

# B I PROSPECT

Dvacátýprvní ročník  
Číslo 2/2011

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@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

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

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

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.  
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Alena Čejková, CSc.  
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6  
(Editor)

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

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

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

Ing. Jan Kopečný, DrSc.  
(Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.  
(Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci)

Doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc.  
(Ústav biochemie, PřF MU, Brno)

RNDr. Ivan Babůrek, CSc.  
(Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.  
(Katedra biochemie PřF UK, Praha)

Doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.  
(Endokrinologický ústav, Praha)

---

# BIOPROSPECT

---

21<sup>th</sup> Volume  
No. 2/2011

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.  
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:

Petra Lipovová, PhD. (editor in chief)  
ICT, Technická 3  
166 10 Prague 6, Czech Republic  
Phone +420 220 443 028  
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

# ÚVODEM

Vážení přátelé,

jak jsme Vás již v minulých číslech našeho bulletinu informovali, bude nejvýznamnější událostí v životě naší společnosti v tomto roce mezinárodní biotechnologické symposium Biotech 2011 spojené s již 5. Česko-švýcarským symposiem. Dosavadní informace publikované v našich dvou předchozích číslech doplňujeme o program seminářů (workshopů), které se nám podařilo pro Vás připravit. Již před oficiálním zahájením symposia jsme pro Vás připravili seminář o tom jak úspěšně publikovat ve vědeckých časopisech, a to s Dr. Anthony Newmanem z významného nakladatelství odborné literatury Elsevier. Seminář je přístupný i těm, kteří nejsou účastníky symposia. Účast doporučujeme zejména studentům a mladým vědeckým pracovníkům, ale jsme si jisti, že i ostatní vědečtí pracovníci a vysokoškolští pedagogové se zde dozví mnoho nového, neboť nároky na publikování vědeckých sdělení se stále zvyšují jak po odborné, tak po technické stránce. V průběhu symposia proběhnou také semináře o pracovních příležitostech a možnostech studia v zahraničí se zaměřením zejména na možnosti studia na švýcarských univerzitách. Pro zástupce biotechnologického průmyslu, vědecké a vysokoškolské pracovníky bude jistě velmi zajímavé setkání českých a švýcarských biotechnologů první den po přivítací party. Zájemce prosíme, aby se z technických důvodů registrovali. Program symposia ve spolupráci s našimi partnery neustále vylepšujeme a upřesňujeme, takže dochází k permanentní aktualizaci webových stránek symposia [www.biotech2011.cz](http://www.biotech2011.cz). Pokud jste se ještě nepřihlásili k účasti, máte stále možnost se zaregistrovat jak k pasivní, tak aktivní účasti a prezentovat na posterech výsledky své práce. Nejlepší postery budou vyhodnoceny a na závěrečném zasedání odměněny. Znovu vyzýváme různé organizace, firmy a společnosti, aby využili tohoto symposia k informacím o svých činnostech a výrobcích formou informačního stánku, posteru, distribucí informací v registračních materiálech sympo-

sia, insercí v knize abstrakt, promítáním informačního šotu či prezentací při přestávkách. Konkrétní formu prezentace lze dohodnout s organizátory. K dotazům slouží též dotazníkový formulář na webové stránce symposia.

V tomto čísle Biopropectu, dle našeho slibu, publikujeme zkrácené texty většiny přednášek přednesených na semináři „Novinky v oblasti genetických modifikací“, který se uskutečnil v pátek 22. dubna 2011 v Národní technické knihovně. Tyto články jsou doplněny dalšími přehledy z různých oblastí genových modifikací a týkají se např. transgenních stromů či transgenních rostlin. V případě článku o transgenních stromech jsme akceptovali zajímavou formu prezentace formou fiktivního rozhovoru, která Vás jistě zaujme.

V souvislosti s aktivitami v oblasti genomiky bychom Vás rádi upozornili na zajímavé mezinárodní symposium „PhenoDays 2011“, které se bude konat 12 – 14. října 2011 v holandském Wageningen (<http://www.phenodays.com>). Fenotypování se stává hlavním směrem výzkumu vedoucího ke zlepšení vlastností hospodářských plodin, a proto symposium jistě zaujme všechny genetiky, biology, biotechnology a ostatní profese, které se o tuto problematiku zajímají. Účastníci symposia mají i možnost se zúčastnit workshopů v největším evropském středisku fenotypového výzkumu rostlin „PhenoFab“, které se nachází v těsné blízkosti konferenčního centra ve Wageningen.

Těšíme se, že se s mnohým z Vás se potkáme v průběhu našeho symposia Biotech 2011 a tradičního již 5. Česko-švýcarského symposia, kde budete mít možnost se setkat se starými známými či navázat nové kontakty a posílit česko-švýcarskou spolupráci v oblasti biotechnologií.

S pozdravy Vaši  
Jan Káš a Petra Lipovová

# BIOTECH 2011 – SCHEDULE OF WORKSHOPS

**Wednesday, June 15, 2011, 14:00 – 15:30, venue – NTL, Balling's hall**

**The Journal Club – How to write a great research paper, and get it accepted by a good journal**

Anthony Newman, Publisher, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

This workshop aims to help researchers understand the publisher and editor's perspective in what makes the distinction between an accepted or rejected journal articles. It will offer practical manuscript advice, cover a range of topics including manuscript structure, the review process, and publication ethics.

**Wednesday, June 15, 2011, 20:00 – 21:00, venue- NTL, room to be specified**

**Czech-Swiss Partnership – the round table (panel discussion)**

Workshop is organized in collaboration with the representatives of the Czech and Swiss biotechnological industry, governmental institutions and universities. The main goal of this meeting is enhance the mutual collaboration in all aspects promoting development of biotechnologies for prosperous society. The final program will be announced after confirmation of participation by the addressed and freely registered personalities.

**Thursday, June 16, 2011, 16:30 – 17:50, venue- NTL, Balling's hall**

**Exchange opportunities for biotechnology students in Switzerland and the Czech Republic**

The workshop is jointly organized by the Institute of Chemical Technology in Prague and the Institute of Biotechnology at the ZHAW. It provides an important forum for participants who are seeking opportunities to study biotechnology in a foreign county. It is aimed at students interested in fostering their career by broadening their professional knowledge and improving their foreign language skills while enhancing their awareness of different cultures.

**Thursday, June 16, 2011, 16:30 – 17:50, venue- NTL, training centre**

**Workshop on industry-academia relationships and job opportunities**

The workshop will give opportunities to the directors of the Departments of human resources to demonstrate the types of working positions in their companies and their ideas about anticipated profiles of the candidates. The academic participants will remember the changes in the university education in the European area in relation to the Bologna agreement. The main workshop attendees will be students participating in the symposium program.

# PROBLÉMY GENOVÉ TERAPIE

Vladimír Vonka

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Vladimír.Vonka@uhkt.cz

## Úvod

Genová terapie (GT) spolu s buněčnou terapií patří k nejperspektivnějším, vědecky nejnáročnějším, ale též nejkontroverznějším oblastem současné medicíny. Její rozvoj je důsledkem průniku molekulové biologie a genového inženýrství do medicíny. GT se obvykle definuje jak přenos genetického materiálu, který má léčebný účinek. Děje se tak proto, že cílovým buňkám nějakou novou funkci přidává nebo ji odnímá. Přesto, že se doposud nepodařilo naplnit velké naděje spojované s GT od počátku 90. let minulého století, málokdo pochybuje, že výrazně ovlivní v blízké budoucnosti lékařskou praxi, zejména pak léčbu chorob, které nejsou zvládnutelné současnými prostředky.

Ačkoliv původním záměrem GT byla léčba monogenních dědičných chorob, v současné době převažuje zájem o její uplatnění při léčbě nemocí získaných. Mezi nimi dominují zhoubné nádory.<sup>1</sup> Přibližně tři čtvrtiny dosud provedených klinických studií se týkaly onkologických onemocnění. Je proto několik důvodů. Za prvé, je snadnější buňku zničit než opravit, za druhé, ke zničení nádorové buňky stačí jen krátkodobá exprese přeneseného genu. Za třetí, k dispozici je celá řada strategií, jež jsou vhodné pro GT nádorů. Za čtvrté, rizika spojená s GT jsou vzhledem k povaze nemoci málo významná. Konečně za páté, onkologičtí pacienti jsou velmi často ochotni podstoupit experimentální způsoby terapie.

Dříve, než se pustíme do popisu hlavních problémů GT, je třeba objasnit několik základních termínů. Gen, který se přenáší, se označuje jako *transgen*. Přenašeče genů nazýváme *vektory*. Termín *transfekce* označuje přenos genů pomocí *plasmidů*, což jsou malé cirkulární,

lární, nezávisle se replikující genetické elementy bakteriálního původu. Proces přenosu genů se označuje jako *transdukce* a úspěšně modifikovaná cílová buňka se označuje jako *transdukováná*.

Problémy GT můžeme rozdělit do tří kategorií, na technické, metodické (strategické) a etické.

## Problémy etické

Pokud hovoříme o technických problémech GT, máme zpravidla na mysli problémy vektorů. Právě vektory mají zásadní význam pro účinnost transdukce, ale též pro rizika, která GT provázejí. Jsou to nedořešené problémy vektorů, jež jsou v současnosti největší brzdou rychlejšího rozvoje GT. Vlastnosti ideálního vektoru jsou v Tabulce I.

GT dosud nedisponuje vektorem, který by splňoval všechny tyto podmínky. Velká část současného výzkumu v oblasti GT usiluje proto o přiblížení se vytčenému ideálu.

Užívané způsoby přenosu genů dělíme na fyzikálně-chemické a biologické. Jejich stručný přehled a základní vlastnosti jsou v Tabulce II. První kategorie využívá linearizovaných či nelinearizovaných plasmidů buď ve formě „nahé DNA“ a nebo navázané na kationické tuky či různé polymery. V prvním případě se hovoří o *lipofekci*, v druhém o *polyplexi*. Cílem je usnadnit vstup DNA do buňky. Hlavními výhodami tohoto typu vektorů je snadnost přípravy, stabilita, nízká toxicita a nízká imunogenita. Jejich nevýhodami jsou nízká stabilita *in vivo*, nízká účinnost a obtíže s orgánovým zacílením. K integraci do buněčného genomu dochází jen vzácně a exprese z extrachromozální DNA je většinou krátkodobá. Vylepšování těchto vektorů a jejich podávání rychle pokračuje.

**Tabulka I: Ideální přenašeč genů.**

|                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Měl by se dát snadno připravit.                                            |
| 2. Jeho kapacita by měla být taková, aby byl s to přenést i velké geny.       |
| 3. Musí přenášet geny v transkripčně aktivním stavu.                          |
| 4. Měl by snadno a specificky pronikat do cílových buněk.                     |
| 5. Nesmí být pro buňky toxický.                                               |
| 6. Expres transgenu musí probíhat po dobu nutnou k dosažení žádoucího účinku. |
| 7. Měl by být co nejméně imunogenní.                                          |
| 8. Nesmí ohrozit příjemce ani jeho kontakty.                                  |



Ve většině klinických studií byly k přenosu genů použity viry, které společně s genově modifikovanými bakteriemi tvoří soubor biologických vektorů. Viry mají před nevirovými vektory několik výhod. Jejich povrchové struktury je předurčují k interakci s receptory na buněčném povrchu a vnesení genetického materiálu do buňky. Krom toho je virový genom vybaven regulačními elementy, které buňka snadno rozpozná. Z obou těchto důvodů jsou virové vektory transdukcí velmi účinné. Velmi významná je skutečnost, že některé viry umožňují integraci transgenu do buněčného genomu, což umožňuje jeho dlouhodobou expresi. Virové vektory mají ale i několik nevýhod. Jejich konstrukce je proces velmi náročný, možný pouze ve vyspělé virologické laboratoři. Za druhé, malé rozměry virů silně omezují velikost genetického materiálu, který jsou s to přenést. Za třetí, většina virů je silně imunogenní, což brání opakovanému užití těchto vektorů. Konečně za čtvrté, jejich podání je spojeno s biologickými risiky. Ta sice snižuje skutečnost, že viry jsou pro přenos genů geneticky upraveny tak, aby sice mohly vstoupit do buňky, ale aby se v nich nemohly množit (až na výjimečné situace, kdy je naopak replikace viru nutná pro docílení žádoucího účinku, tak je při tom v případě onkolytických virů a rekombinantních virových vakcín, viz níže). V současné době jsou nejužívanější pro transfer genů vektory na bázi retrovirů, adenovirů a adeno-asociovaných virů (AAV). Ve vývoji jsou umělé virové vektory, jejichž příprava a využití spadá mezi nanotechnologie. Vyrůstající pozornost se věnuje bakteriálním vektorům. Jde o bakterie, které jsou geneticky manipulované tak, aby ztratily patogenní vlastnosti, ale nikoli schopnost pronikat do buňky. Proces přenosu genu prostřednictvím bakterií se někdy označuje jako *baktofekce*. Velkými výhodami bakteriálních vektorů je jejich velikost umožňující začlenění značného množství cizorodého genetického materiálu a nízké náklady spojené s jejich přípravou.

Běžně užívané metody přenosu jsou v Tabulce II.

#### Problémy metodické (strategické)

GT dnes vládne velkým počtem přístupů, které umožňují zasáhnout do buněčného genomu. Pestrost strategií, jež jsou nyní užívány, budeme demonstrovat na GT zhoubných nádorů. Můžeme je rozdělit do několika skupin. Jsou shrnuty v Tabulce III. První skupinu tvoří ty, které se zaměřují přímo na nádorovou buňku. Velká část jich vychází z poznatku, že příčinou vzniku maligního fenotypu je aktivace genů, které podporují růst buňky (tzv. onkogeny), anebo inaktivace genů, které jej brzdí (tzv. antionkogeny či geny, které potlačují růst nádorů, tzv. *tumour suppressor genes*). Při zásahu jde buď o inaktivaci onkogenů a nebo o vpravení plně funkčních onkogenů. Mimořádně velký zájem se věnuje zavádění genů, jejichž produkty mají imunostimulační účín a podporují vznik reakcí proti většinou slabým nádorovým antigenům. Tato strategie se stala základem vývoje tzv. protinádorových terapeutických vakcín (viz dále). Druhou skupinu tvoří strategie, které se zaměřují na nenádorovou buňku. Jak příklad může sloužit zavedení genu do buněk kostní dřeně, který zvyšuje jejich odolnost vůči chemoterapii. Její toxicita je totiž často limitujícím faktorem při léčbě zhoubných nádorů. Další skupinu postupů představují zásahy proti neoangiogenezi, bez níž není možný růst nádorů ani metastazování. Čtvrtou skupinu tvoří tzv. onkolytické viry, což jsou viry, které se dobře množí v nádorových ale nikoli v nenádorových buňkách. Některé viry se tak chovají pro své přirozené vlastnosti, další je možné připravit genovou manipulací jiných virů. Konečně poslední skupinu strategií tvoří tak zvané genetické vakcíny určené k terapii nádorů. Ve vývoji je několik typů takových vakcín. Mezi ně řadíme DNA vakcíny, rekombinantní virové anebo proteinové vakcíny a buněčné vakcíny připravené vnesením genů pro imunostimulační faktory. Jsou to právě protinádorové vakcíny, které mají největší naději, že se jako výstup GT uplatní v dohledné době ve velkém měřítku v lékařské praxi.

**Tabulka II: Nejužívanější metody přenosu genů.**

| Způsoby přenosu    | Příklady                      | Účinnost       | Integrace transgenu |
|--------------------|-------------------------------|----------------|---------------------|
| Fyzikálně chemické | kalcium-fosfátová precipitace | středně vysoká | málo častá          |
|                    | mikroinjekce                  | vysoká         | málo častá          |
|                    | lipofekce                     | vysoká         | málo častá          |
|                    | polyplexe                     | vysoká         | málo častá          |
| Biologické         | retroviry                     | vysoká         | častá               |
|                    | adenoviry                     | vysoká         | nenastává           |
|                    | AAV                           | vysoká         | častá               |
|                    | Herpesviry                    | vysoká         | nenastává           |
|                    | <i>L. monocytogenes</i>       | vysoká         | nenastává           |

**Tabulka III: Strategie genové terapie nádorů.**

| Strategie                               | Příklad                                                                                                             |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Genová modifikace nádorových buněk   | vnesení plně funkčních antionkogenů<br>inaktivace aktivovaných onkogenů<br>vnesení genů pro imunostimulační faktory |
| 2. Genová modifikace nenádorových buněk | vnesení genů zajišťujících zvýšení resistance k chemoterapii                                                        |
| 3. Antiangiogenese                      | vnesení genů pro faktory, které tlumí novotvorbu cév v nádoru                                                       |
| 4. Onkolytické viry                     | vyřazení genů adenovirů, jež umožňují jejich replikaci v nenádorových buňkách                                       |
| 5. Genetické vakcíny                    | DNA vakcíny<br>rekombinantní vakcíny (virové, proteinové)<br>geneticky manipulované nádorové buňky                  |

#### Problémy etické

Vedle problémů s vektory, představují etické problémy největší brzdu rozvoje GT. Oba typy nesnází jsou ostatně těsně propojené. Význam etických problémů GT umocňují nešťastné události, k nimž došlo v uplynulém desetiletí. Když před několika lety skupina francouzských vědců referovala o úspěšném vyléčení skupiny dětí, které trpěly těžkou vrozenou imunodeficiencí, pomocí retrovirového vektoru nesoucího zdravý gen, vzedmula se vlna nadšení. Bohužel, čtyři děti onemocněly v následujících letech leukemií a provedené analýzy jednoznačně potvrdily, že patogenetický proces byl

vyvolán integrací transgenů na určitém místě buněčného genomu.<sup>2</sup> V jiné klinické studii došlo k úmrtí pacienta, který dostal příliš velkou dávku adenovirového vektoru, která vyvolala toxický šok.<sup>3</sup> Existuje též teoretická možnost, že by se virový vektor nebo užitý onkolytický virus mohl rekombinovat s divokým virem přítomným v organismu. Vlastnosti takové rekombinanty nelze předpovědět.

Nešťastné události, k nimž došlo v nedávné minulosti, vedly k tomu, že se zpřísnily podmínky pro GT. Klinické studie by se měly řídit zásadami shrnutými v Tabulce IV.

**Tabulka IV: Zásady pro klinické studie v oblasti genové terapie.**

|                                                                                                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Preparát musí být připraven podle <i>Správné výrobní praxe</i> .                                                                                    |
| 2. Každý pacient zařazený do studie musí být řádně poučen o všech možných přínosech a risicích léčby.                                                  |
| 3. Každá studie se musí řídit pravidly <i>Správné klinické praxe</i> a příslušná výzkumná skupina musí mít zkušenosti s prověřováním nových preparátů. |
| 4. Předem schválený protokol musí být přísně dodržován.                                                                                                |
| 5. Každá nežádoucí reakce musí být okamžitě hlášena a podrobně analyzována.                                                                            |
| 6. Nad průběhem studie musí být stálý dohled dozorčího orgánu.                                                                                         |
| 7. Mimořádná pozornost musí být věnována hodnocení výsledku. Každá studie musí být dvojité slepá.                                                      |
| 8. Rizika léčby musí být zvláště zvažována tam, kde existuje alternativní účinná terapie.                                                              |

## Závěr

GT se v současné době potýká s celým spektrem problémů, Jejich existence však neznamená, že by mělo polevit úsilí o její uplatnění. Velkým příslibem GT zůstává, že poskytne prostředky pro účinnou léčbu nemocí, kterou nejsou s to zajistit konvenční terapeutické postupy. Zdá se však být jistým, že cesta od laboratorního stolu k lůžku pacienta nebude jednosměrná. V příštích letech se budeme opakovaně vracet od kli-

nických studií do laboratoře, abychom porozuměli nečekaným událostem, a naučili se, jak jim zabránit. Jen tak bude možné postupně zaplnit mezery v našich vědomostech a otevřít cestu rozsáhlému využití GT v lékařské praxi.

*Výzkumná práce autora je podporována grantem IGA Ministerstva zdravotnictví ČR č NS 10 634-3/2009*

## Literatura:

1. Vonka V: *Postgrad. med.* 12, 541 (2010).
2. Cavazzana-Calvo M, Fischer A: *J. Clin. Invest.* 117, 1456 (2007).
3. Raper SE, Chirmulle N, Lee FS et al: *Mol. Genet. Metab.* 80, 148 (2003).

## Souhrn

### Vonka V.: Problémy genové terapie

Genová terapie je jedním z nejvýznamnějších důsledků vstupu molekulové biologie do medicíny. Její uplatnění se však potýká s mnoha problémy. Můžeme je rozdělit na technické, metodické a etické. Hlavní překážkou rychlého rozvoje je nedokonalost současně užívaných vektorů. V současné době se genová terapie nejvíce uplatňuje v onkologii. Její nejnádějnější složkou je vývoj terapeutických protinádorových genetických vakcín.

**Klíčová slova:** genová terapie

## Summary

### Vonka V.: Questions joint with gene therapy

Gene therapy is one of the most important consequences of the penetration of molecular biology into medicine. However, its introduction is associated with considerable difficulties. They include the technical, strategic and ethical problems. The main obstacle preventing a more rapid development is the insufficiency of the presently used vectors. In the present time gene therapy is mostly being used in oncology. Its most hopeful component is the development of therapeutic anti-cancer genetic vaccines.

**Keywords:** gene therapy

# GENETICKY MODIFIKOVANÁ HOSPODÁŘSKÁ ZVÍŘATA

Jaroslav Petr

*Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i., Praha-Uhřetěves, petr@vuzv.cz*

Geneticky modifikovaní (GM) obratlovci byli dlouho využíváni jako modelové organismy pro základní výzkum. Teprve relativně nedávno začali být využíváni pro produkci lidských farmakologicky významných proteinů. Dnes je na trhu v Evropské unii včetně České republiky například k dispozici lidský anti-trombin distribuovaný pod komerčním označením Atryn, který je produkován geneticky modifikovanými kozami. K expresi lidského antitrombinu dochází v mléčné žláze a protein je vylučován v mléce zvířat.

V současné době se projevuje ve využití geneticky modifikovaných obratlovců zcela nový trend, kdy jsou první geneticky modifikovaná zvířata schvalována pro produkci potravin. Genetické modifikace živočichů se tak dočkávají podobného praktického užití, jako je tomu už více než dvě desetiletí u geneticky modifikovaných rostlin.

### Geneticky modifikovaný losos *AquAdvantage*

Geneticky modifikovaný losos obecný (*Salmo salar*) linie *AquAdvantage* byl získán americkou firmou AquaBounty Technologies. Nejprve byl vytvořen ge-

nový konstrukt vzniklý spojením genu pro růstový hormon lososa čavýči (*Oncorhynchus tshawytscha*) s regulačními sekvencemi genu AFP pocházejícími z genomu mořské ryby slimule druhu *Zoarcetes americanus*. Podle genu AFP se tvoří tzv. protimrazový protein, kterým se některé ryby včetně slimulí chrání před poškozením buněk, tkání a orgánů nízkými teplotami. Protein AFP dosahuje v séru slimule koncentrace 25 mg/ml a jeho regulační sekvence jsou tedy zárukou spolehlivé produkce růstového hormonu u geneticky modifikovaného lososa<sup>1</sup>.

Výsledkem vnesení genového konstrukt do genomu lososa obecného je linie *AquAdvantage* se silně zvýšeným růstovým potenciálem. Ryby jsou za stejnou dobu výkrmu o dvě třetiny delší a 2krát až 4krát těžší než nemodifikované ryby chované ve srovnatelných podmínkách. Růstová schopnost se dědí stabilně po řadu generací a je považována za trvalou. Ve srovnání s liniemi lososů, u kterých bylo dosaženo exprese genu pro růstový hormon pomocí metalothioneinové regulační sekvence, je ale koncentrace růstového hormonu v organismu dramaticky menší, i když růstový potenciál je naopak vyšší<sup>1</sup>.



S výjimkou velikosti těla a rychlosti růstu nejsou na geneticky modifikovaném lososovi AquAdvantage patrné žádné odlišnosti od divokého lososa obecného co do anatomie, histologie nebo biochemických parametrů. Výskyt patologických změn byl co do spektra i četnosti v zásadě shodný u geneticky modifikovaného a divokého lososa<sup>2</sup>.

Pokud jde o fyziologické parametry lososa AquAdvantage, je u něj patrný vyšší metabolismus. Je posílena mobilizace a rozklad lipidů v těle. Je zvýšen podíl energie, který je využit k růstu. Posílena je syntéza proteinů pro budování tkání a zvýšen je i příjem minerálních látek, což souvisí se zvýšenými nároky na růst kostí. Celkově je u lososa AquAdvantage vyšší konverze krmiva. Intenzivní látková výměna má za následek, že ryby jsou náročnější na množství i kvalitu krmiva a mají 1,7krát zvýšenou klidovou spotřebu kyslíku. Při námaze spotřeba kyslíku geneticky modifikovaných lososů stoupá 1,6krát rychleji než u divokých lososů obecných. U divokých lososů začíná být limitován přísun kyslíku do organismu, pokud koncentrace kyslíku ve vodě poklesne pod 4 mg/litr. U lososa AquAdvantage dochází k omezení saturace organismu kyslíkem už při koncentracích 6 mg O<sub>2</sub> na litr vody. Zvýšené koncentrace růstového hormonu v organismu lososa AquAdvantage mohou zvýšit vylučování sodných iontů žábami, což je výhodné pro rybu během života v mořské vodě. Celkově je ale fitness geneticky modifikovaného lososa hodnoceno jako nižší než u divokého lososa obecného. Mimo kontrolované podmínky akvakultury geneticky modifikované ryby nejsou s to využít svůj růstový a metabolický potenciál a jejich životaschopnost za takových podmínek významně klesá<sup>2</sup>.

Genetická modifikace vyvolala změny i v etologii lososa AquAdvantage. Nezměnila se sice rychlost pohybu (geneticky modifikované mohou mít sníženou i několikanásobně zvýšenou rychlost pohybu ve srovnání s nemodifikovanými příslušníky vlastního druhu) ale lososi AquAdvantage tráví pohybem dvakrát více času. Je to dáno vysokým příjmem potravy a potřebou jejího shánění. Lososi AquAdvantage omezují méně pohyb a shánění potravy dokonce i v přítomnosti rybích predátorů<sup>2</sup>.

#### *Další GM hospodářská zvířata*

Kromě GM lososa americká FDA a obdobné úřady v Kanadě posuzují žádosti o schválení dalších geneticky modifikovaných hospodářských zvířat a z nich získaných živočišných produktů. V těchto případech není ještě proces tak daleko jako u lososa AquAdvantage,

a tak je obtížné předjímat jeho výsledek. Mnohé však vidí biotechnologičtí experti jako nadějně.

Poměrně daleko postoupilo ve schvalovacím procesu v Kanadě i USA geneticky modifikované prase Enviropig získané na kanadské University of Guelph<sup>3</sup>. Toto prase má díky přenosu genu pro bakteriální fytázu výrazně zvýšené využití fosforu vázaného v rostlinné potravě ve formě fytátu. Bakteriální fytáza je produkována ve slinných žlázách prasete a enzym se dostává do potravy už v ústní dutině. Fytát tvoří až 75 % fosforu rostlinných krmiv a pokud odchází z organismu nevyužitý s výkaly, může v životním prostředí významně přispívat k eutrofizaci povrchových vod (např. přemnožení sinic v rybnících a jezerech). U prasete Enviropig je fytát stráven až ze dvou třetin. Zdravím, růstem, kvalitou masa a dalšími parametry se prase Enviropig neliší od konvenčních prasat. Chov prasat Enviropig by byl obecně šetrnější k životnímu prostředí.

Byly získány i další GM ryby s urychleným růstem a vyšší konverzí krmiva. Tým vedený Terencem Bradleyem z University of Rhode Island blokoval u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) gen pro myostatin. Dosáhl tak u této ryb stejného efektu, jaký má přirozená mutace genu pro myostatin u skotu plemene belgické modré. Myostatin blokuje nadměrný růst svaloviny a při mutaci nebo cíleném bloku metodami genového inženýrství je růst svaloviny výrazně posílen.

Na Harvard Medical School bylo získáno prase, které má přenesen gen fat-1 z genomu hlístice *Caenorhabditis elegans*. Enzym kódovaný genem fat-1 zajišťuje konverzi omega-6 polynenasycených mastných kyselin na dieteticky prospěšnější omega-3 polynenasycené mastné kyseliny, kterým je připisována celá řada pozitivních efektů na zdraví lidí<sup>4</sup>. Stejného efektu se podařilo dosáhnout přenosem genu fat-1 do dědičné informace kura domácího<sup>5</sup>. V současnosti je hlavním zdrojem „omega-3“ maso ryb. V budoucnu by mohlo tyto dieteticky vysoce ceněné mastné kyseliny obsahovat i vepřové a drůbeží maso nebo vejce.

Početná skupina GM hospodářských zvířat je odolná vůči infekčním chorobám. Byly získány kozy rezistentní k viru maedi visna, linie kura odolné k virové leukóze, linie skotu rezistentní k některým streptokokovým zánětům mléčné žlázy. Existuje hned několik linií skotu, které jsou po různých typech genetických modifikací rezistentní k bovinní spongiformní encefalopatii (BSE)<sup>6</sup>. Stejně tak jsou k dispozici GM linie ovcí rezistentních ke skrapii. Pracuje se i na dalších typech rezistence, například na liniích kura rezistentních k chřipkovému viru A(H5N1) vyvolávajícímu tzv. ptačí chřipku<sup>8</sup>.

#### **Literatura:**

1. Yaskowiak ES, Shears MA, et al: *Transgenic Res.* 465 (2006).
2. Cook JT, McNiven MA, et al: *Aquaculture* 188, 15 (2000).
3. Golovan SP, Meidinger RG, et al: *Nat. Biotechnol.* 19, 741 (2001).

4. Lai L, Kang JX, et al: *Nat. Biotechnol.* 24, 435 (2006).

5. Kang JX: *J. Membrane Biol.* 206, 165 (2005).

6. Oransky I: *The Scientist* 19, 41 (2005).

7. Welsh J: Tasty transgenics.

- <http://www.the-scientist.com/blog/display/57577/>

8. Lyall J, Irvine RM, et al: *Science* 331, 223 (2011).

## Souhrn

### Petr J.: Geneticky modifikovaná hospodářská zvířata

Geneticky modifikovaní živočichové byli dlouho využíváni jen jako modelové organismy. Později se uplatnili jako "živé bioreaktory" při produkci léků. Dnes se začínají pomalu prosazovat pro produkci potravin. Jejich chov může snížit dopady zemědělství na životní prostředí. Zároveň se otevírají možnosti pro produkci zdravějších potravin živočišného původu.

## Summary

### Petr J.: Genetically modified farm animals

Genetically modified animals were primarily used as model organisms for basic research. Much later the genetically modified animals were used for the production of human pharmaceutical proteins. Recently the genetically modified animals are going to be used for food production. Keeping these animals could be friendlier to the environment. Much healthier food could be produced using the genetically modified livestock.

# GENETICKÉ MODIFIKACE HMYZU

## František Sehnal

Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice, Sehnal@bc.cas.cz

Hmyz je druhově i počtem jedinců nejpočetnější skupinou eukaryotních organismů, která má významnou úlohu ve většině suchozemských a sladkovodních ekosystémů. Některé druhy ovlivňují bezprostředně lidskou společnost: např. škůdci zemědělských plodin či lesních dřevin a přenašeči chorob, nebo opylovači, na kterých závisí produkce mnoha druhů ovoce a zeleniny. Hmyz je zkoumán z praktických hledisek několik století, v posledních desetiletích však převládá využití hmyzu jako modelů pro výzkumy objasňující mechanismy dědičnosti a vývoje. Především tento typ výzkumu stimuloval vývoj metod genetických modifikací hmyzu. Metody vyvinuté pro mušku octomilku *Drosophila melanogaster* umožňují manipulace genomu, které jsou např. u savců buď nemožné, nebo velmi nákladné. Tento příspěvek stručně popisuje základní metody genetických manipulací hmyzu s odkazy na některé prioritní práce. Podrobnější popis starších a dnes již standardních genetických modifikací hmyzu je možno najít v knize editované Handlerem a Jamesem (2000). Neuvádím citace pracovníků Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR (BCAV), kteří patří mezi průkopníky zavádění moderních GM metod u modelových druhů hmyzu. Jejich publikace je možno najít na <http://www.entu.cas.cz/cs/publikace/>.

Pod pojmem genetické modifikace obvykle rozumíme vnesení cizího genu do genomu zkoumaného druhu. U různých organismů se k tomuto účelu používají různé postupy, u drozofily je klasickou metodou použití transpozonů nazvaných P-elementy (tento název z dob klasické genetiky akcentoval paternální vliv na fenotyp, tzv. hybridní dysgenezi, kterou nebylo možno objasnit Mendelovými zákony). P-elementy kódují svou vlastní transponázu, která je za normálních okolností exprimována ve funkční formě jen v buňkách zárodečné linie. Pokud je aktivní, může v genomu přemístit úseky DNA ohraničené terminálními inverzními repeticemi (TIR) z 31 nukleotidů. Princip využití P-elementů spočívá v oddělení genu pro transponázu od transgenu, který chceme do genomu drozofily

vnést<sup>1,2</sup>. Gen kódující aktivní transponázu, avšak bez koncové TIR, která by umožnila jeho transpozici do genomu, je zaklonován do „pomocného“ plasmidu a „transgen“, který má TIR konce, do druhého plasmidu (obr. 2). „Transgen“ je většinou konstruktem, který vedle genu, jenž je předmětem zájmu, obsahuje pod vhodným promotorem i „marker gen“. Oba plasmidy se injikují do koncové části časného zárodku, to je do ooplasmu, kde jsou maternální determinanty určující vznik buněk zárodečné linie. V této fázi rýhování se u hmyzu nevytvářejí typické blastomery (oddělené buňky), ale dělí se buněčná jádra (tzv. ergidy) vytvářejí v kortikální cytoplasmě nebuněčný blastoderm. Expres transponázy z injikovaného plasmidu umožní vnesení transgenu do jader budoucích buněk zárodečné linie a tím zajistí jeho přítomnost v gametách, které se budou z buněk zárodečné linie vytvářet. Dnes je popsána procedura zjednodušená, protože se používají linie drozofily, které mají gen pro transponázu trvale zabudován do genomu. Úspěch celého procesu se snadno pozná podle exprese markeru v potomstvu vzniklém z gamet nesoucích transgen. Jako marker se často používá gen z medúzy *Aequorea victoria*, který kóduje „green fluorescent protein“ (GFP)<sup>3</sup>. GFP se snadno detekuje podle zelené fluorescence po ozáření modrým světlem, není jedovatý a intenzita záření někdy umožňuje rozlišení homozygotů od heterozygotů. Gen pro GFP se často kombinuje s promotorem, který zajišťuje specifickou expresi v očích. Transgenní mouchy se snadno poznají podle zelené fluorescence očí (obr. 2) Některé jiné markery je možno použít jako regulátory určité funkce. Např. nervové buňky exprimující channelrhodopsin otevírají kanály vyvolávající nervový vzruch na světelný podnět.

Příkladem využití P-elementů v základním výzkumu je studium telomér, kterým se v BCAV zabývá Radmila Frydrychová-Čapková. Teloméry jsou specifické úseky DNA na konci chromozomů. Ve srovnání s většinou eukaryotních organismů, jsou telomery drozofily neobvyklé. Jsou to 70 – 150 kpb dlouhé úseky DNA (označované jako úseky HTT), tvořené třemi opakujícími se

telomerickými retrotransposony *HeT-A*, *TART* a *TAHRE*. Následkem nekompletní replikace konců lineární DNA (tzv. „end replication problem“) dochází při dělení buněk k postupnému zkracování konců telomer. Kompenzace této ztráty je u drozofily zprostředkována především transpozicí nových telomerických elementů k chromosomálním koncům. Transponují se transkripty telomerických elementů zacílené na telomerický konec a pomocí reverzní transkriptázy konvertované do DNA. Kompenzační mechanismus je tedy dán hladinou transkripce telomerických elementů a přístupností konců telomer k těmto transkriptům. Transkripce telomerických elementů je ovlivňována řadou faktorů, jejichž funkce se zkoumá pomocí P-elementů, které slouží ke vnášení unikátních reportérových genů do oblasti HTT. Reportérové geny jsou pak neocenitelným nástrojem pro vyhodnocování transkripční aktivity v daném místě telomery či studiu telomerického chromatinu.

V některých druzích hmyzu se našly jiné transpozony, než jsou P-elementy. Pro genetické modifikace hmyzu se využívá např. piggyBac, který byl prvně nalezen u můry *Trichoplusia ni*<sup>4</sup> a Hermes pocházející z mouchy domácí<sup>5</sup>. Snahou mnoha badatelů je vytvoření transpozonů použitelných univerzálně na všechny druhy hmyzu<sup>6</sup>. Transpozon piggyBac byl úspěšně použit pro genetickou transformaci mnoha druhů hmyzu, vedle drozofily a jiných much také u komárů, brouků, motýlů nebo cvrčků. Laboratoř M. Jindry na BCAV již v roce 2001 jako třetí na světě pomocí transpozonu piggyBac transformovala bource morušového, a jako první zavedla možnost uměle aktivovat expresi vneseného genu pomocí tepelného šoku (metoda, která se u drozofily hojně používá k načasování exprese transgenu v libovolném vývojovém stadiu dle potřeby).

Byla vyvinuta metoda umožňující nasměrovat expresi transgenu do určitých buněk a tkání a tím se přiblížit i objasnění jeho funkce<sup>7</sup>. Jednou komponentou tohoto systému je gen GAL4, který kóduje kvasinkový aktivátor transkripce Gal4. Druhou komponentou je krátká promotorická „Upstream Activation Sequence“ (UAS), na kterou se Gal4 váže. Byly vytvořeny tisíce linií drozofily, které obsahují transgene GAL4 pod kontrolou promotoru určitého genu („driver gen“). Gal4 je pak produkován jen v buňkách, ve kterých je aktivní příslušný promotor. Jeho přítomnost nemá žádný vliv na životnost a funkci příslušných buněk. Druhou složkou systému jsou linie drozofil, které obsahují UAS (CGG–N<sub>11</sub>–CCG) v promotoru genu, jehož funkci zkoumáme. Tento gen je exprimován pouze u potomstva křížení s některou GAL4 linií, protože exprese vyžaduje navázání Gal4 na UAS. Pod kontrolou aktivátoru UAS může být buď exprese funkční mRNA nebo RNAi vlásenka (viz níže); v prvním případě se syntetizuje funkční protein, ve druhém případě je jeho tvorba blokována i z endogenních alel příslušného genu. Systém GAL4–UAS systém je využíván i u některých obratlovců. U drozofily byly vypracovány složitější modifikace této techniky. Je např. možné použít linie, z nichž každá exprimuje jen neúčinnou polovinu proteinu Gal4.

U hybridů těchto linií se v některých buňkách mohou exprimovat obě poloviny Gal4 a spontánně vytvořený celý protein se váže na UAS a spustí transkripci. Touto technikou můžeme zjistit, ve kterých buňkách se oba „driver“ geny exprimují současně.

Jiné techniky umožňují eliminovat expresi určitého genu (knockout) a ze vzniklých defektů usuzovat na jeho funkci. Gen může být zcela vyřazen pomocí homologické rekombinace v linii, do které byla vnesena jeho nefunkční alela v kazetě, která je vystřižena enzymem flipázou<sup>8</sup>. Vystřižený segment rekombinuje s homologickou alelou a trvale ji poškodí, čímž zabrání produkci funkčního proteinu. Obdobnou techniku lze využít k cílenému vnesení určitého genu náhradou za odstraněný gen<sup>9</sup>. Zcela jiná je nedostatečně prověřená metoda založená na použití bakuloviru, který je hmyzím patogenem a má schopnost integrace do určitých oblastí hmyzího genomu<sup>10</sup>. Dalším způsobem cílené mutagenese je například umělých chimerických enzymů – nukleáz se zinkovými prsty, což jsou fúzní proteiny obsahující nespécifickou nukleázu spojenou s DNA vazebnou doménou specificky připravenou pro sekvenci DNA, která nás zajímá. Nukleáza „rozpozná“ krátké sekvence nukleotidů, mezi kterými způsobí zlomy. Následující reparační mechanismy je možno využít k editaci DNA, např. nahrazení defektního genu funkčním genem. Metoda byla rozpracována zejména pro savce s perspektivou jejího využití pro genové terapie<sup>11</sup>. M. Žurovec z BCAV ve spolupráci s japonskými kolegy úspěšně přizpůsobil tuto technologii pro genetické modifikace bource morušového.

Nejrozšířenější metodou inhibující funkci genů je dnes RNA interference (RNAi), za jejíž vývoj u hlístice *Caenorhabditis elegans* získali v roce 2006 A.Z. Fire a C.C. Mello Nobelovu cenu. Principem je použití dvouvláknové RNA (dsRNA), která je v buňce enzymem Dicer rozštěpena na krátké úseky (siRNA), z nichž některé se vážou na komplementární úseky příslušné mRNA a vyvolají její degradaci. Gen je tedy transkribován, avšak mRNA je buď zcela, nebo zčásti degradována aniž dojde k translaci. RNAi proto ve skutečnosti není genetickou modifikací, neboť na rozdíl od mutagenese nebo transgeneze nemění genetickou informaci na úrovni DNA a nevnaší tudíž do ní dědičné změny. RNAi tak přináší vítanou možnost studovat funkci genů v průběhu jedné generace, bez nutnosti zdoluhavě a pracně mutovat každý z nich. Stačí k tomu splnění dvou podmínek: (1) znát sekvenci DNA studovaného genu, a (2) zajistit vnesení dsRNA do buněk hmyzu.

Pro účely RNAi existuje u hmyzu několik metod. Nejjednodušší je injekce dsRNA, předtím uměle připravené ve zkumavce, přímo do těla hmyzu (někdy je možné dodat dsRNA s potravou). Tento postup funguje u hmyzích druhů, kde se dsRNA sama vstřebává do buněk a vyvolává účinek RNAi, který se šíří do okolních tkání (tzv. systemická RNAi). Důsledky potlačené funkce daného genu tudíž můžeme pozorovat v celém organismu několik dní po injekci dsRNA. Takovým dru-



hem je např. brouk potěmník hnědý, *Tribolium castaneum* (obr. 3), který se díky této vlastnosti stal v posledních letech nejvýznamnějším modelovým druhem hmyzu hned po drozofile. Model *Tribolium* byl v ČR poprvé zaveden laboratoří M. Jindry na BCAV a metoda RNAi u něj přinesla zásadní poznatky o hormonální regulaci proměny hmyzu. Na rozdíl od potěmníka drozofila vlastnost systemické RNAi postrádá. V jejím případě je proto nutno dsRNA produkovat přímo v buňkách, což lze docílit přípravou transgenních mušek, které exprimují dsRNA z vloženého transpozonu. Expresi přitom můžeme omezit na určitou tkáň nebo buňky pomocí systému Gal4–UAS, popsaného shora. Dnes jsou dostupné kmeny drozofil, u nichž lze individuálně umlčet většinu ze 13 tisíc genů.

Některé druhy hmyzu, např. motýli, jsou však vůči RNAi extrémně necitlivé (důvody těchto rozdílů dosud neznáme). V případě bource morušového se tento problém podařilo obejít pomocí infekce RNA-virem Sindbis<sup>12</sup>, původně vyvinutého pro genetickou modifikaci komárů. M. Uhlířová z laboratoře M. Jindry na BCAV u bource systém Sindbis zavedla a poprvé jej využila jako nástroj pro RNAi genu řídícího přeměnu larev bource v kukly.

Velká škála dostupných metodik, znalost celého genomu řady hmyzích druhů a udržování bank mnoha genetických linií umožňuje stále hlubší využití hmyzu pro studium vývojových a fyziologických mechanismů. Významnou oblastí rozvíjenou v BCAS je výzkum cirkadiálních (I. Šauman) a sezónních (V. Košťál a D. Doležel) rytmů. Hmyzí organismus vykazuje celou řadu adaptací, které zajišťují přežití nepříznivých období jako je zima nebo sucho. Většina druhů hmyzu vstupuje do diapauzy, kdy je zastaven vývoj, snížena rychlost metabolismu a zvýšena odolnost vůči stresorům z prostředí. Vstup do diapauzy je většinou zajištěn v předstihu, před příchodem nepříznivého období, pomocí vnímání sezónních změn poměrné délky dne a noci (fotoperiody). Fotoperiodický signál je zpracováván tzv. sezónním kalendářem, hypotetickou strukturou mozku, která je patrně funkčně propojena s cirkadiálními biologickými hodinami. V BCAS se zkoumá funkční zapojení známých hodinových genů, jako jsou *timeless*, *period* aj. při vnímání fotoperiody a indukci diapauzy u modelových druhů s jasně vyjádřenou diapauzou: mušky *Chymomyza costata* a plošnice ruměnice bezkřídle. Expresí hodinových genů se zjišťuje pomocí qRT-PCR a jiných technik (obr. 4) a ovlivňuje pomocí RNAi. Byly vytvořeny mutantní a transgenní linie s narušenou diapauzou pro studium mechanismu vnímání a zpracování fotoperiodických a cirkadiálních signálů.

U drozofily či jiných modelových druhů bezobratlých lze také s výhodou zkoumat příčiny mnoha lidských chorob. U drozofily byla např. objevena řada proto-onkogenů, jejichž mutace vyvolávají nádorové bujení, a také supresorových genů, které mají opačný účinek. U hmyzu lze vyvolat neurodegenerace podobné např. Huntingtonově chorobě expanzí kodónu CAG

v některých genech. Tento mechanismus je u člověka i u drozofily stejný – bezprostřední příčinou nemoci jsou dlouhé repetice glutamátu v příslušných bílkovinách. Podobně je tomu v případě závažné poruchy imunity (SCID, severe combined immunodeficiency), která je v některých případech způsobena poruchou metabolismu adeninu. Výzkum úlohy enzymu adenosindeaminázy, kterým se metodami molekulární genetiky zabývá v BCAV skupina M. Žurovce, odhalil mnohé účinky extracelulárního adeninu, které pomáhají pochopit některé zdravotní potíže člověka. Poruchy metabolismu adenosinu se např. u krevních buněk hmyzu projevují zvýšenou mortalitou a sníženým růstem (obr. 5).

Významnou oblastí, ve které se využívají genetické modifikace, je regulace škodlivých druhů hmyzu. Bylo vyvinuto několik velmi různých postupů, z nichž jsou zde uvedeny dva příklady. Prvním je možný způsob boje s malárií, kterou způsobují prvoci rodu *Plasmodium* (zimičky) přenášení komáry rodu *Anopheles*. Prvoci se nepohlavně rozmnožují v játrech a v červených krvinkách, jejichž rozpad ve 3 – 4 denních intervalech způsobuje periodické horečky. Červené krvinky jsou též místem vzniku gametocytů, které se sáním krve dostanou do střeva komára. Tam dojde ke splynutí gamet v ookinety, které se vážou na specifické receptory ve stěně střeva a jejich prostřednictvím se dostávají do tělní dutiny. Z ookinetů se v hemolymfě uvolňují sporozoiti, kteří putují do slinných žláz komára a při příštím sání krve napadnou dalšího člověka. Tento cyklus byl přerušen přípravou transgenu, jehož produkt se váže na receptory ve střevě a tím zamezuje přenosu patogéna do tělní dutiny. Komár je nakažen, nemůže však nemoc dále šířit. Pro praktické využití této a obdobných metod by bylo potřeba uměle odchovat obrovské množství transgenních komárů, kteří by přečíslili jejich přírodní populace. To je prakticky nemožné a proto se hledají další možnosti, např. transgenéza larev v přírodě, zatím však nebylo dosaženo žádného pokroku. V případě úspěchu bude asi velkou překážkou získat jednoznačný důkaz bezpečnosti techniky pro životní prostředí.

Jiná a osvědčená technika se používá už několik desetiletí pro potírání zemědělských škůdců. Nazývá se SIT (sterile insect technique) a spočívá ve vypouštění samců sterilizovaných gama zářením. Při velkém přečíslení (až stonásobné) přírodní populace škůdce, se samičky páří převážně s vypuštěnými sterilními samci a nezanechávají potomstvo. Metoda se osvědčila v případě mouchy tse-tse, vrtule velkohlavé, obaleče jablečného a několika dalších druhů, je však velmi nákladná, zejména kvůli nutnosti hmyzích velkochovů. Náklady na chovy je možno snížit skoro na polovinu, pokud se podaří eliminovat samičí zárodky (poměr pohlaví je obvykle 1:1). Pro genetickou separaci pohlaví u motýlů byla vyvinuta metoda založená na konstrukci balancovaně letálních (BL) linií. Samci takových linií jsou trans-heterozygotní pro dvě nealelické, na chromosom Z vázané recesivně-letální mutace. Samice

nesou na svém chromosomu W translokovaný úsek chromosomu Z obsahující divoké alely obou zmíněných genů. Tato translokace samice chrání před expresí některé z letálních alel přítomných na chromosomu Z. Křížením těchto jedinců polovina samčího potomstva hyne, protože jedna z letálních alel se dostává do homozygotního stavu. Protože jsou oba geny exprimované již v embryogenezi, k úhynu dochází již ve vajíčku. Přeživší samci, označovaní jako BL samci, jsou „balancovaní“ pro dvě letální alely (obr. 6). Produkce jednoho pohlaví („sexingu“) je dosaženo poté, co se BL samci spáří se samicemi divokého typu – produktem takového zkřížení je téměř výlučně samčí potomstvo, samičky umírají díky hemi-zygotnímu stavu jedné z letálních alel. Podle tohoto modelu byla vypěstována komerční odrůda bource morušového zvaná „Platina Boy“. U bource byly konkrétně použity tři pohlavně-vázané markerové geny: *os* (průhledná kůže larev), *sch* (čokoládová barva těla nově vylíhlých larev) a *e* (prodloužené tělo larev). U jiných motýlů je však obtížné takovéto markery nalézt. Další velkou nevýhodou této metody je nutnost udržovat v masovém chovu dvě linie, mutantní BL a divokou, a nutnost pravidelné kontroly genetické struktury BL linie kvůli možné rekombinaci a kontaminaci. Kromě bource byly BL letální linie konstruovány skupinou F. Marece v BCAV u zavíječe moučného, *Ephesia kuehniella*. Kvůli výše uvedeným nevýhodám však není metoda BL linií příliš

vhodná pro produkci samců pro SIT v masových chovech.

V současné době v laboratoři Dr. Marece je vypracován systém genetické separace pohlaví u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). Cílem je vyvinout genetické „sexing“ linie obaleče inzercí selektovatelného transgenu (dominantní podmíněně letální mutaci genu *Notch*) do chromosomu W, specifického pro samice. Tento transgen by v restriktivních podmínkách eliminoval vývoj samic, což by umožnilo produkci pouze samčího netrasgenního potomstva pro ozařování a vypouštění.

Hmyz může také posloužit jako bioreaktor pro produkci těžko dostupných látek. Již před více než 20 léty byly připraveny některé interleukiny v geneticky upravených bakulovirech, kterými byly infikovány housenky bource morušového. Nyní se využívá přímá transgeneze bource, např. pro přípravu prokolagenu typu III<sup>13</sup>. Komerčně je velmi zajímavá produkce fluoreskujícího hedvábí, způsobená řízenou expresí transgenu pro GFP nebo jiný fluoreskující protein (T. Tamura et al., osobní sdělení). Ani v případě bource morušového, který je jediným domestikovaným organismem plně závislým na péči člověka, se však nedaří získat povolení pro komerční chovy transgenního hmyzu. Je zřejmé, že genetické modifikace hmyzu se v nejbližších deseti létech uplatní zejména v biomedicinském výzkumu.

## Literatura

1. Rubin GM, Spradling AC: *Science* 218, 348 (1982).
2. Spradling AC, Rubin GM: *Science* 218, 341 (1982).
3. Prasher DC, Eckenrode VK, et al: *Gene* 111, 229 (1992).
4. Cary LC, Goebel M, et al: *Virology* 172, 156 (1989).
5. Warren WD, Atkinson PW, O'Brochia DA: *Genet. Res. Camb.* 64, 87 (1994).
6. Horn C, Wimmer EA: *Dev Genes Evol* 210, 630 (2000).
7. Brand A, Perrimon N: *Development* 118, 401 (1993).
8. Golic KG, Lindquist SL: *Cell* 592, 499 (1989).
9. Gloor GB, Nassif NA, Johnson-Schlitz DM, et al: *Science* 253, 1110 (1991).
10. Yamao M, Katayama N, Nakazawa H, et al.: *Genes Dev.* 13, 511 (1999).
11. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al: *Nature* 435, 646 (2005).
12. Seabaugh RC, Olseli KE, Higgs S, et al: *Virology* 343, 99 (1998).
13. Tomita M, Munetsuna H, Sato T, et al: *Nature Biotechnol.* 21, 52 (2003).

**Acknowledgements:** This review was prepared in frame of MOBITAG project (7FP Research Potential, REGPOT-2008-1, GA 229518). Critical reading of the text by colleagues R. Frydrychová-Čapková, M. Jindra, V. Košťál, F. Marec and M. Žurovec is gratefully acknowledged.

## Souhrn

### Sehnal F.: Genetické modifikace hmyzu

Genetické modifikace (GM) hmyzu zahrnují řadu metod vedoucích k odstranění (umlčení) určitého genu (nejčastěji pomocí RNAi, nebo „knockout“ genu) nebo vnesení cizorodého genu (hlavně pomocí transpozonů, z nichž je nejznámější systém P-elementů). V obou případech se úspěšnost GM sleduje pomocí exprese „marker“ genů (dnes většinou „green fluorescent protein“). Pro drozofilu jsou dostupné další techniky a zejména velké banky různých mutací. Systém cis elementu UAS („Upstream Activation Sequence“) a jeho aktivátoru Gal4 umožňuje exprimovat vnesený gen v určitých buňkách či orgánech. Genetické modifikace u drozofily i dalších modelových druhů hmyzu se používají jako prostředek pro objasnění vývojových a fyziologických regulací, včetně poruch, které napodobují lidská onemocnění. GM mohou také omezit rozmnožování, nebo způsobit úhyn škodlivého hmyzu. Tato technika by však vyžadovala vypouštění GM hmyzu do přírody a to je v současnosti nemožné. Prakticky významné jsou však GM využívané v chovech hmyzu, který je po sterilizaci vypouštěn do přírody, aby svým přečíslením podstatně snížil rozmnožování přírodní populace (tzv. „sterile insect technique“, SIT).

**Klíčová slova:** umlčení genů, transgeneze, P-elementy, Piggy bag, GFP, UAS/Gal4, vypouštění sterilních samců



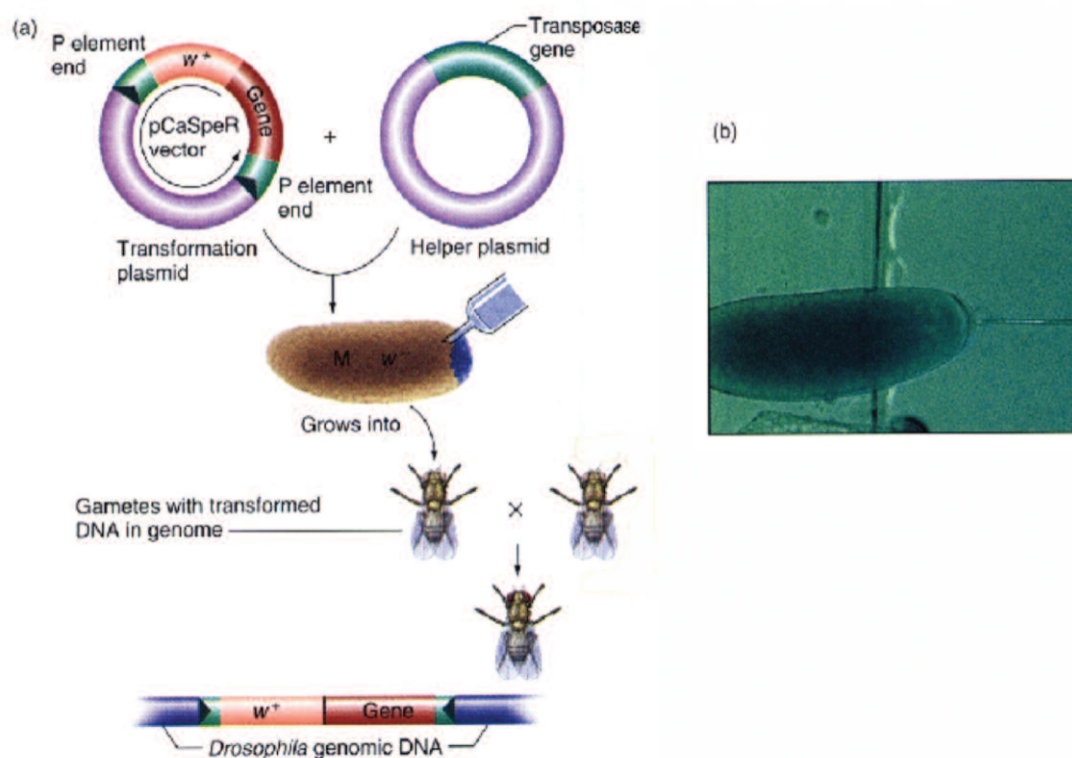
## Summary

### Sehnal F.: Genetically modified insect

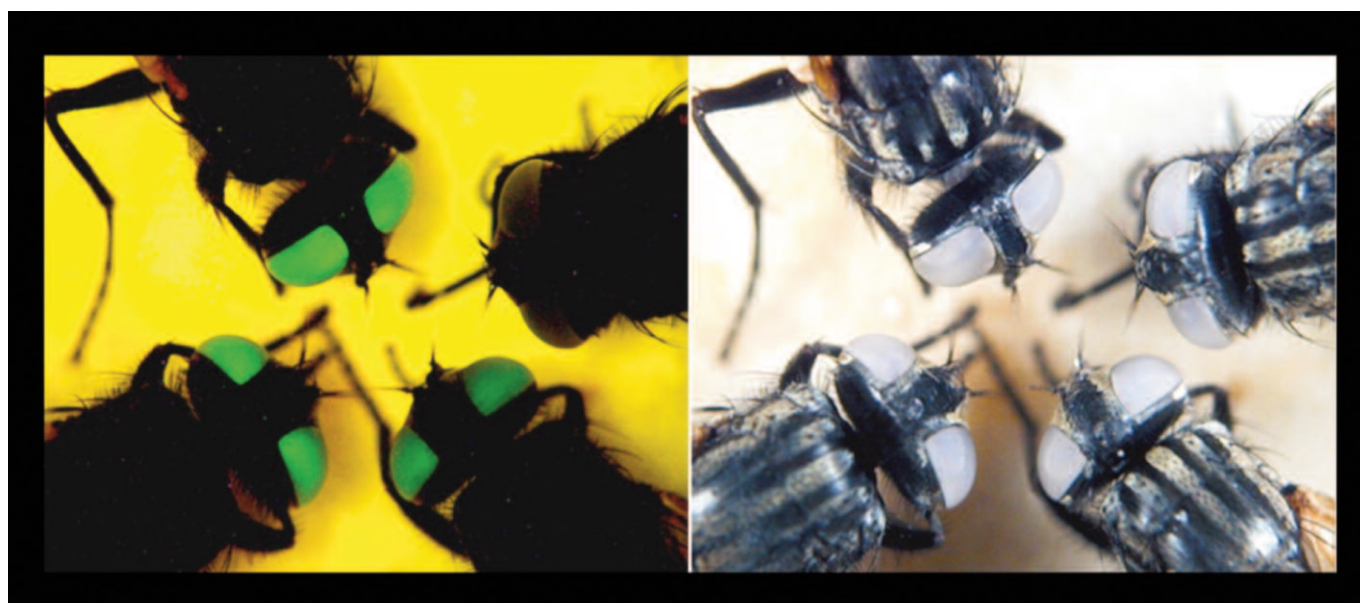
Genetic modifications of insects include diverse methods of gene silencing, such as gene knockdown or RNAi, and methods of transgenesis when a foreign gene is introduced into insect genome, usually with the aid of transposons such as the P elements. The success of GM is typically visualized through expression of a gene encoding the green fluorescent protein or another marker. Additional techniques and also large banks of diverse mutations are available for drosophila. The system of UAS (Upstream Activation Sequence) and its transcription activator Gal4 allows in this species transgene expression in certain cells and organs. Genetic modifications of drosophila and other model insect species provide efficient tool for elucidating developmental and physiological regulations, including defects mimicking human diseases. GM can also be used to curb insect reproduction or survival. Practical deployment of this approach, however, would require release of GM insects into the environment and this would hardly be permitted. On the other hand, GMs restricted to insect cultures are practically exploited in the sterile insect technique (SIT), when sterilized, non-GM insects are released into the field and due to their high numbers and random mating suppress the growth of the native wild population.

**Keywords:** gene silencing, transgenesis, P-elements, Piggy bag, GFP, UAS/Gal4, release of sterile males.

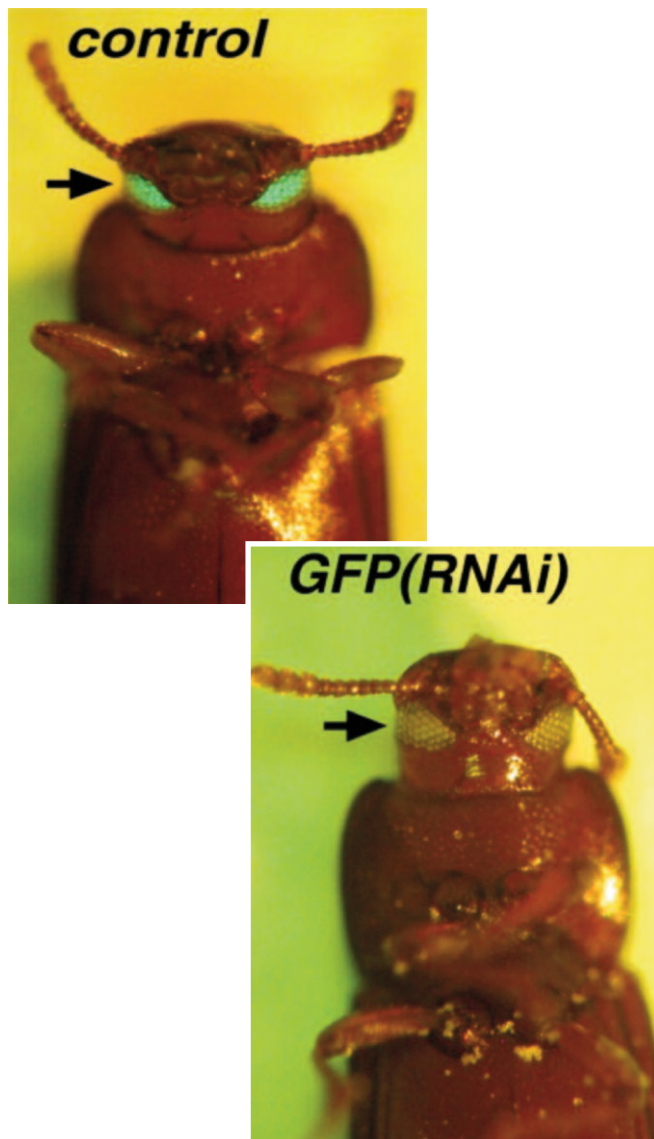
## Příprava transgenních drozofil



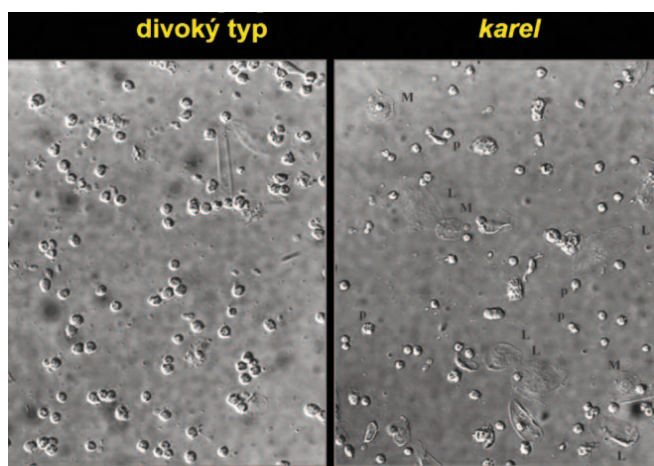
**Obr. 1:** Princip využití P-elementů pro genetickou transformaci.



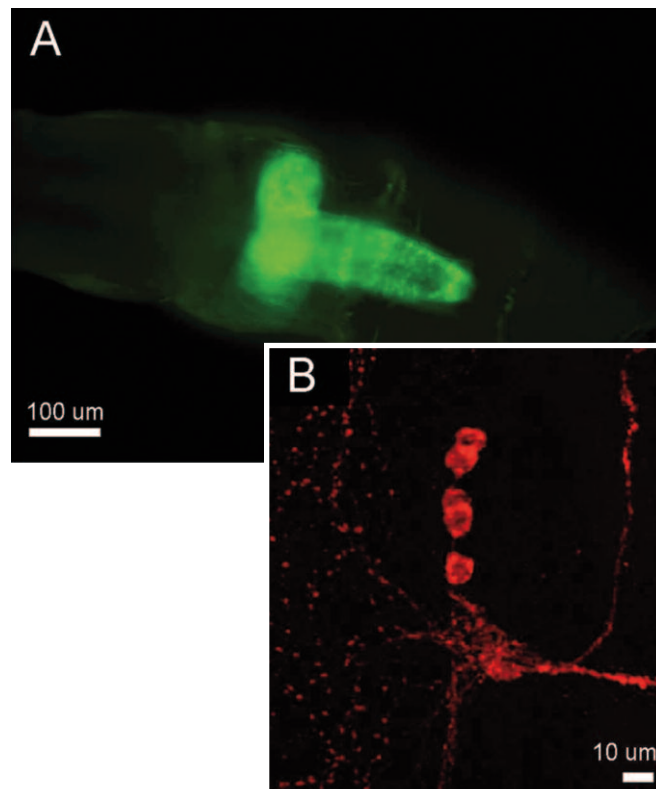
**Obr. 2:** Využití GFP genu jako ukazatele genové exprese v očích (D. Doležel a I. Šauman).



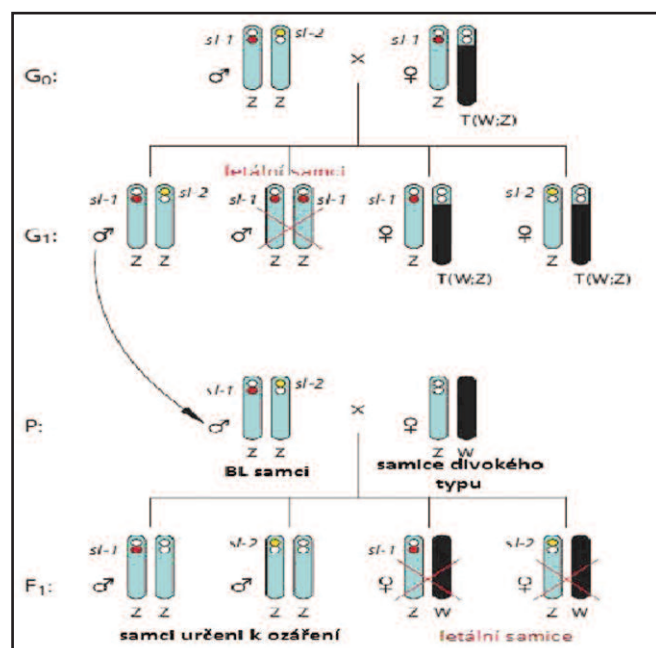
**Obr. 3:** Transgenní brouk *Tribolium castaneum* vykazuje expresi GFP v očích (vlevo). Tato exprese je u geneticky stejného brouka potlačena pomocí systemické RNAi (vpravo): během několika dní po injekci dsRNA o sekvenci odpovídající genu GFP se protein GFP netvoří (M. Jindra a spolupracovníci).



**Obr. 5:** Srovnání krevních buněk drozofily: vlevo buňky ze standardní mušky, vpravo z mutanta s poruchou metabolismu adenosinu. (T. Doležal a M. Žurovec).



**Obr. 4:** (A) Předběžné experimenty ukázaly vhodnost systému PiggyBac-GFP pro genetickou transformaci *C. costata*. Na obrázku je larvální nervová soustava s výraznou expresí GFP. Tato technika se využívá pro vnášení reportérových konstruktů, obsahujících např. gen *timeless* s různými variantami promotoru. (B) Imunocytochemická lokalizace peptidu Pigment Dispersing Factor (PDF) v laterálních neuronech mozku dospělé octomilky. PDF je asi výstupním signálem biologických hodin a může ovlivňovat výdej dalších neuropeptidů, které rozhodují o vývojovém programu hmyzu. (V. Košťál a D. Doležel).



**Obr. 6:** Schéma balancované letální linie a její využití pro produkci pouze samčího potomstva u zavíječe moučného (F. Marec et al.). W, Z – pohlavní chromosomy; T(W;Z) – translokace části chromosomu Z na W; *sl-1*, *sl-2* – pohlavně-vázané recesivně letální mutace.



# REKOMBINANTNÍ ENZYMY POUŽÍVANÉ PŘI ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN ROSTLINNÉHO PŮVODU

Helena Maříková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

Při zpracování mnoha potravin hrají klíčovou roli enzymy. Lidé je využívali již od pradávných dob, kdy ještě ani nevěděli, že právě enzymy jsou zodpovědné za biochemické procesy, ke kterým v potravinách při jejich zpracování dochází. Odedávna se využívají enzymy přirozeně přítomné v potravinářské surovině, nebo se přidávají mikroorganismy, které je produkují. V dnešní době je možné pro zpracování surovin přidávat i enzymy samotné, nejčastěji produkované mikroorganismy přirozenými i rekombinantními<sup>1</sup>

Enzymy se vyskytují ve všech živých organismech a katalyzují biochemické reakce nezbytné pro život. Enzymy jsou všudypřítomné v čerstvých i zpracovaných potravinách, které jsou konzumovány každý den. Průmyslová výroba enzymů pro jejich použití při zpracování potravin se datuje od roku 1874, kdy dánský vědec Christian Hansen získal rennin (chymosin) z telecích žaludků pro použití ve výrobě sýrů<sup>2</sup>. Chymosin se nyní vyrábí z mikroorganismů, do kterých byl pomocí techniky rekombinantní DNA (rDNA) vnesen gen pro hovězí prochymosin. Chymosin se tak stal prvním rekombinantně vyráběným enzymem schváleným FDA (US Food and Drug Administration)<sup>3</sup>.

## Příklady rekombinantních enzymů

Mnoho enzymů, které se v současné době používají při zpracování potravin, je získáváno z rekombinantních mikroorganismů (Tab. 1). Výrobci enzymů využívají nových genetických technik pro vyvíjení a výrobu enzymů s vylepšenými vlastnostmi. Například běžně používaná sladidla, jako jsou glukosové a fruktosové sirupy, jsou vyráběná z kukuřičného škrobu pomocí

hydrolytických enzymů. V prvním kroku hydrolýzy škrobu je škrob ztekucen pomocí  $\alpha$ -amylasy při vysokých teplotách. Díky rekombinantní DNA (rDNA) technologii je možné produkovat  $\alpha$ -amylasy se zvýšenou tepelnou stabilitou. Enzymy používané při zpracování potravin jsou prodávány jako tzv. enzymové přípravky<sup>1</sup>.

## Důležité kroky při přípravě rekombinantních kmenů

Průmyslové výrobě rekombinantních enzymů předchází rozsáhlá fáze výzkumu a vývoje, díky níž jsme schopni zkonstruovat úspěšný produkční kmen. Tento proces obvykle zahrnuje následující fáze:

1. vyhledání vhodného hostitelského kmene
2. konstrukci expresního vektoru
3. transformaci hostitelského kmene
4. identifikaci nejlepšího rekombinantního kmene
5. další zlepšení
6. charakterizaci výrobního kmene

Každý z těchto kroků je ovlivněn specifickými vlastnostmi hostitelského kmene a dostupností genetických metod vhodných pro jeho modifikaci a transformaci. Tyto kroky budou popsány níže a ilustrovány vybranými příklady<sup>1</sup>.

## Charakterizace hostitelských kmenů

Jak je vidět v Tab. 1, většina rekombinantních hostitelských kmenů pro produkci potravin rostlinné výroby byla odvozena z relativně malého množství bakteriálních kmenů a plísní. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *A. niger* a *A. oryzae* byly používány již dlouho pro produkci jim přirozených enzymů, mají dobré produkční i růstové vlastnosti. Navíc se dají dobře geneticky upra-

Tab. 1: Mikroorganismy produkující rekombinantní enzymy používané při zpracování potravin rostlinného původu schválené FDA.

| Produkční mikroorganismus      | Rekombinantní enzym            | Příklady využití                                                      |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i>       | phytasa                        | modifikace škrobu, případně konverze na dextrosu či fruktosové sirupy |
| <i>Aspergillus oryzae</i>      | glukosa oxidasa                | pekárenství – zvýšení stability těsta                                 |
|                                | proteasy                       |                                                                       |
| <i>Bacillus licheniformis</i>  | $\alpha$ -amylasa              | sladovnictví, pekárenství – štěpení či modifikace škrobu              |
|                                | pullulanasa                    |                                                                       |
| <i>Bacillus subtilis</i>       | $\alpha$ -amylasa, pullulanasa |                                                                       |
|                                | maltogenní amylasa (Novamyl)   | prodloužení trvanlivosti pečiva                                       |
| <i>Fusarium veneratum</i>      | xylanasa                       |                                                                       |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | $\alpha$ -amylasa              |                                                                       |
| <i>Trichoderma reesei</i>      | pektin lyasa                   | pekařství, sladovnictví a zpracování obilí pro výrobu alkoholu.       |

vovat, a proto jsou používány pro produkci více typů heterologních enzymů. Některé mikroorganismy, které nebyly dříve moc využívány, jako například *F. venenatum* a *P. fluorescens*, jsou však také pro produkci rekombinantních enzymů vhodné.

Přirozené formy některých mikroorganismů produkují různé extracelulární enzymy, například proteasy. Ty mohou štěpit vznikající enzym, který potřebujeme získat. Proto je snaha o přípravu mikroorganismů, které tyto proteasy neprodukují.

Mikroorganismy uvedené v Tab. 1 jsou charakterizovány jako nepatogenní a netoxigenní. Například *A. niger*, *A. oryzae* a *F. venenatum* ve skutečnosti mohou za jistých kultivačních podmínek produkovat toxické sekundární metabolity. Ty jsou však produkovány ve velmi nízkých koncentracích a proto je i přesto používání těchto mikroorganismů pro produkci rekombinantních enzymů využívaných při přípravě potravin schváleno FDA<sup>1</sup>.

### Konstrukce rekombinantních produkčních kmenů

Geny, které kódují rekombinantní enzymy, jsou zpravidla zavedeny do hostitelských kmenů pomocí expresních vektorů. Expresním vektorem je plasmidová DNA, která nese expresní kazetu. Ta obsahuje promotor, gen kódující požadovaný enzym a terminátor. Kromě toho obsahuje i regulační sekvence promotoru a terminátoru, které řídí přepis genu kódujícího daný enzym. Expresní vektory dále obsahují DNA odvozenou z bakteriálních plasmidů. Obecně platí, že ke konstrukci specifických expresních vektorů jsou používány dobře charakterizované, komerčně dostupné plasmidy.

Velmi často používaný je plasmid pUB110, který byl původně izolován z bakterie *Staphylococcus aureus*<sup>4</sup> a byl následně sekvenován<sup>5,6</sup>. Tento plasmid je replikován v *B. subtilis* a je používán pro konstrukci expresních vektorů pro produkci enzymů v *B. subtilis*. Tento plasmid nese gen *kanr* (resistence pro kanamycin nebo neomycin), také známý jako *neo* nebo *nptII* gen, a *ph1* gen (resistence pro phleomycin). Plasmid nese i gen kódující primární replikační iniciační protein (ORF alpha), který iniciuje replikaci plasmidu v hostitelské buňce. *Kanr* a *ph1* geny jsou použity i jako selekční marker v průběhu přípravy a transformace vektorem, ne vždy však ve finálním expresním vektoru přímo jsou.

Kompletní expresní vektory používané pro produkci enzymů v kvasinkách a plísňích jsou obvykle specificky navrženy pro integraci přímo do hostitelského genomu. Alternativně je expresní vektor nejprve sestřižen pomocí restrikčních enzymů a z něj vzniklý fragment obsahující expresní kazetu a gen pro selekční marker je poté vnesen do hostitelských mikroorganismů.

### Transformace buněk a jejich následná identifikace

Techniky používané pro vložení vektorové DNA do hostitelské buňky záleží převážně na vlastnostech hostitelského mikroorganismu a na povaze expresního vektoru samotného. U bakterií je nejčastěji využíváno

konjugace, elektroporace či inkubace vektoru s protoplasty.

Selekce transformovaných buněk je většinou uskutečňována pomocí selektivního markeru, jako je rezistence na antibiotika. V některých případech, kdy je rezistence na antibiotika ve finálních úpravách vektoru odstraněna, jsou mikrobiální kolonie screenovány přímo na přítomnost enzymové aktivity<sup>1</sup>.

### Zdroje rekombinantních enzymů

Rekombinantní enzymy mohou být získány z různých zdrojů zahrnujících mikroorganismy, rostliny a živočišné tkáně. Často jsou totožné s dlouhodobě známými a používanými enzymy. Většina rekombinantních enzymů, které se v současné době používají, je získávána z dobře charakterizovaných a snadno kultivovatelných kmenů mikroorganismů.

Vývoj moderních, vysoce efektivních screeningových technologií usnadnil další objevování nových enzymů, převážně v mikroorganismech získaných z přírody. DNA může být izolována přímo na místě odběru mikroorganismu a je použita k vytvoření DNA knihovny. Tyto knihovny jsou potom sekvenovány a jsou identifikovány enzymy s požadovanými vlastnostmi<sup>7</sup>.

Vlastnosti enzymu mohou být také přizpůsobeny podmínkám, při kterých je potřeba, aby byl enzym aktivní. Specifickými mutacemi v DNA lze dosáhnout změn v aminokyselinové sekvenci enzymu. Nejefektivnější je vnášení mutací, pokud je již známa prostorová struktura enzymu a její vztah k vlastnostem daného enzymu.

V posledních letech se objevil nový přístup ke zlepšování enzymatických vlastností známý jako molekulární nebo řízená evoluce.

### Produkce a úprava rekombinantních enzymů

Rekombinantní enzymy jsou stejně jako přirozené mikrobiální enzymy vyráběny ve velkých fermentorech. Nejčastěji jsou získávány tzv. "batch" kulturací mikroorganismů, přičemž výhodou je, pokud je enzym sekretován přímo do fermentačního média. Enzymy, které jsou produkovány intracelulárně, jsou nejprve izolovány z buněk. Získaný enzym je zakonzentrován ultrafiltrací nebo kombinací ultrafiltrace a evaporace. Enzymový koncentrát je pak sterilizován a spojen se sloučeninami jako je sacharóza, maltóza, maltodextrin nebo např. benzoan sodný. Pro některé potravinářské aplikace mohou být enzymy použity ve formě granulí či tablet, nebo mohou být imobilizovány na pevné nosiče – v tomto případě složky enzymu vůbec nepřechází do potraviny, která je za jeho pomoci připravována. Finální produkt je pak běžně nazýván enzymový přípravek. Enzymové přípravky mohou obsahovat částečně i další metabolity mikroorganismu nebo sloučeniny používané při fermentaci a zpracování<sup>1</sup>.

### Posouzení enzymových přípravků

Enzymy se používají při zpracování potravin ve velmi malém množství. Často jsou během zpracování potra-



viny přeměněny nebo inaktivovány (například během vaření nebo pečení). Vystavení konzumenta enzymatickému přípravku, který je používán při zpracování potravin, se obvykle určuje podle celkového množství organických pevných látek (total organic solids – TOS). TOS zahrnuje samotný enzym, stejně jako další organický materiál, který pochází z produkce mikroorganismu a zpracování enzymu. Enzymatické přípravky jsou testovány v souladu s obecně uznávanými postupy popisovanými v několika publikacích<sup>8,9,10</sup>. Testovacím materiálem je obvykle koncentrovaný enzym ve formě, ze které je teprve následně připraven enzymatický přípravek. Finální enzymatický přípravek je hodnocen z hlediska souladu se specifikacemi stanovenými pro enzymatické přípravky v FCC (Food Chemicals Codex, 2004) a JECFA (2001).

Některé enzymatické přípravky získané z rekombinantních mikroorganismů byly testovány na přítomnost transformovatelné DNA (tj. DNA, která může být pohlcena příslušnou bakterií), která kóduje markery rezistence na antibiotika. Zatím nebyla žádná takováto DNA v enzymatických přípravcích předložených ke kontrole FDA zjištěna. Stále se navíc zvyšuje počet

enzymatických přípravků, které pochází z kmenů bez rezistence na antibiotika<sup>1</sup>.

## Závěr

Enzymy nacházející se v přírodě byly při výrobě fermentovaných potravin používány po tisíciletí. Produkce enzymatických přípravků izolovaných z přírodních zdrojů se datuje až do konce 19. století. Vývoj v oblasti molekulární genetiky a buněčné biologie v posledních čtyřech desetiletích hodně změnil produkci enzymů. Umožnil vnášet a exprimovat geny kódující enzymy v hostitelských mikroorganismech, které jsou dobře přizpůsobené k rozsáhlé průmyslové fermentaci. Navíc je již i možné zlepšit odolnost enzymů podmínkám zpracování potravin jako jsou teplota a pH. Aktuální strategie vylepšování vlastností rekombinantních kmenů mikroorganismů přispívá k efektivnější a bezpečnější produkci rekombinantních enzymů. Tento trend bude nepochybně pokračovat, stejně jako se budou i nadále rozšiřovat naše znalosti o genetice mikroorganismů používaných pro produkci enzymů a znalosti nových molekulárně-genetických technik.

## Literatura

1. Olempska-Beer ZS, Merker RI, et al: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45, 144 (2006).
2. Nielsen PH, Malmos H, et al: Enzyme applications (industrial). In: fourth ed. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 9. John Wiley & Sons, Inc, New York, 567–620 (1994).
3. Flamm EL: *Bio/Technology* 9, 349 (1991).
4. Keggins KM, Lovett PS, Duvall EJ: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978).
5. McKenzie T, Hoshino T, et al: *Plasmid* 15, 93 (1986).
6. McKenzie T, Hoshino T, et al: *Plasmid* 17, 83 (1987).
7. Short JM: *Nat. Biotechnol.* 15, 1322 (1997).
8. IFBC (International Food Biotechnology Council), 1990. Chapter 4: Safety Evaluation of Foods and Food Ingredients Derived from Microorganisms. In *Biotechnologies and Food: Assuring the Safety of Foods Produced by Genetic Modification. Regulatory Toxicology and Pharmacology*.
9. SCF: Scientific Committee for Food, Report (27th series), 1992. Ref. No EUR14181 EN- Guidelines for the presentation of data on food enzymes.
10. Pariza MW, Johnson EA: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33, 173 (2001).

## Souhrn

### Maříková H.: Rekombinantní enzymy používané při zpracování potravin rostlinného původu.

Enzymy jsou běžně používány při výrobě velkého množství potravin. Tradičně využívané enzymy, které jsou izolovány z mikroorganismů, rostlin a savčích orgánů, nejsou často ideálně použitelné pro moderní produkci potravin. Využívání technologie rekombinantní DNA však umožňuje přípravu nových enzymů, které jsou pro zpracování potravin leckdy vhodnější. Tyto enzymy mohou být objeveny pomocí screeningu mikroorganismů odebíraných z různých oblastí světa, nebo pomocí modifikací již známých enzymů proteinovým či genovým inženýrstvím. Takto byly získány například enzymy jako jsou různé amylasy a lipasy, jejichž vlastnosti byly přizpůsobeny pro konkrétní aplikace v produkci potravin. Využívá se i „vylepšení“ známých mikrobiálních kmenů, například zvýšení produkce enzymů jimi produkováných pomocí delece genu pro extracelulární proteasy, které vznikající enzym štěpí. Kromě toho byly modifikovány některé produkční kmeny plísni pro snížení nebo odstranění jejich schopnosti tvořit toxické sekundární metabolity.

**Klíčová slova:** rekombinantní enzymy, zpracování potravin rostlinného původu, rDNA technologie

## Summary

### Maříková H.: Recombinant enzymes used in processing of food of plant origine.

Enzymes are commonly used in the production of quantities of food. Traditionally, enzymes that are isolated from microorganisms, plants and mammals are often not well-adapted to the conditions used in modern food production methods. The use of recombinant DNA technology has made it possible to manufacture novel enzymes suitable for specific food-processing conditions. Such enzymes may be discovered by screening of microorganisms sampled from diverse environments or developed by modification of known enzymes using modern methods of protein engineering or molecular evolution. As a result, several important food-processing enzymes such as amylases and lipases with properties tailored to particular food applications have become available. Another important achievement is improvement of microbial production strains. For example, several microbial strains recently developed for enzyme production have been engineered to increase enzyme yield by deleting native genes encoding extracellular proteases. Moreover, certain fungal production strains have been modified to reduce or eliminate their potential for production of toxic secondary metabolites.

**Keywords:** recombinant enzymes, food processing of plant origin, rDNA technology

# TRANSGENNÍ STROMY

Martin Janda

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Martin.janda@vscht.cz

## Úvod

Každý z nás už jistě někdy slyšel o geneticky modifikovaných organismech (GMO), o kterých se v posledních letech vede celospolečenská debata, neboť v souvislosti s GMO potravinami se k tomuto tématu vyjadřuje i široká veřejnost.

Součástí problematiky GMO jsou i transgenní stromy, které sice nejsou ústředním bodem debat o GMO, ale i přesto vzbuzují otázky, které vedou molekulární biologie a ochránce přírody k vášnivému dialogu o jejich výhodách a nebezpečích.

Na rozdíl od geneticky modifikovaných rostlin, tj. i zemědělských plodin, je vývoj transgenních stromů a jejich využití o něco složitější kvůli delší době růstu. A tak se nabízí otázky typu: budou v blízké budoucnosti transgenní stromy široce komerčně využívány? Jaké stromy se pro transformaci používají? Jak vlastně transgenní stromy vznikají?

Na tyto, ale i další otázky se nám bude snažit v rozhovoru odpovědět pan Jáchym Lopot.

## Pane Lopote, mohl byste nám stručně říci něco o historii a vývoji problematiky transgenních stromů?

První úspěšná transformace stromu proběhla roku 1987<sup>1</sup> a první polní pokus byl spuštěn o rok později v Belgii, kde se testoval topol odolný vůči herbicidům.<sup>2</sup> V průběhu let byly zaznamenány velké pokroky a došlo k mnohonásobení pokusů na transgenních stromech. **Jaké stromy jsou nejčastěji využívány k transformaci?**

Do dnešního dne bylo spuštěno přes 400 polních pokusů, přičemž nejvíce z nich bylo prováděno na topolu (*Populus*), který je mezi stromy modelovým organismem podobně jako třeba *Arabidopsis thaliana* u rostlin. V roce 2006 byla dokončena sekvenace jeho genomu. Na topolu bylo do února 2008 provedeno 177 polních pokusů, 129 na borovici a 56 na eukalyptu. Dodnes bylo celosvětově úspěšně transformováno 33 druhů stromů.<sup>3</sup>

## Jak se vlastně stromy transformují?

Stromy se transformují pomocí dvou mikroorganismů. Především bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* a v menší míře *Bacillus thuringiensis*.<sup>4</sup> Jejich prostřednictvím je do genomu stromu vnesen gen, který chceme, aby byl exprimován, a nebo je pomocí nich exprese některého genu oslabena, nebo zrušena.

## Jaké jsou cíle genetického inženýrství u stromů?

Jsou to například zvýšená tolerance vůči abiotickému či biotickému stresu, podpora vývoje kořenů, zlepšení vlastností dřeva, možnosti fytořemediace či zvýšení odolnosti proti herbicidům.<sup>5</sup>

## Mohl byste jednotlivé cíle více rozvinout?

U abiotického stresu se vědci nejvíce věnují odolnosti vůči suchu, solnému stresu a toleranci na nízké a vysoké teploty. V těchto tématech jsou často použity znalosti z výzkumu na jiných rostlinách.<sup>6</sup> Například zvýšená exprese transkripčního faktoru *CaPF1* z pepře v bílé borovici vedla k významnému zvýšení tolerance na suchu, zimu a solné prostředí.<sup>7</sup> Dalším příkladem bylo vložení genu *ThCAP* z *Tamarix hispida* do topolu, které vedlo ke zvýšení odolnosti proti nízkým teplotám.<sup>8</sup>

Co se týče reakcí na biotický stres byla pozornost věnována především odolnosti vůči hmyzu a chorobám tj. napadení virem či patogenem. Toto studium by mohlo být výhledově velmi přínosné z důvodu snížení potřeby využívání syntetických insekticidů. A může snížit odumírání stromů po napadení patogeny.<sup>9,10</sup> Také probíhají experimenty na jilmu pomocí vložení antifungálních genů. Do amerického jilmu byl vnesen gen kódující antimikrobiální peptid ESF39, který podporuje rezistenci vůči některým patogenům. Nicméně zmíněné experimenty nemůžeme považovat za naprosto průkazné, neboť stromy byly zatím mladé na to, abychom si byli jisti stabilitou získané rezistence.<sup>11</sup>

U podpory vývoje kořenů se vědci snaží modifikovat expresi genů účastnících se biosyntézy rostlinných hormonů, kterými jsou v tomto případě gibereliny. Vložení genů *GAI* a *RGL1* původem z *Arabidopsis thaliana* a jejich zvýšená exprese v topolu vyvolalo zvýšený vývoj kořenů v pokusech *in vitro*.<sup>12</sup>

Nejčastější snahou o změnu vlastností dřeva je modifikace biosyntézy ligninu, jehož obsah ve dřevě značně zdražuje výrobu papíru. Toto se zkoumá především na transgenním topolu, který má umlčen buď gen pro enzym ethenylbenzendehydrogenasu (CAD; EC 1.1.1.195), nebo pro enzym O-methyltransferasu kyseliny kofeinové (COMT; EC 2.1.1.68). Pouze topoly s těmito modifikacemi byly pěstovány v polních pokusech, ale např. polní pokus ve Velké Británii byl zhacen oponenty GMO.<sup>13</sup> Dalším užitek změn ve vlastnostech dřeva by mělo být lepší získávání biopaliv.<sup>14</sup>

Čištění zamořené půdy různými kontaminanty je obecně velmi složité a transformované stromy by v tomto odvětví mohly v budoucnu sehrát nezanedbatelnou roli, neboť samy o sobě jsou k životnímu prostředí šetrné, levné a mohou sloužit jako tlumiče hluku v prostředí či kontrolovat erozi.<sup>15</sup>

U odolnosti vůči herbicidům je to podobné jako s insekticidy. Díky ní se může snížit jejich užívání množstvím. Stromy v jejich přítomnosti lépe rostou. Ve stromech se nachází málo genů řídících rezistenci vůči herbicidům. Je to především gen *CP4* a geny pro glutamin syntetázu.<sup>16</sup>

## **Můžete uvést nějaký konkrétní příklad výzkumu s transgenními stromy u nás?**

U nás se jedná například o výzkum rezistence transgenní švestky (*Prunus domestica*) vůči viru šarky švestky, která je jednou z nejrozšířenějších chorob na švestce, a ke smíšeným infekcím i jinými viry. Tento výzkum je prováděn ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze Ruzyni.<sup>17</sup>

## **Jak je to s komerčním využitím transgenních stromů?**

Do dnešního dne byly spuštěny pouze dva komerční projekty pěstování transgenních stromů. USA pěstuje komerčně Papayu (*Carica papaya*) rezistentní vůči virům a Čína topol odolný vůči hmyzím škůdcům.<sup>3</sup>

## **Čím si vysvětlujete, že je to pouze takto malý počet projektů za více než dvacet let výzkumu?**

Vidím v tom souhru několika faktorů. Předně transgenním stromům trvá růst mnohem déle než jiným rostlinám. Dalším důvodem je, že stále není stromům věnována taková pozornost jako třeba běžným potravinovým plodinám, kukuřici či bramborám. V neposlední řadě se jedná i o to, že se různé nevládní organizace a jiná uskupení snaží zastavit, či alespoň co nejvíce regulovat pěstování GM plodin.<sup>3</sup>

## **Mohl byste nastínit důvody, které tyto organizace vedou k takto negativním kampaním.**

Častým zdrojem argumentů pro znepokojení je dlouhá životnost stromů, která by mohla vést k permanentnímu začlenění GM stromů do přírody, a s tím jsou spojené obavy, že by mohl proběhnout horizontální přenos genů, a to podle některých aktivistů nejen mezi stromy, ale dokonce i mezi jinými druhy organismů, jako je hmyz. Jiným obavou vzbuzujícím argumentem je, že GM stromy budou mít oproti nedomifikovaným stromům výhodu, budou se lépe množit, vytlačí přirozené druhy a sníží tak přirozenou rozmanitost lesů.

Přenos genů pomocí genetického inženýrství je mnohem menší než genetická rozmanitost způsobená přirozenými změnami, které jsou v přírodě běžné. Stromy, u kterých je změněna biosyntéza ligninu, jsou oproti běžným druhům znevýhodněny, neboť lignin pomáhá stromům v obraně. Tyto transgenní stromy ho

mají méně, takže nejsou zvýhodněny, ba právě naopak. Jinak je tomu u odolnosti vůči hmyzu či nemocem. Zde se zdá být znepokojení oprávněné, avšak množství vysazovaných transgenních stromů vůči divoce rostoucím stromům je malé a navíc nejsou vysazovány v blízkosti lesů. Dále se do GM stromů vkládá gen pro sterilitu. Všechna tato opatření by měla znepokojení minimalizovat. Také velmi málo GM stromů, o kterých se uvažuje do komerčního využití, je schopno se pohlavně množit s přirozeně se vyskytujícími druhy. Do dnešního dne ale určitě neproběhl dostatek pokusů a neuplynul dostatečný časový horizont, abychom mohli tvrdit, že žádné nebezpečí nehrozí.

Mnoho debat se vede okolo ohrožení přirozené biodiverzity, to je spojené s obavami o zvýhodnění transgenních stromů. Když srovnáme tuto hrozbu s vysazováním monokulturních lesů, tak by se tomuto znepokojení chtělo usmát. Některé vědecké studie naopak hovoří o tom, že právě transgenní stromy jsou jedinou možností přežití některých velmi ohrožených druhů stromů a tím podporují biodiverzitu. Jednou z cest, kterou chtějí vědci snížit možnost tohoto ohrožení, je vkládat do transgenních stromů i gen pro sterilitu, tj. transgenní stromy by se dále nemohli generativně množit, tudíž by nevznikaly další generace a biodiverzita by nemohla být ohrožena. Zatím však není vkládání sterility a její udržení po celý „život“ stromu technologicky stoprocentně zvládnuté. Dále existují obavy, že transgenní stromy, které budou mít vylepšenou resistenci k herbicidům a hmyzu či zrychlený růst, budou mít oproti normálním druhům stromů výhodu a nakonec je vytlačí. Proti tomu se nabízí námitka, že většina stromů, které by měly mít potenciál ke komerčnímu využití, nemá tyto výhody oproti divoce rostoucím stromům, ale jsou spíše znevýhodněny. To si lze dobře ukázat na příkladu transgenních stromů s nižším obsahem ligninu pro papírenské potřeby. Lignin je látka, která stromu pomáhá v obraně proti škůdcům a stresu, a tak by transgenní stromy oproti divoce rostoucím stromům žádné výhody neměly.<sup>2,3</sup>

## **Děkuji za rozhovor.**

## **Literatura:**

1. Fillati J, Selner J, et al: *Mol Gen Genet.* 206, 192 (1987).
2. Valeazula S, Balocchi C, Rodriguez J: *J. Biotechnol.* 9, 335 (2006).
3. Strauss SH, et al.: *Nat. Biotechnol.* 27, 519 (2009).
4. Jouanin L, Bonadé-Bottino M, et al: *Plant Sci.* 131, 1 (1998).
5. Harfouche A, Meilan R, Altman A: 29, 9 (2011).
6. Vinocur B, Altman A: *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 123 (2005).
7. Tang W, et al: *Plant Cell Rep.* 26, 115 (2007).
8. Wang YC, et al: *Mol. Biol.Rep.* 37, 1119 (2010).
9. Zhang Q, et al: *Silvae Genet.* 54, 108 (2005).
10. Jia Z, et al: *Carr. Biotechnol.Lett.* 32, 1325 (2010).
11. Merkle SA, Nairn CJ: *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant* 41, 602 (2005).
12. Busov V, et al: *Planta* 224, 288 (2006).
13. Pilate G, Guiney E, et al: *Nat. Biotechnol.* 20, 607 (2002).
14. Stewart JJ, et al.: *Plant Physiol.* 150, 621 (2009).
15. Doty SL, et al.: *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104, 16816 (2007).
16. Li J, et al: *West. J.Appl. For.* 23, 89 (2008).
17. Polák J, et al: *Phytopatol. Pol.* 36, 115 (2005).



## Souhrn

### Janda M.: Transgenní stromy

Článek se pomocí fiktivního dialogu mezi novinářem a vědcem, zabývajícím se problematikou transgenních stromů, snaží přehlednou formou podat poznatky o problematice transgenních stromů čtenářům. Dozvíte se něco málo o historii transformovaných stromů, ale i o tom, na co se vědci u transgenních stromů nejvíce zaměřují a jak je to se znepokojením okolo transgenních stromů.

**Klíčová slova:** Transgenní stromy

## Summary

### Janda M.: Transgenic trees

The article wants to give a review about the knowledge in GM trees issue. The article uses fiction dialog between the journalist and the scientist who works in the transgenic trees field. It informs about the history of transformed trees and about the key targets in tree engineering and at least about the threat of transgenic trees.

**Keywords:** Transgenic trees

# TRANSGENNÍ KVĚTINY

## Barbora Šumová

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, sumovab@vscht.cz*

## Úvod

Následkem silícího vlivu moderních biotechnologických metod začala transgenozose pronikat i do oblasti šlechtitelství rostlin. Producenti řezaných květin se neustále přizpůsobují rostoucím nárokům zákazníků a využívají tak nových postupů, které jim genetické inženýrství může poskytnout. Pozornost je věnována především tvorbě nových barevných odrůd a prodloužení jejich trvanlivosti.

## Transgenní květiny

Geneticky modifikované květiny jsou nyní komerčně dostupné v mnoha částech světa. První firma, která uvedla na trh karafiát se změněnou barvou květu, byla australská společnost Florigene®. V roce 1996 představila karafiát Moonshadow™ a o dva roky později Moonshadow™.<sup>1</sup> Jako u všech GMO byla zavedena nutná regulační opatření pro uvádění do oběhu k zajištění ochrany zdraví lidí, zvířat a životního prostředí. Použití geneticky modifikovaných organismů se obecně řídí principem předběžné opatrnosti. Zjednodušeně řečeno: co není povoleno, je zakázáno.

V zemích Evropské unie jsou mezi GMO schválenými pro uvádění do oběhu prozatím povoleny pouze tři druhy geneticky modifikovaných květin. Karafiát s prodlouženou trvanlivostí řezaných květů Florigene® Moonshadow™ (podána žádost o obnovení), dále karafiát se změněnou barvou květu Florigene® Moonlite™ a jako poslední je to karafiát se změněnou barvou květu Florigene® Moonaqua™.<sup>2</sup>

## Anthokyaniny

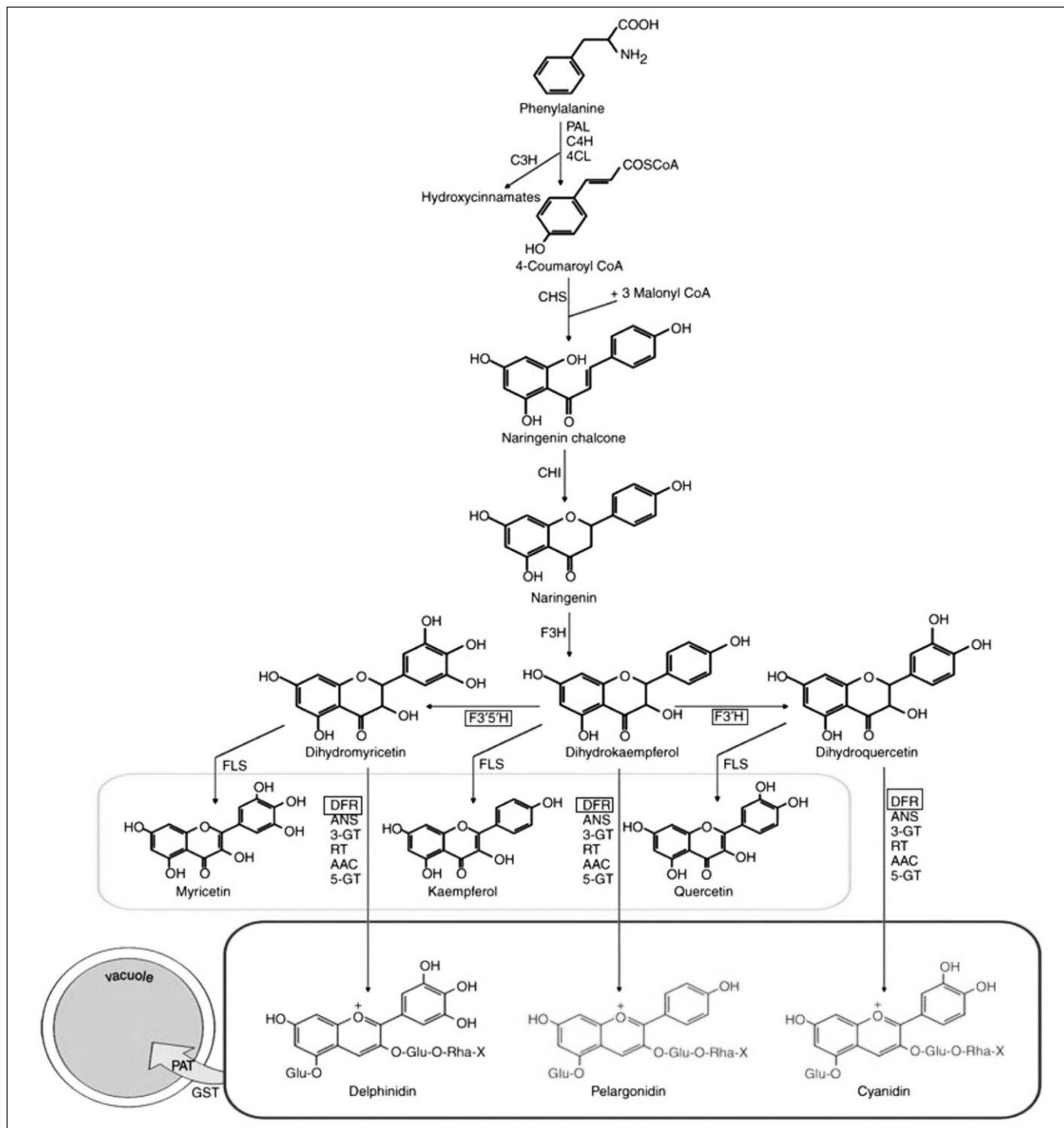
Tradiční křížení nejprodávanejších řezaných květin jako jsou růže, karafiáty a chryzantémy vyprodukovalo široké spektrum barev. Přesto tyto květiny vykazovaly nedostatek genetické kapacity pro produkci pigmentu nazývaného delfinidin, který se nachází v modrých květinách a je syntetizován anthokyaninovou dráhou (Obr. 1).

Anthokyaniny (lat. anthos – květ, cyanos-modrý) jsou přírodní barviva, která se podílejí na konečném zabarvení květních lístků. Tyto flavonoidy slouží rovněž jako přírodní antioxidanty. Široká škála barevnosti sahá od červené, přes modrou až k tmavě fialové. Chemicky jsou to hydroxyderiváty 2-fenylbenzopyryliumchloridu. Mezi nejčastější modifikace patří glykosylace a acylace uskutečňované pomocí specifických transferas. Glykosylovány jsou polohy 3 a 5, zřídka pak 7, 3' a 4' (Obr. 2). Jako cukerná složka se uplatňuje D-glukosa, L-rhamnosa, D-arabinosa, rutinosa a soforosa.<sup>4</sup> Aromatická acylace anthokyaninů posouvá jejich barvu k modré a zvyšuje jejich stabilitu. Další možnou modifikací je methylace, která přidává anthokyaninům strukturální a barevnou pestrost. Modifikace mají rovněž vliv na stabilitu, rozpustnost a odstín výsledných pigmentů. Mezi šest hlavních zástupců anthokyanidů (aglykony anthokyaninů) patří: pelargonidin, kyanidin, peonidin, petunidin a malvidin a již zmiňovaný delfinidin.<sup>5</sup>

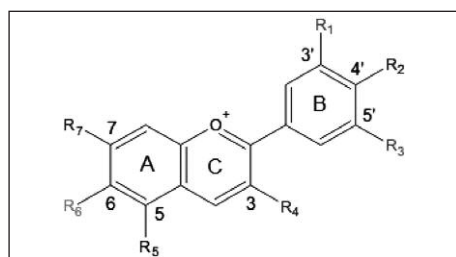
Anthokyaniny mohou být pro buňku škodlivé, ta si s tímto problémem umí poradit a přesune tyto toxické látky do vakuol. Změnou pH uvnitř rostlinných vakuol dochází k protonacím a deprotonacím na těchto heterocyklických sloučeninách a tím k přeskupování elektronů, které interagují s fotony viditelného světla.<sup>4</sup> Výsledná barva tedy nezávisí pouze na struktuře barviva, ale také na pH prostředí. Stejná látka tak může vystupovat jako červené, modré, nebo fialové barvivo (Obr. 3). Mezi další faktory mající vliv na konečnou barvu patří: ionty kovů, kopigmenty a výše popsané modifikace hydroxylových skupin B-kruhu.<sup>5</sup>

## Transgenoze

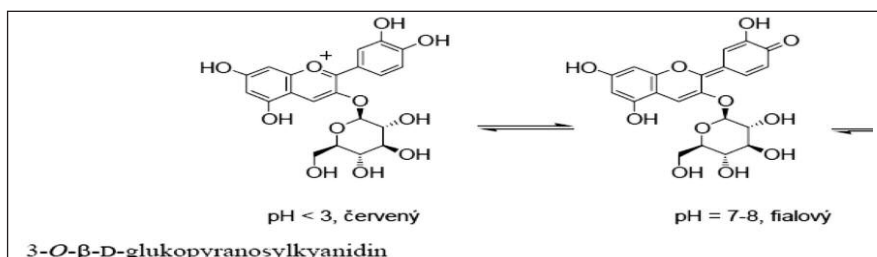
Transgenoze je u rostlin nejčastěji založena na integraci části plazmidové DNA bakterie *Agrobacterium tumefaciens* do jaderného genomu rostlin. Hlavní odlišností od tradičního křížení je cílenost a možnost kontroly vnášeného genu. Do dnes se vědcům podařilo modifikovat mnoho dalších květin. Transgenní rostliny s bílými květy byly získány u mnoha odrůd přímou genetickou modifi-



**Obr. 1:** Biosynthetická dráha anthokyaninů, v červeném rámečku zvýrazněné cílové enzymy: žlutý box: flavonoly, fialový box: anthokyaniny, PAL: fenylalaninammonium lyasa, 4CL: 4-coumaroyl-CoA-ligasa, C4H: cinnamat-4-hydroxylasa, C3H: 4-kumarat-3-hydroxylasa, CHS: chalcon synthasa, CHI: chalcon isomerasa, F3H: flavanon 3-hydroxylasa, F3'H: flavonoid 3'-hydroxylasa, F3'5'H: flavonoid 3',5'-hydroxylasa, FLS: flavonol synthasa, DFR: dihydroflavonol-4-reduktasa, ANS: anthokyanidin synthasa, 3-GT: flavonoid-3-O-glucosyltransferasa, RT: rhamnosyl transferasa, AAC: anthokyanin acyltransferasa, 5-GT: flavonoid-5-glucosyltransferasa, GST: glutathion S- transferasa, PAT: předpokládaný anthokyaninový transporter, PAT a GST mohou být zahrnuty v transportu anthokyaninů do vakuol (růžový kruh), X: acylová skupina<sup>6</sup>



**Obr. 2:** Obecná struktura anthokyanidinů<sup>3</sup>



**Obr. 3:** Vliv pH na anthokyaninové barvivo<sup>4</sup>

kací genů anthokyaninové dráhy. Nejvíce využívanou metodou je sekvenčně specifické umlčení genů zprostředkované krátkými úseky dsRNA. Tato metoda se nazývá RNA interference (RNAi). Ne vždy ale RNAi zajišťuje stálost barvy. Efektivnějšími metodami se tak jeví být genový knock out nebo využití zinkoprstové nukleasy. Důležitým faktorem při snaze o dosažení cílové barvy je rovněž správný výběr hostitelského organismu, který nám umožní minimalizovat kompetici mezi endogenní biosyntetickou dráhou a vneseným enzymem.

### Delfinidin

Základem genetického výzkumu v oblasti vývoje transgenních květin se stala snaha o izolaci genu, který je zodpovědný za konečné modré zabarvení květních lístků. V roce 1993 byly z petúnie izolovány dva geny: *Hf1* a *Hf2*, které kódují dvě na membránu vázané cytochrom P450 monooxygenasy: flavonoid- 3'-hydroxylasa (F3'H) a flavonoid- 3',5'-hydroxylasa (F3',5'H) (Obr. 3). Tyto enzymy jsou schopné hydroxylace B-kruhu, která vede k modrému zbarvení. Příslušné geny byly následně izolovány z celé řady rostlin.

S objevem a úspěšnou izolací genu pro modré barvivo mohli vědci začít s pokusy o vytvoření transgenní rostliny exprimující dané enzymy. Prvním úspěšným experimentem v manipulaci anthokyaninového metabolismu byla produkce pelargonidinu dosažená expresí kukuřičného genu pro dihydroflavon-4-reduktasu (DFR) v petúnii, která měla nedostatečné aktivity F3',5'H a F3'H enzymů. DFR katalyzuje přeměnu flavonových prekursorů anthokyanových pigmentů (Obr. 1).

Pro získání karafiátů série Moon® je nutné vycházet z kultivarů s deficitním genem DFR (viz výše). Do dědičné výbavy těchto mutantů jsou pomocí transgenózy vneseny geny F3',5'H a DFR pocházející z petúnie, které jsou pod kontrolou konstitutivních promotorů zajišťujících stálou expresi vložených genů. Petúnie netvoří pelargonidin, jelikož její dihydroflavon-4-reduktasa není schopna konvertovat dihydrokaempferol na tento oranžový pigment. Karafiáty, u kterých původně převažoval pelargonidin, mají nyní modrou barvu korunních lístků tvořenou ze 70 % delfinidinovými deriváty.

Efektivnější syntézu 3',5'-hydroxylovaných flavonoidů si petúnie zajišťuje také pomocí cytochromu *b<sub>5</sub>*, který specificky přenáší elektrony na F3',5'H enzym. Vnesením genu pro cytochrom *b<sub>5</sub>* je zaručena účinnější produkce modrých pigmentů. V tomto případě není nutné užití DFR mutantů.

Modrá růže je snem pěstitelů většiny okrasných květin. Pomocí tradičních šlechtitelských metod však není možné „Modrý Mauricius“ získat. Prvenství v produkci transgenní modré růže mají dvě navzájem spolupracující firmy: japonská firma Suntory® a již zmiňovaná australská společnost Florigene®.

Plané růže mají obvykle růžové (deriváty kyanidinu) anebo bílé zabarvení. Odrůdy růží, které známe dnes (*Rosa hybrida*), jsou výsledkem mezidruhových křížení zahrnujících žluté (produkce karotenoidů) a oranžové

(deriváty pelargonidinu) zabarvené druhy. Růže však stejně jako karafiát nemá enzymy potřebné k produkci delfinidinových derivátů. V tomto případě byly použity mutantní DFR kultivary, připravené metodou RNA interference, a F3',5'H pocházející z macešky společně s DFR z holandského kosatce.

Na závěr je důležité zdůraznit, že na skutečně šmolkovou modrou barvu květu si budeme muset ještě nějakou dobu počkat. Jak již bylo zmíněno dříve, na konečnou barvu květu mají vliv další faktory (pH vakuol, ionty kovů, ko-pigmenty). Cílem výzkumníku zabývajících se touto oblastí je tedy kompletní porozumění a možnost manipulace se všemi faktory, které se uplatňují v tvorbě rostlinných pigmentů.

### Trvanlivost

Zákazník hledí nejen na barvu květu, ale také na trvanlivost zakoupené květiny. Tyto dvě rostlinné charakteristiky mají tudíž pro producenty ekonomický význam. V současné době jsou na trhu syntetické přípravky, které prodlužují životnost rostlin. Přesto se jako mnohem účinnější jeví genetické manipulace s rostlinným genomem. Existují dva způsoby jak dosáhnout prodloužení životnosti: první je vnesení exogenního genu a exprese nového proteinu, druhou možností je pak inaktivace cílové endogenní biosyntetické dráhy.

Ethylen je rostlinný hormon, který startuje stárnutí květin a má rovněž vliv na dozrávání ovoce. Ve velkém množství je syntetisován několik dní po plném rozvinutí květních lístků. Inhibice syntézy anebo aktivity tohoto hormonu prodlouží nástup symptomů doprovázejících vadnutí květin.

Syntéza ethylenu probíhá následující cestou: L-methionin (Met) → S-adenosylmethionin (AdoMet) → 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina (ACC) → ethylen. ACC syntáza (1-aminocyklopropan-1-karboxylat syntáza) a ACC oxidasa katalyzují poslední dvě reakce. V karafiátech byly identifikovány tři geny kódující ACC syntázu (*DC-ACS1*, *DC-ACS2*, *DC-ACS3*) a jeden gen kódující ACC oxidasu (*DC-ACO1*). *DC-ACS1* a *DC-ACO1* hrají tudíž hlavní roli v masivní produkci ethylenu. Je tedy možné využít cDNA ACC syntázy a ACC oxidasy za účelem potlačení produkce hormonu. Jako vektoru se využívá dříve zmiňované bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a cDNA jsou vnášeny v normální (sense) anebo protismyslové (antisense) orientaci. Transgenní karafiáty mají pak potlačenou produkci ethylenu.

### Závěr

V nynější době je možné geneticky transformovat většinu řezaných květin a s velkou pravděpodobností se budou nové biotechnologické postupy využívat stále častěji za účelem vytváření nových komerčních odrůd. V budoucnu můžeme rovněž očekávat vývoj květin rezistentních k rostlinným onemocněním a škůdcům. I přes obrovský rozvoj oblasti geneticky modifikovaných rostlin je nutné nezapomínat na ne vždy pozitivní postoj veřejnosti ke geneticky modifikovaným organismům.



## Literatura

1. Mol J, Cornish E, Mason J: *Current Opinion in Biotechnology* 10, 198 (1998).
2. <http://www.mzp.cz/www/env-gmo.nsf/gmo-commercial?OpenView>, staženo 3. listopadu 2010
3. <http://www.med-owl.com/herbal-antivirals/tiki-index.php?page=anthocyanins>, staženo 3. listopadu 2010
4. Čopíková J, Uher M, et al: *Chem. Listy* 99, 802 (2005).
5. Tanaka Y, Brugliera F, Steve Ch: *Int. J. Mol. Sci.* 10, 5350 (2009).
6. Butelli E, Titta L, Giorgio M, et al: *Nat. Biotechnol.* 26, 1301 (2008).
7. Brugliera F, Tull D, et al: *International. Plant Molecular Biology Reports (Suppl.)* 18. S6–S8 (2008).
8. Iwazaki Y, Kosugi Y, et al: *J. Appl. Horticulture* 6 (2), 67 (2004).

## Souhrn

### Šumová B.: Transgenní květiny

Geneticky modifikované, barevně pozmeněné odrůdy nejznámějších řezaných květin s prodlouženou délkou života jsou komerčně dostupné již několik let. V následujícím článku je nastíněn stručný popis transgenní manipulace s anthokyaninovou a ethylenovou biosyntetickou dráhou dvou hlavních okrasných květin, karafiátu a růže. Anthokyaninová dráha umožňuje okrasným květinám produkovat modré barvivo, delphinidin. Ethylen je rostlinným hormonem startujícím vadnutí květin. Využitím nových biotechnologických metod tak mohou producenti vyvinout nové odrůdy s modrou barvou květu a prodlouženou trvanlivostí.

**Klíčová slova:** transgenní růže, transgenní karafiát, barevnost květu, anthokyanin, flavonoid, životnost řezaných květů, ethylen, flavonoid- 3',5'-hydroxylasa (F3',5'H), flavonoid- 3'-hydroxylasa (F3'H), ACC syntasa, ACC oxidasa, dihydroflavon-4-reductasa (DFR)

## Summary

### Šumová B.: Transgenic flowers

Genetically-modified, colour-altered varieties of the important cut-flower crop carnation have now been commercially available for nearly ten years. The following article outlines a brief description of the transgenic manipulation of the anthocyanin biosynthesis and ethylene pathways of two major ornamental flowers, the carnation and the rose. The anthocyanin pathways allow ornamental flowers to produce a blue pigment, delphinidin. Ethylene is a plant hormone that starts wilting of flowers. Using new biotechnology techniques the producers can develop new varieties with blue flowers and extension of their longevity.

**Keywords:** transgenic rose, transgenic carnation, flower color, anthocyanin, flavonoid, longevity, ethylene, flavonoid- 3',5'-hydroxylase (F3',5'H), , flavonoid- 3'-hydroxylase (F3'H), ACC synthase, ACC oxidase, dihydroflavon-4-reductase (DFR)

# PŘEHLED FIREM PRODUKUJÍCÍCH ENZYMY PRO PRŮMYSLOVÉ APLIKACE

Daniela Gerstorferová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

Stále více společností se hlásí ke své společenské odpovědnosti (Corporate Social Responsibility – dále CSR). Pro CSR neexistuje žádná jednotná definice. Je trendem, který apeluje na změnu orientace firem z krátkodobých cílů na dlouhodobé, z maximálního na optimální zisk.<sup>1</sup> Z řady definic společenské odpovědnosti firem (dále jen CSR) zde zmiňme alespoň ty nejznámější:

1/ CSR je dobrovolné integrování sociálních a ekologických hledisek do každodenních firemních operací a interakcí s firemními stakeholders (Jako stakeholders jsou označovány všechny zainteresované osoby či skupiny osob uvnitř a v okolí firmy – patří sem zákazníci, akcionáři, zaměstnanci, obchodní partneři, dodavatelé, zástupci státní správy a samosprávy, zájmové skupiny, média, odbory a mezinárodní organizace.). (*Evropská unie, Zelená kniha 2001*)<sup>1</sup>;

2/ CSR je způsob podnikání, který odpovídá či jde nad rámec etických, zákonných, komerčních a společenských očekávání. (*Nevládní organizace Business for Social Responsibility*)<sup>1</sup>.

Právě tzv. bílé biotechnologie, využívající enzymy, přispívají k CSR. V případě enzymové katalýzy se jedná

o efektivní a ekologicky citlivé procesy. Proto firmy produkující enzymy pro průmyslové využití stále více expandují a dnes již téměř nenajdeme průmyslové odvětví, ve kterém by enzymy nenašly uplatnění. Hlavní výhodou enzymů ve srovnání s dalšími katalyzátory je jejich stereo-, regio- a chemoselektivita a specifita.<sup>2</sup> Proteinové inženýrství je dnes oblastí aktivně se zabývající vývojem enzymů s novými vlastnostmi, čímž mohou být designovány i enzymy katalyzující reakce nevyskytující se v přírodě.<sup>3,4,5</sup>

## Potravinářský průmysl

Enzymy se v potravinářském průmyslu objevují ve všech oblastech – pekárenství, pivovarnictví, vinařství, zpracování ovoce a zeleniny, masný průmysl, sýrařství, výroba olejů, kávy, čaje atd. Jedná se také o největší škálu enzymů pro průmysl, dá se říci, že každá firma vyrábí enzymy i pro potravinářský průmysl.

Pro pekárenský průmysl jsou na trh dodávány různé modifikované  $\alpha$ -amylasy štěpící škrob na jednoduché cukry, čímž dochází k lepšímu kvasinkovému kvašení;

proteasy snižující množství proteinů (papain a bromelain štěpí gluten) v mouce pro výrobu sušenek, dále xylanasy, glukanasy a další.

V mlékárenském a sýrařském průmyslu se uplatňují především lipasy, laktasy (snížení obsahu laktosy), proteasy jako chymotrypsin, trypsin, rennin ze žaludku telat. Lze také například zakoupit mikrobiální lipasu pro kosher zpracování sýra od firmy Enzyme Development Corporation (USA)<sup>6</sup>.

Při výrobě džusů se využívají pektinasy a celulasy pro vyčištění džusů. V pivovarnictví mají užitek hlavně amylasy, glukanasy, proteasy štěpící polysacharidy a proteiny ve sladu, či průmyslově vyráběné enzymy přirozeně se vyskytující v ječmeni.

Pro zpracování masa lze zakoupit tzv. enzymové tenderizery („změkčovače“) jako např. papain, bromelain, ficin.

Důležité jsou také enzymové preparáty prodlužující trvanlivost potravin (glukosaoxidasa/katalasa zabírající oxidaci potravin a nápojů vzdušným kyslíkem) a zabírající množení bakterií (lysozym), také např. kyselá ureasa, která brání vzniku ethylkarbamátu z močoviny a ethanolu ve víně. Tyto preparáty uvedly na trh firmy Amano Enzyme Inc. (Japonsko)<sup>7</sup>, Chr. Hansen Inc. (Dánsko)<sup>8</sup> a Enzyme Development Corporation (USA)<sup>6</sup>.

Pro potravinářský průmysl dodávají na trh enzymy firmy: Maps Enzyme Ltd. (Indie)<sup>9</sup>, Novozymes (Dánsko)<sup>10</sup>, Nutricepts Inc. (USA)<sup>11</sup>, Specialty Enzymes and Biotechnologies Co. (součástí SEB Group, USA)<sup>12</sup>, Advanced Enzymes Technologies Ltd. (součástí SEB Group, Indie)<sup>13</sup>, AB Enzymes (Německo)<sup>14</sup>, Biocatalysts Ltd. (UK)<sup>15</sup>, Amano Enzymes Inc. (Japonsko)<sup>7</sup>, Chr. Hansen Inc. (Dánsko)<sup>8</sup>, Deerland Enzymes Inc. (USA)<sup>16</sup>, Bio-Cat Inc. (USA)<sup>17</sup>, DSM Food Specialties (Nizozemí)<sup>18</sup>, Enzyme Development Co. (USA)<sup>6</sup>, Genencor (USA)<sup>19</sup>, logen Co. (Kanada)<sup>20</sup>, National Enzyme Company (USA)<sup>21</sup>, Verenium Co. (USA)<sup>22</sup>.

### **Škrobárenský průmysl**

Pro škrobárenský průmysl dodávají firmy na trh amylasy, amyloglykosidasy, glukoamylasy a glukosaisomerasy. Tyto enzymy se používají pro výrobu glukosy ze škrobu, pro isomeraci glukosy na fruktosu a pro produkci sirupů. Firmy působící v této oblasti jsou: Maps Enzyme Ltd. (Indie)<sup>9</sup>, Novozymes (Dánsko)<sup>10</sup>, Specialty Enzymes and Biotechnologies Co. (USA)<sup>12</sup>, Zhaodong Sun Shine Enzyme Co. (Čína)<sup>23</sup>, Amano Enzymes Inc. (Japonsko)<sup>7</sup>, Bio-Cat Inc. (USA)<sup>17</sup>, Enzyme Development Co. (USA)<sup>6</sup>, Genencor (USA)<sup>19</sup>.

### **Průmysl vyrábějící biologické detergenty**

Biologickými detergenty jsou hlavně proteasy, amylasy, lipasy a celulasy. Tyto enzymy pomáhají odstranit proteinové skvrny z oblečení, rezistentní škrobové zbytky z nádobí, mastné a olejové skvrny a přidávají se do aviváží. Firmy produkující enzymy pro toto průmyslové odvětví jsou: Maps Enzyme Ltd. (Indie)<sup>9</sup>, Novozymes (Dánsko)<sup>10</sup>, Specialty Enzymes and

Biotechnologies Co. (USA)<sup>12</sup>, Bio-Cat Inc. (USA)<sup>17</sup>, Genencor (USA)<sup>19</sup>.

### **Textilní a kožedělný průmysl**

V textilním průmyslu se uplatňují amylasy, celulasy, pektinasy, katalasy, mannanasy, proteasy. Enzymy jsou potřeba pro úpravy tkanin požadovaných vlastností (leštění, dokončení denimu, bělení, drhnutí, odvlhčení atd.) za tzv. mokřích podmínek.

Pro kožedělný průmysl dodávají na trh firmy směsi proteas a lipas používané při moření, namáčení, odvlhčení a odmašťování kůží.

Mezi firmy produkující enzymy pro textilní a kožedělný průmysl patří: National Enterprises (Indie)<sup>24</sup>, Maps Enzyme Ltd. (Indie)<sup>9</sup>, Novozymes (Dánsko)<sup>10</sup>, Specialty Enzymes and Biotechnologies Co. (USA)<sup>12</sup>, Amano Enzymes Inc. (Japonsko)<sup>7</sup>, AB Enzymes (Německo)<sup>14</sup>, logen Co. (Kanada)<sup>20</sup>, Advanced Enzymes Technologies Ltd. (Indie – součástí SEB Group)<sup>13</sup>.

### **Papírenský průmysl**

V potravinářském průmyslu mají využití amylasy, xylanasy, celulasy, lipasy a ligninasy. Amylasy štěpí škrob, čímž dochází ke snižování viskozity, což napomáhá dimenzování a natírání papíru. Xylanasy se užívají k bělení papíru. Celulasy uhlazují vlákna, což usnadňuje odvodňování papíru a podporuje odstranění inkoustu. Lipasy redukuje množství smoly. Ligninasy změkčují papír odstraněním ligninu.

Firmy produkující enzymy pro papírenský průmysl jsou: Genencor (USA)<sup>19</sup>, logen Co. (Kanada)<sup>20</sup>, Specialty Enzymes and Biotechnologies Co. (USA)<sup>12</sup>, Advanced Enzymes Technologies Ltd. (Indie – součástí SEB Group)<sup>13</sup>, Zhaodong Sun Shine Enzyme Co. (Čína)<sup>23</sup>, Verenium Co. (USA)<sup>22</sup>, Deerland Enzymes Inc. (USA)<sup>16</sup>, AB Enzymes (Německo)<sup>14</sup>.

### **Další průmyslové aplikace**

Významnou složkou průmyslu je dnes výroba biopaliv, mezi něž patří i palivový ethanol. Při výrobě průmyslového a palivového ethanolu se využívají celulasy, amylasy, glukoamylasy, proteasy a pullulanasy. Firmy vyrábějící tyto enzymy jsou: Genencor (USA)<sup>19</sup>, logen Co. (Kanada)<sup>20</sup>, Specialty Enzymes and Biotechnologies Co. (USA)<sup>12</sup>, Enzyme Development Co. (USA)<sup>6</sup>, Novozymes (Dánsko)<sup>10</sup>.

Enzymy našly své uplatnění i při výrobě, úpravě či obohacení krmiv pro domácí zvířata. Pomáhají zvířatům lépe trávit a zvyšovat biologickou využitelnost potravy (fytasy, xylanasy, glukanasy, proteasy, amylasy). Na trh tyto enzymy dodávají: Verenium Co. (USA)<sup>22</sup>, Deerland Enzymes Inc. (USA)<sup>16</sup>, AB Enzymes (Německo)<sup>14</sup>, Advanced Enzymes Technologies Ltd. (Indie – součástí SEB Group)<sup>13</sup>, Genencor (USA)<sup>19</sup>, logen Co. (Kanada)<sup>20</sup>, Novozymes (Dánsko)<sup>10</sup>, Bio-Cat Inc. (USA)<sup>17</sup>, Maps Enzyme Ltd. (Indie)<sup>9</sup>, Enzyme Development Co. (USA)<sup>6</sup>.

Dalším využitím enzymů je zpracování odpadní vody: Genencor (USA)<sup>19</sup>, Bio-Cat Inc. (USA)<sup>17</sup>, Deerland

Enzymes Inc. (USA)<sup>16</sup>, Specialty Enzymes and Biotechnologies Co. (USA)<sup>12</sup>.

## Závěr

Využití enzymů v průmyslu je obrovské a neustálý výzkum, ať již komerční či nezávislý, přináší naději

na stále nové aplikace enzymů. Firmy rozšiřují své pobočky do celého světa a stále více fúzí. Vypadá to, že tato disciplína podnikání jistě není prodělečná.

## Literatura:

1. <http://www.blf.cz/csr/cz/vyzkum.pdf>, staženo 3. 11. 2010
2. <http://www.gate2biotech.cz/biotechnologie-enzymu/>, staženo 3. 11. 2010
3. Renugopalakrishnan V, Garduno-Juarez R, et al.: *J Nanosci Nanotechnol.* 5, 1759 (2005).
4. Hult K., Berglund P.: *Curr Opin Biotechnol* 14, 395 (2003)
5. Jiang L., Althoff E.A., Clemente F.R.: *Science* 319, 1387-1391 (2008)
6. <http://www.enzymedevelopment.com/>, staženo 10. 11. 2010
7. <http://www.amano-enzyme.co.jp/eng/index.html>, staženo 10.11. 2010
8. <http://www.chr-hansen.com/>, staženo 10. 11. 2010
9. <http://www.mapsenzymes.com/>, staženo 28. 10. 2010
10. <http://www.novozymes.com/en/>, staženo 28. 10. 2010
11. <http://www.nutricepts.com/>, staženo 28. 10. 2010
12. <http://www.specialtyenzymes.com/>, staženo 1. 11. 2010
13. <http://www.enzymeindia.com/>, staženo 28. 10. 2010
14. <http://www.abenzymes.com/>, staženo 29. 10. 2010
15. <http://www.biocatalysts.com/>, staženo 1. 11. 2010
16. <http://www.deerland-enzymes.com/>, staženo 28. 10. 2010
17. <http://www.bio-cat.com/>, staženo 10. 11. 2010
18. [http://www.dsm.com/en\\_US/html/dfs/home.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/home.htm), staženo 28. 10. 2010
19. <http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/genencor/genencor>, staženo 28. 10. 2010
20. <http://www.iogen.ca/>, staženo 1. 11. 2010
21. <http://www.nationalenzyme.com/index.html>, staženo 28.10. 2010
22. <http://www.verenium.com/>, staženo 1. 11. 2010
23. <http://www.polyenzyme.com/>, staženo 28. 10. 2010
24. <http://www.nationalenterprises.org/home.html>, staženo 1. 11. 2010

## Souhrn

### Gerstorferová D.: Přehled firem produkujících enzymy pro průmyslové aplikace

Firmy produkující enzymy pro průmysl mají obrovský potenciál do budoucna, stále ještě mnoho průmyslových aplikací čeká na svou „enzymovou cestu“. Enzymová katalýza je procesem ekologickým a ekonomicky zajímavým. Firmy zřizují pobočky po celém světě, aby byly co nejbližší svým klientům.

**Klíčová slova:** biotechnologie, průmyslové enzymy, firmy

## Summary

### Gerstorferová D.: Survey of companies producing enzymes for industrial applications

The companies producing industrial enzymes have enormous potential for the future, many industrial applications are still waiting for his “enzyme pathway”. The enzyme catalysis is an environmentally and economically attractive process. The companies are setting up their offices around the world to be as close as possible to their clients.

**Keywords:** biotechnology, industrial enzymes, companies



## O B S A H

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Úvodem                                                                                        | 25        |
| <b>Biotech 2011 – program workshopů</b>                                                       | <b>26</b> |
| Vonka V.: <b>Problémy genové terapie</b>                                                      | <b>27</b> |
| Petr J.: <b>Geneticky modifikovaná hospodářská zvířata</b>                                    | <b>30</b> |
| Sehnal F.: <b>Genetické modifikace hmyzu</b>                                                  | <b>32</b> |
| Maříková H.: <b>Rekombinantní enzymy používané při zpracování potravin rostlinného původu</b> | <b>38</b> |
| Janda M.: <b>Transgenní stromy</b>                                                            | <b>41</b> |
| Šumová B.: <b>Transgenní květiny</b>                                                          | <b>43</b> |
| Gerstorferová D.: <b>Přehled firem produkcujících enzymy pro průmyslové aplikace</b>          | <b>46</b> |

## C O N T E N T S

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Editorial                                                                                  | 25        |
| <b>Biotech 2011 – program of workshops</b>                                                 | <b>26</b> |
| Vonka V.: <b>Questions joint with gene therapy</b>                                         | <b>27</b> |
| Petr J.: <b>Genetically modified farm animals</b>                                          | <b>30</b> |
| Sehnal F.: <b>Genetically modified insect</b>                                              | <b>32</b> |
| Maříková H.: <b>Recombinant enzymes used in processing of food of plant origine</b>        | <b>38</b> |
| Janda M.: <b>Trangenic trees</b>                                                           | <b>41</b> |
| Šumová B.: <b>Transgenic flowers</b>                                                       | <b>43</b> |
| Gerstorferová D.: <b>Survey of companies producing enzymes for industrial applications</b> | <b>46</b> |

## POKYNY PRO AUTORY

Rukopisy je třeba zaslat v elektronické formě e-mailem na adresu [jan.kas@vscht.cz](mailto:jan.kas@vscht.cz) nebo na [petra.lipovova@vscht.cz](mailto:petra.lipovova@vscht.cz). Rukopis musí být opatřen plným jménem autora, názvem jeho pracoviště a e-mailovou adresou autora.

Článek má tyto části: název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr (příp. poděkování), citace literatury, český souhrn, klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova.

Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu práce, a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Seznam citací musí být uveden v závěru článku. Zkratky časopisů se používají podle Chemical Abstract Service Source Index.

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *J.Biochem.* 148, 502 (1997).

Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.

Lowestein K A: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 1979.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 3. září 1999.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi. Každý obrázek musí být opatřen legendou umístěnou pod obrázkem, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky zasílejte **zvlášť** v některém z běžných formátů např. TIF, JPG, CDR, EPS.

Technické parametry: typ písma Arial velikost 11, řádkování jednoduché.

# **BIOPROSPECT**

Vydavatel:  
**BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST**  
Technická 3  
166 28 Praha 6  
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:

**MK ČR E 19409**

Tiskne:  
Venice s.r.o.  
Za Hanspaulkou 13/875  
160 00 Praha 6

**ISSN 1210-1737**

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností