Excelentní věda ve prospěch moderní společnosti

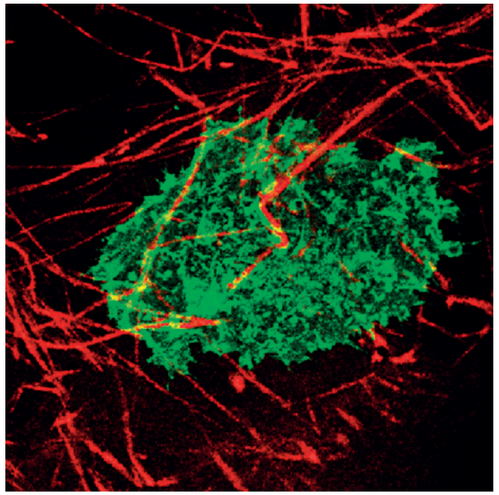
V centru BIOCEV působí více jak 400 vědců a studentů. Do roku 2020 by měl počet stoupnout na 600. Výzkumné týmy publikují ročně kolem 200 odborných článků, včetně publikací v prestižních zahraničních časopisech jako Cell, Nature Communication, Proceedings of the National Academy of Sciences, The American Journal of Human Genetics, Gastroenterology nebo Chemical Science. Každý rok dokončí v BIOCEV doktorská studia desítka studentů. V oblasti spolupráce s firmami získá centrum zakázky smluvního výzkumu v objemu kolem 15 milionů korun ročně. Mezi nejvýznamnější výstupy za poslední rok patří například vývoj látky, která dokázala úplně zneškodnit nádorové buňky u jedné z nejagresivnějších forem rakoviny prsu, nebo zcela nová skupina antibiotik, použitelných proti malárii, streptokokovým či stafylokokovým infekcím.

Buněční biologové z centra BIOCEV a King´s College deklarovali a definovali zcela novou kategorii protinádorových látek

V časopise Trends in Cancer nakladatelství Cell Press vyšla koncem května 2017 Perspektiva publikovaná mezinárodním týmem pod vedením docenta Jana Brábka (korespondující autor), docenta Daniela Rosela z katedry buněčné biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a BIOCEVu a doktorky Victorie Sanz-Moreno z King´s College v Londýně: MIGRASTATICS – anti-metastatic and anti-invasion drugs: promises and challenges (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405803317300857)

Proč je potřeba nová kategorie protinádorových látek?

Jan Brábek, vedoucí skupiny BIOCEV – Molekulární a buněčné mechanismy invazivitu nádorových buněk: Za devadesát procent úmrtí u pevných nádorů je zodpovědná invazivita nádorových buněk a metastázování. V současné paletě protinádorových terapií však zcela chybí specifická kategorie léků, cílících právě na invazivitu a metastázování. V naší studii razíme název „migrastatika“ pro látky inhibující všechny způsoby invazivity a metastázování nádorových buněk, abychom tyto látky odlišili od standardně používaných cytostatik, cílených hlavně na potlačení proliferace buněk. Jako vhodné zásahové cíle pro migrastatika navrhujeme polymeraci aktinu a kontraktilitu buněk a uvádíme přehled kandidátních látek s migrastatickými účinky. Kritické zhodnocení možnosti použití migrastatik je velmi důležité, jelikož v případě, že se osvědčí, může nasazení migrastatik do léčby znamenat průlom v léčbě pevných nádorů. Na tomto místě bychom rádi zdůraznili zásluhy všech vědců z oblasti biomedicíny, pracujících v oblastech migrace, invazivity a metastázování nádorových buněk, mediciálních chemiků i klinických onkologů, jejichž práce nám umožnila přijít s novým konceptem léčby pevných nádorů.



Vizualizace buňky lidské fibrosarkomové linie HT-1080 uvnitř kolagenové sítě pomocí konfokální mikroskopie. Červeně jsou značená vlákna kolagenu. Zeleně, pomocí GFP, je zobrazena lokalizace membránově vázané proteázy MT1-MMP, která patří mezi nejvýznamnější proteázy pro invazivitu nádorových buněk.

Navrhujete tedy nahradit současnou terapii u pevných nádorů léky s migrastatickými účinky?

JB: Je třeba zdůraznit, že cílem není nahradit cytostatickou terapii, ale doplnit ji. Kombinace migrastatik s cytostatickými léky se vskutku jeví jako velmi slibný přístup pro léčbu metastázování.

Interakce migrastatik s dalšími skupinami protinádorových léčiv nabízí velké příležitosti pro synergické zásahy proti nádorovým buňkám. Migrastatika cílená na polymeraci nebo dynamiku aktinu mohou být použita ke zvýšení účinnosti fyzikálně-chemických přístupů, v jejichž důsledku dochází k narušení cytoskeletu buněk, jako jsou ozařování nebo sonodynamická terapie. Kombinace migrastatik s dalšími látkami cílícími na cytoskelet může rovněž vést k účinným chemoterapeutickým protokolům. Jelikož mnoho migrastatik zasahuje cytokinezi, kombinace s látkami zasahujícími dynamiku mikrotubulů, které brání mitóze, povede k účinnější inhibici proliferace nádorových buněk. Buňky, vystavené migrastatikům, která zasahují dynamiku aktinu, vykazují významně zvýšenou aktivitu mitochondrií, což je činí potenciálně citlivějšími k látkám, zasahujícím metabolismus mitochondrií. Jelikož nádorové buňky vystavené migrastatikům, která inhibují cytokinezi mají vysoce narušený cytoskelet díky inhibici polymerace aktinu a jsou vícejaderné v důsledku rychlého dělení jader, mohou být potenciálně mnohem citlivější k látkám cíleným na metabolismus nukleotidů. Migrastatika, cílená na kinázy ROCK jsou navíc schopná i přímo inhibovat proliferaci a růst nádorů v myši. Na základě uvedených evidencí jsme přesvědčeni, že migrastatika mohou doplnit současnou paletu protinádorových léčiv, a být součástí komplexnějších a efektivnějších léčebných přístupů.

Proč myslíte, že je lepší zasahovat finální efektorové mechanismy nádorové invazivity než jim nadřazenou regulační signalizaci? Jak je to s možnou rezistencí k migrastatikům (oproti standardní cytostatické terapii)?

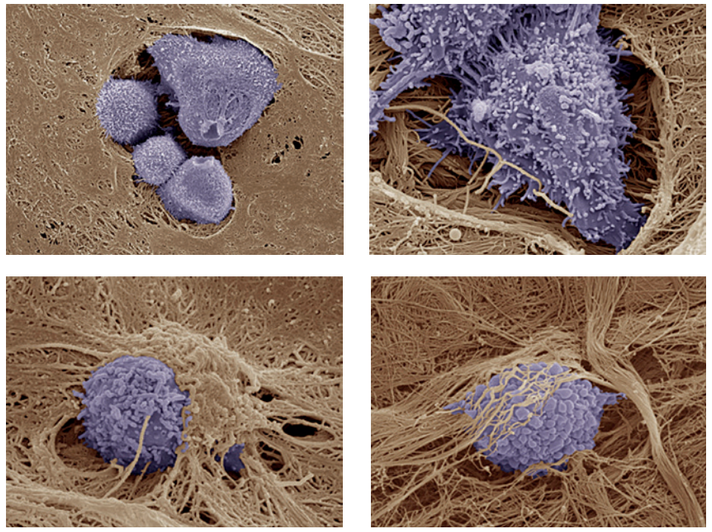
Signální dráhy, regulující migraci buněk jsou vysoce redundantní a inhibice kterékoli konkrétní dráhy proto vede téměř nevyhnutelně k rezistenci. Proto navrhujeme, aby migrastatika zasahovala finální efektorové mechanismy buněčné migrace jako je polymerace aktinu a kontraktilita buněk. Pro nádorové buňky je téměř nemožné nahradit inhibovanou aktinovou polymeraci nebo vyvinout alternativní kontraktilní aparát. Aktinová polymerace a kontraktilita navíc splňují požadavky na ideální cíle pro migrastatika, jelikož jsou nezbytné pro všechny typy invazivity nádorových buněk, bez ohledu na jejich závislost na proteázách. Zásadní výhodou oproti cytostatikům je, že rezistence k migrastatikům, i pokud by byla získána, neudělí nádorové buňce proliferační výhodu!

Co vidíte jako největší překážku pro přenos migrastatického konceptu do klinické praxe?

Každá stříbrná obruba má svůj mrak☺ Hlavním problémem jsou v tuto chvíli regulační koncové body pro klinické testy migrastatik. Zmenšování nádorů je stále ještě hlavním regulačním koncovým bodem v klinických testech u pevných nádorů. I pokud migrastatika budou fungovat v klinických testech tak jak byla navržena, zmenšení nádorů je nepravděpodobné, a proto nebudou schválena. Je třeba mít na paměti, že biologie není předmětem regulace, je to naopak. Nyní víme, že zmenšování nádorů neodráží inhibici metastázování ani přerušení přirozené historie vývoje nádorového onemocnění. Při použití „úspěšné“ konvenční terapie, k progresi onemocnění (metastázování) dojde i přes zmenšení nádoru. V tomto ohledu doufáme, že s využitím pokročilých zobrazovacích metod bude v blízké době možné vyvinout nová objektivní kritéria účinnosti léčby založené na inhibici metastázování.

Díky a hodně štěstí!

Petr Solil,
vedoucí komunikace centra BIOCEV



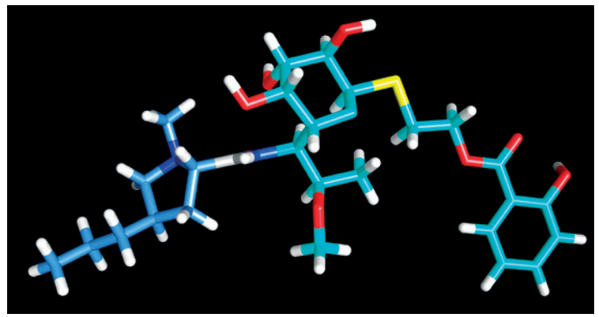
Invaze fibrosarkomových buněk do bezbuněčné dermis, zobrazená pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Nahoře: fibrosarkomové buňky mezenchymální nádorové linie, které invadují pomocí sekrece proteáz štěpící vlákna mezibuněčné hmoty. Dole: fibrosarkomové améboidní buňky, které neprodukují proteázy, se mezi vlákna mezibuněčné hmoty dostávají mechanickým protlačováním.

Zdroj ke všem obrázkům: vytvořil: dr. Ondřej Tolde

Naučíme mikroorganismy vyrábět účinnější antibiotika? Klíčem je molekulární lego

Malárie, streptokokové a stafylokokové infekce. Onemocnění způsobená mikroorganismy, jejichž odolnost proti existujícím antibiotikům se podle únorové zprávy Světové zdravotnické organizace stále zvětšuje. V posledních 30 letech se na trhu neobjevila nová skupina antibiotik. Vzácné jsou i zprávy o účinnějších látkách skupin stávajících. Mikrobiologové z výzkumného centra BIOCEV však nyní byli úspěšní. Informace o jejich objevu upoutala pozornost odborné veřejnosti a dostala se i na titulní stránku květnového čísla prestižního časopisu *Chemical Science*. To se žádnému českému týmu doposud nepovedlo.

Inspirací pro originální recept na přípravu nových antibiotik bylo „molekulární lego" – stavebnicový princip, kterým půdní mikroorganismy skládají své přírodní látky. *„Podstata přípravy nových antibiotik, nazvaných CELIN a ODCELIN, spočívá v nepřírodní kombinaci CELesticetinu a LINkomycinu, dvou přírodních látek – linkosamidů, známých už od 60. let. Veškeré snahy získat účinnější linkosamidová antibiotika se logicky soustředily na chemické úpravy účinnějšího linkomycinu. Tak vznikl dnes nejpoužívanější lék skupiny – klindamycin,"* vysvětluje Jiří Janata, vedoucí laboratoře Struktura a funkce přírodních látek (Mikrobiologický ústav AV ČR v centru BIOCEV).

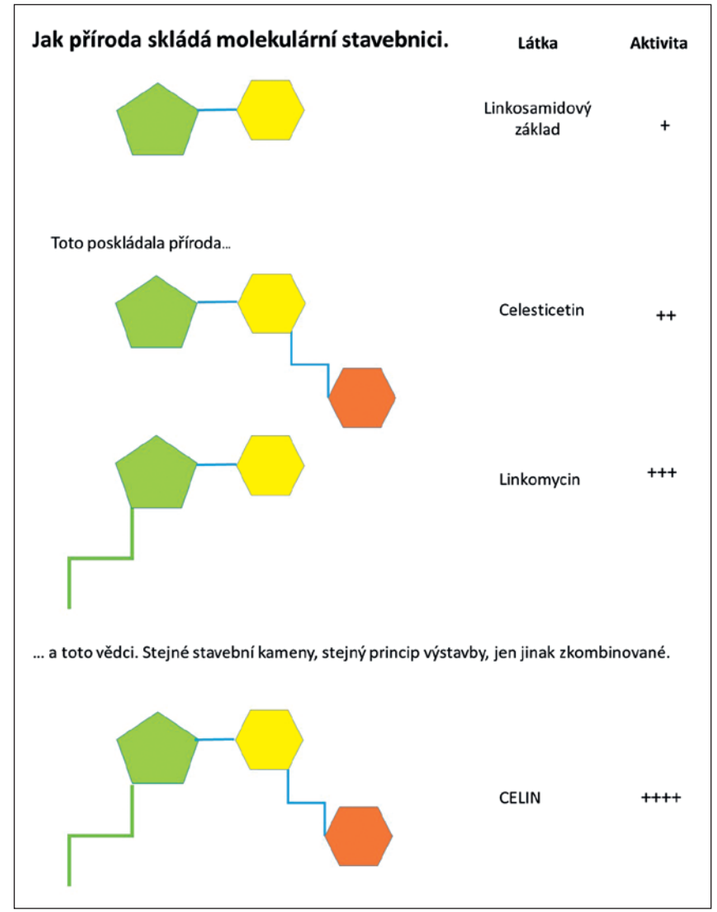


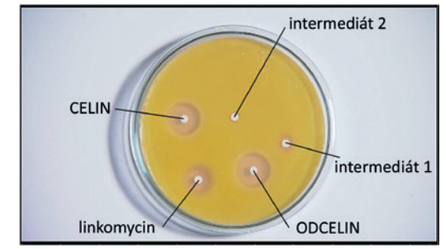
3D struktura nového hybridního antibiotika CELIN

„Kombinovat linkomycin s málo aktivním celesticetinem za celou dobu nikoho nenapadlo. Chemicky je to velmi komplikované a po celá desetiletí chyběly vědcům potřebné znalosti," dodává Jiří Janata. Vědci dokonce věří, že mohou mikroby naprogramovat tak, aby tato nová léčiva přímo vyráběly. Plánují zkombinovat geny pro linkomycin a celesticetin do jediného produkčního organismu.

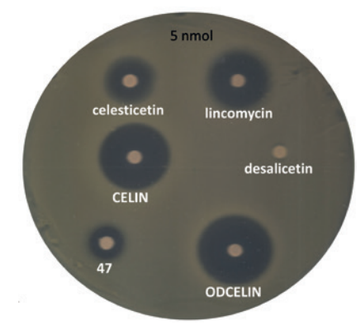
Tým Jiřího Janaty více jak deset let studoval, jakým způsobem vznikají v mikroorganismech přírodní linkosamidy. Pochopení těchto složitých procesů umožnilo vědcům najít správnou kombinaci přírodních stavebních kamenů a vytvořit nová antibiotika bez použití chemických procesů. *„Tímto krokem jsme napodobili, nebo dokonce i předběhli přírodu, kde obdobným způsobem evoluce přírodních antibiotik skutečně probíhá. Domníváme se, že námi připravené nové látky v přírodě existují, jenom je zatím nikdo neobjevil,"* doplňuje Zdeněk Kameník, jeden z autorů úspěšného článku. Samotné vědce překvapil několikanásobně vyšší antibiotický účinek v porovnání s průmyslově vyráběným linkomycinem. Nové látky si nechali patentovat a zahájili rozsáhlé testování účinků na širší skupině mikroorganismů, včetně těch odolných ke stávajícím antibiotikům. Podobným způsobem připravili více než stovku dalších látek. U některých z nich se očekává vysoká účinnost i proti malárii. Pro komerční využití však bude rozhodující, zda se podaří připravit mikroorganismy přímo produkující tyto látky. I v případě úspěšného vývoje vede k medicínsky použitelnému léčivu ještě mnohaletá práce.

„Odolnost k antibiotikům není nic nového. Spolu s existencí antibiotik jdou v přírodě ruku v ruce milióny let. Lidstvu se v polovině minulého století povedl husarský kousek. Převezli jsme lidské mikroorganismy, původce do té doby smrtelných onemocnění, když jsme na ně vyrukovali s látkami z jiného prostředí, především z půdy. Díky tomu jsme si prodloužili život o mnoho let. Bereme to jako vítězství definitivní. Jenže tak tomu není, patogenní mikroorganismy se našim antibiotikům naučily bránit. Chceme-li vítězství uhájit, čeká nás permanentní zápas spočívající ve vývoji nových látek. Délka procesu od základního výzkumu k použitelnému léčivu je 20 až 30 let. S naším objevem jsme přibližně v polovině této cesty," říká Jiří Janata.





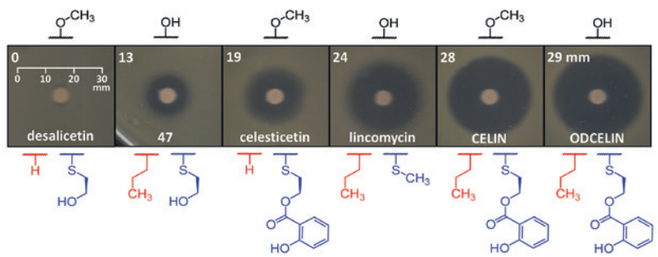
Antibakteriální (antibiotická) aktivita se stanovuje diskovým difúzním testem na Petriho miskách (obrázek nahoře), kdy je růst citlivého bakteriálního kmene (matný povrch plochy misky) inhibován testovanou látkou, jíž jsou napuštěny terčíky rozmístěné na povrchu misky. Kolem terčíků se tvoří inhibiční zóny (průhledné kruhy), jejichž plocha je úměrná antibakteriální aktivitě testované látky. Na dvojici obrázků dole je znázorněn výsledek testu pro celou sérii testovaných látek včetně popisků přímo na Petriho misce, resp. ve výřezech seřazených vzestupně dle stanovené aktivity a se znázorněním strukturních rozdílů testovaných látek.



Doplňující informace:

Odkaz na publikaci:
*http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/sc/c6sc04235j#!divAbstr**act*

Linkosamidová antibiotika *se používají mimo jiné při léčbě stafylokokových a streptokokových infekcí jako alternativa penicilinů, včetně kmenů rezistentních. Přírodními látkami jsou celesticetin a linkomycin. Linkomycin se využívá jako antibiotikum v humánní i veterinární medicíně i pro chemickou přípravu klindamycinu. Klindamycin je dnes nejúčinnější látkou skupiny, vedle aktivity antibakteriální inhibuje i některé parazity (např. Plasmodium, Toxoplasma), v kombinaci se někdy využívá i při léčbě malárie.*



Čeští vědci jsou na stopě velmi časným stavům, kdy krvetvorná kmenová buňka je náchylná k poškození DNA a to díky poznatkům získaným z transgenních myší

V centru BIOCEV v laboratořích 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy se podařilo vytvořit sérii unikátních myších modelů s cílem pochopit, jak se DNA skládá do periodických struktur v jádře kmenových buněk. Úspěch českého týmu vědců a lékařů probíhající již takřka dvacet let přinesl sérii unikátních publikací, z nichž poslední vyšla 9. března 2017 v časopise *Stem Cells*.

Kmenové buňky jsou zcela unikátní v tom, že jsou schopny vytvořit soustavným dělením sebe sama a produkcí klíčových specifikačních bílkovin celé tkáně, jako je třeba krev, srdce, či játra. Pochopení, jak kmenové buňky tohoto docílí jsou velmi důležité, jelikož lidstvo bude (a částečně již je) schopno vytvářet tkáně a orgány ve zkumavce pro rozličné transplantační a náhradové programy. V hematologii, jež nejdříve poznatky o kmenových buňkách aplikovala, jsou kmenové buňky již od padesátých let minulého století využívány k transplantaci u leukemií a lymfomů. Proces vzniku hematologických malignit je postupně odhalován. Krvetvorba je cílem rozličných mutací a recentní objevy ukazují, že až 10% zdravých jedinců v 65 letech má významně poškozenou DNA získanými mutacemi právě v kmenových buňkách." Přesto doposud nebylo jasné, proč je DNA kmenových buněk u starších jedinců k mutacím ‚náchylnější'. Výzkum v oblasti studia kmenových buněk a organizace molekuly DNA je proto naprosto nepostradatelnou součástí výzkumných programů špičkových světových laboratoří a proto je velmi důležité, že v České Republice se nacházejí laboratoře, které tuto tématiku studují a jsou schopny ve špičkových publikacích a spoluprací s laboratořemi ve světě, především v USA, tento program smysluplně rozvíjet.

Buněčné jádro obsahuje takřka 30 tisíc genů, jež se nacházejí zakódovány jazykem 4 typů písmen v celkovém počtu šesti miliard. Smysluplná informace je ale obsažena jen jedním procentem takového textu. Proto je s podivem, že se tak rozsáhlá knihovna informací neustále udržuje v takřka nezměněné formě kdykoli se buňka rozdělí. Tak například pokud normostrana textu obsahuje 1 800 znaků (symbolů a mezer), pak to ‚důležité' ze savčí DNA je napsáno asi na třiceti tisících normostranách. Pokud by měla buňka neustále číst rozsáhlé textové pole, spotřebovala by na to obrovskou energii, a proto je velmi důležité, aby existoval způsob, jak nalistovat a přečíst to důležité jako první, zatímco zbytek je ponechán mimo pozornost. Toto se ve skutečnosti děje pomocí enzymů jež jsou schopny odhalovat text zakódovaný v DNA, zatímco ostatní části DNA dokáže velmi dobře zabalit. Mezi zcela zásadní enzym těchto klíčových reakcí patří jaderná bílkovina Smarca5 (též známá pod označením Snf2h), jež patří do rodiny Helikáz/ATPáz, tedy enzymů, jež za spotřeby ATP jsou schopny manipulovat s DNA a přilehlými proteiny.

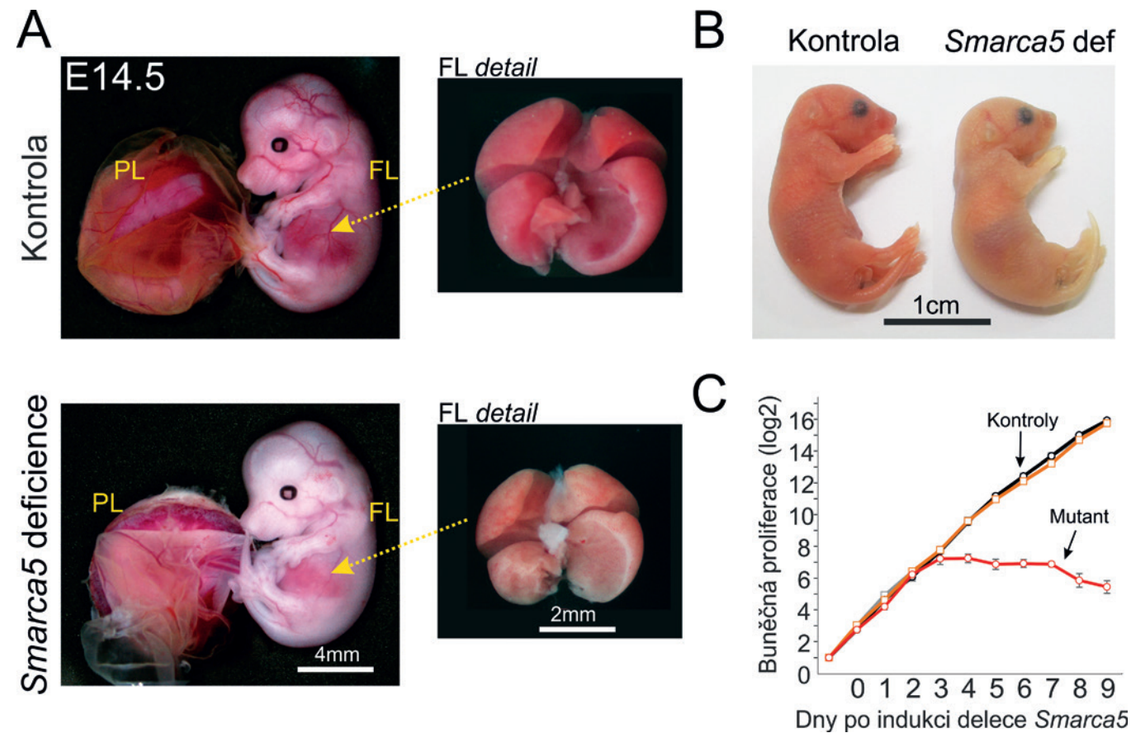
„Je nesporné, že jakákoli zásadní transakce s DNA v jádře vyžaduje, aby se Smarca5 takového procesu účastnila, a proto je výzkum v této oblasti velmi složitý" říká **prof. Tomáš Stopka**, seniorní autor publikací o Smarca5, a zároveň vedoucí laboratoře StopkaLab ve vědeckém centru BIOCEV. *„Od roku 1998, kdy jsme myší produkt Smarca5 klonovali (a popsali v roce 2000 v časopise Leukemia) ve vysoce proliferujících leukemických buňkách víme, že se jedná o naprosto zásadní protein, který, jak se ukázalo v následné publikaci v americkém časopise PNAS, zásadně souvisí s procesem regulace buněčného dělení."* doplňuje prof. Stopka. Nejnovější set publikací z laboratoře se týká studia specificity, jakou vykazuje Smarca5 v rozličných tkáních. Proto byl v laboratoři vytvořen unikátní transgenní myší model, který dokáže odstranit gen kódující Smarca5 v jakékoli tkáni, což vedlo k odhalení role Smarca5 v mozku (publikace Nature Communications), čočce (časopis Development) a zcela recentně v krvetvorných kmenových buňkách (Stem Cells 2017). Tento výzkum probíhal primárně na 1. Lékařské fakultě ve spolupráci s laboratořemi v USA, především na lékařské fakultě v New Yorku na Albert Einstein College of Medicine (AECOM).

Role Smarca5 v krvetvorbě byla testována s využitím myšího kondiciálně-delečního modelu pro Smarca5. Tento model spočívá v tkáňově-determinovaném odstranění genu Smarca5 v hematopoetických kmenových buňkách definitívní krvetvorby. Popsaný myší model je embryonálně letální, kdy jedinci umírají těsně v předporodním období v důsledku závažné chudokrevnosti (Obr. 1A). S využití dalšího myšího modelu delece Smarca5 ve vývojově pozdějších stádiích jsme zjistili, že protein Smarca5 je vyžadován pro správný vývoj červené krvetvorby (Obr. 1B). In vitro experimenty nám naznačují, že je narušeno především buněčné dělení progenitorů červené krevní řady (Obr. 1C).

Co popisuje nejnovější publikace členů StopkaLab vědeckých pracovníků Juraje Kokavce a Tomáše Zikmunda? Mezi zcela zásadní objev patří to, že proces uložení a uskladnění DNA je velmi citlivě vnímán a pokud je Smarca5 vyřazen z tohoto procesu, dochází k významně zvýšené citlivosti kmenových buněk na genotoxické procesy, třeba ozáření či chemoterapii. *„Výzkumný program samozřejmě probíhá a máme v plánu prozkoumat řadu nových aspektů výzkumu. Především nás zajímá, jaké jaderné kompártmenty se zapojují do řízení buněčného dělení pod vlivem Smarca5 a jakým způsobem lze využít fakt, že buňky jsou schopny vnímat poruchu uložení DNA podobně, jako by šlo o její poškození"*, doplňuje Prof. Tomáš Stopka. Pokud je to tak, že uložení DNA do rozličných struktur je předpokladem následného poškození DNA, pak stojíme na prahu nové epochy, kdy budeme schopni studovat skutečně velmi časné mechanizmy nádorové transformace a též iniciovat výzkum, jak lze poškození DNA účinně předejít. K tomu jistě poslouží další myší modely aktuálně připravované ve spolupráci s Českým centrem pro fenogenomiku (CCP) v prostorách Biocev pod vedením a ve spolupráci s doc. Radislavem Sedláčkem. *„Spolupráce na těchto projektech, jakým je výzkum chromatin remodelačních procesů kmenových buněk je velmi důležitá a propojuje laboratoře v rámci Biocev, což je hlavní cíl pro dosažení synergie mezi institucemi Akademie věd a Univerzity Karlovy,"* zdůrazňuje doc. Sedláček.

Autoři zmiňované publikace, T. Stopka, J. Kokavec a T. Zikmund, participují na národním projektu udržitelnosti center výzkumu LQ1604.

Více informací v publikaci: The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) is required for proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells. Kokavec J, Zikmund T, Savvulidi F, Kulvait V, Edelmann W, Skoultchi AI, Stopka T. Stem Cells, 2017 April 15; *35:1614-1623*. doi:10.1002/stem.2604



***Narušení definitívní krvetvorby u myší s tkáňově-specifickou delecí chromatin-nemodelační ATPázy Smarca5. A)** Kontrolní myší embryo (14.5 dne od oplození) s placentou a fetálními játry jako hlavními místy fetální krvetvorby. V dolní části obrázku je zobrazeno embryo stejného věku s vyřazeným genem Smarca5 v kmenových buňkách definitivní krvetvorby. Placenta a fetální játra tohoto jedince mají světlejší barvu a jeví známky chudokrevnosti. Tato embrya se vzhledem k jejich závažnému stavu nedožívají narození. B) Novorozenec s delecí Smarca5 ve vývojově pozdějších stádiích červené krvetvorby se narození dožívá i přes zjevné známky chudokrevnosti,. C) Kultivace prekurzorů červených krvinek in vitro podmínkách naznačují, že tyto buňky mají po deleci genu Smarca5 sníženou schopnost dělit se. Zkratky: FL – fetální játra, PL – placenta.*