

Bio

Ročník 29 • Číslo 2/2019

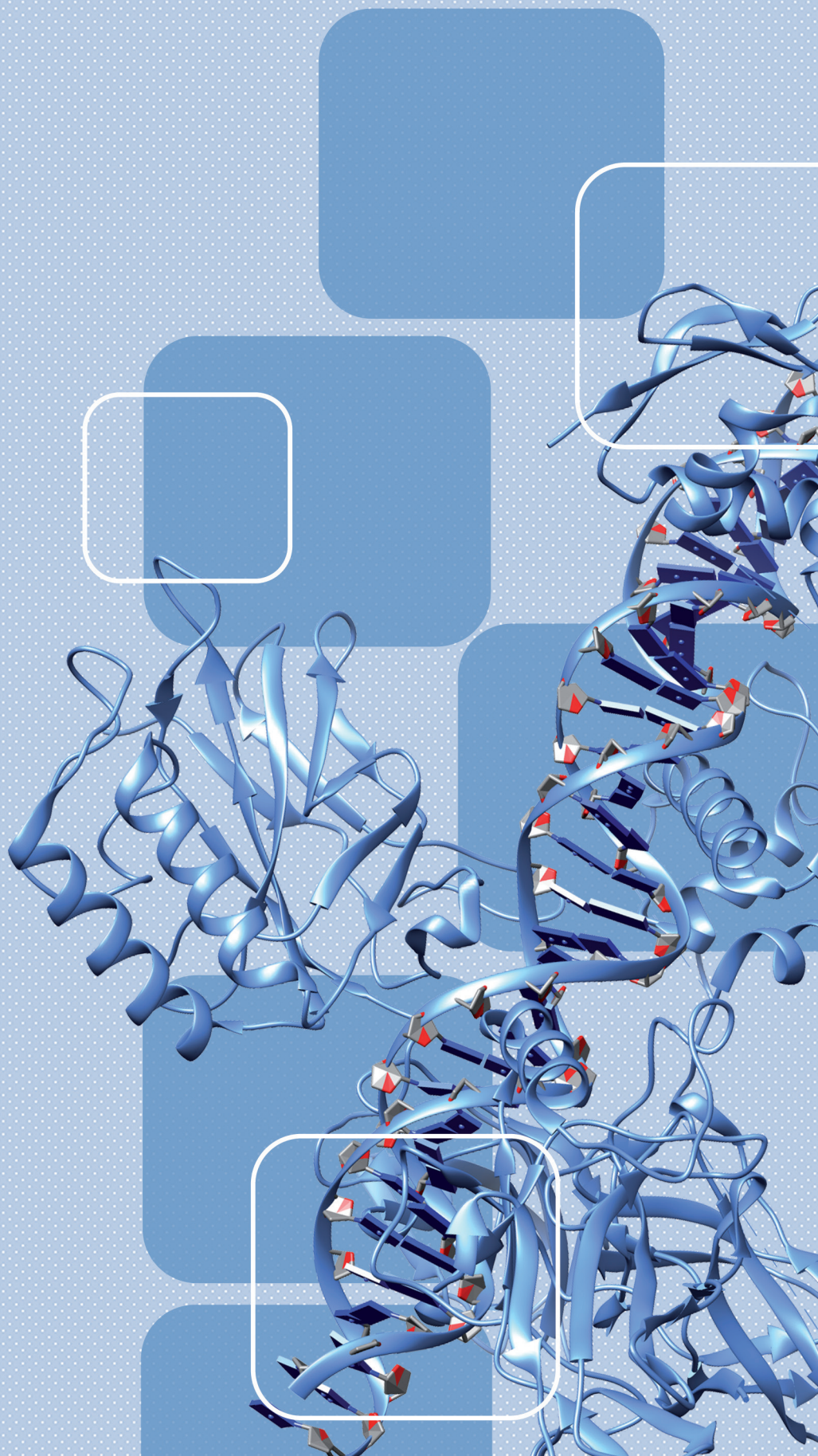
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

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

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

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

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

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

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

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

For more information contacts the editorial board or directly:

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

ÚVODEM

Vážení přátelé,

jak jsme Vás již informovali v minulém čísle Bioprospectu, v plném proudu jsou přípravy na další mezinárodní biotechnologické symposium Biotech2020, které připravujeme v těsné spolupráci s VŠCHT a švýcarskými partnery. Symposium se uskuteční v rekonstruované budově B VŠCHT od 17. do 20. 6. 2020. V nejbližší době se nejdůležitější informace objeví na webových stránkách www.biotech2020.cz. Připravujeme též informaci o aktuálním průběhu přípravy symposia na Facebooku a Instagramu s možností prokliku na webové stránky symposia, kde zájemci získají všechny potřebné informace. Budeme velice rádi, když se připravovaného symposia zúčastníte a zejména když budete o jeho konání informovat Vaše partnery a známé, především v zahraničí. Uvítáme rovněž, když při Vašich výjezdech do zahraničí, zejména na různé konference, vezmete s sebou propagační letáky, které Vám rádi poskytneme (informace na adrese: info@biotech2020.cz). Všichni, kteří se předchozích symposií zúčastnili, mohou potvrdit jejich vysokou odbornou úroveň, perfektní prostředí, nadstandartní stravování sponzorované vybranými potravinářskými podniky, skvělý sociální program, možnost publikace ve vybraných periodikách, příležitost navštívit pamětihodnosti Prahy a jejího okolí a zejména nízký registrační poplatek ve srovnání s jinými podobnými zahraničními akcemi.

Jako vždy v našich úvodních si i tentokrát připomeneme nějaké výročí. V r. 2008 National Institute of Health (NIH) zahájil Human Microbiome Project (HMP) ve snaze charakterizovat jeho úlohu ve zdraví a nemoci. První část projektu byla uzavřena v r. 2012, druhá část pak po 10 letech a publikována 29. 5. 2019. Díky rychlému pokroku v sekvenčních technologiích se podařilo získat množství údajů o mikrobiální diversitě v různých částech lidského těla u zdravých, ale

i nemocných lidí. Projekt se zaměřil na záněty střev, počátek diabetu 2. typu a předčasné porody. Tyto 3 oblasti patří mezi priority výzkumu NIH pro příštích 10 let. Snahou je pokrok v oblasti diagnózy, prevence a léčení zmíněných chorob. Uvedené informace byly publikovány v časopisech Nature a Nature Medicine. Pro jednoduchost doporučuji článek „Finding diversity in the microbiome“ (Nature medicine 25, 863, 2019), kde lze nalézt i odkazy na zmíněné NIH zprávy. Mikrobiom je termín velmi široký a týká se nejen člověka, ale pocho-pitelně i ostatních organismů, které mají své mikrobiomy. Obecně se dá říci, že lidský mikrobiom je společenství bakterií, plísňů a virů, které osídlily jednotlivé části lidského těla (střeva, kůže, dásně, zuby, genitálie, jednotlivé orgány, atd.). Uvádí se, že lidské tělo osídluje asi 100 trilionů bakterií a dalších mikroorganismů. Někdy se mikrobiom také definuje jako souhrn genomů bakterií a dalších mikroorganismů, které osídlily určitého jedince nebo jeho část.

Možnosti „genetické editace“ lidské DNA jsou sice lákavé, ale evidentně velice nebezpečné, neboť nikdy nelze zaručit, že odstraněním cílené vady nevzniknou zároveň jiné neočekávané vady. Tyto obavy potvrdila snaha čínského vědce Che Tien-kchuej-e, který se pokusil dodat několika dětem imunitu vůči viru HIV, ale současně jim vložil mutaci predikující kratší život. Většina vědců podobné zákroky proto striktně odmítá (např. Technický týdeník 11, 2019, str. 12).

Přejeme Vám příjemné prožití léta, krásné dovolené, odpočinek a získání nových sil do další práce. Těšíme s Vámi na shledání nad příštím číslem našeho Bioprospectu.

Srdečně Vás zdraví
Jan Káš a Petra Lipová

ŽIVOTNÍ JUBILEUM PROFESORA JANA KÁŠE

V posledních dnech května tohoto roku se prof. Ing. Jan Káš, DrCs. dožil 85 let. Hned na tomto místě dodávám, že se jich dožil v obdivuhodné svě-žesti a ve velice aktivním přístupu k životu. Při této příležitosti jsem vyhledala soupis jeho minulých akti-vit a funkcí a současně i ocenění a vyznamenání, která za jejich plnění obdržel. Znovu mě udivilo, co všech-no dokázal zvládnout, ale zejména mě překvapilo, že pokud je mi známo, ve všech těchto funkcích dosud aktivně pokračuje. Na tomto místě bych se ale chtěla zaměřit na moje vlastní vzpomínky, protože s pro. Ká-šem jsme kolegové téměř 60 let.

Prof Káš (tehdy inženýr) přišel na Katedru biolo-gických věd (dnes Ústav biochemie a mikrobiologie) VŠCHT po čtyřleté praxi v potravinářském průmyslu na kandidaturu (dnes postgraduální doktorské stu-dium). Jak významná pro jeho práci byla jeho praxe v průmyslu, již prošel, se ukázalo v příštích letech. Měl velmi dobré kontakty s pracovníky z praxe a uměl cit-livě vybírat témata spolupráce pro jednotlivá odvětví potravinářského průmyslu.

Přesto, že první léta na VŠCHT byl z dnešního po-hledu vlastně student, byl od počátku uznáván jako plnohodnotný pracovník katedry pro obor Biochemie. Dlužno podotknout, že v té době kromě kolegy Káše v oboru biochemie byli jen 3 další pracovníci, a to ve-doucí doc. (později profesor) Šícho, jedna asistentka (já) a jedna laborantka. Kolega Káš i já jsme prošli tvr-dou přípravou prof. Šícha na plnohodnotné přednáše-jící předmětu Biochemie. Zcela na starosti jsme také měli tehdy dvousemestrální výuku studentů v labora-tořích biochemie, které jsme ovšem museli od základů vybudovat. Už tehdy se ukázaly přednosti mého kolegy v praxi.

Ačkoliv jsme spolu nikdy nepracovali na společném vědeckém projektu, naše pedagogické aktivity byly veli-ce propojené. K biochemickým laboratořím, které pod-le naší koncepce, i když zmodernizované a doplněné, probíhají dosud, přibýly další teoretické i laboratorní předměty. Prof. Káš, poté co prošel dalšími funkcemi na ústavu, se stal proděkanem pro vědu na Fakul-tě potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT a později i vedoucím Ústavu biochemie a mikrobiolo-gie. Ještě před tím však navrhl a zorganizoval systém vědeckých skupin na tomto ústavu, z nichž každá měla svůj program, za nějž odpovídal vedoucí skupiny. Ten-to organizační krok se ukázal jako velice úspěšný, vedl

k zintenzivnění vědecké práce ústavu a efektivně fun-guje dodnes.

Toto období (1994 – 2000) bylo pro Ústav biochemie a mikrobiologie velice šťastné a plodné; prof. Káš využil všech svých kontaktů se zahraničními spolupracovníky pro získání řady velice významných mezinárodních grantů, zejména grantů TEMPUS, v nichž byly zapojeny univer-sity z Německa, Anglie, Francie, Dánska a Španělska. Ty byly důležité nejen svým vědeckým přínosem, ale i po finanční stránce, neboť umožnily vybavit ústav fi-nančně nákladnými moderními přístroji, ale snad důle-žitější byl i respekt, který si prof. Káš a s ním celý ústav získal na mezinárodním poli a který mu vynesl řadu dal-ších příležitostí a později i uznání a ocenění.

Toto byla vzpomínka z mého pohledu na doby minu-lé. Co ovšem je obzvláště obdivuhodné z mého dneš-ního pohledu je to, že je neustále aktivním členem ústavu a má na starosti (a řádně plní) některé funkce, např. předseda oborové rady Biochemie na VŠCHT. Z toho plyne povinnost sledovat postgraduální studen-ty Biochemie od přijímacích pohovorů až po jejich ob-hajoby disertační práce. Také obdivuji jeho schopnost sledovat řadu směrů ve vývoji jeho vědeckého oboru a informovat o něm i své mladší kolegy.

Profesor Káš byl také hlavním iniciátorem vzniku Biotechnologické společnosti. On a jeho několik nad-šených spolupracovníků dovedl v krátké době tuto společnost mezi velice respektované společnosti v Ev-ropské federaci biotechnologických společností. Sou-časně měl zásadní podíl na zahájení existence časo-pisu Bioprojekt. Za jeden z nejvýznamnějších počínů v této oblasti já považuji jeho myšlenku společných biotechnologických symposií ve spolupráci se švýcar-skou firmou Lonza, která se realizovala formou Česko-švýcarských biotechnologických symposií. Těchto sym-posií se konalo již 7 a nyní se připravuje další, již osmé Česko-švýcarské symposium BioTech 2020. Nedovedu si představit, jak může někdo jeho věku takovou zátěž úspěšně zvládnout. Ale on to dokazuje. A to svědčí ne-jen o síle a energii, ale i o význačné schopnosti vybrat aktuální témata, ale i nadšené spolupracovníky.

Do dalších let mu tedy přeji, aby byl zdravý a ještě dlouho si, i pro náš prospěch, uchoval svou sílu a nad-šení.

Blanka Králová

3D BUNĚČNÉ SFÉROIDY JAKO MODEL Y SOLIDNÍCH NÁDORŮ

Lenka Barchánková, Alžbeta Magdolenová, Miroslav Hájek

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.; lenka.pohlova@uochb.cas.cz

Úvod

Nejjednodušší modely nádorového onemocnění představují buněčné linie odvozené z lidských a zvířecích nádorů kultivované jako monovrstvy nebo suspenze v mediu. Tyto tzv. 2D kultury reprezentují finančně dostupný a experimentálně dobře zavedený model. 2D uspořádání má však i řadu nevýhod – buňky adhe-rují k povrchu kultivačního plastiku a jejich vzájemné kontakty jsou značně omezeny, dále chybí přítomnost metabolických gradientů a interakcí mezi buňkami a extracelulární matrix (ECM). Potřeba fyziologicky relevantnějšího biologického modelu jako mezičlátku mezi 2D kulturami a modelovými zvířecími organismy je proto stále vyšší, a to zejména z důvodu velmi malé úspěšnosti potenciálních protinádorových léčiv v průběhu preklinických a klinických testů, která je zapříčiněna především nedostatečnou klinickou účinností a nepřijatelnou toxicitou¹.

3D buněčné sféroidy představují modelový systém, který vykazuje vlastnosti bližší reálné situaci *in vivo*. V tomto uspořádání se v rámci sféroidu tvoří gradienty živin, kyslíku či odpadních metabolitů a zároveň je možné uskutečnit kokultivaci různých buněčných typů nebo zahrnout interakce s ECM. Přirozenými interakcemi pak buňky získávají morfologické a jiné buněčné charakteristiky podobné těm v solidních nádorech *in vivo*². To činí trojrozměrné buněčné kultury více prediktivní, což při vývoji nových léčiv může snižovat riziko neúspěchu v klinických studiích a v konečném důsledku i vyšší náklady s vývojem spojených.

Způsoby přípravy sféroidů

V současné době je pro studium nádorů *in vitro* využíváno několik typů 3D modelových systémů, které se od sebe liší především zdrojem buněk, kultivačními postupy a aplikacemi. Pro všechny platí, že se kultivují za podmínek, které neumožňují adhezi ke kultivačnímu plastiku. Organotypické multicelulární sféroidy a organoidy odvozené z nádorů se připravují fragmentací a jemnou mechanickou disociací nádorové tkáně³. Tumorsféry, používané pro studium nádorových kmenových buněk, mohou být připraveny z nádorové tkáně nebo některých buněčných linií⁴. Kultivují se v mediu bez séra obohaceném o specifické růstové faktory. Nejběžnějším typem 3D modelů jsou multicelulární nádorové sféroidy. Zdrojem buněk pro jejich přípravu jsou buněčné linie běžně se vyskytující ve výzkumných laboratořích³. Proto bude následující text zaměřen na přípravu a využití multicelulárních nádorových sféroidů.

S ohledem na následné využití je možné vybrat z řady technik, kterými lze připravit více či méně sofistikova-

né 3D sféroidy od jednodušších uspořádání v podobě spontánních agregátů jedné buněčné linie po pokročilejší modely, které zahrnují přítomnost více buněčných typů (endoteliální buňky, fibroblasty, buňky imunitního systému) nebo extracelulární matrix či jiná buněčná lešení^{1, 4–6}.

I. Metody nevyužívající buněčné lešení

Důležitým parametrem při kultivaci sféroidů tímto způsobem je výběr vhodné buněčné linie, která je schopna tvořit kompaktní sféroidy⁷.

Buňky jsou kultivovány v prostředí s omezenou možností adherovat k povrchu, čímž jsou upřednostněny mezibuněčné interakce a dochází k přirozené tvorbě agregátů. Toho lze docílit kultivací sféroidů ve visící kapce media nebo v povrchově upravených kultivačních nádobách.

Technika visící kapky využívá k tvorbě sféroidů povrchového napětí kultivačního media a gravitace⁸. Kapka buněčné suspenze v mediu se nanese na vnitřní stranu víčka kultivační misky a po jeho převrácení se na dně kapky vytváří shluk buněk – sféroid. Výhodou této metody je vysoká reprodukovatelnost a uniformita velikosti buněčných agregátů, kterou lze ovlivnit počtem vysazených buněk⁹. Metoda je však z hlediska následné manipulace (výměna media, ovlivnění testovanými sloučeninami) velmi nepraktická. Náročnost následné manipulace lze částečně vyřešit použitím komerčních destiček (hanging drop plates). Metodu visící kapky lze také propojit s technikou míchání¹⁰, která umožňuje kultivaci ve velkých objemech a snadnou výměnu media¹¹, nezajišťuje však uniformní velikost sféroidů při tvorbě *de novo*.

Povrchově upravený kultivační plastik lze připravit v laboratoři potažením např. 1,5 % agarosou nebo 0,5 % poly-2-hydroxyethyl methakrylátem (poly-HEMA)¹² a nebo lze použít komerční tzv. ultra low attachment (ULA) plast, jehož povrch (nejčastěji kónický) je potažen blíže nespecifikovaným kovalentně vázaným hydrogelem s neutrálním nábojem. Touto metodou lze jednoduchým způsobem docílit sféroidů o stejné velikosti, přičemž v každé jamce je přítomen jeden sféroid¹³. Nejčastěji používaný destičkový formát (6, 24, 96, 384 j.) zajišťuje kompatibilitu s celou řadou analytických přístrojů.

II. Metody využívající buněčné lešení

Použitím buněčného lešení (tzv. scaffold) se v 3D kultivačních technikách výrazně rozšiřují možnosti dalšího výzkumu. Tímto způsobem lze v závislosti na typu scaffoldu simulovat komunikaci mezi buňkami a extracelulární matrix (ECM) nebo podporovat diferenciaci, růst

a migraci buněk, tedy být opět o něco blíže reálnému prostředí nádoru.

3D scaffoldy mohou být vyrobeny z mnoha přírodních a syntetických materiálů. Přírodní scaffoldy jsou založeny na jednotlivých komponentách ECM jako je kolagen, fibrin, kyselina hyaluronová, laminin nebo jiných přírodních materiálech zahrnujících želatinu, hedvábi nebo alginát¹⁴. Tyto materiály lze mezi sebou kombinovat¹⁵ nebo je možné použít izolovanou ECM z tkáně, která obsahuje přirozené zastoupení jednotlivých komponent. Jedna z nejčastěji používaných a komerčně dostupných se získává izolací z Engelbreth-Holm-Swarm myšního sarkomu a je známa pod názvem Matrigel® či Cultrex®. Přírodní scaffoldy obsahují adhezní místa pro buňky, jsou biokompatibilní a biodegradovatelné. Biodegradovatelnost může být však pro účely 3D kultivací nepříznivá vlastnost z důvodu ovlivnění buněčné aktivity¹⁴. Při kultivaci sféroidů v přírodních materiálech nelze zajistit jejich uniformní velikost ani rovnoměrné rozmístění. To lze vyřešit použitím syntetických materiálů, jako jsou polymery, titan, bioaktivní sklo nebo peptidy. Tyto materiály mají definované složení a jsou mechanicky odolnější. Je možné navrhnout a získat strukturu přesně určené velikosti a tvaru pórů, čímž lze docílit stejné velikosti a rovnoměrného rozmístění sféroidů, což zajišťuje větší reprodukovatelnost. Jelikož je syntetický povrch vůči buňkám inertní¹⁴ a nejsou přítomny adhezní místa pro buňky, neprobíhá signalizace mezi buňkou a prostředím. Kombinací syntetických a přírodních scaffoldů, například potažením syntetického materiálu přírodním polymerem, lze docílit systému s přesně definovanými podmínkami pro tvorbu sféroidu a následné aplikace¹⁶.

Klíčové charakteristiky 3D buněčných sféroidů

3D buněčné sféroidy vykazují řadu charakteristik přítomných v prostředí nádoru *in vivo*, což zahrnuje buněčnou heterogenitu, vnitřní strukturu, mezibuněčné interakce, přirozenou morfologii, komunikaci buněk s extracelulární matrix (ECM), změny v genové expresi

a další, přičemž všechny tyto funkce mezi sebou souvisí a vzájemně se ovlivňují¹.

Stejně jako v solidních nádorech je vnitřní struktura sféroidu tvořena vrstvami buněk s různými fenotypy. Na periferii sféroidu se vyskytují rychle proliferující buňky (tzv. proliferační zóna). Čím jsou buňky více ve středu sféroidu, tím mají horší přístup k živinám a kyslíku a hůře se zbavují odpadních metabolitů. Uvnitř dostatečně velkého sféroidu (200 – 500 μm) se tvoří další dvě populace buněk – klidová zóna a nekrotické jádro⁸ (Obr. 1). Z této vnitřní struktury vyplývají další vlastnosti, jimiž se 3D sféroidy odlišují od buněk kultivovaných v monovrstvách a zároveň jsou více podobné solidním nádorům.

V hypoxickém středu se uplatňuje tzv. Warburgův efekt, kdy nádorové buňky produkují energii anaerobní glykolýzou a přeměňují pyruvát na laktát. Hromadění laktátu okyseluje vnitřní prostředí sféroidu (pH 6,5 – 7,2)¹⁷. Hypoxické prostředí a nižší pH navíc podporuje expresi hypoxií indukovaných faktorů (zejména HIF-1 α), které podporují proliferaci a přežívání nádorových buněk¹⁸.

Růstová kinetika sféroidů je velice podobná růstu solidních nádorů v avaskulární fázi. V počátečních fázích sféroid zvětšuje svůj objem exponenciálně, přibližně do velikosti 200 až 500 μm . Následně rychlost růstu začne klesat až do konstantního objemu sféroidu. Tento růstový profil je mimo jiné velmi důležitý pro tvorbu vnitřní zónové struktury sféroidu^{19, 20}.

Mezibuněčná komunikace a syntéza komponent ECM a jejich receptorů buňkami sféroidů umožňují přirozené buněčné interakce, které ovlivňují buněčnou signalizaci a genovou expresi. Podpořena je také schopnost buněk navodit charakteristické morfologické vlastnosti^{1, 21, 22}.

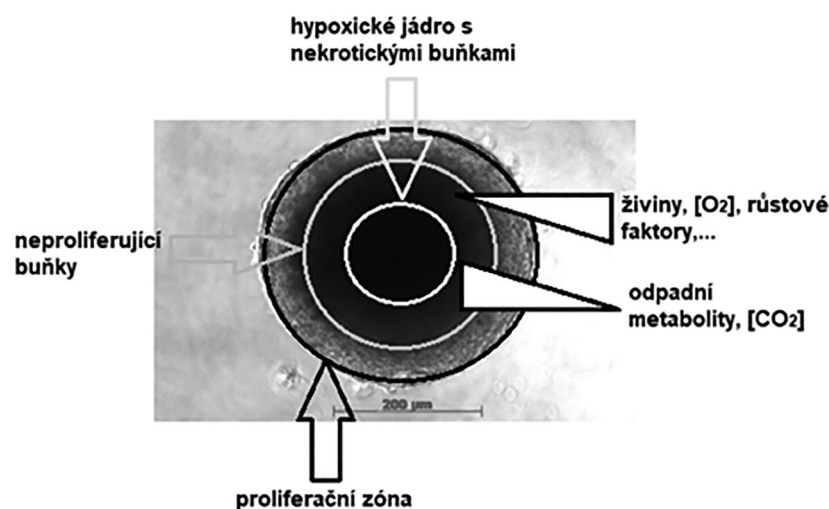
Všechny tyto skutečnosti ovlivňují odpověď buněk sféroidů na působení protinádorových léčiv. V důsledku horšího prostupu léčiva, přítomnosti neproliferujících buněk nebo zvýšené exprese genů podporujících přežívání či zodpovědných za rezistenci, je účinnost léčiv ve většině případů nižší u sféroidů ve srovnání s 2D kulturami, což napodobuje účinnost léčby u nádorů *in vivo*⁸.

Využití 3D buněčných sféroidů ve výzkumu nádorových onemocnění

3D sféroidy mají široké uplatnění v rámci výzkumu rakoviny. Představují efektivní experimentální model, který lze využít ke studiu nádorového mikroprostředí, hledání nových cílových molekul a ke sledování účinků potencionálních protinádorových léčiv.

I. Biologie nádorových buněk a nádorového prostředí

Vzhledem k nesporným výhodám těchto 3D modelů bylo biologickým vlastnostem nádorových buněk sféroidů věnová-



Obr. 1: Sféroid vytvořený kultivací buněčné linie T47D na nepřilnavém povrchu konkávního tvaru se znázorněnými zónami a gradienty.

no mnoho pozornosti. Celá řada publikací poskytuje zajímavé poznatky o buněčných procesech probíhajících u buněk sféroidů a porovnává je s procesy buněk kultivovaných v monovrstvě. Takto byly studovány například expresní^{23, 24} a metabolické²⁵ profily, hypoxie²⁶, produkce reaktivních forem kyslíku²⁷, proliferace²⁸, migrace²⁹, morfologie^{24, 30} a další.

Důležitým faktorem při studiu nádorových onemocnění *in vitro* je přítomnost ECM, protože zásadní změny v buněčném chování se dějí právě na základě interakcí buněk s prostředím. Je známo, že transkripční a translační změny jsou asociovány s adaptací buněk na prostředí. U 2D buněčných linií je přibližně 30 % genů exprimováno jinak než ve tkáních jejich původu³¹. Velice zajímavým příkladem poukazujícím na důležitost prostředí je maligní transformace ektopicky implantovaných embryonálních buněk, které v děloze podstupují normální embryogenezi a naopak normální vývoj buněk teratokarcinomu po implantaci do embrya³².

U 25 buněčných linií nádoru prsu kultivovaných ve 3D uspořádání v prostředí ECM bohaté na laminin (IrECM) a v monovrstvě byly sledovány a porovnány morfologické charakteristiky a expresní profily. U sféroidů byly pozorovány čtyři typy morfologických struktur: přesný kulatý sféroid (tzv. round), neohraničený kulatý sféroid (tzv. mass), hroznovitý (tzv. grape-like) a hvězdčovitě protáhlý (tzv. stellate). Expresní profily buněk byly výrazně ovlivněny prostředím (IrECM) a způsobem kultivace (2D vs. 3D) a korelovaly s morfologickými vlastnostmi³⁰.

Prostředí nádoru však tvoří pouze nádorové buňky a ECM. Pro vytvoření co nejvěrnějšího *in vitro* modelu je potřeba zahrnout interakce s dalšími buněčnými typy jako jsou fibroblasty, imunitní buňky, vaskulární buňky a další. Fibroblasty asociované s nádory (CAFs) a imunitní buňky představují dvě hlavní komponenty nádorového stromatu³³.

Přítomnost CAFs má vliv na chování nádorových buněk. Parakrinní signalizace spuštěná chemokiny a cytokiny produkovanými CAFs (růstový faktor hepatocytů – HGF, fibroblastový růstový faktor – FGF, epidermální růstový faktor – EGF, interleukin 6 – IL6, transformující růstový faktor β 1 – TGF β 1) inhibuje apoptózu nádorových buněk navozenou chemoterapeutiky, podporuje jejich proliferaci a epitel-mezenchymální přechod (EMT), který následně umožňuje přestup transformovaných epitelálních buněk do ECM během tvorby metastáz³⁴.

3D sféroidy kokultivaných buněk kolorektálního karcinomu HT29 a střevních fibroblastů CCD-18co byly použity jako *in vitro* modely pro studium EMT. U tohoto modelu byla pozorována zvýšená exprese mezenchymálních markerů (fibronektin, α SMA) a snížená exprese markerů epitelálních (laminin, E-kadherin), která je pro tuto změnu fenotypu charakteristická *in vivo*. Zvýšená exprese TGF β 1 ve srovnání s odpovídajícím 2D uspořádáním zároveň prokázala důležitost tohoto modelu pro studium EMT³⁵.

Fibroblasty mohou hrát roli také v neoplastické transformaci epitelálních buněk vaječníků. Senescentní fi-

broblasty, napodobující stroma starých vaječníků, kokultivované s immortalizovanými epitelálními buňkami vaječníků ve 3D uspořádání zvyšují proliferaci epitelálních buněk a navozují jaderné abnormality. Při kokultivaci s pre-senescentními fibroblasty nebyly tyto události pozorovány. Vzhledem k tomu, že rakovina vaječníků je často diagnostikována po menopauze, mohou být za rozvoj rakoviny vaječniku zodpovědné změny stromatu způsobené stárnutím a spočívající ve ztrátě faktoru inhibujícího karcinogenezi, který je v normálních fibroblastech přítomen. Tuto hypotézu navíc podporuje analýza lidských nádorů vaječniku ukazující na velkou populaci senescentních fibroblastů ve stromatu³⁶.

Makrofágy jsou imunitní buňky, které prostupují solidními nádory a tvoří až 50 % hmoty nádoru³⁷. Přítomnost těchto makrofágů asociovaných s nádory (TAMs) je často indikátorem horší prognózy. TAMs se v rámci nádoru mohou projevovat prozánětlivými i protizánětlivými fenotypy, přičemž odpověď nádorových buněk na tyto fenotypy se liší. Zatímco prozánětlivé TAMs mohou růst nádoru potlačovat, makrofágy s protizánětlivým fenotypem ho spíše podporují. V lidských nádorových onemocněních jsou TAMs obecně spojovány s podporou růstu nádoru, ale například v případě rakoviny žaludku, kůže či kolorektálního karcinomu jejich přítomnost koreluje s dobrými prognózami. Kokultivační 3D modely jsou velice dobrým nástrojem pro studium vlivu TAMs na chování nádorových buněk stejně jako pro sledování imunomodulačních účinků potenciálních terapeutik³⁴.

Kokultivací myší buněčné linie odvozené od nádoru mléčné žlázy s myšími makrofágy z kostní dřeně sledovala A. Dwyer a kolektiv infiltraci makrofágů do mamosféry a následnou invazi obou buněčných typů do okolní ECM³⁸.

Nížeší exprese genů spojených s proliferací a zvýšená exprese genů asociovaných s apoptózou byla sledována u sféroidů lidských buněk kolorektálního karcinomu kultivovaných s makrofágy, což naznačuje, že aktivací zánětlivé dráhy může docházet k tumorsupresorové imunitní odpovědi³⁹.

Modely sféroidů tvořené třemi buněčnými typy (nádorové buňky, fibroblasty a imunitní buňky) simulují nádorové prostředí ještě o něco věrněji. Ve sféroidech tvořených buňkami rakoviny tlustého střeva HT-29 kokultivovaných s monocytami a fibroblasty byla pozorována vyšší exprese proteolytického enzymu (katepsin B) a pětikrát větší invazivita nádorových buněk ve srovnání se sféroidy tvořenými pouze HT-29 buňkami⁴⁰.

Kokultivací nádorových a endotelálních buněk je možné vytvořit model pro studium angiogeneze, nekrolapstupňového procesu tvorby cév v nádoru pro zajištění přísunu živin. Takto byla například sledována interakce mezi maligními gliomovými buňkami (U-87 MG) a lidskými endotelálními buňkami pupečníku (HUVEC). V kokultivačním modelu U-87 MG – HUVEC byla u endotelálních buněk pozorována zvýšená proliferace, migrace a tvorba síťových struktur. Tento aktivovaný fenotyp endotelálních buněk byl pozorován i v přípa-

dě, kdy byly oba buněčné typy kultivovány v jednom systému bez přímého kontaktu, což naznačuje důležitou roli rozpustných faktorů v procesu angiogeneze⁴¹.

3D kokultury nádorových a endoteliálních buněk mohou být také užitečným nástrojem pro sledování účinků antiangiogenních léčiv⁴².

II. Nádorové kmenové buňky (CSCs)

CSCs je skupina nádorových buněk, která vykazuje vlastnosti podobné vlastnostem normálních kmenových buněk. Mají schopnost samoobnovy a mohou podstoupit neomezený počet symetrických dělení, čímž vznikají kmenové dceřiné buňky se stejnými vlastnostmi. Dále mohou podstoupit asymetrické dělení za vzniku dceřiné kmenové buňky a diferenciované progenitorové buňky a přepínat mezi klidovým a proliferačním stavem⁴³. Díky těmto vlastnostem CSCs podporují růst a progresi nádoru a zároveň bývají zodpovědné za relaps nádorového onemocnění po ukončení terapie⁴⁴.

Pro studium CSCs se využívá tumorsféra, které mohou být za určitých podmínek vytvořeny buňkami některých buněčných linií⁴⁵, majoritně se však pro jejich přípravu používají buňky izolované přímo z nádorových tkání. Expresí markerů asociovaných s kmenovými buňkami (ALDH1, CD133, CD44, CD166 a další) byla prokázána v nádorových tkáních pacientů a koreluje s tumorigenitou nádoru^{46, 47}.

Důležitost 3D uspořádání v souvislosti se studiem nádorových kmenových buněk a jejich vlastností byla prokázána například u lidských buněk karcinomu vaječníku. Xenografty těchto buněk, kultivovaných jako sféroidy, plně zrekapitulovaly původní nádor v imunodeficientních myších. Stejně nádorové buňky, kultivované ve 2D uspořádání, tvorbu nádoru nevyvolaly. Ve srovnání s 2D kulturami nádorových buněk exprimovaly buňky sféroidů markery CSCs (Notch 1, Nanog, CD34, Myc), byly agresivnější v růstu, migraci, invazivitě a vykazovaly rezistenci vůči cisplatině⁴⁸.

Kultivace neurosfér⁴⁹, mamosfér⁵⁰, kolonosfér⁵¹ nebo prostatosfér⁵² také významně přispěly k většímu porozumění biologii nádorových kmenových buněk a jsou výborným nástrojem pro identifikaci sloučenin, které by CSCs cíleně eliminovaly.

III. Účinky protinádorových léčiv

Z uspořádání a charakteristik sféroidů vyplývá, že odpověď tohoto modelového systému na účinky potenciálních léčiv nemůže být totožná s odpovědí buněk kultivovaných v monovrstvě, ačkoliv jsou oba systémy tvořeny stejnými buňkami. U sféroidů je obecně pozorována nižší citlivost vůči léčivu. Existují však i případy vyšší citlivosti 3D modelových systémů oproti buňkám ve 2D uspořádání. To naznačuje, že použitím 3D buněčných sféroidů je možné předejít falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům.

Rezistence sféroidů vůči některým léčivům je způsobena především nedostatečným průnikem a distribucí léčiva v rámci sféroidu, přítomností neproliferující populace buněk uvnitř sféroidu, silnějšími mezibuněčnými

kontakty, produkcí složek ECM, zvýšenou expresí proteinů zodpovědných za eflux léčiva a dalšími faktory^{53, 54}.

V porovnání s 2D kulturami jsou 3D sféroidy rezistentní zejména vůči cytostatickým léčivům jako je paklitaxel, cisplatina, 5-fluorouracil a doxorubicin. Sféroidy buněk rakoviny prsu (MDA-MB-157) jsou například kompletně rezistentní vůči paklitaxelu, u stejných buněk ve 2D uspořádání byla však stanovena velmi nízká hodnota IC₅₀ (~ 8 nmol/l)⁵⁵.

Kyselé vnitřní prostředí sféroidu (pH 6,5-7,2) může mít také nepříznivý vliv na účinek některých protinádorových léčiv jako je melfalan⁵⁶, metotrexát⁵⁷ nebo mitoxantron⁵⁸, kdy snížené pH může zhoršit přístup do nitra sféroidu a průnik do buněk.

Naopak vyšší citlivost 3D kultur byla pozorována k účinkům léčiv aktivovaných hypoxií, TH302 a tirapazaminu⁵⁹, nebo k účinku monoklonální protilátky cílené na HER2, trastuzumabu⁶⁰. Zvýšená citlivost sféroidů vůči trastuzumabu je vysvětlována tvorbou homodimerů HER2 v buňkách kultivovaných ve 3D uspořádání, zatímco buňky kultivované v monovrstvě tvoří heterodimery HER2/HER3 a proto jsou vůči účinkům této specifické protilátky méně citlivé⁶⁰. Je-li do kultivačních podmínek zahrnuta interakce s ECM (IrECM), jsou sféroidy vůči trastuzumabu citlivější pouze v případě, že je inhibován β 1 integrin, což naznačuje zásadní vliv komunikace buněk s prostředím. V této studii byly navíc porovnávány účinky trastuzumabu na čtyři různé buněčné linie nádoru prsu s podobným expresním profilem (AU565, SKBR3, HCC1569, BT549). Za přítomnosti inhibitoru β 1 integrinu byla pozorována výrazná rezistence vůči trastuzumabu u sféroidů buněčné linie BT549 oproti sféroidům ostatních buněčných linií. To ukazuje, že interakce mezi buňkami a matrix může navíc spouštět různé signální transdukce v závislosti na konkrétním typu buněčné linie⁶¹.

Závěr

Vhodný experimentální model je základem pro správné pochopení biologie nádorových onemocnění a pro identifikaci skutečně účinných protinádorových léčiv. Běžně používané monovrstvy nádorových buněk jsou sice dobře zavedeným a finančně dostupným experimentálním modelem, ale postrádají důležité biologické vlastnosti, které ovlivňují odpověď buněk na léčbu. Použitím 3D buněčných modelů ve výzkumu a vývoji protinádorových léčiv lze získat *in vitro* experimentální model, který věrněji napodobuje situaci *in vivo*. Studium biologických vlastností buněk 3D sféroidů a jejich odpovědí na účinky léčiv odhaluje zásadní rozdíly ve srovnání s 2D kulturami, proto by se hodnocení účinku potenciálních protinádorových léčiv na 3D buněčných modelech mělo stát standardní součástí preklinického testování.

Poděkování

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

Literatura

1. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, et al.: *Assay Drug Dev. Technol.* 12(4), 207 (2014).
2. Nath S, Devi GR: *Pharmacol. Ther.* 163, 94 (2016).
3. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V: *Neoplasia (United States)* 17, 1 (2015).
4. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(10), 839 (2007).
5. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, et al.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69-70, 29 (2014).
6. Anton D, Burckel H, Josset E, et al.: *Int. J. Mol. Sci.* 16(3), 5517 (2015).
7. Kelm JM, Fussenegger M: *Trends Biotechnol.* 22(4), 195 (2004).
8. Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, et al.: *J. Control. Release* 164(2), 192 (2012).
9. Foty R: *J. Vis. Exp.* 6(51), 2720 (2011).
10. Sutherland RM, Durand RE: In: *Spheroids in Cancer Research*. 95, 24 (1984).
11. Barrila J, Radtke AL, Crabbé A, et al.: *Nat. Rev. Microbiol.* 8(11), 791 (2010).
12. Ivascu A, Kubbies M: *J. Biomol. Screen.* 11(8), 922 (2006).
13. Langhans SA: *Front. Pharmacol.* 9, 6 (2018).
14. Knight E, Przyborski S: *J. Anat.* 227(6), 746 (2015).
15. Wang JZ, Zhu YX, Ma HC, et al.: *Mater. Sci. Eng. C* 62, 215 (2016).
16. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A: *Front. Mater. Sci.* 30, 546 (2012).
17. Koppenol WH, Bounds PL, Dang C V.: *Nat. Rev. Cancer* 11(5), 325 (2011).
18. Harris AL: *Nat. Rev. Cancer* 2(1), 38 (2002).
19. Sutherland RM: *Science* 240(4849), 177 (1988).
20. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, et al.: *Bio-technol. Adv.* 34(8), 1427 (2016).
21. Mueller-Klieser W: *Am. J. Physiol.* 273(4), C1109 (1997).
22. Ravi M, Ramesh A, Pattabhi A: *J. Cell. Physiol.* 232(10), 2679 (2017).
23. Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, et al.: *J. Cell. Physiol.* 204(2), 522 (2005).
24. Härmä V, Virtanen J, Mäkelä R, et al.: *PLoS One* 5(5), e10431 (2010).
25. Russell S, Wojtkowiak J, Neilson A, et al.: *Sci. Rep.* 7, 15285 (2017).
26. Leek R, Grimes DR, Harris AL, et al.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 36, 102 (2016).
27. Khaitan D, Dwarakanath BS: *Indian J. Biochem. Biophys.* 46(1), 16 (2009).
28. Riedl A, Schleder M, Pudielko K, et al.: *J. Cell Sci.* 130(1), 203 (2017).
29. Rommerswinkel N, Niggemann B, Keil S, et al.: *J. Vis. Exp.* 5(92), e51963 (2014).
30. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, et al.: *Mol. Oncol.* 1(1), 84 (2007).
31. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I: *Semin. Cancer Biol.* 15(5), 405 (2005).
32. Martin GR: *Science* 209(4458), 768 (1980).
33. Stadler M, Walter S, Walzl A, et al.: *Semin. Cancer Biol.* 35, 107 (2015).
34. Ham SL, Joshi R, Thakuri PS, et al.: *Exp. Biol. Med.* 241, 939 (2016).
35. Kim SA, Lee EK, Kuh HJ: *Exp. Cell Res.* 335(2), 187 (2015).
36. Lawrenson K, Grun B, Benjamin E, et al.: *Neoplasia* 12(7), 579 (2010).
37. Solinas G, Germano G, Mantovani A, et al.: *J. Leukoc. Biol.* 86(5), 1065 (2009).
38. Dwyer AR, Ellies LG, Holme AL, et al.: *J. Biol. Methods* 3(3), e49 (2016).
39. Ong SM, Tan YC, Beretta O, et al.: *Eur. J. Immunol.* 42(1), 89 (2012).
40. Krueger S, Kalinski T, Wolf H, et al.: *Cancer Lett.* 223(2), 313 (2005).
41. Khodarev NN: *J. Cell Sci.* 116, 1013 (2003).
42. Amann A, Zwierzina M, Koeck S, et al.: *Sci. Rep.* 9(3), e92511 (2017).
43. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al.: In: *Cancer Research*. 66(19), 9339 (2006).
44. Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, et al.: *Lancet Oncol.* 13(2), e83 (2012).
45. Chen H, Lo P-K, Johnson S, et al.: *Bio-Protocol* 3, 3 (2013).
46. Li T, Su Y, Mei Y, et al.: *Lab. Investig.* 90(2), 234 (2010).
47. Dieter SM, Ball CR, Hoffmann CM, et al.: *Cell Stem Cell* 9(4), 357 (2011).
48. Liao J, Qian F, Tchabo N, et al.: *PLoS One* 9(1), e84941 (2014).
49. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al.: *Cancer Res.* 63(18), 5821 (2003).
50. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al.: *Cancer Res.* 65(13), 5506 (2005).
51. Ohata H, Ishiguro T, Aihara Y, et al.: *Cancer Res.* 72(19), 5101 (2012).
52. Xin L, Lukacs RU, Lawson DA, et al.: *Stem Cells* 22(6), 199 (2007).
53. Gong X, Lin C, Cheng J, et al.: *PLoS One* 10(6), e0130348 (2015).
54. Oshikata A, Matsushita T, Ueoka R: *J. Biosci. Bioeng.* 111(5), 590 (2011).
55. Lemmo S, Atefi E, Luker GD, et al.: *Cell. Mol. Bioeng.* 7, 344 (2014).
56. Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, et al.: *Mol. Pharm.* 8(6), 2032 (2011).
57. Cowan DSM, Tannock IF: *Int. J. Cancer* 94(6), 863 (2001).
58. Raghunand N, Mahoney B, Van Sluis R, et al.: *Neoplasia* 3(3), 227 (2001).
59. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, et al.: *Analyst* 1, 22 (2011).
60. Pickl M, Ries CH: *Oncogene* 28(3), 461 (2009).
61. Weigelt B, Lo AT, Park CC, et al.: *Breast Cancer Res. Treat.* 122(1), 35 (2010).

Souhrn

Barchánková L., Magdolenová A., Hájek M.: 3D buněčné sféroidy jako modely solidních nádorů

Standardní kultivace nádorových buněčných linií ve 2D uspořádání je dobře zavedeným a finančně dostupným experimentálním modelem pro *in vitro* testování biologických účinků potenciálních protinádorových léčiv. 2D kultury však postrádají metabolické a proliferativní gradienty, důležité buněčné interakce a signalizace, které jsou přítomné *in vivo*. 3D buněčné sféroidy zohledňují gradienty živin, kyslíku či odpadních metabolitů, důležitost interakcí mezi buňkami a extracelulární matrix a navozují tak situaci bližší reálným podmínkám. Biologické vlastnosti 3D sféroidů a jejich odpovědi na účinky léčiv se značně liší ve srovnání s 2D kulturami. Hodnocením protinádorových účinků potenciálních léčiv na 3D kulturách se zásadně zvyšuje šance na výběr farmakologicky relevantních struktur a snížit tak riziko neúspěchu v průběhu klinického testování.

Klíčová slova: séroid, solidní nádor, 3D model

Summary

Barchánková L., Magdolenová A., Hájek M.: 3D cell spheroids as a solid tumor models

Traditional cultivation of cancer cell lines in 2D arrangement is well established and affordable experimental model for *in vitro* testing of biological effects of potential anticancer drugs. However, 2D cultures lack metabolic and proliferative gradients, important cell interactions and signaling that are present *in vivo*. Within 3D spheroids the gradients of nutrients, oxygen or waste metabolites, the importance of interactions between the cells and the extracellular matrix are included, and thus 3D can better simulate *in vivo* tumor microenvironment. The biological properties of 3D spheroids and their responses to drug effects vary greatly compared to 2D cultures. The evaluation of anticancer drug effects on 3D spheroids increases the chances of selection of pharmacologically relevant structures and thus reduce clinical trial failure risk.

Keywords: spheroids, solid tumor, 3D model

CYSTEINOVÉ PROTEASY JAKO CÍLOVÉ MOLEKULY V BIOMEDICÍNĚ

Jakub Benýšek

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

Úvod

Proteasy jsou enzymy třídy hydrolas, které katalyzují štěpení proteinů nebo peptidů hydrolýzou peptidové vazby. Dle katalytického mechanismu se dělí na proteasy serinové, cysteinové, aspartátové, threoninové, glutamátové a metaloproteasy. V lidském genomu je kódováno více než 670 proteas, z nichž zhruba 33 % představují proteasy cysteinové. Podle místa štěpení peptidové vazby fungují proteasy jako endopeptidasy a exopeptidasy. Endopeptidasy hydrolyzují vazbu uvnitř aminokyselinového řetězce. Exopeptidasy zahrnují karboxypeptidasy, štěpící na C-konci řetězce, a aminopeptidasy, štěpící na N-konci aminokyselinového řetězce. Cysteinové proteasy hrají spolu s dalšími proteasami klíčovou roli při intracelulární a extracelulární degradaci proteinů, přenosu signálu uvnitř buněk, regulaci krevní koagulace, imunitní odpovědi, tvorbě komplementu a procesování prekurzorových proteinů (např. proenzymů, prohormonů). Cysteinové proteasy jsou proto atraktivními cílovými molekulami pro racionální navrhování nových typů léčiv na základě poznatků získaných studiem jejich struktury a funkce.

Klasifikace cysteinových proteas

Proteasy s evoluční příbuzností aminokyselinových sekvencí vytvářejí rodiny. Rodiny proteas jsou dále sdružovány na základě strukturní podobnosti do klanů. Cysteinové proteasy zahrnují jedenáct klanů s více než stovkou rodin, které vykazují společný katalytický mechanismus. Tento přehledný článek se zaměřuje na cysteinové proteasy ze dvou nejpočetnějších klanů CA a CD a na jejich fyziologickou a patofyziologickou roli u člověka. Klan CA obsahuje přibližně čtyřicet rodin, z nichž nejvýznamnější je rodina C1 (rodina papainu).

Do této rodiny patří katepsiny, na základě sekvenční homologie s rostlinným enzymem papainem a dále C2 (rodina kalpainu). Klan CD obsahuje šest rodin, v genomu člověka se vyskytují proteasy z rodiny C13 (asparaginylendopeptidasy) a C14 (kaspasy).

Katalytický mechanismus cysteinových proteas

Pro štěpení peptidové vazby *in vitro* je obvykle nutné zvolit drastické podmínky, např. koncentrovanou kyselinu chlorovodíkovou při teplotě 100 – 120 °C po dobu 10 hod v anaerobním prostředí. Naproti tomu proteolytické enzymy jsou schopny za fyziologických podmínek rozštěpit stovky peptidových vazeb za sekundu a bez spotřeby energie. Katalytický mechanismus cysteinových proteas je založený na aminokyselinových zbytcích cysteinu a histidinu, které jsou umístěny v katalytickém místě enzymu. Jednotlivé klany se liší detailním uspořádáním tohoto místa a kromě uvedené diády katalytických zbytků mohou zapojovat i další pomocné zbytky, které napomáhají správné prostorové orientaci a reaktivitě diády. Štěpení peptidové vazby substrátu probíhá v několika krocích a je řízeno souhrou interakce s negativně nabitým cysteinem a pozitivně nabitým histidinem. Dochází přitom ke vzniku několika intermediátů. Finální acyl-enzymový intermediát, kovalentně vázaný na cystein je hydrolyzován působením molekuly vody^{1,2}.

Fyziologická úloha cysteinových proteas v lidském organismu

Skupina cysteinových proteas označovaných jako cysteinové katepsiny (klan CA, rodina C1) je tvořena jedenácti enzymy a je obecně zodpovědná za lysosomální odbourávání proteinových substrátů a degradaci

extracelulární matrix³. Kromě této nespecifické degradace proteinů hrají cysteinové katepsiny také důležitou úlohu např. při specifické aktivaci a regulaci řady proteinů ve fyziologických procesech, jako je remodelace kostní tkáně (katepsin K), štěpení antigenů a jejich následná prezentace na MHC II glykoproteinu (katepsin V, S)⁴ nebo cytotoxická imunitní odpověď (katepsin C)⁵. Cysteinové katepsiny jsou syntetizovány ve formě preproenzymu v endoplasmatickém retikulu. Sacharidy vázané na *N*-glykosylační místa v jejich sekvenci jsou potřebné k dopravě těchto proteas prostřednictvím manosa-6-fosfátového receptoru do lysosomu⁶. Jejich lokalizace však nezahrnuje pouze lysosomy, ale mohou být dále transportovány do endosomů a fagosomů⁷. Kromě uvedených hlavních distribuce byly jednotlivé katepsiny nalezeny také v dalších buněčných kompartmentech, jako je jádro (např. katepsin L), endoplasmatické retikulum (katepsin W) či na povrchu plasmatické membrány (např. katepsiny B a X)⁸.

Katepsiny mají obecně nejvyšší enzymovou aktivitu v mírně kyselé oblasti pH a v kyselém prostředí lysosomu jsou tak plně aktivní. Většina katepsinů ztrácí svoji aktivitu v neutrálním pH a díky tomuto regulačnímu mechanismu je omezováno jejich působení mimo lysosom⁹. Tkáňová lokalizace některých katepsinů je specifická pro určitý orgán, například katepsin F je v makrofázích a buňkách hladké svaloviny, katepsin S v lymfatických tkáních a dendritických buňkách, katepsin K v osteoklastech a katepsin W v cytotoxických buňkách. Naproti tomu katepsiny L, B, H, O, C a X se nacházejí v mnoha orgánech a tkáních^{6,9}.

Kalpainy (klan CA, rodina C2) jsou cytosolární proteasy s neutrálním pH-optimumem. U člověka bylo doposud identifikováno 14 isoform těchto proteas¹⁰. Skládají se z katalytické a regulační podjednotky. Ta váže vápenaté ionty nezbytné pro jejich aktivaci a ovlivňování enzymové aktivity. Nejvíce studované isoformy 1 a 2 nemají na rozdíl od mnoha ostatních isoform tkáňovou specifitu a jejich exprese se liší v závislosti na typu buňky a daných podmínkách. Kalpainy jsou považovány za regulační enzymy, neboť se účastní mnoha buněčných signálních drah, které jsou řízeny koncentrací vápníku a fosforylací proteinů. Abnormální aktivita kalpainů je spojena s celou řadou patologických změn^{11,12}.

Kaspasy (klan CD, rodina C14) jsou cysteinové proteasy, které specificky štěpí peptidový řetězec v místě obsahujícím kyselinu asparagovou. Hrají klíčovou roli v udržení buněčné a orgánové homeostáze prostřednictvím programované buněčné smrti (tzv. apoptózy) a regulace zánětlivé odpovědi¹³. Apoptóza je složitý biochemický proces, který se uplatňuje při likvidaci poškozených buněk (např. napadených virem) a při vývoji složitých orgánových struktur (např. tvorbě prstů). Selektce T-lymfocytů a B-lymfocytů je rovněž apoptotický děj a chyby v tomto procesu vedou k rozvoji autoimunitních chorob a zánětů. Kaspasy se rozdělují podle své fyziologické funkce v programované buněčné smrti do tří hlavních skupin zahrnujících kaspasy prozánětlivé (kaspasy 1, 4, 5 a 11 – 13), iniciační (kaspasy 2, 8 – 10) a exekutivní (kaspasy 3, 6 a 7)¹⁴. Kaspasy jsou syntetizovány ve formě neaktivních proenzymů

(tzv. pro-kaspas) a jejich lokalizace v buněčných kompartmentech se liší u jednotlivých zástupců a zahrnuje zejména mitochondrie, buněčné jádro a cytosol^{13,16}.

Patofyziologické působení lidských cysteinových proteas

Tato kapitola obsahuje přehled onemocnění, u kterých je prokázána přímá či nepřímá patologická role cysteinových proteas. Uvedené patofyziologické děje velmi často úzce souvisí s chybnou regulací těchto enzymů, která se může projevit jejich zvýšenou aktivitou.

Ateroskleróza

Při ateroskleróze, (kornatění cév) dochází k ukládáním lipidového plaku do jejich stěn, na čemž se významným způsobem podílejí makrofágy, které způsobují přeměnu lipidového plaku na pojivovou tkáň. V takto vzniklých ateromech byly identifikovány katepsiny S a K¹⁷. Obě tyto proteasy mají silnou elastinolytickou aktivitu a urychlují kornatění cév. Navíc je při ateroskleróze potlačena exprese cystatinu C jako přirozeného inhibitoru cysteinových proteas, což se projeví zvýšenou proteolýzou¹⁸. Při ateroskleróze hraje významnou roli rovněž katepsin F, který ovlivňuje lipoprotein o nízké hustotě (LDL, označovaný jako „zlý“ cholesterol)¹⁹. Bylo prokázáno, že katepsin F účinně štěpí protein apoB100, který tvoří LDL částice, a takto modifikované částice následně agregují a vstupují do plaků. Selektivní inhibitor katepsinu F by byl tedy slibným nástrojem v boji proti rozvoji aterosklerotických plaků.

Osteoporóza

Osteoporóza se projevuje řidnutím kostní tkáně, kdy kostní resorpce převažuje nad tvorbou nové kostní tkáně. Odbourávání kostní tkáně provádí katepsin K, který je jedinou známou savčí proteasou schopnou štěpit uvnitř trojitě spletených struktur kolagenových vláken a degradovat je na menší peptidy. Jeho hlavním substrátem je kolagen typu I, hlavní proteinová složka kostní organické matrice²⁰; kvůli jeho zvýšené degradaci klesá hustota kostní tkáně. Osteoporóza je velice rozšířené onemocnění v současné populaci. Uvádí se, že v roce 2020 bude touto chorobou ve Spojených státech trpět více jak 10 % populace nad 50 let věku²¹, a proto je katepsin K atraktivním cílem terapeutického zásahu²⁰. Inhibitory cílené proti katepsinu K, na rozdíl od dnes používaných léčiv na bázi bisfosfonátů, zachovávají tvorbu nové kostní tkáně²². Po inhibici katepsinu K značná část osteoklastů ztratí svou schopnost odbourávat kostní tkáň, ale nadále se podílí na buněčné signalizaci mezi osteoklasty a osteoblasty, které tvoří novou kostní tkáň. Z vyvíjených nízkomolekulárních inhibitorů katepsinu K byly doposud do klinických studií zařazeny čtyři^{23,24}. Z nich nejnadějnější Odanacatib prošel až do III. fáze klinických studií, které ale byly v roce 2016 ukončeny z důvodu zvýšeného rizika vzniku cerebrovaskulárních onemocnění²⁵. V současné době se vývoj zaměřuje na selektivní inhibitory katepsinu K cíleně regulující pouze jeho kolagenolytickou aktivitu a nikoli ostatní proteolytické funkce.

Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida je chronický autoimunitní zánět synoviální tkáně, který vede k destrukci chrupavky a de-

kalcifikaci kostní tkáně. V synoviálních fibroblastech byly identifikovány katepsiny K, L a B²⁶, v synoviálních makrofázích pak ještě katepsin S²⁷. Tyto proteasy jsou stabilizovány působením glykosaminoglykanů přítomných v extracelulární matrix synoviálních pouzder, v širokém rozsahu pH, včetně neutrálního. Při degradaci chrupavky jsou štěpeny hlavní složky – kolagen typu II, který tvoří základní mechanickou oporu, a proteoglykan agrekan, který je zodpovědný za pružnost. Hlavní podíl na degradaci má katepsin K, ostatní katepsiny přispívají v menší míře²⁸. Inhibiční studie ukazují, že podáním nízkomolekulárních inhibitorů cysteinových katepsinů došlo ke snížení eroze chrupavčité tkáně a potlačení zánětu²⁷. Inhibitor katepsinu S označovaný RWJ 445380 je již ve druhé fázi klinických studií²⁹.

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je chronické neurodegenerativní onemocnění projevující se ztrátou nervových buněk v důsledku ukládání nerozpustných β -amyloidových plaků v mozkové tkáni. Ty působí neurotoxicky³⁰ a aktivují mikrogliové buňky, jež hrají úlohu imunitních buněk v centrální nervové soustavě. Na regulaci těchto buněk se podílejí cysteinové proteasy, včetně katepsinů, kalpainů a kaspas^{12,31}. Např. exprese katepsinů B a S³²⁻³⁴ se mění s věkem, přičemž efektivita degradace proteinů v lysosomech působením katepsinů se postupně snižuje a dochází k akumulaci neštěpeného materiálu v podobě tzv. lipofuscinu. Katepsiny tak ovlivňují imunitní odpověď mikrogliových buněk, jež uvolňují prozánětlivé faktory a spouští kaskádu dějů vedoucí k úhynu nervových buněk. K rozvoji Alzheimerovy choroby dále přispívá narušení systému autofagie. Jedná se o proces, kdy je buňka schopna trávit své vlastní cytosolární komponenty (včetně poškozených organel a cytotoxického β -amyloidu), které jsou uzavřeny do specifické organely autofagosomu. Jeho splynutím s lysosomem vzniká autofagolysosom, v němž probíhá degradace. Snížená aktivita katepsinu B, jakožto hlavní proteasy schopné štěpit β -amyloid v autofagolysoso-

mu, pak zapříčiní akumulaci β -amyloidu a poškození této organely. Výše uvedené procesy vedou ke spuštění apoptotické kaskády řízené kaspasami^{35,36}. Dalším mechanismem vzniku Alzheimerovy choroby je deregulace vápníkové homeostasi, jejímž důsledkem je zvýšená aktivita kalpainů^{12,37}. Kalpains narušují stěnu lysosomů, což opět uvolňuje katepsiny³⁶ a výsledně spouští apoptotickou kaskádu vedoucí k buněčné smrti neuronů. Cílená inhibice katepsinu B a kalpainů má za následek snížení úhynu neuronů až o 84 %³⁴.

Nealkoholická steatohepatitida

Onemocnění je charakterizované ukládáním tuku v jaterní tkáni u lidí, kteří výrazně nekonzumují alkohol, a má nejčastější vazbu na jaterní selhání, cirhózu a hepatocelulární karcinom. Jedním z rizikových faktorů je obezita, při níž dochází k akumulaci tuku v adipocytech, ve kterých se spustí apoptóza. Do postiženého místa se shlukují makrofágy a následuje uvolnění prozánětlivých faktorů, dochází k nekróze a celkové histologické změně tkáně. Apoptózu řídí kaspasy, v tomto případě zejména kaspasy 8, 2 a 1³⁸. V současné době pokročilo testování několika inhibitorů kaspas do druhé fáze klinických studií^{39,40}.

Nádorová onemocnění

Společným rysem nádorových tkání je zvýšená exprese růstových faktorů a tvorba nových kapilárních spojení (angiogeneze). Rakovinné buňky jsou schopny uniknout imunitnímu dozoru a tvořit metastáze. Je patrná přímá korelace v nadměrné expresi cysteinových proteas s agresivnějšími formami rakoviny a špatnou prognózou pro léčbu. Katepsiny jsou schopny štěpit růstové faktory a cytokiny, následkem čehož dochází k patologickým změnám spojeným s angiogenezí, poruchou autofagie a programované buněčné smrti. Svou schopností štěpit komponenty extracelulárního matrix a proteiny důležité v mezibuněčné interakci napomáhají k migraci rakovinných buněk po těle a tvorbě metastáz. Katepsiny jsou využitelné jako tumorové markery⁴¹ a jejich úlohu v tumorogenezi shrnuje tab. I.

Tab. I: Úloha cysteinových katepsinů v tumorogenezi.

Cysteinový katepsin	Typ rakoviny	Úloha v tumorogenezi	Ref.
katepsin B	karcinom tlustého střeva	tvorba metastáz, invaze rakovinných buněk, angiogeneze, prognostický marker	42
	karcinom děložního čípku	buněčné množení, migrace a invaze rakovinných buněk	43
	karcinom prsu	tvorba metastáz	44
	karcinom slinivky	tvorba metastáz	45
	gliom	progrese onemocnění, invaze rakovinných buněk	46
	osteosarkom	pohyblivost buněk, invaze rakovinných buněk	47
	melanom	autofagie	48
katepsin L	melanom	tvorba metastáz, invaze rakovinných buněk	49
	karcinom slinivky	invaze rakovinných buněk	50
	karcinom prsu	angiogeneze	51

Tab. I: Úloha cysteinových katepsinů v tumorogenezi (pokračování).

Cysteinový katepsin	Typ rakoviny	Úloha v tumorogenezi	Ref.
katepsin V	karcinom štítné žlázy	diferenciace zárodečných buněk	52
katepsin K	melanom	invaze rakovinných buněk, tvorba metastází	53
	gliom	migrace rakovinných buněk	54
	karcinom prostaty	angiogeneze, invaze rakovinných buněk	55
	karcinom prsu	růst a invaze rakovinných buněk, tvorba metastází	56
katepsin S	adenokarcinom střeva	autofagie	57
	adenokarcinom hlavy a krku	autofagie	58
	adenokarcinom plic	invaze rakovinných buněk	58
	hepatocelulární karcinom	invaze rakovinných buněk	58
katepsin H	karcinom slinivky	angiogeneze	59
	gliomy	progrese onemocnění, migrace rakovinných buněk	60
	hepatocelulární karcinom	invaze rakovinných buněk	61
katepsin X/Z	hepatocelulární karcinom	migrace rakovinných buněk, invaze rakovinných buněk, tvorba metastází	62
	karcinom žaludku	invaze rakovinných buněk	62
katepsin C	karcinom kůže	růst rakovinných buněk, angiogeneze	63

Neméně důležitou roli při vzniku rakoviny hrají i kaspasy. Rakovinné buňky mají schopnost se neomezeně dělit a jsou potlačeny kaskády jejich apoptózy. V této souvislosti jsou studovány zejména kaspasy 8 a 10, jejichž redukovanou expresí dochází k masivní proliferaci a ztrátě schopnosti buněk spustit efektivně programovanou buněčnou smrt⁶⁴.

Literatura

1. Cstorer A and Ménard R (1994). *Methods in Enzymology*, pp. 486: Elsevier.
2. Stosova T, Havlis J, et al.: *Chem. Listy* 99, 896 (2005).
3. Bohley P and Seglen P: *Experientia* 48(2), 151 (1992).
4. Beers C, Burich A, et al.: *The Journal of Immunology* 174(3), 1205 (2005).
5. Zavašnik-Bergant T and Turk B: *Tissue antigens* 67(5), 349 (2006).
6. Brix K, Dunkhorst A, et al.: *Biochimie* 90(2), 194 (2008).
7. Claus V, Jahraus A, et al.: *Journal of Biological Chemistry* 273(16), 9842 (1998).
8. Bühlung F, Fengler A, et al. (2002). *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases* 2, pp. 241: Springer.
9. Turk V, Stoka V, et al.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1824(1), 68 (2012).
10. Goll DE, Thompson VF, et al.: *Physiological reviews* 83(3), 731 (2003).
11. Hosseini M, Najmabadi H, et al.: *Archives of Iranian Medicine (AIM)* 21(4), (2018).
12. Mahaman YaR, Huang F, et al.: *Medicinal Research Reviews* 39, 608 (2018).
13. Grütter MG: *Current Opinion in Structural Biology* 10(6), 649 (2000).
14. Shalini S, Dorstyn L, et al.: *Cell Death and Differentiation* 22(4), 526 (2015).
15. Boatright KM, Renatus M, et al.: *Molecular cell* 11(2), 529 (2003).
16. Degterev A, Boyce M, et al.: *Oncogene* 22(53), 8543 (2003).
17. Liu J, Sukhova GK, et al.: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(8), 1359 (2004).
18. Bengtsson E, To F, et al.: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25(10), 2151 (2005).
19. Öörni K, Sneek M, et al.: *Journal of Biological Chemistry* 279(33), 34776 (2004).
20. Brömme D and Lecaille F: *Expert Opinion on Investigational Drugs* 18(5), 585 (2009).

Poděkování

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

Literatura (pokračování)

21. Wright NC, Looker AC, et al.: *Journal of Bone and Mineral Research* 29(11), 2520 (2014).
22. Watts NB and Diab DL: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95(4), 1555 (2010).
23. Hao L, Chen W, et al.: *Infection and Immunity* IAI. 01713 (2015).
24. Adami S, Supronik J, et al. (2006). *Journal of Bone and Mineral Research*, pp. S24. AMER SOC BONE & MINERAL RES 2025 M ST, NW, STE 800, WASHINGTON, DC 20036-3309 USA.
25. Drake MT, Clarke BL, et al.: *Endocrine Reviews* 38(4), 325 (2017).
26. Cunnane G, Fitzgerald O, et al.: *Rheumatology (Oxford, England)* 38(1), 34 (1999).
27. Baugh M, Black D, et al.: *Journal of Autoimmunity* 36(3-4), 201 (2011).
28. Yoshihara Y, Nakamura H, et al.: *Annals of the Rheumatic Diseases* 59(6), 455 (2000).
29. Gupta S, Singh RK, et al.: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12(3), 291 (2008).
30. Mucke L and Selkoe DJ: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(7), a006338 (2012).
31. Avila J: *Nature Reviews Neurology* 6(11), 587 (2010).
32. Lemere CA, Munger JS, et al.: *The American Journal of Pathology* 146(4), 848 (1995).
33. Hook VY, Kindy M, et al.: *Journal of Biological Chemistry* 283(12), 7745 (2008).
34. Hook G, Hook V, et al.: *Journal of Alzheimer's Disease* 26(2), 387 (2011).
35. Nixon RA: *Journal of Cell Science* 120(23), 4081 (2007).
36. Cataldo AM and Nixon RA: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(10), 3861 (1990).
37. Saito K, Elce JS, et al.: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(7), 2628 (1993).
38. Kramer L, Turk D, et al.: *Trends in Pharmacological Sciences* 38(10), 873 (2017).
39. Witek RP, Stone WC, et al.: *Hepatology* 50(5), 1421 (2009).
40. Wilson CH and Kumar S: *Cell Death and Differentiation* 25(6), 1010 (2018).
41. Pogorzelska A, Żołnowska B, et al.: *Biochimie* (2018).
42. Kruszewski W, Rzepko R, et al.: *Neoplasma* 51(1), 38 (2004).
43. Wu D, Wang H, et al.: *Histology and Histopathology* 27(1), 79 (2012).
44. Withana NP, Blum G, et al.: *Cancer Research* 2759.2011 (2012).
45. Dumartin L, Whiteman HJ, et al.: *Cancer Research* 1367.2011 (2011).
46. Rempel SA, Rosenblum ML, et al.: *Cancer Research* 54(23), 6027 (1994).
47. Krueger S, Haeckel C, et al.: *Cancer Research* 59(23), 6010 (1999).
48. Fais S: *Cancer Letters* 258(2), 155 (2007).
49. Yang Z and Cox JL: *Cancer Cell International* 7(1), 8 (2007).
50. Gocheva V, Zeng W, et al.: *Genes & Development* 20(5), 543 (2006).
51. Sudhan DR, Rabaglino MB, et al.: *Clinical & Experimental Metastasis* 33(5), 461 (2016).
52. Tedelind S, Poliakova K, et al.: *Biological Chemistry* 391(8), 923 (2010).
53. Quintanilla-Dieck MJ, Codriansky K, et al.: *Journal of Investigative Dermatology* 128(9), 2281 (2008).
54. Hira VVV, Ploegmakers KJ, et al.: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 63(7), 481 (2015).
55. Brubaker K, Vessella R, et al.: *Journal of Bone and Mineral Research* 18(2), 222 (2003).
56. Chen B and Platt MO: *Journal of Translational Medicine* 9(1), 109 (2011).
57. Yang M, Liu J, et al.: *Molecular Cancer* 13(1), 43 (2014).
58. Zhang L, Wang H, et al.: *Neoplasma* 62(1), 16 (2015).
59. Gocheva V, Chen X, et al.: *Biological Chemistry* 391(8), 937 (2010).
60. Sivaparvathi M, Sawaya R, et al.: *Cancer Letters* 104(1), 121 (1996).
61. Wu S, Huang Y, et al.: *Oncogene* 30(17), 2057 (2011).
62. Akkari L, Gocheva V, et al.: *Genes & Development* 28(19), 2134 (2014).
63. Ruffell B, Affara NI, et al.: *Genes & Development* (2013).
64. Olsson M and Zhivotovsky B: *Cell Death and Differentiation* 18(9), 1441 (2011).

Souhrn

Benýšek J.: Cysteinové proteasy jako cílové molekuly v biomedicině

Cysteinové proteasy se zásadním způsobem účastní mnoha fyziologických a patologických procesů v těle člověka. Jejich dysregulace vede k rozvoji mnoha těžkých onemocnění, jako jsou např. ateroskleróza, osteoporóza, revmatoidní artritida, nealkoholická steatohepatitida, neurodegenerativní a nádorová onemocnění. Vzhledem ke své roli by se cysteinové proteasy mohly stát atraktivním cílem, pro návrh nových typů léčiv. Tento přehledný článek se zaměřuje na cysteinové proteasy z klanů CA a CD a shrnuje současné poznatky o jejich roli v patologii člověka.

Klíčová slova: cysteinové proteasy, léčivo, choroba, patologické procesy

Summary

Benýšek J.: Cysteine proteases as drug targeted molecules in the biomedicine

Cysteine proteases are critically involved in numerous physiological and pathological processes in the human body. Their deregulation is associated with severe pathologies, such as atherosclerosis, osteoporosis, rheumatoid arthritis, nonalcoholic steatohepatitis, neurodegenerative and neoplastic diseases. Therefore, cysteine proteases are attractive target molecules for rational design of novel types of chemotherapeutics. This review provides current knowledge on cysteine proteases from clans CA and CD and their role in human pathology.

Keywords: cysteine proteases, drug, disease, pathology

ROLE G-KVADRUPLLEXŮ V BUNĚČNÉ BIOLOGII

Jaroslav Kozák

Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v. v. i., oddělení Biochemické farmakologie; kozak@uochb.cas.cz

Úvod

Před více než půl stoletím byla u sekvencí guaninů (G) pozorována schopnost samovolně vytvářet čtyřvláknové helikální struktury, G-kvadruplexy (G4)¹. Před 30 lety byly DNA G4 objeveny v repetitivních sekvencích telomer prvoka *Oxytricha nova*^{2,3} a Aaron Klug o G4 prohlásil: „Pokud se G4 tak snadno tvoří *in vitro*, příroda našla způsob jejich využití *in vivo*“. Zejména poslední dvě dekády intenzivního výzkumu G4 dokazují platnost tohoto výroku. G4 se vyskytují v DNA i RNA, přičemž se podílí na regulaci replikace^{4,5}, rekombinace⁶, homeostáze telomer⁷, opravy DNA⁸, mutagenese⁹, epigenetických procesů^{10,11}, transkripce¹², postranskripčních procesů (sestřihu RNA a alternativní polyadenylace mRNA)¹³ a translace^{14,15}.

G4 se vytvářejí v rámci jednovláknových RNA a DNA, které obsahují minimálně čtyři G bohaté úseky (G_n ; $n \geq 3$) oddělené od sebe alespoň jedním nukleotidem. Základní stavební jednotkou G4 je G-kvartet, který vzniká ze čtyř guaninů pomocí Hoogstenového párování bází, a vrstvení těchto planárních G-kvartetů na sebe pomocí π - π interakcí vede k tvorbě G4. Centrální oblasti G-kvartetů v G4 mohou být obsazeny monovalentními kationy Na^+ a K^+ , které dále zvyšují stabilitu G4 ve fyziologických pufrch, nebo buněčném prostředí. Intramolekulární G4 se vytváří v rámci jednoho vlákna RNA a DNA. Intermolekulární G4 může být tvořen ze dvou a více vláken nukleových kyselin. V obou případech vznikají v závislosti na orientaci vláken v G4 paralelní nebo antiparalelní struktury¹⁶ (Obr. 1). Struk-

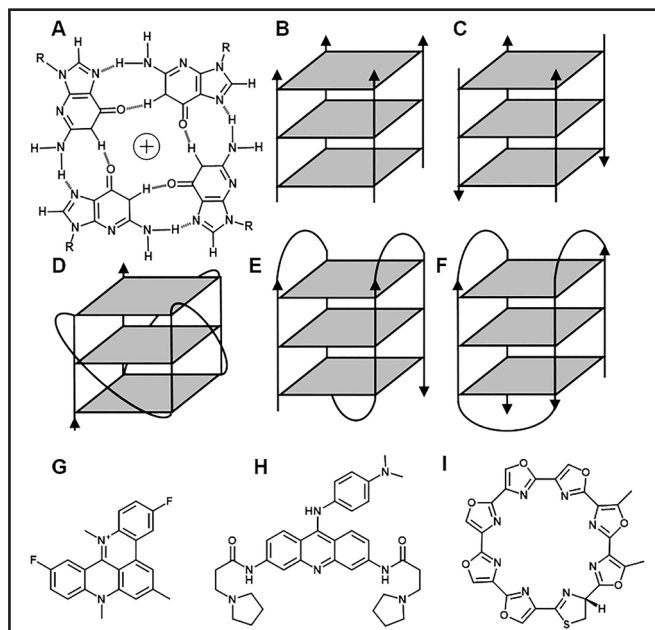
turní variabilitu G4, stejně jako jeho stabilitu, dále ovlivňuje délka a nukleotidové složení sekvencí oddělujících jednotlivé G bohaté úseky, které v rámci G4 vytvářejí smyčky kolem navrstvených G-kvartetů^{17,18}.

Z hlediska biologické funkce je zajímavé, že řada DNA G4 je *in vitro* termodynamicky stabilnější než stejná sekvence ve formě duplexu DNA a často i kinetika denaturace DNA G4 je pomalejší ve srovnání s duplexem DNA¹⁹. G4 se účastní řady buněčných procesů spojených s RNA a DNA (viz výše), a proto se předpokládá, že také samotné formování G4 podléhá buněčné regulaci. Zejména v posledních letech se kumulují přímé důkazy o existenci G4 *in vivo*. Jsou syntetizovány nové ligandy stabilizující G4, stejně tak jsou identifikovány proteiny regulující tvorbu a denaturaci G4, a tím přispívají k rozšíření znalostí o výskytu G4 a jejich biologické funkci.

Výskyt G4 v genomu a transkriptomu

Na základě řady sekvencí tvořících G4 *in vitro* bylo vytvořeno několik algoritmů (např. motiv $G_n L_{1-7} G_n L_{1-7} G_n L_{1-7} G_n$, kde $n \geq 3$ a L odpovídá A, T, C, U), které zkoumaly výskyt G4 motivů v rámci různých organismů²⁰⁻²². Distribuce G4 motivů není náhodná, neboť G4 motivy se nacházejí převážně mimo metylované regiony DNA, úseky DNA podílející se na tvorbě nukleozomů¹⁷ a kódující regiony DNA²³. Výskyt G4 motivů zároveň překvapivě koreluje s regulačními oblastmi DNA a RNA a jejich výskyt je evolučně vysoce konzervovaný, nejvíce u savců a pak jejich konzervovanost postupně klesá v rámci obratlovců k nižším organismům^{18,24,25}. Evoluční význam G4 potvrzuje i jejich zapojení do složitého procesu embryogeneze²⁶. G4 motivy je možné nalézt i u lidských DNA a RNA virů²⁷⁻²⁹ (například v LTR (dlouhá koncová repetice – z angl. *Long Terminal Repeat*) oblasti RNA viru HIV se G4 podílí na regulaci virového promotoru³⁰ a u DNA viru Epstein-Barrové se G4 motiv podílí na replikaci a uchycení virové DNA během metafáze²⁸). Také v bakteriích (*E. coli*, nebo *D. radiodurans*) se G4 motivy také vyskytují v regulačních oblastech DNA a RNA a vytvoření G4 může přispívat k regulaci genové exprese^{8,31}.

Podle výše uvedeného obecného vzorce G4 motivu bylo v lidském genomu nalezeno přes 376 000 G4 motivů²¹. Nejvyšší hustota výskytu G4 motivů je v oblasti telomer tvořených repeticí TTAGGG dlouhou 5 až 15 kilobází, a dále pak v promotorových oblastech, kde více než 40 % lidských genů obsahuje v promotoru alespoň jeden G4 motiv²¹, převážně v kódujícím vlákně³². Dále pak až 80 % lidských replikačních počátků obsahuje G4 motiv a replikační počátky obsahující více G4 motivů jsou aktivnější³³. U přibližně 3000 lidských genů se G4 motiv nachází v 5'- nepřekládané oblasti kódující mRNA, které po zformování do G4 mohou inhibovat translaci¹⁵. G4 motivy se v menší míře vyskytují také v 3'- nepřekládané oblasti, kde se mohou podílet



Obr. 1: Struktura G4. G-kvartet vzniká ze čtyř guaninů pomocí Hoogstenového párování bází (šedivě) (A). Intermolekulární G4 s paralelní (B) a antiparalelní (C) orientací vláken nukleových kyselin. Intramolekulární G4 s paralelní (D) a antiparalelní (E a F) orientací vláken nukleové kyseliny. Příklady ligandů G4: RHPS4 (G), BRACO-19 (H) a Telomestatin (I).

na řízení polyadenylace a degradace mRNA¹³. G4 motivy se dále vyskytují v regionech definujících přestavbu genů imunoglobulinů, místech chromozomových translokací³⁴, horkých místech rekombinace³⁵, intronech³⁶, genech pro ribozomy³⁷, CpG sekvencích, enhancerech³⁸ a mitochondriální DNA³⁹.

Konzervování G4 motivů a hlavně navýšení jejich počtu a komplexity během evoluce se musí nutně odrážet v jejich zapojení do biologických procesů, pro které je nezbytné určit kde, kdy a hlavně zda vůbec se G4 motiv může vytvářet G4, a tím ovlivnit konkrétní biologický proces *in vivo*. G4 motivy ochotně vytvářejí G4 v rámci jednovláknových řetězců nukleových kyselin (*in vivo* se jedná o RNA a o 3'-jednovláknové konce telomer). Zbývající G4 motivy, které se vyskytují v dvouvláknové DNA stabilizované interakcí s histony, můžou přechodně vytvářet G4 pouze během porušení Watson-Crickovského párování bází během replikace, transkripce a opravy DNA^{40,41}. Tvorba G4 je také usnadněna například záporným nadšroubovicovým vinutím DNA, vysokou hustotou buněčného prostředí⁴², a také proteiny, které specificky interagují s G4⁴³. Pro přímý důkaz existence G4 a jejich lokalizace uvnitř buňky byla klíčová příprava G4 specifické protilátky (vůči telomerickému G4). Tato G4 specifická protilátka byla mimo jiné také použita při imunoprecipitaci fragmentované lidské genomové DNA. Mezi izolovanými fragmenty byly identifikovány nejen sekvence telomer, ale také promotorů genů i 5'a 3' nepřekládané oblasti genů⁴⁴. Při objasňování role G4 v biologii buňky by výrazně pomohlo porovnávání map aktuálně vytvořených G4 mezi různě diferenciovanými buňkami a rámci různých buněčných osudů.

Role G4 v biologii telomer

Telomery jsou nukleoproteinové komplexy na koncích eukaryotických chromozomů. Jejich funkcí je odlišit konce chromozomů od dvouvláknových zlomů, a tak zabránit nevhodné aktivaci opravných mechanismů DNA a fúzi konců chromozomů. Lidské telomery jsou tvořeny 5 až 15 kilobází dlouhou repeticí TTAGGG, která je ve formě duplexu a jen její 15 až 200 nukleotidů dlouhý 3'-konec je jednovláknový⁴⁵. Na 3'-jednovláknový konec se váže hPOT1 protein, který za účasti dalších proteinů shelterinového komplexu ochrání jednovláknový konec vmezežením do duplexu telomerické DNA za vzniku T-smyčky⁴⁶. Telomerická DNA se u somatických buněk postupně zkracuje, ať už činností nukleas, nebo během dělení buněk, kde DNA polymerasa není schopná dokončit replikaci přesahů 3'-konců telomerické DNA. Po jejich zkrácení na kritickou délku, definovanou Hayflickovým limitem, dochází k utlumení replikace a buňka vstupuje do fáze senescence^{47–49}. Pro rychle se dělící nádorové buňky je nezbytné tento limit somatických buněk prolomit, a tak zabránit progresivnímu zkracování telomer.

Dva procesy umožňují udržovat délku telomer: aktivace telomerasy a mechanismus alternativního rekombinantního prodlužování telomer. U přibližně 85 % nádorů dochází k aktivaci telomerasy, která podle RNA templátu dokáže reversní transkripcí prodlužovat 3'-jed-

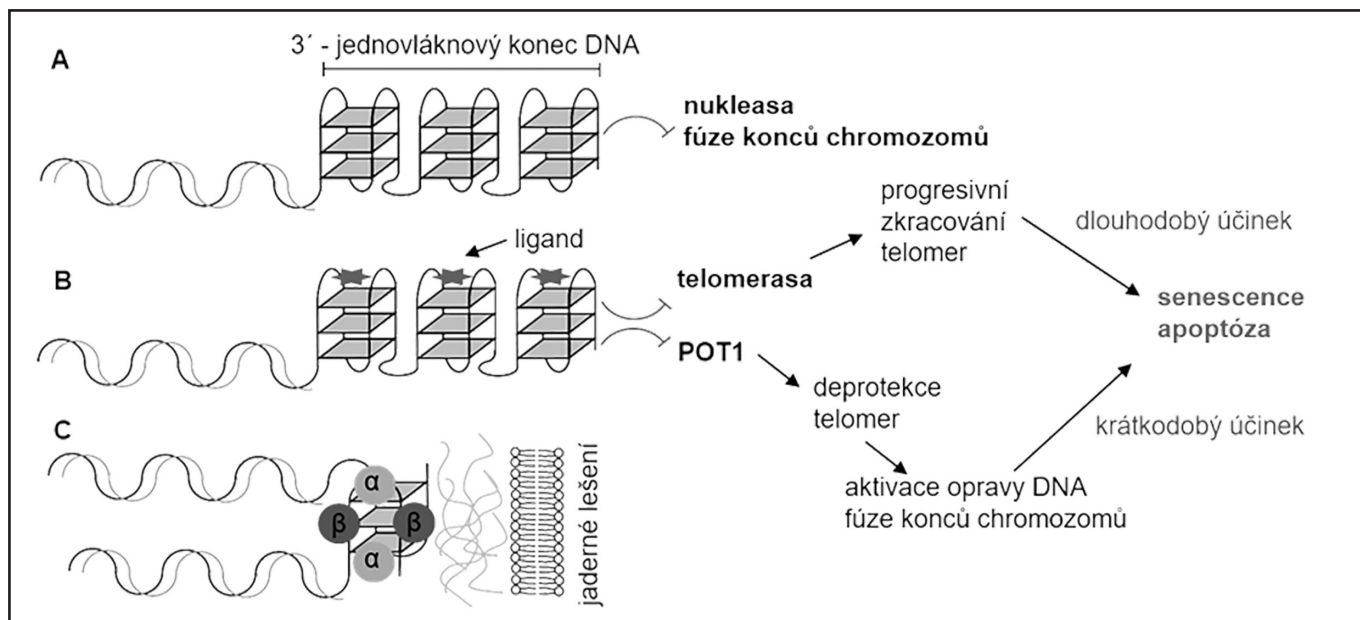
novláknové konce telomer⁵⁰. Zbývajících 15 % nádorů využívá alternativní rekombinantní prodlužování telomer⁵¹. Vzhledem k absenci exprese telomerasy v somatických buňkách a její velmi nízké expresi v kmenových a zárodečných buňkách se inhibice enzymové aktivity telomerasy dlouho považovala za zajímavý cíl nádorové terapie, neboť její inhibice vede ke zpomalení růstu nádoru bez výraznějšího toxického účinku na organizmus⁵², avšak zkrácení telomer na kritickou délku vyžaduje až několik desítek dělení nádorové buňky, a to už nemusí být slučitelné se životem pacienta.

V telomerech se G4 mohou vyskytovat především v rámci 3'-jednovláknových konců telomer, i když rychlá kinetika jejich formování (srovnatelná s rychlostí replikace) naznačuje, že by se telomerické G4 mohly tvořit i v rámci duplexu telomerické DNA během replikace⁵³. Telomerické G4 můžou být v různých organizmech součástí přirozených biologických procesů, stejně jako je narušovat.

Vytvoření jednoho, či více intramolekulárních G4 v rámci 3'-jednovláknového konce telomer může představovat jednoduchý mechanismus protekce konců chromozomů před jejich fúzí a účinkem nukleas (Obr. 2 A). Tato bazální funkce telomerických G4 v protekci telomer byla experimentálně ověřena u kvasinek, po vyřazení všech ostatních protektivních mechanismů chránících telomery⁵⁴. Jeden z prvních *in vivo* důkazů existence G4 přineslo použití G4 specifické protilátky u nálevníků rodu *Stylonychia*. Pozorování telomerických G4 poukázalo na nutnost jejich denaturace během replikace telomerické DNA^{55,56}. Denaturace telomerického G4 je iniciována, v závislosti na buněčném cyklu, fosforylací TEBPβ proteinu, který se váže na konce telomer a RecQ-like helikasu asociovanou s telomerasou. RecQ-like helikasa tak ve správný čas rozplétá telomerické G4. Tyto experimenty pomohly objasnit organizaci telomer nálevníků, kde dva 3'-konce telomer vytváří překvapivě intermolekulární G4 stabilizovaný proteiny TEBPβ a TEBPα. Tento komplex je dále ukotven k jadernému lešení^{7,43,57} (Obr. 2C).

Telomerasa potřebuje pro svou enzymovou aktivitu 3'-jednovláknový konec dlouhý teoreticky alespoň 11 nukleotidů nezbytných pro hybridizaci s RNA templátem, který je součástí telomerasy. Proto uschování 3'-jednovláknového konce telomery ve struktuře G4 a jeho následná stabilizace nízkomolekulárním ligandem inhibuje aktivitu telomerasy^{58,59}. Tato nová skupina potenciálních protinádorových látek, ligandů telomerických G4, je ve srovnání s ostatními inhibitory telomerasy terapeuticky zajímavější, neboť mimo dlouhodobého efektu progresivního zkracování telomer nádorových buněk, vykazuje také žádanější efekt krátkodobý, který nesouvisí se zkracováním délky telomer^{60–62}, ale s jejich strukturou.

Krátkodobý účinek ligandů telomerického G4 (např. BRACO-19, Telomestatin a RHPS4, (Obr. 1 G, H, I)) je založen na inhibici vazby POT1 proteinu na 3'-jednovláknové konce telomer^{61,63–66} která vede na narušení celého shelterinového komplexu, ztrátě jeho protektivní funkce, jejíž součástí je i inhibice signálních kaskád aktivujících opravu DNA prostřednictvím TRF2 proteinu. A právě aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu,



Obr. 2: Role telomerických G4 v biologii buňky. Vytvoření telomerického G4 chrání konce telomer před jejich fúzí, nebo před účinkem nukleas (A). Stabilizace telomerického G4 ligandem může vést k deprotekcí telomer a následně k senescenci a apoptóze nádorových buněk (tzv. krátkodobý účinek) (B). Telomery nálevníků vytváří intermolekulární G4 stabilizovaný proteiny TEBPβ a TEBPα, které ukotvují telomery k jadernému lešení (C).

stejně jako oprava DNA v oblasti telomer (fúze chromozomů, anafázové mosty) vede u nádorových buněk k rychlému nástupu senescence^{61,67,68} (Obr. 2 B). V souladu s tímto mechanismem účinku jsou i pokusy s nadprodukcí proteinů POT1 a TRF2, které nádorům zajišťují rezistenci vůči ligandům telomerického G4⁶⁹.

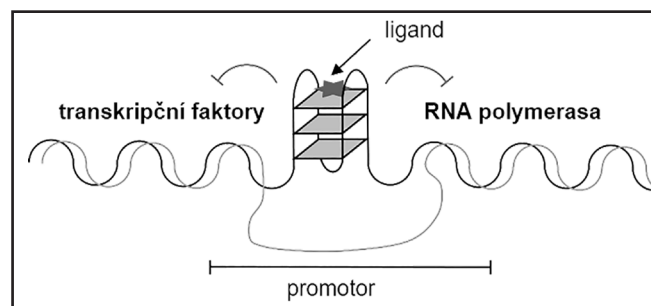
Ligandy telomerického G4 inhibují růst nejen u přibližně 85 % typů nádorů exprimujících telomerasu, ale i u zbývajících 15 % typů nádorů, u kterých se telomery prodlužují rekombinantní procesy. Ukázalo se totiž, že stabilizace telomerického G4 efektivně brání iniciaci rekombinace, neboť vazba rekombinantních proteinů na DNA je možná až po rozpletní G4 helikasou^{70,71}. To je další důvod, proč se stabilizace telomerického G4 nízkomolekulárním ligandem považuje za slibný přístup v protinádorové léčbě⁷². V souvislosti s ligandy telomerického G4 je možné uvažovat i o kombinované léčbě, neboť například stabilizace telomerického G4 ligandem RHPS4 vede k vazbě proteinu PARP1, senzoru poškození DNA, který se vazbou na G4 aktivuje⁷³. Kombinace inhibitorů PARP1 a ligandů G4 (RHPS4) pak vykazuje výraznou účinnost *in vivo*⁷⁴.

Role G4 v expresi genů

Více než 40 % lidských genů obsahuje v promotorové oblasti jeden, či více G4 motivů, které se překvapivě častěji nachází v promotorech onkogenů a regulačních proteinů než v promotorech provozních genů a tumor-supresorových genů^{21,75}. Stabilizace těchto promotorových G4 vhodným ligandem by mohla modulovat expresi genů proteinů klíčových pro řadu procesů spojených s rozvojem a progresí nádorových onemocnění. Tento předpoklad byl poprvé potvrzen u lidských buněčných liniích při studiu vlivu promotorového G4 na expresi onkogenu c-MYC. Zatímco stabilizace G4 inhibovala expresi onkogenu c-MYC, mutace G4 motivu, znemožňující jeho tvorbu, expresi naopak indukovala^{76,77}.

Promotorové G4 obvykle obsahují 5 a více G bohatých úseků oddělených různě dlouhými smyčkami. V rámci jednoho G4 motivu se může vytvořit několik různých forem intramolekulárních G4, nebo dokonce více G4, které dále vzájemně asociují prostřednictvím π - π interakcí svrchních G kvartetů⁷⁸. Promotorové G4 motivy se obvykle formují do intramolekulárních paralelních G4, kde je první a třetí smyčka tvořena jedním nukleotidem a druhá smyčka může nabývat různé délky⁷⁹.

Promotorové G4 se vytvářejí v rámci DNA duplexu, a tak jejich formování může být energeticky příznivé pouze v oblastech chromatinu s negativním nadšroubovicovým vinutím, které napomáhá denaturaci DNA duplexu^{80,81}. Negativní nadšroubovicové vinutí se generuje například za RNA polymerasou během transkripce⁸². Vliv promotorového G4 na expresi genů souvisí také s jeho lokalizací. Pokud se G4 motiv nachází v kódujícím vlákně, nedochází k ovlivnění transkripce. Avšak pokud se G4 motiv nachází v templátovém, nekódujícím vlákně, dochází obvykle k inhibici exprese genů⁸³, kde pak míra inhibice exprese koreluje se stabilitou promotorového G4, kterou je možné dále zvyšovat interakcí s ligandem. Podstata inhibičního účinku může spočívat v zamezení přepisu DNA templátu RNA polymerasou a v inhibici vazby transkripčních faktorů na promotor (Obr. 3)^{22,84}.



Obr. 3: Stabilizace promotorového G4 ligandem může inhibovat transkripci.

Je-li však G4 motiv umístěn v templátovém – nekódujícím vlákně mezi iniciační místo transkripce a terminátor dochází k navýšení exprese genu. Tento efekt se vysvětluje tím, že G4 za promotorem usnadňuje separaci vláken DNA a tím podporuje činnost RNA polymerasy⁸⁵.

Vysoce strukturně polymorfní promotorové G4, avšak dostatečně prostorově definované, se jeví jako zajímavý cíl vývoje nových G4 ligandů umožňujících modulaci exprese genů esenciálních pro nádorové buňky^{12,86}. Racionální design a syntéza ligandu selektivního jen pro jeden konkrétní promotorový G4 však vážne na nutnosti znalosti topologie samotného cíle *in vivo*. Situaci dále komplikuje i fakt, že jednotlivé formy téhož G motivu vedle sebe existují v rovnováze^{87,88}, přičemž každá z jednotlivých forem G4 může mít teoreticky různý vliv na expresi genu a tento vliv se ještě může měnit v závislosti na použité buněčné linii. Na druhou stranu i ligandy schopné stabilizovat více promotorových G4, ale třeba i telomerický G4, jsou velmi zajímavé z hlediska onkologie, neboť nádorové buňky se neustále dělí a exprimují esenciální geny, a tak je u nich zformování G4 pravděpodobnější a zároveň efekt jejich stabilizace drastičtější, zejména při kombinaci deprotektce telomer a inhibice exprese klíčových onkogenů.

Nejintenzivnější studium promotorových G4 motivů a syntéza jejich ligandů probíhá u genů c-Myc^{80,88–90}, Bcl-2^{91,92}, c-Kit1 a c-Kit2^{93,94}, VEGF^{87,95}, KRAS⁹⁶, HIF-1^{97,98}, PDGF⁹⁹ a telomerasy hTERT^{100,101}. V těchto studiích dominuje gen pro transkripční faktor c-Myc, neboť řídí expresi mnoha proteinů, které dále ovlivňují celou řadu množství buněčných procesů spojených s růstem a dělením buněk. U 60 až 80 % nádorových onemocnění dochází k nadprodukci c-MYC proteinu^{102,103}, ať už formou indukce promotoru, translokací genu, nebo jeho amplifikací. Řada buněčných linií nádorů je na produkci c-MYC proteinu zcela závislá, a tak malá změna jeho exprese vede k buněčné smrti^{104–106}. Zároveň je c-MYC protein málo stabilní, jen částečně strukturovaný bez vazebných oblastí, a proto je poměrně nevhodným cílem pro vývoj protinádorových léčiv^{107–109}. Naopak strukturovaný promotorový c-Myc G4 může představovat slibný cíl vývoje nové řady terapeutik – ligandů c-Myc G4.

Promotorový c-Myc G4 se nachází mezi 142 a 115 nukleotidem před iniciačním místem transkripce P1, uvnitř regionu NHE III₁, citlivého k účinku nukleas, který řídí až 90 % transkripce genu c-Myc^{110,111}. Motiv c-Myc G4 je dlouhý 27 nukleotidů a obsahuje hned 6 G-bohatých úseků, které zformováním do G4 (dominují dvě formy G4) vedou k inhibici transkripce genu c-Myc^{80,112–114}. Zároveň byly identifikovány proteiny interagující s c-Myc G4, což dále dokazuje, že promotorové G4 představují přirozené sekundární struktury DNA regulující expresi genů *in vivo*. Například hojný protein nukleolin stabilizuje promotorový c-Myc G4 a tím inhibuje transkripci¹¹⁵, naopak NM23H2 je zapojen do rozplétání G4 a tím transkripci aktivuje¹¹⁵.

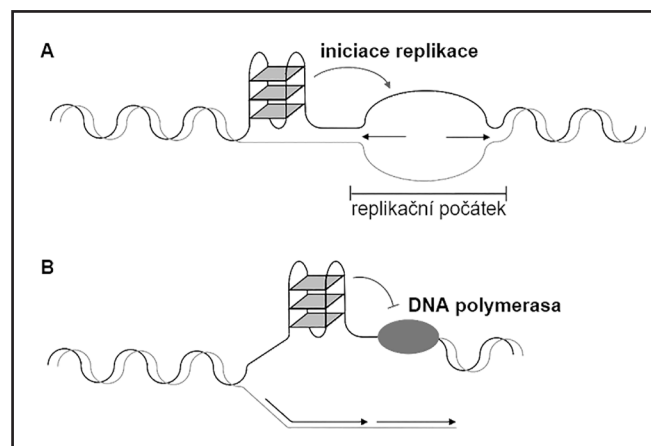
Promotorový c-Myc G4 je také spojován s širší regulací exprese genu c-Myc za účasti FUSE elementu. Tento element se nachází 1,7 kilobází před iniciačním místem a dokáže vnímat negativní nadšroubovicové vinutí chromatinu, které vzniká činností RNA polyme-

rasy. Vazba proteinů, napřed aktivátoru FBP, a pak inhibitoru FIR na FUSE element vytváří cyklus, který řídí frekvenci iniciace transkripce c-Myc genu. Součástí tohoto FUSE/FBP/FIR mechanismu, schopného vnímat mechanický stres na úseku DNA, je také promotorový c-Myc G4^{80,116}.

Role G4 během replikace DNA

Na rozdíl od kvasinek (*S. cerevisiae*), které často obsahují v místech replikačních počátků AT bohaté konsenzus sekvenční, u živočichů a rostlin v těchto oblastech převažují GC bohaté sekvenční (u savců až 80 %) ^{33,117–119}. Replikační počátky obsahující G4 motiv jsou obecně aktivnější, neboť G4 má pozitivní vliv na iniciaci replikace *in vivo*^{4,5} (Obr. 4 A). Porozumění těmto procesům u vyšších eukaryot může vést ke konstrukci autonomně se replikujících vektorů pro genovou terapii, či terapii pomocí kmenových buněk.

I když G4 v replikačním počátku může iniciovat replikaci, jejich přítomnost během syntézy DNA je pro replikaci překážkou a stabilizace G4 ligandem může vést k zastavení replikace a následně ke vzniku vysoce toxického dvouvláknového zlomu DNA^{120–122} (Obr. 4 B). Pro replikaci G4 jsou tak nezbytné specializované polymerasy a helikasy, které rozmotávají G4, a tak potlačují nárůst genetické a epigenetické nestability^{123,124}. Zatímco WRN helikasa se primárně účastní replikace telomerických oblastí, helikasy FANCD1 a BLM se podílejí na replikaci vnitřních částí chromozomů^{123–125}. Blokáce replikace DNA stabilizací G4 ligandem a následná indukce poškození DNA představuje další možnou strategii v nádorové terapii¹²⁶.



Obr. 4: G4 se vyskytují v replikačních počátcích, kde se podílejí se na iniciaci replikace (A). Zformování G4 během replikace může vést k zastavení replikace (B).

G4 a RNA

RNA G4 jsou často stabilnější než sekvenčně stejné DNA G4^{127,128}, což souvisí s 2' hydroxylovou skupinou umožňující tvorbu více vodíkových vazeb a lepší organizaci molekul vody v okolí G4. Zároveň jsou RNA G4 většinou intramolekulární a paralelní¹²⁹. Vzhledem k jednovláknové povaze RNA, vytvoření RNA G4 může principiálně zabránit pouze vazba proteinu, nebo hybridizace G4 motivu s komplementárním C bohatým segmentem za vzniku RNA duplexu. Více než 2000 G4 RNA motivů se nachází na 5' a 3' nepřekládaném kon-

ci mRNA^{130,131}, uvnitř čtecího rámce některých mRNA¹³², v místech alternativního procesování pre-mRNA, stejně jako pre-mikroRNA¹³³, virové RNA¹³⁴, u dlouhých nekódujících RNA¹³⁵, či RNA přepisu telomer (TERRA)¹³⁶. Vytvoření RNA G4 a jeho další stabilizace ligandem může ovlivnit RNA metabolismus, jako například stabilitu dané RNA, sestřih a polyadenylaci pre-mRNA¹³, stejně jako translaci^{15,137}.

RNA G4 v 5'nepřekládaném konci mRNA onkologicky významných genů NRAS¹³⁸, Bcl-2¹³⁹, TRF2¹⁴⁰, VEGF¹⁴¹ a estrogenovém receptoru α ¹⁴² inhibuje iniciaci translace mRNA. U estrogenového receptoru α se destabilizace tohoto inhibičního RNA G4 (záměna GGG za AAA) projeví navýšením translace¹⁴². Podobně RNA G4 v 3'nepřekládaném konci mRNA, stejně jako uvnitř čtecího rámce, inhibuje elongaci translace *in vitro* a snižuje množství proteinu *in vivo*^{132,143,144}. Dále se RNA G4 v 3'nepřekládaném konci mRNA může podílet na alternativní polyadenylaci, nebo na zkrácení mRNA transkriptu¹³. Zároveň stabilizace RNA G4 uvnitř kódující sekvence ligandem může vést ke změně ve čtecím rámci¹⁴⁵.

RNA G4 uvnitř pre-mRNA se tak také jeví jako zajímavý cíl vývoje protinádorových léčiv, neboť RNA G4 jsou přístupnější než promotorové G4 uschované uvnitř duplexu DNA. Na druhou stranu se v nedávné době ukázalo, že vliv RNA G4 na modulaci translace závisí na sekvenčním kontextu, ve kterém se daný RNA G4 nachází, a může být jak inhibiční, tak i aktivační^{15,146}. Pokud se například RNA G4 vytváří uvnitř IRES sekvence (vnitřní místo pro vstup ribozomu z angl. *Internal Ribosome Entry Site*) podílí se na iniciaci translace nezávisle na 5' mRNA čepičce¹⁴¹, jako v případě IRES v mRNA pro protein VEGF, kde se RNA G4 přímo účastní vazby na 40S podjednotku ribozomu¹⁴⁷.

Telomery se dlouhou dobu považovaly za transkripčně neaktivní části genomu, avšak jejich podrobné studium nakonec přineslo důkazy o transkripci telomer

za vzniku dlouhých nekódujících RNA (200 nukleotidů) – TERRA^{148,149}. TERRA transkript, tvořený sekvencí UUAGGG, se skládá do intramolekulárních paralelních G4^{150,151} a zároveň interaguje s řadou RNA vazebných proteinů, stejně jako s proteiny asociovanými s chromatinem¹⁵². TERRA transkript je spojován také s organizací telomer, neboť interaguje s proteinem TRF2¹⁵³ a aktivně pomáhá proteinu POT1 ve vazbě na 3'-konec jednovláknový konec telomer¹⁵⁴, a tím podporuje tvorbu heterochromatinu v oblasti telomer¹⁵⁵.

Závěr

Výzkum G4 se v posledních letech stal velmi zajímavou oblastí molekulární biologie. Existence DNA a RNA G4 *in vivo* ukazuje, že mimo informaci uloženou v primární sekvenci nukleových kyselin existuje ještě další informace, uložená v sekundární struktuře DNA a RNA, která poskytuje možnost regulace řady biologických procesů. Podobně jako existence chaperonů a helikas, modulujících stabilitu G4, poukazuje na evoluční tlak vedoucí k zachování G4 motivů v klíčových regulačních místech RNA a DNA. G4 tak představují polymorfní laditelné přepínače s inherentní schopností reagovat na okolní buněčné prostředí.

Role G4 v buněčné biologii je však poněkud ambivalentní. Na jednu stranu mohou G4 řídit expresi genů během embryogeneze, inhibovat expresi onkogenů, nebo blokovat nežádoucí elongaci telomer, a tak představují zajímavý cíl protinádorových terapeutik. Na druhou stranu G4 může přispívat ke genomové nestabilitě produkcí mutací, delecí, genových inverzí a translokací, a tak akcelerovat procesy spojené s onkologickými onemocněními.

Poděkování

Tento článek vznikl za podpory projektu MŠMT NPU LO1302.

Citace

- Gellert M, Lipsett MN, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, 2013 (1962).
- Sundquist WI and Klug A: *Nature* 342(6251), 825 (1989).
- Lipps HJ, Grissem W, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(8), 2495 (1982).
- Valton AL, Hassan-Zadeh V, et al.: *EMBO J* 33(7), 732 (2014).
- Foult MS, Urban JM, et al.: *Genome Res* 25(5), 725 (2015).
- Cahoon LA and Seifert HS: *Science* 325(5941), 764 (2009).
- Paeschke K, Juranek S, et al.: *Nat Struct Mol Biol* 15(6), 598 (2008).
- Beaume N, Pathak R, et al.: *Nucleic Acids Res* 41(1), 76 (2013).
- Kruisselbrink E, Guryev V, et al.: *Curr Biol* 18(12), 900 (2008).
- Tarsounas M and Tijsterman M: *Journal of molecular biology* 425(23), 4782 (2013).
- Schiavone D, Guilbaud G, et al.: *EMBO J* 33(21), 2507 (2014).
- Balasubramanian S, Hurley LH, et al.: *Nat Rev Drug Discov* 10(4), 261 (2011).
- Beaudoin JD and Perreault JP: *Nucleic Acids Res* 41(11), 5898 (2013).
- Beaudoin JD and Perreault JP: *Nucleic Acids Res* 38(20), 7022 (2010).
- Bugaut A and Balasubramanian S: *Nucleic Acids Res* 40(11), 4727 (2012).
- Burge S, Parkinson GN, et al.: *Nucleic Acids Res* 34(19), 5402 (2006).
- Maizels N and Gray LT: *PLoS Genet* 9(4), e1003468 (2013).
- König SL, Evans AC, et al.: *Biomolecular concepts* 1(2), 197 (2010).
- Lane AN, Chaires JB, et al.: *Nucleic Acids Res* 36(17), 5482 (2008).
- Huppert JL: *Biochimie* 90(8), 1140 (2008).
- Huppert JL and Balasubramanian S: *Nucleic Acids Res* 35(2), 406 (2007).
- Todd AK and Neidle S: *Nucleic Acids Res* 36(8), 2700 (2008).
- Zybailov BL, Sherpa MD, et al.: *Mol Biol (Mosk)* 47(2), 224 (2013).
- Davis L and Maizels N: *EMBO J* 30(19), 3878 (2011).
- Frees S, Menendez C, et al.: *Hum Genomics* 8, 8 (2014).
- David AP, Margarit E, et al.: *Nucleic Acids Res* 44(9), 4163 (2016).
- Sundquist WI and Heaphy S: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8), 3393 (1993).
- Norseen J, Johnson FB, et al.: *J Virol* 83(20), 10336 (2009).
- Tuesuwan B, Kern JT, et al.: *Biochemistry* 47(7), 1896 (2008).

Citace (pokračování)

30. Amrane S, Kerkour A, et al.: *J Am Chem Soc* 136(14), 5249 (2014).
31. Du X, Wojtowicz D, et al.: *Nucleic Acids Res* 41(12), 5965 (2013).
32. Du Z, Zhao Y, et al.: *Genome Res* 18(2), 233 (2008).
33. Besnard E, Babled A, et al.: *Nat Struct Mol Biol* 19(8), 837 (2012).
34. Katapadi VK, Nambiar M, et al.: *Genomics* 100(2), 72 (2012).
35. Mani P, Yadav VK, et al.: *PLoS One* 4(2), e4399 (2009).
36. Zizza P, Cingolani C, et al.: *Nucleic Acids Res* 44(4), 1579 (2016).
37. Wallgren M, Mohammad JB, et al.: *Nucleic Acids Res* 44(13), 6213 (2016).
38. Du Z, Zhao Y, et al.: *Nucleic Acids Res* 37(20), 6784 (2009).
39. Huang WC, Tseng TY, et al.: *Nucleic Acids Res* 43(21), 10102 (2015).
40. Hardin CC, Watson T, et al.: *Biochemistry* 31(3), 833 (1992).
41. Li W, Wu P, et al.: *FEBS Lett* 526(1-3), 77 (2002).
42. Miyoshi D, Karimata H, et al.: *J Am Chem Soc* 128(24), 7957 (2006).
43. Lipps HJ and Rhodes D: *Trends in cell biology* 19(8), 414 (2009).
44. Lam EY, Beraldi D, et al.: *Nat Commun* 4, 1796 (2013).
45. Wright WE, Tesmer VM, et al.: *Genes & Development* 11(21), 2801 (1997).
46. De Lange T: *Genes Dev* 19(18), 2100 (2005).
47. Shay JW and Wright WE: *FEBS Lett* 584(17), 3819 (2010).
48. Harley CB: *Nature reviews. Cancer* 8(3), 167 (2008).
49. Zhang X, Mar V, et al.: *Genes Dev* 13(18), 2388 (1999).
50. Shay JW and Bacchetti S: *Eur J Cancer* 33(5), 787 (1997).
51. Cesare AJ and Reddel RR: *Nature reviews. Genetics* 11(5), 319 (2010).
52. Gunes C and Rudolph KL: *Cell* 152(3), 390 (2013).
53. Zhang AY and Balasubramanian S: *J Am Chem Soc* 134(46), 19297 (2012).
54. Smith JS, Chen Q, et al.: *Nat Struct Mol Biol* 18(4), 478 (2011).
55. Schaffitzel C, Berger I, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15), 8572 (2001).
56. Paeschke K, Simonsson T, et al.: *Nat Struct Mol Biol* 12(10), 847 (2005).
57. Postberg J, Tsytlonok M, et al.: *Gene* 497(2), 147 (2012).
58. Zahler AM, Williamson JR, et al.: *Nature* 350(6320), 718 (1991).
59. Wang Q, Liu JQ, et al.: *Nucleic Acids Res* 39(14), 6229 (2011).
60. Gowan SM, Harrison JR, et al.: *Mol Pharmacol* 61(5), 1154 (2002).
61. Gunaratnam M, Greciano O, et al.: *Biochem Pharmacol* 74(5), 679 (2007).
62. Binz N, Shalaby T, et al.: *Eur J Cancer* 41(18), 2873 (2005).
63. Gomez D, O'donohue MF, et al.: *Cancer Res* 66(14), 6908 (2006).
64. Rodriguez R, Muller S, et al.: *J Am Chem Soc* 130(47), 15758 (2008).
65. Gomez D, Wenner T, et al.: *J Biol Chem* 281(50), 38721 (2006).
66. Sun D, Thompson B, et al.: *J Med Chem* 40(14), 2113 (1997).
67. Incles CM, Schultes CM, et al.: *Mol Cancer Ther* 3(10), 1201 (2004).
68. Tahara H, Shin-Ya K, et al.: *Oncogene* 25(13), 1955 (2006).
69. Salvati E, Leonetti C, et al.: *J Clin Invest* 117(11), 3236 (2007).
70. Riou JF, Guittat L, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5), 2672 (2002).
71. Gowan SM, Heald R, et al.: *Mol Pharmacol* 60(5), 981 (2001).
72. Neidle S: *The FEBS journal* 277(5), 1118 (2010).
73. Soldatenkov VA, Vetcher AA, et al.: *ACS Chem Biol* 3(4), 214 (2008).
74. Salvati E, Scarsella M, et al.: *Oncogene* 29(47), 6280 (2010).
75. Eddy J and Maizels N: *Nucleic Acids Res* 34(14), 3887 (2006).
76. Simonsson T, Pecinka P, et al.: *Nucleic Acids Res* 26(5), 1167 (1998).
77. Siddiqui-Jain A, Grand CL, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18), 11593 (2002).
78. Selvam S, Yu Z, et al.: *Nucleic Acids Res* 44(1), 45 (2016).
79. Chen Y and Yang D: *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* Chapter 17(Unit 17 5 (2012).
80. Sun D and Hurley LH: *J Med Chem* 52(9), 2863 (2009).
81. Zhang C, Liu HH, et al.: *Nucleic Acids Res* 41(14), 7144 (2013).
82. Hirose S and Ohta T: *Cell Structure and Function* 15(3), 133 (1990).
83. Agarwal T, Lalwani MK, et al.: *Biochemistry* 53(7), 1117 (2014).
84. Neidle S (2012). *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, edited by S. Neidle, pp. 1. Boston: Academic Press.
85. Holder IT and Hartig JS: *Chem Biol* 21(11), 1511 (2014).
86. McLuckie KI, Waller ZA, et al.: *J Am Chem Soc* 133(8), 2658 (2011).
87. Agrawal P, Hatzakis E, et al.: *Nucleic Acids Res* 41(22), 10584 (2013).
88. Hatzakis E, Okamoto K, et al.: *Biochemistry* 49(43), 9152 (2010).
89. Mathad RI, Hatzakis E, et al.: *Nucleic Acids Res* 39(20), 9023 (2011).
90. You H, Wu J, et al.: *J Am Chem Soc* 137(7), 2424 (2015).
91. Agrawal P, Lin C, et al.: *J Am Chem Soc* 136(5), 1750 (2014).
92. Dai J, Chen D, et al.: *Nucleic Acids Res* 34(18), 5133 (2006).
93. Zorzan E, Da Ros S, et al.: *Oncotarget* 7(16), 21658 (2016).
94. Islam B, Stadlbauer P, et al.: *Nucleic Acids Res* 43(18), 8673 (2015).
95. Sun D, Guo K, et al.: *Nucleic Acids Res* 39(4), 1256 (2011).
96. Lavrado J, Brito H, et al.: *Sci Rep* 5, 9696 (2015).
97. Lombardo CM, Welsh SJ, et al.: *Bioorg Med Chem Lett* 22(18), 5984 (2012).
98. Welsh SJ, Dale AG, et al.: *Sci Rep* 3(2799 (2013).
99. Qin Y, Rezler EM, et al.: *Nucleic Acids Res* 35(22), 7698 (2007).
100. Chaires JB, Trent JO, et al.: *PLoS One* 9(12), e115580 (2014).
101. Lim KW, Lacroix L, et al.: *J Am Chem Soc* 132(35), 12331 (2010).
102. Pelengaris S, Khan M, et al.: *Nature reviews. Cancer* 2(10), 764 (2002).
103. Dang CV: *Genes Cancer* 1(6), 526 (2010).

Citace (pokračování)

104. Dang CV: *Cell* 149(1), 22 (2012).
105. Sodir NM, Swigart LB, et al.: *Genes Dev* 25(9), 907 (2011).
106. Giuriato S, Ryeom S, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44), 16266 (2006).
107. Soucek L, Whitfield J, et al.: *Nature* 455(7213), 679 (2008).
108. Fletcher S and Prochownik EV: *Biochimica et biophysica acta* 1849(5), 525 (2015).
109. Whitfield JR, Beaulieu ME, et al.: *Front Cell Dev Biol* 5(10) (2017).
110. Berberich SJ and Postel EH: *Oncogene* 10(12), 2343 (1995).
111. Davis TL, Firulli AB, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24), 9682 (1989).
112. Brooks TA and Hurley LH: *Genes Cancer* 1(6), 641 (2010).
113. Gonzalez V and Hurley LH: *Biochemistry* 49(45), 9706 (2010).
114. Gonzalez V and Hurley LH: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50(111) (2010).
115. Dexheimer TS, Carey SS, et al.: *Mol Cancer Ther* 8(5), 1363 (2009).
116. R. Thomas L and Tansey W: MYC and Chromatin, *Open Access J. Sci. Technol.* 3,(2015).
117. Cayrou C, Gregoire D, et al.: *Methods* 57(2), 158 (2012).
118. Cadoret JC, Meisch F, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(41), 15837 (2008).
119. Costas C, Sanchez Mde L, et al.: *Plant science* 181(3), 203 (2011).
120. Sarkies P, Reams C, et al.: *Mol Cell* 40(5), 703 (2010).
121. Rodriguez R, Miller KM, et al.: *Nat Chem Biol* 8(3), 301 (2012).
122. Biffi G, Tannahill D, et al.: *Nat Chem* 5(3), 182 (2013).
123. Wickramasinghe CM, Arzouk H, et al.: *DNA Repair (Amst)* 29, 83 (2015).
124. Brosh RM, Jr.: *Nature reviews. Cancer* 13(8), 542 (2013).
125. London TB, Barber LJ, et al.: *J Biol Chem* 283(52), 36132 (2008).
126. Zimmer J, Tacconi EMC, et al.: *Mol Cell* 61(3), 449 (2016).
127. Zhang DH, Fujimoto T, et al.: *Biochemistry* 49(21), 4554 (2010).
128. Mergny JL, De Cian A, et al.: *Nucleic Acids Res* 33(1), 81 (2005).
129. Joachimi A, Benz A, et al.: *Bioorg Med Chem* 17(19), 6811 (2009).
130. Jodoin R, Bauer L, et al.: *RNA* 20(7), 1129 (2014).
131. Arora A and Suess B: *RNA Biology* 8(5), 802 (2011).
132. Endoh T, Kawasaki Y, et al.: *Angew Chem Int Ed Engl* 52(21), 5522 (2013).
133. Mirihana Arachchilage G, Dassanayake AC, et al.: *Chem Biol* 22(2), 262 (2015).
134. Wang SR, Zhang QY, et al.: *Cell Chem Biol* 23(9), 1113 (2016).
135. Jayaraj GG, Pandey S, et al.: *RNA Biol* 9(1), 81 (2012).
136. Hirashima K and Seimiya H: *Nucleic Acids Res* 43(4), 2022 (2015).
137. Ji X, Sun H, et al.: *Nucleic Acid Ther* 21(3), 185 (2011).
138. Kumari S, Bugaut A, et al.: *Biochemistry* 47(48), 12664 (2008).
139. Shahid R, Bugaut A, et al.: *Biochemistry* 49(38), 8300 (2010).
140. Gomez D, Guedin A, et al.: *Nucleic Acids Res* 38(20), 7187 (2010).
141. Morris MJ, Negishi Y, et al.: *J Am Chem Soc* 132(50), 17831 (2010).
142. Derecka K, Balkwill GD, et al.: *Biochemistry* 49(35), 7625 (2010).
143. Wieland M and Hartig JS: *Chem Biol* 14(7), 757 (2007).
144. Huppert JL, Bugaut A, et al.: *Nucleic Acids Res* 36(19), 6260 (2008).
145. Yu CH, Teulade-Fichou MP, et al.: *Nucleic Acids Res* 42(3), 1887 (2014).
146. Agarwala P, Pandey S, et al.: *Biochimica et biophysica acta* 1840(12), 3503 (2014).
147. Bhattacharyya D, Diamond P, et al.: *Biochemistry* 54(10), 1879 (2015).
148. Luke B and Lingner J: *Embo j* 28(17), 2503 (2009).
149. Schoeftner S and Blasco MA: *Nature cell biology* 10(2), 228 (2008).
150. Xu Y, Suzuki Y, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33), 14579 (2010).
151. Phan AT: *The FEBS journal* 277(5), 1107 (2010).
152. Lopez De Silanes I, Stagno D'alcontres M, et al.: *Nat Commun* 1(33) (2010).
153. Biffi G, Tannahill D, et al.: *J Am Chem Soc* 134(29), 11974 (2012).
154. Flynn RL, Centore RC, et al.: *Nature* 471(7339), 532 (2011).
155. Cusanelli E and Chartrand P: *Front Genet* 6, 143 (2015).

Souhrn

Kozák J.: Role G-kvadruplexů v buněčné biologii

G-kvadruplexy (G4) se za půl století studia staly z přírodní hříčky jednou z nejstudovanějších struktur nukleových kyselin. Lokalizace G4 do funkčních oblastí DNA a RNA poukazuje na množství buněčných procesů, které je možné regulovat formováním G4. Důkazy o jejich existenci *in vivo*, stejně jako možnost jejich stabilizace prostřednictvím nízkomolekulárních látek – ligandů G4, přináší nové terapeutické možnosti zejména v oblasti onkologie, kde narušení funkce telomer, replikace DNA, či exprese onkogenů vede k inhibici růstu nádorových buněk.

Klíčová slova: G-kvadruplex, telomery, promotor, onkogen.

Summary

Kozák J.: The role of G-quadruplexes in cell biology

Within the last 50 years, G-quadruplexes (G4) have become one of the most studied structures of nucleic acids. Localization of the G4 into the functional regions of the DNA and RNA indicates a number of cellular processes that can be regulated by G4 formation. Evidence of their existence *in vivo* as well as the possibility of their stabilization by low molecular weight G4 ligands brings new treatment opportunities, particularly in the field of oncology, where telomere disruption, inhibition of DNA replication, or oncogenic expression may affect tumor cell growth.

Keywords: G-quadruplex, telomeres, promoter, oncogene.

PROTEOLYTICKÉ ENZYMY MOTOLICE JATERNÍ (*Fasciola hepatica*) JAKO CÍLOVÉ MOLEKULY PRO ANTIPARAZITÁRNÍ VAKCÍNY

Adrian Leontovyc

¹Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, ²1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova; leontovyc@uochb.cas.cz

Úvod

Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) je kosmopolitně rozšířený helmint parazitující v játrech a žlučovodech mnoha savců včetně člověka. Jedná se o jednoho z nejvýznamnějších parazitů hospodářských zvířat.

Je to 2 – 3 cm dlouhý červ se zploštělým tělem tvaru kopinatého listu. Životní cyklus fascioly je poměrně komplikovaný a zahrnuje dva hostitele. Dospělé fascioly žijí ve žlučovodech definitivního hostitele, kde kladou vajíčka, která se dostávají spolu se žlučí do tenkého střeva a dále s výkaly ven z těla hostitele. Jedna dospělá fasciola je schopná vyprodukovat obrovské množství vajec, u ovcí a skotu až desítky tisíc denně¹⁻³. Ve vodě se z vajíčka líhne larva zvaná miracidium, která aktivně vyhledává mezihostitele – plže z čeledi plovatkovitých (*Lymnaeidae*). Miracidium penetruje do těla mezihostitele a přeměňuje se ve stádium zvané sporocysta, uvnitř které se ze zárodečných buněk formují mateřské redie. Ty opouštějí sporocystu, dále se nepohlavně množí a nakonec produkují cercarie, které opouštějí tělo mezihostitele. Cercarie se ve vodě přichytí na vegetaci, vytvoří kolem sebe cystu, čímž vzniká stadium zvané metacercarie. Toto stadium je velmi odolné a schopné přežít i několik měsíců. Metacercarie jsou pozřeny spolu s vegetací definitivním hostitelem, v jehož tenkém střevě excystují a vzniká stadium označované jako nově excystovaný jedinec (NEJ, z anglického: „newly excysted juvenile“). NEJ migrují skrz střevní stěnu do břišní dutiny a dále do jater. Nezralé fascioly se po několika týdnech dostávají do žlučovodu, kde pohlavně dospívají a žijí po zbytek svého života, který může trvat až dvacet let⁴. Migrující stadia se živí tkáněmi, zatímco dospělé fascioly krví hostitele.

F. hepatica spolu s příbuzným druhem *F. gigantica* způsobují onemocnění zvané fasciolóza. Toto onemocnění je rozšířené především u ovcí a skotu, kde způsobuje obrovské ekonomické ztráty (celosvětově přes 3 miliardy USD ročně). Ovšem výjimkou není ani nákaza člověka, celosvětově je nakaženo cca 2,4 milionu lidí^{5, 6}.

Akutní fáze fasciolózy začíná pronikáním excystovaných parazitů skrz střevní stěnu do břišní dutiny a dále do jater. Tato invaze je spojena s mechanickým poškozením tkání, které vede k vnitřnímu krvácení, zánětům a alergickým reakcím. Nejčastějšími symptomy jsou vysoké horečky, silné bolesti břicha, nevolnost a vyrážka. Když se motolice dostanou do žlučovodů, přechází nemoc do fáze chronické. Dochází k hypertrofii žlučovodů, jejich zánětu a následnému ucpávání, což se projevuje nevolností, bolestí břicha, průjmami a žloutenkou. Časté jsou také žlučnickové záchvaty a tvorba žlučových kamenů.

Pro léčbu fasciolózy existuje několik účinných antiparazitik, v současné době se používá výhradně triklabendazol. Masové používání tohoto léčiva však vedlo ke vzniku rezistence, která byla pozorována již v roce 1995⁷ a od té doby jsou rezistentní kmeny fascioly stále častější. Navíc přítomnost reziduí léčiv a antibiotik v masu není v potravinářském průmyslu žádoucí, proto se výzkum soustředí především na vývoj účinných vakcín proti fasciolóze.

Tento článek se zaměřuje na proteolytické enzymy fasciol, popis jejich fyziologické role a zhodnocení jejich potenciálu jako cílových molekul pro vývoj vakcín.

Proteasy fasciol a jejich význam pro fyziologii parazita a infekci hostitele

Proteolytické enzymy (proteasy, peptidasy) jsou nezbytnou součástí fyziologie všech živých organismů. Katalyzují hydrolytické štěpení peptidové vazby v proteinech a peptidech. Proteasy můžeme rozdělit podle několika kritérií. Podle místa štěpení substrátu rozeznáváme endopeptidasy štěpící uvnitř polypeptidového řetězce a exopeptidasy, které odštěpují aminokyseliny či dipeptidy z N-konce (aminopeptidasy) nebo C-konce (karboxypeptidasy) řetězce. Podle mechanismu katalýzy, který je určen katalytickými aminokyselinami v aktivním místě, se proteasy dělí do tříd na cysteinové, serinové, aspartátové, glutamátové, threoninové a metaloproteasy. Třetí možností je klasifikace proteas na základě podobnosti jejich prostorové struktury do klanů, které se dále dělí podle podobnosti sekvencí na rodiny a subrodiny⁸.

Proteasy parazitů sajících krev jsou již od devadesátých let intenzivně zkoumány. Důvodem je především jejich zásadní role v degradaci krevních proteinů, které parazitům slouží jako zdroj živin, a při interakci s hostitelem. Proto představují cílové molekuly pro vývoj nových léčiv nebo vakcín proti mnoha parazitárním onemocněním, jako jsou například malárie, schistosomóza, leishmanióza nebo Chagasova choroba⁹. Vzhledem k vysoké míře exprese jsou některé proteasy také využívány jako serodiagnostické markery¹⁰.

U fascioly zprostředkovávají proteasy řadu zásadních životních funkcí, zejména penetraci tkání hostitele, migraci, trávení potravy nebo modulaci fyziologických funkcí a imunitního systému hostitele¹¹. Výzkum zabývající se proteasami fasciol je převážně zaměřen na skupinu cysteinových proteas katepsinového typu, a to především na katepsiny B a L. Ostatní typy proteas zůstávají opomíjené a informací o nich je v literatuře pokaždé málo.

Katepsiny typu B

Katepsiny B mají unikátní schopnost štěpit jako endopeptidasa i jako exopeptidasa díky strukturnímu motivu flexibilní smyčky, která reguluje vstup substrátu do aktivního místa a tím přepíná proteolytickou aktivitu katepsinu B z endopeptidasové na exopeptidasovou¹².

Katepsiny B z *F. hepatica* (FhCB) patří mezi hlavní proteolytické enzymy NEJ, ovšem různé izotypy se vyskytují i u dalších vývojových stádií. Proteomická a transkriptomická analýza ukázala, že u fasciol existuje minimálně deset různých izotypů katepsinů B¹³. Katepsiny FhCB1, FhCB2, FhCB3 a FhCB4 jsou exprimovány a sekretovány NEJ^{14,15}, jejich exprese se snižuje, jakmile parazit penetruje do jater a je úplně potlačena u dospělých fasciol. To naznačuje jejich roli při excystaci, penetraci střešní stěny hostitele a migraci skrz jaterní tkáň^{16,17}. Tuto hypotézu podporuje fakt, že ortology katepsinů B příbuzné motolice *F. gigantica* FgCB2 a FgCB3 jsou schopné štěpit kolagen a fibronectin, což umožňuje parazitovi procházet hostitelskou tkání¹⁸. FgCB2 navíc štěpí imunoglobuliny, proto se předpokládá jeho role v boji proti imunitnímu systému hostitele¹⁸. RNAi experimenty ukázaly, že umlčení FhCB1 genu vede k významné redukci penetrace střešní stěny hostitele juvenilními parazity. Inhibice katepsinů B selektivním inhibitorem vedla ke ztrátě pohyblivosti a životaschopnosti juvenilů¹⁹. Katepsin FhCB5 je exprimován pouze u nedospělých fasciol v játrech, FhCB7-10 jsou přítomné pouze u dospělců. FhCB6 se nachází u obou těchto stádií parazitujících v játrech hostitele. Vzhledem k tomu, že FhCB5-10 jsou proteasy exprimované a sekretované pouze u vývojových stádií fasciol parazitujících v játrech, předpokládá se, že by mohly hrát roli v trávení živin a ovlivňování fyziologie hostitele¹³.

Katepsiny typu L

Katepsiny L (FhCL) patří mezi nejvíce exprimované proteasy motolic, dospělci jsou schopni produkovat až 1 µg FhCL za hodinu, což je asi 5 % z celkového množství proteinů a 80 % všech sekretovaných proteinů^{13,20}. Proto jsou FhCL považovány za hlavní enzymy umožňující přežití a rozmnožení parazita v těle hostitele. Zatím bylo popsáno 5 různých izotypů FhCL. Jejich exprese je během života parazita regulována a každé vývojové stadium produkuje jiné izotypy podle aktuální potřeby. Dospělci, kteří žijí ve žlučovodech a živí se krví, produkují FhCL1, FhCL2 a FhCL5. Naproti tomu NEJ živící se tkáněmi, kterými pronikají, exprimují pouze FhCL3 a FhCL4²¹.

FhCL1, FhCL2 a FhCL5 jsou považovány za hlavní trávicí proteasy dospělých fasciol degradující krevní proteiny hostitele, které slouží jako zdroj živin²². Jsou sekretovány do střeva parazita, které je slepé a je často (cca každé tři hodiny) vyprazdňováno regurgitací („zvracením“). Tím se proteasy dostávají do přímého kontaktu s vnitřním prostředím hostitele, kde mohou plnit i jiné funkce, než je trávení hemoglobinu. Příkladem takových funkcí je štěpení imunoglobulinů, což vede k ovlivňování imunitního systému hostitele. Na myším modelu bylo dokázáno, že fascioly jsou schopné potlačit imunitní odpověď Th1 lymfocytů

a nakažené myši vykazují pouze aktivitu Th2 lymfocytů²².

FhCL3 je v hojné míře exprimovaný a sekretovaný NEJ, jeho exprese je potlačena, jakmile parazit dospívá. Tento enzym je jako jeden z mála schopen štěpit kolagen, za což vděčí své unikátní substrátové specifitě (FhCL3 je schopen v aktivním místě vázat sekvenční motiv Gly-Pro, který se často opakuje právě v kolagenu)²³. Díky této vlastnosti je FhCL3 považován za esenciální enzym používaný NEJ k pronikání střešní stěnou hostitele a k migraci do jater. Kolagen je v menší míře štěpen i FhCL2. Vzhledem k tomu, že je FhCL2 exprimován až když se fasciola dostane do jater, předpokládá se, že by mohl hrát roli při migraci játry do žlučodů²⁴.

Ostatní proteasy fasciol

Další cysteinové proteasy u fascioly podrobně zkoumány nebyly a v literatuře o nich jsou pouze zmínky. Patří sem například asparaginy endopeptidasa, která je také nazývána legumain¹¹.

Ze serinových proteas byla popsána dipeptidylpeptidasa II, která odštěpuje dipeptidy z N-konců proteinů²⁵ a prolylkarboxypeptidasa¹³. Obě proteasy pravděpodobně slouží fasciolám jako trávicí enzymy uplatňující se v poslední fázi trávení, kde z menších peptidů vzniklých degradací hemoglobinu odštěpují dipeptidy, které mohou být absorbovány střešní stěnou a sloužit jako živiny. Tuto teorii podporuje i fakt, že jsou oba enzymy exprimovány dospělými fasciolami a chybí u NEJ¹³.

Ze skupiny metaloproteas byl u fasciol zatím zkoumán pouze jeden enzym – leucin aminopeptidasa (FhLAP). Jak název napovídá, jedná se o exopeptidasu štěpící z N-konce proteinového řetězce a preferující štěpení za aminokyselinou leucinem. Ovšem je schopna štěpit i za argininem a fenylalaninem. FhLAP byla nejprve pomocí imunohistochemických metod identifikována v epiteliálních buňkách gastrodermis²⁶, později i v exkrečně sekrečních produktech dospělých červů²⁷. Předpokládá se, že se uplatňuje v terminální fázi trávení hostitelských proteinů odštěpováním jednotlivých aminokyselin, které jsou následně absorbovány střevními buňkami a použity jako základní živiny.

Proteolytické enzymy fasciol jako cílové molekuly pro vývoj vakcín

Přestože je léčba triklabendazolem účinná, není nejlepším řešením pro kontrolu fasciolózy – je nákladná, rezidua léčiva se dostávají do masa zvířat a do prostředí a především si proti tomuto léčivu motolice snadno vytváří rezistenci. Rezistentní kmeny motolice jaterní jsou již široce rozšířené v Evropě a byly potvrzeny i v Austrálii a Jižní Americe²⁸⁻³⁰. Proto je nutné hledat alternativní strategie pro kontrolu fasciolózy. Bezpečný levný přístup bez negativních dopadů představuje očkování, a proto jsou vakcíny proti fasciolóze již několik desetiletí předmětem intenzivního výzkumu. Nicméně i přes veškeré úsilí zatím neexistuje žádný komerčně použitelný preparát.

Fascioly jsou v těle hostitele přímo vystaveny jeho imunitnímu systému a proto si vytvořily mechanismy,

jak imunitní odpověď modulovat. Jsou schopné potlačit odpověď Th1 lymfocytů za současného zvýšení odpovědi Th2 lymfocytů. Suprese Th1 lymfocytů vede ke snížení obranyschopnosti organismu hostitele, jak bylo dokázáno experimentem, kdy byly myši nakažené fasciolózou koinfikovány bakterií *Bordetella pertusis* (původce černého kašle). Myši nakažené fasciolou měly výrazně potlačený Th1 lymfocyty a díky tomu byly mnohem méně schopné bránit se proti bakteriální infekci. Navíc se myším nakaženým fasciolou Th1 odpověď nezvýšila ani po podání vakcíny proti černému kašli³¹. Fasciola tak snižuje obranyschopnost hostitele nejenom proti jí samotné, ale i proti ostatním patogenům.

Savčí hostitelé infikovaní fasciolou si vytváří specifické protilátky, ale přesto nebylo pozorováno žádné poškození NEJ bílými krvinkami. Buňky imunitního systému jsou sice schopné adherovat na povrch NEJ, ale v přítomnosti jejich exkrečně – sekrečních produktů nejsou efektivní. Předpokládá se, že to je způsobeno katepsiny L, které jsou hlavní složkou exkrečně – sekrečních produktů fasciol a jsou schopné štěpit protilátky IgG³². Specifické protilátky proti FhCL vytvářené lidským hostitelem jsou především IgG4, což odpovídá potlačení Th1 a zesílení Th2 odpovědi³³.

Bylo prokázáno, že organismus definitivního hostitele je schopen si vytvořit rezistenci proti fasciole po vakcinaci metacerkáriemi atenuovanými ozářením (až 89 % redukce počtu fasciol oproti kontrolním neočkovaným zvířatům) nebo jejich antigeny³⁴⁻³⁶. Primárním úkolem pro vytvoření účinné molekulární vakcíny proti fasciolóze je identifikovat klíčové antigeny, na které cílí imunitní systém.

Za takové jsou považovány proteiny sekretované fasciolou, jejichž důležitou složku představují proteasy, zejména katepsiny B a L a FhLAP³⁶. Jako první byl testován vakcinační potenciál katepsinu L, který je fasciolou exprimován ve velkých množstvích, je vysoce imunogenní a jeho různé formy jsou exprimovány ve všech vývojových stádiích parazita. Účinnost očkování se určuje jako redukce počtu dospělých fasciol u vakcinovaného zvířete oproti kontrolnímu nevakcinovanému, pro komerční vakcínu je nutné dosáhnout redukce vyšší než 80 %. Očkování skotu při použití FhCL1 vedlo k 38 – 69 % snížení počtu fasciol³⁷, u ovcí došlo při použití FhCL1 a FhCL2 k 33 – 34 % redukcí³⁸. Experimenty byly prováděny i na krysách, kde vakcinace pomocí FhCL3 zredukovala počet parazitů o 52 %³⁹, použitím bakteriálních inkluzních tělísek obsahujících rekombinantní FhCL1 bylo dosaženo 70 – 80 % snížení⁴⁰.

Katepsiny B jsou dalšími dobrými kandidáty – jsou imunogenní a jsou exprimovány hlavně nedospělými

fasciolami, které jsou vhodnějším cílem pro imunitní systém než dospělý parazit. FhCB se účastní excystace a penetrace tkání hostitele, takže by se vakcínou zprostředkovaná imunitní odpověď mohla spustit dřív, než parazit pronikne střešní stěnou do peritonea⁴¹. Vakcína založená na tomto antigenu poskytovala u krys 60 % ochranu⁴². S cílem zvýšit protektivní efekt katepsinových vakcín se dále experimentovalo s různými kombinacemi katepsinů B a L, což vedlo ke značnému zlepšení. Například kombinace FhCB2 a FhCL5 poskytovala až 83 % ochranu⁴².

Další proteasou používanou v experimentálních vakcínách je FhLAP, a to jak samotná, tak v kombinaci s FhCL. U ovcí vakcína s FhLAP snížila počet fasciol oproti kontrole o 89 %, v kombinaci s FhCL1 a FhCL2 to bylo 79 %. U obou pokusů byla získána také zvířata s úplnou eliminací fasciolózy, což ukazuje vysokou efektivitu vakcíny. Detailní analýza ukázala, že vyvolaná imunitní odpověď eliminovala nedospělé migrující fascioly ještě předtím, než se dostaly do žlučových³⁸. FhLAP tak představuje slibného kandidáta pro výrobu vakcíny proti fasciolóze. Konkrétní aplikace tohoto typu proteasy ale vyžaduje další výzkum, jak ukazují neúspěšné testy na buvolích, kteří byli nakaženi příbuznou fasciolou *F. gigantica* a očkováni pomocí FgLAP⁴³.

Závěr

Motolice rodu *Fasciola* jsou globálním problémem pro potravinářský průmysl, kde působí roční ekonomické ztráty v řádech miliard dolarů a významný je také výskyt fasciolózy u člověka. Vzhledem k rozšířené rezistenci se ukazuje, že kontrola fasciolózy pomocí léčiv není udržitelná a z tohoto důvodu se naděje upínají k očkování. Proteolytické enzymy jsou klíčové pro patofyziologii fasciol, proto představují nadějně vakcinační antigeny. Řada studií prokázala, že očkování hospodářských zvířat pomocí některých proteas vede k poměrně vysokému stupni ochrany před fasciolózou. V dalším období lze očekávat, že vývoj bude směřován na vakcíny obsahující několik proteasových antigenů nebo jejich kombinaci s dalšími proteiny (jako jsou např. FABP proteiny vážící mastné kyseliny nebo glutathion S-transferasa^{44, 45}). Dalším nadějným trendem jsou vakcíny obsahující proteolyticky aktivní formy proteas, pro které byl prokázán zesilující účinek jako vakcinační adjuvans⁴⁶.

Poděkování

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

Literatura

1. Valero MA, Panova M, et al.: *J Parasitol* 88(2), 308 (2002).
2. Boray JC: *Adv Parasitol* 7(95) (1969).
3. Happich FA and Boray JC: *Aust Vet J* 45(7), 329 (1969).
4. Volf P, Horák, P.: *Paraziti a jejich biologie*, Praha: Triton (2007).
5. Curtale F, Hassanein YA, et al.: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99(8), 599 (2005).
6. Molina-Hernandez V, Mulcahy G, et al.: *Vet Parasitol* 208(1-2), 101 (2015).
7. Overend DJ and Bowen FL: *Aust Vet J* 72(7), 275 (1995).
8. Rawlings ND, Barrett AJ, et al.: *Nucleic Acids Res* 46(D1), D624 (2018).

Literatura (pokračování)

9. Mckerrow JH, Caffrey C, et al.: *Annu Rev Pathol* 1(497) (2006).
10. Sajid M and Mckerrow JH: *Mol Biochem Parasitol* 120(1), 1 (2002).
11. Kasny M, Mikes L, et al.: *Adv Parasitol* 69(205) (2009).
12. Illy C, Quraishi O, et al.: *J Biol Chem* 272(2), 1197 (1997).
13. Robinson MW, Menon R, et al.: *Mol Cell Proteomics* 8(8), 1891 (2009).
14. Tkalcovic J, Ashman K, et al.: *Biochem Biophys Res Commun* 213(1), 169 (1995).
15. Cancela M, Acosta D, et al.: *Biochimie* 90(10), 1461 (2008).
16. Wilson LR, Good RT, et al.: *Exp Parasitol* 88(2), 85 (1998).
17. Smooker PM, Jayaraj R, et al.: *Trends Parasitol* 26(10), 506 (2010).
18. Meemon K and Sobhon P: *Parasitol Res* 114(8), 2807 (2015).
19. Beckham SA, Piedrafita D, et al.: *Int J Biochem Cell Biol* 41(7), 1601 (2009).
20. Mcgonigle L, Mousley A, et al.: *Int J Parasitol* 38(2), 149 (2008).
21. Robinson MW, Tort JF, et al.: *Mol Cell Proteomics* 7(6), 1111 (2008).
22. Dalton JP, Neill SO, et al.: *Int J Parasitol* 33(11), 1173 (2003).
23. Corvo I, Cancela M, et al.: *Mol Biochem Parasitol* 167(1), 41 (2009).
24. Robinson MW, Corvo I, et al.: *PLoS Negl Trop Dis* 5(4), e1012 (2011).
25. Carmona C, Mcgonigle S, et al.: *Parasitology* 109 (Pt 1)(113) (1994).
26. Acosta D, Goni F, et al.: *J Parasitol* 84(1), 1 (1998).
27. Marcilla A, De La Rubia JE, et al.: *Clin Vaccine Immunol* 15(1), 95 (2008).
28. Fairweather I: *Vet Parasitol* 180(1-2), 133 (2011).
29. Brockwell YM, Elliott TP, et al.: *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 4(1), 48 (2014).
30. Kelley JM, Elliott TP, et al.: *Trends Parasitol* 32(6), 458 (2016).
31. Brady MT, O'Neill SM, et al.: *Infect Immun* 67(10), 5372 (1999).
32. Berasain P, Carmona C, et al.: *Exp Parasitol* 94(2), 99 (2000).
33. Hassan MM, Abbaza BE, et al.: *J Egypt Soc Parasitol* 34(3), 857 (2004).
34. Haroun ET and Hillyer GV: *Vet Parasitol* 20(1-3), 63 (1986).
35. Hillyer GV: *J Helminthol* 79(3), 241 (2005).
36. Mcmanus DP and Dalton JP: *Parasitology* 133 Suppl(S43) (2006).
37. Dalton JP, Mcgonigle S, et al.: *Infect Immun* 64(12), 5066 (1996).
38. Piacenza L, Acosta D, et al.: *Infect Immun* 67(4), 1954 (1999).
39. Reszka N, Cornelissen JB, et al.: *Vaccine* 23(23), 2987 (2005).
40. Kesik M, Jedlina-Panasiuk L, et al.: *Vaccine* 25(18), 3619 (2007).
41. Law RH, Smooker PM, et al.: *Infect Immun* 71(12), 6921 (2003).
42. Jayaraj R, Piedrafita D, et al.: *Vet Parasitol* 160(3-4), 230 (2009).
43. Raina OK, Nagar G, et al.: *Acta Trop* 118(3), 217 (2011).
44. Toet H, Piedrafita DM, et al.: *Int J Parasitol* 44(12), 915 (2014).
45. Morrison CA, Colin T, et al.: *Vaccine* 14(17-18), 1603 (1996).
46. Tallima H, Dalton JP, et al.: *Front Immunol* 6(130) (2015).

Souhrn

Leontovč A.: Proteolytické enzymy motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) jako cílové molekuly pro antiparazitární vakcíny

Fasciolóza je parazitární onemocnění způsobované dvěma druhy motolic rodu *Fasciola*. Jedná se o jednu z nejvýznamnějších parazitóz hospodářských zvířat, vzácná není ani nákaza člověka. Masivní používání léčiva triclabendazolu vedlo k tvorbě rezistentních kmenů fasciol, které jsou v současnosti velmi rozšířené. Proto se věnuje mimořádné úsilí vývoji vakcíny. Proteolytický systém fasciol se účastní řady procesů nezbytných pro parazita, od líhnutí miracidii přes pronikání tělem hostitele a ovlivňování jeho fyziologických procesů až po trávení živin. Z tohoto důvodu jsou proteolytické enzymy atraktivním cílem pro vývoj vakcín proti fasciolóze. Tento článek pojednává o nejdůležitějších proteasách fasciol a jejich použití jako vakcinačních antigenů.

Klíčová slova: Fasciola, proteasa, katepsin, vakcína

Summary

Leontovč A.: Proteolytic liver fluke enzymes (*Fasciola hepatica*) as target molecules for antiparasitic vaccines

Fasciolosis is a parasitic infection caused by two species of flukes from the genus *Fasciola*. It is considered one of the most important diseases of livestock, but human infection is also common. Massive usage of the drug triclabendazole led to the development of resistant flukes, which are currently spread out in many countries. Hence there is much effort put into development of vaccines against fasciolosis. Proteolytic system of *Fasciola* plays crucial role in number of processes such as hatching, tissue invasion, nutrient intake or modulation of the host physiology. For that reason proteases of *Fasciola* are attractive targets for vaccine development. This paper summarizes current knowledge about the most important proteases from *Fasciola hepatica* and their vaccination potential.

Keywords: Fasciola, protease, cathepsin, vaccine

O B S A H

Úvod	33
Králová B.: Životní jubileum profesora Káše	34
Barchánková L, Magdolenová A, Hájek M.: 3D buněčné sféroidy jako modely solidních nádorů	35
Benýšek J.: Cysteinové proteasy jako cílové molekuly v biomedicině	40
Kozák J.: Role G-kvadruplexů v buněčné biologii	45
Leontovyč A.: Proteolytické enzymy motolice jaterní (<i>Fasciola hepatica</i>) jako cílové molekuly pro antiparazitární vakcíny	52

C O N T E N T

Editorial	33
Králová B.: Professor Káš Jubilee	34
Barchánková L, Magdolenová A, Hájek M.: 3D cell spheroids as a solid tumor models	35
Benýšek J.: Cysteine proteases as drug targeted molecules in the biomedicine	40
Kozák J.: The role of G-quadruplexes in cell biology I	45
Leontovyč A.: Proteolytic liver fluke enzymes (<i>Fasciola hepatica</i>) as target molecules for antiparasitic vaccines	52

REDAKČNÍ RADA

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

POKYNY PRO AUTORY

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

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

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

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

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers. In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

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

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

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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

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

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

BIOPROSPECT

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

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

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

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

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

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