

Jan Svoboda (1934–2017): Šedesát let s retroviry

Třináctého března 2017 se ve věku 82 let uzavřel život a dílo prof. RNDr. Jana Svobody, DrSc., předního virologa a genetika respektovaného celosvětovou vědeckou komunitou. S jeho odchodem ztrácíme vynikajícího odborníka na retroviry, který spoluvytvářel základy tohoto oboru a inspiroval generace spolupracovníků nejen vědeckými objevy, ale také nakažlivou vášní pro poznávání, svou autoritou a osobním šarmem. V rámci české vědy byl dobře znám svými zásadovými postoji a angažovaností ve prospěch Akademie věd České republiky. Celý svůj profesní život strávil na Ústavu molekulární genetiky, jehož byl v letech 1991–99 ředitelem. Práci a myšlenky J. Svobody si připomínáme i v jeho článku o reverzní transkripci na str. LXVI–LXVII tohoto čísla.

Dlouhý a barvitý život Jana Svobody byl úzce propojen s moderní historií Československa a České republiky, jak to poutavě popsal ve vzpomínkovém článku otiskném v časopise *Advances in Cancer Research* (2008) nebo v autobiografické knize *Volno-myšlenkář* (Academia, Praha 2015, viz také *Živa* 2015, 3: LX). Narodil se v Praze, ale za války vyrůstal ve vesnici Dobré Pole na Kouřimsku. Ve středostavovské rodině byl podle svých vzpomínek vychováván v demokratickém duchu a veden ke vzdělání. Rád vzpomínal na gymnaziální léta v období od osvobození Československa do komunistického únorového puče v r. 1948. Poválečné nadšení a liberalismus formovaly jeho osobnost, což mu později přineslo potíže v 50. a 70. letech.

Studoval biologii na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v letech 1952–57 a již v té době experimentoval s buňkami transformovanými virem Rousova sarkomu (RSV). Tehdy se jeho celoživotní vášní staly buněčné kultivace. Mám v živé paměti, že Jan ani v pozdních letech nelitoval času a se svou neodmyslitelnou dýmku usedal k laminárnímu boxu, aby osobně prováděl experimenty, nebo jen udržoval buněčné kultury. Jako dobrovolný pracovník se během studií dostal do skupiny Milana Haška, vynikajícího imunologa a spoluobjevitele imunologické tolerance. Prostředí v Haškově laboratoři bylo velmi stimulační, mimo jiné díky četným kontaktům se zahraničními kolegy. Jan Svoboda vzpomínal především na návštěvy Conrada Waddingtona. Diskuze s ním poskytly Janovi mnohé argumenty proti lisenkismu, který byl v té době ideologicky prosazován v celém východním bloku ovládaném Sovětským svazem. Rané práce J. Svobody publikované od r. 1953 s M. Haškem se týkaly imunologické tolerance vůči buňkám transformovaným RSV. Jeho zájem však přitahovala neobyčejná rychlost buněčné transformace a indukce nádorů *in vivo* pomocí RSV. Bylo mu jasné, že replikace RSV musí být něčím mimořádná a v tomto přesvědčení ho utvrdilo setkání se Lvem Zilberem,

Georgem Svet-Moldavským a Fjodorem Kiseljevem na transplantacní konferenci v Moskvě v r. 1957.

Klíčový objev Jana Svobody přišel s infekcí a transformací savčích hostitelů – krysy, myši a křečků, virem Rousova sarkomu. Buňky savčích hostitelů jsou pro RSV nepermissivní, virus se v nich nemůže replikovat a tvořit infekční potomstvo. Virus však šlo uvolnit, pokud byly nádorové buňky savců inokulovány do kuřat nebo pokud byly fúzovány s neinfikovanými, ale permissivními kuřecími buňkami. Virus tedy setrval v savčích buňkách v inaktivním stavu, aby mohl být posléze uvolněn. Toto záhadné chování RSV, nazývané virogenie, bylo vysvětlováno analogicky s lyzogenií fágů a bylo navrženo, že retrovirus zůstává ve formě DNA jako provirus začleněný do DNA hostitele. Jan Svoboda do analýzy virogenie u buněčné linie XC zainteresoval i slovenské kolegy, např. Dušana Šimkoviče. Byl v té době rovněž v korespondenčním styku s Howardem M. Teminem. V r. 1963 navštívil mezinárodní konferenci o ptačích nádorových virech v Durhamu (Severní Karolína, USA), kde se setkal s Harry Rubinem, H. M. Teminem, Peterem Vogtem, Hidesaburo Hanafusou aj. Od té doby byl v těsném kontaktu s kolegy z USA a západní Evropy, a pražské izoláty RSV stejně jako virogenní buněčná linie XC se staly užitečnými nástroji v mnoha laboratořích.

V průběhu 60. let Jan Svoboda nashromáždil dostatek podkladů na podporu provirové hypotézy prostřednictvím několika modelů virogenních buněk. Přesto byl spolu s Teminem jediným obhájcem hypotézy, a to až do objevu reverzní transkriptázy v r. 1970, učiněného nezávisle v laboratořích Howarda M. Temina a Davida Baltimore (Wisconsin University, Madison a Massachusetts Institute of Technology, Cambridge). Reverzní transkriptáza konečně představovala biochemický mechanismus pro přepis RNA na DNA a její objev byl po zásluze oceněn Nobelovou cenou. Temin ve své nobelovské přednášce vyzdvihl zásluhu Jana Svobody a prohlásil, že jeho přístup s pomocí kryších buněk infikovaných RSV vedl k nezávislému návrhu provirové hypotézy. Na východní straně železné opony nebyly podmínky pro biochemický výzkum reverzní transkriptázy, Jan se soustředil zejména na biologický průkaz proviru. Tím spíše, že ani objev reverzní transkriptázy neznamenal definitivní důkaz provirové hypotézy, mimo jiné protože původní preparáty byly schopny přepisovat jen krátké molekuly RNA. Proto navázal spolupráci s Miroslavem Hillem a plánoval uvolnění viru pomocí transfekce DNA virogenních buněk XC.

Slibný vývoj ale převala sovětská okupace Československa v r. 1968. Kritické transfekční pokusy nemohly být provedeny v Praze a později byla experimentální práce čím dál tím obtížnější kvůli emigraci



1 Jan Svoboda přednáší během Slovenských onkologických dnů v Bratislavě v r. 1964. Foto z archivu autora

2 V r. 2016 byl prof. Jan Svoboda zvolen zahraničním spolupracovníkem Národní akademie věd USA. Osobně mu k tomuto ocenění blahopřál tehdejší velvyslanec USA u nás Andrew Schapiro. Foto V. Černoch, AV ČR

kvalifikovaných spolupracovníků, nedostatku specializovaných materiálů a přístrojů a rovněž kvůli přímým represím normalizačního režimu. Navzdory tíživé situaci Jan Svoboda nerezignoval, znovu kolem sebe soustředil výzkumný tým a podstatným způsobem zasáhl do další významné kapitoly v retrovirologii – objevu onkogenu *v-src*. Tento objev opět vycházel ze studia savčích buněk infikovaných a transformovaných RSV. Některé buněčné linie neuvolňovaly virus ani po fúzi s kuřecími buňkami, ačkoli z jejich nádorové přeměny bylo jasné, že obsahují provirus RSV. Úspěch přinesly teprve kuřecí buňky předem infikované netransformujícím, ale replikačně kompetentním leukózyrovým retrovirem. Skupina J. Svobody popsala řadu takových tzv. kryptovirogenních buněčných linií a některé z nich obsahovaly jen malou část proviru RSV. Z těchto dat bylo zřejmé, že za přeměnu buněk odpovídá jistá část proviru, zbytek obstarává replikaci viru a kóduje tedy strukturní virové bílkoviny a enzymy, např. reverzní transkriptázu. Odtud byl již jen krok k charakterizaci transformační části RSV a k definici onkogenu *v-src*. Zde opět sehrály roli lepší materiální podmínky pro výzkum v USA a v západní Evropě, takže poslední fázi v objevu onkogenů ovládli zejména Michael Bishop, Harold Varmus a Dominique Stéhelin (University of California San Francisco a Institute Pasteur, Lille). Transdukcí onkogenů a Janovy myšlenky se staly nicméně jednou z inspirací pro koncept retrovirových vektorů. Zjednodušený retrovirus, který obsahuje pouze regulační sekvence viru, může podobně jako onkogen přenášet geny kódující např. prakticky zajímavé, nebo terapeutické bílkoviny, pokud je jeho množení

a infekce podporována tzv. pomocným virem. Mimořádně důležitý v tomto úsilí byl provirus H-19 – jak prokázaly pozdější analýzy, zahrnuje integrovaný sestřížený transkript *v-src* a definuje tak minimální autonomní transformující jednotku RSV.

V 80. letech již represe komunistického režimu polevily a Jan Svoboda mohl opět cestovat do zahraničí a znovu navázat ztracené kontakty. V té době strávil dva roky jako hostující profesor na University of Missouri v americkém městě Columbia. Experimentálně zde pracoval na projektech započatých v Praze a živě si vzpomínám, jak v té době řídil chod laboratoře častými dopisy s detailními instrukcemi. Jeho návraty do Prahy pro nás vždy znamenaly malou slavnost. Přivázel krabice se suchým ledem napěchované enzymy, kity (laboratorními soupravami) a čistými chemikáliemi, u nás v té době prakticky nedostupnými. Díky tomu jsme byli schopni udržet výzkum v některých směrech, zároveň jsme si uvědomovali technologické zaostávání za západem a nutnost koncentrovat se na témata vycházející z našich tradičních modelů. Retrovirologická scéna se rychle změnila s objevem lidských retrovirů, HTLV a HIV. Jan Svoboda byl v kontaktu s objevitelskými týmy, zejména s Jean-Claude Chermanem v Paříži a Mikulášem Popovičem v National Institute of Health v Marylandu (USA). Druhý z nich byl dříve Svobodovým spolupracovníkem z Bratislavy. Jan od počátku zvažoval studium mezidruhového přenosu HIV-1, to bylo ovšem v našich podmínkách nemožné. Místo toho jsme se věnovali vysoké frekvenci reverze transformovaného fenotypu u buněčné linie H-19. Ve spolupráci s Johnem Wykem v Glasgow jsme popsali, že jde o epigenetickou záležitost – transkripční umlčení proviru doprovázené metylací DNA. Stejně mechanismy byly později prokázány i při latenci HIV. Latentní, tedy transkripčně umlčené proviry nemohou být zasaženy antiretrovirovou terapií a jsou zdrojem opětovné infekce v případě, že pacient vysadí léčbu. V současnosti se mechanismy latence intenzivně studují, protože nabízejí do budoucna strategii k vyléčení pacientů infikovaných HIV-1.

Dobře si pamatuji Janovo úsloví „stick to your guns (drž se svých pistolí)“, kterým nám mladším doporučoval, abychom rozpracovávali vlastní témata vycházející z našich modelů a metodických přístupů. Zavrhoval „nastupování do rozjetého vlaku“ čili *ad hoc* zachytávání mainstreamových témat a jejich opakování vždy, když se objeví nové a moderní metody. Jeho modelem byl RSV a ostatní ptačí nádorové a leukózní viry v savčích nebo kuřecích buňkách. Výborně využil možnosti drůbeží farmy Ústavu molekulární genetiky v Kolči u Prahy, kde již od 50. let udržují a studují inbrední linie slepic. Inbrední, tj. díky příbuzenské plemenitbě geneticky homogenní, a definované linie byly potřebné pro experimentální studium imunologické tolerance, např. i pro pokusy s parabiotickým propojením kuřecích embryí prováděné M. Haškem. Později byly nově vytvářené „pražské“ inbrední linie hojně využívány pro imunogenetická studia a popis kuřecího histokompatibilního systému, který je mnohem jednodušší než obdobný systém savčí a který umožnil snazší pochopení funkce jeho jednotlivých genů. Inbreeding však též umožnil segregaci alel genů kódujících receptory pro ptačí retroviry, takže jednotlivé linie mohou být buď rezistentní, nebo citlivé ke konkrétním izolátům RSV. Tímto způsobem se podařilo definovat několik podskupin RSV a ostatních ptačích virů a začaly být popisovány jednotlivé receptorové molekuly. Zejména tak byla objevena receptorová molekula pro podskupinu C. Jana Svobodu rovněž zajímaly otázky protinádorové imunity, především jak imunitní odpověď proti nádorům ovlivňují onkogeny coby neoantigeny. Tyto otázky inspirovaly pokusy s indukcí nádorů pouhou inokulací DNA klonovaného onkogenu *v-src*, jež dále vedly ke studiu regrese nádorů, jejich metastázování a možnosti protinádorových vakcín na bázi DNA.

Bylo zcela přirozené, že se po kolapsu komunistického režimu Jan Svoboda stal ředitelem Ústavu molekulární genetiky Akademie věd. Vždy otevřeně vyjadřoval své názory na politiku, věci veřejné a organizaci vědy. Zároveň byl vždy bezvýhrad-

ně loajální vůči ústavu a Akademii věd jako celku a svou autoritu využíval ve prospěch vědecké komunity v naší zemi. Nové společenské zřízení nepřineslo okamžitou nápravu zanedbaných poměrů ve vědecké sféře a jako ředitel ústavu v letech 1991–99 musel čelit potížím s nedostatečným financováním, bolestnou reformou řízení vědy a odlivem odborníků do ciziny. Hodně sil ho stály boje o zachování Akademie věd, která byla v těch dobách dokonce vystavena politickým tlakům a hrozilo přinejmenším její přidružení pod pravomoc univerzity.

Vykonávání ředitelského úřadu znamená vzdálení se laboratorní problematice, zaostávání v nových technikách a přístupech a zpoždění v promýšlení nejnovějšího pokroku oboru. Jan se však díky vášni pro vědu dokázal plně vrátit do laboratoře a navázal na problémy, které zůstávaly nedořešeny ještě z 50. a 60. let. V té době pomohla nepermissivní povaha infekce RSV v savčích buňkách definovat provirus. Jaké faktory ale činí savčí buňku nepermissivní pro RSV? A jaké faktory musí poskytnout permissivní kuřecí buňka, aby mohlo dojít k uvolnění viru? Těto problematice se věnoval komplexně z mnoha stran a spolu se studenty poukázal na problémy vstupu viru do hostitelské buňky, poruchy v expresi a sestřihu jeho transkriptů a na přestavbu virových obalových glykoproteinů při interakci s buněčnými receptory. Zůstal plně aktivní téměř do posledních dní, i když mu plíživě se stupňující zdravotní potíže ukusovaly z jeho pracovní kapacity.

V průběhu vědecké dráhy vychoval mnohé studenty a spolupracovníky a sám považoval svou v pravém slova smyslu vědeckou školu za nejdůležitější část vlastního odkazu. Měl čich na správné lidi a ještě lépe uměl nadchnout studenty pro vědu a poznávání. Vědecká výchova pro něj byla regulérní spoluprací na projektech, společnými experimenty a společnou analýzou výsledků. Nebylo vždy lehké být Janovým studentem, ale v konečném důsledku průprava v jeho laboratoři vedla k vědecké originalitě a samostatnosti. Za celoživotní aktivitu ve vědě získal Jan mnohé pocty, byl např. nositelem národních cen České hlava a Neuron, členem Evropské organizace pro molekulární biologii (EMBO) a zakládajícím členem Učené společnosti České republiky. V r. 2015 byl zvolen zahraničním členem Národní akademie věd Spojených států amerických (obr. 2). Sám si velmi cenil toho, že v r. 2010 byl jednomyslně vybrán odbornou komunitou k uspořádání mimořádné pražské konference ke stoletému výročí objevu retrovirů.

Závěrem musím též říci, že Jan Svoboda nebyl jen brilantním a oddaným vědcem. Měl mnohostranné zájmy a bylo potěšením debatovat s ním (nebo se s ním pohádat) o historii, filozofii, literatuře, evoluci nebo politice. Svě názory neváhal doprovázet citáty, ať už z antických klasiků nebo Haškova Dobrého vojáka Švejka. Jeho odchodem přichází retrovirologie o jednoho z gigantů, který pomohl dostat tento obor z pouhé popisné vědy na molekulární úroveň a po 60 let propojoval retroviry s genetikou, onkologií, imunologií a buněčnou biologii.

