
B I PROSPECT

Šestnáctý ročník
Číslo 1/2006

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

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

**zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)**

a

**člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)**

Redakční rada

RNDr. Tomislav Barth, DrSc
ÚOCHB AVČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
(Editor)

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

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

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

Doc. Ing. Ladislav Fukal, CSc
VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

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

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

RNDr. Tomáš Vaněk, CSc
ÚOCHB AVČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Bc. Pavel Jenč
VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6

BIOPROSPECT

16th Volume
No. 1/2006

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

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

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

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

For more information contact the editorial board or directly:

Ladislav Fukal, Ph.D. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 445 137

e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

vítám Vás již v šestnáctém ročníku našeho bulletinu *Biopropect* ve kterém Vás již tradičně chceme seznamovat s aktuálními tématy biotechnologií, představovat jednotlivé biotechnologické subjekty a přinášet informace o naší společnosti. V každém případě chceme zachovat tištěnou formu našeho bulletinu i když to není levná záležitost. Nicméně doufám, že již v nejbližších dnech zpřístupníme naši webovou stránku (<http://bts.vscht.cz>), kde budou umístěny základní informace o Biotechnologické společnosti, seznam zajímavých webových stránek i aktuální informace. Dovoluji si Vás požádat o Vaše názory a náměty jak k náplni *Biopropectu*, tak webových stránek. Uvítáme Vaše příspěvky i velice krátké, neboť různé informace i oznámení mohou být sděleny v několika větách s odkazem na podrobnější zdroj informací. Takové sdělení Vás nevyčerpá a čtenáři Vám budou vděční. Pestrost informací z široké oblasti biotechnologií je přesně to po čem toužíme. Nikdo totiž nedokáže sledovat pokrok vědy i to co se kolem děje v nejširších souvislostech. Informace z jiných oblastí nám často pomůže vyřešit naše profesní problémy nebo alespoň nás udržet v rovině všeobecné informovanosti. Ukazuje se však, že ani tištěné publikace ani internetové stránky nejsou vhodným médiem pro sdělování velmi aktuálních informací. Čtení bulletinu odložíme často stranou na pozdější dobu aniž bychom jej prolistovali a webové stránky také neotvíráme každý den, jak si to bohužel někteří naivkově představují (jejich webové stránky jsou pochopitelně ty nejdůležitější). Jediným prostředkem jak na něco aktuálně upozornit je krátké e-mailové sdělení. Tento servis využíváme pro členy Rady biotechnologické společnosti a kontaktní osoby našich institucionálních členů. Vzhledem k tomu, že z praktických důvodů nemůžeme tyto informace třídit, je na kontaktních osobách, aby posoudily, zda je vhodná informace postoupit dále. Pokud kterýkoliv z našich členů chce dostávat tyto nepravidelné e-mailové informace (zejména o různých seminářích, kurzech, symposiích, grantech, nabízených zaměstnáních, stážích, knihách a pod.), ať nám sdělí svou e-mailovou adresu a rádi jej do této služby zařadíme.

V letošním roce nebudeme samostatně organizovat žádné větší symposium, ale omezíme se jen na běžnou přednáškovou činnost. O některých přednáškách Vás dále informujeme, další mimo Prahu (na podzim) jsou v jednání a seznámíme Vás s nimi ve druhém čísle *Biopropectu* a na našich webových stránkách.

V tomto čísle bulletinu Vám přinášíme informaci o biotechnologiích na jižní Moravě, které připravil náš partner Jihomoravské inovační centrum.

Znovu připomínáme, abyste věnovali pozornost jím organizovanému biochemickému portálu www.gate2biotech.com (a také si Vás dovoluji upozornit na právě vydanou ročenku "Czech Biotech Report" – v anglickém jazyce). V odborných příspěvcích přinášíme pestrou paletu námětů týkajících se proteomiky, biomedicíny a geneticky modifikovaných organismů. Pro aktuální informace o Evropské federaci biotechnologií a jí sponzorovaných symposiích se nezapomeňte podívat na webovou stránku www.efb-central.org.

V tomto čísle naleznete též složenku k uhrazení členského příspěvku za letošní rok. Členský příspěvek můžete uhradit i bankovním převodem, ale nezapomeňte uvést jako specifický symbol Vaše členské číslo, které naleznete ve Vaší adrese *Biopropectu*, který jste právě obdrželi. Zaplacení příspěvku laskavě neodkládejte. Jak vidíte, udržujeme náš členský příspěvek nezměněný na nejnižší možné výši, přestože náklady na tisk, poštovné, atd. stále rostou. Je proto nutné, abychom alespoň tuto minimální úhradu dostali co nejdříve. Zvýšíte-li svůj příspěvek dobrovolně, budeme Vám vděční.

Těším se na spolupráci s Vámi

Váš

Jan Káš

***Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech***

a

Ichtyologická sekce České zoologické společnosti



pořádají
vědeckou konferenci s mezinárodní účastí

IX. Česká ichtyologická konference

4. – 5. 5. 2006, zasedací místnost MěÚ Vodňany

konference je pořádána
v rámci XVI. Vodňanských rybářských dnů a k 85.výročí založení VÚRH

Základní tématické okruhy: ichtyologie, ichtyocenózy, biodiverzita, hydrobiologie, genetika a reprodukce ryb, vodní toxikologie, choroby ryb a dalších vodních živočichů, záchranné chovy, akvakultura a další příbuzná témata.

Příspěvky: O zařazení příspěvku do programu konference budou účastníci informováni. Příspěvky budou lektorovány a otištěny ve sborníku. Předpokládaná délka vystoupení max. 20 minut (včetně diskuse).

Vědecký výbor konference: Ing. Jan Kouřil, Ph.D., doc. Ing. Otomar Linhart, DrSc.

Organizační výbor konference: Ing. Blanka Vykusová, CSc., Jarmila Moudrá, Pavla Nováková, Anna Kocová, Petra Martínková, Marie Pečená.

Předběžný časový harmonogram konference:

4. května (čtvrtek): 9 – 10 h – prezentace účastníků
10 – 18 h – zahájení a 1.den jednání
5. května (pátek): 8 – 12 h – 2. den jednání a ukončení

Z dalšího programu VRD 2006:

Čtvrtek od 19 h Rybářské toulky po světě (diskusní program, filmy) – Kulturní dům
Sobota 8 – 12 h Rybí trh (náměstí Svobody)
9 – 14 h Den otevřených dveří SRŠ a VOŠ Vodňany a VÚRH JU Vodňany

EUROFISH magazine

Časopis EUROFISH magazine (ISSN 1020-9956) je vydáván v Dánsku a je zaměřen na střední a východní Evropu. Je součástí Fish info network, kde kromě výše jmenované organizace najdeme 6 dalších sítí, které informačně pokrývají zbytek světa, Infofish (Asie a Pacifik), Infopeche (Afrika), Infopesca (Latinská Amerika), Infosamak (Arabsky mluvící oblasti), Ingoyu (Čína) a Globefish (FAO Fisheries Department).

Informace o časopise najdete na adrese www.eurofish.dk. Vychází 6x ročně a jeho informační struktura je zaměřena na charakteristiku profilu rybářské a zpracovatelské aktivity jednotlivých zemí, akvakultury, obchodu a trhů a profilů jednotlivých ryb a zákonů. Časopis je zaplněn insercí, nabízející jak rybí produkty tak zpracovatelská zařízení.

Tomáš Barth, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha 6



SEMINÁŘ O OCHRANĚ DUŠEVNÍHO VLASTNICTVÍ

Jak chránit duševní vlastnictví v oblasti biotechnologií vzniklé na výzkumných pracovištích i v podnicích v České republice, to je námět odborného semináře, který se uskuteční v úterý 6. června 2006 v hotelu Adalbert v Praze 6 (areál Břevnovského kláštera).

Na semináři vystoupí odborníci, kteří se v ČR zabývají problematikou patentů, ochranných známek, užitných vzorů, průmyslových vzorů a licencí. Účastníci se budou moci seznámit také s konkrétními příklady úspěšně ochráněných technologií u nás i v zahraničí.

Seminář, který organizuje společnost Inova Pro s.r.o., je součástí probíhajícího projektu, jehož cílem je podpořit spolupráci pražských výzkumných a vývojových pracovišť s podniky na území hlavního města v oblasti biotechnologií a motivovat vznik budoucí sítě biotechnologických firem v Praze. Projekt, spolufinancovaný ze strukturálních fondů a státního rozpočtu ČR, spojuje vzdělávání v oblasti biotechnologií, především senzorů a biosenzorů, s komplexem aktivit zaměřených na efektivní zavádění výsledků vědy a výzkumu do praxe. Dále podporuje vzdělávání účastníků projektu k podpoře podnikání.

Podrobné informace o semináři a dalších vzdělávacích akcích probíhajících v rámci projektu najdete na webových stránkách www.sbb.cz a www.inovapro.cz.

Jiřina Shrbená, Inova Pro s.r.o.



CHITOSANPEROS

Ve dnech 26. a 27. ledna proběhlo ve Ville Lanné v Praze 6 zasedání projektu CHITOSANPEROS (N^o 508421), který je zaměřen na využití nových derivátů chitosanu pro prevenci a léčbu potíží a nemocí trávicího traktu jako jsou ulcerativní kolitida, Crohnova choroba, celiakie, hypercholesterolemie a nadváhy. Koordinátorem tohoto projektu je profesor Franco Rustichelli z Polytechnické university v Anconě. Jedná se o projekt CRAFT 6. rámcového programu EU zaměřený na vývoj a aplikace. Zúčastněny jsou jak výzkumné instituce, university i malé a střední podniky.

V rámci projektu budou studovány interakce cholátových solí derivátů chitosanu s různými triacylglyceroly. Cílem bude popsat specifitu a vazebnou kapacitu těchto derivátů při snižování sorpce lipidů a resorpce cholesterolu v trávicím traktu. Zvýší se tím zeštíhlující efekt chitosanu. Pro přímou aplikaci do potravin se vyvíjí mikronizovaný chitosan, který má zlepšené technologické i organoleptické vlastnosti. Deriváty tohoto chitosanu budou testovány v tabletách, kapslích i v nápojích.

Deriváty chitosanu jsou testovány i jako nosiče léků, umožňující cílenou aplikaci léčiv v tlustém střevu. Vedle toho je sledován vliv chitosanu na průběh a léčbu celiakie a zánětlivých onemocnění tlustého střeva, ke kterým patří ulcerativní kolitida a Crohnova choroba. Vedle léčebného efektu je sledován i účinek chitosanu na složení střevní bakteriální mikroflóry. Chitosan je možné použít i jako základní surovinu pro náhradu cereálií v bezlepkové dietě.

Jan Kopečný, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Praha 4

JIŽNÍ MORAVA MÁ PRO BIOTECHNOLOGIE DOBRÉ PŘEDPOKLADY

Michal Kostka, biotech sector manager,
Jihomoravské inovační centrum, U vodárny 2, 616 00 Brno

Jinde nevídané podhoubí pro rozvoj biotechnologického podnikání má Jihomoravský kraj (JMK). Biotechnologický sektor v České republice jako celek v současnosti zaostává za ostatními vyspělými zeměmi Evropské unie. Rozvoj sektoru dostupnými nástroji by měl být cílem na všech úrovních. Z analýz provedených Jihomoravským inovačním centrem (JIC) plyne, že JMK má předpoklady rozvinout biotechnologický sektor zejména díky rozvinutému a postupně se lepšícímu univerzitnímu školství, které ročně vzdělává přes 60 tisíc studentů, z toho přibližně 10 tisíc studuje v biotechnologických oborech a dalších přibližně 20 tisíc studentů v technických oborech, které mohou být využity při aplikaci biotechnologií, několika stovkám pracovišť, které se věnují základnímu i aplikovanému výzkumu, existujícím biotechnologickým firmám a více než 100 tisícům zaměstnanců v průmyslových oborech, v kterých biotechnologie nalézají uplatnění. Významné jsou také rozvojové projekty, jejichž hodnota přesáhne 5,5 miliardy Kč (kampus MU, MediPark, INBIT a další), již úspěšně navázaná mezinárodní spolupráce a výhodná geografická poloha. Zásadou JIC zde existuje také schopnost aktivně podporovat, „inkubovat“ biotechnologické firmy a pomáhat zahájeným a probíhajícím biotechnologickým projektům.

Tvrzení, že JMK má předpoklady stát se nejsilnějším regionem v ČR v oblasti biotechnologií, je ve světle uvedeného ambiciózní ale reálné. Již dnes se zde vyrábějí pokročilé diagnostické sety (firmy BioVendor, Test-Line), na zakázku připravují proteiny a protilátky (Clonestar Biotech, Moravian Biotechnology), vyvíjejí léky (I.Q.A., Bioveta, PLIVA) nebo realizují špičkové technologie z oblasti eko-biotechnologie (Ecofluid Group).

Jsou zde i špičková výzkumná pracoviště, například Recetox, což je výzkumné pracoviště Katedry chemie

životního prostředí a ekotoxikologie přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Cílem činnosti pracoviště je přispět k rozvoji environmentální chemie, ekotoxikologie a analýzy rizik v podmínkách ČR. Za zmínku stojí i Laboratoř funkční genomiky a proteomiky (pracoviště se zabývá výzkumem biologicky významných molekul), Centrum biostatistiky a analýz, Národní centrum pro výzkum biomolekul (zaměřené na strukturální chemii).

Jak se budou biotechnologie v JMK rozvíjet do roku 2013?

K tradičním biotechnologickým aplikacím přibudou inovativní aplikace čerpající z pokroku v strukturální chemii, genovém inženýrství, informatice a podobně. Pouze v projektu INBIT se počítá se vznikem a podporou 30 – 40 firem do roku 2008. Mezi léty 2008 – 2013 se toto číslo minimálně z trojnásobí. V návaznosti na projekt INBIT je odhadován vznik 200 nových pracovních míst do roku 2008. V letech 2008 – 2013 lze předpokládat vznik dalších 400 – 500 špičkových pracovních příležitostí.

Rozvoj spojený s funkcí INBIT představuje odhadem 70 % celkového očekávaného rozvoje v oblasti inovativního podnikání v JMK. Celkový rozvojový potenciál JMK v oblasti biotechnologií, měřeno vznikem nových pracovních příležitostí, je minimálně 4 – 6ti násobkem potenciálu INBIT. Vzniklé příležitosti výrazně omezí odliv mozků mimo region či kontinent. Vznik ale i zánik biotechnologických společností vytvoří základnu kvalitního personálu, který bude dále vzdělávat své následovníky. Dostupnost kvalitního personálu je zatím neuspokojivá. Jakmile bude dosaženo kritické hodnoty objemu firem a personálu, skokem vzroste konkurenceschopnost firem v regionu a regionu samotného.

SEKRECE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V *ESCHERICHIA COLI*

Stanislav Vinopal

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Escherichia coli je nejoblíbenějším prokaryotickým organismem, který se používá pro genetické manipulace a průmyslovou výrobu rekombinantních proteinů. Vyrábějí se a prodávají nejrozličnější proteiny počínaje enzymy, které se využívají v molekulární biologii, potravinářství, v textilním průmyslu nebo v průmyslu pracích prášků jako katalyzátory důležitých chemických reakcí. V dnešní době je také velmi běžné použití rekombinantně připravených enzymů a proteinů při analýze biologických vzorků. Dále jmenujme z velkého výčtu rekombinantních proteinů proteiny určené k terapiím (např. lidský insulin, růstový hormon atd.), nebo ke speciálnímu využití pro své unikátní vlastnosti (např. AFP – anti-freeze-protein, GFP – green-fluorescent-protein). Výroba rekombinantních proteinů je dnes natolik rutinní záležitostí, že komerční biotechnologické společnosti nabízejí předpřipravené expresní systémy, takže si stačí jen vybrat, jaký protein chceme vyrobit, vložit jeho kódující sekvenci DNA do dodaného vektoru a pak už jen postupovat dle návodu od výrobce.

Obľíbenost právě *E. coli*, jako hostitelského organismu, plyne z několika výhod, které tato enterobakterie nabízí. Roste na levném růstovém mediu, má krátkou generační dobu, takže dochází k rychlému nárůstu biomasy a tím i žádaného produktu, je vhodná k fermentacím i při vysoké koncentraci biomasy a převedení kultivace a exprese do většího měřítka (tzv. „scale up“) není obtížné. Protože je *E. coli* již dlouhá léta modelovým organismem, je velmi dobře charakterizována nejen její genetika, ale bylo vyvinuto i značné množství prostředků pro manipulaci s jejím genomem, což velmi usnadňuje klonování i expresi požadovaných genů. Již v 80. letech minulého století však bylo jasné, že stávající expresní systém není možné použít pro produkci proteinů vyžadujících pro správnou biologickou funkci složitější posttranslační modifikace, či proteinů obsahujících velké množství disulfidových můstků. Přecházelo se proto na eukaryotické expresní systémy. Ty sice prokázaly schopnost produkovat autentické, biologicky aktivní proteiny, ale nepodařilo se pro ně vyvinout jednoduché, levné, efektivní metody poskytující vysoký výtěžek. Nedávné pokroky v porozumění procesům translokace, sbalování proteinů, působení chaperonů a foldas však umožnily vytvořit kmeny *E. coli* akumulující heterologní proteiny v rozpustné formě, exportující je do periplasmy nebo přímo do média, a tak se *E. coli* navrátila na trůn krále hostitelských organismů pro

produkci rekombinantních proteinů. Není ale možné nezmínit problémy se sbalováním nadexprimovaného proteinu, jeho agregaci a tvorbu inkluzních tělísek.

V dalším textu se budeme zabývat pouze sekrecí rekombinantních proteinů do periplasmy nebo do média. Sekrece rekombinantních proteinů je v mnoha ohledech výhodnější než intracelulární produkce. Při intracelulární expresi totiž dochází k mnohem častější tvorbě inkluzních tělísek, kvůli redukcujícímu prostředí cytoplasmy se špatně sbalují proteiny obsahující disulfidové můstky, je obtížné získat autentický N-konec proteinu, množství proteas snižuje výtěžek a v neposlední řadě je purifikační proces kvůli kontaminaci intracelulárními proteiny obtížnější.

Sekrece rekombinantních proteinů

Bakterie vylučují do okolního prostředí proteiny jako jsou degradační enzymy, toxiny a jiné faktory patogenity. Gramnegativní bakterie, mezi něž *E. coli* patří, vlastní několik typů sekrečních drah, které se však v mechanismu svého působení zásadně liší. Je zatím popsáno pět typů sekrečních mechanismů, které jsou označeny římskými číslicemi: I, II, III, IV a V. V této rešerši se budeme dále zabývat jen systémy typu I a II, protože jsou pro sekreci rekombinantních proteinů nejpoužívanější. Sekreční systém typu III je využíván patogenními G- bakteremi (např. *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, patogenní sérotypy *E. coli*) pro specifickou injekci patogenních proteinů do eukaryotických buněk. Sekreční systém typu IV je evolučně spojen s konjugacími systémy bakterií. Do tohoto typu patří např. sekreční systém *Agrobacterium tumefaciens* vnášející kancerogenní DNA do rostlinných buněk, čehož se využívá pro genetické modifikace rostlin. Sekrečním systémem typu V je tzv. „two-partner“ sekrece, kterou využívají některé G- bakterie pro transport velkých patogenních proteinů (100-500 kDa).

Jak již bylo naznačeno, cílená sekrece rekombinantních proteinů do média nebo periplasmy je v mnoha ohledech výhodnější než intracelulární produkce. Mezi hlavní výhody patří jednodušší purifikace, vyšší stabilita a biologická aktivita, lepší rozpustnost a autenticita N-konce rekombinantního proteinu. *E. coli* za normálních podmínek vylučuje jen malé množství proteinů, a tak při využití jejího sekrečního aparátu lze získat protein, který je jen málo kontaminován. V případě transportu do periplasmy stačí k získání produktu pouze

jednoduchý osmotický šok nebo permeabilizace buněčné stěny, aniž by došlo k uvolnění cytoplasmatických proteinů, které by produkt zkontaminovaly.

Vyšší stability a biologické aktivity je dosaženo proto, že periplasma *E. coli* obsahuje mnoho thiol-disulfid-isomeras (**DsB**, např. DsbA, DsbB, DsbC, DsbD) a peptidyl-prolyl-isomeras (**PPI**, např. SurA, FkpA, FkpB – některé zároveň chaperony), které správné sbalování proteinů usnadňují (viz **Obr. 2**). V periplasmě je také mnohem nižší koncentrace proteas.

Při nadprodukci rekombinantního proteinu však může dojít k nasycení kapacity chaperonů, důsledkem čehož je agregace proteinu. To vede buď k tvorbě inkluzních tělísek nebo přímo k degradaci částečně či špatně sbaleného proteinu. Rutinním používáním silných promotorů a vysokou koncentrací induktorů lze dosáhnout až 50% koncentrace produktu v buňce, avšak toto zvyšuje pravděpodobnost špatného sbalení proteinů. Inkluzní tělíska jsou vejčité nebo válcovité porézní útvary o délce přibližně 1 μm obsahující agregované proteiny (80 – 95 %), části ribozómů, fosfolipidy i malé množství nukleových kyselin. Inkluzní tělíska nemají pouze negativní vlastnosti – odolávají proteasám, takže se jich někdy používá pro produkci proteinů toxických, nestabilních či těch, se snadno lze denaturovat/renaturovat.

Právě sekrece proteinu do periplasmy nebo do média problém s příliš vysokou koncentrací proteinů v buňce řeší. Na druhou stranu může dojít k nasycení sekrečních drah a inkluzní tělíska se začnou tvořit také. Tomu se předchází koexpresí částí sekrečních drah i chaperonů – cytoplasmatických i periplasmatických. Je nezbytné pečlivě vyvážit sílu promotoru a počet kopií genu.

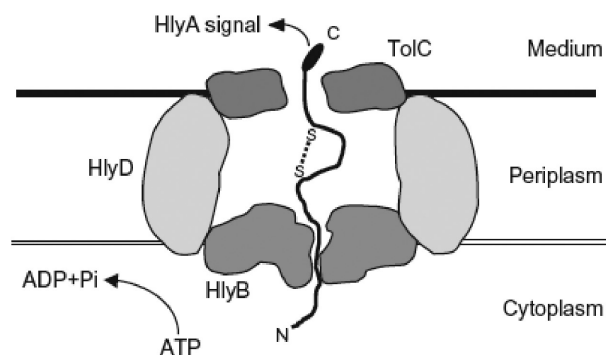
Sekrece rekombinantních proteinů v *E. coli* je velmi složitý proces. Jeho efektivitu ovlivňuje velké množství faktorů, např. velikost proteinu, aminokyselinové složení signální sekvence (tzv. leader peptidu), vlastního proteinu, hydrofobicita atd. Dosud se pro sekreci rekombinantních proteinů v *E. coli* používaly nejvíce sekreční systémy typu I a II, nedávno bylo publikováno i použití dráhy III.

Typ I

Sekreční dráha typu I transportuje proteiny přes obě buněčné membrány, protože její proteiny tvoří kanál spojující médium a cytoplasmu, takže nedochází k zastavení transportovaného proteinu v periplasmě jako u jiných sekrečních drah. *E. coli* tuto dráhu používá pro sekreci makromolekulárních toxinů a exoenzymů. Sekreční aparát je tvořen třemi membránovými proteiny, z nichž dva – HlyB a HlyD – jsou lokalizovány na vnitřní straně cytoplasmatické membrány, zatímco TolC na vnější straně. HlyB a HlyD patří do rodiny transportérů, tzv. ABC proteinů (ATP-binding-cassette), které obsahují vazebná místa pro ATP. Signální sekvence pro transport touto drahou je obsažena v C-terminální části

daného proteinu. Pro zacílení rekombinantního proteinu do této dráhy se nejčastěji používá fúze s C-terminální oblastí HlyA (α -hemolysin *E. coli*), která obsahuje veškeré informace nutné k transportu.

Vlastní translokace začne tím, že dojde k rozpoznání fúzního rekombinantního proteinu s C-terminální signální sekvencí HlyA dvěma ABC proteiny HlyB a HlyD a k vytvoření stabilního komplexu, které je doprovázeno vazbou ATP k HlyB. K tomuto komplexu se naváže trimer TolC tvořící jednoduchý hydrofóbní pór a vznikne kanál spojující obě buněčné membrány; viz **Obr. 1**. Hydrolýza ATP proteinem HlyB je nutná



Obr. 1: Sekreční systém typu I

k transportu proteinu skrz nově vytvořený kanál. Po translokaci se TolC opět odpojí a tím dojde ke zrušení kanálu. K tvorbě disulfidových vazeb dochází během průchodu proteinu kanálem a to nezávisle na periplasmatických Dsb.

Ačkoli je tento typ sekrečního mechanismu schopný exportovat rekombinantní proteiny přímo do média, má dva významné nedostatky. Za prvé je zapotřebí odštěpit C-terminální signální sekvenci, aby byl získán nativní protein a za druhé je nutná koexprese složek sekrečního systému, aby došlo k navýšení kapacity transportu. Protože *E. coli* přirozeně transportuje pouze malé množství proteinů, nemají její sekreční dráhy příliš velkou kapacitu. Je-li totiž exprese rekombinantního proteinu příliš silná, může docházet k zahlcení transportního systému a následné agregaci proteinu a tvorbě inkluzních tělísek. Je proto nutné zajistit nízkou rychlost translace rekombinantního proteinu.

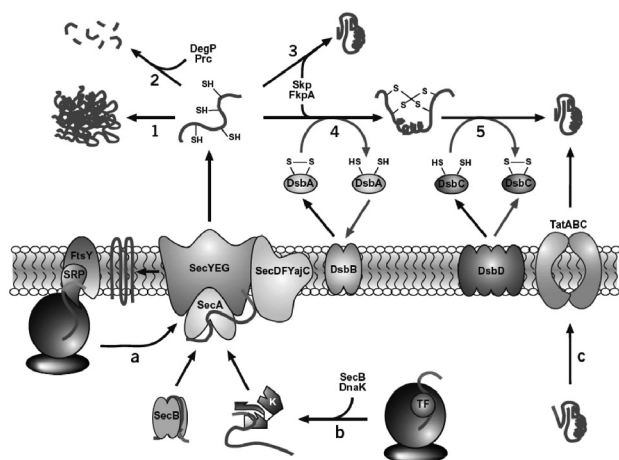
Typ II

Obecně je sekreční mechanismus typu II dvou-
stupňový. Nejdříve dochází ke translokaci proteinu do periplasmy, poté přes vnější membránu do média. Sekreční dráhy, které lze použít pro transport do periplasmy, jsou tři: SecB-dependentní dráha, SRP (signal recognition particle) dráha a TAT dráha (twin-arginin translocation). Druhý krok, tj. transport přes vnější membránu, zahrnuje komplex proteinů zvaný sekretion.

SecB dependentní dráha (post-translační export)

Tato dráha je pro sekreci rekombinantních proteinů zatím nepoužívanější. Obsahuje translokační aparát

v membráně, který je tvořen komplexy proteinů SecY, SecE, SecG (SecYEG), SecD, SecF, YajC (SecDFYajC) a tzv. molekulárním motorem SecA a cytosolický sekreční chaperon SecB; viz **Obr. 2**. Proteiny sekreto-



Obr. 2: Sekreční dráha typu II

vané touto dráhou obsahují N-koncovou signální sekvenci o délce 18 – 30 aminokyselin. Signální sekvence je charakteristická kladně nabitým N-koncem (n-oblast), hydrofóbním core (h-oblast) a polární oblastí pro štěpení periplasmatickou membránovou leaderpeptidasou. Funkce n-oblasti je v zacílení proteinu k záporně nabitě cytoplasmatické membráně a k translokase (SecA). Bylo prokázáno, že zvýšení kladného náboje n-oblasti vedlo ke zvýšení rychlosti translokace. Zvýšením hydrofobicity h-oblasti bylo zase dosaženo vyšší efektivity translokace.

K rodícímu se proteinu spojenému s ribozómem se připojí tzv. trigger faktor, který zabraňuje jak kontranslačnímu sbalování, tak vazbě SRP (alternativní dráha, viz níže). Trigger faktor je zároveň navázán na ribozóm. Poté co nově nasyntetizovaný protein opustí ribozóm, naváže se na něj SecB, který zabraňuje předčasnému sbalování a chrání hydrofóbní částí proteinu před vodným prostředím cytoplasmy. Pouze s navázaným preproteinem interaguje SecB s „proteinovým motorem“ SecA. SecA interagující s komplexem SecYEG rozpoznává signální sekvenci preproteinu, ale v pozdější fázi translokace i řetězec vlastního proteinu. Vazba ATP do jednoho ze dvou vazebných míst SecA způsobí uvolnění SecB. Hydrolyza ATP (SecA má ATPasovou aktivitu) způsobí konformační změnu SecA, jejímž následkem je posunutí transportovaného proteinu o ~20 aminokyselin do SecYEG kanálu. Od SecA se odpoutá ADP, což způsobí odpadnutí SecA od membrány. Další vazba ATP přiměje SecA interagovat s další částí transportovaného proteinu a připojit se k SecYEG. Následná hydrolyza ATP umožní translokaci dalších 15 – 20 aminokyselin preproteinu. Několikanásobným opakováním tohoto cyklu je protein transportován do periplasmy. Je třeba zmínit, že během transportu jednoho proteinu se může vystřídat několik různých SecA. V pozdějších fázích

translokace je zapojena PMF (proton-motivní síla), transport pak může probíhat i bez přítomnosti SecA, což je v této fázi efektivnější. PMF také napomáhá odpadávat SecA od membrány po hydrolyze ATP v počáteční fázi translokace. I když přesný mechanismus není doposud objasněn, přenos energie PMF je zprostředkováván komplexem SecDFYajC.

Po translokaci preproteinu do periplasmy je odštěpena N-terminální signální sekvence membránovou leaderpeptidasou a protein se za pomoci periplasmatických chaperonů a enzymů (Dsb, PPI; viz výše) sbalí. Jako chaperony částečně působí i SecDF.

Tento sekreční systém je pro sekreci rekombinantních proteinů nejpoužívanější. Jeho nevýhodou však je, že není schopen transportovat sbalené proteiny. Proto proteiny, které se v cytoplasmě rychle sbalují, není možné transportovat. Pro tyto případy je vhodné zvolit SRP nebo TAT dráhu.

SRP dráha (ko-translační export)

E. coli tuto dráhu používá pro cílení proteinů do vnitřní části cytoplasmatické membrány. Bakteriální SRP je tvořena 48 kDa GTPasou Ffh a 4.5 S RNA o délce 114 nt. SRP se může vázat buď k vysoce hydrofóbní signální sekvenci některých proteinů, nebo k hydrofóbní částem membránových proteinů, které budou zanořeny ve fosfolipidové dvojvrstvě. SRP se zároveň váže na ribozóm, kde se jeho vazebné místo překrývá s vazebným místem pro trigger faktor (viz výše). Pravděpodobně dochází k přechodné vazbě jak trigger faktoru tak SRP a tato interakce s ribozómem je stabilizována podle afinity vazebných molekul k rodícímu se proteinu. Komplex SRP-ribozóm-translatovaný protein je zacílen k membráně, kde interaguje s membránovým receptorem FtsY (viz **Obr. 2**). Díky interakci celého komplexu s membránovými lipidy je stimulována GTPasová aktivita Ffh i FtsY. Po hydrolyze GTP dojde k uvolnění preproteinu do translokačního místa, kterým je ve většině případu SecYEG translokón (viz výše).

Tuto dráhu lze použít pro proteiny, které se příliš rychle sbalují a nemůže proto dojít k jejich interakci se SecB.

TAT dráha (transport sbalených proteinů)

Teprve nedávno byla popsána dráha typu II, která je nezávislá na mašinérii Sec proteinů. Dostala název podle dvou Arg (twin-arginin-transport), které se nacházejí v signálních sekvencích proteinů transportovaných touto cestou. Jako jediná dráha typu II je schopná transportovat sbalené či částečně sbalené proteiny. Proto jsou její substráty proteiny, které vážou v cytoplasmě specifické kofaktory, a tak se sbalují ještě před vlastním exportem.

Přesný mechanismus translokace doposud není znám. Předpokládá se, že protein TatA tvoří transportní kanál. Proteiny TatB a TatC tvoří komplex, který obsahu-

je vazebné místo. Jakmile se objeví signální sekvence, dojde k interakci sbaleného proteinu s komplexem TatBC. PMF podpoří asociaci TatBC a proteinu s TatA, kterým je protein transportován do periplasmy, kde dojde k odštěpení signální sekvence. TatA poté disociuje od komplexu TatBC.

Signální sekvence pro tuto dráhu je delší než u Sec-dependentní translokace (~38 AK), avšak obsahuje také tři části: bazickou, hydrofóbní a polární. V bazické části se nacházejí konzervované Arg zbytky.

Nevýhodou této dráhy je nízká rychlost translokace (Sec-dependentní translokace ~sekundy, TAT ~minuty). Také bylo prokázáno, že brzy dochází k nasycení tohoto transportního řetězce, a tak je nutná koexprese TatABC operonu. To je velká nevýhoda podobně jako u sekreční dráhy typu I.

Sekreton

Sekreton je komplex 12 – 16 proteinů zajišťující export proteinů do média přes vnější membránu G⁻ bakterií. Není však zatím popsána funkce jeho jednotlivých proteinů. Za laboratorních podmínek totiž *E. coli* geny pro sekreton (až 5 % genomu!) neexprimuje. Bylo prokázáno, že protein musí být před transportem pomocí sekretonu sbalen. Není známa žádná signální sekvence či strukturní motiv rozpoznávaný proteiny sekretonu.

V praxi se dosahuje sekrece rekombinantního proteinu do média buď nadexprimováním složek sekretonu nebo úpravou podmínek kultivace, aby exprese započala. Pro zvýšení permeability vnější membrány se

však také používají chemické (EDTA, vápník, glycin, hořečnaté ionty, Triton X-100), enzymatické (lysosym) nebo mechanické (ultrazvuk) postupy.

Extracelulární sekreci lze zvýšit také použitím vhodných podmínek kultivace (teplota, aerace, pH atd.).

Závěr

Sekrece rekombinantních proteinů je složitý problém. Ve skutečnosti dochází ke kooperaci odlišných systémů, např. TAT systém je schopen transportovat proteiny určené pro Sec-dependentní dráhu, je-li zablokována nebo dochází k simultánnímu transportu rekombinantního proteinu jak SRP tak Sec-dependentní dráhou. V současnosti ještě není zcela objasněn mechanismus SRP dráhy a popis TAT systému je teprve v začátcích. Problémy s malou kapacitou transportních mechanismů stále brání použití sekrece rekombinantních proteinů v průmyslovém měřítku. Dalším problémem je neochota *E. coli* exprimovat geny pro sekreton za normálních laboratorních podmínek. Výzkum na poli genetiky a vlivu okolních podmínek na expresi genů by měl v budoucnu přispět k porozumění exprese genů sekretonu, což by bylo pro produkci rekombinantních proteinů prospěšné.

Literatura

Mergualhco, F.J.M., et al: Biotech. Adv. 23, 177 (2005).
Baneyx, F., Mujacic, M.: Nat. Biotech. 22, 1399 (2004).
Vrontou, E., Economou, A.: Biochim. Biophys. Acta 1694, 67 (2004).
Hueck, C.J.: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 379 (1998).

MOHOU VAKCÍNY ZLEPŠIT LÉČENÍ RAKOVINY?

Miroslav Macíček

Ústav biochemie a mikrobiologie, FPBT, VŠCHT Praha

Rakovinou se z medicínského hlediska rozumí soubor chorob charakteristických buď nekontrolovanou buněčnou proliferací nebo selháním apoptózy. V případě organismem nevyžádaného množení buněk vzniká přebytečná tkáň, tzv. **tumor**, a to buď **benigní** (neohrožující život) nebo **maligní** (zhoubný). Nádory vzniklé migrací maligních buněk primárního tumoru krevním řečištěm do dalších tkání se nazývají **metastáze**. V současné době je identifikováno více než 100 rakovinných onemocnění, které lze rozdělit do 6 základních skupin podle původu infikované tkáně, a to **karcinom**, **lymfom**, **leukémie**, **sarkom**, **mozkové nádory** a **kožní nádory**. Karcinomem se rozumí zhoubný nádor epiteliálních buněk. Lymfom je charakterizován jako maligní tumor lymfatického systému. Leukémie je definována jako rakovina krevních destiček a kostní dřeně. Sarkom je nádor z buněk mezo-

dermálního původu. Mozkové nádory postihují nervovou tkáň a kožní nádory zahrnují rakovinu kožních buněk.

Současné léčebné metody bohužel nedokáží účinným způsobem zvládnout chorobu, která se stává největší hrozbou civilizovaného světa. Standardní metodou léčby je vyoperování nádoru, pokud je to možné s ohledem na polohu tumoru, mnohem častěji však chemoterapie, kdy je organismu poskytnuta látka, jež má cytostatické účinky a jejíž úlohou je eliminovat karcinogenní buňky. Tyto látky ovšem mají na lidský organismus téměř neakceptovatelné vedlejší účinky, svou cytotoxicitou a nízkou specifitou se mohou ony samy stát zdrojem poškození organismu.

Tento článek se pokouší osvětlit problematiku imunoterapie při léčbě rakoviny. Očkování a imunizace mají své kořeny na konci 18. století, kdy v roce 1798

Edward Jenner poprvé úspěšně naočkoval pacienty proti planým neštovicím. Od té doby byly specifikovány a široce využity mnohé další vakcíny, např. proti tuberkulóze, obrně a dalším. Mechanismus účinku vakcín spočívá v indukci reakce imunitního systému podáním látky, která je organismu cizí a jež tedy vyvolá imunitní reakci. Dnes se již nejedná pouze o usmrcené či oslabené formy organismů způsobujících nemoci, ale vakcinace probíhá i pomocí nukleových kyselin, proteinů a jiných chemicky specifických látek.

Dnešní výzkum se zabývá možnostmi a nejvhodnějšími formami imunizace pomocí specifických nádorových antigenů (TAA tumor associated antigens), jejichž přítomnost byla potvrzena na povrchu rakovinových buněk. V tabulce 1 je přehled některých známých a definovaných TAA z různých nádorů a rozdělení dle původu jejich exprese v organismu. Hlavním cílem imunizačních technik je využití těchto antigenů, faktorů způsobujících dozrávání antigen prezentujících buněk (APC-antigen presenting cells) a následná aktivace T lymfocytů a jejich specifikace vůči nádorovým antigenům. Tato aktivace imunitního systému se ukázala velice slibná při experimentech *in vitro*, ale klinická fáze pokusů prokázala velice malou úspěšnost.

Současné poznatky tento malý úspěch vysvětlují složitostí organismu a jeho imunitního systému. Nádorový antigen stačí na aktivaci T lymfocytů, ukazuje se však jako nedostatečný pro kompletní stimulaci

imunitního systému. Proto jsou prováděny modifikace experimentů a k vakcínám se přidávají cytokiny, látky zodpovědné za podporu imunitní odezvy v organismu. Z provedených studií se zatím jako nejúčinnější ukazuje přidávání interleukinu 2 (IL-2) a interleukinu 12 (IL-12). IL-2 je stimulant růstu a diferenciacie buněk imunitního systému, IL-12 indukuje produkci interferonu gamma T lymfocyty. Což by mohlo znamenat, že populace T lymfocytů vzniklá na základě aktivace pomocí APC může být těmito látkami rozšířena a celkový účinek imunitní odpovědi je tak zvýrazněn. Ačkoliv se tento způsob ukázal jako perspektivnější, stále nejsou ani zdaleka dosaženy tak slibné výsledky jako z experimentů provedených *in vitro*.

Další obecnou metodou kostimulace imunitní odpovědi jsou vakcíny tvořené kombinací TAA a nějakého adjuvans – látky, která indukuje celkovou aktivaci imunitního systému, nejčastěji stimulací B lymfocytů, granulocytů a makrofágů. Jako takové se často užívá IFA (incomplete Freund's adjuvant), M-CSF (macrophages colony stimulating factor), GM-CSF (granulocytes, macrophages colony stimulating factor) a další. Podobně jsou využívány specifické virové a bakteriální antigeny, které jsou také schopny kostimulovat imunitní systém. Bohužel zatím nebyla nalezena metoda, která by měla naprosto průkazný, všestranně použitelný a opakovatelný pozitivní vliv na celkovou léčbu rakoviny.

Tabulka 1: Některé druhy TAA, jejich produkce různými tkáněmi.

skupina	TAA	nádor
nádorové antigeny- produkované spermatocyty	MAGE-1,2,3 BAGE GAGE-1,2 LAGE HAGE NY-ESO-1	kůže
diferenciační antigeny – tkáňově specifické	MART-1/Melan-A gp100 tyrosinase PSA	kůže prostata
obecně exprimované antigeny – z různých tkání	CEA CAMEL HER2/neu MUC1,2 PRAME SART-1	střeva kůže kůže, prsa, vaječníky prsa, vaječníky kůže, plíce jícen
nádorové specifické antigeny – bodové mutace rakovinných nádorů	AFP Caspase-8 RAGE GnT-V	játra mozek, krk kůže

Zatím tedy očkování nemůže ani zdaleka plnit vysněnou funkci prevence rakoviny na celý život, a to vzhledem k dynamickému charakteru samotné choroby a množství nevyjasněných faktů, které jsou stále předmětem výzkumu. Současná léčba pomocí vakcín slouží jako doplňkový prostředek a týká se pacientů, u kterých došlo na základě léčby jinými způsoby k určité remisi a imunizace organismu proti specifickým nádorovým antigenům může pomoci tuto remisi prodloužit, či dokonce jakémukoliv opakování choroby zabránit.

V klinické praxi je doposud využíváno 5 typů imunizace a jejich obměny. Prvním z těchto způsobů je **očkování upravenými nádorovými buňkami**. Tyto buňky nesou širokou paletu specifických antigenů, které jsou vlastní určitému typu tumoru (TAA), což v organismu vyvolává spontánní imunitní reakci. Vysoký počet různých antigenů přítomných na buňkách ovšem negativně ovlivňuje specifitu vakcinace, kdy sice lze pozorovat aktivaci imunitního systému, ale tato odpověď nemusí stačit k eliminaci zhoubné choroby. Navrhované vysvětlení zdůvodňující nedostatečnou účinnost je neexistence kostimulačních signálů nutných pro účinnou imunitní odpověď.

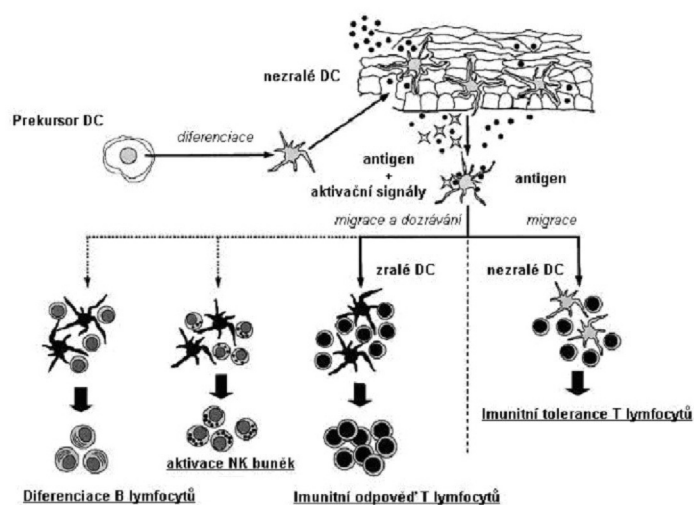
Druhým, v současnosti slibnějším postupem, je využití **peptidových vakcín**. Sekvence 9-12 AK reprezentující epitop nádorového antigenu je vnesena k antigen-presentujícím buňkám (APC), které díky přítomnosti antigenu dozrávají a v lymfatických orgánech aktivují nespecifické T lymfocyty, a to buď do formy pomocných CD4+ T lymfocytů (HTL- helper T cells) nebo do aktivní cytotoxické formy CD8+ T lymfocytů (CTL- cytotoxic T cells). CD4 je koreceptorem aktivace MHC genů 2. třídy a indikátorem aktivace nezralých HTL, CD8 je indikátorem aktivace CTL a koreceptorem pro MHC geny 1. třídy. V případě své přítomnosti na povrchu T lymfocytů jsou tyto skupiny CD genů (cluster of differentiation) vnímány jako důkaz aktivace T lymfocytů imunitním systémem.

Jakožto kostimulační adjuvans lze také přidávat nízkomolekulární látku (hapten), jež má stimulační účinky na celkovou imunitní odezvu, nebo antigeny ze známých infekčních organismů, které vyvolají mobilizaci imunitního systému.

Největší výhodou tohoto způsobu je možnost modifikovat peptidovou sekvenci a tím zvýšit imunitní odpověď, respektive množství nádorově-specifických T lymfocytů. Limitujícím faktorem je procesivita antigenu. Pokud zvolený oligopeptid nebude zpracován pomocí APC, nedojde k imunitní reakci. Dalším faktorem, jež ovlivňuje účinnost tohoto typu vakcín je rychlá proliferace a genetická variabilita nádorových buněk. Pokud sekvence oligopeptidu nepřísluší pro buňku esenciálnímu proteinu, je exprese tohoto proteinu zastavena, čímž se nádorové buňky vyhnou detekci imunitním systémem.

Nezbytnost zpracování nádorového antigenu pomocí APC, jejichž neúčinnějším představitelem jsou **dendri-**

tické buňky (DC – dendritic cells), je podstatou třetí metody vakcinace. Dendritické buňky jsou odebrány z organismu a *in vitro* vystaveny vysokým dávkám oligopeptidu, či celého proteinu (TAA). Zralé dendritické buňky jsou následně vpraveny zpět do organismu, kde indukují vznik specifických T lymfocytů a imunitní odpověď. Určitým vylepšením této metody je vnesení genu pro expresi nádorového proteinu do genomu dendritické buňky, a to buď elektroporací nebo injekčním způsobem. Tyto metody jsou ovšem nákladné a časově náročné.



Obr. 1: Charakterizace dozrávání dendritických buněk. Aktivace T lymfocytů, diferenciace B lymfocytů a aktivace NK buněk

Elegantní, poněkud levnější a také účinnější metodou je využití **virových vektorů**. Mírně infekční viry mají do svého genomu vpraveny geny pro expresi TAA a kostimulačních signálů. Takto upravené viry v organismu aktivují APC, především dendritické buňky. Tyto buňky na základě stimulace antigenem dozrávají a v lymfatických uzlinách aktivují T lymfocyty. Problémem této metody je samotná infektivita viru, který může být z organismu eliminován dříve než bude schopen vytvořit dostatečně velkou populaci APC, které by byly schopny vyvolat imunitní reakci vůči TAA.

Poslední metodou je užití **Heat Shock Proteinů** (HSPs). Tyto proteiny jsou produkovány buňkami ve stresovém prostředí. Vakcinace probíhá pomocí HSPs nesoucích TAA izolovaných z nádorových buněk. Nutnost separace vhodných HSPs, tj. těch, které nesou pouze TAA, ze všech izolovaných HSPs činí ovšem tuto metodu opět finančně nákladnou a globálně těžce použitelnou.

Ačkoliv již byly vyvinuty teoretické imunizační modely a metody, jež mají napomáhat pacientům, u kterých byl diagnostikován maligní nádor, celková úspěšnost léčby zatím zdaleka nedosahuje očekávaných výsledků.

Prvním, a v předcházejícím textu již zmíněným důvodem, je charakter zhoubného bujení, který nám neumožňuje okamžitou přesnou genetickou specifikaci

choroby. Diagnosa projevu rakoviny nám takřka nedává jiné možnosti než problémovou buňku či tkáň eliminovat. Což lze provést pomocí radioterapie, chemoterapie či chirurgickým zákrokem, volba léčby závisí na projevu rakovinného bujení, zdravotním stavu pacienta a mnoha dalších faktorech. Tyto způsoby s sebou ovšem nesou nezanedbatelné množství vedlejších účinků. Expresivně řečeno by se dalo říci, že nejde o léčbu, ale o holé přežití, a to za jakoukoliv cenu. Přesto jsou však dokumentovány případy, kdy u zcela neléčených pacientů došlo k nevysvětlitelné remisi, dokonce ke kompletnímu uzdravení.

Jak přesně tedy reaguje organismus na zhoubný nádor? Jak je rakovinná buňka schopna se vyhnout imunitní odpovědi organismu? Odpovědi na tyto dvě otázky se ukazují jako klíčové v porozumění celkové léčby rakoviny a v neposlední řadě se týkají i problematiky imunizace proti zhoubnému bujení. Současný výzkum prověřuje možnosti, kterými je možno podpořit nejen přirozenou imunitu, ale hlavně specifickou imunitní odpověď pomocí T lymfocytů v přítomnosti nádorového antigenu. To umožní maximalizovat účinek současných vakcín a jejich modifikací.

Právě syntetická úprava přirozených epitopů nádorových buněk je v současnosti největším příslibem. Cílem těchto modifikací je vytvořit oligopeptidy, které budou asociovány s přítomností TAA, ale zároveň zaručí "imunitu" zdravých buněk v organismu. Vzhledem k obrovské variabilitě organismu jde ovšem o úkol velmi komplikovaný.

Nutno poznamenat, že dalším z úskalí je nepřítomnost vhodného modelového systému. Výsledky pokusů

in vitro se neukazují jako průkazné a klinické experimenty jsou časově náročné a limitované přísnými předpisy. Každopádně zůstává imunizace organismu proti nádorovým antigenům nejen obrovskou nadějí a příslibem do budoucnosti, ale také již v současnosti vhodnou a hlavně v případě neúspěchu neškodnou doplňkovou léčbou.

Použitá literatura:

- Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J.: Immunology (5th edition, W.H. Freeman & Company), New York, 2002.
- Mocellina S., Rossia C.R. et al.: Bichim. Biophys. Acta 1653, 61 (2003).
- Nguyen C.L., Salem M.L., Rubinstein M.P. et al.: Vaccine 21, 2318 (2003).
- Ardavin C. et al.: Immunity 20, 17 (2004).
- Chen D.S., Soen Y., Stuge T.B. et al.: PLOS Medicine 2, 1019 (2005).
- Fukuda K., Takao Y. et al.: Immunobiology 209, 245 (2004).
- Scheibenbogen C., Letsch A. et al.: Sem. Cancer Biol. 13, 423 (2003).
- Lollini P.L., De Giovanni C. et al.: Future Oncol. 1, 57 (2005).
- Colombo M.P., Trinchieri G.: Cytokine Growth Factor Rev 13, 155 (2002).
- Duin van D., Medzhitov R., Shaw A.C.: Trend Immunol. (2006) v tisku.
- Dannull J., Su Z., Rizzieri D. et al.: J. Clin. Invest. 115, 3623 (2005).

BANÁNY A GENETICKÉ INŽENÝRSTVÍ

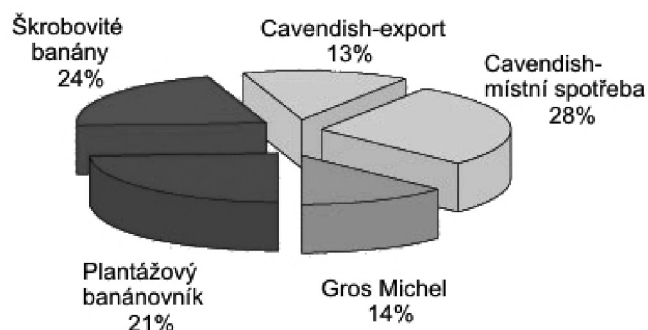
Kateřina Flajšmanová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Banány patří do rodu *Musa sapientum*, což volně přeloženo znamená ovoce moudrého člověka. Tvoří hlavní součást stravy obyvatel mnoha zemí Afriky, západní Indie, Střední a Jižní Ameriky a Asie. Banánů existuje mnoho druhů a dnes patří mezi nejdůležitější potraviny zejména v rozvojových zemích (Obr.1). Jde především o škrobové banány, které jsou jako ovocný desert nevhodné. Je jich několik desítek druhů. Vaří se, smaží, pečou, dělají se z nich kaše i banánová mouka, různé kečupy, vaří se z nich banánové pivo a destiluje banánový gin. Plně se využívají i listy a stonky. Listy se pokrývají střechy příbytků, vlákna se používají k výrobě textilií, z částí rostlin se vyrábějí barviva, kosmetika, deštníky a nejrůznější potřeby pro domácnost. Podle odhadů závisí dnes na banánech asi půl miliardy lidí

v Asii a v Africe. Například v Ugandě se banánovníky pěstují na třetině všech obdělávaných ploch a většinou pro místní spotřebu. Banány jsou v řadě asijských a afrických zemích základním zdrojem kalorií.



Obr.1: Hlavní druhy banánovníku a jejich využití.

Historie banánů

Banány patří k nejstarším světovým kulturním plodinám. Vědci předpokládají, že první banán si naši předci zřejmě oloupali a snědli už před více než deseti tisíci let někde v jihovýchodní Asii. Divoké banány, obří byliny domovem z džungle, obsahovaly množství tvrdých semen, kvůli nimž byl plod, tedy banán, téměř nejedlý (Obr.2). Občas však našli naši předkové



Obr. 2: Druh banánovníku s tvrdými semeny

banánovníky, které byly zmutované a rodily banány s méně semeny nebo vůbec bez semen. Genetikové už dnes přišli na to, jak k tomu došlo. Byla to v podstatě genetická nehoda, při níž se v buňkách banánu objevily místo dvou kopií chromosomu tři. Takové rostliny jsou sterilní. Ale lidé si právě takové rostliny vybírali a už v době kamenné pěstovali banány bez semen řízkováním. Tmavé linky, které jsou vidět uvnitř banánů, jsou připomínkou dávno vymizelých semen. Potomci banánovníků, které se už od pravěku množí pouze řízkováním, jsou tu dodnes.

Nepohlavní rozmnožování banánů:

Banánovník se už několik tisíciletí rozmnožuje nepohlavně pomocí řízkování a přestal se vyvíjet zhruba tehdy, když skončila poslední doba ledová. Protože se nevyvíjel, postrádá genetickou různorodost a není schopen čelit škůdcům ani chorobám. Ty v současné době ničí banánovníkové plantáže na celém světě. Banán potřebuje geneticky oživit. Po celá desetiletí tato skutečnost pěstitele nezajímala. Vyvíjet nové variety bezpohlavním rozmnožováním je velmi nákladné a zdoluhavé. A tak úroda banánů soustavně klesá už půl století. Výroba a obchod s banány se dostávají do kritického bodu. Situace připomíná dobu před sto padesáti lety, kdy bramborová sněť postihla bramborářství a v Irsku vyvolala hladomor.

Výživová hodnota banánů

Výživová hodnota banánů závisí na stupni jejich zralosti při konzumaci. U nás se většinou konzumují banány vyzrálé, v Africe a všude tam, kde banány představují základní potravinu ve stravě, se konzumují zelené a nezralé, přičemž představují hodnotný zdroj škrobu. V Evropě se banány konzumují většinou zralé,

to znamená, že vysoký podíl škrobu je již přeměněn na mono- a disacharidy. Obsah škrobu se snižuje z 20 – 30 % v nezralých na méně než 1 – 2 % ve zcela zralých plodech. Banány jsou bohatým zdrojem energie, 100 g dodává 80 – 120 kcal, přičemž asi 95 % celkové energie představují sacharidy. Ve vyzrálých banánech je z monosacharidů nejvíce zastoupena glukosa a fruktosa a z disacharidů sacharosa. Banány jsou dobře stravitelné a neobsahují lepek a jsou tedy vhodné pro osoby s nesnášenlivostí lepku. Mají poměrně vysoký obsah pektinu, stopy sodíku, ale vysoký obsah draslíku.

Nebezpečí pro banány

Nebezpečí, které v konečném důsledku znamená velký pokles úrody banánů a tím hlad milionů lidí, je různého druhu. Díky slabé genetické různorodosti jsou banánovníky velmi náchylné ke škůdcům a k chorobám. Jako zástupce uvedme například škůdce nosatec banánový a chorobu nazvanou Černá sigatoka. Jelikož banány jsou v mnoha tropických a subtropických oblastech světa zdrojem obživy, je to tedy problém ve velkém měřítku.

a) Nosatec banánový

Tento drobný brouk z čeledi *nosatcovitých* je velmi obávaným škůdcem hlavně v afrických zemích a velmi výrazně ovlivňuje úrodu banánů. Nosatec banánový je proto také označován jako „syndrom snižujícího se výtěžku“. Kontrola nad tímto ničitelem je založena na aplikaci zkušeností z výzkumu tohoto živočicha. Jedna z možností ochrany banánovníku je použití insekticidů. Tato možnost ale není ekonomicky ani ekologicky výhodná. Aplikace insekticidů na plantáže s banánovníky v těchto chudých zemích je finančně i technicky prakticky nemožná. Další problém spočívá v tom, že mnoho insekticidů vyvolává u lidí alergické reakce. Proto prakticky jediná možnost ochrany banánovníků před tímto škůdcem je genetická modifikace banánovníků. Nosatec banánový používá ve svém trávicím traktu serinové a cysteinové proteasy. Geneticky modifikované rostliny mají resistenci k tomuto škůdci díky tomu, že jejich genom obsahuje geny pro syntézu proteasových inhibitorů a tím poškozují jeho trávicí trakt.

b) Černá sigatoka

Je to plísňové onemocnění projevující se jako černé tečky na listech rostlin způsobené parazitujícím mikroorganismem *Mycosphaerella fijiensis*. Existuje i žlutá sigatoka (*Mycosphaerella musicola*), rozdíl mezi nimi je vidět mikroskopickým zkoumáním spor. Rozšíření tohoto mikroorganismu je velmi rychlé a podílí se na něm vítr, déšť, zvěř, ale i člověk. Stanovení této plísňové choroby pomocí identifikace spor je prakticky nemožné, protože po dešti jsou spory odplaveny. Proto se používá stanovení založené

na PCR, které je možno uskutečnit i když nejsou k dispozici spory. Tato plíseň produkuje mnoho askospor, které napadají rostlinná pletiva listů zejména v 2 – 5 patře. Poprvé se vyskytla na Fidži v roce 1963 a od té doby se vyskytuje na téměř všech plantážích s banánovníky. Je těžké ji vyhubit, podle vědců má schopnost tzv. toulat se. Askospory jsou schopné přežít několik dní na lidském oděvu, a tak je tato choroba přenášena i lidmi samotnými. Proto už v některých postižených oblastech byl zaveden zákaz vstupu na pole s banánovníky. Osoby, které mají povolen vstup nosí speciální obleky, které se po použití ihned spalují. Tato plíseň je odolná i šestihodinovému působení UV záření. Napadené rostliny jsou spáleny, ale askospory sigatoky přežívají i v půdě takže tato pole nejsou dále vhodná k pěstování. Je to velmi problematická choroba, 15 – 20 % z ceny banánů představuje ochrana před Sigatokou.

Možnosti boje s touto chorobou jsou následující:

- 1) Plody-banány jsou velmi dobré indikátory nastupující nemoci, tudíž mohou poukazovat na včasné odhalení Sigatoky a tím ke zničení napadené rostliny než se choroba rozšíří do okolí.
- 2) Rané stádium žluté Sigatoky se projevuje žlutými skvrnami na horní straně listů, zatímco černá Sigatoka se projevuje červenými až hnědými fleky na spodní straně listů, což pomáhá určit včasnou diagnózu.
- 3) Finančně náročná aplikace fungicidů (1000 \$/hektar/rok) na postižená pole pomocí letadel. Častá aplikace způsobuje u Sigatoky resistenci k těmto fungicidům.
- 4) Prořezávání větví banánovníků pro lepší cirkulaci vzduchu.
- 5) Genetická modifikace banánovníku, která by způsobila resistenci k této chorobě. Toto by problém vyřešilo, ale tato možnost je bohužel zatím v nedohlednu.

Genetická modifikace

Genetická modifikace rostlin se provádí z několika důvodů. Hlavně se používá pro vnesení genů zodpovědných za resistenci rostlin vůči škůdcům, chorobám, ale i pro jejich lepší adaptaci na dané prostředí. Genetickou modifikací se u rostlin zlepšují nutriční, ale i kvalitativní vlastnosti jejich plodů, např. u rajčat se pozastavuje jejich zrání blokáci genů pro syntézu ethylenu. U banánovníku se genetická modifikace používá hlavně pro získání resistance k chorobě Černá Sigatoka a pro resistenci k různým škůdcům např. k nosatci banánovému. Transgenóze banánovníku se také využívá pro vakcinaci proti hepatitidě B.

a) Metody transgenóze rostlin

Transgenóze nebo-li genetická modifikace rostlin se provádí mnoha způsoby. Závisí na druhu rostliny, ale

i na tom, jaký zásah do genomu rostlin chceme uskutečnit. Z mnoha metod zde uvádím pouze ty nejpoužívanější:

1. Nepřímá transgenóze pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*.
2. Přímá transgenóze plasmidové DNA do rostlinných buněk a pletiv:
 - a) Mikroinjekce DNA
 - b) Bombardování projektily
 - c) Elektroporace
 - d) Ultrazvuk
 - e) Příjem DNA rostlinnými protoplasty
3. Vnesení cizorodých genů do rostlinných buněk virovými vektory.

U banánovníku se např. pro vnesení resistance vůči nosatci banánovému používá nepřímá transgenóze pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Resistance spočívá v tom, že vnesené transgeny pro inhibitory serinových a cysteinových proteas inhibují enzymy v trávicím traktu hmyzu, čímž způsobí jeho úhyn.

b) Využití transgenóze pro získání tzv. jedlé vakcíny

Jedlé vakcíny, tak se nazývají rostliny nebo jejich plody, které díky genetické modifikaci obsahují vakcínu proti nějaké chorobě. U banánovníku se jedná o vnesení genu pro syntézu vakcíny proti hepatitidě typu B. Tímto úkolem se zabývá Charles Arntzen z Arizonské státní university v USA. Jeho cíl je vytvořit banánovník, jehož plody budou obsahovat tuto vakcínu, která by tak byla dostupná lidem hlavně v chudých oblastech Afriky. Komerční vakcína se vyrábí pomocí kvasinek 12-stupňovým, finančně náročným výrobním procesem. Takto se získá velmi účinná vakcína, která ale stojí přibližně 70 dolarů. Proto se Arntzen snaží pomocí transgenóze získat levnější vakcínu proti hepatitidě B. Použil gen získaný z komerční vakcíny a vnesl ho do banánovníku. Svými pokusy nejdříve zkoušel vnést do banánovníku modrou barvu. Když získal modré banány tak začal s vnesením vakcíny. Arntzen si vybral banány proto, že jsou snadno dostupné v oblasti, kde žijí chudí lidé, pro které je vakcína proti hepatitidě typu B určena. Výzkum je ve stádiu laboratorního zkoušení a tato vakcína byla už testována u prvních dobrovolníků. Ale ještě není vyhráno, jelikož ve světě pořád přetrvávají obavy z geneticky modifikovaných rostlin, takže tyto banánovníky ještě čeká dlouhá cesta, než se dostanou na africká pole a než si první lidé budou moci utrhnout jedlou vakcínu v podobě geneticky modifikovaného banánu.

Závěr

Banány patří ve světě mezi významné plodiny. Díky velkému obsahu sacharidů patří mezi nutričně důležité potraviny a pro mnohé lidi je to základní zdroj obživy. V posledních letech velmi výrazně klesají hektarové

výnosy z důvodu špatné odolnosti banánovníku proti chorobám a škůdcům. Malá odolnost je způsobena tím, že banánovník se už po několik tisíciletí rozmnožuje nepohlavně a tudíž neměl šanci se geneticky vyvíjet a tím si evolučně vytvořit resistenci. To je dnes hlavní úkol vědců, tzv. genetické oživení banánovníku. Proto se genetické snaží získat informace o celém genomu banánovníku a pak ho geneticky modifikovat pro získání lepší odolnosti vůči chorobám, škůdcům, nepřízní počasí, ale i pro získání tzv. jedlé vakcíny proti hepatitidě typu B.

Použitá literatura

Kiggundu A., Pillay M., Viljoen A., Gold C. (2003): Enhancing banana weevil resistance by plant genetic modification: A perspective. *African J. of Biotechnology* **12**, 563-569.
Kvasničková A. (2004): Obsah fungicidů v banánech. *Agronavigator*, 27359.

Valárik M., Šimková H., Hříbová E., Doležalová M., Doležel J. (2002): Isolation, characterisation and chromosome localisation of repetitive DNA sequences in bananas. *Chromosome Research* **10**, 89-100.
Genetic engineering: not the only option. *Leisa Magazine- december 2001*.
3th International symposium on molecular and cellular biology of bananas, Leuven-Belgium, sborník (2002).
Drenth A. (2002): Northern Australian diagnostics network. *Tropical plant protection*.
Davidson L. (2004): The Black Sigatoka threat. *Inside Bananas Issue 5*
Ondřej M., Drobník J.: Transgenozie rostlin. *Academia* (2002).
www.inibap.org
www.promusa.org
<http://www.arcadiaherbsandalternatives.com/singles/herbs/banana.htm>
<http://www.novinky.cz/44821-.html>

SOUČASNÝ STAV A PERSPEKTIVY GENETICKÝCH MODIFIKACÍ OKRASNÝCH DŘEVIN A ROSTLIN

Václava Bauerová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Nové odrůdy okrasných rostlin byly donedávna získávány klasickým šlechtěním rostlin. Klasické šlechtění je založeno na vzájemném křížení příbuzných rostlin a selekci potomstva s požadovanými vlastnostmi. Za účelem zachování stejné genetické informace jsou vyšlechtěné druhy dál pomnožovány pouze vegetativně. Jednou z velkých nevýhod této metody je zdoluhavost, navíc touto klasickou metodou vznikají jedinci, jejichž genetická výbava je limitována genetickou výbavou rodičů. Dalším negativním faktorem je častý vznik sterilního potomstva a fakt, že řada vlastností rostlin je určena heterozygotně. Nástup nových genetických metod, umožňujících vnášení nových genů z jiných organismů spolu s identifikací a izolací genů příslušných rostlin, umožnilo změnu řady specifických vlastností jednotlivých okrasných druhů, které byly úspěšně získány klasickým šlechtěním. Těmito metodami je možné do velké míry genetickou výbavu rozšířit, a to nejen geny náležejícími jiným druhům rostlin, ale také geny bakterií nebo virů. Kromě toho může být exprese původních genů vlivem nově vnesených genů stimulována či potlačena.

Všechny výše uvedené důvody vedly k postupnému vytlačení metod klasického šlechtění a prakticky úplnému nahrazení metodami genetickými. V posledních letech došlo k výraznému zvýšení efektivity transformací a úspěšnosti v regeneraci transformovaných

rostlin, což znamenalo obrovský pokrok v šlechtění nových druhů na molekulární úrovni.

Mezi vlastnosti, které byly do okrasných rostlin a dřevin uměle vneseny patří například resistance k řadě onemocnění, ať už způsobené hmyzem, viry nebo houbami, odolnost k herbicidům. Genetickými manipulacemi byla rovněž ovlivněna rychlost růstu, schopnost účinného využití vody, případně schopnost vytvářet bohatší kořenový systém.

Uplatnění transformací u okrasných rostlin a dřevin

Biotechnologický výzkum okrasných rostlin zahrnuje řezané květiny, květiny rostoucí v květináčích, plazivé venkovní rostliny, keře a stromy. Zaměřuje se převážně na transformace týkající se změny barvy květů, tvaru, životnosti a resistance k onemocněním způsobeným hmyzem. Nejvíce studií bylo doposud vypracováno na téma zbarvení květů. Transformace za tímto účelem zvyšuje pravděpodobnost opylování a následně tak produkci. Důvody jsou do velké míry také komerční. Význam resistance k infekcím je obrovský, uvážíme-li, že komerčně nejvýznamnější řezané květiny jako růže, karafiáty a částečně také chryzantémy jsou závislé na poměrně vysokém množství pesticidů a mají prakticky nulovou toleranci k infekcím způsobeným hmyzem. V řadě zemí je jejich kultivace tudíž velmi problematická, ne-li nemožná. Regenerace rostlin po

transformaci je jednou ze zásadních podmínek pro úspěšnou modifikaci. Od roku 1987, kdy byla provedena první transformace, se podařilo transformovat dalších více než 30 druhů.

Co se týče transformací dřevin, první úspěšně transformovanou a následně regenerovanou dřevinou byl topol, a to v roce 1986. První geneticky modifikovaný jehličnatý strom, modřín, byl připraven v roce 1991. Topol je využíván jako modelový strom pro genetické modifikace, přičemž nejvíce je ceněna jeho schopnost rychlé regenerace. U stromů jsou sledovány podobné trendy jako u rostlin, tzn. snaha o zvýšení odolnosti vůči herbicidům, infekcím, modifikace morfologie květů, případně celé rostliny.

Vývoj květů

Vývoj květů a kvetení je kontrolováno kaskádou dějů, v závislosti na vnitřních a vnějších podmínkách. Například u *Arabidopsis* byly pozorovány hned čtyři dráhy, a to dráha fotoperiodická, jarovizační, autonomní a dráha ovlivňovaná hormonálně gibereliny. Regulace velikosti květů probíhá na úrovni transkripce, kdy potlačením genu limitujícího velikost květu dochází k prakticky neomezenému růstu. Genetické modifikace se soustřeďují právě na tyto regulační geny.

Barva květů

Nejdůležitějším znakem okrasných rostlin stále zůstává barva květů. Za růžové, červené, fialové a modré zbarvení jsou zodpovědné flavonoidy antokyany. Vložením dihydroflavonol-4-reduktázy, získané z kukuřice do petúnií a následnou syntézou pelargonidinu vznikl nový druh petúnií a první transformovaná květina současně. Obdobně vnesením chalkon syntázy došlo k zesvětlení původního zbarvení chryzantémy, karafiátu, či růže.

Karotenoidy, náležící mezi isoprenoidy, jsou zodpovědné za žlutou, oranžovou a červenou barvu květů a plodů. Téměř všechny geny, odpovídající enzymům zodpovědným za syntézu tohoto barviva, byly izolovány. Přesto žádný úsek této dráhy doposud modifikován nebyl.

Vůně květů

Klasickým křížením byly sice vylepšeny mnohé vlastnosti okrasných rostlin, co se ovšem vůně týče, byla tato vlastnost neúmyslně potlačena. Vonné látky produkované rostlinami patří mezi sekundární metabolity rostlin. Chemicky jsou to terpenoidy, fenypropanoidy a deriváty mastných kyselin. Pouze některé z genů zahrnuté v produkci těchto těkavých látek byly izolovány. Studium Klarkie umožnilo klonování tzv. *lis* genu, kódujícího linalool syntázu. Vnesením genu *lis* do karafiátů nebyla pozorována žádná výrazná změna vůně květiny, přestože linalool uvolňován byl. Výzkum tohoto druhu je zatím v počátcích.

Životnost řezaných květů

Řezané květiny musí přežít transport do obchodů a pokud možno co nejpozději uvadat. Jejich životnost je ovlivňována zejména produkcí ethylenu. Genetické modifikace mohou být dvojího druhu, a to jednak modifikace mající za následek inhibici produkce ethylenu nebo častěji způsobující potlačení vnímavosti rostliny k ethylenu. Inhibice se provádí například vložením genů degradujících prekursorů ethylenu. Potlačení vnímavosti rostliny k ethylenu se nejčastěji provádí mutací v genu pro receptory, které jsou citlivé na ethylen.

Resistance k hmyzu a infekcím

Jakmile je rostlina či dřevina napadena, začne produkovat chitinázy, případně glukonázy, které ji chrání před plísňovými onemocněními, nadprodukcí těchto látek může být tedy trvale ochráněna. Aby bylo zabráněno infekcím způsobeným bakteriemi, jsou do rostlin a dřevin vnášeny různé geny pro toxiny bakterií. Ochrana proti virům je zajišťována vnášením genů pro obalové proteiny virů.

Resistance k herbicidům

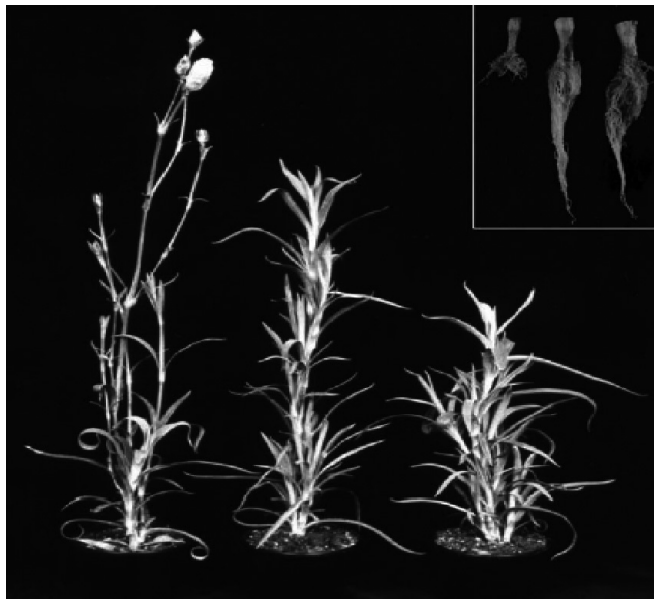
Jak u rostlin, tak stromů je resistance nejčastěji umožněna vnesením genů pro enzymy schopné herbicidy degradovat.

Morfologie rostlin a dřevin

K modifikaci morfologie rostlin a dřevin se nejčastěji používá rod *Agrobacterium*, konkrétně druhy *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes*, u dřevin hlavně *A. tumefaciens*. Jedná se o tzv. modifikaci nepřímou. Bakterie rodu *Agrobacterium* nesou plasmidy (*A. tumefaciens* tzv. Ti plasmid (tumor-inducing), *A. rhizogenes* Ri plasmid (root-inducing)), jejichž části mohou být vnášeny do rostlin a stromů. Geny těchto bakterií způsobují nadprodukcí některých hormonů, konkrétně auxinů a cytokinů. Může jít o regulační geny nebo geny kódující enzymy přímo katalyzující vznik růstových hormonů. Těmito modifikacemi dochází ke změnám v morfologii, např. ke změnám v tvorbě kořenového systému, tvorbě postranních větví, četnosti a tvaru listů, atd.

Jedním z významných genů bakterie *A. tumefaciens*, využívaného u okrasných rostlin je *ipt* gen. Jestliže je *ipt* gen vložen do tabáku pod konstitutivní promotor CaMV-35S, dochází k redukci kořenového systému. Vložením pod vlastní promotor nastává prakticky stejná situace, kořenový systém rostliny je redukován, jen v jiné míře. Pokud ale ten samý pokus provedeme u petúnií a využijeme inducibilního promotoru SAG z *Arabidopsis*, získáme rostlinu se zpomaleným vadnutím spodních listů. Tato vlastnosti se hojně využívá u řezaných rostlin obecně.

Příkladem působení jednoho z genů bakterie *A. rhizogenes* (*rol C*), je patrné z obrázku 1. Bakterie *A. rhizogenes* má celkem čtyři *rol* geny, a to *rol A*, *B*, *C* a *D*,



Obr. 1

které po vnesení do rostliny různým způsobem pozměňují morfologii rostliny. Na obrázku vlevo je netransformovaná rostlina, uprostřed a vpravo rostlina po vnesení genu *rol C*. Transformované rostliny jsou ve srovnání s rostlinou původní mnohem menšího vzrůstu, rostlina je mnohem více větvená a listy mírně zakřivené. V čem tedy spočívá hlavní výhoda této modifikace? Rostlina po vnesení *rol C* genu vytváří nesrovnatelně bohatší kořenový systém, který zajišťuje vyšší odolnost rostliny při přesazování, rychlejší ujmoutí a lepší využití živin. Tímto způsobem se dále připravují různé zakrslé typy větších rostlin, případně dřevnatých rostlin, které jsou v důsledku této změny vhodné pro

pěstování v květináčích. Vnesením genu *rol C*, případně méně studovaného genu *rol D*, se také zvyšuje množství květů, které rostlina produkuje. Všechny tyto vlastnosti se významně podílí na zvýšení prodeje okrasných rostlin.

Genetické modifikace okrasných rostlin vycházejí ze zkušeností s modifikacemi zemědělských rostlin, které mají daleko větší uplatnění a proto jsou daleko podrobněji studovány. Naopak řada studií provedených na okrasných rostlinách, jako například resistance k infekcím způsobených řadou škůdců a rezistencí k herbicidům může z velké míry posloužit k rozvoji metod používaných pro zemědělské plodiny, ať už jsou to rostliny nebo dřeviny (zejména ovocné stromy). Genetické modifikace okrasných rostlin a dřevin tak doplňují mezery v dosavadních tradičních biotechnologiích, zaměřených na pouhé křížení příbuzných druhů, které, jak už bylo řečeno, mají svá omezení. Umožňuje vznik rostlin a dřevin požadovaných vlastností, s co nejmenšími nároky na podmínky rozmnožování a růstu, vznik rostlin nových tvarů a barev, které byly donedávna nemožné.

Použitá literatura:

1. Papers Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. Forestry Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Forest Genetic Resources Working, December 2004
2. Casanova E., Trillas M.I. et al.: Biotechnol. Adv. 23, 3 (2005).
3. Bijman, J.: Biotechnol. Develop. Monitor 20, 10 (1994).
4. Carman N.: List of Genetically Engineered Tree Species and Transgenic Hybrids. Sierra Club Genetic Engineering Committee 11-03-2005.

ZÁKAZ PLOŠNÉHO POUŽITÍ ANTIBIOTIK VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT A JEHO DŮSLEDKY

Milan Marounek^{1,2}

¹Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Praha 4

²Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha 10

Antibiotika se v živočišné výrobě používají ke stimulaci růstu, léčbě a prevenci onemocnění. Použití antibiotik ke stimulaci růstu, tj. ve formě plošného přídatku v subterapeutických koncentracích do krmných směsí (odtud název krmná antibiotika) má dlouhou, více než 50-ti letou historii. Protože je ekonomicky výhodné, došlo k jeho velkému rozšíření. Z více než 1 milionu tun antibiotik, které byly ve 20. století vyrobeny, polovina směřovala do živočišné výroby. Tento rozsah začal vzbuzovat obavy, zpočátku z přítomnosti reziduí

v živočišných produktech, potom ze vzniku a přenosu rezistence na běžná antibiotika používaná při léčbě lidí. Rezidua byla důvodem zákazu tzv. neantibiotických stimulatorů růstu, což byly deriváty chinoxalinu a nitrofuranu. V případě antibiotik se začala používat antibiotika s vyšší molekulovou hmotností, která se z trávicího traktu prakticky nevstřebávají. Obavy z přenosu rezistence vedly ve Velké Británii k ustavení komise vedené Dr. Swannem, která v roce 1969 doporučila stávající antibiotika rozdělit na ta, která se výlučně používají

k léčbě a jiná, která se přidávají do krmiv. V roce 1994 bylo vzneseno podezření, že nárůst enterokoků rezistentních ke glykopeptidovým antibiotikům souvisí s používáním příbuzných antibiotik ve výživě zvířat. Tyto enterokoky, rozšířené zejména v nemocnicích způsobují těžko léčitelná onemocnění. Hospodářská zvířata by mohla představovat reservoar resistantních bakterií, odkud se tyto mikroorganismy šíří do prostředí. Vskutku bylo prokázáno, že krmné antibiotikum avoparcin vyvolává zkříženou rezistenci bakterií k antibiotiku vankomycinu, významnému při léčbě lidí. To vedlo k zákazu avoparcinu v Dánsku v roce 1995, Německu v roce 1996 a v ostatních zemích EU od roku 1997. V té době již dlouho (od roku 1986) platil zákaz antimikrobiálních stimulatorů ve Švédsku. V roce 1999 byla zakázána krmná antibiotika spiramycin, tylosin, virginiamycin a Zn-bacitracin, rovněž neantibiotické stimulatory růstu karbadox a olachindox. Poté zůstala povolena jen krmná antibiotika flavomycin, avilamycin, monensin (ve výkrmu skotu) a salinomycin. Podle našich zkušeností je antimikrobiální aktivita flavomycinu a avilamycinu poměrně nízká. Od 1. ledna 2006 platí v celé EU zákaz všech krmných antibiotik. Z toho vyplývá potřeba nalézt za antibiotika vhodné náhrady. Moderní živočišná výroba se bez antimikrobiálních látek těžko obejde. Perfektní zoohygienu, při které jsou antibiotika zbytečná, se často nedá docílit. V podmínkách běžné zoohygieny vede vyloučení antibiotik ke snížení rychlosti růstu, zvýšení úhynů a také vzniká riziko kontaminace živočišných produktů pathogenními bakteriemi, které mohou způsobit onemocnění spotřebitelů (salmonely, kampilobakterie, některé sérovary *Escherichia coli*). K alternativám antibiotik patří především mannanoligosacharidy, organické kyseliny, rostlinné extrakty a enzymy, snad i probiotika. V dalším textu bude jejich podstata stručně zmíněna.

Mannanoligosacharidy ztěžují pathogenním bakteriím kolonizaci střevního epitelu. Brání adhezi patogenů na střevní sliznici tím, že blokují interakci lektinové struktury na povrchu bakterie s receptorem slizniční buňky. Mannanoligosacharidy se vyrábí z buněčných stěn kvasinek a jsou běžně dostupné. Do krmných směsí se přidávají v množství 2–4 g/kg. Jejich pozitivní účinek u prasat a drůbeže dokládá více studií. Jsou použitelné i u dalších hospodářských zvířat.

Organické kyseliny, hlavně octová, mléčná, benzoová a sorbová, se po dlouhou dobu používají ke konzervaci potravin. Mechanismus jejich antimikrobiálního působení není zcela objasněn, předpokládá se však, že v nedisociované formě prochází membránou buněčné stěny bakterií a uvnitř buněk disociují pod vlivem vyššího pH na anion a proton. Bakterie velké okyselení cytosolu nemohou připustit, proto vytlačují protony z buněk ven, za spotřeby energie. Buňkám se pak nedostává energie k plnění základních životních funkcí. Na rozdíl od antibiotik je antimikrobiální aktivi-

ta organických kyselin podmíněna nízkým pH prostředí. Ve výkrmu prasat se osvědčila kyselina mravenčí, fumarová a citronová. V menším rozsahu se organické kyseliny zkoušely u drůbeže. Kyselina kaprylová v množství 5 g/kg významně snížila úhyny mladých králíků po odstavu. U králíků je alternativou kyseliny kaprylové komerčně dostupný olej obsahující triacylglyceroly kyseliny kaprylové a kaprinové. Je to umožněno vysokou lipolytickou aktivitou v jejich trávicím traktu. U dalších zvířat je vhodný současný přídatek lipasy. Mastné kyseliny o střední délce řetězce (např. kyselina kaprylová) mají proti ostatním organickým kyselinám výhodu vyšší účinnosti i mimo oblast nízkého pH.

Rostlinné extrakty jsou složité směsi látek obsahující různé aldehydy, thymol a terpenové sloučeniny. Jsou komerčně dostupné a mají širokou antimikrobiální aktivitu. Příkladem může být extrakt z máty, dobromysli a esenciální oleje z různých rostlin.

Enzymy. Běžnými složkami krmiv jsou polysacharidy, které zvyšují viskozitu střevního obsahu (arabinoxylany, β -glukany, pektin). Důsledkem vysoké viskozity je zpomalení toku zažítiny a zhoršené vstřebávání živin. Do zadních oddílů trávicího traktu pak přechází fermentovatelný substrát, který unikl trávení v tenkém střevu. Vznikají příznivé podmínky pro pomnožení enteropathogenních bakterií a následný vznik průjmů. Přídavek enzymů, které tyto polysacharidy štěpí, do krmné směsi riziko poruch trávení snižuje.

Probiotika jsou životaschopné bakterie, u nichž se předpokládá, že po přidání do krmiva osídlí trávicí trakt a zabrání, či aspoň omezí proliferaci pathogenních bakterií, příznivě ovlivní imunitní systém a případně i zlepší růst zvířat a využití krmiva. Positivních, statisticky průkazných výsledků s použitím probiotik je dosti málo, zejména proto, že reakce zvířat na probiotika je kolísavá a značně individuální. Relativně nejúspěšnější je použití probiotik u drůbeže. Osídlení trávicího traktu kuřat vhodnou mikroflórou je ve velkochovech ztěženo tím, že nemají kontakt s exkrementy nosnic. Probiotika proto mohou představovat určitou náhradu. Komerčně dostupná probiotika podléhají schválení Evropskou komisí. Ta vyžaduje rozsáhlé zkoušky, které mají dokázat účinnost probiotika, stabilitu při skladování a rovněž musí vyloučit případné šíření resistance k antibiotikům. V roce 2001 bylo schváleno použití 19-ti probiotik s tím, že většina měla souhlas Evropské komise časově omezen. Uvedení nového probiotika na trh je velmi nákladné.

Závěr

Alternativ k nedovoleným krmným antibiotikům je tudíž víc a zatím nelze říci, které je nejlepší. Již nyní je ale možné odhadnout, že účinnosti klasických krmných antibiotik zřejmě nedosáhnou. Legislativa USA použití krmných antibiotik stále povoluje, i když diskuse o jejich přípustnosti nastala již i tam. V obou

geografických oblastech probíhá stálé testování rezistence klinických izolátů pathogenních bakterií vůči antibiotikům. K žádoucímu zlepšení, které by bylo možno připsat zákazu krmných antibiotik, zatím v Evropě nedochází. Rovněž nelze říci, že situace v Evropě je lepší než v USA. Důvodů může být víc, hlavní příčinou vysoké rezistence pathogenních bakterií k běžným antibiotikům je však nepochybně příliš vysoká spotřeba antibiotik v léčbě lidí. Zákaz krmných antibiotik také logicky vede ke zvýšení spotřeby anti-

otik k prevenci a léčbě zvířat, jejich celková spotřeba v živočišné výrobě tudíž klesla jen asi na polovinu. Je rovněž pravděpodobné, že dlouhodobé podávání některých antimikrobiálních látek (např. rostlinných extraktů) povede k selekci rezistentních kmenů bakterií, s důsledky stejnými jako ty, které vedly k zákazu krmných antibiotik.

(Práce souvisí s řešením projektů AVOZ 50450515 a MZe 0002701403).

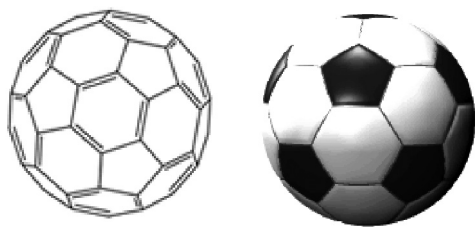
FULLERENY – KULATĚJŠÍ MOLEKULY V CHEMII NENAJDETE

Jiří Patočka

Katedra radiologie a toxikologie, Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice

Úvod

V loňském roce uplynulo dvacet let, co byla nalezena nová forma uhlíku. Až do roku 1985 byl tento prvek znám v čisté formě ve dvou modifikacích: jako grafit a diamant. Třetí modifikace byla objevena americkými profesory R.E. Smalleyem a R.F. Curlem a britským H. Krotem^{1,2} a byl to objev tak významný, že v roce 1996 jim byla za něj udělena Nobelova cena za chemii. Třetí formu uhlíku tvoří obří molekuly složené z 20 a více atomů uhlíku umístěných ve vrcholech různých mnohostěnů více či méně kulovitých útvarů. Tyto molekulární útvary, představující třetí alotropickou modifikaci uhlíku, dostaly název fullereny, na památku známého amerického architekta R. Buckminstera Fullera. Ten proslul svými geometrickými konstrukcemi velmi podobnými těmto obřím molekulám uhlíku. Nejznámějšími a pozoruhodně stabilními molekulami tohoto druhu jsou fullereny C_{60} a C_{70} , kulovité či kouli blízké útvary ve formě mnohostěnů, zbudované z pěti- a šesti-členných cyklů. Molekula C_{60} je z geometrického hlediska komolý ikosaedr, připomínající ze všeho nejvíce povrch fotbalového míče a je to nejkulatější a nejsymetričtější molekula, jakou známe³ (Obr.1).



Obr. 1. Molekula fullerenu C_{60} je dokonale kulatá a její podobnost s fotbalovým míčem je evidentní.

Teoretické předpoklady

Aby mohla z rovinné molekuly grafitu, tvořeného pravidelnými šestiúhelníky uhlíku, vzniknout zakřivená plocha a svinout se do uzavřeného prostorového

útvary, musí být některé šestičlenné kruhy nahrazeny kruhy pětičlennými. Podle známé Eulerovy věty, která určuje vztah mezi počtem vrcholů, hran a stěn uzavřených těles, musí být těchto pětiúhelníků dvanáct, aby utvořily uzavřené těleso, zatímco počet šestiúhelníků omezen není. Nejmenším takovým tělesem je pravidelný dvanáctistěn (kde počet šestiúhelníků je nula), jehož stěny jsou pětiúhelníky a který má dvacet vrcholů. Jestliže je v každém vrcholu atom uhlíku, máme nejmenší možný fullerén C_{20} . Postupným vkládáním šestiúhelníků pak vznikají další mnohostěny. Nejznámějším a nejlépe prozkoumaným fullerenem je fullerén C_{60} (nazvaný původně buckminsterfulleren, kterýžto název se však pro jeho délku neujal a bývá proto označován jako fullerén), jehož dokonale kulovitý povrch je tvořen 12 pětiúhelníky a 20 šestiúhelníky.

O teoretických možnostech vytvoření dutých uhlíkatých molekul spekuloval již v roce 1966 David Jones v časopise New Scientist, ale jeho nápad zapadl, stejně jako výpočty dvou japonských teoretických chemiků⁴, kteří předpověděli vysokou stabilitu molekuly C_{60} . Jejich japonsky psaná práce nepronikla v širší známost a nezbudila větší pozornost. Teprve pozdější kvantově-chemické výpočty plně prokázaly reálnost takových molekul⁵ a předpověděly jejich velkou budoucnost.

Kde se vyskytují a jak se připravují fullereny

Dlouho byly fullereny spíše akademickou záležitostí, protože se je nedařilo připravit v dostatečně velkém množství, které by umožnilo studovat jejich fyzikální a chemické vlastnosti. V přírodě byly ve zcela nepatrném množství nalezeny v sazích a v uhlí a některých dalších minerálech, dokonce i u nás⁶. V laboratořích jsou dnes fullereny produkovány s vysokým výtěžkem metodou, založenou na elektrickém oblouku mezi uhlíkovými elektrodami v prostředí inertního plynu. Materiál, který při tomto procesu vzniká se extrahuje

benzenem za vzniku vínově červeného roztoku směsi C_{60} a C_{70} , které lze rozdělit chromatograficky.

Další osud fullerenu

Ještě dlouho po objevu fullerenu a určení jejich struktury byly tyto látky jen těžko dostupné a jejich cena mnohonásobně převyšovala cenu zlata. V roce 1990 W. Krätschmer z Heidelbergu a D. Huffman z Arizonské univerzity se svými kolegy vypracovali technologii, která umožňovala připravovat fullereny v makroskopickém množství a tyto látky se tak rychle staly předmětem materiálového výzkumu. V anketě časopisu Science byl fullerén C_{60} vyhlášen molekulou roku 1990. O rok později bylo v Bellových laboratořích zjištěno, že C_{60} s alkalickými kovy vykazuje supravodivost až do teploty kolem 40 kelvinů⁷, což bylo velkým impulsem pro intenzivní technologický výzkum fullerenu. Krátce na to byla provedena příprava protáhlých fullerenu⁸, jakýchsi uhlíkových nanotrubiček a predikovány jejich různé zajímavé elektronické vlastnosti⁹. Příprava takových nanotrubiček probíhá též v elektrickém oblouku mezi uhlíkovými elektrodami, ale za katalýzy některými kovy⁸. Dnes lze vhodnou změnou podmínek produkovat různé druhy uhlíkových nanotrubiček, které hrají významnou úlohu v rozvíjejících se nanotechnologiích.

K čemu mohou být fullereny dobré?

Chemici dnes umějí navázat různé atomy a molekuly na povrch fullerenu, nebo je i umístit dovnitř, do dutiny. Umí také vyrobit fullereny s jakýmsi „otvorem“ dovnitř uhlíkové klece, které rovněž vykazují velmi zajímavé vlastnosti a skýtají řadu možností praktického využití. To vše, spolu s poznáním unikátních elektronických, optických a magnetických vlastností fullerenu, vyvolává nemalý zájem aplikovaného výzkumu o tyto nevšední molekuly, jejichž výzkum je teprve na začátku.

Byla již patentována řada nápadů, jak a k čemu fullereny v budoucnu využít. Tak např. vysokým tlakem lze i za pokojové teploty přeměnit C_{60} na diamant a kvalita takto připravených diamantových povrchů je mnohem lepší než u dosud používaných metod. Možnost vytvářet ochranné diamantové vrstvy na různých součástkách a materiálech může mít velký ekonomický význam. Značné technické možnosti nabízí také některé anomálie optických vlastností fullerenu, které mohou nalézt uplatnění v optice a optoelektronice, stejně jako již zmíněná supravodivost fullerenu s alkalickými kovy (např. K_3C_{60} , Rb_3C_{60} , Cs_3C_{60}) nebo jejich derivatizace.

Deriváty fullerenu mohou být exohedrické, kdy nejrozličnější atomy jsou navázány na povrch fullerenu, nebo endohedrické, kdy atomy jsou uvězněny v jejich dutině, jejíž průměr pro C_{60} je např. 0,7 nm. Vhodnou substitucí lze připravit i fullereny rozpustné ve vodě, což dále posouvá možnosti jejich využití. Z druhé skupiny derivátů lze uvést C_{60} s uvězněnými atomy kovů, např. $La@C_{60}$ (pomocí @ se označuje, že atom

je uvnitř fullerenu a netvoří s ním chemickou vazbu). Takovým způsobem lze do fullerenu uvěznit např. i atom inertního plynu, jako např. $He@C_{60}$. Do větších fullerenu lze umístit i víceatomové molekuly. Uvažuje se proto o možnosti vkládat do nich molekuly léčiv a přenášet je tímto způsobem do organismu nebo ukládat do nich atomy radioaktivních prvků.

Velká budoucnost je prorokována uhlíkovým nanotrubičkám – trubičkám tvořených svinutými rovinami grafitu uzavřených polokoulemi fullerenu, které by se podle teoretických výpočtů mohly chovat buď jako kovy nebo jako polovodiče v závislosti na svém poloměru a jejich délce¹⁰. Zdokonalení technologie výroby již vede k praktickým aplikacím nanotrubiček. Díky vysokému poměru pevnosti ku hmotnosti mohou být nanotrubičky použity jako miniaturní uhlíková vlákna v superpevných a lehkých kompozitních materiálech. K využití v nanotechnologiích se nabízí i vnitřek trubiček. Pokud jej vyplníme kovem, získáme vysoce vodivý izolovaný drátek o průměru jen několika nanometrů. Materiály tohoto druhu by mohly nalézt uplatnění v molekulární elektronice. Zcela nové možnosti také nabízí příprava fullerenu, v nichž uhlík je nahrazen jiným prvkem (heterofullereny), např. BN-fullereny, v nichž je pouze bor a dusík.

Málokterá oblast chemie prodělala za posledních dvacet let tak ohromný rozmach, jako chemie fullerenu a v málokteré oblasti dochází k tak fascinujícím objevům. Jsou to např. tzv. uhlíkové lusky (carbon peapods), což jsou uhlíkové nanotrubičky, jejichž vnitřek je vyplněn „kuličkami“ fullerenu¹¹ nebo uhlíkové cibule (carbon onions), které svou architekturou připomínají ruské „matrjošky“. Kolem nejmenšího fullerenu jsou uspořádány další a další vrstvy větších fullerenu, takže celkový výsledek připomíná cibuli složenou z různého množství vrstev¹². Uhlíkové cibule vznikají např. v elektrickém oblouku ve vodě.

Literatura

1. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E.: Nature 318, 162 (1985).
2. Curl F.R., Smalley R.E.: Science 242, 1017 (1988).
3. Valenta J.: Vesmír 76, 65 (1997).
4. Osawa E.: Kagaku 25, 854 (1970).
5. Slanina Z., Rudzinski J.M. et al.: Mol. Struct. (Theochem) 202, 169 (1989).
6. Jehlička J., Frank O. et al.: Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 61, 2364 (2005).
7. Hebard A.F.: Physics Today, June 1996, 26 (1992).
8. Lijima S.: Nature 354, 56 (1991).
9. Ebbesen T.W.: Physics Today, June 1996, 26 (1996).
10. Slanina Z., Uhlík F., Adamowitz L.: J Mol Graph Model 21, 517 (2003).
11. Berber S., Kwon Y.K., Tomanek D.: Phys Rev Lett 88, 185502 (2002). Epub 2002 Apr 18.
12. Rettenbacher A.S., Elliot B. et al.: Chemistry 2005, Epub. Sep 28.

ZDRAVOTNÍ VÝZNAM ROSTLINNÝCH STEROLŮ

Irena Bacíková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Rostlinné steroly (fytosteroly) jsou složkami lipidických frakcí olejnatých semen, některých druhů ovoce a zeleniny a některých dalších přírodních extraktů. Z pohledu zdrojů je tedy lze považovat za velmi rozšířené.

Z hlediska chemické struktury patří rostlinné steroly do skupiny steroidů společně s cholesterolem, žlučovými kyselinami a steroidními hormony. Základní skelet steroidních látek tvoří steran, nasycený tetracyclický uhlovodík. Jeho molekula je plochý cyklopentanoperhydrofenantrenový systém. Druh, počet a pozice substituentů, jejich konfigurace, počet a pozice dvojných vazeb a vzájemná konfigurace kruhů, to vše zvyšuje pestrost steroidních sloučenin. Chemickou strukturou se fytosteroly nejvíce podobají cholesterolu a mají v rostlinách stejnou funkci jako cholesterol u živočichů – udržují strukturu a funkci buněčných membrán.

Celkem bylo identifikováno asi 40 druhů rostlinných sterolů, mezi nejrozšířenější patří β -sitosterol, campesterol, a stigmasterol. Obvykle se izolují z nezmýdelnitelných složek rostlinných extraktů. Zvláště vysoké obsahy sterolů jsou v přírodě známy u rýžových otrub, kukuřičných klíčků, obilných olejů a sojových bobů; zajímavé jsou i obsahy v některých plodech, ovoci i zelenině. Komerčně významným obsahem se pak vyznačují i některé organické odpadní hmoty – např. ze specifických technologií výroby papíru, palmového oleje, deodorizovaných podílů sojového oleje.

V tabulce jsou uvedeny obsahy fytosterolů některých potravin.

Potravina	obsah fytosterolů v mg /100g potraviny
Kukuřičný olej	729
Slunečnicový olej	650
Pšeničné klíčky	346
Pšeničné otruby	200
Olivový olej	157
Mandle	121
Žitný chléb	52

Fytosteroly jsou v posledních letech zajímavou komoditou pro řadu pozitivních vlivů na lidský organismus. Na základě mnoha lékařských studií jsou prokazatelně zodpovědné za eliminaci některých negativních jevů tzv. civilizačních chorob. Jde zejména o snižování hladiny cholesterolu v lidské krvi, pozitivní regulační vliv na imunitní systém a léčbu některých chorob (například benigní prostatická hyperplasie, kde byl dokonce

zjištěn výrazný terapeutický efekt). Proto se začínají fytosteroly a fytostanoly, jejich saturované analogy, objevovat nejen ve formě potravních doplňků, ale i v běžných potravinách (oleje a margaríny).

V následujícím textu budou stručně popsány jednotlivé účinky fytosterolů na lidský organismus.

Účinek rostlinných sterolů na snižování hladiny cholesterolu v krvi

Již v roce 1950 bylo zjištěno, že fytosteroly mají schopnost snižovat koncentraci plazmatického cholesterolu tím, že redukují absorpci cholesterolu ze střeva kompeticí s cholesterolem o vazbu v micelách. Saturovatelnost micel je omezená, a tak přidání rostlinných sterolů vede proporcionálně ke snížení koncentrace cholesterolu v transportních micelách, a tím ke snížení absorpce cholesterolu střevem.

Tento fenomén je v současné době využíván k dietní léčbě hypercholesterolemie. Přidání rostlinných sterolů do diety redukuje vstřebávané množství cholesterolu ve střevě. Rostlinné steroly jsou potenciálně aterogenní podobně jako cholesterol, ale ve skutečnosti aterogenezi nevyvolávají, protože se z potravy vstřebávají minimálně. Z přijatého množství, které při normální dietě činí 0,25 g, se může vstřebat okolo 5 % sitosterolu, 15 % kampesterolu a méně než 1 % dietních stanolů. Největší příjem dietních fytosterolů je pozorován u vegetariánů, kde může dosáhnout až 4 g denně. Avšak i z tohoto množství je resorbovaná frakce tak malá, že neohrožuje nemocného.

Resorbované fytosteroly se podobně jako cholesterol metabolicky transformují ve žlučové kyseliny, které se však svým detergentním účinkem i solubilitou liší od žlučových kyselin vznikajících z živočišných sterolů a cholesterolu. V přírodě se rostlinné steroly vyskytují ve volné i esterifikované formě. Pokud jsou v dietě obsaženy estery rostlinných sterolů, jsou ve střevě štěpeny na volný fytosterol a mastné kyseliny. Uvolněné fytosteroly snadno pronikají do micel, z nichž cholesterol vytěsňují, případně brání vstupu cholesterolu do micel. Tímto způsobem rostlinné tuky – oleje obsahující estery fytosterolů – snižují významně absorpci cholesterolu přijímaného ve stravě a současně snižují účinnost enterohepatální cirkulace cholesterolu tím, že zamezují jeho zpětnému vstřebávání z gastrointestinálního traktu do portálního oběhu.

Důsledkem toho je redukce plazmatické hladiny cholesterolu navzdory tomu, že při snížené resorpci se cholesterol zvýšeně syntetizuje v játrech a dalších tkáních. Snížení resorpce cholesterolu klesá úměrně s dávkou fytosterolů v dietě až do 2 g fytosterolů

za den. Při dávkách fytosterolů nad 2 g již není dávková závislost na snížení cholesterolu pozorována. Účinnost fytosterolů na snížení resorpce tuku a cholesterolu z diety je tím menší, čím menší obsah tuku a cholesterolu je dietou přiváděn.

Nejlepší efekt mají fytosteroly, které jsou podávány emulgované v tuku v potravě, zatímco steroly podávané v kapslích nebo tabletách se jen nedokonale rozptýlí v přijímané potravě, a tím klesá jejich schopnost blokovat absorpci cholesterolu.

Určitou opatrnost vyvolává účinek fytosterolů na resorpci liposolubilních sloučenin. Větší randomizované studie ukázaly, že rostlinné steroly a stanoly snižují plasmatickou koncentraci β -karotenu asi o 25 %, α -karotenu o 10 % a koncentraci vitamínu E o 8 %. Vzhledem k tomu, že v přirozených zdrojích potravy, které obsahují fytosteroly, je obvykle i zvýšený přívod karotenů a tokoferolů, neprojeví se toto snížení deficitem v organismu.

Z údajů analýzy 41 klinických studií vyplynulo, že příjem 2 až 3 gramů rostlinných sterolů denně vede ke snížení hladiny cholesterolu LDL v průměru o 10 %. Příjem rostlinných sterolů přesahující 3 g denně nemá žádný významný další účinek na snížení hladiny cholesterolu.

V roce 2001 byly na český trh společností Unilever uvedeny výrobky Flora pro.activ. Jedná se o řadu potravin obohacených rostlinnými steroly, v České republice jsou nyní zařazeny do kategorie potravin pro zvláštní výživu. Sadu těchto produktů tvoří nízkotučný rostlinný tuk (7,5 % rostlinných sterolů), odtučněné mléko (0,3 % rostlinných sterolů), nízkotučné jogurty (0,5 – 0,6 % rostlinných sterolů) a jogurtové probiotické minidrinky (0,2 % rostlinných sterolů). Producent deklaruje, že snížení hladiny LDL cholesterolu v krvi o 10 až 15 % do tří týdnů je možné dosáhnout konzumací 2 až 3 gramů rostlinných sterolů denně. Takové množství je obsaženo v 1 lahvičce minidrinku Flora pro.aktiv či ve 3 porcích potravin Flora pro.aktiv, přičemž 1 porce je ekvivalentní 250 ml mléka nebo 10 g rostlinného tuku nebo 150 g jogurtu.

β -sitosterol a imunitní systém

Další oblastí, kde by se fytosteroly mohly prosadit jako léčiva je imunologie. Fytosteroly a steroliny (glukosidy sterolu) vykázaly schopnost reverzovat imunologické abnormality jak u pacientů s plicní tuberkulózou, tak HIV.

Správně fungující imunitní systém je důležitý pro každého člověka, pro sportovce zvlášť. Všeobecně je akceptováno, že trénink nízké intenzity může imunitnímu systému prospět tím, že zvyšuje reakce lymfocytů na mitogenní stimulaci a zvyšuje počet NK buněk a počet lymfocytů. Avšak cvičení vysoké intenzity dlouhého trvání je spojováno naopak s negativním dopadem na imunitní systém. Bylo zjištěno, že intenzivní trénink zvyšuje sérové koncentrace zánětlivých

cytokinů, jmenovitě interleukiny IL1 β a IL6 a tumorový nekrotický faktor TNF α . Tito sportovci jsou pak náchylnější k různým infekcím, např. infekcím horních cest dýchacích. Předpokládá se, že zde hrají roli některé hormony, zvláště glukokortikoidy, jmenovitě kortizol a jeho antagonistu dehydroepiandrosteron (DHEA), což je prekurzor testosteronu.

Byl testován vliv β -sitosterolu na imunitu sportovce. Dobrovolníkům, kteří se zúčastnili ultramaratonského běhu v Kapském Městě v Jižní Africe, byly podávány kapsle obsahující směs β -sitosterolu a jeho glukosidu (sterolinu). Druhá skupina obdržela neúčinné placebo. Nejdrastičtější rozdíly mezi těmito dvěma skupinami vykazala koncentrace IL6 a poměr kortizol: DHEA. Placebo skupině bylo naměřeno typické zvýšení zánětlivých cytokinů. Naproti tomu byly tyto koncentrace významně sníženy u sportovců, kteří požíli kapsle s účinnou látkou fytosterolů. Výzkumníci spekulovali, že směs β -sitosterolu a jeho glukosidu je možným přírodním antistresovým agens či antagonistou kortizolu. V každém případě vědci doporučují další výzkum v této oblasti.

Fytosteroly pro léčbu benigní prostatické hyperplasie (BPH)

Benigní prostatická hyperplasie (BPH) je název pro nerakovinné onemocnění prostaty. Jedná se o nezhoubný nárůst počtu buněk postiženého orgánu. BPH nejčastěji postihuje muže mezi čtyřicátým a šedesátým rokem života. Typickým symptomem je časté a bolestivé močení. Studie prováděné za účelem ověření příznivého vlivu β -sitosterolu na potíže související s BPH dopadly velmi dobře a v současné době lze považovat podávání β -sitosterolu pacientům za účinnou součást terapie. Například v jedné šestiměsíční studii bylo 200 mužům se symptomy BPH třikrát denně podáváno 20 mg β -sitosterolu. Ve všech případech došlo k výraznému zlepšení obtíží ve srovnání se skupinou konzumující placebo. Subjektivní pocity dobrovolníků korelovaly s klinickými markery. Zvýšil se průtok moči a poklesl zbytkový objem moči v močovém měchýři.

Jedním z komerčních přípravků dostupných na trhu je extrakt z americké trpasličí palmy *Saw palmetto* či *Serenoa repens*. Jedná se o lipido-sterolový koncentrát, který slouží k léčení klinické BPH.

Přestože dosud není prozkoumán mechanismus, jakým se fytosteroly účastní terapie BPH, usuzuje se, že jejich účinek souvisí s protizánětlivým působením a schopností snižovat akumulaci cholesterolu v prostatě. Zatím nebylo prokázáno, že by fytosteroly měly nějaký vliv na velikost prostatické žlázy.

Fytosteroly v boji proti rakovině

V posledních letech se vědecká pozornost zaměřuje na výzkum dalších pozitivních účinků fytosterolů při léčbě různých druhů onemocnění a to především

rakoviny. Jedním z nejběžnějších druhů je rakovina prostaty vyskytující se v současné době u mužů žijících na Západě. Jen v USA je ročně diagnostikováno 200 tisíc nových případů a konstatováno přibližně 31 tisíc úmrtí na tento typ rakoviny. Statistické údaje ukazují, že se rakovina prostaty vyskytuje méně často u Asiatů v porovnání s muži ze západních zemí, což svědčí o tom, že strava bude hrát v této nemoci určitou roli. Jedním z hlavních rozdílů mezi jídelníčkem v Asii a na Západě je poměr rostlinných a živočišných tuků, potažmo fytosterolů a cholesterolu. V západní kuchyni se stále uplatňuje nižší procento rostlinných sterolů, než je tomu u Asiatů.

Zatím není známa přímá souvislost mezi konzumací rostlinných sterolů a výskytem rakoviny, pouze několik málo epidemiologických studií bylo zaměřeno tímto směrem. Bohužel výsledky z nich neposkytují příliš jasný závěr. Z jedné studie z USA vyplynulo, že ženy s diagnosou rakoviny prsu měly nižší průměrný denní příjem fytosterolů než ženy zdravé. Na druhou stranu v jiné studii bylo zjištěno, že muži s diagnosou rakoviny prostaty měli vyšší denní příjem rostlinných sterolů, než muži zdraví.

V současnosti se provádí mnoho různých výzkumů, kde je testován vliv rostlinných sterolů na lidské tkáňové kultury rakovinných buněk (*in vitro*) a na nádory v živých zvířatech (*in vivo*). Zde uvádím dva příklady. V průběhu osmi týdnů byly monitorovány nádory dvou skupin inokulovaných myší. První skupina dostávala stravu bohatou na rostlinné steroly a druhé skupině byla podávána strava bohatá na cholesterol. Po osmi týdnech došlo u první skupiny ke 40 %ní redukci velikosti nádorů oproti skupině druhé. Studie prováděná *in vitro* na tkáni lidské prostaty ukázala, že β -sitosterol inhibuje růst rakovinných buněk prostaty o 70 % a campasterol o 14 %, zatímco cholesterol jej zvyšuje o 18 %.

Na rozdíl od normálních buněk ztrácí rakovinné buňky přirozenou schopnost reagovat na signály vedoucí k apoptóze. Spekuluje se, že β -sitosterol dokáže buňky netečné k těmto signálům nějakým způsobem stimulovat a tak programovanou buněčnou smrt v nich opět navodit.

Fytosteroly pro syntézu steroidních hormonů

Do 40. let se steroidní hormony izolovaly z příslušných žláz živočichů, tento postup byl ve srovnání s nynější produkcí s ohledem na zdroje nedostatečný a značně nákladný. V roce 1943 byl poprvé izolován rostlinný sterol diosgenin z mexických yamů. Tato sloučenina se pro svou vhodnou chemickou strukturu začala používat pro komerční způsob syntézy progesteronu. Dalším krokem v inovaci způsobu získávání steroidních hormonů byl objev bakteriální konverze (*Rhizopus arrhizus*) kortisonu z progesteronu, a to

jinou cestou než používá lidský organismus. Tak ve 40. a 50. letech se používal diosgenin pro syntézu mnoha steroidních hormonů používaných v medicíně.

Dnes se téměř všechny steroidní hormony vyrábí ze stigmasterolu, nejvíce rozšířeného fytosterolu, jenž se získává především ze soji, nebo z cholesterolu dostupného v obrovském množství v tuku z vlny. Stigmasterol je buď chemickou syntézou modifikován na progesteron, nebo podléhá bakteriální konverzi v estron či testosteron. Zatím neexistuje důkaz, že by lidské tělo použilo diosgenin či stigmasterol jako substrát pro vlastní metabolickou syntézu steroidních hormonů.

Závěr

Rostlinné steroly jsou součástí naší každodenní stravy. Důležitou roli však hraje jednak absolutní množství fytosterolů v denním příjmu a pak poměr fytosterolů a cholesterolu v dietě. Toto jsou faktory, jenž podmiňují lidské zdraví. Je potvrzeno, že fytosteroly mají příznivý vliv na prevenci a léčbu chorob souvisejících s vysokou hladinou cholesterolu v krvi. Bylo dokázáno, že do jisté míry odstraňují problémy frekventovaného a bolestivého močení u mužů trpících benigní prostatickou hyperplasií. Podávání β -sitosterolu vykazovalo pozitivní dopad na imunitní systém z hlediska potlačení určitých neefektivních zánětlivých reakcí organismu.

Nebyly objeveny žádné významné nežádoucí účinky způsobené konzumací rostlinných sterolů, avšak jejich nadměrný příjem snižuje schopnost organismu absorbovat β -karoten a vitamin E. Proto lze konstatovat, že příjmem fytosterolů nepřesahujícím 2 až 3 gramy denně je možné dosáhnout optimální hladiny cholesterolu v krvi a pomoci organismu v prevenci srdečně-cévních onemocnění, případně dalších chorob a potíží.

Literatura:

- Steroly v rostlinných tucích jako racionální doplněk stravy; možnosti výzkumu a vývoje v ČR, Technologické centrum AV ČR, 2003.
Law M.: Plant sterol and margarines and health, Br. Med. J. 320, 861, 2000.
Firemní materiály Unilever: Flora pro-aktiv, informace o výrobcích, 2005.
Kvasničková A.: Bezpečnost potravin (27851, 2004).
Bouic P., Lamprecht J.: Altern. Med. Rev. 4, 170, 1999.
Bouic P.: Int. J. Sport. Med. 20, 258, 1999.
Berges R.R. et al.: Lancet 345, (8964), 529, 1995.
Wilt T.: BJU Int 83, 976, 1999.
Wilt T.: JAMA 281, 1705, 1999.
Awad A.B. et al.: Int. J. Mol. Med. 5, 541, 2000.
Awad A.B. et al.: Eur. J. Cancer Prevent. 10, 507, 2001.

VÝZNAM A SYNTÉZA OLIGOSACHARIDŮ A JEJICH KONJUGÁTŮ

Eva Benešová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Jedním z významných témat, kterými se zabývá současná věda, je syntéza a ověřování vlastností přírodních i uměle syntetizovaných oligosacharidů a jejich různých konjugátů například s proteiny, lipidy a dalšími organickými látkami necukerného charakteru. Podobný výzkum je zásadní z toho důvodu, že tyto látky hrají nezastupitelnou úlohu v důležitých biologických procesech. Glykosylace ovlivňuje vlastnosti mnoha biologicky aktivních látek a tím i jejich biologické funkce. Účast glykosylovaných konjugátů byla potvrzena například při mezibuněčných interakcích či při interakcích buněk s viry (Rastall a Bucke, 1992), dále pak při procesech intracelulární adheze a maskování receptorových míst (Koeller a Wong, 2000) a v procesech diferenciaci a morfogenezi (Mori a kol., 2004). Předmětem zkoumání je i jejich možná účast při přenosu signálů. (Koeller a Wong, 2000).

Kromě výše zmiňovaných významných funkcí oligosacharidů a jejich konjugátů v přirozených biologických procesech je pro vědu neopominutelný fakt, že mnoho účinných farmaceutik využívaných v současné humánní medicíně jsou glykokonjugáty. Metody umožňující modifikaci jejich oligosacharidové struktury by mohly vyřešit některé problémy týkající se například rozpustnosti, antigenicity nebo vlastního příjmu léku cílovými buňkami (Wong a kol., 1995). Kromě těchto znalostí se však současná medicína neobejde ani bez detailního popisu přirozených glykosylových struktur na povrchu buněk, neboť jejich změny umožňují diagnostikovat mnohá závažná (například nádorová) onemocnění (Koeller a Wong, 2000). Mimo to je možné oligosacharidy a jejich různé konjugáty využívat k modulaci buněčných funkcí a k inhibici některých enzymů. To je výhodné, pokud je nutno inhibovat procesy glykosylace, čehož se využívá například při léčbě diabetu a dalších metabolických poruch a což zároveň může vést k zamezení procesů infekce, zánětů a metastatického šíření (Wong a kol., 1995).

Existuje několik způsobů, kterými je možné glykokonjugáty získávat. Jedním z nich je jejich přímá izolace z přirozených zdrojů. Protože se však vyskytují v komplexních biologických materiálech pouze ve velmi malých množstvích, je tento způsob velmi finančně náročný a pro průmyslovou praxi nepoužitelný (Rastall a Bucke, 1992).

Stejně tak i chemická syntéza skrývá mnohá úskalí. V současné době je sice možné touto metodou získat většinu požadovaných produktů, to vše ale za cenu velmi náročného a komplikovaného postupu. Celý proces chemické syntézy oligosacharidu, případně glykokonjugátu, se totiž skládá z mnoha dílčích kroků, zahrnujících chránění a případně následné odblokovávání důležitých funkčních skupin (lit. 5). Více-

stupňový charakter procesu ovšem sám o sobě vede ke snižování konečných výtěžků, a to má dopad na praktickou využitelnost metody (Weignerová a kol., 1999).

Alternativním řešením je syntéza, ve které jsou využívány buď izolované enzymové preparáty nebo přímo celé buňky produkující potřebné enzymy (Giacomini a kol., 2002). Podstatnou výhodou této metody je její jedнокrokový charakter, neboť je eliminováno nebezpečí postupného snižování konečných výtěžků v jednotlivých krocích, které komplikuje použitelnost chemické syntézy. Vzhledem k regioselektivitě některých enzymů odpadá i pracné chránění a následné odblokovávání funkčních skupin (lit. 5). Kromě toho je pomocí metod využívajících enzymové preparáty možno kontrolovat konfiguraci na anomerickém centru. To vše má za následek výrazné zjednodušení syntézních procesů a úsporu času vynaloženého na syntetický proces (Scigelova a kol., 1999).

Pro enzymovou glykosylaci se využívá enzymů dvou tříd, a to transferas (glykosyltransferasy) a hydrolas (glykosidasy).

Glykosyltransferasy jsou enzymy, které i za fyziologických podmínek katalyzují transport cukerného zbytku na akceptorovou molekulu, přičemž tento transport vykazuje vysokou regioselektivitu, což je společně s poměrně vysokými výtěžky reakcí zásadní výhodou aplikace těchto enzymů. Situaci však komplikuje špatná dostupnost a malá stabilita glykosyltransferas, stejně jako vysoká cena substrátů (resp. donorů glykosylového zbytku), kterými jsou cukerné nukleosidy (Giacomini a kol., 2002). Aby průmyslové využití glykosyltransferas bylo ekonomicky akceptovatelné, je nezbytné zavádět přímo do jednotlivých procesů regenerační postupy, při kterých se finančně velmi nákladné substráty obnovují pomocí multienzymových systémů (lit. 5). Další nesnáze způsobuje také fakt, že glykosyltransferasy vykazují vysokou selektivitu k akceptorové molekule, což omezuje možnost jejich použití pro syntézu nových oligosacharidů resp. glykokonjugátů (Scigelova a kol., 1999).

Na rozdíl od glykosyltransferas jsou glykosidasy neboli enzymy, které za běžných podmínek katalyzují štěpení glykosidické vazby, poměrně snadno dostupné, jsou značně rozšířeny v živočišných i rostlinných tkáních a zároveň je produkuje mnoho mikroorganismů (Scigelova a kol., 1999), práce s nimi není náročná a nevyžadují drahé substráty. Kromě toho jsou poměrně tolerantní k organickým rozpouštědlům, což může být v praxi velmi užitečné, neboť v přítomnosti vody jako kompetující akceptorové molekuly dochází ke snížení celkového výtěžku reakcí. Tyto výhody jsou ovšem na úkor obecně nižší selektivity glykosidas i efektivit celého procesu v porovnání s glykosyltrans-

ferasami (Giacommini a kol. 2002; Scigelova a kol., 1999). Existuje však hypotéza, že regiosektivita enzymu při produkci oligosacharidů je shodná s tou, kterou enzym vykazuje při štěpení glykosidické vazby (Malá a kol., 1999; Ajisaka a kol., 2002).

Většina glykosidas, které jsou v současné době při syntéze oligosacharidů a glykokonjugátů využívány (asi nejvyužívanějším enzymem této třídy je enzym beta-galaktosidasa, používaná k syntéze di- případně trisacharidů z laktosy (Kéry a kol., 1991; lit. 12)), jsou exoglykosidas. To znamená, že katalyzují přenos pouze koncového monosacharidového zbytku z donorové na akceptorovou molekulu. Využití endoglykosidas by přineslo mnoho nových důležitých poznatků o struktuře a vlastnostech různých větvených struktur, neboť by docházelo k přenosu celých oligosacharidových fragmentů, avšak studie zabývající se touto problematikou jsou teprve v začátcích (Crout a Vic, 1998).

Zajímavé je, že glykosidas, jejichž přirozenou funkcí je hydrolyza glykosidické vazby, jsou schopny katalyzovat syntézu oligosacharidů a glykokonjugátů hned dvojím způsobem, a to katalýzou transglykosylačních reakcí nebo reversní hydrolyzou. V případě transglykosylační reakce je přenášený monosacharid nejprve odštěpen z vhodné donorové molekuly a teprve následně přenesen na akceptorovou, která nahrazuje molekulu vody, na kterou by glykosylový zbytek byl přenesen v případě hydrolytické reakce. Jakou vazbou bude glykosylový zbytek k akceptoru připojen závisí na typu enzymu (Ajisaka a kol., 2002). Průběh těchto reakcí je řízen kineticky (Weignerová a kol., 1998). Při reverzní hydrolyze je průběh reakce řízen rovnováhou mezi jednotlivými reakčními složkami a na akceptor je přenášen přímo samostatný monosacharid přítomný v reakční směsi. Nutnou podmínkou je jeho dostatečně vysoká koncentrace (lit. 5). Podstatnou předností tohoto typu reakcí je možnost využití mnoha sacharidů jako akceptorových molekul, což umožňuje syntézu mnoha nových látek, které mohou být využity v různých průmyslových, medicínských i vědeckých oborech. Nevýhodou zůstávají poměrně malé výtěžky a složitá izolace jednotlivých produktů z různorodé reakční směsi (lit. 12).

Současná věda se snaží využít dosavadních poznatků k vývoji co nejjednodušších a ekonomicky nejvýhodnějších metod syntézy, které by umožnily produkci co nejširšího spektra známých i zcela nových látek. Příkladem takového modernizované metody může být enzymová syntéza na pevné fázi, ve které se využívá výhod samostatné enzymové syntézy v roztoku, ale zároveň i možnosti snadné purifikace a odstranění nadbytku reagujících látek (Crout a Vic, 1998). Snadný přístup k velkému množství různých oligosacharidových či glykokonjugátových struktur totiž otevírá možnosti detailního zkoumání většího počtu látek potenciálně důležitých jak z vědeckého, tak z medicínského hlediska (Murata a Usui, 2000).

Literatura:

1. Rastall R. A., Bucke C.: Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10, 253 (1992).
2. Koeller K. M., Wong CH.-H.: Chem. Rev., 100, 4465 (2000).
3. Mori T., Sekine Y., Yamamoto K., Okahata Y.: Chem. Commun., 23, 2692 (2004).
4. Wong C.H., Halcomb R.L. et al.: Chem. Int. Ed. Engl., 34, 521 (1995).
5. <http://www.food.reading.ac.uk/online/fs560/topic4/t4b/t4b.htm> (staženo 6.10. 2005).
6. Weignerová L., Rajnochová-Herkommerová E., Křen V.: Chem. Listy, 93, 781 (1999).
7. Giacommini C., Ivazouqui G. et al.: J. Mol. Catal., 19-20, 159 (2002).
8. Scigelova M., Singh S., Crout D.H.G.: J. Mol. Catal. B Enzym., 6, 483 (1999).
9. Malá Š., Dvořáková H., Hrabal R., Králová B.: Carbohydr. Res., 322, 209 (1999).
10. Ajisaka K., Yamamoto Y.: Trends Glycosc. Glycotechnol., 14, 1 (2002).
11. Kéry V., Kučár Š., Matulová M., Haplová J.: Carbohydr. Res. 209, 83 (1991).
12. <http://www.food.rdg.ac.uk/people/afsrastl/synthesis.htm> (staženo 20. 4. 2005).
13. Crout D.H.G., Vic G.: Curr. Opin. Chem. Biol., 2, 98 (1998).

BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST A ÚSTAV BIOCHEMIE A MIKROBIOLOGIE, VŠCHT PRAHA

Vás srdečně zvou na seminář

GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY V POTRAVINÁŘSTVÍ A PRŮMYSLU

středa 14. června 2006 od 10:30

v posluchárně BIII, VŠCHT Praha budova B, Technická 3, Praha 6

<http://bts.vscht.cz>

V TOMTO ČÍSLE NAJDETE

ÚVOD	1
ČESKÁ ICHTYOLOGICKÁ KONFERENCE	2
EUROFISH MAGAZINE	3
SEMINÁŘ O OCHRANĚ DUŠEVNÍHO VLASTNICTVÍ	3
CHITOSANPEROS	3
JIŽNÍ MORAVA MÁ PRO BIOTECHNOLOGIE DOBRÉ PŘEDPOKLADY	4
SEKRECE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V <i>ESCHERICHIA COLI</i>	5
MOHOU VAKCÍNY ZLEPŠIT LÉČENÍ RAKOVINY?	8
BANÁNY A GENETICKÉ INŽENÝRSTVÍ	11
SOUČASNÝ STAV A PERSPEKTIVY GENETICKÝCH MODIFIKACÍ OKRASNÝCH DŘEVIN A ROSTLIN	14
ZÁKAZ PLOŠNÉHO POUŽITÍ ANTIBIOTIK VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT A JEHO DŮSLEDKY	16
FULLERENY – KULATĚJŠÍ MOLEKULY V CHEMII NENAJDETE	18
ZDRAVOTNÍ VÝZNAM ROSTLINNÝCH STEROLŮ	20
VÝZNAM A SYNTÉZA OLIGOSACHARIDŮ A JEJICH KONJUGÁTŮ	23

POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,

aby byla technická úprava našeho časopisu co nejlepší a s minimálním množstvím chyb, uvítali bychom dodržování některých dále uvedených zásad.

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako "attachment" spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem.
2. Texty pište v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. Nerozdělujte slova na konci řádků. V textu lze používat zvýraznění některých termínů tučným písmem či kurzívou, a také horní a dolní index. Řádkování jednoduché. Odsazení odstavců a mezery mezi nimi nepoužívejte (nastavení = 0).
3. Nepoužívejte automatické číslování, tabulátory, ani „tvrdé“ definice stránek.
4. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
5. Připojte vždy svojí e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

Děkuji

L. Fukal

BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

Podávání novinových zásilek povoleno Ředitelstvím pošt Praha, čl. NP 1177/1994 ze dne 13. 6. 1994