

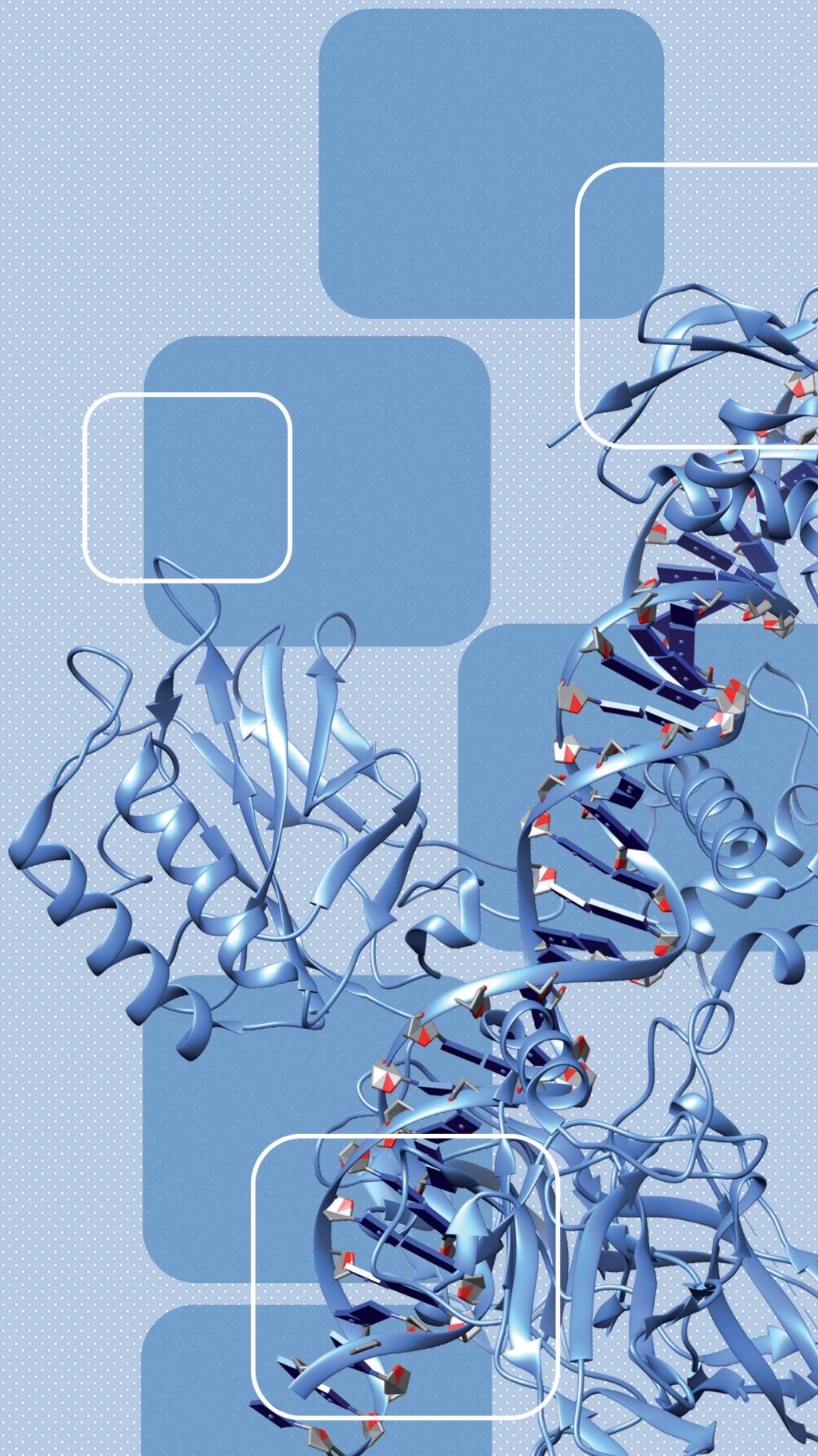
Bio

Ročník 28 • Číslo 4/2018

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

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



Bio prospect

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

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,

v současnosti zapomínáme na to, že ještě v nedávné minulosti jsme pro získání potřebných informací museli listovat v řadě knih. Dnes stačí otevřít počítač a v internetové encyklopedii získat během chvíle všechny potřebné informace. Oblíbenou a spolehlivou internetovou encyklopedií je Wikipedia provozovaná Nadací Wikimedia. Její oficiální pobočkou je Wikimedia Česká republika (<https://www.wikimedia.cz/>). Zmiňuji se o tom proto, abych s Vámi ocenil skvělou práci jejich spolupracovníků a nadšenců, kteří stále pracují na jejím zdokonalování, širokém záběru (odkazy v textu na další informace) a zejména na spolehlivosti presentovaných údajů. Česká pobočka pořádá již 10 let každoroční konference, kde se řeší zajímavé aktuální problémy. První konference se konala v r. 2009 v pražské městské knihovně, letošní bude 1. prosince v Olomouci. Konference jsou veřejně přístupné, ale důležité je to, že přednesené referáty od r. 2012 si můžete přečíst na jejich webových stránkách (<https://cs.wikipedia.org/wiki/Wikipedie:Wikikonference>).

V nedávné době jsme se dozvěděli jména nositelů Nobelových cen za rok 2018. Na základě závěti Alfréda Nobela jsou od r. 1901 udělovány ceny v 5 kategoriích, a to za chemii, fyziku, lékařství nebo fyziologii, literaturu a mír. Ceny jsou udělovány významným osobám a v případě cen za mír i organizacím. Ve stejném ročním období se od r. 1969 uděluje obdobná cena za ekonomii, která však není cenou dle závěti Alfreda Nobela a finančně se oceňuje z jiných zdrojů. Nejedná se tedy o Nobelovu cenu, i když se to často takto uvádí.

Za období 1901 – 2018 byla udělena Nobelova cena ze chemie 110 x (t.j. každoročně, zatímco v jiných kategoriích někdy ceny uděleny nebyly), a to celkem 180 laureátům. Pouze jediný laureát Frederick Sanger obdržel Nobelovu cenu za chemii 2 krát, a to v r. 1958 za stanovení struktury proteinů a v r. 1980, spolu s Paulem Bergem a Walterem Gilbertem, za metodu stanovení posloupnosti bází v nukleových kyselinách. Pokud se jedná o Marii Curie-Sklodowskou, ta obdržela cenu za chemii v r. 1911 (objev radia a polonia) a Nobelovu cenu za fyziku již v r. 1903 spolu s manželem a Henřim Becquerelem za výzkum záření objeveného H. Becquerem.

Prohlédneme-li si seznam Nobelových cen za chemii, rozprostře se před námi obraz historie a rozvoje chemie a na ní navazujících oborů jako je biochemie,

biotechnologie, potravinářství, výživa a v některých případech i medicína. Výběr laureátů byl vždy obtížný a v dnešní době velkého rozvoje vědy je to ještě složitější. Nejde však jen o rozhodnutí, který z nových objevů či poznatků je v daném období nejvýznamnější, ale v rozhodování komise udělující ceny hrají nespornou úlohu i běžné lidské vlastnosti. Mezi laureáty Nobelových cen za chemii nenajdeme např. Dmitrije Ivanoviče Mendělejeva, který nedostal Nobelovu cenu pro údajné nepřátelství se Švédem Svante Arrheniem (podle odtažených záznamů komise pro udělování cen). Další překážkou udělení ceny může být úmrtí navrženého, protože ceny *in memoriam* se neudělují. Návrh na udělení ceny je obvykle podán až za řadu let od vzniku objevu. I u udělení cen za rok 2018 je doba od publikace oceněného výsledku bádání 22 let. Zatímco v počátcích Nobelových cen byla cena většinou udělována jedinému laureátovi, v posledních letech jsou jmenováni dva a nejčastěji 3 laureáti, protože určitá problematika je současně studována na několika pracovištích a předmětem ocenění se stávají čím dál více inovace v metodických přístupech. Poslední Nobelova cena za chemii v r. 2018 byla udělena Frances Arnoldové „za řízenou evoluci enzymů“ a dvojici George P. Smith a Gregory Winter „za fágový displej peptidů a protilátek“. Jedná se o dvě na sebe navazující témata, se kterými Vás podrobně seznámí dále uvedený příspěvek kolegy Spiwoka.

Na závěr bychom se ještě rádi zmínili o českých laureátech Nobelových cen. Všeobecně je známo, že Češi získali jen dvě Nobelovy ceny. V r. 1959 obdržel Jaroslav Heyrovský Nobelovu cenu za chemii „za objev polarografické analýzy“. Objev učinil již v r. 1922 a o objevu polarografie přednesl přednášku na zasedání Faradayovy společnosti v Londýně již v roce 1923. Trvalo tedy zhruba 36 let, než se tento objev plně prosadil v chemické analýze. Druhou Nobelovu cenu získal Jaroslav Seifert v r. 1984 za literaturu. Nobelovu cenu však ještě získali další čeští rodáci. Byla to především Berta Kinská, provdaná Suttnerová, která získala jako první žena Nobelovu cenu za mír v r. 1905. Berta se narodila v Praze, žila v Kinského paláci na Staroměstském náměstí a po smrti svého otce hraběte Františka Josefa Kinského se odstěhovala do Brna. Byla to velmi vzdělaná žena. Kromě češtiny a němčiny ovládala francouzštinu, angličtinu a italštinu. Byla radikální pacifickou a spisovatelkou. Umřela ve Vídni v r. 1914 ve věku 71 let. Žila v Rakousku-Uhersku, a proto se počítá za Rakušanku.

Carl Ferdinand Cori se narodil v Praze na Novém Městě v Salmovské ulici č. p. 6/1693 v rodině lékaře, zoologa a universitního pedagoga Carla Isidora Coriho a akademičky Marie Coriové, roz. Lippichové. Od roku 1898 do 1914 žil s rodiči v Terstu (zde se otec stal ředitelem zoologické a výzkumné stanice), absolvoval tamní gymnázium a v roce 1914 byl přijat ke studiu na Lékařské fakultě německé Karlo-



-Ferdinandovy univerzity v Praze. Během studia byl v roce 1917 povolán do rakouské armády a sloužil na italské frontě I. sv. války v lyžařských oddílech a ve zdravotnickém sboru. Po skončení války v roce 1918 pokračoval ve studiu v Praze. Na fakultě se seznámil se studentkou Gertou Theresou Radnitzovou a jejich společné zájmy již zde vedly k výzkumné práci i publikování. Studium oba ukončili promocí v oboru medicíny s titulem MUDr. Carl Cori odjel (1922) do Ameriky a ve Státním ústavu (State Institute for the Study of Malignant Diseases) v Buffalu (stát New York) nastoupil na místo biochemika (1922–1931). Za půl roku přijela a nastoupila i Gerta Coriová. V r. 1947 obdrželi Nobelovu cenu za fyziologii nebo medicínu za objev „Coriho cyklu“ (propojení anaerobní glykolýzy ve svalch s glukoneogenezí v játrech). Při anaerobní glykolýze vzniká ve svalu pyruvát, který je redukován na laktát. Laktát je krví do-

praven do jater, kde je zpětně oxidován na pyruvát. Pyruvát je v játrech za spotřeby energie zpětně převáděn na glukosu, která je krví dopravována zpět do svalu. Tento děj zabraňuje hromadění toxického laktátu v krvi a pomáhá udržovat stálou hladinu glukosy v krvi.

V závěru našeho editorialem Vám všem děkujeme za přízeň a spolupráci a těšíme se na její pokračování v příštím roce. Přejeme Vám a Vaším blízkým příjemné prožití vánočních svátků a po celý příští rok pevné zdraví a mnoho úspěchů a splnění Vašich přání po všechny dny nadcházejícího roku 2019.

Se srdečnými pozdravy
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

NOBELOVA CENA ZA CHEMII PRO ROK 2018

Nobelovu cenu za chemii pro rok 2018 získali Frances H. Arnoldová (USA), George P. Smith (USA) a Sir Gregory P. Winter (Velká Británie). První oceněná vědkyně získala polovinu ceny za vývoj cílené evoluce proteinů, zejména enzymů. Druhá polovina ceny patří dalším dvěma vědcům za vývoj metody fágového displeje.

Enzymy jsou úžasné pro svou schopnost velmi specificky urychlovat chemické reakce. Velmi často se ale stává, že enzym nemá přesně ty vlastnosti, jaké bychom si představovali. V tom případě je možné enzym „vylepšit“ právě pomocí řízené evoluce.

Typický enzym je bílkovina skládající se z řekněme 500 aminokyselinových zbytků s přesně danou aminokyselinovou sekvencí. Tato sekvence předurčuje vlastnosti enzymu, tudíž záměnou jediné nebo několika aminokyselinových zbytků můžeme změnit vlastnosti enzymu, například jej vyřadit z provozu, nebo naopak jej stabilizovat, či dokonce „naučit“ enzym urychlovat nějakou novou reakci. Každý z aminokyselinových zbytků je možné nahradit za některou z 19 zbývajících kódovaných aminokyselin. Existuje tudíž téměř 10 000 možných variant našeho enzymu lišících se v jedné aminokyselině. Variant lišících se ve dvou zbytcích je téměř 5 milionů, variant lišících se ve třech zbytcích je více než dvě miliardy a tak dále. Je tudíž zoufalé snažit se vytvářet a testovat nové enzymy tak, že bychom systematicky měnili jednotlivé aminokyseliny.

Metoda řízené evoluce, za jejímž vývojem stojí první oceněná vědkyně, funguje tak, že je gen pro enzym (případně jiný protein) podroben mutaci. Existují například mikroorganismy s oslabenými mechanismy dohlížejšími na správnou replikaci DNA. Když je do takového

mikroorganismu vložen nějaký gen, tak po čase může být izolován zpět, ale v jeho sekvenci budou obsaženy různé mutace.

Další možností je provedení polymerasové řetězové reakce (Nobelova cena za chemii 1993), u které se většinou snažíme, aby byl přepis co nejpřesnější, ale kterou je možné uměle zneprávnit. Dalším používaným postupem je takzvaný DNA shuffling, který umožní poskládat nějaký gen z náhodných fragmentů dvou nebo více podobných genů.

Takto získáme tisíce nebo i miliony mutovaných variant našeho enzymu. Velká část z nich nebude mít lepší vlastnosti než původní enzym, ale malá část mutací se může „trefit“ do toho správného místa a zlepšit vlastnost enzymu. V další fázi experimentu je nutné izolovat jednotlivé mutanty, připravit odpovídající enzymy a testovat jejich vlastnosti. Tento jinak nákladný postup je možné v dnešní době zlevnit použitím mikrofluidních zařízení. Jinou možností je využít postupy vyvinuté dalšími letošními laureáty (viz níže). Další alternativou je použít selekci. Pokud například chceme „naučit“ enzym odbourávat nějakou toxickou látku, tak můžeme mutované varianty genu vložit do bakteriálních buněk. Buňky potom kultivujeme v médiu, které obsahuje toxickou látku. Buňky obsahující variantu enzymu, která umí látku odbourávat, přežijí. Z nich pak můžeme izolovat variantu genu pro náš nový enzym schopný degradace toxické látky.

Jaké je využití? Především, enzymy a jiné bílkoviny jsou málo stabilní. Jejich využití je tedy limitováno například vyššími teplotami nebo v prostředí nevodných rozpouštědel. Pokud máme gen pro nějaký zajímavý

ale málo stabilní enzym, můžeme se pokusit jej stabilizovat řízenou evolucí. V roce 2012 byla Nobelova cena udělena za vyřešení trojrozměrných struktur receptorů vázaných na G-proteiny. Jedná se o transmembránové proteiny (v tomto případě nejde o enzymy), se kterými je velmi obtížné pracovat, pokud jsou vytrženy z prostředí membrány. Jedním z figlů, které přispěly k objasnění prostorové struktury těchto proteinů, byla právě jejich stabilizace pomocí řízené evoluce. V roce 2008 získal Nobelovu cenu zelený fluorescenční protein, respektive jeho objevitelé. Tento protein (opět se nejedná o enzym) má velké uplatnění v mikroskopických technikách. Kromě originálního zeleného fluorescenčního proteinu máme dnes k dispozici celou řadu různobarevných a jinak vylepšených fluorescenčních proteinů, z nichž velká část vznikla právě postupem řízené evoluce. Jak již bylo řečeno, pomocí této metody je možné "naučit" enzym katalyzovat i zcela novou reakci. Například virová thymidinkinasa byla řízenou evolucí upravena tak, aby bylo možné použít její gen jako bezpečnostní prvek při genových terapiích nebo při transplantaci kostní dřeně.

Druhá polovina Nobelovy ceny byla udělena za vývoj metody zvané fágový displej (nebo chcete-li fágový display nebo fágové vystavování nebo dokonce vystavení pomocí fágů). Fágy jsou viry, které jako hostitele využívají bakterie. Pro tuto metodu použitý fág obsahuje DNA, která nese jeho genetickou informaci, a proteinový obal. Geny, které kódují obalové proteiny, jsou součástí genomu fága. Oceněné vědce napadlo vložit do určité části genu, který kóduje obalový protein, nějaký jiný gen, který pro náš účel nazveme genem X. Tím vznikne obalový protein, který bude z části tvořen sekvencí obalového proteinu a z části proteinem kódovaným genem X. Výsledný fág tak na svém povrchu „vystavuje“ protein X.

K čemu je to dobré? Zatímco první oceněný objev je inspirován evolucí, druhý objev je spíše inspirován imunitním systémem. Hlavní hráče imunitního systému, tedy protilátky, je možné připravit více způsoby. Tradiční způsob spočívá v tom, že je nějaké laboratorní zvíře naočkováno antigenem. Poté, co si proti němu vytvoří protilátky, je z něj získána krev a z ní je možné izolovat

takzvané polyklonální protilátky. Modernější monoklonální protilátky (Nobelova cena za fyziologii a medicínu 1984), je možné získat znesmrtněním slezinných buněk produkujících protilátky a separovat pouze ty buňky, které produkují určitou chemicky čistou protilátku.

Fágový displej umožnil vznik další zcela nové techniky pro přípravu protilátek. Z buněk imunitního systému zvířete je možné získat gen kódující protilátku. Protože tento gen je získán z různých buněk imunitního systému, bude směsí velkého počtu variant; každá tato varianta bude tvořit odlišnou protilátku. Každá z těchto protilátek by měla být schopna vázat jiný antigen. Směs variant genu pro protilátku je pomocí metody fágového displeje vystavena na površích fágů. Každý fág tak nese ve svém genomu jinou variantu genu a protein na povrchu každého fágu přesně odpovídá genu uvnitř. Pak stačí na vhodný nosič navázat antigen a s jeho pomocí vychytat ze směsi fágů pouze ty, které mají na svém povrchu protilátku vážící náš antigen. Z nich pak můžeme izolovat DNA, zjistit její sekvenci a pomocí rekombinantní technologie produkovat neomezené množství protilátek. Metoda byla v průběhu let vylepšena zavedením dalších variant (např. ribosomální display) a zavedením pokročilých metod sekvenace DNA.

Metodu fágového displeje je možné použít spolu s metodou řízené evoluce F. Arnoldové. DNA-polymerasa byla například „přeučena“ kombinací řízené evoluce a fágového displeje na RNA-polymerasu. Stejným přístupem byla vyvinuta nová polymerasa, která umí do DNA vnášet syntetické stavební prvky.

Letošní Nobelova cena za chemii tedy byla udělena za vývoj metod, které významně přispívají k přípravě proteinů s novými vlastnostmi. Takové proteiny mohou přinést pokrok ať už v medicíně při přípravě nových léků, v průmyslu například při přípravě biopaliv z odpadních produktů nebo pro ekologičtější výrobu chemických látek pomocí enzymů upravených „na míru“.

*doc. Spiwok
a kolektiv autorů
z Ústavu biochemie a mikrobiologie*

PROTEASY JAKO ALERGENY

Jana Pytelková

Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR; jana.pytelkova@uochb.cas.cz

Úvod

Alergie bývá označována za nemoc 21. století. Alergické choroby představují v současné době nejčastější poruchu imunity a počet nemocných stále stoupá. V České republice má téměř každé třetí dítě diagnostikovaný nějaký typ alergie¹. Projevy alergie jako nepřiměřené reakce imunitního systému na látky v okolním prostředí jsou různé. Nejčastěji je to polinosa (senná rýma), ekzém nebo urticaria (kopřivka). Běžným onemocněním je také astma bronchiale, chronické postižení dolních cest dýchacích a plic. Nejzávažnější alergickou reakcí celého organismu je anafylaktický šok bezprostředně ohrožující život.

Alergeny se dají rozdělit do skupin podle toho, jakým způsobem se dostávají do těla.

- Inhalační alergený do organismu vnikají dýchacími cestami. Do této skupiny patří např. rostlinné pyly, roztoči, zvířecí alergený nebo plísně.
- Potravinové alergený vstupují do organismu trávicím traktem a u nás jsou jejich významným zdrojem zejména vajíčka, mléko, pšeničná mouka, kořenová zelenina, rajčata, ořechy a různé ovoce.
- Hmyzí bodnutí je v našich podmínkách spojené s alergickou reakcí převážně při bodnutí včely a vosy, případně sršně nebo čmeláka.
- Kontaktní alergený působí při dotyku na kůži nebo sliznici (např. různé kovy, latex nebo lanolin).

Světová zdravotnická organizace (WHO) a výbor pro nomenklaturu Mezinárodní unie imunologických společností (IUIS) spravuje databázi známých alergenů. On-line přístup do databáze je možný na adrese www.allergen.org. Alergený mají jednotný způsob pojmenovávání. Název tvoří první tři písmena pocházející z rodového názvu organismu, ze kterého alergen pochází, dále první písmeno z druhového názvu a na konci číslo označující číslo alergenů. U členovců (Arthropoda) jsou alergený různých druhů, které mají stejné biochemické vlastnosti, označeny stejným číslem.

Alergený mají různou chemickou povahu a z velké části jsou zde zastoupeny proteiny. Významnou skupinou proteinů, které alergické reakce způsobují, jsou proteolytické enzymy, tzv. proteasy. Jedná se o skupinu hydrolytických enzymů, které štěpí peptidovou vazbu mezi dvěma aminokyselinami tvořící peptidový řetězec proteinů nebo peptidů. Podle katalytického mechanismu jsou proteasy děleny do čtyř hlavních tříd – serinové proteasy, cysteinové proteasy, aspartátové proteasy a metaloproteasy. Serinové proteasy obsahují ve svém aktivním místě hlavní katalytický aminokyselinový zbytek serin a jejich pH optimum bývá v alkalické oblasti. Mezi nejčastější serinové proteasy patří proteasy trypsinového a chymotrypsinového typu. Cysteinové proteasy, které mají v aktivním místě aminokyselinu

cystein, a aspartátové proteasy, které mají dva katalytické zbytky kyseliny asparagové, jsou nejvíce aktivní v kyselém pH. Jednou z nejpočetnějších skupin cysteinových proteas jsou cysteinové proteasy papainového typu. Metaloproteasy obsahují v aktivním centru atom kovu (nejčastěji zinek) a jsou obecně aktivní v neutrálním prostředí. Proteolytické enzymy se vyskytují ve všech organismech a jsou spojeny s velkým množstvím fyziologických procesů a funkcí.

Tento přehledný článek se zaměřuje na proteasy z různých organismů, které byly identifikovány jako alergený a bylo prokázáno, že u citlivých jedinců vyvolávají alergickou reakci.

Proteasy jako inhalační alergený

Alergený roztočů

Jedním z významných původců vzniku alergií jsou roztoči (Acari), patřící mezi členovce (Arthropoda). Jsou mezi nimi druhy parazitující nebo dravé, ale z pohledu významnosti pro vznik alergií jsou nejvýznamnější skupiny prachových a skladových roztočů. Hlavními zástupci prachových roztočů, kteří se v našich zeměpisných šířkách vyskytují, jsou prachovka prachová (*Dermatophagoides pteronyssinus*) a prachovka americká (*Dermatophagoides farinae*) z čeledi Pyroglyphidae. Největší výskyt těchto prachových roztočů je v domácím prachu, koberecích, matracích nebo lůžkovinách. Živí se materiálem bohatým na bílkoviny, především odumřelými zbytky kůže lidí i zvířat nebo plísněmi. Optimální podmínky pro jejich život a rozmnožování jsou teplota 25 – 30 °C a vlhkost vzduchu 55 – 75 %. Skladoví roztoči se vyskytují zejména v zemědělských surovinách, skladovaných potravinách nebo krmivu pro zvířata, nicméně v domácím prachu byly některé druhy nalezeny také. Mezi významné skladové roztoče patří roztoč moučný (*Acarus siro*) a roztoč zhoubný (*Tyrophagus putrescentiae*) z čeledi Acaridae a peříčkovec zhoubný (*Lepidoglyphus destructor*) a roztoč mlékožub obecný (*Carpoglyphus lactis*) z čeledi Glyciphagidae.

V současnosti je u roztočů identifikováno 37 skupin alergenů. Významnými alergený jsou enzymaticky aktivní proteasy, které v těle roztoče obvykle fungují jako trávicí proteasy. Ty pomáhají roztočům zajišťovat chemické zpracování přijaté potravy tím, že štěpí makromolekuly bílkovin až na jednotlivé aminokyseliny. Tyto proteasy procházejí s potravou střevem roztoče a jsou vylučovány s exkrementy do prostředí². Spolu s rozpadlými těly roztočů se pak stávají součástí domácího prachu a s ním jsou inhalovány do plic, kde interagují s imunitním systémem člověka a spouští alergickou reakci. Popsány byly alergenní cysteinové proteasy, serinové proteasy trypsinového a chymotrypsinového typu a kólagenolytické serinové proteasy (Tab. I).

Tab. I. Přehled proteasových alergenů. Roztoči: Blo t: *Blomia tropicalis*; Der f: *Dermatophagoides farinae*; Der m: *Dermatophagoides microceras*; Der p: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Eur m: *Euroglyphus maynei*; Tyr p: *Tyrophagus putrescentiae* (roztok žoubný). **Švábi:** Bla g: *Blattella germanica* (rus domácí); Per a: *Periplaneta americana* (šváb americký). **Pyl:** Amb a: *Ambrosia artemisiifolia* (ambrosie peřenolistá; Ant o: *Anthoxanthum odoratum* (tomka vonná); Cyn d: *Cynodon dactylon* (troskut prstnatý); Dac g: *Dactylis glomerata* (srha laločnatá); Hol l: *Holcus lanatus* (medyněk vlnatý); Lol p: *Lolium perenne* (jílek vytrvalý); Ory s: *Oryza sativa* (rýže setá); Pas n: *Paspalum notatum*; Pha a: *Phalaris aquatica*; Phl p: *Phleum pratense* (bojínek luční); Poa p: *Poa pratensis* (lipnice luční); Sor h: *Sorghum halepense* (čirok halabský); Zea m: *Zea mays* (kukuřice setá). **Houby:** Alt a: *Alternaria alternata*; Asp f: *Aspergillus fumigatus*; Asp fl: *Aspergillus flavus*; Asp n: *Aspergillus niger*; Asp o: *Aspergillus oryzae*; Asp v: *Aspergillus versicolor*; Cla c: *Cladosporium cladosporioides*; Cla h: *Cladosporium herbarum*; Cur l: *Curvularia lunata*; Epi p: *Epicoecum purpurascens*; Fus p: *Fusarium proliferatum*; Pen b: *Penicillium brevicompactum*; Pen c: *Penicillium citrinum*; Pen ch: *Penicillium chrysogenum*; Pen o: *Penicillium oxalicum*; Rhi o: *Rhizopus oryzae*; Rho m: *Rhodotorula mucilaginosa*; Tri r: *Trichophyton rubrum*; Tri t: *Trichophyton tonsurans*. **Potravinové aler-geny:** Act d: *Actinidia deliciosa* (aktinidie lahodná; kiwi); Ana c: *Ananas comosus* (ananasovník chocholatý); Cuc m: *Cucumis melo* (meloun cukrový). **Hmyzí jed:** Aed a: *Aedes aegypti* (komár egyptský); Api m: *Apis mellifera* (včela medonosná); Bom p: *Bombus pennsylvanicus* (čmelák pensylvánský); Bom t: *Bombus terrestris* (čmelák zemní); Pol d: *Polistes dominulus* (vosík francouzský); Pol e: *Polistes exclamans*; Ves v: *Vespula vulgaris* (vosa obecná). Křížkem jsou označeny biochemické skupiny alergenů, které obsahují alergeny s nejednotným systémem číslování.

Skupina alergenů	Proteasa	Identifikované alergeny
INHALAČNÍ ALERGENY		
Roztoči		
1	Cysteinová proteasa	Blo t 1, Der f 1, Der m 1, Der p 1, Eur m 1
3	Trypsin (serinová proteasa)	Blo t 3, Der f 3, Der p 3, Eur m 3, Tyr p 3
6	Chymotrypsin (serinová proteasa)	Blo t 6, Der f 6, Der p 6
9	Kolagenolytická serinová proteasa	Der p 9
Švábi		
2	Aspartátová proteasa	Bla g 2, Per a 2
10	Serinová proteasa	Per a 10
Pyl		
1 (pouze u Poaceae)	β -expansin (cysteinová proteasa)	Ant o 1, Cyn d 1, Dac g 1, Hol l 1, Lol p 1, Ory s 1, Pas n 1, Pha a 1, Phl p 1, Poa p 1, Sor h 1, Zea m 1
x	Cysteinová proteasa	Amb a 11
Spory hub		
x	Alkalická serinová proteasa (subtilisin)	Asp fl 13, Asp f 13, Asp o 13, Asp v 13, Cur l 1, Epi p 1, Pen b 13, Pen ch 13, Pen c 13
x	Vakuolární serinová proteasa	Alt a 15, Asp n 18, Cla c 9, Cla h 9, Cur l 4, Fus p 9, Pen ch 18, Pen o 18, Rho m 2
x	Aspartátová proteasa	Asp f 10, Rhi o 1
POTRAVINOVÉ ALERGENY		
x	Cysteinová proteasa	Act d 1 (aktinidin), Ana c 2 (bromelain)
x	Alkalická serinová proteasa	Cuc m 1 (kukumisin)
ALERGENY HMYZÍHO JEDU		
3 / 5	Dipeptidylpeptidasa IV (serinová proteasa)	Api m 5, Pol d 3, Ves v 3
4	Trypsin (serinová proteasa)	Bom p 4, Bom t 4, Pol d 4, Pol e 4
7	CUB serinová proteasa	Api m 7
9	Serinová karboxypeptidasa	Api m 9,
11	Aspartátová proteasa	Aed a 11

Alergeny ze skupiny 1 – cysteinové proteasy:

První skupina alergenů roztočů zahrnuje cysteinové proteasy papainového typu. Tento typ alergenů byl identifikován u druhů *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, *Dermatophagoides microceras*, *Blomia tropicalis* a *Euroglyphus maynei*. U roztočů se jedná o nejvýznamnější a také nejvíce prostudovanou skupinu alergenů, zejména u zástupců rodu *Dermatophagoides*. Patří sem hlavní alergen roztoče *D. pteronyssinus* označený Der p 1. Pomocí imunolokalizace byl tento alergen nalezen v buňkách střevního epitelu, lumen střeva a ve velkém množství také v exkrementech^{3, 4}. Alergen se dostává do prostředí a spolu s prachem a dalšími alergeny je vdechován do dýchacích cest. Zde se Der p 1 nejprve dostává do kontaktu se sliznicí, kde svojí proteolytickou aktivitou narušuje mezibuněčné spojení (tzv. tight junction) tvořené proteiny okludinem a kladinem^{5, 6}. Při delší expozici alergenu dochází ke snížení tvorby těchto proteinů⁷. Poškozením povrchového epitelu zajišťuje Der p 1 průnik do plicní tkáně a otvírá tím zároveň cestu ostatním alergenům. Uvnitř buněk plicního epitelu Der p 1 aktivuje receptory PAR-2 (Protease Activated Receptor), čímž indukuje vylučování cytokinů, jako jsou GM-CSF, IL-6 a IL-9 podporujících zánětlivý proces. Alergen se dále dostává do kontaktu s imunitními buňkami v těle, na jejichž povrchu dochází ke štěpení receptorů CD 23 (na B-lymfocytech)^{8, 9}, CD 25 (na T-lymfocytech)¹⁰ a CD 40 (na dendritických buňkách)¹¹. Štěpení CD receptorů výsledně vede třemi různými mechanismy k porušení procesu regulace syntézy imunoglobulinu IgE, který je zodpovědný za alergickou hypersensitivitu.

Dále Der p 1 působí na povrchu plicních sklípků, kde narušuje plicní surfaktant produkovaný plicními epitelálními buňkami. Surfactant je tvořen komplexem lipoproteinů, které mají ochrannou schopnost vázat patogeny a také aktivovat buňky imunitního systému. Bylo objeveno, že Der p 1 štěpí surfaktantový protein A (SP-A) a D (SP-D), čímž dochází ke ztrátě jejich ochranné role¹². Komplexní působení alergenů ze skupiny cysteinových proteas je příčinou jejich vysoké alergenicity.

Alergeny ze skupiny 3, 6 a 9 – serinové proteasy:

Další skupinou alergenních proteas jsou serinové proteasy, které obsahují proteasy trypsinového typu (skupina 3), chymotrypsinového typu (skupina 6) a kolagenolytické proteasy (skupina 9). Serinové proteasy mají funkci hlavních trávicích proteas zejména u skladových roztočů, u prachových roztočů mají pro trávení potravy roli minoritní¹³. Byly nalezeny v exkrementech roztočů a patří mezi alergeny, které se akumulují v prostředí¹². Bylo zjištěno, že tyto alergeny působí svou proteolytickou aktivitou podobné změny na plicním epitelu jako alergen Der p 1¹⁴ tím, že štěpí transmembránové proteiny okludinu a kladinu¹⁵, zvyšují permeabilitu plicního epitelu pro další alergeny, štěpí receptor PAR-2 a indukují tvorbu prozánětlivých cytokinů^{16, 17}. Serinové proteasy vznikají v těle roztočů v neaktivní formě a u prachových roztočů je jejich hlavním aktivátorem cysteinová proteasa Der p 1¹⁸.

Alergeny švábů

Švábi (Blattodea) je řád hmyzu, který zahrnuje více než 3000 druhů. Většina z nich žije ve volné přírodě v tropických a subtropických oblastech, nicméně existuje také několik druhů synantropních (tj. žijících v blízkosti lidských obydlí), které jsou rozšířené po celém světě. Mezi nejhojnější synantropní druhy patří šváb americký (*Periplaneta americana*) a rus domáci (*Blattella germanica*). Švábi jsou většinou všežraví a v lidských obydlích nebo potravinářských provozech napadají skladované potraviny. Z jejich exkrementů a těl se do prostředí dostávají alergeny, které se stávají součástí prachu a jeho inhalace může u citlivých jedinců vyvolat alergickou reakci. U švábů bylo identifikováno 12 skupin alergenů s různými biochemickými vlastnostmi a mezi nimi také dvě skupiny proteasových alergenů ze třídy aspartátových proteas (skupina 2) a serinových proteas (skupina 10) (Tab. I).

U švába *P. americana* byl identifikován hlavní alergen, označený jako Per a 10. Tento enzym patří mezi serinové proteasy trypsinového typu. Stejně jako u roztočů se jedná o aktivní enzym. V plicním epitelu indukuje tvorbu histaminu a sekreci prozánětlivých interleukinů (IL-4 a IL-5)¹⁹. Alergen Bla g 2 vykazuje sekvenční homologii s aspartátovými proteasami a byl nalezen ve vysoké koncentraci v trávicím traktu *B. germanica*. Na rozdíl od předchozího alergenu však není tato proteasa aktivní. Mutací aminokyselin v aktivním místě došlo k její inaktivaci. Biologická funkce tohoto proteinu je neznámá^{20, 21}.

Pylové alergeny

Alergie na pyl, tzv. polinosa, je v Evropě velmi rozšířená. Patří mezi jednu z nejčastějších příčin alergické rýmy²². Doposud bylo identifikováno několik desítek pylových alergenů s různými biochemickými vlastnostmi a mezi nimi také proteasy²³. Hlavním alergenem u pylu trav (*Poaceae*) jsou tzv. β -expansiny. Jedná se o cysteinové proteasy papainového typu, nejvíce příbuzné katepsinu B. Tyto alergeny tvoří skupinu 1 alergenů. Při styku pylového zrna s vlhkým povrchem v plicích dojde k uvolnění β -expansinu a jeho interakci s plicním epitelem, kde se váže na imunoglobuliny IgE a spouští alergickou reakci. Tento alergen byl identifikován u bojínku lučního (*Phleum pratense*), lipnice luční (*Poa pratensis*), kukuřice seté (*Zea mays*) a dalších trav. Dalším identifikovaným proteasovým alergenem je cysteinová proteasa Amb a 11. Jedná se o hlavní pylový alergen ambrosie peřenolisté (*Ambrosia artemisiifolia*). Strukturní analýza ukázala, že se jedná o protein vysoce podobný alergenům roztočů (např. Der p 1) a vykazuje také podobnou aktivitu²⁴.

Pylová zrna rostlin, která u citlivých jedinců mohou vyvolat alergickou reakci, obsahují i další typy proteas. Aktivita serinových proteas byla detekována např. u břízy (*Betula alba*), cypřišku (*Chamaecyparis obtusa*), jalovce (*Juniperus scopulorum*) nebo ambrosie (*A. artemisiifolia*)^{25, 26} a dále také např. u trav lipnice luční (*P. pratensis*) a jílku vytrvalého (*Lolium perenne*)^{27, 28}. Aspartátová proteasa byla nalezena u krypt-

tomerie japonské (*Cryptomeria japonica*)²⁹. Alergeny z těchto dvou proteasových skupin zatím nebyly charakterizovány a imunologicky klasifikovány. Nicméně je známo, že serinové proteasy jsou schopné rozrušit bariéru plicního epitelu a zvýšit jeho propustnost pro molekuly, které se v plových zrncích nacházejí³⁰.

Alergeny houbových spor

Alergii mohou vyvolávat také spory hub (Fungi). Velikost spor se pohybuje mezi 3 a 12 µm a šíří se velmi snadno vzduchem. Rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* a *Alternaria* jsou nejčastěji se vyskytující houby, které mají spojitost se vznikem alergií a mohou být silnými rizikovými faktory pro vznik a rozvoj astmatu³¹. Nejpodrobněji zmapované alergeny jsou u zástupců rodu *Penicillium* a *Aspergillus*, u kterých byly popsány více než tři desítky různých alergenů. Mezi hlavní alergeny patří alkalické a vakuolární serinové proteasy, které porušují epiteliální bariéru v plicních sklípcích^{32,33,34}. Další skupinou alergenních proteas hub jsou aspartátové proteasy. U druhu *Rhizopus oryzae* byla identifikována proteasa Rhi o 1 vykazující homologii s alergenem Bla g 2. Na rozdíl od enzymaticky neaktivního alergenu švába, je alergen Rhi o 1 aktivní enzym funkční v kyselé pH³⁵. Podobná proteasa byla identifikována také u druhu *Aspergillus fumigatus*³⁶.

Potravinové alergeny

Dalším zdrojem alergenů jsou potraviny. Nejčastěji se jedná o alergeny proteinové povahy, u nichž k vyvolání alergické reakce stačí i stopové množství. Mezi potravinovými alergeny nalezneme dvě skupiny proteas³⁷. První skupinou jsou cysteinové proteasy papainového typu, které se nacházejí v několika druzích tropického ovoce. Například v kiwi (*Actinidia deliciosa*) je hlavní alergen aktinidin (Act d 1), který představuje 50 % rozpustného proteinu v plodech. Více než 90 % pacientů alergických na kiwi reaguje právě na tento alergen³⁸. Dalším enzymem ze stejné skupiny cysteinových proteas je bromelain z ananasu (*Ananas comosus*), označovaný jako Ana c 2. Zatím jediným známým potravinovým alergenem ze skupiny serinových proteas je kumisin (Cuc m 1), alkalická proteasa podobná subtilisinu obsažená v melounu cukrovém (*Cucumis melo*)³⁹.

Na základě podobnosti molekul alergenů často dochází k tzv. zkřížené alergické reakci. Její podstatou je sekvenční a strukturní homologie mezi alergeny z různých organismů, kdy se IgE protilátky, původně zvýšené proti jednomu alergenů, vážou na podobný alergen jiného druhu a spustí alergickou reakci⁴⁰. Ke zkříženým alergiím dochází např. mezi hlavním proteasovým alergenem v plodech kiwi Act d 1 a pylem břízy⁴¹, bojínku lučního⁴² nebo pelyňku⁴³. Alergen z kiwi způsobuje také zkříženou reakci s latexem; tomuto jevu se říká „latexo-ovocný syndrom“⁴⁴.

Alergeny hmyzího jedu

Hmyz z řádu blanokřídlí (*Hymenoptera*) může způsobit závažné až život ohrožující alergické reakce. Alerge-

ny tohoto hmyzu jsou obsaženy v jeho jedu, který primárně slouží k obraně před nepřítelem nebo omráčení kořisti. U nás z pohledu alergií patří k nejvýznamnějším blanokřídlým čeledi včelovití (*Apidae*) a sršňovití (*Vespidae*). Jed, který je produkován v tzv. jedovém aparátu, obsahuje více než 60 různých komponent – proteinů, peptidů a malých molekul. Hlavní složkou jedu je peptid melitin, který porušuje strukturu buněčných membrán, způsobuje hemolýzu a navozuje zánětlivou reakci v místě vpichu. Další významnou složkou hmyzího jedu jsou enzymy.

Z pohledu alergenů je nejvíce prostudovaný jed včelí. Množství jedu, které se dostane do organismu při bodnutí, je u včely 50 až 140 µg. Bylo v něm identifikováno 12 různých alergenů; hlavní jsou enzymy fosfolipasa A a hyaluronidasa. Mezi významné alergeny patří také tři alergeny proteasové. Molekula alergenu Api m 7 se skládá ze dvou domén – proteasové domény, která je homologická se serinovými proteasami trypsinového typu a tzv. CUB domény, která se účastní protein-proteinových interakcí^{45,46}. Další serinovou proteasou je alergen Api m 9, enzym karboxypeptidasa, který odštěpuje aminokyseliny z C-terminálního konce proteinového řetězce. Třetím proteasovým alergenem je lysosomální serinová proteasa Api m 5, která vykazuje sekvenční homologii s lidskou dipeptidyl peptidasou IV. Stejná alergenní proteasa byla nalezena také u vosy obecné (*Vespula vulgaris*) a vosíka francouzského (*Polistes dominulus*)⁴⁷. Jed čmeláka zemního (*Bombus terrestris*) obsahuje minimálně 4 alergeny, včetně proteasy trypsinového typu⁴⁸. U pacientů s alergií na látky obsažené v jedu blanokřídlého hmyzu se často vyskytuje zkřížená alergie mezi alergeny jedu včely, čmeláka i vosy⁴⁹.

Alergickou reakci na hmyzí jed mohou způsobit také zástupci řádu dvoukřídlého hmyzu (*Diptera*). Mezi identifikovanými alergeny byla u komára egyptského (*Aedes aegypti*) nalezena proteasa, která byla charakterizovaná jako lysosomální aspartátová proteasa Aed a 11⁵⁰.

Závěr

Tento článek shrnuje poznatky o proteolytických enzimech, které přispívají k vyvolání alergických reakcí a byly klasifikovány jako alergeny. Počet lidí s hypersenzitivitou na nějaký typ alergenu stále narůstá a význam alergických onemocnění se zvyšuje. Studium biochemických vlastností jednotlivých alergenů umožňuje pochopit komplexní působení alergenů na imunitní systém. Na základě těchto informací budou vyvíjeny nové přístupy k léčbě a prevenci alergických onemocnění.

Poděkování

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

Literatura

1. Státní zdravotní ústav: <http://www.szu.cz/publikace/studie-zdravi-deti-2016>, staženo 11. 6. 2018
2. Tovey ER, Chapman MD, et al.: *Nature* 289(5798), 592 (1981).
3. Thomas B, Heap P, et al.: *Int Arch Allergy Appl Immunol* 94(1-4), 365 (1991).
4. Tovey ER and Baldo BA: *J Med Entomol* 27(3), 368 (1990).
5. Wan H, Winton HL, et al.: *J Clin Invest* 104(1), 123 (1999).
6. Roche N, Chinnet TC, et al.: *Eur Respir J* 16(2), 309 (2000).
7. Henriquez OA, Den Beste K, et al.: *Int Forum Allergy Rhinol* 3(8), 630 (2013).
8. Hewitt CR, Brown AP, et al.: *J Exp Med* 182(5), 1537 (1995).
9. Gough L, Schulz O, et al.: *J Exp Med* 190(12), 1897 (1999).
10. Schulz O, Sewell HF, et al.: *J Exp Med* 187(2), 271 (1998).
11. Ghaemmaghami AM, Gough L, et al.: *Clin Exp Allergy* 32(10), 1468 (2002).
12. Deb R, Shakib F, et al.: *J Biol Chem* 282(51), 36808 (2007).
13. Morales M, Iraola V, et al.: *J Med Entomol* 50(1), 147 (2013).
14. Chapman MD, Wunschmann S, et al.: *Curr Allergy Asthma Rep* 7(5), 363 (2007).
15. Wan H, Winton HL, et al.: *Clin Exp Allergy* 31(2), 279 (2001).
16. King C, Brennan S, et al.: *J Immunol* 161(7), 3645 (1998).
17. Sun G, Stacey MA, et al.: *J Immunol* 167(2), 1014 (2001).
18. Herman J, Thelen N, et al.: *Biochim Biophys Acta* 1840(3), 1117 (2014).
19. Sudha VT, Arora N, et al.: *Allergy* 63(6), 768 (2008).
20. Arruda LK, Vailles LD, et al.: *J Biol Chem* 270(33), 19563 (1995).
21. Pomes A, Chapman MD, et al.: *Am J Respir Crit Care Med* 165(3), 391 (2002).
22. Bauchau V and Durham SR: *Eur Respir J* 24(5), 758 (2004).
23. Asam C, Hofer H, et al.: *Allergy* 70(10), 1201 (2015).
24. Bouley J, Groeme R, et al.: *J Allergy Clin Immunol* 136(4), 1055 (2015).
25. Bagarozzi DA, Jr., Pike R, et al.: *J Biol Chem* 271(42), 26227 (1996).
26. Bagarozzi DA, Jr., Potempa J, et al.: *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(3), 363 (1998).
27. Gunawan H, Takai T, et al.: *Allergol Int* 57(1), 83 (2008).
28. Raftery MJ, Saldanha RG, et al.: *Respir Res* 4 (10) (2003).
29. Ibrahim AR, Kawamoto S, et al.: *Int Arch Allergy Immunol* 152(3), 207 (2010).
30. Runswick S, Mitchell T, et al.: *Respirology* 12(6), 834 (2007).
31. Licorish K, Novey HS, et al.: *J Allergy Clin Immunol* 76(6), 819 (1985).
32. Shen HD, Lin WL, et al.: *Clin Exp Allergy* 29(5), 642 (1999).
33. Shen HD, Lin WL, et al.: *Clin Exp Allergy* 31(2), 295 (2001); Tai HY, Tam MF, et al.: *Allergy* 61(3), 382 (2006).
34. Chiu LL, Perng DW, et al.: *J Immunol* 178(8), 5237 (2007).
35. Sircar G, Saha B, et al.: *PLoS One* 10(12), e0144547 (2015).
36. Cramer R: *Int Arch Allergy Immunol* 115(2), 99 (1998).
37. Breiteneder H and Radauer C: *J Allergy Clin Immunol* 113(5), 821 (2004).
38. Pastorello EA, Conti A, et al.: *J Allergy Clin Immunol* 101(4 Pt 1), 531 (1998).
39. Cuesta-Herranz J, Pastor C, et al.: *Clin Exp Allergy* 33(6), 827 (2003).
40. Ferreira F, Hawranek T, et al.: *Allergy* 59(3), 243 (2004).
41. Gall H, Kalveram KJ, et al.: *J Allergy Clin Immunol* 94(1), 70 (1994).
42. Pastorello EA, Pravettoni V, et al.: *J Allergy Clin Immunol* 98(3), 601 (1996).
43. Blanusa M, Perovic I, et al.: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 857(2), 188 (2007).
44. Moller M, Kayma M, et al.: *Allergy* 53(3), 289 (1998).
45. Abdu, Mahmoud Al-Samie M, et al.: *International Journal of Advancements in Research and Technology* 1(2), 1 (2012).
46. Georgieva D, Greunke K, et al.: *Mol Biosyst* 6(6), 1056 (2010).
47. Blank S, Seismann H, et al.: *J Immunol* 184(9), 5403 (2010).
48. Hoffman DR, El-Choufani SE, et al.: *J Allergy Clin Immunol* 108(5), 855 (2001).
49. Bilo BM, Rueff F, et al.: *Allergy* 60(11), 1339 (2005).
50. Cantillo JF, Puerta L, et al.: *Allergy* 72(10), 1499 (2017).

Souhrn

Pytelková J.: Proteasy jako alergen

Prevalence alergických onemocnění celosvětově dramaticky stoupá. Mezi nejvýznamnější alergenů patří proteolytické enzymy (proteasy). Byly nalezeny jako alergen hmyzího jedu, potravinové alergenů a velká skupina inhalačních alergenů, které pocházejí z roztočů, hmyzu, rostlinného pylu a spor hub. Proteasové alergenů patří do různých tříd proteolytických enzymů, a to cysteinových, serinových a aspartátových proteas. K jejich vysoké alergenicitě přispívá především enzymová aktivita, která se účastní několika fází patofyziologie hypersenzitivní reakce. Proteasy zároveň narušují buňky plicního epitelu a umožňují průnik také ostatním typům alergenů. V tomto přehledném článku jsou shrnuty dostupné poznatky o klasifikaci a funkci alergenních proteas.

Klíčová slova: alergen, alergie, proteolytické enzymy, proteasy

Summary

Pytelková J.: Proteases as allergens

The global prevalence of allergic diseases is dramatically increasing worldwide. Proteolytic enzymes (proteases) are among the most important allergens. They have been identified as insect venom allergens, food allergens, and a large group of inhalant allergens from mites, insects, plant pollen, and fungal spores. Protease allergens belong to different classes of proteolytic enzymes, including cysteine, serine and aspartic proteases. The enzymatic activity contributes to the high allergenicity of proteases and participates in several phases of pathophysiology of the hypersensitivity reaction. Proteases also play an important role in the disruption of the lung epithelial barrier and allow penetration of other types of allergens. This review article summarizes current knowledge on classification and function of allergenic proteases.

Keywords: allergens, allergy, proteolytic enzymes, proteases

STANDARD „BEZ GMO“

Anna Petrová

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

Úvod

Standard pro výrobu a produkty „bez genetické modifikace“, neboli Standard „Bez GMO“, je dokument vydaný Spolkem pro komodity a krmiva (SKK), který vznikl jako reakce na požadavky trhu, především pak na mlékárenský průmysl¹. Tento Standard by měl pomoci producentům mléka nebo mlékárnám prodávat své produkty do zemí mimo ČR, a to především do Německa². Aby se producenti krmiv a potravin nemuseli přizpůsobovat odlišným standardům od různých odběratelů, byl sepsán tento jednotný Standard, který určuje zásady a podmínky pro zpracování produktů, které nejsou geneticky modifikované³.

Do rozsahu certifikace Standardu „Bez GMO“ spadájí krmiva, zemědělství a živočišná výroba. Na produkty ekologického zemědělství se tento Standard nevztahuje⁴.

Používání značky „Bez GMO“

Produkty, které nejsou vyrobeny z geneticky modifikovaných (GM) krmiv a jsou ověřeny dle kritérií Standardu, mohou být certifikovanou společností označeny značkou „Bez GMO“. Značky se využívají dvě, pro krmiva a ostatní použití v potravinářském řetězci^{4,5}, viz Obr. 1, a pro produkty živočišného původu, viz Obr. 2.

Pokud chce společnost používat značku „Bez GMO“, je potřeba, aby si zažádala o nezávislý audit certifikačním orgánem, který bude ověřený podle Standardu. Společnost, která nemá souhlas Vlastníka Standardu „Bez GMO“ a nositele značky (Spolek pro komodity a krmiva) a certifikace „Bez GMO“, tuto značku nesmí na svých produktech uvádět, tj. značka je chráněna autorskými právy.

Legislativními podklady pro Standard vyplývají z legislativy Evropského společenství a z národní harmonizované legislativy. V souladu s platnou legislativou je každá společnost povinná označovat produkty obsahující GMO nebo potraviny z nich sestávající. Produkty bez genetické modifikace být označovány nemusí. Produkty, které neobsahují GM složky z více než 0,9 %, a to za předpokladu, že přítomnost tohoto materiálu je náhodná nebo ji nejde technicky zabránit, mohou též nést označení „Bez GMO“⁴.

Certifikace

Zažádá-li si společnost o certifikaci, aby její výrobky mohly nést značku „Bez GMO“, proběhne v takové společnosti audit. Audity hodnocení a sledování krmiv a potravin označených jako „Bez GMO“ jsou prováděny certifikačními orgány, které mají platnou akreditaci pro



Obr. 1: Logo „Bez GMO“ pro krmiva a ostatní použití v potravinářském řetězci⁵



Obr. 2: Logo „Bez GMO“ pro produkty živočišného původu⁵

certifikaci produktů⁴. V České republice to jsou společnosti BUREAU VERITAS CZECH REPUBLIC, spol., s. r. o., TÜV SÜD Czech, s. r. o. a Česká společnost pro jakost, z.s.⁶. Vzhledem k tomu, že krmiva „Bez GMO“ dle Standardu podléhají přísným kritériím a kontrolám, musí producent provádět opatření, aby krmiva „Bez GMO“ nebyla kontaminována GM složkou, a tedy je potřeba pečlivě vyčistit vše, co může s krmivy přijít do styku, jako např. sklady, přístroje a dopravní prostředky.

Pokud je živočišná složka produktu označena jako „Bez GMO“, je potřeba, aby producent prokázal minimální dobu krmení hospodářských zvířat krmivy, které nejsou geneticky modifikovány. Tuto minimální dobu udává Standard. Například nejmenší minimální doba krmení krmivy „Bez GMO“ je stanovena pro drůbež na produkci vajec (6 týdnů), naopak pro koně a skot pro produkci masa je doba delší (12 měsíců a minimálně $\frac{3}{4}$ jejich života). Určitým živočišným druhům musejí být podávána krmiva „Bez GMO“ po celý jejich život.

Pokud je při auditu zjištěno, že produkty společnosti jsou kontaminovány GM materiálem ve výši, kdy je možné ještě udělat nápravu a takový materiál odstranit, dostane společnost stanovený čas na jeho odstranění. V případě, že společnost do stanovené doby své chyby nenapraví, certifikační orgán pozastaví platnost certifikátu nebo jej úplně odebere.

Udělený certifikát je platný maximálně po dobu jednoho roku a to ve všech třech kategoriích rizik. Poté si musí společnost opět zažádat o audit, kde je zjištěno, zda nejsou jejich produkty kontaminovány geneticky modifikovaným materiálem víc, než dovoluje limit⁴.

Kategorizace podniků dle rizikovosti a odběr vzorků

Certifikační orgán zařazuje společnost do tří kategorií, podle toho, jak velké u nich hrozí riziko kontaminace produktů GM materiálem. Čím vyšší riziko kontaminace, tím více vzorků je odebíráno a zároveň ve společnosti dochází k častějším kontrolám produktů.

Kategorie rizika „0“ se vyznačuje žádným nebo malým rizikem kontaminace produktů „Bez GMO“. V takovém podniku nejsou používány žádná GM krmiva ani suroviny. Dodávky rizikových krmiv nebo surovin jsou odebírány pouze v případě, že jsou označeny značkou „Bez GMO“. V takových podnicích je potřeba provádět kontroly, zda nedošlo u zpracovávaných surovin ke kontaminaci produktů nějakým geneticky modifikovaným materiálem alespoň dvakrát do roka.

V kategorii rizika „1“ hrozí střední riziko kontaminace. Jedná se o podniky, které mají prostorově odděleny produkty s GM a bez GM. K přepravě surovin „Bez GMO“ mají určené dopravní prostředky, ve kterých se nepřeváží suroviny s genetickou modifikací. Kontrola zpracovávaných surovin je zde prováděna alespoň šestkrát do roka.

Ve třetí kategorii, kategorii rizika „2“, je vysoká hrozba kontaminace, protože takové podniky nemají prostorově odděleny produkty s GM a bez GM, ale výroba je oddělena pouze časově. Krmiva odebírána podnikem nejsou certifikovaná dle Standardu, stejně tak jako externí mobilní zařízení, která krmiva míchají. Kontroly

zpracovávaných produktů zde musejí probíhat minimálně patnáctkrát do roka.

Laboratoře, které provádějí rozbor surovin jednotlivých podniků, musí být akreditované. Standard uvádí seznam laboratoří, které k rozborům produktů uznává⁴.

Požadavky systému „Bez GMO“

Aby se co nejefektivněji předešlo kontaminaci produktů „Bez GMO“ produkty s genetickou modifikací, je potřeba, aby podnik dodržoval požadavky Standardu „Bez GMO“. Následující výčet udává příklad takových požadavků.

- Každý podnik musí mít zdokumentovaný svůj aktuální stav, tedy informace o tom, které suroviny a krmiva se v podniku vyrábí, jsou tam skladována a je s nimi manipulováno. Dále je potřeba mít uvedenou recepturu a specifikace vyráběných produktů „Bez GMO“ a mít seznam dodavatelů, subdodavatelů a zpracovatelů.
- Všechny produkty, které již podnik opustily, musejí být zpětně výsledovatelné během jednoho pracovního dne.
- Je potřeba mít plán odběru vzorků.
- Krmiva a suroviny „Bez GMO“ přijímána do podniku, které jsou potencionálně rizikové, musejí mít veškerá potřebná potvrzení od dodavatele, jako např. prohlášení o nepřítomnosti GMO v dodávce.
- Každý rok musí být v podniku proveden interní audit a to pracovníky, které mají požadovaná školení⁴.

Diskuse

Z ČR je každoročně vyvezeno 680 milionů tun mléka, přičemž více než 75 % je vyváženo na německý trh. Vzhledem k tomu, že se němečtí spotřebitelé v posledních letech čím dál více ptávají po potravinách typu bio, eko a „bez GMO“, bylo potřeba sepsat jednotný standard udávající jasná pravidla pro zpracování produktů, které nejsou geneticky modifikované. Tato poptávka byla podtržena požadavkem některých německých mlékáren, které v roce 2016 začaly požadovat certifikované dodávky mléka pocházejících z dojníc, které nebyly krmeny GM krmivem. Z toho důvodu byl Spolkem pro komodity a krmiva vydán ke dni 18. září 2017 Standard pro výrobu a produkty „bez genetické modifikace“². I když si je předseda představenstva SKK vědom iracionality takového označování potravin, bylo z důvodu tlaku okolních států potřeba Standard vydat⁷. Například sóju, která je podstatným zdrojem bílkovin pro dojnice, je do ČR dovážena ve velkém a je geneticky modifikována, bude potřeba nahradit jiným krmivem, které bude pravděpodobně dražší⁸.

V Německu jsou spotřebitelé ochotni si za mléko „bez GMO“ připlatit², přitom pravděpodobně ani neví, že mléko v EU není geneticky modifikováno, protože není povoleno k hospodářským účelům chovat geneticky upravenou krávu a z krmiva se genetická modifikace do zvířete dostat nemůže⁹. Jedná se tedy spíše o marketingový trik, jak udržet cenu mléka ve vyšších hladinách, který tentokrát dosáhl až do politické sféry. Vzhledem k tomu, že média hází často negativní stín na GMO, vyvolávají tak v lidech dojem, že se jedná o něco špatného, možná dokonce až toxického. U ta-

kových lidí upadá tendence dohledávat si odborné články o dopadu GMO na zdraví a na životní prostředí. Uvidí-li lidé na svých potravinách certifikovanou značku Standardu „Bez GMO“, může to v nich vyvolat dojem, že produkty, které jsou GM, jsou špatné a tlak trhu na produkty „Bez GMO“ se ještě zvýší. To pak může mít nežádoucí vliv na zhoršení životního prostředí, protože bude opět potřeba použití chemických postřiků a na vzrůstající množství obdělávaných ploch, protože suroviny bez GM mohou být méně výnosné.

Závěr

Aby mohly české mlékárny přeprodávat do Německa surové mléko o pár desítek haléřů za litr dražší, jsou

ochotny podrobovat se několikrát do roka auditům, platit za rozborů svých produktů a kupovat dražší krmivo pro své dojnice. Projít si poměrně složitou procedurou získání a obnovování certifikátu se jim i přes to všechno nejspíše stále vyplatí, protože mléko se značkou „Bez GMO“ jde jednoduše na odbyt, kvůli malé informovanosti spotřebitelů na trhu. Co se tedy pravého účelu Standardu „Bez GMO“ týče, ten byl splněn. I když se objevují odpůrci GM plodin, kteří tvrdí, že konzumace GMO má neblahý vliv na lidské zdraví, nejsou doposud žádné studie, které by jednoznačně prokázaly negativní vliv konzumace v EU schválených GMO na zdraví člověka. I tak se najdou lidé, kteří raději konzumují potraviny se značkou „Bez GMO“ s pocitem, že si raději připlatí za potraviny, které považují za bezrizikové.

Literatura

1. <http://www.bezgmo.cz/index.php>, staženo 9. listopadu 2018.
2. <https://naschov.cz/cesky-standard-bez-geneticke-modifikace/>, staženo 9. listopadu 2018.
3. <http://www.spkk.cz/novinky/standard-bez-gmo>, staženo 11. listopadu 2018.
4. Standard pro výrobu a produkty „bez genetické modifikace“, Spolek pro komodity a krmiva, 23 p. (2017).
5. Logo manuál standardu pro výrobu a produkty „bez genetické modifikace“, Spolek pro komodity a krmiva, 18 p. (2018).
6. <http://www.bezgmo.cz/index.php/certifikace>, staženo 10. listopadu 2018.
7. <https://www.biotrin.cz/standard-bez-gmo-uz-i-v-cr/>, staženo 11. listopadu 2018.
8. <https://www.biotrin.cz/cr-bez-gmo/>, staženo 11. listopadu 2018.
9. <https://www.biotrin.cz/ceske-mleko-bez-gmo/>, staženo 11. listopadu 2018.

Souhrn

Petrová A.: Standard „Bez GMO“

Vzhledem k tomu, že se v mlékárenském průmyslu ze strany německých odběratelů výrazně zvýšila poptávka po surovinách, které prokazatelně nejsou geneticky modifikované, sepsal Spolek pro komodity a krmiva český dobrovolný standard pro výrobu a produkty bez genetické modifikace, který svým obsahem koresponduje se zahraničními standardy. Produkty, ve kterých se prokazatelně nevyskytují GMO, nesou označení podléhající tomuto standardu. Společnosti, které si přejí mít své potraviny označené logem „Bez GMO“ musí splňovat určité specifikace. Podniky produkující suroviny, potraviny a krmiva bez genetických modifikací jsou kategorizovány podle rizikovosti kontaminace produktů geneticky modifikovaným materiálem. Vydání Standardu „Bez GMO“ má vliv nejen na spotřebitele, ale i na ekonomiku a životní prostředí.

Klíčová slova: Geneticky modifikované organismy, Spolek pro komodity a krmiva

Summary

Petrová A.: „Non-GMO“ standard

As the demand from German milk industry buyers significantly increased for raw materials proven not to be genetically modified, the Association for Commodities and Feeds wrote a voluntary Czech standard for production and products without genetic modification, which corresponds to foreign standards. Products which can demonstrate that they are free from genetically modified organisms are labelled with this standard. Companies that wish to have their food marked „Non GMO“ must meet certain specifications. Undertakings producing raw materials, food and feed without genetic modification are categorized according to the risk of contamination of products with genetically modified material. The release of the Standard „Non GMO“ has an impact not only on consumers, but also on the economy and the environment.

Keywords: Genetically modified organisms, Association for Commodities and Feeds

VYUŽITÍ PROTILÁTEK PROTI VYBRANÝM PROTEINŮM TESTES A SPERMIÍ K TESTOVÁNÍ JEJICH KVALITY A PATOLOGIE V PROSTŘEDÍ *diabetes mellitus*

Jana Pěkníková¹, Hasmik Margaryan¹, Alena Kubátová¹, Pavla Dostálová¹, Simona Hylmarová^{1,2}, Romana Bohuslavová², Gabriela Pavlínková²

¹Laboratoř reprodukční biologie, ²Laboratoř molekulární patogenetiky, Biotechnologický ústav AV ČR, BIOCEV, Vestec; jana.peknikova@ibt.cas.cz

Úvod

Protilátky jsou užitečným nástrojem k detekci exprese sledovaných proteinů a jejich přesné lokalizaci ve sledované tkáni. Panel vybraných protilátek byl použit ke zjištění změn exprese proteinů v testes a spermiích diabetických savců. Jak neplodnost, tak i diabetes patří mezi tzv. civilizační choroby, kdy počet jedinců postižených těmito onemocněními stále narůstá. Více jak 15 % párů lidí v reprodukčním věku evropské populace má problém s reprodukcí a mužský faktor se na neplodnosti podílí více než v 60 %¹. Mužská neplodnost je způsobena celou řadou faktorů (genetické, životní prostředí, vaskulární onemocnění, ale také metabolické onemocnění). Současný trend starších rodičů je navíc spojen se zvýšeným výskytem neplodnosti a metabolických onemocnění, kdy nejčastější z nich je *diabetes mellitus* (DM). Kombinace obou těchto faktorů zvyšuje riziko reprodukčních problémů, které se následně vyskytují v centrech asistované reprodukce. Cílem této práce je popis možného využití protilátek proti vybraným proteinům, následná charakterizace patologických změn v histologickém obrazu myších testes a spermií a identifikace patologických změn spermií u diabetických pacientů.

Protilátky proti vybraným proteinům testes a spermií

V našich předchozích studiích jsme vyvinuli nové citlivé metody s použitím připravených monoklonálních protilátek k hodnocení reprodukčních orgánů a kvality myších i lidských spermií^{2, 3, 4, 5, 6}.

Na myším modelu jsme detegovali patologické změny organismu působením různých polutantů životního prostředí, například endokrinními disruptory, které napodobují funkci přirozených hormonů a brání tak jejich funkci. Testovali jsme změny v expresi a lokalizaci vybraných proteinů (a jiných reprodukčních markerů) v organismech po působení endokrinních disruptorů, resveratrolu⁷, genisteinu a diethylstilbestrolu⁸, tetrabrombisfenolu A⁹, zearalenonu¹⁰, anti androgenu vinklozolinu¹¹ a antibiotik¹².

Z předchozích studií víme, že faktory životního prostředí mají negativní vliv na reprodukční parametry u myších samců (viz výše). Klinická data z center asistované reprodukce^{14, 15} a experimentálních přístupů¹⁶ prokazují, že diabetické prostředí poškozuje spermie, což má za následek jejich špatnou kvalitu. Protilátky proti vybraným proteinům jsou nástrojem k testování kvality myších, ale i lidských spermií^{4, 5, 6, 16, 17}.

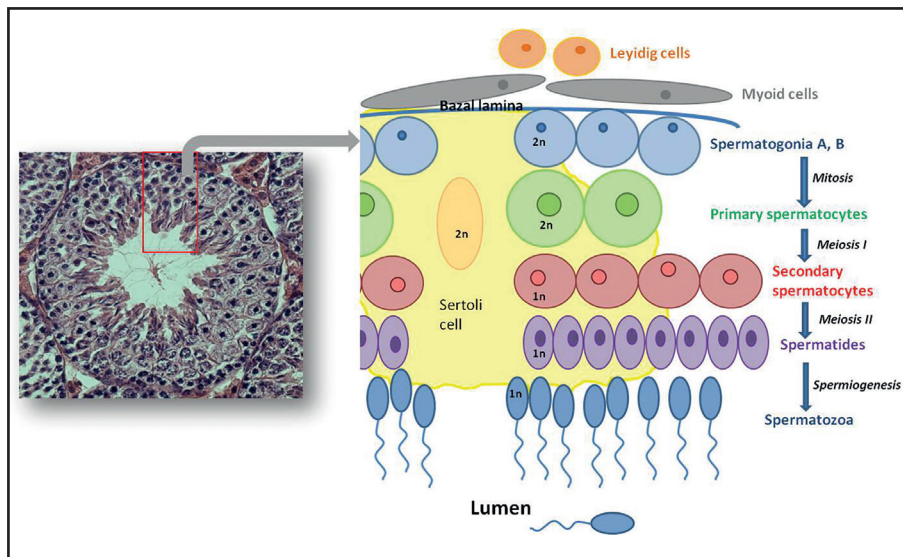
Experimentální model s indukovaným *diabetes mellitus* a vzorky spermií

V rámci hodnocení vlivu *diabetes mellitus* typu 1 (DM1) na reprodukční parametry samců byly porovnány a) histologické změny v testes na myším modelu, b) kvalita spermií (myší model a lidské spermie).

Ze změn morfologie a imunodetekce vybraných proteinů v testes můžeme soudit na míru poškození procesu spermatogeneze a spermiogeneze. Za standardních podmínek probíhá spermatogeneze v semenotvorných tubulech, které se skládají z různých druhů zárodečných buněk, které jsou obklopeny nosnými Sertoliho buňkami. Intersticiální prostor mezi jednotlivými semenotvornými tubuly se skládá z buněk Leydigových a myoidních. Všechny tyto buňky pomáhají vytvořit prostředí potřebné pro správnou spermatogenezi.

Proces spermatogeneze začíná řadou mitotických dělení prvotních zárodečných buněk, které vedou ke vzniku spermatogonií (typy A1 – A4). Spermatogonie typu A si stále zachovávají schopnost kmenových buněk, to znamená, že jsou schopné se rozdělit a zajistit kontinuální zásobování spermatogoniemi typu A nebo diferencovat ve spermatogonie typu B. Spermatogonie typu B jsou již určeny pro diferenciaci spermií. Tyto buňky se mitoticky rozdělují a dávají vznik primárním spermatocytům. Primární spermatocyty vstupují do prvního meiotického dělení a tvoří sekundární spermatocyty, které následně ukončují druhé meiotické dělení a produkují haploidní kulaté spermatidy. Procesem zrání spermie (spermiogenezi) vznikají spermatické buňky, které se nachází uvnitř kanálků Obr. 1¹⁸.

Pro testování změn byl vybrán panel protilátek uvedených v Tabulce I. Experimentálním modelem byly myši inbredního kmene FVB, které byly chovány za standardních podmínek a podle protokolu schváleného Komisí pro ochranu zvířat Ústavu molekulární genetiky AV ČR. U tohoto modelu byl *diabetes mellitus* 1 (DM1) navozen streptozotocinem¹⁹. Lidské spermie byly získány se souhlasem pacientů Fakultní nemocnice v Motole. Vliv DM1 na testes byl hodnocen za použití histologických řezů myších testes. Nejprve bylo provedeno histologické barvení s použitím hematoxylinu a eosinu, které slouží k detekci morfologických změn. Pomocí tohoto barvení byly identifikovány změny morfologie semenotvorných kanálků testes diabetických myších samců. Pro další posouzení patologických změn semenotvorných kanálků testes souvisejících s diabetem byly vybrány protilátky, které detegují proteinové



Obr. 1: Schéma semenných kanálků s probíhající spermatogenezí a konkrétními typy buněk přítomných v testikulárním tkáni (převzato a upraveno¹⁸).

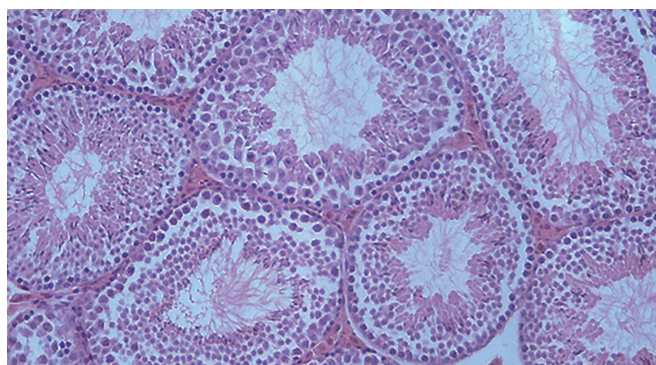
markery identifikující jednotlivá stadia spermatogeneze, mezibuněčné komunikace, meiosis a mitosis. Kvalita spermií, jak u lidských pacientů, tak u experimentálního myšího modelu byla hodnocena za použití námi připravených monoklonálních protilátek proti intra-akrozomálnímu proteinům, které se nachází v akrozomu hlavičky spermie.

Morfologie a histologie testes myší, změny v přítomnosti DM1

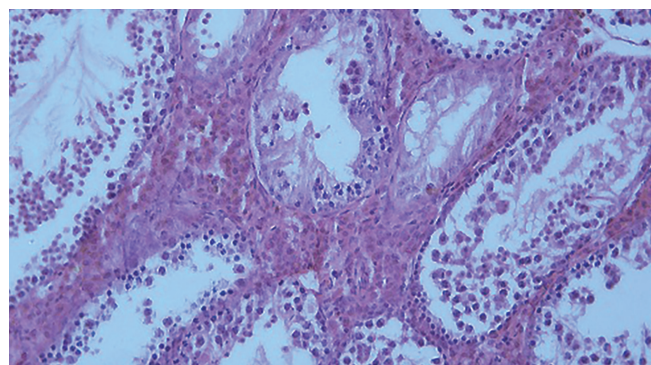
Morfologie testes u myšího DM1 modelu prokázala jasné změny ve struktuře kanálků a průběhu/zastavení spermatogeneze (Obr. 2).

Tabulka I: Vybrané protilátky k testování změn exprese proteinů v diabetickém prostředí.

Protilátka	Proteiny/marker
VEGF-A	Vaskulární endoteliální růstový faktor A má řadu funkcí (angiogeneze, neurogeneze, migrace, inhibice apoptózy). VEGF-A je marker pro spermatogonie typu B, primárních spermatocyty a spermatidy.
SCP3	Synaptonemální komplexní protein 3 je složkou příčných vláken synaptonemálních komplexů (SCS), vytvořených mezi homologními chromozomy během meiotické profáze. Má esenciální meiotickou funkci ve spermatogenezi a je důležitý pro vývoj varlete. Je meiotickým markerem.
Cx43	Connexin 43 (Cx43) – proteiny skupiny konexinů jsou specializované domény buněčné membrány a vytvářejí mezibuněčné kanály. Jsou důležité pro metabolickou spolupráci mezi buňkami, elektrickou vazbu, synchronizaci buněčných fyziologických aktivit, kontrolu růstu a vývojovou regulaci.
Ki-67	Antigen Ki-67 je nukleární protein, který je exprimován v prolifерujících buňkách. Je mitotickým markerem.
WT1	Wilmsův nádorový protein. Jedná se o transkripční faktor, který hraje důležitou roli v buněčném vývoji a přežití buněk. WT1 je exprimován v Sertoliho buňkách.
Hs-8	Akrozomální protein spermie. Spermatická glycerinaldehyd fosfát dehydrogenasa (GAPDHS) – vazebný protein spermie účastnící se vazby spermie a vajíčka.
Hs-14	Akrozomální protein spermie. ATP-asa v endoplasmatickém retikulu (TERA), dříve „valosin containing protein“ (VCP).



A

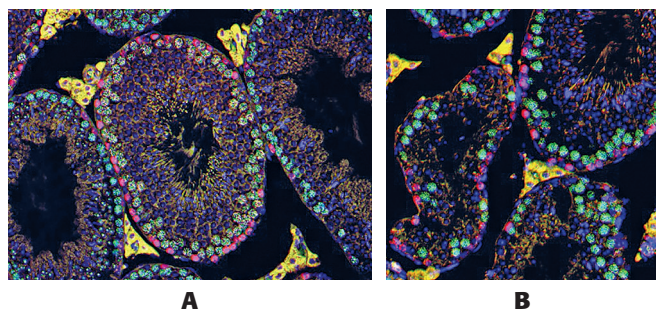


B

Obr. 2: Morfologie testes. (A) Kontrola, barvení histologických řezů hematoxylin & eosinem ukazuje normální strukturu testes s kanálky s probíhající spermatogenezí a spermiogenezí, kdy zralé spermie jsou uvolňovány do středu kanálků. (B) Patologické změny v testes vyvolané DM1, ukazují změny morfologie kanálků, ztrátu epitelu, navýšení mezibuněčné hmoty a úplné zastavení spermatogeneze v některých kanálkách.

Imunohistochemické barvení testes s anti-SCP3 a anti-Ki-67

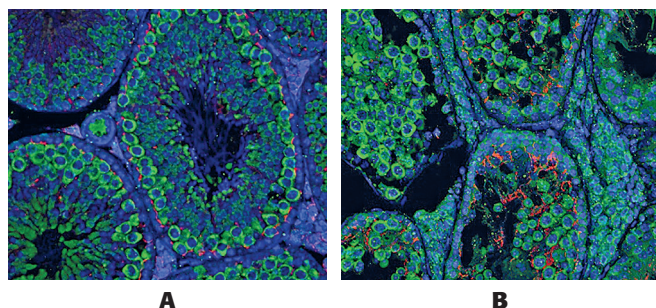
Imunohistochemické barvení řezů testes s protilátkami detekujícími meiotické (SCP3 pozitivní buňky) a mitotické (Ki-67 pozitivní buňky) v semenotvorných kanálkách testes ukazuje na zřetelné rozdíly v expresi těchto proteinů u kontrolních a diabetických samců (Obr. 3). U diabetických samců jsme v některých kanálkách detekovali snížený počet meioticky se dělících buněk a v některých kanálkách vznikl tzv. meiotický arest, kdy kanálek byl vyplněn meioticky se dělícími buňkami bez následné spermatogeneze a spermiogeneze. Imunohistologické barvení testes diabetických samců ukazuje tvorbu defektních kanálků, abnormální uspořádání prekurzorů spermatid i poruchy ve spermatogenezi (Obr. 3 B).



Obr. 3: Imunohistochemické barvení testes. Spermatotvorné tubuly obsahují spermatocyty a spermatidy dělící se meioticky detegované anti-SCP3 protilátkou (zelená), a mitoticky se dělící buňky vázající protilátku Ki67 (červená). Leydigovy buňky jsou označeny žlutě. Kontrolní samec (A), diabetický samec (B).

Imunohistochemické barvení testes s anti-VEGFA a anti-Cx43

Imunohistochemické barvení s protilátkami proti proteinu VEGFA, který se specificky váže na spermatogonie typu B a spermatidy a proti proteinu CX43 ukazuje na patologické změny v uspořádání kanálků testes diabetických samců ve srovnání se samci kontrolními. Navýšená exprese CX43 u diabetických samců může představovat snahu o kompenzaci mezibuněčné komunikace v důsledku silného poškození morfologie semenotvorných kanálků testes a dezorganizaci spermatogonií typu B (Obr. 4).

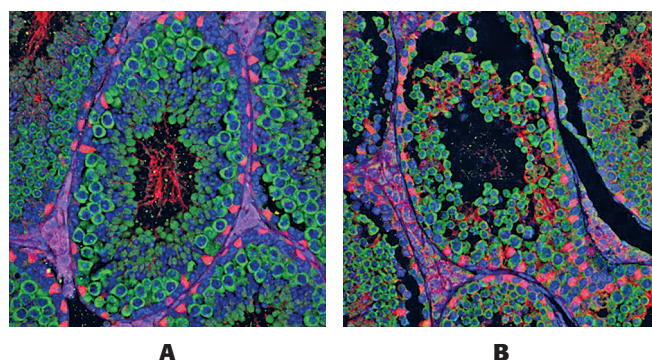


Obr. 4: Imunohistochemické barvení testes. Spermatogonia a spermatidy v semenotvorných kanálkách exprimují VEGFA (zelená). CX 43 (červená) je markerem mezibuněčné komunikace. Kontrolní samec (A), patologické změny v kanálkách testes diabetického samce (B).

Pomocí imunohistologického barvení s protilátkami proti VEGFA a CX43 jsme detegovali dezorganizaci spermatogonií semenotvorných kanálků testes diabetických samců, špatnou mezibuněčnou komunikaci a poškozenou spermatogenezi (Obr. 4 B).

Imunohistologické barvení testes pomocí anti-VEGFA a anti-Wt1

Imunohistochemické barvení s protilátkami proti proteinu VEGFA, který se specificky váže na spermatogonie typu B a spermatidy a proti proteinu WT1, jež je markerem Sertoliho buněk, jsme opět detegovali značné množství defektních semenotvorných kanálků u diabetických myších samců. Nepotvrdili jsme změny na úrovni exprese proteinu WT1 a v uspořádání Sertoliho buněk, které jsou buňkami podpůrnými (Obr. 5).



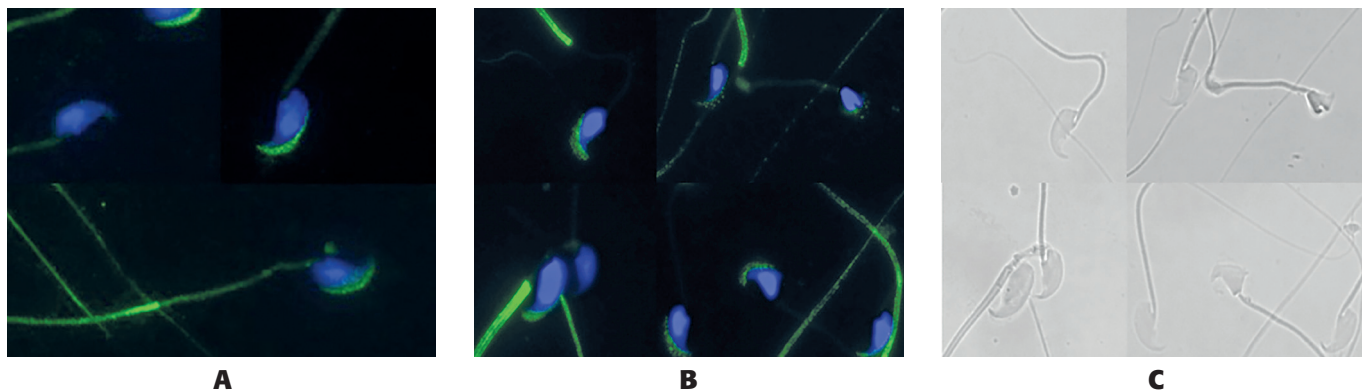
Obr. 5: Imunohistochemické barvení testes. Anti-VEGFA protilátka se specificky váže na spermatogonia typu B a spermatidy, které odcházejí středem kanálku (zelená). Anti-WT1 se váže na podpůrné Sertoliho buňky, které jsou symetricky rozprostřeny po obvodu semenotvorných kanálků testes (červená). Kontrola (A), patologické změny v kanálkách testes, narušená spermatogeneze u diabetického samce (B).

Kvalitativní změny myších spermií vlivem DM1 detegované pomocí specifických protilátek

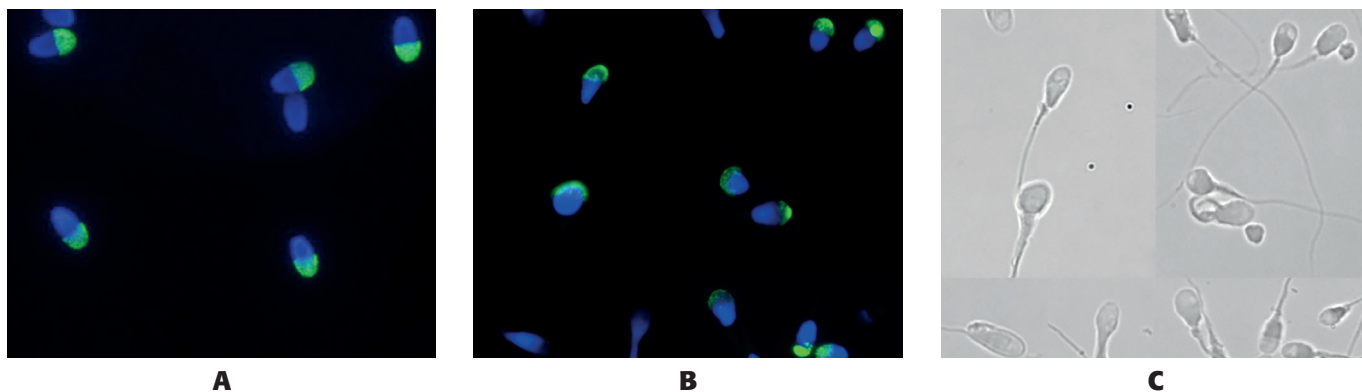
Imunodetekce myších spermií s protilátkou Hs-8, proti akrozomálnímu proteinu glycerinaldehyd fosfát dehydrogenáze specifické pro spermie (GAPDHS) a protilátkou Hs-14, která značí akrozomální endoplazmatickou retikulární ATPasu (TERA), dříve „valosin containing protein“ (VCP)

Imunodetekce s protilátkou proti GAPDHS, která deteguje protein popsáný jako vazebný protein spermie důležitý pro vazbu spermie na vajíčko²⁰, prokazuje nižší expresi GAPDHS u spermií diabetických samců, podobně imunodetekce s protilátkou proti TERA proteinu, který byl popsán jako protein důležitý pro metabolismus a motilitu spermie¹⁷, ukazuje nižší procento značených buněk u myších samců s DM1 (Ilustrativní Obr. 6).

Spermie diabetického samce vykazují sníženou expresi GAPDHS který je zodpovědný za úspěšnou vazbu



Obr. 6: Imunodetekce GPDHS / TERA (žlutá) v myši spermiích, jádro (modrá, DAPI). Kontrola (A), Spermie od diabetického samce (B), fázový kontrast, diabetický samec (C).



Obr. 7: Imunodetekce GPDHS / TERA (zelená) v lidských spermiích, jádro (modře, DAPI). Kontrola (A), Spermie diabetického pacienta (B), fázový kontrast, pacient s DM (C).

spermie na vajíčko a TERA, který je zodpovědný za motilitu spermií a hraje důležitou úlohu v metabolismu spermií (Obr. 6 B).

Kvalita lidských spermií hodnocená pomocí specifických protilátek proti proteinům spermie

Imunodetekce lidských spermií s protilátkou Hs-8, proti akrozomálnímu proteinu glycerinaldehyd fosfát dehydrogenáze specifické pro spermie (GAPDHS) a s protilátkou Hs-14, která značí akrozomální endoplazmatickou retikulární ATPasu (TERA), dříve „valosin containing protein“ (VCP)

Imunodetekce s protilátkou proti GAPDHS, který byl popsán jako vazebný protein vazby spermie na vajíčko prokazuje nižší expresi daného proteinu u pacientů s DM a TERA, který byl popsán jako protein důležitý pro metabolismus a motilitu buňky ukazuje nižší procento značených buněk u pacientů s DM (Ilustrativní Obr. 7).

Spermie diabetického pacienta vykazují sníženou expresi GDPHS, který je zodpovědný za úspěšnou vazbu spermie na vajíčko a TERA, který je zodpovědný za motilitu spermií a hraje důležitou úlohu v metabolismu spermií (Obr. 7 B).

Závěr

V předložené práci jsme testovali možnost využití vybraného panelu protilátek k detekci patologických změn v testes a spermiích ovlivněných diabetem. U experimentálního myšního modelu byl DM1 navozen streptozotocinem, který specificky poškozuje beta-buňky pankreatu. U diabetických myších samců jsme potvrdili pomocí imunohistochemického barvení změny v morfologii kanálků testes a s nimi spojené molekulární změny ukazující na strukturní a funkční poškození. Ukázali jsme změny na úrovni mezibuněčné komunikace. Dále jsme ukázali, že poškození kanálků testes v důsledku DM1 vede ke změnám exprese důležitých proteinů, které se účastní spermatogeneze (mitózy a meiózy).

Kvalita spermií myších samců a pacientů s DM byla testována námi připravenými monoklonálními protilátkami proti intra-akrozomálním proteinům, z nichž jeden protein (GPDHS) je klíčovým vazebným proteinem spermie na vajíčko. Jeho nepřítomnost snižuje šanci k oplození. Jak u spermií diabetických myších samců, tak u spermií diabetických pacientů jsme potvrdili sníženou expresi tohoto proteinu.

Získané výsledky prokazují, že použití vybraných protilátek umožňuje detegovat patologické změny v reprodukční tkáni testes a také kvalitu spermií u diabetických jedinců. Výsledky jasně dokumentují negativní vliv diabetického prostředí na morfologii kanálků testes, spermatogenezi, spermiogenezi a kvalitu spermií.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky (projekt 15-

-30880 A), institucionální podpory Akademie věd České republiky (RVO:86652036) a projektu BIOCEV. CZ. 1.05/1.1/02.0109 z ERDF.

Literatura

1. World Health Organization (WHO), 5th edition, Geneva, Switzerland (2010).
2. Peknicova J, Moos J: *Andrologia*. 22, 427 (1990).
3. Peknicova J, Kyselova V, Buckiova D, et al.: *Amer J Reprod Immunol*. 47, 311 (2002).
4. Peknicova J, Chladek D, Hozak P: *Amer. J. Reprod. Immunol*. 53, 1 (2005).
5. Peknicova J, Pexidrova M, Kubatova A, Koubek P, et al.: *Fertil. Steril*. 88, 1120 (2007).
6. Tepla O, Peknicova J, Koci K, Mika J, et al.: *Fertil. Steril*. 86, 113 (2006).
7. Kyselova V, Peknicova J., Buckiova D., et al.: *Reprod. Biol. Endocrinol*. 1, 30 (2003).
8. Kyselova V, Peknicova J, Boubelik M, et al.: *Theriogenology*. 61, 1307 (2004).
9. Zatecka E, Ded L, Elzeinova F, et al.: *Reprod. Toxicol*. 35, 32 (2013).
10. Zatecka E, Castillo J, Elzeinova F, et al.: *Andrology*. 6, 910 (2014a).
11. Zatecka E, Ded L, Elzeinova F, et al.: *Reprod. Toxicol*. 45, 20 (2014 b).
12. Elzeinova F, Novakova V, Buckiova D, et al.: *Reprod. Toxicol*. 26, 231 (2008).
13. Elzeinova F, Peknicova J, Ded L, et al.: *Exp. Toxicol. Pathol*. 65, 911 (2013).
14. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, et al.: *Journal of Andrology*. 33, 145 (2012).
15. Mulholland J, Mallidis C, Agbaje I, McClure N: *Reprod. Biomed*. 22, 215 (2011).
16. Pavlinkova G, Margaryan H, Zatecka E, et al.: *Scientific Rep*. 7, 4940 (2017).
17. Capkova J, Kubatova A, Ded L, et al.: *Asian J Androl*. 18, 108 (2016).
18. Dym M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11287 (1994).
19. Bohuslavova R, Skvorova L, Sedmera D, et al.: *J Mol Cell Cardiol*. 60, 129 (2013).
20. Margaryan H, Dorosh A, Capkova J, et al.: *Reprod Biol. Endocrinol* 13, 15 (2015).

Souhrn

Pěkníková J., Margaryan H., Kubátová A., Dostálová P., Hylmarová S., Bohuslavová R., Pavlíková G: Využití protilátek proti vybraným proteinům testes a spermií k testování jejich kvality a patologie v prostředí diabetes mellitus

Pro detekci molekulárních změn vyvolaných *diabetes mellitus* jsme použili panel protilátek proti vybraným proteinům testes a spermií. Detegovali jsme změny v morfologii a histologii varlat a změny v expresi důležitých proteinů, které jsou zapojeny do spermatogeneze a mezibuněčné komunikace. Monoklonální protilátky proti intra-akrozomálním proteinům prokázaly zhoršenou kvalitu spermií u diabetických pacientů i spermií diabetických myší. Panel vybraných protilátek lze použít k testování změn v testes a kvalitě spermií vyvolaných diabetem. Tyto výsledky jasně dokumentují vliv diabetického prostředí na morfologii a histologii varlat a kvalitu spermií.

Klíčová slova: Protilátky, diabetes mellitus, testes, spermie

Summary

Pěkníková J., Margaryan H., Kubátová A., Dostálová P., Hylmarová S., Bohuslavová R., Pavlíková G: Use of antibodies against selected testes proteins and sperm to test their quality and pathology in diabetes mellitus

We used a panel of antibodies against selected testicular and sperm proteins to detect molecular changes induced by diabetes mellitus. We detected changes in morphology and histology of the testes, and changes in the expression and distribution of proteins involved in spermatogenesis and intercellular communication. Monoclonal antibodies against intra-acrosomal proteins demonstrated the impaired quality of sperms from diabetic patients as well as sperms from diabetic mice. In conclusion, the panel of selected antibodies can be used to test diabetes-induced changes in the testes and sperm quality. These results clearly document the effect of the diabetic environment on the morphology and histology of the testes, and sperm quality.

Keywords: Antibodies, Diabetes mellitus, Testes, Sperm

SLOŽENÍ, VÝZNAM A MOŽNOSTI KVANTIFIKACE EXTRACELULÁRNÍ MATRIX BIOFILMU PODMÍNĚNĚ PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ

Petra Kašparová

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; Kasparop@vscht.cz

Úvod

Biofilm je konsorcium mikroorganismů vytvořené na fázovém rozhraní, kterým může být například pevný povrch ve vodném prostředí nebo hladina média ve styku se vzduchem¹. Jedná se o společenství buněk obalené v jimi produkované mukózní hmotě, nazývané extracelulární matrix (ECM), která tvoří kompaktní 3D strukturu. Charakteristickou vlastností buněk žijících ve formě biofilmu je změna jejich fenotypu (změna exprese genů až o 70 %) ¹⁻³. Tato změna fenotypu vede

k mnohonásobně vyšší odolnosti biofilmu vůči vlivům prostředí (pH, střížné síly kapaliny proudící okolo biofilmu, nedostatek nutrientů) ^{3, 4}. Extracelulární matrix spolu s vysokou hustotou buněk způsobuje podstatné zpomalení prostupu antimikrobiálních látek, což je jeden z důvodů značné rezistence mikroorganismů, které se v biofilmu vyskytují, vůči některým typům antimikrobiálních látek². Tyto látky mohou působit pouze na buňky, které jsou v nejsvrchnějších vrstvách biofilmu, jelikož nejsou schopny proniknout hlouběji (jedná se především o vysokomolekulární látky, které se

v ECM zachytávají a hůře difundují ke spodnějším buněčným vrstvám). Zvýšená odolnost buněk v biofilmu představuje též ochranu před predátory (např. zástupci rodu *Protozoa*), anebo umožňuje vznik nových mutualistických vztahů a buněčnou kooperaci v biofilmu⁵. Tato kooperace je převážně zprostředkována chemickými signály typu quorum sensing, které jsou dostatečně amplifikovány pouze v prostředí s vysokou buněčnou hustotou⁶.

Rezistence vůči antimikrobiálním látkám a mechanická odolnost biofilmu významně komplikuje jeho eradikaci, např. z nemocničních nástrojů, implantátů nebo z otevřených kontaminovaných ran. Významný je také výskyt nozokomiálních infekcí, jejichž značná prevalence je způsobena právě tvorbou biofilmu, která způsobuje vysokou rezistenci buněk k antibiotikům a desinfekcím¹.

Tvorba biofilmu proto představuje rozsáhlý problém nejen v medicíně, kde jsou tato mikrobiální společenství příčinou mnoha závažných chronických onemocnění nebo komplikují implantaci biomateriálů, ale i v průmyslu, kde způsobuje biologické koroze potrubí a dalších kovových materiálů³.

Extracelulární matrix

Buňky biofilmu tvoří obvykle méně než 10 % sušiny biofilmu, jelikož nejvyšší podíl (mimo vody, která představuje 70 – 90 % celkového objemu biofilmu) zaujímá hmota matrix, která je obklopuje⁷. Matrix se skládá z mnoha typů sloučenin, kterým se souhrnně říká extracelulární polymerní látky (EPS). Většina těchto látek (s výjimkou enzymů a toxinů, viz dále) mají podpůrnou funkci pro třírozměrnou výstavbu biofilmu a napomáhají přilnutí buněk v raných fázích jeho tvorby⁷. Složení EPS je značně proměnlivé a liší se jak v rámci jednotlivých druhů, tak i kmenů. Jedná se převážně o polysacharidy (homopolysacharidy, glykosaminoglykany, peptidoglykany), extracelulární DNA (eDNA), nebo nejrozličnější extracelulární enzymy, amyloidní struktury a toxiny^{7–11}. Extracelulární matrix imobilizuje buňky biofilmu mezi sebou a udržuje je v blízkosti povrchu, ke kterému je biofilm přichycen. Kvůli malé vzdálenosti mezi buňkami se násobí signály mezibuněčné komunikace a může docházet také ke vzniku kooperativních mikrokolonií v souvislosti s lokálními změnami podmínek (např. pH, koncentrace živin, teplota)⁷. K tomuto jevu dochází především ve smíšených populacích, kde spolu mohou koexistovat např. aerobní druhy mikroorganismů na povrchu biofilmu s druhy anaerobními v hlubších vrstvách. V tomto případě aerobní buňky zcela vyčerpají kyslík, který tedy nemůže limitovat anaerobní niky hlouběji v biofilmu. V jiném případě mohou produkty jedné skupiny mikroorganismů představovat vhodný substrát pro jinou skupinu mikroorganismů. V mezních situacích, jako je například limitace živin v okolním prostředí, může docházet i k degradaci samotné EPS biofilmu jako zdroje energie⁷.

Matrix obklopující buňky úzce souvisí s morfologií biofilmu. Díky ní může být biofilm hladký a plochý, hrubý, mukózní či vláknitý. Morfologie biofilmu se může lišit i různou porositou nebo se zde mohou vyskytovat houbovitě útvary obklopené vodními kanálky typické pro rod *Pseudomonas*.

Důležitou funkcí extracelulární matrix je její schopnost významně zpomalit prostup antimikrobiálních látek, a tím posílit rezistenci buněk biofilmu k těmto látkám¹². Singh a kol., (2010) sledovali prostup něko-

lika antibiotik do nitra biofilmu *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* a zjistili, že prostup oxacillinu, cefotaximu (β -laktamy) a vankomycinu (glykopeptid) byl díky ECM výrazně snížen¹³. Podobný výsledek našel i Anderl a kol., (2000) v případě biofilmu *Klebsiella pneumoniae*, kde byl výrazně snížen prostup ampicilinu (β -laktam) a ciprofloxacinu (chinolon)¹⁴. Zpomalení prostupu těchto látek značně zvyhodňuje nejrozličnější lidské patogeny např. již zmíněné *S. aureus* a *S. epidermidis*, dále streptokoky nebo *Pseudomonas aeruginosa*¹².

EPS biofilmu prokaryot

Hlavní složkou extracelulární matrix biofilmu bakterií jsou většinou exopolysacharidy. Nejčastěji se jedná o dlouhé lineární či větvené molekuly o velikosti 50 – 200 kDa⁷. Některými exopolysacharidy jsou homopolysacharidy, jako například glukany a fruktany, které produkují orální streptokoky a někteří zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae* nebo *Pseudomonadaceae*. Častěji se však v biofilmové matrix vyskytují heteropolysacharidy, které se skládají z různých neutrálních či nabitých monosacharidových jednotek. V těchto biopolymerech jsou obvykle přítomné uronové kyseliny, někdy přes kyslík vázaný pyruvát či méně často sulfát. Mezi záporně nabitě polysacharidy patří alginát, xantan nebo kolanová kyselina, mezi kladně nabitě např. intercelulární adhezín (PIA – z angl. polysaccharide intercellular adhesin) vyskytující se v biofilmech *S. aureus* a *S. epidermidis*⁷.

Exopolysacharidy obou zmíněných druhů rodu *Staphylococcus* mají významnou funkci v jejich patogenitě a odolnosti jejich biofilmů. To je mimo jiné způsobeno i přítomností PIA¹¹, který představuje účinnou ochranu před fagocytózou bílými krvinkami hostitele^{12,15}. PIA obsahuje fosfátové zbytky a esterově vázaný sukcinát, a má proto záporný náboj¹⁵. Jinou důležitou sacharidovou složkou biofilmu rodu *Staphylococcus* je lineární homoglykan složený z minimálně stotřetí 2-deoxy-2-amino-D-glukopyranos spojených vazbou $\beta(1-6)$, které jsou zhruba z 80 % N-acetylované^{11,16}. Celá molekula tohoto exopolysacharidu má tedy kladný náboj při fyziologickém pH 7¹⁵. *Stafylokoky* dále tvoří glykokalyx, což je soubor sacharidových látek bohatých na galaktosu, fosfát, glukosu, manosu a galaktosamin¹⁵.

Extracelulární polymerní látky mají nejrozličnější funkce. Např. sacharidy produkované *Vibrio cholerae* nebo kyselina kolanová u *Escherichia coli* mají vliv na morfologii 3D struktury biofilmu¹⁷. *Bacillus subtilis* produkuje heteropolysacharid složený z galaktosy, fruktosy a glukosy spolu s proteinem TasA, které jsou nezbytné pro strukturní integritu matrix jeho biofilmu^{10,18}. Exopolysacharidy hrají důležitou roli i v biofilmech *P. aeruginosa*. ECM tohoto mikroorganismu obsahuje převážně uronové kyseliny, které se nevyskytují v cytosolu *P. aeruginosa*, a dají se tak využít jako marker přítomnosti extracelulární matrix tohoto mikroorganismu. *P. aeruginosa* je kromě toho schopen produkce tří různých exopolysacharidů – alginátu, Pel a Psl. Alginát je důležitou součástí biofilmů mukoidních kmenů *P. aeruginosa*⁸. Netvoří sice hlavní složku extracelulární matrix *P. aeruginosa*, ale přesto může přispívat ke vzniku rezistence buněk vůči celé řadě látek, tím, že účinně zpomaluje jejich prostup do hmoty biofilmu^{8,12}. Pel (odvozeno od genu *pel* z angl. polysaccharide export locus) je sacharid bohatý na glukosu, esenciální pro vznik biofilmu na rozhraní vzduch-kapalina, zatímco

PsI (odvozeno od genu *psI* z angl. polysaccharide synthesis locus) je složen z opakujících se segmentů D-manosy, D-glukosy a L-rhamnosy, a je důležitý pro adhezi k pevným povrchům a udržení architektury biofilmu^{8,9,19}.

Polysacharidy nejsou jedinou složkou matrix biofilmu prokaryot. Dále se zde vyskytuje extracelulární DNA nebo lipidy, lipopolysacharidy či lipoproteiny. Lipidy jsou esenciální pro adhezi buněk *Thiobacillus ferrooxidans* nebo *Serratia marcescens*, která produkuje povrchově aktivní extracelulární lipoproteiny serratetiny⁷. Důležitou skupinou extracelulárních látek jsou také glykolipidy rhamnolipidy, což jsou povrchově aktivní látky, které v biofilmu *P. aeruginosa* umožňují fragmentaci biofilmu a únik jednotlivých buněk⁷. *P. aeruginosa* tvoří biofilmy v dýchací soustavě pacientů s cystickou fibrózou. Bylo prokázáno, že kromě fragmentace buněk ze samotného biofilmu je rhamnolipid B také účinný proti fagocytóze buňkami neutrofilů v plicích pacientů s cystickou fibrózou tak, že tyto bílé krvinky usmrcuje¹².

Strukturní funkci mají v EPS i látky bílkovinné povahy, mezi něž patří amyloidní struktury vytvářející extracelulární vlákna vně buněk. Mají strukturní i funkční podobnost fimbriím *E. coli*, a byly detekovány u různých druhů rodu *Pseudomonas*¹⁰. Poskytují morfologickou oporu extracelulární matrix a podílí se na adhezi buněk k pevným povrchům¹⁰. Tento typ řasinkových struktur se vyskytuje i u *S. aureus*. Jedná se o moduliny stafylokoků, jejichž funkce ještě není zcela známa, ale předpokládá se, že mají především strukturní význam. Významným proteinem v matrix biofilmu tohoto rodu je dále bap (z angl. biofilm associated protein), vysokomolekulární protein kovalentně navázaný k peptidoglykanu v buněčné stěně buněk. Jeho funkcí je intercelulární adheze buněk k sobě navzájem^{10,11}. Příbuznými látkami jsou proteiny fibrinonektin nebo fibrinogen, které také podporují adhezi biofilmu *S. aureus*^{15,20,21}.

EPS biofilmu eukaryot

Na rozdíl od extracelulární matrix bakteriálních biofilmů, která je v posledních letech velmi intenzivně studována, především jako jeden z významných prostředků vzniku rezistence vůči antibakteriálním látkám těchto mikroorganismů, je jen velmi málo informací o fungálních biofilmech a složení EPS v nich obsažených. Morfologie fungálních biofilmů se obecně příliš neliší od biofilmů bakterií. Velký rozdíl oproti bakteriím je však u fenotypu biofilmu kvasinek a plísní²².

EPS mohou v prostředí fungálního biofilmu u některých rodů sloužit, kromě ochrany buněk v biofilmu před predací a vstupem cizorodých antimikrobiálních látek, jako důležitý pool uhlíku, který může být dalšími mikroorganismy i samotným producentem daných EPS zpracován²³. Exopolymery peptidové povahy jsou v mnoha případech nestráveny jinými mikroorganismy a zůstávají tak v prostředí i po odumření či fragmentaci biofilmu. Mohou pak být využity např. vyššími organismy (např. zooplankton, drobní korýši) jako možná potrava a tak přispívají k navrácení aminodusíku zpět do přírody, čímž mohou významně ovlivnit jeho koloběh např. v pelagických mořských ekosystémech. Jejich další významnou funkcí je také schopnost chovat se jako pufr nebo jako vhodné prostředí pro působení extracelulárních enzymů²³.

Řada těchto polymerů získává své různorodé vlastnosti díky jejich schopnosti absorbovat vodu. Voda tvoří významnou součást fungálních i bakteriálních biofilmů.

V mukózních koloniích *Saccharomyces cerevisiae* se nachází glykoprotein s molekulovou hmotností větší než 200 kDa, který se u hladkých kolonií stejného druhu nevyskytuje. Tento glykoprotein je často kovalentně vázán k buněčné stěně, čímž je komplikováno jeho uvolnění do volné hmoty ECM²². Biofilm *S. cerevisiae* obsahuje také velké množství exopolysacharidů, obsahujících převážně glukosu, manosu nebo galaktosu a často se zde vyskytují i uronové kyseliny, které jsou typické hlavně pro ECM vyšších eukaryot, ale mohou se vyskytovat i u prokaryot, jak je zmíněno výše²⁴.

Polysacharidy mají vysokou schopnost vázat na sebe vodu, čímž dochází k zvětšení objemu extracelulární matrix v důsledku navázání vody na sacharidové složky matrix, jak bylo ukázáno u extracelulárních mannanů v biofilmu kvasinky *Rhodotorula acheniorum*²⁵.

Exopolysacharidy, stejně jako v bakteriálních biofilmech, tvoří největší, a rozhodně jednu z nejvýznamnějších součástí fungálních biofilmů. V biofilmech *Candida albicans* mohou tvořit až 80 % hmoty veškeré ECM²⁶. U *C. albicans* je vzájemná buněčná agregace a adheze buněk k povrchu zprostředkována glykoproteiny obsaženými v buněčné stěně. Tento druh mikroorganismu produkuje rozmanité glukany spolu s mannan-glukanovým komplexem, které jsou nezbytné pro udržení architektury biofilmu tohoto mikroorganismu^{24,27}. Faria-Oliveira a kol. (2015) detekovali v biofilmu *C. albicans* sacharidy složené z D-glukosy, α-D-manosy, α-L-rhamnosy a N-acetylglukosaminu. Jedná se o β-1,3-glukan, který se převážně nachází v buněčné stěně, a je nejvíce spjat s tvorbou biofilmu a se vznikem rezistence k antimikrobiálním látkám u buněk v biofilmu²⁷. Nejčastějšími polysacharidy, které se nachází v ECM *C. albicans* jsou však α-1,2-mannan či α-1,6-mannan (tvořící asi 85 % hmoty ECM), a kratší lineární β-1,6-glukany (asi 14 %). Oba tyto polysacharidy jsou většinou koextrahovány, a je tedy pravděpodobné, že vytvářejí mannan-glukanový komplex²⁷. Podílejí se na zpomalení prostupu antifungálních látek do nitra biofilmu a také chrání buňky před rozpoznáním bílými krvinkami hostitele, tzn. neutrofily²².

Proteiny jsou též významnou součástí biofilmu *C. albicans*, stejně jako eDNA²⁴. Primární adheze pomocí glykoproteinů je v průběhu zrání biofilmu dále stabilizována tvorbou amyloidních můstků mezi Als (z angl. agglutinin-like sequence) proteiny. Buňky biofilmu tohoto mikroorganismu mohou dále produkovat vláknité hyfy a pseudohyfy, které se také významně podílí na stabilitě vzniklých konsorcií tohoto druhu²⁷.

Mezi exopolysacharidy *Aspergillus fumigatus*, dalšího významného mikroorganismu, schopného tvořit biofilm, patří vzájemně si strukturně podobné α-(1,3)-glukany, galaktomannan, a především galaktosaminogalaktan²⁸. Galaktomannan se skládá z mannanového skeletu, ke kterému je vázána β-1,5 glykosidickou vazbou galaktofuranosa. Tento sacharid je důležitý pro počáteční tvorbu biofilmu^{27, 28}. Galaktosaminogalaktan se skládá z heteropolysacharidu složeného z galaktosy a částečně deacetylovaného N-acetylgalaktosaminu, které jsou spojeny α-1,4 vazbou. Tato sloučenina hraje významnou roli ve stabilizaci extracelulární matrix, a navíc se podílí na schopnosti *A. fumigatus* pronikat do hostitelských organismů a v podobě biofilmu způsobovat chronická onemocnění²⁷. Galaktosaminoglykan rodu *Aspergillus* nebo galaktosylomannan druhu *Cryptococcus neoformans*²⁴ představují strukturní analogy hlavní složky glykosaminoglykanů, které

se vyskytují v extracelulární matrix mnohobuněčných organismů (keratan sulfát, kyselina hyaluronová, heparinoidy).

V případě *A. fumigatus* je v ECM vedle exopolysacharidů obsažena i heterogenní směs extracelulární DNA, proteinů, lipidů, polyolů a pigmentů jako je např. melanin^{27,28}. Významnou součástí biofilmu rodu *Aspergillus* a dalších vláknitých hub jsou také tzv. hydrofobiny, malé hydrofóbní proteiny (velikost menší než 20 kDa), které napomáhají adhezí vláknitých hub k povrchu²⁸.

Možnosti kvantifikace EPS biofilmu

Existuje mnoho metod, které se zaměřují na kvantifikaci extracelulární matrix biofilmu. Jedná se o klasické analytické metody využívající kapalinové či plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, kterým ovšem vždy nutně předchází účinná extrakce EPS ze vzorku biofilmu²⁹. Taková extrakce může být značně problematická z důvodu malého objemu biofilmu, který lze v laboratorních podmínkách získat. Pokud se ovšem podaří získat jednotlivé složky extracelulární matrix biofilmu v dostatečném množství, využití HPLC s MS a jiných vysokovýkonných chromatografií (např. HPAEC, high-performance anion exchange chromatography nebo HPSEC, high-performance size exclusion chromatography) může být velmi výhodné pro přesné stanovení daných látek obsažených v ECM^{29,30}. V kombinaci s chromatografickými metodami se využívá i elektroforetických metod. Využívá se např. klasická elektroforéza v agarosovém či polyakrylamidovém gelu pro stanovení nukleových kyselin resp. bílkovin ve vzorku či izotachoforéza^{29,31}. Takových stanovení se nicméně využívá hlavně pro kvalitativní určení složení EPS.

Další skupinou metod pro stanovení obsahu EPS v biofilmu jsou metody vizualizační (světelná, epifluorescenční či konfokální skenovací laserová mikroskopie, CSLM), které se s pomocí vhodných kvantifikačních programů dají využít i k popsání složitých struktur EPS a vyjádření jejich zastoupení a prostorového umístění^{23,32}. Pomocí CSLM je možné sledovat biofilm jako celek. Z pořízených snímků biofilmu lze pomocí analýzy obrazu stanovit tloušťku, obsah biomasy, heterogenitu či plochu osídlenou biofilmem^{33,34}. Za tímto účelem se využívají různé náročné kvantifikační programy, mezi které patří např. Comsat, CMEIAS, Imaris, Amira, Arivis a ImageJ³².

Za použití fluorescenčních barviv, která mají schopnost se specificky vázat na jednotlivé složky EPS, lze pak pomocí CSLM sledovat jednotlivé komponenty biofil-

mu, případně sledovat jejich zastoupení. Existuje řada fluorescenčních barviv, které lze využít. Pro sledování a stanovení obsahu extracelulární DNA se využívá barviv TOTO-1, TO-PRO 3, PicoGreen, DDAO, nebo tzv. LIVE/DEAD kitu skládajícího se z propidium jodidu a SYTO 9^{32,35,36}. Pro barvení exopolysacharidů či sacharidů připojených k buněčné stěně buněk se využívá barviv Concavalin A, fluorescein-isothiokyanátu, Cafluor White M2R, FUN-1 nebo značených lektinů^{23,32,36}. Tyto látky jsou konjugovány s fluorescenčními značkami jako např. AlexaFluor 488 nebo GFP protein^{32,34}. Pro stanovení celkových proteinů se využívá barviv FilmTracer a SyPro. Dále se využívá fluorescenčně značených protilátek s FLAG tagy. Pro barvení amyloidních struktur v biofilmu se využívá thioflavinu T, Kongo červení a nebo také fluorescenčně značených protilátek³². Lze sledovat i hydrofóbní regiony biofilmu obsahující vyšší množství lipidů, glykolipidů a lipoproteinů. Za tímto účelem se využívá barviv řady BODIPY a karbocyaninu DiD, které barví lipidy a membrány. Pro stanovení lipoproteinů a glykolipidů v EPS se používá nilská červen³².

Často se využívají také přístupy semi-kvantitativních metod využívajících kolorimetrickou analýzu jednotlivých komponent v biofilmu v porovnání s určenými standardy. Tyto metody jsou velmi rychlé, nenáročné a umožňují kvantifikaci velkého množství vzorků najednou.

Z toho důvodu jsou hojně využívány pro hromadný screening vlivu antimikrobiálních látek na tvorbu biofilmu různých mikroorganismů. Tradiční a nejvíce používanou semi-kvantitativní metodou je barvení krystalovou violetí, které se využívá pro stanovení celkového obsahu biomasy biofilmu³⁷. Krystalová violet barví nukleové kyseliny, proteiny i sacharidy obsažené jak v ECM, tak i v mikrobiální buňce a barvením touto látkou získáme informaci o kompletním obsahu biomasy v narostlém biofilmu v porovnání s kontrolními buňkami³⁸. Vhodné vyhodnocení takto získaných výsledků je závislé na správné volbě standardů a kontrol (např. volba správného standardu pro semi-kvantifikaci obsahu proteinů v daném vzorku (boviní sérový albumin nebo kasein nemusí vždy splňovat potřebné požadavky)). Mezi další metody semi-kvantifikace patří např. barvení sacharidů rutheniovou červení^{38,39}, stanovení kyselých mukopolysacharidů pomocí barvení alcianovou modří⁴⁰, metoda stanovení vicinálních diolů v polysacharidech pomocí kombinace kyseliny jodisté se Schiffovým činidlem⁴¹, barvení proteinů Coomassie brilantní modří²³, stanovení koncentrace proteinů pomocí Brad-

Tabulka I. Stručný přehled nejdůležitějších vlastností popsaných metod. CSLM – konfokální skenovací laserová mikroskopie, ECM – extracelulární matrix biofilmu

Metoda	Vizualizace/ Kvantifikace ECM	Cena přístrojů	Cena reagencií	Časová náročnost	Množství získaných dat	Kvalita získaných dat
CSLM	Obojí	Vysoká	Vysoká	Vysoká	Střední až velké	Vysoká
Světelná a fluorescenční mikroskopie	Obojí (více vizualizace)	Střední	Vysoká	Střední	Malé až střední	Střední až vysoká
Semi-kvantifikace	Kvantifikace	Nízká	Nízká až střední	Nízká	Velké	Nízká
Analytické a preparační metody	Kvantifikace	Vysoká	Střední až vysoká	Vysoká	Střední až velké	Vysoká

fordovy metody, Lowry/Folin-Ciocalteu metody⁴² či pomocí bicinchonové kyseliny^{31,35}.

Přítomnost a složení EPS v biofilmu lze stanovit širokou škálou metod. Rychlost těchto stanovení je většinou podmíněna náročností prováděných technik a je tedy potřeba najít rozumný kompromis mezi náročností prováděných metod, množstvím sledovaných vzorků a získaných dat, výší nákladů a výběrem použitých standardů. V tabulce (Tab. I) jsou krátce shrnuty nejdůležitější aspekty diskutovaných metod. Náročnější metody jako CSLM či kompletní izolace a preparace pomocí chromatografických metod dávají množství informací o tvorbě biofilmu a účinku antimikrobiálních látek na něj, ale jsou velmi časové i finančně náročné a mnohdy je vhodnější použít jednodušších semi-quantitativních metod.

Závěr

Extracelulární matrix je důležitou komponentou bakteriálních i fungálních biofilmů. Významně přispívá k persistenci těchto společenství na různých površích

a představuje účinnou ochranu buněk před nepříznivými vlivy prostředí. Eradikace vzniklých biofilmů a prevence jejich tvorby v lidském organismu se stala značnou terapeutickou výzvou. Je velká snaha hledat způsoby, jak tato konsorcia odstranit a jedním z cílů, jak to provést, je lépe porozumět roli extracelulární matrix v tvorbě biofilmu a možnému případnému potlačení tvorby některých složek EPS, které jsou pro tvorbu biofilmu esenciální. Za tímto účelem bylo vyvinuto mnoho různých kvantifikačních metod, které byly v této práci shrnuty. Stálý rozvoj metod vizualizace a kvantifikace biofilmu významně přispívají ke studiu jeho tvorby a případnému boji proti patogenům, kteří biofilm vytváří.

Poděkování

Tato práce byla realizována v rámci „Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost“ (CZ.2.16/3. 1. 00/21537 a CZ.2.16/3. 1. 00/24503) za podpory „Národního programu udržitelnosti I“ – NPU I (LO1601 – č. : MSM1-43760/2015).

Literatura

1. Costerton JW, Stewart PS, et al.: *Science* 284(5418), 1318 (1999).
2. Ehrlich GD, Ahmed A, et al.: *Fems Immunol. Med. Mic.* 59(3), 269 (2010).
3. Mah TFC and O'Toole GA: *Trends Microbiol.* 9(1), 34 (2001).
4. Branda SS, Vik A, et al.: *Trends Microbiol.* 13(1), 20 (2005).
5. Fux CA, Costerton JW, et al.: *Trends Microbiol.* 13(1), 34 (2005).
6. Juhas M, Eberl L, et al.: *Environ. Microb.* 7(4), 459 (2005).
7. Flemming H and Wingender J: *Nature* 8, 623 (2010).
8. Jackson KD, Starkey M, et al.: *J. Bacteriol.* 186(14), 4466 (2004).
9. Ma LM, Conover M, et al.: *Plos. Pathogens* 5(3), 1 (2009).
10. Taglialegna A, Lasa I, et al.: *J. Bacteriol.* 198(19), 2579 (2016).
11. von Eiff C, Peters G, et al.: *Lancet Infect., DiS.* 2(11), 677 (2002).
12. Hall-Stoodley L and Stoodley P: *Cell. Microbiol.* 11(7), 1034 (2009).
13. Singh R, Ray D, et al.: *J. Antimicrob. Chemother.* 65(9), 1955 (2010).
14. Anderl JN, Franklin MJ, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(7), 1818 (2000).
15. Mack D: *J. Hosp. Infect.* 43, 113 (1999).
16. Izano EA, Amarante MA, et al.: *App. Environ. Microb.* 74(2), 470 (2008).
17. Danese PN, Pratt LA, et al.: *J. Bacteriol.* 182(12), 3593 (2000).
18. Branda SS, Chu F, et al.: *Mol. Microbiol.* 59(4), 1229 (2006).
19. Matsukawa M and Greenberg EP: *J. Bacteriol.* 186(14), 4449 (2004).
20. Foster TJ and Hook M: *Trends Microbiol.* 6(12), 484 (1998).
21. Hauck CR and Ohlsen K: *Curr. Opin. Microbiol.* 9(1), 5 (2006).
22. Štoviček V, Vachová L, et al.: *Fungal Genet. Biol.* 47(12), 1012 (2010).
23. Joubert LM, Wolfaardt GM, et al.: *Microb. Ecol.* 52(2), 187 (2006).
24. Faria-Oliveira F, Carvalho J, et al.: *J. Basic Microb.* 55(6), 685 (2015).
25. Pavlova K, Panchev I, et al.: *World J. Microb. Biot.* 21(3), 279 (2005).
26. McCourtie J and Douglas LJ: *J. gen. Microbiol.* 131(MAR), 495 (1985).
27. Sheppard DC and Howell PL: *J. Biol. Chem.* 291(24), 12529 (2016).
28. Beauvais A and Latge JP: *Microbiol. Spectrum* 3(4), 1 (2015).
29. Andersson S, Dalhammar G, et al.: *Appl. Microbiol. Biot.* 82(3), 535 (2009).
30. Meisen S, Wingender J, et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* 391(3), 993 (2008).
31. Sousa C, Henriques M, et al.: *J. Adhes. Sci. Technol.* 23(12), 1657 (2009).
32. Schlafer S and Meyer RL: *J. Microbiol. Meth.* 138, 50 (2017).
33. Bridier A, Dubois-Brissonnet F, et al.: *J. Microbiol. Meth.* 82(1), 64 (2010).
34. Wagner M, Ivleva NP, et al.: *Water Res.* 43(1), 63 (2009).
35. Singh R, Shivaprakash MR, et al.: *Microbiol.-Sgm* 157, 2611 (2011).
36. Lin D, Ma WT, et al.: *Colloid Surface B* 138, 10 (2016).
37. Dubois M, Gilles KA, et al.: *Anal. Chem.* 28(3), 350 (1956).
38. Jung JH, Choi NY, et al.: *Food Microbiol.* 34(1), 70 (2013).
39. Combrouse T, Sadovskaya I, et al.: *J. Appl. Microbiol.* 114(4), 1120 (2013).
40. Knudsen G, Sorum H, et al.: *J. Fish, DiS.* 22, 409 (1999).
41. Randrianjatovo-Gbalou I, Girbal-Neuhausser E, et al.: *Anal. Biochem.* 500, 12 (2016).
42. Redmile-Gordon MA, Armenise E, et al.: *Soil Biol. Biochem.* 67, 166 (2013).

Souhrn

Kašparová, P.: Složení, význam a možnosti kvantifikace extracelulární matrix biofilmu podmíněně patogenních mikroorganismů

Biofilm je společenství mikroorganismů, které vzniká na fázovém rozhraní. Buňky adherují k povrchu či k sobě navzájem pomocí mukózní hmoty, která se nazývá extracelulární matrix biofilmu. Jedná se o komplexní směs složenou ze sacharidů, proteinů, extracelulárních enzymů, eDNA a dalších látek. Extracelulární matrix významně přispívá k odolnosti biofilmů podmíněně patogenních mikroorganismů, představuje jeden z významných faktorů patogenese a zabraňuje prostupu mnohých antimikrobiálních látek do nitra biofilmu. V posledních letech bylo vyvinuto mnoho metod pro studium a identifikaci látek v extracelulární matrix, z nichž nejvýznamnější je především konfokální skenovací laserová mikroskopie, dále semi-kvantitativní spektrofotometrické metody nebo standardní analytické identifikací a preparační metody kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií.

Klíčová slova: extracelulární matrix, exopolysacharidy, exoproteiny, eDNA, podmíněně patogeny, biofilm, tvorba biofilmu, kvantifikace biofilmu

Summary

Kašparová P.: Composition, significance and options for quantification of extracellular matrix in biofilm of opportunistic pathogens

The biofilm is a microbial community occurring on a phase interface. The cells adhere to solid surface or to each other due to viscous matter called the extracellular matrix. The matrix is complex mixture which contains polysaccharides, proteins, extracellular enzymes, eDNA and other compounds. Extracellular matrix significantly enhances biofilm persistence of opportunistic pathogens and acts as one of the main virulence factors. It prevents various antimicrobials from penetration into biofilm, thus it increases resistance of cells in it. In recent years there has been many quantification and identification methods developed. The most prevalent has been the confocal scanning laser microscopy and semi-quantitative spectrophotometric methods. Classic analytic methods of liquid chromatography combined with mass spectrometry are also often used.

Keywords: extracellular matrix, exopolysaccharides, exoproteins, eDNA, opportunistic pathogens, biofilm, biofilm formation, biofilm quantification

ASPARTÁTOVÉ PROTEASY A JEJICH FUNKCE U PARAZITŮ

Radka Houšteká

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

Úvod

Parazitární onemocnění představují závažný zdravotní, sociální a ekonomický problém. Infekce způsobené parazitickými prvky a červy či přenášené krevsajcími členovci postihují stovky milionů lidí po celém světě, zejména v tropických a subtropických oblastech. Parazité také způsobují značné škody v chovech hospodářských zvířat. Léčba je v mnoha případech neefektivní, někdy zcela chybí. Vznikají rezistence na dosud známá léčiva, u kterých navíc často nejsou známy přesné mechanismy jejich účinku¹. Pochopení biochemických pochodů a úlohy jednotlivých enzymů v interakci mezi parazitem a jeho hostitelem jsou nezbytné k navrhování nových strategií boje proti parazitům a vývoji antiparazitárních léčiv.

Proteolytické enzymy (proteasy, peptidasy) štěpí peptidovou vazbu v proteinech a peptidech. U parazitů se účastní řady procesů spojených s patogenézí, jako jsou invaze hostitele a průnik tkáněmi, larvální migrace, překonání imunitního systému hostitele a modulační zánětlivé odpovědi, trávení hostitelské krve nebo ovlivňování koagulace². Často fungují v rámci multienzymového systému a jejich činnost je regulována přirozenými inhibitory.

Proteasy se rozdělují dle katalytického mechanismu na cysteinové, serinové, threoninové, aspartátové, glutamátové a metalloproteasy, a dále do klanů a rodin dle evoluční příbuznosti a podobnosti aminokyselinové sekvence a prostorové struktury³. Aspartátové proteasy tvoří 16 rodin, z nichž nejpočetnější je rodina A1, zvaná dle modelové proteasy rovněž rodina pepsinu. Kromě pepsinu zahrnuje např. katepsin D a E, renin či β -sekretasu. Mezi další významné patří rodina A2, reprezentovaná virovou HIV proteasou, nebo rodina intramembránových proteas A22³. Tento přehledný článek se

zaměřuje na aspartátové proteasy rodiny A1 (dále jen AP) u parazitů. Z této rodiny bylo identifikováno a charakterizováno množství enzymů, převážně s homologií k pepsinu a katepsinu D.

Obecná charakteristika aspartátových proteas rodiny pepsinu

AP jsou syntetizovány jako neaktivní zymogeny, které jsou aktivovány na zralé funkční enzymy buď autokatalyticky v kyselém prostředí, nebo působením jiných proteas. Katalytický mechanismus enzymové reakce je založen na dvou zbytcích kyseliny asparagové, nacházejících se v aktivním místě enzymu, které aktivují molekulu vody k nukleofilnímu ataku štěpené peptidové vazby substrátu (acidobazická katalýza). AP jsou endopeptidázy, tedy enzymy hydrolyzující peptidovou vazbu uvnitř polypeptidového řetězce. Upřednostňují štěpná místa obsahující hydrofobní aminokyseliny (např. fenylalanin a leucin). AP obvykle vykazují nejvyšší aktivitu v kyselém pH a jsou inhibovatelné přirozeným inhibitorem pepstatinem z bakterií rodu *Actinomyces*⁴.

Prostorová struktura AP se skládá ze dvou domén, N-koncové a C-koncové. Mezi nimi se nachází velká hydrofobní dutina tvořící aktivní místo enzymu. Každá z domén poskytuje jeden katalytický zbytek kyseliny asparagové, který je součástí konzervovaného motivu Asp-Thr-Gly. U zymogenů je aktivní místo blokováno N-koncovým segmentem (tzv. propeptidem). V průběhu aktivace dochází k jeho odštěpení, což je spojeno s výraznými konformačními změnami vedoucími ke zpřístupnění aktivního místa. Na substrátové specifitě AP se podílejí dva strukturní motivy, tyrosinová a polyprolinová smyčka, nacházející se u vstupu do aktivního místa enzymu⁴.

Aspartátové protasy endoparazitů

Mezi endoparazity, neboli vnitřní parazity živočichů, řadíme prvky a parazitické červy. Živí se převážně krví

hostitele, méně často obsahem trávicího traktu hostitele. U většiny endoparazitů byly identifikovány AP na genové či proteinové úrovni (Tab. I).

Tab. I: Stručný přehled aspartátových proteas rodiny pepsinu u parazitů.

Endoparazit	Onemocnění	Proteasa	ref.
prvoci			
Trypanosoma americká <i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagasova choroba	cruzipsiny (CZP-I, CZP-II)	19
Zimnička tropická <i>Plasmodium falciparum</i>	malárie	plasmepsiny (PfPM I-II, IV-X) histoaspartátová peptidáza (HAP)	7, 9, 11, 12
Kokcidie kočičí <i>Toxoplasma gondii</i>	toxoplasmóza	toxomepsiny (TgASP1-7)	13, 14, 16
Kokcidie <i>Eimeria tenella</i>	kokcidióza	eimepsiny 1-3	56
parazitičtí červi – ploštěnci			
Krevnička jaterní <i>Schistosoma japonicum</i>	schistosomóza	katapsin D (SjCD)	57
Krevnička střevní <i>Schistosoma mansoni</i>		katapsin D (SmCD)	57, 58
Motolice thajská <i>Opisthorchis viverrini</i>	opisthorchiáza	Ov-APR-1	59
parazitičtí červi – hlístice			
Měchovec americký <i>Necator americanus</i>	nekatoriáza	NaAPR 1 a 2	25, 28
Měchovec psí <i>Ancylostoma caninum</i>	ankylostomiáza	AcASP	28
Vlasovec kožní <i>Onchocerca volvulus</i>	onchocerkóza (říční slepota)	Ov-APR	29
Vlasovka slezová <i>Haemonchus contortus</i>	hemonchóza	PEP1	30
Ektoparazit	Přenášené patogeny	Proteasa	ref.
kliščata			
Piják tropický <i>Rhipicephalus microplus</i>	prvoci (Babesia)	BmAP žloutkový katapsin (BYC) hem-vázající proteasa (THAP)	37, 38
Klíště obecné <i>Ixodes ricinus</i>	bakterie (Borrelia) víry (v. kliščové encefalitidy) prvoci (Babesia, Ehrlichia)	katapsin D1-3 (IrCD1-3)	34
Klíšť dlouhorožý <i>Haemaphysalis longicornis</i>	bakterie víry prvoci	longepsin	60
roztoči			
Čmelík kuří <i>Dermanyssus gallinae</i>	bakterie (Salmonella, Borrelia)	DgASP	50
Zákožka svrabová <i>Sarcoptes scabiei</i>	původce svrabu	SsAP	39
hmyz			
Komár tropický <i>Aedes aegypti</i>	víry (Dengue, Zika)	lysosomální AP (LAP)	61
ploštice <i>Triatoma infestans</i>	prvok <i>Trypanosoma cruzi</i>	katapsin D (TiCatD1, TiCatD2) ASP25	42
ploštice <i>Rhodnius prolixus</i>		střevní AP žloutková AP	62, 63
ploštice <i>Dipetalogaster maxima</i>		katapsin D (DmCatD)	64

Aspartátové proteasy prvoků

Prvoci tvoří různorodou skupinu jednobuněčných heterotrofních organismů, z nichž naprostá většina jsou volně žijící organismy. Malá skupina prvoků se specializovala na parazitismus; mají zpravidla komplikovaný životní cyklus zahrnující více hostitelů, spojený se střídáním pohlavního a nepohlavního rozmnožování. Řadí se sem například zimničky (*Plasmodium*), způsobující malárii, patrně nejzávažnější parazitární onemocnění dnešní doby, dále kokcidie (*Toxoplasma*) a trypanosomy (*Leishmania*, *Trypanosoma*), zodpovědné za toxoplasmózu, leishmaniózu, spavou nemoc nebo Chagasovu chorobu.

Nejvíce prostudovanými jsou AP zimničky tropické (*Plasmodium falciparum*), hlavního původce malárie. V současné době je identifikováno deset AP, souhrnně nazývaných plasmepsiny, které vykonávají různé funkce v průběhu životního cyklu parazita. Většina z nich se uplatňuje v tzv. krevní fázi cyklu, probíhající uvnitř červených krvinek lidského hostitele. Plasmepsiny I, II, IV a histoaspartátová peptidasa (HAP, také zvaná plasmepsin III) se účastní metabolismu hemoglobinu uvnitř potravní vakuoly parazita. Plasmepsin II je navíc spojován s degradací cytoskeletu napadených krvinek⁵. Enzymy se liší mírou exprese v jednotlivých vývojových stádiích a částečně také svou substrátovou specificitou a pH optimem⁶. Při trávení krve plasmepsiny pracují v součinnosti s cysteinovými proteasami (falcipainy) a metaloproteasami (falcilysiny)⁷. Experimenty s několikanásobným vypnutím genů trávicích plasmepsinů prokázaly, že nejsou pro přežití parazita zcela esenciální, i když mají vliv na rychlost jeho vývoje a jsou důležité pro správnou vnitrobuněčnou degradaci⁸. Plasmepsin V zpracovává proteiny parazita obsahující tzv. plasmodiový exportní element (PEXEL) s konzervovanou aminokyselinovou sekvencí RxLx/E/Q/D (x je libovolná aminokyselina), a zajišťuje tak jejich export do hostitelské buňky. Exportované proteiny pomáhají uzpůsobit hostitelskou buňku pro potřeby parazita. Dochází k tvorbě nových organel, povrchových proteinů i změnám v metabolických drahách buňky⁹. Díky unikátní substrátové specificitě je plasmepsin V intenzivně studován jako kandidát pro vývoj nových antimalarik¹⁰. Teprve v nedávné době se podařilo popsat také role plasmepsinů IX a X^{11,12}. Zatímco plasmepsin IX umožňuje průnik parazita do hostitelské buňky, plasmepsin X se uplatňuje zejména při uvolnění namnožených parazitů z hostitelské buňky (hepatocytu či erytrocytu). Plasmepsiny VI až VIII jsou exprimovány pouze v exoerytrocytické fázi životního cyklu parazita a jejich funkce zatím nebyla zcela objasněna.

Kokcidie *Toxoplasma gondii*, způsobující poměrně rozšířenou infekci zvířat a lidí, také disponují arzenálem AP. V jejich genomu bylo identifikováno sedm genů kódujících AP (TgASP1-7), pouze některé z těchto AP však byly detailně charakterizovány¹³. TgASP5 je homolog plasmepsinu V, který je součástí sekreční dráhy potřebné pro export proteinů parazita do napadené hostitelské buňky^{14,15}. Podobně TgASP3 je homologem plasmepsinů IX a X; štěpí enzymové substráty zapojené do procesu invaze parazita do buněk a uvolnění z bu-

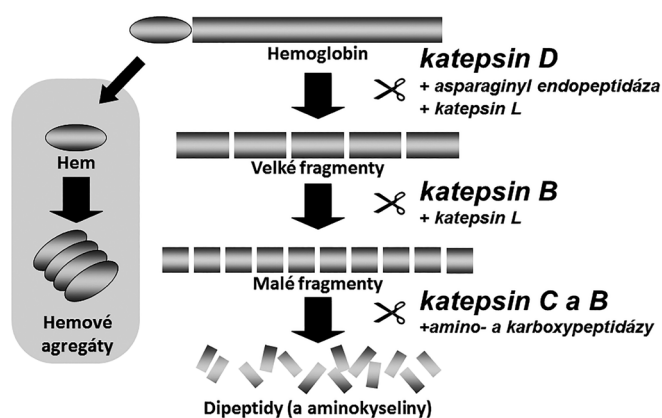
něk¹⁶. TgASP1 je intramembránová proteasa unikátní pro *T. gondii*, u níž pravděpodobně plní funkci při nepohlavním rozmnožování. Vypnutí genu neprokázalo nezbytnost TgASP1 pro přežití parazita¹⁷.

U prvoků z řádu *Trypanosoma* byla pomocí specifických substrátů identifikována enzymová aktivita aspartátové proteasy katepsinu D v homogenátech parazitů¹⁸. U trypanosomy americké se navíc podařilo izolovat dva enzymy s AP aktivitou, nazvané cruzipsin I a II¹⁹.

Aspartátové proteasy parazitických červů

Parazitické červi, neboli helminti, jsou velkou skupinou mnohobuněčných endoparazitů. Díky schopnosti modulovat imunitní systém často přežívají v hostiteli i mnoho let a způsobují chronická onemocnění²⁰. Infekce způsobené helminty jsou ve světě velmi rozšířené, především v rozvojových zemích se sníženými hygienickými standardy. Taxonomicky je možné helminty rozdělit do kmenů ploštěnců (*Platyhelminthes*) a hlístic (*Nematoda*).

AP jsou u krevsajících helmintů spojovány většinou s trávením proteinů z krve hostitele sloužících jako zdroj živin. Jako příklad lze uvést AP krevniček (*Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*), původců onemocnění schistosomózy. Dospělí červi žijí v cévním systému člověka, kde se živí krevními proteiny, především hemoglobinem. Ten je ve střevě krevniček degradován kaskádou trávicích proteolytických enzymů, zahrnující aspartátové proteasy, cysteinové proteasy a metaloproteasy²¹. Aspartátová proteasa typu katepsinu D (SmCD resp. SjCD) je jedním z klíčových komponentů tohoto multienzymového systému. Je zodpovědná za počáteční štěpení hemoglobinu na větší fragmenty, které jsou postupně degradovány cysteinovými proteasami až na dipeptidy a aminokyseliny (Obr. 1), které krevnička dále využívá. Při vypnutí genu pro SmCD metodou RNA interference dochází k zastavení růstu parazitů a ztrátě schopnosti trávit hemoglobin²². V současné době se vědci zaměřují na vývoj antischistosomální vakcíny založené na SjCD a SmCD^{23, 24}.



Obr. 1: Kaskáda proteolytických enzymů zajišťujících trávicí proces u krevničky *Schistosoma mansoni*.

Z parazitických hlístic jsou AP známy zejména u měchovce amerického (*Necator americanus*), kde byly charakterizovány dva enzymy, NaAPR-1 a NaAPR-2^{25,26}.

Oba se účastní katabolismu krevních a sérových proteinů, liší se však v pH optimu i ve štěpných místech. NaAPR-1 štěpí molekuly hemoglobinu a rozbaluje je, aby byly přístupné k dalšímu zpracování jinými typy proteas. Kromě toho hraje úlohu v degradaci tkání hostitele, čímž usnadňuje larvám parazita proniknutí do kůže²⁶. Díky své imunogenicitě je hlavní složkou vakcíny proti nekatoriáze²⁷. Porovnání AP z měchovce amerického a příbuzného měchovce psiho (*Ancylostoma caninum*) prokázalo, že enzymy preferenčně štěpí hemoglobin a sérové proteiny svého primárního hostitele. Tato specifita může být příkladem koevoluce hostitele a parazita²⁸.

O AP jiných hlístic toho není tolik známo. Ov-APR z vlasovce *Onchocerca volvulus* je lysosomální AP s předpokládanou trávicí funkcí ve střevě parazita²⁹. AP PEP1 je součástí glykoproteinového komplexu střevní membrány vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) a uplatňuje se při degradaci hemoglobinu³⁰.

Aspartátové proteasy ektoparazitů

Ektoparaziti žijí na povrchu těla hostitele. Zůstávají přichyceni nebo zanořeni do kůže hostitele, kde sají krev. Patří mezi ně členovci jako klíšťata, roztoči, blechy a vši, a také komáři, zákeřnice a další krevsající hmyz³¹. Ačkoli tito členovci mohou způsobovat onemocnění přímo, největší hrozbu představují coby přenašeči (vektory) patogenů. Při sání krve se do těla hostitele dostávají prvoci, bakterie nebo viry, způsobující závažná onemocnění. Ektoparazité používají širokou škálu proteolytických enzymů, z nichž mnoho se uplatňuje při sání a trávení krve³². Podobně jako u helmintů je trávení klíšťat a ploštic založeno na aspartátových a cysteinových proteasách. Naproti tomu u komárů a dalšího krevsajícího hmyzu probíhá trávení pomocí vývojově novějšího systému serinových proteas³³. Přehled známých AP ektoparazitů shrnuje Tab. I.

Aspartátové proteasy klíšťat a roztočů

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je přenašečem závažných lidských onemocnění – lymské boreliózy a klíšťové encefalitidy. V genomu klíštěte byly identifikovány 3 isoformy AP typu katepsinu D (IrCD1 až IrCD3) produkované v různých vývojových stádiích a v odlišných orgánech parazita, z nichž pouze IrCD1 byl detailně charakterizován. Role IrCD1 v hemoglobinolýze byla potvrzena imunolokalizací ve váčcích trávicích buněk a expresí ve střevě klíštěte, která je silně zvýšena při sání krve³⁴. Vedle hemoglobinu IrCD1 také pomáhá rozkládat sérový albumin³⁵.

U pijáka tropického (*Rhipicephalus microplus*), klíštěte způsobujícího devastaci chovů dobytka, byly identifikovány tři různé AP. Trávicí proteasa BmAP štěpí hemoglobin za vzniku peptidů s antimikrobiálními vlastnostmi (hemicidiny), které by mohly hrát roli v imunitní odpovědi proti invazi patogenů do střeva parazita³⁶. Žloutkový katepsin (BYC) a AP vázající hem (THAP) zajišťují při vývoji vajíček specifickou degradaci žloutkového hemoproteinu vitellinu^{37, 38}.

Ačkoli zákožka svrabová nepřenáší patogeny, způsobuje kožní onemocnění svrab. Aspartátová proteasa SsAP roztoče degraduje hemoglobin, sérový albumin,

fibrinogen a fibronectin, ale ne kolagen III nebo laminin, což koreluje s výskytem parazita ve vrchních vrstvách kůže³⁹.

Aspartátové proteasy ploštic

Zákeřnice *Rhodnius prolixus* a *Triatoma infestans* jsou přenašeči prvoka *Trypanosoma cruzi* způsobujícího v latinské Americe Chagasovu chorobu. U obou byla detekována AP aktivita zvyšující se při kolonizaci střeva prvokem^{40,41}. U *T. infestans* byly charakterizovány dva katepsiny D (TiCatD1 a TiCatD) s funkcí v časně resp. pozdní fázi trávení⁴². Stejně jako klíšťata využívají ploštice AP k degradaci vitellinu při embryogenezi. Příkladem je katepsin D u *R. prolixus*⁴³.

Regulace aspartátových proteas u parazitů

Endogenní inhibitory proteas jsou proteiny či peptidy, které se v organismu vyskytují přirozeně a blokováním aktivity proteolytických enzymů regulují jejich fyziologické funkce. U parazitů je známo mnoho přirozených proteinových inhibitorů pro serinové a cysteinové proteasy, ale jen málo pro aspartátové proteasy (tzv. aspiny).

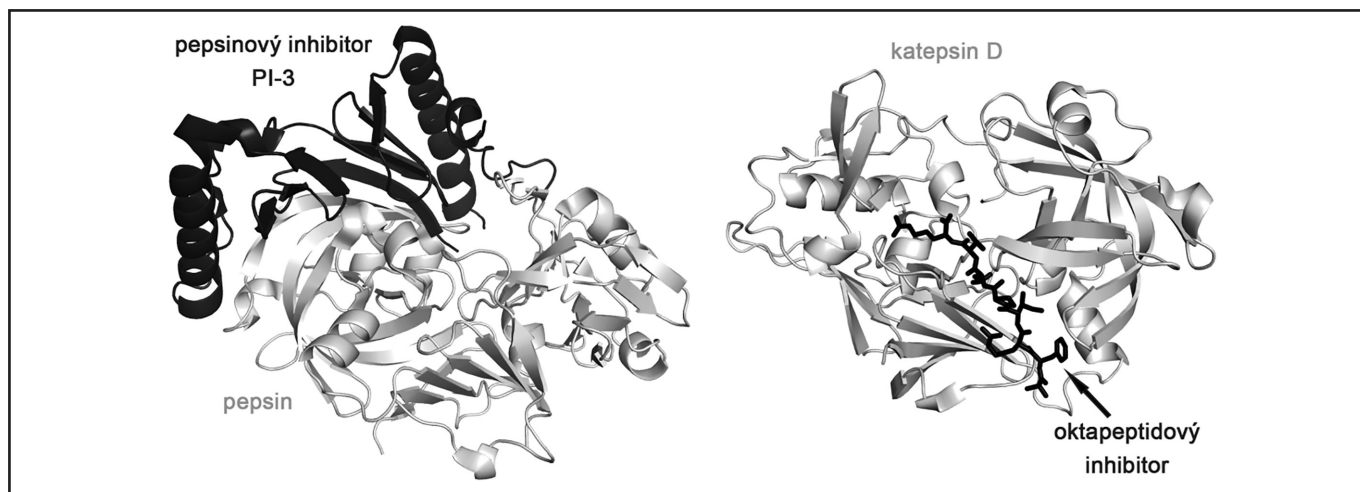
Prvním objeveným aspinem byl pepsinový inhibitor z parazitické škrkavky *Ascaris suum* (PI-3) s inhibiční specifitou k pepsinu a katepsinu E. Jeho úkolem je chránit parazita před poškozením hostitelskými proteasami v trávicím traktu a potenciálně se také podílí na modulaci imunitní odpovědi⁴⁴. Vyřešení jeho prostorové struktury v komplexu s pepsinem umožnilo popsat mechanismus blokování aktivního místa AP (Obr. 2)⁴⁵. Postupně byla identifikována řada homologních inhibitorů u různých druhů hlístic⁴⁶. Obecně jsou vysoce imunogenní, a proto se testuje jejich diagnostické využití k detekci parazitárních onemocnění⁴⁶.

Na modelu parazitárního katepsinu IrCD1 byl objeven allosterický mechanismus regulace AP. Peptidový inhibitor odvozený z propeptidu se váže do tzv. exomísta na povrchu proteasy (Obr. 2), což vyvolá strukturní změnu vedoucí k blokování vzdáleného aktivního místa. Jev je závislý na pH, což pravděpodobně umožňuje cílenou regulaci AP ve váčcích střevních buněk klíštěte⁴⁷.

Aspartátové proteasy parazitů jako potenciální terapeutické cíle

Vývoj léčiv proti parazitárním infekcím se ubírá dvěma směry. Hledají se nové proteinové antigeny parazitů využitelné jako preventivní vakcíny a současně jsou připravovány nízkomolekulární inhibitory enzymů jako léčiva.

AP jsou testovány jako vakcinační kandidáti proti různým parazitickým červům. Rekombinantní katepsin D (SjCD) z krevničky *S. japonicum* a aspartátová proteasa Na-APR1 z měchovce *N. americanus* byly úspěšně testovány na myším modelu schistosomiázy²³ resp. proti nekatoriáze⁴⁸. Slibně se jeví i vývoj vícesložkových vakcín, jako například vakcína proti červům *N. americanus* založená na aspartátové protease Na-APR1 a glutathion-S-transferase, která už se dostala do fáze klinického testování²⁷.



Obr. 2: Regulace AP navázáním přirozeného inhibitoru do aktivního místa a exomísta. Vlevo: Prostorová struktura prasečího pepsinu (zobrazen šedě jako stužkový model) v komplexu s inhibitem PI-3 ze škravky (černě jako stužkový model); vpravo: Prostorová struktura kathepsinu D klíštěte (šedě jako stužkový model) v komplexu s inhibitem odvozeným z propeptidu (černě jako tyčinkový model). PDB kódy pro zobrazené struktury: 1F34, 5N70.

Vakcinace je také jediným možným řešením boje proti ektoparazitům. Imunizace dobytka kathepsinem BYC klíštěte *R. microplus* snížila dobu přežití parazitů i množství nakladených vajec⁴⁹, a kombinace kathepsinů D a L roztoče *Dermanyssus gallinae* byla navržena pro vakcinaci drůbeže⁵⁰.

Aspartátové proteasy jsou již známé jako molekulární cíle pro vývoj inhibitorů pro léčbu hypertenze (renin), AIDS (HIV proteasa) nebo Alzheimerovy choroby (β - a γ -sekretasa). Antiparazitický efekt inhibitorů HIV proteasy používaných pro léčbu AIDS byl testován na různých stádiích zimničků^{51, 52} a trypanosom⁵³. Ačkoli inhibitory vykazovaly účinnost v biologických testech, hypotéza, že se tak děje prostřednictvím inhibice AP, je dnes spíše vyvrácena⁵⁴. Pozornost farmaceutických firem se soustředí i na vývoj nových specifických inhibitorů, jako jsou inhibitory jednotlivých plasmepsinů s potenciálem pro léčbu malárie^{6, 10, 55}. Dále lze očekávat zahájení vývoje inhibitorů cílených proti AP parazitických helmintů a jejich kombinování s inhibitory dalších typů proteas³³.

Literatura

1. Renslo AR and Mckerrow JH: *Nat Chem Biol* 2(12), 701 (2006).
2. Horn M, Jilkova A, et al.: *Chem Listy* 108(4), 358 (2014).
3. Rawlings ND, Barrett AJ, et al.: *Nucleic Acids Res* 46(D1), D624 (2018).
4. Rawlings ND and Barrett AJ (2013). *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, edited by N. D. Rawlings & G. Salvesen, pp. 3: Academic Press.
5. Le Bonniec S, Deregnaucourt C, et al.: *J Biol Chem* 274(20), 14218 (1999).
6. Ersmark K, Samuelsson B, et al.: *Med Res Rev* 26(5), 626 (2006).
7. Banerjee R, Liu J, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2), 990 (2002).
8. Bonilla JA, Moura PA, et al.: *Int J Parasitol* 37(3-4), 317 (2007).
9. Boddey JA, Hodder AN, et al.: *Nature* 463(7281), 627 (2010).
10. Gambini L, Rizzi L, et al.: *PLoS One* 10(11), e0142509 (2015).
11. Pino P, Caldelari R, et al.: *Science* 358(6362), 522 (2017).
12. Nasamu AS, Glushakova S, et al.: *Science* 358(6362), 518 (2017).
13. Shea M, Jakle U, et al.: *Traffic* 8(8), 1018 (2007).
14. Coffey MJ, Sleebs BE, et al.: *Elife* 4, e10809 (2015).
15. Hammoudi PM, Jacot D, et al.: *PLoS Pathog* 11(10), e1005211 (2015).
16. Dogga SK, Mukherjee B, et al.: *Elife* 6, e27480 (2017).
17. Polonais V, Shea M, et al.: *Exp Parasitol* 128(4), 454 (2011).
18. Valdivieso E, Dagger F, et al.: *Experimental Parasitology* 116(1), 77 (2007).
19. Pinho RT, Beltramini LM, et al.: *Exp Parasitol* 122(2), 128 (2009).

Závěr

Proteasy parazitů se účastní řady procesů spojených s patogenezí a jsou proto intenzivně studovány jako možné cílové molekuly pro terapeutický zásah. Hledají se nové způsoby, jak jejich regulací zamezit parazitům průnik do hostitele, zabránit přenosu patogenů z vektoru do hostitele nebo jak parazity vyhladovět zablokováním jejich trávicích pochodů. Tento přehledný článek shrnuje poznatky o aspartátových proteasách parazitů, které hrají klíčovou roli ve vývoji, růstu a interakci parazitů s hostitelem a jsou tak nadějnými kandidáty pro vývoj nových antiparazitárních vakcín a léčiv.

Poděkování

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

Literatura (pokračování)

20. Maizels RM and Yazdanbakhsh M: *Nat Rev Immunol* 3(9), 733 (2003).
21. Delcroix M, Sajid M, et al.: *J Biol Chem* 281(51), 39316 (2006).
22. Morales ME, Rinaldi G, et al.: *Mol Biochem Parasitol* 157(2), 160 (2008).
23. Verity CK, Mcmanus DP, et al.: *Parasite Immunol* 23(3), 153 (2001).
24. Dougall AM, Skwarczynski M, et al.: *Hum Vaccin Immunother* 10(2), 399 (2014).
25. Williamson AL, Brindley PJ, et al.: *J Infect Dis* 187(3), 484 (2003).
26. Williamson AL, Brindley PJ, et al.: *Parasitology* 126, 179 (2003).
27. Hotez PJ, Beaumier CM, et al.: *Vaccine* 34(26), 3001 (2016).
28. Williamson AL, Brindley PJ, et al.: *FASEB J* 16(11), 1458 (2002).
29. Jolodar A, Fischer P, et al.: *Experimental Parasitology* 107(3-4), 145 (2004).
30. Longbottom D, Redmond DL, et al.: *Mol Biochem Parasitol* 88(1-2), 63 (1997).
31. *About parasites*, (2016). <https://www.cdc.gov/parasites/about.html>.
32. Santiago PB, De Araujo CN, et al.: *Parasit Vectors* 10(1), 79 (2017).
33. Sojka D, Hartmann D, et al.: *Trends Parasitol* 32(9), 708 (2016).
34. Sojka D, Franta Z, et al.: *J Biol Chem* 287(25), 21152 (2012).
35. Sojka D, Pytelkova J, et al.: *Ticks Tick Borne Dis* 7(4), 604 (2016).
36. Cruz CE, Fogaca AC, et al.: *Parasit Vectors* 3, 63 (2010).
37. Logullo C, Vaz Ida S, et al.: *Parasitology* 116(6), 525 (1998).
38. Sorgine MH, Logullo C, et al.: *J Biol Chem* 275(37), 28659 (2000).
39. Mahmood W, Viberg LT, et al.: *PLoS Negl Trop Dis* 7(11), e2525 (2013).
40. Borges EC, Machado EM, et al.: *Exp Parasitol* 112(2), 130 (2006).
41. Buarque DS, Braz GR, et al.: *PLoS One* 8(5), e61203 (2013).
42. Balczun C, Siemanowski J, et al.: *Insect Biochem Mol Biol* 42(4), 240 (2012).
43. Gomes FM, Oliveira DM, et al.: *J Cell Physiol* 222(3), 606 (2010).
44. Kageyama T: *Eur J Biochem* 253(3), 804 (1998).
45. Ng KKS, Petersen JFW, et al.: *Nature Structural Biology* 7(8), 653 (2000).
46. Knox DP: *Parasite Immunol* 29(2), 57 (2007).
47. Hanova I, Brynda J, et al.: *Cell Chem Biol* 25(3), 318 (2018).
48. Pearson MS, Bethony JM, et al.: *FASEB J* 23(9), 3007 (2009).
49. Seixas A, Oliveira P, et al.: *Vet Immunol Immunopathol* 148(1-2), 149 (2012).
50. Bartley K, Huntley JF, et al.: *Parasitology* 139(6), 755 (2012).
51. Andrews KT, Fairlie DP, et al.: *Antimicrob Agents Chemother* 50(2), 639 (2006).
52. Hobbs CV, Voza T, et al.: *J Infect Dis* 199(1), 134 (2009).
53. Santos LO, Garcia-Gomes AS, et al.: *Curr Med Chem* 20(25), 3116 (2013).
54. Kraft TE, Armstrong C, et al.: *Antimicrob Agents Chemother* 59(10), 6203 (2015).
55. Hodder AN, Sleebs BE, et al.: *Nat Struct Mol Biol* 22(8), 590 (2015).
56. Katrib M, Ikin RJ, et al.: *BMC Genomics* 13, 685 (2012).
57. Brindley PJ, Kalinna BH, et al.: *Mol Biochem Parasitol* 112(1), 103 (2001).
58. Morales ME, Kalinna BH, et al.: *Gene* 338(1), 99 (2004).
59. Suttiprapa S, Mulvanna J, et al.: *Int J Biochem Cell B* 41(5), 1148 (2009).
60. Boldbaatar D, Sikalizyo Sikasunge C, et al.: *Insect Biochem Mol Biol* 36(1), 25 (2006).
61. Cho WL and Raikhel AS: *J Biol Chem* 267(30), 21823 (1992).
62. Nussenzweig RH, Oliveira PL, et al.: *Arch Insect Biochem Physiol* 21(4), 253 (1992).
63. Ribeiro JM, Genta FA, et al.: *PLoS Negl Trop Dis* 8(1), e2594 (2014).
64. Leyria J, Fruttero LL, et al.: *PLoS One* 10(6), e0130144 (2015).

Souhrn

Houštěcká R.: Aspartátové proteasy a jejich funkce u parazitů

Parazitární onemocnění postihují stovky milionů lidí po celém světě, a představují tak závažný zdravotní a socioekonomický problém. Proteolytické enzymy (proteasy) parazitů se účastní řady klíčových procesů spojených s patogenézí, což z nich činí perspektivní cílové molekuly pro vývoj antiparazitárních léčiv. Aspartátové proteasy tvoří relativně malou, ale funkčně významnou součást proteolytické výbavy parazitů. Mají nezastupitelnou roli v trávicím systému při degradaci krevních proteinů hostitele, které slouží parazitům jako výhradní zdroj potravy. Kromě toho plní i další zásadní úlohy v interakci parazita s hostitelem nebo při vývoji vajíček parazitů. V tomto referátu jsou shrnuty dostupné poznatky o aspartátových proteasách parazitů, jejich regulaci a využití v biomedicině.

Klíčová slova: parazité, proteolytické enzymy, aspartátové proteasy, proteasové inhibitory

Summary

Houštěcká R.: Aspartic proteases and their function in parasites

Parasitic diseases affect hundreds of millions of people around the world and represent a serious health and socioeconomic problem. Proteolytic enzymes (proteases) of parasites are involved in many processes associated with pathogenesis, which makes them promising molecular targets for the development of antiparasitic drugs. Aspartic proteases comprise a relatively small, but functionally significant part of the proteolytic system of parasites. They play a critical role in the digestion of host blood proteins that serve as an ultimate source of nutrients for blood-feeding parasites. Furthermore, they have essential functions in host-parasite interactions or parasite egg development. This review article summarizes current knowledge on aspartic proteases of parasites, their regulation and use in biomedicine.

Keywords: parasites, proteolytic enzymes, aspartic proteases, protease inhibitors

IMOBILIZACE ENZYMŮ A MIKROORGANISMŮ PRO BIOTECHNOLOGICKÉ ÚČELY

Klára Herkommerová, Iva Pichová

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR, v. v. i., Praha; klara.herkommerova@uochb.cas.cz

Úvod

Biokatalyzátory (enzymy či mikroorganismy) jsou v dnešní době nedílnou součástí mnoha biotechnologických procesů. Na rozdíl od chemických katalyzátorů disponují biokatalyzátory celou řadou výhod a napomáhají tak snižovat náklady výrobních procesů. Reakce katalyzované enzymy jsou vysoce specifické, což zaručuje produkci požadované látky a minimalizuje vznik vedlejších produktů. Navíc u těchto typů reakcí není většinou zapotřebí extrémních reakčních podmínek (pH a teploty) a také spotřeba energie bývá nižší¹. Použití biokatalyzátorů v průmyslu je ovšem limitováno jejich stabilitou. Přítomnost organických rozpouštědel nebo použití vysokých teplot během procesu negativně ovlivňuje aktivitu enzymů či životaschopnost produkčních mikroorganismů. Řešením bývá imobilizace těchto systémů.

Dle IUPAC² je imobilizace v biotechnologiích definována jako „technika používaná pro fixaci buněk, organel, enzymů nebo jiných proteinů (např. monoklonálních protilátek) na pevný nosič, do pevné matrice nebo na membránu, za účelem zvýšení jejich stability a možnosti jejich opětovného nebo kontinuálního použití.“ Obecně lze říci, že imobilizace napomáhá ke zvýšení stability, aktivity a selektivity biokatalyzátorů, zvyšuje jejich odolnost vůči potencionálním inhibitorům, umožňuje jejich jednoduchou separaci na konci produkčního procesu a jejich následnou regeneraci pro další použití. Imobilizační techniky a nosiče (materiály pro imobilizaci) se liší v závislosti na typu biotechnologického procesu. V současnosti se imobilizované biokatalyzátory používají např. v potravinářském, papírenském a farmaceutickém průmyslu, při produkci biopaliv, či degradaci xenobiotik v životním prostředí.

V následujících kapitolách jsou popsány základní techniky imobilizace a nejčastěji používané nosiče jak pro imobilizaci mikroorganismů, tak i samotných enzymů. Dále jsou porovnány výhody a omezení imobilizovaných systémů a aplikace volných mikroorganismů či enzymů. V závěrečné kapitole jsou pak uvedeny některé ze zajímavých aplikací využívajících imobilizované biokatalyzátory.

Základní typy nosičů a jejich vlastnosti

Materiál pro imobilizaci biokatalyzátorů musí být levný, inertní, mechanicky, chemicky a biologicky stabilní, schopný regenerace, snadno oddělitelný od produktu / média a vhodný i pro produkci v bioreaktorech. Toxicita materiálu se zkoumá především při imobilizaci biokatalyzátorů používaných v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Pro imobilizaci biokatalyzátorů jsou vhodné nosiče, které^{3,4,5}:

- Mají dostatečně velký povrch (> 100 m²/g), který obsahuje odpovídající množství reakčních skupin pro

interakci s enzymem. Interakce musí být stabilní a nesmí ovlivňovat vlastnosti enzymu. Vhodný nosič zachovává nebo dokonce i zvyšuje aktivitu enzymu a omezuje jeho nespecifickou adsorpci.

- Mají požadovanou velikost pórů umožňující přestup substrátů, živin, kyslíku a metabolitů k imobilizovanému biokatalyzátoru. Díky správné velikosti lze částečně snížit inhibici enzymu produktem či omezit mikrobiální kontaminaci.
- Jsou odolné vůči mikrobiální degradaci.
- Nemají vliv na životaschopnost buněk a jejich mobilitu v rámci nosiče.

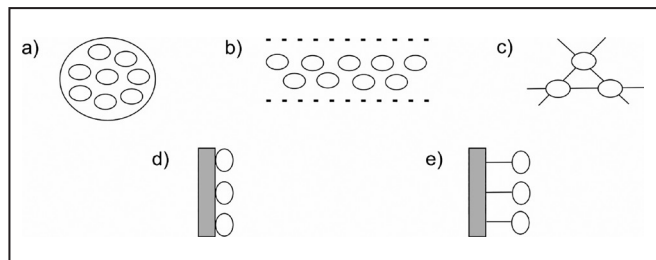
Materiál používaný pro imobilizaci biokatalyzátorů lze rozdělit do třech základních skupin^{5, 6}:

- 1) anorganické nosiče typu silikagel, porézní sklo, kovy nebo jejich oxidy, magnetické částice atd. Tyto nosiče se vyznačují dobrými mechanickými vlastnostmi, chemickou stabilitou a odolností vůči mikrobiální degradaci. Pórovitost a tuhost těchto materiálů je neměnná a není tedy ovlivněna např. změnou pH nebo teploty, což představuje výhodu oproti organickým nosičům. Na druhou stranu kovy se svým neporézním povrchem mají jen omezenou plochu pro vazbu enzymů.
- 2) přírodní organické materiály na bázi proteinů nebo polysacharidů jsou z hlediska ekonomického levnější variantou anorganických nosičů. Z těchto materiálů se snadno vytváří hydrogely, do jejichž polymerní struktury lze imobilizovat jak enzymy, tak i buňky a to pomocí kovalentních, elektrostatických nebo vodíkových vazeb mezi hydrofilními řetězci polymeru a imobilizovaným biokatalyzátorem. Právě snadná tvorba hydrogelů je hlavní výhodou těchto materiálů. Na druhou stranu nejsou příliš chemicky a mechanicky stabilní. Z proteinů se pro imobilizaci využívá zejména albumin, želatina, lepek a fibroin. Zvláště pak imobilizace do fibroinových maticí, které mohou být ve formě vláken, membrán nebo prášku, jsou nenáročné a přinášejí řadu výhod oproti ostatním proteinům. Fibroin je netoxický a obsahuje řadu funkčních skupin (amino, karboxy, phenol) pro navázání enzymů. Větší část přírodních organických materiálů pro imobilizaci ale tvoří polysacharidy. Jsou to jednak polyuronidy (pektiny a alginová kyselina), polymery galaktosy (agar, agarosa, karagenan) nebo polymery glukopyranosy (chitin, chitosan, škrob, celulóza a jejich karboxylové deriváty).
- 3) syntetické organické materiály se vyznačují vyšší chemickou stabilitou a jsou méně náchylné k opotřebení v porovnání s přírodními materiály. Přitom splňují i ostatní požadavky kladené na nosiče určené pro imobilizaci (biologická stabilita, dobrá propustnost atd.). Nejběžnější jsou matrice z polyvinylalkoholu (PVA) nebo polyakrylamidu. Výjimkou nejsou

ale ani nosiče z polyuretanu, polyethylenglykolu (PEG) a polyamidu. Díky mechanické stabilitě lze tyto materiály různě modifikovat a vytvářet tzv. „chytřé“ polymery. Většina z nich jsou N-substituované akrylamidy, které se regenerují např. změnou pH nebo teplot. Své zastoupení v biotechnologiích si našly i vodivé syntetické materiály na bázi polypyrrolu, polyanilinu nebo polyindolu. Enzymy imobilizované do těchto matic se využívají jako biosenzory^{7,8}.

Metody imobilizace

Základní rozdělení imobilizačních technik dle pozice imobilizovaného biokatalyzátoru vůči nosiči a typu jejich interakcí jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1: Metody imobilizace biokatalyzátorů: a) zabudování do gelu polymerního nosiče, b) zabudování do mikrokapsulí z polopropustných membrán, c) imobilizace síťováním (cross-linking), d) nekovalentní navázání na nosič (např. pomocí hydrofobních nebo elektrostatických interakcí), e) kovalentní navázání na nosič. Převzato a upraveno²⁰.

Imobilizace zabudováním

Metoda zabudování do gelu polymerního nosiče (enkapsulace) nebo do mikrokapsulí z polopropustných membrán (Obr. 1a, b) se využívá jak pro imobilizaci buněk, tak i pro samotné enzymy. Důležitým faktorem je zde propustnost matrice, která musí být dostatečná pro přestup živin/substrátu a produktu. Zároveň ale nesmí docházet k uvolňování biokatalyzátoru z dané matrice. Z tohoto pohledu je tato metoda vhodná především pro imobilizaci buněk, i když i zde dochází k určitým problémům spojeným např. se zanášením pórů matrice rostoucími buňkami. U takto imobilizovaných enzymů je hlavní nevýhodou jejich neschopnost katalyzovat vysokomolekulární substráty (neboť ty neprojdou přes póry matrice), a jejich využití je tedy limitované na přeměnu látek s nízkou molekulovou hmotností^{4,9}. V posledních letech se objevují nové metody a nové typy membrán pro imobilizaci enzymů, čímž se zvyšuje atraktivita těchto systémů a možnost jejich častějšího použití v bioreaktorech^{10,11}. U gelových polymerních nosičů, jejichž základem jsou polysacharidy nebo proteiny, je největší překážkou jejich nízká stabilita⁹. V tomto případě se povrch dané matrice pokrývá ještě dalším polymerem, který stabilizuje celý nosič¹². Trend poslední doby však představuje zabudování biokatalyzátorů do organických syntetických polymerů. Jednou z technologií využívající pro imobilizaci biokatalyzátorů polymerní matrice z PVA je LentiKats® systém. Jedná se o metodu, během níž jsou biokatalyzátory imobilizovány do částic z PVA a PEG o průměru 3 – 4 mm a tloušťky 200 – 400 µm. Pro přípravu matrice není zapotřebí

dalších drahých či toxických chemikálií a imobilizace probíhá za laboratorních podmínek. Tvar, velikost a pórovitost těchto částic umožňuje dostatečnou difuzi potřebných látek. Částice se dají jednoduše separovat na konci produkčního procesu a díky dobrým mechanickým vlastnostem a stabilitě PVA, je lze používat opakovaně¹³.

Imobilizace síťováním

Tato imobilizační technika (Obr. 1c) se využívá pro imobilizaci enzymů. Jejím principem je vytvoření kovalentní vazby mezi aminoskupinou enzymu a bi- nebo multifunkčním síťovacím činidlem, např. glutaraldehydem. Výhodou této metody je, že není zapotřebí žádný nosič, na který by byla potřeba enzym kovalentně vázat, což snižuje náklady na daný proces. Při této imobilizaci však může docházet ke konformačním změnám enzymu, a tím i k ovlivnění jeho aktivity^{14,15}.

Imobilizace nekovalentním navázáním na nosič

Fyzikální adsorpce (Obr. 1d) patří mezi ty nejjednodušší, nejméně nákladné a nejčastěji používané metody imobilizace. Jsou založeny na nekovalentních interakcích (van der Waalsovy vazby či hydrofobní a elektrostatické interakce) mezi enzymem a pevným nosičem. Toto navázání jen minimálně ovlivňuje katalytickou funkci enzymu a lze jej snadno přerušit, čímž je možné daný nosič regenerovat a použít ho opakovaně pro navázání nového biokatalyzátoru. Na druhou stranu díky těmto poměrně slabým vazbám může docházet k uvolňování enzymu z nosiče během biotechnologického procesu¹⁶. Co se týče buněk, tak ty mohou v určité fázi svého růstu a za určitých podmínek flokulovat nebo tvořit biofilm, čehož se v biotechnologiích také využívá^{17,18}. Jedná se rovněž o určitý druh imobilizace (pomocí nekovalentních interakcí), byť vzniká přirozeně.

Imobilizace kovalentním navázáním na nosič

Pro imobilizaci buněk není tato metoda příliš vhodná. Pro vytvoření kovalentní vazby mezi buňkami a nosičem (Obr. 1e) je nutné použít síťovací činidlo (glutaraldehyd, karboimidy), což může mít negativní dopad na životaschopnost buněk¹⁹. Naopak pro imobilizaci enzymů se tato technika používá často. Enzym se kovalentně váže na povrch nosiče prostřednictvím postranních aminokyselinových řetězců (histidin, arginin, asparagová kyselina, atd.), přičemž reaktivita závisí na přítomnosti funkčních skupin (-OH, -NH₂, -COOH). Podstatné ovšem je, aby funkční skupiny enzymu, zapojené do vytvoření kovalentní vazby, nebyly esenciální pro jeho aktivitu. Metod pro kovalentní navázání enzymu na nosič existuje více. Většinou dochází k aktivaci povrchu nosiče, např. použitím síťovacího činidla nebo k pozměnění funkční skupiny na povrchu nosiče tak, aby vznikla peptidová vazba mezi nosičem a enzymem. Výhodou takovéto imobilizace enzymů je bezesporu jejich vysoká stabilita a přímý kontakt se substrátem. Rovněž nedochází k uvolňování navázaných molekul enzymů z nosiče během biotechnologického procesu.

Nevýhodou může být částečné omezení mobility enzymů a tím snížení jejich aktivity a nemožnost daný nosič regenerovat. V porovnání s fyzikální adsorpcí je tento proces časově náročnější, je při něm zapotřebí více reagentů a množství navázaného enzymu může být nižší^{15,20}.

O vhodnosti imobilizační techniky pro daný systém a biokatalyzátor rozhoduje rovněž i provedení samotné imobilizace, které může být buď nahodilé, nebo orientované. V prvním případě dochází k imobilizaci proteinu pomocí aminokyselinových zbytků exponovaných na jeho povrchu, např. prostřednictvím lysinů. Tento způsob imobilizace může vést k ovlivnění konformace proteinu a ke změně jeho aktivity. Při orientované imobilizaci, která se používá např. při imobilizaci protilátek, dochází ke specifické vazbě mezi modifikovanou maticí a protilátkami, které obsahují např. biotin, His kotvu, GST kotvu a interagují s vazebnou skupinou na matici^{21,22}.

Porovnání imobilizovaných a neimobilizovaných systémů v biotechnologickém procesu

Použití biokatalyzátorů v biotechnologiích je obecně nákladné. Kromě různých technik genového inženýrství, které mají za cíl vylepšit vlastnosti biokatalyzátorů (např. aktivitu, specifitu)²³, je imobilizace klíčovým nástrojem především pro dosažení jejich vyšší stability²⁴ a možnosti jejich opětovného použití²⁵. Díky těmto metodám a jejich kombinacím lze zajistit efektivní a ekonomicky výhodné aplikace biokatalyzátorů v průmyslu.

Vzhledem k tomu, že samotná imobilizace zvyšuje náklady na daný proces, musí být tato technologie

navržena tak, aby následné použití imobilizovaných systémů bylo ve výsledku levnější a/nebo účinnější, než použití neimobilizovaných systémů. Při návrhu metod pro imobilizaci enzymů se hodnotí dva základní parametry: 1) vliv imobilizace na stabilitu enzymu a jeho opětovné použití a 2) katalytická funkce enzymů, tedy schopnost přeměnit substrát na produkt. Důraz se klade zejména na to, aby zvolená technika, respektive materiál použitý pro imobilizaci enzymů neměnil (nebo jen v malé míře) jejich požadované vlastnosti (stabilitu, kinetiku atd.). Podobné požadavky rovněž platí i pro imobilizaci buněk. Ty lze oproti imobilizovaným enzymům snadněji separovat, lépe purifikovat a umožňují kontinuální produkci požadovaného enzymu pro daný proces¹⁴.

Účinnost biotechnologického procesu za použití biokatalyzátoru se vyjadřuje tzv. číslem přeměny (množství získaného produktu vztaheného na množství použitého biokatalyzátoru). Stanovením tohoto parametru u neimobilizovaných a imobilizovaných systémů a jeho porovnáním lze také zjistit, zda se pro daný proces vyplatí biokatalyzátor imobilizovat či nikoliv. Např. pokud se jedná o produkt s vysokou přidanou hodnotou a/nebo samotný neimobilizovaný systém disponuje vyšším číslem přeměny, není imobilizace biokatalyzátoru potřeba. Ta se doporučuje v případech, pokud číslo přeměny u „volného“ biokatalyzátoru je spíše nižší než vyšší²⁶. Vědeckých prací, které testují a porovnávají neimobilizované a imobilizované systémy pro nejrůznější biotechnologické procesy je celá řada^{27,28,29}. Obecné porovnání jednotlivých parametrů biotechnologického procesu za použití neimobilizovaného nebo imobilizovaného systému je pak shrnuto v Tab. I.

Tab. I: Porovnání imobilizovaného a neimobilizovaného biokatalytického procesu. Převzato a upraveno dle¹⁴.

Porovnávaný parametr biotechnologického procesu	Biokatalytický proces	
	neimobilizovaný	imobilizovaný
Náklady na provedení	žádné dodatečné náklady	náklady na imobilizační technologii
Náklady x účinnost	častá ztráta biokatalyzátoru v průběhu procesu	biokatalyzátor lze opětovně použít
Přístup potřebných látek (živin, substrátů)	limitován typem bioreaktoru	limitován typem bioreaktoru a vlastnostmi nosiče
Následné zpracování	obtížné oddělení biokatalyzátoru/produktu	snadné oddělení biokatalyzátoru/produktu
Kontaminace	riziko kontaminace	minimální
Nárůst biomasy (pro buňky)	vysoká koncentrace buněk za krátký časový úsek	konstantní v průběhu procesu
Mobilita (pro buňky)	vysoká	limitovaná vlastnostmi nosiče
Regenerace a opětovné použití	minimální	efektivní
Stabilita biokatalyzátoru	nízká	vysoká/zvýšená
Průmyslová aplikace	nutná optimalizace pro daný proces	nutná optimalizace také imobilizační technologie pro daný proces

Náklady na biotechnologický proces využívající imobilizované biokatalyzátory se liší v závislosti na typu produktu a jeho aplikaci. Např. ve farmaceutickém průmyslu, kde se používají biokatalyzátory s vysokou specifitou, se náklady na 1 kg biokatalyzátoru odhadují na 1000 – 2000 €, přičemž vznikne pouze okolo 10 kg požadovaného produktu. Oproti tomu produkce běžných chemikálií (ethanol, aceton) je okolo 10 000 kg/kg imobilizované biokatalyzátoru a náklady se pohybují do 500 €²⁶.

Příklady průmyslového využití imobilizovaných biokatalyzátorů

Mezi hlavní odvětví využívající imobilizované biokatalyzátory patří především potravinářský, farmaceutický, papírenský a textilní průmysl. Mimoto se tyto katalyzátory využívají při organických syntézách (biotransformace), pro produkci biopaliv, v procesech čištění odpadních vod a dekontaminace zeminy (biosorpce) nebo mohou sloužit jako biosenzory^{1,5,14,30,31,32}. V následujících odstavcích je uvedeno několik zajímavých příkladů z posledních let testující nové materiály nebo postupy pro imobilizaci biokatalyzátorů či nové možnosti jejich využití.

Imobilizovaná glukosaoxidasa se často využívá jako biosenzor pro detekci hladiny/množství glukosy v biologickém materiálu či potravinových vzorcích. Imobilizaci glukosaoxidasy na povrch elektrod pomocí uhlíkových nanotrubic se zvýšila katalytická účinnost tohoto enzymu, jeho stabilita vůči inhibitorům a možnost jeho opětovného použití³³.

Enzym pullulanasa se používá v potravinářském průmyslu pro štěpení škrobu. Jeho imobilizaci na povrch hybridních magnetických nanočástic (Fe_3O_4 -karagenan) pomocí elektrostatických interakcí se zvýšila jeho stabilita a tento imobilizovaný systém bylo možné použít v deseti po sobě jdoucích procesech, aniž by aktivita imobilizovaného enzymu klesla pod 60 %. Navíc takto imobilizovaný enzym vykazoval vyšší aktivitu při nižším pH a nižší ztrátu aktivity při vyšší teplotě v porovnání s enzymem neimobilizovaným³⁴.

Bioprodukce vodíku pomocí imobilizovaných bakteriálních buněk je jedna z možností jak podpořit rozvoj alternativních zdrojů energie a omezit tak používání fosilních paliv. Průmyslová produkce tohoto plynu není až tak účinná (vzhledem k nákladům). Zatímco použitím bakterií rodu *Clostridium*, *Enterobacter* nebo

směsných kultur lze dosáhnout vysokých výtěžků. Pro imobilizaci buněk lze využít nejrůznější materiál (agar, polyuretanová pěna, lignocelulosa či pórovité sklo), který zabraňuje uvolňování buněk během procesu, chrání je před výkyvy pH a teplot či může dokonce podpořit mikrobiální aktivitu během kontinuálních procesů³⁵.

Mykotoxin patulin, který je produkován houbami rodu *Penicillium* a *Aspergillus* se může díky nahnílému ovoci dostat do ovocných šťáv nebo dětské výživy. Pro degradaci tohoto toxinu v jablečném džusu byla testována imobilizovaná (pomocí uhličitanu vápenatého) prasečí pankreatická lipasa. Míra degradace tohoto toxinu byla více než 70 %. Obsah ostatních živin v testovaném vzorku přitom nebyl nějak významně ovlivněn³⁶.

Pro vysoce účinnou analýzu proteomu pomocí hmotnostní spektrometrie byla testována imobilizace trypsinu do termosenzitivního polymeru (N-akrylol glycina-mid a undekanal). Výhodou imobilizace je především ochrana samotné proteasy před hydrolýzou a možnost jejího opětovného použití. Určitou nevýhodou ovšem může představovat mechanická bariéra (samotný nosič) mezi proteasou a testovaným vzorkem (substrátem). Tento problém byl vyřešen použitím termosenzitivního materiálu a změnou jeho skupenství při 37 °C (vznik rozpustné formy, která umožní reakci enzymu se substrátem). Rozdíl oproti neimobilizovanému systému byl především v rychlosti štěpení vzorku – 1 min x 12 h. V dalším případě bylo za použití takto imobilizovaného trypsinu dosaženo i lepší identifikace analyzovaných proteinů³⁷.

Závěr

Imobilizace biokatalyzátorů je nedílnou součástí mnoha biotechnologických procesů. Správně zvolený katalyzátor a stejně tak i vhodně zvolená imobilizační technologie mohou významně snížit náklady na výrobu daného produktu a/nebo dokonce navýšit jeho produkci. V souvislosti s tím, jak jsou neustále vyvíjeny nové materiály a postupy imobilizace, je zřejmé, že biokatalyzátory a biotechnologie budou i nadále zaujímat významné místo v nejrůznějších odvětvích průmyslu.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem NPU LO 1302 od MŠMT.

Literatura

1. Min K and Yoo YJ: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19(4), 553 (2014).
2. Mcnaught AD and Wilkinson A: IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"), Blackwell Scientific Publications (1997).
3. Mateo C, Palomo JM, et al.: *Enzyme Microb. Technol.* 40(6), 1451 (2007).
4. Cantone S, Ferrario V, et al.: *Chem. Soc. Rev.* 42(15), 6262 (2013).
5. Stolarzewicz E, Białecka-Florjańczyk E, et al.: *Chem. Biochem. Eng. Q.* 25(1), 135 (2011).
6. Zucca P and Sanjust E: *Molecules* 19(9), 14139 (2014).
7. Arslan A, Kiralp S, et al.: *Int. J. Biol. Macromol.* 35 (3-4), 163 (2005).
8. Suryani R: *Enz. Eng.* 05(1), 140 (2016).
9. Verbelen PJ, De Schutter DP, et al.: *Biotechnol. Lett.* 28(19), 1515 (2006).
10. Guo Y, Zhu X, et al.: *Molecules* 23(1), (2018).
11. Kumari A and Datta S: *J. Membr. Sci.* 539(2017), 43 (2017).
12. Gutarra MLE, Miranda LSM, et al. (2016). *Organic Synthesis Using Biocatalysis*, edited by J. D. Stewart, pp. 99: Academic Press.
13. Krasnan V, Stloukal R, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(6), 2535 (2016).

Literatura (pokračování)

14. Es I, Vieira JD, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(5), 2065 (2015).
15. Nguyen HH and Kim M: *Appl. Sci. Conver. Technol.* 26(6), 157 (2017).
16. Mohamad NR, Marzuki NHC, et al.: *Biotechnol. Bio-technol. Equip.* 29(2), 205 (2015).
17. Burgstaller D, Krepper W, et al.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93(7), 1881 (2018).
18. Muffler K, Lakatos M, et al. (2014). *Productive Bio-films*, edited by K. Muffler & R. Ulber, pp. 123. Cham: Springer International Publishing.
19. Junter GA and Jouenne T: *Biotechnol. Adv.* 22(8), 633 (2004).
20. Sirisha VL, Jain A, et al. (2016). *Advances in Food and Nutrition Research*, edited by S.-K. Kim & F. Toldrá, pp. 179: Academic Press.
21. Wilchek M and Miron T: *J. Biochem. Biophys. Methods* 55(1), 67 (2003).
22. Seuryneck-Servoss SL, Baird CL, et al.: *Front. Biosci.* 12(3956 (2007).
23. Bulter T, Alcalde M, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2), 987 (2003).
24. Sun J, Xu B, et al.: *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2017(1), 10 (2017).
25. Herkommerova K, Zemancikova J, et al.: *Biotechnol. Lett.* 40(2), 405 (2018).
26. Polakovič M, Švitel J, et al.: *Biotechnol. Lett.* 39(5), 667 (2017).
27. Blevé G, Lezzi C, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79(5), 731 (2008).
28. Yuvadetkun P, Reungsang A, et al.: *Renewable Energy* 115(2018), 634 (2018).
29. Rodríguez-Alonso M, Rodríguez-Vico F, et al.: *Catalysts* 7(6), 192 (2017).
30. Franssen MCR, Steunenberg P, et al.: *Chem. Soc. Rev.* 42(15), 6491 (2013).
31. Nisha S, Karthick A, et al.: *Chem. Sci. Rev. Lett.* 1(3), 148 (2012).
32. Partovinia A and Rasekh B: *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 48(1), 1 (2018).
33. Husain Q: *Biointerface Res. Appl. Chem.* 8(1), 3060 (2018).
34. Long J, Wu Z, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 63(13), 3534 (2015).
35. Sekoai PT, Awosusi AA, et al.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 38(2), 157 (2018).
36. Tang H, Peng X, et al.: *Food Control* 88(2018), 69 (2018).
37. Zhang Q, Zheng F, et al.: *Chin. J. Anal. Chem.* 44(11), 1692 (2016).

Souhrn

Herkommerová K., Pichová I.: Imobilizace enzymů a mikroorganismů pro biotechnologické účely

Imobilizace enzymů a mikroorganismů se stala nedílnou součástí mnoha biotechnologických procesů. V dnešní době je pro imobilizaci k dispozici celá řada anorganických, organických i syntetických materiálů a způsobů imobilizace, pomocí kterých je možné zvýšit stabilitu biokatalyzátorů, zajistit možnost jejich opětovného použití, a tím snížit náklady výrobního procesu. Zda je pro daný proces vhodné biokatalyzátor imobilizovat či nikoliv, závisí na řadě parametrů, mimo jiné na typu biokatalyzátoru, jeho vlastnostech a na aplikaci výsledného produktu.

Klíčová slova: biokatalyzátory, metody imobilizace, nosiče, stabilita, biotechnologie

Summary

Herkommerová K., Pichová I.: Immobilization of enzymes and microorganisms for biotechnological applications

Immobilization of enzymes and microorganisms has become an important part of many biotechnological processes. Different types of inorganic, organic, and synthetic materials and immobilization methods are used for increasing the biocatalyst stability, reusability and reduction of operating costs. Suitability of biocatalyst immobilization in the process depends on many parameters, such as biocatalyst properties, type of product and its application.

Keywords: biocatalysts, immobilization techniques, carriers, stability, biotechnology

OBSAH

Úvodem	69
Nobelova cena za chemii pro rok 2018	70
Pytelková J.: Proteasy jako alergen	72
Petrová A.: Standard „Bez GMO“	77
Pěkníková J., Margaryan H., Kubátová A., Dostálová P., Hylmarová S., Bohuslavová R., Pavlínková G: Využití protilátek proti vybraným proteinům testes a spermii k testování jejich kvality a patologie v prostředí <i>diabetes mellitus</i>	80
Kašparová, P.: Složení, význam a možnosti kvantifikace extracelulární matrix biofilmu podmíněně patogenních mikroorganismů	84
Houštická R.: Aspartátové proteasy a jejich funkce u parazitů	89
Herkommerová K., Pichová I.: Imobilizace enzymů a mikroorganismů pro biotechnologické účely	95

CONTENT

Editorial	69
The Nobel Prize in Chemistry 2018	70
Pytelková J.: Proteases as allergens	72
Petrová A.: „Non-GMO“ standard	77
Pěkníková J., Margaryan H., Kubátová A., Dostálová P., Hylmarová S., Bohuslavová R., Pavlínková G: Use of antibodies against selected testes proteins and sperm to test their quality and pathology in <i>Diabetes mellitus</i>	80
Kašparová P.: Composition, significance and options for quantification of extracellular matrix in biofilm of opportunistic pathogens	84
Houštická R.: Aspartic proteases and their function in parasites	89
Herkommerová K., Pichová I.: Immobilization of enzymes and microorganisms for biotechnological applications	95

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 Skácel, 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).