

Pro zdravější život

Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., je velmi mladým ústavem; byl založen v roce 2008. Za krátkou dobu své existence však již dosáhl řady pozoruhodných výsledků. Zaměřuje se na základní výzkum v oblasti molekulárně biologických věd na špičkové úrovni a výhledově také na převod biotechnologických metod a molekulárních nástrojů k diagnostice a léčbě patologického stavu buňky do humánní a veterinární medicíny, případně do dalších důležitých oblastí lidské činnosti.

Spojme síly

Pro rozvoj ústavu je důležité jeho zapojení do projektu BIOCEV, společného projektu šesti ústavů Akademie věd ČR (Ústav molekulární genetiky, Biotechnologický ústav, Mikrobiologický ústav, Fyziologický ústav, Ústav experimentální medicíny a Ústav makromolekulární chemie) a dvou fakult Univerzity Karlovy v Praze (Přírodovědecká fakulta a 1. Lékařská fakulta), jehož

cílem je realizace vědeckého centra excelence v oblastech biotechnologií a biomedicíny.

Finance byly poskytnuty z Evropského fondu regionálního rozvoje, prostřednictvím Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace.

Ústav se podílel na přípravě projektu, který byl v realizační části ukončen ke konci roku 2015.



BIOCEV

Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci

V novém k novým metám

V lednu 2016 se ústav přestěhoval do nové budovy centra BIOCEV ve Vestci a je zapojen do dvou z pěti výzkumných programů centra.

Chceme plně využít tuto příležitost k produkci špičkových vědeckých výsledků, které budou převedeny do klinické praxe.



Nové sídlo BTU

V partnerství s univerzitami

Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i. se podílí na vzdělávání studentů ve všech stupních vysokoškolského studia z České republiky i ze zahraničí. Ve výzkumných skupinách se studenti pod vedením zkušených pracovníků učí experimentálními technikami a metodikami vědecké práce a přitom připravují svoji bakalářskou, diplomovou nebo disertační práci. Vedoucí výzkumní pracovníci přednáší na řadě českých i zahraničních vysokých škol. Studijní programy BTÚ jsou připravovány ve spolupráci s českými vysokými školami – Univerzitou Karlovou, Vysokou školou chemicko-technologickou, Českým vysokým učením technickým, Českou zemědělskou univerzitou, Jihočeskou univerzitou. V současnosti pracuje na BTÚ přibližně 15 pregraduálních a 30 postgraduálních studentů.

PhD program Biotechnologického ústavu je součástí postgraduálního studia v biomedicině, ve kterém je sdružena Univerzita Karlova a řada ústavů Akademie věd. PhD program využívá též možností VŠCHT. Jednotlivé studijní obory jsou organizovány příslušnými oborovými radami. Studium musí být zakončeno státní závěrečnou zkouškou a obhajobou disertační práce na příslušné vysoké škole.



KONTAKTY:
**Biotechnologický ústav
AV ČR, v. v. i.**

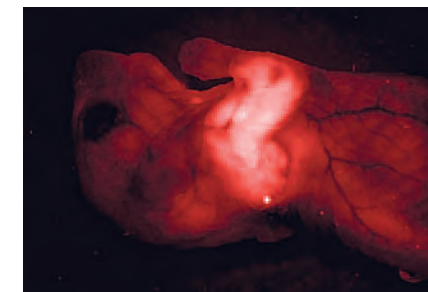
**Průmyslová 595
252 50 Vestec
Česká republika**

Tel.: +420 325 873 700

Fax: +420 325 873 710

e-mail: btu-office@ibt.cas.cz

Výzkumný program 1: Vývoj léčebných a diagnostických postupů.



Myši transgenní embryo exprimující červený fluorescenční protein v mitochondriích somatických buněk (CAG/su9-DsRed2).

Sjednocujícími prvky výzkumného programu 1 jsou studium patologických stavů buňky, identifikace příčin těchto stavů, změny expresního profilu studovaných genů, detekce změn v lokalizaci a modifikaci určitých proteinů a identifikace dalších molekul ve vztahu k indukci patologie.

Cílem programu je vývoj postupů pro prevenci onemocnění, příprava nových metod pro monitorování a diagnostiku onemocnění a vývoj nástrojů pro molekulární terapii doprovodných patologických stavů.



Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.
ředitelka BTÚ AV ČR, v.v.i.

Plasticita nádorových buněk a léčba nádorů

Pracovní skupina pod vedením Jiřího Neužila (Laborať molekulární terapie) společně s českými kolegy a mezinárodním týmem publikovala v prestižním časopisu *Cell Metabolism* (IF časopisu 17.565) článek který prokázal, že nádorové buňky bez mitochondriální DNA (mtDNA) ukazují zpoždění růstu nádoru a opětovná tvorba nádorů je spojena se získáním mtDNA z hostitelských buněk. To vede k částečnému obnovení mitochondriální funkce.

Výsledky naznačují, že horizontální přenos mtDNA z hostitelských buněk na nádorové buňky poškozenými respiračními funkcemi vede k obnovení dýchání a nádorovému bujení. Tyto výsledky naznačují, patofyziologické pochody k překonání poškození mtDNA a ukazují na vysokou plasticitou maligních buněk.

Deriváty vitamínu E cílené na mitochondrie zabíjí nádorové buňky. Některé z těchto látek jsou chráněny národními a mezinárodními patenty. Jedna z těchto látek je v klinickém testování s cílem připravit látku k léčbě vybraných nádorů.

Výzkumný program 2: Strukturní biologie a proteinové inženýrství

Cílem programu 2 je výzkum nových, biotechnologicky, diagnosticky a medicínsky zajímavých biomolekul, proteinů a nukleových kyselin, které mohou být připraveny metodami molekulární biologie a proteinového inženýrství.

Pochopení struktur studovaných molekul a jejich vzájemná inter-

akce může pomoci v modifikaci jejich biologických aktivit a může být použita v diagnostice, jako léčivo nebo jiné materiály.



Struktura receptoru 2
interferonu gamma

V centru BIOCEV odpovídáme za dvě servisní pracoviště



Jde o Centrum molekulární struktury a Kvantitativní a digitální PCR.

Centrum molekulární struktury poskytuje komplexní přístup ke studiu prostorové struktury, funkce a biofyzikálních vlastností biologických molekul.

Kvantitativní a digitální PCR se specializuje na poskytování PCR v reálném čase (RT-qPCR) a dalších služeb a organizuje kurzy s touto tematikou.

Lepší léky k léčbě lupénky

Tým Petra Malého (Laborať inženýrství vazebných proteinů) se dlouhodobě zabývá přípravou nových typů malých vazebných proteinů, tzv. rekombinantních ligandů. Pokud připravíme malý vazebný protein tak, aby se navázal na buněčný receptor na povrchu buňky a vyvolal inhibiční nebo stimulační reakci, můžeme tento protein velice účinně využít při vývoji terapeutik nové generace. Výhodou rekombinantních ligandů je jejich snadná příprava z bakteriálních kultur, vysoká stabilita, strukturní odolnost a poměrně jednoduchá možnost modifikace.

Připravené REX ligandy jsou chráněny českým patentem, probíhá rozšíření tohoto patentu na mezinárodní.

K novému životu

Oplození je vysoce specifická interakce gamet (pohlavních buněk), která vede k tvorbě zygoty a vývoji nového jedince daného druhu. U savců se interakce spermie-vajíčko skládá z mnoha specializovaných a regulovaných dějů zahrnujících vajíčkem indukovanou aktivaci spermií a následnou aktivaci vajíčka spermií. Pohyblivost, metabolismus, kapacitace a akrozomální reakce spermií je zásadní pro získání fertilizačního potenciálu spermií a schopnosti interagovat s vajíčkem, a to jak s jeho buněčnými tak nebuněčnými složkami. Svůj důležitý podíl při oplození mají i tekutiny samčího a samičího reprodukčního traktu. Proteiny spermie a glykoproteinový obal vajíčka (zona pellucida) se podílejí na vysoce specifické interakci mezi těmito gametami.

Ať jsou muži plodní!

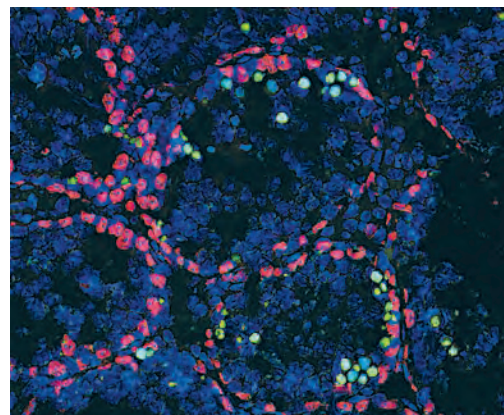
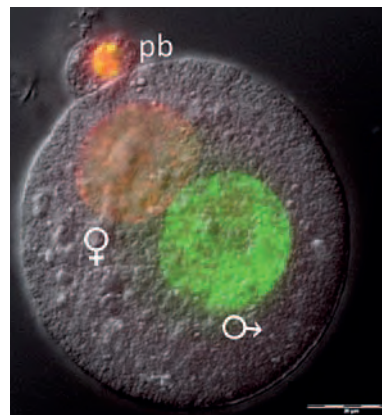
Laboratoř reprodukční biologie se zabývá charakterizací procesů a molekulárních faktorů přípravy spermie k oplození (kapacitace, akrozomální reakce, složení seminální tekutiny), interakcí spermie a vajíčka během oplození a rozvíjením nástrojů (monoklonální protilátky) pro detekci neplodnosti u mužů.

Současně se skupina zaměřuje na charakterizaci změn reprodukčních parametrů v souvislosti s *Diabetes mellitus* a vybranými environmentálními faktory včetně identifikace epigenetických mechanismů podílejících se na změnách gametogeneze v souvislosti s genovou expresí, která povede k lepšímu pochopení samčí reprodukce a k prevenci a diagnostice rostoucí neplodnosti.

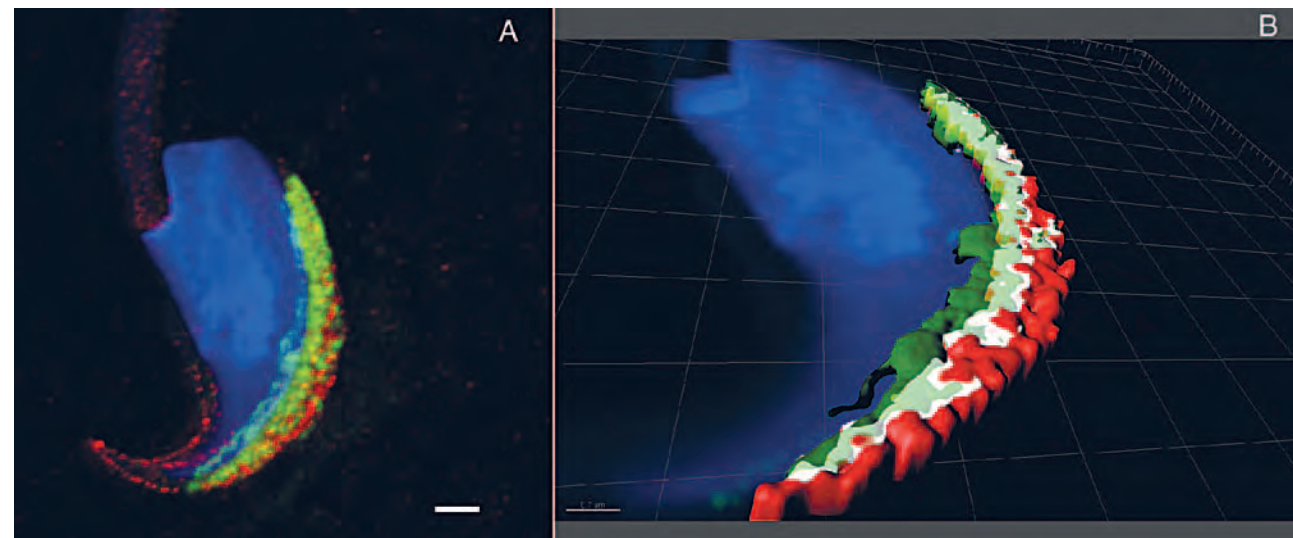


Vedoucí:
RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

Myší embryo: samčí a samičí provojádra značené protilátkou proti histonové modifikaci H4K12ac (zeleně) a DNA metylaci 5mC (červeně) ukazující přenos specifických epigenetických znaků pocházejících výhradně ze spermie (zeleně), a které se aktivně účastní časné embryogeneze (Vieweg M. and Dvorakova-Hortova K. et al. 2015).

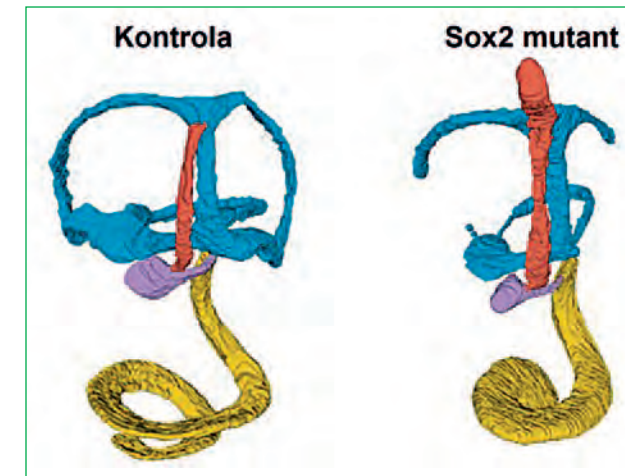


Myší varle: Evaluace míry apoptózy (zeleně) za využití metody TUNEL po vystavení jedinců environmentálním faktorům (Elzeinova et al., 2013).



Detekce protein CD46 (zeleně) a $\beta 1$ integrinu (červeně) v hlavě myší spermie pomocí STED superrezoluční mikroskopie (A); Kolokalizační linie proteinů (bíle) analyzované pomocí Imaris softwaru. Měřitko udává 0.7 μ m. Jádru (modře).

Pro budoucí radost ze světa zvuků



Porovnání vývoje vnitřního ucha u kontrolního jedince a myši s delecí transkripčního faktoru Sox2.

V jednom z našich projektů se zaměřujeme na analýzy transkripční regulace v neurosenzorovém vývoji embrya. Naším cílem je identifikace genů a signálních drah, které jsou nezbytné pro vývoj specifických buněčných typů vnitřního ucha. Toto je kritický krok k pochopení patofyziologických procesů u sluchových defektů, které jsou spojovány se smrtí sluchových buněk, neuronů a se ztrátou nervových kontaktů. Přibližně 71 miliónů Evropanů trpí poškozením nebo ztrátou sluchu.

Za pomoci myších transgenních mutantů analyzujeme interakce a spolupráci transkripčních faktorů ISLET1, SOX2 a bHLH neurosenzorových specifikačních faktorů ve vývoji neurálních a senzorych linií ve vnitřním uchu.

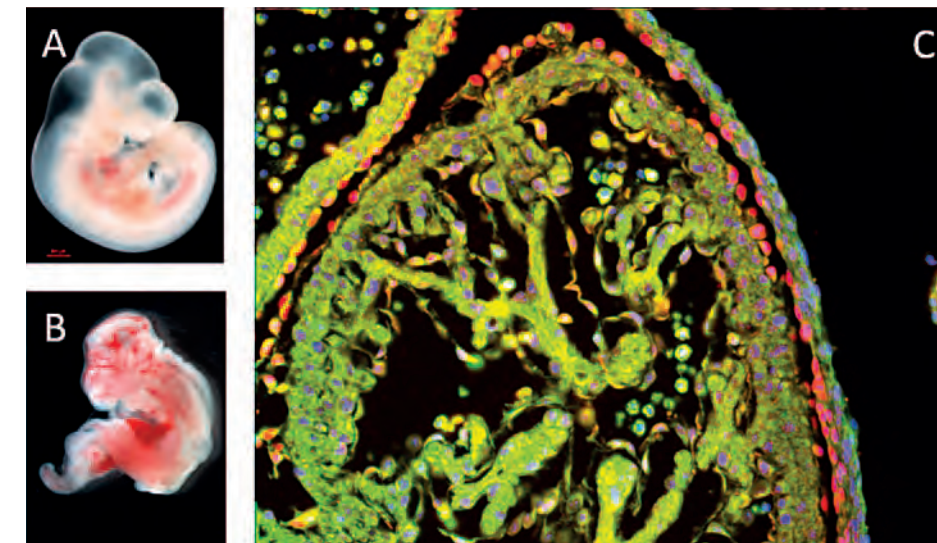


Vedoucí:
RNDr. Gabriela Pavlíková, Ph.D.

Omezit riziko

Diabetes mellitus během těhotenství může negativně ovlivnit vývoj plodu. Nedostatečně kontrolovaná hyperglykémie matky během prvního trimestru zvyšuje riziko vzniku vrozených defektů a spontánní potratů. Nejčastějšími vrozenými defekty jsou defekty nervové trubice, kaudální regrese a kardiovaskulární defekty. Klinické studie ukázaly, že nejčastějšími defekty v diabetické embryopatii jsou kardiovaskulární defekty, zejména atrioventri-

kulární defekty, hypoplastické levé srdce a transpozice velkých cév. Navíc, riziko pro kardiovaskulární onemocnění a diabetes je zvýšené u dětí a dospělých, kteří byli vystaveni nepříznivým podmínkám během embryonálního vývoje, proces nazývaný fetální programování. Laboratoř molekulární patogenetiky se zabývá odhalováním genetických faktorů, které by v kombinaci s prostředím mateřského diabetu mohly ovlivnit embryonální a fetální vývoj a tím zvýšit riziko kardiovaskulárních defektů a funkčních změn srdce. Pomocí metod profilování genové exprese a zviřecího modelu, jsme identifikovali změny signálních drah důležitých pro morphogenezi a maturaci fetálního srdce, které korelují s klíčovým krokem ve vývoji srdce, septací. Dále jsme ukázali, že mutace transkripčního faktoru hypoxia inducible factor 1 alfa zvyšuje náchylnost ke vzniku kardiovaskulárních defektů v diabetické embryopatii. Ukázali jsme, že v závislosti na vývojovém stádiu a teratogenním prostředí změny v signálních drahách zvyšují riziko vzniku diabetické embryopatie a změn v procesu fetálního programování.



Změny ve vývoji embrya exponovanému diabetickému prostředí. (A) normální vývoj a (B) diabetická embryopatie. (C) Imunohistologické barvení exprimovaných genů indukujících změny v morfogenetickém procesu vývoje srdce.

Zasáhnout přesně a účinně

Nádorová onemocnění jsou v industriálních zemích stále větším problémem, a to i navzdory velkému úsilí řady vědeckých pracovníků v mnoha laboratořích. Důvodem této velmi neradostné perspektivy je neobyčejná plasticita nádorových buněk, tedy jejich schopnost unikat léčbě, překonávat nepříznivé situace a využívat alternativní zdroje energie. Ukazuje se, že není reálné léčit nádorová onemocnění látkami, které cílí na jednu signální dráhu či na jeden gen. Je proto třeba nalézt neměnné zásahové místo, které by rakovinné buňky nemohly mutovat a které by bylo univerzální (a selektivní) pro většinu typů nádorových onemocnění. Takovým zásahovým místem se jeví mitochondriální respirace.

Nové malé molekuly

Naše skupina se zaměřuje na nový způsob léčby nádorových onemocnění, kdy se zaměřujeme na nové malé molekuly, které na základě modifikace, kterou jsme navrhli, specificky působí právě na mitochondriální respiraci. Tyto látky nazýváme „mitokany“ (z anglického „mitocans“, což je akronym slov „mitochondria and cancer“). Tyto

molekuly jsou velmi účinné (a zároveň selektivní pro nádorové buňky) i proti obtížně léčitelným nádorovým chorobám, jako jsou nádory pankreatu, nádory prsu s vysokým Her2 či trojnásobně negativní nádory prsu. Jedna z námi navržených látek (které jsou chráněny mezinárodními patenty) momentálně vstupuje do klinických testů.

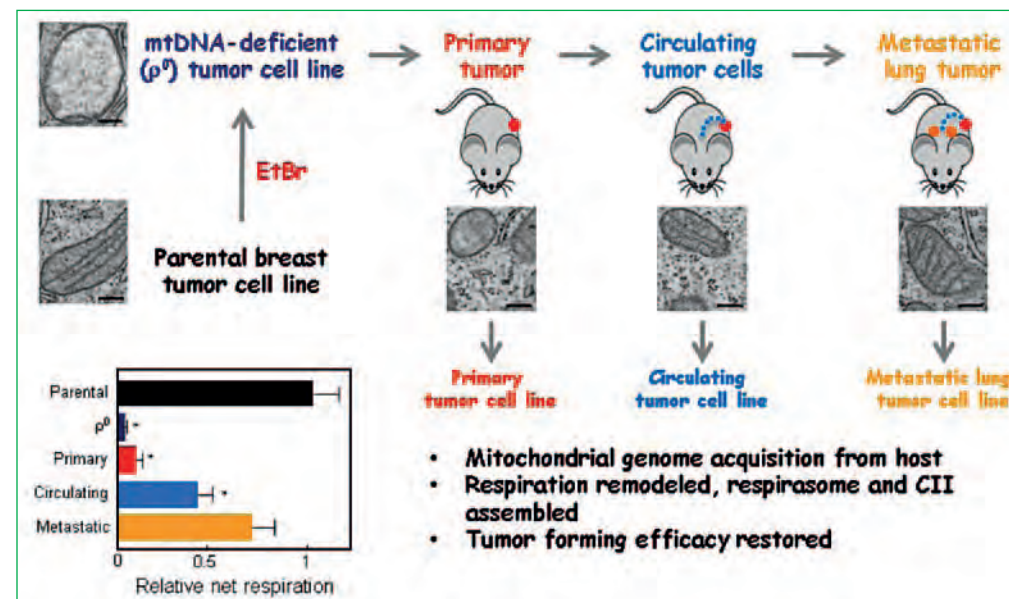
Experimentálně ověřeno

To, že je mitochondriální respirace vhodným zásahovým místem pro léčbu nádorových nemocí plyne i z našeho výzkumu týkajícího se horizontálního přenosu mitochondrií v pokusném zvířeti. Zjistili jsme, že rakovinné buňky se silně poškozenou mitochondriální DNA (mtDNA), po vložení do experimentální myši tvoří nádory teprve poté, kdy si obnoví mitochondriální respiraci. K tomu dochází na základě získání mitochondrií z okolních buněk, které infiltrují nádorové buňky graftedované do zvířete. Protože bez obnovení respirace rakovinné buňky nemohou

tvorit nádory, je zřejmé, že respirace je pro tvorbu a progresi nádorů zcela zásadní. Z toho vyplývá výše zmíněný fakt, že je respirace vhodným zásahovým místem pro léčbu nádorových chorob. V současné době studujeme mechanismy a regulace horizontálního mezibuněčného přenosu mitochondrií a jejich roli pro nové přístupy k nádorovým chorobám.

CHCETE-LI VĚDĚT VÍCE:

Tan A et al (2015) Cell Metab 21, 81-94.



Získávání mitochondrií v nádorech bez mitochondriální DNA. Rakovinné buňky, které nemají mitochondrie je získají z hostitelského organismu - v tomto případě myši a až poté co obnoví mitochondriální dýchání jsou schopny růstu a tvorby metastáz.

Pryč s nádory!

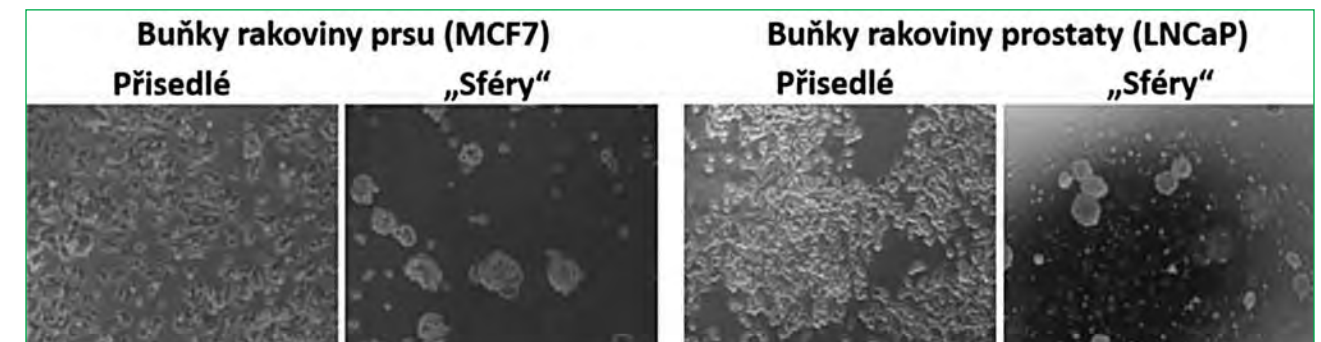
Nádorové onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou smrti ve vyspělých zemích. Zásadní přínos pro léčbu představuje jednak včasná a přesná diagnostika a vhodně zvolená léčba. Přes ohromný posun v diagnostice i léčbě nádorů je evidentní, že významná část pacientů na léčbu neodpoví adekvátně anebo na léčbu reaguje, ale nádor si postupně vyvine mechanismy jak na léčbu reagovat přestane, a vyvine rezistenci. Nádorová rezistence představuje jeden ze zásadních problémů protinádorové léčby neboť většina pacientů neumírá na primární nádor, ale na nádory druhotné, které vykazují rezistenci k léčbě. Jednou z možných příčin nádorové rezistence může být speciální typ nádorových buněk nazvaných nádor-iniciující buňky nebo také rakovinné kmenové buňky. Tyto buňky vykazují znaky kmenových buněk a značnou rezistenci k protinádorovým léčivům.

Využijme všech zbraní

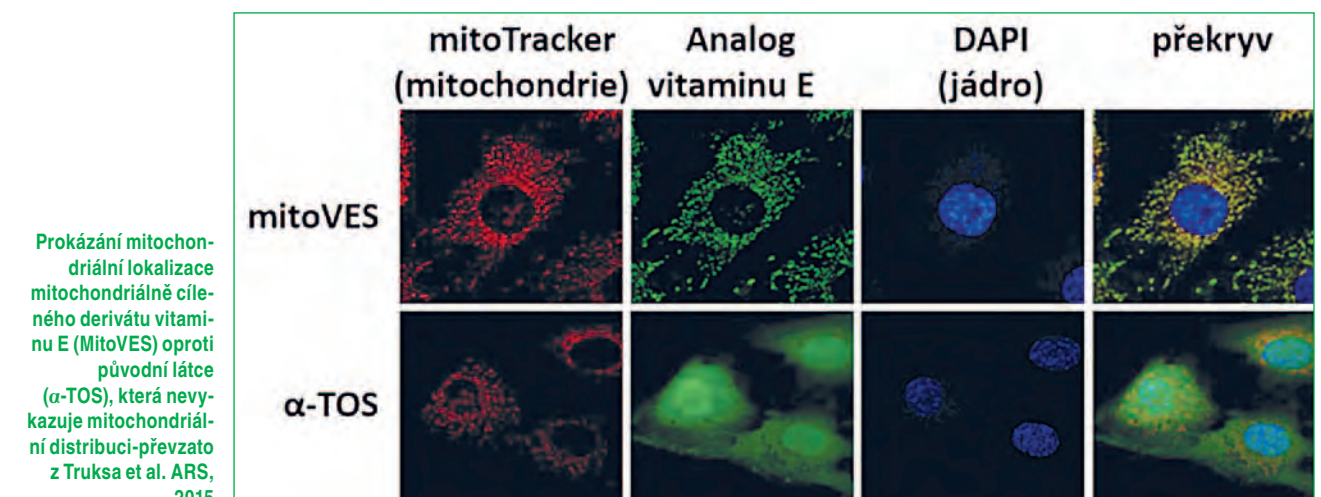
Laboratoř nádorové rezistence se zabývá biologií a charakterizováním nádor-iniciujících buněk. V laboratoři nejčastěji využíváme model takzvaných „sfér“, kdy se rakovinné buňky pěstují ve speciálním médiu a rostou jako malé „mikronádory“, tj. trojrozměrné struktury, které vykazují zvýšené množství nádor-iniciujících buněk a umožňují tak studovat jejich odlišné charakteristiky. Mezi naše výzkumné cíle patří charakterizace molekul, které se podílejí na rezistenci k léčivům - například jaké tyto buňky

exprimují tzv. ABC transportní proteiny a dále pak nalezení charakteristických znaků těchto buněk, které by se uplatnily v diagnostice a prognóze nádorových onemocnění.

Dalším zaměřením skupiny je pak vývoj a testování nových protinádorových léčiv, které jsou cílené do mitochondrií a také sledování přenosu mitochondrií mezi buňkami, obojí ve spolupráci s Laboratoří molekulární terapie.



Nádorové buňky rakoviny prsu (MCF7) a rakoviny prostaty (LNCaP) v kultuře pěstované jako buňky přisedlé buňky a jako „sféry“.



Od zdravých buněk k zdravým organismům



Vedoucí:
prof. Mikael Kubista, PhD.

Laboratoř genové exprese je v Evropě vedoucí akademickou laboratoří, která je specializována na vysoce kapacitní expresní profilování a jednobuněčnou analýzu pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Pracujeme na několika projektech základního výzkumu v oblasti vývojové biologie a kmenových buněk, a dále na aplikovaných projektech v oblasti rakoviny a neurologického výzkumu. Vytváříme také metody a aplikace pro analýzu nukleových kyselin a naším zájmem je i oblast standardizace. Laboratoř je vybavena unikátními přístroji pro izolaci jednotlivých buněk ze suspenze – přístroj CellCelector (ALS, Německo) a pro vysoce kapacitní analýzu genové exprese – přístroj Biomark (Fluidigm, USA).

Žáby jako vývojový model



Dvoudenní embryo drápatky jako model vývojové biologie

Na modelovém organismu drápatky zkoumáme v rámci projektů vývojové biologie tyto jevy:

- úlohy signalizace oxidu dusnatého při časném vývoji
- funkce oxidu dusnatého během regenerace a hojení ran
- lokalizace maternálních mRNA, miRNA a proteinů ve vajíčku a jejich distribuce mezi blastomery v časném vývoji.

Spolupracujeme s Univ. of Notre Dame, USA a Whitehead Institute, MIT, USA.

Pro obnovu nervových buněk

V oblasti neurální regenerace používáme myši a potkaní modely pro studium:

- změn genové exprese v gliových buňkách během vývoje mozku a po ischemickém poškození mozku
- změn genové exprese v gliových buňkách během stárnutí
- změn genové exprese v gliových buňkách během stárnutí u myšího modelu Alzheimerova onemocnění
- astrocytové subpopulace nalezené jednobuněčnou analýzou genové exprese
- identifikace nových markerů pro astrocyty.

Spolupracujeme s Ústavem experimentální medicíny AV ČR.

Účinněji léčit rakovinu

V oblasti výzkumu rakoviny:

- hodnotíme panel 24 markerů profilování a charakterizaci cirkulujících rakovinných buněk pro pomoc s léčbou.
- zkoumáme funkční a molekulární markery opravy DNA a miRNA v rakovinné a zdravé tkáni ve skupině pacientů s rakovinou tlustého střeva.

Spolupracující instituce: AdnaGen, TATAA Biocenter, 1. Lékařská fakulta University Karlovy, Ústav experimentální medicíny AV ČR.



Sběr jednotlivých buněk u rakoviny prostaty pomocí CellCelectoru

Molekuly života

Pro mnoho lidí slovo “molekula” představuje jen matnou vzpomínku na středoškolské studium chemie. Přesto, že molekuly tvoří svět okolo nás a vlastně i nás samotné, jen málokdy přemýšlíme nad tím, jak vlastně z jednotlivých molekul vzniká něco tak nesmírně složitého, jako je například lidský organismus. Na biomolekuly je možné se dívat jako na biologické systémy s rozměry nanočástic, které se samy umí spojovat do větších organizovaných celků a vytvářet tak živou hmotu. Ta se však zároveň neustále mění, a to rovněž činností biomolekul, které se vzájemnými interakcemi shlukují, chemicky transformují, vyrábějí nové a rozkládají staré molekuly i samy sebe. Ve všech těchto procesech je podstatné, že správné molekuly se musí vzájemně rozpoznat.

Čím jsou biomolekuly tak zajímavé?

Přes obrovský pokrok poznání v oboru molekulární biologie v posledních několika desetiletích jsme stále teprve na prahu detailního pochopení toho, jak biomolekulární procesy fungují. Výzkum a vývoj na tomto poli má potenciál přinést úplně nové aplikace, materiály, léčiva... V laboratoři studujeme dva typy biomolekul, proteiny a DNA. Metodami tak zvané řízené evoluce hledáme proteiny, které se budou vázat s vysokou specificitou na tak zvané cytokiny, proteiny vrozeného imunitního systému. U DNA nás zajímají její základní strukturní vlastnosti, které jsou důležité pro pochopení a eventuální ovlivnění genetických procesů.

Protože se jak proteiny, tak DNA v průběhu evoluce vyvinuly

Investice, která se vyplatí

Abychom v našem výzkumu drželi krok se světem, musíme používat nejmodernější experimentální a výpočetní přístupy. V tomto směru je velkou výhodou, že naše laboratoř je součástí nově vybudovaného centra BIOCEV, vybaveného špičkovými přístroji a technikou. Věda je v dnešní době mezinárodní, nutností je proto spolupráce s předními domácími i zahraničními pracovišti v oboru.



ve vodním prostředí, chceme se co nejdříve dozvědět i o jejich interakcích s vodou a rozpuštěnými ionty.



V laboratoři se podařilo vyřešit dosud neznámou strukturu receptoru 2 interferonu gamma. Hlavní řetězec proteinu je znázorněn zeleně, bílá plocha naznačuje povrch proteinové molekuly. Červeně jsou zvýrazněny postranní řetězce aminokyselinového motivu, který receptor stabilizují. Struktura byla deponována do Protein Data Bank pod kódem 5eh1.

Od základního výzkumu k praktickému využití

Studium biomolekul je v mnoha ohledech fascinující intelektuální činností. Vědci sami si dobře uvědomují, že ze společenského hlediska uspokojení jejich touhy po poznání není tou hlavní motivací, proč vědu podporovat. Tou jsou praktické výstupy vědy. V naší laboratoři studujeme biomolekulární systémy, u kterých je reálné předpokládat, že jejich poznání, či modifikace jejich funkce povedou k vývoji diagnostických, léčebných, nebo biotechnologických prostředků. V současné době nejvíce pozornosti věnujeme návrhu a dalšímu výzkumu molekul, které blokují biologické působení již zmíněných cytokinů, jež mohou způsobovat závažná autoimunitní onemocnění jako je lupénka či Crohnova nemoc.



Vedoucí:
doc. Ing. Bohdan Schneider, CSc.

Proteiny šité na míru

Proteiny tvoří základní stavební a metabolickou složku každého živého organismu a ovlivňují jeho stav při zdraví i vzniku nemoci. Oblast proteinového inženýrství se zabývá výzkumem jednotlivých proteinů jak z hlediska struktury, tak i funkce a její součástí bývá cílená úprava proteinových molekul vedoucí ke zlepšení jejich vlastností, např. vyšší specifity při mezimolekulárních interakcích, zvýšení vazebné afinity ke zvolenému molekulárnímu terči nebo navození požadované blokační funkce. Laboratoř inženýrství vazebných proteinů se zabývá nejen „molekulárním designem“, tedy molekulární úpravou daných proteinů nebo jejich jednotlivých domén pomocí genové fúzní techniky s případným využitím počítačového modelování, ale především přípravou a studiem nových vazebných proteinů selektovaných z vysoce komplexních sbírek vazebných molekul, tzv. proteinových knihoven.

Pro lepší diagnostiku

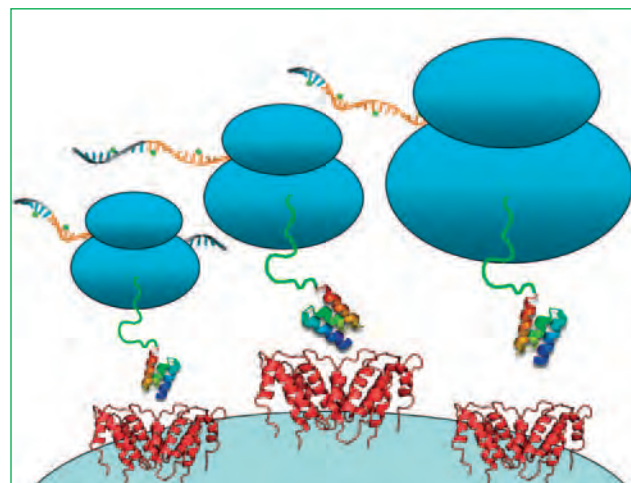
V laboratoři byl zaveden model albumin vázící domény (ABD), části povrchového proteinu G z bakterie streptokoka, který slouží jako základní strukturní koncept (tzv. scaffold) pro tvorbu kombinatoriálních knihoven s teoretickou komplexitou až sto biliónů variant. Zvolením daného proteinu jako molekulárního terče lze vysoce účinným selekčním způsobem identifikovat sbírku vysoce vazebných variant, které jsou dále analyzovány z hlediska sub-

strátové specifity, biochemických vlastností a biofyzikálních parametrů, např. teplotní stability, kinetiky vazby se svým molekulárním cílem nebo schopnosti tvorby multimerů. V průběhu posledních let se podařilo na zavedeném modelu ABD knihovny vyselektovat a charakterizovat vysoce afinní proteinové varianty vážící lidský interferon gama, ale i varianty rozpoznávající několik sérových nádorových znaků využitelných k vývoji nových biosenzorů k účinnější a komplexnější diagnostice rakoviny prostaty.

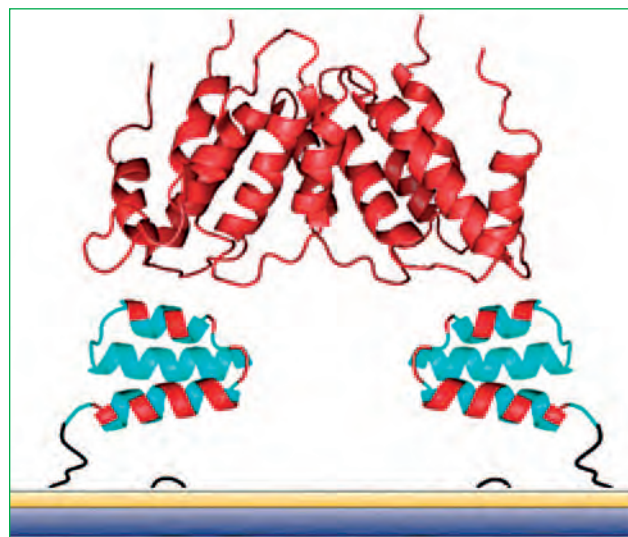
NE autoimunitním onemocněním!

Zvláštní význam mají také námi vytvořené blokační vazebné proteiny cílené na lidský cytokin IL-23 a jeho receptor (tzv. ILP a REX ligandy), které blokují vazbu cytokínu na buněčný receptor, a tím ruší klíčovou signalizaci do buněčného jádra T lymfocytů a následnou sekreci zánětlivých modulatorů ovlivňujících

vznik a průběh autoimunitních onemocnění. Tyto ligandy jsou patentově chráněny jako možné terapeuticky využitelné proteinové alternativy protilátek užitečné například k vývoji zevních léků k léčbě lupénky.



Ribosomální komplexy produkují na základě genetické informace nesené informační RNA danou variantu vazebného proteinu, který je testován na vazebnou schopnost k ukotvení proteinovému terči. Přichycené varianty jsou dále pomnoženy a jejich genetická informace identifikována sekvenováním.



Příklad využití nového vazebného proteinu jako specifické kotvy na povrchu mikrofluidního čipu vyvazujícího daný diagnostikovaný cíl ze séra testovaného jedince.

Biologické funkce tkví v přesném uspořádání atomů a molekul a jejich interakcích

Zobrazení struktury biologických molekul pomocí monokrystalové rentgenové difrakce umožňuje vysvětlovat principy funkce proteinů pomocí detailů uspořádání jejich atomů. V Laboratoři struktury a funkce biomolekul studujeme doposud neznámé enzymy a receptory pomocí krystalografie. Vyhodnocujeme atomární detaily a objasňujeme vlastnosti proteinů s praktickou aplikací. Výsledky nacházejí uplatnění ve vývoji léčiv (inhibice retrovirů, plísňová onemocnění, rakovina), v imunologii (receptory imunitního systému) a při zpracování potravin a nebezpečných látek (enzymatické zpracování a ochrana potravin, degradace bojových látek).

Vrozená obrana proti nemocem

Interakce proteinů hrají zásadní roli v imunitním systému člověka. Při kontaktu musí buňka vrozeného imunitního systému rozpoznat normální buňku organismu od infikované nebo rakovinné buňky. Rozhodující jsou interakce mezi povrchovými receptory a ligandy. Pokud receptor přirozené zabíječské buňky vyšle své buňce signál k likvidaci nepřítele, je vypuštěn komplex proteinů způsobující rozklad kontrolované buňky. Ve spolupráci s PŘF UK v Praze a MBÚ AV ČR jsme určili strukturu a s ní související vlastnosti ligandů a receptorů C-lektinového typu zabí-

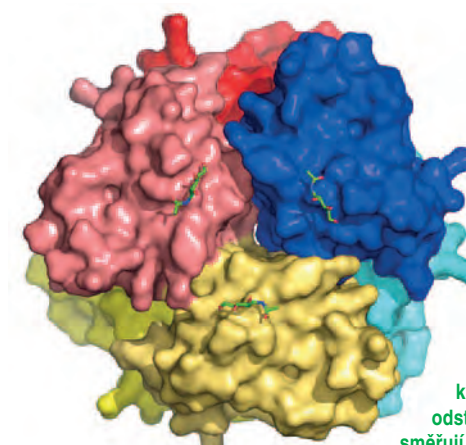
ječských buněk: myši C-1rb, myši NKR-P1A, lidský LLT1. Cílem studií je zjištění interakčních detailů a využití nových znalostí ve prospěch zdraví člověka.

Spojenými silami

Laboratoř zásadně přispěla ke zřízení Centra molekulární struktury Biocev. Spolupracuje s evropskou infrastrukturou Instruct, University of Oxford a University of York. Součástí našich studií jsou i nové enzymy pro biotechnologie ve spolupráci s Novozymes A/S v Kodani.

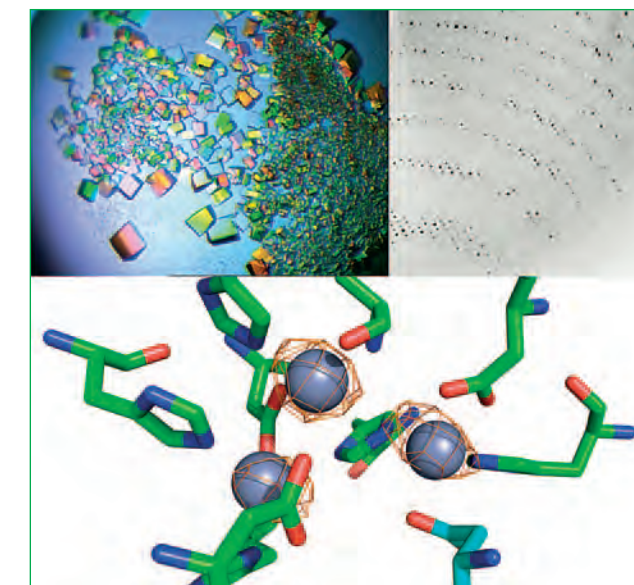
Nejen proti rakovině

Enzymy zajišťují dramaticky zvýšenou efektivitu nezbytných chemických reakcí pomocí přesného uspořádání klíčových chemických skupin. Nukleázy typu I využívají rostliny k nespecifickému štěpení nukleových kyselin při zajištění řízeného odumírání tkání. Ve spolupráci s ÚMBR AV ČR a VŠCHT jsme určili strukturu multifunkční nukleázy s protirakovinnými účinky typu 1 z rajčete a objasnili její stabilitu a principy specifity. Obdobné enzymy využívají i patogeny člověka, například Legionella a Leishmania. Jejich studiem chceme přispět k boji proti významným onemocněním.



Krystalová struktura extracelulární části ligandu LLT1 lidského receptoru zabíječských buněk. Je znázorněn povrch uspořádání tří dimerů proteinu, každý dimer je v různých odstínech jedné barvy. Dimery směřují svými obvyklými interakčními povrchy dovnitř hexameru a mimo

hexamer pak glykosylační řetězce tohoto proteinu – tyčinkami je zobrazena první jednotka N-acetylglukosaminu.



Vlevo nahoře: Krystaly proteinu (flavinová oxidáza) v polarizovaném bílém světle. Vpravo nahoře: Záznam monokrystalové rentgenové difrakce enzymu. Dole: Využití anomálního rozptylu v krystalografické analýze umožňuje přesnou identifikaci iontů zinku v aktivním centru rostlinné multifunkční nukleázy TBN1; kuličky znázorňují pozice iontů zinku, tyčinkový model okolní aminokyselinové zbytky a síť konturu elektronové hustoty, která odpovídá signálu anomálního rozptylu zinku při dané vlnové délce rentgenového záření a identifikuje prvek a jeho prostorové souřadnice.

Metalohydrolasy jako cíle pro diagnostiku a terapii nádorů



Vedoucí:
RNDr. Cyril Bařínka, Ph.D.

K dosažení prvního cíle využíváme široké spektrum experimentálních přístupů zahrnujících produkci rekombinantních proteinů v různých expresních systémech (bakteriální, kvasinkové, hmyzí a savčí tkáňové kultury), jejich purifikaci a následnou biofyzikální a biochemickou charakterizaci. Pomocí moderních metod molekulární biologie pozměňujeme strukturu přirozeně se vyskytujících proteinů a sledujeme vliv daných mutací na jejich fungování. Enzymová aktivita a substrátová specifita

Laboratoř strukturní biologie se zabývá studiem metalohydrolas, zejména pak skupinou deacetylasy histonů a proteasami rodiny M28 (například membránovým antigenem specifickým pro prostatickou tkáň – PSMA). Mutace nebo abnormální produkce těchto enzymů jsou spojovány s procesy nádorového bujení a množstvím neurologických poruch včetně např. Alzheimerovy choroby, schizofrenie nebo amyotrofické laterální sklerózy.

Výzkumná činnost naší laboratoře si klade dva hlavní cíle: (i) pochopit roli studovaných metalohydrolas ve fyziologických a patologických procesech a (ii) vyvinout účinné látky, které specificky rozpoznávají zmíněné proteiny, a které by mohly být využity pro diagnostické nebo léčebné účely.

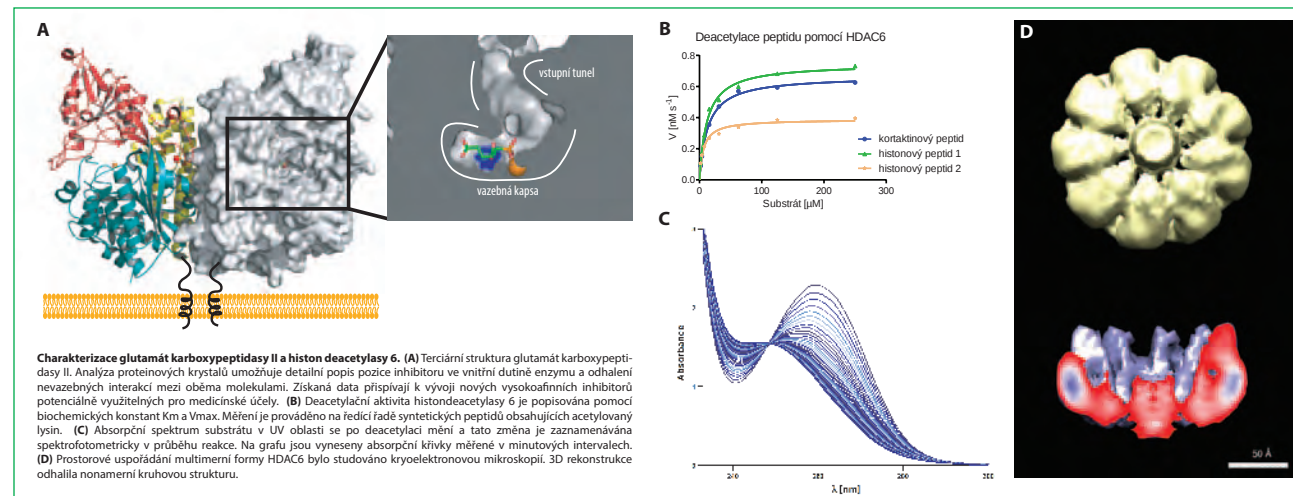
Široká škála experimentálních přístupů

jsou studovány metodami vysokorozlišovací kapalinové chromatografie, fluorescenčními technikami nebo s využitím peptidových mikročipů. Biofyzikální charakterizace zahrnuje například diferenční skenovací kalorimetrii, cirkulární dichroismus nebo povrchovou plasmonovou rezonanci. Primárním nástrojem pro studium trojrozměrné struktury studovaných proteinů a jejich interakcí s účinnými látkami jsou pak elektronová mikroskopie a proteinová krystalografie/rentgenostrukturní analýza.

Rozpoznat a vyléčit

Poznatky získané při základní charakterizaci studovaných proteinů dále využíváme k vývoji nástrojů (t.j. malých molekul nebo makromolekul) využitelných ve výzkumu nebo v klinické praxi. Tento aplikovaný výzkum provádíme ve spolupráci s výzkumnými centry a komerční sférou v České republice i v zahraničí. Ve spolupráci s našimi zahraničními kolegy jsme například vyřešili trojrozměrné struktury několika desítek komplexů PSMA s malými mo-

lekulami, z nichž některé jsou používány pro detekci nádorů prostaty v klinické praxi. S Technickou univerzitou v Mnichově jsme nedávno podali evropskou patentovou přihlášku popisující vývoj vysokoafinních makromolekul rozpoznávajících PSMA využitelných u onkologických onemocnění. V našich projektech se tak snažíme překračovat hranice základního výzkumu a získané zkušenosti využívat pro aplikované projekty v biomedicině.



Zajišťují tvar i pohyb buňky

Strukturní proteiny, jež tvoří základ cytoskeletálních sítí, zajišťují rigiditu buněčnému obsahu a jsou zároveň schopné, jako celek, vytvářet mechanické síly. Tato role cytoskeletu je nezbytná pro celou řadu základních buněčných procesů, jakými jsou na příklad buněčné dělení nebo buněčný pohyb (Civelekoglu-Scholey & Scholey 2010; Abu Shah & Keren 2013). Mechanické síly jsou vyvíjeny dvěma základními způsoby, pomocí cytoskeletálních vláken, které rostou a smršťují se a pomocí proteinů, jež se na tyto cytoskeletální vlákna váží a jsou schopny těmito vlákny pohybovat, jako jsou na příklad molekulární motory. Jakými mechanismy tyto jednotlivé prvky spolupracují na vyvíjení mechanických sil a jak se vzájemně regulují tak, aby byl zajištěn bezchybný průběh buněčných procesů, však není zcela známo.

Chápeme stále složitější celky

Abychom odpověděli na tyto otázky využíváme v našem výzkumu strategii stavění zkoumaného systému "zdola-nahoru". Izolujeme jednotlivé strukturní proteiny, jednotlivé prvky daného systému, které pak kombinujeme in vitro do funkčních systémů (Liu & Fletcher 2009). Takto rekonstituované systémy pak zkoumáme pomocí pokročilých biofyzikálních metod s rozlišením na úrovni jedné molekuly. Pro tyto experimenty využíváme mikroskopické techniky umožňující sledovat jednotlivé molekuly (Joo et al. 2008) a optickou pinzetu, kterou můžeme manipulovat mi-

kro-objekty pomocí zaostřeného laserového paprsku (Moffitt et al. 2008). Simultánní kombinací těchto dvou metod můžeme současně manipulovat s jednotlivými molekulami, měřit síly, které tyto molekuly vyvíjí a pozorovat lokalizaci jednotlivých zkoumaných molekul v prostoru během celé studované situace. Naším cílem je kvantitativně porozumět molekulárním mechanismům, jež tvoří základ zkoumaného cytoskeletálního systému. Za tímto účelem doprovázíme naše experimenty matematickým modelováním.

Princip pohybu odhalen

Touto kombinací experimentálních a teoretických přístupů se nám podařilo na příklad ukázat, že vzájemný pohyb cytoskeletálních vláken může být poháněn analogickou silou, která žene píst v plynu naplněném válci (Lansky et al. 2015). Zjistili jsme, že cytoskeletální proteiny, které jsou uzavřeny v prostorech mezi cytoskeletálními vlákny, v němž se difúzně pohybují (Braun et al. 2011), vyvíjejí na tyto vlákna tlak podobně jako částice plynu v uzavřeném prostoru. Tento tlak, který se nám podařilo změřit, je natolik velký, že dokáže těmito vlákny pohybovat a může být tedy důležitým faktorem při přeskupování cytoskeletu během života buňky. Naš přístup takto umožňuje pochopit detailní souhru jednotlivých složek, které vyvíjí mechanické síly uvnitř buňky, čímž postupně získáváme ucelený pohled na procesy jež v buňce zajišťují cytoskeletální síť a strukturní proteiny.

CHCETE-LI VĚDĚT VÍCE:

Lansky Z et al., Cell 2015, 160 (6), 1159-1168.

Vzájemný pohyb cytoskeletálních vláken poháněný tlakem difundujících proteinů. a) Mikroskopické snímky dvou cytoskeletálních vláken v čase $t = 0$ až 15 minut. Jedno vlákno je pevně přichyceno k podložce. Toto vlákno je ležce červené a jeho konce jsou vyznačeny bílou čárkovanou čarou. Druhé vlákno (sytlé červené) se pohybuje podél pevně přichyceného vlákna. Síla působící tento pohyb je tvořena cytoskeletálními proteiny Ase1 (označeny zeleně), které se difúzně pohybují v prostoru mezi vlákny. b) Náčrt experimentu prezentovaného v panelu a). c) Makroskopická analogie experimentu v panelu a), difundující částice plynu působí tlak v uzavřeném prostoru válce. Tento tlak se projevuje pohybem pístu.



Vedoucí:
RNDr. Zdeněk Lánský, Ph.D.

