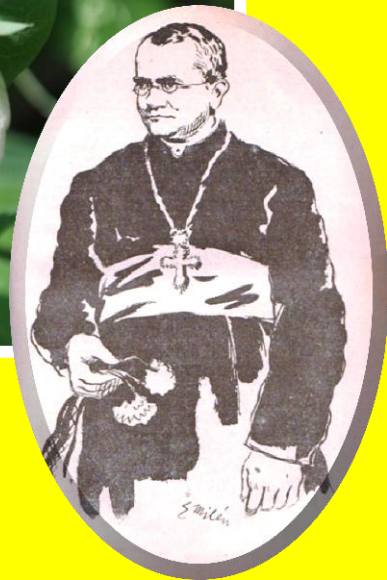


MENDEL FORUM 2013



www.mendelianum.cz



Mendelianum MZM, Brno



ÚŽFG AV ČR,
v.v.i., Brno



Ústav fyziologie
FVL VFU Brno

Vydala Veterinární a farmaceutická
univerzita Brno
2013

ISBN 978-80-7305-651-3

MENDEL FORUM 2013



26. dubna 2013

**VFU Brno
Palackého 1/3**

ISBN 978-80-7305-651-3

Mendel Forum 2013

navazuje na Odpoledne s DNA k 60. výročí objevu
struktury DNA

Odpoledne s DNA

čtvrtek 25. dubna 2013

MENDELu, budova A
Zemědělská 1, Brno

15 - 16:15 h

Genomika a moderní šlechtění
(prof. A. Knoll, doc. T. Urban)

16:15-16:30 h: diskusní přestávka

16:30-17:30 h

Sekvenování DNA v praxi
(doc. T. Urban)

Organizace akcí Odpoledne s DNA:
prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.
Program a zajištění Odpoledne s DNA 2013:
doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.



Mendel Forum 2013

pátek 26. dubna 2013

DOPOLEDNÍ SEKCE

9:30 h: zahájení

9:45 – 10:30 h

**Aktuální vzdělávací projekty
(prof. J. Doubek)**

10:30–10:45 h: diskusní přestávka

10:45–11:45 h

**Indukované pluripotentní buňky
-naděje pro regenerativní medicínu?
(dr. T. Bárta)**

11:45–12 diskuse

Mendel Forum 2013

pátek 26. dubna 2013

ODPOLEDNÍ SEKCE

MENDELIANUM - ATRAKTIVNÍ SVĚT GENETIKY

14-16 h

Round table discussion

- uzavřené jednání členů odborného týmu
podílejících se na přípravě návštěvnického centra
Mendelianum-atraktivní svět genetiky (projekt
VaVpI- CZ.1.05/3.2.00/09.0180)

Program a organizace Mendel Forum:
Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.
Odborný garant: PhDr. Anna Matalová

ODPOLEDNE S DNA

Tomáš Urban



V letošním roce uplyne 60 let od objevu struktury DNA. Za tento významný objev, který nastartoval éru molekulární biologie, byla udělena Nobelova cena v roce 1962. Stěžejní práce D. J. Watsona a F. H. C. Cricka vyšla v časopise Nature 25. dubna 1953. Tento den je proto mezinárodně připomínán jako Den DNA.

Mendelova univerzita ve spolupráci s Mendelianem MZM Brno připravila na 25. duben 2013 další ročník vzdělávacího cyklu pro veřejnost Odpoledne s DNA. Tyto akce jsou tradičně zaměřeny především na přímé praktické zkušenosti s vědou a výzkumem formou hands-on experience. Mendelova univerzita v letošním roce nabízí seznámení s metodami sekvenování DNA přímo ve svých molekulárních laboratořích. Odpoledne bude zahájeno přednáškou T. Urbana a A. Knolla na téma genomika pro moderní šlechtění, na kterou naváže praktická činnost účastníků v laboratoři.



Genomika skotu a prasat - aplikace ve šlechtění

Tomáš Urban, Aleš Knoll, Zuzana Vykoukalová

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, AF MENDELU

V posledních padesáti letech došlo k výraznému zvýšení užitkovosti v chovu hospodářských zvířat. Toto zvýšení bylo podmíněno systematickým šlechtěním založeným na umělé selekci a hybridizaci. Selektce vycházela z pozorovaných fenotypových hodnot, které reprezentují celkový efekt složený z vlivu genů a prostředí, a na znalosti populačních genetických parametrů, jako jsou genetické variance, heritabilita a korelace. Pro mnoho druhů, plemen atp. byly vytvořeny a implementovány procesy testování a selekce s cílem zvýšení genetického založení fenotypu u jednotlivých druhů, plemen a linií. Toto zlepšení je uskutečňováno především pomocí opakované selekce a introgrese, která ovlivňuje především aditivní složku genetické variance.

V současné době je nejrozšířenější selekce na základě *plemenné hodnoty* (breeding value). Plemenná hodnota může být odhadována pomocí mnoha metod. V současné době je nejvyužívanější metoda BLUP-AM. Tato metoda se snaží o co nejpřesnější odhad genetického založení jedince. Pro odhad plemenné hodnoty je nutná znalost genetických parametrů (genetické variance, heritabilita a korelace) které jsou odhadnutelné pomocí statistické analýzy fenotypových informací jedinců a jejich příbuzenských vztahů.

Fenotyp (užitkové vlastnosti) však nemůže být vždy zaznamenanelný z důvodů fyziologických (např. býci neprodukují mléko, kanci nemají selata, krávy rodí telata až po dvou letech života), některé vlastnosti nelze zjistit u živých zvířat (např. ukazatele jatečného těla, kvalita masa), nebo zaznamenávání fenotypu je chybné nebo nepřesné (snadnost porodu). V posledních desetiletích došlo k hlubšímu poznání struktury genomu a působení určitých genů u jednotlivých druhů hospodářských zvířat. Tyto výzkumy umožňují zkoumat, zda variabilita v DNA (polymorfismus v lokusech kvantitativních vlastností, QTL, identifikovatelné pomocí markerů)

určitých zvířat může být vázána k rozdílům v produkčních nebo jiných ekonomických vlastnostech. Je zde však několik zásadních problémů vlastní celému genomu. Musí se určit funkční struktura chromatinu a pak nalézt v této struktuře funkční oblasti (geny, regulační oblasti) a nefunkční oblasti. Těchto molekulárních markerů, které byly studovány ve vztahu k masné užitkovosti u skotu či prasat, bylo popsáno již mnoho (několik set QTL). V MAS (Marker Assisted Selection - selekci s přispěním markerů) se jich však přímo a univerzálně využívá podstatně méně.

Problémem při využití jednotlivých markerů je to, že výsledný fenotyp kvantitativních vlastností je podmíněn velkým množstvím genů (polygenní dědičnost), z nichž některé mají větší efekt na příslušný znak než jiné a jejichž efekty při tomto stanovení jednotlivých markerů nepodchytíme. Kromě toho většina markerů patří mezi tzv. nepřímé markery (vázané), které jsou ve vazbové nerovnováze (dědí se spolu) s neznámým příčinným genem. V každé populaci musí být před selekcí nejprve zjištěna vazbová nerovnováha mezi markerem a znakem. U jednotlivých zvířat mohou být marker a příčinná mutace v různé vazbové fázi. V důsledku toho je určitá alela asociovaná u jednoho souboru zvířat s vyšší hodnotou příslušného znaku, u jiné naopak s nižší, nebo nemusíme zjistit průkaznou asociaci vůbec. Proto většina markerů není použitelná plošně. Řešení tohoto problému nabízí až identifikace příčinné mutace, která je metodicky velmi náročná. Daná asociace a tím i využití markeru může fungovat u určitého konkrétního souboru zvířat. Řada šlechtitelských firem tak již řadu let využívá některé z tzv. nukleotidů pro kvantitativní znaky QTL, které má otestovány na svých plemenných zvířatech. Řada markerů je také součástí komerčních testů cílených na určité znaky (Igenity aj.), firma Pfizer nabízí inovovaný kit o 55 markerech především na konverzi krmiva, marbling a křehkost masa u skotu.

V mapování genomu se největší pozornost soustřeďuje na ty QTL, které by mohly být využity při šlechtění, vedoucí ke zlepšení ekonomiky produkce. Tato QTL se nazývají lokusy ekonomicky významných znaků a označují se ETL. QTL mají vesměs polygenní

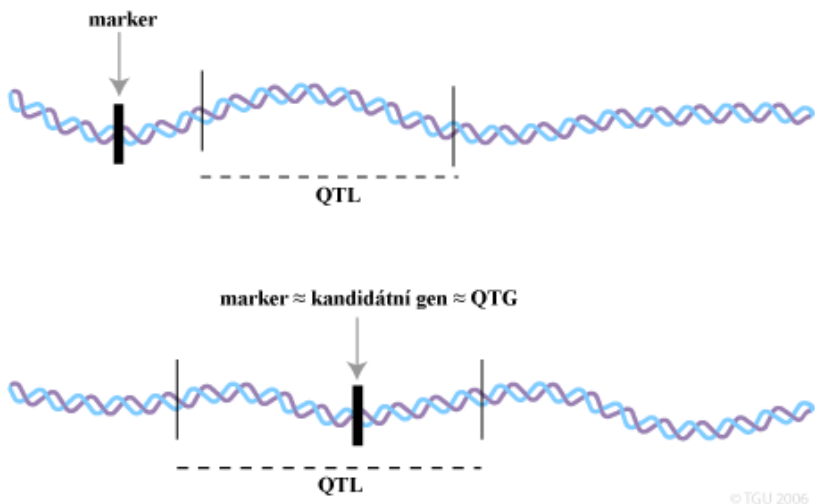
charakter s bezpočtem kombinací alel a berou se jako celek a o jejich složení se prakticky nic neví. Proto se jejich vztah k užítkovosti vyjadřuje nepřímou prostřednictvím genetických markerů - polymorfních úseků DNA s rozličnou funkcí či bez funkce, ale se známou identifikovatelnou pozicí. Genetický marker je vlastně mutace v genomu, která je identifikovatelná nějakou metodou molekulární genetiky (PCR-RFLP, sekvenování, DNA chipy). V případě, že je polymorfní lokus asociován s užítkovou vlastností, jedná se pravděpodobně o důsledek vazby s QTL. Proto mapování QTL vyžaduje populaci zvířat, ve které je genetická proměnlivost ve zkoumaných vlastnostech a genotypování těchto populací pro panel polymorfních genetických markerů pokrývajících genom v určité hustotě.

Hlavní výhody QTL/ETL ve šlechtitelských programech jsou

- zvýšení přesnosti v selekci pomocí doplňkových informací přímo vztažených ke genotypu jedince,
- možnost snížit generační interval přidáním nového selekčního období v životě zvířete - nejranější věk, protože QTL/ETL dovolují získat informace nezávislé na pohlaví a věku.

Detekce QTL/ETL

Tento krok tvoří studium potenciální vazby mezi polymorfizmy DNA a fenotypovými vlastnostmi. Hlavní ideou je, že specifický gen nazývaný QTL/ETL je zodpovědný za část variability daného fenotypu kvantitativní vlastnosti. K detekci QTL/ETL se používají dva přístupy. Přístup kandidátních genů využívá znalost již známých genů, nazývaných jako kandidátní pro QTL/ETL. Je-li znám jen polymorfizmus DNA, pak se předpokládá, že tento marker pro danou oblast DNA se nachází blízko QTL/ETL genetických markerů.



© TGU 2006

Metoda kandidátních genů závisí na předpokladu, že známe působení kandidátního genu na genetické a fyziologické úrovni. Musí být známy geny a jejich sekvence DNA. Výběr správného genu by měl být prováděn na základě dobré znalosti jeho pozice v metabolických drahách. Aditivní efekty pro různé alely těchto kandidátních genů se pak porovnávají navzájem, aby se prokázaly substituční efekty alely. Používají se rozdílné techniky na úrovni populací nebo rodin.

Genetické markery jsou také založeny na známém polymorfizmu DNA, které jsou však většinou v nefunkčních oblastech (tedy v oblastech, které přímo nekódují proteiny či RNA) nebo nejsou funkční jako kandidátní geny. Nejvíce jsou využívány mikrosatelity, markery s vysokým polymorfizmem. V současné době se začínají masivně prosazovat jednonukleotidové polymorfizmy (SNP).

U hospodářských zvířat je situace komplikovaná tím, že většinou (kromě drůbeže) nejsou k dispozici inbrední linie. Populace jsou outbrední a liší se jen frekvencemi alel v markeru a QTL a vazbová fáze v jednotlivých rodinách není známa. Alely markeru a QTL nejsou fixovány, tzn., že jiná alela markeru je vázána s různými alelami QTL. Proto se používá křížení mezi outbredními divergentními liniemi, které mají rozdílné fenotypové charakteristiky.

Využití QTL/ETL ve šlechtění

Dalším problémem po detekci QTL/ETL je jejich integrace do současných šlechtitelských programů, s čímž jsou svázané různé technické problémy. Detekce se provádí na rodinách nebo subpopulacích, takže jejich široké uplatnění v populacích musí být zpřesňováno nebo se omezí jen na rodiny, kde je jejich segregace známá.

Detekce se provádí pro jednu vlastnost nebo jen zřídka pro skupinu vlastností. Nemohou být vyloučeny pleiotropní efekty na jiné vlastnosti a studium tedy musí být o to pečlivější. Např. gen svalové hypertrofie nezpůsobuje jen dvojité osvalení zvířete, ale má pleiotropní efekt na mnohé malformace. Studují se hlavně aditivní QTL/ETL efekty, ale je potřeba vysvětlit i zbývající polymorfismus na QTL/ETL – dominantní efekty, které udržují v populacích různé alely navzdory silné selekce (Muir, 2003).

Využití znalosti o genotypech QTL/ETL lze různými způsoby. Metody se mohou lišit podle toho, zda se použije nebo ne apriorní úroveň QTL/ETL efektů, nebo se společně odhadnou polygenní a QTL/ETL efekty. Druhý způsob se zdá být výhodnější a více se prosazuje (viz genomická selekce).

Selekce s podporou markerů (Marker assisted selection, MAS) je moderní metoda šlechtění, která využívá asociované genetické markery s variabilitou fenotypu a to zejména u vlastností s nízkou hodnotou heritability (Lande a Thompson, 1990). Markery musí být používány pro svou ekonomickou hodnotu poté, co byly zafixované po několika generacích selekce. Vyvíjejí se různé metody a strategie pro co nejefektivnější využívání informace o markerech. Poslední variantou MAS je genomická selekce, která používá informace o desítkách až stovkách tisíc markerů SNP, stanovené metodou DNA chipů (microarray), a následného výpočtu odhadu genomické plemenné hodnoty. Genomická selekce se již využívá u dojeného skotu ve světě a Česká republika na tuto metodu šlechtění bude co nejdříve také přecházet. Co se týče situace ve šlechtění prasat, tak se genomická selekce ještě neuplatňuje, i když DNA chipy již jsou k dispozici: např. Illumina Porcine

SNP60 BeadChip (více než 60 tis. vysoce informativních SNP, kde vzdálenost mezi markery je cca 40kb napříč celým genomem prasete). Aplikovaná metoda genomické selekce se určitě se nevyhne ani těmto druhům hospodářských zvířat.

Genetické markery asociované s produkcí a kvalitou masa u skotu

U skotu mezi nejvýznamnější markery masné užitkovosti patří gen myostatinu (*MSTN* nebo *GDFB* - růstový diferenciační faktor 9). Tento gen podmiňuje běžné osvalení. Blokuje funkci myogeninu a zamezuje tím nadměrné tvorbě svalových myofibril v embryonálním stádiu. Nejvýraznější efekt recesivní mutace v myostatinu způsobující ztrátu jeho funkce je znám u plemene belgické modrobílé, kde vzniká tzv. dvojí osvalení (Grobet *et al.*, 1998). Kromě vyšší produkce (o 20-30% u homozygotů) zde dochází i k zvýšení kvality masa, které je libovější a křehčí. Nárůst svalové hmoty v souvislosti s různými mutacemi v genu pro myostatin byl zjištěn i u jiných plemen skotu, jako charolais, piemontese, asturiana, maine- anjou a limousin. Efekty jsou u různých plemen způsobeny různými mutacemi, které je možno detekovat DNA testy.

Kalpastatin (*CAST*) je součástí kalcium-dependentního proteinázového systému (kalpain/kalpastatin systému), který hraje důležitou roli během fyziologických změn ve struktuře svalů *post mortem*. Kalpain je odpovědný za rozklad klíčových myofibrilárních proteinů, které ovlivňují křehkost masa. Kalpastatin inhibuje funkci kalpainu. U skotu byly nalezeny mutace v tomto genu asociované se zvýšenou křehkostí masa (Schenkel *et al.*, 2006). Gen je součástí řady komerčních testů často dohromady s dalším významným genem a to genem pro kalpain (*CAPN*) (Page *et al.*, 2002).

Leptin je hormon regulující energetickou homeostázi. Koncentrace leptinu v krvi predikuje složení jatečného těla u vykrmovaného skotu a odpovídá růstu svalových vláken. Uvnitř genu pro leptin (*LEP*) u skotu bylo nalezeno velké množství polymorfizmů, především SNP, z nichž některé jsou asociovány s příjmem a

konverzí krmiva, růstem a kvalitou masa, především ovlivňuje ukládání intramuskulárního tuku a mramorování masa. Výsledky však bohužel nejsou úplně konzistentní u všech zkoumaných souborů a populací zvířat.

Gen *H-FABP* (protein vázající mastné kyseliny, srdeční typ) je označován jako gen intramuskulárního tuku, který je důležitým ukazatelem kvality masa. Produkt genu se podílí na transportu mastných kyselin ve směru od plazmatické membrány na místo jejich využití ve svalových buňkách (Gerbens *et al.*, 1999).

Genetické markery asociované s produkcí a kvalitou masa prasat

Prasata byla vyšlechtěna pro lidskou kulinářskou spotřebu čerstvého masa a procesně upravených masných produktů. Zvýšené zastoupení libového masa a poměru libového masa a tuku v jatečném těle prasat bylo hlavním cílem šlechtitelů po mnoho desetiletí, a cílem šlechtitelských a různých hybridizačních programů v mnoha zemích. Je samozřejmé, že řešit tyto úkoly bez zajištění reprodukce, tj. dobré plodnosti prasnic a kanců, by bylo nesmyslné, neboť bez selat vhodných pro výkrm by nebyla možná produkce masa. Toto úsilí šlechtitelů pokračuje až do současnosti, ale mimo zastoupení libového masa je v poslední době věnována mimořádná pozornost kvalitě masa.

Na začátku šedesátých let minulého století byl u některých plemen prasat, šlechtěných na vysokou produkci, zjištěn značný výskyt snížení kvality masa PSE (bledé, měkké a vodnaté) a náchylnost na stres. Přestože vnímavost prasat na stresové podněty je podmíněna polygeny, bylo postupně zjištěno, že významnou část variability je ovlivněna variabilitou v genu označovaný postupně jako *HAL*, *RYRI* a *CRC*. Mutace cytosinu za tymin v 1843. nukleotidu v sekvenci genu má za následek náhradu aminokyseliny arginin za cystein v transmembránovém proteinu sarkoplazmatického retikula (Fuji *et al.*, 1991). Záměna se ukázala být příčinou citlivosti ke stresu a vývoje PSE. Toto zjištění umožnilo přímou detekci mutace na základě DNA testu (PCR- RFLP). PSE je kvantitativní vlastností a ta je determinována polygeny, a na její expresi mají vliv vnitřní a vnější faktory prostředí.

Podíl prostředí je způsoben vlivem výživy (půst před porážkou), transportu zvířat, zvláště teploty a směsí sociálních skupin, a také délkou transportu a počtem zvířat ve skupinách. Organizace práce na jatkách, velikost ohrady, typ náhonu, sprchování zvířat, způsob porážky, postup při porážce a délka trvání porážky a paření jatečného těla do značné míry ovlivňují výslednou kvalitu masa. Velký význam má celý chladicí řetězec, tj. výška teploty a proměnlivost teploty při skladování.

Genotypy *CRC* genu jsou také v asociaci s významnými znaky produkce masa, proto je tento gen možno označit za gen ekonomického znaku u prasete. Jedná se o jediný marker, který byl prakticky přímo využit v selekci prasat (MAS).

Další genetické markery asociované s produkcí a kvalitou vepřového masa jsou např. gen *RN* (gen kyselého masa) (Lundström *et al.*, 1996), geny rodiny Myod (tato rodina se u prasat skládá z genu *MYF4* determinujícího myogenin, genu *MYOD1* (*MYF3*) pro determinaci proteinu myoblastů, genů *MYF5* a *MYF6* (nazvaného také jako herkulin), které jsou významné pro vývin myoblastů.) (Verner *et al.*, 2007). Geny *IGF1* a *IGF2* jsou v asociaci s ukazateli jatečného těla (obsahu libového masa) a s konverzí krmiva. Pro výběr nejvhodnějších kanců a prasnic k produkci jatečných prasat je důležité zohlednit epigenetický jev, který se týká genu *IGF2* - paternální imprinting (Nezer *et al.*, 2003). Leptin je produktem genu *LEP* v tukové tkáni. Reguluje příjem krmiva a výdaje energie. Z toho důvodu je velmi zajímavým kandidátním genem produkce masa (Jiang a Gibson, 1999).

Nové možnosti využívání genetických markerů ve šlechtění zvířat

Při vyhledávání genů, které by mohly sloužit jako markery pro selekci, se v současnosti ve velkých světových výzkumných střediscích využívá relativně nový přístup – celogenomová SNP asociace GWAS (Genome Wide Association Study). Je to obdoba klasických asocičních studií, kde sledujeme vztah jednoho, nebo maximálně několika málo polymorfních markerů s vybranými parametry užitkovosti, ale s tím rozdílem, že do analýzy a výpočtů se

nyní zahrnují řádově desetitisíce polymorfizmů. Tímto moderním přístupem se například podařilo nalézt jasnou asociaci genu *calpastatin (CAST)* s křehkostí vepřového masa (Lidholm-Perry *et al.*, 2009), nicméně příčinný polymorfizmus zatím znám není a předpokládá se, že to bude nějaké SNP ovlivňující expresi genu.

Praktickým využitím GWAS je genomická selekce na základě co nejkomplexnější informace o genomu současně, tzv. velkoformátové molekulárně genetické metody umožňují testovat řádově tisíce až desetitisíce molekulárně-genetických markerů u stovek až tisíců zvířat. U skotu jsou například aktuálně k dispozici SNP čipy (tzv. SNP microarray) dvou výrobců umožňující testovat 50 tis. SNP a poslední generace čipu zahrnující 777 tis. SNP (Hayes *et al.*, 2009).

Ke zjištění dalších efektivnějších markerů mohou pomoci přístupy funkční genomiky, která se zabývá studiem funkce genů jedince. Významné je především studium regulace stupně vyjádření genů (tzv. exprese), tzn., jak velké množství produktu bude vznikat. Pomocí metod funkční genomiky je snaha detekovat tzv. eQTN (expresní nukleotidy pro kvantitativní znaky), tj. polymorfizmy, které expresi genů ovlivňují. Bernard *et al.* (2007) například při srovnání expresí mnoha genů u dvou rozdílných skupin zvířat plemene charolais detekoval kandidátní gen pro křehkost masa *DNAJA1*, jehož exprese byla s tímto znakem negativně korelována. Exprese tohoto genu je zodpovědná za 63 % fenotypové variance tohoto znaku.

Současný počet SNP, které jsme schopni testovat (např. u skotu 54 tis.), však není zřejmě zcela dostatečný pro jasnou identifikaci příčinného polymorfizmu. Ideálním stavem by byla schopnost otestovat prakticky všechny polymorfizmy, které se v populacích vyskytují, čehož však nelze stoprocentně dosáhnout. Některé polymorfnní varianty (alely) se vyskytují ve velmi nízké frekvenci (a uniknou zařazení do čipu) a navíc díky přirozeným mutacím (které mohou mít i relativně velké efekty - většinou však bohužel negativní) neustále vznikají další varianty genů. Proto další metodou, která se nabízí, je tzv. celogenomové sekvenování, označované též jako sekvenování poslední generace (Next Generation Sequencing, NGS),

umožňující získat sekvenci téměř celého genomu konkrétního zvířete. Zatím se však metoda v této oblasti nevyužívá vzhledem ke své vysoké ceně, předpokládá se ale, že se bude postupně snižovat. Meuwissen a Goddard (2010) uvádějí, že s využitím NGS je možno zvýšit přesnost odhadu genetické hodnoty až o 40 % ve srovnání s využitím 30 tis čipu. Problémem ale i nadále zůstane, jak danou genetickou informaci interpretovat, a to nejen vzhledem k funkčním interakcím těchto genetických variant mezi sebou v genomu, epigenetickým mechanismům, ale především ve vztahu k proměnlivým efektům prostředí.

Kromě výzkumu dnes již klasickými metodami strukturní genomiky (např. srovnávacím sekvenováním DNA) se uplatňují další nové přístupy, jako např. studium micro RNA, které se výrazným způsobem podílejí na regulaci genové exprese. Pro detekci kandidátních resp. příčinných genů se bude stále více využívat i proteomiky (tj. komplexního studia proteinů v organismu) (Picard *et al.*, 2010).

- Bernard C et al. (2007). *J Agric Food Chem.* 55 (13) : 5229-37.
- Fujii J et al. (1991). *Science* 253 (5018): 448-51.
- Gerbens F et al. (1999). *J Anim Sci* 77:846-852.
- Grobet, LD et al. (1998). *Mamm. Genome* 9:210-213
- Hayes BJ et al. (2009). *J Dairy Sci* 92(2): 433-43.
- Henderson CR (1984). *Applications of linear models in animal breeding.* p 462. Univ. of Guelph, Guelph, ON, Canada.
- Jiang Z-H, Gibson JP (1999). *Mamm Genome*, 10 (2): 191-193.
- Lande R, Thompson R (1990). *Genetics*, 124: 743-756.
- Lindholm-Perry AK et al. (2009). *Anim Genet.* 40(5):713-21.
- Lundstrom K et al. (1996) *Meat Science*, 42 (2): 145-153.
- Meuwissen T, Goddard M (2010). *Genetics* 185: 623-631.
- Muir WM (2003): *Incorporating Molecular Information in Breeding Programmes: Applications and Limitations.* In. Muir W.M. Aggrey S.E. *Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology.* CABI Publishing 2003, pp. 549- 560.
- Nezer C et al. (2003). *Genetics*, 165 (1): 277-285.
- Page BT et al. (2002). *J Anim Sci* 80: 3077-3085.
- Picard B et al. (2010). *Brief Funct Genomics.* 9(3): 259-78.
- Schenkel FS et al. (2006). *J Anim Sci.* 84(2):291-9.
- Verner J et al. (2007). *J Anim Breed Genet* 124 (2): 81-85.

Protokoly pro praktickou část Odpoledne s DNA

Zuzana Vykoukalová

UMFGZ AF MENDELU

1. IZOLACE GENOMOVÉ DNA Z RŮZNÝCH BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

Prvním krokem při přípravě vzorku na sekvenování je získání výchozího materiálu – genomové DNA. Genomovou DNA lze získat z různých typů biologických vzorků – z krve, mléka, slin, spermatu, chlupů, z různých tkání (maso, játra, tuk, chrupavka), potravinových výrobků, apod. K izolaci DNA byla vyvinuta řada metodik v různých modifikacích, např. proteinázová metoda, fenol-chloroformová extrakce, nebo metoda založená na adsorpci DNA na silikát (kolonková metoda). V tomto protokolu je uvedena moderní, jednoduchá a v naší laboratoři nejčastěji používaná metoda izolace DNA z krve kolonkovou metodou (protokol č. 1a). Kvalitu izolované DNA ověřujeme pomocí gelové agarózové elektroforézy (protokol č. 1b) a zjišťujeme také její koncentraci pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (protokol č. 1c). Kvalitně izolovaná DNA pak může být použita pro další krok přípravy vzorku na sekvenování – pro PCR reakci (bod 2).

Protokol č. 1a - Izolace genomové DNA z krve pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kitu

Potřebné vybavení a reagentie:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit - kolonka + 1 x 2 ml zkumavka (součást kitu)
 - pufry – AL, AW1, AW2, AE
 - QIAGEN proteáza
- 96 - 100% ethanol
- stojan na 1,5 ml zkumavky
- 1 x 1,5 ml zkumavka / 1 vzorek
- sada pipet + špičky
- vortex

- centrifuga
- termální blok předehřátý na 56°C

Před začátkem

- nahřát termální blok na 56°C
- do stojánku nachystat kolonku vloženou do centrifugační zkumavky a 1 čistou 1,5 ml zkumavku s ustříženým víčkem (víčko uschovat!)

Postup

1. Do připravené 1,5 ml zkumavky s **200 µl krve** přidejte nejprve **25 µl QIAGEN proteázy** a pak **200 µl pufru AL**, vortexujte **15 s**.
2. Nechte inkubovat v termálním bloku **10 min. při 56°C**.
3. Ke vzorku přidejte **200 µl ethanolu**, vortexujte **15 s**.
4. Směs získanou v kroku 3 přepipetujte do kolony a centrifugujte **1 min/8 000 rpm**.
5. Vyjměte kolonku, odpad z centrifugační zkumavky vylijte, vraťte kolonu a napipetujte do ní **500 µl pufru AW1**, centrifugujte **1 min/8 000 rpm**.
6. Vyjměte kolonku, odpad ze zkumavky vylijte, vraťte kolonu a napipetujte do ní **500 µl pufru AW2** a centrifugujte **3 min/13 000 rpm**.
7. Vyjměte kolonku, odpad ze zkumavky vylijte, vraťte kolonu a poté dodatečně **1 min/13 000 rpm**.
8. Zkumavku s odpadem vyhoďte, kolonku umístěte do čisté 1,5 ml zkumavky, přidejte **100 µl AE pufru**. Nechte stát **5 min.** při pokojové teplotě, pak centrifugujte **1 min/8 000 rpm**.
9. Kolonku vyhoďte a zkumavku s izolátem uchovejte při -20°C k dalším analýzám.

Protokol č. 1b – Ověření kvality izolované DNA pomocí gelové agaróзовé elektroforézy

Potřebné vybavení a reagensie:

- DNA izolovaná v předchozím cvičení
- hmotnostní standard M1kb – 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp
- agaróza
- 1x TBE pufr

- 100 ml erlenka
- ethidium bromid, EtBr (0,5 mg/ml)
- sada pipet + špičky
- vanička na gel + hřebínek (nejlépe na 14 jamek)
- nanášecí pufr: 40% sacharóza, 0,25% bromfenolová modř
- elektroforetická vana s anodou, katodou a pufrem + externí zdroj stejnosměrného napětí
- ochranné (latexové) rukavice

Postup

1. Připravíme 1% agarózový gel (= 1g agarózy na 100 ml pufru): Do 30 ml elektroforetického pufru přidáme 0,3 g agarózy, promícháme a vaříme tak dlouho, až se prášek rozpustí a roztok bude homogenní.
2. Necháme gel ochladit na 50-60 °C, pipetou přidáme 6 µl EtBr, zamícháme a nalijeme do misky, umístíme hřebínek.
V tomto kroku použijeme ochranné rukavice!
3. Necháme gel ztuhnout.
4. Ponoříme misku s gelem do elfo vany s pufrem a opatrně vytáhneme hřebínek. Pufr musí být těsně nad povrchem gelu.
V tomto kroku opět použijeme ochranné rukavice!
5. Do vzniklých jamek postupně nanese pipetou 5 µl markeru M1kb a 5 µl z každého izolátu DNA smíchaného s 1 µl nanášecího pufru.
6. K elfo vaně připojíme zdroj stejnosměrného napětí tak, aby DNA putovala k anodě (+ pól). Optimální velikost napětí je 5V/cm (měřeno vzdáleností mezi elektrodami), doba separace podle potřeby.
7. Vypneme a odpojíme zdroj od elfo vany, v ochranných rukavicích vyjmeme gel a umístíme na transiluminátor (zdroj UV světla, pozor na expozici - používat ochranné brýle). Kvalitně izolovaná DNA by měla být na gelu vidět v podobě ostrého proužku v horní části gelu (blízko k jamkám). Gel vyfotografujeme.

Uchování DNA

Izolovanou DNA lze dlouhodobě uchovávat při -70°C , nejčastěji ve vodném roztoku nebo v pufru. Časté rozmrazování izolátu negativně ovlivňuje kvalitu DNA, proto je vhodné vytvořit alikvotní vzorky (tj. rozdělit celkové množství izolátu do více zkumavek) a z nich používat vždy jen jeden, který lze uchovávat při -20°C .

Protokol č. 1c – Stanovení koncentrace izolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDropu

Potřebné vybavení a reagensie:

- izolovaná DNA
- elučňi pufr z použitého izolačního kitu (AE pufr)
- pipeta + špičky
- tampony buničité vaty
- přístroj NanoDrop 2000

Postup

1. Zapněte přístroj do elektrické sítě a připojte k počítači.
 2. Zapněte počítač.
 3. Nechte přístroj asi 15 min zahřívát.
 4. Klikněte na ploše na ikonu „**NanoDrop2000**“.
 5. V pravé části obrazovky klikněte na „**Nucleic Acid**“.
 6. Potvrďte okno pro „**Wavelength verification**“, přístroj provede krátký ověřovací proces.
 7. V horní liště zvolte „**File**“ → „**New Workbook**“ → v nově otevřeném okně zadejte umístění a název souboru s vašimi výsledky.
 8. Proved'te stanovení nulové hodnoty **BLANK**:
 - napipetujte 2 μ l elučňiho pufru AE na spodní rameno, přiklopte horní rameno
 - klikněte na ikonku „**blank**“ v horní liště vlevo, přístroj provede kalibraci
 - po skončení měření otřete obě ramena kouskem čisté buničité vaty
 9. Proved'te měření koncentrace vašeho vzorku DNA:
 - v pravém horním rohu napište do kolonky „**Sample ID**“ název vašeho vzorku
 - v další kolonce nastavte „**DNA – 50,00**“ pro měření koncentrace dsDNA
 - na spodní rameno napipetujte 2 μ l DNA, přiklopte horní rameno, klikněte na ikonku „**Measure**“, počkejte, až přístroj provede měření
 - zkontrolujte výsledek v pravé horní části obrazovky:
 10. Očistěte obě ramena přístroje kouskem čisté buničité vaty.
 11. Proved'te měření koncentrace dalšího vzorku.
- Všechny výsledky si lze prohlédnout přes „**Report**“ v levé části okna.

2. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Vzhledem ke své velikosti je celková izolovaná genomová DNA nevhodná pro klasický způsob sekvenování (tj. Sangerovou metodou), prováděný v naší laboratoři. Nejprve je tedy nutné získat dostatečné množství pouze krátkého úseku DNA, který je následně sekvenován. Jednou z možných metod, jak takový úsek získat, je použít PCR reakci.

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) slouží k získání milionů identických kopií vybraného úseku genomové DNA pomocí enzymu DNA polymerázy a cyklického střídání tří teplotně odlišných kroků (denaturace – rozvolnění jedné molekuly dvouřetězcové DNA na dvě jednořetězcové DNA; annealing – nasednutí dvojice primerů, krátkých jednořetězcových molekul DNA vymezujících množný úsek; a elongace – syntéza nových řetězců z volných nukleotidů (dNTP) DNA polymerázou v úseku vymezeném primery). Množení (amplifikace) probíhá v přístroji označovaném jako termální cykler za teplotních podmínek specifických pro konkrétní amplifikovaný úsek DNA.

V tomto protokolu je uveden příklad amplifikace (protokol č. 2a) 379 bp dlouhého úseku DNA prasečího genu *MYF6* (myogenní faktor 6), u kterého je studován vliv na vývoj svaloviny. Po úspěšné amplifikaci je výsledek PCR reakce opět ověřen pomocí gelové agaróзовé elektroforézy (protokol č. 2b) a v případě úspěšného namnožení požadovaného úseku je výsledný PCR fragment sekvenován (bod 3).

Protokol č. 2a – Amplifikace části prasečího genu *MYF6* pomocí PCR reakce

Potřebné vybavení a reagensie:

- DNA izolovaná v předchozím cvičení (denaturovaná 7 min. při 95°C)
- PCR reagensie: H₂O

- 10x LA PCR pufr (kompletní) – obsahuje 2,2 mM Mg²⁺
dNTP mix (10 mM)
- roztok primeru MF6 2A (10 pmol/μl)
- roztok primeru MF6 2B (10 pmol/μl)
- LA DNA polymeráza (5U/μl)

- 1 x PCR zkumavka (0,2 ml)/1 vzorek
- stojan
- sada pipet + špičky
- led nebo mrazicí box
- rukavice
- termální cykler

Před začátkem:

- zapnout cykler, aby se zahřál

Postup:

1. Do 0,2 ml PCR zkumavky napipetujte všechny složky reakční směsi v následujícím pořadí a množství:

složka	množství	konečná koncentrace
H ₂ O	37,6 µl	-
10x LA PCR pufr	5,0 µl	1 x
dNTP mix	1,0 µl	200 µM
primer MF6 2A	1,0 µl	0,2 µM
primer MF6 2B	1,0 µl	0,2 µM
LA polymeráza	0,4 µl	2 U
DNA	4,0 µl	-
celkové množství	50,0 µl	

2. Reakční směs dobře promíchejte a poté zkumavku ihned vložte na led.
3. Na cykleru nastavte následující teplotní profil:
95°C/2 min; 30x (95°C/20 s, 64°C/30s, 68°C/50s); 68°C/7 min.; 4°C/∞
4. Počkejte, až se cykler nahřeje na 95°C, pak vložte zkumavku s připravenou reakční směsí a nechte proběhnout amplifikaci. Trvá přibližně 1,5 hodiny.
5. Výsledek reakce ověřte elektroforeticky (viz následující protokol).

Protokol č. 2b – Ověření výsledku PCR reakce pomocí gelové agaróзовé elektroforézy

Potřebné vybavení a reagensie:

- hotová PCR reakce
- hmotnostní standard M50 – 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp
- agaróza
- 1x TBE pufr
- 100 ml erlenka
- ethidium bromid, EtBr (0,5 mg/ml)
- sada pipet + špičky
- vanička na gel + hřebínek (nejlépe na 14 jamek)
- nanášecí pufr: 40% sacharóza, 0,25% bromfenolová modř
- elektroforetická vana s anodou, katodou a pufrem + externí zdroj stejnosměrného napětí
- ochranné (latexové) rukavice

Postup

8. Připravíme **3% agaróзовý gel** (= 3g agarózy na 100 ml pufru): Do 30 ml elektroforetického pufru přidáme 0,9 g agarózy, promícháme a vaříme tak dlouho, až se prášek rozpustí a roztok bude homogenní.
9. Necháme gel ochladit na 50-60 °C, pipetou přidáme **6 µl EtBr**, zamícháme a nalijeme do misky, umístíme hřebínek.
V tomto kroku použijeme ochranné rukavice!
10. Necháme gel ztuhnout.
11. Ponoříme misku s gelem do elfo vany s pufrem a opatrně vytáhneme hřebínek. Pufr musí být těsně nad povrchem gelu.
V tomto kroku opět použijeme ochranné rukavice!
12. Do vzniklých jamek postupně nanese pipetou **5 µl markeru M50** a **5 µl z každé PCR reakce** smíchané s **1 µl nanášecího pufru**.
13. K elfo vaně připojíme zdroj stejnosměrného napětí tak, aby DNA putovala k anodě (+ pól). Optimální velikost napětí je 5V/cm (měřeno vzdáleností mezi elektrodami), doba separace podle potřeby.
14. Vypneme a odpojíme zdroj od elfo vany, v ochranných rukavicích vyjmeme gel a umístíme na transiluminátor (zdroj UV světla, pozor na expozici - používat ochranné brýle). Kvalitní PCR produkt by měl být na gelu vidět jako jediný ostrý proužek.

3. SEKVENOVÁNÍ PCR PRODUKTU

V naší laboratoři provádíme klasické sekvenování **Sangerovou metodou** (známou také jako **terminační** nebo **dideoxynukleotidovou**). Tato metoda je založena, stejně jako PCR reakce, na syntéze nových řetězců pomocí DNA polymerázy během cyklického střídání tří teplotně odlišných kroků (denaturace, annealing a elongace). Na rozdíl od PCR reakce má ale sekvenační reakce dvě základní odlišnosti:

1. při amplifikaci se používá pouze jeden primer (vymezuje počátek amplifikace), množí se tedy pouze jedno ze dvou vláken templátové DNA (PCR fragmentu),
2. kromě klasických nukleotidů (dNTP) se při syntéze nových řetězců pomocí DNA polymerázy používají ještě tzv. **dideoxynukleotidy**, ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP), kterým chybí OH skupina na deoxyribóze, nutná pro navázání dalšího nukleotidu. Jestliže je tedy při syntéze nových řetězců do nově vznikajícího řetězce začleněn DNA polymerázou dideoxynukleotid, syntéza řetězce končí (proto se dideoxynukleotidy označují také jako **terminátory**, ukončují proces syntézy). Začlenění dideoxynukleotidu do syntetizovaného řetězce probíhá zcela náhodně.

Výsledkem amplifikace během sekvenační reakce je pak směs různých dlouhých fragmentů začínajících vždy primerem a končících příslušným dideoxynukleotidem (terminátorem). Tyto fragmenty pak analyzujeme pomocí kapilární elektroforézy v genetickém analyzátoru (sekvenátoru), kdy jsou seřazeny podle velikosti (jednotlivě po sobě jdoucí fragmenty se budou vždy velikostně lišit o jeden nukleotid). Následným odečtením terminátorů na koncích fragmentů je pak pomocí počítače sestavena sekvence templátové DNA. Pro rozlišení jednotlivých typů terminátorů se používají čtyři různé fluorescenční barvy – zelená pro ddATP, modrá pro ddCTP, žlutá pro ddGTP a červená pro ddTTP, detekované pomocí laseru.

Příprava PCR fragmentů pro sekvenování probíhá v několika krocích:

- Nejprve je nutné purifikovat výslednou PCR reakci, tj. získat pouze namnožené PCR fragmenty a zbavit se všech ostatních nepotřebných složek hotové PCR reakce (polymeráza, nespotebované nukleotidy, primery a soli), které by mohly inhibovat následnou sekvenační reakci. Jednou z možností purifikace je např. použití rychlé a jednoduché

metody purifikace hotové PCR reakce kolonkovou metodou (protokol č. 3a).

- Pro přípravu sekvenační reakce je nutné určit koncentraci purifikovaných PCR fragmentů, např. pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (protokol č. 3b).
- Následně je připravena sekvenační reakce obsahující vše potřebné pro amplifikaci PCR fragmentů – templátová DNA (purifikovaný PCR fragment o známé koncentraci), DNA polymeráza, směs dNTP, směs fluorescenčně značených ddNTP a sekvenační primer. Směs dNTP, ddNTP a polymerázy je možné koupit už hotovou, ve formě různých komerčních, tzv. sekvenačních kitů, které by měly zaručovat optimální poměr všech těchto složek. K této směsi už pak přidáváme pouze DNA a sekvenační primer. Množství DNA použité do sekvenační reakce závisí na velikosti sekvenovaného PCR fragmentu a je obvykle dáno výrobcem sekvenačního kitu. Amplifikace pak probíhá v termálním cyklu za univerzálních teplotních podmínek (protokol č. 3c).
- Po skončení amplifikace je nutné hotovou sekvenační směs opět purifikovat, zbavit ji volných, nespotřebovaných značených terminátorů, které jinak při následné elektroforetické separaci fragmentů tvoří shluky a znehodnocují výslednou sekvenci. K purifikaci je opět možno použít různé metody (kolonková metoda, precipitace ethanolem, atd.), zde je uvedena metoda rychlé a jednoduché purifikace pomocí komerčního kitu určeného přímo pro sekvenační kit a sekvenátor používaný v naší laboratoři (protokol č. 3d).
- Purifikovaná sekvenační směs je pak připravena pro kapilární elektroforézu v sekvenátoru (protokol č. 3e).

Protokol č. 3a - Purifikace PCR pomocí MinElute PCR Purification Kitu (Qiagen)

Potřebné vybavení a reagenty:

- hotová PCR reakce
- MinElute PCR Purification Kit:
 - 1 MinElute kolona a 2 ml zkumavka / 1 vzorek
 - PBI, PE a EB pufr

- 1 x 1,5 ml zkumavka/1 vzorek
- stojan na 1,5 ml zkumavky
- sada pipet + špičky
- centrifuga

Před začátkem:

- umístit MinElute kolonu do 2 ml zkumavky a spolu s 1,5 ml zkumavkou (s ušříženým víčkem) nachystat do vhodného stojánku

Postup:

1. **K 1 množství PCR reakce přidejte 5 množství PB pufru**, vortexujte.
Např. 20 µl PCR reakce + 100 µl PBI pufru
 Naneste směs do MinElute kolony umístěné v 2 ml zkumavce, centrifugujte **1 min/13000 rpm**.
V tomto kroku dojde k navázání DNA na membránu kolony.
4. Vylijte odpad ze zkumavky a vraťte do ní zpět kolonu.
5. Přidejte do kolony **750 µl PE pufru** a centrifugujte **1 min/13000 rpm**.
PE pufr slouží k promývání navázané DNA.
 Vylijte odpad ze zkumavky, vraťte do ní kolonu a dodatečně centrifugujte **1 min/13000 rpm**.
DŮLEŽITÉ: Tento krok odstraní poslední zbytky ethanolu.
8. Zkumavku s odpadem vyhoďte, kolonu umístěte do čisté 1,5 ml zkumavky.
9. Přidejte **10 µl EB pufru**, nechte **stát 10 minut** a pak centrifugujte **1 min/13000 rpm**.
 V tomto kroku dojde k uvolnění čisté DNA z membrány kolony.
DŮLEŽITÉ: Eluční pufr nanášejte doprostřed membrány kolony, aby se kompletně eluovala DNA.
Nedotýkejte se špičkou membrány kolony.

Protokol č. 3b - Měření koncentrace PCR produktu pomocí spektrofotometru NanoDrop

Potřebné vybavení a reagensie:

- purifikovaný PCR produkt
- eluční pufr z použitého purifikačního kitu (EB pufr)
- pipeta + špičky
- tampony buničité vaty
- přístroj NanoDrop 2000

Postup

1. Zapněte přístroj do elektrické sítě a připojte k počítači.
 2. Zapněte počítač.
 3. Nechte přístroj asi 15 min zahřívat.
 4. Klikněte na ploše na ikonu „**NanoDrop2000**“.
 5. V pravé části obrazovky klikněte na „**Nucleic Acid**“.
 6. Potvrďte okno pro „**Wavelength verification**“, přístroj provede krátký ověřovací proces.
 7. V horní liště zvolte „**File**“ a „**New Workbook**“, v nově otevřeném okně zadejte umístění a název souboru s vašimi výsledky.
 8. Proved'te stanovení nulové hodnoty **BLANK**:
 - a. napipetujte 2 μ l elučního pufru EB na spodní rameno, přiklopte horní rameno
 - b. klikněte na ikonku „**blank**“ v horní liště vlevo, přístroj provede kalibraci
 - c. po skončení měření otřete obě ramena kouskem čisté buničité vaty
 9. Proved'te měření koncentrace vašeho PCR produktu:
 - a. v pravém horním rohu napište do kolonky „**Sample ID**“ název vašeho vzorku
 - b. v další kolonce nastavte „**DNA – 50,00**“ pro měření koncentrace dsDNA
 - c. na spodní rameno napipetujte 2 μ l PCR směsi, přiklopte horní rameno, klikněte na ikonku „**Measure**“, počkejte, až přístroj provede měření
 - d. zkontrolujte výsledek v pravé horní části obrazovky:
 10. Očistěte obě ramena přístroje kouskem čisté buničité vaty.
 11. Proved'te měření koncentrace dalšího vzorku.
- Všechny výsledky si lze prohlédnout přes „**Report**“ v levé části okna.

Protokol č. 3c - Příprava sekvenační reakce

Potřebné vybavení a reagentie:

- PCR produkt o známé koncentraci (v ng/ μ l)
- sekvenační primer MF6 2A (10 pmol/ μ l)
- H₂O
- BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1
 - 2,5 x Ready Reaction Mix (reakční mix)
 - 5 x Sequencing Buffer (sekvenační pufr)
- sada pipet + špičky
- 1 x 0,2 ml PCR zkumavka / 1 vzorek
- termální cykler

Postup:

1. Určete množství PCR produktu (v μ l) potřebného pro 20 μ l sekvenační reakce.

Postup: Nejprve je nutné zjistit potřebné množství v ng (dle následující tabulky), které se pak přepočítá na μ l. Pro výpočet je nezbytné znát koncentraci PCR produktu (viz předchozí protokol).

Příklad: Pro PCR fragment o velikosti 379 bp je potřeba do sekvenační reakce 6 ng templátu. Je-li koncentrace daného PCR produktu, např. 19,1 ng/ μ l, odpovídá pak 6 ng množství 0,31 μ l toho PCR produktu.

Tabulka udávající množství PCR produktu (v ng) dané velikosti potřebné pro 20 μ l sekvenační reakční směsi:

velikost fragm. (v bp)	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550
množství DNA (v ng)	1	2	3	3,75	4,5	5,25	6	6,75	7,5	8,25

2. Do 0,2 ml PCR zkumavky napipetujte všechny složky sekvenační

velikost fragm. (v bp)	600	650	700	750	800	850	900	950	1000
množství DNA (v ng)	9	9,75	10,5	11,25	12	12,75	13,5	14,25	15

reakční směsi v následujícím pořadí a množství:

H ₂ O	do 20 μ l – <i>nutné dopočítat podle množství PCR produktu</i>
sekvenační pufr	3 μ l
PCR produkt	množství vypočítané v kroku 1
primer MF6 2A	0,32 μl
reakční mix	2 μ l
<hr/>	
celkové množství	20 μl

- 3. Reakční směs dobře promíchejte.**
- 4. Na cykleru nastavte následující teplotní profil:** 96°C/1min, 25x (96°C/10 s, 50°C/ 5s, 60°C/ 4min); 4°C/ ∞
- 5. Počkejte, až se cykler nahřeje na 96°C, pak vložte zkumavku s připravenou reakční směsí a nechte proběhnout amplifikaci.** Trvá přibližně 2,5 hodiny.

Protokol č. 3d - Purifikace sekvenační směsi pomocí

BigDye® XTerminator™ Purification Kitu

Potřebné vybavení a reagentie:

- hotová sekvenační reakce v 0,2 ml PCR zkumavce
- BigDye XTerminator Purification Kit – SAM Solution
- XTerminator Solution
- pipety + špičky
- vortex se speciálním nástavcem pro 0,2 ml zkumavky
- plato do sekvenátoru

Postup:

1. Centrifugujte hotovou reakční směs v 0,2 ml PCR zkumavce **1 min/13 000 rpm.**
2. Do zkumavky s reakční směsí přidejte **90 μ l SAM Solution.**
3. Vortexujte XTerminator Solution alespoň 10s při max. otáčkách.
4. Do zkumavky s reakční směsí přidejte **20 μ l XTerminator Solution.** POZOR: Neodebírat shora!!!
5. Vortexujte směs **30 min/2000 rpm** (~ 33,5 Hz).
6. Centrifugujte směs **2 min/3200 rpm.**

7. Opatrně přepipetujte supernatant na plato, vložte do sekvenátoru a analyzujte.

Protokol č. 3e – Analýza vzorku na automatickém sekvenátoru

Potřebné vybavení a reagensie:

- ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer:
 - kapilára - 50 cm
 - polymer - POP6

Postup:

1. **V Run 3100-Avant Data Collection Softwaru vyplňte Sample Sheet:**
 - Sample Name:* název vzorku (gen[číslo vzorku]_primer)
 - Result Group:* Sequencing
 - Instrument Protocol:* SeqPOP6BDTv3do500bp – doba analýzy 1,5 hod
 - Analysis Protocol:* BDTv3-1
2. **Vložte plato se vzorky do sekvenátoru a spusťte run.**
3. **Po skončení analýzy vyhodnoťte výsledky pomocí jednoho z následujících programů:**
 - Sequencing Analysis Software v5.1 – součást softwarového vybavení sekvenátoru; analýza jednotlivých vzorků
 - Sequence Scanner v1.0 – volně dostupný program; analýza jednotlivých vzorků
(<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583>)
 - SeqScape Software v2.1 – součást softwarového vybavení sekvenátoru; srovnání více vzorků mezi sebou



AKTUÁLNÍ VZDĚLÁVACÍ PROJEKTY

Jaroslav Doubek

Ústav fyziologie VFU Brno aktuálně nabízí využití výstupu a/nebo přímou účast na vzdělávacích projektech:



- ❖ **Kreativní přístupy ve výuce fyziologie - integrované (motivační) vzdělávací moduly**
CZ.1.07/2.2.00/15.0252, <http://kreativnifyziologie.upol.cz>
- ❖ **Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe**
CZ.1.07/2.3.00/09.0219, <http://cit.vfu.cz/fyziolmed>
- ❖ **Internacionalizace výuky veterinární medicíny jako cesta na evropský trh práce**
Modul II: Integrace preklinického a klinického vzdělávání
CZ.1.07/2.2.00/28.0288, webové stránky projektu v přípravě
- ❖ **Mendelianum – atraktivní svět genetiky**
CZ.1.05/3.2.00/09.0180, www.mendelianum.cz



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



Kreativní přístupy ve výuce fyziologie – integrované vzdělávací moduly



CZ.1.07/2.2.00/15.0252



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Projekt realizuje



Univerzita Palackého
v Olomouci



- Univerzita Palackého v Olomouci
- Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.
- partner projektu
- Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
- partner projektu



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Projekt OPVK



Číslo operačního programu: CZ.1.07
Název operačního programu: OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
Číslo prioritní osy: 7.2
Název prioritní osy: Terciární vzdělávání, výzkum a vývoj
Číslo oblasti podpory: 7.2.2
Název oblasti podpory: Vysokoškolské vzdělávání
Číslo výzvy: 15
Název výzvy: Žádost o finanční podporu z OP VK - IP - oblast podpory 2.2

Celková výše finanční podpory	11.657.320,33 Kč
Částka ESF	9.908.722,28Kč
Datum zahájení realizace projektu	1. 3. 2011
Datum ukončení realizace projektu	31. 5. 2014



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Aktivita 01 – Tvorba výukových materiálů



Výstup aktivity

- Obohacení fakultních knihoven o nejnovější odbornou literaturu v oblastech obecné, rostlinné, živočišné i humánní fyziologie
- Vytvoření obrazových podkladů pro multimediální prezentace
- Získání příspěvků externích spolupracovníků
- Vytvoření obsahové a grafické struktury jednotlivých vzdělávacích modulů
- Pracovní verze multimediálních prezentací interaktivně propojených s dalšími vzdělávacími moduly
- Pracovní verze textových výukových materiálů
- Strukturovaná obrazová databáze
- Soubor testových otázek a procvičovacích
- Soubor interaktivních návodů do praktických cvičení



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Aktivita 02 – Odborné konzultace a konfrontace výstupů projektu v rámci ČR



Výstup aktivity

- Publikace ve sbornících tuzemských konferencí
- Korektury, doporučení a kritiky pracovních verzí projektových materiálů českými odborníky z oblasti fyziologie a didaktiky
- Návrhy pro finální úpravy projektových vzdělávacích materiálů



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Aktivita 03 – Získání podkladů, odborné konzultace a konfrontace výstupů projektu v zahraničí



Výstup aktivity

- Anglické verze ukázkových multimediálních materiálů
- Získání AV materiálů ze zahraničních univerzit a odborných pracovišť pro výukové programy a "virtuální procházky"
- Prezentace projektových materiálů v zahraničí
- Korektury, doporučení a kritiky pracovních verzí projektových materiálů zahraničními odborníky



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Aktivita 04 – Pilotní projekt -

testování vytvořených vzdělávacích materiálů ve výuce UP a VFU a jejich evaluace

Výstup aktivity

- Hodnocení studentů jednotlivých vzdělávacích materiálů, vytvořených projektovým týmem
- Statistické zpracování hodnotících dotazníků
- Další připomínky, názory a náměty studentů k jednotlivým výukovým modulům
- Finalizace - konečné úpravy výukových modulů na základě výsledků pilotních testů.
- Publikování komplexní studie o efektivitě výuky pomocí multimediálních materiálů
- Hodnotící dotazníky pro pilotní projekt (pro studentské hodnocení jednotlivých výukových modulů formou dotazníků).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita Palackého
v Olomouci

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Aktivita 05 – Finální úpravy projektových materiálů,

jejich vydání v tištěné a v multimediální podobě na webu, CD resp. DVD



Multimediální materiály na CD resp. DVD nosičích:

- DVD Obecná fyziologie - soubor interaktivně provázaných multimediálních ppt (texty, praktická cvičení, obrazová databáze, testové otázky, procvičovací schémata a modul "Virtuální procházky")
- DVD Fyziologie rostlin - soubor interaktivně provázaných multimediálních ppt
- DVD Fyziologie živočichů - soubor interaktivně provázaných multimediálních ppt
- DVD Fyziologie člověka - soubor interaktivně provázaných multimediálních ppt
- DVD "Virtuální procházky odbornými pracovišti", představující aplikace teoretických fyziologických poznatků do praxe
- Terminologický slovník: Výkladový slovník odborné biologické terminologie v českém a anglickém jazyce
- Obrazová databáze strukturovaná do 4 celků (obecná fyziologie, fyziologie rostlin, živočichů a člověka)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita Palackého
v Olomouci

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Tištěné materiály :



- Fyziologie rostlin - tištěné textové materiály pro teoretickou výuku
- Fyziologie živočichů - tištěné textové materiály pro teoretickou výuku
- Fyziologie člověka - tištěné textové materiály pro teoretickou výuku
- Návod pro praktická cvičení I: Fyziologie rostlin
- Návod pro praktická cvičení II: Fyziologie živočichů a člověka
- Soubor testových otázek a procvičovacích schémat I: Fyziologie rostlin
- Soubor testových otázek a procvičovacích schémat II: Fyziologie živočichů a člověka
- Terminologický slovník: Výkladový slovník odborné biologické terminologie v českém a anglickém jazyce
- Diplomové a disertační práce (5-8 kusů)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



UNIVERSITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



CZ.1.07/2.2.00/15.0252

Realizací projektu vznikají interaktivní studijní materiály fyziologie rostlin, živočichů, člověka a obecné fyziologie. Vizualizace provázaných fyziologických procesů při využití nových technologických přístupů je vytvořena s cílem zajištění snadné a efektivní výuky vysokoškolských studentů a poskytnutí srozumitelného přiblížení stanovených témat laické veřejnosti.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

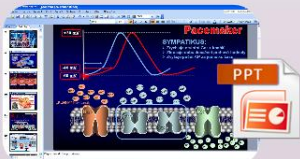


UNIVERSITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Vzdělávací materiály ve čtyřech základních sekcích (obecná, humánní, živočišná a rostlinná fyziologie) budou k dispozici v sedmi vzájemně provázaných MODULECH:



PREZENTACE



PRAKTICKÁ CVIČENÍ



VÝKLADOVÝ SLOVNÍK



OBRAZOVÁ DATABÁZE



VÝUKOVÝ TEXT



TESTOVÉ OTÁZKY



VIRTUÁLNÍ PROCHÁZKY

KREATIVNÍ FYZIOLOGIE

HUMÁNNÍ FYZIOLOGIE

Vzdělávací materiály z oblasti humánní fyziologie. Děkujeme, že jste se rozhodli pro tuto formu prezentace učiva. Materiály k dispozici jsou také ve formě otázek, pracovních listů, nových a praktických cvičení a obrázků. Další informace najdete na stránce: www.kreativnifyziologie.upol.cz

PROJEKTOVÉ MENU

- O projektu
- Realizátor
- Realizátor 2
- Realizátor 3
- Realizátor 4
- Realizátor 5
- Realizátor 6
- Realizátor 7
- Realizátor 8
- Realizátor 9
- Realizátor 10
- Realizátor 11
- Realizátor 12
- Realizátor 13
- Realizátor 14
- Realizátor 15
- Realizátor 16
- Realizátor 17
- Realizátor 18
- Realizátor 19
- Realizátor 20
- Realizátor 21
- Realizátor 22
- Realizátor 23
- Realizátor 24
- Realizátor 25
- Realizátor 26
- Realizátor 27
- Realizátor 28
- Realizátor 29
- Realizátor 30
- Realizátor 31
- Realizátor 32
- Realizátor 33
- Realizátor 34
- Realizátor 35
- Realizátor 36
- Realizátor 37
- Realizátor 38
- Realizátor 39
- Realizátor 40
- Realizátor 41
- Realizátor 42
- Realizátor 43
- Realizátor 44
- Realizátor 45
- Realizátor 46
- Realizátor 47
- Realizátor 48
- Realizátor 49
- Realizátor 50
- Realizátor 51
- Realizátor 52
- Realizátor 53
- Realizátor 54
- Realizátor 55
- Realizátor 56
- Realizátor 57
- Realizátor 58
- Realizátor 59
- Realizátor 60
- Realizátor 61
- Realizátor 62
- Realizátor 63
- Realizátor 64
- Realizátor 65
- Realizátor 66
- Realizátor 67
- Realizátor 68
- Realizátor 69
- Realizátor 70
- Realizátor 71
- Realizátor 72
- Realizátor 73
- Realizátor 74
- Realizátor 75
- Realizátor 76
- Realizátor 77
- Realizátor 78
- Realizátor 79
- Realizátor 80
- Realizátor 81
- Realizátor 82
- Realizátor 83
- Realizátor 84
- Realizátor 85
- Realizátor 86
- Realizátor 87
- Realizátor 88
- Realizátor 89
- Realizátor 90
- Realizátor 91
- Realizátor 92
- Realizátor 93
- Realizátor 94
- Realizátor 95
- Realizátor 96
- Realizátor 97
- Realizátor 98
- Realizátor 99
- Realizátor 100

Publikační úroveň: Cest

<http://kreativnifyziologie.upol.cz/>

Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe

Projekt „Od fyziologie k medicíně“ je podporován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky, aktuálně probíhá jeho fáze udržitelnosti. Vlastní projekt byl otevřen prioritně pro studenty vysokých škol, ale také pro akademické pracovníky VŠ, studenty a pedagogy středních škol, zejména pro ty, kteří prokazují zájem o vědu a výzkum např. formou Středoškolské odborné činnosti. Počet aktivních účastníků byl limitován, a to zejména z důvodu individuálního přístupu, hands-on experience a tím vysoké efektivity vzdělávání. Veškeré aktivity probíhají v neformální atmosféře umožňující bohatou diskusi a integraci začínajících a zkušených pracovníků vědy a výzkumu, pedagogů a studentů s motivačním prvkem pro potenciální zájemce o tuto oblast z řad středoškolské mládeže.

Konkrétním přínosem pro přímé účastníky projektu je získání odbornosti v oblasti nejnovějších poznatků z oboru fyziologie a jejich praktického uplatnění zejména v medicíně. Další přínos pak představuje získání nadstandardního vzdělávání a zkušeností v oblasti dynamické orientace v aktuálních poznatcích z oboru fyziologie, jejich efektivního zpracování a využití. Projekt tak přispívá k usnadnění integrace začínajících pracovníků vědy a výzkumu na mezinárodní úrovni cestou získání přehledu o kvalitních odborných prezentacích vlastních výsledků, ale také o možnostech získání finanční podpory na odborné výzkumné pobyty a prezentace výsledků v rámci konferencí.

Projektové materiály byly přehledně zpracovány a vydány pod
ISBN 978-80-7305-623-0



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Od fyziologie k medicíně



**Integrace vědy, výzkumu,
odborného vzdělávání a praxe**



E. Matalová, J. Doubek, I. Fellnerová

Projekt „Od fyziologie k medicíně“ CZ.1.07/2.3.00/09.0219 je spolufinancován
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Pro širší cílovou skupinu jsou materiály k dispozici na webových stránkách projektu

<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ
INTEGRACE VĚDY, VÝZKUMU, ODBORNÉHO VZDĚLÁVÁNÍ A PRAXE



O projektu | Projektové materiály | Propagace | Kontakty | Proběhlé akce

Akce-Brno

Aktivní účastníci projektu
Úspěšní absolventi
Věda na úrovni Nobelových cen
Aktuální výzkum kmenových buněk
Prezentace vlastního výzkumu a výzkum funkčních plánů or.
Mezinárodní možnosti
Fyziologie-patofyziologie-diagnostika
Fyziologie-patofyziologie-humánní medicína
Fyziologie-patofyziologie-veterinární medicína
Mendel Forum 2011
Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí

Akce-Olomouc

Registrace pro Olomouc 2011
Mendel Forum 2010
Kmenové buňky-využití ve výzkumné a klinické praxi
Urgentní medicína-záchrana lidského života, resuscitace
Imunologie a imunomodulační terapie
Mezinárodní možnosti II
Laboratorní hematologie
Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika
Kardiologie 3. tisíciletí
Konference Od fyziologie k medicíně

Indukované pluripotentní buňky – naděje pro regenerativní medicínu?

Tomáš Bárta

V roce 2012 byla udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu dvěma vědcům. John B. Gurdon a Shinya Yamanaka ji získali za objev „přeprogramování“ somatické, terminálně diferencované buňky v buňku pluripotentní, která je schopna diferencovat se do všech buněčných typů.



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012
Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

Nobel Prize Award Ceremony

Sir John B. Gurdon

Shinya Yamanaka



Photo: U. Montan

Photo: U. Montan

Sir John B. Gurdon

Shinya Yamanaka

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 was awarded jointly to Sir John B. Gurdon and Shinya Yamanaka "for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"

<http://www.nobelprize.org>

Přednáška v rámci Mendel Forum je zaměřena na objasnění a diskusi, jak takové přeprogramování do pluripotentního stavu probíhá, co se v buňce během této procedury děje, a také na otázku, proč zatím nejsou indukované pluripotentní buňky široce používány v regenerativní medicíně.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Od fyziologie k medicíně

**Aktuální výzkum
kmenových buněk:
ze zkumavky
k terapeutickému
využití**

Tomaš Barta, Daša Doležalová, Aleš Hampl,
Žuzana Holubcová, Josef Jaroš, Vladimír Vínarský

Projekt „Od fyziologie k medicíně“ CZ.1.07/2.3.00/09.0219 je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Kmenové buňky: co jsou, kde jsou a na co jsou.

Dospělé mnohobuněčné organismy, včetně člověka, jsou tvořeny stovkami typů buněk specializovaných pro různé funkce. Fotoreceptory sítnice zachycují světelný signál a předávají jej k dalšímu zpracování buňkám mozku, buňky srdečního svalu se smršťují a uvolňují a zajišťují tak nasávací a vypuzovací funkci tohoto orgánu, spermie spolu s vajíčky umožňují vznik nových jedinců procesem oplození a podobně. Toto jsou jen čtyři příklady z nepřeberného množství buněčných typů fungujících v lidském těle; již z nich je však dobře zřejmé, že buňky specializované pro různé funkce se mezi sebou velmi zásadně liší. Tato strukturální a funkční různorodost mezi buňkami evokuje velmi závažnou otázku – kdy a jakými procesy vlastně vzniká. Jisté je, že na začátku vývoje organismu, v zárodku v jeho časném vývojovém stádiu, tato buněčná různorodost neexistuje. Naopak, iniciační vývojová stádia organismu jsou typická přítomností buněk, které jsou v zásadě všechny stejné. Jinými slovy, buňky časného zárodku jsou schopné dát postupným vývojem, procesem rozrůžňování či diferenciací, vznik jakémukoli specializovanému buněčnému typu dospělého organismu - tyto buňky embrya jsou takzvaně totipotentní či alespoň **pluripotentní**.

Nejen buňky časného embrya však mohou být pluripotentní. V roce 1954 byl v USA vytvořen kmen myši nazvaný 129, jehož samci trpěli ve vysoké frekvenci výskytem nádorů varlat, takzvaných teratokarcinomů. Teratokarcinomy jsou nádory, které jsou tvořeny mnoha různými buněčnými typy. Zajímavé je, že mezi těmito buňkami nádoru byly nalezeny také „naivní“ nediferencované buňky, které měly schopnost diferencovat se do různých specializovaných buněčných typů, podobně jako buňky časného zárodku – byly tedy také pluripotentní. Tato vlastnost je nejlépe experimentálně dokumentována jejich schopností účastnit se normálního vývoje myši po jejich vpravení (injikování) do časného myšího zárodku. Takto vzniklý jedinec je potom chimérou.

Na pluripotentních buňkách teratokarcinomů je však kromě samotné pluripotence zajímavá ještě jedna vlastnost, která byla odhalena

jejich dlouhodobou kultivací v podmínkách *in vitro* (v Petriho misce). Touto vlastností je schopnost udržovat si pluripotenci v podstatě neomezeně dlouho. Jinými slovy, opakovaným dělením buňky svoji pluripotenci neztrácí. Tato skutečnost je definována jako **schopnost sebeobnovy** – kdy každým dělením vzniknou dvě identické pluripotentní buňky.

Buňky teratokarcinomů jsou pluripotentní a sebeobnovující se, avšak jsou stále buňkami nádorovými, které nesou nějakou genetickou poruchu. Zásadní krok od nádorových pluripotentních buněk k pluripotentním buňkám zcela normálním učinili až Gail Martinová s Martinem Evansem, kterým se v roce 1981 podařilo přimět buňky zdravého časného myšního embrya ve stádiu blastocysty žít a dělit se v podmínkách *in vitro*. Takto získané buňky (buněčné linie) byly pro svůj původ v myším embryu (v jeho části zvané embryoblast, ze které se vyvine celý jedinec kromě plodových obalů) a pro svoji schopnost sebeobnovy a pluripotenci nazvány **myší embryonální kmenové (EK) buňky**. Nutno zdůraznit, že embryonální KB nejsou již „skutečnými“ buňkami embrya, jsou sice buňkami derivovanými z embryoblastu myšního embrya, ale jsou současně produktem kultivace *in vitro*, jejíž unikátní podmínky zajišťují jejich pluripotenci a sebeobnovu. Tyto podmínky sestávají zejména z vrstvy podpůrných buněk (myších embryonálních fibroblastů) a růstového faktoru označovaného jako LIF (leukemický inhibiční faktor).

Myší EK buňky se díky svým vlastnostem, časově zcela neomezené propagovatelnosti v podmínkách *in vitro* a schopnosti diferencovat se jak *in vivo* tak také *in vitro* do různých buněčných typů dospělého organismu, staly nenahraditelným modelovým systémem pro studium plejády aspektů normálního vývoje mnohobuněčného organismu. Tento význam si dochovaly dodnes. Existence myších EK buněk v kombinaci s možností jejich genetické modifikace a schopnosti přispívat ke vzniku chimér umožnila tvorbu geneticky modifikovaných myší. Tyto jsou dodnes jedním ze základních a nenahraditelných nástrojů ke studiu funkce savčích genů. Za vývoj technologie přípravy geneticky modifikovaných myší pomocí myších

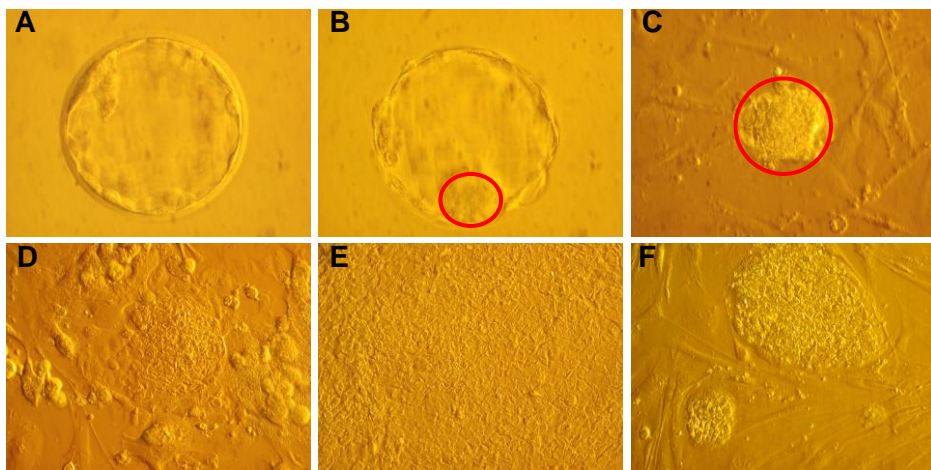
EK buněk a metody takzvané homologní rekombinace obdrželi v roce 2007 badatelé Martin Evans, Mario Capecchi a Oliver Smithies Nobelovu cenu za fyziologii/medicínu.

EK buňky ustavené z myši byly, přes rozsáhlé pokusy s mnoha jinými živočišnými druhy, po dlouhou dobu jedinými EK buňkami, které se podařilo ustavit. V roce 1998 však přišel zcela zásadní průlom díky týmu badatelů, vedenému američanem Dr. Jamesem Thompsonem. Ten, ve spolupráci s kolegy z Izraele dokázal poprvé v dějinách biologické vědy ustavit linie EK buněk ze zárodků (blastocyst) člověka. Stojí za uvedení, že postup ustavení linie lidských EK buněk je principiálně shodný s postupem vyvinutým v roce 1981 pro ustavení linií EK buněk z embrya myši. Jediným skutečně zásadním rozdílem je růstový faktor, který lidské EK buňky v kultuře vyžadují. Tím je bazický fibroblastový růstový faktor (FGF2) namísto LIF, který, jak je uvedeno výše, vyžadují EK buňky myši.

Skutečnost, že svět získal první **linie lidských EK buněk** rozpoutala nezměrný zájem o studium tohoto buněčného typu. Důvodem byly samozřejmě znalosti o diferenciačním potenciálu KB buněk, získané léty práce s myšimi EK buňkami, slibující zejména užití lidských EK buněk v klinické medicíně v podobě různých druhů buněčné terapie. Mnoho laboratoří ve vyspělých zemích světa proto okamžitě napřelo své síly na získání nových linií lidských EK buněk a pustilo se s obrovským úsilím do studia jejich biologických vlastností. Stojí za zmínku, že ani Česká republika nezůstala v tomto biomedicínském tažení opodál a díky práci badatelů Hampla a Dvořáka získala první linie lidských EK buněk na jaře roku 2003.

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts

James A. Thomson,* Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro,
Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall,
Jeffrey M. Jones



Jednotlivé kroky ustavení linie lidských EK buněk. A) Lidská blastocysta se zona pellucida. B) Lidská blastocysta po odstranění zona pellucida. Embryoblast označen červeně. C) Embryoblast (červeně) po převedení do kultury na vrstvu podpůrných fibroblastů. D) Rozrůstající se buňky embryoblastu. E) Populace lidských EK buněk zabírající celé zorné pole. F) Dvě kolonie lidských EK buněk po pasáži.

Přestože kmenové buňky odvozené z buněk embrya daly hlavní impuls ke studiu kmenových buněk, nejsou jedinými existujícími kmenovými buňkami. Pluripotence, jedna z charakteristik kmenových buněk, je vlastností, kterou musí mít buňky časného embrya, aby mohly dát procesem postupného rozrůžňování (diferenciace) vznik všem specializovaným buněčným typům dospělého organismu. Většina specializovaných buněk dospělého organismu však kontinuálně podléhá postupnému opotřebení či dokonce rychlému zániku v případě zranění a tyto buňky musí mít možnost být nahrazovány. Zdrojem pro náhradu těchto specializovaných buněk jsou sebeobnovující se buňky skryté po celý život ve tkáních a orgánech, takzvané **tkáňové či orgánové kmenové buňky** (anglicky se jim říká adult stem cells, čili dospělé kmenové buňky). Tyto buňky jsou ve tkáních ve velmi malých počtech a většinou jsou „ukryty“ ve speciálních místech, takzvaných nikách, a jejich odhalení není tedy vůbec snadnou záležitostí. Svoje kmenové buňky ukryté v kostní dřeni mají buňky krve, kmenové buňky mají buňky svalů, kmenové buňky mají buňky mozku a tento výčet kmenových buněk dospělého organismu nelze dnes uzavřít. Jedním z relativně dobře popsanych typů orgánových KB jsou například kmenové buňky zajišťující trvalou obnovu epitelu tenkého střeva, které jsou ukryty hluboko v kryptách střevní sliznice.

Čím nám mohou být kmenové buňky prospěšné?

Lidské kmenové buňky (KB) jsou terapeutickým příslibem budoucnosti díky své schopnosti dát vzniknout všem buněčným typům, které nacházíme v lidském organismu. Lze si proto představit situaci, kdy bude pacientům s degenerující, poškozenou či chybějící tkání možné nabídnout uměle vypěstovanou funkční náhradu z KB, či buňky které ji po implantaci znovu vytvoří. Při použití autologních (vlastních) KB pacienta je navíc vyloučeno riziko odvrhnutí štěpu a nutnost potlačení imunitního systému jako v případě dnes používaných allogeních (cizích) transplantátů dárce. Ziskáním

indukovaných KB z pacientů je možné zkoumat i molekulární podstatu vrozených a degenerativních onemocnění.

Možnost terapie za použití KB je v současné době zkoumána na zvířecích modelech, u některých lidských onemocnění a poruch již probíhají klinické testy.

Možnosti terapie kmenovými buňkami

- regenerace tkáně poškozené při zranění nebo nemoci - kmenové buňky hrají roli stimulátoru růstu ostatních buněk
- znovuosídlení poškozené nebo odumřelé tkáně buňkami přímo vzniklými z kmenových buněk
- odstranění zbytkové populace nemocných buněk tkáně pomocí implantace zdravých kmenových buněk

Postup terapie založené na použití kmenových buněk

- získání dostatečného množství kmenových buněk
- zmnožení kmenových buněk v kultuře *in vitro* (v Petriho miskách) a jejich diferenciaci do požadovaného buněčného typu
- implantace správně diferencovaných zdravých buněk

Typy kmenových buněk využitelné v terapii

- tkáňové/orgánové kmenové buňky pacienta, nebo dárce
- embryonální kmenové buňky
- indukované pluripotentní kmenové buňky

Tkáňové KB existují v různých orgánech v tzv. nikách kmenových buněk. Jsou schopny se diferencovat do buněčných typů dané tkáně, ale možnost jejich diferenciaci do všech buněčných typů nebyly jednoznačně prokázány. Po většinu času se nedělí a zůstávají v klidovém stavu. V případě poškození orgánu dojde k aktivaci kmenové buňky okolními buňkami. Kmenová buňka se začne dělit a

produkovat rychle se dělicí progenitory, jejichž dalším dělením na více specializované buňky dojde k opravě poškozené tkáně. Izolace tkáňových KB je omezena z důvodu jejich malého počtu v tkáni. Výjimku tvoří mesenchymální a krvetvorné KB, které je možno izolovat z kostní dřeni nebo periferní krve ve větším množství.

Embryonální KB získané z časných blastocysty jsou dobře dostupné (kolem 400 linií), mohou být v kultuře *in vitro* propagovány a množeny neomezenou dobu, přičemž si stále udržují schopnost diferencovat do všech buněčných typů. Jejich nevýhodou je riziko imunitní reakce způsobené rozdílností genetického vybavení mezi dárcem a příjemcem, genomová nestabilita způsobená dlouhodobou kultivací a eticky kontroverzní původ.

Indukované pluripotentní KB jsou buňky pocházející z diferencovaných buněčných typů, které byly "přeprogramovány" do pluripotentního stavu dočasným zapnutím několika transkripčních faktorů typických pro kmenové buňky. Indukované KB byly vytvořeny např. z dobře dostupných kožních fibroblastů. Vzhledem k tomu, že je v tomto případě léčený pacient zároveň dárcem buněk (autologní transplantace), nehrozí riziko imunitní odpovědi.

Současné terapeutické aplikace kmenových buněk

Tkáňové kmenové buňky

Nejstarší a i v současnosti nejčastější formou izolace tkáňových KB je izolace krvetvorných KB a mesenchymálních KB z kostní dřeni, periferní krve. Pozorování klonogenní kapacity buněk kostní dřeni se datuje do šedesátých let minulého století, transplantace kostní dřeni probíhají již 40 let.

Krvetvorné KB jsou schopny diferencovat se do buněk krevní řady a jejich transplantace je využívána k léčbě vrozených i získaných onemocnění krve. Transplantaci předchází úplné či částečné odstranění původních krvetvorných buněk, aby nedošlo k imunitní reakci.

Mesenchymální KB jsou schopné vytvořit všechny buňky mesenchymální linie jako např. buňky chrupavky, kosti, šlachy, kůže

či tukové tkáně. Mesenchymální kmenové buňky vytvořené z kostní dřevě mohou být po implantaci v příhodném nosiči (např. kolagenová struktura) použity k zacelení zlomenin, jejichž části k sobě nedoléhají. Uplatnění nacházejí i při léčbě nadměrně opotřebované chrupavky. Transplantovaná chrupavka dárce zbavená všech původních buněk je osídlena mesenchymálními kmenovými buňkami pacienta, které se po transplantaci přemění na chondrocyty a propojí transplantát s poškozenou chrupavkou.

Rovněž v případě regenerace srdečního svalu po infarktu myokardu bylo pozorováno výrazné zlepšení po injekci autologních mesenchymálních KB (dobře zpracováno v Strauer a kol., 2008, Cell Proliferation).

Embryonální kmenové buňky

Terapie založené na lidských embryonálních KB nebyly na rozdíl od mesenchymálních kmenových buněk v lidské medicíně dosud terapeuticky použity. Výzkum zaměřený na schopnost embryonálních KB a jejich diferencujících se derivátů obnovit porušené funkce nervové soustavy u zvířecích modelů ukázal překvapivé zjištění. Ačkoliv došlo k vyléčení poranění mozku po implantaci embryonálních KB, jen malá část implantovaných KB se přeměnila na neurony, většinou tvořily podpůrné buňky (astrocyty a gliové buňky). Zda se dají výsledky ze zvířecích modelů přenést i do oblasti humánní medicíny se brzy dozvíme, neboť na počátku roku 2009 schválila FDA firmě Geron spuštění první fáze klinických testů, které využívají lidských embryonálních KB diferencovaných do oligodendrocytů u pacientů s porušenou míchou.

Indukované pluripotentní kmenové buňky

Vzhledem k novosti technologie indukovaných pluripotentních KB (myší indukované KB 2006, lidské indukované KB 2007) je jejich terapeutické využití otázkou budoucnosti. Indukované pluripotentní KB disponují obrovským terapeutickým potenciálem z důvodu možnosti tvorby pluripotentních KB z tkáně pacienta. Další významnou výhodou přístupu indukované pluripotence je eticky

bezproblémová příprava indukovaných pluripotentních KB. Možnost získání indukovaných KB z buněk pacienta s vrozenou vadou a jejich diferenciací do postiženého buněčného typu (např. neuronů u Huntingtonovy chorei) otevírá možnost zkoumání molekulárních jevů v podmínkách *in vitro*, kterých není možno dosáhnout jiným způsobem.

Jak lze embryonální kmenové buňky přimět k vytvoření funkčních buněk našeho těla?

Lidé na celém světě již dlouhá léta přemýšlejí o náhradách poškozené lidské tkáně či dokonce orgánu za tkáň zcela novou, zdravou a zejména funkční. Příslibem pro tyto aplikace byly (a stále ještě jsou) lidské embryonální kmenové buňky (KB). Jejich unikátní biologické vlastnosti a zejména diferenciatní potenciál (schopnost vytvořit jakoukoliv buňku lidského těla) využívají vědci nejen při zkoumání procesů uplatňujících se ve vývoji lidského organismu, ale také pro již zmíněnou možnost užití v tzv. regenerativní medicíně. Prozatím jsou jejich praktické aplikace stále ještě omezené, některé světové laboratoře však již diferencované lidské embryonální KB aplikují nemocným pacientům v prvních klinických studiích.

A jak je vlastně možné přimět nediferencovanou lidskou embryonální KB k tomu, aby vytvořila neuron, který se poškodil v míše pacienta upoutaného na invalidní vozík? Nebo v buňku chrupavky, která se časem opotřebuje v kolenní a způsobuje pacientům bolesti? Odpověď je na první pohled velmi jednoduchá – zjistit, jak vývoj tohoto buněčného typu funguje přirozeně v těle živých organismů (*in vivo*) a napodobit tyto přirozené podmínky ve zkumavce (*in vitro*).

Z vývojové biologie víme, že tvorba nových specializovaných buněk je postupný proces, který vždy zahrnuje několik přechodových (prekurzorových) stadií, kdy je buňka tzv. multipotentní – může kupříkladu vytvořit kteroukoliv buňku nervového systému, ale již nemůže dát vznik buňkám chrupavky nebo jaterním buňkám.

Rovněž víme, že na specifikaci jednotlivých buněčných typů se podílí vždy dva typy molekul:

- 1) „rozpuštěné“, které jsou vylučovány jinými buňkami z okolí (jsou jimi tzv. **růstové faktory** a **morfogeny** (př. fibroblastový růstový faktor FGF, kyselina retinová apod.),
- 2) molekuly „nerozpuštěné“, nacházející se fixně v okolí buňky (těmi jsou **povrchové molekuly sousedících buněk** a také **složky mezibuněčné hmoty**).

Jak ale všechny tyto faktory spolupracují, které konkrétně to jsou a v jakém pořadí na buňky působí, zatím pro většinu diferenciacních procesů zcela objasněno není.

Současné přístupy k diferenciaci lidských embryonálních KB do specializovaných buněčných typů se tedy pokouší kombinovat jednotlivé znalosti o vývoji *in vivo* a uvést je do *in vitro* systému v minimálně dvou krocích:

1. Indukce diferenciaci lidských embryonálních KB do prekurzorů daného buněčného typu ovlivněním růstovými faktory a/nebo povrchem kultivační misky.
2. Indukce diferenciaci prekurzorů do specifického terminálního buněčného stadia opět ovlivněním morfogeny, růstovými faktory a/nebo povrchem kultivačního prostředí.

Jednou z možných aplikací lidských embryonálních KB v regenerativní medicíně je jejich využití při opravě poškození nervového systému člověka. Potenciál léčby v této oblasti je poměrně široký, počínajíc nahrazením odumřelých neuronů při neurodegenerativním onemocnění (například Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba) až po nahrazení poškozených nervů po přerušení míchy (léčba doživotní paralýzy jedince). V této oblasti se již mnoho let experimentuje na laboratorních zvířatech a výsledky ve většině případů prokazují zlepšení stavu postižených zvířat po aplikaci embryonálních KB do místa poškozených neuronů nebo přerušené míchy.

První klinický výzkum na lidech byl započat teprve nedávno v USA. Skupina vědců pod vedením Hanse Kiersteada navrhla postup, jak efektivně diferencovat embryonální kmenové buňky do podpůrných buněk neuronů (glií), které produkují myelin. Myelin je potřebný pro vedení vzruchu podél axonů. Buňky, které o tzv. myelinovou pochvu přišly v důsledku poranění míšních nervů, již vzruchy nemohou vést a živočich tak zůstane paralyzován. Pokud jsou gliové buňky (diferencované z myších embryonálních KB) podány myším do 10 dnů po poranění míšních nervů, vedení vzruchu se za čas obnoví a myši se tak mohou opět pohybovat.

Biotechnologická firma Geron (USA; www.wsj.com) se rozhodla tento postup aplikovat na lidský organizmus a v listopadu loňského roku (2009) jí bylo umožněno výzkum započít. Výsledky prozatím nejsou k dispozici, zůstává proto věřit, že léčba bude úspěšná.

Postupy, jakými je možno lidské embryonální KB diferencovat do neurálních prekursorů a dále do terminálně diferencovaných stádií jsou v různých laboratořích různé (a také více či méně úspěšné). Hlavním problémem však zůstává „čistota“ výsledné populace neuronů nebo glií. Pro případné klinické aplikace je nezbytné, aby výsledná populace buněk byla 100% homogenní (obsahovala jenom ten buněčný typ, který bude člověku injikován do těla). Jakákoliv nediferencovaná embryonální kmenová buňka by totiž mohla způsobit v lidském těle tvorbu nádoru.

Limitace využití lidských embryonálních KB v buněčné terapii

Potencionální využití lidských embryonálních KB v buněčné terapii je limitováno řadou faktorů. 1) lidské embryonální KB jsou kultivovány *in vitro* při nevhodných podmínkách; 2) během kultivace *in vitro* akumulují změny ve svém genomu; 3) při transplantaci hrozí odmítnutí štěpu imunitním systémem příjemce; 4) musí být zaručena diferencovanost všech buněk, které se do pacientova těla vpravují.

1) Lidské embryonální KB jsou kultivovány v přítomnosti komponent zvířecího původu, které mohou být zdrojem imunogenních látek (tj. látek, které v pacientově těle vyvolávají imunitní reakci), retrovirových či houbových infekcí, které mohou být nebezpečné pro pacienta. Mezi komponenty zvířecího původu patří především vrstva podpůrných buněk (myší embryonální fibroblasty), na kterých lidské embryonální KB rostou. Tato vrstva podpůrných buněk produkuje do média růstové faktory a složky mimobuněčné hmoty, které jsou klíčové pro růst lidských embryonálních KB. Další důležitou složkou kultivačního systému lidských embryonálních KB, která však obsahuje komponenty zvířecího původu, je náhražka séra. Cílem výzkumu mnoha vědeckých skupin je proto vyvinout kultivační systémy, které neobsahují složky zvířecího původu.

2) Při použití lidských embryonálních KB v buněčné terapii je nutná jejich dlouhodobá kultivace *in vitro*. Během této dlouhodobé kultivace lidské embryonální KB akumulují změny v genomu. Podobné změny jsou běžně nacházeny v nádorových buňkách. Proto je použití těchto buněk nesoucích změny v genomu nebezpečné.

Zdrojem genetických abnormalit mohou být a) již výše zmíněné nevhodné kultivační podmínky, b) absence klíčových komponent signálních drah monitorující poškození DNA (tzv. kontrolní body buněčného cyklu) nebo c) poruchy funkce dělicího vřetenka (centrozomální abnormality).

Udržování stability genomu u eukaryotických buněk zajišťuje komplexní síť kontrolních bodů, které jsou strategicky umístěny v

průběhu buněčného cyklu. Pokud je DNA poškozena nebo nejsou dokončeny klíčové procesy dané fáze buněčného cyklu, aktivují se tyto kontrolní body, což vede k pozastavení průchodu buněčným cyklem. Iniciační signál pro aktivaci kontrolního bodu je prezentován specifickou změnou struktury DNA nebo interakcí DNA-protein. Tento signál je pak přenášen na efektorové molekuly, které zastavují buněčný cyklus nebo indukují apoptózu (programovaná/řízená buněčná smrt).

Klíčovou molekulou signálních drah monitorujících poškození DNA je protein p53. Při poškození DNA nebo při indukci stresu se tento protein prostřednictvím dalších molekul modifikuje (fosforylace, acetylace, ubikvitinace). Na základě modifikací proteinu p53 pak buňka rozhoduje, zda zastaví svou progresi buněčným cyklem a opraví DNA. Pokud je však poškození DNA natolik robustní, že buňka nedokáže poškození opravit, aktivují se komponenty apoptických drah a buňka zahyne řízenou buněčnou smrtí.

Zastavení buněčného cyklu při poškození DNA prostřednictvím proteinu p53 probíhá tak, že se p53 váže na DNA v místě regulační oblasti, kde se nachází gen pro protein p21. Vazbou proteinu p53 na DNA se spustí exprese proteinu p21, který svou vazbou inhibuje aktivitu molekul zodpovědných za progresi buněčným cyklem (CDK/cyklin) a buněčný cyklus se zastavuje.

Studium reakce lidských embryonálních KB na poškození DNA ukázaly, že ačkoliv protein p53 je po poškození DNA správně modifikován, nedokáže spustit expresi proteinu p21, který je zodpovědný za zastavení buněčného cyklu. Pokud buňka nedokáže po poškození DNA zastavit průchod buněčným cyklem, může se toto poškození přenést do další generace buněk. Neschopnost lidských embryonálních KB syntetizovat protein p21 po poškození DNA může přispívat k nestabilitě genomu.

Další příčinou genetické nestability lidských embryonálních KB mohou být poruchy funkce dělicího vřeténka. Významnou součástí dělicího vřeténka je centrozom. Centrozom je útvar v cytoplazmě buněk, který má za úkol organizovat dělicí vřeténka během

buněčného dělení, a proto je zodpovědný za rovnoměrné rozdělení genetického materiálu. Za normálních okolností má buňka při dělení centrozomy dva - každý v opačném pólu buňky. Pokud má buňka centrozomů více, dochází k nerovnoměrnému rozdělení genetického materiálu (aberantní dělení) a tedy ke genetické nestabilitě.

Lidské embryonální KB mají zvýšené procento aberantních dělení v kultuře *in vitro*, které mohou být potenciální příčinou akumulace genetických změn v genomu.

3) Lidské somatické buňky nesou na svém povrchu soubor molekul MHC (major histocompatibility complex). Tyto molekuly jsou u každého člověka jedinečné. Molekuly MHC, které nejsou organismu vlastní, jsou rozpoznány imunitním systémem. Při transplantaci diferencovaných buněk z lidských embryonálních KB, může proto dojít k odmítnutí štěpu imunitním systémem pacienta.

4) Při transplantaci buněk diferencovaných z lidských embryonálních KB musí být zaručeno, že opravdu všechny buňky jsou diferencovány do požadované buněčné linie. Pokud by při transplantaci zůstala určitá část populace buněk nediferencována, mohlo by dojít ke tvorbě nádoru (teratomu).

Pro bezpečné použití lidských embryonálních KB v buněčné terapii musí být všechny tyto nedostatky eliminovány.

Více informací: Bárta T. et al. 2010: Aktuální výzkum kmenových buněk: ze zkumavky k terapeutickému využití.

ISBN 978-80-7305-097-9,

elektronicky dostupné na <http://cit.vfu.cz/fyziolmed>

Terapeutické využití kmenových buněk ve veterinární medicíně

Jaroslav Doubek, Eva Matalová

Terapeutické využití kmenových buněk je založeno na jejich identifikaci v místě původu (niche), objasnění signálních drah, které řídí jejich uplatnění v regeneraci tkání a využití těchto poznatků. Nejlépe charakterizovaná populace somatických kmenových buněk jsou krvetvorné kmenové buňky (Kaufman et al. 2009). U člověka se staly běžně používanou součástí terapií hematologických nádorových (leukemických) onemocnění a regenerace kostní dřene po chemoterapii. Tento postup má však ve veterinární medicíně dosud malé uplatnění vzhledem k minimálnímu využití myeloablativní chemoterapie (s následkem zničení kostní dřene) s následnou obnovou buněčných krevních elementů u zvířat, a to z finančních i jiných důvodů.

Mnohem častěji využívanou skupinou buněk pro veterinární terapie jsou mezenchymové kmenové buňky (MSC), které také pocházejí z kostní dřene, a to i z nehematopoetických oblastí.

Tyto buňky mohou diferencovat např. do chondrocytů, osteoblastů, svalových buněk, adipocytů a zřejmě mohou i transdiferencovat („přeprogramovat“) do buněk endodermálního a neuroendodermálního původu. MSC terapie využívají buď přímé aplikace zakoncentrovaných buněk z aspirátu kostní dřene, případně se expandují v buněčné kultuře a následně aplikují.

U psiho srdce bylo ukázáno, že aplikace těchto buněk vedla k podpoře reparace mechanické funkce srdce a dokonce lze z těchto buněk derivovat buňky s pacemakerovou aktivitou. Izolace a charakterizace mezenchymových kmenových buněk odvozených z kostní dřene probíhají zejména u koní a psů. Ve veterinární medicíně jsou aplikovány také mezenchymové kmenové buňky odvozené z tukové tkáně. Z tkáně jsou izolovány kmenové buňky a poté vráceny do těla pacienta, a to zejména za účelem podpůrné terapie chronické osteoartritidy, traumatických a degenerativních kloubních

onemocnění u psů. U psů byla dokonce prokázána schopnost těchto buněk podílet se na léčebném efektu při poškození míchy.

Důležitou oblastí využití mezenchymových kmenových buněk ve veterinární medicíně jsou terapie poškození šlach, vazů, kloubů a kostí. U zvířat s chirurgicky nebo kolagenázou vyvolaných lézí šlach byly potvrzeny pozitivní efekty v kultuře expandovaných MSC z kostní dřeni na organizaci, složení a mechanické vlastnosti tkáně, výrazný pozitivní efekt byl zaznamenán u koní s tendinitidou. Pilotní studie ukazují při terapiích tendinitidy také na možnost využití buněk získaných z tukové tkáně. Ty byly testovány i při terapiích osteoartritid a poškození chrupavek, určité zlepšení bylo popsáno u psů, u koní však neprokázaly žádný signifikantní léčebný efekt. Lepších výsledků bylo dosaženo při použití buněk kostní dřeni expandovaných v kultuře, kdy došlo ke snížení synoviální efuze a hladiny prostaglandinů (PGE2). Nebyly ale nalezeny žádné změny v klinických parametrech, ani v histologii chrupavky a složení synoviální tekutiny. Hladiny PGE2 potvrdily imunomodulační efekt kmenových buněk. Kapacita těchto buněk při regeneraci chrupavek byla demonstrována i u dalších druhů zvířat - ovce, kozy, králíka a potkana. Efektivní bylo v obdobných případech také použití koncentráту kmenových buněk kostní dřeni, souhrnné průkazné výsledky však stále chybějí. Dalším směrem výzkumu je využití mezenchymových buněk při regeneraci kostí po frakturách.

Kmenové buňky odvozené z kostní dřeni se ukázaly jako nový nástroj také v léčbě onemocnění oka, jako je ulcerativní keratitida u koní. Kmenové buňky se zde uplatňují při redukci destrukce rohovky, údržbě její struktury a eliminaci bolesti a mohou být využity v kombinaci s chirurgickými postupy. O využití genových a buněčných terapií se uvažuje i v léčbě glaukomů.

Embryonální kmenové buňky a od nich odvozené linie jsou nejlépe popsány u myši, člověka, a také některých primátů, tyto technologie však zatím nebyly využity u zájmových a hospodářských zvířat. Dosud byly získány kmenové buňky z blastocysty koček a koní, izolovány byly také u psa, koně, skotu, ovcí, prasat, ale také králíků, kuřat a norků.

Přestože etické aspekty využití kmenových buněk u zvířat nejsou tak kontroverzní jako u člověka, také veterinární medicína testuje možnosti použití indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPS). Jejich velkou výhodou je totiž pluripotentní kapacita a imunologická kompatibilita. Získání iPS je založeno na technologiích transdiferenciace již diferencovaných buněk do buněk kmenových. Derivace iPS se provádějí u řady živočišných druhů, od potkanů, přes prasata, až k primátům. Z iPS buněk již byly získány kardiomyocyty, buňky produkující inzulin, neurony, hepatocyty i fotoreceptory a dosavadní výsledky ukazují jejich potenciál i pro veterinární užití. Indukované kmenové buňky odstraňují obtíže s protokoly in vitro fertilizace a maturace, stejně jako nižšího počtu blastocyst u některých zvířat a mohly by být základem individualizované terapie. K tomu směřuje i jejich další využití, a to pro farmakologické testování.

Úspěchy se objevují i v dalších oblastech veterinární medicíny. Aktivace kmenových buněk v dospělém srdci psů byla využita pro rekonstrukci části myokardu a jeho kontraktlní kapacity. Izolace, in vitro expanze, charakterizace a využití kmenových buněk při srdečních selháních je jedním z aktuálních směrů buněčné terapie. Další výzkum probíhá na poli léčby koní postižených chronickou obstrukční pulmonální nemocí, psů a koček s onemocněními srdce, jater, ledvin, neurologickými onemocněními a imunitními chorobami. Aplikace kmenových buněk se týká také dalších oblastí, např. veterinární reprodukční medicíny, zejména transplantací spermatogonálních kmenových buněk nebo produkční medicíny.

Více informací: Veterinářství 4/2012, s. 220-224 (Matalová E.,
Doubek J. 2012: Kmenové buňky a veterinární medicína)

MENDELIANUM - ATRAKTIVNÍ SVĚT GENETIKY

Hlavní cíle projektu: Využití genia loci spojeného s významnou světovou osobností jihomoravského regionu pro popularizaci a propagaci VaV v oblasti genetiky a molekulární biologie.

1) Zpřístupnění problematiky vědy a výzkumu v oblasti genetiky a molekulární biologie studentům, zájemcům o činnost ve VaV i široké veřejnosti,

2) vytvoření vhodného prostředí pro atraktivní popularizaci vědy se zachováním odborné úrovně pro motivaci potenciálních zájemců o činnost ve VaV,

3) vytvoření podmínek pro spolupráci výzkumných a vzdělávacích institucí pro posílení zájmu o činnost ve VaV v oblasti genetiky a molekulární biologie (prioritní obor DZSV), a to v několika směrech:

I) vertikální integrace: od historicko-vědního základu po aktuální výsledky vědy a výzkumu, rozvoj vědeckého odkazu brněnské osobnosti J. G. Mendela v souvislosti se současnými poznatky

II) horizontální integrace: vytvoření prostředí pro mnohostranné aktivity od seminářů až po rozsáhlé popularizační akce s praktickými prvky, propojení teorie s praxí každodenního života (témata širokého společenského zájmu)

III) interaktivita: přímé zapojení zájemců do vědy (3D cesta buňkou ve směru exprese genů) a výzkumu (genetická a molekulární laboratoř)

IV) interdisciplinarita: seznámení s nejaktuálnějšími výsledky výzkumu na úrovni Nobelových cen a jejich rozsáhlým významem v řadě oblastí VaV a praxe (i pro každodenní život),

V) internacionalizace: připomenutí postavení Brna na vědecké a kulturní mapě Evropy a světa, zdůraznění přínosu české vědy a představení významných osobností VaV v Brně i celé ČR.

O realizaci projektu bylo informováno také na Mendel Forum 2012
(sborník ISBN 978-80-7305-622-3)

Realizace projektu: Projekt byl zahájen 1. 1. 2012 a bude ukončen do 31. 10. 2014. Základní stavební kámen byl položen při slavnostním aktu dne 26. 9. 2012.



Aktuálně stavba úspěšně pokračuje a probíhá výběrové řízení na realizaci vnitřních expozic.



Aktuální info na: www.mendelianum.cz

Round table discussion Mendelianum – atraktivní svět genetiky

Odborný tým projektu Mendelianum-atraktivní svět genetiky (CZ.1.05/3.2.00/09.0180).

Základní tým:

- Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. (autor projektu, odborný garant), ÚŽFG AV ČR, v.v.i., VFU Brno
- PhDr. Anna Matalová (ideový námět projektu, odborný konzultant projektu), Mendelianum MZM, Brno
- PhDr. Jiří Sekerák, Ph.D. (garant expozic), Mendelianum MZM, Brno

Externí odborní spolupracovníci (konzultanti) – brněnská pracoviště:

- RNDr. Lenka Dubská, Ph.D., MOÚ Brno
- Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc., LF MU Brno
- Prof. RNDr. et MVDr. Petr Hořín, CSc., VFU Brno
- Prof. RNDr. Miloš Macholán, CSc., ÚŽFG AV ČR, v.v.i. Brno
- Doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D, PřF MU Brno
- Prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc., PřF MU Brno
- Doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D., MENDELu Brno

Odborný tým – zahraniční pracoviště (Advisory Board):

- Prof. Jan Klein, Pennsylvania State University, USA (chair)
- Prof. Robert C. Karn, University of Arizona, USA
- Dr. Hervé Lesot, University of Strasbourg, France
- Dr. Dinko Mintchev, Academy of Sciences, Bulgaria
- Prof. Paul T. Sharpe, King's College London, UK
- Prof. Valery N. Soyfer, George Mason University, USA

MENDELIANUM - profil

Mendelianum Moravského zemského muzea jako první muzeum na světě zařadilo do svého výzkumného programu genetiku. Mendelianum provádí historickovědní výzkum Mendelova života a díla kontinuálně od roku 1962. **Archiv** Mendeliana uchovává doklady k Mendelově biografii i vědeckému kontextu jeho objevu, které shromáždí mendelovští badatelé od začátku 20. století. Mendelianum vydává jediný specializovaný historickovědní časopis s výsledky výzkumu Mendelova života a díla a vzniku a vývoje genetiky s příspěvky od našich i zahraničních spolupracovníků – **Folia Mendeliana**. V programu Mendeliana je pořádání **výstav** a zajišťování **lektorské činnosti** pro účely školní výuky. **Konference Mendel Forum** jsou pořádány Mendelianem Moravského zemského muzea od roku 1992 a vytvářejí prostor pro setkání vědců, učitelů, studentů i široké veřejnosti. Hlavním cílem je seznámení účastníků s aktuálním vědeckým a kulturním odkazem J. G. Mendela, na který navazuje současný výzkum v genetice a molekulární biologii a následné aplikace v řadě oblastí od šlechtění přes diagnostiku až k biomedicině. Mendelianum organizuje akce **Odpoledne s DNA** s důrazem na hands-on experience v oblasti molekulární biologie a genetiky. Mendelianum pro veřejnost dále od roku 1992 organizuje **Mendel Lecture**, která je příležitostí pro významné vědce k prezentaci jejich odborné práce v rámci převzetí **Mendelovy pamětní medaile Moravského muzea**. Podle stanov Hospodářské společnosti a Přírodovědního spolku měly zůstat doklady z činnosti obou institucí v zemském muzeu a zemské knihovně, které se k Mendelovu odkazu legitimně hlásí. Mendelianum aktivně podporuje nadaci **Mendelova rodného domu**. Poskytuje informační službu studentům i zájemcům z řad široké veřejnosti, z níž většina probíhá elektronicky, ale také výpůjční službou v archivu a knihovně. Mendelianum nabízí vzdělávací **kvízy a soutěže**. Od 1. 1. 2012 realizuje Mendelianum projekt návštěvnického centra: **Mendelianum-atraktivní svět genetiky** (VaVpI CZ.1.05/3.2.00/09.0180), www.mendelianum.cz.

Mendelovy otisky v Moravském zemském muzeu

Anna Matalová

Málokdo ví, že Moravské zemské muzeum jako jediná vědecká instituce kontinuálně navazuje na Mendelův přírodovědný výzkum. Studium hybridů rostlin probíhalo v rámci výzkumného a dokumentačního programu Hospodářské společnosti a jejího zemského (tehdy Františkova) muzea, které založila v roce 1817. V celosvětovém měřítku náleží Hospodářské společnosti důležité prvenství. Členové Hospodářské společnosti, která muzeum zřídila v Biskupském dvoře, jako jediní na světě oceňovali Mendelův výzkum s hybridy hrachu už za jeho života a v Mendelově nekrologu ho označili jako epochální. Světová věda k tomuto poznání dospěla až o 35 let později.

Po organizačních změnách ve starobrněnském klášteře po roce 1995 Mendelianum MZM neuspělo s prodloužením nájemní smlouvy a po čtyřiceti letech své působitě v roce 2000 vyklidilo. Jeho činnost v klášteře byla fundamentální nejen pro genetiku u nás, ale v celém bloku prosovětsky orientovaných zemí. Podílelo se zásadním způsobem na rehabilitaci Mendelovy práce v šedesátých letech a na rehabilitaci Mendelovy osobnosti v devadesátých letech. V současné době se Mendelianum vrátilo do Moravského zemského muzea do původních prostor vědecké Hospodářské společnosti. Na její půdě Mendel čerpal inspiraci pro svou objevitelskou práci s hybridy hrachu. Osobnosti, které Mendela odborně ovlivnily, jsou veřejnosti představovány v rámci projektu Mendelianum – atraktivní svět genetiky. Z mobiliáře MZM se pro restauraci vyčleňuje nábytek z doby Mendelovy odborné a funkcionářské činnosti v Hospodářské společnosti, které nesou otisk Mendela jako vědce. Po zrestaurování bude nábytek vrácen na své původní místo do zasedací místnosti, ve které Mendel často předsedal schůzím hlavního výboru učené moravské společnosti. V Mendelově duchu se zde studenti seznámí s aktuálním genetickým výzkumem, jak probíhá v současných laboratořích.

Mendelovo brněnské vědecké kolegium

Anna Matalová

V loňském roce se Mendelianum Moravského zemského muzea zaměřilo na uvedení Mendela do ulic historického centra města Brna. Turistické informační centrum navázalo na procházky Mendelovým Brnem, které provádělo Mendelianum od roku 1992. Zdařilá komentovaná podzimní procházka byla ukončena besedou a promítáním filmu ČT o Mendelovi jako trvalé výzvě v Moravském zemském muzeu. Účastníci procházky měli možnost diskutovat o složitém pronikání Mendelova objevu do hlavního proudu světové vědy. TIC chce v tomto úspěšném projektu komentovaných prohlídek pokračovat, takže se zájemci a studenti mohou těšit, že se mohou seznámit s Mendelem živou formou a diskutovat přímo s odborníky Mendeliana.

Po prezentaci míst spojených s činností Johanna Gregora Mendela představí Mendelianum v letošním roce osobnosti, se kterými byl Mendel v přímém styku a které mohly mít na něho vliv z hlediska vědeckého výzkumu. Každý měsíc představíme jednu osobnost z Mendelova okruhu, která s ním byla v pracovním styku. Začali jsme profesorem Františkem Dieblem, od kterého Mendel získal vysvědčení z oboru zemědělství, ovocnářství a vinařství. Dieblovo vysvědčení z těchto oborů bylo pro Mendela důležitou kvalifikací pro jeho učitelskou dráhu i odbornou činnost v Hospodářské společnosti. Další postavou z Mendelova kruhu je Alexander Zawadski, který přijímal Mendela do přírodovědné sekce Hospodářské společnosti, byl významný fyzik, botanik a Mendelův kolega z reálky.

V prostředí Hospodářské společnosti měl Mendel informace o výzkumu hybridů rostlin od šlechtitele Jana Tvrdeho, Hanse Molische a sekretáře spolku Gustava Niessla, kteří tuto problematiku sledovali, přinášeli živé exempláře hybridů na přednáškové schůze a publikovali výsledky svých výzkumů v odborné literatuře. Studium variability a selekce v duchu Darwina se zabýval Mendelův přítel

Matouš Klácel, který odkázal svou klášterní pokusnou zahrádku Mendelovi. Mendelův spolubratr Tomáš Bratránek ve svých úvahách o estetice rostlin rozvíjel myšlenky o vývoji přírody jako živého organismu v silovém pojetí německé naturfilozofie. Od Pavla Olexíka Mendel převzal meteorologická pozorování i některé meteorologické přístroje. Alexander Makowsky, profesor přírodovědy na Technickém učení v Brně, referoval v brněnském tisku o Mendelově přednášce v roce 1865 a díky němu dnes víme, jak byla Mendelova sdělení o jeho objevu přijata. V Hospodářské společnosti Mendel spolupracoval se včelařem Františkem Živanským, který správně předpokládal, že Mendel se svými hybridizačními pokusy u včel nemohl uspět. A. Tomášek referoval o Mendelových aklimatizačních pokusech se včelou *Trigona lineata* v německých a ruských odborných časopisech. Náš brněnský okruh Mendelových kolegů z vědeckého prostředí uzavře J. Liznar, profesor meteorologie, který Mendela navštěvoval ve starobrněnském klášteře a zveřejnil Mendelova měření o stavu spodní vody v klášterní studni.

Jednotlivé osobnosti a jejich vztah k Mendelovi dají nahlédnout do ideového kontextu Mendelova vědeckého díla, jehož těžiště bylo v učené Hospodářské společnosti, která je v Ottově slovníku naučném označována jako moravská vědecká akademie, která podporovala vědu, výzkum a vzdělanost.

Aktualizované informace jsou dostupné na stránkách www.mendelianum.cz

Mendel jako včelač, učitel a všestranná osobnost

V roce 2013 představujeme osobnosti, se kterými J. G. Mendel spolupracoval ve vědecké oblasti. [více informací](#)

LEDEN	Leden s Františkem Dieblm (1770-1859), profesorem a uznávaným odborníkem v oblasti zemědělských věd.
ÚNOR	Únor s Alexandrem Zawadskim (1798-1866), profesorem fyziky, který oficiálně jmenoval Mendela do přírodovědné sekce Hospodářské společnosti.
BŘEZEN	Březen s Jánem Turčim , významným brněnským hybridizátorem okrasných rostlin, který po svém příteli Mendelovi pojmenoval jednu z nových odrůd fuchsii.
DUBEN	Duben s Albinem Heinrichem (1785-1864), Přírodovědec, kustod dnešního Moravského zemského muzea a čestný člen Přírodovědného spolku v Brně, který spoluzakládal J. G. Mendel.

Ohlédnutí za jubilejní konferencí Mendel Forum 2012

Jubilejní konference Mendel Forum se konala u příležitosti 190. výročí narození JGM a proběhla dne 25. června 2012 v Dietrichsteinském paláci na Zelném trhu v Brně. Konferenci tradičně pořádalo Mendelianum Moravského zemského muzea ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. a Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno. Setkání připomnělo nejenom Mendelovy narozeniny, ale i 50 let od udělení Nobelovy ceny za fyziologii/medicínu za objev struktury DNA, 50 let od zahájení činnosti Mendeliana Moravského zemského muzea Brno jako výzkumné instituce zaměřené na život a dílo JGM a také 20 let tradice konferencí Mendel Forum a série přednášek Mendel Lecture. Konference byla členěna na dopolední sekci pod názvem Mendelova laboratoř v 21. století a navazující praktickou část Odpoledne s DNA. Hlavními diskusními tématy byly Mendelovy pokusy v kontextu dnešní vědy, souboje v hybridních zónách, možnosti genových manipulací zapínáním a vypínáním genů a v neposlední řadě geny ve zdraví a nemoci. Dopolední sekce konference byla uzavřena pozvánkou na prázdninové akce spojené s oslavou 190. výročí narození J. G. Mendela.

Odpolední část otevřela možnost přímé účasti na vědecké práci v laboratoři. Účastníci se přímo zapojili do paralelně probíhajících experimentů realizovaných v laboratořích Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. a Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Praktická část probíhala ve třech tematických směrech týkajících se práce s nukleovými kyselinami, detekce aktivních genů a možností ovlivňování genové exprese *in vivo*.

Právě vzhledem k umožnění hands-on experience byla letošní konference Mendel Forum omezena počtem 100 účastníků, registrace byla tradičně bezplatná a její součástí byl sborník konference vydaný pod ISBN 978-80-7305-622-3. Sborník, stejně

jako řada dalších materiálů a informací, je k dispozici také na stránkách www.mendelianum.cz.

Sekce Mendelianum – atraktivní svět genetiky realizovaná formou diskuse u kulatého stolu odborného týmu nového projektu VaVpI zahájeného v letošním roce uzavřela v podvečerním čase jubilejní konferenci Mendel Forum.



EVROPSKÁ UNIE **esf** MŠMT OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
INVESTICE DO KVALITY VZDĚLÁVÁNÍ

Flanzosen, Hylbenwien
Gregor Mendel

JUBILEJNÍ

MENDEL FORUM

2012



FOTOSOUTĚŽ

Mendelovo Brno ve čtyřech ročních obdobích

Mendelianum Moravského zemského muzea nabídlo v loňském roce výstavu Prázdninové toulky Mendelovým Brnem a publikaci Mendelovo Brno, které seznámily zájemce s řadou známých i méně známých míst spojených s vědeckou, kulturní a další činností J. G. Mendela v Brně z pohledu odborníka.



Doplněním těchto akcí je pohled na uvedená místa z pozice široké veřejnosti, která jimi denně prochází. Fotosoutěž je výzvou (nejen) pro Brňany, aby zachytili Mendelovo Brno v konkrétním okamžiku moderního života města. Zimní cyklus proběhl od 21. 12. 2012 do 20. 3. 2013, nyní je otevřen cyklus Jaro v Mendelově Brně. Otevřeným hlasováním jsou voleny nejlepší fotografie z každého cyklu, které budou odměněny. Vybrané fotografie jsou zveřejněny na internetových stránkách.

Pro (nejen) fotografickou inspiraci si Mendelianum dovoluje pozvat na virtuální procházku Mendelovým Brnem, která je společně s dalšími aktuálními informacemi dostupná na www.mendelianum.cz

Mendelianum zve k účasti jak přispěvatele fotografií, tak jejich hodnotitele.

Mendel na portrétu E. Miléna

Portrét J. G. Mendela s autorstvím Eduarda Miléna vyšel původně v Lidových novinách ke stému výročí narození J. G. Mendela, v ranním vydání dne 22. června 1922.



Reprodukce kresby ze Zvěrolékařského obzoru (ročník XCV., listopad 1922). Archiv VFU Brno.

Seznam autorů příspěvků

Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.
ÚŽFG AV ČR, v.v.i., VFU Brno, Mendelianum MZM, Brno
(editor)

Mgr. Tomáš Bárta, Ph.D.
Newcastle University, UK

Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.
VFU Brno

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.
Mendelova univerzita v Brně

PhDr. Anna Matalová
Mendelianum MZM Brno

Doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.
Mendelova univerzita v Brně

Mgr. Zuzana Vykoukalová, Ph.D.
Mendelova univerzita v Brně

**Vydala Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně
2013**

ISBN 978-80-7305-651-3

OBSAH

Program konference	2
Odpoledne s DNA (T. Urban)	5
Genomika skotu a prasat – aplikace ve šlechtění (T. Urban et al.)	6
Protokoly pro praktickou část Odpoledne s DNA (Z. Vykoukalová)	16
Aktuální vzdělávací projekty (J. Doubek)	30
Indukované pluripotentní kmenové buňky – naděje pro regenerativní medicínu (T. Bárta)	40
Terapeutické využití kmenových buněk ve veterinární medicíně (J. Doubek, E. Matalová)	56
Mendelianum – atraktivní svět genetiky	59
Round table discussion Mendelianum - atraktivní svět genetiky	62
Mendelianum - profil	63
Mendelovy otisky v Moravském zemském muzeu (A. Matalová)	64
Mendelovo brněnské vědecké kolegium (A. Matalová)	65
Ohlédnutí za jubilejní konferencí Mendel Forum 2012	67
Fotosoutěž Mendelovo Brno ve čtyřech ročních obdobích	69
Mendel na portrétu E. Miléna	70
Seznam autorů příspěvků	71

Služby



Určování otcovství znalcem

Vsaďte na jistotu garantovanou soudním znalcem a nejpřesnější metodou...

www.testjotcovstvi.cz



Testy na močové infekce

Navštěvujete často lékaře a berete často antibiotika na močové infekce? Pomůžeme vám...

www.mocovainfekce.cz

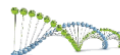


Testy klíšťat

Klíště, které odstraníte z kůže otestujte na borélii, klíšťovou encefalitu i ehrlichie.

www.testborielozy.cz

Rychlé testy



Test okultního krvácení

Rakovina tlustého střeva a konečníku je častou příčinou úmrtí v ČR. Včasným odhalením lze tomu předejít...

www.krevestolida.cz



Test na celiakii (XELIAC)

Jednoduchý a moderní test, který si můžete provést sami doma je vhodný pro dospělé i pro děti...

www.testceliakie.cz



Těhotenské testy

Moderní a citlivý těhotenský test ve formě proužků, testování je možné již 3-5 dnů po oplodnění...

www.elisabeth.cz

www.elisabeth.cz

tel.: +420 542 213 851