

B I P R O S P E C T

Dvacátýdruhý ročník
Číslo 3/2012

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

BULLETIN BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)

a
člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)

Redakční rada

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<http://bts.vscht.cz>

B I P R O S P E C T

22th Volume
No. 3/2012

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

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

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

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

For more information contact the editorial board or directly:

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

ÚVODEM

Vážení přátelé,

jako každoročně, i letošní léto bylo plné zajímavých vědeckých konferencí, jichž jsme se většinou z finančních důvodů nemohli zúčastnit. Dovolte nám, abychom Vám připomněli alespoň ty dvě nejdůležitější události.

První z nich bylo **15. Mezinárodní biotechnologické symposium** (IBS 2012) pořádané ve dnech 16. – 21. 9. 2012 v jihokorejském Daegu (<http://www.ibs2012.org>).

Druhou významnou mezinárodní událostí, která se nás významně týká, byl již **15. Evropský biotechnologický kongres v Istanbulu**, který se konal 23. – 26. 9. 2012 v tureckém Istanbulu. V rámci tohoto kongresu se již tradičně konala valná hromada EFB, na níž naši společnost zastupoval p. prof. RNDr. Ivo Fréborst, CSc., ředitel Centra pro biotechnologický a zemědělský výzkum regionu Haná (www.cr-hana.eu). Je mým potěšením Vám oznámit, že p. prof. Fréborst byl zvolen do výkonného výboru EFB a bude tam zastupovat naši společnost i ČR. Informaci o 15. EFB podanou p. prof. Fréborstem naleznete v tomto čísle. Rád bych Vám znovu připomněl, abyste občas otevřeli webové stránky EFB (www.efb-central.com), kde naleznete řadu základních i aktuálních informací a mimo jiné si zde můžete prohlédnout články publikované v časopise EFB „European Biotechnology“, který letos vychází již čtvrtým rokem. Naleznete tam i seznam akcí s biotechnologickou tematikou, na nichž se EFB podílí jako spolupořadatel. Pro příští rok to jsou následující akce: Recombinant Protein Production (6. – 9. 3. 2013, Laupheim, NSR), 5th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi (4. – 7. 6. 2013, Montpellier, Francie), 10th Carbohydrate Bioengineering Meeting (21. – 25. 4. 2013, Praha, ČR), 11th Biotrans Conference (datum ještě nestanoveno, Manchester, GB) a především již druhá konference pořádaná ve spolupráci s naší Biotechnologickou společností **Olomouc Biotech 2013 Plant Biotechnology: Green for Good II (17. – 21. 6. 2013, Olomouc, ČR)**. **Webová stránka této konference je <http://www.cr-hana.eu/G4G2>, kde naleznete již první cirkulář.**

V letošním roce náš významný partner, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, oslavil 60. let samostatné existence. Slavnostní zasedání akademické obce

VŠCHT Praha se uskutečnilo 1. října 2012 v Břevnovském klášteře za účasti mnoha významných hostů, především rektorů, případně prorektorů, všech vysokých škol v ČR. Na zasedání promluvil rektor VŠCHT p. prof. Ing. Karel Melzoch, CSc. (mimo jiné i člen Rady naší společnosti), který zde udělil dva tituly *doctor honoris causa* dvěma mimořádným osobnostem české a světové vědy p. prof. RNDr. Václavu Pačesovi, DrSc. a p. prof. Ing. Pavlu Hobzovi, DrSc. a dále pak medaile Emila Votočka osobnostem, které se zasloužily o rozvoj a úspěchy VŠCHT. Podrobnosti o této události i další aktuální informace naleznete zájemci na webových stránkách VŠCHT Praha (www.vscht.cz) v rubrice „aktuality“.

Jako každoročně pořádá Česká komise GMO, ve spolupráci s VŠCHT Praha, veřejnou schůzi a seminář. Akce se uskuteční opět v Národní technické knihovně v Dejvicích 1. listopadu ve 13 hod.

V tomto čísle pokračujeme ve zveřejňování stručných aktuálních informací pod názvem „Víte, že....?“ a tradičně následují přehledné články, které Vás určitě zaujmou.

Jak jsme Vás již informovali, proběhnou letos na podzim **volby Rady a Revizní komise naší společnosti**. Kandidátky byly sestaveny na základě návrhu členů a snaží se zahrnout reprezentanty našich významných institucionálních členů. Volby probíhají elektronicky. Pokud jste nám nesdělili Vaši elektronickou adresu, jste členem a chcete volit, vystřihněte kandidátky Rady a Revizní komise z čísla Biopropectu, přeškrtněte kandidáty, se kterými **nesouhlasíte**, dejte do obálky, na níž napíšete Vaše členské číslo (je uvedeno na Biopropectu, který dostáváte) a pošlete na adresu Ing. Dana Pokorná, CSc., Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6 nejdéle do 30. 11. 2012.

Velice oceníme Vaše příspěvky do Biopropectu, a to jak odborné, tak informativní. Těšíme se na Vaši spolupráci.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST

Člen ČSVTS a Evropské federace biotechnologických společností (EFB)

Kandidátka pro volby v r. 2012

Rada Biotechnologické společnosti a revizní komise

Rada:

Ing. Iva Pichová, CSc.	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha
Prof. Ing. Martin Fusek, CSc.	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha
Doc. Ing. Radovan Hynek, CSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha
RNDr. Milan Fránek, DrSc.	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno
Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha
Doc. Ing. Pavel Kotrba, CSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha
RNDr. Pavel Kyslík, CSc.	Mikrobiologický ústav AV ČR
Ing. Martin Bláha	Lonza Biotec, s.r.o., Kouřim
Doc. Ing. Martin Mandl, CSc.	Přírodovědecká fakulta Masarykovy university, Brno
Ing. Dana Pokorná, CSc.	Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Praha
Ing. Leona Paulová, PhD.	Ústav biotechnologie, VŠCHT, Praha
Prof. Ing. Karel Melzoch, CSc.	Ústav biotechnologie, VŠCHT, Praha
Doc. RNDr. Lenka Tůmová, CSc.	Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové
Ing. Peter Šebo, CSc.	Mikrobiologický ústav AV ČR
Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.	Biotechnologický ústav AV ČR
RNDr. Tomáš Vaněk, CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, Praha
Prof. Ing. Karel Voříšek, CSc.	Česká zemědělská universita, Praha-Suchdol
Prof. Ing. Jana Zábranská, CSc.	Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Praha
RNDr. Ludmila Zajoncová, CSc.	Př. Fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc
RNDr. Ivo Frébort, CSc.	Centrum pro biotechnologický a zemědělský výzkum regionu Haná, Olomouc
Prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.	JČU, České Budějovice

Revizní komise:

Ing. Jan Kopečný, DrSc.	Ústav fyziologie a genetiky AV ČR
Prof. Ing. Michal Dohányos, CSc.	Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Praha
Prof. Ing. Tomáš Macek, CSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha
Doc. Vojtěch Spiwok, PhD.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha

VÍTE, ŽE

- V Evropě jsou blízko povolení první dva léčebné postupy genové terapie. První spadá do kategorie „*in vivo*“ terapie, kdy virus nesoucí gen pro produkci lipoprotein lipasy (LPL) je injikován nemocnému. Jedná se o vzácnou nemoc (onemocní 1 – 2 lidé z milionu), kdy chybějící enzym, mající významnou úlohu v odbourávání tuků, způsobuje závažné zdravotní komplikace. Aplikace má být přesto omezena jen na vážné případy, kdy nemocný trpí krutými či opakovanými záchvaty pankreatitidy. Druhý léčebný postup patří do kategorie „*ex vivo*“. Jedná se o léčbu imunodeficiency ADA-SCID, kdy příslušný gen je vpraven do buněk odebraných pacientovi a ošetřené buňky kostní dřeně mu jsou následně zpět injikovány. Oba postupy se snaží do praxe prosadit fy. Glybera, která patří holandské firmě UniQure (více doi: 10.1038/nature.2012.11048)
- První zemí na světě, která povolila používání genové terapie v léčbě rakoviny byla v r. 2004 Čína. V Evropě a v USA genová terapie není dosud povolena.
- Firma Evonik staví v Rusku (ve Volgodonsku u Rostova) továrnu na výrobu L-lysinu (pod názvem „Biolys“) určenou pro výživu zvířat. V r. 2014 má roční produkce dosáhnout 100 000 t. (Process Worldwide 14, č. 4, září 2012, str.10)

- Firma LPP Combustion připravuje v Omanu výrobu syntetického “přírodního plynu” z tekutých paliv, mimo jiné i z biodieslu a ethanolu (Process Worldwide **14**, č.4, září 2012, str.11)
- Firma Evonik plánuje v Singapuru výstavbu továrny na výrobu methioninu pro krmivářské účely. V r. 2014 má produkce dosáhnout kapacity 150 000 t. Tím firma dosáhne roční produkce DL-methioninu 580 000 t. Její současná produkce v továrnách v NSR, USA a Belgii činí 430 000 t. (Process Worldwide **14**, č.4, září 2012, str.15).
- Dánský výrobce enzymů, firma Novozymes, bude vyrábět enzymy pro produkci biopaliv v Nebrasce (Blair), USA. Produkce biopaliv (nového typu) má v r. 2014 dosáhnout 250 milionů galonů (Process Worldwide **14**, č.4, září 2012, str.16).
- V r. 2011 ministerstvo obrany USA nakoupilo 450 000 galonů biopaliv, hlavně pro letadla. (Process Worldwide **14**, č.4, září 2012, str.16).
- Na letošním veletrhuACHEMA byly uděleny inovační cenyACHEMA v 9 kategoriích. V kategorii biotechnologie obdržel cenu Dennis Leong z firmy Beta Renewables. V kategorii farmaceutické technologie získal cenu Thomas Heinrich (Fette Compacting) (Process Worldwide **14**, č.4, září 2012, str.40 – 42).
- Holding Renova plánuje v blízkosti Moskvy postavit závod na výrobu biologicky odbouratelných polymerů za 400 milionů dolarů (Technický týdeník **60**, č. 15, červenec 2012, str. 17).
- Vědci z Rice University vyvinuli bakteriální kmen *E.coli*, který je schopen transformovat sacharidy na butanol 10x rychleji než jiné mikroorganismy. Komerční aplikace se plánuje za 3 – 5 let (Technický týdeník **60**, č. 15, červenec 2012, str. 20).
- Na popsání genomu banánovníku se podíleli i čeští vědci z olomouckého pracoviště Ústavu experimentální botaniky AV ČR a Regionálního centra Haná pro biotechnologie a zemědělství (Technický týdeník **60**, č. 15, červenec 2012, str. 13).
- Nedávné publikování názoru, že arsen může u některých organismů nahradit fosfor a tak se stát nezbytným prvkem pro život se ukázal jako špatná interpretace získaných výsledků (<http://cenm.ag/gfajl>, C&EN July 16, 2012 str. 7)
- Vědci z Tuft University zjistili, že hedvábí může uchovat vakcíny bez degradace, aniž by byly skladovány v chladu (C&EN July 16, 2012 str. 41, Proc. Natl. Acad. Sci. USA DOI: 10.1073/pnas.1206210109)
- Gilead Sciences získala od FAD povolení k aplikaci dvou léčiv. První je nám všeobecně známá Truvada (kombinace emtricitabinu a tenofoviru) k léčbě HIV v kombinaci s dalšími antiretrovirovými a snížení riziku infekce HIV. Druhým léčivem je Qsymia (kombinace dvou již dříve povolených léčiv phenterminu a topiramatu) k léčbě obezity (C&EN July 23, 2012 str. 15)
- Koření curry a v něm obsažený curcumin má údajně pozitivní vliv na obnovu ztráty paměti a zpomalení Alzheimerovy choroby (C&EN July 30, 2012 str. 44 – 46)
- Firma RARECYTE pracuje na vývoji přístroje k detekci rakovinných buněk v krvi. Princip spočívá v tom, že větší objem krve se odstřeďuje, aplikuje se fluorescenční barvivo a rakovinné buňky se objeví ve vrstvě mezi červenými krvinkami a plasmou (C&EN September 10,2012, str. 21)
- Fluorogenní sonda specifická pro enzym produkovaný bakterií způsobující tuberkulosu umožňuje detegovat nízkou hladinu pathogena v lidském hlenu během 10 minut (C&EN September 10,2012, str. 27).
- Robert J. Lefkowitz a Brian K. Kobilka získali Nobelovu cenu za chemii za objevení mechanismu působení receptorů G-proteinů (G-protein-coupled receptors/GPCRs). Tyto receptory umožňují buňkám reagovat a odpovědět na vnější signály a jsou cílem mnoha často předepisovaných léčiv, jako jsou např. beta blokátory, antihistamika a antidepresiva.
- Nobelovu cenu za fyziku získali pro rok 2012 Serge Haroche a David J. Wineland za práci na kvantových informačních systémech. Jejich objev má i praktické využití, např. při měření času atomovými hodinami, které si využívají i v systémech GPS.
- Letošní laureáty Nobelovy ceny za medicínu jsou Brit John Gurdon a Japonec Šinja Jamanaka za výzkum kmenových buněk. Ukázali, že kmenové buňky mohou být využity lékaři k náhradě postižených tkání a částí těla.

ZPRÁVA Z 15. KONGRESU EUROPEAN FEDERATION OF BIOTECHNOLOGY (EFB) – ISTANBUL

V pořadí již 15. Evropský kongres biotechnologie (European Congress on Biotechnology, pořádaný European Federation of Biotechnology) s podtitulem „bio-crossroads“ se konal ve dnech 23.-26. září 2012 v Istanbulu a spolu se satelitními konferencemi přivítal více než tisíc účastníků ze 48 zemí pěti kontinentů. Program kongresu sestával z 6 společných plenárních přednášek významných vědeckých osobností a dále 94 přednášek a více než 600 posterů ve 4 sekcích, které byly rozděleny podle již zažitého barevného kódu: bílá – průmyslové biotechnologie, červená – biotechnologie v medicíně, zelená – rostlinné a environmentální biotechnologie, fialová – systémová biotechnologie a nanotechnologie. Kongres zahájil president EFB Marc van Montagu a úvodní přednášku na téma vývoj nízkonákladových diagnostických souprav pro rozvojové země přednesl George Whitesides (Harvard University). Velká pozornost byla věnována novým poznatkům a vyvíjeným metodikám v oboru systémové biologie, kterou uvedl svojí plenární přednáškou Ruedi Aebersdorf (ETH Zürich). Mezi další hvězdné účastníky kongresu patřili např. Werner Arber, objevitel restričních endokuleas a nositel Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu z roku 1978, vynálezce „zlaté rýže“ Ingo Potrykus a Huanming Yang, ředitel Beijing Genomic Institute, jednoho z nejvýznamnějších center sekvenování genomů.

Jednání kongresu byla přímo nabitá kvalitními odbornými vystoupeními i soubornými prezentacemi nových trendů v podání pozvaných špičkových odborníků, takže bylo poměrně obtížné si vybrat z paralelní nabídky sekcí. Všechny přednášky byly hojně navštěvovány posluchači, k čemuž jistě přispělo i kvalitní zázemí kongresového centra v Grand Hotelu Cevahir i jeho umístění v turisticky odlehlejší části Istanbulu.

V sekci zelené biotechnologie, jejíhož jednání jsem se převážně účastnil, často zaznívala z úst přednášejících i diskutujících kromě vědeckých výsledků i velká kritika na stranu nesmyslných byrokratických omezení výzkumu, vývoje a využívání geneticky modifikovaných plodin státy EU, a to zejména v případech, kdy jsou tyto produkty a technologie cíleny na odstranění chudoby, hladu a podvýživy v zemích Afriky a jihovýchodní Asie.

Kongres zakončil svojí přednáškou Christian Paternmann, bývalý ministr SRN pro vědu a vzdělávání a programový ředitel DG Research Evropské komise, který představil strategii EU v následujícím programovacím období namířenou směrem k většímu využití biotechnologií a vytvoření „biobased economy“. Pro konání dalšího, 16. kongresu EFB byl vybrán Edinburgh, v termínu 20-23. července 2014.

Ivo Frébort, C.R. Haná, Olomouc

BIOLOGICKÁ LÉČIVA – TEORETICKÉ ZÁKLADY A KLINICKÁ PRAXE

Autoři: M. Fusek, L. Vitek, J. Blahoš jr., M. Hajdúch, T. Ruml a kolektiv

Nakladatelství Grada Publishing, a.s. (ISBN 978-80-247-3727-0)

ve spolupráci s edičním střediskem VŠCHT (ISBN 978-80-7080-810-8), 2012

Počet stran 224 + 4 barevné přílohy

Kniha *Biologická léčiva* je první českou ucelenou publikací o dynamicky se rozvíjejícím oboru léčiv. *Biologická léčiva* jsou skupinou látek, které jsou připravovány biotechnologickými procesy a to především expresí peptidů a proteinů v prokaryontních či eukaryotních buňkách. Na rozdíl od klasických, syntetických léčiv se jedná o molekuly s vysokou relativní molekulovou hmotností z čehož plyne jednak rozdílný postup výroby, ale také vyšší nebezpečí denaturace a odlišný způsob charakterizace těchto látek. Důležitým rozdílem oproti produkci například antibiotik, které se většinou připravují také biotechnologickými postupy, je nutnost vnesení cizorodé genetické informace do hostitelského organismu, kterým bývají většinou buňky *E.coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, BHK či CHO buňky.

Kniha *Biologická léčiva* obsahuje dvě části. Nejdříve se autoři zaměřují na teoretické základy výzkumu, výroby, analýzy či formulace léčiv v obecné rovině. V další části je pak pozornost věnována jednotlivým funkčním a indikačním skupinám. Tato část byla připravena v úzké spolupráci s lékaři, kteří dané léky používají v každodenní klinické praxi a tak vznikl text, který spojuje právě teoretické a velmi praktické aspekty dané problematiky. Jednotlivé kapitoly zahrnují: využití rekombinantních hormonů, krevních derivátů v léčbě jak hemofilie, tak léčiv využívaných pro prevenci či odstranění krevní sraženiny, cytokinů v léčbě cytopenií, rekombinantních enzymů u dědičných metabolických poruch, protilátek v léčbě autoimunitních onemocnění a v léčbě onkologických onemocnění, interferonů pro léčbu hepatitid a zahrnuje také kapitolu o využití rekombinantních proteinů ve vakcinaci. Kniha se také

zabývá významem diagnostiky pro správnou indikaci léčby, obsahuje kapitolu věnovanou zneužívání některých biologických léčiv a v závěru dává krátký výhled do budoucna a shrnuje snahy v oblasti genových terapií.

Uvedená publikace trpí několika nešvary, které jsou typické pro takový typ publikací. U takto rozsáhlého materiálu a v případě velmi dynamicky se vyvíjejícího oboru je vždy problémem ztráta aktuálnosti. V mezidobí, mezi dokončením textu a vydáním knihy se na trhu objevilo několik nových preparátů, které se již do přehledné publikace nedostaly. Druhou výtka může být ne zcela optimální vyváženost jednotlivých textů, která je daná rozsáhlým autorským kolektivem který zahrnuje 19 spoluautorů. Přes tyto výtky však počet autorů a vydavatelství Grada s podporou edičního střediska VŠCHT Praha zasluhuje velikou pochvalu. Česká literatura je v tomto oboru velmi chudá a neexistuje souhrnná publikace, která by podala ucelený obraz. Díky této chudosti je problémem samotná nomenklatura. I název knihy „biologická léčiva“ je vlastně přínosem v odborné literatuře a snahou o sjednocení, protože se mísí názvy cílená léčiva (který by se hodil především na protilátky), proteinová léčiva, bioléčiva, biofarmaceutika atd.

Celkově lze shrnout, že kniha *Biologická léčiva* je vhodným textem jak pro lékaře (ať specialisty či praktické lékaře) tak pro odborné pracovníky ve vědě ale i pro studenty nejen medicíny ale i dalších přírodovědných a technických směrů.

Jan Káš

WESTERN BLOTTING – PRINCIPY A METODY

Klára Pečánková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze,
pecankok@gmail.com

Úvod

Western blotting je metoda sloužící nejčastěji k přenosu elektroforeticky rozdělených proteinů na porézní nosič – membránu. V dnešní době je již běžně používanou technikou v laboratořích zabývajících se studiem proteinů. Slouží především k validaci elektroforetických analýz a k validaci metod kapalinové chromatografie. Definice western blotu není přesně vymezena. Některé zdroje uvádí, že se jedná pouze o přenos proteinů z gelu na membránu, jiné do tohoto termínu zahrnují i elektroforézu a následnou blokaci neobsazených míst na membráně spolu se specifickou detekcí vybraných proteinů. Prvotně se pojem blotting vztahoval k metodě přenosu nukleových kyselin zavedené Erwinem Southernem, která sloužila k detekci DNA sekvencí.¹ Slovní hříčkou postupně vznikal blotovací kompas: nejprve Northern blotting (přenos RNA) provedený poprvé v roce 1977 Alwinem a kol.,² poté roku 1979 Western blotting (H. Towbin a kol.)³ a jeho modifikace Eastern blotting⁴, jehož definice se formulovala od roku 1982 až do roku 2009. Nejnovější definice⁵ popisuje Eastern blotting jako techniku, která slouží k detekci posttranslačně modifikovaných proteinů pomocí k nim specificky navržených sond.

Principy přenosu

Proteiny putují z gelu na membránu působením hnačích sil, jimiž mohou být kapilární síly a difuze, vakuum, elektrické pole nebo ultrazvuk. Nejvíce se u western blottingu setkáváme s přenosem pomocí elektrického pole, jehož působením jsou proteiny přenášeny z polyakrylamidového gelu. Tento princip byl poprvé použit Towbinem roku 1979 v práci, která popisovala metodiku a aplikace přenosu elektroforeticky rozdělených proteinů na nitrocelulózovou membránu.³ V tomto experimentu vyšlo najevo, že nitrocelulózové membrány a použité podmínky mají určitá omezení (např. křehkost, efektivita přenosu proteinů – viz dále). Kapilárními silami jsou proteiny hnány z gelu na membránu při zatížení přes vrstvu suchého filtračního papíru.⁶ Hnačí silou vakuového přenosu je tok pufu z navlhčeného filtračního papíru vrstvou gelu a nosiče; tok kapaliny je zajištěn připojením aparatury na vakuovou pumpu.⁷ Poměrně novou metodou je přenos proteinů působením ultrazvuku. Přesný princip přenosu ale není úplně jasný.⁸

Membrány

Jako nosiče přenesených proteinů se používají porézní materiály s průměrem póru v rozmezí od 0,5

do 10 μm . Nejvíce používanými materiály jsou nitrocelulosa a polyvinylidfluorid (PVDF), méně často se používá aktivovaný papír či aktivovaný nylon.

Mechanismus vazby proteinů na membránu prozatím není zcela objasněn, ale předpokládá se, že se jedná o kombinaci hydrofobních interakcí s dipólovými (v případě PVDF) a nekovalentními interakcemi v případě nitrocelulózové membrány. Nitrocelulosa a PVDF se liší vazebnou kapacitou, odolností a stabilitou a oba typy membrán vyžadují rozdílné zacházení během experimentu. Obvyklým problémem experimentů bývá nespecifická interakce protilátky, což se projeví jako tzv. pozadí. Nitrocelulózové membrány mají uspokojivou ($80 - 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)⁹ vazebnou kapacitu a během detekce proteinů vzniká jen nízké pozadí. Jejich nevýhodou je nízká odolnost k mechanickému namáhání. Existují i mechanicky stabilnější nitrocelulózové membrány, do nichž je inkorporována polyesterová síť snižující křehkost nitrocelulózové matrice. PVDF membrány mají vysokou vazebnou kapacitu ($100 - 300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)⁹ a jsou mechanicky velmi odolné. Oproti nitrocelulózovým membránám je jejich výhodou vyšší pozadí vznikající během detekce přenesených proteinů. To však lze do jisté míry ovlivnit složením blokačního činidla (viz dále). Vzhledem k hydrofobnímu charakteru materiálu je před přenosem nezbytné ekvilibrovat PVDF membránu v metanolu. Výhodou PVDF membrán ve srovnání s nitrocelulózovými je možnost efektivnějšího zachycení nízkomolekulárních proteinů díky menší průměrné velikosti pórů.¹⁰

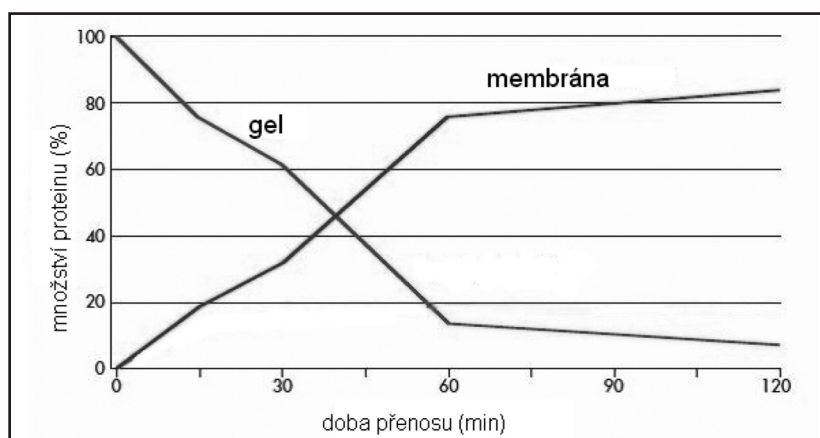
Většina aktivovaných (nabitých) nylonových membrán obsahuje kvarterní aminy, které pomocí iontových, elektrostatických a hydrofobních interakcí vážou negativně nabitě molekuly (např. SDS). Velikost pórů nylonových membrán se pohybuje okolo $0,4 \mu\text{m}$, jsou mechanicky velmi stabilní a jejich vazebná kapacita je přibližně $120 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Z důvodu vzniku vysokého pozadí po přenosu proteinů se používají spíše pro přenos nukleových kyselin.^{11,12} Existují i alternativní matrice, které mají speciální použití. Chemicky aktivované nosiče ze skleněných vláken se využívají k zachycení proteinů či peptidů určených k sekvenaci nebo k mapování epitopů pomocí monoklonálních protilátek. Proteiny jsou na tento nosič ukotveny pomocí iontových sil. Výhodou nosičů ze skleněných vláken je maximální mechanická stabilita, avšak značnou nevýhodou je, ve srovnání s ostatními nosiči, nízká vazebná kapacita ($7 - 20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).¹³⁻¹⁵

Efektivita a podmínky přenosu proteinů

Na přenos proteinů má vliv několik faktorů. Patří mezi ně velikost pórů gelu, molekulová hmotnost přenášených proteinů, složení transferového pufru, uspořádání blotovacího systému nebo doba přenosu. Nejpoužívanější metodou separace proteinů před western blotem je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE). Porozita polyakrylamidového gelu je určena jeho složením, čili koncentrací akrylamidu a bisakrylamidu.¹⁶ Větší porozita gelu, daná nižší koncentrací akrylamidu a bisakrylamidu, přenos proteinů urychluje. Vysokomolekulární proteiny putují v gelu pomaleji, avšak jejich přenos je možné urychlit zvýšením teploty (70 – 75°C).¹⁷ Zvýšení teploty pro usnadnění přenosu proteinů je vhodné pouze pro proteiny rozdělené za denaturujících podmínek. U proteinů rozdělených nativní elektroforézou by mohla zvýšená teplota způsobit denaturaci. Základním transferovým pufrům pro western blotting je Towbinův pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20 % metanol (v/v), pH 8,3). Změnou složení základního pufru můžeme dosáhnout různé kvality přenosu proteinů s rozdílnými vlastnostmi.¹⁸ Například pro přenos bazických proteinů jsou doporučovány pufrы o vysokém pH. Mezi ně patří Dunnův karbonátový pufr (10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20 % metanol (v/v), pH 9,9), Bjerrumův a Shaferův-Nielsenův pufr (40 mM Tris, 39 mM glycin, 20 % metanol (v/v), pH 9,2) nebo CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonová kyselina) pufr (10 mM CAPS, 10 % metanol (v/v), pH 11).¹⁸ Metanol uvolňuje SDS z komplexu SDS-protein, odhaluje hydrofobní skupiny proteinů a usnadňuje jejich vazbu na membránu.¹⁶ Při přenosu vysokomolekulárních proteinů za zvýšené teploty je metanol, vzhledem k jeho těkavosti, ze složení transferového pufru vynechán. Další možností pro usnadnění přenosu je aplikace SDS o koncentraci větší než 0,1 % (w/v). Přidavek SDS usnadňuje přenos proteinů o vyšší molekulové hmotnosti. Kvalitu přenosu proteinů ovlivňuje volba kontinuálního či diskontinuálního uspořádání blotovacího systému. Diskontinuální uspořádání je založeno na různém složení pufru na katodické a anodické straně aparatury. Pro efektivní přenos proteinů je rovněž nezbytná správná volba doby přenosu. Množství proteinů na membráně s časem roste, ale při příliš dlouhé době přenosu opět klesá, protože může dojít k jejich průchodu skrz membránu a zachycení do vrstvy filtračního papíru. Závislost množství přenesených proteinů na době přenosu je znázorněna na Obr. 1.¹⁹

Nejvyužívanějším principem přenosu je působení elektrického pole. Pro elektroblot je typické sendvičové uspořádání sestávající z gelu a membrány, které jsou vloženy mezi vrstvy filtračního papíru. Podle množství použitého transferového pufru můžeme elektrotransfer

rozdělit do tří kategorií, a to na přenos mokrý (wet), polosuchý (semidry) a suchý (dry). Wet blotting probíhá ve vertikálním uspořádání v nádobě naplněné transferovým pufrům. Proud je do systému přiváděn platinovými drátovými elektrodami a přenos realizován za konstantního napětí. Obvykle je třeba celý systém důkladně chladit a míchat, aby byla teplota v systému rovnoměrná a po dobu přenosu konstantní. Semidry blotting je výhodný zejména díky nízké spotřebě transferového pufru. Je potřeba pouze malé množství na zvlhčení filtračních papírů a ekvilibraci membrány a gelu. Další jeho výhodou je zkrácení doby přenosu na zhruba 30 – 60 minut při zachování efektivity přenosu. Systém je uspořádán horizontálně mezi plošné elektrody – katodu z nerezové oceli a grafitovou anodu. Přenos probíhá při konstantním proudu – obvykle 0,8 mA/cm². Tyto hodnoty jsou nižší než u wet blotu, a proto obvykle není nutné aparaturu chladit.²⁰ Poměrně novým typem přenosu je tzv. dry blotting. Jeho velkou výhodou je, že veškeré reagenty, které jsou k experimentu potřebné, jsou dodávány připravené k okamžitému použití. Jedná se o textil protkaný měděnými drátky, který má funkci elektrod. Na textilní vrstvě je imobilizován transferový pufr. Gel a membrána se přiloží na spodní elektrodu, vše se uspořádá do sendviče a vloží do blotovacího stroje. Výsledkem je zkrácení doby přenosu na jednotky minut. Určitou nevýhodou je finanční náročnost ve srovnání s předchozími technikami.²¹



Obr. 1. Závislost množství proteinů přenesených z gelu na membránu na čase

Blokace membrány a detekce proteinů

Za předpokladu, že je definice western blottingu rozšířena i na část experimentu následující po přenosu, je možné charakterizovat další podmínky této metody. Blokací membrány se brání nespecifické vazbě protilátky na místa, která nejsou obsazena přenesenými proteiny. Požadované vlastnosti blokačního činidla jsou: vyplnit neobsazená místa na membráně, nesmí odstranit proteiny navázané přenosem, nesmí překrýt nebo inaktivovat proteiny určené k detekci, mělo by být levné a dostupné. Jako blokační činidla se používají roztoky proteinů, neionogenních detergentů nebo jejich kom-

binace. Inkubací membrány s roztokem proteinu dosáhneme permanentní blokace. Běžně se používá hovězí sérový albumin (BSA) v koncentraci až 10 % (w/v), hemoglobin v koncentraci od 0,1 % (w/v), želatina, kasein, sušené odtučněné mléko nebo koží sérum. Výhodou použití hemoglobinu jako blokačního činidla je oproti BSA prakticky nulový obsah oligosacharidových kontaminantů. Avšak díky své peroxidase aktivita je nevhodný k použití spolu s peroxidase konjugáty. Blokováním povrchu membrány roztoky neionogenních detergentů (např. Tween, Triton X-100, SDS) je docíleno pouze dočasné blokace (neobsadí volná místa na membráně, pouze znesnadňuje nespecifické interakce sondy k nosiči)²²: Po vyjmutí membrány z roztoku detergentu může být detergent snadno odmyt. Pufr pro blokovací činidlo je volen v závislosti na charakteru detekovaných proteinů (např. pro fosfoproteiny volíme jiný než fosfátový pufr) a dobu blokace volíme tak, aby nedocházelo k interferenci s konjugátem (1 hod. při 37 °C nebo přes noc při 4 °C) a nevznikalo vysoké pozadí. Přenesené proteiny jsou detekovány označením specifickou protilátkou nebo je možné je derivatizovat a detekovat derivát proteinu příslušnou metodou (např. spektrofotometricky). Protilátky používané k detekci proteinů po western blotu mohou být konjugovány s enzymem (alkalicou fosfatasou nebo křenuvou peroxidase), fluorescenční značkou, biotinem, zlatem nebo radioaktivním prvkem. Volbou značení protilátky je určen způsob detekce.¹⁰

Aplikace western blottingu

Western blot se nejčastěji využívá pro validaci elektroforetických metod (ověření pozice spotu po identifikaci hmotnostní spektrometrií), validaci metod kapalinové chromatografie (přítomnost proteinu ve frakci) nebo k semikvantitativnímu stanovení koncentrace proteinů. Přenos na principu kapilárních sil je jediným možným způsobem pro blotování po izoelektrické fokuzaci, protože proteiny jsou v pH odpovídajícím jejich izoelektrickému bodu (jsou bez náboje).¹⁸ Slot/dot/spot blot postavený na principu vakuového přenosu je vhodný pro validaci analýz frakcí kapalinové chromatografie či pro určování vhodné koncentrace protilátek. Přenos pomocí ultrazvuku se osvědčil při současném přenosu různě nabitých proteinů, a mohl by být vhodným postupem pro efektivní přenos nízkomolekulárních proteinů, a to vše za dobu kratší než tři minuty.⁸ Western blotting našel uplatnění v imunochémických metodách, a to například při epitopovém mapování a charakterizaci protilátek.^{23,24} Díky velkému počtu vzorků a potřebě provádět mnoho analýz současně je snaha co nejvíce práci usnadnit a urychlit. Automatické blotovací systémy jsou schopné zpracovat větší počet membrán najednou. Tyto přístroje jsou schopné v naprogramovaných časových úsecích a s přiloženými reagensy zaopatřit kroky blokace, promývání a inkubace s protilátkou.²⁰ Současným trendem western blotu je zaměření se na kvantitativní měření intenzity signálu, a to hlavně fluorescenčními či chemiluminiscenčními technikami. Zároveň je snahou co nejvíce zkrátit dobu přenosu a do budoucna celý proces automatizovat.

Literatura

1. Southern EM: *J. Mol. Biol.* 98 (3), 503 (1975).
2. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12), 5350 (1977).
3. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350 (1979).
4. http://en.wikipedia.org/wiki/Eastern_blotting, staženo 11. ledna 2012.
5. Thomas S, Thirumalapura N, Crossley EC, Ismail N, Walker DH: *Parasite Immunol.* 31, 296 (2009).
6. Renart J, Reisser J, Stark GR: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3116 (1979).
7. Peferoen M, Huybrechts R, De Loof A: *FEBS Lett.* 145 (2), 369 (1982).
8. Kost J, Liu L-S, Ferreira J, Langer R: *Anal. Biochem.* 216, 27 (1994).
9. <http://www.millipore.com/immunodetection/id3/membraneselection> staženo 18. července 2012.
10. http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/LD_497901435-A543, staženo 19. listopadu 2011.
11. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=C946AFF6-CCD2-A65C-8A96-03C4AC3E1E07#nylon>, staženo 18. července 2012.
12. http://www.membrane-solutions.com/nylon_membrane.htm, staženo 18. července 2012.
13. Aebersold RH, Teplow DB, Hood LE, Kent SBH: *J. Biol. Chem.* 261 (9), 4229 (1986).
14. Vandekerckhove J, Baud G, Puype M, van Damme J, van Montagu M: *Eur. J. Biochem.* 152, 9 (1985).
15. Montelaro RC: *Electrophoresis* 8, 432 (1987).
16. Walker JM, Rapley R: *Molecular biomethods handbook*. Springer, Hertfordshire 2008.
17. Kurien BT, Scofield RH: *J. Immunol. Methods* 266, 127 (2002).
18. Walker JM: *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, New Jersey 2002.
19. <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/tp001en00>, staženo 21. listopadu 2011.
20. Kurien BT, Scofield RH: *Methods* 38, 283 (2006).
21. www.invitrogen.com, staženo 20. listopadu 2011.

22. Gershoni JM: *Methods Biochem. Anal.* 33, 1 (1988).
23. Mazzoni MR, Porchia F, Hamm HE: *Methods Mol. Biol.* 524, 77 (2009).

24. Bernard-Gallon D, Cravello L, Vissac C, Bignon YJ: *Oncol. Rep.* 8 (6), 1363 (2001).

Souhrn

Pečánková K.: Western blotting – principy a metody

Western blotting je běžně používanou laboratorní technikou pro přenos nejčastěji elektroforeticky rozdělených proteinů na membránu. Efektivita přenosu je ovlivněna několika aspekty – např. typem membrány, podmínkami přenosu. Western blotting se používá pro validaci metod kapalinové chromatografie a metod elektroforetických.

Klíčová slova: western blotting, membrány, podmínky přenosu

Summary

Pečánková K.: Western blotting – principles and methods

Western blotting is a method commonly used to transfer proteins mostly separated by gel electrophoresis to a membrane. The efficiency of the transfer is affected by several aspects, e.g., membrane type, blotting conditions. Western blotting is mainly used for liquid chromatography and electrophoretic methods validation.

Keywords: western blotting, membranes, blotting conditions

NOVÉ TECHNOLOGIE PŘÍPRAVY HUMANIZOVANÝCH GLYKOPROTEINŮ A JEJICH VYUŽITÍ V PRAXI

Hynek Mrázek, Ondřej Vaněk, Petr Novák, Karel Bezouška

Katedra biochemie UK PŘF Praha a MBÚ AV ČR Praha, karel.bezouska@natur.cuni.cz

Úvod

Současná postgenomová etapa výzkumu v biomedicinských vědách a biotechnologii klade zvýšený důraz na objasnění plného osudu proteinů jako klíčových efektorových molekul živé buňky zahrnujícího kromě procesů genetického kódování a translace též ko- a posttranslační procesy stejně jako následné procesy skládání a buněčného transportu proteinů do jejich finálních destinací, procesy stárnutí a odbourání poškozených proteinů. Zjištění přesné sekvence biochemických reakcí probíhajících v průběhu celého života proteinové molekuly zůstává samozřejmě velmi složité, jednotlivé fyzikálně chemické procesy a biochemické reakce se složitým způsobem prolétají a vzájemně ovlivňují. Jednou z nejčastějších a kvantitativně nejvýznamnějších posttranslačních kovalentních modifikací proteinů je jejich glykosylace

definovaná jako enzymově katalyzovaný proces blokového nebo stupňovitého přenosu některých sacharidových zbytků na určité aminokyseliny v proteinech vedoucí k tvorbě kovalentních glykosidických vazeb. U eukaryotických respektive lidských glykoproteinů je přitom nejvýznamnější *N*-glykosylace, zahrnující modifikaci amidové skupiny asparaginu následovaná *O*-glykosylací, při níž dochází k přenosu sacharidových zbytků na hydroxylové skupiny serinu nebo threoninu. Z pohledu biotechnologií se tato posttranslační modifikace dostala do popředí zájmu po zjištění, že glykosylace plní pro proteinovou makromolekulu řadu základních funkcí ať již jde o zvýšení rozpustnosti ve vodném prostředí, stabilitu, pomoc při skládání a tvorbu plně biologicky aktivních komplexů až po specifickou úlohu v některých rozpoznávacích procesech.

Klíčová je potom úloha glykosylace u řady proteinů produkovaných pro terapeutické použití zejména

v humánní medicíně. Ačkoliv zaznamenala syntetická chemie proteinů v některých případech určité úspěchy při náhradě složitých sacharidových sekvencí látkami jiné povahy¹, ve většině případů plní sacharidové sekvence nezastupitelnou úlohu. To přivádí soudobé biotechnologie před nezbytnost zajistit širokou dostupnost spolehlivých postupů umožňujících přesně glykosylované proteiny produkovat v množství a kvalitě nezbytné pro jejich použití jako léčiv pro substituční léčbu (erythropoetin, glykoproteinové hormony), monoklonálních protilátek (monoclonal antibodies, mAb) pro nádorové terapie a diagnosu různých onemocnění, a jako komponent důležitých vakcín². Moderní technologie, které jsou klíčové pro vývoj a neustálé zdokonalování takových postupů, jsou detailně popsány v našem odborném článku, který vyjde koncem roku 2012 ve speciálním čísle odborného časopisu „Biotechnology Advances“ a na nějž čtenáře odkazujeme². Velké možnosti jsou dnes nabízené široce rozvíjenými metodami chemické a chemoenzymatické modifikace proteinových molekul sacharidy², jimiž se však nebudeme v tomto příspěvku detailně zabývat. Zde chceme pro čtenáře přiblížit možnosti současných buněčných biotechnologií spočívající v genetických modifikacích produkčních buněčných linií vybraných organismů s cílem dosáhnout určité konkrétní glykosylace jimi produkováných proteinů. Jelikož je většina takto získaných glykoproteinů používána v lidských (humánních) terapiích, hovoříme též často o dosažení „humanizované“ glykosylace, kdy je přirozená glykosylace dané produkční linie upravena tak, aby co nejvíce napodobovala přirozenou glyko-sylaci vyskytující se u člověka.

Biosyntéza sacharidových řetězců glykoproteinů

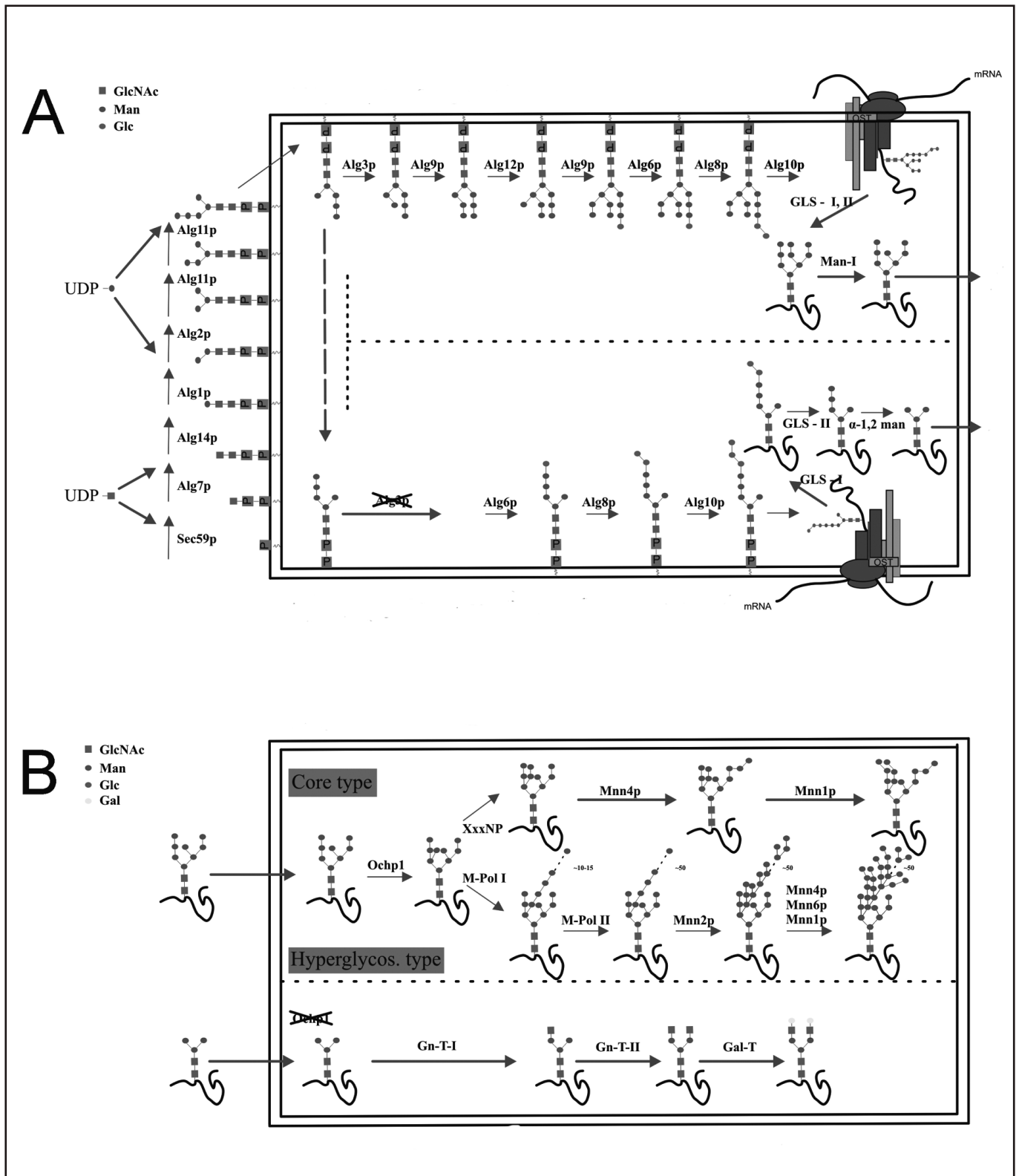
Glykosylace proteinů je přísně druhově specifická a její přesnost může být ovlivněna dokonce i fyziologickým nebo nutričním stavem produkční buňky. Evolučně konzervovaná je u většiny eukaryotů pouze prvá část biosyntetické dráhy *N*-glykosylace začínající na cytoplasmatické straně endoplasmatického retikula (Obr. 1 vlevo). Zde jsou na molekulu dvojnásobně fosforylovaného lipidu dolicholu postupně přenášeny dva zbytky GlcNAc a pět zbytků Man z vysokoenergetických prekursorů těchto sacharidů za katalýzy příslušnými glykosyltransferasami. Takto syntetizovaný sacharidový prekursor je nyní překlopen dovnitř do lumen endoplasmatického retikula (Obr. 1 nahoře), kde je jeho syntéza ukončena přidáním čtyř dalších zbytků Man a ještě tří zbytků Glc. Prekursor *N*-glykanu je poté za katalýzy oligosacharidyltransferasovým komplexem kotranslačně přenesen na odpovídající sekvenci (Asn-Xxx-Ser, Asn-Xxx-Thr, vzácně Asn-Xxx-Cys, kde Xxx je libovolná aminokyselina s výjimkou Pro)³. Po přenosu na polypeptid jsou ještě v endoplasmatickém retikulu tři naposled přidané zbytky Glc odštěpeny, čehož se současně využívá ke kontrole kvality poskládání příslušného glykosylovaného proteinu⁴. Poté molekula glykoproteinu opouští endoplasmatické retikulum a je transportována do Golgiho systému (Obr. 1, spodní část). Zde je oligosacharidový řetězec glykoproteinu dále

enzymaticky upravován, přičemž je konkrétní podoba výsledných *N*-glykanů již závislá na daném produkčním organismu a jeho enzymatické výbavě (viz. níže).

Mikrobiální systémy cílené glykosylace

Mikrobiální systémy exprese (glyko)proteinů mají řadu dobře známých výhod, mezi něž patří zejména nízké provozní náklady a vysoké výtěžky produkovaných proteinů. To je však vyváženo některými nevýhodami z hlediska kvality cílových produktů: mohou nastat problémy se správným sbalením produkovaného proteinu nebo může dojít ke kontaminaci nízkomolekulárními mikrobiálními produkty. U glykosylovaných terapeutických proteinů navíc nemusí vyhovovat produkovaný typ glykosylace, který může být u mikrobiálního producenta velmi vzdálený od glykosylace humánní. Z tohoto hlediska jsou systémy bakteriální glykosylace⁵ využívány zřídka, a zájem biotechnologických firem se zcela soustřeďuje zejména na produkční kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* a některé další produkční mikroorganismy². Přirozená *N*-glykosylace zajišťovaná těmito organismy ovšem vede většinou k hypermanosylaci při níž jsou proteiny modifikovány sacharidovými řetězci s vysokým obsahem manosy (Obr. 1). Pro humánní použití mají takto připravené glykoproteiny velmi omezené použití, neboť jsou z oběhu člověka rychle eliminovány receptorově podmíněnou endocytosou, navíc jsou často silně imunogenní. V kvasinkách *S. cerevisiae* je ovšem možné několikanásobnou mutací zahrnující vyřazení *och1* manosyltransferasy v Golgi se současnou cílenou expresí *a-1,2*-manosidas v této organelle produkovat *och1-mnn1+mnn4+* kmeny, u nichž pak nedochází k hypermanosylaci a lze naopak dosáhnout homogenní glykosylace pentamanosovými řetězci (Man₅GlcNAc)⁶.

Naopak kvasinka *Pichia pastoris* většinou hypermanosylaci neprovádí, a stala se tak v poslední době nejoblíbenějším mikroorganismem manipulovaným na cestě k humánní glykosylaci. Kromě vyřazení *och1* genu byla použita mutace *alg3* genu pro *a-1,3*-manosyl-transferasu stejně jako cílená exprese *N*-acetylglykosaminyl-transferasy I a II a galaktosyl-transferasy I v Golgiho systému (Obr. 1 dole). Takovým způsobem se můžeme dostat u mnohonásobně geneticky modifikované kvasinky *P. pastoris* ke glykosylaci komplexního typu odpovídající lidským glykoproteinům⁷. U savců včetně člověka jsou ovšem *N*-glykany komplexního typu ještě ukončené sialylací. U dnes produkovaných terapeutických glykoproteinů je toho dosaženo buď další genetickou modifikací produkční kvasinky vnesením nejméně pěti dalších genů⁸, nebo je sialylace provedena po izolaci požadovaného glykoproteinu *in vitro* s použitím aktivovaného sacharidu (CMP-Sia) a rekombinantních sialyltransferas⁹. Vysoce sofistikované produkční kvasinky schopné poskytnout lidský typ glykosylace jsou dnes v biotechnologických firmách široce využívány (firma Glycofi patří do sféry chemického giganta Merck)¹⁰.



Obř. 1 Biosyntéza *N*-glykosidicky vázaných oligosacharidů v normálních kvasinkách (*horní část obdělníků*) a v kvasinkách s cíleně modifikovanou glykosylací (*spodní část obdělníků*) Kritické pro glykosylaci jsou tři buněčné kompartmenty, endoplasmatické retikulum (A), Golgiho system (B) a cytoplasma (*vnější část obdělníků*). Proces začíná v cytoplasmě (A, *vlevo*) přenosem zbytků GlcNAc a Man z UDP donorů na membránový lipid dolicholdifosfát. Derivát obsahující dva zbytky GlcNAc a pět zbytků Man se poté překlápí do endoplasmatického retikula, kde je dokončena syntéza prekursoru obsahujícího dva zbytky GlcNAc, devět zbytků Man a tři zbytky Glc. Takový prekurzor je poté přenesen kotranslačně oligosacharidyltransferasovým komplexem (A, *vpravo*) na polypeptid. Následně je glykoprotein dále upravován a přechází do Golgiho komplexu (B), kde je jeho biosyntéza ukončena. U kvasinek s cíleně modifikovanou glykosylací lze dosáhnout vnesením genů pro glykosyltransferasy nebo glykosidasy významného odchýlení od standardních glykosylačních drah, takže vznikají místo vysoce manosových struktur typických pro kvasinky divokého typu (*horní část obdělníků*) komplexní struktury blízké strukturám vyskytujícím se u lidských glykoproteinů (*spodní část obdělníků* – tzv. „humanizovaný“ typ glykosylace). Upraveno podle citace 10.

Systémy cílené glykosylace s použitím vyšších eukaryot

I přes nedávné úspěchy dosažené při expresi glykoproteinů v mikrobiálních (zejména kvasinkových) buňkách má exprese glykoproteinů vyššími eukaryoty řadu nesporných výhod zejména z hlediska homogeneity a kvality získávaných výsledných produktů. Širšího použití doznaly zejména systémy používající hmyzích produkčních buněk, rostlinných buněk, a posléze savčích buněčných linií včetně linií lidského původu. Hmyzí produkční linie vynikají snadnou technologií údržby i vysokými produkčními výtěžky, z hlediska produkce lidských terapeutických glykoproteinů však nepředstavují příliš výhodný systém. Způsob glykosylace produkované těmito buňkami totiž bývá dosti heterogenní, a dosud ne dokonale probádaný, což klade samozřejmě zvýšené nároky na chemickou analýzu finálních produktů. Nicméně lze konstatovat, že i v této oblasti dochází v posledních letech k rychlému pokroku katalyzovanému jak sekvenováním kompletních hmyzích genomů¹¹, tak i vývojem prvních hmyzích linií s lidskou glykosylací¹². Podobně je možné komentovat i rostlinné expresní systémy, u nichž je jejich nevýhoda spočívající v nehumánní hyperglykosylaci vedoucí opět k potenciačně imunogenním produktům v posledních letech též kompenzována vývojem specializovaných buněčných linií s příznivějšími parametry¹³. Nejpřesněji jsou samozřejmě lidský typ glykosylace schopné produkovat savčí resp. přímo lidské produkční linie, mezi něž řadíme zejména lidské fibrosarkomové buňky HT1080, lidské lymfomové buňky Namalwa, a lidské embryonální ledvinné buňky HEK293¹⁴. Inženýrství těchto buněčných linií z hlediska jejich praktického použití dosáhlo již značného stupně sofistikovanosti, ať již jde o jejich nutriční požadavky (definovaná média), způsob udržování buněk v kultuře (suspenzní varianta) nebo snadné získání výsledného sekretovaného produktu z média (použití bezsérových médií). Glykosylace je samozřejmě lidského typu, i tak však pozorujeme genetické zásahy doladující například homogenní sialylaci a-2,6-vázanými zbytky kyselin sialových¹⁵ popřípadě nepřítomnost fukosylace na biosyntetickém jádře *N*-glykanů¹⁶.

Praktické využití cílené glykosylace a metody analýzy získaných glykoproteinů

V roce 2010 přesáhlo celkové množství proteinů schválených pro terapeutické použití v Evropě a ve Spojených státech dvě stovky, přičemž několik stovek dalších produktů je připraveno ke schválení¹⁷. Více než polovina těchto terapeutických proteinů je přitom povahy glykoproteinů, a téměř u všech z nich ovlivňuje řádná glykosylace jejich terapeutickou účinnost. Produkce a purifikace těchto terapeutických glykoproteinů je tedy pro biotechnologické firmy pouze jednou polovinou jejich úkolu: druhým úkolem zůstává kontrola a průkaz dosažení náležité glykosylace, kterou musí výrobce deklarovat dle stále přesnějších standardů a metodik vydávaných národními ústavy nebo labora-

tořemi odpovídajícími za kontrolu léčiv v jednotlivých zemích.

Přehled nejběžnějších terapeutických glykoproteinů produkovaných biotechnologickými firmami je uveden v Tabulce I. Tabulka odráží významné pokroky při získání dedikovaných buněčných linií dnes převážně s humanizovanou glykosylací jak bylo popsáno výše. V kvasinkách jsou dnes takto produkovány například aktivátor plasminogenu používaný pro léčbu revmatoidní artritidy¹⁸, růstový faktor hepatocytů doporučovaný u některých forem diabetu¹⁹, glukocerebrosidasa nezbytná pro léčbu Gaucherova onemocnění²⁰, hirudin používaný při poruchách krevní koagulace²¹, ale dokonce i terapeutické monoklonální protilátky používané při léčbě non-Hodgkinova lymfomu, kde je jejich přesná glykosylace pro terapeutickou účinnost kritická²². V hmyzích buňkách jsou v současné době produkovány zejména některé diagnosticky významné glykoproteiny používané při detekci výskytu lidského papilomaviru²³, hepatitidy C²⁴, kolorektálních nádorů²⁵, autoimunitních onemocnění²⁶, a infekcí virem HIV²⁷. V savčích produkčních buňkách jsou potom připravovány zejména takové terapeutické glykoproteiny, u nichž jsou nároky na jejich přesnou glykosylaci nejvyšší. Mezi takové produkty se řadí například monoklonální protilátky určené pro léčbu kolorektálního karcinomu²³, laronidasa používaná při revmatoidní artritidě²³, erythropoetin široce používaný pro léčbu anemických stavů (a zneužívaný sportovci při dopingů)²⁸, luteinizační hormon používaný pro léčbu neplodnosti²³, nebo třeba monoklonální protilátky používané pro léčbu autoimunitní Crohnovy choroby²⁹.

Pokud jde o analýzu glykosylace výše uvedených terapeutik, bývala dlouhou dobu problematická, neboť vyžadovala provedení velké řady velmi specializovaných analýz (kvantitativní sacharidová analýza, permylační analýza typu glykosylace, ověření typu glykosidické vazby s použitím drahých a obtížně dostupných glykosidas). Situaci dnes do velké míry usnadnila široká dostupnost technik hmotnostní spektrometrie ve výzkumných institucích i v kontrolních laboratořích biotechnologických firem. Popularita a široká dostupnost této citlivé a specifické analytické techniky umožnila široce aplikovat například protokoly založené na štěpení produkovaných glykoproteinů přímo v gelu po SDS elektroforese s následnou analýzou uvolněných (glyko)peptidů³⁰. Podobně účinně bylo možné aplikovat izotopové a enzymatické techniky pro analýzu a ověření konkrétních míst glykosylace v glykoproteinech³¹. Zavedení technik hmotnostní spektrometrie s Fourierovskými transformovanou iontově cyklotronovou resonancí pak konečně umožnilo analyzovat typy glykosylace na úrovni jednotek p.p.m. Tato metoda také disponuje řadou účinných fragmentačních ionizačních technik s disociací záchytem elektronu (ECD) nebo pomocí infračerveného záření (IRPMD)³². Kombinace všech těchto technik, klasických s těmi nejmodernějšími, tak velmi účinně přispívá k rychlé a přesné analýze způsobu glykosylace proteinů.

Tabulka I: Vybrané glykoproteiny produkované s využitím hostitelských systémů s cílenou („humanizovanou“) glykosylací

Produkční buňky	Produkovaný glykoprotein	Terapeutické použití
<i>Kvasinky</i> <i>P. pastoris</i> <i>P. pastoris</i> <i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i>	Aktivátor plasminogenu Růstový faktor hepatocytů Glukocerebrosidasa Hirudin mAb Rituxan®	Revmatoidní artritida ¹⁸ Diabetes mellitus ¹⁹ Gaucherova nemoc ²⁰ Poruchy koagulace ²¹ Non-Hodgkinův lymfom ²²
<i>Hmyzí</i> Sf9 Sf9 Sf21 <i>Theileria parva</i> Sf9	LICAM HCV E2 protein Karcinoembryonální antigen Povrchový antigen p67 Lidský IL-7	Lidský papilomavirus ²³ Hepatitida C ²⁴ Kolorektální nádory ²⁵ Autoimunitní onemocnění ²⁶ Infekce HIV ²⁷
<i>Savčí</i> CHO CHO CHO SP2/0 SP2/0	mAb proti receptoru pro EGF Laronidasa Erythropoetin Luteinizační hormon mAb Remicade®	Kolorektální karcinom ²³ Revmatoidní artritida ²³ Anemie ²⁸ Neplodnost ²³ Crohnova choroba ²⁹

Závěr

Zatímco ještě před několika lety představoval stav technologií dostupných pro úspěšnou přípravu a analýzu terapeutických glykoproteinů pro jejich účinné použití v humánních terapiích a jiných praktických situacích spíše brzdu, byly v posledních letech vyvinuty v této oblasti velmi účinné metody založené na genetických a buněčných technologiích, moderních separačních postupech, a nových protokolech hmotnostně spektrometrických analýz. Ve vzájemné kombinaci tyto nové technologie otevřely biotechnologickému prů-

myslu cestu k přípravě terapeutických přípravků, jejichž přesná glykosylace je garantována použitím náležitých produkčních buněčných linií, a může být efektivně ověřena moderními analytickými postupy. To vše dnes umožnilo širokou dostupnost glykoproteinových terapeutik i diagnostik, jejichž další masivní použití bude ovšem záviset též na dalším vývoji soudobé glykobiologie pokoušející se o objasnění základních mechanismů a významu proteinové glykosylace pro stále vzrůstající počet konkrétních životních procesů.

Věnováno prof. Gustavu Entlicherovi k jeho 70. narozeninám. Tato studie byla zpracována s finanční podporou projektů poskytnutých Univerzitou Karlovou v Praze (UNCE 204025/2012 a 265124/2012), GAČR (303/09/0477 a 305/09/H008) a EU (COST actions Chemistry CM1001).

Literatura

1. Bezouška K: *Vesmír* 82, 620 (2003).
2. Mrázek H, Weignerová L, Bojarová P, et al.: *Biotechnol. Adv.* Doi:10.1016/j.biotechadv. 2012.03.008 (2012).
3. Yan A, Lennarz WJ: *J. Biol. Chem.* 280, 3121 (2005).
4. Measaeli N, Nakamura K, Zvairtel E, et al.: *J. Cell Biol.* 144, 857 (1999).
5. Wachter M, Linton D, Hitchem, et al.: *Science* 298, 1790 (2002).
6. Abe H, Takaoka Y, Chiba T, et al.: *Glycobiology* 19, 428 (2009).
7. Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, et al.: *Glycobiology* 14, 757 (2009).
8. Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, et al.: *Science* 313, 1441 (2006).
9. Cheng J, Huang S, Yu H, et al.: *Glycobiology* 20, 260 (2010).
10. Pourcq K, Schutter K, Callewaert N: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1617 (2010).
11. Xia Q, Zhou Z, Lu C, et al.: *Science* 306, 1937 (2004).

12. Aumiller JJ, Hollister JR, Jarvis DL, et al.: *Glycobiology* 13, 497 (2003).
13. Castilho A, Gattinger P, Grass J, et al.: *Glycobiology* 21, 813 (2011).
14. Durocher T, Butler H: *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 700 (2009).
15. Damiani R, Oliviera JE, Vorauer-Uhl K, et al.: *Protein Expr. Purif.* 67, 7 (2009).
16. Arnolds JV, Wormald M, Sim RB, et al.: *Annu. Rev. Immunol.* 25, 21 (2007).
17. Walsh G: *Nat. Biotechnol.* 28, 917 (2010).
18. Sun J, Coughlin P, Salem HH: *Biochim. Biophys. Acta* 1252, 28 (1995).
19. Liu Z, Zhao HL, Xue C, et al.: *World J. Gastroenterol.* 11, 7079 (2005).
20. Liu L, Stadheim A, Hamuro L, et al.: *Biologicals* 39, 205 (2011).
21. Kim MD, Lee TK, Lim HK, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 259 (2004).
22. Davis TA, Grillo-Copez AJ, White AC, et al.: *J. Clin. Oncol.* 18, 3135 (2000).
23. Jaypal KP, Wlaschin KP, Yap MGS, et al.: *Chem. Eng. Prog.* 103, 40 (2007).
24. Hüssy P, Faust H, Wagner JC, et al.: *J. Hepatol.* 26, 1179 (1997).
25. Edelman MI, Chaabihi CH, Monchatre E. et al.: *Immunology* 91, 13 (1997).
26. Kaba SA, Hemmes JC, van Lent JW, et al.: *Protein Eng.* 16, 73 (2003).
27. Mirzaei M, Xu Y, Elias CB, et al.: *J. Biomed. Biotechnol.*
28. Goh JS, Zhang P, Chan KF, et al.: *Metab. Eng.* 12, 360 (2010).
29. Beck A, Roussert WE, Bussat MC, et al.: *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9, 482 (2008).
30. Dalpathado DS, Desaire H, Carre SA, et al.: *Anal. Biochem.* 157, 396 (1986).
31. Carr SA, Roberts GD: *Anal. Biochem.* 157, 396 (1986).
32. Adamson JT, Hakansson K: *J. Proteome Res.* 5, 493 (2006).

Souhrn

Mrázek H., Vaněk O., Novák P., Bezouška K.: Nové technologie přípravy humanizovaných glykoproteinů a jejich využití v praxi
 Rychlý rozvoj badatelského výzkumu v moderní glykobiologii a glykobiologii vedl k širokému zpřístupnění nových experimentálních postupů přejímaných vzápětí biotechnologickým průmyslem pro produkci glykoproteinových terapeutik a diagnostik. Pokrok posledního období je založen na důkladných a systematických znalostech detailů enzymové mašinerie vedoucí ke specifické glykosylaci proteinů, která zůstává jednou z nejčastějších a nejdramatičtějších ko- a posttranslačních modifikací proteinů. Klonování genů kódujících jednotlivé glykosylační enzymy umožnilo jejich použití v buněčných technologiích a buněčném inženýrství vedoucím k široké dostupnosti linií produkujících spolehlivě humánní typ glykosylace. Pokrok v těchto technikách probíhal paralelně s rozvojem metod umožňujících provést komplexní analýzu proteinové glykosylace, a byl nyní rozsáhle využit biotechnologickými firmami k produkci více než dvou stovek schválených terapeutických proteinů, z nichž má více než polovina charakter glykoproteinů.

Klíčová slova: proteosyntéza, produkční buňky, přirozená glykosylace, humánní glykosylace, glykoproteinová terapeutika.

Summary

Mrázek H., Vaněk O., Novák P., Bezouška K.: New technologies for preparation of humanized glycoproteins and their practical use

Rapid progress in contemporary glycobiology led to widespread availability of new technologies employed by biotechnology industry for production of glycoprotein therapeutics and diagnostics. This progress has been based on our detailed knowledge of enzyme machinery enabling protein glycosylation, one of the most often and most extensive posttranslational protein modification. Cloning of individual genes coding for glycosylation enzymes enabled their use in cellular technologies and cellular engineering resulting in wide availability of cell lines able to produce human glycosylation efficiently and precisely. Progress in this direction went in parallel with that in the techniques suitable for analytical evaluation of glycosylation, and has been now widely adopted at biotechnological companies producing more than two hundred therapeutic proteins, more than half of them being glycosylated.

Keywords: proteosynthesis, production cell, native glycosylation, humanized glycosylation, glycoprotein therapeutics.

FUNKCE A BIOLOGICKÉ AKTIVITY ROSTLINNÝCH NUKLEAS

Tomáš Podzimek

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

Úvod

Pod pojmem nukleasy dnes rozumíme širokou skupinu enzymů, které interagují s různými typy nukleových kyselin, ať se jedná o DNA nebo RNA či o jejich jedno- nebo dvouřetězcové formy. Příkladem různorodosti této skupiny může být to, že se jedná o enzymy, které štěpí nukleové kyseliny (DNasy, RNasy, nukleasy

nespecifické k cukru, restriční endonukleasy), enzymy, které se podílejí na biosyntéze nukleových kyselin (DNA a RNA polymerasy, DNA ligasy), rozvolňují nebo zpětně vytvářejí dvoušroubovicovou strukturu DNA (topoisomerasy, helikasy), podílejí se na rekombinacích (rekombinasy), na opravách poškození nukleových kyselin (NK) atd. Nejdůležitější funkce, která z těchto

procesů vyplývá, je zachování a přenos genetické informace do další generace. Další funkcí, kterou je nutné zmínit, je ochrana před patogenními mikroorganismy nebo využití nepotřebných NK jako zdroj nukleotidů a fosfátových skupin.

Zajímavými rostlinnými enzymy s velkým potenciálem jsou nukleasy ze skupiny *nukleasa I*. Tato skupina zahrnuje endonukleasy, které degradují jednořetězcové substráty (některé ale štěpí efektivně i dvořetězcové substráty), tedy RNA i ssDNA (fosfodiesterasová aktivita), ale dokáží i defosforylovat nukleosid-3-monofosfáty (fosfomonoesterasová aktivita). Jejich pH optimum je v rozmezí 5,0 – 6,5 a molekulová hmotnost 31 – 39 kDa. Produkují 5' mononukleotidy (E.C. 3.1.30.1) a jsou vysoce citlivé k EDTA. Patří sem například ZEN1 z *Zinnia elegans*, BFN1 z *Arabidopsis thaliana*, BEN1 z ječmene, „mung bean“ nukleasa z *Phaseolus aureus* (MBN), TBN1 z rajčete, HBN1 z chmelu, ABN1 z *Arabidopsis brassica* a další. Kromě podobných biochemických vlastností vykazují poměrně vysokou homologii jejich aminokyselinových sekvencí.¹ Byly popsány různé funkce rostlinných nukleas, ale přesné mechanismy jejich působení zatím zůstávají neznámé. Do nedávna byla neznámá také jejich protinádorová aktivita, která je pravděpodobně výsledkem degradace nukleových kyselin v nádorových buňkách.

Funkce rostlinných nukleas

Nukleasy se v buňkách v přední řadě účastní replikace, transkripce, rekombinace a oprav poškozené DNA. Neméně důležitá je jejich role při výživě, reprodukci, obraně proti patogenům (hypersenzitivní odpověď), stresových situacích (např. vysoká salinita půdy) nebo při senescenci rostlin. Společným rysem těchto procesů je, že jsou provázány smrtí vybraných buněk – programovanou buněčnou smrtí (PCD = programmed cell death).

Funkcí nukleas ve výživě rostlin se myslí recyklace nukleových kyselin z odumírajících tkání, z nichž se zpět získávají nukleotidy a především důležitý fosfát. Příkladem nespecifické nukleasy, která se účastní recyklace nukleových kyselin, je extracelulární endonukleasa izolovaná z pylu rostliny *Nicotiana tabacum*. Během zrání pylu je nukleasa sekretována do okolí, které se nazývá *tapetum* a slouží jako nutriční tkáň vyvíjejícímu se pylu. Během zrání pylu je tato vrstva kompletně degradována. Účinkem extracelulární tabákové nukleasy dochází k degradaci RNA i DNA *tapeta* a vzniklé nukleotidy jsou poté využívány pylem.²

Klasickým příkladem PCD u cévnatých rostlin je přeměna tracheálních elementů (TE). Při tomto procesu dochází ke kolapsu vakuoly, degeneraci jádra a ostatních organel a ke zpevnění buněčné stěny elementů. Tím vznikne vodivé pletivo, které slouží rostlině k transportu vody. Ito a Fukuda (2002) detegovali přítomnost nukleasy ZEN1, která hraje zásadní roli v degradaci jaderné DNA tracheálních elementů. Při potlačení exprese této nukleasy totiž docházelo k nižší míře odbourání DNA v jádrech TE.³

Přítomnost nukleas byla detegována také při reakci rostlin na stres vyvolaný vysokou koncentrací NaCl v půdě. Akumulace NaCl v rostlině byla lokalizována převážně ve starých listech. Ve směsi cDNA získaných z těchto listů byla objevena nukleasa Bnucl1 o hmotnosti 36 kDa s poměrně vysokou homologií k enzymům ze skupiny *nukleasa I*, takže se lze domnívat, že tato nukleasa se podílela na zvýšené RNAsové a (hlavně) ssDNAsové aktivitě během působení soli. Transkript pro tuto nukleasu nebyl detegován u kontrolních rostlin což naznačuje, že k expresi této nukleasy dochází jen za stresových podmínek.⁴

Na rozdíl od programované buněčné smrti vlivem vnějších zásahů je odumírání buněk vlivem senescence neboli stárnutí přirozeným jevem ve vývoji rostlin. Jako v předchozích případech je vysoce regulovaný. Nejlépe je to vidět na starých odumírajících listech na podzim, kdy dochází nejprve k degradaci chloroplastů, odbourávání chlorofylu a syntéze různých barviv. K dalším procesům patří změny buněčného metabolismu, změny buněčné struktury a exprese genů. U senescentních rostlinek *A. thaliana* byla objevena nukleasa BFN1 patřící do skupiny *nukleasa I*. U nesenescenčních rostlin byly detegovány velmi nízké hladiny mRNA pro BFN1 v kořenech, listech a stoncích, zatímco při senescenci bylo pozorováno 10krát vyšší množství mRNA v listech a 2krát vyšší ve stoncích. S vyšší hladinou mRNA korelovala také vyšší RNAsová a ssDNAsová aktivita. U *Arabidopsis* dochází k senescenci listů a stonků v době kvetení, vytváření plodů a zrání semen. Vysoké hladiny mRNA pro BFN1 byly nalezeny také v květech, což pravděpodobně ukazuje (kromě role při senescenci) i na vyživovací roli této nukleasy.⁵

Hypersenzitivní odpověď (HR = hypersensitive response) je mechanismus, jímž rostlina reaguje na napadení patogenem. Tato reakce je provázána buněčnou smrtí, která vyúsťuje v rychlé odumírání buněk v místě napadení, což vede k omezení šíření infekce rostlinou. V tabáku byly nalezeny tři endonukleasy (NUCI, NUCII a NUCIII) ve spojení s HR po infekci mozaikovým virem tabáku. Tyto nukleasy byly schopny štěpit jednořetězcovou i dvořetězcovou DNA. Částečná aktivita NUCIII byla detegována v jádře, což může souviset s typickou fragmentací genomové DNA jako důsledek degradace při PCD. Degradace jaderné DNA byla pozorována po 24 až 72 hodinách a nikoliv po 6 až 12 hodinách od indukce buněčné smrti (v časných fázích). To ukazuje na fakt, že nukleasy byly exprimovány později a jejich činnost tedy nebyla impulsem pro zahájení buněčné smrti, ale slouží k „likvidaci“ DNA a RNA obsažené v buňce.⁶

Biologické aktivity rostlinných nukleas

Cytotoxické účinky na nádorové buňky byly testovány u MBN (běžně užívána při klonování genů), PN nukleasy z borovice černé, TBN1 z rajčete, HBN1 z chmelu a ABN1 z huseníku chudokvětého. Kromě ABN1 byly všechny nukleasy testovány *in vitro* na linii buněk lid-

ského melanomu (ML-2), kde nevykazovaly žádný významný antiproliferační efekt. Na druhou stranu, všechny zmíněné nukleasy inhibovaly růst nádorů při experimentech *in vivo*. Například nukleasy TBN1, HBN1 a ABN1 byly konjugovány s aktivovaným polyethylenglykolem o velikosti 5 kDa (NHS-PEG 5000) a intravenózně podávány myším. Navázané molekuly PEG na povrchové lysiny proteinu slouží ke stabilizaci molekuly, ochraně před proteasami a k prodloužení cirkulace konjugátu v krvi, což v důsledku zvyšuje účinek konjugovaných proteinů oproti nekonjugovaným. Testovaná dávka u nukleas činila 10 mg proteinu na 20 g hmotnosti myši. Inhibice růstu melanomu způsobená nukleasami TBN1, HBN1 a ABN1 činila 49, resp. 66, resp. 55 % oproti kontrolním skupině neošetřených myši. Nukleasy byly testovány také na karcinomu prostaty (LNCaP) a TBN1 navíc na neuroblastomu (UKF-NB-3). Při stanovení vedlejších účinků byl zjišťován účinek na vývoj spermií u myši a vliv na diferenciaci embryí *in vitro*. Ze všech pěti nukleas byly nejlepší výsledky získány s nukleasami TBN1, HBN1 a ABN1.^{7B}

Pravděpodobný mechanismus účinku bude nejspíše podobný působení živočišných RNAs s protinádorovým účinkem, u kterých již byl částečně prostudován. Dосud popsaná strategie zahrnuje interakci nukleasy

s povrchem membrány, její transport dovnitř buňky (endocytózou) a intracelulární transport do cytosolu, kde se nacházejí potenciální cílové molekuly v podobě mRNA, tRNA a dalších.

Závěr

Rostlinné nukleasy představují zajímavé enzymy, jak z hlediska jejich katalytických vlastností, tak z hlediska biologických aktivit. Jedná se o širokou skupinu enzymů napříč rostlinnými druhy, které vykazují podobné katalytické vlastnosti a genetickou podobnost. Navíc vykazují, kromě funkcí v rostlinách, další biologické aktivity, pokud jsou vneseny do jiných živých systémů.

V současné době je nutné vyřešit dostatečnou produkci těchto enzymů pro další biologické testování a studium těchto nukleas. Například nynější produkce rekombinantní nukleasy TBN1 v listech tabáku je sice fungující metodou, ale je poměrně náročná a vede k malým výtěžkům. Produkce aktivní nukleasy v bakterii *E. coli* selhala kvůli glykokoproteinové povaze TBN1. Zbývajícími možnostmi jsou produkce v kvasinkách *P. pastoris* nebo v suspenzní kultuře vhodných rostlinných buněk. Obě metody mají výhodu potenciálního transportu nukleasy do média, což by usnadnilo nejen její izolaci, ale také její purifikaci.

Literatura

1. Sugiyama M, Ito J, Aoyagi S, et al.: *Plant Mol. Biol.* 44, 387 (2000).
2. Matoušek J: *Biochem. Cell Biol.* 64, 891 (1985).
3. Ito J, Fukuda H: *Plant Cell* 14, 3201 (2002).
4. Muramoto Y, Watanabe A, Nakamura T, et al.: *Gene* 234, 315 (1999).
5. Pérez-Amador MA, Ablner ML, De Rocher EJ, et al.: *Plant Physiol.* 122, 169 (2000).
6. Mittler R, Lam E: *Plant Cell* 7, 1951 (1995).
7. Lipovová P, Podzimek T, Orctová L, et al.: *Neoplasma* 55, 158 (2008).
8. Matoušek J, Podzimek T., Poučková P, et al.: *Oncol. Res.* 18, 163 (2009).

Souhrn

Podzimek T.: Funkce a biologické aktivity rostlinných nukleas

Rostlinné nukleasy ze skupiny *nukleasa I* (E.C.3.1.30.1) jsou enzymy schopné štěpit jednořetězcovou RNA a DNA a tudíž nejsou specifické k cukerné složce nukleové kyseliny. Najde se mnoho dalších nukleových kyselin, které mohou sloužit jako substráty, např. polymer obsahující jednu bázi (poly(C), poly(A), poly(U) atd.). Někteří členové této skupiny efektivně štěpí i dvouřetězcovou DNA a RNA. Tato substrátová nespecificita dává prostor pro různé působení nukleas uvnitř nádorové buňky, jehož výsledkem bude buněčná smrt.

Klíčová slova: rostlinná nukleasa, protinádorový účinek, vedlejší negativní účinek

Summary

Podzimek T.: Functions and biological activities of plant nucleases

Plant nucleases from *nuclease I* family (E.C.3.1.30.1) cleave both single-stranded DNA and RNA, therefore they are called sugar non-specific nucleases. Moreover, some other molecules are cleavable by these nucleases, such as poly(C), poly(A), poly(U) etc. Some members of this family effectively cleave also both double-stranded DNA and RNA. This enzyme non-specificity leads to a degradation of various target molecules inside a tumor cell, resulting in a cell death.

Keywords: plant nuclease, antitumor effect, side negative effect

O B S A H

Úvodem	41
Kandidátky do voleb Rady a Revizní komise Biotechnologické společnosti	42
Káš J.: Víte, že ... ?	42
Frébort I.: Zpráva z 15. kongresu European Federation of Biotechnology	44
Káš J.: Recenze knihy „Biologická léčiva – Teoretické základy a klinická praxe“	45
Pečánková K.: Western blotting – principy a metody	46
Mrázek H., Vaněk O., Novák P., Bezouška K.: Nové technologie přípravy humanizovaných glykoproteinů a jejich využití v praxi	49
Podzimek T.: Funkce a biologické aktivity rostlinných nukleas	54

C O N T E N T S

Editorial	41
List of the nominees for elections of the Council and Audit Committee of the Czech Biotechnology Society	42
Káš J.: Do you know ... ?	42
Frébort I.: Report from the 15th Congress of the European Federation of Biotechnology	44
Káš J.: Book review „Biosimilars – backgrounds and methods“	45
Pečánková K.: Western blotting – principles and methods	46
Mrázek H., Vaněk O., Novák P., Bezouška K.: New technologies for preparation of humanized glycoproteins and their practical use	49
Podzimek T.: Functions and biological activities of plant nucleases	54

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIOPROSPECT

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

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

MK ČR E 19409

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností