
B I PROSPECT

Sedmnáctý ročník
Číslo 1/2007

Adresa společnosti: VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka Pokorná@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

**zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)**

**a
člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)**

Redakční rada

RNDr. Tomislav Barth, DrSc
ÚOCHB AVČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
(Editor)

RNDr. Milan Fránek, DrSc
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70, 621 32 Brno

Ing. Petra Lipovová, Ph.D.
VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc
VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6

Doc. Ing. Ladislav Fukal, CSc
VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.
VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala
Ivax, Ostravská 29, 747 70 Opava

RNDr. Tomáš Vaněk, CSc
ÚOCHB AVČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Bc. Pavel Jenč
VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6

<http://bts.vscht.cz>

B I PROSPECT

17th Volume
No. 1/2007

Society address: ICT, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both

research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech and Slovak Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech and Slovak biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:

Ladislav Fukal, Ph.D. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 445 137

e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

tímto číslem vstupujeme již do 17. ročníku bulletinu naší společnosti a pokoušíme se toto naše tiskové médium stále o něco vylepšovat. Od tohoto ročníku zavedeme průběžné číslování stránek v celém ročníku, zlepšíme úroveň obsahu, který bude i v angličtině a provedeme i některé další formální úpravy. Věříme, že všechny tyto změny přijmete s pochopením. Samozřejmě rádi přijmeme k uvážení všechny Vaše návrhy a těšíme se na Vaši spolupráci, zejména na Vaše kvalitní, třeba i velmi krátké příspěvky. Vaše aktuální informace rádi zveřejníme na našich webových stránkách <http://bts.vscht.cz> v rubrice „aktuálně“.

Zájemcům poskytujeme také aktuální informace e-mailem. U institucionálních členů dostává tyto informace automaticky určená kontaktní osoba, která dle svého uvážení dále rozšiřuje relevantní informace ve svém okolí.

Chtěl bych Vás včas informovat, že i letos uspořádáme na VŠCHT v posluchárně BIII **seminář o geneticky modifikovaných organismech zaměřený především na zemědělské aplikace**. Seminář se uskuteční ve středu 16.5.2007 od 13 hod. Podrobný program bude zveřejněn na našich webových stránkách a rozeslán prostřednictvím e-mailového servisu. Zájemce o zemědělskou problematiku GMO odkazujeme na seminář, který se uskuteční o den později, t.j. 17.5.2007, v aule České zemědělské univerzity v Praze 6 Suchbátka od 8,30 hod. Registrace a bližší informace na marie.cerovska@mze.cz.

Ze zahraničních akcí znovu připomínáme **13. Evropský biotechnologický kongres**, který organizuje EFB ve dnech 17. – 19. září 2007 v Barceloně. Bližší

informace naleznete na webových stránkách <http://www.ecb13.eu>.

V předstihu Vás také chceme informovat o 13. mezinárodním biotechnologickém symposiu (**The 13. International Biotechnology Symposium – IBS 2008**), sponzorované IUPACem, které se bude konat ve dnech **12. – 17. října 2008 v Dalianu**, Čínská lidová republika. Symposium se koná od r. 1960 každé 4 roky v jiném světadíle. Poslední se konalo v chilském Santiagu. Heslem symposia je „Biotechnology for the Sustainability of Human Society“. Informace: <http://www.ibs2008.org> nebo loc@ibs2008.org. Pokud by byl o účast na symposiu větší zájem Biotechnologická společnost by se pokusila získat pro účastníky nějaké výhody, včetně letecké přepravy. Laskavě oznamte Váš zájem v české výpravě do konce září letošního roku.

Věřím, že výběr článků v tomto čísle i v následujících číslech, na jejichž přípravě již pracujeme, Vás zaujme a připomene některé aktuální problémy současných biotechnologií. Závěrem dnešního úvodníku bych rád na Vás apeloval abyste laskavě uhradili členské příspěvky za letošní rok, pokud jste tak dosud neučinili. Rovněž Vás prosím, abyste na tuto okolnost upozornili odpovědné pracovníky Vaší instituce v případě institucionálního členství.

Se srdečnými pozdravy a přáním všeho nejlepšího v našich dnešních hektických dnech

Váš
Jan Káš

CONTENTS

Molecular Basis of Eukaryotic Transcription in the Light of Award the Nobel Prize to R.D. Kornberg in 2006	2
RNA Interference – the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006	4
RNA Interferences and their Possibilities at a Metabolic Syndrome Study	7
Telomeres – Purposeless Ends of Chromosomes?	9
Biohydrometallurgy	10
Microbial Production of Methionine	15

MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY TRANSKRIPCE U EUKARYOT VE SVĚTLE UDĚLENÍ NOBELOVY CENY R. D. KORNBERGOVI V ROCE 2006

Jan Prchal

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Nobelova cena za chemii za rok 2006 byla udělena Rogeru D. Kornbergovi za jeho studium molekulárních základů eukaryotní transkripce. Transkripce je proces v buňce, při kterém je genetická informace uložená v molekule DNA aktivována biosyntézou komplementární molekuly RNA pomocí enzymu DNA polymerasy. Takto vzniklá molekula RNA může sloužit jako vzor pro syntézu proteinů nebo mít jinou úlohu. Řízení transkripce je jedním z nejdůležitějších mechanismů regulace enzymové aktivity a diferenciací buněk, a proto je velmi důležité jí porozumět na molekulární úrovni. Kornberg byl prvním, kdo vytvořil reálný obraz, jak transkripce v eukaryotických buňkách funguje na molekulární úrovni.

Transkripce

Historie výzkumu transkripce začíná v roce 1959 objevem RNA polymerasové aktivity v jádře krysích jaterních buněk¹. Isolace RNA polymerasy z těchto buněk je velmi obtížná, a proto byl dříve popsán mechanismus transkripce v bakteriálních buňkách. Za tento výzkum byla udělena roku 1965 Nobelova cena za medicínu a fyziologii Jacobovi, Monodovi a Lwoffovi.

Po dlouhou dobu se předpokládalo, že mechanismus transkripce u eukaryot je stejný jako u prokaryot. Dnes ovšem víme, že eukaryotní DNA je vázána na proteiny a sbalena do formy chromatinu, zatímco u bakterií je DNA volně v buňce bez větší organizace a navíc regulace transkripce je u eukaryot složitější a děje se na více úrovních.

Bakterie mají jen jeden druh RNA polymerasy, která syntetizuje veškerou RNA v buňce. Na ní se váže menší protein – σ faktor². Ten váže RNA polymerasu na specifická místa na DNA (promotory) a po začátku transkripce se odpojí. Hladinou různých σ faktorů v buňce může bakterie regulovat transkripci různých genů.

U eukaryot nebyl nalezen žádný ekvivalent σ faktorů. Naproti tomu byly v eukaryotních buňkách nalezeny tři druhy RNA polymerasy^{3,4}. Všechna RNA pro syntézu proteinů je ovšem syntetizována RNA polymerasou II, a proto se na ni zaměřily studie struktury a regulace. Bylo zjištěno, že k iniciaci transkripce je potřeba pěti obecných transkripčních faktorů (TFIIB, E, F, H a TBP), nezávisle na genu, který se transkribuje⁵. Pomocí těchto faktorů eukaryotní RNA polymerasa II rozezná počáteční sekvenci v genu, oddělí řetězce DNA, jeden z nich přepíše do RNA a nakonec je opět spojí. Koncept pro-

motoru pochází z prokaryotní transkripce, ovšem eukaryotní promotory jsou mnohem komplikovanější. Transkripce je regulována tzv. enhancerovými sekvencemi DNA, které určují, kdy se bude gen, ke kterému náleží, transkribovat⁶.

Přínos R. Kornberga

Roger Kornberg se narodil roku 1947 v St. Louis (USA) jako syn Arthura Kornberga, který v roce 1959 obdržel Nobelovu cenu za medicínu za vysvětlení mechanismu biosyntézy DNA a RNA. Roger Kornberg vstoupil na pole studia nukleových kyselin jako PhD student MRC v Cambridge svoji prací na struktuře chromatinu^{7,8}.

Po návratu na Stanfordskou universitu, kde před tím studoval, začal studovat eukaryotní transkripci na modelu *Saccharomyces cerevisiae*. Vytvořil kvasničný systém pro *in vitro* translaci, který poté sloužil jako zdroj proteinů pro jeho studie. Objevil, že základní systém, obsahující jen RNA polymerasu II spolu s pěti obecnými transkripčními faktory (TFIIB, D, E, F, H a TBP), zajišťuje jen základní transkripci a nereaguje na genově specifické aktivační proteiny^{9,10}. Toto zjištění vedlo k objevu mediátoru – komplexu zhruba 20 proteinů, který zajišťuje přenos signálu od genově specifických regulačních proteinů na RNA polymerasu a obecné transkripční faktory.

Mediátor spolu s kondenzací chromatinu vytváří další vrstvu regulace transkripce, která se u prokaryot nevykazuje. Prokaryota regulují transkripci pouze proteiny přímo ovlivňujícími vazbu RNA polymerasy na promotor. Bylo tedy prokázáno, že eukaryota mají daleko složitěji regulovanou transkripci, ale nebylo mnoho známo o molekulární podstatě transkripce a její regulaci.

Kornberg si záhy uvědomil, že RNA polymerasa II by mohla být základem celého transkripčního komplexu. Problém ovšem byl ve velikosti kvasničné RNA polymerasy (12 podjednotek, 0,5 Mda) a v nestabilitě vyčištěného komplexu. Pro vyřešení tohoto problému Kornberg použil kombinaci elektronové mikroskopie a rentgenové krystalografie. K tomu vyvinul metodu tvorby 2D proteinových krystalů na lipidovém povrchu¹¹ a již zmíněný systém pro *in vitro* transkripci. Po 20 letech biochemické práce v roce 2001 přišel průlom. Kornberg publikoval strukturu 10ti podjednotkové kvasničné RNA polymerasy v rozlišení 2,8 Å spolu se strukturou elongačního komplexu složeného z RNA polymerasy, templátové DNA a vznikající RNA^{12,13}. V těchto struktu-

rách dvě největší podjednotky tvoří střed DNA-vazebného žlábků s menšími podjednotkami okolo. Celek má tvar klepeta obepínajícího DNA. Velké podjednotky jsou propojeny α -helixem z jedné z nich, který prochází blízko aktivního místa pro vznik fosfodieserové vazby ve vznikající RNA. Ve vlastním aktivním místě se nalézají dva hořčnaté ionty, které pravděpodobně katalyzují elongaci RNA. Díky vysoké homologii mezi savčí a kvasničnou RNA polymerasou II se předpokládá, že tato struktura poskytuje dobrý model pro všechny eukaryotní RNA polymerasy o více podjednotkách.

Kornbergova laboratoř poté publikovala téměř deset dalších struktur RNA polymerasy ve funkčních komplexech s DNA, RNA nebo jinými proteiny. Tato data umožnila dynamickou interpretaci procesu transkripce.

Mechanismus transkripce

Rentgenová struktura ukázala, že dsDNA je vázána v žlábků a z druhé strany držena částí velké podjednotky nazvané „svorka“. Ta po navázání DNA změní konformaci a překryje aktivní místo. Řetězec DNA se rozplétá tři báze před vstupem do aktivního místa. Nukleotidy vstupují do aktivního místa otvorem ve tvaru nálevky. V získaných strukturách se podařilo zachytit jak správný, tak nesprávný nukleotid v aktivním místě a lze tak určit jak jsou nukleotidy vybírány¹⁴.

Reakce probíhá ve dvou krocích. Nejdříve se nukleotid naváže na protein v obrácené poloze pod aktivní místo. Tato vazba výrazně prodlouží dobu, po jakou je nukleotid v aktivním místě¹⁵. Poté se nukleotid otočí a může selektivně interagovat s DNA. Pokud se nová báze správně páruje s templátovou, vzniká fosfodiesterová vazba. Její vznik je katalyzován dvěma hořčnatými ionty podobně jako v ostatních polymerasách nukleových kyselin. Téměř všechny interakce mezi proteinem a nukleotidy jsou zprostředkovány přes fosforibosylovou páteř, což přispívá ke specifitě k ribonukleotidům. Spolehlivost transkripce je zajištěna vlastnostmi RNA-DNA duplexu. Hybridní dvojšroubovice navázaná na protein zaujímá nestandardní konformaci, která je oproti normální RNA-DNA dvojšroubovici podvinutá¹³. Inkorporace nesprávného nukleotidu vede k destabilizaci hybridního dihelixu a k uvolnění nevhodného nukleotidu ještě před vznikem fosfodiesterové vazby.

Posun RNA-DNA dihelixu během transkripce je zajišťován již zmíněným helixem vycházejícím z velké podjednotky, který nespécificky interaguje s bazí templátové DNA v aktivním místě^{13,16}. Ve struktuře kvasničné RNA polymerasy je dihelix rovný, avšak ve struktuře bakteriální RNA polymerasy je ohnutý¹⁷. Pokud by se mohl pohybovat mezi rovným a zahnutým tvarem, pak by byl schopen pohybovat DNA o 3 až 4 Å Kornberg tedy spekuloval, že translokace dvojšroubovice probíhá tak, že se helix ohne, a tak postrčí spárované nukleotidy o jednu pozici dále. Návrat do rovné polohy poté uvolní aktivní místo pro další nukleotid a tak připraví enzym pro další kolo adice nukleotidu. Tento mechanismus souhlasí s dalšími genetickými studiemi^{18,19}.

Ze struktury v post-translačním stavu vyplývá, že zhruba po jedné otáčce je hybridní dihelix rozdělen smyčkou, která vychází ze svorky. To vede k úplnému oddělení RNA od DNA 10 nukleotidů od aktivního místa. Opětovnému spojení RNA s DNA brání další dvě smyčky vycházející ze svorky¹⁴. DNA poté může obnovit konformaci dvojšroubovice.

Iniciace transkripce

Popsání struktury RNA polymerasy II nejen objasnilo mechanismus transkripce, ale také umožnilo strukturní studie větších funkčních komplexů s transkripčními faktory a s mediátorem, což je klíčové pro pochopení regulace transkripce u eukaryot. Kornberg již podnikl první krok tímto směrem tak, že určil strukturu komplexu RNA polymerasy II s TFIIB, která ilustruje mechanismus iniciace transkripce²³. Za určitých podmínek k iniciaci transkripce postačuje RNA polymerasa s TFIIBa TBP. V krystalové struktuře je ovšem dobře rozlišená pouze C-terminální oblast TFIIB, ale spojení s již známou strukturou komplexu TFIIB, TBP a DNA²⁴ umožnilo vyřešení struktury proteinů navázaných na DNA. TBP se váže na TATA-box a směřuje DNA směrem k aktivnímu místu. Mezi TATA-boxem a místem počátku transkripce je mezera zhruba 25 nukleotidů. Tato mezera je charakteristická pro většinu promotorů RNA polymerasy II.

Tato struktura také vysvětluje některá předchozí pozorování jako například neúspěšnou iniciaci, což je situace, kdy se transkripce ukončí po zhruba 10 nukleotidech a transkripční komplex se rozpadne. Ze struktury komplexu vyplývá, že smyčka z N-konce TFIIB se může natáhnout do aktivního místa RNA polymerasy, kde kompetuje s nově vzniklou hybridní RNA-DNA dvojšroubovicí. Pokud smyčka vyhraje, pak se celý komplex rozpadne. Pokud vyhraje nukleová kyselina, tak se RNA polymerasa odpoutá od TFIIB a pokračuje v transkripci.

Kombinací výsledků rentgenové krystalografie a elektronové mikroskopie se také Kornbergovi a jeho spolupracovníkům podařilo vytvořit model iniciačního transkripčního komplexu se všemi pěti iniciačními faktory²³. Nejzajímavějším výsledkem je, že zatímco transkripční faktory se váží na volnou DNA, RNA, polymerasa se váží až na rozpletanou dvojšroubovicí po navázání ostatních faktorů.

Elektronová mikroskopie komplexu RNA polymerasy s mediátorem ukazuje mediátor jako srpek obepínající polymerasu²⁵. Mediátor se skládá z cca 20 proteinů o celkové M_w okolo 1 MDa, což jeho studium činí velmi obtížným. Nedávno bylo oznámena izolace funkční hlavice mediátoru (7 podjednotek)²⁶. Bohužel není doposud známa žádná struktura komplexu mediátoru s RNA polymerasou.

Terminace transkripce

Terminace transkripce u prokaryot je zajišťována sekundární strukturou DNA vytvářející vlásenku nebo rho faktory, které se váží na specifická místa DNA

a brání pokračování transkripce²⁰. U eukaryot je mechanismus méně prozkoumán, jsou však známy dva mechanismy terminace transkripce. První zajišťuje sekundární struktura DNA, která tvoří stonek a smyčku, o kterou se RNA polymerasa zastaví a transkripce skončí²¹. Druhý způsob terminace je zajištěn polythymidinovým úsekem DNA. Tato sekvence destabilizuje RNA-DNA dihelix a dojde k terminaci transkripce²².

Závěr

Kornbergovy studie mechanismu eukaryotní transkripce nám objasňují její molekulární základy. Vysvětlují mechanismus iniciace transkripce, rozpoznání promotoru, mechanismus rozeznávání jednotlivých nuk-

leotidů i posun a rozpletení DNA-RNA dvojšroubovice. Struktura RNA polymerasy II je navíc základem pro další výzkumy upřesňující vazbu iniciačního komplexu na DNA.

Kornbergův tým dále pokračuje ve výzkumu struktury iniciačního komplexu. Vysoce rozlišené struktury iniciačního komplexu by mohly objasnit mechanismy regulace eukaryotní transkripce. Tato znalost je důležitá, protože mnoho těžkých onemocnění, jako je rakovina nebo některé srdeční choroby, je způsobeno poruchami regulace transkripce. Regulace transkripce se podílí i na diferenciaci kmenových buněk do jednotlivých tkání. Pro použití kmenových buněk k léčbě je nutné, abychom byli schopni určit, v jaký typ buněk se vyvinou.

Literatura

1. Weiss S.B., Gladstone L.: J. Am. Chem. Soc. **81**, 4118 (1959).
2. Burgess R.R., Travers A.A., Dunn J.J., Bautz E.K.: Nature **221**, 43 (1969).
3. Roeder R.G., Rutter W.J.: Nature **224**, 234 (1969).
4. Keding C., Gniazdowsky M. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **38**, 165 (1970).
5. Matsui T., Segall J., Weill P.A., Roeder R.G.: J. Biol. Chem. **225**, 11992 (1980).
6. Johnson P.F., McKnight S.L.: Ann. Rev. Biochem. **58**, 799 (1989).
7. Kornberg R.D.: Science **184**, 868 (1974).
8. Kornberg R.D., Thomas J.O.: Science **184**, 865 (1974).
9. Lue N.F., Kornberg R.D.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **84**, 8839 (1987).
10. Sayre M.H., Tschonochner H., Kornberg R.D.: J. Biol. Chem. **267**, 23376 (1992).
11. Uzgiris E.E., Kornberg R.D.: Nature **301**, 125 (1983).
12. Cramer P., Buschnell D.A., Kornberg R.D.: Science **292**, 1863 (2001).
13. Gnatt A.L., Cramer P., Fu J., Buschnell D.A., Kornberg R.D.: Science **292**, 1876 (2001).
14. Westover K.D., Buschnell D.A., Kornberg R.D.: Cell **119**, 481 (2004).
15. Batada N.N., Westover K.D., Buschnell D.A., Levitt M., Kornberg R.D.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **101**, 17361 (2004).
16. Buschnell D.A., Travers A.A., et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **99**, 1218 (2002).
17. Zhang G., Campbell E.A., Minakhin L., et al.: Cell **98**, 811 (1999).
18. Epshtein V., Mustaev A., Markovtsov V., et al.: Mol. Cell Online **10**, 623 (2002).
19. Bar-Nahum G., Epshtein V., Ruckenstein A.E., et al.: Cell **120**, 183 (2005).
20. Von Hippel P., Bear D.E., et al.: Ann. Rev. Biochem. **53**, 389 (1984).
21. Galli G., Hostefer H., Stunnenberg G., Birnstiel M.L.: Cell **34**, 823 (1983).
22. Gil A., Prodfoot J.: Nature **312**, 473 (1984).
23. Buschnell D.A., Westover K.D., Davis R.E., Kornberg R.D.: Science **303**, 983 (2004).
24. Tsai F.T.F., Singler P.B.: EMBO J. **19**, 25 (2000).
25. Asturias F.J., Jiang Y.W., Myers L.C., Gustafsson C.M., Kornberg R.D.: Science **283**, 985 (1999).
26. Takagi Y., Calero G., Komori H., et al.: Mol. Cell Online **23**, 355 (2006).
27. <http://nobelprize.org/>
28. Voet D., Voet J.: Biochemistry, 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc. (2004).

RNA INTERFERENCE – NOBELOVA CENA ZA FYZIOLOGII A MEDICÍNU 2006

Matyáš Flemr

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

ÚVOD

Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu v roce 2006 získali američtí vědci Andrew Z. Fire a Craig C. Mello za objasnění podstaty procesu RNA interference v hlístici *Caenorhabditis elegans*.⁽¹⁾ Tento objev, který autoři v první chvíli nepovažovali za nijak výjimečný, způsobil během osmi let doslova revoluci v genetice a genovém inženýrství a má potenciál stát se v následujících dese-

tilecích dominantním terapeutickým prostředkem v boji s nepřeborným množstvím nejen virových a nádorových onemocnění. Andrew Fire se o utišení genové exprese pomocí RNA pokoušel už na počátku 90. let, kdy při studiu genů zapojených v rozvoji a dospívání *C. elegans* úspěšně potlačil expresi genů přidáním antisense ssRNA (jednořetězcová RNA komplementární k cílové mRNA). Spolu s dalšími vědci, kteří pozorovali

podobný jev při studiu jiných genů, postuloval tzv. "antisense inhibition model", aniž by věnoval jakoukoli pozornost zjištění, že i sense ssRNA (sekvence identická s mRNA) potlačuje expresi genů s přibližně stejnou účinností. Craig Mello se touto problematikou začal zabývat v polovině 90. let, rovněž v souvislosti s objasňováním procesu maturace *C. elegans*. Také on pozoroval inhibiční efekt sense ssRNA na genovou expresi. Narozdíl od Firea však tento jev nenechal bez povšimnutí, naopak na jeho základě odmítl označení "antisense inhibition model" a v roce 1997 zavedl pojem RNA interference. Zájem o objasnění funkce stejného genu svedl záhy oba vědce dohromady. Porovnáním svých výsledků došli po dlouhých diskusích k myšlence, že RNA polymerasa používaná pro *in vitro* syntézu sense nebo antisense ssRNA není bezchybná a že by mohl ve velmi malém množství vznikat i komplementární řetězec, potažmo dvojřetězcová dsRNA. Pro další experiment byly tedy připraveny dsRNA a obě jednořetězcové varianty důkladně přečištěné separací na gelu. Výsledky hovořily jasnou řečí. Zatímco antisense ani sense ssRNA neměly žádný nebo jen velmi malý vliv na expresi genu, dsRNA i ve velmi nízké koncentraci několika molekul na buňku s vysokou účinností snížila úroveň mRNA pod detekovatelnou mez^(1,2).

Od roku 1998, kdy Fire a Mello zjistili, že za utišení genové exprese na post-transkripční úrovni je zodpovědná molekula dvojřetězcové dsRNA, byl za relativně krátkou dobu učiněn velký pokrok při objasnění detailního mechanismu RNA interference. Efekt RNA interference se plně etabloval v širokých vědeckých kruzích a patří dnes k nejpoužívanějším metodám utišení genové exprese při studiu fyziologické funkce genů a proteinů jimi kódovaných. Objevení funkčního aparátu RNA interference v savčích buňkách navíc počátkem nového tisíciletí spustilo lavinu dalšího vědeckého bádání s již zmíněným cílem vyvinout terapeutika nové generace účinná i proti onemocněním, se kterými si současná medicína nedokáže poradit⁽³⁾.

Mechanismus RNA interference

Téměř současně s odhalením podstaty RNA interference u *C. elegans* bylo zjištěno, že dvojřetězcová RNA je odpovědná i za již dříve popsané post-transkripční utišení genové exprese u rostlin (PTGS, Post Transcriptional Gene Silencing), když mezi izolovanými efektorovými RNA o délce 21 až 25 nukleotidů byly identifikovány sekvence antisense i sense ssRNA. Modelovým organismem pro objasnění biochemických mechanismů RNA interference se však staly buňky *Drosophila melanogaster* kultivované ve formě *in vitro* buněčné kultury. Bylo zjištěno, že za degradaci cílové komplementární mRNA jsou odpovědné krátké sekvence dvojřetězcové dsRNA o délce 21 až 25 párů basí, nazvané small interfering RNA (siRNA). siRNA vznikají v cytoplasmě buněk působením enzymu podobného ribonuklease III, který dostal označení Dicer. Tento vysoce konzervovaný enzym štěpí dlouhé fragmenty dsRNA, typicky transpozónové nebo virové dsRNA, za vzniku 21

až 23 nukleotidových dsRNA se symetrickým di- až trinukleotidovým přesahem na 3' konci. Takto produkováná siRNA se začlení do ribonukleoproteinového komplexu zvaného RISC (RNA-induced silencing complex). Následným působením enzymu s helikasovou aktivitou dochází za spotřeby ATP k rozpletení siRNA. Sekvence sense ssRNA odpadá a vzniká aktivovaný RISC s řetězcem antisense ssRNA, který váže a štěpí komplementární mRNA. Řetězce rozštěpené mRNA pak podléhají v cytosolu rychlé degradaci. Součástí komplexu RISC odpovědnou za štěpení mRNA je vysoce konzervovaná endonukleasa Argonaute 2. Ačkoliv byl výše popsán mechanismus produkce a působení siRNA již poměrně podrobně rozšířován, jen velmi málo se dosud zjistilo o jeho regulaci. Zatím jediným významným objevem v tomto směru bylo nalezení ribonukleasy ERI-1 štěpící siRNA u *C. elegans*⁽⁴⁾.

MicroRNA a přirozená funkce RNA interference

Analýza krátkých RNA u *D. melanogaster* odhalila kromě siRNA také další skupinu tzv. microRNA (miRNA). Ty vznikají postupnou úpravou z dlouhých endogenních transkriptů pri-miRNA. Ribonukleasa Drosha štěpí v jádře pri-miRNA na zhruba 70 nukleotidů dlouhou vláseňkovou pre-miRNA, která je následně transportována do cytoplasmy a Dicerem upravena na výslednou miRNA. Stejně jako siRNA se i miRNA inkorporuje do RISC komplexu. miRNA však narozdíl od siRNA váže jen částečně komplementární mRNA, nejčastěji v 3' nepřekládané oblasti, a nezpůsobuje štěpení navázané mRNA. Mechanismus účinku miRNA zůstává zatím neznámý. Předpokládá se, že RISC komplex navázaný na mRNA prostřednictvím miRNA blokuje translaci, případně směřuje vznikající protein k okamžité degradaci.

Systém miRNA se v eukaryotické buňce bezpochyby podílí na přirozené regulaci genové exprese. Ukázalo se, že při dospívání *D. melanogaster* a při procesu diferenciace myších embryonálních kmenových buněk se miRNA tvoří specificky v určitém čase na určitém místě, což ukazuje na funkci mechanismu RNA interference v přirozeném vývoji buněk. Kromě toho působí siRNA jako ochrana buňky proti invazivní exogenní virové dsRNA, čehož se využívá pro přípravu geneticky modifikovaných rostlin rezistentních vůči virové nákaze. siRNA se podílí rovněž na udržování částí genomu s repetitivní DNA, které zahrnují mimo jiné transpozóny a retrotranspozóny, ve stavu znemožňujícím transkripci. Z dosud zjištěných poznatků lze tedy říci, že přirozená funkce RNA interference spočívá v ochraně integrity genomu a v regulaci genové exprese⁽⁴⁾.

Využití RNA interference pro vědecké účely

Objevení RNA interference přineslo zásadní změnu do oblasti studia fyziologické funkce genů. Jak již bylo řečeno v úvodu, o potlačení genové exprese pomocí RNA se A. Fire a další pokoušeli již počátkem 90. let minulého století. Tyto pokusy však byly spíše výjimečné. Teprve po objasnění principu RNA interference se siRNA velmi rychle stala masově využívaným nástrojem

pro utlumení exprese genů umožňující studium jejich funkce. Zpočátku nebyly výsledky dosahované pomocí siRNA vždy uspokojivé, neboť navrhované sekvence siRNA pro utlumení požadovaného genu často nespecificky blokovaly i expresi jiných genů obsahujících sekvenci částečně komplementární k vnesené siRNA. S přibývajícím znalostmi o struktuře 21 nukleotidové sekvence siRNA a o tom, které konkrétní pozice v sekvenci jsou zásadní pro navázání a štěpení cílené mRNA⁽⁵⁾, se ale neustále zdokonalují algoritmy pro navrhování dostatečně specifických sekvencí siRNA a v dnešní době je již možné získat komerční siRNA sekvenci pro žádaný gen se zárukou požadované účinnosti a specifity. Technicky nejjednodušší metodou tlumení genové exprese pomocí RNA interference je vnesení chemicky syntetizované siRNA do zkoumaných buněk. Efekt takové siRNA trvá v závislosti na typu buněk od 2 dnů u rychle se dělících buněk až po několik týdnů u terminálně diferencovaných nedělících se buněk, např. makrofágů nebo neuronů. Pro získání buněčných linií nebo organismů s trvale potlačenou expresí určitého genu byly vytvořeny DNA vektory s expresním systémem na bázi adenovirů, onkoretrovirů nebo lentivirů, které mohou nést a exprimovat v buňkách požadovanou sekvenci siRNA nebo účinnější vlásenkovou short hairpin RNA (shRNA), která je na efektorovou molekulu siRNA upravena přirozeným procesem štěpením Dicerem. Narozdíl od tlumení genové exprese klasickou mutagenézou vedoucí k vytvoření „knock-out“ mutantů se zcela vypnutým genem způsobuje RNA interference tzv. „knock-down“ efekt. Potlačení genové exprese tedy není nikdy úplné, i když v některých případech klesá hladina cílové mRNA pod detekovatelnou mez. Různými úpravami nukleotidového složení navržené siRNA lze docílit odstupňovaného efektu RNA interference. Toho se s výhodou využívá např. při studiu funkce genů, jejichž „knock-out“ mutace má za následek letální fenotyp. Další nespornou výhodou RNA interference oproti klasické cestě získávání „knock-out“ mutantů jsou celkové náklady a doba potřebná k přípravě mutantního organismu, kdy např. získání „knock-down“ myši trvá řádově několik měsíců oproti několika rokům při přípravě „knock-out“ jedinců⁽⁴⁾.

Využití RNA interference v medicíně

Jak již název Nobelovy ceny napovídá, největší potenciál RNA interference spočívá v terapeutických aplikacích. Vyjdeme-li z předpokladu, že každá buňka v sobě nese všechny biochemické mechanismy potřebné pro rozvoj RNA interference a že každý gen může být cíleně utišen specifickou siRNA, jsou možnosti využití RNA interference v medicíně téměř neomezené. Možnost použít siRNA jen pro antagonismus nějakého nežádoucího jevu pomocí potlačení genové exprese představuje hlavní limitující faktor siRNA jako léčiva oproti běžně používaným nízkomolekulárním látkám a proteinům, které mohou působit i agonisticky, např. při léčení nejruznějších deficiencí. Naopak velkou výhodou siRNA je nenáročnost návrhu a přípravy samotné molekuly.

Zatímco získání nízkomolekulární látky s požadovanými účinky vyžaduje technicky i finančně náročnou syntézu několika tisíc různých molekul a následný zdlouhavý screening, přičemž výsledek není nikdy zaručený, návržení efektorové sekvence siRNA se stává díky stále se zdokonalujícím počítačovým programům poměrně snadnou záležitostí. Náklady na syntézu sekvence o délce 21 párů basí jsou navíc zanedbatelné ve srovnání s přípravou mnoha tisíc různých malých molekul nebo s produkcí rekombinantních proteinů. Navržení optimální vysoce specifické siRNA pak minimalizuje riziko nežádoucích vedlejších účinků^(5,6).

Největší překážkou, která brání rychlému uvedení siRNA léčiv do praxe, zůstává způsob dopravení siRNA na místo určení v organismu. Při intravenózní aplikaci má samotná malá molekula dvojřetězcové siRNA vzhledem k rychlé ledvinové clearance velmi krátký biologický poločas v krvi. Ten se navíc ještě snižuje působením některých sérových ribonukleas schopných štěpit dsRNA. I při úspěšném dopravení do místa působení pak vyvstává pro molekulu siRNA velký problém, jak překonat cytoplasmatickou membránu buňky a dostat se do cytoplasmy, kde se teprve stává účinnou. Samotná nemodifikovaná siRNA není dostatečně účinně přijímána dokonce ani makrofágy nebo dendritickými buňkami, které mají schopnost pinocytózy. Prodloužení biologického poločasu siRNA a usnadnění překonávání přirozených bariér v organismu lze dosáhnout tvorbou komplexů s lipidovými částicemi nebo proteinovými nosiči. siRNA v komplexu s vysokomolekulární látkou nepodléhá rychlému vyloučení z krevního oběhu renální filtrací a navíc proteinový nebo lipidový nosič může usnadnit přechod molekuly siRNA přes biologické membrány. Pro zvýšení stability siRNA se používají chemicky modifikované ribonukleotidy, nejčastěji se změnou 2'-OH skupinou ribosy. Takové 2'-O-methyl-ribonukleotidy nebo 2'-deoxy-2'-fluoro-ribonukleotidy odolávají působení sérových ribonukleas a navíc, je-li chemicky modifikovaný nukleotid ve správné pozici v rámci siRNA sekvence, mohou zvyšovat specifitu siRNA a omezit nebezpečí tzv. off-targetingu, tedy nespecifického potlačení exprese jiných genů^(4,5).

Další způsob účinné distribuce siRNA představuje stálá exprese siRNA prekurzorů, např. shRNA, přímo v cílových buňkách pomocí vnesení do virových vektorů. Tato metoda by mohla najít uplatnění zejména při léčení autosomálně dominantních genetických defektů, např. neurodegenerativní Huntingtonovy choroby nebo amyotrofní laterální sklerózy, kdy správně navržená siRNA tlumí pouze expresi vadné dominantní alely s mutací v jediném nukleotidu. Exprese siRNA přímo v postižených buňkách lze docílit použitím tkáňově specifického promotoru. Některé promotory se navíc aktivují až po přidání nízkomolekulárního aktivátoru, což umožňuje regulovat expresi siRNA podle aktuální potřeby. Regulace efektorové siRNA zůstává hlavním problémem při použití stálých expresních vektorů pro účely genové terapie. Narozdíl od běžných léčiv není možné přesně stanovit množství ani kinetiku působení

siRNA v organismu. Dalším zdrojem problémů pak může být narušení přirozeného systému miRNA regulace genové transkripce.

I přes velké množství obtíží spojených s dopravením aktivních siRNA do cílových buněk byl již pozitivní efekt siRNA terapie prokázán u velkého množství onemocnění na modelových myších systémech. První výsledky ukázaly, že by genová terapie využívající mechanismus RNA interference mohla být účinná při léčbě závažných virových onemocnění, jako jsou hepatitida typu B a C, akutní respirační syndrom SARS, vaginální zánětlivé onemocnění způsobené HSV (Herpes Simplex Virus) nebo v boji s celosvětově nejrozšířenějším virem HIV. siRNA by se mohly stát dominantním typem terapeutik také při léčení nádorových onemocnění, která obecně vznikají poruchou regulace genové exprese. I v tomto směru již probíhá rozsáhlý výzkum především na myších modelových organismech⁽⁶⁾.

Pilotní projekty uvedení terapeutik založených na principu RNA interference do praxe představují dva přípravky, pro léčbu oční poruchy zvané makulární degenerace (AMD, Age-Related Macular Degeneration) a antivirotikum proti RSV (Respiratory Syncytial Virus), který způsobuje onemocnění dolních cest dýchacích u malých dětí. U přípravku Bevasiranib (Acuity Pharma-

ceuticals) tlumícího expresi růstového faktoru cévního endotelu (VEGF), který způsobuje AMD, byla nedávno úspěšně dokončena druhá fáze klinických testů⁽⁷⁾. V příštím roce by do fáze klinických testů měly dospět také siRNA proti viru pandemické chřipky a viru hepatitidy C.

Závěr

Popsání principu RNA interference, se kterým v roce 1998 přišli A. Fire a C. Mello, zásadním způsobem změnilo tvář moderní genetiky a genového inženýrství. Pouze několik let stačilo k tomu, aby byl relativně detailně objasněn mechanismus tlumivého efektu dvojřetězcové RNA na expresi genů. Použití siRNA se stává dominantním prostředkem pro studium funkce neznámých genů. Obrovský potenciál siRNA pro lékařské účely způsobil počátkem nového tisíciletí doslova explozi experimentů přinášejících důkazy o použitelnosti mechanismu RNA interference v terapeutických aplikacích. V minulém roce se již první přípravky na bázi siRNA proti makulární degeneraci a RSV dostaly do fáze klinických testů.

Lze tedy závěrem říci, že pánové Fire a Mello se svým objevem výrazně zasloužili o rozvoj moderní medicíny, i když otázek, na které je potřeba v souvislosti s RNA interferencí odpovědět, zůstává stále mnoho.

Literatura

1. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.: *Nature* **391**, 806 (1998).
2. Montgomery M.K.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1039 (2006).
3. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., et al.: *Nature* **411**, 494 (2001).
4. Dykxhoorn D.M., Lieberman J.: *Annu. Rev. Med.* **56**, 401 (2005).
5. Bumcrot D., Manoharan M., et al.: *Nat. Chem. Biol.* **2**, 711 (2006).
6. Rychahou P.D., Jackson L.N., et al.: *Surgery* **140**, 719 (2006).
7. <http://www.acuitypharma.com/press/release13.pdf> .

RNA INTERFERENCE A JEJICH MOŽNOSTI PŘI STUDIU METABOLICKÝCH SYNDROMŮ

Kateřina Kontrová, Boris Bartoš

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Kardiovaskulární onemocnění patří v současné době mezi nejčastější příčiny úmrtí v evropských zemích. Za jeden z hlavních rizikových faktorů mozkové mrtvice, infarktu myokardu a selhání ledvin je považován vysoký krevní tlak, který se významně podílí také na zvýšené nemocnosti a úmrtnosti našeho obyvatelstva.

Soubor faktorů zvyšujících významně riziko vzniku srdečních chorob byl v roce 1988 označen jako *Syndrom X*, někdy též *metabolický syndrom*. Do tohoto souboru patří esenciální hypertenze, inzulínová rezistence, dyslipidémie, diabetes mellitus II. typu, abdominální obezita nebo některé prothrombotické a zánětlivé stavy^[1].

K odhalení genetického pozadí zmíněných poruch se kromě nejrůznějších statistických metod využívají zejména zvířecí experimentální modely. Velké množství experimentálních modelů bylo vyvinuto během posledních 30-ti let. Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*)

se stal pro svou dostupnost a relativní jednoduchost měření hemodynamických parametrů nejrozšířenějším modelovým zvířetem. Zvláště geneticky upravené modely jsou velmi výhodné, neboť umožňují simulovat různé vzájemné interakce mezi genetickými faktory a faktory vnějšího prostředí.

Genetická analýza laboratorních potkanů odhalila skutečnost, že většina genů, zodpovědných za výše uvedené metabolické poruchy je lokalizována v stejné oblasti 4. chromozómu. Tato hypotéza byla potvrzena výzkumem kongenních kmenů spontánně-hypertenzních laboratorních potkanů (SHR, „Spontaneously Hypertensive Rat“). SHR kmeny disponují velmi podobným souborem metabolických poruch jako lidský syndrom X. Genom potkana je navíc poměrně dobře prozkoumán a je tudíž snadno interpolovatelný na člověka^[2,3]. Pomocí DNA mikročipů, které umožnily porovnat expresi genů

v tukové tkáni obou kmenů, bylo odhaleno několik genů s rozdílnou expresí, největší pozornost však vzbudil gen kódující protein CD36, jehož následná sekvenční analýza objevila řadu mutací genu Cd36 u kmene SHR^[4].

Protein CD36 je membránový receptor, patří mezi scavenger receptory třídy B. Jedná se o multiligandový receptor, díky čemuž má řadu biologických funkcí. Je zodpovědný například za transport mastných kyselin přes cytoplazmatickou membránu, ovlivňuje metabolismus sacharidů a lipidů v buňce a je významným receptorem antiangiogenní odpovědi a tudíž součástí ochrany proti rakovinnému bujení v tkáni. Nedostatek tohoto proteinu se výrazně podílí na poruchách metabolismu lipidů a glukózy a nepřímo ovlivňuje také vznik hypertenze a inzulinové rezistence.

Dalším proteinem, který se jeví jako potenciálně zodpovědný za poruchy lipidového a glukózového metabolismu v buňce je nedávno objevený adipokin nalezený jako hormon sekretovaný útrobním tukem, tzv. visfatin (z angl. visceral fat adipokin). Visfatin je přednostně syntetizován útrobním tukem, jen v malé míře ho produkuje i podkožní tuk. Při obezitě koncentrace visfatinu roste^[5]. Sekretuje se zejména intracelulárně, kde působí také jako enzym nikotinamidfosforibosyltransferáza, enzym působící v syntetické dráze NAD. Byla prokázána jeho schopnost snižovat hladinu glukózy v krvi (tzv. „insulin-mimetic effect“)^[6]. V současnosti ještě nejsou jeho přesné účinky na metabolismus zcela prozkoumány.

Vedle živých laboratorních modelů a studií *in vivo* nabývají v současné době stále většího významu tkáňové kultury s možností *in vitro* analýz^[12]. Pro naši práci je využita prekurzorová kultura 3T3-L1 myších preadipocytů a Fao potkaních hepatocytů, jejichž výhodou je zachování genetické informace z generace na generaci (tzv. hybridomové buňky).

Kultury adipocytů a jejich prekurzorů jsou velmi vhodnými modely pro výzkum fyziologických mechanismů kontrolujících buněčnou proliferaci, diferenciaci a zachování funkce jako tukové tkáně. Přestože většina studií se zabývá diferenciací adipogenních buněčných linií, použití prekurzorů adipocytových kultur je v současné době na vzestupu^[7].

Novou metodou je metoda RNA interference (RNAi), schopná tlumit expresi genu cílového proteinu s vysokou účinností v širokém spektru organismů. Jev RNA interference byl poprvé popsán u rostlin Richardem

Jorgensenem v roce 1990^[lit.8], exaktní mechanismus byl pak znám až o několik let později.

RNA interference představuje přírodní mechanismus sloužící k ochraně vlastního genomu organismu. Jedná se o sekvenčně – specifický posttranslační genový útlum, který je spouštěn pomocí krátkých dsRNA úseků. Tento revoluční mechanismus, využívající krátké RNA (tzv. small hairpin RNA – shRNA) představuje výkonný nástroj pro funkční analýzu genů a vývoj nových terapeutických materiálů a léčiv^[9,10]. Kromě zablokování již známých genů je možné využít tuto metodu také k odhalení nových, dosud nepoznaných genů, hrajících roli při vzniku a průběhu onemocnění^[11]. Schopnost RNA interference (RNAi) má k dispozici každá buňka prakticky každého mnohobuněčného organismu^[12]. Z biochemického hlediska se jedná o kaskádový systém multienzymových komplexů, aktivovaných přítomností pro buňku netypické dsRNA. Uměle může být RNAi aktivována dvěma způsoby: prvním způsobem je vnesení presyntetizovaného krátkého úseku dsRNA, tzv. siRNA (short interfering RNA), druhou možností je intracelulární exprese shRNA (short hairpin RNA), vzniklé z DNA templátu. Templát pak může být virového (retroviry, adenoviry, HSV) nebo nevirového původu (různé bakteriální plasmidy). Obě metody, jak vnesená, tak exprimovaná RNAi indukují genový útlum a výběr metody závisí na vhodných podmínkách, požadované stabilitě exprese, klinických indikacích a metodě vpravení interferenčních molekul do cílových tkání^[13].

Při vlastním mechanismu RNAi hraje klíčovou roli dvojice multienzymových komplexů – tzv. Dicer a RISC („RNA-induced silencing complex“). První z nich, Dicer, katalyzuje štěpení dsRNA na krátké, obvykle 20 – 25nt dlouhé úseky tzv. siRNA duplexy. Vzniklé siRNA jsou dále inkorporovány do druhého multienzymového komplexu – RISC. Na aktivovaném RISC komplexu poté zůstává jen jedno vlákno RNA, které slouží jako templát k vyhledání komplementárního úseku na mRNA. Po tomto vyhledání je vlákno mRNA rychle degradováno, čímž dochází k selektivnímu vyřazení exprese konkrétních genů. Tuto vlastnost lze využít ke studiu role jednotlivých proteinů v metabolismu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů VŠCHT v Praze 320/08/0015 a MŠMT ČR 6046137305.

Literatura

1. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) Final report Circulation **106**; 3143 (2002).
2. Pravenec M., Křen V.: Vesmír **74**; 485 (1995).
3. Kuneš J., Zícha J.: Klinická patofyziologie hypertenze (Grada Publishing); 28 (2002).
4. Aitman T.J., Pravenec M., Křen V. et al.: Nature Gen **21**; 76 (1999).
5. Ognjanovic S. et al.: J. Mol. Endocrinol. **26**, 107 (2001).
6. Rongvaux A. et al.: Eur. J. Immunol. **32**, 3225 (2002).
7. Davis J.M.: Basic Cell Culture – a practical approach (IRL Press); 194 (1994).
8. Jorgensen R.A.: Plant Cell **2**; 279 (1990).
9. Sioud M., Sørensen D.R.: Biochem Biophys Res Commun **312**; 1220 (2001).
10. Schütze N.: Mol Cell Endocrin **213**; 115 (2004).
11. Downward J.: Brit Med J **328**; 1245 (2004).
12. Hannon G.J.: Nature **418**; 244 (2002).
13. Ammini C., Suhy D., Cunningham S.: Topics in RNA; 8 (2005).

TELOMERY – BEZÚČELNÉ KONCE CHROMOZOMŮ?

Filip Auinger

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Telomery jsou útvary nacházející se na koncích eukaryotických chromozómů. Jsou tvořeny krátkými opakujícími se sekvencemi bohatými na guanin. Nenesou žádnou genetickou informaci.¹ I tak jsou odpovědné za mnoho zajímavých a esenciálních funkcí. U dlouho žijících organismů včetně druhu *homo sapiens* nejspíše ovlivňují délku života, což je staví do popředí zájmu. Všichni savci mají shodnou telomerickou sekvenci T₂AG₃. Stavba telomer je poměrně složitá. Obsahují mnoho na telomery se vázajících se proteinů, např. TRF1 a TRF2 a zaujímají specifické prostorové uspořádání.²

Při procesu buněčného dělení jsou chromozomy za pomoci enzymového aparátu buňky zkopírovány. Ústřední enzymy tohoto procesu DNA-polymerasy však pro svou činnost potřebují na kopírovaném vlákně RNA primer, který je později degradován. Na koncích chromozómů proto zůstává krátký jednovláknový úsek, který není zkopírován a je odstraněn. To vede ke zkracování konců chromozómů při každém buněčném dělení. Telomery tedy chrání části chromozómů, které nesou genetickou informaci, před postupnou ztrátou genů. Zároveň se podílejí i na tlumení subtelomerických genů.³

Telomery jsou prodlužovány enzymaticky za působení enzymu telomerasy. Funkcí se řadí mezi reversní transkriptasy. Jde o ribonukleoprotein, skládající se ze dvou podjednotek a mnoha asociovaných proteinů ovlivňujících aktivitu. Proteinová část je tvořena telomerasovou reversní transkriptasou (TERT) a ribonukleová část telomerasovou RNA. Kooperace obou podjednotek je velmi úzká a o mnohé funkce se podjednotky dělí. Pro vnik funkční telomerasy je předpokládána dokonce nutnost kolektivního foldingu. Telomerasová RNA nese velmi konzervovanou sekundární strukturu a je odpovědná za sekvenci telomer. Jednotlivé strukturní domény jsou odpovědné za aktivitu, kontakt a kooperativitu s TERT podjednotkou. Telomerasová RNA je vysoce exprimována i v buňkách bez telomerasové aktivity. TERT podjednotka je kódována jedním genem a její transkripce a translace je striktně kontrolována, o čemž svědčí i častý výskyt inaktivované mRNA v jádrech buněk. Sekvence je velmi konzervována i malé změny ve struktuře způsobí ztrátu aktivity. V lidských tkáních se telomerasa vyskytuje jako dimer. Ke správné funkci je třeba ještě mnoho asociovaných proteinů. Hmotnost telomerasového komplexu se proto pohybuje mezi 230 – 5000 kDa. Funkce telomerasy je ovlivňována jak změnami katalytické aktivity, tak i změnami v procesivitě. K prodlužování telomer může docházet i bez aktivity telomerasy. Jedná se o homologní rekombinaci a následnou výměnu vzniklých kopií, nicméně tento proces ještě není příliš prostudován u vyšších organismů⁴.

Specifické telomerové struktury umožňují odlišení přirozených konců chromozómů od chromozomálních zlomu.⁵ Jedná se o velmi důležitou funkci, jelikož rozpoznání chromozomálních zlomů vede k aktivaci opravných mechanismů, které jsou náchylné k chybám a mohou vést k nevratnému genetickému poškození nebo k apoptose buněk. To je snadno pozorovatelné například u nádorových buněk, které mnohdy rychlým dělením vyčerpají délku svých telomer, čehož následkem dochází k fúzím jednotlivých chromozómů a značné genomové nestabilitě^{6,7}.

Délka telomer byla prokázána jako faktor limitující dělení u buněk *in vitro*. Ukázalo se, že existuje vztah mezi délkou telomer a možným počtem dělení buňky⁸. Stejná funkce telomer *in vivo* byla prokázána u myši, kde délka telomer v ledvinách korespondovala se zbývajícím délkou života.⁹ Zdá se tedy, že čím jsou telomery delší, tím žije jedinec déle. S tím však nekorrespondují délky telomer naměřené u různých druhů. Lidské telomery, mající obvykle kolem 20 Kb, patří mezi velmi krátké, například myš (*muss musculus*) má telomery asi 10x delší^{10,11}.

A právě s krátkými telomery u dlouho žijících druhů souvisí asi jejich nejdůležitější funkce. Jedná se o ochranu před zhoubným bujením. Pokud se buňka vymkne kontrole buněčného cyklu a začne se nekontrolovaně dělit, dojde rychle k vyčerpání délky telomer a spuštění programu buněčné senescence či apoptosy. Aby mohl vzniknout zhoubný nádor, musí buňky od okamžiku, kdy se vymknou kontrole buněčného cyklu, aktivovat geny které umožní udržovat délku telomer.¹² Čas, který na to buňky mají je limitován právě délkou telomer. Telomery tedy hrají úlohu v ochranném mechanismu před nádorovým bujením. A zde leží největší paradox ohledně telomer. Krátké telomery znamenají nižší riziko rakovinného bujení ale také kratší život, zatímco dlouhé telomery umožňují svým majitelům žít déle, avšak s vyšším rizikem předčasného úmrtí v souvislosti s nádorovým bujením. Účinnost tohoto mechanismu je patrná při srovnání s tkáněmi s aktivní telomerasou například ve tkáni střevní, kožní a odpovědné za krvetvorbu. Právě tyto tkáně jsou náchylné ke vzniku velmi nebezpečných forem nádorů. U krátké žijících savců tento mechanismus neexistuje a telomerasa je aktivní ve všech tkáních¹¹.

Ve většině tkání je telomerasa neaktivní, což vede ke zkracování telomer v průběhu stárnutí.¹³ Zkracování bylo zaznamenáno v různých tkáních jako např. játrech a ledvinách. Oproti tomu zkracování v nervové tkáni mozku a svalové tkáni nebylo zaznamenáno.¹⁴ Podobně ani většina nádorů své telomery nezkracuje¹⁵. Zajímavé však je, že ke zkracování dochází i u tkání

s aktivní telomerasou, jako například v epidermální tkáni epitelu tlustého střeva, toto zkracování je však poměrně pomalé a přesný mechanismus není znám¹⁶. Jako důkaz rychlejšího zkracování a stárnutí více namáhaných tkání může být uveden závěr, že dochází k násobně rychlejšímu zkracování telomer v tkáních tepen oproti žilám¹⁷. Vyčerpání délky telomer vede v organismu ke vzniku senescentních buněk. Ty transkribují odlišné geny, nedělí se a neodpovídají na podněty z okolí. Mnohé dále vykonávají, byť částečně, svou funkci a mohou v organismu přetrvat i mnoho let. Nejsou však schopny dalšího dělení a tak nemohou zajistit odpověď na napadení či zranění a následnou regeneraci tkáně¹⁸. Organismus s vysokým množstvím senescentních buněk je tedy náchylnější k nemocem a proces regenerace trvá déle. To jsou projevy, které souvisí s mnohem všeobecnějším jevem – stárnutím.

Ačkolí jsme vybaveni různě dlouhými telomery, zatím nás tento stav nemusí příliš trápit. Telomery

budou nejspíše limitovat délku život až v budoucnu. Vzhledem k známým ročním zkrácením v tkáních by docházelo k vyčerpání délky telomer ve věku asi 150 let, což je téměř dvojnásobek současné průměrné délky života.

Mnohé jevy, například mechanismus zkracování telomer v tkáních s aktivní telomerasou, udržování délky telomer ve spermích a vajíčkách v průběhu stárnutí, rozdíly v délce telomer mezi různými tkáněmi a osudy senescentních buněk musí být pro plné pochopení mechanismů ještě dále studovány. Teprve budoucnost tak ukáže, zda známe veškeré funkce telomer, či je zde místo pro další objevy. Již dnes telomery vnímáme jako struktury s mnoha důležitými funkcemi, nikoli jen jako bezvýznamné konce chromozómu bez genetické informace, jak tomu v minulosti bývalo.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů VŠCHT v Praze 320/08/0016 a MŠMT ČR 6046137305.

Literatura

1. Blackburn E. H.: Nature **350**, 569 (1991).
2. Griffith J. D., Comeau L., Rosenfield S., et al.: Cell **97**, 503 (1999).
3. Greider C.W.: Curr. Opin. Genet. Dev. **4**, 203 (1994).
4. Harrington L.: Cancer Letters **194**, 139 (2003).
5. Chan S.W., Blackburn E.H.: Oncogene **21**, 553 (2002).
6. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.: Nature **396**, 643, (1998).
7. McClintock B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **28**, 458 (1942).
8. Vaziri H. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 9857 (1994).
9. Jennings B.J., Ozanne S.E., et al.: FEBS Lett. **448**, 4 (1999).
10. Brown, W.R.: Nature **338**, 774 (1989).
11. Prowse K.R., Greider C.W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 4818 (1995).
12. Thomas M., Suwa T., Yang L., et al.: Neoplasia **4**, 493 (2002).
13. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., et al.: Science **266**, 2011 (1994).
14. Cherif H., Tarry J. L., Ozanne S. E., Hales C. N.: Nucleic Acids Res. **31**, 1576 (2003).
15. Counter C. M., Avilion A. A., LeFeuvre C. E., et al.: EMBO J. **11**, 1921 (1992).
16. Terstappen L. W. M., Huang S., Safford M., et al.: Blood **77**, 1218 (1991).
17. Chang E. and Harley, C.B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 11190 (1995).
18. Zhang H., Pan K.-H., Cohen S.N.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 3251 (2003).

BIOHYDROMETALURGIE

Sabina Purkrťová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Výskyt a těžba hornin

Schopnost získávat a zpracovávat kovy patří mezi základní technologie, které umožnily technologický a posléze průmyslový rozvoj lidstva. Začátek používání kovů se datuje do období pozdní doby kamenné (eneolit, též chalkolit – doba měděná, 5200 př.n.l. – 1900 př.n.l.), kdy se hlavně v oblastech Předního Východu a jižní a jihovýchodní Evropy začala zpracovávat měď. V době bronzové (1900 – 700 př.n.l.) je čistá měď pro zvýšení tvrdosti nahrazena svojí slitinou s cínem – bronzem a pravděpodobně po zmenšení zásob cínu si lidé v následující době železné osvojili znalost výroby železa. Mezi kovy známé a používané již od starověku patří též zlato, stříbro, zinek, měď, rtuť a antimon.

Ostatní kovy byly postupně objevovány v průběhu od raného novověku až do doby průmyslové revoluce (počátek 18. století – konec 19. století). V čistém ryzím stavu se v přírodě hlavně vyskytují pouze tzv.vzácné kovy, které jsou vysoce nereaktivní. Ostatní kovy se vyskytují převážně ve formě sloučenin, rud, což jsou takové minerály a horniny či jejich směsi, které obsahují ekonomicky významný podíl kovů získatelných těžbou. Jedná se převážně o sulfidy, oxidy, případně silikáty, sírany či soli dalších kyselin odvozených od kovů. Z oxidických rud je kov obvykle získáván redukcí koksem či oxidem uhelnatým, sulfidické rudy jsou na oxidické převáděny pražením za přístupu vzduchu. Zpracování ostatních typů rud se liší podle jejich druhu.

Biohydrometalurgie – biologické rozpouštění hornin

Se zvyšující se poptávkou po surovinách, vzrůstem jejich ceny a zároveň se snižujícími se zásobami rud v nyní dostupných ložiscích se objevuje snaha o zavádění nových postupů a aplikací, které by dovolovaly ekonomicky rentabilně těžit i ložiska chudých rud s nízkým obsahem kovů (low-grade ore) či dotěžovat ložiska bohatých rud s vysokým obsahem kovů (high-grade ore). Jednou z těchto metod je tzv. biohydrometalurgie – metoda biologického rozpouštění hornin. Biohydrometalurgie využívá schopnosti chemolithotrofních bakterií a archaeobakterií oxidujících Fe^{2+} a S^0 a anorganické sírné sloučeniny účastnit se a urychlovat rozpouštění hornin. Hornina je rozpouštěna působením vznikajícího Fe^{3+} , příp. H^+ ze vznikající kyseliny sírové. Tento proces biologického rozpouštění hornin je znám i v přírodě, kdy nastává samovolně v opuštěných dolech. Působením vnikající, neodčerpávané vody a vzduchu začne docházet jak k abiotické oxidaci přítomných sulfidických rud, tak k nárůstu přirozeně se vyskytujících extremofilních bakterií a archaeobakterií, které svou činností oxidaci dále urychlují. Tato činnost vede k vyvěrání velmi kyselých důlních drenáží (acid mine drainage – AMD, acid rock drainage – ARM), které znečišťují a ohrožují okolí (1). Základní podmínkou pro použití biohydrometalurgie je chemické složení systému – rozpouštěná hornina by měla obsahovat železo či redukované formy síry, případně pokud je neobsahuje, avšak podléhá oxidaci Fe^{3+} kationtem či kyselinou sírovou, být s takovými horninami ve směsi (2). Z hlediska struktury horniny může být kov buď přímo chemickou složkou (např. měď v chalkosinu – CuS_2 , uran ve svých oxidech) a rozpouštěním horniny se rozpustí (vylohuje) i kov sám nebo se kov vyskytuje v hornině pouze jako příměs (např. zlato v matici zlatonosného arsenopyritu) a rozpouštěním horniny dochází k jeho uvolnění z této matrice, nikoliv k rozpouštění v roztoku, které probíhá až při následném chemické loužení. Ačkoliv v obou případech se jedná z hlediska rozpouštěné horniny o stejný proces její biooxidace (biooxidation) a bioloužení (bioleaching), kdy lze uvažovat oba termíny jako synonyma, z hlediska získávaného kovu jsou někdy oba procesy terminologicky odlišovány. V prvním případě, kdy se kov přímo rozpouští do roztoku, se mluví o bioloužení žádaného kovu (např. bioloužení mědi), v druhém případě, kdy se požadovaný kov z matrice horniny pouze uvolní, aniž by došlo k jeho rozpouštění, se používá pojem biooxidace (např. biooxidace) (2).

Mechanismus mikrobiálního působení

Z hlediska mechanismu vzájemné interakce mikroorganismů a hornin byly původně uvažovány dva způsoby mikrobiálního útoku – tzv. přímý a nepřímý útok (3). Teorie *přímého útoku* uvažuje přímé působení mikroorganismu na molekuly horniny působením extracelulárních enzymů či chemickou reakcí horniny se strukturami buněčné membrány (např. reakce sulfhydrylových

skupin cysteinu s pyritem za vzniku disulfidové vazby vedoucí k uvolnění Fe-S částic z povrchu pyritu) (4). Teorie *nepřímého útoku* naopak předpokládá, že mikroorganismy narušují horninu nepřímo, tvorbou Fe^{3+} příp. H^+ kationtů, které se účastní oxidačních reakcí vedoucích k rozpouštění. Proces rozpouštění je poté kombinací jak chemických, tak biochemických reakcí. Při rozhodování o správnosti těchto dvou možných způsobů útoku se brala v úvahu jejich odlišnost ve stechiometrii a kinetice reakcí a ve vlivu adheze buněk na povrch horniny na účinnost procesu, neboť tato adheze buněk by měla mít vliv pouze v případě přímého útoku. I když stechiometrická a kinetická měření odpovídala variantě nepřímého útoku, zároveň byla pozorována i zvýšená účinnost při adhezi, předpokládaná pro přímý útok. Hypotéza nepřímého útoku však byla následně potvrzena elektronovou rastrovací mikroskopií povrchu horniny (5), kdy vliv adheze byl vysvětlen tvorbou biofilmu (3). Přestože by tedy dle některých studií přímý útok mohl probíhat (např. oxidace pyritu cysteinem v nepřítomnosti kyslíku a bakterií) (3,4) a případně mít velmi okrajový vliv při rozpouštění, za prokázaný mechanismus způsobující tento proces je považován nepřímý útok podporovaný tvorbou biofilmu. Bakteriální buňky rostoucí na povrchu jsou obklopené exopolysacharidovou vrstvou (EPS), kterou naopak netvoří buňky rostoucí v roztoku. Tato EPS slouží jako reakční prostor, kde jsou reaktanty koncentrovány blízko povrchu minerálu, což usnadňuje útok produkovaného Fe^{3+} či H^+ na valenční vazby minerálu. Složení EPS závisí na typu bakterie a dostupných substrátech. V případě *Acidithiobacillus ferrooxidans* (dříve *Thiobacillus ferrooxidans*), který oxiduje jak Fe^{2+} , tak S^0 se složení EPS liší při růstu na pyritu či síře. Při růstu na pyritu je EPS vysoce impregnovaná Fe^{3+} kationty za tvorby komplexů s kyselinou glukuronovou. EPS tak má kladný náboj, který umožňuje pomocí elektrostatických sil uchycení na povrchově záporně nabitým pyritu, tvorba komplexů také zajišťuje zvýšenou dostupnost kationtů železa. Při růstu pouze na síře má EPS hydrofobní charakter (vyšší zastoupení lipidů a volných mastných kyselin, bez komplexu Fe^{3+} -kyselina glukuronová), který umožňuje uchycení na povrchu síry, nikoliv však na povrchu pyritu (6). Částečný, ale spíše menší význam pro rozpouštění, má i lokální zvýšení pH v EPS. Zatímco kationty železa jsou zadržovány v EPS, vznikající sloučeniny síry jsou uvolňovány do roztoku, kde se stávají zdrojem energie pro volně rostoucí bakterie a přispívají tak k růstu celého konsorcia.

Thiosíranový a polysulfidový mechanismus

Pro rozpouštění nepřímým útokem byly navrženy dva mechanismy lišící se podle rozpustnosti sulfidů v kyselinách (7). Oxidace sulfidů nerozpustných v kyselinách (pyrit - FeS_2 , molybdenit- MoS_2) probíhá thiosíranovým mechanismem, kdy hlavním meziproduktem je thiosíran a koncovým produktem síran, ruda je rozpouštěna Fe^{3+} kationtem, který cyklicky dodávají bakterie reoxi-

dací Fe^{2+} . Pro thiosíranový mechanismus je nutná jak přítomnost Fe^{3+} kationtů v systému, tak přítomnost Fe^{2+} oxidujících bakterií. Oxidace sulfidů rozpustných v kyselinách (sfalerit-ZnS, chalkopyrit-CuFeS₂, galena-PbS) běží polysulfidovým mechanismem, kdy hlavním meziproduktem je síra, která může být dále oxidována bakteriemi na síran za vzniku H^+ . Bakterie se tedy účastní rozpouštění nejenom produkcí Fe^{3+} , ale též ho podporují tvorbou kyselého prostředí. V tomto případě může docházet k rozpouštění i v nepřítomnosti Fe^{3+} kationtu, oxidačním činidlem může být i O_2 , který se redukuje přes superoxidový radikál a peroxid na vodu (7), což znamená, že rozpouštění může probíhat i za přítomnosti pouze sírných bakterií. Přítomností Fe^{3+} kationtu a železitých bakterií se však jeho rychlost enormně zvyšuje. V obou případech je pro rychlou reoxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} nutná přítomnost železitých bakterií, neboť tato reoxidace probíhá i samovolně, ale bez přítomnosti bakterií v kyselém prostředí velmi pomalu.

Mikroorganismy účastníci se procesu

Sírné a železité bakterie, které se účastní těchto procesů, jsou chemolithotrofní autotrofní organismy. energii získávají oxidací Fe^{2+} a S^0 či anorganických sírných sloučenin, kdy akceptorem je obvykle O_2 . Některé z těchto bakterií jsou ale schopny používat jako akceptor elektronů i Fe^{3+} . Například *A. ferrooxidans* (dříve *Thiobacillus ferrooxidans*), oxidující jak Fe^{2+} , tak S^0 , je schopen za anaerobních podmínek oxidovat S^0 redukcí Fe^{3+} (8), což je významné z technologického hlediska, neboť během procesu nelze vždy zajistit dostatečnou aeraci v celém objemu. Tyto sírné a železité bakterie jsou zároveň autotrofní, fixace uhlíku probíhá Calvinovým cyklem, není tedy nutno dodávat organické substráty pro výživu, neboť bakterie rostou autotrofně na CO_2 . Jak sírné, tak železité bakterie jsou výrazně acido-

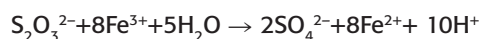
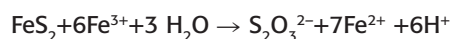
filní – v případě sírných bakterií je acidofilita způsobena produkcí kyseliny sírové, v případě železitých bakterií faktem, že pouze při pH kolem 1,6 jsou oba kationty Fe^{2+} / Fe^{3+} rozpustné (2). Vzhledem k vysoké koncentraci mnoha kovových iontů (As^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^+) musí být jednotlivé druhy k nim tolerantní (9). Druhové složení konsorcia mikroorganismů závisí na teplotě procesu v závislosti na teplotním optimu jednotlivých druhů. Při 40 °C a méně (obvyklá teplota pro biooxidaci) se jedná hlavně o G^- bakterie rodu *Acidithiobacillus* – *A. ferrooxidans* (Fe a S oxidující), *A. thiooxidans* a *A. caldus* (S oxidující) a rodu *Leptospirillum* – *L. ferrooxidans* a *L. ferriphilum* (Fe oxidující). Při 50 °C se z G^- bakterií jedná o *A. caldus* a druhy *Leptospirillum spp.*, z G^+ bakterií druhy rodu *Sulfobacillus* (Fe a S oxidující) a *Acidimicrobium* (Fe oxidující) a též archaebakterie rodu *Ferroplasma* (Fe oxidující). Při teplotě nad 65 °C dominují archaebakterie rodu *Sulfolobus* (S oxidující) a *Metallosphaera* nad bakteriemi. Některé archaebakterie rodu *Acidianus* jako *Ad. ambivalens* či *Ad. infernus* jsou schopny růst i při ještě vyšších teplotách (až 90 °C) na redukované síře a při nízkém pH. Obecně však oblast těchto vyšších teplot, která by mohla rozšířit spektrum biohydrometalurgicky rozložitelných hornin, není tak prozkoumána jako teploty 40 a 50 °C (2).

Poměrné zastoupení jednotlivých druhů pak závisí na způsobu provedení (aerace, koncentrace kovů), neboť jednotlivé druhy se liší svou tolerancí ke kovovým kationtům, schopností anaerobní respirace a schopností autotrofní fixace CO_2 , případně schopností žít mixotrofně, tj. využívat organické látky produkované ostatním mikroorganismy konsorcia (10). Např. *A. ferrooxidans*, který patří mezi nejvíce se vyskytující bakterii, má nižší toleranci k Fe^{3+} kationtu. V případě míchaných tanků, kdy je v ustáleném stavu koncentrace Fe^{3+} kationtu vysoká, je za těchto podmínek spíše než *A. ferroxi-*

Srovnání jednotlivých mechanismů (7):

Thiosíranový mechanismus

rozpouštění rudy

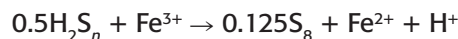
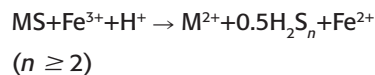


reoxidace Fe^{2+} železítými bakteriemi

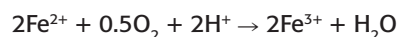


Polysulfidový mechanismus

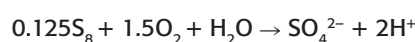
rozpouštění rudy



reoxidace Fe^{2+} železítými bakteriemi



oxidace S_8 sírnými bakteriemi na SO_4^{2-}



dans důležitější spolupůsobení rodu *Leptospirillum* a *A. thiooxidans* či *A. caldus* (11).

Technologické provedení

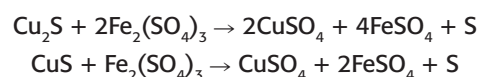
Z hlediska technologie lze odlišit dva základní postupy. Prvním způsobem je tzv. bioloužení na haldě (dump and heap bioleaching), kdy vytěžené kusy horniny jsou vrstveny do haldy a proplachovány kyselým loužícím roztokem. Hornina se vrší na nepropustnou membránu, halda je opatřena potrubím pro rozvod a odvod loužícího roztoku, do kterého je vmíšena část mikrobiální populace, zbylá část žije na povrchu horniny, aerace může být pasivní pouze proudem roztoku či aktivní vháněním vzduchu. Výhodou bioloužení na haldě je jednoduché a levné provedení. Nevýhodou je obtížnost dostatečné aerace, nestejně podmínky v různých částech (gradient pH, přístup vzduchu) a nemožnost dostatečné kontroly procesu (12). Proces také trvá poměrně dlouho, v řádu týdnů. Pro většinu procesů mimo zlato je však tento postup dostačující. Další možnou variantou je bioloužení v místě (in situ bioleaching), kdy jsou kyselými důlními drenážemi zavlažovány přímo stěny porubů či vydolovaná podzemní ložiska. V tomto případě odpadá nutnost manipulace a přemístování horniny a tato metoda je využívána u mědi pro chudá ložiska či dotěžení bohatých a téměř vždy u uranu (2). Druhým způsobem je aplikace postupů známých z klasických biotechnologií – jemně rozemletá minerální suspenze je kultivována v míchaných průtočných tancích – fermentorech (stirred tanks) o různých pH a teplotách. Tento způsob je velmi účinný a rychlý, trvá pouze několik dnů oproti týdnům bioloužení na haldě. Nevýhodou je nákladnost zařízení a provozu (tanky mohou být navíc z důvodu udržení vhodných podmínek plněny pouze z 20 % svého objemu), takže se tento způsob užívá pouze u hornin s vysokým obsahem drahého kovu, kde je ekonomicky rentabilní. Z kovů, které se v současné době získávají biometalurgií, je tato metoda využívána běžně pouze pro získávání zlata ze zlatonosného pyritu (12).

Kovy získávané biohydrometalurgií

Měď

Ryzí měď se vyskytuje v přírodě vzácně, většina mědi je vázána ve sloučeninách, nejčastěji v sulfidech. Hlavním zdrojem jsou sulfidické rudy, poměrně bohaté na železo (pyrit – FeS_2 , chalkopyrit – CuFeS_2), ale s velmi nízkým obsahem mědi – asi 1%. Při klasické metodě je po rozdrčení a zakoncentrování (obsah mědi stoupne na 15-20 %) přidán ke směsi křemen (SiO_2) a směr je pražena při 1400 °C. V rudě obsažený FeS se převede do křemičitanové strusky, zatímco Cu_2S se zredukuje na Cu. Surová měď je poté čištěna elektrolyticky, kdy anodou je surová měď, katodou čistá měď a elektrolytem CuSO_4 . Naopak při bioloužení dojde za pouze mírně zvýšené teploty (40-50 °C) ke konverzi ve vodě nerozpustných sulfidů mědi na rozpustné sírany za uvolnění

Cu^{2+} do roztoku. Po rozbití a okyselení kyselinou sírovou jsou navrstvené haldy zavlažovány roztokem obsahujícím železo, přičemž probíhají v případě chalkosinu (Cu_2S) a covellin (CuS) následující sumární reakce (2):



Z odváděného roztoku obsahujícího 1,5-6 g/l mědi a až 20 g/l železa je měď dále získávána precipitací na železných pilinách (cementace) a hlavně elektrolyzou. Celkový dlouhodobý přehled o objemu těžby mědi bioloužením je kvůli neúplnosti dat z jednotlivých dolů nedostupný. Většina dostupných údajů pochází z Chile, největšího producenta mědi, kde se takto nejvíce produkuje v dole Calama – 225 tisíc tun mědi ročně (2).

Zlato

Zlato se díky své inertnosti vyskytuje v přírodě pouze jako ryzí kov, který je příměsí v jiných horninách, nejčastěji v křemenu. Z křemenných zlatonosných žil se po jejich rozrušení dostávalo do náplavů, odkud se rýžovalo. Tato rýžonosná ložiska jsou však v současnosti již takřka vyčerpana. Hlavním zdrojem zlata jsou tedy nyní ložiska, kde je zlato velmi jemně rozptýleno a získává se hydrometalurgicky – po jemném namletí se hornina louží buď roztokem kyseliny chlorovodíkové v oxidačním prostředí plynného chloru či přidané kyseliny dusičné (lučavka královská) nebo působením roztoku alkalických kyanidů při probublávání kyslíkem. Vyloužené zlato se z roztoku získává redukcí (elektrolyzou, redukčními činidly – hydrazin, hliník). V případě zlata se biohydrometalurgie používá pro získávání zlata ze zlatonosného arsenopyritu (FeAsS). Zlato enkapsulované v matici arsenopyritu/pyritu vzdoruje běžné metodě loužení kyanidem. Bez předběžné úpravy arsenopyritu, kdy je arsenopyrit rozemlet, zlato nesoucí koncentrát je zpracováván floatací a dále žhaven při 700 °C v přítomnosti kyslíku a leptán kyselinou pod tlakem v atmosféře obohacené kyslíkem (autokláv), lze následným loužením získat jen 30% Au. Alternativou k této náročné fyzikálněchemické úpravě arsenopyritu je biooxidace, která umožňuje následně vyloužit kyanidem až 95 % obsaženého Au. Proces se někdy označuje jako biooxidace, nikoliv jako bioloužení, protože není rozpouštěno přímo zlato, ale pouze zlatonosný arsenopyrit, z jehož matrice se zlato uvolní, a teprve následně je louženo kyanidem. Celková sumární reakce je následující (2):

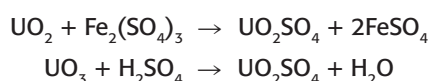


V případě zlata, které je velmi drahým kovem, se biooxidace provádí ve fermentorech. Další výhodou biooxidace je evidentně jednodušší provedení, s nižší produkcí silně znečištěných odpadních vod. Nevýhodou je, že při následném loužení zlata pomocí kyanidu je často nutno užít ho více než po fyzikálněchemické úpravě arsenopyritu.

Tato metoda byla vyvinuta v 80. letech v Jihoafrické republice (2). Nejzrůslehlejší fermentační závod je v dole Sansu na Ashanti zlatých polích (Ghana), kde je denně zpracováno 960 tun arsenopyritu ve 24 tancích, každý o objemu 1 mil. litrů. V současné době je v 6 zemích provozováno 10 provozů pro biooxidaci arsenopyritu – 8 fermentorů (3 v Austrálii, 2 v Ghaně, 1 v Peru, 1 v Brazílii, 1 v Jihoafrické republice) a 2 haldy (1 v Austrálii, 1 v USA) (12).

Uran

Uran se vyskytuje v přírodě v různých rudách relativně často, jeho obsah je však relativně nízký (0,04–3 %), navíc často s příměsí dalších kovů. Nejčastěji se vyskytuje jako smolivec (UO_2). Uranová ruda obsahující smolivec se nejdříve louží kyselinami (sírovou, dusičnou, chlorovodíkovou) a přítomné kovy (Al, Fe, Co, Mn) se poté sráží uhličitánem sodným a hydroxidem vápenatým, rozpustný uhličitán uranylo-sodný se rozkládá kyselinou chlorovodíkovou a po vysrážení amoniakem a žiháním je připraven U_3O_8 , který se dále zpracovává převážně na jaderné palivo. Při bioloužení je uran získáván konverzí nerozpustných oxidů uranu na rozpustné uranyl sírany, které se stejně jako jiné koncentráty uranu dále zpracovávají na jaderné palivo (souhrnně se uranové koncentráty získané zpracováním uranových rud ve formě různých oxidů, hydroxidů, uranyl síranů či dalších sloučenin uranu nazývají podle své barvy jako „yellowcake“). Výsledné rovnice jsou následující (2):



Bioloužení je téměř vždy prováděno in situ. V roce 1988 bylo takto vytěženo 300 tun uranu v dole Dennison v Kanadě. Vzhledem k útlumu poptávky po uranu tento důl ale zastavil těžbu a ze stejného důvodu nízké poptávky se v současnosti tímto způsobem uran netěží nikde (2).

Kobalt

Kobalt netvoří samotná ložiska, kde by se převážně vyskytoval, vyskytuje se pouze jako příměs niklových

rud či sulfidických rud mědi a olova. Metody jeho získávání jsou poměrně složité a záleží na chemickém složení dané horniny.

Jediný známý případ bioloužení kobaltu jsou míchané aerované tanky k extrakci kobaltu ze zásob pyritového koncentrátu obsahujícího kobalt provozované v Kasese (Uganda). Objem zásob je 1,1 miliónu tun pyritu, koncentrát obsahuje 1,38 % Co a více, objem tanků je 1,35 miliónu litrů, výtěžek je 92 %. Těžba začala v roce 1998 a denně je zpracováno kolem 240 tun pyritu užitím nedefinované směsi bakterií *Acidithiobacillus* a *Leptospirillum* při optimální teplotě 37 °C (2).

Jiné kovy

Bioloužení může být použito u každého kovu, který se vyskytuje ve formě nerozpustné redukované sloučeniny síry – např. NiS, ZnS. Ačkoliv biometalurgie umožňuje vytěžení jinak nevytěžitelných chudých ložisek, její aplikace záleží na hodnotě kovu, který je takto získáván. Například technologie pro získávání niklu již byla otestována, zatím se ale nenašlo žádné ložisko vhodné koncentrace a velikosti, které by umožnilo rentabilní těžbu při současných cenách niklu (2).

Výhody a nevýhody

Oproti klasickým metodám má biometalurgie mnoho výhod, jak ekonomických, tak ekologických. Mezi ekonomické výhody patří, že lze úspěšně a s menšími náklady těžít kovy i z chudých ložisek s nízkým obsahem kovu, což nabývá důležitosti s postupujícím vyčerpáváním bohatých ložisek, kdy se zájem obrací i na těžbu chudých ložisek či dotěžení bohatých. Zároveň je biohydrometalurgie šetrnější k životnímu prostředí, dochází při ní k nižší produkci látek znečišťujících životní prostředí než u klasických fyzikálněchemických postupů (použití nebezpečných chemikálií ve velkých množstvích, vysoká teplota, tlak, možnost havárie atd.). Navíc kontrolované dovytěžení dolů zabraňuje, aby tento proces nastal nekontrolovaně a samovolně, což by vedlo ke znečištění prostředí kyselými důlními drenážemi z opuštěných dolů (2).

Literatura

- Bond P.L., Druschel G.K., Banfield J.F.: Appl Environ Microbiol. **66**, 4962 (2000).
- Rawlings D.E.: Pure Appl. Chem. **76**, 847 (2004).
- Tributsch H.: Hydrometallurgy **59**, 177–185, (2001).
- Rojas-Chapana J.A., Tributsch H.: Hydrometallurgy **59**, 291 (2001).
- Edwards K.J., Hu B., Hamers R.J., Banfield J.F.: FEMS Microbiol. Ecol. **34**, 197 (2001).
- Gehrke T., Telegdi J., Thierry D., Sand W.: Appl Environ Microbiol. **64**, 2743 (1998).
- Schippers A, Sand W.: Appl Environ Microbiol. **65**, 319 (1999).
- Sugio T., Domatsu C., Munakata O., et al.: Appl. Environ. Microbiol. **49**, 1401 (1985).
- Rawlings D.E.: Microb. Cell Fact. **14**, 13 (2005). (<http://www.microbialcellfactories.com/content/4/1/13>)
- Clark D.A., Norris P.R.: Microbiology **142**, 785 (1996).
- Rawlings D.E., Tributsch H., Hansford G. S.: Microbiology **145**, 5 (1999).
- Acevedo F.: The use of reactors in biomineral processes. El. J. Biotechnol. **3**, 184 (2000). (<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue3/full/4/reprint.html>)
- Informace o historii a klasické metalurgii: <http://en.wikipedia.org/wiki/Wikipedia>

MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE METHIONINU

Linda Paulová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Methionin (*Met*) patří mezi esenciální aminokyseliny. Poprvé byl izolován z kaseinu v roce 1922. Kromě toho, že je methionin součástí bílkovin, hraje důležitou úlohu v řadě fyziologických procesů, jako je například methylace sloučenin, slouží jako prekurzor cysteinu, účastní se odbourávání mastných kyselin, má značný vliv na detoxikaci jater nebo může sloužit jako antioxidant. Člověk, ani některá hospodářská zvířata si tuto aminokyselinu neumí nasyntetizovat, proto musí být přijímána formou potravy. Methionin je v běžných potravinách, zejména v rostlinných, zastoupen relativně málo. Vzhledem k rozličným funkcím, nedostatek methioninu způsobuje řadu fyziologických poruch, jako je toxemie, dětská revmatická horečka, vypadávání vlasů, deprese, schizofrenie a další. Aby se předešlo těmto problémům, přidává se methionin jako aditivum do některých produktů, převážně do sojových výrobků, ale i do krmných směsí například skotu nebo prasat. Dále je methionin spolu s jeho deriváty součástí některých terapeutických léčiv¹.

Průmyslová výroba methioninu:

V současné době se methionin vyrábí dvěma způsoby. Převažuje chemická syntéza. Méně se používá extrakce z proteinových hydrolyzátů.

Extrakce z proteinových hydrolyzátů:

Hydrolyzou proteinů vzniká směs látek, ze kterých musí být methionin odseparován. Navíc se musí vycházet z ohromného množství hydrolyzátů, protože je methionin v bílkovinách zastoupen poměrně málo².

Chemická syntéza:

Chemickou cestou vzniká racemická směs D,L-methionin, která musí být následně převedena na L-formu. Jako výchozí látka pro výrobu methioninu se používá akrolein³.

Vzhledem k tomu, že oba dva způsoby výroby jsou vysoce nákladné, je snaha vyvinout ekonomičtější cestu průmyslové produkce. Levnější alternativu slibují fermentační procesy, pomocí kterých se již úspěšně vyrábí ostatní esenciální aminokyseliny. Mikrobiální výroba umožňuje produkci pouze L-izomerů. V roce 1957 byla představena první produkce aminokyseliny (L-glutamátu) s využitím mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum*. V dnešní době se úspěšně využívají fermentační procesy například pro výrobu lysinu, threoninu, isoleucinu a histidinu⁴. Přestože již byly připraveny nadprodukční kmeny pro biosyntézu biologicky aktivního L-methioninu, průmyslově se vyrábí tato aminokyselina stále ještě hlavně pomocí organické syntézy.

Biosyntéza L-methioninu u mikroorganismů:

Biosyntéza methioninu za normálních podmínek podléhá silné regulaci. Přirozené mikroorganismy produkují tuto aminokyselinu pouze pro vlastní potřebu, tedy v malém množství. Pro průmyslovou výrobu je zapotřebí připravit rekombinantní kmeny, které budou syntetizovat methionin v nadprodukcí. Při navrhování vhodného producenta je zapotřebí znát celou biosyntetickou dráhu L-methioninu spolu s regulačními mechanismy u vybraného mikroorganismu. Při hledání vhodného kmene byly využity poznatky z průmyslové výroby lysinu a threoninu, které patří spolu s methioninem do stejné rodiny aminokyselin, do aspartátové rodiny^{4,5}.

Skupina aminokyselin odvozených od aspartátu:

Do aspartátové rodiny se řadí 5 aminokyselin (aspartát, asparagin, threonin, methionin a lysin). Aspartát vzniká transaminační reakcí z oxalacetátu, který je meziproductem Krebsova cyklu a glukoneogeneze. U bakterií a u rostlin slouží aspartát jako prekurzor pro tvorbu methioninu, lysinu a threoninu.

Existuje mnoho databází a literárních citací, kde se dají najít informace ohledně anabolických drah aminokyselin⁶. Biosyntetická dráha methioninu u řady mikroorganismů má spoustu společných znaků. Přeměna aspartátu na methionin se skládá ze 7 enzymaticky katalyzovaných reakcí. Tvorba methioninu je zahájena fosforylací L-aspartátu aspartátkinasou za vzniku L-aspartyl- β -fosfátu. Následuje oxidace pomocí β -aspartátsemialdehyddehydrogenasy za vzniku aspartátsemialdehydu. Tyto první dvě reakce jsou společné i pro biosyntézu lysinu a threoninu. Přesto je vznik jednotlivých aminokyselin regulován nezávisle na ostatních. Většina mikroorganismů produkuje tři izoenzymy aspartatkinasy. Každý z izoenzymů samostatně katalyzuje produkci jedné ze tří aminokyselin a je inhibován mechanismem zpětné vazby příslušnou aminokyselinou. Díky tomu není biosyntéza methioninu, lysinu a threoninu kontrolována jako celek, ale jednotlivě pro každou aminokyselinu zvlášť.

Biosyntéza methioninu a její regulace u *E.coli*:

Vlastní biosyntéza methioninu se skládá ze 4 kroků, kdy prekurzorem je homoserin, který vzniká oxidací aspartátsemialdehydu působením enzymu homoserindehydrogenasy. Homoserin je převeden na O-sukcinyl-L-homoserin za katalýzy homoserin-O-sukcinyltransferasy. Tento krok zřejmě nepodléhá žádné regulaci. Následuje eliminační reakce, která je katalyzována O-sukcinylhomoserin(thiol)lyasou za vzniku cystathioninu. Nejsou známy žádné efekory této reakce. Inhibiční vliv na enzym O-sukcinylhomoserin(thiol)lyasu mají

cystathionin a L-homocystein. Jedná se o zpětnovazebnou inhibici produktem. Třetí reakce je katalyzována cystathionin- β -lyasou. Jedná se o eliminačně-adiční reakci, jejíž produktem je L-homocystein. Produkt reakce, L-homocystein, inhibuje reakci, naopak pyridoxal působí jako aktivátor. V posledním kroku biosyntézy methioninu dochází k přenosu methylové skupiny z donoru na L-homocystein za tvorby L-methioninu. Tato reakce je katalyzována enzymem homocysteintransmethylovasou, který podléhá zpětnovazebné inhibici L-methioninem. Hořčičnaté ionty a kyanokobalamin působí jako aktivátory^{5,7}.

Biosyntéza methioninu podléhá také regulaci na úrovni transkripce. Je znám jak represor (MetJ), tak i aktivátor (MetR) transkripce některých strukturálních genů kódujících enzymy, které se účastní biosyntézy methioninu⁷.

Strategie při přípravě nadprodučních kmenů pro výrobu L-methioninu:

Úspěch fermentačních procesů závisí na správném výběru produkčního kmene. Nejdříve je zapotřebí zvolit takový mikroorganismus, u kterého je dobře prozkoumána celá metabolická dráha pro syntézu methioninu včetně všech regulačních kroků. Dále je zapotřebí připravit mutanty s upravenými regulačními mechanismy, tak aby mohla probíhat nadprodukce žádané aminokyseliny. Byly připraveny mutanty rezistentní k analogům methioninu, u kterých jednotlivé enzymy metabolické dráhy (aspartátkinasa, homoserindehydrogenasa, O-sukcinylhomoserin(thiol)-lyasa, cystathionin- β -lyasa a homocysteintransmethylovasa) pro produkci methioninu nepodléhají zpětnovazebné inhibici produktem. Takové mutanty se označují jako regulační. U některých regulačních mutantů byl vyřazen z činnosti i represor MetJ. Existují ještě mutanty, které vyžadují pro svůj růst některé živiny (v našem případě methionin) na rozdíl od přirozených kmenů, od kterých byly odvozeny. Takové mutanty se označují jako auxotrofní. Komerční produkce většiny aminokyselin využívá kombinaci obou typů mutantů, tedy auxotrofně-regulační mutanty, které

se ukázaly jako nejvýhodnější. Další možností, jak zvýšit produkci methioninu, je amplifikace některých důležitých enzymů (aspartátkinasa, homoserin-O-sukcinyltransferasa) pro jeho biosyntézu^{4,5,8}.

Příklady rekombinantních kmenů pro produkci methioninu:

Byla připravena celá řada mutantních kmenů od různým mikroorganismů, u kterých byla docílena syntéza methioninu v nadprodukcii⁸. Jako nejvýhodnější se ukázaly kmeny *Brevibacterium heali* a *Corynebacterium lilium*.

Auxotrofně-regulační mutant kmene *Brevibacterium heali* pro produkci methioninu, který vyžaduje přítomnost lysinu a threoninu v médiu a je rezistentní k ethioninu. Tento kmen produkuje 12,5 g/l methioninu v 15 l fermentoru. Do média byl kromě lysinu a threoninu přidáván navíc biotin a dusičnan amonný. Regulační mutant stejného kmene produkuje pouze 13 mg/l methioninu⁵.

Regulační mutant kmene *Corynebacterium lilium* (M-128) pro produkci methioninu, který je rezistentní k ethioninu a analogům methioninu. Tento kmen produkuje 3,4 g/l methioninu s přidavkem cysteinu do média v 15 l fermentoru. Dále se pracuje na přípravě auxotrofně-regulačního mutantu, u kterého se předpokládá vyšší produkce methioninu⁹.

Závěr

Vzhledem k širokému uplatnění L-methioninu v potravinářském a farmaceutickém průmyslu je žádoucí nalézt levnější způsob výroby této aminokyseliny. Doposud se methionin vyrábí převážně pomocí organické syntézy, kdy vzniká směs D,L-izomerů. Levnější alternativu slibují fermentační procesy, pomocí kterých se již úspěšně vyrábí ostatní esenciální aminokyseliny. Aby se mutantní kmeny daly využít pro průmyslovou výrobu této aminokyseliny, musely by být schopny vyprodukovat kolem 50 g/l methioninu. Byla již připravena řada mutantů, u kterých dochází k nadprodukcii methioninu, ale stále v nedostačujícím množství.

Literatura:

1. Loest C.A., Titgemeyer E.C., St-Jean G., et al.: J. Animal Sci. **80**, 2197 (2002).
2. Vigneaud V.D., Dyer H.M.: Ann. Rev. Biochem. **5**, 159 (1992).
3. Akari K., Ozeki T.: Amino acids (survey). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, **9**, 504 (1991).
4. Ikeda M.: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology **79** (2002).
5. Kumar D., Gobes J.: Biotechnol. Adv. **23**, 41 (2005).
6. file:///D:/Documents%20and%20Settings/iv0/Dokumenty/laborka/methionin/Botany%20online%20Basic%20Metabolism%20-%20Biosyntheses%20-%20Amino%20Acids.htm
7. Green R.C.: In Neidhardt F.C. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, 542-561 (1994).
8. Rodionov D.A., Vitreschak A.G., et al.: Nucleic Acids Res. **32**, 3340 (2004).
9. <http://dbtindia.nic.in/annualreports/2003-04/Chapter%207.pdf>

V TOMTO ČÍSLE NAJDETE

ÚVODEM	1
MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY TRANSKRIPCE U EUKARYOT VE SVĚTLE UDĚLENÍ NOBELOVY CENY R. D. KORNBERGOVI V ROCE 2006	2
RNA INTERFERENCE – NOBELOVA CENA ZA FYZIOLOGII A MEDICÍNU 2006	4
RNA INTERFERENCE A JEJICH MOŽNOSTI PŘI STUDIU METABOLICKÝCH SYNDROMŮ	7
TELOMERY – BEZÚČELNÉ KONCE CHROMOZOMŮ?	9
BIOHYDROMETALURGIE	10
MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE METHIONINU	15

POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,

aby byla technická úprava našeho časopisu co nejlepší a s minimálním množstvím chyb, uvítali bychom dodržování některých dále uvedených zásad.

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako "attachment" spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem.
2. Texty pište v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. Nerozdělujte slova na konci řádků. V textu lze používat zvýraznění některých termínů tučným písmem či kurzívou, a také horní a dolní index. Řádkování jednoduché. Odsazení odstavců a mezery mezi nimi nepoužívejte (nastavení = 0).
3. Nepoužívejte automatické číslování, tabulátory, ani „tvrdé“ definice stránek.
4. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
5. Připojte vždy svojí e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

Děkuji

L. Fukal

**BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST**
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

Podávání novinových zásilek povoleno Ředitelstvím pošt Praha, čl. NP 1177/1994 ze dne 13. 6. 1994