českých a slovenských univerzit a institucí a přinesl užitečné informace o doktorském studiu na jednotlivých univerzitách. V Informačních listech byly publikovány dva příspěvky, které shrnuly průběh semináře a závěry, které z něj vyplynuly. Diskutovalo se uspořádání dalšího ročníku podobně zaměřeného semináře na jaře 2018. Výbor podpořil návrh prof. Tomášky posunout konání 4. ročníku Edu-semináře až na rok 2019, vzhledem k časově náročné přípravě genetické konference v roce 2018.

ad 5)

Výbor GSGM obdržel v uplynulém období tři nové přihlášky, které byly projednány a jednomyslně schváleny. Nové členky spolku Mgr. Zuzana Novosadová, RNDr. Štěpánka Šebastianová, Ph.D. a RNDr. Andrea Kuthanová, Ph.D. budou informovány o přijetí a o právech a povinnostech členů GSGM.

ad 6)

Prof. Knoll informoval o placení členských příspěvků. V Informačních listech je pravidelně připomínána povinnost členů platit včas členské příspěvky. I přesto se v některých případech opakuje prodlení plateb. Výbor se bude otázkou platební morálky věnovat na dalším zasedání a v individuálních případech budou vyvozeny patřičné závěry.

ad 7)

Velice pozitivně byla hodnocena úroveň posledního čísla IL. Vysoce kladně byly hodnoceny příspěvky prof. Tomášky na téma „gen“ a RNDr. Holé, která zhodnotila 3. ročník Edukačního semináře. Přínosné byly i příspěvky prof. Matalové a dr. Matalové z Mendeliana MZM i dalších autorů. Prof. Šmarda vyzval přítomné redaktory, aby včas dodali příspěvky pro nadcházející číslo. Byla diskutována možnost přejít na pouze elektronickou formu IL nebo tištěnou formu zasílat pouze těm členům GSGM, kteří si to přímo vyžádají. Po diskusi, v níž zazněly různé důvody pro i proti, výbor doporučil zůstat u tradiční formy IL a jejího rozesílání všem členům GSGM v tištěné podobě.

ad 8)

Předseda informoval o dalším ročníku mezinárodního Mendelova dne organizovaného Mendelianem MZM ve spolupráci se zahraničními partnery. Program Mendel Day 2018 v Brně nabízí kontaktní platformu také pro spolupráci GSGM s dalšími Mendelovými společnostmi, zejména Gregor Mendel Gesellschaft. Přítomní členové výboru požádali brněnské kolegy z výboru GSGM o účast na této akci a vyjádření souhlasu s případnou další spoluprací.

Prof. Knoll informoval o průběžné aktualizaci webových stránek GSGM. Dále navrhl vytvoření sdíleného adresáře členů společnosti na webovém úložišti Dropbox, které umožňuje ukládat a sdílet soubory, aby mohly být průběžně prováděny všechny potřebné úpravy a aktuální soubory byly stále k dispozici všem členům výboru. Editací adresáře a vytvořením a zpřístupněním úložiště byli pověřeni zástupci výboru (Knoll, Kočová, Slaninová).

Prof. Relichová požádala členy výboru, aby na svých pracovištích zveřejnili možnost zakoupit si novou učebnici Genetiky, která v českém překladu právě vyšla a bude představena a uvedena na trh 11. 12. 2017 v Univerzitním kampusu a 13. 12. 2017 v Mendelově muzeu MU v Brně. Nová učebnice bude v těchto dnech prodávána za zvýhodněnou cenu. Všichni členové GSGM budou o této akci informováni mailem.

Prof. Zdražil navrhl udělit čestné členství PhDr. Anně Matalové za mimořádné aktivity na poli historie genetiky. Výbor s návrhem souhlasí a po projednání s kandidátkou bude předložen ke schválení na valném shromáždění na konferenci v Bratislavě.

Zapsala: M. Kočová

Připravujeme Genetickou konferenci 2018 v Bratislavě

Srdečně pozýváme všechny příznivcov genetiky na konferenci Genetickej spoločnosti Gregora Mendela, ktorá sa uskutoční 12. - 14. septembra 2018 v kongresovom centre Družba v Bratislave. Viac informácií o programe a dôležitých dátumoch nájdete na priebežne aktualizovanej stránke: <https://fns.uniba.sk/gsgm2018>

Tešíme sa na stretnutie s Vami.

Za organizátorov,

Ľubomír Tomáška

Katedra genetiky

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave



Připomínka soutěže o Cenu GSGM

Výbor GSGM připomíná, že do 30. dubna 2018 se přijímají přihlášky do soutěže o Cenu GSGM pro období 2017-2018. Podmínky soutěže byly zveřejněny v Informačních listech GSGM č. 48, 2016.

Z Mendelovy korespondence

Anna Matalová

Centrum Mendelianum, Muzejní 1, 602 00 Brno

„Milý Aloisi!

Na základě věcného nálezu, který vystavil Ferdinand, jsi to letos Ty, o němž bylo sumárně jednáno a na něhož je možno v plném souhlasu s právní normou uvalit vánoční trest, který si máš odsedět v Brně, pokud bude žalářování oznámeno dva dny předem. Poněvadž ses dosud nepřihlásil dobrovolně k výkonu trestu, nastupuje použití donucovacích prostředků, čímž se Ti to tímto dává na vědomí.

Pokud se mých osobních pocitů týče, musím přiznat, že proti tomu nemám námitek, zvláště ne tentokrát, kdy chovám tak velkou touhu prohovorit s Tebou jednu důležitou odbornou záležitost.

Srdečné pozdravy Ferdinandovi, jemuž mohu přát jen vše dobré v jeho práci při pitvání, dezinfikování atd; která letos vyplní jeho Vánoce.

V naději, že Tě už brzy uvidím v onom známém vězení, znamenám se, Tvůj vždy věrný spřízněnec Gregor.

Brno 26/12 883.“

Několik dní před svou smrtí žádal Mendel svého staršího synovce Aloise Schindlera, který ve Vídni studoval lékařství, aby se cestou z Vídně zastavil ve starobrněnském klášteře. Potřeboval s ním probrat nějakou odbornou záležitost. Již dříve se Mendel zajímal o to, jak léčí Aloisovi vídeňští profesori nemoci srdce a ledvin. V té době Mendelův synovec Alois studoval interní medicínu u prof. Bambergera. Pamatoval si, že Mendelův puls byl setrvale velmi vysoký. Přesto Mendel zůstal silným kuřákem až do smrti. Ani humor ho celý život neopouštěl. I tento dopis datovaný necelé dva týdny před Mendelovou smrtí odráží jeho veselou mysl. Odborná záležitost se týkala Aloisovy účasti při Mendelově pitvě. Od něho víme, že se pitva konala v chodbě prelatury v prvním poschodí čelního křídla starobrněnského klášteře. Silně mrzlo a mráz komplikoval manipulaci s vodou. Ohledací zprávu zemřelého vystavil 7. ledna H. Kudler, který uvedl, že Mendel zemřel v 1 hodinu v noci 6. 1. 1884 a příčinou jeho smrti bylo srdeční selhání a Morb. Brightii. Podle H. Iltise, který pro svou biografii o Mendelovi získal mnoho informací od rodiny Mendelovy mladší sestry Terezie, a jejích synů Aloise a Ferdinanda, chtěl Mendel pitvou vyloučit případnou zdánlivou smrt. Již od mládí Mendel trpěl opakovanými projevy své vážné „potutelné“ nemoci. Za potutelnou ji označil Mendelův

Informační listy GSGM, 2017, 50: 5–6

spolubratr Matouš Klácel. Mendelova psychosomatická choroba mu zasáhla nepříznivě do gymnaziálního studia v Opavě, filozofického studia v Olomouci, byla příčinou jeho odchodu z pastorační a duchovní činnosti na starobrněnské faře a přivedla jeho neúspěch při zkoušce z učitelské způsobilosti na vídeňské univerzitě. Zřejmě sehrála i svou roli v Mendelově rozhodnutí, že jako jediný syn nepokračoval v selské tradici na zemědělské usedlosti svých rodičů v Hynčicích a životní dráha ho přivedla do starobrněnského kláštera, který v humorně laděném dopisu přirovnává k žaláři.



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

Právě vychází „Anordnung: Mendel's Discovery of Inherited Information“

Lucie Tuzová

Mendelianum, Moravské zemské muzeum, Muzejní 1, Brno



Moravské zemské muzeum vydává na konci letošního roku práci Jiřího Sekeráka pod názvem „Anordnung: Mendel's Discovery of Inherited Information“ (144 stran, ISBN 978-80-7028-491-9). Autor v ní analyzuje historicko-vědní kontext Mendelova objevu a poukazuje na nové možnosti popisu jeho podstaty jako bio-informačního procesu. Podrobným rozбором Mendelovy původní terminologie, zejména pak pojmu Anordnung (uspořádání), který považuje za klíčový, dochází k závěru, že lze zcela legitimně interpretovat Mendelův objev jako objev dědičné informace ve všech podstatných aspektech, které souvisí s dnešní problematikou zkoumání života na informační úrovni. Rovněž tím vysvětluje i důvody, pro které došlo k pocho-

pení Mendelova vědeckého přínosu tak pozdě. Sekerákův přístup tu velmi věrohodně ukazuje Mendelův přesah, který nezůstal dobově omezen. Naopak představuje rozvinutí inspirací pro řešení zcela konkrétních aktuálních otázek současné vědy.



Ing. Mgr. Lucie Tuzová vystudovala biologii na UK v Praze, aktuálně pracuje jako lektorka a kurátorka Centra Mendelianum Moravského zemského muzea.

Mendel Day 2018

Eva Matalová

Centrum Mendelianum, Moravské zemské muzeum, Zelný trh 6, 659 37 Brno

Příští rok se bude konat již třetí ročník mezinárodního Mendelova dne, a to opět 8. března ve výroční den závěrečné části Mendelovy světově proslulé přednášky O pokusech s hybridy rostlin. Ta je neodmyslitelně spjata s Brnem, kde Mendel strávil téměř 40 let svého života. Proto, ač Mendel nebyl rodákem, Brno se pyšní označením město Mendelovo. Mendelovu příslušnost k Brnu a Moravě dokládá i dochovaný domovský list (Archiv Mendeliana, MZM Brno). Z něj se také dozvídáme, že Mendel byl střední postavy, měl blond vlasy a šedé oči.

Mendel Day 2018 je věnován připomenutí 175. výročí Mendelova příchodu do Brna. Shodou životních okolností Mendel nepokračoval v rolnické tradici své rodiny ve slezských Hynčicích, přestože byl jediný syn, od něhož se očekávalo převzetí statku. Johann Mendel se stěhoval do Brna na podzim roku 1843 po studiích v Lipníku, Opavě a Olomouci, kde se jeho existenční podmínky již staly neúnosnými.

Jak píše ve svém životopise: „Jmenovaný se narodil roku 1822 v Hynčicích ve Slezsku, kde jeho otec byl majitelem malého selského statku. Po získání základního vzdělání na tamní vesnické škole a později v piaristické koleji v Lipníku, byl přijat roku 1834 do první gramatikální třídy c. k. gymnázia v Opavě. Čtyři roky později neměli jeho rodiče pro rychle za sebou následující neštěstí možnost uhradit nutné studijní náklady, a tak se tehdy 16letý podepsaný dostal do smutného postavení, že se musel o své živobytí postarat sám. Proto navštěvoval výukový kurs pro „školní kandidáty a soukromé učitele“ při krajské hlavní škole v Opavě, a poněvadž dostal po složení zkoušky o osvědčení

List domovský

Jméno: *Johann Mendel*
 stáří: *21 let*
 stav: *svobodný*
 místo, kde se zdržuje: *Brno*
 náleží do společnosti obce: *Brno*
 a že mu v ní přísluší právo domovské.

Heimathschein

Womit von dem gefertigten Gemeindevorstande bestätigt wird, daß *Johann Mendel*
 Name: *Johann Mendel*
 Beschäftigung: *Lehrer an der hiesigen Schule*
 Alter: *21 Jahre*
 Stand: *ledig*
 Aufenthaltsort: *Brno*
 in den Verband der Gemeinde *Brno* gehört und in derselben das Heimathrecht besitzt.

Derselbe ist:
 von Statur *mittelmäßig*
 hat Haare: *blond*
 „ Augen: *grün*
 „ besondere Kennzeichen: *keine*
 spricht: *deutsch*

Dieser Schein ist auf die Dauer von vier Jahren gültig.

List tento platí na čtyry leta.

Brno, 18. März 1843
M. J. ...
Vice-Regent

způsobnosti nejlepší doporučení, podařilo se mu během humanitních studií soukromým vyučováním vydělat aspoň tolik, že mohl nuzně žít. Po absolvování gymnázia v roce 1840 bylo jeho první starostí, aby si zajistil nutné prostředky pro pokračování ve studiu. Proto se opakovaně pokoušel v Olomouci nabídnout své služby jako soukromý učitel, ale všechny jeho snahy zůstaly bezúspěšné, protože tam neměl ani přátele ani doporučení. Zármutek ze zklamání nadějí a smutná tísnivá vyhlídka do budoucna na něj zapůsobily tak mocně, že onemocněl a musel se rok zotavovat u svých rodičů. V následujícím roce se uctivě podepsaný dostal do kýženého postavení, že našel v Olomouci možnost obživy a tak mohl pokračovat ve svých studiích. S vypětím všech sil mohl absolvovat oba ročníky filozofie.“ Z životopisu je také zřejmé, že to byly právě finanční starosti, které Mendela nasměrovaly do kláštera: „Uctivě podepsaný si uvědomoval, že není schopen nadále snášet takové vypětí, a byl proto po skončení filozofického studia nucen vstoupit do stavu, který by ho zbavil trpkých existenčních starostí, jeho poměry rozhodly o jeho volbě povolání. Požádal v roce 1843 o přijetí do augustiniánského kláštera u sv. Tomáše na Starém Brně a byl téhož roku přijat.“ Zabezpečení vrátilo Mendelovi chuť do dalších studií, která v Brně úspěšně absolvoval, a také do přírodovědného zkoumání: „Jeho materiální postavení se tímto krokem podstatně změnilo. S takovou fyzickou pohodou se uctivě podepsanému navrátila také odvaha a síla, takže s velkou chutí a láskou studoval klasické předměty, předepsané pro zkušební rok. Ve volném čase se zabíral malou botanicko-mineralogickou sbírkou, kterou měl v klášteře k dispozici. Jeho záliba pro obor přírodních věd rostla tím více, čím více nacházel příležitost, jak se s nimi hlouběji seznámit.“

Pro naplnění touhy stát se učitelem absolvoval Mendel po přesídlení do Brna ještě studia na vídeňské univerzitě, a to v letech 1851-1853. Příští rok tedy, kromě 175 let od příchodu Mendela do Brna, uplyne také 165 let od jeho návratu z Vídně do Brna. Proto Mendelianum pozvalo k účasti na Mendel Day 2018 v Brně zástupce *Gregor Mendel Gesellschaft*, se kterou je v dlouhodobém kontaktu. Po pozitivní odezvě nabídlo Mendelianum aktivní účast také zástupcům dalších Mendelových společností. Vzhledem k úzké vazbě Mendeliana k založení GSGM a intenzivní kooperaci s řadou jejích členů nemohlo chybět ani pozvání zástupcům výboru GSGM a nabídka směřovala také k reprezentaci *Japan Mendel Society*, která je jedním ze zahraničních organizátorů Mendelova dne. Na půdě Mendeliana se tak v rámci Mendel Day 2018 sejde triumvirát klíčových Mendelových společností s příležitostí bližšího představení jejich cílů a aktivit, osobního seznámení reprezentantů a vytvoření širší komunikační platformy pro rozvoj a sdílení Mendelova vědeckého a kulturního odkazu. Srdečně zváni jsou samozřejmě všichni členové GSGM i další zájemci! Dopolední program bude věnován Mendelovi - učiteli a studentům, v polední přestávce nabídne Mendelianum k prohlídce výstavu Věda fotogenická, zapůjčenou od AV ČR, odpolední část je tematicky zaměřena na Mendelovy společnosti a bude uzavřena udělením Mendelovy pamětní medaile za rok 2018 generálním ředitelem Moravského zemského muzea. Mendelův den ukončí diskusní část a komentovaná podvečerní procházka Mendelovým Brnem, která představí Mendelovu mnohostrannou osobnost v konkrétních místech jeho působení.

Aktuální informace a bezplatná registrace jsou dostupné na www.mendelianum.cz

Těšíme se na setkání v prostorech, kde Mendel pracoval v odborném kolegiu Hospodářské společnosti, tehdejší moravské vědecké akademie, a to 8. března 2018 od 14 do 17 h (Mendelianum MZM Brno, Muzejní 1, Brno-střed).



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

Komplexní analýza genomů jedinečných bakteriofágů a plazmidů nesoucích geny pro exfoliativní toxiny A a B u *Staphylococcus aureus*

Tibor Botka

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity,
Kotlářská 2, 641 37 Brno

Abstrakt

Staphylococcus aureus je významný oportunní patogen a častý původce bakteriálních nozokomiálních nákaz a toxikóz. Asi 5 % kmenů *S. aureus* produkuje exfoliativní toxiny (ET) A a B, které jsou kódovány geny mobilních genetických elementů a způsobují epidermolytická onemocnění novorozenců a dětí předškolního věku. Mírná lokální forma se nazývá bulózní impetigo, zatímco generalizovaný a život ohrožující stav se označuje jako stafylokokový syndrom opažené kůže (SSSS – *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*).

Cílem této práce je molekulární charakteristika a komparativní analýza genomů dosud nepopsaných eta-pozitivních bakteriofágů čeledi *Siphoviridae* (ETA-fágy) a etb-pozitivních plazmidů (ETB-plazmidy), které byly izolovány z kmenů *S. aureus* zodpovědných za epidermolytická onemocnění v ČR. Analýza genomů ETA-fágů odhalila jejich četné odlišnosti, které se projevily například ve strukturních proteinech virionů. Bylo identifikováno několik oblastí získaných zřejmě rekombinačními procesy. Oba bakteriofágy představují dosud nepopsané typy ETA-fágů, které mají schopnost konvertovat netoxinogenní kmen *S. aureus* na vysoce efektivního producenta ETA, čímž potvrdily svou významnou roli v patogenitě hostitelské bakterie.

Studiem ETB-plazmidů bylo zjištěno, že plazmidy izolované z kmenů *S. aureus* klonálního komplexu CC121 sdílí rozsáhlou oblast sekvence DNA, která zahrnuje geny pro faktory virulence, ETB a EDIN C. Plazmidy této linie dále obsahují variabilní úseky umožňující jejich typové rozlišení. Přestože se dosud předpokládalo, že ETB-plazmidy jsou relativně uniformní, byl v této práci překvapivě izolován a popsán dosud neznámý typ vykazující minimální sekvenční homologii s ostatními ETB-plazmidy. Ten navíc nese geny pro konjugaci a nové varianty genů pro faktory virulence včetně ETB, čímž reprezentuje zcela novou linii ETB-plazmidů. V této práci byla navržena multiplex PCR pro spolehlivou identifikaci všech typů ETB-plazmidů.

Úvod

Bakterie *Staphylococcus aureus* patří mezi nejvýznamnější lidské oportunní patogeny. Je příčinou širokého spektra onemocnění zahrnující jak různé formy kožních infekcí, tak i životu nebezpečné sepse a toxikózy. Výjimečná virulence *S. aureus* je způsobena řadou povrchových a extracelulárních proteinů, které usnadňují vstup bakterie do hostitele

a její další šíření. Geny pro extracelulární faktory virulence jsou často přenášeny mobilními genetickými elementy, které tak vytvářejí jejich neobyčejně široký arzenál umožňující vznik nových toxinogenních kmenů.

Exfoliativní toxiny (ET) A a B jsou extracelulární proteiny zodpovědné za vznik epidermolytických onemocnění, kterými jsou nejčastěji postiženi novorozenci a děti předškolního věku [1,2]. Lokalizovaná forma onemocnění se nazývá bulózní impetigo, zatímco mnohem závažnější generalizovaná forma je označována jako stafylokokový syndrom opařené kůže - SSSS. Zatímco u dětí se mortalita SSSS pohybuje pod 5 %, u dospělých (téměř výhradně imunodeficientních) pacientů dosahuje až 60 % [3]. Teorie o existenci toxinu způsobujícím SSSS se poprvé objevila v roce 1967, ale jeho existence byla potvrzena až v roce 1972 [4,5]. O několik let později byly identifikovány dva sérotypy: ETA a ETB [6,7]. Exfoliativní toxiny patří mezi serinové proteázy, jejichž aminokyselinové sekvence se podobají stafylokokové proteáze V8 [1]. Analýzou krystalické struktury byla odhalena aktivní část, tzv. katalytická triáda histidin-aspartát-serin. Vedle lidí jsou k exfoliatinům citlivé i opice a myši [8]. ETA je termostabilní protein, který se skládá z 242 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 26,9 kDa. ETB je naopak termolabilní protein s molekulovou hmotností 27,3 kDa a je složený z 246 aminokyselin. Aminokyselinové řetězce obou toxinů jsou identické zhruba ze 41 %. Exfoliatiny působí proteolyticky na dezmozomální glykoprotein desmoglein 1 [8]. Fakt, že SSSS postihuje jen svrchní vrstvu pokožky a nikoliv její hlubší vrstvy, lze vysvětlit distribucí izoform desmogleinu [9]. Exfoliatiny hydrolyzují výhradně Dsg1, který je zastoupen rovnoměrně ve všech vrstvách epidermis. Ostatní formy vyskytující se hlouběji ve *stratum basale* a *stratum spinosum* zůstávají intaktní. Rozklad Dsg1 tak není ve svrchních vrstvách kompenzován, čímž dochází k odlučování keratinocytů na úrovni *stratum granulosum* a tvorbě puchýřů [10].

Kmeny *S. aureus* produkující ETA se častěji vyskytují v Evropě a USA, zatímco kmeny produkující ETB především v Japonsku [11,12]. Přestože dermatologický efekt obou toxinů je totožný, zdají se být kmeny produkující ETB virulentnější [3]. Na vzniku SSSS se nejčastěji podílí právě kmeny produkující ETB, zatímco v případě bulózního impetiga výrazná převaha žádného ze sérotypů zjištěna nebyla [13]. Je možné, že aktivita ETB je umocňována působením faktoru EDIN (*Epidermal Cell Differentiation Inhibitor*), který usnadňuje tvorbu a šíření infekčních ložisek [14,15].

Gen kódující ETA je přenášen tzv. ETA-bakteriofágy rodu „*Phietalikevirus*“ z čeledi *Siphoviridae* prostřednictvím lyzogenní konverze [16,17]. Na základě antigenních vlastností kapsidových proteinů a bičíkových vláken jsou řazeny do serologické skupiny B [18]. Jedná se o mírné (temperované) fágy, které mohou svou DNA začlenit do bakteriálního chromozomu ve formě tzv. profága. Prvním ETA-fágem se známým genomem byl fág ϕ ETA [16]. Velikost jeho genomu je 43 kb, obsahuje 66 otevřených čtecích rámců a je tvořen terminálně redundantní a cyklicky permutovanou lineární dsDNA s obsahem G + C 35,4 %. Gen *eta* je tedy lokalizován v terminální části profágové DNA. V oblasti před genem *eta* se nacházejí geny kódující holin (*hol*) a amidázu (*ami*), které tvoří lytickou kazetu. Virion ETA-fága je tvořen hexagonální hlavičkou a nekontraktilním flexibilním bičíkem s malým rozšířením na jeho konci.

Gen kódující ETB je přenášen tzv. ETB-plazmidy, které kódují tvorbu bakteriocinů, rezistenci ke kadmiu a nesou geny pro faktory virulence, např. exfoliativní toxin B a EDIN C [14]. Plazmid pETB_{TY4} byl prvním ETB-plazmidem se známou kompletní nukleotidovou sekvencí. Jeho DNA má velikost 38,2 kb a obsahuje 50 ORF. Zastoupení G + C bylo stanoveno na 27,7 %. Plazmid obsahuje tři kopie IS257, které jej rozděluje na tři

oblasti. První oblast tvoří operonovou oblast pro rezistenci ke kadmiovým iontům. Druhá operonová oblast obsahuje gen pro produkci antibiotik. Třetí oblast nese geny pro plazmidovou replikaci a také dva geny související s virulencí. Jedná se o gen *etb* a gen *edinC*, který kóduje ADP-ribozyltransferázu modifikující GTPázu Rho. Dosud posledním ETB-plazmidem se známou sekvencí je pETB_{TY825} [19], který je odvozen od pETB_{TY4}, a navíc obsahuje 22kb inzerci zahrnující geny pro multirezistenci k antibiotikům. ETB-plazmidy je možné detekovat prostřednictvím identifikace genu *etb*, jehož jsou výhradními nositeli. Nejčastěji je detekován pomocí PCR [20], nicméně žádná z dosud publikovaných metod neumožnila přesnější identifikaci a rozlišení jednotlivých typů ETB-plazmidů, a tedy ani studium jejich diverzity a evoluce.

Cíle disertační práce

Přestože byly popsány první prototypové ETA-fágy i ETB-plazmidy, další studie zabývající se genomovou rozmanitostí těchto elementů chybí. Hlavním cílem této práce byla molekulární charakterizace dvou dosud nepopsaných ETA-konvertujících bakteriofágů a pěti ETB-plazmidů, které byly izolovány z klinických kmenů *S. aureus* zodpovědných za hromadná epidermolytická onemocnění v porodnicích a nemocnicích v České republice v období 1998 - 2015.

Dílčí cíle práce:

1. komparativní analýza genomu a proteomu dvou ETA-bakteriofágů
2. zhodnocení jejich role v horizontální genomice, molekulární epidemiologii a evoluci kmenů *S. aureus*
3. charakteristika klinických kmenů *S. aureus* produkujících ETB
4. komparativní genomová a fylogenetická analýza pěti ETB-plazmidů izolovaných z klinických kmenů *S. aureus*
5. návrh typizační metody pro rozlišení různých typů ETB-plazmidů

Materiál a metody

Bakteriální kmeny

Kmeny *S. aureus* SA166 a SA236 produkující ETA byly izolovány z puchýřů dětských pacientů v letech 2008 a 2009. Kmen SA236 obsahoval geny *eta* i *etb* a patřil do klonálního komplexu CC121. Kmen SA166 nesl jen gen *eta* a byl zařazen do klonálního komplexu CC9. Bezprofágový a netoxinogenní kmen *S. aureus* CCM 4890, který byl použit při lyzogenizaci, byl získán od Dr. Y. Yoshizawy (*Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japonsko*). Pro studium ETB-plazmidů bylo využito 11 ETB-produkujících kmenů *S. aureus* izolovaných z puchýřů dětských pacientů mezi lety 1999 – 2015, další dva byly původci SSSS. Dalších čtrnáct kmenů ze sbírky LMDM bylo využito k verifikaci PCR typizace ETB-plazmidů. Všechny kmeny byly prověřeny na produkci ETB a/nebo ETA, pomocí testu RPLA (*Denka Seiken for Unipath, Tokyo, Japonsko*).

Izolace a propagace bakteriofágů a jejich DNA

Fágy B166 a B236 byly izolovány z kmenů SA166 a SA236 dle [21]. Fágové lyzáty, připravené propagací na kmeni CCM 4890, byly použity pro izolaci fágové DNA, analýzu strukturních proteinů a lyzogenizaci. Plazmidová DNA byla izolována dle instrukcí výrobce pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, SRN) a bakteriální DNA kitem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, SRN).

Analýza restrikčních fragmentů a PCR genotypizace

Fágová DNA byla štěpena restrikční endonukleázou *Hind*III (Roche Diagnostics, SRN). Plazmidová DNA byla štěpena *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I a *Xba*I (Roche Diagnostics, SRN). Restrikční fragmenty byly analyzovány gelovou elektroforézou. Restrikční fragmenty *Sma*I DNA lyzogenizovaných kmenů byly rozděleny pomocí CHEF Mapper (Bio-Rad Laboratories) při následujících podmínkách: 1,2% agaróza v 1×TAE pufru při 14 °C, 6V cm⁻¹, pulzy od 1 s do 55 s po dobu 24 h. Fágy byly zařazeny do ETA-B skupin a sero skupin, v jejich genomech byly detekovány geny *eta*, *etb* a *etd*. Charakterizace kmenů *S. aureus* zahrnovala MLST, *spa*-typizaci, *agr*-typizaci a detekci genů pro faktory virulence a rezistence (uvedeno v [22]). ETB-plazmidy byly identifikovány a typizovány dle [22].

Sekvenování DNA, bioinformatická analýza

Sekvence fágových genomů byly získány metodou 454 sekvenování systémem GS Junior (Roche 454 Life Science, USA). Sekvence plazmidů byly získány systémem MiSeq (Illumina, USA). Vzorky byly připraveny dle instrukcí výrobce. Získané sekvence byly složeny, anotovány a analyzovány. Sekvence fágů a plazmidů byly uloženy do databáze GenBank: fág B166 (přístupový kód KP893289), fág B236 (KP893290), pETB049 (KY436021), pETB459 (KY436022), pETB608 (KY436023), pETB791 (KY436024) a pETB797 (KY436025).

Analýza strukturních fágových proteinů

Příprava a purifikace virionových proteinů a proteomická analýza pomocí vertikální 1-DE SDS PAGE a LC-MS/MS je popsána v [23].

Výsledky a diskuze

Charakteristika dvou nových ETA-bakteriofágů B166 a B236

Fágy byly zařazeny do seroskupiny B a typu ETA-B6 (ΦB166), respektive ETA-B5 (ΦB236). Zatímco profágy typu ETA-B5 byly dříve identifikovány u 24 kmenů *S. aureus* izolovaných v osmi českých porodnicích, profágy typu ETA-B6 se vyskytovaly u 17 kmenů pocházejících z dvou poměrně vzdálených nemocnic [12]. Horizontální přenos genu *eta* byl potvrzen lyzogenizací *eta* negativního kmene *S. aureus* oběma fágy zvlášť. V obou případech došlo k úspěšné lyzogenní konverzi netoxinogenního kmene na vysoce efektivního producenta exfoliativního toxinu A. Stejně jako u předchozích studií [21] se

DNA ETA-fágů začlenila do druhého největšího restrikčního fragmentu *Sma*I (velikost ~365 kb) recipientního kmene.

Metodou 454 pyrosequenování systémem GS Junior (Roche) byly stanoveny kompletní sekvence genomů fágů ϕ B166 a ϕ B236. Oba genomy byly anotovány. Vedle identifikace otevřených čtecích rámců a jejich produktů byly predikovány i promotory a terminátory. Genom ϕ B166 má velikost 42,9 kb a obsahuje 64 ORF, které tvoří 94,4 % genomu. V sekvenci bylo identifikováno 12 promotorů a 5 terminátorů nezávislých na rho faktoru. Genom ϕ B236 má velikost 43,2 kb, obsahuje 67 ORF (93,7 % genomu), 13 promotorů a 7 terminátorů nezávislých na rho faktoru. Obsah G + C je u obou fágů srovnatelný s jinými B fágy. Na základě funkčního uspořádání, plynoucího z pozice predikovaných regulačních elementů a modulárního uspořádání, byly fágové genomy rozděleny na pět oblastí: oblast I obsahuje geny pro lyzogenii a regulaci transkripce, oblast II geny pro replikaci DNA, oblast III geny pro terminázu a strukturní kapsidové proteiny, oblast IV nese geny pro proteiny bičíku a v oblasti V jsou geny pro lyzy a gen *eta*. Analýza virionových proteinů metodou SDS-PAGE potvrdila hlavní rozdíly ve velikosti kapsidových proteinů obou fágů, na což ukazovaly i rozdíly v odpovídajících genech. Podobně byly již dříve popsány i rozdíly v kapsidových proteinech ETA-fágů B557 a B122 [21].

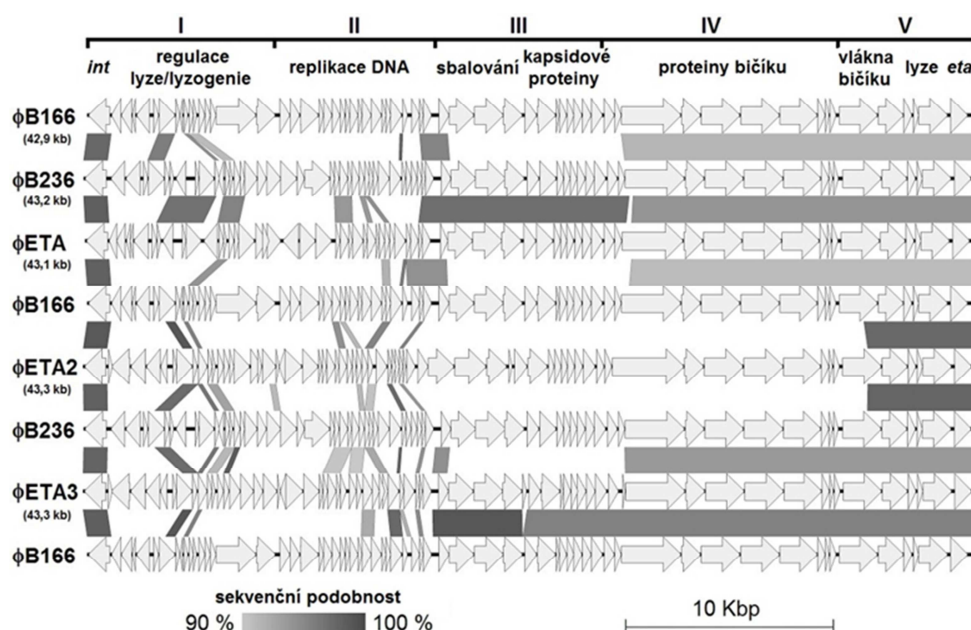
Srovnávací analýza genomů ETA-fágů B166 a B236

Na základě sekvenční analýzy lze konstatovat, že fágy B166 a B236 nejsou blízce příbuzné jak navzájem, tak ani v porovnání s již popsanými ETA-fágy (obr. 1). Fág B166 vykazuje sekvenční podobnost 51 % s ϕ ETA, 36 % s ϕ ETA2, 67 % s ϕ ETA3 a 54 % s fágem B236. V porovnání s non-eta fágy vykazuje ϕ B166 více než 60% shodu s ϕ NM4 a ϕ 96. Vysoká sekvenční shoda oblasti III ϕ B166 s non-eta fágy ukazuje na možnost společného předka. Je také možné, že oblast III byla získána rekombinací během koreplikace s těmito fágy. Fág B236 vykazuje sekvenční podobnost 78 % s fágem ϕ ETA, 37 % s ϕ ETA2, 58 % s ϕ ETA3 a 53 % s fágem B236. Z non-eta fágů jsou mu nejpodobnější sekvence ϕ 71 a ϕ 29 se shodou asi 70 %. Vysoce variabilní oblasti I a II ϕ B166 a ϕ B236 se od ostatních ETA-fágů liší nejvíce. Naopak největší sekvenční shoda byla zaznamenána v genu pro integrázu a v oblasti V, která obsahuje gen *eta* kódující exfoliativní toxin A. Stejně jako ϕ ETA, ani fágy B166 a B236 nenesou gen *xis* pro excizi. Z toho lze usuzovat, že vyčlenění genomu těchto fágů z hostitelského chromozomu je umožněno jiným faktorem, než u fágů ETA2 a ETA3. Rozdíly v pozicích regulačních sekvencí v genomech ETA-fágů jsou dány zejména variabilitou oblasti II a obsahem pravděpodobných moronů (např. ORF09 fága B166, ORF08 a 12 fága B236), které mají vlastní promotor a terminátor.

Genomový mozaicismus bakteriofágů

Mírné fágy jsou typické mozaikovitou strukturou svých genomů, vyplývající z rekombinací při souběžné infekci hostitelské bakterie [24]. Geny pro rekombinační proteiny byly nalezeny v ϕ B166 i ϕ B236. Na základě nízké hodnoty G + C a predikce pomocí InterPro, bylo identifikováno několik genů či sekvencí získaných pravděpodobně rekombinací. Genom ϕ B236 obsahuje i tři geny bez homologie ke známým sekvencím v databázi GenBank (*orf31*, *orf32* a *orf35*). Relativně velká část genomu ϕ B166 (ORF14-22) je ho-

mologní s odpovídající oblastí některých fágů skupiny F (NM3, PVL a JS01). Místa rekombinace byly pravděpodobně okrajové části sekvencí odpovídající ORF13 a 23 ϕ B166, které se nacházejí i u zmíněných fágů F.



Obr. 1: Porovnání známých genomů ETA-fágů. Srovnání genomových map fágů ϕ B166, ϕ B236, ϕ ETA, ϕ ETA2 a ϕ ETA3. Oblasti I-V jsou znázorněny v horní části. Geny jsou znázorněny šipkami, nekódující oblasti přímkou. Sekvenční podobnost je vyjádřena intenzitou zástinu. Velikost genomu je uvedena v závorce pod označením fága.

Podle současného dělení čeledi *Siphoviridae* patří oba studované fágy do podskupiny I rodu „*Phietalikevirus*“ [17]. Zajímavostí je však přítomnost genu pro protein s HNH endonukleázovou doménou (ORF32) u ϕ B236, která je typická pro zástupce rodu „*3alikevirus*“. Dále bylo zjištěno, že vyjma sekvence genu *eta* a jeho promotoru je oblast V homologní s odpovídající oblastí profága kmene *S. aureus* 04-02981 (CP001844). To naznačuje, že gen *eta*, včetně promotoru, byl rekombinací začleněn do operonu tzv. lytické kazety mezi gen *ami* a terminátor. Toto zjištění je v rozporu s dřívější teorií o aberantní excizi profága, jakožto příčiny zisku genu *eta* [16].

Charakterizace kmenů produkujících ETB

Byla provedena molekulární charakterizace 13 *etb*-pozitivních klinických kmenů *S. aureus*, které byly izolovány v českých nemocnicích mezi roky 1999 – 2015 (tab. 1). Ze 13 kmenů bylo 10 kmenů sekvenčního typu ST121, jeden kmen ST2276 a jeden ST123. Tyto sekvenční typy jsou součástí klonálního komplexu CC121. U šesti kmenů produkujících ETA byl gen *eta* lokalizován na profázích, které patřily výhradně do skupiny ETA-B1, nebo ETA-B5, což je v souladu s dříve publikovanými výsledky [12]. Z genů virulence (geny pro enterotoxiny a PVL, *tst*, *mecA*) byly prokázány superantigenní geny pro enterotoxiny *sea*, *seg* a *sei*. Bezprofágový kmen 608 genotypu ST130/*spa* t843,

který byl izolován z pacienta s bulózním impetigem v roce 2011, produkoval jen ETB a obsahoval jeden ETB-plazmid. Jak ukázaly restriční a sekvenční analýzy, jednalo se o zcela nový a dosud nepopsaný typ. Hostitelský kmen 608 byl *agr* typu III, zatímco u ostatních kmenů byl detekován *agr* typ IV.

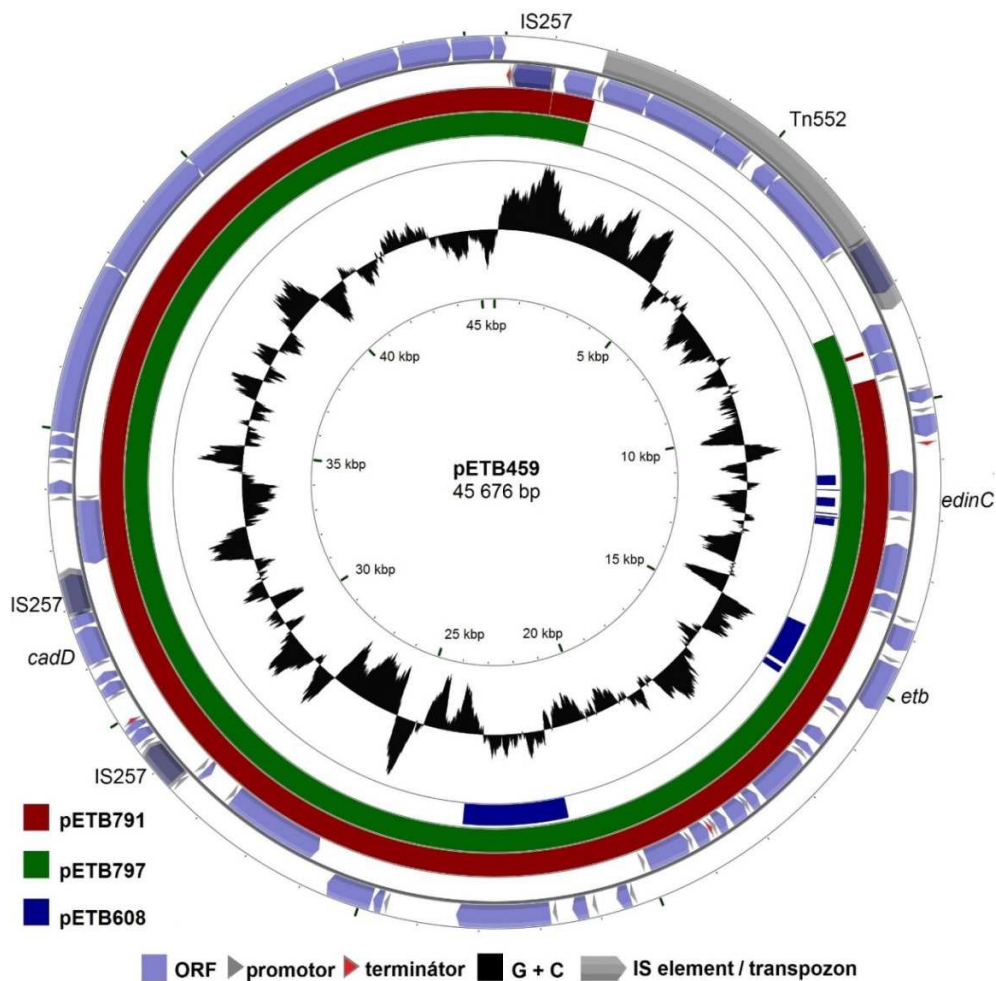
Tab. 1: Molekulární charakteristika 13 klinických kmenů produkujících ETB

kmen	klinický původ	MLST	<i>spa</i> typ	typ ETB plazmidu	profágy	gen <i>eta</i>	ETA-B typ
791	dítě, puchýř	ST121	t159	I	B, Fb	+	B5
445	personál, nos	ST121	t159	II	A, B, Fb	+	B1
507	dítě, puchýř	ST121	t159	III	Fb	-	-
586	dítě, puchýř	ST121	t169	I	B, Fb	+	B5
013	dítě, puchýř	ST121	t169	II	-	-	-
459	dítě, puchýř	ST121	t169	III	Fb	-	-
049	dítě, SSSS	ST121	t916	II	A, B, Fb	+	B1
797	dítě, puchýř	ST121	t916	II	A, B, Fb	+	B1
497	dítě, SSSS	ST121	t272	II	-	-	-
151	dítě, puchýř	ST121	t645	II	Fb	-	-
618	dítě, nos	ST123	t1688	II	Fb	-	-
420	dítě, puchýř	ST2276	t876	II	B, Fb	+	B1
608	dítě, puchýř	ST130	t843	V	-	-	-

Srovnání plazmidů podobných pETB_{TY4}

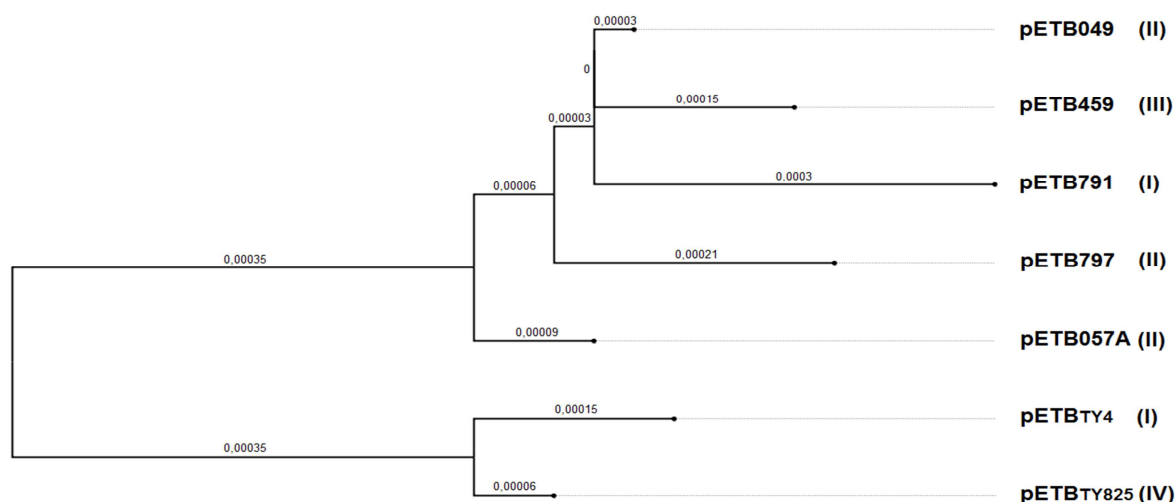
Již první analýzy pomocí štěpení plazmidové DNA restričními endonukleázami odhalily rozdílná spektra restričních fragmentů izolovaných plazmidů (tab. 1). Proto byla stanovena sekvence DNA reprezentativních zástupců jednotlivých typů restričních spekter. Byly složeny kompletní genomové sekvence plazmidů pojmenovaných pETB049 (KY436021), pETB459 (KY436022), pETB791 (KY436024) a pETB797 (KY436025). Velikost plazmidů se pohybovala mezi 37,3 až 45,7 kb. Sekvence byly anotovány a srovnány s již známými ETB plazmidy pETB_{TY4} (AP003088), pETB_{TY825} (AP012457) a SAP057A (GQ900415) [14,19].

Bylo zjištěno, že všechny výše zmíněné ETB-plazmidy obsahují společnou jádrovou sekvenci o velikosti 33 kb, a proto byly pojmenovány jako „pETB_{TY4}-based“ plazmidy (tzn. plazmidy odvozené od archetypálního pETB_{TY4}). Tyto plazmidy se navzájem liší obsahem dvou variabilních oblastí, na základě čehož byly rozděleny do čtyř typů pETB (obr. 2). První oblast se nachází mezi geny pro resolvázu a protein spojený s replikací, zatímco druhá mezi genem fágové rezistence *abiK* a genem pro transponázu. Plazmidy typu I neobsahují v těchto oblastech žádnou inzerci. U plazmidů typu II a III je v první oblasti lokalizován replikační gen *repA*, který je rozdělen předčasným terminačním kodonem na dvě části. U typu III mu předchází transpozon Tn552 kódující beta-laktamázu [25]. Druhá oblast, mezi *abiK* a genem pro transponázu, obsahuje u všech „pETB_{TY4}-based“ plazmidů operon kódující geny rezistence ke kadmiu. Z porovnání sekvencí *cad* operonu pETB_{TY825} a ostatních ETB-plazmidů vyplývá, že se jeho uspořádání i původ liší. Plazmid pETB_{TY825} typu IV obsahuje v této části také asi 22 kb velkou inzerci, která kóduje multi-rezistenci k antibiotikům [19].



Obr. 2: Srovnání genomu pETB459 (typ III) s ETB-plazmidy typu II, III a V

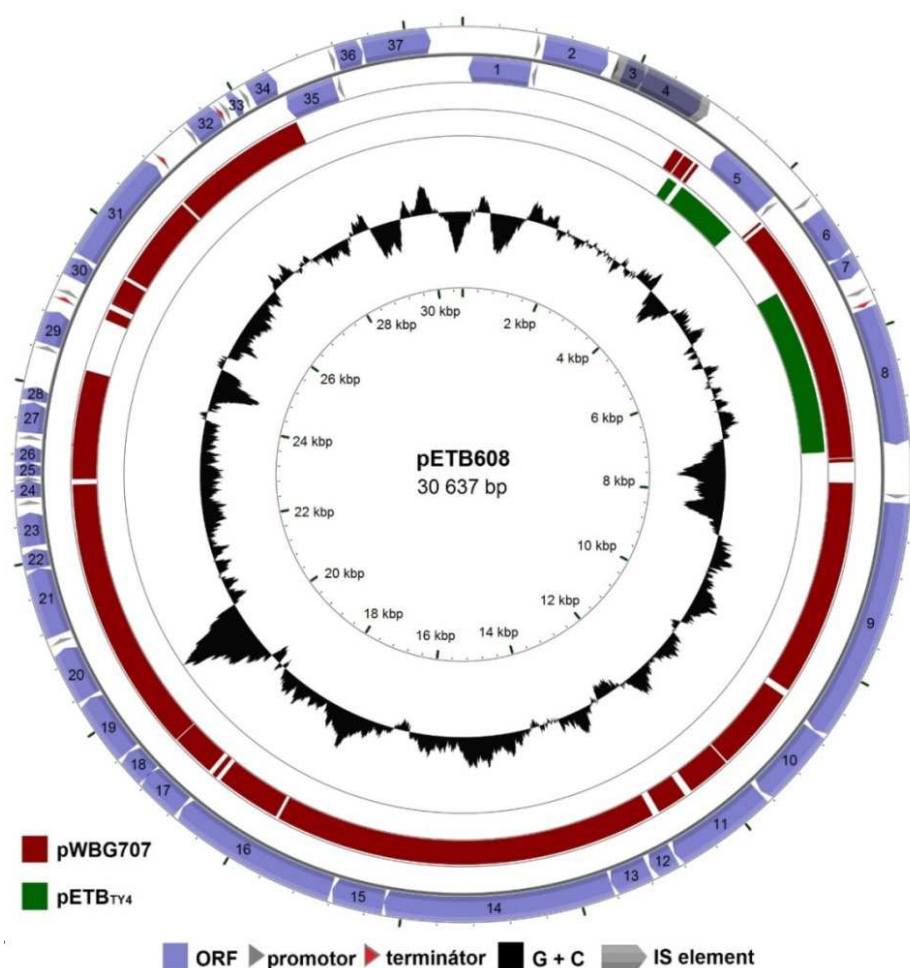
Fylogenetický strom plazmidů podobných pETB_{TY4} se dělí na dvě větve, které odpovídají geografickému výskytu hostitelských kmenů (obr. 3). Jedna zahrnuje evropské izoláty a druhá izoláty japonské. Typ pETB II a je zřejmě evolučně nejstarší, přičemž plazmidy typu III vznikly následnou inzercí transpozonu Tn552. Zatímco geny rezistence byly získány integrací inzerčních sekvencí a transpozonů (u typu pETB III a IV), gen *repA* je pravděpodobně původní (typ II a III). Jeho čtecí rámec je rozdělen předčasným terminačním kodonem, a je tak zřejmě nefunkční. Gen *repA* byl deletován nezávisle u evropských izolátů typu pETB I a společného předka japonských izolátů typu pETB I a IV. Typ IV vznikl po rekombinaci *cad* operonu a zisku velké inzerce s geny multirezistence.



Obr. 3: Fylogenetický strom „pETB_{TY4}-based“ plazmidů. Délka větví odpovídá uvedenému počtu substitucí na jednu pozici.

Analýza genomu a fylogeneze pETB608

Analýza plazmidu pETB608 ukázala, že se jedná o nový typ, který je zcela odlišný od plazmidů příbuzných pETB_{TY4} (obr. 2 a 4). Plazmid pETB608, zařazený do typu V, je výrazně menší (30,6 kb) a má vyšší obsah G + C než ostatní ETB-plazmidy. V jeho sekvenci bylo identifikováno 37 genů, 18 promotorů a 4 terminátory nezávislé na rho faktoru. Dále byla identifikována nová inzerční sekvence IS608. Oproti jiným ETB-plazmidům nebyly v pETB608 nalezeny geny pro rezistenci k antibiotikům ani těžkým kovům. Zatímco všechny „pETB_{TY4}-based“ plazmidy kódují identický exfoliativní toxin B, plazmid pETB608 kóduje jeho dosud nepopsanou variantu o stejné velikosti, ale pouze s 84% shodou v proteinové sekvenci. Plazmid pETB608 kóduje i další dvě serinové proteázy trypsinového typu, které patří do rodiny S1B peptidáz stejně jako exfoliativní toxiny. Tyto proteázy vykazují asi 50% podobnost s proteázami druhu *Streptococcus didelphis* (WP_018367156), respektive *Staphylococcus pseudintermedius* (WP_015728600). Vícenásobné přiložení proteinových sekvencí ETB, SP608A, SP608B a ETA ukázalo na několik konzervativních oblastí včetně katalytické triády. Plazmid pETB608 dále kóduje dva proteiny podobné EDIN A. První z nich vykazuje 93% shodu se stejně velkým prekurzorem proteinu EDIN A, a je tak možné jej považovat za jeho novou variantu. Druhý, se sekvenční shodou s EDIN A 65%, je pravděpodobně zkrácen vlivem genomových přestaveb. Gen, který jej kóduje, se nachází na okraji oblasti, která nese pravděpodobné faktory virulence a jako celek nevykazuje výraznou podobnost s jiným záznamem v GenBank (obr. 4). Inhibiční účinek faktorů EDIN A a EDIN C na epidermální diferenciaci a růst byly popsány již dříve [26,14].



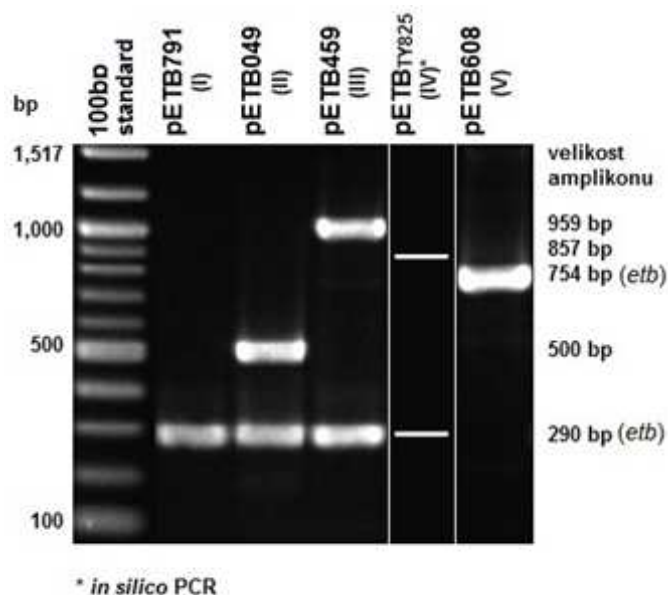
Obr. 4: Srovnání genomu pETB608 (typ V) s plazmidem ETB_{TY4} (typ I) a pWBG707. Jednotlivé ORF jsou číslovány dle [22]. Geny vykazující podobnost s ostatními ETB-plazmidy ETB: *orf5*, exfoliativní toxin B; *orf7*, transkripční regulátor; *orf8*, primáza. Geny pro konjugaci: *orf9* – *orf29*.

Ze získaných poznatků vyplývá, že všechny ETB-plazmidy nesou geny pro faktory EDIN. Mezi kmeny produkujícími EDIN A a C se předpokládá blízká příbuznost [27], což je v souladu s naší hypotézou o vzniku genomu pETB608. Ten je pravděpodobně odvozen z konjugativního plazmidu pWBG707, který byl izolován z malajsijského kmene *S. aureus* v roce 1992 [28]. Oproti němu má deletovanou oblast zahrnující gen *dhfr* pro rezistenci k trimethoprimu. Dále v genomu pETB608 došlo k rekombinacím vedoucím ke zkrácení několika genů a zisku oblasti nesoucí geny virulence (obr. 4). K těmto postupným změnám došlo nejspíše v asijských kmenech *S. aureus*, které nesly plazmidy typu pETB_{TY4} a také plazmidy s genem *edinA*. Přítomnost *tra* operonu u pETB608 předjímá schopnost horizontálního přenosu tohoto plazmidu konjugací. Přítomnost genů *traA-M* není asociována s žádnou vývojovou linií *S. aureus* [29], a proto je pravděpodobné, že pETB608 a jemu podobné plazmidy nejsou vázány výlučně na kmeny sekvenčního typu ST130. Mechanismus horizontálního přenosu plazmidů příbuzných pETB_{TY4} není dosud znám. Tyto plazmidy nemají geny *tra* ani *mob* umožňující konjugaci či mobilizaci. Přes

značnou velikost ETB-plazmidů zůstává nejpravděpodobnějším způsobem horizontálního přenosu fágem zprostředkovaná transdukce [30].

Metody identifikace a diferenciací ETB-plazmidů

Protože bylo v této práci identifikováno a popsáno několik typů ETB-plazmidů, byla navržena multiplex PCR sloužící k jejich rozlišení. Bylo prověřeno nejen 13 charakterizovaných kmenů (tab. 1), ale také dalších 14 klinických kmenů *S. aureus* produkujících ETB z laboratorní sbírky. Reakce byla spolehlivě ověřena jak na bakteriální, tak na plazmidové DNA. Multiplex PCR je založena na detekci sekvencí specifických pro jednotlivé typy pETB (obr. 5). Primery byly navrženy tak, aby byla amplifikována oblast zahrnující část společné jádrové sekvence a část navazující variabilní oblasti. Tím bylo docíleno specifity pro ETB-plazmidy. Nejčastěji byl detekován typ pETB II (14 plazmidů), dále pETB I (8 plazmidů), pETB III (4 plazmidy) a nakonec typ pETB V (1 plazmid). V této práci nebyl detekován žádný plazmid typu pETB IV, do kterého spadá v Japonsku izolovaný pETB_{TY825}. Dříve používané primery pro detekci genu *etb* vykazují četné nekomplementární pozice v cílových sekvencích u pETB608, což vedlo k rozporuplným výsledkům. Primery navržené v této práci jsou proto pro detekci *etb*, včetně jeho nové varianty, vhodnější.



Obr. 5: Multiplex PCR pro typizaci pETB. Použité primery a podmínky jsou uvedeny v [22].

Závěr

V této práci byly popsány dva nové typy bakteriofágů obsahující gen *eta*. Genomy fágů ϕ B166 a ϕ B236 byly detailně charakterizovány a porovnány nejen s ostatními zástupci různorodé skupiny fágů serologické skupiny B kódujících exfoliativní toxin A, ale i s fágy ostatních skupin negativními na gen *eta*. Toto srovnání ukázalo, že oba představují no-

vé linie dosud nepopsaných tzv. ETA-konvertujících bakteriofágů. Četné sekvenční rozdíly, často heterogenního původu, mohou být využity pro detailní klasifikaci ETA-fágů, ale hlavně poukazují na jejich velkou různorodost vlivem mozaikovitě struktury genomu a rekombinační nezávislosti jednotlivých modulů. Z tohoto důvodu představují významný a stále se měnící zdroj genů, které mohou podléhat rekombinaci s koreplikujícími se fágy nebo chromozomální DNA hostitelských kmenů *S. aureus*, a tím ovlivnit jejich patogenitu.

Dalším neméně důležitým zdrojem virulenčních faktorů, včetně genu pro exfoliativní toxin B, jsou ETB-plazmidy. Ty kódují několik významných genů zvyšujících invazivitu kmenů *S. aureus* produkujících ETB. Především to jsou geny pro faktory EDIN, bakteriociny a geny rezistence k antimikrobiálním látkám. Epidermolytické kmeny *S. aureus* klonálního komplexu CC121 nesou společně s ETB-plazmidem často i ETA-profága typu ETA-B1, nebo ETA-B5. Jak se tyto mobilní genetické elementy navzájem ovlivňují a jaký dopad má jejich současná přítomnost na fenotyp hostitelského kmene, není dosud objasněno.

ETB-plazmidy byly dosud považovány za vysoce konzervativní MGE. Toto je částečně potvrzeno existencí jádrové sekvence společné pro všechny plazmidy podobné prvotně popsánému pETB_{TY4}. Plazmidy této linie se vzájemně liší ve dvou variabilních oblastech, které mohou nést geny pro antimikrobiální rezistenci a dodatečný gen *repA*. Na základě těchto zjištění byly tyto ETB-plazmidy rozděleny do čtyř sekvenčních typů a byla provedena jejich fylogenetická analýza. Společně s předchozími studiemi se potvrdila asociace mezi ETB-plazmidy podobnými pETB_{TY4} a kmeny *S. aureus* CC121. Existence několika málo variant a zachování jádrové sekvence naznačuje, že se tyto ETB-plazmidy šíří především vertikálně, zatímco horizontální přenos je velmi vzácný.

Nově byl objeven a popsán unikátní plazmid pETB608, který představuje zástupce zcela odlišné linie ETB-plazmidů. Pochází z kmene klonálního komplexu CC130 a nese nejen novou variantu genu *eta*, ale také pro ETB-plazmidy netypické geny podobné *edinA*. Byly identifikovány i geny kódující predikované serinové proteázy trypsinného typu podobné exfoliativním toxinům. Objasnění jejich role při epidermolytických či jiných infekcích však vyžaduje další výzkum. Pro horizontální přenos plazmidu pETB608 je zcela zásadní přítomnost genů pro konjugativní přenos. Přestože schopnost konjugace není u plazmidů *S. aureus* příliš častá, představuje novou možnost přenosu genu *eta* do kmenů mimo CC130 i dosud typický CC121, a tím vznik epidermolytických kmenů s novými vlastnostmi. Tato práce poskytla novou metodu pro rychlou a spolehlivou diferenciaci ETB-plazmidů za použití plazmidové i celkové bakteriální DNA klinických kmenů. Zahrnuje i nově popsanou variantu *etb*, která byla stávajícími metodami obtížně detekovatelná.

Poděkování

Práce vznikla s finanční podporou grantu IGA NT12395-5 (Ministerstvo zdravotnictví ČR), MUNI/A/0967/2015, QJ1510216 (Ministerstvo zemědělství ČR) a projektu AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01 (MŠMT ČR).

Literatura

1. Ladhani, S., Joannou, C.L., Lochrie, D.P., Evans, R.W., Poston, S.M., 1999. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 224–242.
2. Jeyakumari, D., Gopal, R., Eswaran, M., Maheshkumar, C., 2009. Staphylococcal scalded skin syndrome in a newborn. *J. Glob. Infect. Dis.* 1, 45–47.
3. Mulligan, M.E., Murray-Leisure, K.A., Ribner, B.S., Standiford, H.C., John, J.F., Korvick, J.A., Kauffman, C.A., Yu, V.L., 1993. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am. J. Med.* 94, 313–328.
4. Lyell, A., 1967. A review of toxic epidermal necrolysis in Britain. *Br. J. Dermatol.* 79, 662–671.
5. Melish, M.E., Glasgow, L.A., Turner, M.D., 1972. The staphylococcal scalded-skin syndrome: isolation and partial characterization of the exfoliative toxin. *J. Infect. Dis.* 125, 129–140.
6. Kondo, I., Sakurai, S., Sarai, Y., 1974. New type of exfoliatin obtained from staphylococcal strains, belonging to phage groups other than group II, isolated from patients with impetigo and Ritter's disease. *Infect. Immun.* 10, 851–861.
7. Wiley, B.B., Rogolsky, M., 1977. Molecular and serological differentiation of staphylococcal exfoliative toxin synthesized under chromosomal and plasmid control. *Infect. Immun.* 18, 487–494.
8. Amagai, M., Matsuyoshi, N., Wang, Z.H., Andl, C., Stanley, J.R., 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat. Med.* 6, 1275–1277.
9. Arneemann, J., Sullivan, K.H., Magee, A.I., King, I.A., Buxton, R.S., 1993. Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *J. Cell. Sci.* 104, 741–750.
10. Bukowski, M., Wladyka, B., Dubin, G., 2010. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 2, 1148–1165.
11. Lamand, V., Dauwalder, O., Tristan, A., Casalegno, J.S., Meugnier, H., Bes, M., Dumitrescu, O., Croze, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., 2012. Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E514–521.
12. Růžicková, V., Pantůček, R., Petráš, P., Machová, I., Kostýlková, K., Doškař, J., 2012. Major clonal lineages in impetigo *Staphylococcus aureus* strains isolated in Czech and Slovak maternity hospitals. *Int. J. Med. Microbiol.* 30, 237–241.
13. Yamasaki, O., Yamaguchi, T., Sugai, M., Chapuis-Cellier, C., Arnaud, F., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., 2005. Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1890–1893.
14. Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Asakawa, K., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Sugai, M., 2001. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect. Immun.* 69, 7760–7771.
15. Munro, P., Benchetrit, M., Nahori, M.-A., Stefani, C., Clément, R., Michiels, J.-F., Landraud, L., Dussurget, O., Lemichez, E., 2010. The *Staphylococcus aureus*

- epidermal cell differentiation inhibitor toxin promotes formation of infection foci in a mouse model of bacteremia. *Infect. Immun.* 78, 3404–3411.
16. Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Nakasone, K., Ohnishi, M., Nakayama, K., Yamada, S., Komatsuzawa, H., Sugai, M., 2000. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 38, 694–705.
 17. Gutiérrez, D., Adriaenssens, E.M., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., Kropinski, A.M., García, P., 2014. Three proposed new bacteriophage genera of staphylococcal phages: "*3alikevirus*", "*77likevirus*" and "*Phietalikevirus*". *Arch. Virol.* 159, 389–398.
 18. Pantůček, R., Doškař, J., Růžicková, V., Kašpárek, P., Oráčová, E., Kvardová, V., Rosypal, S., 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Virol.* 149, 1689–1703.
 19. Hisatsune, J., Hirakawa, H., Yamaguchi, T., Fudaba, Y., Oshima, K., Hattori, M., Kato, F., Kayama, S., Sugai, M., 2013. Emergence of *Staphylococcus aureus* carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 6131–6140.
 20. Růžicková, V., Voller, J., Pantůček, R., Petráš, P., Doškař, J., 2005. Multiplex PCR for detection of three exfoliative toxin serotype genes in *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.* 50, 499–502.
 21. Holochová, P., Růžicková, V., Pantůček, R., Petráš, P., Janisch, R., Doškař, J., 2010. Genomic diversity of two lineages of exfoliative toxin A-converting phages predominating in *Staphylococcus aureus* strains in the Czech Republic. *Res. Microbiol.* 161, 260–67.
 22. Botka, T., Růžicková, V., Svobodová, K., Pantůček, R., Petráš, P., Čejková, D., Doškař, J., 2017. Two highly divergent lineages of exfoliative toxin B-encoding plasmids revealed in impetigo strains of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 307, 291–296.
 23. Botka, T., Růžicková, V., Konečná, H., Pantůček, R., Rychlík, I., Zdráhal, Z., Petráš, P., Doškař, J., 2015. Complete genome analysis of two new bacteriophages isolated from impetigo strains of *Staphylococcus aureus*. *Virus Genes* 51, 122–131.
 24. De Paepe, M., Hutinet, G., Son, O., Amarir-Bouhram, J., Schbath, S., Petit, M-A., 2014. Temperate phages acquire DNA from defective prophages by relaxed homologous recombination: The role of Rad52-Like recombinases. *PLoS Genet.* 10, e1004181.
 25. Rowland, S.J., Dyke, K.G., 1990. Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 4, 961–975.
 26. Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Sugai, M., Weber, P.C., 1997. Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1623–1629.
 27. Czech, A., Yamaguchi, T., Bader, L., Linder, S., Kaminski, K., Sugai, M., Aepfelbacher, M., 2001. Prevalence of Rho-inactivating epidermal cell differentiation inhibitor toxins in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Infect. Dis.* 184, 785–788.
 28. Udo, E.E., Wei, M.Q., Grubb, W.B., 1992. Conjugative trimethoprim resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 76, 243–248.

29. McCarthy, A.J., Lindsay, J.A., 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BMC Microbiol.* 12, 104.
30. Varga, M., Kuntová, L., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Růžicková, V., Doškař, J., 2012. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol. Lett.* 332, 146–152.



Mgr. Tibor Botka, Ph.D. je absolventem oboru Molekulární a buněčná biologie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Svou doktorskou disertační práci (školitelka doc. RNDr. Vladislava Růžicková, CSc.) obhájil v roce 2017. (E-mail: tibor.botka@mail.muni.cz)

Využití metody RNA interference (RNAi) ke studiu onkogenních vlastností viru Kaposiho sarkomu (KSHV)

Petra Riegerová

Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Studničkova 7,
128 00 Praha 2 - Albertov

Úvod

Vznik nádorového onemocnění je mnohastupňový proces, při kterém dochází k deregulaci buněčné proliferace a růstu. Přibližně 20% úmrtí spojených s rakovinou je primárně zapříčiněno infekcí (Anand P. et al., 2008), přičemž nejčastějším infekčním agens způsobujícím rakovinu jsou viry. Do skupiny onkogenních virů patří RNA i DNA viry.

Virus Kaposiho sarkomu (KSHV; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus), známý také jako lidský herpesvirus 8 (HHV8), je onkogenní DNA virus. Tento člen gama-herpesvirové subrodiny je asociován se všemi klinickými formami Kaposiho sarkomu (KS) a se dvěma lymfoproliferativními onemocněními: primárním efuzním lymfomem (PEL) a Castlemanovou chorobou (MCD, multicentric Castleman disease) (Cesarman E. et al., 1995; Soulier J. et al., 1995; Wen K.W. a Damania B., 2010). Genomem KSHV je lineární dvouřetězcová DNA o velikosti 165kbp (Russo R. et al., 1996), kódující nejméně 87 otevřených čtecích rámců (ORF) tvořících 140kbp velkou centrální oblast, obklopenou rozsáhlou 801bp dlouhou, nekódující GC-bohatou (85%) koncovou repeticí (Lagunoff M. a Ganem D., 1997). Některé z genů KSHV vykazují blízkou homologii s buněčnými geny, jenž regulují buněčný růst, imunitní a zánětlivou odpověď či apoptózu (Boshoff C. et al., 1997; Molden J. et al., 1997; Thome M. et al., 1997; Bais C. et al., 1998; Moore P.S. a Chang Y., 1998; Lubyova B. a Pitha P.M., 2000).

Během latentní infekce je virová DNA uchovávána v podobě cirkulárního epizomu, jenž asociuje s buněčnými histony a perzistuje jako neintegrováný minichromozom v jádře infikovaných buněk (Toth Z. et al., 2013). V této fázi dochází k expresi pouze několika latentních genů, odpovědných za proliferaci hostitelské buňky, prevenci apoptózy a udržení extrachromozomálního virového genomu během dělení (Dittmer D. et al., 1998; Sarid R. et al., 1998; Talbot S.J., 1999; Fakhari F.D. a Dittmer D.P., 2002; Lu M. et al., 2004; Chandriani S. a Ganem D., 2010). Zkoumání latentní fáze infekce vedlo k identifikaci několika latentních genů, k jejichž expresi dochází u všech lymfoproliferativních onemocnění asociovaných s KSHV. Jsou jimi LANA (latency-associated nuclear antigen), v-FLIP (flice-inhibitory protein), v-cyklin a Kaposin B (Dittmer D. et al., 1998; Umbach J.L. a Cullen B.R., 2009). Navíc v buňkách PEL a buňkách pocházejících z MCD, dochází k expresi vIRF3 (viral interferon regulatory factor 3) (Rivas C. et al., 2001).

vIRF3 (ORF K10.5 a K10.6) je sestřižený produkt dvou ORF (Lubyová B. a Pitha P.M., 2000). Tento 566 aminokyselin dlouhý protein je konstitutivně exprimován v jádře hematopoetických tkání infikovaných KSHV zahrnujících PEL a Castlemanovu chorobu, díky čemuž je někdy nazýván také jako LANA2 (latency-associated nuclear antigen 2) (Cunningham C. et al., 2003; Jenner R.G. et al., 2001; Rivas C. et al., 2001; Fakhari F.D. a Dittmer D.P., 2002). Exprese vIRF3, jenž je nezbytná pro proliferaci buněk PEL (Wies E. et al., 2008), působí dramatické změny v kritických hostitelských drahách zapojených do regulace apoptózy, buněčného cyklu, protivirové imunity a vývoje nádorů.

vIRF3 a rakovina

Častou příčinou onkogeneze je inaktivace nádorově supresorového genu či aktivace buněčných protoonkogenů. vIRF3 kódovaný virem Kaposiho sarkomu může přispět k vývoji nádoru nejméně dvěma mechanismy: 1) aktivací protoonkogenu *c-myc* (Lubyová B. et al., 2007) a 2) asociací s klíčovým nádorovým supresorem p53 (Rivas C. et al., 2001). vIRF3 je dále zapojen do regulace apoptózy, buněčného cyklu a modulace dynamiky mikrotubulů (Munoz-Fontela C. et al., 2008).

c-Myc působí jako univerzální zesilovač genové exprese, který ovlivňuje všechny aktivní promotory (Nie Z. et al., 2012). Cílové geny, které jsou pod kontrolou c-Myc, se účastní regulace a kontroly buněčného cyklu, proliferace a přežití (Grandori C. et al., 2000). Významným regulátorem stability proteinu c-Myc je ubiquitin ligáza Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) (Jin J. a Harper J.W., 2003; Kim S.Y. et al., 2003; von der Lehr N. et al., 2003; von der Lehr N. et al., 2003b). E-box dependentní transkripční aktivita c-Myc je pod kontrolou represoru MM-1 (Myc modulator 1) (Mori K. et al., 1998; Kimura Y., et al., 2007). V přítomnosti vIRF3 je MM-1 řízená represe c-Myc narušena. Přímá asociace vIRF3 s MM-1 α vede k inhibici tvorby MM-1 α -c-Myc komplexu. Uvolněný c-Myc pak stimuluje transkripční aktivitu nejen promotoru *cdk4* (cyclin-dependent kinase 4), ale i dalších promotorů regulovaných c-Myc. vIRF3 je přes vazbu na c-Myc navíc přímo asociován s promotorem *cdk4* u buněk PEL. Asociace vIRF3 s c-Myc posiluje DNA-vazebnou schopnost c-Myc a zvyšuje tak jeho transkripční aktivitu (Lubyová B. et al., 2007).

p53 je transkripční faktor indukovaný jako odpověď na stresové signály, jako je poškození DNA či virová infekce. Aktivace p53 vede k indukci blokace buněčného cyklu či apoptózy (Vogelstein B. et al., 2000). Zeslabení funkce p53 je pak jednou z nejčastějších příčin vývoje rakoviny u člověka (Hussain S.P. a Harris C.C., 1999). U normálních tkání je hladina p53 udržována na velmi nízké úrovni, přičemž rychlá degradace p53 je zajišťována pomocí jeho zásadního negativního regulátoru - E3 ubiquitin ligázy Mdm2 (murine double minute 2). Vystavení buněk rozdílným genotoxickým stresovým signálům, jako je poškození DNA, hypoxie či teplotní šok, vede k aktivaci p53 a jeho následné akumulaci v jádře (Maltzman W. a Czyzyk L., 1984; Kastan M.B. et al., 1991). Schopnost p53 působit jako specifický transkripční faktor je regulována jeho posttranslačními modifikacemi, protein-protein interakcemi a proteinovou stabilizací (Ryan K.M. et al., 2001). Rivas a kol. identifikovali vIRF3 jako potenciální inhibitor p53 indukované transkripce a apoptózy a *in vitro* prokázali interakci vIRF3 a p53 (Rivas C. et al., 2001). Vzhledem k tomu, že přímá asociace endogenního vIRF3 a p53 u KSHV infikovaných buněk PEL prokázána nebyla, nebyl ani popsán přesný molekulární mechanismus, kterým vIRF3 moduluje funkci p53.

RNA interference

RNA interference může být iniciována endogenní (pre-miRNA) či exogenní dsRNA, která aktivuje ribonukleázový komplex Dicer (Bernstein E. et al., 2001). Tento komplex štěpí dsRNA na 20-25pb dlouhé fragmenty s přesahem dvou nukleotidů na 3'-konci (Castanotto D. a Rossi J.J., 2009) zvanými siRNA. Dvouřetězcová siRNA je následně rozdělena na jednotlivá vlákna. Vlákno s komplementární sekvencí k cílové mRNA (známé jako *guide strand*) je inkorporováno do komplexu RISC (*RNA-induced silencing complex*), kde dojde k štěpení příslušné mRNA, jenž tak nemůže být použita jako template pro syntézu proteinů (Ahlquist P., 2002).

Hypotézy a cíle práce

Hlavním cílem našeho projektu bylo přispět k porozumění KSHV-indukované neoplázie. Charakterizace funkce vIRF-3 by mohla v budoucnu poskytnout cíle pro terapii, léčbu či prevenci tumorů asociovaných s KSHV.

Konkrétní cíle práce byly následující:

1. vytipování siRNA specifických pro vIRF3 a zavedení metody RNA interference do naší laboratoře
2. zjištění mechanismu, kterým vIRF3 ovlivňuje stabilitu a transkripční aktivitu proto-onkogenu *c-myc*
3. detailněji popsat a charakterizovat vliv proteinu vIRF3 na stabilitu a funkci nádorového supresoru p53

Materiál a metodika

Buněčné linie: KSHV-pozitivní BCBL-1 a BC-3, HeLa, HEK293, p53-nulitní Saos2, HCT-116, BJAB/vIRF3, BJAB/pcDNA

Plazmidy: vIRF3-FL, vIRF3-GST, c-myc-HA, wtMBS1-4, WWP-luc, Skp2-myc, Skp2-GST, wtp53, p53(1-359), p53(1-292), sestřižené formy c-myc a Skp2, vIRF3 a p53 deleční konstrukty, c-Myc-GST, His-Myc-Ub, p53(14/19) a p53(22/23), p53-GST

RNA interference: Syntetické siRNA cílící vIRF3 byly navrženy pomocí Sigma-Aldrich a Dharmacon siRNA designových center. Buňky PEL byly transfekovány pomocí transfekčních činidel HiPerFect, nebo X-treme GENE siRNA. Buněčné lyzáty byly analyzovány pomocí real-time RT-PCR.

Imunoprecipitace a Western blot: Buňky byly lyzovány ko-imunoprecipitačním pufrem, nebo imunoblotovacím pufrem. Proteinové extrakty byly inkubovány s příslušnými protilátkami při 4°C. K extraktům byly přidány proteinové agarozové kuličky a následovala inkubace při 4°C přes noc. Imunokomplexy byly analyzovány Western blotem.

Luciferázový test: Buňky byly transfekovány stejným množstvím luciferázového reportérového plazmidu a příslušnými expresními plazmidy spolu s kontrolním plazmidem pRL-SV40. Luciferázová aktivita byla měřena užitím kitu Dual-Luciferase reporter assay.

GST pull-down: GST fúzované proteiny vázané na glutation-sefarózové kuličky byly inkubovány s proteiny translatovanými *in vitro*. Vázané proteiny byly detekovány Western blotem.

Oligonukleotidový pull-down: Příslušné dvouřetězcové oligomery byly syntetizovány a označeny biotinem na 5'-konci vlákna „sense“ a spojeny se streptavidinovými magnetickými kuličkami. Buněčné lyzáty byly inkubovány spolu s DNA vázanou na magnetické kuličky. Vázané proteiny byly detekovány Western blotem.

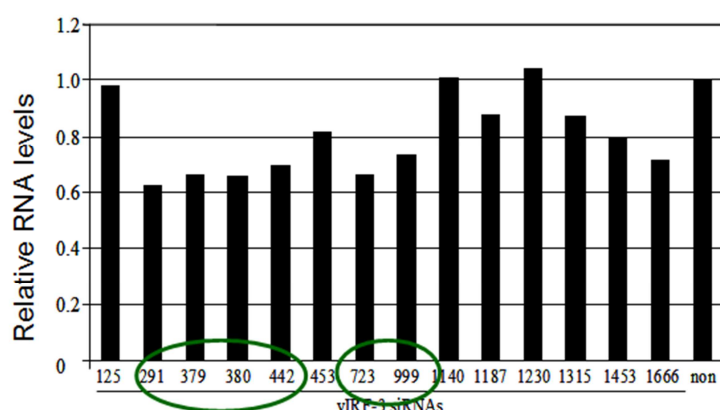
Chromatinový imunoprecipitační (ChIP) test: Vazba k endogennímu promotoru p21 *in vivo* byla analyzována užitím chromatinového imunoprecipitačního kitu. Buňky byly transfekovány expresním plazmidem vIRF3, nebo prázdným vektorem. Proteiny vázané k DNA byly spojeny v přítomnosti 1% formaldehydu. Buňky pak byly resuspendovány v lyzačním pufru a následovala sonikace. Po předčištění byly proteinové extrakty vystaveny imunoprecipitaci. DNA byla uvolněna fenol/chloroformovou extrakcí. DNA přítomná v imunokomplexech byla analyzována pomocí PCR.

qPCR (kvantitativní PCR): RNA byla izolována pomocí činidla TRIzol. 0,5 - 1 µg RNA bylo použito pro reverzní transkripci s použitím oligo(dT) primerů. cDNA byla smíchána se specifickými sondami, nebo SybrGreen a Universal PCR mastermixem. Kvantitativní PCR byla provedena systémem ABI 7300 PCR. Relativní míra exprese jednotlivých genů byla stanovena pomocí 2- $\Delta\Delta CT$ metody (Livak K. J. a Schmittgen T. D., 2001) a normalizována vzhledem k referenčnímu genu.

Výsledky

Inhibiční potenciál siRNA specifických pro vIRF3

Pro vytipování siRNA specifických pro vIRF3, které by zajistily účinné snížení exprese vIRF3, jsme využili Sigma-Aldrich a Dharmacon siRNA designová centra. Celkem bylo navrženo 14 siRNA specifických pro vIRF3: si124, si291, si379, si380, si442, si453, si723, si999, si1140, si1187, si1230, si315, si1453 a si1666, jenž jsou označeny podle jejich počáteční pozice na cDNA vIRF3. Vytipovanými siRNA byly spolu s nonsense siRNA transfekovány buňky BC-3. Dva dny po transfekci byly buňky PEL lyzovány; specifita a účinnost snížení exprese vIRF3 byla stanovena pomocí real-time RT-PCR. Jak ukazuje obr. 1, relativní množství mRNA vIRF3 bylo sníženo u většiny navržených siRNA. Pro další experimenty jsme si pak zvolili si291 a si999 u nichž došlo k cca 30-35% snížení exprese mRNA vIRF3 ve srovnání s kontrolou v podobě nonsense siRNA.



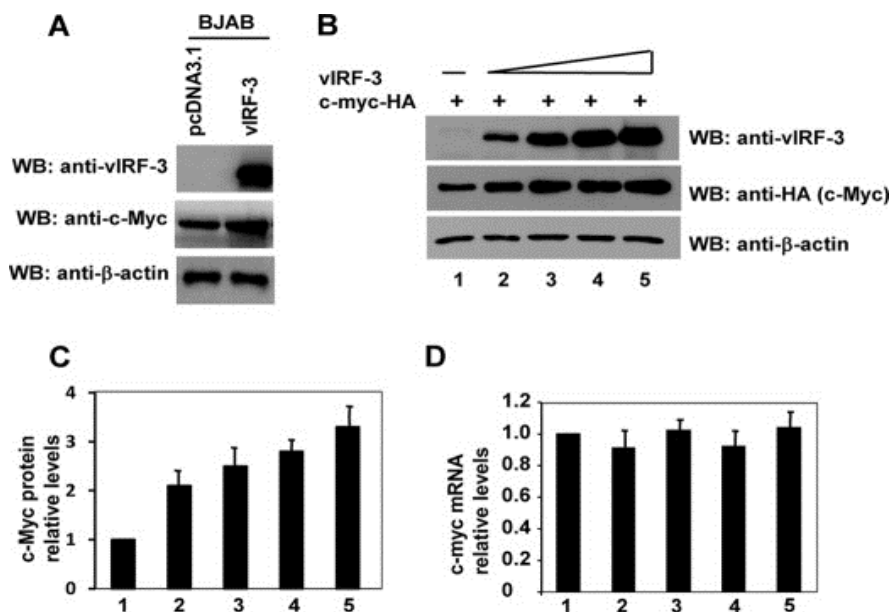
Obr. 1: Redukce množství mRNA vIRF3 u buněk PEL. Buňky BC-3 byly transfekovány non-sense siRNA a siRNA specifickými pro vIRF3. Dva dny po transfekci byla z buněk izolována RNA, jež byla analyzována pomocí real-time RT-PCR.

vIRF3 a c-Myc

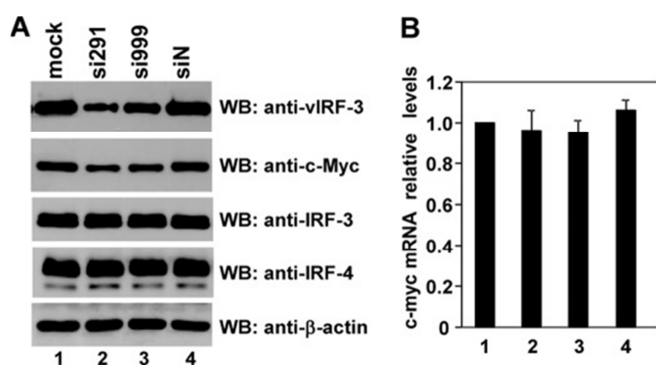
vIRF3 reguluje stabilitu c-Myc

vIRF3 asociuje s c-Myc a indukuje jeho transkripční aktivitu (Lubyová B. et al., 2007). Na začátku našeho zkoumání jsme pozorovali, že stabilní buněčná linie exprimující vIRF3 (BJAB/vIRF3), při porovnání s kontrolní buněčnou linií (BJAB/vektor), opakovaně vykazuje vyšší expresi endogenního proteinu c-Myc (obr. 2A). Vzhledem k tomu, že velká část rakovinných buněk nese mutovaný c-Myc, jež je pak mnohem stabilnější než jeho forma wt, analyzovali jsme proteinovou stabilitu transfekovaného exogenního wt c-Myc-HA u HeLa buněk. Jako je vidět na obr. 2B, zatímco množství endogenního β -aktinu zůstalo nezměněno, množství c-Myc-HA rostlo v závislosti na množství transfekovaného vIRF3. Transfekce vIRF3 expresního plazmidu navíc neměla vliv na relativní množství mRNA c-myc (obr. 2D), což naznačuje, že vIRF3 zvyšuje stabilitu c-Myc na úrovni proteinu.

Pro potvrzení, zda tento objevený fenomén působí také v přirozeném prostředí, jsme použili metodu RNA interference. Expres vIRF3 byla snížena u KSHV-pozitivní PEL buněčné linie BC-3. Denzitometrická kvantifikace výsledků získaných z Western blotové analýzy prokázala, že redukce množství proteinu vIRF3 dosáhla 63% (si291), respektive 41% (si999). Snížení exprese vIRF3 souviselo s redukcí proteinu c-Myc o 58% (si291), respektive o 35% (si999) (obr. 3). Pozorovaná redukce proteinu c-Myc detekovaná pomocí Western blotu však nebyla zaznamenána na úrovni RNA (obr. 3B). Jak ukazuje obr. 3A, si291 ani si999 neovlivnily expresi nejbližších buněčných homologů vIRF3 (IRF-3 a IRF-4), z čehož usuzujeme, že exprese vIRF3 vede ke zvýšení stability a akumulaci proteinu c-Myc v KSHV-pozitivních buňkách PEL.



Obr. 2: vIRF3 zvyšuje stabilitu c-Myc. A/ BJAB stabilní buněčná linie exprimující vIRF3 (BJAB/vIRF3) vykazuje vyšší množství proteinu c-Myc v porovnání s kontrolními buňkami (BJAB/pcDNA3.1). WB, Western blot. B/ HeLa buňky byly ko-transfekovány konstantním množstvím c-myc-HA a vzrůstajícím množstvím vIRF3 expresního plazmidu (0, 0,5, 1,5, 3,0 a 6,0 μg). 48 hod po transfekci byly připraveny proteinové extrakty. Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a blotovány s anti-HA (c-Myc), anti-vIRF3 a anti-β-aktinovými protilátkami. C/ kvantifikace signálů z obrázku B. Množství c-Myc bylo normalizováno vzhledem k signálu β-aktinu a poté vztahováno k signálu získaného při transfekci 0 μg vIRF3. D/ celková RNA byla izolována z buněk použitých na obrázku B a analyzována pomocí real-time RT-PCR. Použity byly sondy specifické pro *c-myc* a *gapdh*. Chybové úsečky reprezentují odchylku u čtyř nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech.

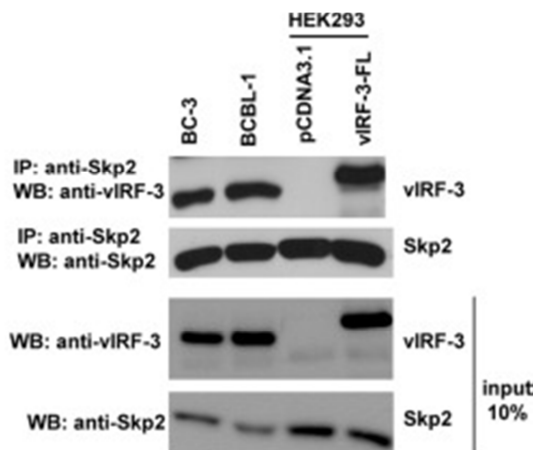


Obr. 3: Redukce proteinu c-Myc v buňkách PEL po snížení exprese vIRF3. A/ Buňky BC-3 byly buď mock-transfekovány, nebo transfekovány nonsense siRNA (siN), či siRNA specifickou pro vIRF3 (si291 a si999). Dva dny po transfekci byla polovina buněk sklizena a 8 μg proteinu bylo analyzováno pomocí Western blotu (WB) s anti-vIRF3, anti-c-Myc, anti-β-aktin, anti-IRF3 a anti-IRF4 protilátkami. B/ Druhá polovina použitých buněk BC-3 byla sklizena pro izolaci celkové RNA a analyzována real-time RT-PCR se sondami specifickými pro *c-myc* a *gapdh*. Chybové úsečky reprezentují odchylku u čtyř nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech.

Pro potvrzení vlivu vIRF3 na zvýšení stability c-Myc jsme prověřili životnost (half-life) proteinu c-Myc u HeLa buněk po působení inhibitoru proteinové syntézy, cykloheximidu. Podařilo se nám prokázat, že zatímco životnost samotného c-Myc wt byla okolo 40 min, v přítomnosti vIRF3 byla životnost c-Myc značně prodloužena a dosahovala přibližně 150 min.

vIRF3 spolupracuje s Skp2 při aktivaci c-Myc cílových genů

c-Myc je transkripční faktor s krátkou životností. Jeho rychlá degradace je zprostředkována ubiquitin/proteazomální dráhou, které se jako ubiquitin ligáza E3 specifická pro c-Myc účastní Skp2 (Salghetti S.E. et al., 1999; Kim S.Y. et al., 2003). Na základě našich zjištění jsme chtěli prozkoumat, zda může vIRF3 asociovat s komponenty ubiquitin ligázového komplexu SCFskp2 a regulovat tak stabilitu c-Myc. Ko-imunoprecipitační experimenty ukázaly, že endogenní vIRF3 asociuje s Skp2 u buněk BC-3 a BCBL-1 PEL (obr. 4). Tyto výsledky pak byly dále podpořeny ko-imunoprecipitací transfekovaného vIRF3 a endogenního Skp2 u buněk HEK293 (obr. 4).

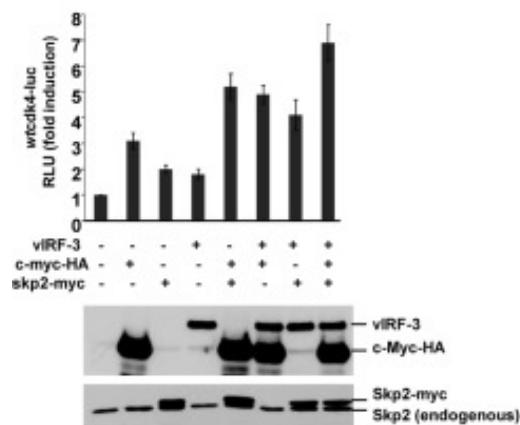


Obr. 4: vIRF3 interaguje s Skp2. Ko-imunoprecipitace Skp2 a vIRF3v PEL buňkách BC-3 a BCBL-1 a v transfekovaných buňkách HEK293. Proteinové lyzáty (400μg), byly imunoprecipitovány (IP) s anti-Skp2 protilátkami a imunoprecipitované komplexy byly analyzovány Western blotem (WB) s anti-vIRF3 protilátkami. Pro srovnání je znázorněno relativní množství Skp2 a vIRF3 ve 40 μg proteinového lyzátu (input 10%). Vyšší molekulární hmotnost transfekovaného vIRF3-FL je zapříčiněná přítomností Myc-His tagu na jeho C-konci.

Pro identifikaci oblasti na Skp2, která interaguje s vIRF3, jsme použili metodu GST pull-down. Tato analýza prokázala, že pro interakci s vIRF3 je důležitá oblast na Skp2, jenž tvoří F-box (aminokyseliny 94-140). Vzhledem k tomu, že je doména F-box odpovědná za ubiquitinační aktivitu Skp2 (Kim S.Y. et al., 2003), může interakce vIRF3 s touto doménou zasahovat do jeho vlivu na regulaci stability c-Myc. Dále jsme potvrdili schopnost vazby vIRF3 i Skp2 do stejné domény proteinu c-Myc, kdy v přítomnosti vIRF3 navíc vzrůstá schopnost interakce c-Myc se Skp2. Při testování ubiquitinačního statusu c-Myc v buňkách exprimujících vIRF3, jsme pak prokázali, že exprese vIRF3 opravdu vedla k prokazatelnému nárůstu ubiquitinace c-Myc.

Skp2 je dáván do souvislosti nejen jako degradátor c-Myc, ale také jako transkripční koaktivátor proteinu c-Myc (Jin J. a Harper J.W., 2003; Kim S.Y. et al., 2003; von der Lehr N. et al., 2003; von der Lehr N. et al., 2003b). Již dříve bylo prokázáno, že vIRF3 může stimulovat c-Myc regulovanou transkripci (Lubyová B. et al., 2007). V dalších experimentech jsme proto testovali, zda může vIRF3 přispívat k aktivaci promotoru *cdk4* wt v buňkách exprimujících geny *c-myc* i *skp2*. Pro toto zjištění jsme buňky HEK293 transfekovali expresními plazmidy *c-myc*-HA, vIRF3 a *skp2* společně s reportérovým konstruktem nesoucím luciferázový gen, jenž byl navázán na promotor *cdk4*. Přesto, že samotný c-Myc aktivoval promotor *cdk4* přibližně 3x, ko-transfekce *skp2* nebo vIRF3 vedla k dalšímu zesílení promotorové aktivity *cdk4* a to 5,2x v případě *skp2*, či 4,9x v přítomnosti vIRF3 (obr. 5). Ko-transfekce všech tří expresních plazmidů - *c-myc*-HA, *skp2* a vIRF3 - pak vedla k ještě výraznější aktivaci transkripce (7x) z promotoru *cdk4*. Tyto výsledky tak podpořily naše dřívější pozorování a potvrzují, že vIRF3 spolupracuje se Skp2 při aktivaci transkripce regulované c-Myc. Výsledky analýzy DNA pull-down s oligodeoxynukleotidy, jenž souhlasí s MBS4 sekvencí lidského wt promotoru *cdk4* navíc prokázaly, že c-Myc, jeho ubiquitinovaná forma, Skp2 a vIRF3 tvoří multikomponentální transkripční komplex, jenž se sestavuje na promotoru *cdk4* a aktivuje jeho transkripci.

Pro lepší porozumění vzájemné interakce proteinů vIRF3, c-Myc a Skp2 jsme analyzovali oblast na vIRF3, jenž je potřebná pro vazbu c-Myc a Skp2. Analýzou GST pull-down jsme našli doménu uvnitř C-koncové poloviny proteinu vIRF3 (aminokyseliny 346-455), jenž je podstatná pro interakci s c-Myc, stejně tak jako se Skp2.

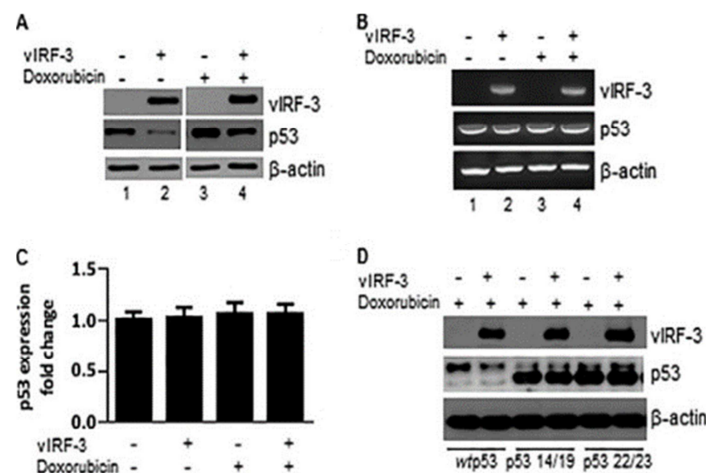


Obr. 5. Vliv vIRF3 na aktivaci promotoru *cdk4*. Buňky HEK293 byly ko-transfekovány wt (wild-type) *cdk4* reportérovým konstruktem (wt MBS1-4) a plazmidem pRL-SV40 spolu s prázdným vektorem (pcDNA3.1) nebo expresními plazmidy *c-myc*-HA, vIRF3 a *skp2*-Myc. Luciferázová aktivita byla analyzována 48 hod po transfekci jako násobek aktivace vztažené k bazálnímu množství reportérového genu v přítomnosti kontrolního vektoru (pcDNA3.1). Výsledky byly normalizovány vzhledem k Renilla luciferázové aktivitě. Chybové úsečky reprezentují odchylku u tří nezávislých experimentů. Exprimované množství transfekovaných proteinů je ukázáno dole. RLU, relativní množství luciferázy (*relative luciferase units*).

vIRF3 a p53

vIRF3 negativně reguluje stabilitu proteinu p53

Již dříve bylo prokázáno, že vIRF3 asociuje s p53 a inhibuje apoptózu zprostředkovanou tímto proteinem (Rivas C. et al., 2001). Přesný molekulární mechanismus tohoto fenoménu však prokázán nebyl. My jsme zjistili, že buňky HCT116 exprimující vIRF3 a nesoucí p53 wt (wild type), vykazují opakovaně nižší množství endogenního proteinu p53 ve srovnání s kontrolními buňkami HCT-116, jež byly transfekovány prázdným vektorem (pcDNA3.1) a to bez ohledu na přítomnost doxorubicinu (induktor dvouřetězcových zlomů na DNA, jenž aktivuje p53) (obr. 6A).



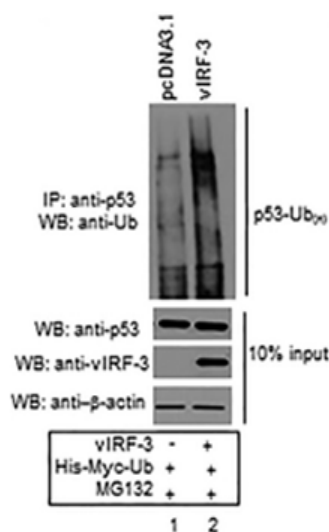
Obr. 6: Stabilita proteinu p53 je snížena v přítomnosti vIRF3. A/ Buňky HCT-116 exprimující vIRF3 vykazují nižší množství p53 než kontrolní buňky. Buňky HCT-116 (wt p53+/+) byly transfekovány expresním plazmidem vIRF3 (sloupce 2 a 4), nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1; sloupce 1 a 3) a 24 hod po transfekci inkubovány v přítomnosti (+), nebo nepřítomnosti (-) doxorubicinu (1 μ M) po dobu 24 hod. Celé buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-vIRF-3 a anti- β -aktinovými protilátkami. B/ RT-PCR. Celková RNA byla izolována z buněk, jež byly připraveny stejným způsobem, jenž je popsán výše (A). Tato RNA pak byla analyzována pomocí RT-PCR za použití primerů specifických pro vIRF3, p53 a β -aktinovou cDNA. C/ Real-time RT-PCR. p53 cDNA připravená stejným způsobem jako pro RT-PCR byla analyzována real-time RT-PCR za použití specifických p53 a β -aktinových primerů. Chybové úsečky reprezentují odchylku u čtyř nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech.

Zjištěná redukce proteinu p53 detekovaná Western blotem nebyla zaznamenána na úrovni RNA. Výsledky získané pomocí RT-PCR (obr. 6B) a kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR) (obr. 6C) prokázaly, že relativní množství p53 mRNA zůstalo konstantní ve všech testovaných vzorcích.

Pro zjištění, zda vIRF3 snižuje stabilitu proteinu p53, jsme stanovovali životnost p53 u buněk HCT-116 při inhibici proteinové syntézy způsobené cykloheximidem. Z výsledků je patrné, že v přítomnosti vIRF3 dochází k výrazné destabilizaci endogenního p53. Zatímco životnost (half-life) proteinu p53 wt u buněk transfekovaných prázdným plazmidem byla okolo 38 min, v přítomnosti vIRF3 byla životnost p53 snížena na 20 min.

Mnohem zřetelnější efekt vIRF3 na stabilitu proteinu p53 byl zaznamenán v buňkách, jež byly vystaveny působení doxorubicinu. Stresem vyvolaná indukce p53 prodloužila životnost proteinu p53 na více než 240 min (4 hod). Naproti tomu, v přítomnosti vIRF3, dochází k prokazatelnému snížení životnosti proteinu p53, a to přibližně na 78 min (1,3 hod).

Pro porozumění mechanismu, kterým vIRF3 snižuje množství p53, jsme zjišťovali ubiquitinační status p53 u buněk exprimujících vIRF3. Buňky HEK293 byly ko-transfekovány konstantním množstvím plazmidu exprimujícím ubiquitin (His-Myc-Ub) a vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem a poté inkubovány v přítomnosti proteazomálního inhibitoru MG132. I přesto, že v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byl p53 již ubiquitinován (obr. 7, sloupec 1), ko-transfekce s vIRF3 expresním plazmidem vedla k jasnému zesílení ubiquitinace p53 (obr. 7, sloupec 2).



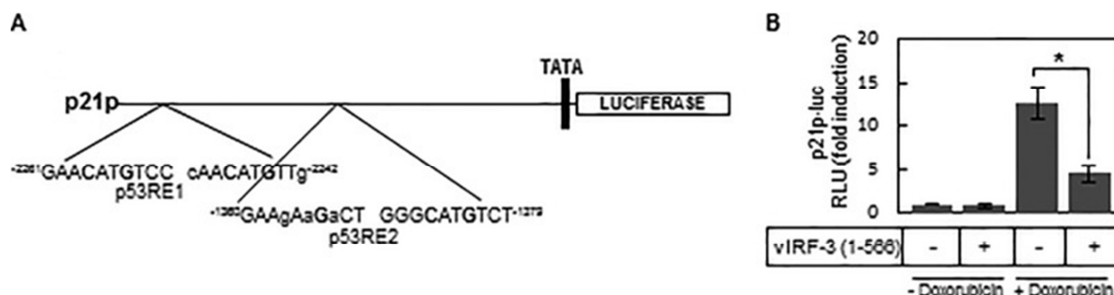
Obr. 7: vIRF3 zvyšuje ubiquitinaci p53. Buňky HEK293 byly nejprve transfekovány stejným množstvím His-Myc-Ub a následně vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). Šest hod před lyzí byly buňky vystaveny působení proteazomálního inhibitoru MG132 (50 μ M). p53 byl z buněčných lyzátů imunoprecipitován (IP) s anti-p53 (DO-1) specifickými protilátkami. Následoval Western blot (WB) s anti-Ub protilátkami. Relativní množství endogenního p53, β -aktinu a transfekovaného vIRF3 ve vstupním lyzátu (10% input) bylo stanoveno Western blotem.

vIRF3 inhibuje aktivaci transkripce genu p21 zprostředkovanou p53

V dalších experimentech se nám podařilo prokázat, že v přítomnosti vIRF3 dochází k zeslabení N-koncové fosforylace serinových zbytků na p53 (S15/S20). Tato fosforylace redukuje afinitu p53 k jeho negativnímu regulátoru Mdm2/Hdm2 a podporuje asociaci s jeho transkripčními koaktivátory CBP/p300 (Toledo F. a Wahl G.M., 2006), což následně vede ke snížení ubiquitinace p53 a ke zvýšení jeho proteinové stability. Přímým důsledkem vIRF3 indukované deregulace fosforylace S15/S20 na p53 je pak redukce exprese p53 cílového genu p21. Následné analýzy pak prokázaly vazbu vIRF3 do DNA-vazebné domény p53 a jeho negativní vliv na oligomerizaci p53, jenž je nezbytná pro jeho vazbu k cílovým promotorům. Toto zjištění pak bylo potvrzeno testem DNA pull-down, kdy do-

cházelo k redukci schopnosti vazby p53 na promotorovou sekvenci p21 genu v přítomnosti vIRF3.

Při testování vlivu vIRF3 na p53 zprostředkovanou aktivaci promotoru p21 jsme použili přechodnou transfekci s reportérovým plazmidem (WWP-luc), který obsahoval luciferázový gen pod kontrolou promotoru p21, jenž zahrnoval oblast odpovídající sekvenci 2.4 kp před iniciačním startovním místem transkripce p21. Tato promotorová oblast obsahuje dvě funkční p53 vazebná místa (p53RE1 a 2) (obr. 8A).



Obr. 8: vIRF3 inhibuje aktivaci transkripce p21 zprostředkovanou p53. A/ Schématické znázornění wt p21 (p21p) reportérového konstrukt. Promotor p21 obsahuje dvě potenciální vazebná místa pro p53, p53RE1 a p53RE2. Nukleotidové zbytky značící p53 konsenzus sekvenci jsou označeny velkými písmeny (RRRCATGYYYRRRCATGYYY); invariantní C/G báze jsou označeny tučně. B/ Vliv vIRF3 (1-566) na aktivaci promotoru p21 (p21p). Buňky HCT-116 (wt p53+/+) byly ko-transfekovány lidským wt p21p reportérovým konstruktem (WWP-luc) a *Renilla* luciferázovým plazmidem (pRL-SV40) spolu s vIRF3 (1-566) expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA 3.1). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány v přítomnosti (+), nebo nepřítomnosti (-) doxorubicinu (1 μ M) po dobu dalších 24 hod. Luciferázová aktivita byla analyzována jako násobek aktivace vztažené k bazálnímu množství reportérového genu v přítomnosti kontrolního vektoru (pcDNA3.1). Výsledky byly normalizovány vzhledem k luciferázové aktivitě *Renilla*. Výsledky byly stanoveny jako průměr $\pm$ směrodatné odchylky u tří nezávislých experimentů (*, $P < 0,05$). RLU, relativní množství luciferázy (*relative luciferase units*).

Buňky HCT-116 byly transfekovány reportérovým plazmidem p21spolu s vIRF3 (1-566) expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány v přítomnosti nebo bez doxorubicinu po dobu dalších 24 hod. Vystavení buněk působení doxorubicinu zvýšilo množství luciferázy přibližně 12x (obr. 8B). V přítomnosti nezkráceného (FL, full-length) vIRF3 pak došlo ke snížení množství luciferázy přibližně 4x. Tyto výsledky tak naznačují, že vIRF3 je schopný efektivně snižovat aktivaci promotoru p21 doxorubicinem, což bylo dále potvrzeno ko-transfekčními experimenty v p53 nulitních buňkách Saos2.

vIRF3 cílí na p53 regulační dráhy u KSHV-pozitivních buněk PEL

Pro potvrzení, že výše pozorovaný fenomén má biologické opodstatnění a vyskytuje se taktéž v přirozeném prostředí, jsme analyzovali vliv vIRF3 na signalizaci p53 u KSHV-pozitivní PEL buněčné linie BC-3. I přes to, že mutace nebo delece p53 jsou velmi běžnou záležitostí u většiny maligních nádorů (Hollstein M. et al., 1991), v případě

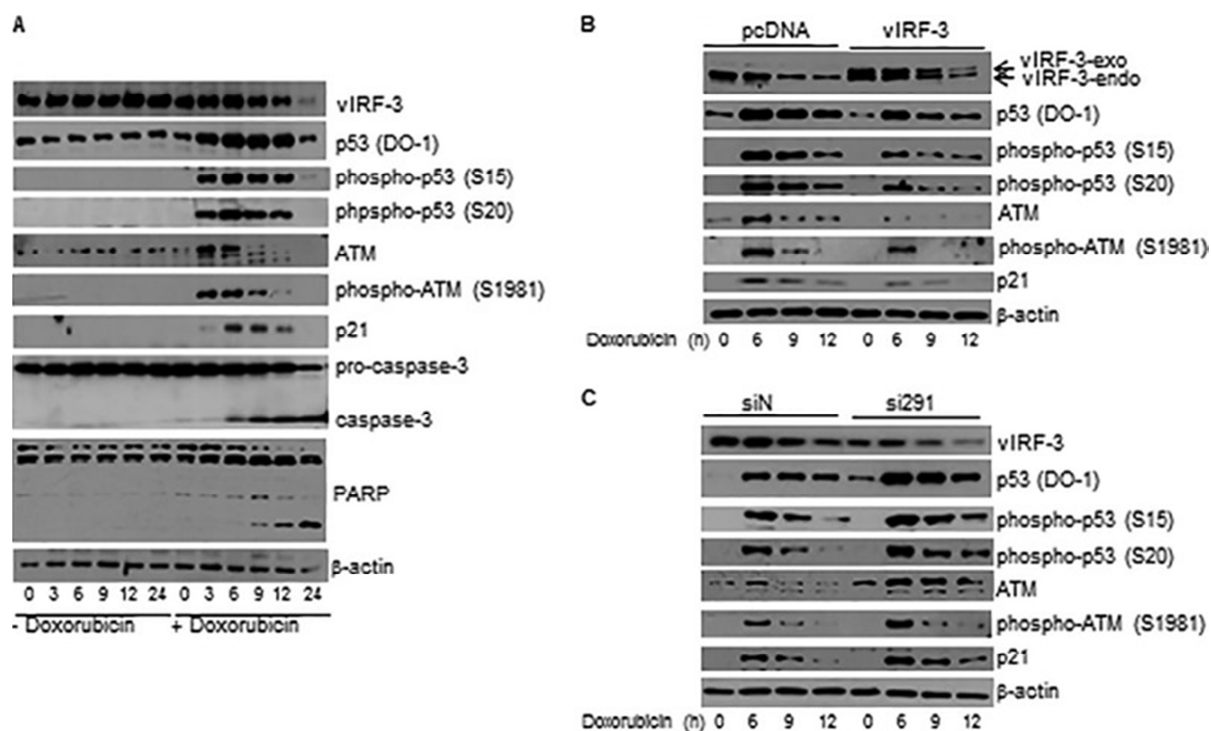
KSHV indukovaných buněk PEL, je p53 přítomen v nezměněné formě (wt p53) (Dumaz N. a Meek D.W., 1999; Katano H. et al., 2001). Pro zjištění odpovědi buněk PEL na poškození DNA jsme nejprve testovali vliv doxorubicinu na aktivaci p53 a indukci exprese jeho cílových genů. Vystavení buněk BC-3 působení doxorubicinu po dobu 24 hod vedlo k výrazné aktivaci a akumulaci proteinu p53 (obr. 9A). Nejvyšší míra akumulace p53 a fosforylace na S15 a S20 byla zaznamenána po šestihodinové inkubaci buněk s doxorubicinem. Indukce aktivity p53 byla v souladu s transkripční aktivací inhibitoru cyklin-dependentních kináz p21, jehož exprese taktéž vrcholila 6 hod po přidání doxorubicinu. Při delším časovém intervalu aktivace p53 a transkripce genu p21 ustává a buňky podléhají apoptóze. Hladina aktivace kaspázy 3 a štěpení proteinu PARP dosahuje maxima přibližně 24 hod po přidání doxorubicinu. Navíc dochází 3 hod po přidání doxorubicinu k nahromadění kinázy ATM a také ke zvýšení její autofosforylace na serinu S1981 (obr. 9A). Je známo, že v odpovědi na genotoxický stres, prochází kináza ATM rychlou aktivací prostřednictvím autofosforylace serinu S1981 (Bakkenist C.J. a Kastan M.B., 2003). Aktivovaná ATM pak fosforyluje p53 na pozici S15 a Mdm2 na pozici S395 (Caspari T., 2000). Tyto modifikace pak vedou ke stabilizaci a aktivaci p53.

Pro zjištění vlivu nadprodukce vIRF3 na aktivaci p53 dráhy v buňkách PEL jsme transfekovali buňky BC-3 expresním plazmidem vIRF3 nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1), a následně jsme buňky vystavili působení doxorubicinu po dobu 0, 6, 9 a 12 hod (obr. 9B). Jak jsme předpokládali, množství proteinu p53 a hladina jeho S15/S20 fosforylace byla v porovnání s kontrolními buňkami u buněk exprimujících vIRF3 redukována. Navíc nadprodukce vIRF3 vedla ke snížení množství proteinu ATM a také ke snížení hladiny jeho autofosforylace na serinu S1981. Výrazná deregulace p53 signalizace byla dále doplněna redukcí množství proteinu p21 (obr. 9B).

Opačný efekt pak mělo snížení exprese vIRF3, jehož jsme dosáhli užitím RNA interference (RNAi) (obr. 9C). Buňky BC-3 byly transfekovány siRNA specifickou pro vIRF3 (si291), nebo nesmyslnou siRNA (nonsense siRNA; siN). Dva dny po transfekci byly buňky vystaveny působení doxorubicinu po dobu 0, 6, 9 a 12 hod. Množství proteinu vIRF3 bylo, ve srovnání s kontrolními buňkami, u buněk transfekovaných si291 sníženo přibližně o 70% (obr. 9C). Množství aktinu zůstalo stejné u všech testovaných vzorků. Toto výrazné snížení množství proteinu vIRF3 bylo asociováno se zvýšením množství p53 a ATM proteinu, stejně tak jako se vzrůstem hladiny fosforylace p53 (S15/S20) a autofosforylace ATM (S1981) či s vyšší expresí p21 (obr. 9C). Společně pak všechna tato získaná data potvrzují, že vIRF3 zřetelně moduluje funkci p53 u KSHV asociovaného primárního efuzního lymfomu (PEL).

Diskuse

Virová infekce je častou příčinou vzniku nádorového onemocnění u člověka. Až 15-20% případů rakoviny je dáváno do přímé souvislosti s onkogenními viry (McLaughlin-Drubin M.E. a Munger K., 2008), jejichž onkogenní potenciál je následkem schopnosti vytvářet latentní infekci. Virová perzistence je charakterizována expresí proteinů, které kontrolují buněčnou smrt a proliferaci a jenž jim zajišťují minimální možnost odhalení imunitním systémem. Častým cílem těchto virových proteinů jsou pak různé buněčné dráhy regulující klíčové nádorové supresorové geny, aktivaci onkogenů, angiogenezi či hlavní komponenty drah signální transdukce a antigenní prezentace.



Obr. 9: vIRF3 inhibuje regulační dráhu p53 u KSHV pozitivních buněk BC-3. A/ Inkubace buněk s doxorubicinem vede k aktivaci regulační dráhy p53 u KSHV-pozitivních buněk. Buňky BC-3 (wt p53) byly, nebo nebyly, vystaveny působení doxorubicinu (1 μ M) po indikovanou dobu. Buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-fosfo-p53 (anti-phospho-p53; S15 a S20), anti-ATM, anti-fosfo-ATM (anti-phospho-ATM; S1981), anti p21, anti-kaspáza-3 (anti-caspase-3), anti-PARP, anti-vIRF3 a anti- β -aktinovými protilátkami. B/ Nadprodukce vIRF3 v buňkách BC-3 vede k deregulaci regulační dráhy p53. Buňky BC-3 byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány s 1 μ M doxorubicinem po indikovanou dobu. Buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-fosfo-p53 (anti-phospho-p53; S15 a S20), anti-ATM, anti-fosfo-ATM (anti-phospho-ATM; S1981), anti p21, anti-vIRF3 a anti- β -aktinovými protilátkami. vIRF-3-endo, endogenní vIRF3; vIRF-3-exo, exogenní vIRF3. Nižší mobilita exogenního vIRF3 je následkem navázání tagu myc. C/ Snížení exprese vIRF3 v buňkách PEL vede k aktivaci dráhy p53. Buňky BC-3 byly transfekovány siRNA specifickou pro vIRF3 (si291), nebo nesmyslnou siRNA (nonsense siRNA; siN). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány s 1 μ M doxorubicinem po indikovanou dobu. Buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-fosfo-p53 (anti-phospho-p53; S15 a S20), anti-ATM, anti-fosfo-ATM (anti-phospho-ATM; S1981), anti p21, anti-vIRF3 a anti- β -aktinovými protilátkami. Ukázána jsou data získaná ze tří nezávislých experimentů.

c-myc je protoonkogen řídící proliferaci, buněčný cyklus a přežití buněk (Grandori C. et al., 2000). V naší práci jsme navázali na studii týkající se stimulace transkripční aktivity c-Myc zprostředkované vIRF3, kterou publikovali v roce 2007 Lubyová B. a kol. (Lubyová B. et al., 2007). Prokázali jsme, že vIRF3 může stabilizovat protein c-Myc a prodloužit jeho životnost (half-life) přibližně 4x. Vzhledem k tomu, že za rychlou degradaci c-Myc zodpovídá F-box protein Skp2, testovali jsme, zda vIRF3 interaguje se Skp2. I přes to, že vIRF3 byl schopný asociovat se Skp2, nevedla tato interakce k narušení

tvorby heterodimeru c-Myc/Skp2. V přítomnosti vIRF3 naopak docházelo ke stimulaci ubiquitinace c-Myc. Studium zaměřené na přítomnost domén zapojených do tvorby vIRF3/c-Myc/Skp2 odhalilo, že se vIRF3 váže do F-box oblasti Skp2, která je podle všeho potřebná pro regulaci ubiquitinace a stability c-Myc (Kim S.Y. et al., 2003). Dalším zajímavým aspektem interakce vIRF3/c-Myc/Skp2 je způsob, jakým c-Myc interaguje s vIRF3. Prokázali jsme, že vazba vIRF3 vyžaduje přítomnost dvou oblastí na c-Myc: 1/ AMK 128-143 v N-koncové oblasti, přičemž tato oblast odpovídá konzervované doméně Myc box II (MBII) a 2/ AMK 379-418 v C-koncové části proteinu. Obě tyto oblasti c-Myc pro vazbu vIRF3 jsou pak nezbytné pro interakci c-Myc/Skp2 (Kim S.Y. et al., 2003). Navíc C-koncová oblast vIRF3 (aminokyseliny 346-455), je nezbytná pro vazbu jak c-Myc tak Skp2. Dohromady tyto výsledky naznačují, že vIRF3 působí jako spojka, jenž pomáhá přiblížení c-Myc ke svému transkripčnímu koaktivátoru Skp2 a usnadňuje tak iniciaci transkripce zprostředkované c-Myc. V souladu s tímto předpokladem jsme prokázali, že vIRF3 může stimulovat transkripci regulovanou c-Myc vedenou z promotoru *cdk4*, přičemž tato stimulace je ještě více zesílena v přítomnosti Skp2. Aktivita promotoru *cdk4* je obrazem přítomnosti transkripčních faktorů a kofaktorů v této oblasti. Již dříve byla chromatinovou imunoprecipitací (ChIP) prokázána přítomnost komplexu vIRF3-c-Myc na endogenním promotoru *cdk4*, jenž byla spojena se zvýšením acetylace histonu H3 (Lubyová B. et al., 2007). V naší studii jsme pak pozorovali vliv exprese vIRF3 vedoucí ke zvýšení množství Skp2 a polyubiquitinaného proteinu c-Myc asociovaného s wt promotorem *cdk4*. Tato data tak podporují hypotézu spojení ubiquitinace c-Myc s jeho transkripční aktivitou (Kim S.Y. et al., 2003; von der Lehr N. et al., 2003). Ubiquitinace c-Myc může být navíc zvýšena v přítomnosti vIRF3. Na druhou stranu exprese vIRF3 vede ke zvýšení stability c-Myc. Jedním z možných vysvětlení tohoto paradoxu je možnost, že vIRF3 inhibuje proteazomální degradaci c-Myc v pozdější fázi dráhy vedoucí od ubiquitinace k proteazomální degradaci a tedy, že vIRF3 odděluje ubiquitinační a degradační dráhu. Takovýto mechanismus regulace byl pozorován u mutantních forem c-Myc spojených s rakovinou, jenž byly efektivně ubiquitinované ligázou Skp2, ale zároveň byly rezistentní vůči proteazomální degradaci (Salghetti S.E. et al., 1999; Kim S.Y. et al., 2003). Jiným možným vysvětlením je možnost, že ubiquitinace c-Myc, která je pod kontrolou vIRF3, může zahrnovat rozdílnou sadu lyzinových zbytků, jejichž ubiquitinace není spojena s proteazomální degradací.

V současné době je stále patrnější, že množství virů vyvinulo různé strategie, jimiž využívají ubiquitin-proteazomální systém hostitelské buňky. Jde tedy zřejmě o úspěšnou strategii, která pomáhá virům získat zásadní vliv při regulaci buněčného cyklu a přežití hostitelské buňky.

p53 je transkripční faktor vázající se do specifických vazebných míst v promotoru mnoha genů (např. genů pro p21, PUMA, Bax, atd.), čímž aktivuje jejich transkripci (Vogelstein B. et al., 2000). Přestože u většiny nádorů dochází díky mutacím ke změnám exprese p53, u B-buněčných lymfomů indukovaných KSHV není p53 modifikován (Boulanger E. et al., 2009). V naší studii jsme prokázali, že KSHV kódovaný vIRF3, může destabilizovat protein p53 a prokazatelně snížit jeho životnost (half-life) prostřednictvím indukce jeho ubiquitinace. Tento efekt je pak ještě více patrný u buněk, jež byly vystaveny působení stresu. Poškození DNA vyvolané doxorubicinem iniciuje kaskádu vedoucí k modifikacím p53 a Mdm2, jenž jsou zodpovědné za stabilizaci a aktivaci dráhy p53. V naší studii jsme prokázali, že vIRF3 inhibuje fosforylaci p53 na pozici serinu S15 a S20 a to v přítomnosti i bez proteazomálního inhibitoru. Zdá se tedy, že snížená fosforylace p53, vázaná na vIRF3, vede ke stabilizaci heterodimeru p53-Mdm2

a k indukci ubiquitinace p53. Dále jsme odhalili, že množství N-koncové fosforylace p53 přímo souvisí s akumulací p53 a s p53 zprostředkovanou transkripční regulací p21. Analýza akumulace proteinu ATM a jeho autofosforylace S1981 prokázala, že množství proteinu ATM i úroveň jeho fosforylace byla efektivně zvýšena u latentně infikovaných buněk PEL po snížení exprese vIRF3. Tyto výsledky tak naznačují, že vIRF3 může cílit na dráhu vedoucí ke kináze ATM.

Dalším poznatkem pak bylo, že vIRF3 specificky interferuje s p53 při vazbě do oblasti promotoru p21 a také, že vIRF3 narušuje tetramerizaci p53, jenž je nezbytná pro jeho funkci (Jeffrey P.D. et al., 1995). Pro efektivní expresi p21 i Mdm2 musí dojít k oligomerizaci p53 (Warnock L.J. et al., 2008). Pomocí testů DNA pull-down a chromatinové imunoprecipitace se nám podařilo ukázat narušení vazby p53 k promotoru p21 v přítomnosti vIRF3. Navíc je v buňkách exprimujících vIRF3 redukována acetylace histonu účastníčího se aktivní genové transkripce, tedy histonu H3. Proto se domníváme, že přímá interakce mezi vIRF3 a p53 maskuje DNA vazebnou doménu p53 a inhibuje jeho vazbu k promotorové DNA. Velká většina nádorových buněk nese mutaci v DNA vazebné doméně p53, jejímž následkem je pak neschopnost vazby p53 k DNA vedoucí k narušení jeho funkce. Strategie blokace schopnosti tvorby oligomerů by tak velmi účinně blokovala účinek p53. Posttranslační modifikace proteinu p53 má zásadní vliv na funkci a stabilitu tohoto klíčového nádorového supresoru. Změny fosforylace a ubiquitinace p53 způsobené vIRF3 tak zásadně přispívají k oslabení jeho transkripční aktivity a následně k deregulaci důležitých buněčných drah zapojených do řízení buněčného cyklu či apoptózy.

Závěr

Cílem naší práce bylo objasnění mechanismu, kterým KSHV-kódovaný vIRF3 moduluje funkci zásadního onkoproteinu c-Myc a klíčového nádorového supresoru p53. Naše výsledky lze využít k vývoji nových léčebných postupů, jenž by mohly v budoucnu pomoci pacientům s onemocněním asociovaným s KSHV.

Shrnutí výsledků:

1. Podařilo se nám identifikovat dvě siRNA specifické pro vIRF3 (si291 a si999), které po úspěšném doručení do cílových buněk redukovaly množství proteinu vIRF3 s 63-70%, respektive 41% účinností. Tyto siRNA navíc nevykazovaly žádný nespecifický účinek či vazbu k buněčným homologům cílového virového genu.
2. Prokázali jsme zásadní vliv proteinu vIRF-3 na stabilitu c-Myc.
3. vIRF3 pomáhá vazbě c-Myc a jeho transkripčního ko-faktoru Skp2 k promotorům regulovaným c-Myc a efektivně tak zvyšuje c-Myc dependentní transkripci.
4. Buňky, ve kterých dochází k nadprodukci vIRF3, vykazují vyšší míru ubiquitinace c-Myc, jenž je zřejmě nezbytná pro transkripci zprostředkovanou c-Myc.
5. Identifikovali jsme vzájemná vazebná místa jednotlivých komponent komplexu vIRF3/Skp2/c-Myc.
6. Prokázali jsme, že vIRF3 snižuje stabilitu a životnost proteinu p53 a že jeho exprese má zásadní vliv na jeho posttranslační modifikace, tvorbu tetramerů či na jeho DNA vazebnou schopnost.
7. Exprese vIRF-3 vede ke snížení transkripce genů regulovaných p53.
8. Navrhli jsme mechanismus, kterým se vIRF3 zaměřuje na funkci p53.

Literatura

- Ahlquist, P. RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, And RNA Silencing. *Science* 2002, 296 (5571), 1270–1273.
- Anand, P.; Kunnumakara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Tharakan, S. T.; Lai, O. S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B. Cancer Is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research* 2008, 25 (9), 2097–2116.
- Bais, C.; Santomaso, B.; Coso, O.; Arvanitakis, L.; Raaka, E. G.; Gutkind, J. S.; Asch, A. S.; Cesarman, E.; Gershengorn, M. C.; Mesri, E. A. Erratum: G-Protein-Coupled Receptor of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Is a Viral Oncogene and Angiogenesis Activator. *Nature* 1998, 392 (6672), 210–210.
- Bakkenist, C. J.; Kastan, M. B. DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation. *Nature* 2003, 421 (6922), 499–506.
- Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M.; Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001, 409 (6818), 363–366.
- Boshoff, C.; Endo, Y.; Collins, P.D.; Takeuchi, Y.; Reeves, J.D.; Schweickart, V.L.; Siani, M.A.; Sasaki, T.; Williams, T.J.; Gray, P.W.; Moore, P.S.; Chang, Y.; Weiss, R.A. Angiogenic And HIV-Inhibitory Functions of KSHV-Encoded Chemokines. *Science* 1997, 278 (5336), 290–294.
- Boulanger, E.; Marchio, A.; Hong, S.-S.; Pineau, P. Mutational Analysis of TP53, PTEN, PIK3CA and CTNNB1/ -Catenin Genes in Human Herpesvirus 8-Associated Primary Effusion Lymphoma. *Haematologica* 2009, 94 (8), 1170–1174.
- Caspari, T. Checkpoints: How To Activate p53. *Current Biology* 2000, 10 (8), R315-7.
- Castanotto, D.; Rossi, J. J. The Promises and Pitfalls of RNA-Interference-Based Therapeutics. *Nature* 2009, 457 (7228), 426–433.
- Cesarman, E.; Chang, Y.; Moore, P. S.; Said, J. W.; Knowles, D. M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Like DNA Sequences In AIDS-Related Body-Cavity-Based Lymphomas. *New England Journal of Medicine* 1995, 332 (18), 1186–1191.
- Chandriani, S.; Ganem, D. Array-based transcript profiling and limiting-dilution reverse transcription-PCR analysis identify additional latent genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology* 2010, 84 (11), 5565–5573.
- Cunningham, C.; Barnard, S.; Blackbourn, D.J.; Davison, A.J. Transcription Mapping of Human Herpesvirus 8 Genes Encoding Viral Interferon Regulatory Factors. *Journal of General Virology* 2003, 84 (6), 1471–1483.
- Dittmer, D.; Lagunoff, M.; Renne, R.; Staskus, K.; Haase, A.; Ganem, D. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology* 1998, 72 (10), 8309–8315.
- Dumaz, N.; Meek, D.W. Serine15 Phosphorylation Stimulates p53 Transactivation but Does Not Directly Influence Interaction with HDM2. *The EMBO Journal* 1999, 18 (24), 7002–7010.
- Fakhari, F. D.; Dittmer, D. P. Charting Latency Transcripts In Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus by Whole-Genome Real-Time Quantitative PCR. *Journal of Virology* 2002, 76 (12), 6213–6223.
- Grandori, C.; Cowley, S. M.; James, L. P.; Eisenman, R. N. The Network And The Transcriptional Control Of Cell Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2000, 16 (1), 653–699.

- Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. p53 Mutations in Human Cancers. *Science* 1991, 253 (5015), 49–53.
- Hussain, S.; Harris, C. C. p53 Mutation Spectrum and Load: the Generation of Hypotheses Linking the Exposure of Endogenous or Exogenous Carcinogens to Human Cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1999, 428 (1-2), 23–32.
- Jeffrey, P.; Gorina, S.; Pavletich, N. Crystal Structure of the Tetramerization Domain of the p53 Tumor Suppressor at 1.7 Angstroms. *Science* 1995, 267 (5203), 1498–1502.
- Jenner, R. G.; Alba, M. M.; Boshoff, C.; Kellam, P. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent And Lytic Gene Expression as Revealed by DNA Arrays. *Journal of Virology* 2001, 75 (2), 891–902.
- Jin, J.; Harper, J. A License to Kill. *Cancer Cell* 2003, 3 (6), 517–518.
- Kastan, M.B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research* 1991, 51 (23), 6304–6311.
- Katano, H.; Sato, Y.; Sata, T. Expression Of p53 and Human Herpesvirus-8 (HHV-8)-Encoded Latency-Associated Nuclear Antigen with Inhibition of Apoptosis in HHV-8-Associated Malignancies. *Cancer* 2001, 92 (12), 3076–3084.
- Kim, S. Y.; Herbst, A.; Tworkowski, K. A.; Salghetti, S. E.; Tansey, W. P. Skp2 Regulates Myc Protein Stability And Activity. *Molecular Cell* 2003, 11 (5), 1177–1188.
- Kimura, Y.; Nagao, A.; Fujioka, Y.; Satou, A.; Taira, T.; Iguchi-Ariga, S.; Ariga, H. MM-1 Facilitates Degradation of c-Myc by Recruiting Proteasome and a Novel Ubiquitin E3 Ligase. *International Journal of Oncology* 2007, 31 (4), 829–36.
- Lagunoff, M.; Ganem, D. The Structure And Coding Organization of the Genomic Termini of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8). *Virology* 1997, 236 (1), 147–154.
- Lehr, N. V. D.; Johansson, S.; Wu, S.; Bahram, F.; Castell, A.; Cetinkaya, C.; Hydbring, P.; Weidung, I.; Nakayama, K.; Nakayama, K. I.; et al. The F-Box Protein Skp2 Participates In c-Myc Proteosomal Degradation and Acts as a Cofactor for c-Myc-Regulated Transcription. *Molecular Cell* 2003, 11 (5), 1189–1200.
- Lehr, N. V. D.; Johansson, S.; Larsson, L.-G. Implication Of the Ubiquitin/Proteasome System in Myc-Regulated Transcription. *Cell Cycle* 2003b, 2 (5), 402–406.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis Of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001, 25 (4), 402–408.
- Lu, M.; Suen, J.; Frias, C.; Pfeiffer, R.; Tsai, M.H.; Chuang, E.; Zeichner, S.L. Dissection of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression program by using the viral DNA replication inhibitor cidofovir. *Journal of Virology* 2004, 78 (24), 13637–13652.
- Lubyova, B.; Pitha, P. M. Characterization Of a Novel Human Herpesvirus 8-Encoded Protein, VIRF-3, That Shows Homology to Viral and Cellular Interferon Regulatory Factors. *Journal of Virology* 2000, 74 (17), 8194–8201.
- Lubyova, B.; Kellum, M. J.; Frisancho, J. A.; Pitha, P. M. Stimulation Of c-Myc Transcriptional Activity by VIRF-3 of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282 (44), 31944–31953.

- Maltzman, W.; Czyzyk, L. UV Irradiation Stimulates Levels of p53 Cellular Tumor Antigen in Nontransformed Mouse Cells. *Molecular and Cellular Biology* 1984, 4 (9), 1689–1694.
- Mclaughlin-Drubin, M. E.; Munger, K. Viruses Associated with Human Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008, 1782 (3), 127-150
- Molden, J.; Chang, Y.; You, Y.; Moore, P. S.; Goldsmith, M. A. A Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Cytokine Homolog (VIL-6) Activates Signaling through the Shared gp130 Receptor Subunit. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272 (31), 19625–19631.
- Moore, P. S.; Chang, Y. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Oncogenes And Oncogenesis. *JNCI Monographs* 1998, 1998 (23), 65–71.
- Mori, K.; Maeda, Y.; Kitaura, H.; Taira, T.; Iguchi-Arigo, S. M. M.; Ariga, H. MM-1, a Novel c-Myc-Associating Protein That Represses Transcriptional Activity of c-Myc. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273 (45), 29794–29800.
- Munoz-Fontela, C.; Marcos-Villar, L.; Hernandez, F.; Gallego, P.; Rodriguez, E.; Arroyo, J.; Gao, S.-J.; Avila, J.; Rivas, C. Induction Of Paclitaxel Resistance by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Protein LANA2. *Journal of Virology* 2008, 82 (3), 1518–1525.
- Nie, Z.; Hu, G.; Wei, G.; Cui, K.; Yamane, A.; Resch, W.; Wang, R.; Green, D. R.; Tessarollo, L.; Casellas, R.; et al. c-Myc Is a Universal Amplifier Of Expressed Genes in Lymphocytes and Embryonic Stem Cells. *Cell* 2012, 151 (1), 68–79.
- Rivas, C.; Thlick, A.-E.; Parravicini, C.; Moore, P. S.; Chang, Y. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus LANA2 Is a B-Cell-Specific Latent Viral Protein That Inhibits p53. *Journal of Virology* 2001, 75 (1), 429–438.
- Russo, J. J.; Bohenzky, R. A.; Chien, M.-C.; Chen, J.; Yan, M.; Maddalena, D.; Parry, J. P.; Peruzzi, D.; Edelman, I. S.; Chang, Y.; et al. Nucleotide Sequence of the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV8). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996, 93 (25), 14862–14867.
- Ryan, K. M.; Phillips, A. C.; Vousden, K. H. Regulation And Function of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Current Opinion in Cell Biology* 2001, 13 (3), 332–337.
- Salghetti, S. E. Destruction Of Myc by Ubiquitin-Mediated Proteolysis: Cancer-Associated and Transforming Mutations Stabilize Myc. *The EMBO Journal* 1999, 18 (3), 717–726.
- Sarid, R.; Flore, O.; Bohenzky, R.A.; Chang, Y.; Moore, P.S. Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *Journal of Virology* 1998, 72 (2), 1005-12.
- Soulier, J.; Grollet, L.; Oksenhendler, E; Cacoub, P.; Cazals-Hatem, D.; Babinet, P.; d'Agay, M.F.; Clauvel, J.P.; Raphael, M.; Degos, L.; et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* 1995, 86 (4), 1276-80
- Talbot, S.J.; Weiss, R.A.; Kellam, P.; Boshoff, C. Transcriptional analysis of human herpesvirus-8 open reading frames 71, 72, 73, K14, and 74 in a primary effusion lymphoma cell line. *Virology* 1999, 257 (1), 84-94.
- Thome, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Fickenscher, H.; Meinl, E.; Neipel, F.; Mattmann, C.; Burns, K.; Bodmer, J.-L.; Schröter, M.; et al. Viral FLICE-Inhibitory Proteins (FLIPs) Prevent Apoptosis Induced by Death Receptors. *Nature* 1997, 386 (6624), 517–521.

- Toledo, F.; Wahl, G. M. Regulating The p53 Pathway: in Vitro Hypotheses, in Vivo Veritas. *Nature Reviews Cancer* 2006, 6 (12), 909–923.
- Toth, Z.; Brulois, K.; Lee, H.-R.; Izumiya, Y.; Tepper, C.; Kung, H.-J.; Jung, J. U. Biphasic Euchromatin-To-Heterochromatin Transition on the KSHV Genome Following De Novo Infection. *PLoS Pathogens* 2013, 9 (12) e1003813.
- Umbach, J. L.; Cullen, B. R. In-Depth Analysis Of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNA Expression Provides Insights into the Mammalian MicroRNA-Processing Machinery. *Journal of Virology* 2009, 84 (2), 695–703.
- Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* 2000, 408 (6810), 307–310.
- Warnock, L. J.; Knox, A. A.; Mee, T. R.; Raines, S. A.; Milner, J. Influence Of Tetramerisation on Site-Specific Post-Translational Modifications of p53: Comparison of Human and Murine p53 Tumour Suppressor Protein. *Cancer Biology and Therapy* 2008, 7 (9), 1481–1489.
- Wen, K. W.; Damania, B. Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV): Molecular Biology and Oncogenesis. *Cancer Letters* 2010, 289 (2), 140–150.
- Wies, E.; Mori, Y.; Hahn, A.; Kremmer, E.; Sturzl, M.; Fleckenstein, B.; Neipel, F. The Viral Interferon-Regulatory Factor-3 Is Required for the Survival of KSHV-Infected Primary Effusion Lymphoma Cells. *Blood* 2008, 111 (1), 320–327.



Mgr. Petra Riegerová, Ph.D. (e-mail: petra.riegerova@jh-inst.cas.cz) je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Svou doktorskou dizertační práci „Využití metody RNA interference pro studium onkogenních vlastností vIRF3 proteinu kódovaného virem Kaposiho sarkomu“ vypracovala pod vedením Mgr. Barbory Lubyové, Ph.D. na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF a úspěšně ji obhájila dne 31.5.2017.

Perličky ze školních lavic
(z písemných zkoušek z genetiky, PŘF UK, Praha, 2013-2015)
RNDr. Dana Holá, Ph.D., Katedra genetiky a mikrobiologie, PŘF UK, Praha

„U člověka se při rekombinačním mapování může používat jen pár metod, protože má velmi malý počet potomků.“

„Princip Sangerova sekvenování je takový, že syntézou vzniká různě dlouhý polypeptid, jehož délka závisí na sekvenci DNA.“

(Odpověď na otázku Popište principy různých metod sekvenování DNA): „Amplifikovaná DNA se odešle na sekvenaci do speciální sekvenační laboratoře.“

„PCR = polymerní chromatografie“

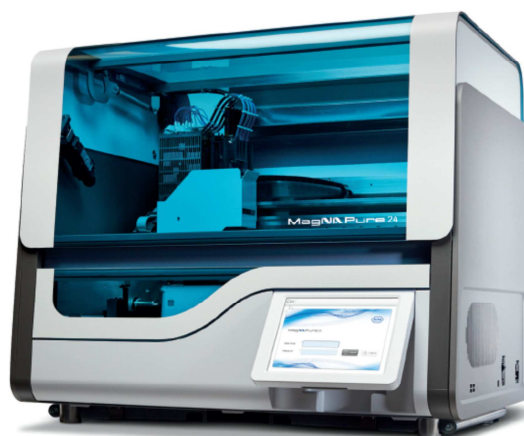
(Odpověď na otázku Jaké hlavní parametry musejí splňovat modelové organismy?):
„Musejí být snadno získatelné (zvířata je jednodušší získat/přemluvit než lidi).“



MagNA Pure 24 Systém

Roche nastavuje nové standardy v izolaci NK

Představujeme nový
automatický izolátor
genomické a cell-free
DNA.



■ škálovatelné řešení automatické izolace od 1–24 vzorků ■ certifikované (CE-IVD) ■
propojitelné do LISu ■ možnost využít primární odběrové zkumavky ■ trekovatelné,
intuitivní ■ vysoce efektivní a rychlé ■ již od 200 µl až do 4 ml ■ validované pro krev,
plazmu, sérum, sputum, BAL, CSF, výtěr, moč, stolici, čerstvou a zmraženou tkáň, FFPE ■

Roche s.r.o., Diagnostická divize
Na Valentince 3336/4, 150 00 Praha 5,
www.roche-diagnostics.cz

Objednávky

- E-mailem: objednavky@roche-diagnostics.cz
- Elektronická objednávka na:
<http://objednavky.roche-diagnostics.cz/objednavky/>

Centrum zákaznické podpory

- Tel: 800 11 11 99
- E-mailem: czech.rsc@roche.com
- Potřebujete-li více produktových informací, naleznete je na
<https://kdsolutions.roche.com>
- <https://lifescience.roche.com>

MagNA Pure

The MagNA Pure 24 System including instrument, kits, and accessories are for in vitro diagnostic unless otherwise noted.

MAGNA PURE is registered trademarks of Roche. All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

© 2017 Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved.

eppendorf



Zvládne více

....inteligentní, šetrná a vždy „cool“. Centrifuga 5920 R.

Na svůj výkon a kapacitu je menší a lehčí než obdobné přístroje. Chladicí systém s kompresorem s dynamickou kontrolou umožňuje centrifuze regulovat výkon, čímž chrání vložené vzorky, šetří energii a životní prostředí.

Výkonná – až $22.132 \times g$ s fixními rotory, až $4.816 \times g$ s výkyvnými rotory (rychlost 200–14.000 rpm).

Hodně zvládne – 6 rotorů s různou kapacitou (fixní i výkyvné).

Max. kapacita např.: 4 × 49 ks (196 celkem) odběrové zkumavky do 8 ml, 4 × 27 ks 15 ml konické zkumavky, 4 × 13 ks 50 ml konické zkumavky, 4 × 1l, 4 × 7 MTP, 4 × 2 DWP atd.

Elegantní – díky technologiím, materiálům a komponentům použitým při výrobě je na svou kapacitu menší než jiné, ergonomický design, snadné zavírání víka, nízká hlučnost.

Vždy „cool“ – kompresor s dynamickou kontrolou teploty, teplota nastavitelná v rozsahu -10°C až 40°C .

Inteligentní – SW funkce: automatický přepočet rpm/rcf, FastTemp, ECO power shut-off, nastavitelné stupně rozběhu a brzdění (10/10), uložení až 99 programů, 5 programů dostupných rychlým stlačením tlačítka na ovládacím panelu a mnoho dalších příjemných funkcí.

Prostě úžasná.

www.eppendorf.cz

Eppendorf® and the Eppendorf logo are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2015 by Eppendorf AG.