

Genetická Společnost Gregora Mendela

Informační listy

Číslo 30

Listopad 2006

Informační listy, tiskové forum GSGM

Dostáváte do ruky 30. číslo Informačních listů (IL), které jsou vydávány od roku 1985 a představují tak do určité míry stručnou historii sekce pro obecnou genetiku Čs.biologické společnosti (1971-92), jež se v roce 1992 osamostatnila jako nezávislá Genetická společnost Gregora Mendela (GSGM) s působností v České republice i na Slovensku. Již ta skutečnost, že vydávání IL nebylo při osamostatnění zastaveno, ale pokračovalo dokonce se zachováním pořadových čísel jednotlivých, nepravidelně vycházejících výtisků podtrhuje jejich význam pro existenci sekce a společnosti a pro informovanost jejich členů.

IL jako „tiskové fórum“ společnosti byly a jsou formálním vyjádřením ochoty a snahy členů dobrovolně se sdružovat a sjednocující celou členskou základnu. Jejich cílem je zprostředkovat komunikaci odborníků a zájemců o genetiku a příbuzné obory a zajišťovat jejich informovanost o nejnovějších směrech a poznacích, vytvářet podmínky pro jejich prezentaci a podílet se na koncepční, poradenské, prognostické a jiné odborné činnosti (viz stanovы GSGM z roku 1992). Prvním redaktorem byl S. Rosypal, který stanul v čele redakčního kruhu (I.Cetl, L.Lojsa, J.Nečásek a D.Vlček). Hlavní náplní IL se podle rozhodnutí výboru sekce z ledna 1985, staly informace o činnosti sekce a později společnosti, čs. pracovišť a příbuzenských vědeckých společností zabývajících se genetikou a obdobnou problematikou a stručné přehledy, články a zprávy o pokrocích a nových odborných poznacích v oboru, jakož i návrhy a připomínky členů k práci a činnosti orgánů společnosti. Tato předsevzetí byla v následujících letech víceméně dodržována a naplňována i po převzetí odpovědnosti za redakční práci J. Doškařem (od r.1989) a celým výborem, jako redakční radou nahrazující redakční kruh, což významně zjednodušilo a snad i zvýšilo účinnost přípravy obsahu a vydávání IL.

Rozhodující význam měly IL v organizační práci společnosti, kdy především v prvních 10-15 letech existence podrobně informovaly členskou základnu o práci, volbách a ustavení výboru, programech rozhodujících shromáždění a schůzí, jejich průběhu a rozhodnutích a při přípravách hlavních akcí společnosti, konferencí a monotematických seminářů. Sehrály důležitou úlohu i při korespondenčním zajišťování voleb a při referendech o přejmenování sekce (1990) osamostatnění společnosti (1992) a o přijímání a úpravách stanov. Některá čísla byla plně věnována tématické náplni jednotlivých genetických konferencí jako sborníky abstraktů všech příspěvků se seznamy účastníků a autorů.

Na počátku vydávání IL byla značná pozornost věnována většinou podrobným informacím o pracovištích s genetickým zaměřením na VŠ, v ústavech ČSAV, AVČR i v různých resortech, zvláště zdravotnických a zemědělských, které později ustupovaly do pozadí, aby uvolnily prostor odborným přehledným článkům o významných tématech jednotlivých oblastí genetiky a příbuzných oborů, často jako upoutávka či úvod do diskuse o hlavních tématech konferencí, či publikace vystoupení zvaných přednášejících na nich. Z více než 40 takto zaměřených titulů v dosud distribuovaných číslech IL, byla téměř polovina takových článků a přehledů uveřejněna v posledních 6 letech.

Pozorní čtenáři tak měli dostatek příležitostí nejen k získání potřebných informací jak o činnosti společnosti tak o rozvoji jejich oblíbeného oboru, ale i k vlastnímu podílu na nich, jako přispěvatelé, komentátoři a kritici. Takováto členská iniciativa však téměř neexistovala. Jen sporadicky byly uveřejněny např. zprávy a vzpomínky k důležitým a významným výročím známých genetiků a členů společnosti a to většinou z pera členů výboru. Až na vzácné výjimky nedostal výbor, jako redakční rada či redaktor IL žádné reakce na výzvy k diskusi o nabízených tématech, takže vše zůstávalo jen na úrovni příspěvku „funkcionářů“

společnosti a to je rozhodně málo, zvláště když obměna na takových „postech“ není příliš častá (i nejlepší „koště“ se časem opotřebuje).

V posledních 4 letech se postupně začala měnit struktura obsahu IL. V roce 2002 byla zavedena stále obnovovaná a doplňovaná internetová stránka GSGM, věnovaná nej-důležitějším informacím o sídle, stanovách a výboru společnosti, úplnému seznamu členů z ČR a SR, ale i programům konference (s periodicitou 3 let), zápisům ze schůzí výboru, hospodaření, stanovám a pravidlům Ceny GSGM (udělované mladým vědeckým pracovníkům) i organizacím genetických společností ve světě. Lze tam najít i dostatečný popis IL a kontakty na nejdůležitější osoby společnosti, které jsou pro pohodlí čtenářů uvedeny i na předposlední straně obálky každého čísla. Tím dochází ke stále většímu uvolňování obsahu jednotlivých čísel pro odborné zaměření a pro potřeby a příspěvky členské základny.

Vydávání IL je, jako konečně příprava, tisk a distribuce každého “časopisu“ byt v nejjednodušším uspořádání, dosti finančně náročné, a to zvláště pro zcela nezávislou organizaci, kterou GSGM je. Jediným zdrojem finančních prostředků společnosti jsou členské příspěvky, které jsou navíc, v porovnání s ostatními vědeckými a odbornými společnostmi na minimální úrovni. Je proto vhodné upozornit i na tomto místě, že osud IL a celé GSGM je do značné míry závislý i na bezpodmínečném plnění této základní členské povinnosti.

Jsme přesvědčeni, že dosavadní vývoj a současný stav IL odpovídá představám a požadavkům nejen jejich zakladatelů z roku 1985, ale i současným jednotícím potřebám GSGM. K tomu abychom mohli pokračovat v jejich vydávání a ve stálém zlepšování jejich formy a obsahu a tak, mimo jiné, přispívat k optimálnímu naplňování všech služeb členské základně společnosti (proto jsme byli zvoleni), potřebujeme nezbytně všestrannou pomoc každého člena ať radou, kritikou, či jiným příspěvkem, což se může bezprostředně projevit i na stránkách následujících čísel IL. Přejeme IL, sobě i všem členům společnosti, aby se nám taková vzájemná spolupráce ve prospěch GSGM i nadále dařila.

Jménem výboru GSGM Stanislav Zadražil

Členské příspěvky – připomínka a upomínka

Každá společenská organizace, která pocítí ve své činnosti nedostatek finančních prostředků, provede jako první opatření kontrolu placení členských příspěvků. Není proto překvapením, že tak učinil i výbor GSGM, který se přitom, bohužel, přesvědčil, že s plněním této základní povinnosti, uložené stanovami, mají někteří členové společnosti značné problémy. Je třeba si uvědomit, že naše Genetická společnost Gregora Mendla je finančně zcela nezávislá, nedostává od nikoho žádné dotace, a že je tudíž na pravidelné placení členských příspěvků svými členy plně odkázána. Naše příspěvky (100,-Kč ročně pro výdělečně činné členy, 50,-Kč pro studenty a pro důchodce) představují svou výší, v porovnání s obdobnými vědeckými společnostmi (a to i dotovanými) nejnížší požadavek v ČR.

Naproti tomu, při vydávání našich Informačních listů, jejich rozšiřování a rozesílání dalších členských materiálů zaznamenáváme v posledních letech postupně poměrně strmé narůstání všech nákladů, včetně poštovného, na což nám naše stávající finanční prostředky již výrazně přestávají stačit. Při pokračování současné téměř katastrofální platební příspěvkové morálky členů společnosti bychom museli co nejdříve přistoupit ke zvýšení členských příspěvků, ale je zřejmé, že to by postihlo především platící členy. Proto se obracíme na všechny, kteří z nejrůznějších důvodů neplatili svoje členské příspěvky, aby tak učinili co možná nejdříve, a to nejenom za letošní rok, ale i za všechna neuhrazená minulá léta. Prosíme Vás přitom, abyste při svých platbách, ať už poštovní poukázkou, či převodem z účtu, vždy uváděli svůj variabilní symbol. Jenom tak budeme schopni identifikovat plátce.

Výbor společnosti bude důsledně pokračovat ve zvýhodňování řádně platících členů GSGM, např. při vypisování nižších konferenčních poplatků na konferencích GSGM. Naproti tomu, výbor bude muset přistoupit k tvrdším sankcím u neplatících členů, a to nejprve přerušením zasílání Informačních listů a dalších tištěných materiálů společnosti, a u těch, kteří neplatí svoje členské příspěvky již více než jeden rok, zrušit jejich členství.

Výbor GSGM

VYÚČTOVÁNÍ HOSPODAŘENÍ GSGM ZA ROK 2005

Zůstatek ke 31.12. 2004		13 475,36 Kč	
	z toho:		
	na účtu KB	11 748,46 Kč	k 20.12.04
	v pokladně	1 726,90 Kč	k 31.12.04

Příjmy v roce 2005		3 352,50 Kč	
	z toho		
1. úroky z účtu u KB		2,48 Kč	
2. členské příspěvky:	z toho		
	placené na účet KB	2 700,- Kč	
	placené hotově	650,- Kč	
	celkem	3 350,- Kč	

Výdaje v roce 2005		13 517,50 Kč	
	z toho		
1. poštovné za IL 2005:		3 021,- Kč	
2. faktura tisk IL		7 785,50 Kč	
3. občerstvení		697,- Kč	
4. poplatky KB: z toho	z toho		
	za vedení účtu	1 820,- Kč	
	za položky	124,- Kč	
	provize	70,- Kč	
	celkem	2 014,- Kč	

Zůstatek ke dni 31.12.2005		3 315,50 Kč	
	z toho:		
	na účtu KB	2 652,- Kč	
	v pokladně	658,50 Kč	

Vyúčtoval J. Dvořák

Vyúčtovanie hospodárenia slovenskej časti GSGM k 31. 12. 2005

<u>Zostatok k 1.1.2005</u>	A- konto	10 552,15 SK
	B- hotovosť	7 420,90 SK
A		
Bankové operácie (dok.1)		- 793,6 SK
Príjmy z členských poplatkov k 31.12. 2005 (dok.1)		+ 1 800,00 SK
<hr/>		
Zostatok na účte k 31.12.2005 (dok.1)		+ 11 558,55 SK
B		
Členské príspevky (dok.2)		+ 1 100,00 SK
Kancelárske potreby (dok.3)		- 325,00 SK
<hr/>		
Zostatok hotovosti k 31.12. 2005		+ 8195,90 SK
Celkový finančný stav k 31. 12. 2005		+ 19754,45 SK

Bratislava, 15. 5. 2006

Vyúčtovala: M. Slaninová

CO NOVÉHO V GENETICE

(články nositelek ceny GSGM)

Obvyklé a neobvyklé telomery

Eva Sýkorová

Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno

Obvyklé telomery

Konce eukaryotických chromosomů jsou opatřeny specializovanými nukleoproteinovými strukturami - telomerami. Tyto struktury odlišují konce chromosomů od dvouřetězcových zlomů vznikajících v buňce poškozením DNA. Chrání je před působením exonukleas a před jejich vzájemným spojováním (fúzí), k němuž někdy dochází v důsledku chybné opravy chromosomových zlomů za vzniku dicentrických chromosomů (McClintock, 1941). Kromě ochranné a stabilizační funkce je telomerám připisována účast na řešení známého problému spojeného s replikací konců lineárních chromosomů (Wellinger a Sen 1997).

Na telomeru bezprostředně navazuje subtelomerická oblast (zkráceně subtelomera), která bývá chápána také jako jakási "nárazníková zóna". Může například suplovat funkci telomery v případě její ztráty, jak bylo zjištěno u kvasinek (Palladino a Gasser 1994). Jde o dynamickou oblast, ve které dochází k rozpoznání a párování homologních chromosomů, genové konversi, homogenizaci heterologních konců chromosomů, jsou tu také častá místa rekombinace. Subtelomera je napojena na telomeru prostřednictvím sekvencí, které označujeme jako sekvence asociované s telomerou (TAS, *telomere-associated-sequence*). Jako TAS často vystupují vysoce repetitivní sekvence satelitního typu, ale také jimi mohou být sekvence málo četné či unikátní. Sekvence, které se nalézají v sousedství telomery, mohou, ale nemusí být specifické pro daný chromosom, také nemusí být jedinečné ve svém umístění, jejich kopie mohou být i v jiných částech chromosomu (Horáková a Fajkus 2000; Chute *et al.* 1997). Vyjma speciálních případů se v subtelomeře obvykle nenacházejí geny. Pokud jsou přítomny kódující sekvence, jsou v blízkosti telomery zpravidla umlčeny - tzv. telomerový posiční efekt. Telomery mají totiž kompaktní chromatinovou strukturu podobnou v mnoha ohledech heterochromatinu. Jednou z jejich osobitých zvláštností je kratší periodičita telomerového chromatinu ve srovnání s tzv. většinovým chromatinem (*bulk chromatin*).

Strukturu chromatinu repetitivních sekvencí, a potažmo i telomer, na základní úrovni popisujeme pomocí periodicity chromatinu, která představuje pravidelné opakování délky DNA sbalené do nukleosomu, tj. včetně „linkerové“ DNA. Na opakujících se sekvencích se uplatňují pro usazení nukleosomu posiční signály, které (díky periodické povaze repetice) výsledně určují periodicitu takového chromatinu. Pro mnoho repetitivních sekvencí, je typická délka jednotky odpovídající délce mono a di-nukleosomální DNA a na mnohých z nich zaujímají nukleosomy preferované posice. Mohou to být satelitní sekvence z různých částí genomu, jako dobrý příklad lze uvést sekvence tabáku - subtelomerickou HRS 60 (Fajkus *et al.* 1995, Koukalová *et al.* 1989) nebo pericentromerickou a interkalární GRS (Gazdová *et al.* 1995, Královics *et al.* 1995). U repetice subtelomerické oblasti se setkáváme s periodicitou podobnou periodicitě většinového chromatinu. Naproti tomu telomerová oblast

tvořená krátkými oligonukleotidovými telomerovými repeticemi je příkladem sekvence, která nemá sekvenční preference pro vazbu histonového oktameru, a tak se v organizaci chromatinové struktury budou zřejmě uplatňovat jiné faktory. Periodicita telomerového chromatinu bývá tedy zpravidla kratší o cca 40 pb v porovnání s většinovým chromatinem (Lejnine *et al.* 1995) a měření stability nukleosomů tvořených různými repetitivními sekvencemi ukázalo, že nejnižší stabilita přísluší právě telomerickým repetitím (Rosetti *et al.* 1998).

Délka telomer stejného typu bývá různá a tudíž i oblast telomerového chromatinu, srovnáme-li délku rostlinných telomer např. u tabáku je 40 - 150 kb (Fajkus *et al.* 1995), u huseničku (*Arabidopsis thaliana*) 2 - 5 kb (Richards a Ausubel 1988). Rostlinou s krátkými telomerami je i *Silene latifolia* (2,5 - 4,5kb, Říha *et al.* 1998). Zkoumání telomery a jejího napojení na subtelomeru u knotovky bílé (*Silene latifolia*) přineslo několik zajímavých zjištění (Sýkorová *et al.* 2003a). Pro analýzu subtelomer byla použita přímá PCR reakce s telomerovým primerem a primery odvozenými z obou řetězců vysoce repetitivní subtelomerické sekvence X43.1 (popsána poprvé v Bůžek *et al.* 1997). Tato sekvence je přítomna ve všech chromosomech knotovky bílé, ale její vzdálenost od konce chromosomu nebyla známa. Pročištěná směs produktů byla klonována a jednotlivé klony sekvenovány. Získané varianty napojení lze schematicky rozdělit na varianty s přímým napojením sekvence X43.1 na telomeru a varianty s nepřímým napojením. V druhém případě je napojení zprostředkováno nepříbuznými sekvencemi, které nebyly homologní s dosud známými sekvencemi *S. latifolia* ani s jinými sekvencemi z databáze GENBANK. Tyto varianty lze dále rozdělit podle typu mezerníku na: a) s krátkou mezerníkovou sekvencí, b) s jinou temovou repetitivní sekvencí, c) s dlouhou mezerníkovou sekvencí.

Pro sekvenci X43.1 (délka jednotky 335bp) v přímém napojení na telomeru byly identifikovány tři různé varianty uspořádání. Ve skupině s krátkou mezerníkovou sekvencí byly popsány dvě varianty, u nichž po mezerníkové sekvenci v místě napojení pokračuje telomera degenerovanými telomerovými motivy. V několika dalších klonech byla mezi telomerou a X43.1 nalezena nová vysoce repetitivní sekvence 15Ssp a dále charakterizována. Délka jednotky je 159 bp, sekvence je AT bohatá (69%) a sekvenčně konzervativní, zastoupení v genomu je 8000 kopií na haploidní jádro. Její subtelomerická posice byla ověřena fluorescenční hybridizací *in situ* (FISH). Získané klony obsahovaly různý počet jednotek sekvence 15Ssp, které byly napojeny na telomeru ve dvou různých místech. Podobně jako u přímého napojení sekvence X43.1 není zde přítomen žádný další mezerník. Variantu s dlouhou mezerníkovou sekvencí reprezentují 4 klony se stejným způsobem a místem napojení na telomeru. Mezerník je v tomto případě představován dlouhou sekvencí 19Bst, která je na telomeru napojena prostřednictvím úseku obsahujícího degenerované telomerové motivy. Jde o sekvenci s nízkým počtem kopií v genomu.

Jak již bylo zmíněno, periodicita chromatinu v telomeře a subtelomerické oblasti bývá odlišná. Kde dochází k přechodu struktury chromatinu, zda bezprostředně pod telomerou nebo hlouběji v genomu a dochází-li k přeskoku pozvolna nebo naráz, jsou otázky, na něž může dát odpověď studium struktury chromatinu repetitivních TAS sekvencí. V případě knotovky bílé, rostliny s krátkými telomerami, je situace obzvláště zajímavá (Sýkorová *et al.* 2001). Periodicita telomerického chromatinu je 164 ± 7 pb, periodicita většinového chromatinu a 18S rDNA je 180 ± 11 pb. Subtelomerické repetitivní sekvence přítomné v přímém napojení na telomeru 15Ssp a X43.1 vykazovaly odlišnou periodicitu než většinový chromatin. Organizace chromatinu sekvence X43.1 se projevuje dvojí periodicitou (153 ± 10 bp a 188 ± 12 bp), nápadné je, že kratší je podobná telomerovému chromatinu, delší pak většinovému chromatinu. Nukleosomy zaujímají na sekvenci preferované posice, které byly určeny pomocí tří nezávislých metod analýzy translační posice nukleosomu – restriční analýzou, extensí

primeru a klonováním nukleosomální DNA. Výsledky ukázaly dobrou shodu s posicemi nukleosomů predikovanými pomocí programu NUCLEOSM. Chromatin sekvence 15Ssp se projevuje krátkou periodicitou (157 ± 7 bp) podobnou periodicitě telomerového chromatinu. Nukleosomy však na sekvenci nezaujmají preferované translační posice. Podobné chování subtelomerické sekvence dosud nebylo pozorováno. Další vlastností připodobňující sekvenci 15Ssp telomeře je zvýšená citlivost k nukleasovému štěpení. O terminálních částech savčích chromosomů byla již dříve vyslovena domněnka, že struktura chromatinu blíže ke konci chromosomu je odlišná od proximální části (Tommerup *et al.* 1994). Práce zmiňující dvojnásobnou periodicitu chromatinu v subtelomerických oblastech (Vershinin a Heslop-Harrison 1998) naznačují, že oblast s kratší periodicitou příslušící telomeře by mohla být rozšířena i na sousední oblasti a možná společně tvořit jednu strukturně-funkční jednotku. Vlastnosti chromatinu temově repetitivní sekvence 15Ssp a částečně i X43.1 takovou domněnku podporují. Na základě těchto i dalších charakteristik byl vytvořen nový model uspořádání chromatinu do sloupcové struktury, který by se mohl významně uplatňovat zejména v telomerových oblastech (Fajkus a Trifonov 2001). Jeho základem je představa spojitě vinuté DNA okolo sloupce histonových oktamerů, přičemž „linkery“ jsou deformovány stejným způsobem jako nukleosomová DNA. Struktura je stabilizována především vzájemnými interakcemi histonových oktamerů.

Neobvyklé telomery

Telomery až donedávna bývaly považovány za jedny z nejkonzervativnějších částí chromosomů, zejména díky faktu, že jejich DNA složka je tvořena mnohočetným opakováním krátkých oligonukleotidových motivů - telomerových repetitiv - a je společná celým skupinám organismů. Například repetice TTAGGG je vlastní obratlovcům včetně člověka (Cheng *et al.*, 1989; Meyne *et al.*, 1989), repetice TTTAGGG je považována za univerzální pro rostliny (popsaná poprvé u *Arabidopsis thaliana*, Richards a Ausubel 1988), hmyz má ve svých telomerách repetici TTAGG (poprvé popsána u bource morušového (Okazaki *et al.*, 1993). Až do roku 1999 bylo známo pouze několik výjimek, nejznámější z nich u modelového organismu *Drosophila melanogaster*, jejíž telomera je tvořena retroelementy Het-A a TART (Biessmann *et al.*, 1996), u rostlin pak byla popsána nepřítomnost typické telomerické sekvence u cibule kuchyňské (*Allium cepa*, Fuchs *et al.*, 1995, Pich *et al.* 1996). Posun v pohledu na to, co lze považovat za typické a netypické v rámci telomery lze spatřit v práci Sahara *et al.* (1999), kde autoři popsali několik dalších výjimek u hmyzu a také u pavouka. Další překvapivé zjištění bylo publikováno Adamsem *et al.* v roce 2000 a 2001, a to o ztrátě typických telomerických sekvencí u *Aloe* a dále u velké skupiny jednoděložných rostlin z řádu Asparagales (zahrnují *Aloe* i *Allium*). Podle některých odhadů tento rostlinný řád představuje množinu 11% z krytosemenných rostlin, což spolu se zmíněnými výjimkami u hmyzu vyvolává otázku, jak "typické" jsou vlastně typické telomery.

Zájem naší skupiny o telomery se posunoval také od těch typických k těm neobvyklým. Ze spolupráce se skupinou Prof. Leitch (Queen Mary University of London, Velká Británie), v jehož laboratoři vznikla i průlomová zjištění publikovaná v pracích Adams *et al.* (2000 a 2001), vzešlo několik publikací o neobvyklých telomerách rostlin. Prvním překvapením bylo, že také u dvouděložných lze najít příklady rostlin s netypickými konci chromosomů, čímž se škála organismů s neobvyklými telomerami dále rozšiřuje. Příslušníkům rodů *Cestrum*, *Vestia* a *Sessea* také chybí v telomerách typ *Arabidopsis* telomerické sekvence TTTAGGG (Sýkorová *et al.* 2003b). Tyto rostliny patří do čeledi Solanaceae, z níž pochází mnoho modelových a dobře prozkoumaných rostlin se zcela typickými telomerami, jako jsou např. tabák, rajče nebo brambor. Ačkoli sekvence TTTAGGG netvoří telomeru těchto rostlin, její

mnohé kopie zůstaly roztroušené v genomu a lze je nalézt v sousedství mnoha dalších sekvencí s vysokým počtem kopií. Důkaz o nepřítomnosti sekvence TTTAGGG v telomeře nebylo možné podat použitím pouze hybridizačních technik, jako jsou např. fluorescenční hybridizace *in situ* nebo slot-blot (Southern) hybridizace, vzhledem k detekčnímu limitu těchto technik ovlivněnému v případě slot-blot hybridizace i velikostí genomu (např. *Cestrum parqui* 1C = 10,94 pg). Klasickou metodou použitou úspěšně v případě cibule kuchyňské (citace) byla tzv. asymetrická PCR s jedním primerem odpovídajícím hledané telomerové sekvenci a po rozdělení produktů na agarózovém gelu přenos na membránu a následná hybridizace se značenou specifickou sondou. Zatímco cibule nedávala žádné produkty v asymetrické PCR, u rostlin rodu *Cestrum* byla po rozdělení na gelu patrná celá škála produktů a to velmi různých v závislosti na použitém primeru. Tyto produkty byly klonovány a dále podrobněji charakterizovány (Sýkorová *et al.* 2003c). Šlo o sekvence s vysokým počtem kopií, které se v genomech cester nacházejí někdy i v sousedství několika sekvencí TTTAGGG a jejich lokalizace na mitotických chromosomech prokázala rozptýlený výskyt. Konečný důkaz o nepřítomnosti delších úseků TTTAGGG, které by snad mohly tvořit telomeru, byl založen na faktu, že telomera je směrově specifickou sekvencí, tj. ve směru 5'-3' ke konci chromosomu se v řetězci objevuje pouze G-řetězec neboli sekvence TTTAGGG. Komplementární C-řetězec je ve směru 5'-3' prodloužován směrem dovnitř chromosomu. Modifikujeme-li asymetrickou PCR tak, že pro prodloužení primeru odvozeného z C-řetězce bude použita směs pouze tří deoxynukleotidů (A,C,T), produkty budou jednořetězcové molekuly s monotónní sekvencí (CCCTAAA)_n, prodloužené až do místa prvního guaninu v templátu. Pro klasickou telomeru nebude představovat nepřítomnost deoxyguanosinu v reakci problém a vzniknou dlouhé produkty reakce, které jsou po rozdělení na gelu a blotování snadno detegovatelné značenou sondou pomocí Southern hybridizace. U zkoumaných příslušníků rodu *Cestrum* však nebyly žádné produkty detegovány, zatímco kontrolní vzorek *Arabidopsis thaliana*, rostliny s krátkými telomerami, poskytl silný hybridizační signál.

Velkou skupinu rostlin s neobvyklými telomerami nacházíme u jednoděložných, a to v řádu Asparagales. Podle typu telomerické sekvence byly rozděleny v práci Adams *et al.* (2001) do dvou skupin a to na skupinu rostlin s telomerami tvořenými telomerickou sekvencí typu *Arabidopsis* (skupina I) a na rostliny, které ji postrádají na koncích chromosomů (skupina II). Velice objeveným bylo pozorování, že obě skupiny tvoří fylogeneticky sevřené skupiny, přičemž rostliny s typickou sekvencí jsou fylogeneticky starší, tj. ke ztrátě sekvence typu *Arabidopsis* došlo ve zcela určitém bodě evoluce telomer. Neznámou však zůstalo, jaká sekvence ji nahradila v telomeře rostlin skupiny II a jakými mechanismy jsou tyto telomery udržovány. Tyto otázky se staly základem pro mezinárodní projekt "Loss gain of typical telomeres in monocots" (Leverhulme Trust, 2001-2004) navazující na práci Adams *et al.* (2001), řešení kterého se účastnilo i naše pracoviště. Jednou ze zvolených strategií byl skrínink genomových DNA velkého počtu rostlin řádu Asparagales na přítomnost podobných telomerických motivů, které již byly popsány jako funkční telomerické sekvence u jiných organismů (Sýkorová *et al.* 2003d). Pomocí metody slot-blot hybridizace, která umožňuje efektivní skrínink velkého počtu vzorků, bylo do experimentu zahrnuto 112 druhů, které reprezentovaly v široké škále 19 rostlinných čeledí. Genomová DNA rostlin byla hybridizována s radioaktivně značenými sondami specifickými pro telomerické motivy rostlin (*Arabidopsis*, TTTAGGG), zelených řas (*Chlamydomonas*, TTTTAGGG), obratlovců (člověk, TTAGGG), hmyzu (*Bombyx*, TTAGG), obrvených (*Tetrahymena*, TTGGGG a *Oxytricha* TTTTGGGG) a červů (*Ascaris*, TTAGGC). Výsledky hybridizace prokázaly, že v genomové DNA rostlin skupiny II, které podle původní práce Adams *et al.* (2001) postrádaly signál *Arabidopsis*-typu sekvence na koncích chromosomů, je možno pozorovat zvýšený výskyt zejména sekvence TTAGGG typické pro obratlovce (lidský typ), který je doprovázen zvýšeným výskytem dalších typů sekvencí (typ *Tetrahymena*, typ *Arabidopsis*). Jedinou

výjimku z tohoto poměrně homogenního chování představovaly příslušníci rodu *Allium*. Pomocí FISH se podařilo ukázat, že signály odpovídající "doprovodným" sekvencím hybridizují pouze na některých koncích chromosomů, zatímco lidský typ sekvence byl lokalizován na všech koncích chromosomů. Stále však zůstávala otevřená možnost, že konce chromosomů jsou tvořeny velkým úsekem lidského typu sekvence, ale zakončeny jsou krátkým úsekem telomerických sekvencí typu *Arabidopsis*. Další otázkou bylo, zda zůstal zachován funkční mechanismus udržování telomer pomocí telomerasy, který je typický pro organismy jejichž telomery jsou tvořeny minisatelitními sekvencemi. Experiment pro zjištění aktivity telomerasy mohl zodpovědět obě otázky. Pomocí techniky TRAP (*telomere-repeat-amplification-protocol*), která využívá toho, že telomerasa je schopna přidávat telomerické repetice i na netelomerické oligonukleotidy a produkty takové reakce je možno amplifikovat pomocí PCR reakce, bylo prokázáno, že telomerasa je aktivní. Sekvence produktů TRAP reakce pro rostliny *Bulbine rectiflora* (Asphodelaceae) a *Ornithogalum virens* (Hyacinthaceae) demonstrovala, že telomerasa rostlin skupiny II syntetizuje repetice lidského typu, tj. TTAGGG. Vyhodnocení aktivity telomerasy a syntetizovaných sekvencí ukázalo, že telomerasy těchto rostlin syntetizují telomerické repetice s velkým množstvím chyb (až 23%). Poslední neznámou zůstala cibule, u níž byla TRAP reakce negativní, podobně slot-blot hybridizace nebo FISH.

Zájem o telomery Asparagales se posunul k podrobnějšímu studiu konců chromosomů a chromatinové struktury. Dříve zmíněný výskyt "doprovodných" sekvencí v terminálních oblastech zejména u Hyacinthaceae evokoval otázky o vzájemném uspořádání těchto sekvencí v telomeře a také, jak změna telomerické sekvence ovlivnila proteiny vázající se na telomery (Rotková *et al.* 2004). Tyto proteiny jsou nezbytné pro fungování telomery a modulují strukturu telomer, např. umožněním nebo zabráněním přístupu telomerase. Bývají také specifické k rozpoznávané telomerické sekvenci. Technikami fluorescenční hybridizace *in situ* na natažených vláknech DNA u *Ornithogalum virens* bylo demonstrováno, že sekvence lidského typu tvoří homogenní bloky, které jsou z velké části přerušovány bloky sekvencí typu *Arabidopsis* v různém vzájemném uspořádání, nebo v některých případech se objevuje typ *Tetrahymena*. Dalším zajímavým pozorováním bylo chování proteinů k oligonukleotidům různých telomerických typů. Jak bylo dříve zmíněno, telomera je směrově specifickou sekvencí, její zvláštností je také přítomnost 3' koncového přesahu, který je tvořen G-řetězcem. Oligonukleotidové sondy se specifickou sekvencí pro G-řetězec mimikovaly takovýto přesah pro proteiny v experimentu *in vitro*. Proteiny, které se specificky vážaly k oligonukleotidu, jej zpožďovaly v polyakrylamidovém gelu (metoda EMSA, *electrophoretic-mobility-shift-assay*). Následná SDS-PAGE umožnila zjistit i zdánlivé velikosti proteinů, které se navázaly na značený oligonukleotid. U rostlin ze skupiny II se tak podařilo demonstrovat přítomnost jednak proteinů specifických pro lidský typ telomerické sekvence, dále proteinů specificky rozpoznávajících sekvenci typu *Arabidopsis* a také proteinů jež se vážaly k oběma typům.

Závěrem

Studium obvyklých a neobvyklých telomer rostlin stojí na svém počátku a dosud nabízí více otázek než odpovědí. Vedle telomer se můžeme ptát na telomerasy, které syntetizují změněný typ telomerické sekvence. Lze se ptát na proteiny a na to, jak fungují v telomerách těchto rostlin. Záhadou zůstávají zahaleny telomery cibule kuchyňské nebo jejich výskyt u Solanaceae... a jak se zdá, další překvapení nás mohou čekat v telomerách jakékoli další skupiny organismů.

Literatura

- Adams, S. P., Leitch, I. J., Bennett, M. D., Leitch, A. R. (2000) *Aloe* L.- a second plant family without (TTTAGGG)*n* telomeres. *Chromosoma* **109**: 201-205.
- Adams, S. P., Hartman, T. P., Lim, K. Y., Chase, M. W., Bennett, M. D., Leitch, I. J., Leitch, A. R. (2001) *Proceedings of the Royal Society London Biological Sciences* **268**, 1541-6.
- Bůžek, J., Koutníková, H., Houben, A., Říha, K., Janoušek, B., Šíroký, J., Grant, S., Vyskot, B. (1997) *Chromosome Res* **5**, 57-65.
- Fajkus, J., Trifonov, E. N. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 961-3.
- Fajkus, J., Kovařík, A., Královics, R., Bezděk, M. (1995) *Mol Gen Genet* **247**, 633-8.
- Fuchs, J., Bres, A., Schubert, I. (1995) *Plant Systematics Evolution* **196**, 227-241.
- Gazdová, B., Šíroký, J., Fajkus, J., Brzobohatý, B., Kenton, A., Parokony, A., Heslop-Harrison, J. S., Palme, K., Bezděk, M. (1995) *Chromosome Research* **3**, 245-254.
- Horáková, M., Fajkus, J. (2000) *Genome* **43**, 273-84.
- Cheng, J. F., Smith, C. L., Cantor, C. R. (1989) *Nucleic Acids Res* **17**, 6109-27.
- Chute, I., Le, Y., Ashley, T., Dobson, M. J. (1997) *Genomics* **46**, 51-60.
- Koukalova, B., Reich, J., Matyasek, R., Kuhrova, V., Bezděk, M. (1989) *Theor Appl Genet* **78**, 77-80.
- Královics, R., Fajkus, J., Kovařík, A., Bezděk, M. (1995) *J Biomol Struct Dyn* **12**, 1103-19.
- Lejnine, S., Makarov, V. L., Langmore, J. P. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2393-7.
- McClintock, B. (1941) *Genetics* **26**, 234-282
- Meyne, J., Ratliff, R. L., Moyzis, R. K. (1989) *Proceedings of the National Academy of Science, U S A* **86**, 7049-7053.
- Okazaki, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., Ishikawa, H., Fujiwara, H. (1993) *Molecular Cell Biology* **13**, 1424-1432.
- Palladino, F., Gasser, S. M. (1994) *Curr Opin Cell Biol* **6**, 373-9.
- Pich, U., Fuchs, J., Schubert, I. (1996) *Chromosome Res* **4**, 207-13.
- Říha, K., Fajkus, J., Šíroký, J., Vyskot, B. (1998) *Plant Cell* **10**, 1691-8.
- Richards, E. J., Ausubel, F. M. (1988) *Cell* **53**, 127-36.
- Rossetti, L., Cacchione, S., Fua, M., Savino, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 6727-37.
- Rotková, G., Skleničková, M., Dvořáčková, M., Sýkorová, E., Leitch, A. R., Fajkus, J. (2004) *Cytogenet Genome Res* **107**, 132-138.
- Sahara, K., Marec, F., Traut, W. (1999) *Chromosome Res* **7**, 449-460.
- Suzuki, K., Yamagiwa, Y., Matsui, T., Yoshida, K. (1994) *DNA Res* **1**, 129-38.
- Sýkorová, E., Fajkus, J., Ito, M., Fukui, K. (2001) *Chromosome Res* **9**, 309-323.
- Sýkorová, E., Cartagena, J., Horakova, M., Fukui, K., Fajkus, J. (2003a) *Mol Gen Genomics* **269**, 13-20.
- Sýkorová, E., Lim, K. Y., Chase, M. W., Knapp, S., Leitch, I. J., Leitch, A. R., Fajkus, J. (2003b) *Plant J* **34**, 283-91.
- Sýkorová E, Lim KY, Fajkus J, Leitch AR (2003c) *Chromosoma* **112**: 164-172.
- Sýkorová, E., Lim, K. Y., Kunická, Z., Chase, M. W., Bennett, M. D., Fajkus, J., Leitch, A. R. (2003d) *Proceedings of the Royal Society London Biological Sciences* **270**, 1893-904.
- Tommerup, H., Dousmanis, A., de Lange, T. (1994) *Mol Cell Biol* **14**, 5777-85.

Vershinin, A. V., Heslop-Harrison, J. S. (1998) *Plant Mol Biol* **36**, 149-61.
Wellinger, R. J., Sen, D. (1997) *Eur J Cancer* **33**, 735-49.

Polyomavirus: Význam minoritních strukturních proteinů; Studium časně fáze infekce

Petra Mannová

Katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze
(současné pracoviště: Public Health Sciences Division, , Fred Hutchinson Cancer Research
Center, Seattle, USA)

Úvod – polyomaviry včera a dnes

Polyomaviry jsou malé, neobalené DNA viry s ikosahedrální kapsidou o velikosti asi 45 nm. Myší polyomavirus byl poprvé izolován Ludwigem Grossem v roce 1953 (Gross, 1953) jako agens indukující nádory v různých orgánech myši. Objevy dalších polyomavirů infikujících obratlovce následovaly v pozdějších letech. Taxonomicky jsou dnes polyomaviry řazeny do samostatné čeledi *Polyomaviridae*, která vznikla po rozdělení původní čeledi *Papovaviridae* zahrnující také papilomaviry. Myší polyomavirus (polyomavirus, Py) a opičí virus SV40 jsou dnes nejlépe prostudovanými zástupci skupiny. Lidské viry BK a JC jsou na základě sekvenční analýzy příbuzné SV40, zatímco např. křeččí virus polyomaviru.

Polyomavirový genom (tvořený dvouvláknovou kružnicovou molekulou DNA o velikosti přibližně 5 000 bp) je replikován v jádře hostitelské buňky, kde dochází nejprve k transkripci genů časně oblasti. Tyto geny kodují nestrukturní proteiny velký (LT), střední (MT) a malý (ST) T antigen (u SV40 pouze LT a ST), které jsou nezbytné pro replikaci virové DNA a navození S fáze buněčného cyklu hostitelské buňky, což je zprostředkováno interakcí T antigenů s klíčovými regulačními proteiny buněčného cyklu (LT Py a SV40 váží protein Rb a LT SV40 protein p53). Nárůst hladiny strukturních proteinů VP1, VP2, VP3 (geny pozdní oblasti) je následován sestavováním virionů. Nově replikované virové genomy jsou enkapsidovány ve formě minichromosomu asociovaného s hostitelskými histony H2A, H2B, H3 a H4. Histon H1 je odstraněn (patrně vytěsněn VP1, který má sekvenčně nespecifickou afinitu k DNA) v průběhu enkapsidace. Proces rozpoznání virové DNA a enkapsidace není doposud zcela objasněn.

Produktivní polyomavirová infekce permisivních buněk končí destrukcí hostitelské buňky. Údaje získané pro SV40 naznačují, že k lyzi infikovaných buněk nedochází pouze v důsledku naplnění jádra nově vzniklými viriony, ale že se jedná o aktivní proces ovlivněný interakcemi mezi virem a hostitelskou buňkou (Clayson *et al.*, 1989).

Kromě permisivních buněk se receptory pro Py a SV40 nacházejí také na povrchu celé řady buněčných typů (včetně lidských), které jsou pro virus nepermisivní, ale mohou být immortalizovány nebo transformovány, pokud dojde k expresi časných T antigenů. Aktivita časného zesilovače a promotoru je dána přítomností či nepřítomností určitých buněčných proteinů v závislosti na buněčném typu a stupni diferenciaci. K replikaci virového genomu dochází pouze v přirozených hostitelích (vazba LT s proteiny hostitelského replikačního aparátu je druhově specifická). Vazba LT antigenu Py a SV40 s buněčným onkosupresorem Rb je pravděpodobně klíčovým faktorem v immortalizaci buněk. LT váže hypofosforylovaný Rb (Ludlow *et al.*, 1989), který je v buňce přítomen v G0 a G1 fázi buněčného cyklu a váže transkripční faktor E2F. Důsledkem vyvázání Rb LT antigenem je aktivace E2F a přechod buňky do S fáze. Zatímco Py LT může buňky immortalizovat, LT SV40, který kromě Rb váže také onkosupresor p53, je schopen buňky plně transformovat (Martin a Chou, 1975). Hlavním onkogenním proteinem Py je MT antigen, který se váže k proteinům rodiny Src tyrosinkinasy a konstitutivně je aktivuje (přehled Messerschmitt *et al.*, 1997). Nepermisivní buňky mohou být

transformovány abortivně (virový genom se po několika dnech z buňky ztrácí) nebo trvale (pokud dojde k integraci viru do genomu hostitele a geny pro LT respektive MT zůstanou intaktní a aktivní).

Přes výrazný onkogenní potenciál polyomavirů v kulturách nepermissivních buněk *in vitro*, v přirozeném hostiteli (kde dochází k replikaci viru) je jejich tumorogenicita velmi nízká a perzistentní asymptomatická infekce přetrvává celoživotně. V případě silného oslabení nebo nedostatečné funkce imunitního systému však může dojít ke vzniku onemocnění (lidský JCV je spojen s progresivní multifokální leukoencefalopatií, některé kmeny polyomaviru indukují nádory po inokulaci novorozenečným myším). V této souvislosti je zajímavé, že nové analýzy (přehled Carbone, 1999) dávají do souvislosti zvýšený výskyt některých typů nádorů u člověka a infekci virem SV40 přítomným jako kontaminace ve vakcíně proti poliomyelitidě v 60-tých letech (v infikovaných lidských buňkách dochází k expresi časných antigenů SV40).

Pro svůj malý genom, snadnou kultivaci *in vitro* a značnou míru závislosti na hostitelské buňce, se polyomaviry staly velmi užitečnými nástroji při studiu základních procesů eukaryotické buňky (replikace, transkripce, mechanismus sestřihu hnRNA, signální transdukce, úloha onkogenů a onkosupresorů v buněčném cyklu). Stále ale zůstává mnoho nezodpovězených otázek spojených s biologií polyomavirů a jejich interakcí s hostitelskou buňkou. Detailní poznání v tomto směru je důležité i z hlediska možného využití polyomavirových, SV40 a JCV kapsid pro účely genové terapie (přehled Tegerstedt *et al.*, 2005, Strayer *et al.*, 2005, Georgens *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2004). Pseudokapsidy lze získat z rekombinantně exprimovaného hlavního kapsidového proteinu VP1, který se samouspořádává do pseudokapsidových struktur bez přítomnosti virového genomu, což je výhodou oproti adenovirovým a retrovirovým vektorům. Koexprese VP1 a minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3 vede ke vzniku partikulí obsahujících všechny tři strukturní proteiny v zastoupení analogického virové partikuli. (Salunke *et al.*, 1986, Montross *et al.*, 1991, Forstová *et al.*, 1993, An *et al.*, 1999) Prázdné kapsidy interagují *in vitro* s DNA polyomaviru (Aposhian *et al.*, 1975) i s heterologní DNA (Štokrová *et al.*, 1999). Polyomavirové pseudokapsidy byly použity pro *in vitro* a *in vivo* přenos exogenních genů a peptidů do několika typů myších, krysích a lidských buněk (Forstová *et al.*, 1995, Bouřa *et al.*, 2005, Arad *et al.*, 2005).

Tento článek předkládá souhrn výsledků publikovaných v pracích Mannová *et al.* (2002) a Mannová a Forstová (2003). Tyto práce se týkají významu minoritních strukturních antigenů v životním cyklu Py a charakterizace časné fáze infekce Py.

I. Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E. & Forstová, J. (2002). Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins.

I.I. Úvod

Minoritní strukturní antigeny polyomaviru

Kapsidy polyomaviru jsou složeny ze tří strukturních proteinů, VP1, VP2, VP3 (viral proteins 1, 2, 3). Geny pro strukturní antigeny jsou exprimovány v pozdní fázi infekce, po zahájení replikace virového genomu. Pozdní transkripty jsou sestřihovány z velkých multigenomových transkriptů, které jsou přepisovány v pozdní fázi infekce kontinuální transkripcí cirkulárního genomu bez terminace. Protože gen proVP3 se překrývá s C-

koncovou částí genu pro VP2 a příslušné mRNA jsou přepisovány ve stejném čtecím rámci, sekvence VP3 je zcela obsažena v C-koncové části VP2. Čtecí rámec pro syntézu VP1 je vzhledem k VP2/3 posunutý, proto překryvná sekvence mezi N-koncem VP1 a C-koncem VP2 a VP3 není homologní.

Struktura polyomavirové kapsidy byla určena pomocí rozptylu X-paprsků na krystalech virionů při rozlišení 25 Å (Griffith *et al.*, 1992). Hlavní kapsidový protein, VP1 (45 kDa), vytváří 72 pentamerů. Pentamery spolu vzájemně interagují C-konci VP1 molekul a tvoří ikosahedrální kapsidu viru.

Ze srovnání map elektronových hustot získaných z difrakčních studií virionů a kapsid složených pouze z VP1 vyplynulo, že v pětičetné ose symetrie každého pentameru se směrem „dovnitř“ virionu nachází jedna molekula minoritního kapsidového proteinu VP2 (35 kDa) nebo VP3 (23 kDa) (Griffith *et al.*, 1992). Minoritní kapsidové proteiny jsou svým C-koncem zakotvené v axiální dutině pentameru a jejich flexibilní N-konec směřuje dovnitř virionu (Barouch a Harrison, 1994, Chen *et al.*, 1998).

Úloha minoritních kapsidových proteinů v životním cyklu polyomaviru není do současnosti beze zbytku objasněna. VP2 a VP3 nejsou nezbytné pro sestavení kapsidy - hlavní strukturální protein VP1 je v přítomnosti Ca^{2+} iontů schopen samouspořádání do pentamer a následně kapsidových struktur (Montross *et al.*, 1991). Informace o struktuře je pravděpodobně obsažena v primární sekvenci VP1, protože kapsidy tvoří i posttranslačně nemodifikovaný VP1 produkovaný v prokaryontním expresním systému (Salunke *et al.*, 1986). Ve virionech se VP1 nachází v šesti různých posttranslačně modifikovaných formách (Bolen *et al.*, 1981). Forstová *et al.* (1993) zjistili, že k syntéze všech forem VP1 v bakulovirovém expresním systému je nezbytná koexprese VP2. Interakce VP1 a VP2 pravděpodobně stabilizuje konformaci VP1 vhodnou pro fosforylaci specifických threoninů v molekule. VP1 a kyselé (fosforylované) formy VP1 jsou esenciální pro enkapsidační proces a vznik virionů (Garcea a Benjamin, 1983, Li a Garcea, 1994).

Z doposud známých údajů vyplývá, že morfogenese virionů u Py a SV40 probíhá, alespoň částečně, odlišným způsobem. Syntetizované strukturální proteiny jsou cíleny do jádra, kde jsou sestavovány viriony. Jaderné lokalizační signály (NLS) byly identifikovány v oblasti prvních 12 aminokyselin na N-konci VP1 (Moreland a Garcea, 1991) a v C-koncové oblasti VP2 a VP3 (Clever a Kasamatsu, 1991). Ačkoliv Py minoritní proteiny obsahují vlastní NLS, v kontextu infikované buňky pravděpodobně nejprve interagují v cytoplasmě s VP1 a do jádra vstupují v komplexu s VP1. Py VP1, exprimovaný v bakulovirovém systému, je lokalizován v jádře, zatímco samostatně exprimované minoritní proteiny jsou v hmyzích buňkách lokalizovány kolem jaderné membrány (VP2) nebo difusně v cytoplasmě (VP3) a jadernou lokalizaci získávají pouze při současné expresi VP1 (Forstová *et al.*, 1993).

Komplexy VP1 a VP2 nebo VP1 a VP3, vzniklé v cytoplasmě a translokované do jádra, následně váží genomovou DNA viru (minichromosom asociovaný s hostitelskými histony). Tento proces pravděpodobně probíhá postupným uspořádáním kapsidových proteinů na minichromosomu. Detailní mechanismus rozpoznání virové DNA a vazby kapsidových proteinů není znám. VP2 a VP3 mohou asociovat s histony a navádět komplexy strukturálních proteinů během maturace virionu (interakci VP2 a histonů našli Forstová *et al.*, 1993). Mezi strukturálními proteiny Py, pouze VP1 byl identifikován jako DNA vazebný protein (DNA vazebná doména se nachází na N-konci VP1, VP1 váže DNA sekvenčně nespecificky, Chang *et al.*, 1993). Oproti tomu, nejen VP1, ale také VP2 a VP3 SV40 váží DNA. DNA vazebná doména se nachází v sekvenci posledních 13 aminokyselin na C-konci VP2 a VP3 SV40 (Clever *et al.*, 1993). VP2 a VP3 mají nezastupitelnou roli při vzniku virionů v infekčním cyklu SV40. U Py nebyla podobná funkce minoritních antigenů prokázána. VP2 a VP3 Py jsou oproti svým SV40 protějškům na C-konci kratší o 27 aminokyselin, neobsahují DNA vazebnou doménu a DNA neváží (Chang *et al.*, 1993). Nicméně, je možné, že přítomnost VP2

a VP3 v komplexu s VP1 je důležitá pro udržení konformace umožňující vazbu VP1 a DNA, příp. správné uspořádání pentamer na minichromosomu a stabilizaci virionu.

Konformační stabilizace virových partikulí, daná přítomností VP2 a VP3, může být důležitá také v časně fázi infekce. An *et al.* (1999) zjistili, že pseudokapsidy složené z rekombinantně exprimovaného VP1 a VP2 neúčinněji kompetovaly infekci divokým typem Py (wt), v porovnání s VP1 a VP1/VP3 kapsidami. Ačkoliv i pseudokapsidy, složené pouze z VP1, vstupují do buněk (Richterová *et al.*, 2001), přítomnost minoritních antigenů (zvláště VP2) může umožnit specifickou interakci VP1 s receptorem, vedoucí k produktivní virové infekci. Chen *et al.* (1998) ve své krystalografické studii uvádí teoretickou možnost průchodu flexibilního N-konce VP2 molekuly otvorem ve středu pentameru na vnější stranu kapsidy, ale doposud nejsou žádné experimentální důkazy pro konformační přestavbu kapsidy a expozici VP2 nebo VP3 na vnější stranu.

Studie delečních mutantů SV40 ukázaly, že mutanty s deletovanou oblastí unikátní části VP2 tvoří velmi malé plaky a termosenzitivní mutanty s mutovanou sekvencí společnou VP2 a VP3 jsou za restriktivních podmínek neživotaschopné (Cole *et al.*, 1977).

Modifikace odifikace proteinů kyselinou myristovou

V předcházející kapitole byly shrnuty doposud známé poznatky o úloze minoritních strukturních proteinů v životním cyklu polyomaviru. Vzhledem k faktu, že celá sekvence VP3 je obsažena v C-koncové části VP2 a NLS, VP1 interagující sekvence a DNA vazebná doména (u SV40) se nacházejí na C-konci obou proteinů, nabízí se otázka po významu unikátní N-koncové části VP2. Jak bylo výše uvedeno, partikule VP1/VP2 kompetují infekci wt Py účinněji než VP1/VP3 a mutanty SV40 v N-koncové části VP2 mají velmi sníženou životaschopnost. Také koexprese VP2 a nikoliv VP3, zajišťuje vznik všech posttranslačně modifikovaných forem VP1 důležitých pro sestavování virionů.

VP2 Py a SV40 jsou na svém N-konci modifikovány kyselinou myristovou (Streuli a Griffin, 1987). Konsensus sekvence pro myristylaci byla nalezena na N-konci VP2 u všech doposud známých polyomavirů. Modifikace proteinů kyselinou myristovou patří mezi acylace, tzn. modifikace proteinů mastnými kyselinami (přehled Mannová, 2001). Kyselina myristová (14-ti uhlíkatá nasycená mastná kyselina) je kotranslačně vázána cytoplasmatickým enzymem N-myristyltransferasou na glycin, který se stává N-koncovou aminokyselinou po odštěpení methioninu z nascentního proteinu. Konsensus sekvence pro enzym je Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr, přičemž glycin na N-konci proteinu je esenciální. Obecně lze uvést, že hydrofóbní charakter acylovaných proteinů zvyšuje jejich afinitu k buněčným membránám a acylace slouží jako jeden ze signálů pro membránovou lokalizaci proteinu. Nicméně, bylo prokázáno, že myristylace samotná není dostačující pro stabilní membránovou lokalizaci proteinu (Peitzsch a McLaughlin, 1993). Vícenásobná acylace (např. myristylace a palmitylace) nebo sekvence basických aminokyselin (které elektrostaticky interagují s kyselými fosfolipidy membrány) jsou další faktory ovlivňující vazbu myristylovaného proteinu k membráně (přehled Resh, 1999). Dvojitá acylace proteinů nasycenými mastnými kyselinami (jako jsou kyselina myristová a palmitová) je významná z hlediska cílení proteinů do specifických oblastí plasmatické membrány, tzv. raftů nebo kaveol (Garcia-Cardena *et al.*, 1996, Moffet *et al.*, 2000). V těchto mikrodoménách, charakteristických složením bohatým na sphingolipidy, cholesterol a nasycené mastné kyseliny, se např. organizují proteiny drah signální transdukce (Webb *et al.*, 2000) a také některé virové proteiny.

Většina virových myristylovaných proteinů jsou strukturní antigeny kapsidy nebo obalu. Poměrně rozsáhlý počet studií je věnován úloze myristylovaných proteinů v životním cyklu polioviru a retrovirů (přehled Mannová, 2001).

Jak bylo uvedeno výše pro polyomavirus, minoritní kapsidový protein VP2 je na svém N-konci modifikován kyselinou myristovou a konsensus sekvence pro myristylaci VP2 byla nalezena u všech známých polyomavirů. Většina doposud publikovaných poznatků o úloze VP2 v životním cyklu viru byla získána s wt VP2 a nevztahuje se přímo k myristylaci.

Myristylovaný VP2 je v kontextu infikované buňky jaderný protein, což je ojedinělý případ mezi myristylovanými proteiny. Dnes známá experimentální data o sestavování virionů nenasvědčují membránové lokalizaci VP2 v průběhu životního cyklu viru. Samostatně exprimovaný VP2 v bakulovirovém systému byl nalezen v cytoplasmě kolem jaderné membrány (Forstová *et al.*, 1993), ale při expresi v CV-1 buňkách z rekombinantního vektoru vaccinie je VP2 lokalizován v jádře asociovaný s jadernou matrix (Stamatos *et al.*, 1987). Pomocí počítačové analýzy VP2 (Predict protein, Columbia University) byla nalezena potenciální transmembránová oblast (aminokyseliny 80-95). Výsledky naznačují, že VP2 má sám o sobě určitou membránovou afinitu, ale jeho lokalizace je dána typem buněk, v nichž je exprimován, a především přítomností VP1.

I.II. Shrnutí a diskuse výsledků

První práce, zabývající se významem myristylace Py VP2, byla uveřejněna v roce 1990 (Krauzewicz *et al.*, 1990). Myr⁻ mutant byl izolován po transfekci buněk virovým genomem s kodonem pro N-koncový glycin VP2 mutovaným na kodon pro kyselinu glutamovou (mutant E). Partikule mutovaného viru měly odlišnou morfologii v porovnání s wt na elektronmikroskopických snímcích (méně sferické a kompaktní). Poměr prázdných kapsid a virionů byl u mutantu a wt srovnatelný. Nepřítomnost myristylové modifikace VP2 neznamenal ztrátu schopnosti infikovat buňky. V roce 1993 publikoval Sahli *et al.* studii myr⁻ mutantu (glycin mutovaný na alanin), který vykazoval sníženou infektivitu a zpoždění v zahájení replikace v prvním cyklu po infekci.

Pro detailnější objasnění úlohy myristylace VP2 v polyomavirové infekci byly připraveny další dva myr⁻ mutanty s různými aminokyselinami substituovanými za glycin (mutant H s bazickým histidinem, mutant Q s neutrálním glutaminem). Dále byly připraveny mutanty bez VP2 (mutant M) nebo VP3 (mutant A).

Analýza replikace virového genomu (metodou Southern blot) a exprese časných a pozdních antigenů (pomocí Western blot a imunofluorescenčního značení) v průběhu 48 h cyklu p.i. (1. životní cyklus Py) neodhalila zpoždění jednotlivých fází infekce ani výrazné kvantitativní rozdíly při porovnání mutantů E a Q s wt Py. Na elektronmikroskopických snímcích ultratenkých řezů buněk 48 h p.i. byly u mutantu E, obdobně jako u wt, nově vzniklé viriony koncentrovány především pod jadernou membránou a v oblasti jadérek. Na základě těchto výsledků pro myr⁻ mutanty E a Q lze shrnout, že nepřítomnost myristylu na VP2 neovlivňuje počáteční fáze infekce, t. j. schopnost viru infikovat myší fibroblasty 3T6 a zahájit produktivní infekci.

Na rozdíl od myr⁻ mutantů E a Q, myr⁻ mutant H infikoval buňky s nižší účinností již v prvním cyklu p.i. Při analýze zastoupení pozdních antigenů v izolovaných virech bylo zjištěno, že partikule mutantu H obsahují velmi malé množství VP2, což je pravděpodobnou příčinou snížené infektivity již v prvním replikačním cyklu, která koresponduje s vlastnostmi VP2 mutantu M (viz dále). Malé množství VP2 ve virionech a lyzátech infikovaných buněk může být důsledek snížené stability transkriptu mutovaného genu pro VP2 nebo proteinu VP2 H. Basické aminokyseliny na N-konci proteinů byly identifikovány jako tzv. destabilizující a označují protein určený k degradaci pomocí ubiquitinové dráhy (Bachmair *et al.*, 1986). Zajímavé však je, že ačkoliv celkový počet buněk infikovaných (VP1 pozitivních) mutantem H byl 48 h p.i. nižší než u E, Q nebo wt infekce, v případě úspěšného doručení genomu do jádra byl další průběh infekce zřejmě neovlivněn. To lze usuzovat na základě porovnání

intenzit imunofluorescenčního značení LT a VP1 a z elektronmikroskopických snímků nově vzniklých virionů 48 h p.i.

Rozdíl mezi myr⁻ mutanty a wt se projevil v průběhu dlouhodobé kultivace infikovaných buněk (sledováno pomocí imunofluorescenčního značení infikovaných buněk po dobu 6 dnů p.i.). Myr⁻ mutanty se v kultuře fibroblastů 3T6 množily výrazně pomaleji než wt, a výtěžky mutovaných virů byly nízké. Specifická infektivita, určená pomocí plakové titrace, byla u mutantu E asi 400x nižší a u mutantu Q asi 30x nižší než u wt. Spolu s výsledky pro mutant H to ukazuje, že nejenom absence myristylu na VP2, ale i charakter N-konce VP2 ovlivňuje vlastnosti jednotlivých mutantů. Problém myr⁻ mutantů v průběhu dlouhodobé infekce může být způsoben neefektivním sestavováním virionů v pozdní fázi infekce, neschopností mutantů navodit lyzi infikované buňky a uvolnit virové potomstvo, případně sníženou schopností reinfikovat další buňky.

V buňkách, infikovaných myr⁻ mutanty, byla v průběhu 1. životního cyklu exprese VP1 a replikace virového genomu srovnatelná s wt infekcí a jádra infikovaných buněk obsahovala partikule virového potomstva. Nicméně, izolace virionů 48 h p.i. poskytla nižší výtěžky u mutantu E v porovnání s wt.

V pozdní fázi infekce permisivních buněk jsou polyomaviry uvolněny lyzí hostitelské buňky. Tento mechanismus nebyl zcela objasněn, ale pravděpodobně se nejedná o pasivní proces lyze v důsledku naplnění jádra viriony. Clayson *et al.* (1989) a von der Weth a Deppert (1992) popisují uvolňování virionů SV40 bez lyze infikovaných polarizovaných epiteliálních buněk, resp. persistentně infikovaných LLC-MK2 opičích buněk, zatímco např. opičí ledvinové buňky lyzují v pozdní fázi SV40 infekce (von der Weth a Deppert, 1992). Specifické interakce virus-hostitelská buňka (závislé i na buněčném typu) jsou pravděpodobně nezbytné pro indukci lyze a uvolnění virového potomstva. Elektronmikroskopické studie pozdní fáze Py infekce fibroblastů 3T6 ukázaly, že 48 h p.i. dochází k lokálním rozrušením jaderné membrány a viriony lze posléze najít i v cytoplasmě infikovaných buněk. Ultrastruktura cytoplasmy je postupně zcela zničena, což lze makroskopicky pozorovat jako cytopatický efekt. Uvolněné viriony se nacházejí ve shlucích nebo vázané na zbytky buněčných struktur (především fragmenty membrán a cytoskeletu). V blízkosti buněk v konečné fázi infekce dochází k reinfekci, viriony vstupují do okolních buněk v monopinocytických váčcích, obsahujících vždy jednu virovou partikuli. V obdobných studiích pozdní fáze infekce myr⁻ mutantu E nebo H byla také pozorována lyze infikovaných buněk a reinfekce v monopinocytických váčcích a výrazné kvalitativní morfologické rozdíly (což však nevylučuje kvantitativní rozdíly) oproti wt Py nebyly nalezeny.

Jak bylo uvedeno výše, specifické interakce virus-hostitelská buňka jsou důležité pro efektivní uvolnění virového potomstva. Kromě charakterizace pomocí morfologických elektronmikroskopických studií, lze komplexy virových proteinů nebo virové DNA s buněčnými strukturami izolovat frakcionačními metodami a analyzovat biochemicky. Pomocí frakcionace *in situ* buněk v pozdní fázi infekce SV40 byly nově sestavené viriony nalezeny nejprve ve frakci jaderné matrix a s postupujícím časem částečně také v chromatinové a cytoplasmatické frakci, většina virionů však zůstala asociována s jadernou matrix (Schirmbeck *et al.*, 1993). Při frakcionaci *in situ* buněk infikovaných Py byly získány obdobné výsledky. Viriony (VP1) wt Py i mutantů E a Q byly akumulovány ve frakci jaderné matrix (frakce 5) a chromatinu (frakce 3), ale pouze wt VP1 byl nalezen v membránové a cytoplasmatické frakci (frakce 1) při analýze zachovávající nativní struktury a vazby. VP1 z E a Q virionů byl ve frakci 1 nalezen pouze po denaturaci (analýza pomocí SDS-PAGE). To může být způsobeno odlišnými vazbami wt a myr⁻ virionů na buněčné struktury, v důsledku čehož je epitop VP1 v myr⁻ virionech v nativním kontextu nedostupný pro protilátku (na rozdíl od wt VP1). Změněná vazba na buněčné struktury může odrážet odlišnou konformaci

myr⁻ a wt virionů. Zjištění Krauzewicz *et al.* (1990) o odlišné morfologii virionů mutantu E, v porovnání s wt viriony, podporuje toto vysvětlení.

Shrneme-li získané poznatky, k nižší efektivitě pomnožení myr⁻ mutantů v průběhu několika životních cyklů mohou přispívat dva faktory (i) mírně snížená účinnost sestavování virových partikulí, (ii) vzniklé viriony mohou být v důsledku změněné konformace a odlišné vazby na buněčné struktury uvolňovány v komplexu s buněčnými proteiny nebo strukturami, které následně brání efektivní reinfekci (mohou např. znemožnit specifickou vazbu virionu na receptor). Celkově je tedy sníženo množství mutantních virů schopných reinfikovat okolní buňky. Mutované viriony mají i vyšší tendenci vytvářet shluky, což také může snižovat efektivitu reinfekce. Průběh životního cyklu virů, které reinfikovaly buňky, se pravděpodobně neliší od wt, jak ukázala charakterizace 1. infekčního cyklu izolovaných mutantů.

Na rozdíl od myr⁻ mutantů (E, Q), při infekci mutanty M (VP2⁻), A (VP3⁻) a H (viz výše) byla nižší infektivita zjištěna již v prvním cyklu p.i. Výrazně snížený počet buněk exprimujících časný antigen LT a obsahujících replikující se virovou DNA ukazují na problém mutantů v časně fázi infekce, t. j. při vstupu do buňky a/nebo rozbalení virionu a uvolnění virové DNA pro transkripci a replikaci. Epitopy pro vazbu Py na buněčný receptor se nacházejí v sekvenci VP1 (Stehle *et al.*, 1994), nicméně nepřítomnost VP2 nebo VP3 ve virové kapsidě může vést k nespecifické vazbě. Pseudokapsidy, tvořené pouze VP1, vstupují do buněk a v nich enkapsidovaná DNA je doručena do jádra (Forstová *et al.*, 1995), ale není zcela objasněno, zda tyto partikule a wt Py využívají stejnou dráhu od buněčného povrchu k jádru a také účinnost přenosu je nízká (Krauzewicz *et al.*, 2000). An *et al.* (1999) zjistili, že rekombinantní partikule tvořené pouze VP1 a partikule VP1/VP3 kompetují wt infekci méně než VP1/VP2 partikule. To je v souladu s naším zjištěním, že nepřítomnost VP2 ovlivní infektivitu viru více než absence VP3. Nepřítomnost VP3 a především VP2 ve virové kapsidě pravděpodobně nezabrání viru vstoupit do buňky, ale specifita vstupu a/nebo následná cesta mutovaných virionů a jejich rozbalení mohou být ovlivněny.

II. Mannová, P. & Forstová, J. (2003). Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport.

II.I. Úvod

Regulace endocytosy - regulační proteiny

V třídění látek do jednotlivých drah a regulaci endocytosy mají klíčovou úlohu proteiny z rodiny Rab (Pfeffer a Aivazian, 2004). Tyto malé GTPasy jsou zodpovědné za vazbu specifických efektorových molekul v membránách endosomů a tím se významně podílejí na strukturní a funkční determinaci endosomů (fúze endosomu s jiným endosomem, pučení membrán a vznik nových váčků, interakce s jinými membránovými organelami nebo cytoskeletem). Rab proteiny jsou v membráně reversibilně vázány pomocí C-koncové geranylgeranylové skupiny. V neaktivním stavu se nacházejí v komplexu s GDP-disociačním inhibítorem v cytoplasmě, za aktivaci (výměnu GDP za GTP) jsou zodpovědné guanin-nukleotidové výměnné faktory. Charakterizace jednotlivých endosomálních kompartmentů na základě morfologie je obtížná v důsledku neustálé výměny membrán. Podle modelu biochemické charakterizace, navrženého Sönnichsen *et al.* (2000), jsou právě Rab GTPasy určující pro vznik funkčních domén v rámci membránové struktury a endosomy jsou nahlíženy jako mozaika funkčních membránových domén, které spolu komunikují prostřednictvím efektorových molekul shromážděných Rab proteiny.

Na endocytickém transportu se podílejí také membránové proteiny SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor). Proteiny SNARE byly původně identifikovány na synaptických váčcích a presynaptických membránách

v neuronech, ale postupně byly nalezeny další zástupci rodiny SNARE účastníci se transportních dějů na jiných úrovních (přehled Ungar a Hughson, 2003). v-SNARE se nacházejí v membráně transportních váčků a prostřednictvím interakce s t-SNARE v cílové membráně tvoří trans-komplexy, které napomáhají fúzi membrán. SNARE proteiny (např. rodina syntaxinů) jsou součástí komplexů koordinovaných Rab proteiny.

Regulace endocytosy - charakterisace jednotlivých kompartmentů

Nasednutí ligandu na příslušný receptor na buněčném povrchu vede k internalizaci ligandu a receptoru do primárního váčku. Nejvíce prostudovaným mechanismem je v této souvislosti vstup látek pomocí váčků obalených klatrinem. Jinou cestou je vazba ligandů v raftových doménách plasmatické membrány obohacených o kaveolin (kaveoly) a následná internalizace ligandů do neobalených váčků odvozených z kaveol. Pro integritu kaveol a endocytosy je nezbytná přítomnost cholesterolu v membráně (Smart *et al.*, 1994).

Podle interakce s povrchovými molekulami jsou látky, přítomné v extracelulárním prostředí, internalizovány buňkou ve váčcích různého typu (viz výše). Většina těchto váčků následně fúzuje s časnými endosomy, jejichž hlavní úlohou je třídění internalizovaných látek. Časné endosomy (early endosomes, EE; nazývané také sorting endosomes) jsou mírně kyselé (pH 6,2-6,5) vesikulární organely, rozptýlené v cytoplasmě. Kyselé prostředí časných endosomů umožní disociaci ligandu a receptoru a část receptorů je recyklována na povrch buněk. Proteiny, které nejsou recyklovány, jsou z EE tříděny do pozdních nebo do recyklujících endosomů. Z regulačních proteinů je s časnými endosomy spojen především Rab5. Prostřednictvím Rab5-GTP je do membrány časných endosomů vázán např. protein EEA1 (early endosomal antigen 1) (Simonsen *et al.*, 1998).

Z časných endosomů jsou proteiny tříděny do pozdních nebo do recyklujících endosomů. Tyto dvě cesty se výrazně liší morfologií a biochemickými vlastnostmi endosomů. Pozdní endosomy (late endosomes, LE) jsou kyselé organely (pH asi 5,5), obsahující vnitřní membránové struktury a váčky. S pozdními endosomy je spojen Rab7, který je nezbytný pro transport proteinů z LE do lysosomů (Bucci *et al.*, 2000). Do pozdních endosomů jsou především tříděny proteiny, které jsou určeny k degradaci (kyselé prostředí pozdních endosomů napomáhá degradačnímu procesu proteinů, který je dokončen v lysosomech). Kromě úlohy v degradační cestě, pozdní endosomy také spojují časné endosomy s TGN (trans-Golgi network). Některé ligandy a receptory jsou disociovány až v prostředí LE a receptory se vrací do TGN drahou, která je regulována Rab9 (Lombardi *et al.*, 1993).

Recyklující endosomy (recycling endosomes, RE) jsou v některých pracích uváděny jako podskupina časných endosomů (Mellman, 1996). Nicméně, řada experimentálních výsledků prokazuje, že recyklující endosomy jsou biochemicky a funkčně odlišitelné od časných endosomů. Recyklující endosomy jsou mírně kyselé, ale pH je vyšší než v časných endosomech (Gagescu *et al.*, 2000). Při izolaci jednotlivých endosomálních populací byly ve frakci recyklujících endosomů nalezeny především GTPasy Rab4 a Rab11 (Sönnichsen *et al.*, 2000). Recyklující endosomy jsou křížovatkou endocytických drah. Rab4 domény, obdobně jako u časných endosomů, mají úlohu při vzniku váčků, ve kterých jsou molekuly recyklovány na plasmatickou membránu. Zatímco však recyklační proces z EE je velmi rychlý (během několika minut), kinetika recyklace z RE je pomalejší (desítky minut). Většina molekul transferinu je recyklována velmi rychle z EE, ale část je akumulována v RE, odkud recykluje pomaleji (Sönnichsen *et al.*, 2000). Rab11 má pravděpodobně klíčovou roli pro třídění proteinů na výstupu z RE (Wilcke *et al.*, 2000).

Proces transportu a třídění na úrovni časných a recyklujících endosomů je ovlivněn také složením membrány endosomu, které souvisí s charakterem a složením membrány váčku, do kterého byl ligand internalizován na plasmatické membráně. Gagescu *et al.* (2000) zjistili, že

složení membrány časných a recyklujících endosomů MDCK buněk (Madin-Darby canine kidney cells) je odlišné a membrány RE jsou obohaceny o proteiny a lipidy asociované s raftovými doménami plasmatické membrány (flotillin-1, kaveolin-1, cholesterol, sphingomyelin).

Dráhy z EE přes LE nebo RE do TGN představují spojení mezi endocytickou a biosyntetickou/sekreční dráhou. Proteiny jsou z TGN recyklovány na plasmatickou membránu nebo jsou transportovány retrográdním směrem přes Golgiho komplex (GK) do endoplasmatického retikula (ER). To znamená, že procházejí opačným směrem než nově syntetizované proteiny, které jsou modifikovány a skládány v ER, odkud jdou anterográdní biosyntetickou/sekreční dráhou do GK a TGN, odkud jsou sekretovány nebo dopraveny na místo uvnitř buňky.

Transport látek mezi GK a ER anterográdním i retrográdním směrem je v savcích buňkách zprostředkován tzv. ER-Golgi intermediálním kompartmentem (ERGIC, Schweizer *et al.*, 1990). ERGIC je morfologicky velmi variabilní a dynamická membránová struktura. Dva odlišné proteinové komplexy byly doposud popsány v souvislosti s ERGIC. COPII komplex tvoří obal váčků, které pučí z ER a uvolňují proteiny v ERGIC pro anterográdní transport do cis-Golgi. COPI obalené váčky jsou naopak nezbytné pro retrográdní transport a vznikají na ERGIC, kde se podílejí na třídění antero- a retrográdních proteinů. (Aridor *et al.*, 1995, Shima *et al.*, 1999). Transport zprostředkovaný COPI slouží pro navrácení ER-residentních proteinů do ER (např. chaperony a receptory, které provázejí některé proteiny z ER, cholera toxin). Proteiny, recyklované do ER mají na C-konci konsensus sekvenci KDEL nebo KKXX (Munro a Pelham, 1987), která je rozpoznána specifickým receptorem. COPI komplex, nebo-li koatomer, je tvořen sedmi podjednotkami (α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ), které jsou v cytosolu složeny do 14 S komplexu (Waters *et al.*, 1991).

Pro asociaci koatomerů s membránou a vznik váčku, obaleného COPI, je nezbytná aktivovaná GTPasa Arf1 (ADP-ribosylační faktor 1) (Palmer *et al.*, 1993). Zástupci jednotlivých tříd rodiny malých GTPas Arf jsou aktivovány specifickými guanin-nukleotidovými výměnnými faktory (GEF), které katalyzují výměnu GDP za GTP. Jednotlivé GEF se liší citlivostí k brefeldinu A (BFA). Vazba BFA k citlivým GEF znemožňuje výměnu nukleotidu a aktivaci GTPas, v důsledku čehož dochází k výrazné změně morfologie endosomů (tubulace a fúze endosomálních kompartmentů), rozpadu GK a zastavení třídění a transportu látek (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991). Arf1 je aktivována GEF, který je inhibován BFA, a působení BFA má za následek také vyloučení retrográdního transportu v COPI váčcích (Orlandi *et al.*, 1993).

Na základě studií transportu některých bakteriálních toxinů (napr. Shiga toxin, ricin) byla popsána alternativní retrográdní cesta z GK do ER, která není zprostředkována váčky obalenými COPI. Tato dráha je definována Rab6a isoformou, která má úlohu také v transportu mezi TGN a cis-Golgi (pravděpodobně stimuluje retrográdní směr transportu - Girod *et al.*, 1999, White *et al.*, 1999). COPI nezávislou cestou mohou být do ER doručeny proteiny bez signální sekvence KDEL nebo KKXX.

Časná fáze infekce některých skupin virů

Viry, jako intracelulární parazité replikující se v cytoplasmě nebo jádře buňky, využívají mnoha přirozených buněčných mechanismů pro proniknutí dovnitř buňky a doručení virionů nebo jejich komponent, včetně virového genomu, na místo replikace. Časná fáze virové infekce je zahájena interakcí viru s příslušným receptorem na povrchu buňky. Vazba viru na receptor indukuje internalizaci virionu do váčku nebo fúzi plasmatické membrány a virového obalu. V případě internalizace do váčků jsou viry uvolněny do cytosolu mechanismem

závislým na pH nebo využívají endocytických drah pro dopravu do blízkosti replikačních kompartmentů.

Viry, replikující se v jádře, musí mít také strategii pro dopravení svého genomu do jádra. Některé retroviry se replikují pouze v dělicích se buňkách, kdy je jádro přístupné díky rozpadu jaderné membrány v průběhu mitozy. Většina virů je ale schopna množit se i v interfázních nebo nedělicích se buňkách a využívá jaderných pórů (NPC, nuclear pore complex). Komplex jaderného póru u obratlovců obsahuje až 100 různých proteinů, nukleoporinů (Allen *et al.*, 2000). NPC kontrolují transport látek mezi cytolem a jádrem. Malé molekuly procházejí pasivní difúzí, transport větších molekul a komplexů probíhá aktivním mechanismem za spotřeby energie. Klíčovou roli v aktivním transportu mají importiny α a β , které rozpoznávají proteiny s jaderným lokalizačním signálem (NLS) a prostřednictvím interakce s nukleoporiny umožní jejich translokaci (Radu *et al.*, 1995). Pouze velmi malé viry (např. parvoviry) nebo viry s tyčkovitou kapsidou (např. bakulovirus) mohou projít jaderným pórem intaktní, ostatní viry musí být alespoň částečně rozbaleny v cytosolu.

Obalené viry (např. retroviry, herpesviry) často penetrují do buněk fúzí virového obalu a plasmatické membrány. Kapsidy (nukleoproteinové komplexy) jsou uvolněny do cytosolu, kde procházejí konformačními změnami vedoucími k destabilizaci virové partikule. Ale např. virus chřipky vstupuje do buněk endocytosou v klatrinových nebo hladkých váčcích a k fúzi virového obalu a membrány váčku dojde až v kyselém prostředí endosomu.

Neobalené viry (např. adenoviry, parvoviry, reoviry) většinou vstupují do buněk receptorem zprostředkovanou endocytosou do váčků, které následně fúzí s časnými endosomy. Endosomální transport byl poměrně dobře popsán pro CPV (canine parvovirus), který vstupuje do buněk endocytosou v klatrinových váčcích. Na základě kolokalizačních studií s transferinem byl CPV nalezen v recyklujících endosomech (Parker a Parrish, 2000). Suikkanen *et al.* (2002) charakterisovali další transport viru a zjistili, že CPV je z recyklujících endosomů tříděn do pozdních endosomů a odtud vstupuje do lysosomů. Lysosomy jsou pravděpodobně kompartmentem, z něhož jsou kapsidy CPV uvolněny do cytosolu.

Podle doposud publikovaných výsledků je pravděpodobné, že jednotlivé polyomaviry mohou mít odlišné strategie pro vstup do buněk.

SV40 se na povrchu buněk váže na MHC I molekuly (Breau *et al.*, 1992) nebo gangliosid GM1 (Tsai *et al.*, 2003) a je internalizován do neobalených monopinocytických váčků (Kartenbeck *et al.*, 1989). Tyto váčky obsahují kaveolin-1 a význam kaveol pro produktivní infekci SV40 byl opakovaně potvrzen (Anderson *et al.*, 1996, Stang *et al.*, 1997, Norkin, 1999). Kartenbeck *et al.* (1989) zjistili na základě svých pozorování unikátní transport SV40 - po vstupu do buněk v hladkých váčcích byly viry nalezeny v tubulárních membránových strukturách a následně akumulovány v ER. Pelkmans *et al.* (2001) dále charakterizovali vstup SV40 jako dvoustupňový vesikulární transport do ER, který obchází endosomy a GK, a navrhli název kaveosom pro intermediální organelu. Kaveosomy jsou membránové organely, obsahující kaveolin, ale nekolokalizující s proteiny typickými pro časné endosomy, lysosomy, GK a ER. Po několika hodinách viriony SV40 opouštějí kaveosomy v tubulárních vesikulech, které již neobsahují kaveolin, a pohybují se podél mikrotubulů do ER. Richards *et al.* (2002) a Norkin *et al.* (2002) ukázali, že časná fáze infekce SV40 je (obdobně jako transport toxinu cholery) citlivá k brefeldinu A. Infekce je inhibována také expresí mutantní GTPasy Arf 1 a mikroinjekcí anti- β -COP protilátky a virus kolokalizuje s β -COP. Tato zjištění ukazují na úlohu COPI váčků v transportu SV40 do ER. Není nicméně jasné jaký je vztah mezi kaveosomem a COPI váčky (podle Norkin *et al.*, 2002 mohou být tyto struktury totožné).

SV40 putuje z intermediální organely do ER, kde je nalezen 5-10 h p.i. (Kartenbeck *et al.*, 1989, Pelkmans *et al.*, 2001, Norkin *et al.*, 2002). Nejsou žádné experimentální důkazy, že by SV40 penetroval z lumen ER přes vnitřní jadernou membránu přímo do jádra. Virus

pravděpodobně vstupuje do jádra z cytosolu, kam je transportován z ER. Nakanishi *et al.* (1996) zjistili, že virová infekce je blokována mikroinjekcí anti-VP1 nebo VP3 protilátek do cytosolu. Také intaktní viriony mikroinjikované do cytosolu jsou infekční (Clever *et al.*, 1991). Otázkou je, jakým způsobem je doručena virová DNA do jádra. Clever *et al.* (1991) a Yamada a Kasamatsu (1993) uvádějí, že partikule SV40 vstupují do jádra nerozbalené a celé viriony byly pozorovány v jaderných pórech a v interiéru jádra. Nicméně, není jasné jakým způsobem by intaktní viriony o průměru 45 nm prošly jaderným pórem, jehož maximální funkční velikost je asi 23 nm. Všechny tři strukturní proteiny SV40, VP1, VP2, VP3, obsahují NLS, ale ve virionu jsou tyto sekvence orientovány dovnitř partikule (Liddington *et al.*, 1991). Je proto pravděpodobnější, že viriony jsou alespoň částečně rozbaleny před vstupem do jádra. Norkin *et al.* (2002) pozorovali imunofluorescenční signál interních kapsidových proteinů VP2/3 poprvé až v ER a předpokládají, že k rozbalení virionu dojde v ER a do cytosolu je uvolněn virový minichromosom spolu s VP2/3. Úlohu VP3 (a nikoliv VP1) pro transport virového genomu do jádra popsali Nakanishi *et al.* (1996) a Nakanishi *et al.* (2002) ukázali, že NLS VP3 je rozpoznáván $\alpha 2/\beta$ importinem.

JCV vstupuje do buněk způsobem odlišným od SV40. JCV pravděpodobně využívá pro vstup receptory serotoninu (Elphick *et al.*, 2004) a je internalizován v klatrinových váčcích (Pho *et al.* 2000). Pro infekci dalšího lidského polyomaviru, BKV, jsou pravděpodobně důležité gangliosidy GD1b a GT1b a infekce je inhibována brefeldinem A (Low *et al.*, 2006).

Polyomavirus. První práce, charakterizující časnou fázi polyomavirové infekce, byly založeny na elektronmikroskopických a frakcionačních technikách. Mackay a Consigli (1976) popsali vstup virionů Py do buněk v monopinocytických váčcích a jejich přímý transport do jádra, zatímco prázdné kapsidy vstupují do buněk ve shlucích ve velkých váčcích. Griffith a Consigli (1984) izolovali monopinocytické váčky z infikovaných buněk a potvrdili, že obsahují vždy jeden intaktní virion. Griffith *et al.* (1988) navrhli mechanismus vstupu virionů do jádra fúzí monopinocytického váčku a jaderné membrány. Winston *et al.* (1980) izolovali virové intermediáty z infikovaných buněk, po vstupu virionu do jádra byla převažující struktura 190 S, tvořená virovou DNA v komplexu s VP1, VP2, VP3 a hostitelskými proteiny.

Gangliosidy GD1a a GT1b byly identifikovány jako receptory polyomaviru (Tsai *et al.*, 2003). Časná fáze polyomavirové infekce je relativně málo objasněna. Gilbert a Benjamin (2000) inhibovali dráhu internalizace do klatrinových nebo caveolových váčků a nenalezli vliv na infekci Py. Richterová *et al.* (2001) ukázali kolokalizaci VP1 a caveolinu, nicméně, caveoly nejsou nezbytné pro produktivní Py infekci myších epitelialních buněk (Liebl *et al.*, 2006).

II.II. Shrnutí a diskuse výsledků

Cílem této práce bylo charakterizovat dráhu Py po internalizaci do buněk a zjistit efektivitu Py infekce. Ačkoliv vstup Py do buněk v hladkých váčcích vykazuje podobnost se vstupem SV40, z našich experimentů vyplývá, že jeho další osud je částečně odlišný.

Pro charakterizaci časné fáze infekce Py a možné transportní dráhy do ER jsme pomocí konfokální mikroskopie studovali kolokalizaci viru (strukturního proteinu VP1) a proteinů spojených s endosomy. Imunofluorescenční značení VP1 a Rab5, který je vázán s časnými endosomy (EE), ukázalo částečnou kolokalizaci VP1 a Rab5 1 h p.i., ale většina signálu obou proteinů se nepřekrývala. Infekcí buněk při 20°C (teplota, při které jsou proteiny zadržovány v EE a RE) jsme chtěli rozhodnout, zda Py vstupuje do EE. V obdobném pokusu Richards *et al.* (2002) zjistili, že SV40 není do buněk při 20°C vůbec internalizován (na rozdíl od toxinu cholery -CT, který také vstupuje caveolovými váčky). Internalizace Py byla při 20°C omezená, i po delší době inkubace (1-3 h p.i.) virus zůstal v blízkosti plasmatické membrány, nepohyboval se směrem k jádru a nekolokalizoval s CT a transferinem uvnitř buňky. CT a

transferin byly naopak při 20°C lokalizovány v cytoplasmě a v perinukleárním prostoru, což znamená, že transport látek v klatrinových a kaveolových váčcích do EE při inkubaci buněk při 20°C není zcela vyloučen. Nicméně, výsledky pro SV40 a Py naznačují, že transport látek v hladkých váčcích je při 20°C neefektivní. Je proto možné, že zjištěný transport CT do EE a RE při 20°C mohl být zprostředkován jiným mechanismem (internalizaci CT nezávislou na kaveolách popsali pro některé buněčné typy Orlandi a Fishman, 1998). Kolokalizační studie VP1 a jiného markeru časných endosomů, EEA1, nicméně ukázali výraznou kolokalizaci obou proteinů, což podporuje úlohu EE v časné fázi infekce Py (Liebl *et al.*, 2006).

Zjištěná výrazná kolokalizace (3 h p.i.) VP1 s Rab11 a transferinem naznačuje, že Py vstupuje do recyklujících endosomů (RE). Toto zjištění bylo potvrzeno pomocí techniky FRET (Liebl *et al.*, 2006). RE jsou organelou, v níž jsou proteiny tříděny do dalších drah. Nedávno popsáný transport canine parvoviru z RE do LE a lysosomů (Suikkanen *et al.*, 2002), zřejmě není případem Py, protože kolokalizace s proteiny těchto kompartmentů (Rab7, LAMP-2) nebyla nalezena.

Otázkou proto zůstává, jakou úlohu mají RE v transportu Py. Úloha RE v infekci Py může být analogická úloze intermediární organely kaveosomu pro SV40, odkud virus putuje do ER. Zjištěná kolokalizace s proteiny RE byla výrazná, ale část VP1 se s RE nepřekrývala. Je možné, že část virové populace je již v ER (kolokalizace s proteiny obou organel byla nalezena 3 h p.i.) nebo pouze část virů je transportována do recyklujících endosomů.

Jak bylo uvedeno výše, dráha citlivá k BFA a COPI váčky jsou důležité pro transport SV40 do ER. Chtěli jsme proto zjistit, zda také Py využívá pro dopravu do ER COPI dráhu, která je inhibována BFA. BFA byl přidán do kultivačního média v určitých časech po inkubaci s Py a buňky byly následně kultivovány za přítomnosti BFA a fixovány 24 h (pro značení LT) nebo 44 h (pro značení VP1) p.i. Počet infikovaných buněk byl 44 h p.i. srovnatelný s kontrolními buňkami infikovanými bez BFA. Rozdíl byl zaznamenán v intenzitě (nikoli počtu značených buněk) imunofluorescenčního signálu LT 24 h p.i. (slabší signál v buňkách s BFA). Pro zjištění, zda by tento rozdíl mohl být způsoben zpožděnou infekcí byly buňky 24 h p.i. značeny anti-VP1 protilátkou. Počet buněk, které v přítomnosti BFA již 24 h p.i. obsahovaly pozdní protein VP1, byl výrazně nižší (asi o 80 %) v porovnání s infekcí bez BFA. V kontrolním experimentu byl ověřen účinek BFA na infekci SV40. V souladu s publikovanými výsledky (Norkin *et al.*, 2002), přidání BFA do kultivačního média v určitých časech po inkubaci s SV40, mělo za následek inhibici infekce. Značení buněk anti-LT nebo anti-VP1 protilátkou ukázalo, že počet buněk infikovaných SV40 je nižší o více než 90 % v porovnání s buňkami inkubovanými bez BFA. Z těchto výsledků vyplývá, že BFA má rozdílný vliv na infekci Py a SV40. Zatímco infekce SV40 je v přítomnosti BFA výrazně inhibována, infekce Py byla pouze zpožděna a počet infikovaných buněk byl srovnatelný s počtem infikovaných buněk v nepřítomnosti BFA.

Tyto výsledky naznačují, že transportní dráha Py do ER by mohla být odlišná od SV40 (t.j. nezávislá na COPI cestě). Zajímalo nás proto, zda Py kolokalizuje s proteinem β -COP, který je součástí koatomerů tvořících obal COPI váčků. Zjistili jsme, že 1-3 h p.i. se naprostá většina imunofluorescenčních signálů VP1 a β -COP nepřekrývala. Také kolokalizace VP1 a Rab6a, který reguluje alternativní retrogradní dráhu do ER, byla minimální.

Výše uvedené výsledky ukazují na úlohu RE v transportu Py do endoplasmatického reticula, kde se Py, obdobně jako SV40, akumuluje před vstupem do jádra (kolokalizace ER proteinu BiP a VP1 byla nejvýraznější 3 h p.i.). Další osud obou virů není zcela objasněn. Musí dojít k rozbalení virové partikule a doručení genomu do jádra, kde se virová DNA replikuje. Norkin *et al.* (2002) přinesli experimentální údaje naznačující rozbalení partikule SV40 v ER. VP2 a VP3, orientované dovnitř kapsidy, nebyly v prvních fázích infekce přístupné pro protilátku a imunofluorescenčně označeny byly až v ER a autoři předpokládají, že VP2/3 (na rozdíl od VP1) putují z ER do cytosolu. Nezastupitelnou úlohu VP3 v doručení

DNA SV40 jaderným pórem do jádra popsali Nakanishi *et al.* (2002). V našich pokusech jsme minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3 Py v průběhu časné fáze infekce imunofluorescenčně neoznačili (možným vysvětlením je nedostupnost epitopu pro použitou monoklonální protilátku proti VP2/3). Py VP2 a VP3 mají NLS, ale, na rozdíl od SV40, neobsahují DNA vazebnou doménu, proto je úloha VP2 a VP3 v jaderném transportu Py DNA méně pravděpodobná. Určitá úloha minoritních antigenů (především VP2) pro vstup viru do buňky a/nebo časnou fázi infekce Py (např. rozvolnění kapsidy) je nicméně zřejmá z výrazně snížené infekivity mutantů bez VP2 nebo VP3 popsané dříve.

Rozbalení kapsidy v ER může být umožněno chaperony, které také mohou translokovat virovou partikuli nebo nukleoproteinový komplex do cytosolu. Mezi tyto proteiny patří i BiP, s nímž kolokalizovala část VP1 3 h p.i. BiP je součástí translokačního kanálu, kterým jsou transportovány z ER do cytosolu proteiny určené k degradaci. Tuto ERAD (eradikační) dráhu využívají některé toxiny pro proniknutí do cytosolu. Je možné, že také Py využívá tuto cestu a částečná proteolýza při translokaci ERAD dráhou může napomoci rozbalení kapsidy. Tento proces však může být také součástí obranných mechanismů hostitelské buňky a pouze větší či menší část virionů unikne degradaci.

Výsledky opakovaných experimentů potvrdily, že 3 h p.i. se většina viru (VP1) nachází v blízkosti jádra a kolokalizuje částečně se strukturami RE a ER (viz výše). Později p.i. je VP1 patrný v periférii cytoplasmy. Přibližně 3 h p.i. by tudíž mělo dojít ke vstupu viru nebo jeho DNA do jádra. Zajímalo nás, jak velká část z virionů internalizovaných do buňky, je skutečně infekční, t.j. dopraví virovou DNA do jádra a zda do jádra vstupuje také VP1. Pomocí imunofluorescenčního značení VP1 a hybridizace *in situ* Py DNA jsme ukázali, že efektivita Py infekce je relativně nízká (pokud vstup pouze několika kopií genomu do jádra není součástí replikační strategie viru). Případná degradace části přicházejících virů při translokaci z ER by mohla být důvodem. Nelze ale vyloučit, že o osudu virionů je rozhodnuto např. již na povrchu buněk a pouze část virionů směřuje k produktivní infekci. Vazba na receptor asociovaný s rafty specifického složení může ovlivnit následnou cestu z RE. Také o transportu prázdných kapsid a pseudokapsid se uvádí, že je nespecifický a odlišný od transportní dráhy virionů (Mackay a Consigli, 1976, Krauzewicz *et al.*, 2000) a pseudokapsidy tvořené pouze VP1 kompetují infekci wt Py velmi málo (An *et al.*, 1999). Je možné, že i část virionů putuje touto nespecifickou cestou.

Jak bylo uvedeno, pouze několik kopií Py DNA bylo nalezeno v jádře infikovaných buněk, a to nejdříve 6 h p.i. Toto zjištění je v souladu s nalezením prvních transkriptů LT antigenu 6 h p.i. (Chen a Fluck, 2001). Šest h p.i. (ani dříve) nebyl v jádře nalezen imunofluorescenčně značený VP1. Pouze několik bodů imunofluorescenčního signálu VP1 bylo zjištěno na lamině 3 h p.i., ale jejich přesná pozice vůči jaderné membráně by měla být ještě ověřena. Podobně jako pro SV40, také pro Py některé práce uvádějí nalezení intaktních partikulí v jádře na elektronmikroskopických řezech (Mackay a Consigli, 1976). V mnohonásobných experimentech v naší laboratoři nebyly intaktní partikule v jádře ani v jeho blízkosti nalezeny (Richterová *et al.*, 2001), což podporuje možnost rozbalení virionů v ER. Vstup „holé“ DNA do jádra je málo pravděpodobný (spíše do jádra vstupují virionové nukleoproteinové komplexy). Množství VP1, obsažené v nukleoproteinových komplexech několika molekul virové DNA vstupujících do jádra, může být pod detekčním limitem imunofluorescenční techniky. Jinou možností je vstup do jádra spojený s velmi rychlým odstraněním VP1 z virové DNA (např. už na jaderné membráně nebo lamině). Po rozbalení nukleoproteinového komplexu na lamině by do interiéru jádra mohl vstoupit pouze virový minichromosom. To je v souladu s nalezením Py DNA, ale nikoliv VP1, v interiéru jádra.

Ze shrnutí uvedených výsledků vyplývá, že Py, podobně jako SV40, vstupuje do endoplasmatického reticula, ale transportní dráhy obou virů jsou odlišné. Py využívá časné a recyklující endosomy a transport, zprostředkovaný COPI váčky, nebyl pro Py prokázán. Další

osud Py (mechanismus vstupu do jádra po akumulaci v ER) není zcela objasněn, ale na základě našich výsledků lze říci, že většina virů nedoručí genom do jádra. Je možné, že pouze část virionů putuje produktivní cestou nebo může být většina virů degradována při translokaci z ER do cytosolu.

Literatura

Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E. & Goldberg, M.W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *Journal of Cell Science* **113**, 1651-1659.

An, K., Gillock, E. T., Sweat, J.A., Reeves, W.M. & Consigli, R.A. (1999). Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *Journal of General Virology* **80**, 1009-1016.

Anderson, H.A., Chen, Y. & Norkin, L.C. (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 1825-1834.

Aposhian, H.V., Thayer, R.E. & Qasba, P.K. (1975). Formation of nucleoprotein complexes between polyoma empty capsids and DNA. *Journal of Virology* **15**, 645-653.

Arad, U., Zeira, E., El-Latif, M.A., Mukherjee, S., Mitchell, L., Pappo, O., Galun, E. & Oppenheim, A. (2005). Liver-targeted gene therapy by SV40-based vectors using the hydrodynamic injection method. *Human Gene Therapy* **16**, 361-371.

Aridor, M., Bannykh, S.I., Rowe, T. & Balch, W.E. (1995). Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *Journal of Cell Biology* **131**, 875-893.

Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. (1986). *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186.

Barouch, D.H. & Harrison, S.C. (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology* **68**, 3982-3989.

Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempey, J. & Consigli, R.A. (1981). Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *Journal of Virology* **37**, 80-91.

Bouřa, E., Liebl, D., Spisek, R., Frič, J., Marek, M., Štokrová, J., Holan, V. & Forstová, J. (2005). Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Letters* **579**, 6549-6558.

Breau, W.C., Atwood, W.J. & Norkin, L.C. (1992). Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *Journal of Virology* **66**, 2037-2045.

Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. & van Deurs, B. (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 467-80.

Carbone, M. (1999). Simian virus 40 and human tumors: it is time to study mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry* **76**, 189-193.

- Clayson, E.T., Brando, L.V. & Compans, R.W. (1989). Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *Journal of Virology* **63**, 2278-2288.
- Clever, J. & Kasamatsu, H. (1991). Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology* **181**, 78-90.
- Clever, J., Dean, D.A. & Kasamatsu, H. (1993). Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 20877-20883.
- Cole, C.N., Landers, T., Goff, S. P., Manteuil-Brutlag, S. & Berg, P. (1977). Physical and genetic characterization of deletion mutants of simian virus 40 constructed in vitro. *Journal of Virology* **24**, 277-294.
- Elphick, G.F., Querbes, W., Jordan, J.A., Gee, G.V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W.K., Roth, B.L. & Atwood, W.J. (2004). The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* **306**, 1380-1383.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palková, Z., Strauss, M. & Griffin, B.E. (1995). Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Human Gene Therapy* **6**, 297-306.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A. J., Dilworth, S.M., Beard, S. & Griffin, B.E. (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology* **67**, 1405-1413.
- Gagescu, R., Demarex, N., Parton, R.G., Hunziker, W., Huber, L.A. & Gruenberg, J. (2000). The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2775-2791.
- Garcea, R.L. & Benjamin, T.L. (1983). Host range transforming gene of polyoma virus plays a role in virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **80**, 3613-3617.
- Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J.W., Schnitzer, J.E. & Sessa, W.C. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**, 6448-6453.
- Georgens, C., Weyermann, J. & Zimmer, A. (2005). Recombinant virus like particles as drug delivery system. *Current Pharm Biotechnology* **6**, 49-55.
- Gilbert, J.M. & Benjamin, T.L. (2000). Early steps of polyomavirus entry into cells. *Journal of Virology* **74**, 8582-8588.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T. & Pepperkok, R. (1999). Evidence for a COPI-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology* **1**, 423-430.
- Griffith, G.R. & Consigli, R.A. (1984). Isolation and characterization of monopinocytotic vesicles containing polyomavirus from the cytoplasm of infected mouse kidney cells. *Journal of Virology* **50**, 77-85.
- Griffith, G.R., Marriott, S.J., Rintoul, D.A. & Consigli, R.A. (1988). Early events in polyomavirus infection: fusion of monopinocytotic vesicles containing virions with mouse kidney cell nuclei. *Virus Research* **10**, 41-51.

- Griffith, J.P., Griffith, D.L., Rayment, I., Murakami, W.T. & Caspar, D.L.D. (1992). Inside polyomavirus at 25Å resolution. *Nature* **355**, 625-654.
- Gross, L. (1953). A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* **83**, 3553-3558.
- Chang, D., Cai, X. & Consigli, R.A. (1993). Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology* **67**, 6327-6331.
- Chen, L. & Fluck, M.M. (2001). Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *Journal of Virology* **75**, 8368-8379.
- Chen, X.S., Stehle, T. & Harrison, S.C. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO Journal* **17**, 3233-3240.
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H. & Helenius, A. (1989). Endocytosis of Simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* **109**, 2721-2729.
- Krauzewicz, N., Streuli, C.H., Stuart-Smith, N., Jones, M.D., Wallace, S. & Griffin, B.E. (1990). Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *Journal of Virology* **64**, 4414-4420.
- Krauzewicz, N., Štokrová, J., Jenkins, C., Elliott, M., Higgins, C.F. & Griffin, B.E. (2000). Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Therapy* **7**, 2122-2131.
- Li, M. & Garcea, R.L. (1994).** Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *Journal of Virology* **68**, 320-327.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L. & Harrison, S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* **354**, 278-284.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J. & Forstová, J. (2006). Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection and meets transferrin cargo in Rab-11 positive endosomes. *Journal of Virology*, in press.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L. & Klausner, R.D. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67**, 601-616.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M.A., Goda, Y., Zerial, M. & Pfeffer, S.R. (1993). Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO Journal* **12**, 677-682.
- Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B. & Imperiale, M.J. (2006). Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *Journal of Virology* **80**, 1361-1366.
- Ludlow, J.W., DeCaprio, J.A., Huang, C.M., Lee, W.H., Paucha, E. & Livingston, D.M. (1989). SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* **56**, 57-65.
- Mackay, R.L. & Consigli, R.A. (1976). Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry. *Journal of Virology* **19**, 620-636.

- Mannová, P. (2001). Fatty acylation of virus and cell proteins. Review in Czech. *Biologické listy* **66**:65.
- Mannová, P. & Forstová, J. (2003). Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *Journal of Virology* **77**, 1672-1681.
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E. & Forstová, J. (2002). Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology* **83**, 2309-2319.
- Martin, R.G. & Chou, J.Y. (1975). Simian virus 40 functions required for the establishment and maintenance of malignant transformation. *Journal of Virology* **15**, 599-612.
- Mellman, I. (1996). Membranes and sorting. *Current Opinions in Cell Biology* **8**, 497-498.
- Messerschmitt, A.S., Dunant, N. & Ballmer-Hofer, K. (1997). DNA tumor viruses and Src family tyrosine kinases, an intimate relationship. *Virology* **227**, 271-280.
- Moffett, S., Brown, D.A. & Linder, M.E. (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 2191-2198.
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L.D. & Garcea, R.L. (1991). Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *Journal of Virology* **65**, 4991-4998.
- Moreland, R.B. & Garcea, R.L. (1991). Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* **185**, 513-518.
- Munro, S. & Pelham, H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Nakanishi, A., Clever, J., Yamada, M., Li, P.P. & Kasamatsu, H. (1996). Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**, 96-100.
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E. & Kasamatsu, H. (2002). Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *Journal of Virology* **76**, 9368-9377.
- Norkin, L.C. (1999). Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunological Reviews* **168**, 13-22.
- Norkin, L.C., Anderson, H.A., Scott, W.A. & Oppenheim, A. (2002). Caveolar endocytosis of Simian virus 40 is followed by brefeldin A - sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *Journal of Virology* **76**, 5156-5166.
- Orlandi, P.A. & Fishman, P.H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: Evidence for toxin internalisation and activation through caveolae-like domains. *Journal of Cell Biology* **141**, 905-915.
- Orlandi, P.A., Curran, P.K. & Fishman, P.H. (1993). Brefeldin A blocks the response of cultured cells to cholera toxin. Implications for intracellular trafficking in toxin action. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12010-12016.

- Palmer, D.J., Helms, J.B., Beckers, C.J., Orci, L. & Rothman, J.E. (1993). Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12083-12089.
- Parker, J.S. & Parrish, C.R. (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves dynamin regulated clathrin mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *Journal of Virology* **74**, 1919-1930.
- Peitzsch, R.M. & McLaughlin, S. (1993). Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**, 10436-10443.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology* **5**, 473-83.
- Pfeffer, S. & Aivazian, D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology* **5**, 886-896.
- Pho, M.T., Ashok, A. & Atwood, W.J. (2000). JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Journal of Virology* **74**, 2288-2292.
- Radu, A., Moore, M.S. & Blobel, G. (1995). The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* **81**, 215-222.
- Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1451**, 1-16.
- Richards, A.A., Stang, E., Pepperkok, R. & Parton, R.G. (2002). Inhibitors of COP-mediated transport and cholera toxin action inhibit Simian virus 40 infection. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 1750-1764.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J. & Forstová, J. (2001). Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyoma virions and artificial VP1 pseudocapsids towards cell nuclei. *Journal of Virology* **75**, 10880-10891.
- Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R. & Benjamin, T. (1993). Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* **192**, 142-153.
- Salunke, D.M., Caspar, D.L. & Garcea, R.L. (1986). Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**, 895-904.
- Shima, D.T., Scales, S.J., Kreis, T.E. & Pepperkok, R. (1999). Segregation of COPI-rich and anterograde-cargo-rich domains in endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport complexes. *Current Biology* **9**, 821-824.
- Schirmbeck, R., von der Weth, A. & Deppert, W. (1993). Structural requirements for simian virus 40 replication and virion maturation. *Journal of Virology* **67**, 894-901.
- Schweizer, A., Fransen, J.A., Matter, K., Kreis, T.E., Ginsel, L. & Hauri, H.P. (1990). Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *European Journal of Cell Biology* **53**, 185-196.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M. & Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498.

- Smart, E.J., Yun-Shu, Y., Conrad, P.A. & Anderson, R.G.W. (1994). Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *Journal of Cell Biology* **127**, 1185-1197.
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. & Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualised by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab 11. *Journal of Cell Biology* **149**, 901-913.
- Stamatos, N.M., Chakrabarti, S., Moss, B. & Hare, J.D. (1987). Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *Journal of Virology* **61**, 516-525.
- Stang, E., Kartenbeck, J. & Parton, R.G. (1997). Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Molecular Biology of Cell* **8**, 47-57.
- Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T.L. & Harrison, S.C. (1994). Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* **369**, 160-163.
- Strayer, D.S., Cordelier, P., Kondo, R., Liu, B., Matskevich, A.A., McKee, H.J., Nichols, C.N., Mitchell, C.B., Geverd, D.A., White, M.K. & Strayer, M.S. (2005). What they are, how they work and why they do what they do? The story of SV-40 derived gene therapy vectors and what they have to offer. *Current Gene Therapy* **5**, 151-165.
- Streuli, C.H. & Griffin, B.E. (1987). Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* **326**, 619-621.
- Suikkanen, S., Sääjärvi, K., Hirsimäki, J., Välilehto, O., Reunanen, H., Vihinen-Ranta, M. & Vuento, M. (2002). Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *Journal of Virology* **76**, 4401 – 4411.
- Štokrová, J., Palková, Z., Fischer, L., Richterová, Z., Korb, J., Griffin, B.E. & Forstová, J. (1999). Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Letters* **445**, 119-125.
- Tegerstedt, K., Franzen, A.V., Andreasson, K., Joneberg, J., Heidari, S., Ramqvist, T. & Dalianis, T. (2005). Murine polyomavirus virus-like particles (VLPs) as vectors for gene and immune therapy and vaccines against viral infections and cancer. *Anticancer Research* **25**, 2601-2608.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L. & Rapoport, T.A. (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO Journal* **22**, 4346-4355.
- Ungar, D. & Hughson, F.M. (2003). SNARE protein structure and function. *Annual Reviews Cellular Developmental Biology* **19**, 493-517.
- von der Weth, A. & Deppert, W. (1992). Lytic infection of primary rhesus kidney cells by simian virus 40. *Virology* **189**, 334-339.
- Wang, M., Tsou, T.H., Chen, L.S., Ou, W.C., Chen, P.L., Chang, C.F., Fung, C.Y. & Chang, D. (2004). Inhibition of simian virus 40 large tumor antigen expression in human fetal glial cells by an antisense oligodeoxynucleotide delivered by the JC virus-like particle. *Human Gene Therapy* **15**, 1077-1090.
- Waters, M.G., Serafini, T. & Rothman, J.E. (1991). 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**, 248-251.

Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L. & Resh, M.D. (2000). Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 261-270.

White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B. & Stelzer, E.H.K. (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *Journal of Cell Biology* **147**, 743-759.

Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. & Salamero, J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalisation of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-Golgi network. *Journal of Cell Biology* **151**, 1207-1220.

Winston, V.D., Bolen, J.B. & Consigli, R.A. (1980). Isolation and characterization of polyoma uncoating intermediates from the nuclei of infected mouse cells. *Journal of Virology* **33**, 1173-1181.

Yamada, M. & Kasamatsu, H. (1993). Role of nuclear pore complex in simian virus 40 nuclear targeting. *Journal of Virology* **67**, 119-130.

ZPRÁVY

RNA klub 2005 v Českých Budějovicích

Dne 3. října 2005 proběhlo již třetí setkání badatelů v oblasti výzkumu ribonukleové kyseliny - RNA klub. Organizace zasedání RNA klubu se tentokrát ujali kolegové Marek Jindra, Lukáš Trantírek a Petra Sekyrová z Katedry molekulární biologie, Biologické fakulty Jihočeské university v Českých Budějovicích a tak bylo setkání, ač uspořádané v tradičním jednodenním formátu, v mnoha ohledech nové. Organizátoři výborně odhadli perspektivnost v posledních letech stále častěji se objevujícího metodického i tématického propojení vývojové biologie a molekulární biologie RNA a ohlásili toto propojení jako jedno z témat RNA klubu. Jednání klubu bylo rozděleno do tří sekcí, z nichž každá byla uvedena zvanou půlhodinovou plenární přednáškou, a bylo tentokrát vedeno celé včetně diskusí v angličtině.

Sekci „Struktura a funkce RNA molekul“ uvedla vynikající přednáška Leoše Valáška z Mikrobiologického ústavu AV ČR zasvěcená struktuře a funkci komplexu eukaryontního translačního iniciačního faktoru eIF3. Také dva další příspěvky z této sekce se týkaly regulace proteosyntézy u bakterií (Krásný, ÚMG AV ČR Praha) a u patogenní kvasinky *Candida albicans* (Feketová, PĚF UK Praha). V sekci rovněž zazněly dva příspěvky, které se zabývaly zvláštní variantou sestřihu (trans-splicing) u prvoka *Trypanosoma brucei* (Trantírková, JČU České Budějovice) a teoretickým studiem mechanismu a průběhu katalytické reakce u ribozymů typu „hammerhead“ (Chval, JČU České Budějovice). Druhá sekce, věnovaná buněčné a vývojové biologii, byla uvedena přednáškou Gregora Buchera z University v Göttingenu, ve které byli posluchači seznámeni s možnostmi využití umlčování genů pomocí RNA interference u potměníka hnědého (*Tribolium castaneum*) a s uplatněním tohoto biologického modelu pro vývojová studia hlavy. Další příspěvky v druhé sekci se týkaly složení jaderných „catal bodies“ a jejich funkce ve skládání a uspořádání malých jaderných ribonukleoproteinových částic (snRNP) (Staněk, 1. LF UK Praha), aplikace siRNA ve studiu úlohy vimentinu při diferenciaci makrofágů (Macešková, MÚ Brno), sledování vlivu fúzního genu TEL/AML1 v rozvoji akutní leukémie (Starková, 2. LF UK Praha), identifikace potenciálních mutací zodpovědných za thermosensitivní fenotyp u viru klíšťové encefalidity, kmene ts263 (Růžek, PaÚ AV ČR České Budějovice) a nakonec charakterizace transkriptomu rostlinného gametofytu. Třetí sekce nazvaná „RNAi a další techniky“ byla více zaměřena metodicky a byla uvedena plenární přednáškou Julia Lukeše věnovanou využití RNA interference pro studium RNA editace u trypanosom (PaÚ AV ČR České Budějovice). Také dvě další přednášky byly věnovány uplatnění siRNA v cílené supresi genové exprese (Žaliová, 2. LF UK Praha a Neuwirth ÚMG AV ČR Praha). Oproti minulým letům poklesl počet příspěvků věnovaných cDNA čipům. Ruszová z CPN spol. s.r.o. Dolní Dobrouč referovala o zajímavé metodě analýzy úrovně genové exprese u buněk svrchní epidermis získávaných neinvazivní metodou speciálních náplastí. Poslední dvě přednášky jednacího dne byly věnovány problematice rostlinného transkriptomu (Duplákova a Štorchová, obě ÚEB AV ČR Praha).

Celkem bylo během dne předneseno 17 odborných sdělení a několik přednášek sponzorujících firem věnovaných novým technologiím v jejich nabídce. Kromě ústních sdělení bylo předvedeno a diskutováno dalších 9 plakátových sdělení. Počet registrovaných účastníků vrostl v roce 2005 na rekordních 41, což však, dle tradice RNA klubů, zdaleka neodpovídalo počtu posluchačů v přednáškové místnosti. Další zájemci o jednotlivá

projednávaná témata, především z řad místních odborníků a studentů, rozšiřovali auditorium v průběhu dne.

Celkově lze shrnout, že jednání RNA klubu bylo tématicky široké a přitom po celou dobu zůstávalo zajímavé a obohacující pro většinu přítomných. Presentace se týkaly celé řady problémů studia RNA molekul i jejich použití pro výzkum řady jiných biologických problémů. Také z hlediska modelových organismů byl záběr široký – od bakterií, přes jednobuněčná eukaryonta a hmyzí modely po člověka a jeho virové parasity. 3. RNA klub byl po organizační stránce bezchybně připraven a jeho zdaru zajisté prospělo, že byl zaštitěn autoritou Prof. Libora Grubhoffera, děkana Biologické fakulty JČU, který měl úvodní slovo, jež bylo zároveň i velmi dobrou historizující odbornou přednáškou věnovanou padesátiletému výročí založení „RNA Tie Clubu“ v USA. Organizátoři pokračovali nejen v tradici rozdávání předem vydaného sborníku příspěvků „RNA Club 2005“ (ISSN 1214-8598), který tak byl výborným pomocníkem při přednáškách a diskusích, ale především pokračovali v tradici neformálních večerů následujících oficiální jednání klubu. Tentokrát se účastníci spolu se zástupci fakulty a sponzorů, jejichž reklamní stránky jsou rovněž součástí sborníku, sešli na večeři a následném posezení v Indické restauraci, jejíž vynikající kuchyně a milý personál vytvořily skvělou a nezapomenutelnou tečku za 3. ročníkem RNA klubu.

4. ročník RNA klubu se opět navrací do Prahy, kde proběhne opět jako jednodenní seminář v tradičním termínu na přelomu měsíce září a října.

Martin Pospíšek a Stanislav Zadražil

RNA klub 2006 v Praze

Již v tradičním období, na konci měsíce září bezprostředně před zahájením akademického roku 2006/07, se uskutečnil 4. ročník RNA klubu, setkání vědců, výzkumníků a konečně i jen zájemců o problematiku studia RNA. Tentokrát se organizátoři vrátili, po jednoleté přestávce, z Českých Budějovic (viz zprávu RNA klub 2005 v těchto IL) opět do Prahy, aby na PřF UK pokračovali jednodenním seminářem v jednání klubu o výsledcích experimentální práce v oblasti RNA na různých pracovištích z celé ČR. Letošní zasedání navštívilo 26 přihlášených účastníků a minimálně stejný počet příležitostných posluchačů (připomeňme, že většinou mladšího a středního věku), kteří přednesli 10 programovaných sdělení, zaměřených většinou na konkrétní problémy genové exprese a její regulace s účastí RNA.

Jednání zahájil vědecký tajemník Československé společnosti mikrobiologické, spoluorganizátora konference, a v dopoledním zasedání zaznělo 5 přednášek věnovaných postupně problematice mechanismu recyklování snRNP v Cajalových tělících buněčného jádra (1.LF UK Praha), zajímavému ovlivnění síly promotorů iniciačním nukleosidtrifosfátem u *B.subtilis* (ÚMG AVČR) a RNA interferenci na úrovni tkáňově specifických procesů v diferenciaci buněk *C.elegans* (2 práce z Biol.centra AV ČR a JU v Českých Budějovicích) resp. při „regulačním umlčování“ metabolismu eikosanoidů v lidských nádorových buňkách (Generi Biotech, s.r.o., Hradec Králové).

Odpolední zasedání bylo již tradičně (ve všech ročnících klubu) zahájeno přednáškou (PřF UK Praha) věnovanou nejnovějším pokrokům ve studiu funkce RNA, tentokrát (1) regulační úloze mikroRNA v objasnění mechanismu latentní infekce HSV-1 u člověka, (2) účasti ribozymových sekvencí a „ribospinačů“, specificky reagujících s nízkomolekulárními metabolity, a (3) významu nadměrné transkripce genomu (až 70%) v porovnání s jeho kodujícími schopnostmi (2-5% genomu) v evoluci (např. při vývoji mozku u člověka a šimpanze), vyvolávajícímu problémy i v současné definici genu. Ostatní přednášky pak byly věnovány bioinformační analýze IRES sekvencí v mRNA (PřF UK Praha), struktuře a funkci tmRNA u tzv. transtraslace u streptomycet (MBAV ČR), charakterizaci a výskytu virů vinné révy v ČR (VÚRV Praha) a konečně i optimalizaci metod izolace celkové RNA z různých myších (živočišných) tkání (1.LF UK Praha).

Celé setkání bylo provázeno skutečným odborným zájmem všech zúčastněných (i když, v porovnání s předcházejícími „kluby“, ve zřetelně menším počtu), což se projevilo ve velmi živé diskusi ke každému vystoupení. Na překážku nebylo ani nepravidelné střídání češtiny a angličtiny (podle výběru přednášejícího), které zde zřejmě vytvořilo optimální jazykový kompromis proti striktnímu používání angličtiny v Českých Budějovicích 2005 a jen českým vystoupením v obou pražských jednáních 2003 a 2004. Živě se diskutovalo i při večerním společenském programu, zajištěném sponzorujícími firmami (měly své „stánky“ i v průběhu konference), a to i na odborná témata. Nižší počet účastníků, kteří se po čtyřech konferencích v ročních odstupech zřejmě tématicky a metodicky „vyčerpali“ přivedl organizátory z obou spolupracujících institucí (PřF UK a BF JU) k závěru, že příští RNA klub se uskuteční až v roce 2008 a o jeho umístění se rozhodne později. Jsem přesvědčen, že je na co se těšit.

Stanislav Zadražil

Statut Ceny GSGM a vyhlášení nového kola soutěže 2005-2007

Statut

1. Cena je vypisována za významný přínos v oblasti genetiky a molekulární biologie a je sponzorována spolupracujícími firmami.
2. Cenu ve výši 2000 EUR může získat pouze občan ČR nebo SR, člen GSGM, který nepřekročil věk 35 let. Cena se uděluje za vědeckou práci nebo soubor prací publikovaných v posledních třech letech před podáním přihlášky do soutěžního kola. Udělení ceny není omezeno žádnými zvláštními kvalifikačními požadavky na předkladatele, avšak oceněný autor nemůže být vyhlášen vítězem soutěže opakovaně.
3. O udělení ceny, která kromě finanční odměny zahrnuje i povinnost autora přednést plenární přednášku na konferenci společnosti a uveřejnit anotaci práce v konferenčním sborníku, rozhoduje výbor společnosti po zhodnocení přihlášek a na návrh odborné posuzovatelské komise, kterou výbor společnosti k tomu účelu *ad hoc* ustavuje. Výbor společnosti má právo v daném kole soutěže cenu neudělit nebo ji rozdělit mezi dva vyhodnocené předkladatele.
4. Přihláška do soutěže se podává na příslušném formuláři, který je předkladatelům k dispozici na internetových stránkách společnosti (www.gsgm.cz). Společně s přihláškou musí být předložena i jednostránková anotace práce a po jednom výtisku každé položky souboru prací přihlašovaných k ocenění, z nichž je zřejmý podíl předkladatele na publikovaných vědeckých výsledcích (první autor, korespondující autor, vyjádření spoluautorů apod.).

Vyhlášení dalšího kola soutěže o Cenu GSGM 2005-2007

Další, již třetí kolo soutěže vyhlašuje výbor GSGM na léta 2005 – 2007 s tím, že cena bude udělena a přednáška oceněného autora přednesena na konferenci GSGM, která se bude konat v Bratislavě v roce 2008. Přihlášky do soutěže se přijímají do konce roku 2007 na adrese: Výbor Genetické Společnosti Gregora Mendela, Ústav experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno.

Výbor GSGM

Vznik nové společnosti pro probiotika a prebiotika

V období, kdy většina zavedených odborných a vědeckých společností se potýká s různými organizačními a finančními problémy, vyplývajícími do určité míry i z dnešních poněkud pozměněných představ o významu a důležitosti spolčování za určitým cílem, existují stále skupiny lidí, kteří se s velkým entusiasmem pokoušejí o zakládání společností nových, zaměřených na vědní, většinou interdisciplinární oblasti, které se zdají být v tomto smyslu nedostatečně pokryty.

Příkladem může být svolání a program I. symposia Společnosti pro probiotika a prebiotika (18.10.2006 v Praze), v jehož rámci byla uvedena společnost jako občanské sdružení ustavena. Podmínky pro vznik takového sdružení občanů a právnických osob, a zahrnující od samého počátku účast zainteresovaného průmyslu s obchodní činností, směřováním do praktických aplikací probiotik a prebiotik a s požadavkem vytvoření poradní komise pro průmyslové a obchodní společnosti, jsou samozřejmě poněkud jiné než při vzniku a další činnosti čistě vědecké společnosti. Projevilo se to již v průběhu symposia, kde kromě 5 informativních přednášek multioborového zaměření, přednesených většinou členy přípravného výboru společnosti pro několik desítek značně heterogenních posluchačů: Probiotika a prebiotika – renesance terapeutického principu (prof. MUDr. P. Frič, DrSc, 1. LFUK a ÚVN); Střevní mikroflora a gastrointestinální ekosystém (prof. MUDr. H. Tlaskalová, DrSc, MBÚ AV ČR); Probiotika a prebiotika v pediatrii (prof. MUDr. J. Nevoral, CSc, 2.LF a FNM); Místo probiotik a prebiotik v intenzivní a umělé výživě pacientů (doc. MUDr. P. Kohout, PhD, FTN) a Použití probiotik a prebiotik ve výživě zvířat (prof. Ing. V. Rada, CSc, ČZU), byl program doprovázen propagačními aktivitami sponzorujících firem, podílejících se na výrobě a distribuci současného spektra probiotik a prebiotik na našem trhu.

Druhá část symposia byla věnována právě ustavující schůzi společnosti se všemi nezbytnými volebními a administrativními akty, které ji doprovázejí. Základní tematikou společnosti bude podpora výzkumu probiotik a prebiotik, dodržujícího přísně vědecké přístupy a postupy a podloženého novými vědeckými poznatky. Společnost se zaměří i na odborné a vzdělávací formy prezentace a komunikace s odbornou a laickou veřejností o významu probiotik a prebiotik pro zlepšení zdravotního stavu, prevenci a léčení chorob populace. Mikrobiální genetici jistě najdou mnoho společných témat pro spolupráci s novou společností, které lze jen popřát mnoho úspěchů.

Stanislav Zadražil

Zpráva z výboru

Prof. Ing. Josef Dvořák, CSc., rezignoval na svoje členství ve výboru GSGM. Výbor proto na svém zasedání 17.5.t.r. jmenoval hospodářem GSGM pro české země člena výboru doc. RNDr. Aleše Knolla, Ph.D.

Výbor GSGM