

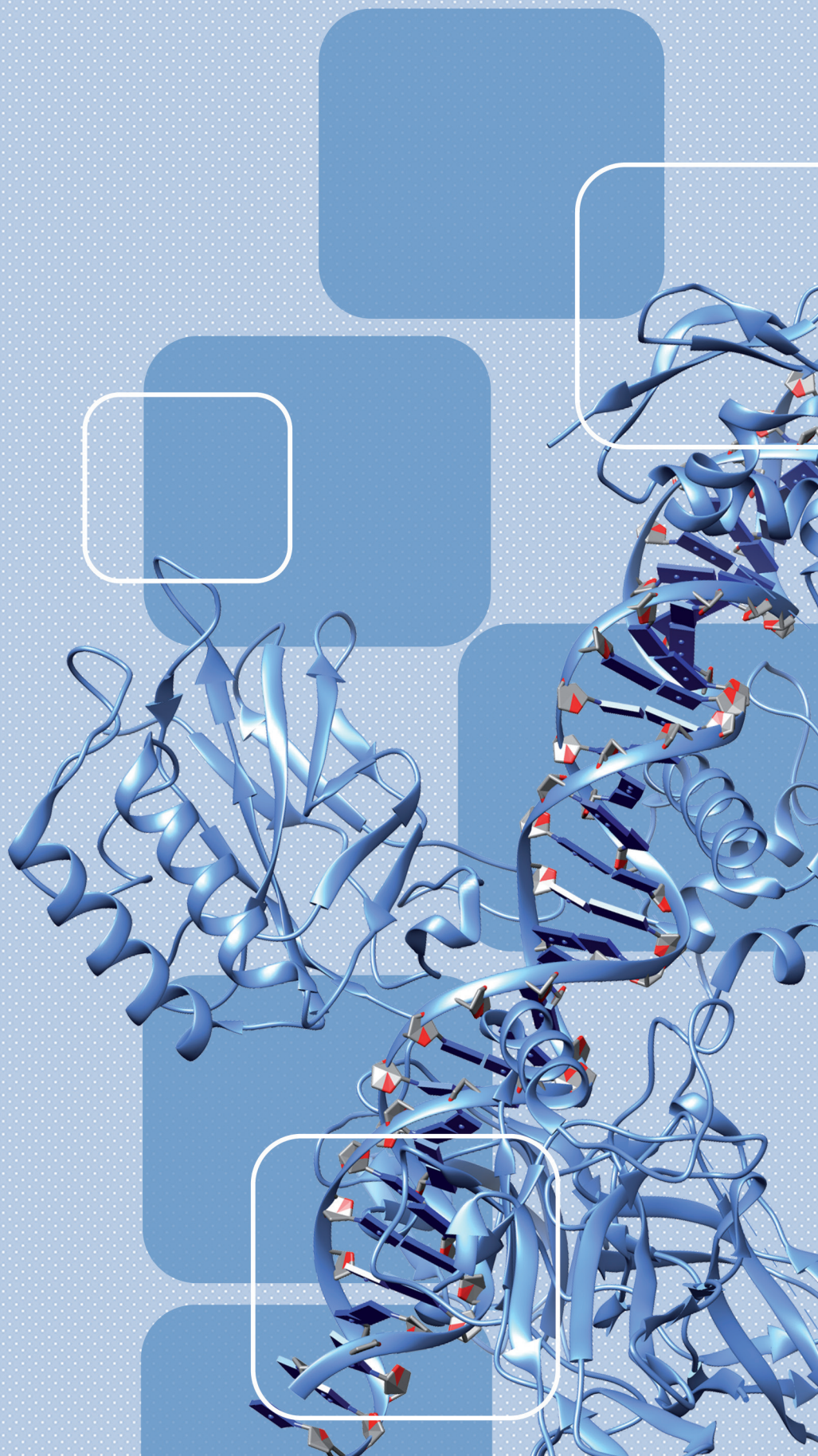
Bio

Ročník 29 • Číslo 3/2019

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)
a
člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and 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

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

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 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. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech 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 cooperation 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 Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

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

ÚVODEM

Vážení přátelé,

věříme, že jste prožili hezké léto a načerpali nové síly na zvládnutí mnoha úkolů, které Vás čekají ve druhé polovině letošního roku. Byli bychom velmi rádi, kdyby Vám mezi mnoha úkoly a osobními problémy, které musíte zvládat, zbylo trochu času i na Biotechnologickou společnost. Čeká nás příprava nových voleb do Rady Biotechnologické společnosti a byli bychom velmi rádi, kdyby do Rady kandidovali noví mladší členové z různých krajů republiky, zastupující nejrozličnější biotechnologická pracoviště. Bohužel v současné době nemáme žádného zástupce ve hlavních orgánech naší střešní organizace Českého svazu vědeckotechnických společností (www.csvts.cz). Do komise pro vzdělávání a inovace byl však zvolen zástupce naší společnosti p. RNDr. Mgr. Tomáš Vaněk, CSc. Doporučujeme Vám číst nebo si občas prohlédnout „Zpravodaj ČSVTS“, který vychází 2 x ročně a je k dispozici na uvedených stránkách ČSVTS nebo přímo na <http://zpravodaj.csvts.cz>. Na těchto webových stránkách se dozvíte informace o nejrozličnějších akcích pořádaných naší střešní organizací či jednotlivými členy svazu, ale také např. že v blízkosti Karlova mostu v hostinských pokojích svazu můžete lacině přespat a v restauraci techniků se dobře najíst za přijatelné ceny. Za velmi přijatelné ceny můžete pod hlavičkou naší společnosti uspořádat různé semináře v Kytlicích lokalizovaných na okraji národního parku České Švýcarsko.

V úvodníku minulého čísla Biopropectu jsme Vás již informovali o tom, že v příštím roce budeme opět pořádat mezinárodní symposium Biotech 2020 ve dnech 17. – 20. 6. 2020 (www.biotech2020.cz). Rádi bychom Vás požádali o Vaši účast nebo alespoň propagaci u nás doma i v zahraničí. Na konání této akce laskavě upozorněte své zahraniční přátele, případné vystavovatele a sponzory. Doufáme, že využijeme této akce též k propagaci výzkumu na VŠCHT, ukázkou významných rekonstrukcí vnějších i vnitřních částí jejich budov, moderních laboratoří, pivovaru, úspěchů absolventů VŠCHT v zahraničí i 20 let spolupráce se švýcarskými biotechnologiemi.

V minulém úvodníku jsme se dotkli velice aktuální problematiky lidského mikrobiomu a velmi diskutované „genetické editace“, která do jisté míry zastínila stále nedořešenou otázku genetických modifikací založenou na vnášení cizích genů do jiných organismů. Oddělení vědeckých prognóz (RTOA) Evropského parlamentu (Autoři: Christian Kurrer a James Tarlton) vypracovalo zprávu „Deset dalších technologií, které by mohly změnit naše životy“ ([http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/IDAN/2017/598626/EPRS_IDA\(2017\)598626_CS.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/IDAN/2017/598626/EPRS_IDA(2017)598626_CS.pdf)). V této zprávě jsou uvedeny dvě kapitoly, které se týkají biotechnologií, a to Organoidy (Kapitola 9) a Úprava genomů (Kapitola 10).

Organoidy jsou malé shluky (lidských) buněk, které se kultivují v laboratorním prostředí s cílem napodobit funkce orgánů, jako jsou játra, srdce, plíce, mozek aj. Mohou být vytvořeny z interních kmenových buněk dospělých orgánů, z embryonálních kmenových buněk či indukovaných pluripotentních buněk. Jsou kultivovány za podmínek umožňujících uspořádání jako *in vivo*. Mají genetické vlastnosti člověka, z jehož těla byly buňky odebrány, a tudíž reagují stejně jako orgán, ze kterého byly buňky odebrány. Mohou být skladovány v biobankách a využity v řadě oblastí jako např. testování léčiv,

průběhu různých onemocnění, vzniku nemocí při zárodečném vývoji a snad i nahradit orgány při transplantacích.

Jako druhá nejperspektivnější biotechnologická oblast se jeví úprava genomů, která naznačuje úžasné perspektivy, ale také velmi závažná rizika. Z tohoto hlediska je důležité zvolit prozíravou právní regulaci, která by příliš nebrzdila výzkum, ale zároveň eliminovala hazardní konání. V současnosti je známo několik technologií úpravy genů TALENs (transcription activator-linker effector nucleases), ZFN (zinc-finger nucleases) a systémy CRISPR-Cas. Jako nejspolehlivější, nejrychlejší, nejlevnější a nejperspektivnější se v současnosti jeví systém CRISPR-Cas9. CRISPR-Cas9 lze použít k poměrně přesné úpravě genů různých organismů a tak vytvořit zvířecí modely pro základní výzkum. Perspektivní je oprava těch částí genomu, které jsou spojeny s určitým onemocněním, např. rakovinou. Naproti tomu jsou velkým rizikem dědičné změny lidského genomu. Provedená změna může mít i jiné důsledky než žádaná změna. Příkladem může být zásah čínského vědce Che Tien-khuej, který se pokusil dodat několika dětem imunitu vůči HIV viru, ale zároveň snížil perspektivu jejich dožití běžného věku.

Většina odborníků pokusy s úpravou DNA u lidí dnes nedoporučuje, protože dosud nesou neznámá rizika. Významní genetici vydali výzvu, aby bylo alespoň pro několik příštích let vyhlášeno moratorium na genetickou editaci DNA u embryí před porodem. V současnosti si nemůžeme být jisti, jaké následky může úprava genu přinést. Příkladem je již zmíněná úprava genomu čínským vědcem. Zdá se být evidentní, že změna genomu kromě změny cílené vlastnosti může ovlivnit i vlastnosti jiné. Někteří vědci však zastávají názor, že v případě odstranění závažného zdravotního problému by bylo možno toto riziko podstoupit. Zastáncem takového názoru je např. ruský vědec Denis Rebrikov. Jednak zkritizoval přístup čínského vědce a navrhl jiný způsob ochrany potomka před virem HIV od matky, nositelky viru (Nature 570, 145 – 146, 29019) a dále navrhl projekt ochrany novorozenců od přenosu dědičné hluchoty, nemoci, která se často vyskytuje v určité oblasti Sibiře. Vzhledem k tomu, že v Rusku není zákon zakazující genetické úpravy plodu, jako v EU, bylo by asi možné získat souhlas k provedení experimentu, než budou i v Rusku podobná pravidla jako v EU schválena.

Techniky transplantace orgánů byly velmi dobře zvládnuty, ale neustálým problémem je nedostatek vhodných orgánů pro transplantace. Jednou z cest je příprava orgánů vhodných pro transplantace. Možná cesta řešení tohoto problému je příprava chimér (např. chiméra člověk-prase). Nedávno byla publikována zpráva, že španělsko-americký team vedený americkým profesorem Juanem Carlosem Izpisua Belmontem připravil v Číně chiméru člověk-opice. Tento team navázal na předchozí zkušenosti s přípravou lidských buněk a tkání ve vepřových a hovězích embryích či krysího pankreatu, srdce a očí v myších. Chiméry člověk – opice otvírají cestu ke studiu mozkových nemocí, např. Alzheimerova a demence. Tak rozsáhlé možnosti otevírá technika CRISPR/Cas9.

Těšíme se, že si rádi přečtete články, které jsme pro Vás vybrali a přejeme Vám pohodu a radost v práci i soukromí.

Srdečně Vás zdraví Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

ČESKÉ ZASTOUPENÍ EVROPSKÉ BIOTECHNOLOGICKÉ FEDERACE MÁ ZA SEBOU RUŠNÉ OBDOBÍ

Martina Šaradinová

martina.saradinova@upol.cz

Nové trendy v oblasti rostlinných biotechnologií, genetiky, genomiky či biochemie rostlin představovali účastníci mezinárodní konference Plant Biotechnology: Green for Good V. Ve dnech 10. až 13. června ji v Olomouci pořádala česká pobočka Evropské biotechnologické federace (EFB), která působí v Centru regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (CRH). Bezprostředně po ukončení vrcholné události letošního roku se členové regionálního zastoupení pustili do přípravy Evropského biotechnologického kongresu 2020 a v červenci ředitel CRH Ivo Frébort utužoval spolupráci s asijskými partnery na Asijském biotechnologickém kongresu na Tchaj-wanu.

Konference Plant Biotechnology: Green for Good se koná vždy jednou za dva roky. Letos se jí zúčastnilo na 150 vědců a studentů z 20 zemí, v programu rozděleném do deseti sekcí zaznělo 36 přednášek, v posterové sekci bylo 86 posterů. Odborníci se věnovali biotechnologiím zemědělských plodin, vztahu mezi rostlinami a mikroorganismy, genetice a genomice rostlin, molekulárnímu farmaceutu a genetickému inženýrství, možnostem zlepšování kvality potravin a krmiv nebo vztahům mezi rostlinami a životním prostředím.

K nejvýznamnějším hostům patřil odborník na sekvenování genomů obilovin Nils Stein z IPK Gatersleben a Univerzity v Göttingenu, který se postaral o úvodní přednášku s názvem „From genome to pan-genome in barley and wheat“. Ačkoliv s vědci z CRH, respektive olomouckého pracoviště Ústavu experimentální botaniky AV ČR dlouhodobě spolupracuje, konferenci i vědecké centrum v holickém areálu navštívil poprvé. Jak uvedl vědecký ředitel CRH Jaroslav Doležel, jím vedené pracoviště se s týmem Nilse Steina podílelo na prestižních projektech včetně sekvenování genomu ječmene či genomu žita. Návštěva může být motivací k ještě intenzivnější spolupráci.

Plenární přednášku na téma „Morphogenetic regulatory networks“ pronесl další z klíčových účastníků kon-

ference – Miltos Tsiantis, jeden z ředitelů Ústavu Maxe Plancka pro výzkum šlechtitelství rostlin v Kolíně nad Rýnem. K předním osobnostem patřil rovněž Kyle Lancaster z prestižní Cornell University v USA, jehož účast na konferenci finančně podpořilo Velvyslanectví USA v České republice. Mladý a velmi perspektivní vědec se věnuje problematice fixace dusíku v půdě, takzvané nitrifikaci. Ve své přednášce zdůraznil nutnost porozumění přírodním procesům. Jen tak budou moci vznikat technologie, které tyto procesy budou mít určitým způsobem pod kontrolou.

Velmi podnětnou přednášku pronесl mimo jiné Sunghwa Choe z Seoul National University v Jižní Koreji, který svůj odborný zájem soustředí zejména na editování genomu metodou CRISPR. Na konferenci zastupoval Asijskou biotechnologickou federaci, jež úzce spolupracuje s EFB.

Propojení nano- a biotechnologií

Vůbec poprvé byla součástí konference sekce Udržitelné technologie pro životní prostředí, kterou řídil zástupce ředitele Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů (RCPTM) Univerzity Palackého v Olomouci Michal Otyepka. Klíčovým řečníkem sekce

byl chemik Rajender S. Varma, který kromě RCPTM pracuje v Agentuře pro ochranu životního prostředí v USA. Zatímco profesor Varma přednášel na téma využití uhlíkatých odpadů v technologiích pro životní prostředí (Carbonaceous waste: sustainable applications in chemical transformations and environmental remediation), jeho kolega Jan Filip hovořil o využití materiálů na bázi sloučenin železa při čištění vod (Iron-based (nano)materials: an advanced tool for water). Ten označil konferenci G4G za velmi zajímavé a hlavně profesně přínosné fórum, které propojilo zdánlivě příliš nesouvisející oblasti rostlinných biotechnologií s udržitelnými environmentálními (nano)technologiemi.

Další novinkou letošního programu byl Grantový a publikační workshop vedený viceprezidentem EFB



Obr. 1: Miltos Tsiantis patřil ke klíčovým přednášejícím.



Obr. 2: Ivo Frébort zahajuje konferenci G4G.

Jeffem Colem. Zástupkyně pobočky vydavatelství odborné literatury Elsevier v Bostonu Lynn Sherrer promluvila o etice vědecké práce při publikační činnosti a zatím jediný držitel ERC grantu na Univerzitě Palackého Michal Otyepka se podělil o zkušenosti s jeho získáním a řešením. Naďa Koníčková z Technologického centra Akademie věd ČR představila možnosti podpory biotechnologického výzkumu z prostředků Horizon 2020.

Konferenci předcházelo otevření sekvenační laboratoře

Podle hlavního organizátora konference Ivo Frébort se kvalita přednášek oproti předchozímu ročníku opět zvýšila, což je velmi potěšitelné. Témata vzbudila velký zájem a podnítila diskuzi. Jako správná se ukázala i snaha otevřít nová témata v rámci nových programových sekcí. Příznivou odezvu měla i prohlídka vědeckého centra. Spokojenost s programem i organizací vyjádřil i viceprezident EFB Jeff Cole, který poděkoval všem účastníkům i těm, kteří konferenci připravovali. Konference se konala pod záštitou Olomouckého kraje a s podporou Univerzity Palackého.

Setkání biotechnologů předcházelo otevření v tuzemsku ojedinělé laboratoře pro sekvenování DNA, kterou CRH vybudovalo. Věvodí jí vysokokapacitní DNA sekvenátor NovaSeq 6000 za 29 milionů korun, který CRH nedávno pořídilo díky projektu Rostliny jako prostředek udržitelného globálního rozvoje z Operačního programu Věda, výzkum a vzdělávání. Kromě toho se v laboratoři nacházejí další tři sekvenátory s různou kapacitou, výkonností i systémy sekvenování.

Výkonný výbor EFB jednal v Barceloně

Konference Green for Good V a činnost českého regionálního zastoupení byly i součástí jednání výkonného výboru EFB, které se uskutečnilo 15. června v Barceloně. Olomoučtí organizátoři sklídili za konferenci pochvalu. Jedním z přínosů odborného fóra je i posun v přípravě nové sekce EFB věnované rostlinným biotechnologiím. Podle Michaely Holecové z CRH se o vzniku této sekce diskutuje delší dobu, na konferenci v Olomouci se však podařilo dát dohromady skupinu vědců, kteří by její činnost řídili. Byl tak učiněn další krok pro to, aby sekce byla oficiálně zřízena a mohla fungovat.

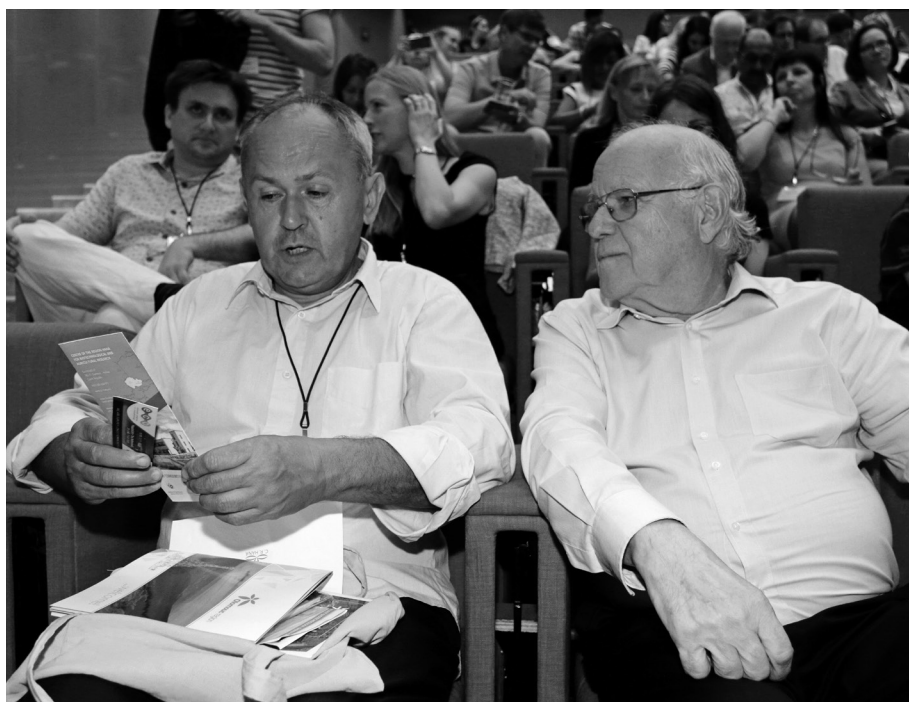
Hlavním bodem programu výkonného výboru EFB, jehož se zúčastnil rovněž profesor Frébort, však byla příprava příštího Evropského biotechnologického kongresu v Maastrichtu. Otevřena je už i výzva pro uspořádání kongresů v letech 2022 a 2024, zájemci o pořádání již mohou podávat nabídky. Členové Výkonného výboru si vyslechli i zprávu prezidenta EFB Mathiase Uhléna, zprávu o hospodaření nebo zhodnocení aktuálních parametrů časopisu New Biotechnology, který vydává nakladatelství Elsevier.

Spolupráce s asijskými kolegy se prohlubuje

Evropská biotechnologická federace již v minulosti deklarovala zájem navázat úzkou spoluprací s Asijskou biotechnologickou federací. V roce 2014 podepsali zástupci obou institucí memorandum o spolupráci, které v dalších letech naplnili konkrétními kroky. Patří

k nim i vzájemná účast na biotechnologických kongresech pořádaných oběma federacemi. Letos na počátku července na Asijském biotechnologickém kongresu na Tchaj-wanu EFB poprvé zastupoval i prezident Mathias Uhlén a tři viceprezidenti.

Velmi aktivní je v této oblasti i profesor Frébort, který se Asijského biotechnologického kongresu jako zástupce EFB zúčastnil potřeť. Propojení obou světů v oblasti biotechnologií považuje za velmi zásadní. Asijská věda totiž velmi pokročila a v tomto regionu působí celá řada mladých začínajících vědců, jejichž kvalita výrazně stoupá. Je potřeba na tuto situaci zareagovat, sdílet informace a společně hledat nová řešení globálních problémů. V mnohém se v Asii můžeme inspirovat, například systém přenosu výsledků vědy do praxe mají výrazně pružnější.



Obr. 3: Konference G4G se zúčastnilo na 150 vědců a studentů.

Jedním z konkrétních výsledků jeho účasti na kongresu je dohodnutá návštěva prezidenta Asijské biotechnologické federace v České republice – Praze a Olomouci. Profesor Wen-Chien Lee zavítá do CRH i na Univerzitu Palackého letos v září.

EFB se připojilo k výzvě o změnu evropské legislativy. Evropská biotechnologická federace podpořila i nedávnou iniciativu předních světových biologů a dalších vědeckých pracovníků, kteří vyzvali Evropský parlament i Evropskou komisi ke změně legislativy týkající se moderních metod editování genomu včetně CRISPR. Prohlášení bylo zveřejněno přesně rok poté, co Evropský soudní dvůr (ESD) rozhodl, že rostliny upravené metodami přesného šlechtění jsou geneticky modifikované organismy a podléhají přísným evropským regulacím. EFB na prohlášení reagovala mimo jiné vydáním Position Paper zveřejněném v Newsletteru EFB. Na jeho přípravě se podílel rovněž ředitel CRH Ivo Frébort, jenž na negativní důsledky stávající evropské legislativy upozorňoval i v minulosti. Již vloni v prosinci se společně s vědeckým ředitelem CRH Jaroslavem

Doležalem obrátil na českého premiéra a ministry životního prostředí a zemědělství s výzvou, aby se o změnu evropské legislativy zasadili.

Právní předpisy EU o GMO neodrážejí současný stav vědeckých poznatků. Organismy získané cíleným editováním genomu neobsahují cizí geny, proto by měly podléhat stejným legislativním pravidlům jako rostliny získané tradičními metodami šlechtění. Bez aplikace nových technik šlechtění nebude možné získat odrůdy zemědělských plodin přizpůsobených podmínkám měnícího se klimatu, odolných vůči chorobám a škůdcům, s vyšším výnosem a zlepšenou kvalitou. Bez takových odrůd pak nelze v budoucnu zajistit dostatek potravin pro rostoucí světovou populaci, aniž by bylo životní prostředí extrémně poškozováno pesticidy a vysokými dávkami umělých hnojiv s následným ohrožením zdraví obyvatel planety. Zastaralé právní předpisy mohou nenávratně poškodit evropské zemědělství i životní prostředí a způsobit odliv inovací mimo EU.

Členství v Platformě pro bioekonomiku ČR

Univerzita Palackého se prostřednictvím CRH stala členem Platformy pro bioekonomiku ČR, která sdružuje především instituce z oblasti vzdělávání, výzkumu a jeho aplikací. Za cíl si platforma stanovila soustavně prohlubovat znalosti v jednotlivých oblastech bioekonomiky a podporovat jejich využití v praxi na úrovni podniků i veřejné správy při dodržování principů udržitelného rozvoje. CRH by svým členstvím rádo zprostředkovalo intenzivnější spolupráci platformy a EFB, kde se problematice bioekonomiky cíle-

ně věnuje Task Force on Bioeconomy. Tím by byl posílen kontakt aktivit platformy s děním v evropském výzkumném prostoru.



PARAZITÁRNÍ CYSTEINOVÉ PROTEASY A JEJICH FUNKCE V LIDSKÝCH PATOLOGIÍCH

Jakub Benýšek

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR; benysek@uochb.cas.cz

Úvod

Parazitární onemocnění mají na svědomí každoročně miliony lidských životů po celém světě a představují obrovskou sociální a ekonomickou zátěž. Vzhledem k jejich dopadu a rozšíření jsou parazité jedním z nejzávažnějších problémů dnešní doby, a to jak v humánní, tak veterinární medicíně. Hlavní parazitární choroby, jakými jsou malárie, schistosomóza, leishmanióza a trypanozomózy, postihují především chudé obyvatelstvo v oblastech rozvojových států. Jsou vážným problémem v tropických a subtropických oblastech, ale můžeme se s nimi setkat i v mírném podnebném pásmu. Počet onemocnění způsobených parazity stoupá a zároveň dochází k rozšíření oblastí s výskytem těchto onemocnění a hrozí nebezpečí pandemie.

Na žádné lidské parazitární onemocnění neexistuje účinná vakcína a používané antiparazitární léky se stále častěji stávají neúčinnými v důsledku rezistence. Většina těchto chorob se řadí mezi tzv. opomíjená tropická onemocnění, protože pro velké farmaceutické společnosti nepředstavovaly ekonomicky atraktivní oblast zájmu. Až v tomto desetiletí bylo zahájeno společné úsilí farmaceutického sektoru, soukromých sponzorů, akademických institucí a Světové zdravotnické organizace v boji proti těmto onemocněním, zahrnující také vývoj a distribuci nových léčiv.

Pro účinný terapeutický zásah proti parazitům je klíčovým krokem vyhledání vhodných molekulárních cílů. Za vysoce zajímavé jsou považovány proteolytické enzymy (proteasy, peptidasy) parazitů. Úloha proteas zahrnuje, kromě zachování základní homeostáze parazita, důležité působení na rozhraní hostitel-parazit. Patří sem invaze do těla hostitele a následná migrace v jeho tkáních, štěpení krevních proteinů jako zdroje živin a potlačení imunitní reakce či modulace fyziologie hostitele¹. Tento referát shrnuje dosavadní poznatky o cysteinových proteasach medicíně významných parazitických prvoků a červů a o biologické roli těchto enzymů.

Cysteinové proteasy parazitů: patobiochemie a terapeutický potenciál

Třída cysteinových proteas se nazývá podle katalytického zbytku cysteinu v aktivním místě enzymu. Thiolo-vá skupina cysteinu působí jako nukleofil v počátečních krocích štěpení peptidové vazby. V genomech parazitů byly doposud identifikovány a funkčně charakterizovány především cysteinové proteasy katepsinového typu, kalpainy, GPI ukotvené transamidasy a metakaspasy. **Cysteinové katepsiny** (dle databáze MEROPS klan CA, rodina C1) jsou nezbytnou součástí proteolytické výbavy parazitů, zejména byly charakterizovány katepsiny typu B, L, F a C. **Kalpainy** (klan CA, rodina C2), kódované v genomech parazitů, ale na rozdíl od vyšších

organismů nemusí vždy obsahovat doménu vázající vápenatý iont, a tudíž jejich aktivace nemusí být řízena koncentrací vápníku^{2, 3}. **GPI ukotvené transamidasy** (klan CD, rodina C13) se vyskytují na plazmatické membráně eukaryotických buněk, kde jsou ukotveny prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy na C-konci proteinu. Od lidských se liší v substrátové specifitě (rozeznává širší úsek ω sekvenční pro připojení GPI kotvy k proteinu), určitých krocích biosyntézy a dále v modifikaci některých cukerných zbytků v glykolipidovém motivu.⁴ **Metakaspasy** (klan CD, rodina C14) byly identifikovány u prvoků, kde plní pravděpodobně podobnou funkci jako kaspasy u savců.

Nejvíce informací je v současné době o proteasach katepsinového typu a jejich regulaci pomocí specifických inhibitorů. Tyto proteasy jsou atraktivním molekulárním cílem pro supresi parazitů a navrhování nové generace antiparazitárních léčiv⁴.

Malárie

Malárie je horečnaté tropické onemocnění přenášené samičkami komárů (např. rodu *Anopheles*). Původcem tohoto onemocnění jsou zimničky, prvoci rodu *Plasmodium*. Nejčastějším je *Plasmodium falciparum* a dále *P. vivax*, *P. malariae* a *P. ovale*. Každoročně na tuto chorobu zemře více než milion lidí, převážně dětí do věku pěti let. Léčba spočívá v podání antimalarik (např. chininu a chlorochinu), nicméně dochází k nárůstu rezistence vůči těmto léčivům, a tak se hledají nové způsoby medikace⁵. Proteolytické enzymy se jeví jako slibný molekulární cíl pro terapii malárie. U *P. falciparum* byly identifikovány tři cysteinové peptidasy z rodiny C1 označované jako falcipainy. Za nejdůležitější jsou považované falcipainy 2 a 3, které jsou zodpovědné za degradaci hemoglobinu v potravní vakuole merozoitů (stadium prvoka napadající erytrocyty)⁶. Představují slibný cíl pro vývoj inhibičních léčiv, protože regulaci jejich aktivity je zastaveno trávení hemoglobinu, který slouží jako hlavní zdroj aminokyselin ve výživě parazita. Falcipainy fragmentují hemoglobin na oligopeptidy, které jsou následně degradovány od N-konce po dvou aminokyselinových zbytcích působením exopeptidas. Ty jsou označovány jako dipeptidyl aminopeptidasy (DPAPs), z nichž DPAP I a III se účastní trávení hemoglobinu, zatímco DPAP II má zřejmě i úlohu při migraci z červených krvinek hostitele^{6,7}. Dále bylo v genomu *plasmodia* popsáno devět genů, kódujících tzv. antigenní s opakuji-cím se serinovým motivem („serine-repeat antigens“, SERA), které obsahují proteasovou doménu z rodiny C1. SERA6 je důležitá pro narušení buněčné membrány červených krvinek, čímž přispívá k uvolnění parazita do krevního řečiště a opětovné infekci⁸. Genom *P. falciparum* obsahuje gen kódující proteasu kalpain

(Pf-kalpain), která je aktivována vápenatými ionty. Tyto ionty se akumulují v cytosolu parazita u dospělých jedinců a zvýšená aktivita kalpainů přispívá k porušením buněčné stěny červených krvinek hostitele^{3,9}.

Toxoplazmóza

Toxoplazmóza je parazitární onemocnění člověka a teplokrevných živočichů. Jeho původcem je prvek *Toxoplasma gondii*. U zdravých jedinců probíhá infekce téměř bez příznaků, představuje ovšem závažný problém pro gravidní matky a pro jedince se sníženou imunitou. *Toxoplasma* napadá všechny buňky hostitele, nicméně převažuje výrazná afinita k nervovým buňkám. Zdrojem infekce jsou oocysty v trusu koček domácích nebo oocysty v tkáni infikovaných zvířat, která je konzumována. Po nákaze pronikají vývojová infekční stadia sporozoitů a bradyzoitů do střevní sliznice. Zde se přemění na tachyzoity, pomnoží se a dostávají se dále do ostatních částí těla, kde mohou způsobit zánět. Při latentní formě onemocnění vytváří parazit cysty, které zůstávají především v nervové tkáni po celý život hostitele. U imunodeficientních jedinců se vyskytují komplikace v podobě zánětu mozku a míchy. Pro gravidní matky tato infekce představuje zvýšené riziko potratu a vývojových vad plodu^{3,10}.

Genom toxoplasmu kóduje jednu proteasu typu katepsinu B (TgCPB), jednu katepsinu typu L (TgCPL) a tři typy katepsinu C (TgCPC 1 – 3). Jsou lokalizovány v potravní vakuole parazita, kde tráví cytosolické proteiny hostitele. TgCPL s TgCPB jsou spojovány s invazí do buněk hostitele a TgCPL je rovněž důležitý pro životaschopnost cyst. TgCPC jsou exopeptidasy odlišných stádií parazita, které štěpí peptidy vzniklé činností TgCPL a TgCPB dále na dipeptidy^{3,11}. Všechny uvedené proteasy představují slibné cílové molekuly pro terapii toxoplazmózy, jak ukazují studie na myším modelu. Vypnutím genů je parazitovi znemožněn vstup do buněk hostitele či jeho vnitrobuněčný růst a vývoj. Problematiké je zatím použití inhibitorů těchto proteas jako léčiv, protože u nich není vyřešen průnik přes hematoencefalickou bariéru¹².

Chagasova choroba a spavá nemoc

Chagasova choroba je tropické onemocnění vyskytující se převážně ve Střední a Jižní Americe. Původcem je prvek *Trypanosoma cruzi*, jehož přenašečem jsou krevsající ploštice z podčeledi Triatominae; k přenosu nicméně může dojít i při transfuzi krve. Nemoc postihuje zejména srdce, mozek a střeva. V akutní fázi dochází k otoku mízních uzlin, horečce a zbytnění srdeční tkáně. Buňky ve střevní tkáni odumírají a dochází k poruše peristaltiky, napadené gangliové buňky odumírají a objevují se příznaky demence. Neléčené onemocnění má pak často fatální následky^{3,13}. Léčba se provádí antiparazitickým léčivem benznidazolem, jehož mechanismus účinku spočívá v tvorbě radikálů, které poškozují DNA parazita. Pro člověka může mít vedlejší účinky ve formě alergické vyrážky a fotosenzitivity kůže¹⁴. Slibným terapeutickým cílem se jeví proteasa typu katepsinu L cruzipain (cruzain). Vyskytuje se u všech vývojových stádií *T. cruzi*, ale s různou lokalizací např. v lysosomech

nebo na povrchu buňky³. Inhibice cruzipainu zamezuje invazi buněk hostitele a zabraňuje metamorfóze mezi vývojovými stádii. Mezi nejslibnější inhibitory patří vinylsulfonové sloučeniny jako je např. K11777. Jeho podávání po dobu 20 dní odvrátilo smrtelný průběh infekce u myši a za pouhých 7 dní byl zastaven rozvoj kardiomyopatie u psů^{15,16}. Inhibitor K11777 je v současné době ve stavu předklinických studií. U zvířecích modelů, konkrétně u opic byla pozorována (po 28 dnech podávání ve vyšších dávkách 500 mg/kg) nevolnost. To bylo ovšem vyřešeno neutralizací roztoku inhibitoru, kdy v původních testech vykazoval hodnotu pH 3 – 4 z důvodu jeho přípravky ve formě hydrochloridu².

Spavá nemoc je způsobena dvěma poddruhy prvoka *Trypanosoma brucei* (*T. brucei gambiense* a *T. brucei rhodesiense*), který je přenášen krevsajícím mouchou tse-tse. Vyskytuje se v subsaharské oblasti Afriky a až 80 % nakažených pochází z Demokratické republiky Kongo. Mezi prvotní symptomy patří horečka a bolesti kloubů, následně pak zmatenost, strnulost a potíže se spánkem. Nejlépe charakterizovány jsou proteasy typu katepsinu L (TbCatL neboli brucipain a rhodesain) a typu katepsinu B (TbCatB)³. Obě jsou zodpovědné za virulenci a jsou prvokem využívány při přechodu hematoencefalickou bariérou. TbCatL rovněž chrání prvoka před opsonizací štěpením protilátek hostitele. Podobně jako v případě *T. cruzi* byla i u *T. brucei* úspěšně testována antiparazitární aktivita inhibitorů katepsinových proteas; účinné bylo např. kombinované působení inhibitoru K11777 s léčivem eflonithinem¹⁷.

Leishmanióza

Leishmanióza je název pro onemocnění způsobené prvoky rodu ničivka (*Leishmania*). Vektorem je komár z rodu *Phlebotomus*. Onemocnění se vyskytuje v oblastech tropického a subtropického pásu, ale jsou hlášeny i případy z jihovýchodní Evropy. Projevy se dají rozdělit do tří typů: kožní, mukokutánní a viscerální. Kožní forma je charakterizována vyrážkou, obdobně je tomu i u mukokutánní formy, kde se vyskytují až hluboké rány a destrukce tkáně. Poslední formou jsou napadeny jaterní a slezinové buňky. Léčba je obtížná, zdlouhavá a někdy i neúčinná, s řadou vedlejších účinků. Podávají se léčiva na bázi derivátů antimonu (Pentostam, Glucantime)¹⁸. Proteasy leishmanií byly prokázány jako faktory virulence a nejvíce informací je o cysteinových proteasach rodiny C1. Patří sem dvě skupiny katepsinů typu L a dále katepsiny typu B. Byla popsána jejich úloha při interakci parazita s hostitelem, zejména při modulaci jeho Th1 imunitní odpovědi hostitele na úrovni regulace cytokinů³.

Améboza

Améboza je onemocnění vyvolané prvokem měňavkou úplavičnou (*Entamoeba histolytica*), který je jedním z nejrozšířenějších parazitů u člověka. Nejvyšší výskyt je v rozvojových zemích. Napadením střevní sliznice způsobuje střevní amébozu, která se projevuje těžkými průjmy. U extraintestinální formy je napadena jaterní tkáň. Nejvíce exprimovány jsou cysteinové pro-

teasy rodiny C1 s označením EhCP1, EhCP2, EhCP5 a EhCP7. Jsou zodpovědné za přechod parazita přes hematoencefalitickou bariéru a degradaci proteinů extracelulárního matrix. Sekretované formy těchto proteas jsou schopny štěpit mukózu střevní výstelky, degradovat protilátky a překonat slizniční obranu hostitele. Dále modulují buněčnou imunitu a procesy zánětu³. Vinylsulfonové inhibitory katepsinových proteas jako K11777 byly testovány jako potenciální terapeutická činidla proti améboze¹⁹.

Trichomoniáza

Trichomoniáza je sexuálně přenosné onemocnění, jehož původcem je prvok bičenka poševní (*Trichomonas vaginalis*). Ta žije v pochvě či močové trubici a způsobuje zánět. U mužů bývá často onemocnění bez příznaků. Pro kolonizaci cílové tkáně jsou bičenky vybaveny sadou cysteinových proteas. Byla identifikována sada asi desítek proteas, které patří jednak do rodiny C1 a jsou příbuzné katepsinu L a jednak do rodiny C13, příbuzné legumainům. Řada z nich byla prokázána jako důležité faktory virulence²⁰. Jsou schopné štěpit systém komplementu a tak modulovat imunitní reakci hostitele či štěpit proteiny extracelulárního matrix jako kolagen typu IV či fibronektin. Jsou sekretovány a přispívají ke zvýšené cytoadherenci parazita k buňkám sliznice²¹. Krom výše popsané formy onemocnění je i forma plicní a dentální, způsobená bičenkou *T. tenax*. U tohoto druhu byly identifikovány proteasy katepsinu typu B s kolagenolytickou aktivitou, namířené proti kolagenu typu I²².

Giardióza

Giardióza je onemocnění zažívacího traktu, způsobeném prvokem lamblie střevní (*Giardia intestinalis*). Nejvíce je rozšířené v Africe, Asii a latinské části Ameriky. Projevuje se průjmy a bolestmi břicha, nechutenstvím a poruchou příjmu potravy. K nákaze dojde pozřením kontaminované vody či potravy, obsahující parazita ve formě odolných cyst. Katepsiny typu B (GICP1 až 3) se účastní procesu excystace²³ a z experimentálních údajů na zvířecích modelech plyne, že po podání inhibitorů cysteinových proteas dochází k potlačení infekce²⁴.

Schistosomóza

Schistosomóza je označovaná též jako bilharióza, podle německého lékaře Theodora Bilharze, jenž v roce 1851 jako první identifikoval původce, kterými jsou parazitické motolice rodu *Schistosoma* (druhy krevnička střevní *S. mansoni*, krevnička jaterní *S. japonicum* a krevnička močová *S. hematobium*). Schistosomózou je nakaženo přes 240 mil lidí převážně v tropických a subtropických oblastech. K infekci dochází kontaminovanou vodou při kontaktu s pokožkou, přes kterou pronikají cercarie (larvy) parazita. Patogenním agens nejsou samotné motolice, nýbrž jejich vajíčka. Ta při své migraci tkáněmi hostitele vyvolávají imunitní reakci a způsobují četné zánětlivé procesy. Léčba se provádí praziquantelem, který pravděpodobně otevírá vápníkové kanály buněčných membrán, což vede u parazita ke svalové kontrakci a poškození povrchu těla (tzv.

tegumentu). Vůči tomuto léčivu je hlášena narůstající rezistence.

Cysteinové proteasy hrají zásadní roli při trávení krevních proteinů (zejména hemoglobinu) hostitele jako hlavního zdroje živin a také při průniku do těla hostitele a migraci jeho tkáněmi. Trávicí systém schistosom je tvořen především katepsiny B, L, C a dále legumainem. Z nich nejvyšší proteolytickou aktivitu vykazuje katepsin B, který účinně štěpí krevní proteiny hostitele jako endopeptidasa i exopeptidasa. Legumain (asparagyl-endopeptidasa) se účastní štěpení hemoglobinu, ale funguje také jako aktivační proteasa zejména pro katepsin B. Mezi nejslibnější inhibitory katepsinu B patří vinylsulfonový inhibitor K11777 a jeho odvozené deriváty.^{25, 26}

Fasciolóza

Původcem fasciolózy jsou motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) a motolice obrovská (*Fasciola gigantica*) parazitující v játrech, přesněji ve žlučovodech. *F. hepatica* se vyskytuje po celém světě, zatímco *F. gigantica* pouze v tropickém pásmu Afriky a Asie. Dospělá motolice dosahuje velikosti kolem 3 cm a kromě člověka parazituje na ovcích a skotu, kde způsobuje velké hospodářské škody. K nákaze dochází pozřením metacerkarií (larev motolic), které se nacházejí na neomytých listové zelenině, u zvířat pak na vegetaci. Při migraci motolic do jater dochází k mechanickému poškození tkání s nástupem horečky, nevolnosti, bolesti břicha a nahromadění tekutin v dutině břišní. K léčbě se používají antiparazitika ze skupiny benzimidazolů, ke kterým však vzniká rezistence a je proto nutné hledat jiné typy chemoterapie²⁷. Nejslibnějšími cílovými molekulami pro novou generaci léčiv nebo vakcín jsou katepsiny typu L (FhCL) a typu B (FhCB), které jsou sekretovány parazitem a hrají klíčovou úlohu v procesu infekce a při a výživě. V časných stádiích vývoje, kdy parazit proniká tkáněmi hostitele a degraduje extracelulárního matrix, se uplatňují především FhCB a FhCL3. U dospělců jsou produkovány zejména FhCL1 a FhCL2 a jsou též hlavními antigeny při fasciolóze, proti kterým se tvoří vysoký titr protilátek²⁸⁻³⁰.

Nematodózy

Nematodózy jsou onemocnění způsobená cizopasnými hlísticemi. Tato kapitola se zaměřuje na parazity řádu měchovců (*Strongylida*), u kterých byly identifikovány cysteinové proteasy jako možné terapeutické cílové molekuly pro léčbu. Jedná se konkrétně o druhy *Ancylostoma ceylanicum*, *A. duodenale*, *A. caninum*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Necator americanus* a *Haemonchus contortus*. Odhaduje se, že nakaženo je až 7 % populace a to zejména v oblastech subsaharské Afriky, jižní Ameriky a jihovýchodní Asie. Životní cyklus zahrnuje několik larválních stádií. Dospělci se živí hemoglobinem a samička je schopná naklást až tisíce vajíček denně. Hemoglobin je degradován za pomoci série cysteinových a aspartátových proteas. Postižení trpí podvýživou, anemií v důsledku nedostatku železa a pro gravidní matky představuje nákaza riziko zhoršeného vývinu plodu či předčasného potratu.

Léčba spočívá v podání benzimidazolu, na který ovšem vzrůstá rezistence. V genomu *A. caninum* byly nalezeny dvě proteasy typu katepsinu B (AcCP1 a AcCP2)^{31,32}. Genom *N. americanus* je svým uspořádáním podobný genomu hlístice *Haemonchus* a je tvořen klastrem po čtyřech genech kódujících katepsinu B (Na-CP-2 až 5)³³. Genom *A. cantonensis* kóduje dvě proteasy typu katepsinu B (Ac-CathB1 a Ac-CathB1) a dále proteasu AC-hem, která je homologická s legumainem z *H. con-*

tortus. Uvedené katepsiny byly regulovány podáváním vinylsulfonového inhibitoru K11777 a nitrilového inhibitoru Odanacatibu s pozitivním účinkem na úspěšnost léčby u zvířecích modelů^{34, 35}.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu InterBioMed LO1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura:

1. Lecaille F, Kaleta J, et al.: *Chemical Reviews* 102(12), 4459 (2002).
2. Mckerrow JH: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(8), e0005850 (2018).
3. Siqueira-Neto JL, Debnath A, et al.: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(8), e0006512 (2018).
4. Mottram JC, Helms MJ, et al.: *Trends in Parasitology* 19(4), 182 (2003).
5. Thomas JA, Tan MS, et al.: *Nature Microbiology* 3(4), 447 (2018).
6. Rosenthal PJ (2011). *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms*, pp. 30: Springer.
7. Lehmann C, Tan MSY, et al.: *PLoS Pathogens* 14(5), e1007031 (2018).
8. Ruecker A, Shea M, et al.: *Journal of Biological Chemistry* jbc. M112. 400820 (2012).
9. Gomes MM, Budu A, et al.: *Analytical Biochemistry* 468(22) (2015).
10. Robert-Gangneux F and Darde ML: *Clinical Microbiology Reviews* 25(2), 264 (2012).
11. Zhao G, Zhou A, et al.: *BMC Infectious Diseases* 13(1), 207 (2013).
12. Teo CF, Zhou XW, et al.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(2), 679 (2007).
13. Bonney KM, Luthringer DJ, et al.: *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 14(1), null (2019).
14. Puente V, Demaria A, et al.: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(9), e0006764 (2018).
15. Jones BD, Tochowicz A, et al.: *ACS Medicinal Chemistry Letters* 7(1), 77 (2016).
16. Chen YT, Brinen LS, et al.: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(9), e825 (2010).
17. Steverding D: *Experimental Parasitology* 151 – 152 (28) (2015).
18. Desjeux P: *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 27(5), 305 (2004).
19. Meléndez-López SG, Herdman S, et al.: *Eukaryotic Cell* 6(7), 1130 (2007).
20. Hernández HM, Marcet R, et al.: *Parasite* 21((2014).
21. Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE, et al.: *BioMed Research International* 2015(946787) (2015).
22. Yamamoto A, Asaga E, et al.: *Oral Microbiology and Immunology* 15(6), 360 (2000).
23. Park H, Kim S-I, et al.: *Experimental Parasitology* 102(3), 143 (2002).
24. Ward W, Alvarado L, et al.: *Cell* 89(3), 437 (1997).
25. Jílková A, Horn M, et al.: *Chemické listy* 112(1), 3 (2018).
26. Jílková A, Řezáčová P, et al.: *Journal of Biological Chemistry* jbc. M111. 271304 (2011).
27. Mas-Coma S, Bargues MD, et al.: *International Journal for Parasitology* 35(11 – 12), 1255 (2005).
28. Robinson MW, Dalton JP, et al.: *Trends in Biochemical Sciences* 33(12), 601 (2008).
29. Robinson MW, Corvo I, et al.: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(4), e1012 (2011).
30. McVeigh P, Maule AG, et al.: *Microbes and Infection* 14(4), 301 (2012).
31. Williamson AL, Lecchi P, et al.: *Journal of Biological Chemistry* 279(34), 35950 (2004).
32. Yang Y, Qin W, et al.: *Experimental Parasitology* 129(3), 215 (2011).
33. Ranjit N, Zhan B, et al.: *Molecular and Biochemical Parasitology* 160(2), 90 (2008).
34. Vermeire JJ, Lantz LD, et al.: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(7), e1680 (2012).
35. Vermeire JJ, Suzuki BM, et al.: *Pharmaceuticals* 9(3), 39 (2016).

Souhrn

Benýšek J.: Parazitární cysteinové proteasy a jejich funkce v lidských patologiích

Parazitární onemocnění představují problém globálního významu s dopady na hospodářství a veřejné zdraví, zejména v rozvojových zemích. Cysteinové proteasy patří mezi klíčové molekuly produkované parazity. Jsou důležité pro homeostázu parazitů a jejich interakci s hostitelem: umožňují zejména pronikání do hostitelských buněk a tkání, migraci v tkáních, výživu parazitů a překonání imunitní obrany hostitele. To vše je činí atraktivním cílem pro vývoj nových chemoterapeutik či vakcín. Tento přehled shrnuje současné poznatky o cysteinových proteasách parazitů a jejich roli v biologii parazitů a parazitárních onemocněních.

Klíčová slova: parazit, parazitární onemocnění, cysteinové proteasy, léčivo

Summary

Benýšek J.: Parasite cysteine proteases and their involvement in human pathology

Parasitic diseases represent a problem of global importance with economic and public health impacts, especially in developing countries. Cysteine proteases belong among key molecules produced by parasites. They are important for parasite homeostasis and parasite-host interactions: in particular, they play a role in penetration of host cells and tissues, migration through tissues, parasite nutrition, and evasion of host immune defenses. Therefore, cysteine proteases are attractive chemotherapeutic and vaccination targets. This review provides current knowledge on cysteine proteases of parasites and their role in parasite biology and parasitic diseases.

Keywords: parasite, parasitic disease, cysteine proteases, drug, pathology

ROLE NIKOTINAMIDFOSFORIBOSYLTRANSFERASY V RAKOVINNÉM BUJENÍ

Diana Rayová, Jarmila Zídková, Petr Svoboda

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; rayovadi@vscht.cz

Úvod

V dnešní době je rakovina celosvětově vzrůstajícím problémem. Jen v roce 2012 bylo zaznamenáno 14,1 milionu nových případů a 8,2 milionu úmrtí s rakovinou souvisejících. Počet nových případů rakoviny roste spolu s rozrůstáním populace a zvyšováním střední délky dožití a to jak v rozvinutých, tak v rozvojových zemích. Také je dnešní populace stále více vystavena rizikovým faktorům (znečištěné životní prostředí vlivem nadměrné industrializace) a nevhodnému životnímu stylu (nadměrný kalorický přísun, kouření, stres atd.).¹

V poslední době se výzkum a léčba rakoviny zaměřují na metabolismus rakovinných buněk a nádoru samotného. Nádorové buňky mají totiž oproti zdravé tkáni charakteristické změny v metabolismu a především vysoké požadavky na energetický přísun. V této souvislosti je v hledáčku vědců i enzym nikotinamidfosforibosyltransferasa (Nampt, EC 2.4.2.12), který působí jako enzym v biosyntéze životně důležitého koenzymu NAD²⁻⁵. Kromě intracelulární funkce Nampt, kde vystupuje jako enzym, byly popsány její extracelulární role – funkce cytokinu a adipokinu. Tyto funkce byly popsány nezávisle, a proto se Nampt v literatuře vyskytuje také pod názvy Faktor dozrávání pre-B lymfocytů (PBEF, pre-B cell colony-enhancing factor) a Visfatin (visceral fat adipokin)^{6, 7}. Úloha Nampt jako adipokinu a cytokinu však bývá často zpochybňována, a to z několika důvodů. Nebyl identifikován receptor, ani signalizační kaskáda, kterou by Nampt aktivovala. Není znám způsob aktivace či regulace sekrece Nampt, respektive ani samotný mechanismus sekrece. V neposlední řadě nebyly od objevu Nampt blíže určeny buňky, které ji aktivně sekretují. Nejčastěji jsou však uváděny buňky imunitního systému, tukové buňky nebo rakovinné

buňky^{3,8}. Z těchto důvodů se předpokládá, že účinky Nampt v extracelulárním prostoru jsou výsledkem její enzymové aktivity^{3, 9, 10}.

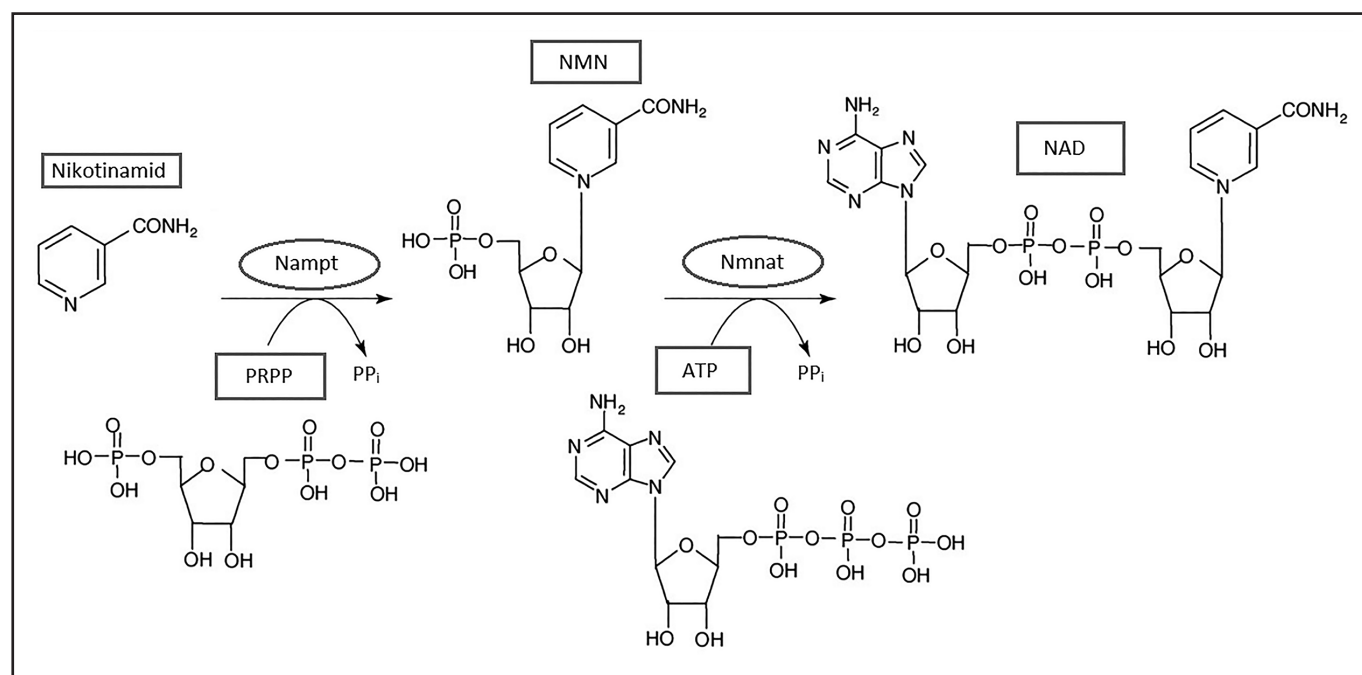
Struktura Nampt a mechanismus katalýzy

Nampt je enzym s molekulovou hmotností 52 kDa⁶. Jedná se o evolučně konzervovaný protein, významně se podobající mezi eukaryoty a prokaryoty¹¹.

Rentgenokrystalografická analýza prokázala příslušnost Nampt k třídě fosforibosyltransferas II. typu. Tato třída enzymů katalyzuje přenos fosforibosylové jednotky z 5'-fosforibosyl-1'-difosfátu (PRPP) na specifické substráty – nikotinamid, kyselinu nikotinovou a kyselinu chinolinovou a kromě Nampt sem patří další 2 enzymy – fosforibosyltransferasa kyseliny nikotinové (EC 2.4.2.11) a fosforibosyltransferasa kyseliny chinolinové (EC 2.4.2.19)¹¹⁻¹³.

Nampt se účastní dvoukrokové syntézy NAD z nikotinamidu (Obr. 1)¹⁴. V prvním kroku této syntézy je fosforibosylvá jednotka z PRPP za pomoci Nampt přenesena na nikotinamid (Nam). Touto reakcí vzniká nikotinamidmononukleotid (NMN). V syntéze NAD představuje Nampt klíčový, rychlost-limitující enzym. Druhý krok syntézy NAD spočívá v přenosu AMP z ATP na NMN za vzniku NAD. Tato reakce je katalyzována nikotinamidmononukleotidadenyltransferasou (Nmnat, EC 2.7.7.1)¹⁴⁻¹⁶.

Nampt je homodimer s rozsáhlým intramolekulovým rozhraním. Každý z monomerů je složen ze 491 aminokyselin, které vytváří 13 α -helixů a 19 β -listů. Rozhraní obou podjednotek obsahuje dvě aktivní místa, každé je tvořeno aminokyselinami z obou monomerů. Proto je pro enzymovou aktivitu Nampt nutná dimerizace¹³. Za stabilizaci NMN v aktivním místě odpovídají π - π



Obr. 1: Dvoukroková syntéza NAD z nikotinamidu.

vazebné interakce mezi nikotinamidem z NMN, fenylalaninem 193 z prvního monomeru a tyrosinem 18 z monomeru druhého. Vodíková vazba mezi asparagovou 219 kyselinou a amidovou skupinou Nam je specifická pro Nampt v ohledu znemožnění vazby substrátů jiných fosforibosyltransferas II. typu – kyseliny chinolinové a kyseliny nikotinové. Další aminokyselinou zajišťující substrátovou specifitu Nampt vodíkovou vazbou na amidovou skupinu Nam je arginin 311 z téže podjednotky. Na fixaci NMN v aktivním místě se podílí i jiné aminokyseliny obou podjednotek – např. serin 280, histidin 247 nebo asparagová kyselina 313^{12, 13, 17}.

NAD

NAD je koenzym, který v organismu plní nezastupitelnou úlohu přenašeče elektronů ve velkém množství oxidačně-redukčních reakcí. Avšak bylo zjištěno, že se NAD účastní i mnoha neredoxních reakcí – regulačních procesů včetně kovalentních modifikací proteinů, replikace a transkripce DNA, oprav DNA a řízení buněčného cyklu a apoptózy. Dvě třídy enzymů využívají NAD jako substrát. Jedná se o poly-(ADP-ribosyl)-polymerasy (PARPs; EC 2.4.2.30) a NAD-dependentní protein deacetylasy neboli sirtuiny (SIRT; EC 3.5.1.-)¹⁸⁻²⁰.

Enzymy PARPs zahrnují 17 různých isoenzymů, které se účastní rozpoznávání, značení a oprav poškozené DNA. V případě poškození DNA jsou schopny během několika sekund zvýšit svou aktivitu až 500× a tím do 15 minut vyčerpat téměř 90 % intracelulární zásoby NAD^{18, 19, 21-23}. Enzymová funkce PARPs spočívá v katalýze přenosu ADP-ribosy z NAD na molekuly proteinů, histonů a transkripčních faktorů, které jsou tímto aktivovány. Nejlépe je prozkoumána a popsána funkce isoenzymu PARP1, který hledá zlomy (jednovláknové i dvouvláknové) v DNA a poté se podílí na jejich opravě^{19, 21, 22, 24}.

Enzymy SIRTs zahrnují 7 isoenzymů, které se uplatňují především při deacetylaci histonů a proteinů. Při těchto reakcích je NAD hydrolyzován na Nam a O-acetyl-ADP-ribosu²². Zároveň se SIRTs podílí na regulaci metabolismu glukosy a lipidů v závislosti na množství NAD a energetické homeostáze buňky. Také modifikují některé transkripční faktory spojované s replikací DNA a útlumem růstu rakovinných buněk^{19, 22, 24}. V rakovinných buňkách byl zjištěn radikální nárůst koncentrace obou tříd enzymů².

Během neredoxních procesů je NAD rozložen za vzniku nikotinamidu. *De novo* syntéza NAD probíhá pouze v hepatocytech a v CNS z chinolinové kyseliny s počátkem v tryptofanu. Pro ostatní buňky je nezbytná existence takzvaných „drah šetřících NAD“. Tyto dráhy existují tři a využívají jako prekurzor buď nikotinamid, kyselinu nikotinovou, nebo nikotinamidribonukleosid^{16,25}. Primární dráhou pro syntézu NAD většinou savčích buněk je dráha vycházející z nikotinamidu, kde v prvním kroku zastává Nampt úlohu enzymu.

Nampt a rakovinné bujení

Metabolismus rakovinných buněk je oproti metabolismu normálních buněk tkání odlišný. Zvýšená buněčná proliferace klade důraz na vyšší rychlost syntézy biomolekul jako DNA, proteinů, lipidů a s tím souvisí vyšší energetické požadavky rakovinných buněk. Pro metabolismus rakovinných buněk je také specifický tzv. Warburgův efekt, který popisuje, že rakovinné buňky při zpracování přebytku glukosy preferují anaerobní glykolýzu. To způsobuje, že z nádorových buněk je vy-

lučován laktát, který je pro zdravou tkáň toxický. Tento jev je vysvětlován nedostatečným přísunem kyslíku a častou přítomností mitochondriálních poruch v nádorových buňkách^{5, 26, 27}.

NAD je v rakovinném bujení substrátem nebo kofaktorem mnoha buněčných procesů od buněčného růstu a dělení, přes energetický metabolismus až po opravy DNA. Přitom jsou mnohé z těchto procesů v rakovinných buňkách dysregulovány⁵. Rakovinné buňky tak mají zvýšené nároky na NAD, které následně slouží ve vyšší míře i pro enzymy SIRTs a PARPs^{2, 22, 28}. Ve výsledku jsou tak rakovinné buňky zranitelnější inhibicí syntézy NAD, než buňky zdravé²⁹.

V rakovinných buňkách probíhá biosyntéza NAD především biosyntetickou dráhou z nikotinamidu s Nampt jako rychlost limitujícím enzymem. Farmakologická inhibice této dráhy působí na rakovinné buňky cytotoxicky⁵. Některé nádorové buňky dokonce ztrácejí schopnost *de novo* syntézy NAD z tryptofanu a jsou proto zcela závislé na drahách šetřících NAD. Pro tyto buňky je pak Nampt nezbytný^{30, 31}. V případě některých druhů rakovinných onemocnění byl také pozorován nárůst produkce Nampt (melanom, glyoblastom, myelom, karcinom prsu, kolorektální karcinom, karcinom prostaty, karcinom jater)^{2, 4}. Vyšší produkce Nampt je rovněž spojovaná s agresivitou a progresí nádoru^{3, 4}. Buněčná lokalizace Nampt se také mění v průběhu buněčného cyklu. Po dokončení mitózy se Nampt nachází v cytoplasmě a až do počátku další mitózy dochází k postupnému přesunu Nampt do jádra buňky³².

V případě mnoha nádorů byla také zjištěna extracelulární forma Nampt, avšak její původ zatím nebyl dostatečně objasněn. Předpokládá se, že je produkována nádorovými buňkami jako odpověď na stres (nedostatek glukosy, oxidativní stres, hypoxie). Podle nedávné studie podporuje extracelulární Nampt proliferaci rakovinných buněk a poskytuje jim zvýšenou ochranu proti apoptóze. Zároveň pravděpodobně inhibuje imunitní reakci organismu na nádor^{3, 4}. Zvýšená genová exprese *Nampt* může přinášet i problémy při tradiční chemoterapii. Například doxorubicinová terapie rakoviny prsu byla méně úspěšná v případě nádorů se zvýšenou genovou expresí *Nampt*³³.

Tyto poznatky naznačují, že inhibice enzymové aktivity Nampt může/mohla by poskytovat další cíl v léčbě rakovinných onemocnění^{2, 3}. Většina zatím známých nízkomolekulárních inhibitorů enzymové aktivity Nampt je strukturně podobná nikotinamidu. Obsahují pyridinový kruh, díky kterému se váží do aktivního místa Nampt a tím fungují jako kompetitivní inhibitory a jejich účinné koncentrace začínají již na nmol·l⁻¹. Původní inhibitory z první generace – GMX1778/CHS828 a APO866/FK866 byly původně zkoumány pro inhibiční účinek na buněčnou proliferaci, přitom ale byly popsány jejich protirakovinné účinky^{29, 30}. Po podání inhibitorů enzymové aktivity došlo v *in vitro* kultivovaných rakovinných buňkách během několika hodin k výraznému snížení intracelulárního množství NAD. Již 24 hodin po podání se projevovaly sekundární metabolické poruchy – inhibice glykolýzy, Krebsova cyklu, syntézy ATP i syntézy nukleotidů. Po 36 – 48 hodinách od podání inhibitoru se pak množství ATP v buňce snížilo o 90 %, což iniciovalo buněčnou smrt. Poruchy glykolýzy a syntézy nukleotidů pak byly popsány také *in vivo* s použitím myších modelů^{34, 35}. Pokud byla rakovinným buňkám podána dávka inhibitoru způsobující snížení množství intracelulárního NAD o 80 %, byly buňky schopné

do 48 hodin zásobu NAD obnovit na původní hladinu. Pokud snížení přesáhlo 90 %, nastávala buněčná smrt³⁶. Již koncentrace pouhý 1 nmol·l⁻¹ APO866/FK866 působila jako IC₅₀ u buněk HepG2 *in vitro*²⁹. APO866/FK866 má navíc velmi nízké účinné koncentrace pro mnoho druhů lymfomů a leukemických buněk, zatímco zdravé krevní buňky k němu tolik citlivé nejsou³⁷. Přesto byly v pozdějších klinických studiích popsány silné toxické vedlejší účinky obou látek včetně trombocytopenie, dále lymfocytopenie a anémie³⁸. Kromě toho se pacienti potýkali s nevolností, zvracením, zácpou, průjemem, ale i zánětem jícnu^{30, 39}.

Jako řešení bylo navrženo kombinované podávání inhibitorů enzymové aktivity Namp1 spolu s cytostatiky. Při kombinované léčbě byly v kombinaci s cytostatikem použity nízké, samostatně subletální, koncentrace inhibitoru Namp1^{29, 34, 40}. Tato kombinovaná léčba je zatím ve stadiu testování *in vitro*, kde poskytuje slibné výsledky, klinické studie zatím zahájeny nebyly^{41, 42}.

Literatura:

1. Torre LA, Bray F, et al.: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65(2), 87 (2015).
2. Shackelford RE, Mayhall K, et al.: *Genes and Cancer* 4(11 – 12), 447 (2013).
3. Grolla AA, Travelli C, et al.: *British Journal of Pharmacology* 173(14), 2182 (2016).
4. Carbone F, Liberale L, et al.: *COMPREHENSIVE PHYSIOLOGY* 7(2), 603 (2017).
5. Kennedy BE, Sharif T, et al.: *Pharmacological Research* 114(274) (2016).
6. Samal B, Sun Y, et al.: *Molecular and Cellular Biology* 14(2), 1431 (1994).
7. Fukuhara A, Matsuda M, et al.: *Science* 307(5708), 426 (2005).
8. Svoboda P, Krizova E, et al.: *PHYSIOLOGICAL RESEARCH* 66(4), 709 (2017).
9. Revollo JR, Körner A, et al.: *Cell Metabolism* 6(5), 363 (2007).
10. Yang H, Lavu S, et al.: *Experimental Gerontology* 41(8), 718 (2006).
11. Luk T, Malam Z, et al.: *Journal of Leukocyte Biology* 83(4), 804 (2008).
12. Wang T, Zhang X, et al.: *Nature structural & molecular biology* 13(7), 661 (2006).
13. Sommer G, Garten A, et al.: *CLINICAL SCIENCE* 115(1 – 2), 13 (2008).
14. Magni G, Amici A, et al.: *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61(1), 19 (2004).
15. Garten A, Petzold S, et al.: *Trends in Endocrinology & Metabolism* 20(3), 130 (2009).
16. Revollo JR, Grimm AA, et al.: *Journal of Biological Chemistry* 279(49), 50754 (2004).
17. Takahashi R, Nakamura S, et al.: *Journal of Biochemistry* 147(1), 95 (2010).
18. Beneke S, Scherr A-L, et al.: *Mechanisms of Ageing and Development* 131(5), 366 (2010).
19. Canto C, Menzies KJ, et al.: *Cell metabolism* 22(1), 31 (2015).
20. Tanner KG, Landry J, et al.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26), 14178 (2000).

Závěr

Snížení hladiny NAD zaměřené na rakovinné buňky je slibnou možností léčby rakovinných onemocnění. Zacílení na biosyntetickou dráhu z nikotinamidu, které se také účastní Namp1 v roli enzymu, je jednou z možností, jak toho docílit. Výzkumy však ukazují, že samostatné využití dosud známých inhibitorů Namp1 není možné z důvodu silných vedlejších účinků. Nabízí se však možnost kombinace těchto inhibitorů s dalšími látkami (cytostatiky), nebo specifické využití pro nádory se zvýšenou syntézou Namp1 jako doplněk běžné chemoterapie.

Poděkování

Práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21 – SVV/2019).

21. Wielckens K, George E, et al.: *Journal of Biological Chemistry* 258(7), 4098 (1983).
22. Houtkooper RH, Cantó C, et al.: *Endocrine Reviews* 31(2), 194 (2010).
23. Houtkooper RH, Pirinen E, et al.: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(4), 225 (2012).
24. Li M and Yu X: *Oncogene* 34(26), 3349 (2015).
25. Mattevi A: *Nature Structural & Molecular Biology* 13(7), 563 (2006).
26. Hanahan D and Weinberg Robert a: *Cell* 144(5), 646 (2011).
27. Chen H, Wang S, et al.: *Expert Review of Anticancer Therapy* 16(8), 827 (2016).
28. Berger F, RamiRez-Hernández MaH, et al.: *Trends in biochemical sciences* 29(3), 111 (2004).
29. Hasmann M and Schemainda I: *Cancer research* 63(21), 7436 (2003).
30. Sampath D, Zabka TS, et al.: *Pharmacology & therapeutics* 151, 16 (2015).
31. Xiao Y, Elkins K, et al.: *Neoplasia* 15(10), 1151 (2013).
32. Svoboda P, Krizova E, et al.: *Journal of Biological Chemistry jbc*. RA118. 003505 (2019).
33. Folgueira MaaK, Carraro DM, et al.: *Clinical Cancer Research* 11(20), 7434 (2005).
34. Roulston A and Shore GC: *Molecular & cellular oncology* 3(1), e1052180 (2016).
35. Tolstikov V, Nikolayev A, et al.: *PloS one* 9(12), e114019 (2014).
36. Chan M, Gravel M, et al.: *Cancer research* 74(21), 5948 (2014).
37. Nahimana A, Attinger A, et al.: *Blood* 113(14), 3276 (2009).
38. Holen K, Saltz LB, et al.: *Investigational new drugs* 26(1), 45 (2008).
39. Ravaut A, Cerny T, et al.: *European Journal of Cancer* 41(5), 702 (2005).
40. Muruganandham M, Alfieri AA, et al.: *Clinical cancer research* 11(9), 3503 (2005).
41. Barraud M, Garnier J, et al.: *Oncotarget* 7(33), 53783 (2016).
42. Grohmann T, Penke M, et al.: *Leukemia Research* 69(39) (2018).

Souhrn

Rayová D., Zídková J., Svoboda P.: Role nikotinamidfosforibosyltransferasy v rakovinném bujení

Rakovinná onemocnění jsou velkým problémem dnešní doby. Ve srovnání se zdravými se rakovinné buňky vyznačují pozměněným metabolismem s vysokými požadavky na energetický přísun. V energetickém metabolismu (nejen) rakovinných buněk hraje podstatnou roli NAD jako přenašeč elektronů v oxidačně-redukčních reakcích, ale i jako substrát enzymů SIRTů a PARPů. Tyto enzymy se účastní regulačních procesů zahrnující kovalentních modifikací proteinů, replikace a transkripce DNA, oprav DNA a řízení buněčného cyklu a apoptózy. Zde je NAD spotřebováván za vzniku nikotinamidu. Pro většinu savčích buněk, zvláště pak rakovinných je proto nezbytná možnost biosyntézy NAD z nikotinamidu. V této biosyntéze hraje nezastupitelnou úlohu nikotinamidfosforibosyltransferasa (Nampt). Je totiž enzymem katalyzujícím rychlost určující krok této biosyntézy. Díky tomu se nabízí inhibice Nampt jako vhodná možnost pro léčbu rakoviny.

Klíčová slova: Nampt, PBEF, visfatin, rakovina, inhibice enzymové aktivity

Summary

Rayová D., Zídková J., Svoboda P.: The role of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cancerous growth

Nowadays, cancer is a big problem for society. Compared to healthy cells, cancer cells are characterized by altered metabolism with high energy intake requirements. In the energy metabolism of (not only) cancer cells, NAD plays an essential role as an electron carrier in oxidation reduction reactions, but also as a substrate for SIRT and PARPs. These enzymes are involved in regulatory processes including covalent protein modifications, DNA replication and transcription, DNA repair and cell cycle control and apoptosis. Here, NAD is consumed, producing nicotinamide. NAD biosynthesis from nicotinamide is therefore essential for most mammalian cells, especially cancer cells. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) plays an irreplaceable role in this biosynthesis. It is an enzyme catalyzing the rate-determining step of this biosynthesis. As a result, inhibition of Nampt is offered as a suitable option for cancer treatment.

Keywords: Nampt, PBEF, visfatin, cancer, enzyme activity inhibition

NEKÓDUJÍCÍ RNA A MALIGNÍ MELANOM

Anna Palánová, Helena Kupcová Skalníková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Laboratoř aplikovaných proteomových analýz; Palanova@iapg.cas.cz

Úvod

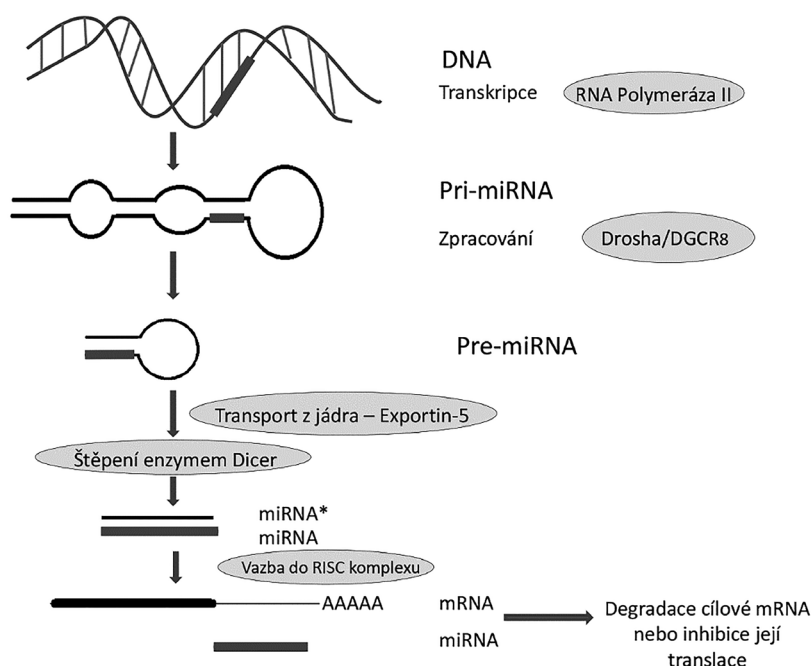
Dědičná informace živočichů, rostlin, bakterií a některých virů je zapsána pomocí DNA (deoxyribonukleová kyselina). Základními stavebními kameny DNA jsou nukleotidy (nt) – „písmena dědičné abecedy“. Těchto „písmen“ jsou u člověka přibližně 3 miliardy¹ a před kompletním přečtením lidského genomu se předpokládalo, že čím složitější je organismus, tím více genů (kódujících proteiny) bude zapsáno v jeho dědičné informaci. Naproti očekávání se ukázalo, že člověk i myš (organismy zastupující vyšší živočichy) mají přibližně stejný počet genů jako *Caenorhabditis elegans* (Háďátka obecná) – mikroskopický oblý červ². Proto se předpokládalo, že zbytek dědičné informace představuje nefunkční tzv. odpadní DNA („junk DNA“), nashromážděnou v průběhu evoluce.

Analýzy genové exprese však ukázaly, že přibližně 90 % genomu je aktivně transkribováno³ a byly objeveny RNA nekódující proteiny (non-coding RNA, ncRNA), které se dělí dle délky: na dlouhé ncRNA (long ncRNA, lncRNA) o délce 0,2 až 100 kb bez otevřeného čtecího rámce a krátké ncRNA (small ncRNA, sncRNA)⁴. Deregulace některých lncRNA byla popsána u řady nádorových onemocnění a přispívá k jejich patogenetice⁵. Skupina krátkých ncRNA sdružuje krátké interferující RNA (small interfering RNA, siRNA), s promotorem asociované RNA (promoter associated small RNA, pasRNA), s piwi proteiny interagující RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA; hlavní funkcí komplexů piRNA s piwi proteiny je umlčování transpozónů v pohlavních

buňkách živočichů⁶) a především mikroRNA (miRNA)⁷. První popsanou miRNA byla lin-4⁸ a tento objev V. Ambrose a jeho kolegů vedl k vzniku celého nového odvětví genetiky.

Biogeneze a funkce miRNA

miRNA byly objeveny v roce 1993⁸, jejich biogeneze byla podrobněji popsána v roce 2002⁹ a ve své maturované podobě představují úseky RNA o délce většinou 22 nukleotidů (20 – 200 nt). Nicméně jsou prepisované z DNA jako více než 1000 nt dlouhá prekurzorová molekula, nazývaná primární transkript (pri-miRNA, Obr. 1). Vzniklá pri-miRNA má vlásenkovou strukturu



Obr. 1 Biogeneze a funkce miRNA

a je zpracována enzymem Drosha, který v komplexu s dalšími proteiny rozpoznává a štěpí pri-miRNA mezi vlásečkovou a jednovláčkovou strukturou. Molekula vzniklá z pri-miRNA po zpracování enzymem Drosha je dlouhá přibližně 60 – 100 nt a nazývá se prekurzorová miRNA (pre-miRNA). Poté je pre-miRNA transportována z buněčného jádra do cytoplazmy, kde je zpracována enzymem Dicer. Ten štěpí molekulu RNA na dvě části, z nichž jedna je většinou degradována, zatímco druhá se stává součástí RISC komplexu (RNA-induced silencing complex). RISC komplex se váže na komplementární sekvenci v 3' nepřekládané (3'UTR – untranslated region) oblasti cílové mRNA a v závislosti na „přesnosti vazby“ v tzv. seed oblasti dochází buď k degradaci cílové mRNA, nebo zamezení syntézy proteinu bez degradace mRNA. Popsaná dráha biogeneze miRNA se nazývá kanonická, jelikož byly popsány i jiné dráhy, například dráha nezávislá na enzymu Drosha.

Regulace pomocí miRNA je jedním z epigenetických faktorů, které řídí řadu buněčných procesů, jako jsou proliferace a diferenciaci, senescence, přežití, autofágie a migrace buněk a může ovlivňovat i buněčný metabolismus a genomovou stabilitu. Počet popsanych miRNA stále narůstá, nejvíce anotovaných miRNA je u člověka a myši. Detailnější informace o biogenezi, názvosloví a typech miRNA jsou k dispozici v novějších odborných článcích¹⁰ či na některých webových zdrojích¹¹.

Maligní melanom

Maligní melanom (MM) je kožní nádor rezistentní k terapii díky mnoha mechanismům podporujícím jeho progresi. MM vzniká přeměnou kožních buněk melanocytů, které produkují barvivo melanin chránící DNA kožních buněk před účinky UV záření¹². Počáteční stadia onemocnění MM, pokud jsou včas odhalena, jsou dobře léčitelná pomocí chirurgického odstranění nádoru s dostatečně širokým lemlem okolní zdravé tkáně. Pokud ovšem dojde k průniku nádoru přes bazální membránu či rozšíření nádorových buněk do organismu (vzdálené metastázy), je prognóza pacienta ve většině případů velmi nepříznivá. Incidence MM celosvětově narůstá, v České republice došlo za poslední 4 dekády ke čtyřnásobnému zvýšení výskytu MM¹³.

Vědci Douglas Hanahan a Robert A. Weinber v roce 2000 definovali nádor na základě šesti obecných znaků¹⁴:

1. soběstačnost nádorových buněk v produkci růstových faktorů;
2. necitlivost nádorových buněk k faktorům zastavujícím buněčný cyklus;
3. narušení apoptózy nádorových buněk;
4. neomezená replikace nádorových buněk;
5. schopnost nádorů vyvolat angiogenezi;
6. schopnost nádorových buněk pronikat do tkání a vytvářet metastázy.

V roce 2011 stejní autoři revidovali a doplnili svou práci o další znaky definující nádory: energetický metabolismus je deregulován; nádorové buňky unikají imunitnímu systému; nádor vyvolává zánětlivou reakci; v nádorové DNA vznikají mutace a genomová nestabilita¹⁵.

Role miRNA v patogenezi maligního melanomu

Problematika miRNA u nádorových onemocnění je velmi aktuální téma. Bylo prokázáno, že miRNA představují klíčové komponenty různých buněčných procesů ve vývoji nádorů, například regulují jevy tak odlišné jako exprese proteinů či jaderné funkce uvnitř buňky a zároveň mohou sloužit jako mezibuněčné signály – jsou sekretovány a transportovány pomocí exosomů či jiných extracelulárních váčků¹⁶.

Mnoho studií odhalilo rozdíly v expresi různých miRNA mezi zdravou tkání a nádorem, či mezi primárním nádorem a metastatickými ložisky. U MM byly zjištěny rozdíly v expresi miRNA mezi melanomovými buňkami a normálními melanocyty. Tyto změny mohou být způsobeny chromozomálními abnormalitami, epigenetickou regulací či dalšími faktory ovlivňujícími biogenezi miRNA¹⁷.

V souvislosti s MM jsou často studovány tyto miRNA: miR-21^{17,18}, miR-7-5p^{20,21}, miR-204^{22,23}, miR-221^{24,25} a miR-222^{24,26}. miR-21 je považována za klíčový onkogen, který je exprimován v mnoha typech nádorů^{27,28}. Cílem této miRNA jsou mRNA tumor-supresorových proteinů, regulátorů buněčného cyklu a vnitřní a vnější dráhy aktivace apoptózy²⁹. miR-21 je také jednou z nejvíce melanomem sekretovaných miRNA prostřednictvím exosomů³⁰. Bylo prokázáno, že exprese miR-21 může být zvyšována změnami prostředí, epigenetickými a genetickými změnami, které všechny mohou podporovat vznik melanomu³¹. Vztah nádorových znaků a genů ovlivňovaných miR-21 znázorňuje Obr. 2.

miR-7-5p hraje důležitou roli ve zdravé i nemocné tkáni a byla potvrzena jako nádorový supresor³². U melanomu tato miRNA potlačuje růst a životaschopnost nádorových buněk a inhibuje tvorbu metastáz v plících²⁰.

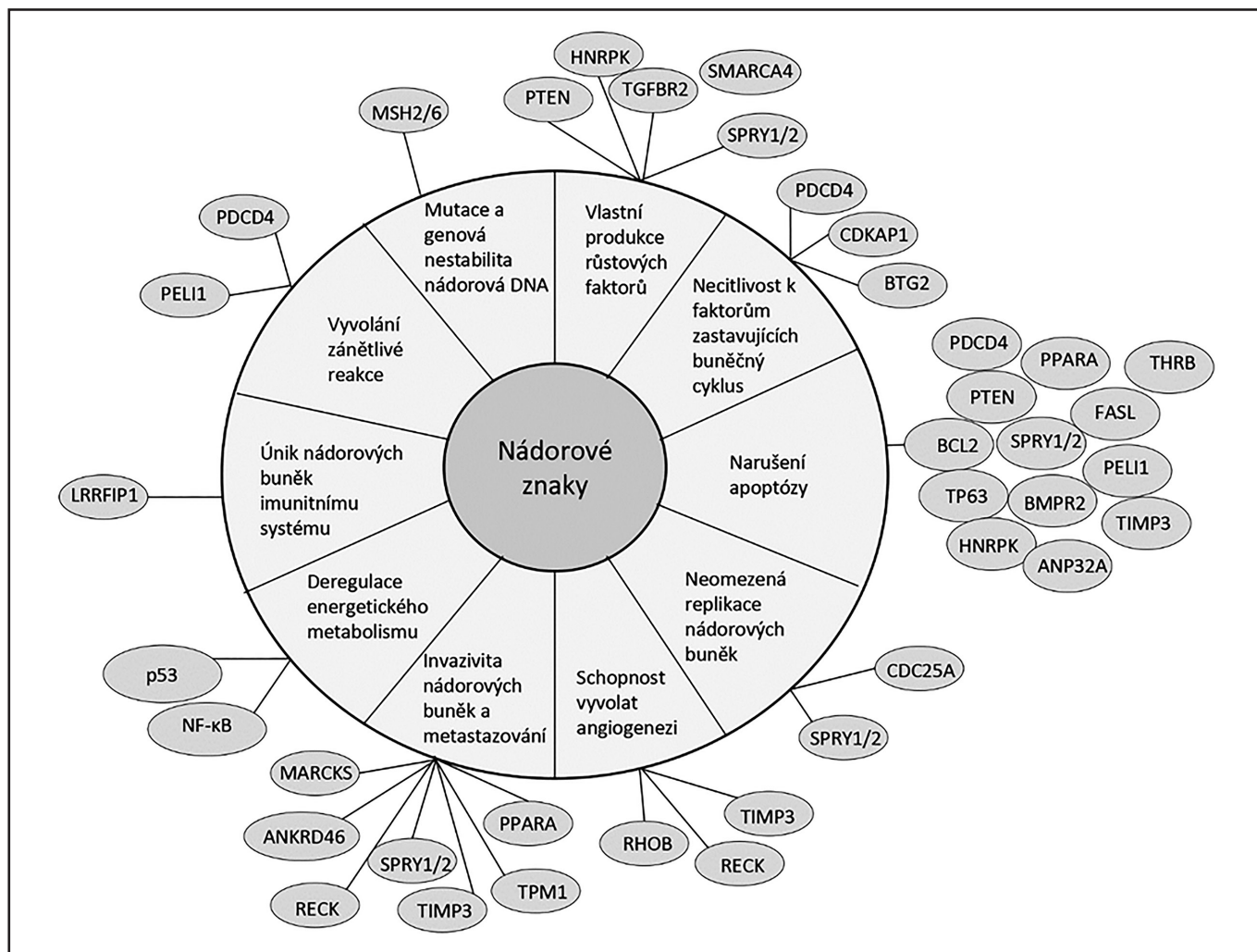
miR-204 vykazuje tumor supresorové funkce. Exprese miR-204 je snížena u MM v porovnání s benigními névy²³. Ztráta její exprese má negativní efekt na přežití pacientů s MM, kteří byli zároveň nositeli specifických mutací²².

Zvýšená exprese protumorigenních miR-221 a miR-222 způsobuje aktivaci několika základních drah ovlivňujících přežívání buněk a inhibici tvorby melaninu²⁴. Zvýšená exprese miR-222 podporuje invazivitu buněk nádoru a zkracuje dobu přežití pacientů²⁶.

Ke vzniku nádorových onemocnění mohou přispívat i polymorfismy v genech pro miRNA. U pacientů s familiárním maligním melanomem bylo mimo jiné popsáno 8 nových sekvenčních variant miR-34a³².

Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) a maligní melanom

Biogeneze lncRNA je ve většině případů podobná biogenezi mRNA; jsou transkribovány RNA polymerázou II, podstupují sestřih, přidání „čepičky“ na 5' konci a polyadenylaci (existují samozřejmě i výjimky)^{33,34}. Funkce těchto RNA jsou velice rozmanité, ovlivňují téměř všechny procesy v buňce a mohou hrát roli i ve vývoji maligních onemocnění.



Obr. 2: Vztah nádorových znaků a genů ovlivňovaných miR-21

Znaky definující nádory dle Hanahana a Weinberga ve vztahu ke genům, které jsou cílem miR-21. Některé geny se podílejí na více nádorových znacích a každý znak je ovlivňován minimálně jedním cílem miR-21. Upraveno dle Becker Buscaglia a kol., 2011²⁹. miR-21 je mimo jiné zapojena i do regulace energetického metabolismu nádorových buněk jako aktivátor NF-κB signalizace a naopak negativní regulátor p53. Zatímco NF-κB podporuje dělení buněk a rychlé získání energie glykolýzou, p53 zpomaluje příjem glukózy a podporuje tvorbu energie pomalejší oxidativní fosforylací⁴² miR-21 tak může v nádorech přispívat k rychlému získání energie glykolýzou za tvorby laktátu bez zapojení oxidativní fosforylace (Warburgův efekt).

Například lncRNA SPRIGHTLY (transkribovaná z intronu genu SPRY4) je zapojena do regulace buněčné proliferace, apoptózy, organizace chromatinu, regulace odpovědi na poškození DNA a buněčného cyklu u melanocytů. Melanomové buňky mají ve srovnání se zdravými melanocyty výrazně vyšší expresi této lncRNA³⁵.

Zvýšená exprese lncRNA SLNCR1 podporuje invazivitu melanomových buněk a snižuje dobu přežití pacientů s MM³⁷.

S růstem a tvorbou metastáz mnoha nádorových onemocnění je spojená také lncRNA MALAT1; u MM bylo zjištěno, že tato lncRNA podporuje proliferaci, invazivitu a migraci melanomových buněk díky „vychytávání“ miR-22 (tato miRNA byla potvrzena jako nádorový supresor u MM)³⁸.

Další u MM vysoce exprimovanou lncRNA je HEIH, která podporuje proliferaci, invazivitu a migraci melanomových buněk³⁹.

I přes to, že znalosti o lncRNA nejsou příliš rozsáhlé, již dnes můžeme říci, že představují biomolekuly s potenciálním významem v onkologii. Jako příklad diagnostického a prognostického faktoru lze uvést

lncRNA PCA3, specificky exprimovanou buňkami karcinomu prostaty, sloužící jako biomarker tohoto onemocnění detekovatelný neinvazivně v moči pacientů⁴⁰. lncRNA díky svým schopnostem regulovat genovou expresi a buněčné signální dráhy mohou být cílem protinádorových terapií. Léčebné ovlivnění exprese lncRNA je zatím pouze ve stadiu výzkumu⁴¹.

Závěr

Výzkum nekódujících RNA, které byly dříve považovány za genetický „odpad“, dnes představuje velmi rychle se rozvíjející oblast. Anotovaných miRNA stále přibývá a díky vysoké mezidruhové konzervovanosti těchto struktur je možné snáze porovnávat výsledky výzkumu na modelových organismech (např. myši či praseti) s výsledky studií u lidských pacientů.

Stále častější využití tkáňových či buněčných kultur usnadňuje poznání základních procesů odehrávajících se v jednotlivých buňkách, interakcí mezi buňkami a umožňuje cílené ovlivňování buněčných procesů, což přináší hlubší pohled do buněčné biologie a biologie nádorů.

I přes velký pokrok, který nastal v této oblasti, jsme teprve na počátku dlouhé cesty od identifikace jednotlivých komponentů buněčných drah k úspěšné aplikaci výsledků výzkumu v léčbě zhoubných onemocnění. Cílem současných snah je vytvoření léčby „na míru“ danému pacientovi, která umožní nejen potlačení stávajícího nádorového onemocnění, ale také zabrání případnému návratu onemocnění v budoucnosti.

Literatura:

1. Natl. Hum. Genome Res. Inst. NHGRI. Available at: <https://www.genome.gov/12011238/an-overview-of-the-human-genome-project/>. Accessed January 9, 2019.
2. Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS: *BioEssays* 29, 288 (2007).
3. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, et al.: *J. Pathol.* 220, 126 (2010).
4. Esteller M: *Nat. Rev. Genet.* 12, 861 (2011).
5. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL: *Mol. Cancer* 10, 38 (2011).
6. Siomi MC, Sato K, Pezic D, et al.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 246 (2011).
7. Stefani G, Slack FJ: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 219 (2008).
8. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: *Cell* 75, 843 (1993).
9. Lee Y et al.: *EMBO J.* 21, 4663 (2002).
10. Saliminejad K, Khorshid HRK, Fard SS, et al.: *J. Cell. Physiol.* 234, 5451 (2019).
11. Available at: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/miRNA_Introduction.php. Accessed January 14, 2019.
12. Hartman ML, Czyz M: *J. Invest. Dermatol.* 135, 352 (2015).
13. Dvořánková B, Szabo P, Kodet O, et al.: *Protoplasma* 254, 1143 (2017).
14. Hanahan D, Weinberg RA: *Cell* 100, 57 (2000).
15. Hanahan D, Weinberg RA: *Cell* 144, 646 (2011).
16. Mione M, Bosserhoff A: *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 340 (2015).
17. Gajos-Michniewicz A, Czyz M: *Cancers* 11, 326 (2019).
18. Melnik BC: *J. Transl. Med.* 13 (2015). Available at: <http://www.translational-medicine.com/content/13/1/202>. Accessed October 10, 2018.
19. Jiao J, Fan Y, Zhang Y: *J. Int. Med. Res.* 43, 672 (2015).
20. Giles KM, Brown RAM, Ganda C, et al.: *Oncotarget* 7, 31663 (2016).
21. Sun X, Li J, Sun Y, et al.: *Oncotarget* 7 (2016). Available at: <http://www.oncotarget.com/fulltext/10669>. Accessed January 16, 2019.
22. Galasso M, Morrison C, Minotti L, et al.: *Mol. Cancer* 17, 71 (2018).
23. Palkina N, Komina A, Aksemenko M, et al.: *Oncol. Lett.* (2018). Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8443>. Accessed November 14, 2018.
24. Felli N, Errico M, Pedini F, et al.: *Oncogene* 35 (2015).
25. Kanamaru H, Fukushima S, Yamashita J, et al.: *J. Dermatol. Sci.* 61, 187 (2011).
26. Felicetti F, De Feo A, Coscia C, et al.: *J. Transl. Med.* 14 (2016). Available at: <http://www.translational-medicine.com/content/14/1/56>. Accessed December 3, 2018.
27. Medina PP, Nolde M, Slack FJ: *Nature* 467, 86 (2010).
28. Krichevsky AM, Gabriely G: *J. Cell. Mol. Med.* 13, 39 (2009).
29. Buscaglia LEB, Li Y: *Chin. J. Cancer* 30, 371 (2011).
30. Saldanha G, Potter L, Shendge P, et al.: *J. Invest. Dermatol.* 133, 1381 (2013).
31. Box NF, Terzian T: *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 525 (2008).
32. Horsham JL, Ganda C, Kalinowski FC, et al.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 69, 215 (2015).
33. Cozzolino AM, Pedace L, Castori M, et al.: *Fam. Cancer* 11, 201 (2012).
34. Spurlock CF, Crooke PS, Aune TM: *J. Immunol. Bal-tim. Md* 1950 197, 4509 (2016).
35. Moran VA, Perera RJ, Khalil AM: *Nucleic Acids Res.* 40, 6391 (2012).
36. Zhao W, Mazar J, Lee B, et al.: *J. Invest. Dermatol.* 136, 819 (2016).
37. Schmidt K, Joyce CE, Buquicchio F, et al.: *Cell Rep.* 15, 2025 (2016).
38. Luan W, Li L, Shi Y, et al.: *Oncotarget* 7 (2016). Available at: <http://www.oncotarget.com/fulltext/11564>. Accessed October 31, 2018.
39. Zhao H, Xing G, Wang Y, et al.: *Biosci. Rep.* 37, BSR20170682 (2017).
40. Prensner JR, Chinnaiyan AM: *Cancer Discov.* 1, 391 (2011).
41. Schmitt AM, Chang HY: *Cancer Cell* 29, 452 (2016).
42. Ak P, Levine AJ: *FASEB J.* 24, 3643 (2010).

Souhrn

Palánová A., Kupcová Skalníková H.: Nekódující RNA a maligní melanom

Incidence maligního melanomu, závažného kožního nádoru, celosvětově narůstá. Léčba tohoto onemocnění při pozdním odhalení je v dnešní době téměř nemožná. Nekódující RNA, dříve považované za „odpad“ evoluce, byly odhaleny jako klíčoví hráči ve většině buněčných procesů a mohou ovlivňovat i růst a prognózu nádorů. Očekává se, že poznatky v rychle se rozvíjícím výzkumu nekódujících RNA přispějí k diagnostice a léčbě nádorových onemocnění.

Klíčová slova: nádor, maligní melanom, nekódující RNA, miRNA

Summary

Palánová A., Kupcová Skalníková H.: Noncoding RNA and malignant melanoma

Incidence of malignant melanoma, a very dangerous skin cancer, is rising worldwide. Later stages of melanoma are refractory to therapy. Noncoding RNAs, previously considered as „junk“ RNA, were currently confirmed as key players in almost all cellular processes and may also influence tumour growth and prognosis. Research of noncoding RNAs is expected to contribute to diagnosis and treatment of malignant diseases.

Keywords: tumour, malignant melanoma, noncoding RNA, miRNA

Poděkování

Tato studie vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci Národního programu udržitelnosti I. (projekt LO1609) a Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání (projekt CZ.02. 1. 01/0.0/0.0/16_019/0000785).

OD ZVIERACÍCH MODELOV NEURODEGENERATÍVNYCH CHORÔB KU GÉNOVÝM TERAPIÁM ĽUDSKÝCH NEURODEGENERATÍVNYCH OCHORENÍ

Božena Levinská (Bohuslavová)

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR; bohuslavova@iapg.cas.cz

Úvod

Zvieracie modely chorôb

Na dôkladné preskúmanie patofyziológie chorôb sa používajú zvieracie modely. Aby skúmanie bolo čo najefektívnejšie, použité zvieratá by mali mať čo najbližšiu fyziológiu podobnú človeku. Najviac podobné sú modely cicavcov. Tieto modely môžeme rozdeliť na genetické a negenetické. Najprv sa vyvíjali negenetické modely. Ich princípom je indukcia klinických príznakov ochorenia chemickými činidlami. Genetické modely delíme na náhodne vložené transgénne modely exprimujúce skrútený alebo kompletný gén a na knock-in modely¹. Najčastejšie sa používajú modely hlodavcov – myši, potkany. Hoci je nepopierateľné, že hlodavce poskytujú dôležité informácie o patofyziológii neurodegeneratívnych ochorení, ich použitie je obmedzené. V porovnaní s ľudskými pacientmi majú veľmi malý mozog a inú anatómiu mozgu. Pretože ich dĺžka života je krátka, nie je možné uskutočniť dlhodobé štúdie. Aby sa mohli uskutočniť dlhodobé štúdie a prípadná liečba mohla byť použitá na človeka, treba použiť zvieratá ktoré sú svojou fyziológiou viac podobné človeku. Preto boli vytvorené veľké zvieracie modely. Patria sem opice, ošipané a ovce^{2, 3} (Obr. 1). Veľké zvieracie modely majú niekoľko výhod. Najdôležitejšia je podobná štruktúra mozgu s človekom. Výhodou miniprasiat je hmotnosť 70 – 90 kg, ktorá je podobná hmotnosti dospelého človeka, taktiež veľký gyrencefa-

lický mozog s podobnou neuroanatómiu ako majú ľudia⁴.

Génová terapia

Génová terapia je liečebný postup, pri ktorom je DNA sekvencia vložená do genómu pacienta. Táto DNA sekvencia kóduje chýbajúci alebo nefunkčný proteín, alebo môže potlačiť mutantný proteín. Podľa toho, či génová terapia nahradí gény vo všetkých bunkách tela okrem gamét, alebo nahradí gény v gamétach rozdeľujeme génovú terapiu na somatickú a gametickú. Prvé pokusy o génovú terapiu boli zaznamenané v 70. rokoch minulého storočia, ale neboli veľmi úspešné. Úspech nastal v osemdesiatych rokoch, keď bol gén pre betaglobulín vložený do myších gamét. Tento gén exprimoval funkčný betahemoglobín na potlačenie prejavov ochorenia nazývaného talasémia⁵. 14. Septembra 1990 bola Národným inštitútom zdravia uskutočnená prvá klinická štúdia génovej terapie u ľudí⁶. Štvorročnému dievčatku s deficitom adenosín-deaminázy, ktorá spôsobuje ťažkú imunodeficienciu (ADA-SCID) boli odobrané T-lymfocyty, ktoré boli v podmienkach *ex vivo* vystavené pôsobeniu retrovírusov s génmi pre adenosín-deaminázu. Po deviatich dňoch kultivácie boli T-lymfocyty vrátené do krvného riečišťa. Dostavil sa dočasný pozitívny efekt. Prvý klinický úspech pri terapii neurodegeneratívnych chorôb opísal Finkel v roku 2016, keď použil antisense oligonukleotid (ASO), ktorý sa viaže na pre-mRNA

Zvieracie modely neurodegeneratívnych chorôb



M. musculus



Rattus norvegicus



S. scrofa



O. aries



M. mulatta

Obr. 1: Zvieracie modely neurodegeneratívnych chorôb

survival motoric neuron (SMN2 – motorický neurón prežitia 2). Ten bol podávaný do lumbálnej miechy a predĺžil prežívanie u pacientov so spinálnou svalovou atrofiou prostredníctvom zvýšenej produkcie proteínov motorických neurónov²⁷. Výsledky klinického skúšania priniesli dôkaz, že neurodegenerácia u pacientov môže byť spomalená zacielením terapie na génovú expresiu. Tento priekopnícky prístup otvoril bránu ďalších pokusov na zvieratách o génovej terapii iných monogénnych neurodegeneratívnych ochorení. Ako každá terapia má svoje výhody, tak má aj nevýhody. K nevýhodám génovej terapie môžeme zaradiť veľmi vysokú finančnú náročnosť, technickú a technologickú náročnosť, môže sa vyskytnúť častá nízka úspešnosť terapie, pokiaľ je problém s uchytením vnesenej genetickej informácie, pri použití napr. lentivírusu ako nosiča, sa môže objaviť imunitná odpoveď organizmu.

Neurodegeneratívne ochorenia

Neurodegeneratívne ochorenia sú charakteristické zaníkaním populácii neurónov v ľudskom mozgu, relatívnym zmnžením glie a ukladaním proteínových inklúzií. To je spojené s vážnymi psychickými a neurologickými príznakmi⁸. Strata rozumových schopností, strata pamäti, halucinácie a zmeny správania sú typické psychické príznaky. K častým neurologickým poruchám patrí porucha reči, sťažená koordinácia. K najčastejším neurodegeneratívnym ochoreniam patrí Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, Jakobova-Creutzfeldova choroba a rôzne ataxie.

Rozvoj a genetika neurodegeneratívnych ochorení

Príčinou vzniku ochorenia je obmedzenie tvorby potrebných bielkovín, tvorba toxických proteínov, alebo modifikácia štruktúry bielkoviny, čo zapríčini, že táto

bielkovina sa stane nepoužiteľnou. Tieto zmeny vedú k poruche metabolizmu bunky, čo zapríčini morfologické zmeny – atrofie nervového tkaniva mozgu a tým stratu jeho funkcií. Podľa miesta poškodenia sa vyvíjajú klinické príznaky.

ALS- Amyotrofická laterální skleróza

ALS je neurodegeneratívne ochorenie charakterizované degeneráciou dolných motorických neurónov⁹. Prevalencia ochorenia je 5 pacientov na 100 000 obyvateľov¹⁰. Etiopatogenéza nie je úplne objasnená. U 20 % dedičných ALS dochádza k defektu v SOD1 géne na chromozóme 21 (SOD 1 kóduje superoxid dismutázu, ktorá prispieva k premene superoxidového aniónu na kyslík a peroxid vodíka), keď je mutácia SOD1 vystavená zvýšenému oxidačnému účinku – stres¹¹. Typickými klinickými príznakmi sú paréza, svalová atrofia, kŕče¹². Mozog nakoniec nie je schopný ovládať väčšinu svalov, a pacient zostáva paralyzovaný pri zachovaní psychických a mentálnych schopností. ALS je letálna, neliečiteľná choroba. Po vzniku prvých príznakov je priemerná doba prežitia 2 – 3 roky. Príčinou smrti je zlyhanie dýchania a následné udusenie¹⁰. Rozlišujeme tri formy ALS, a to sporadickú, familiárnu a guamsku. Najčastejšou formou je forma sporadická, zatiaľ čo familiárna forma (5 – 10 %) predpokladá skorší výskyt v rodine – dedičný pôvod¹³. Tretia spomínaná forma odkazuje k mimoriadnemu výskytu choroby na tichomorskom ostrove Guam v 50. rokoch 20. storočia.

Ranné štádium

Medzi príznaky rannej formy ALS patrí zvýšená svalová slabosť a atrofia (75 % prípadov), v rukách a nohách, taktiež dochádza k poruchám reči v niektorých prípadoch dochádza k zhoršenému prehĺtaniu, dýchaniu a ku kŕčom postihnutých svalov.

Tab. I: Druhy zvieracích modelov neurodegeneratívnych chorôb

Neurodegeneratívne ochorenie	Zvierací model							
	Hlodavce		Primáti		Ovce		Prasatá	
Huntonova choroba	Transgénny model myši							
	Fragment of <i>HTT</i>	R6/2, N 171-82Q,	Fragment of <i>HTT</i>	exon1 <i>HTT</i> , LV-N171 <i>HTT</i>			Fragment of <i>HTT</i>	N 208 <i>HTT</i> , N 548 <i>HTT</i>
	Full lenght <i>HTT</i>	YAC 128, BAC HD,			Full lenght <i>HTT</i>	OVT 73	Full lenght <i>HTT</i>	Liběchovské miniprasa
	Transgénny model potkana						Knock-in HD model	82CAG repetícií
	Full lenght <i>HTT</i>	TG 51, BAC					Knock-in HD model	150CAG repetícií
	Knoc -in HD models							
	Myš	Q 18,48,78,92,111,						
		HdhQ50, 100, 150, 200, 250, 300						
Alzheimer	127 myších modelov rozdielných v tau proteíne							
Parkinson	18 modelov potkanov a myši							
ALS	35 modelov myši							

Pokročilé štádium

Väčšina pacientov sa postupom času stáva imobilná, neschopná ovládať ruky a nohy. Taktiež stráca schopnosť rozprávať a prehĺtať. V konečných štádiách choroby je nutné použiť pľúcnu ventiláciu.

Parkinsonova choroba

K ďalším ochoreniam centrálnej nervovej sústavy patrí Parkinsonova choroba¹⁴. Je charakterizovaná úbytkom nervových buniek v časti mozgu, nazývaného substantia nigra¹⁵. Nervové bunky v tejto časti mozgu produkujú dopamín, ktorý zaisťuje prenos signálu medzi neurónmi. Pri nedostatku dopamínu pacient prestáva byť schopný kontrolovať svoj pohyb. Približný počet chorých ľudí v ČR je 15000¹⁶. Častým prejavom choroby je trasenie končatín, pocit únavy a stuhnutosť končatín, kŕče, problémy so spaním. To vyústi k spomaleniu chôdze a k zhoršenej mimike. Najväčšie riziko Parkinsonovej choroby sa vyskytuje u ľudí starších ako 50 rokov. Asi u 15 % pacientov sa táto choroba môže prejaviť pred dovŕšením 40 rokov alebo ešte skôr.

Príznaky Parkinsonovy choroby

V pokročilých fázach choroby sa vyskytujú vážne pohybové problémy. Stav pacienta sa behom dňa strieda. Miestami môžu budiť dojem takmer zdravých ľudí a v priebehu malého okamihu budú s vypätím všetkých síl len stuhnuto sedieť alebo trpieť mimovoľnými pohybmi. Častými prejavmi sú pocity únavy, trias rúk, stuhnuté kríže a končatiny, kŕče, častá je zápcha a problémy so spánkom. V ďalšom kroku dochádza k spomaleniu chôdze, k zhoršenej mimike a k zhoršovaniu čuchu a chuti. K chorobe sa často pridružuje depresia.

Alzheimerova choroba

Ide o progresívne chronické ochorenie nervovej sústavy. Dochádza k degeneratívnemu zániku neurónov¹⁰. K rizikovým faktorom patrí vysoký vek¹⁷ a prítomnosť apolipoproteínu E4¹¹. Významnú úlohu zohráva ukladanie amyloidu β v mozgovom tkanive, kde vytvára tzv. Alzheimerovské plaky¹¹. V oblasti plakov dochádza k neurodegenerácii a odumieraniu neurónov. Taktiež dochádza k degenerácii tau-proteínu. Poškodený tau-proteín vytvára v neurónoch neurofibrilárne uzlíčky, tie môžu poškodiť cytoarchitektúru bunky a spôsobiť smrť bunky¹⁸. K prvým príznakom choroby patria poruchy pamäti, postupne sa pridáva zhoršená schopnosť kognitívnych, intelektuálnych ale i fyzických schopností. Časté je rýchle zabúdanie, opakovanie rovnakých otázok, strácanie predmetov a ich odkladanie na nesprávne miesta. Dochádza k zhoršenému hľadaniu správnych slov pri komunikácii, zhoršenej orientácii v priestore. Časté sú bludy¹⁹.

Štádia choroby

Ranné štádium

Dochádza k sťaženému dorozumievaniu, k zabúdaniu základných vecí, vyskytuje sa zvýšená podozrievavosť, vzťahovačnosť, časté je popieranie problému, poruchy pamäte a dezorientácia v čase. Na známych miestach dochádza k blúdeniu, môžu sa prejaviť známky depresie, úzkosti a agresivity.

Stredné štádium

Poruchy súdnosti, človek začína byť voči sebe nekritický, dochádza k prehlbovaniu zmien osobnosti, neschopnosť vykonávať bežné aktivity ako je varenie a nakupovanie, potreba pomoci pri vykonávaní osobnej hygieny a obliekaní. Komunikácia sa stáva obťažnou, človek sa často potuluje a pri tom blúdi.

Neskoré štádium

Pacient v neskorom štádiu často nepoznáva blízke osoby, nechápe dianie okolo seba. Dochádza k poruchám príjmu potravy, k strate súvislej reči. Častá je zmätenosť. S postupným zhoršením chôdze dochádza taktiež k poruchám močenia a vylučovania stolice. Dôjde k úplnej strate sebestačnosti a upútaniu na invalidný vozík. Končí smrťou¹⁹.

Huntingtonova choroba (HCH)

Ide o autozomálne dominantne dedičné ochorenie, s neurodegeneratívnymi príznakmi a progresívnym priebehom. Vo väčšine prípadov sa prejaví v dospelosti, len asi 5 % prípadov v detskom veku²⁰. Typické príznaky sú choreatické pohyby, zníženie mentálnych schopností. Priebeh je progresívny s fatálnym koncom. V roku 1983 bol identifikovaný polymorfný DNA marker, lokalizovaný na ľudskom chromozóme 4, signalizujúci HCH²¹. V roku 1993 bol objavený jediný kauzálny gén, ktorého mutácia je zodpovedná za HCH²².

Riziko choroby podľa počtu opakovania tripletu CAG

- 10 – 26 CAG – jedinec je zdravý, bez choroby (normálny počet u zdravého jedinca)²³
- 27 – 35 CAG – ak nevznikne mutácia, jedinec je zdravý, pri náhodnej mutácii prejavujúcej sa zmnžením tripletu, môže dôjsť k ochoreniu
- 36 – 41 CAG – pacienti majú Huntingtonovu chorobu, prejavujúca sa v starobe²⁴
- 40 – 55 CAG – prejav ochorenia je viditeľný okolo 40 roku života^{25, 26}
- ≥ 60 CAG – prejavy začínajú už v detstve²³

Formy Huntingtonovej choroby

- Klasická – začína obvyčajne medzi 35 – 50 rokom života (cca 90 % všetkých prípadov)
- Juvenilná – začiatok do 20 roku života (cca 5 %)
- Forma s neskorým začiatkom – začiatok po 60 roku života (cca 5 %)

Klasická forma

Prvé príznaky sa objavujú medzi 35 – 50 rokom života. Počiatkové problémy sú nešpecifické – poruchy chovania, zmeny povahy, môžu sa vyskytnúť časté depresívne stavy. V neskoršom štádiu sa prejaví demencia. V začiatočnom štádiu sa objavujú mimovoľné pohyby a porucha cielených pohybov. V neskoršom štádiu dochádza k neistote pri chôdzi, poruchám reči, taktiež môže nastať problém s prehĺtaním, čo vyústi k následnej kachexii. V pokročilom štádiu ubudne mimovoľných pohybov. Priebeh choroby je individuálny, ale v priemere pacient v priebehu 15 rokov sa stáva závislým na starostlivosti okolia. Umiera v nezadržateľnom marazme, ku ktorému sa väčšinou pričlení infekcia a iné druhotné komplikácie^{20, 27}.

Juvenilná forma

Začína pred 20. rokom života. Jej prevalencia je približne 5 %²⁸ z celkového počtu všetkých pacientov postihnutých Huntingtonovou chorobou. Dokonca sa môže stať, že sa choroba prejaví pred 10 rokom (0,5 – 1 % všetkých prípadov). Typický začiatkový prejav je nezvládanie školských aktivít (dôsledok kognitívnej poruchy a motorického spomalenia)²⁰. Jasným príznakom je dyskoordinácia pohybu. Pozorujeme poruchy správania sa – výbuchy zlosti, agresivitu, antisociálne správanie²⁹. Rigidita, dystonia a hypokinéza sú hlavnou príčinou rýchle progredujúcej poruchy stability a chôdze. Mimovoľné pohyby sa obvykle neobjavia. Asi u 30 % postihnutých jedincov sa objavujú epileptické záchvaty^{28, 30}. Dochádza k poruchám prehltnutia a výslovnosti. Rýchla progresia vedie k demencii a k nesamostatnosti, úplná závislosť na starostlivosti okolia²⁰.

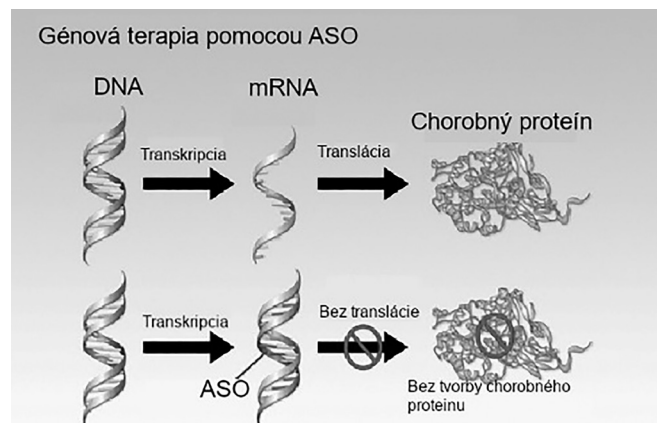
Forma s oneskoreným začiatkom

Prevalencia je okolo 5 %. Jej prvotné príznaky sa začínajú objavovať okolo 60. roku života. Veľmi výnimočné je pozorovanie prvých príznakov až po dovŕšení sedemdesiatky. Táto forma má pomalý priebeh, a pacienti sa dožívajú bežného priemerného veku zdravej populácie. Hlavným príznakom sú mimovoľné pohyby. Obvyčajne nespôsobujú závažné postihnutie základných denných aktivít a pacienti sú po motorickej stránke sebestační. Výraznej demencii obvyčajne nedôjde³¹.

Terapeutické princípy génovej terapie neurodegeneratívnych chorôb

ASOs- antisense oligonucleotides

Princípom ASOs je využitie ssDNA o dĺžke 18 – 30 báz, ktoré sú určené k cielej degradácii pomocou komplementárnej mRNA. Cieľ – zabrániť expresii mRNA kódujúcej proteín. Hybridizujú so špecifickou oblasťou cieľovej mRNA za vzniku stabilného komplexu DNA-RNA, ktorý je následne štiepení RNázou³². Degradovaná mRNA potom nemôže byť podrobená translácii. Ako náhle je ASOs opäť voľné, je schopné znovu sa naviazať a celý proces sa zopakuje. Nevýhodou je ľahká degradácia endo a exonuklázami v bunke ešte pred naviazaním na mRNA. Stratégia – ciele zníženie hladiny mutantného proteínu, čím sa ovplyvní fenotyp. V Londýne a v Kanade boli v septembri 2015 prvýkrát použité ASO na liečbu Huntingtonovej choroby³³.



Obr. 2: Génová terapia pomocou ASO

Na liečbu bol použitý IONIS-HTT. Ide o 20-nucleotidovú sekvenciu obsahujúcu nepriepustné atómy kyslíka na fosfátovej kostre³⁴. IONIS-HTT úspešne redukoval expresiu mutantnej *HTT* alel aj wild-type *HTT* alely. V roku 2015 bola použitá na princípe ASO liečba Nusinersen na potlačenie prejavov ALS choroby. (Obr. 2)

RNA interferencia (RNAi)

Ďalším spôsobom umlčania génovej expresie je RNA interferencia. U organizmov chráni bunky pred napadnutím vírusom. Počas vývoja organizmu reguluje génovú expresiu. Dĺžka RNA je 21 – 28 nukleotidov. Podľa pôvodu rozlišujeme siRNA a mikroRNA. Medzi veľmi prospešné supresívne účinky tlmenia RNA v génovej terapii patrí degradácia mRNA, translačná represia, tvorba represívneho chromatinu. Termín RNAi bol vytvorený pre sekvenčnú degradáciu mRNA z dlhej dvojreťazcovej dsRNA³⁵. RNAi môžeme rozdeliť do troch krokov.

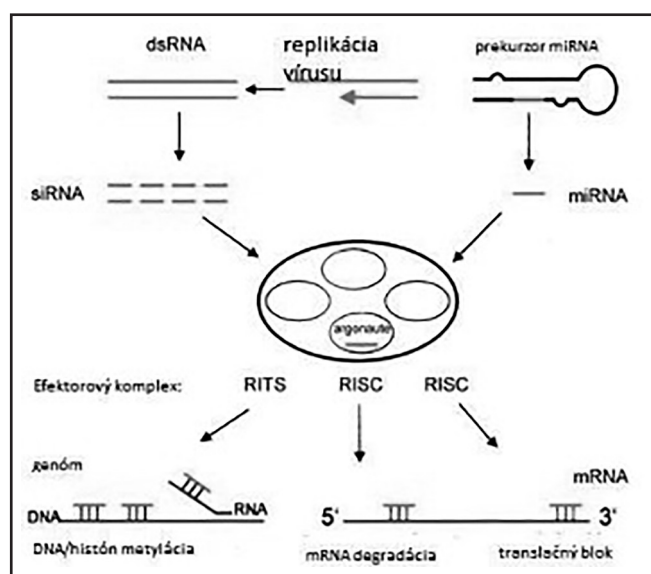
1. štiepenie dlhej dsRNA pomocou DICER,
2. naviazanie malých RNA na efektorový komplex nazývaný RISC
3. rozpoznávanie a štiepenie RNA pomocou RISC (RNA-induced silencing complex).

siRNA

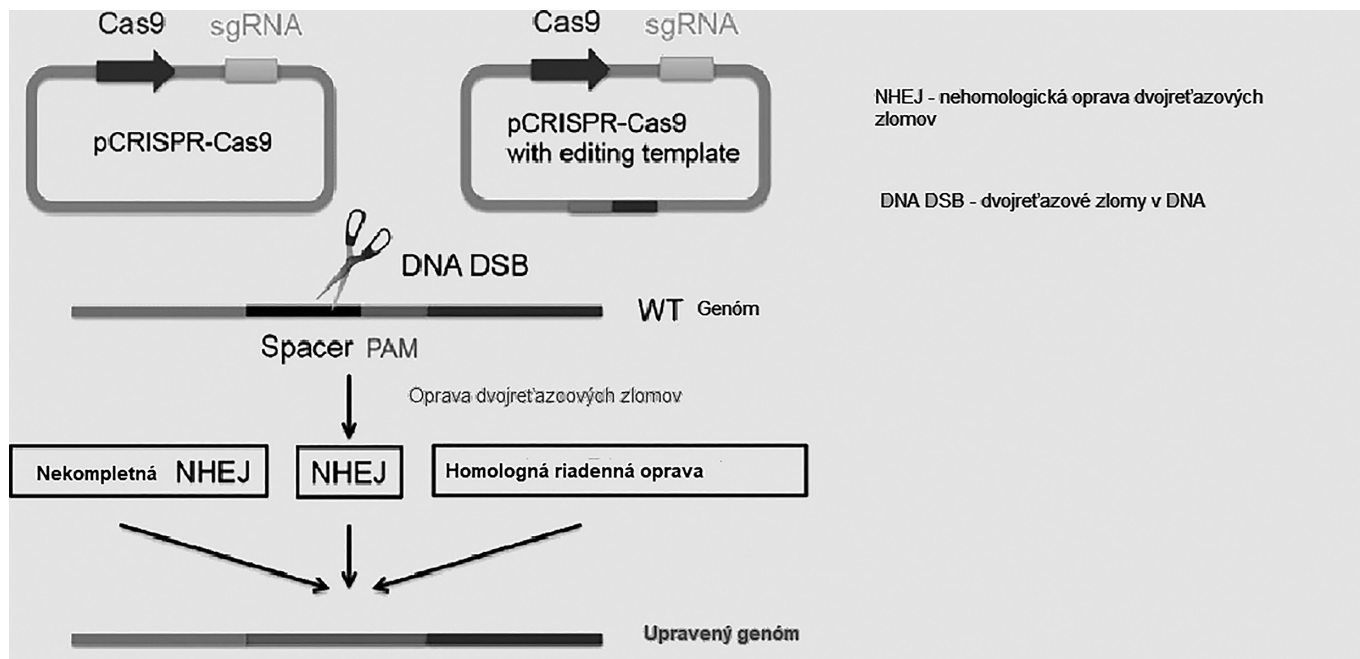
Do bunky ju zavádzame z terapeutických dôvodov. Jej najdôležitejšou schopnosťou je špecificky štiepiť cieľnú mRNA nielen v cytoplazme, ale jej aktivita bola zistená aj v jadre³⁶. Molekuly siRNA vznikajú pomocou enzýmu DICER (približne 200 kDa veľká RNáza III), ktorý štiepi dlhú dsRNA³⁷. Po rozštiepení a rozpletení je odstránené protizmyslové vlákno, a vytvorí sa umlčovací komplex indukovaný RNA (RISC)³⁸. Úlohou RISCu je v cytoplazme vyhľadať cieľovú mRNA a dokonale sa s ňou spárovať. Po spárovaní je RISC uvoľnený. (Obr. 3)

miRNA – mikroRNA

Ide o nekódujúcu RNA, bežne sa vyskytujúcu v bunke, ktorá hrá dôležitú úlohu v regulácii bunkových funkcií. Porucha regulácie miRNA má vplyv na veľký počet ľudských ochorení³⁹.



Obr. 3: RNA interferencia



Obr. 4: CRISPR/Cas9, DNA editácia

Mechanizmus pôsobenie miRNA

1. V jadre bunky sa najprv miRNA prepíše RNA polymerázou do pri-miRNA, ktorá sa skladá do vlásenky^{40, 41}.
2. Vlásoka vstúpi do komplexu s endonukleázou Drosha a vzniká prekursor miRNA (pre-miRNA)⁴².
3. V cytoplazme je pre-miRNA štiepená pomocou enzýmu DICER na 21 nukleotidový duplex miRNA.
4. Po odstránení zmyslového vlákna sa vytvorí RISC. Pretože RISC sa páruje nedokonalou, tak nedochádza k degradácii mRNA, ale len k inhibícii proteosyntézy.

CRISPR/Cas9, DNA editácia

CRISPR (Clustred Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Ide o 21 – 37 nukleotidov dlhé, pravidelne sa opakujúce palindromické repetície. Tieto repetície sú prerušované nerepetívnymi sekvenciami (medzerníkmi – spacers) o približne rovnakej dĺžke ako sú repetície. Súčasťou CRISPR lokusov sú CAS gény (CRISPR Associated). Tieto gény obklopujú repetície a medzerníky⁴³.

Mechanizmus pôsobenia CRISPR

Repetície – spacerové úseky sú prepísané ako dlhý prekursor, ktorý sa následne spracúva na malý crRNAs, ktorý určuje cieľovú sekvenciu (protospacer). Tieto cieľové sekvencie sú následne štiepené Cas9 proteínom (nukleáza v CRISPR systéme). CRISPR spacers sú potom použité k rozpoznaniu a umlčaniu exogénnych genetických elementov na úrovni DNA. Aby došlo k štiepeniu, je potrebný trojnukleotidový sekvenčný motív (NGG) na konci 3'cieľovej oblasti. Je známy ako protospacer – susediaci motív – PAM. PAM je prítomný v cieľovej DNA (nie v crRNA, ktorá ju rozpoznáva). Po naviazaní k cieľovej sekvencii Cas9 indikuje špecifický dvojláknový zlom. Nasleduje štiepenie DNA, zlom je opravený prostredníctvom bunkových reparačných mechanizmov. Buď je to NHEJ – nehomologné spojovanie koncov alebo je to HDR – homologná riadená oprava. Pomocou CRISPR-Cas9 systému môžeme uskutočniť

editáciu genómu, inhibíciu a aktiváciu – CRISPR interferencia⁴⁴. V roku 2017 bola táto metóda úspešne testovaná na modely myši pre Huntingtonovu chorobu⁴⁵. (Obr. 4)

Liečba neurodegeneratívnych ochorení génovou terapiou

ALS

Prvá klinická liečba ALS, génovou terapiou bola vykonaná 23. 12. 2016 v USA. Nazývala sa Nusinersen. Jej princípom bolo ASO⁹. Čo je dôležité pre ochorenia postihujúce nervový systém, ASO sa široko distribuuje, keď sa vstreknú do cerebrospinálnej tekutiny (CSF). Nusinersen bol lumbálnou punkciou priamo podaný do CSF. Účinnou látkou bol 2-metoxetyl modifikovaný ASO komplementárne k ISS-N1 nachádzajúcemu sa v intróne 7 pre-mRNA SMN2. Špecifická hybridizácia ASO/pre-mRNA obmedzuje chybný zostrih exónu 7, čím sa zvyšuje množstvo funkčného SMN vytvoreného SMN2. V predklinickej testovaní, veľmi dobré výsledky dosahuje AVXS-101 (a.k.a. scAAV9.CB.SMN a Charisma), ktorá dodáva gén SMN1 s použitím nereplikujúceho sa samokomplementárneho adeno-asociovaného vírusu sérotypu 9 (scAAV9)⁴⁶. Hlavnou výhodou tejto terapie nad nusinersenom je to, že AAV9 môže prekročiť hematocelulárnu membránu a tým umožňuje intravenózne podanie^{47–49}. Ďalšia úspešná predklinická štúdia bola robená na myšiach. Ako vektor bol použitý adeno-asociovaný vírus. V ňom bol vložený antisense exon AAV10-U7-hSOD. Podávanie tohto vektoru zvýšilo prežitie injektovaných myši, zabránilo strate hmotnosti a poklesu neuromuskulárnych funkcií⁵⁰.

Parkinsonova choroba

V súčasnej dobe prebiehajú predklinické štúdie. Najčastejšie ako vektor sa používa AAV (adenoasociovaný vírus) preto, lebo nevyvoláva zápalovú odpoveď⁵¹.

Pomocou tohto vektoru sa dodávajú gény, ako je kyselina glutámová (GAD), dekarboxyláza aromatických aminokyselín a neurotrofický faktor GDNF. Aby tieto vektory s génmi dokázali prekonať hematoencefalitickú membránu je použitý ultrazvuk⁵². Štúdia Feia, ukázala že intradermálna injekcia neurotrofického faktora odvodeného z mesencefalického astrocytu (MANF-mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor) poskytuje neuroprotektívne účinky na modely Parkinsonovej choroby u potkanov. Na dodanie ľudského génu hMANF bol použitý vektor AAV9. Transfer génu podporil prežitie dopaminergných neurónov, regeneráciu striatálnych vlákien a zvýšil hladiny striatálneho dopamínu⁵³. Pri použití adeno-asociovaných vírusových sérotypov 2 (AAV2) vektorov poskytovanie génu CDNF do striata poskytlo neuroprotektívne účinky na potkanom modeli Parkinsonovej choroby^{54, 55}.

Alzheimerova choroba

Zatiaľ prebiehajú predklinické štúdie na hlodavcoch. He a kolektív študoval dodanie AAV9 nesúcich zelený fluorescenčný proteín a CIP myšiam s Alzheimerovou chorobou (CDK 5 (cyklín dependentná kináza 5) inhibičný peptid, ktorý selektívne inhibuje aktivitu aberrantnej CDK 5 čím znižuje patologické zmeny a zabraňuje atrofii mozgu) (AAV9 –GFP-CIP) do mozgových buniek prostredníctvom intracerebroventrikulárnej infúzie v amyloidnom prekursorovom proteíne. Tri mesiace tejto liečby redukovali patologické zmeny ako hyperfosforylácia, bielkovinové depozície, astrocytóza a mikroglióza. Následne došlo k zlepšeniu pamäti, a k zníženiu prejavov úzkosti⁵⁶. Vyraďením Cdk5 z hipokampu sa zaoberal Castro. Použil injekciu vlásenkovej mikroRNA proti CDK5 (ShCDK5miR). Táto liečba predstavuje sľubnú stratégiu na liečbu Alzheimerovej choroby. Výrazne zabraňuje dysfunkcii priestorovej pamäti⁵⁷. Shukla a kolektív aplikoval liečbu na modely myši pomocou TFP5. TFP5 je modifikovaný skrátený 24-aa peptid odvodený z CDK5 aktivátor p35. Má schopnosť preniknúť cez hematoencefalickú bariéru po intraperitoneálnych injekciách. Inhibuje abnormálnu hyperaktivitu CDK5 a výrazne znižuje patológiu Alzheimerovej choroby. Aplikácia TFP 5 myšiam výrazne potlačila pa-

tologické prejavy choroby. Jej nevýhodou je opakované podávanie injekcie pre dlhodobú liečbu⁵⁸.

Huntingtonova choroba

V génovej terapii Huntingtonovej choroby sa najčastejšie využívajú ASO (antisense oligonukleotidy), mRNA interferencia, zink-fingers a CRISPR-Cas9 metódy. Ich úlohou je zníženie transkripcie mutovanej DNA. Zníženie HTT pomocou ASO bolo úspešné na zvieracích modeloch⁵⁹. V septembri 2015 bola prvýkrát podaná pacientom terapia IONIS-HTTRx založená na princípe ASO³⁴. Experimenty na myšiach dokázali zníženie expresie HTT a expresie proteínu asi o dve tretiny³³. Taktiež na zvieracích modeloch HCH boli úspešné prístupy na princípe siRNA⁵⁹. Stiles a kolektív použil infúzne podanie siRNA bez vírusového vektora do putamenu primátov. Dosiahol supresie HTT na celom striate⁶⁰. Holandská firma Uniqure v predklinických liečbach využíva RNA interferenciu za použitia mikro RNA (miRNA) a ako vektor je použitý AAV5⁶¹. Vďaka experimentom na Liběchovskom miniprasačom získala v januári 2019 povolenie ku klinickým štúdiám.

Terapie zamerané na DNA zahŕňujú Zinc-fingers a CRISPR-Cas9. Obe metódy dosahujú úspechy. CRISPR-Cas9 bola v r. 2017 úspešne testovaná na myšacom modeli HCH. Došlo k zmierneniu patológie, zlepšeniu motorických funkcií a predĺženiu prežitia⁵³.

Záver:

V predloženej práci som opísala základné neurodegeneratívne ochorenia so základnými princípmi génovej terapie. Opisujem nedávne molekulárne prístupy, ktoré boli použité ako predklinické štúdie génovej terapie neurodegeneratívnych chorôb. Tieto prístupy vedú k zníženiu toxického mRNA, po ktorej nasleduje zníženie mutovaného proteínu, ale taktiež môže ísť o dodanie chýbajúceho alebo defektne fungujúceho génu či jeho oprave.

Podakovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory Národného programu udržateľnosti MŠMT LO 1609.

Tab II: Zoznam génových terapií pre Huntingtonovu chorobu.

Génové terapie Huntingtonovej choroby			
	Alelová selektivita	Vektor	Sponzor
ASO			
Pre-mRNA degradácia	nie je	nie je	Ionis Pharmaceuticals
Pre-mRNA degradácia	SNP – ciele	nie je	Wave Life Sciences
Pre-mRNA degradácia	CAG repetície	nie je	Biomarin
RNA interferencia			
mRNA degradácia	nie je	AAV2	Spark
mRNA degradácia	nie je	AAV1	Voyager
mRNA degradácia	nie je	AAV5	Uniqure
Malé molekuly			
Skríningový program	neznáma	nie je	CHDI Foundation

Referencie:

1. Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH: *ILAR J.* 48, 356 (2007).
2. Morton AJ, Howland DS: *J. Huntingtons., DiS.* 2, 3 (2013).
3. Baxa M, Hruska-Plochan M, Juhas S, et al.: *J. Huntingtons., DiS.* 2, 47 (2013).
4. Li X-J, Li S: *J. Genet. Genomics* 39:, 239 (2012).
5. Costantini F, Chada K, Magram J: *Science* 233, 1192 (1986).
6. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al.: *Science* 270, 475 (1995).
7. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsaar J, et al.: *Lancet* 388, 3017 (2016).
8. Horáček Jiří ML: 78th ed. Vesmir; 1999.
9. Tosolini AP, Sleight JN: *Front. Mol. Neurosci.* 10, 405 (2017).
10. Nevšímalová S, Tichý J, Ružicka E: *Galén* 2002.
11. Goetz CG, MD Consult LLC.: *Saunders Elsevier* 2007.
12. Ambler Z, Univerzita Karlova.: *Galén* 2006.
13. Al-Chalabi A, van den Berg LH, Veldink J: *Nat. Rev. Neurol.* 13, 96 (2017).
14. Lang AE, Lozano AM: *N. Engl. J. Med.* 339, 1044 (1998).
15. Lang AE: *Neurology* 68, 948 (2007).
16. <http://www.spolecnost-parkinson.cz/res/data/038/004042.pdf>. Accessed May 8, 2019.
17. Robbins SL (Stanley L, Kumar V, Cotran RS: *Saunders/Elsevier*; 2010.
18. Yaari R, Corey-Bloom J: *Semin. Neurol.* 27, 032 (2007).
19. Budson AE, Solomon PR, Preceeded by: Budson AE: *Practical neurology*, 2012.
20. Roth Jan: *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* 2, 107 (2010).
21. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, et al.: *Nature* 306, 234 (1983).
22. Gusella JF, Persichetti F, MacDonald ME: *Mol. Med.* 3, 238 (1997).
23. Walker FO: *Lancet (London, England)* 369, 218 (2007).
24. Rubinstein DC, Leggo J, Coles R, et al.: *Am. J. Hum. Genet.* 59, 16 (1996).
25. Montoya A, Price BH, Menear M, et al.: *J. Psychiatry Neurosci.* 31, 21 (2006).
26. de Die-Smulders CEM, de Wert GMWR, Liebaers I, et al.: *Hum. Reprod.* 19, 304 (2013).
27. Zelená Věra, Fanfrdlová Zuzana RI: *Neurologie pro praxi* 10(1), 50 (2009).
28. Rasmussen A, Macias R, Yescas P, et al.: *Neuropediatrics* 31, 190 (2000).
29. Ribai P, Nguyen K, Hahn-Barma V, et al.: *Arch. Neurol.* 64, 813 (2007).
30. Siesling S, Vegter-van der Vlis M, Roos RA: *Pediatr. Neurol.* 17, 37 (1997).
31. Lipe H, Bird T: *J. Neurol. Sci.* 276, 159 (2009).
32. Dash P, Lotan I, Knapp M, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7896 (1987).
33. Bennett CF, Swayze EE: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 259 (2010).
34. Wild EJ, Tabrizi SJ: *Lancet. Neurol.* 16, 837 (2017).
35. Nejepinska J, Flemr M, Svoboda P: In: *Regulatory RNAs*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 111–149.
36. Robb GB, Brown KM, Khurana J, et al.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 133 (2005).
37. Jaskiewicz L, Filipowicz W: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 320, 77 (2008).
38. Carthew RW, Sontheimer EJ: *Cell* 136, 642 (2009).
39. Lu M, Zhang Q, Deng M, et al.: *PLoS One* 3, e3420 (2008).
40. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR: *RNA* 10, 1957 (2004).
41. Lee Y, Kim M, Han J, et al.: *EMBO J.* 23, 4051 (2004).
42. Lee Y, Ahn C, Han J, et al.: *Nature* 425, 415 (2003).
43. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al.: *PLoS Comput. Biol.* 1, e60 (2005).
44. Mali P, Esvelt KM, Church GM: *Nat. Methods* 10, 957 (2013).
45. Yang S, Chang R, Yang H, et al.: *J. Clin. Invest.* 127, 2719 (2017).
46. Mulcahy PJ, Iremonger K, Karyka E, et al.: *Hum. Gene Ther.* 25, 575 (2014).
47. Duque SI, Arnold WD, Odermatt P, et al.: *Ann. Neurol.* 77, 399 (2015).
48. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, et al.: *Nat. Biotechnol.* 27, 59 (2009).
49. Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, et al.: *Hum. Gene Ther.* 23, 382 (2012).
50. Biferi MG, Cohen-Tannoudji M, Cappelletto A, et al.: *Mol. Ther.* 25, 2038 (2017).
51. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, et al.: *Lancet* 369, 2097 (2007).
52. Fan C-H, Lin C-Y, Liu H-L, et al.: *J. Control. Release* 261, 246 (2017).
53. Yang F, Wolk A, Håkansson N, et al.: *Mov. Disord.* 32, 1631 (2017).
54. Bäck S, Peränen J, Galli E, et al.: *Brain Behav.* 3, 75 (2013).
55. Ren X, Zhang T, Gong X, et al.: *Exp. Neurol.* 248, 148 (2013).
56. He Y, Pan S, Xu M, et al.: *FASEB J.* 31, 3383 (2017).
57. Castro-Alvarez JF, Uribe-Arias SA, Kosik KS, et al.: *Front. Aging Neurosci.* 6 (2014).
58. Shukla V, Zheng Y-L, Mishra SK, et al.: *FASEB J.* 27, 174 (2013).
59. Keiser MS, Kordasiewicz HB, McBride JL: *Hum. Mol. Genet.* 25, R53 (2016).
60. Stiles DK, Zhang Z, Ge P, et al.: *Exp. Neurol.* 233, 463 (2012).
61. Evers MM, Miniarikova J, Juhas S, et al.: *Mol. Therapy* 26(9), 2163 (2018).

Súhrn:**Božena Levinská: Od zvieracích modelov neurodegeneratívnych chorôb ku génovým terapiám ľudských neurodegeneratívnych ochorení**

Pokiaľ sa ma vyvinúť účinná liečba, je potrebné poznať nie len príčinu choroby ale aj celkovú patofyziológiu choroby. Na dôkladne preštudovanie patofyziologických zmien nám slúžia zvieracie modely chorôb. Tie sa zároveň môžu využiť ako modelové organizmy na skúšanie potenciálnej terapie. Mnoho neurodegeneratívnych chorôb patrí doposiaľ k nevyliciteľným chorobám. U týchto chorôb sa zatiaľ potláčajú len príznaky, ale k vyliečeniu nedochádza. V dnešnej dobe prebieha niekoľko predklinických štúdií génovej terapie, ktoré by mohli okrem potlačenia príznakov chorobu spomaliť, dokonca i zastaviť, a to znížením tvorby toxického mRNA a znížením mutovaného proteínu, či nahradením poškodeného génu. Pozitívne výsledky génovej terapie na zvieracích modeloch, dávajú veľkú nádej pre pacientov, ktorí trpia „zatiaľ“ nevyliciteľným neurodegeneratívnym ochorením.

Kľúčové slová: Zvieracie modely, neurodegeneratívne ochorenia, génová terapia

Summary:**Božena Levinská: From Animal Models of Neurodegenerative Diseases to Gene Therapy of Human Neurodegenerative Diseases**

If an effective treatment is to be invented, it is necessary to know not only the cause of the disease but also the overall pathophysiology of the disease. Animal models of disease can serve for a thorough study of pathophysiological changes and at the same time they can be used as model organisms for testing potential therapy. Many neurodegenerative diseases have no cure so far, just therapy that can suppress symptoms. Nowadays, several preclinical gene therapy studies are ongoing that could, in addition to suppressing symptoms, slow the disease, or even stop it, by reducing the formation of toxic mRNA and reducing the mutated protein, or replacing the damaged gene. Positive results of gene therapy in animal models give a great hope to patients who are suffering from “yet” incurable neurodegenerative disease.

Keywords: animal models, neurodegenerative diseases, gene therapy

O B S A H

Úvodem	57
Šaradínová M.: Zpráva z konference	58
Benýšek J.: Parazitární cysteinové proteasy a jejich funkce v lidských patologiích	61
Rayová D., Zídková J., Svoboda P.: Role nikotinamidfosforibosyltransferasy v rakovinném bujení	65
Palánová A., Kupcová Skalníková H.: Nekódující RNA a maligní melanom	68
Božena Levinská: Od zvieracích modelov neurodegeneratívnych chorôb ku génovým terapiám ľudských neurodegeneratívnych ochorení	72

C O N T E N T

Editorial	57
Šaradínová M.: Report from the conference	58
Benýšek J.: Parasite cysteine proteases and their involvement in human pathology	61
Rayová D., Zídková J., Svoboda P.: The role of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cancerous growth	65
Palánová A., Kupcová Skalníková H.: Noncoding RNA and malignant melanoma	68
Božena Levinská: From Animal Models of Neurodegenerative Diseases to Gene Therapy of Human Neurodegenerative Diseases	72

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

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 a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

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

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

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

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).