

Bio

Ročník 27 • Číslo 1/2017

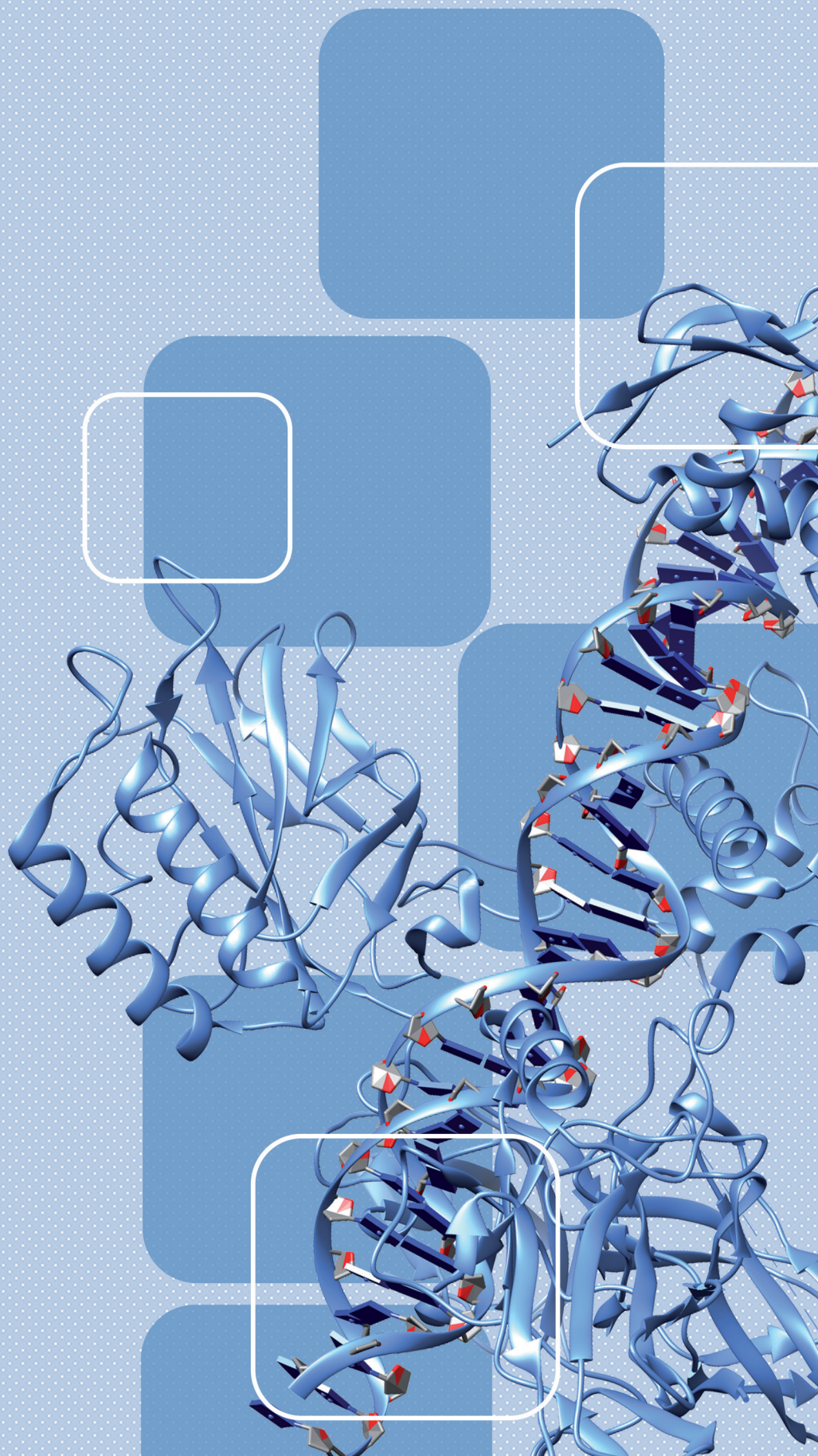
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

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

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

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

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

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

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

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

For more information contacts the editorial board or directly:

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

ÚVODEM

Vážení přátelé,

Úvodem bychom Vás rádi opětovně pozvali k účasti na našem symposiu BioTech 2017 (www.biotech2017.cz), které se bude konat ve dnech 13. – 17. června 2017 v Národní technické knihovně v Praze. Pro členy naší Biotechnologické společnosti, kteří se rozhodli účastnit později, nabízíme možnost registrace za registrační poplatek „Early bird“. Můžeme Vás ubezpečit, že organizační výbor udělal vše proto, aby symposium mělo vysokou odbornou úroveň a zároveň poskytlo ideální prostředí pro navazování nových kontaktů. Záštitu nad naším symposiem převzali místopředseda vlády p. MVDr. Bělobrádek, předsedkyně AV ČR p. prof. Zažímalová a starosta Prahy 6 p. Mgr. Kolář. Mezi VIP hosty, kteří potvrdili svou účast, bychom rádi jmenovali také rektora VŠCHT prof. Melzocha, rektora partnerské švýcarské university ZHAW prof. Hilbera a předsedu ČSVTS doc. Hanuse. Jednání každého dne otevřou plenární přednášky významných zahraničních hostů na velmi aktuální témata současných biotechnologií. Prof. Wilhelm Ansorge (ETH Lausanne, Švýcarsko) přednese přehled o současném stavu sekvenačních technik a jejich významu pro pokroky v genomice a medicíně. Prof. Ansorge osobně přispěl k rozvoji i aplikaci těchto technik. Je autorem 30 patentů, které nalezly praktické využití a řada z nich je využívána významnými společnostmi při produkci úspěšných výrobků. Má ohromné zkušenosti s transferem technologií. Druhý přednášející je profesor Ed Bayer (The Weizmann Institute of Science, Israel), který vyvinul ve výzkumu dnes velice využívaný systém avidin- a streptavidin-biotin systém, za který obdržel v r. 1990 Sarstedtovu cenu. Mezi jeho další významné vědecké úspěchy patří výzkum celulosomu a možnosti jeho biotechnologických aplikací. Tyto úspěchy mu přinesly řadu dalších ocenění (např. Ulitzkého cena, 1999). Ve své přednášce představí ucelený přehled jeho nejvýznamnějších vědeckých úspěchů. Jako další přednášející přijal naše pozvání mladý český vědec prof. Martin Jínek působící na curyšské universitě ve Švýcarsku. Jeho přednáška bude zaměřena na nejaktuálnější téma současných biotechnologií, a to tzv. editaci genů (gene editing). Jeho experimentální práce vedla k objevení bioche-

mické funkce RNA-endonukleasy CAS 9 a umožnila vývoj genomové editační technologie CRISPR CAS 9. Prof. Jínek je tedy tou nejvhodnější osobou, která může tuto perspektivní technologii auditoriu symposia co nejlépe vysvětlit. Prof. MooYong (University of Waterloo, Kanada) se zúčastnil již našich předchozích dvou symposií. Jeho jméno je spojeno s nejrozsáhlejším kompendiem o biotechnologiích, založením nejprestižnějšího biotechnologického časopisu Biotechnology Advances, biotechnologickou komisí IUPAC a mnoha dalšími institucemi. Jako profesor chemického inženýrství vždy inklinoval k problematice životního prostředí a biopaliv. Jeho přednáška bude zaměřena na problematiku dilemat, které se v této oblasti vyskytují.

Během symposia bude předneseno více než 80 přednášek v 7 vědeckých sekcích. V současné době probíhá stále registrace do posterové sekce, takže jejich konečný počet není zatím uzavřen. Kromě zajímavého vědeckého programu je pro účastníky připraven bohatý společenský program. Symposium bude otevřeno uvítací recepcí v Národní technické knihovně, kde bude již tradičně podáván bohatý raut a rozléváno bude pivo jednoho z našich sponzorů, pivovaru Ferdinand. Na další večer je připravena pivní party s možností ochutnat pivo vyrobené v pivovaru VŠCHT, ve čtvrtek se hosté mohou těšit na gala večeři v nádherném Kaiserstejnském paláci na Malé Straně a v pátek bude organizována prohlídka nejvýznamnějších pražských památek. Na sobotu je poté připravena exkurze do plzeňského Prazdroje, kde bude podáván oběd následovaný prohlídkou Kladrubského kláštera.

Program symposia obohatí několik workshopů a samozřejmě výstavy a informace dodavatelů laboratorní techniky.

Věříme, že vás nabídka přednášek i společenského programu zaujala natolik, že se rozhodnete této akce zúčastnit a společně tak budeme mít možnost prožít několik příjemných dní nabitých novými poznatky a dojmy.

Srdečně Vás zdravíme a těšíme se, že se na symposiu setkáme

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

Významná podpora mezinárodní konference BioTech2017 & 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition

Dovolujeme si s hrdostí oznámit, že záštitu nad připravovanou mezinárodní konferencí BioTech2017 & 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, která se bude konat ve dnech 13. – 17. 6. 2017 v Národní technické knihovně v Praze 6, převzali následující významné osobnosti: MVDr. Pavel Bělobrádek, Ph.D., MPA, místopředseda vlády pro vědu, výzkum a inovace, prof. RNDr. Eva Zažímalová, CSc., předsedkyně Akademie věd ČR a Mgr. Ondřej Kolář, starosta městské části Praha 6.



MVDr. Pavel Bělobrádek, PhD



prof. RNDr. Eva Zažímalová, CSc



Mgr. Ondřej Kolář

Biotech 2017

and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition



June 13-17, 2017

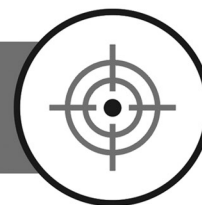


www.biotech2017.cz

Important dates

February 28, 2017	Early bird registration deadline
May 18, 2017	Registration and payment deadline
June 13-17, 2017	Conference

Scope



BioTech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium with exhibition will cover all important aspects of advanced biotechnologies. **Attention will be paid to the key technologies playing important role in bio-based economies.** Microorganisms such as bacteria, yeast, and microalgae, and their enzymes, are used for manufacturing a wide range of products in sustainable, forward-looking bioprocesses. These products represent high-performance chemicals or ingredients in demand for foodstuffs, animal feed, cosmetics and pharmaceuticals.

Lectures will be organized in following sessions:

- **Medical and Pharmaceutical Biotechnology**
- **Microalgae Biotechnology**
- **Environmental Biotechnology**
- **Food and Agriculture Biotechnology**
- **Biorefinery**
- **Industrial Biotechnology**

Selection criteria for oral and poster presentations will be based on novelty, potential for practical application and scientific merit. The official conference language will be English.

Plenary lectures



Wilhelm Ansorge (ETH Lausanne):
PERSPECTIVES FOR DNA SEQUENCING TECHNIQUES, APPLICATIONS IN GENOMICS and MEDICINE

Martin Jinek (University of Zurich):
MOLECULAR MECHANISM OF THE GENOME EDITOR NUCLEASE CAS9

For Exhibitors and sponsors

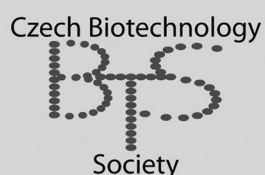
Participation in this event will help to promote your company as a key player in the biotechnology sector, build connections with new clients, and seek research partners or future employees among the top students attending this event.

For detailed offer for Exhibitors see the conference website.

Hosted by



scienceINDUSTRIES
SWITZERLAND



Zurich University
of Applied Sciences



Life Sciences and
Facility Management
Institute of
Biotechnology



SOTIO JE MEZINÁRODNÍ BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST ZAMĚŘUJÍCÍ SE NA VÝZKUM A VÝVOJ NOVÝCH LÉČEBNÝCH POSTUPŮ V OBLASTI ONKOLOGIE A AUTOIMUNITNÍCH ONEMOCNĚNÍ

SOTIO je součástí skupiny PPF a v jejím rámci buduje diverzifikované portfolio v oblasti biotechnologií založené na vlastním výzkumu a vývoji, spolupráci s partnery, licenčních dohodách, investicích, fúzích a akvizicích. Nejrozvinutějším projektem je vlastní platforma aktivní buněčné imunoterapie (ACI) na bázi dendritických buněk. SOTIO ověřuje bezpečnost a účinnost svých produktů DCVAC v rámci řady klinických hodnocení fáze I až III.

Klíčová mezinárodní studie fáze III (VIABLE) zaměřená na pacienty s nádorovým onemocněním prostaty, byla zahájena v roce 2014. V moderní historii je to poprvé, co do takovéto fáze klinického vývoje vstoupila firma z České republiky. SOTIO je rovněž první společností z regionu střední a východní Evropy, která zahájila fázi III klinických hodnocení v oblasti buněčné imunoterapie.

V roce 2016 v rámci SOTIO probíhalo deset klinických studií v Evropě a USA, zaměřených na pacienty s nádorovým onemocněním prostaty, vaječníků a plic. Několik dalších klinických studií je ve stádiu přípravy. Společnost realizuje také několik výzkumných projektů s předními čínskými nemocnicemi, dva klíčové projekty byly zahájeny v roce 2016. Stěžejní studie VIABLE v současnosti zařazuje pacienty z 21 evropských zemí a USA. Většina pacientů pochází z USA, České republiky, Německa či Polska.

Klinická studie fáze I/II zaměřená na využití aktivní autologní buněčné imunoterapie pro pacienty s karcinomem plic (přípravek DCVAC/LuCa) v listopadu 2016 úspěšně dokončila zařazování pacientů v České republice a na Slovensku. V loňském roce byl v souladu s plánem završen i nábor pacientů do klinických studií fáze II určených pro pacienty s nádorovým onemocněním vaječníků.

SOTIO rovněž hledá další firmy či instituce vyvíjející nadějně léčebné onkologické postupy s cílem navázat spolupráci. Ve spolupráci se sesterskou firmou Accord

Research rovněž zastřešuje předklinický a klinický vývoj pro další biotechnologické firmy, které jsou majetkově či smluvně navázány na skupinu PPF či SOTIO. V současnosti se jedná o francouzskou společnost Cytune Pharma a švýcarské NBE-Therapeutics a Cellectia Biotech. Ve spolupráci s těmito partnerskými firmami a v rámci svého vlastního vědeckého výzkumu SOTIO připravuje několik projektů v předklinickém stádiu s cílem posunout jejich vývoj do fáze I klinického vývoje.

Firma rozvíjí a financuje vlastní vědecký výzkum, svého druhu největší v České republice, a uvádí do praxe objevy českých vědců, kteří nyní pracují i na výzkumu nových metod léčby dalších závažných onkologických a autoimunitních onemocnění.

Společnost SOTIO působí v Evropě, USA, Číně a Rusku a má vlastní kapacity potřebné pro výzkum, klinický vývoj a uvedení produktů na trh. V roce 2011 vybudovala vlastní výrobní a výzkumné prostory v pražských Holešovicích, které patří k nejmodernějším a největším svého druhu v Evropě. Tyto superčisté laboratoře splňují nejpřísnější nároky na sterilitu výroby léčivých přípravků používaných v buněčné terapii. Obdobné laboratoře společnost otevřela v roce 2014 rovněž v čínském Pekingu.

Sídlo největší společnosti – SOTIO, a. s. – je v Praze. Součástí holdingu SOTIO jsou rovněž firmy v USA, Rusku a Číně. Holding SOTIO zaměstnává okolo 340 odborníků (k 31. 12. 2016).

CHEMICKÁ OXIDACE SULFIDŮ JAKO NEDÍLNÁ SOUČÁST BIOLOGICKÉ OXIDACE SULFIDŮ

Dana Pokorná

Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT Praha; Danka.Pokorna@vscht.cz

Síra je po chemické stránce asi nejzajímavější, ale rovněž nejsložitější prvek. Složitost pochopení chemie síry spočívá v tom, že se tento prvek nachází ve více oxidačních stupních. Dokonce i jako elementární síra v oxidačním stupni 0 se nachází v několika různých podobách a může vytvářet v podstatě neomezeně dlouhé řetězce nebo kruhy. Svoji nezanedbatelnou úlohu má tento prvek rovněž v oblasti anaerobního zpracování odpadních vod, kalů nebo odpadů. V případě některých průmyslových odpadních vod, které obsahují vysoké koncentrace síranů a siřičitanů, dochází k jejich redukci prostřednictvím sulfát-redukujících bakterií (SRB), které je dokážou redukovat na sulfidy za současného využívání přítomných organických látek, čímž významně konkurují anaerobním mikroorganismům v soutěži o přítomný organický substrát. Sulfidy vznikají v anaerobním prostředí rovněž při zpracování odpadů obsahujících bílkoviny s inkorporovanou sírou jako výsledek štěpení těchto bílkovin anaerobními mikroorganismy a následnou redukcí vznikajících síranů SRB. Vzniklé sulfidy potom podle podmínek prostředí přechází do bioplynu jako sulfan, čímž poměrně výrazně ztěžuje energetické využití bioplynu.

Způsobů odstraňování sulfanu z bioplynu je několik. Vedle chemických a fyzikálně-chemických metod jsou to v současné době hlavně metody biologické, které využívají činnosti sírných bakterií. Tyto biologické metody nemají významné provozní náklady a neprodukují vedlejší produkty, které by bylo třeba následně likvidovat. Mikroorganismy, které se na této činnosti podílejí, jsou tzv. sírné bakterie, v případě technologického uspořádání odsiřování bioplynu hlavně bezbarvé chemolitotrofní sírné bakterie (*Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Beggiatoa* a *Thiothrix*). Jako meziprodukty oxidace sulfidů se v médiu mohou vyskytovat thiosíran y a polysulfidy, které jsou tvořeny za podmínek vysokého zatížení a extrémnějších pH. Tyto dva významné meziprodukty se však tvoří v největší míře chemickou

oxidací (autooxidací) sulfidů a polysulfidů za alkalických podmínek¹ a dále pak mohou být bakteriální činností oxidovány až na sírany. Význam chemické oxidace sulfidů tedy spočívá hlavně v tom, že může pozitivně ovlivňovat biologickou aktivitu sírných bakterií tím, že snižuje inhibiční vliv přítomných sulfidů na mikroorganismy. Je proto vítaná zejména při oxidaci vysokých koncentrací sulfidů. Probíhá ve vodném alkalickém prostředí spontánně v přítomnosti dodávaného kyslíku a vede k tvorbě elementární síry, polysulfidů, siřičitanů a thiosíranů. Mezi faktory, které ovlivňují stechiometrii a kinetiku chemické oxidace patří molární poměr sulfidy – kyslík, teplota, iontová síla a přítomnost katalyzátorů příp. inhibitorů a hlavně na pH^{2-4} . V oblastech $\text{pH} < 6$, kde převažuje sulfan v nedisociované formě jako H_2S , je rychlost oxidace sulfidické síry velice malá. Stoupá postupně s rostoucím pH, kdy byla potvrzena dvě maxima specifické rychlosti oxidace sulfidů – při pH 8 a 11.

Siřičitany jsou v silně alkalickém prostředí ($\text{pH} > 10$) chemicky stabilní 1 den. Thiosíran y jsou dále v aerovaném vodném abiotickém prostředí poměrně stabilní 2 – 3 dny. Jsou však energeticky velmi výhodným substrátem pro sírné bakterie, které jej dokážou podle množství dodaného oxidačního činidla zoxidovat až na sírany. Jejich vymizení ze systému je tedy způsobeno právě jejich biologickou oxidací.

Chemickou oxidací sulfidů až na sírany je při $\text{pH} > 9$ možno očekávat až v delším časovém horizontu protože tvorba síranů potřebuje vyšší aktivační energii z enzymatické reakce mikroorganismů. Za normálního průběhu chemické oxidace, tj. v časovém horizontu hodin, je tedy možno předpokládat pouze tvorbu thiosíranů a siřičitanů.

Je tedy zřejmé, že proces biologické oxidace sulfidické síry není v principu nikterak jednoduchý, protože je doprovázen i oxidací chemickou, která zdá se, hraje v případě oxidace sulfidické síry nezanedbatelnou roli.

Literatura

1. Steudel R: *Ind. Eng. Chem. Res.* 35, 1417 (1996).
2. Chen KY, Morris JC: *Environ. Sci. Technol.* 6, 529 (1972).
3. Nielsen A, Vollertsen J, Hvortved-Jacobsen T: *Environ. Sci. Technol.* 37, 3853 (2003).
4. O'Brian DJ, Birkner FB: *Environ. Sci. Technol.* 11, 1114 (1977).

CHLADOVĚ AKTIVNÍ ENZYMY A JEJICH BIOTECHNOLOGICKÉ VYUŽITÍ

Patricie Buchtová

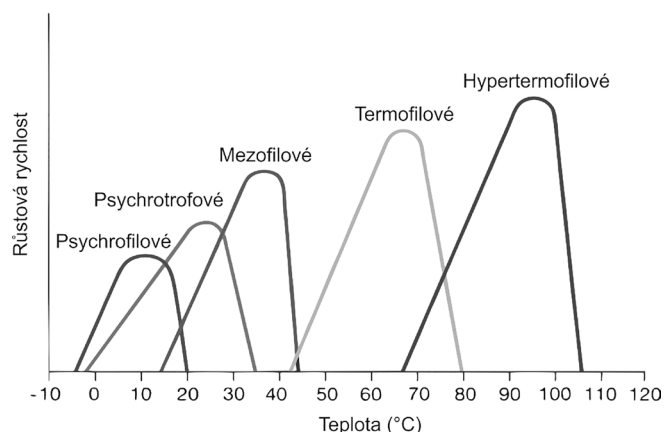
Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; patricie.buchtova@vscht.cz

Úvod

Jedním z nejdůležitějších abiotických faktorů životního prostředí, ne-li tím úplně nejdůležitějším, je teplota. Významně se totiž podílí na vytyčení podmínek vhodných pro život na naší Zemi. Až 90 % biosféry tvoří chladné oblasti, které jsou vystaveny teplotám nižším než 10 °C. Dominují jim zejména polární regiony Arktidy a Antarktidy, chladná voda v hloubkách oceánů a vysokohorské oblasti. Největší procento tvoří právě oceány, pokrývající naši planetu ze 71 %, v nichž je až 90 % vody o teplotě nižší než 5 °C. Dále je to také sníh, pokrývající asi třetinu zemského povrchu, permafrost, pokrývající přibližně čtvrtinu povrchu, ledovce a mořský led. Méně významná jsou sladkovodní jezera, půda v chladných oblastech nebo jeskyně. Díky činnosti člověka lze mezi chladná prostředí zařadit i chladírenské a mrazírenské vybavení či klimatizační prvky^{1,2}.

Chladově adaptované organismy

Ačkoliv by se na první pohled mohlo zdát, že jsou jmenované oblasti bez života, opak je pravdou. Mnoho živých organismů se nízkým teplotám přizpůsobilo a trvale kolonizovalo chladné oblasti. Většina chladově adaptovaných organismů patří dle definice do skupiny psychotrofů (jinak nazývaných také psychrotolerantní), jejichž optimální růstová teplota se pohybuje okolo 20 °C. Druhou skupinou jsou psychrofilní organismy, jejichž optimální teplota růstu se pohybuje níže – kolem 15 °C, při teplotě kolem 20 °C je jejich růst již značně inhibován (Obr. 1). Obě skupiny chladově aktivních organismů jsou nicméně schopny růst za teplot blízkých bodu mrazu, v některých ojedinělých případech i pod ním^{3,4,5}. Adaptace organismů na nízké teploty bývá často spjata také s adaptací na další extrémní podmínky prostředí, jako jsou vysoké koncentrace solí, vysoký tlak či krajní hodnoty pH⁶.



Obr. 1: Porovnání rychlosti růstu jednotlivých skupin organismů v závislosti na teplotě prostředí⁷.

Mezi organismy trvale přizpůsobené životu v chladných oblastech patří zejména mikroorganismy – gramnegativní bakterie (např. někteří zástupci rodů *Moraxella*, *Moritella*, *Polaribacter*, *Polaromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* a *Vibrio*, zároveň také některé cyanobakterie – např. *Oscillatoria* a *Phormidium*), grampozitivní bakterie (*Arthrobacter*, *Bacillus* a *Micrococcus*), archea (*Methanogenium*, *Methanococcoides* a *Halorubrum*), kvasinky (*Candida* a *Cryptococcus*), plísně (*Penicillium* a *Cladosporium*) (D'Amico et al., 2006; Pulicherla et al., 2011). Některé adaptované organismy jsou i ze skupiny rostlin (například *Chlamydomonas* – zástupci zelených řas) a živočichů (tzv. polární ryby)^{5,8,9}.

Vliv nízkých teplot

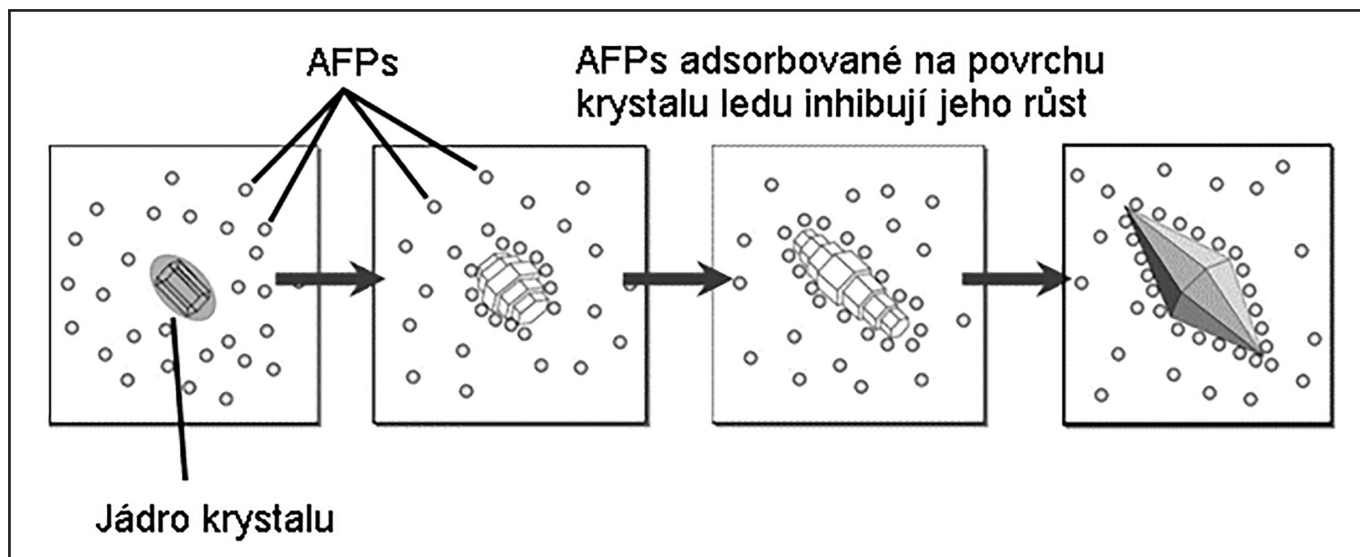
Obecně jsou živé organismy nízkými teplotami ovlivněny v mnoha směrech. Jde zejména o negativní vliv na výtěžky biochemických reakcí, fluiditu buněčných membrán, viskozitu intracelulárního obsahu, dostupnost živin, zároveň i na procesy související s proteosyntézou, se sbalováním exprimovaných proteinů a s buněčnou reprodukcí. V případě teplot okolo bodu mrazu vzniká také potřeba ochrany proti tvořícím se krystalům ledu^{5,10,11}.

V následující části práce budou postupně popsány jednotlivé mechanismy chladové adaptace organismů, které zajišťují jejich komplexní a trvalé přizpůsobení životu v chladných oblastech.

Nejvýznamnější mechanismy chladové adaptace

Důležitým požadavkem pro existenci života je dostupnost vody v kapalném skupenství, což může být pro organismy trvale žijící při nízkých teplotách limitujícím faktorem. Obecně je limitace života definována bodem, při kterém intracelulární voda tuhne a nemůže tak plnit svou biologickou funkci. Za normálních podmínek je v přírodě touto hranicí teplota 0 °C. Bylo však zjištěno, že v případě některých organismů se její hodnota významně snižuje, a to až o několik stupňů. Voda v jejich buňkách tak zůstává nadále kapalná a může plnit mnohé, pro přežití nezbytné, funkce^{5,11}.

U nemalého počtu druhů chladově adaptovaných organismů byla nalezena skupina tzv. „antifreeze“ proteinů (AFPs), jejichž funkce souvisí s ochranou před vznikajícími krystaly ledu za nízkých teplot. Mechanismus účinku těchto proteinů není zcela objasněn, nicméně na základě experimentů různých vědeckých skupin bylo navrženo několik hypotéz. Pravděpodobně nejrozsáhlejší z nich mluví o efektu termální hystereze. AFPs podle ní vykazují vysokou afinitu ke krystalkům



Obr. 2: Znárodnění inhibičního účinku AFPs na růst krystalu ledu¹⁶.

ledu tvořícím se v extracelulárním prostoru, na jejichž povrch adherují. Důsledkem je vznik výrazného rozdílu mezi hodnotami bodu tuhnutí a bodu tání. Díky tomu je růst ledových krystalů inhibován (Obr. 2). AFPs tak působí jako prevence proti vzniku větších krystalů, které by mohly narušit životaschopnost organismu^{12, 13, 14, 15}. Alternativní teorie vysvětlující jejich účinek hovoří o schopnosti interakce s tzv. ice-nucleating agents (INAs), tedy s proteiny, které vytváří nukleační jádro tvořícího se krystalu. AFPs maskují aktivní místa na povrchu INAs, jež slouží k navázání molekul vody a iniciaci tvorby pevné částice ledu¹².

Se snižujícími se teplotami dochází také k výrazným fyzikálním změnám ve vlastnostech buněčné membrány vedoucím typicky k redukci fluidity. Pro zachování funkčnosti membrány tak bylo nezbytné, aby se organismy žijící trvale za nízkých teplot prostřednictvím změn v jejím složení na tyto podmínky adaptovaly. Za nejvýznamnější z nich je považováno zvýšení množství přítomných polynenasycených mastných kyselin na úkor nasycených. Časté bývá také začlenění mastných kyselin s kratšími řetězci či s řetězci více rozvětvenými. Známé jsou také změny v zastoupení jednotlivých typů izomerů: přítomno bývá více rozvětvených mastných kyselin v konformaci *anteiso*- než *iso*- a více izomerů nenasycených mastných kyselin *cis* na úkor *trans*. Ovšem adaptační změny se nemusí vždy týkat jen řetězců mastných kyselin. Pozorovány byly v některých případech také odlišnosti týkající se polárních hlavic lipidů, proteinového zastoupení v membráně či kompozice karotenoidů, které se zde mohou také vyskytovat^{11, 17, 18}.

V případě, kdy jsou organismy vystaveny teplotám vymykajícím se rozmezí vhodných růstových teplot, dostávají se do stresové situace, které se snaží přizpůsobit. V průběhu evoluce tak vznikly dva systémy, reagující na příliš nízké, nebo vysoké teploty. Pro oba je typická syntéza specializovaných proteinů, jejichž úlohou je zajištění přežití buněk při nepříznivých podmínkách. V prvním případě jde o proteiny chladového šoku – cold shock proteins (CSPs) a v druhém o protei-

ny tepelného šoku – heat shock proteins (HSPs). Zjištěno bylo, že chladově adaptované organismy disponují těmito ochrannými mechanismy stejně jako organismy mezofilní. Rozdílem jsou ale teploty, o nichž se dá hovořit jako o stresujících^{19, 20}.

CSPs obsahují speciální doménu, prostřednictvím které vážou molekuly nukleových kyselin. V rámci chladového šoku se účastní zejména proteosyntetických procesů, jejichž průběh je nízkými teplotami omezen. Konkrétním příkladem je regulace některých fází transkripce a translace nebo jejich účast na degradaci molekul mRNA^{8, 11, 18, 19, 21}.

HSPs jsou chladově adaptovanými organismy syntetizovány jak v rámci teplotního šoku, tak i v rámci jiných druhů stresujících podmínek. Většinu z nich řadíme mezi chaperony, jejichž úlohou v buňkách je pomoc exprimovaným proteinům správně se svinout a nalézt tak svou nativní konformaci. V případě vzniku agregátů denaturovaných proteinů zajišťují některé HSPs jejich zpětný přechod na rozpustnou formu^{8, 18, 20}.

Kromě zmíněných dvou skupin proteinů syntetizují chladově adaptované organismy také další typ specializovaných proteinů nazvané jako cold-acclimation proteins. Na rozdíl od CSPs, jejichž syntéza je indukovatelná nízkými teplotami, jde o trvalou expresi, která je ale v rámci chladového šoku výrazně zvýšena^{8, 11}.

Chladová adaptace enzymů

Klíčovou veličinou pro průběh chemických reakcí je teplota. Závislost jejich rychlosti na teplotě vyjadřuje Arrheniova rovnice^{6, 22}:

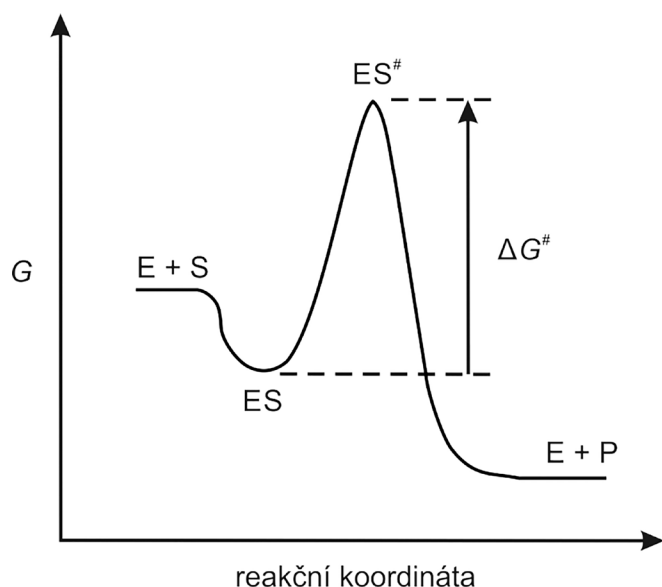
$$k = Ae^{(-E_a/RT)}$$

kde k je rychlostní konstanta, A je předexponenciální faktor, jehož hodnota závisí na konkrétní podobě reakce, E_a je aktivační energie reakce, R je molární plynová konstanta a T je termodynamická teplota.

Vyplývá z ní, že se snižující se teplotou reakce dochází k exponenciálnímu snížení i hodnoty rychlostní konstanty. V případě snížení teploty o 10 °C lze obvykle pozorovat dvojnásobné až trojnásobné snížení re-

akční rychlosti. Teoreticky by tak v případě, kdy se teplota pohybuje okolo bodu mrazu, nebyl umožněn průběh téměř žádné chemické reakce^{6, 22}.

V případě biochemických reakcí, jejichž průběh téměř vždy katalyzuje vhodný biokatalyzátor, je jejich průběh popsán podle tohoto schématu vycházejícího z teorie tranzitního stavu: $E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow ES^\# \leftrightarrow E + P$, kde E označuje enzym, S substrát, P produkt, ES je stabilní komplex enzymu se substrátem v základním stavu, který dle této teorie existuje v rovnováze s komplexem enzymu a substrátu v aktivovaném stavu $ES^\#$ (Obr. 3)^{9, 23, 24}.



Obr. 3: Tento diagram vycházející z teorie tranzitního stavu, popisuje průběh enzymově katalyzované reakce z hlediska její energie. Aktivační energie reakce je zde znázorněna jako Gibbsova aktivační energie $\Delta G^\ddagger$ ²³.

Arrheniova rovnice může být při uvažování platnosti této teorie přepsána také v tomto tvaru^{9, 24, 25}:

$$k_{cat} = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{(\Delta G^\ddagger / RT)}$$

kde k_{cat} je katalytická konstanta vyjadřující celkovou rychlost reakce, κ je transmisní koeficient, k_B je Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota, h je Planckova konstanta, R je plynová molární konstanta a $\Delta G^\ddagger$ je Gibbsova aktivační energie.

Důležitým parametrem rovnice je kromě teploty také Gibbsova energie, vyjadřující velikost aktivační energie reakce, tedy rozdíl mezi energií aktivovaného komplexu $ES^\#$ a energií komplexu v základním stavu ES. Lze říci, že v případě, kdy se hodnota Gibbsovy energie blíží nule, je reakce na teplotě téměř nezávislá. Tohoto faktu využila evoluce právě při řešení otázky chladové adaptace organismů, jejichž enzymy často vykazují nízkou hodnotu aktivační energie^{9, 25}. V následující rovnici je vyjádřena její závislost na hodnotě aktivační entalpie $\Delta H^\ddagger$, aktivační entropie $\Delta S^\ddagger$ a na termodynamické teplotě T ^{6, 9}:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Z této rovnice vyplývá, že snížení hodnoty aktivační Gibbsovy energie se dá teoreticky docílit snížením hodnoty aktivační entalpie nebo zvýšením hodnoty aktivační entropie. Ovšem z experimentálně získaných dat bylo zjištěno, že pro chladově aktivní enzymy je charakteristické snížení obou hodnot – aktivační entalpie i entropie. Chladová adaptace se totiž zaměřila pouze na optimalizaci jednoho ze dvou parametrů. Nižší hodnota aktivační entalpie pro reakce katalyzované chladově adaptovanými enzymy byla dosažena snížením počtu nebo síly intramolekulárních entalpic-ky řízených interakcí, které je nutné přerušit v průběhu aktivace během katalýzy. Tyto interakce přímo souvisejí se stabilitou prostorového uspořádání molekuly enzymu. Jejich oslabení se projeví zvýšenou flexibilitou té části molekuly, která se katalýzy přímo účastní, zejména tedy aktivního místa. Komplex enzymu se substrátem v základním stavu ES tak vykazuje širší možnosti, co se týká počtu možných konformačních stavů. Po přechodu do tranzitního stavu se ale komplex stává lépe organizovaným a kompaktním. Důsledkem toho je charakteristické snížení hodnoty aktivační entropie chladově adaptovaných enzymů v porovnání s jejich mezofilními protějšky^{8, 23, 24}.

U chladově adaptovaných enzymů je možné pozorovat optimalizaci nejen v hodnotě katalytické konstanty k_{cat} , ale někdy také v hodnotě Michaelisovy konstanty K_M , vyjadřující afinitu vazby enzymu na substrát. Občas dochází i k současné optimalizaci obou uvedených parametrů k_{cat} i K_M a to tak, aby byl jejich poměr k_{cat}/K_M (označovaný jako katalytická účinnost) co nejvyšší. Zvýšení hodnoty k_{cat} je typické především pro extracelulární enzymy, v jejichž případě jsou substráty často přítomny při saturačních koncentracích. Co se týká K_M , její snížení bylo popsáno jen u některých intracelulárních enzymů, u nichž je charakteristická nízká koncentrace substrátu. Obecně je totiž hodnota K_M u chladově aktivních enzymů zvýšená, a to díky evolučnímu tlaku na co nejvyšší celkový výtěžek reakce a zároveň také díky slabší interakci enzymu se substrátem, vyplývající z větší flexibility molekuly^{9, 23, 25}.

Jak již bylo zmíněno, struktura chladově aktivních enzymů je celkově méně stabilní. Nicméně zjištěno bylo, že při teplotní denaturaci dochází ke ztrátě aktivity enzymů dříve, než dojde k rozvolnění celé jeho prostorové struktury. Z toho vyplývá, že aktivní místo enzymu je výrazně více termolabilní v porovnání se zbývajících částmi molekuly. Při porovnání prostorových struktur chladově aktivních enzymů a jejich mezofilních protějšků bylo zjištěno, že podoba aktivního místa je striktně konzervována. Zvýšení jeho flexibility tak nebylo dosaženo záměnou aminokyselinových zbytků, které ho tvoří, nýbrž vytvořením většího prostoru pro vstup substrátu do něj. Nalezeny byly tři různé možnosti, kterými bylo dosaženo prostornějšího aktivního místa. První z nich zahrnuje nahrazení aminokyselinových zbytků s objemnými postranními řetězci v jeho blízkosti za méně objemné. Druhá se týká vzdálení blízkých smyček díky změnám v jejich konformaci a třetí hovoří o delecí některých aminokyselin z těchto smyček a tedy o celkovém zmenšení zmíněných sekundárních struktur^{9, 23}.

V porovnání s mezofilními a termofilními analogy mají chladově aktivní enzymy obecně nižší hodnotu teplotního optima. Je tak logické, že vykazují nižší teplotní stabilitu související s nárůstem flexibility molekuly, jak již bylo zmíněno. Důkazem jsou kalorimetrická měření chladově aktivních, mezofilních a termofilních enzymů, pomocí kterých byly změřeny jednotlivé teploty tání a hodnoty kalorimetrické entalpie, korespondující s množstvím absorbovaného tepla nezbytným pro rozrušení intramolekulárních interakcí. Výsledkem bylo potvrzení platnosti zvyšujícího se trendu obou veličin se zvyšující se teplotní aktivitou enzymů. Zjištěno bylo dále, že chladově aktivní enzymy vykazují během teplotní denaturace reverzibilní rozvinutí prostorové struktury bez vzniku jakýkoliv stabilních intermediátů. Tento fakt tak poukazuje na vysokou kooperativitu celého procesu^{9, 23}.

Jak již bylo řečeno, za nižší rigiditou chladově aktivních enzymů stojí snížení počtu stabilizujících nevalebných interakcí uvnitř molekuly. Jde zejména o elektrostatické interakce (včetně solných můstků) a hydrofóbní efekt, dále také o vodíkové vazby a van der Waalsovy interakce - zejména aromatické interakce. V jejich sekvenci je možné pozorovat obecně větší zastoupení polárních aminokyselinových zbytků na úkor nepolárních. Zároveň dochází také k záměně hydrofóbních aminokyselin s delším postranním řetězcem za ty, které mají teno řetězec kratší, a to z důvodu zmenšení povrchu dostupného pro hydrofóbní kontakt mezi atomy. Důsledkem přítomnosti méně hydrofóbních interakcí v molekule je snížení hydrofóbního efektu v jejím jádře, hrajícího důležitou roli ve stabilitě struktury. Dále dochází také ke snížení výskytu zbytků argininu, které jsou odpovědné zejména za tvorbu vodíkových vazeb a solných můstků, a zbytků prolinu, jež poskytují větší flexibilitu sekundárním strukturám. Naopak zde můžeme nalézt více glycylových zbytků, což vede k větší lokální mobilitě ve struktuře proteinu. Co se ale týká povrchu molekuly, zde byl zaznamenán výskyt většího množství nepolárních aminokyselinových zbytků. Spolu s redukcí počtu nabitých postranních řetězců aminokyselin přispívá tento fakt ke zvýšení hydrofobicity povrchu a tedy ke snížení množství polárních interakcí s rozpouštědlem, což zvyšuje flexibilitu hydratačního obalu enzymu. Dále bylo zjištěno, že chladově adaptované enzymy vykazují oslabení interakcí se stabilizujícími ionty, jako jsou například ionty vápenaté. Z některých studií vyplývá, že množství vyskytujících se disulfidových můstků bývá také sníženo^{2, 9, 22, 24, 26, 27, 28}.

Nicméně ne všechny zde jmenované mechanismy chladově adaptace jsou využívány všemi chladově adaptovanými enzymy. U některých se uplatňují i změny individuální, které souvisí s konkrétní podobou struktury a funkce, vedoucí k požadovaným vlastnostem molekuly⁹.

Využití chladově aktivních enzymů v biotechnologiích

Chladově aktivní enzymy v porovnání se svými mezofilními a termofilními protějšky vykazují některé významné charakteristiky, díky kterým našly v uplynulých letech široké uplatnění v různých biotechnolo-

gických procesech. Klíčovou vlastností této skupiny enzymů je vysoká katalytická účinnost za nízkých teplot a zároveň i vysoká termolabilita za vyšších teplot. Mezi nejdůležitější výhody spojené s jejich aplikací v průmyslu patří finanční a energetické úspory, a to díky větší účinnosti enzymů, která souvisí s možností použít menší množství katalyzátoru a také nižší reakční teploty v porovnání s jejich mezofilními homology. Nízké termostability těchto biokatalyzátorů může být využito zejména při jejich teplotní inaktivaci na konci procesu. Další výhodou je také prevence rozpadu nestabilních termosenzitivních složek reakce a případně i ztráty těkavých reaktantů. Důležitá je i možnost jejich použití v organických rozpouštědlech, jejichž denaturačním účinkům obecně lépe odolávají^{5, 10, 11}.

Jak již bylo zmíněno, chladově aktivní enzymy jsou používány v širokém rozmezí biotechnologických aplikací. V následujících odstavcích budou popsány nejdůležitější příklady jejich využití v různých průmyslových oblastech.

Prací prostředky

Nejvýznamnější aplikací chladově aktivních enzymů z hlediska jejich celkové produkce je použití v podobě aditiv do pracích prášků. Jde především o proteasy, lipasy, amylasy a celulas. Z ekologického hlediska je aktuálně důležitá snaha snížit teplotu pracího procesu, s čímž souvisí ale i jeho efektivita. To je důvodem, proč se do pracích prostředků namísto mezofilních enzymů začaly přidávat enzymy chladově aktivní, jejichž katalytická účinnost je za nižších teplot vyšší. Použití této skupiny enzymů je výhodné také v případě čištění některých syntetických materiálů, které nemohou být vystaveny vyšším teplotám (50-60 °C). Problematickým bodem bývají nicméně teplotní podmínky skladování pracích prášků. Chladově aktivní enzymy v nich obsažené mohou při vyšších skladovacích teplotách denarovat a ztratit tak svou aktivitu^{10, 11, 27, 29, 30, 31}.

Potravinářský průmysl

V procesu přípravy či úpravy potravin lze nalézt mnoho příkladů využití biokatalyzátorů aktivních za nízkých teplot. Velmi významné je použití β -galaktosidasy v procesu hydrolytického štěpení laktosy v mléce a mléčných výrobcích za nízkých teplot, určených pro konzumenty trpící laktózovou intolerancí. Časté je také použití dalších chladově aktivních enzymů: pektinas pro zvýšení výtěžnosti extrakce ovocných šťáv, proteas v procesu tenderizace masa, xylanas, amylasy a proteas v pekárenském průmyslu za účelem redukce času kynutí těsta a zlepšení vlastností těsta i následného finálního výrobku. Za zmínku stojí také použití proteas ve fermentativních procesech – například při výrobě sójových omáček, nebo jejich využití spolu s lipasami pro urychlení procesu zrání sýrů (funkce syřidla). Chladově aktivní enzymy jsou používány také v pivovarnictví, vinařství či při výrobě krmiv pro zvířata^{10, 11, 27, 30, 31}.

Textilní průmysl

V textilním průmyslu se nejvíce uplatňují chladově aktivní celulas, a to při výrobě bavlněných a úpravě denimových výrobků. V prvním případě jsou enzymy

používány v procesu zvaném „biopolishing“, kdy jsou vylepšovány některé vlastnosti bavlněných oděvů. Při jejich opakovaném praní je totiž redukována hladkost povrchu oděvu. Pokud jsou ale textilie nejdříve enzymově ošetřeny (redukce vyčnívajících konců vláken bavlny), je možné předejít vzniku žmolků a docílit tak větší jemnosti tkanin. V případě denimových tkanin jsou enzymy používány při úpravě vzhledu finálních výrobků v procesu zvaném „stone-washing“, jehož podstatou je bělení modrých ploch či destrukce textury materiálu – vznik trhlín^{10, 11, 27, 30, 31}.

Molekulární biologie

V metodách molekulární biologie je používáno relativně velké množství chladově aktivních enzymů, u nichž je využívána především jejich nízká termostabilita. Inaktivace takových enzymů pro ukončení reakce pak může být provedena jednoduše s použitím vysoké teploty. Široce komerčně používaná je alkalická fosfatasa, katalyzující hydrolytické štěpní fosfátu z 5' konce oligonukleotidů. Dalším příkladem je použití chladově aktivní DNA ligasy pro ligaci fragmentů nukleových kyselin, proteasy pro selektivní inhibici vybraných enzymů či uracil-DNA glykosylasy katalyzující štěpení uracilu z molekuly DNA^{4, 10, 11, 27, 30}.

Biokatalýza

Významným průmyslovým odvětvím je syntéza biologicky aktivních látek jako jsou například estery mastných kyselin, peptidy či cukerné deriváty. Rozpustnost jmenovaných látek je ale ve vodném prostředí limitována. Co se týká mechanismu jejich přípravy, často je využívána reverzní hydrolyza, jejíž výtěžnost závisí zejména na aktivitě vody v systému. Z těchto důvodů je znevýhodněno použití mezofilních, případně termofilních biokatalyzátorů, jejichž účinnost rapidně klesá se snižující se koncentrací vody v reakční směsi. Vysoká flexibilita chladově aktivních enzymů jim umožňuje být aktivní i v prostředí s vyšším obsahem organických rozpouštědel, proto mohou být použity pro katalýzu s dosažením uspokojivých výtěžků reakcí^{10, 11, 27, 30}.

Literatura

1. Margesin R, Miteva V: *Res. Microbiol.* 162, 346 (2011).
2. Gianese G, Argos P, Pascarella S: *Protein Eng.* 14, 141 (2001).
3. Morita RY: *Bacteriol. Rev.* 39, 144 (1975).
4. Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, et al.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 253 (2002).
5. Pulicherla KK, Ghosh M, Suresh Kumar P, et al.: *J. Mar. Sci.: Res. Dev.* 1, 1 (2011).
6. Smaks AO, Schröder Leiros HK, Os V, et al.: *Biotechnol. Annu. Rev.* 6, 1 (2000).
7. <https://www.studyblue.com/notes/n/chapter-6a-continued/deck/9933773>, staženo 1. února 2017.
8. D'Amico S, Collins T, Marx JC, et al.: *EMBO Rep.* 7, 385 (2006).

Farmaceutický průmysl

Častým požadavkem při výrobě léčiv je získání chirálně čistých léčivých látek. Pro jejich syntézu se proto používají enzymy, jejichž selektivní aktivita může zajistit získání požadovaného produktu. Použití chladově aktivních biokatalyzátorů přináší hlavní výhodu v možnosti vedení těchto syntetických reakcí za nízkých teplot s dostatečnými výtěžky v porovnání s jejich mezofilními protějšky^{10, 11, 30}.

Environmentální procesy

V pojmu environmentální procesy je zahrnuta bioremediace organických polutantů, čištění odpadních vod a produkce bioplynu či kompostování. Pro všechny zmíněné případy je typické použití spíše celých chladově adaptovaných mikroorganismů, které produkují chladově aktivní enzymy, jejichž aktivita je v procesech využívána. V případě bioremediací jde hlavně o procesy *in situ* situované v chladných oblastech, kdy je z hlediska jejich efektivity žádoucí použití psychrofilních či psychrotrofních mikroorganismů, jejichž biodegradace dráhy bývají za nízkých teplot aktivní. V ostatních zmíněných environmentálních procesech s sebou použití chladově aktivních organismů přináší hlavně benefit v podobě energetické úspory^{10, 11, 27, 30}.

Závěr

Drtivá většina naší planety je tvořena chladnými oblastmi, které jsou trvale osídleny velkým množstvím organismů. Přizpůsobení nízkým teplotám jim bylo umožněno díky vzniku jednotlivých molekulárních mechanismů, které jako celek zajišťují jejich komplexní adaptaci. Tento článek seznámil čtenáře se základními principy chladově adaptace enzymů, které byly v průběhu posledních dvaceti let intenzivně studovány. Díky svým jedinečným vlastnostem přináší tato skupina biokatalyzátorů nemalé možnosti, co se týká jejich využití v mnoha biotechnologických procesech. Ačkoliv je mnoho z nich již komerčně připravováno a používáno, stále zde existuje prostor pro nalezení dalších chladově adaptovaných enzymů, jejichž vlastnosti či účinek budou vykazovat vysoký potenciál pro nové průmyslové aplikace.

9. Feller G: *Scientifica* 2013, 1 (2013).
10. Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, et al.: *Microb. Biotechnol.* 4, 449 (2011).
11. Margesin R, Neuner G, Storey KB: *Naturwissenschaften* 92, 77 (2007).
12. Inada T, Koyama T, Goto F, et al.: *J. Phys. Chem. B* 116, 5364 (2012).
13. Celik Y, Drori R, Pertaya-Braun N, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1309 (2013).
14. Davies PL: *Trends Biochem. Sci.* 39, 548 (2014).
15. Groot CCM, Meister K, DeVries AL, et al.: *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 4836 (2016).
16. <http://amazingbiotech.blogspot.cz/2014/02/antifreeze-proteins.html>, staženo 1. února 2017.
17. Russell NJ: *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 118, 489 (1997).

Literatura (pokračování)

18. Chattopadhyay MK: *J. Biosci. (New Delhi, India)* 31, 157 (2006).
19. Yoshimune K, Kawamoto J, Kurihara T (2013): Proteins involved in cold adaptation. In: *Cold-adapted microorganisms*. (Yumoto I. ed.), Caister Academic Press, Japan, 97-110.
20. Yamauchi S, Fukata S, Hayashi H (2013): Heat shock response in psychrophilic microorganisms. In: *Cold-adapted microorganisms*. (Yumoto I. ed.), Caister Academic Press, Japan, 111-136.
21. <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR002059>, staženo 1. února 2017.
22. Marshall CJ: *Trends Biotechnol.* 15, 359 (1997).
23. D'Amico S, Claverie P, Collins T, et al.: *Phil. Trans. R. Soc., B* 357, 917 (2002).
24. Marx JC, Collins T, D'Amico S, et al.: *Mar. Biotechnol.* 9, 293 (2007).
25. Feller G, Narinx E, Arpigny JL, et al.: *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 189 (1996).
26. Russell N: *Extremophiles* 4, 83 (2000).
27. Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, et al.: *Trends Biotechnol.* 18, 103 (2000).
28. Gianese G, Bossa F, Pascarella S: *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 47, 236 (2002).
29. Maiangwa J, Ali MSM, Salleh AB, et al.: *Extremophiles* 19, 235 (2015).
30. Javed A, Qazi JI: *Am. sci. res. j. eng., technol., sci.* 23, 103 (2016).
31. Joshi S, Satyanarayana T.: *Biology* 2, 755 (2013).

Souhrn

Buchtová P.: Chladově aktivní enzymy a jejich biotechnologické využití

Chladné oblasti naší planety jsou trvale osídleny nemalým množstvím rozličných organismů, pro které bylo nezbytné se životu zde přizpůsobit. Adaptace na nízké teploty zahrnuje hned několik různých molekulárních mechanismů. Jde například o změny ve složení buněčných membrán nebo syntéza specializovaných proteinů, jejichž účast je nezbytná v procesu proteosyntézy či při správném sbalování exprimovaných proteinů. Tento článek věnuje ale největší pozornost biokatalyzátorům chladově adaptovaných organismů, které jsou nízkým teplotám také přizpůsobeny, a to počínaje svým aminokyselinovým složením, přes stabilitu až po zvýšenou katalytickou účinnost. Unikátní vlastnosti chladově aktivních enzymů pak vykazují vysoký potenciál pro jejich využití v celé řadě biotechnologických aplikací.

Klíčová slova: chladově aktivní enzymy, chladová adaptace, psychrofilní organismy

Summary

Buchtová P.: Cold-active enzymes and their biotechnological applications

Cold areas of our planet are permanently inhabited by a huge amount of various organisms which had to adapt to living here. The adaptation to low temperatures involves several different molecular mechanisms. For example, it includes changes in a composition of cell membrane and synthesis of specialized proteins, participation of which is essential for a process of proteosynthesis or for proper folding of expressed proteins. However, this article is focused on biocatalysts of cold-adapted organisms that are well adapted to low temperatures, starting from its amino acid composition, through increased stability leading to higher catalytic efficiency. Unique properties of cold-active enzymes exhibit a high potential for their use in a wide range of biotechnological applications.

Keywords: cold-active enzymes, cold adaptation, psychrophilic organisms

OBSAH A DISTRIBUCE FENOLOVÝCH SLOUČENIN S ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITOU V ROSTLINĚ VITIS VINIFERA

Lucia Gharwalová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; gharwall@vscht.cz

Úvod

Nejrozšířenějšími sekundárními metabolity rostlin jsou fenolové látky. Jde o přírodní antioxidanty, které jsou v révě vinné syntetizované jako odpověď na biotický a abiotický stres, např. některé infekce (především plísňové)¹, expozice ultrafialovému (UV) záření^{2,3}, ozónový stres⁴ nebo mechanické poškození. Mezi nejvýznamnější a nejprozkoumanější fenolové sloučeniny patří stilbenoid resveratrol a jeho analoga.

Fenolové antioxidanty mají schopnost eliminovat volné radikály, čímž mohou zabránit peroxidaci lipidů. Výsledky studií také dokazují, že fenolové sloučeniny, především kvercetin, epikatechin a resveratrol chrání DNA proti oxidačnímu narušení její struktury^{5,6}. Fenolické látky jsou odpovědné za různé charakteristické vlastnosti vín, například chuť, barva a antioxidační účinky.

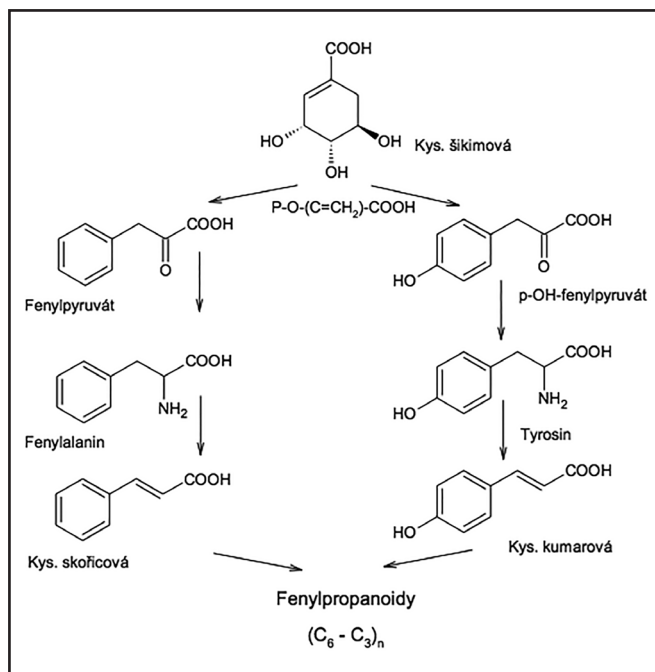
Obsah antioxidantů v různých částech révy vinné je rozdílný, např. části, které byly vystaveny živému, či neživému stresu obsahují více antioxidantů. Antokya-

ny jsou především obsaženy ve vakuolách a buněčné stěně slupky bobulí a jsou zodpovědné za barvu hroznů. Slupky obsahují i další antioxidanty z jiných skupin, jako například resveratrol nebo kyselinu gallovou, které se vyluhují během macerace hroznů do vína⁷. Fenolové sloučeniny se nachází například i v letorostech a listech.

Biosyntéza fenolových sloučenin

Biosyntéza fenolických látek začíná vznikem fenylpropanových kyselin. Cesta vedoucí k tvorbě těchto prekurzorů se nazývá šikimátová dráha, její průběh je znázorněn na Obr. 1. Nejprve je přeměněna kyselina šikimová (C₇H₁₀O₅) na fenylalanin (C₉H₁₁NO₂) nebo tyrosin (C₉H₁₁NO₃) a následně na kyselinu skořicovou (C₉H₈O₂) nebo kumarovou (C₁₅H₁₈O₈), popřípadě jiné fenylpropanové kyseliny.

Vlastní kyselina šikimová vzniká při metabolismu cukrů, kdy prvním krokem jejího vzniku je spojení fosfoenolpyruvátu s erytroso-4-fosfátem. Ze vzniklých pre-



Obr. 1: Šikimátová dráha biosyntézy fenylypropanoidů.

kurzorových fenylypropanových kyselin cestou Šikimátové dráhy pak vznikají další meziprodukty, a to různými reakcemi, například prodloužením propanového řetězce substitucí, prodloužením a cyklizací, zkrácením řetězce nebo redukcí dvojné vazby řetězce⁸.

Syntéza flavonoidů a stilbenoidů, jakožto nevýznamnějších představitelů fenolových sloučenin, vzniká biosyntézou tří molekul malonyl-CoA vázaných na iniciátor, jímž je právě jedna z již zmiňovaných prekursorových fenylypropanových kyselin v podobě CoA-esteru. Prekurzorem flavonoidů je flavanon, vznikající postupnými reakcemi přes chalkon. Z flavanonu poté vznikají další flavonoidy. Takto vzniklé látky pak mohou poskytovat různými modifikacemi velké množství dalších flavonoidů^{8, 9}. Prekurzorem stilbenoidů je resveratrol a jeho biosyntéza vyžaduje aktivitu enzymu zvaného stilbensyntáza (STS)¹⁰, který se řadí mezi polyketidické syntázy. Enzym využívá p-kumaryl-CoA a malonyl-CoA jako substráty.

Výskyt a distribuce fenolových látek ve *Vitis vinifera*

Výskyt fenolových látek s antioxidační aktivitou v révě vinné nemusí být vždy totožný s místem jejich syntézy, neboť tyto sloučeniny bývají transportovány z místa zdroje do míst určených k jejich spotřebě či akumulaci. Tok asimilátů probíhá ve speciálním vaskulárním pletivu – floému. Fenolové látky mohou být transportovány prostřednictvím floému jak apikálním tak bazálním směrem¹¹. Naproti tomu u xylému, tedy vodivém cévním pletivu, který primárně rozvádí živiny z kořenového systému k nadzemním částem rostliny, byla prokázána akumulace fenolových látek¹².

Sledováním distribuce STS u mladé rostliny *Vitis vinifera* bylo zjištěno, že k biosyntéze stilbenoidů, především resveratrolu, dochází v listech i v jiných orgánech rostliny, a to zejména v bobulích. Lokalizace STS v rost-

linách révy vinné byly zkoumány pomocí standardních technik imunolokalizace. Obsah samotného resveratrolu se v různých orgánech rostliny pohyboval v rozmezí od 0,2 – 16,5 mg/kg původní hmoty rostliny, přičemž maximální obsah resveratrolu byl nalezen ve floému letorostů, následovaný pupeny, kořeny, xylémem letorostů, výhonky a řapíky; v minimálním množství byl nalezen v listech¹³.

V bobulích probíhá syntéza stilbenoidů i flavonoidů v tenkostěnných epidermálních buňkách slupky. Místem shromažďování fenolových látek v buňkách je vakuola, kde se kromě toho hromadí také cukry, organické kyseliny, ionty a voda¹⁴.

Vliv vnějších podmínek na obsah antioxidantů ve *Vitis vinifera*

Obsah fenolových antioxidantů ve víně a rostlině *Vitis vinifera* je závislý nejen na odrůdě ale i na podmínkách pro růst rostliny, jako například intenzita slunečního záření, teplota, obsah živin a minerálních látek v půdě či množství vláhy v období dozrávání bobulí^{17, 15}.

Co se stilbenoidů týče, jejich syntéza je podporována několika abiotickými faktory – UV zářením, ozonem nebo anoxií (bezokyslíkatým prostředím)¹⁶. UV záření indukuje biosyntézu resveratrolu v bobulích hroznů během zrání, přičemž konečný obsah je závislý na vývojové fázi rostliny¹⁷. Ve zralé hroznové bobuli se obsah resveratrolu po vystavení UV záření snižuje, pravděpodobně z důvodu konkurence mezi chalkon syntázou a STS pro stejné substráty. Chalkon syntáza využívá p-kumaryl-CoA a malonyl-CoA pro produkci chalkonu, jakožto prekurzoru flavonoidů¹⁸.

Zkoumaná byla i možná závislost vlivu nedostatku vody na biosyntézu fenolových látek. Přestože se ve studiích objevují výsledky potvrzující narůst fenolů během vystavení rostliny nedostatku vláhy v době jejího dozrávání¹⁹, ne všechny dostupné studie tento fakt potvrzují. Jedna ze studií tak poukazuje na pětinašobné navýšení množství *trans*-piceidu (glykosylované formy *trans*-resveratrolu) v odrůdě Cabernet Sauvignon při vystavení těmto podmínkám, avšak u odrůdy Chardonnay tohoto navýšení docíleno nebylo²⁰. Také Król a kol.²¹ pozorovali, že dlouhodobé sucho způsobilo pokles fenolových kyselin (kyselina kávová, p-kumarová a kyselina ferulová) v listech a kořenech révy vinné odrůdy Kiszmisz Łuczistyj. To může souviset se specifickostí kontrolních molekulárních mechanismů (ovlivňujících biosyntézu stilbenoidů), která je dána odrůdovým charakterem.

Naopak, aplikace rostlinných hormonů, giberelinů, na rostlinu révy vinné může zvýšit obsah fenolových látek a flavonoidů v listech, stoncích a úponcích *Vitis vinifera* odrůdy Muškát Hamburg, zatímco jejich obsah ve slupkách bobulí snížit²². Gibereliny mají vliv na vývoj rostlin, mohou stimulovat rapidní růst kořenů a stonků, vyvolat mitotické dělení v listech některých rostlin a zvýšit rychlost klíčení semen²³. Bylo pozorováno, že když je kyselina giberelová (GA₃) aplikována na rostlinu po plném květu, některé odrůdy Muškátu se semeny, jako například Muškát Hamburg, nebudou obsahovat semena v bobulích²².

Nejen aplikace hormonů ale i pesticidů může ovlivnit obsah antioxidantů ve slupkách bobulí a tím i antioxidační aktivitu vín. Hodnoty antioxidační aktivity ve vzorcích chorvatských vín a biovín, hodnocené pomocí metod ABTS a DPPH se prokázaly vyšší u biovín ve srovnání s konvenčními víny²⁴. U metody ABTS je využívána schopnost antioxidantů přítomných ve víně zhášet volné radikály, konkrétně radikály chemické sloučeniny 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) (ABTS). U DPPH metody se využívá schopnost antioxidantů zhášet DPPH, aneb 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl, což je stabilní volný radikál. Zvýšená antioxidační aktivita u biovín může být způsobena tím, že rostlina vytváří vlastní obranné látky, když není chráněná před škůdci vnějším zásahem.

Vyšší koncentrace fenolových sloučenin ve víně může být také spjata s mírnou plísňovou infekcí bobulí. Rozsáhla plísňová infekce bobulí může zničit fytoalexiny, čili sloučeniny produkované rostlinou jako odpověď na kontakt s parazitem. Taková infekce by ovšem zničila i úrodu a nebylo by možné z infikovaných bobulí produkovat víno²⁵.

Změna obsahu fenolových látek během vegetačního období

Předcházející studie dokázaly, že obsah a distribuce antioxidantů ve *Vitis vinifera* se mění během vývoje rostliny, v průběhu vegetačního období. Během vegetačního období dochází i k významnému procesu dozrávání bobulí. Zralost hroznů se posuzuje změnou barvy slupky, měknutím bobulí a změnou jejich chuti. Změna a intenzita barvy bobulí u modrých odrůd, způsobená navýšením antokyanů, je jedním z charakteristických rozpoznávacích znaků zralosti bobulí²⁶. Stupeň zralosti hroznů lze bezpečně zjistit podle obsahu cukru ve vylisované šťávě bobulí moštoměrem nebo refraktometrem¹⁴.

Literatura

1. Chung I-M, Park MR, Chun JC, et al.: *Plant Science* 164, 103 (2003).
2. Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil AC, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 6103 (2000).
3. Versari A, Parpinello GP, Tornielli GB, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 5531 (2001).
4. Grimmig B, Nuria Gonzalez-Perez M, Welzl G, et al.: *Plant Physiol. Biochem.* 40, 865 (2002).
5. Athar M, Back JH, Tang X, et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224, 274 (2007).
6. Liu GA, Zheng RL: *Pharmazie* 57, 852 (2002).
7. Ortega T, De La Hera E, Carretero ME, et al.: *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1641 (2008).
8. Harmatha J: Fenylpropanoidy, lignany a jejich biologické účinky. In: *Chemie a biochemie přírodních látek*. ÚOCHB-AVČR, Praha, 2002, 117-142.
9. Chong J, Poutaraud A, Hugueney P: *Plant Sci.* 177, 143 (2009).
10. Williams LE: Grape. In: *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops*, CRC Press, Orlando 851-881 (1996).
11. Wang L, Xu M, Liu C, et al.: *PLOS ONE* 8, e61642 (2013).

Versari a kol.³ sledovali obsah vybraných stilbenoidů ve slupkách hroznů během zrání. Během tohoto období byl *cis-piceid* hlavním stilbenem přítomným ve slupkách a byla pozorována i malá akumulace STS mRNA a s tím spojená slabá syntéza stilbenoidů.

Effekt zrání bobulí byl pozorován u bobulí *Vitis vinifera* odrůdy Kishmish Chornyi. Hrozny a stonky v počáteční fázi zrání vykazovaly vysoký obsah celkových fenolických sloučenin (flavonoidů, flavanolů, flavan-3-olů) a antioxidační aktivity (FRAP – „ferric reducing antioxidant power“), přičemž během zrání byla zaznamenána drastická redukce fenolických složek a také hodnoty FRAP. Hrozny, které byly získány na konci období zrání, měly vysoké hodnoty antokyanů a redukujících cukrů, ovšem nižší hodnoty celkových fenolických sloučenin a související antioxidační aktivity. Složení fenolů a antioxidační potenciál během zrání bobulí byly stanovené také ve stoncích, listech, řapících a výhoncích stejné rostliny. Tyto vykazovaly (v daném pořadí) 8x; 3x; 2x; a 1,5x násobně vyšší hodnoty FRAP než bobule²⁷, čímž bylo dokázáno, že kromě bobulí, mohou i různé části révy vinné představovat potenciálně využitelný zdroj fenolových látek.

Závěr

Obsah fenolových sloučenin v révě vinné je závislý nejen na odrůdě ale i na vnějším prostředí. Flavonoidy a stilbenoidy patří mezi nejpočetnější skupiny v přírodě se vyskytujících fenolových látek. Tyhle se nenachází jenom v bobulích *Vitis vinifera*, ale i v listech, stoncích, letorostech či kořenech a jejich obsah může být zvýšený po vystavení biotickému nebo nebiotickému stresu.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokýškolský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2017).

12. Bruno G, Sparapano L: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69, 195 (2006).
13. Wang W, Tang K, Yang H-R, et al.: *Plant Physiol. Biochem.* 48, 142 (2010).
14. Fontes N, Gerós H, Delrot S: *Am. J. Enol. Vitic.* 62, 270 (2011).
15. Cantos E, Espín JC, Tomás-Barberán FA: *J. Agric. Food Chem.* 50, 5691 (2002).
16. Teixeira A, Eiras-Dias J, Castellarin SD, et al.: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 18711 (2013).
17. Jeandet P, Bessis R, Gautheron B: *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 41 (1991).
18. Jeandet P, Sbaghi M, Bessis R, et al.: *VITIS* 34, 91 (2015).
19. Grimplet J, Deluc LG, Tillett RL, et al.: *BMC Genomics.* 8, 187 (2007).
20. Deluc LG, Decendit A, Papastamoulis Y, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 289 (2011).
21. Król A, Amarowicz R, Weidner S: *Acta Physiol. Plant.* 36, 1491 (2014).
22. Tian SF, Wang Y, Du G, et al.: *Acta Physiol. Plant.* 33, 2467 (2011).
23. Riley JM: *CRFG Journal.* 19, 10 (1987).

Literatura (pokračování)

24. Vrček IV, Bojić M, Žuntar I, et al.: *Food Chem.* 124, 354 (2011).
25. Jeandet P, Bessis R, Sbaghi M, et al.: *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 1 (1995).

26. Adams DO: *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 249 (2006).
27. Doshi P, Adsule P, Banerjee K: *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 1 (2006).

Souhrn

Gharwalová L.: Obsah a distribuce fenolových sloučenin s antioxidační aktivitou v rostlině *Vitis vinifera*

Obsah fenolů v rostlině *Vitis vinifera* je závislý na agrotechnických a klimatických faktorech, nicméně jenom málo je známo o tom, kdy je akumulace antioxidantů v rostlině nejvyšší. Je důležité znát, které faktory a jakým způsobem ovlivňují obsah přírodních antioxidantů v různých částech révy vinné pro jejich další využití v potravinářství nebo farmacii.

Klíčová slova: antioxidant, resveratrol, *Vitis vinifera*

Summary

Gharwalová L.: Content and distribution of phenolic compounds with antioxidant activity in plant *Vitis vinifera*

The phenol content in the plant *Vitis vinifera* depends on agrotechnic and climatic factors, however, only little is known about when the accumulation of antioxidants in the plant is at its highest. It is necessary to understand which factors and in what way they influence the natural antioxidant content in different parts of the grapevine for their further use in the food or pharmaceutical industry.

Keywords: antioxidant, resveratrol, *Vitis vinifera*

PRVNÍ VLNA OBRANY V ROSTLINÁCH VŮČI NAPADENÍ PATOGENY A MOŽNOSTI JEJÍHO SLEDOVÁNÍ

Lucie Lamparová^{a,b}

^aLaboratoř biochemie rostlin, Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, ^bLaboratoř patofyziologie rostlin, Ústav experimentální botaniky rostlin AV ČR, v. v. i.; lucie.lamparova@vscht.cz

Úvod

Rostliny jsou k velkému množství patogenů obvykle rezistentní. Pro svou obranu používají, kromě vnějších konstitutivních bariér jako jsou kutikula či vosk, velice sofistikovanou imunitu. Spuštění rostlinné imunity je závislé na rozpoznání patogena. Rostlinné receptory mohou rozpoznat molekulární vzory mikrobů (MAMP; „microbe-associated molecular pattern“) triggered immunity“), pak jde o MAMP vyvolanou imunitu (MTI; „MAMP triggered immunity“) nebo mohou být rozpoznány patogenní efekty a takto vyvolaná obrana se nazývá efekty vyvolaná imunita (ETI; „effector triggered immunity“). V tomto článku se budu zabývat pouze „první vlnou“ rostlinné imunity vyvolané molekulárními vzory mikrobů. Zaměřím se na charakteristické znaky MTI a metody, jimiž je studována.

Slovníček nejdůležitějších pojmů:

MAMP – molekulární vzory mikrobů „microbe-associated molecular pattern“; **MTI** – MAMP vyvolaná imunita „MAMP triggered immunity“; **PRR** – receptor rozpoznávající molekulární vzory, „pattern recognition receptor“; **RLK** – protein kinasy receptorového typu, „receptor-like kinases“; **RLP** (receptory podobné proteinům, „receptor-like proteins“); **flg22** – rozpoznávaná sekvence 22 aminokyselin flagelinu; **EF-Tu** – elongační faktor Tu; **elf** – rozpoznávaná sekvence EF-Tu; **PGN** – peptidoglykan; **LPS** – lipopolysacharidy; **PR proteiny** – proteiny spojené s pathogenesí, „pathogenesis related“.

MTI

MAMP jsou vysoce konzervované struktury mikrobů, v častém případě nezbytnými pro jejich přežití. Mezi dosud popsané MAMP se řadí jak látky proteinového charakteru flagellin (flg), elongační faktor (EF-Tu), pep-

tidoglykan (PGN), tak MAMP sacharidové či lipidové povahy, například lipopolysacharidy (LPS), chitin či β -glukany. Tyto MAMP jsou rozpoznány receptory PRR (receptor rozpoznávající molekulární vzory, „pattern recognition receptor“), které jsou v drtivé většině případů lokalizovány na plasmatické membráně. Nejčastěji se jedná o receptory RLK (protein kinasy receptorového typu, „receptor-like kinases“) a RLP (receptory podobné proteinům, „receptor-like proteins“). Oba druhy obsahují extracelulární doménu, díky níž probíhá rozpoznání MAMP, a transmembránovou doménu. RLK má vnitrobuněčnou intracelulární kinasovou doménu, kdežto RLP má pouze krátkou cytosolickou doménu. Důležité je zmínit, že ne ke všem MAMP je známý rostlinný PRR, stejně tak ne všechny rostliny rozpoznávají všechny druhy MAMP. Po rozpoznání MAMP pomocí PRR dochází k indukci MTI, jejíž součástí je produkce Ca^{2+} , ROS (reaktivní formy kyslíku, „reactive oxygen species“), NO, zvýšení extracelulárního pH, aktivace MAPkinasové kaskády, produkce antimikrobiálních látek jako jsou fytoalexiny (např. kamalexin), syntéza PR proteinů (proteiny spojené s pathogenesí, „pathogenesis related“), aktivace fytohormonálních drah či ukládání kalosy do buněčné stěny. Ke studiu odpovědi MTI vyvolaných bakteriemi se používá ošetření krátkými syntetickými peptidy, jako jsou flg22 (epitop proteinu flagelinu) či elf18 (epitop elongačního faktoru Tu), nebo strukturami buněčných stěn (LPS, PGN). MTI odpovědi vyvolané napadením houbami se studují pomocí ošetření chitinovými oligomery¹.

MAMP

Flg22

Protein flagelin je základním stavebním kamenem bakteriálního bičíku, který hraje zásadní roli v pohybu

a zároveň v adhezi patogena na buňky hostitele. Receptorem rostliny *A. thaliana* (huseníček rolní) rozpoznávajícím N- koncovou vysoce konzervovanou doménu flagelinu pocházející z *Pseudomonas aeruginosa*, čítající dvaadvacet aminokyselin (flg22), je protein FLS2 (flagellin-sensing 2)². Tento receptor se řadí do rodiny RLK a nachází se na povrchu plasmatické membrány³. Po navázání flg22 receptor FLS2 kooperuje s receptorovou kinasou, která slouží jako pozitivní regulátor MTI. Následně je FLS2 endocytován a odbourán⁴. Na mutantech *fls2* *A. thaliana* bylo ukázáno, že v nepřítomnosti FLS2 je rapidně snížena odpověď rostliny závislá na flg22. Ošetření flg22 indukuje v rostlině *A. thaliana* rezistenci k bakterii *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 a částečně i k houbě *Botrytis cinerea*^{5,6}. Rostlina *Solanum lycopersicum* (rajče), rozpoznává sekvenci 15 aminokyselin z flagelinu bakterie *E. coli*⁷.

EF-Tu

EF-Tu patří mezi elongační faktory, které jsou nezbytné během biosyntézy proteinů, konkrétně ve fázi elongace, kdy jsou asociované na ribozom. EF-Tu je jedním z nejhojněji se vyskytujících proteinů bakteriální buňky, avšak jeho rozpoznávání bylo doposud pozorováno pouze u rostlin z rodu brukvovitých (Brassicaceae)⁸. Sekvence, rozpoznávaná receptorem *A. thaliana* EFR (EF-Tu receptor), který se řadí také do rodiny RLK, čítá 18 či 26 aminokyselin umístěných na N-konci, tyto epitopy jsou označeny v dalším textu jako elf18 resp. elf26. Bylo zjištěno, že EFR nemůže být nahrazen FLS2, přestože elf18 bakterie *E. coli* či elf26 bakterie *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 a flg22 vyvolávají v rostlinné buňce velmi podobné (někdy totožné) signální procesy a odpovědi, například spouští transienční produkci ROS, aktivují stejné kinasy, a to bez navýšení efektu v případě použití obou elicitorů najednou⁹. Zajímavostí je, že mutant *A. thaliana efr*, se zablokováním genem *EFR*, projevuje díky zhoršené schopnosti rozpoznávání zvýšenou náchylnost k *Agrobacterium tumefaciens*, což vede ke zvýšení efektivity T-DNA transformace⁸.

Ax21

Ax21 je protein obsahující 194 aminokyselin. Zajímavostí je, že jeho receptor LRR XA21 byl prvním nalezeným rostlinným PRR, a to v rýži. Tehdy byl ale identifikován jako PR-protein indukující rezistenci výlučně proti *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Dnes je známo, že tento mimořádně silný receptor rozpoznává sulfatovaný epitop proteinu Ax21, který je typický pro různé druhy bakterie *Xanthomonas* a několik málo příbuzných rodů^{10, 11}.

PGN

PGN je nezbytnou a jedinečnou stavební složkou grampozitivních i gramnegativních bakterií. Jde o komplex mnoha glykanových řetězců, složených z N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny, prokřížených pomocí krátkých peptidových řetězců. PGN rostlinných patogenů *Agrobacterium* a *Xanthomonas* indukuje v rostlinách *A. thaliana* tvorbu ROS, zvýšení

extracelulárních pH, transkripci genu *PR1* a ukládání kalosy do buněčné stěny¹². Za rozpoznání PGN a následnou signalizaci v rostlinách *A. thaliana* je zodpovědný receptor rozpoznávající chitin CERK1 (kinasa 1 receptor chitinového elicitoru, „chitin elicitor receptor kinase 1“), ale také LYM1 z rodiny CEBiP (protein vážící elicitor chitin, „chitin elicitor-binding protein“)¹³. Hlavní doména, zodpovědná za rozpoznání jak PGN, tak chitinu, je LysM (lysinový motiv, „lysin motif“)¹⁴.

LPS

LPS, jež jsou složeny z lipidové a oligosacharidové části, jsou hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií. Dřívější studie vypovídaly, že LPS mohou předcházet hypersenzitivní reakci (HR) vyvolané bakterií. Mechanismus procesu potlačení HR, během které dochází vlivem indukce tvorby ROS v místě napadení patogenem k nekróze rostlinného pletiva hromaděním H₂O₂, je ale stále neznámý¹⁵. Efektivita potlačení HR je dána délkou oligosacharidového řetězce¹⁶. Oligosacharidové jednotky také indukují transkripci obranných genů *PR1* a *PR2* v *A. thaliana*¹⁷. Také u rýže byla prokázána indukce tvorby ROS po ošetření LPS. Na základě těchto informací jsou LPS řazeny mezi MAMP u jednoděložných i dvouděložných rostlin¹⁸. Žádný rostlinný PRR rozpoznávající LPS ještě nebyl identifikován.

Chitin

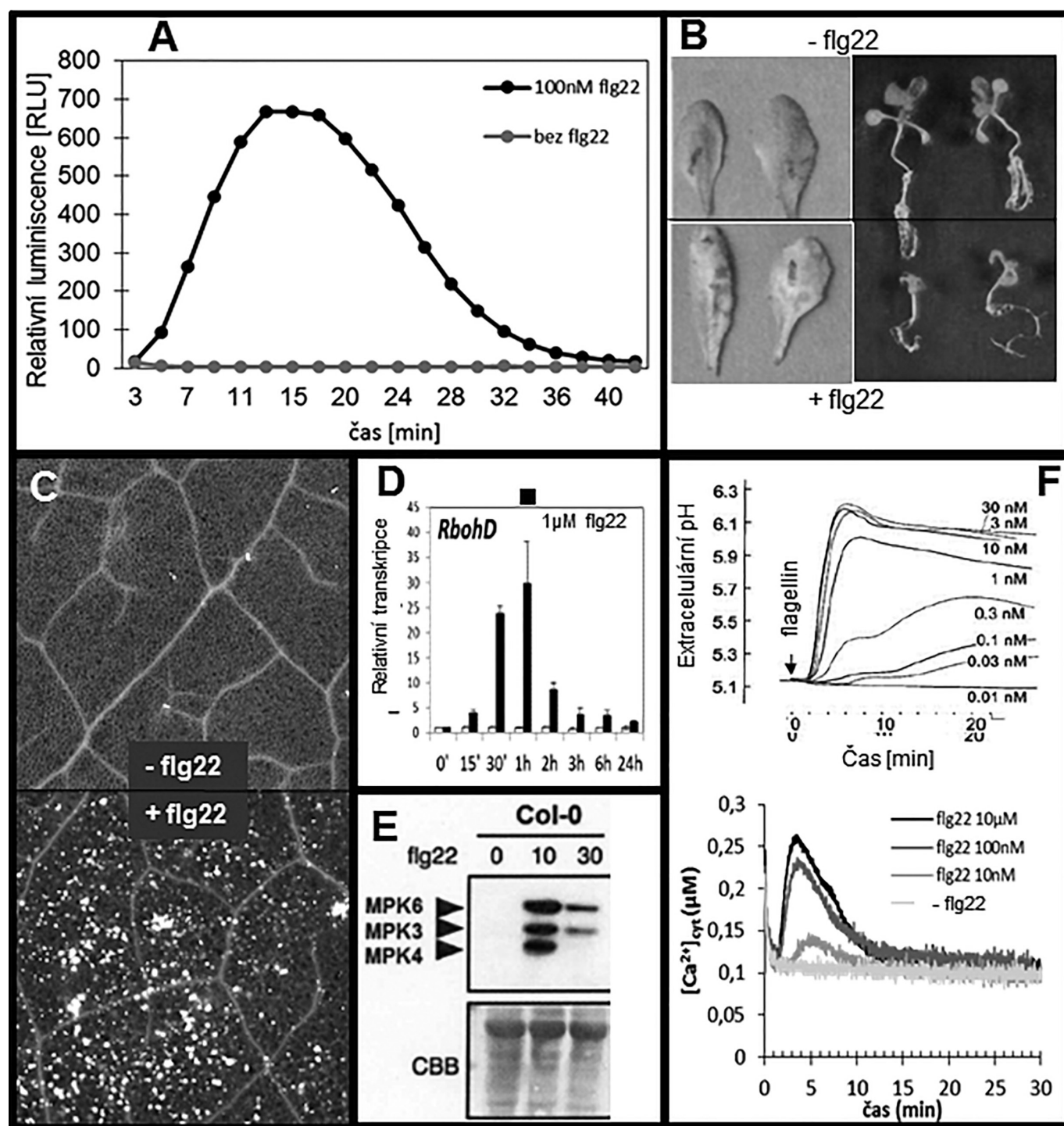
Chitin je stavebním polysacharidem hub. Řetězce složené z jednotek N-acetyl-D-glukosaminu vzájemně spojených 1,4-β-glykosidovou vazbou jsou prokříženy pomocí β-glukanu. Obecně platí, že chitin či chitinové oligosacharidy jsou rozpoznávány pomocí receptorů RLK CERK1 a RLP CEBiP^{19, 20}. Rozpoznání a následná signalizace se odlišuje mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami. Například v rýži, jež patří mezi jednoděložné, jsou chitinové oligosacharidy vázány na buněčném povrchu receptorem RLP CEBiP. CEBiP pak tvoří tzv. sandwichový typ receptoru s RLK CERK1 obsahující LysM doménu. Tato interakce vede k další signalizaci²¹. Bylo prokázáno, že ve dvouděložných rostlinách *A. thaliana* je do rozpoznání chitinu zapojen dimerizující RLK CERK1 obsahující doménu LysM. Dále byly nalezeny proteiny podobné CEBiP označené LYM1-3, které jsou na sebe schopny vázat chitinové oligosacharidy²². Následné bádání ukázalo, že LYM2 může být také zodpovědný za rozpoznání chitinu u rostlin *A. thaliana*^{19, 20, 23}.

MAMP vyvolané projevy MTI a jejich detekce

Studium projevů MTI vyvolaných MAMP a k tomu určené metody byly zpočátku vyvíjeny a optimalizovány hlavně na modelové rostlině *A. thaliana* a jejích fytopatogenech. Následně však byly metody k měření odpovědi spojených s MTI modifikovány i pro ekonomicky důležité plodiny, jako jsou rostliny rodu *Brassicaceae* (řepka), *Solanaceae* (rajče, brambory, paprika a tabák) a další. Zkoumají se například změny fenotypu spojené s MTI, změny v produkci Ca²⁺ či ROS, testy resistance,

změny v indukcí obranných genů, ukládání kalosy či aktivace MAPKinasové kaskády (Obr. 1). Tyto odpovědi se projevují v různých časech a zároveň jsou rozdílné napříč rostlinnými druhy²⁴. Některé metody jsou leh-

ce přenositelné na jiné rostlinné druhy, avšak k nutné optimalizaci dochází například kvůli rozdílné morfologii listů. Metody se také liší v závislosti na věku a velikosti rostlin či podmínkách, ve kterých jsou pěstovány^{25,26}.



Obr. 1: Typické projevy MTI vyvolané flg22

A) Relativní luminiscence měřená pomocí luminolu a křenové peroxidasy na discích 4týdenních rostlin *A. thaliana* v závislosti na čase.

B) Levá část: Infekce na listech 4týdenních rostlin *A. thaliana*, infikovaných bakterií *Pseudomonas* předem ošetřených/neošetřených flg22.⁴⁷

Pravá část: Inhibice růstu semenáčků *A. thaliana* ošetřovaných/neošetřovaných flg22 po dobu dvou týdnů.⁴⁶

C) Mikroskopická vizualizace kalosy pomocí anilinové modři v listech 4týdenních rostlin *A. thaliana*.

D) Relativní transkripce *RbohD* zjištěná u buněk vinné révy po ošetření 1mM flg22.⁴⁸

E) Výsledky imunochemické detekce aktivace MAPKinas vyvolané flg22.⁴⁹

F) Metody detekce influxu vápenatých iontů.

Nahoře: Měření změny pH extracelulárního prostředí vyvolané různými koncentracemi flg22 pomocí kombinované skleněné elektrody.

Dole: Luminiscenční stanovení komplexu Ca^{2+} aequorin vznikajícího v cytosolu po ošetření flg22 o různé koncentraci.⁴⁸

Zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu buňky

Jednou z nejrychlejších odpovědí rostliny reagující na MAMP (30 s – 2 min) je influx extracelulárního Ca^{2+} do cytosolu za současné alkalizace extracelulárního prostředí¹. To je pozitivně regulováno cytoplazmatickým RLK BIK1 (*Botrytis* indukovaná kinasa 1). Zvýšení koncentrace Ca^{2+} v buňce je nezbytné pro funkci některých proteinů, typicky CDPK („calcium dependent protein-kinases“), NADPH oxidasy nebo také fosfolipasy D²¹. Změny Ca^{2+} po ošetření MAMP mohou být detekovány v živých rostlinných buňkách produkujícími protein aequorin, který byl objeven u medusy a který váže Ca^{2+} za vzniku bioluminiscence. Emisní záření lze měřit s užitím CCD kamery nebo luminometrem²⁷. Kromě změny koncentrace Ca^{2+} lze také konduktometricky stanovit změnu pH extracelulárního prostředí (Obr. 1 F)²⁸.

Zvýšení produkce ROS

Po rozpoznání MAMP dochází během 2 – 3 minut ke zvýšení produkce ROS, nejvyšších hodnot je dosaženo během 10 – 14 minut. Tato produkce ROS je transientní¹. Za tento proces je v *A. thaliana* zodpovědná NADPH oxidasa RBOHD („respiratory burst oxidase homolog D“). RBOHD produkuje v apoplastu membránou neprocházející superoxidový radikál $\text{O}_2^{\cdot-}$, z nějž pomocí superoxidismutasy vzniká membránou procházející peroxid vodíku H_2O_2 , který tak může pronikat jak do cytosolu, tak do organel. Jednou z nejčastěji používaných variant stanovení tvorby apoplastického H_2O_2 po ošetření některým z MAMP je chemiluminiscenční měření, a to pomocí křenové peroxidasy a luminolu (Obr. 1 A)²⁹. Velmi často se k tomuto stanovení používají disky o průměru kolem 3 – 5 mm vyřezané ze čtyřtydenních rostlin nebo 10denní semenáčky pěstované v tekutém mediu přímo v 96-jamkové destičce²⁶. Další variantou je měření koncentrace H_2O_2 vyloučeného do media založené na oxidaci Fe^{2+} katalyzované peroxidasou a následnou reakcí Fe^{3+} s xylenolovou oranží, což je extrémně citlivá metoda používaná k měření nízkých hodnot H_2O_2 rozpuštěného ve vodě. Absorbance vzniklého komplexu Fe^{3+} -xylenolová oranž se měří při 560 nm. Tato metoda se nazývá FOX1³⁰. H_2O_2 lze kvantifikovat po histochemickém barvení pomocí diaminobenzidinu (DAB), kdy je H_2O_2 kvantifikován pomocí obrazové analýzy³¹.

Zvýšení produkce NO

Oxid dusný a jeho deriváty, které bývají označovány za RNS („reactive nitrogen species“), jsou malé molekuly účastnící se MTI, například tím, že mohou inhibovat RBOHD, což naznačuje úzký vztah mezi RNS a ROS³². Indukce syntesy NO se zvyšuje po aktivaci calmodulinu, což je způsobeno právě influxem Ca^{2+} indukovaným MAMP³³. Ke stanovení plynného NO se používá chemiluminiscenční stanovení, které je založeno na reakci NO s O_3 produkující fotony, přičemž délka emitovaného záření je kolem 600 nm. NO lze stanovit také uvnitř pletiva a to pomocí spektrofotometrického stanovení methhemoglobinu³⁴.

Aktivace MAPkinas

Genom *A. thaliana* kóduje 20 MAPK („mitogen-activated protein kinase“), 10 MAPKK (mitogen-activated protein kinase-kinase) a 60 MAPKKK (mitogen-activated protein kinase-kinase-kinase). Představují funkční signální moduly zprostředkovávající mimobuněčný signál do odpovídajících buněčných odpovědí. Jsou hojně studovány právě v souvislosti s interakcí rostlina-patogen. Po ošetření flg22 a elf18 dochází k aktivaci MPK3 a MPK6 během 1 – 2 minut, nejvyšší aktivita byla naměřena mezi 10 – 15 minutou⁸. MAPK kaskáda aktivuje transkripční faktory, díky nimž dochází k transkripci časných obranných genů. Bylo navrženo obsáhlé schéma zapojení MAPK do MTI, ačkoli propojení některých dílčích procesů jsou stále nejasná³⁵. MAPK jsou aktivovány fosforylací, takto aktivované MAPK lze detekovat pomocí protilátky, po rozdělení pomocí SDS-PAGE, imunochemickou metodou western blot (Obr. 1 E)²⁶.

Aktivace fytohormonálních signálních drah

Mezi hlavní aktéry v obranných procesech vyvolaných MAMP se řadí také fytohormony. Dráha kyseliny salicylové (SA) je obvykle spojována s obranou po rozpoznání biotrofních patogenů, žijících v živých buňkách rostlin, zatímco kyselina jasmonová (JA) a etylén (ET) jsou spojovány spíše s obranou po rozpoznání nekrotrofních patogenů žijících se rozkladem mrtvých rostlinných buněk³⁶. V poslední době však vyšlo několik publikací, které tomuto obecně přijímanému ustanovení oponují, respektive uvádějí i případy, kdy tomu není přesně podle zaběhnutého dogmatu³⁷. U čtyřtydenních rostlin *A. thaliana* byla po infiltraci 10 μM flg22 do listů zvýšená produkce SA již 3 h po ošetření, ovšem nejvyšší hodnoty byly získány z měření 9 h po ošetření³⁸. Produkce ET po ošetření 0.2 μM flg22 byla zkoumána na dvoutýdenních rostlinách *A. thaliana*, kdy zvýšená produkce byla zaznamenána 3 h po ošetření a nejvyšších hodnot bylo dosaženo 4 h po ošetření³⁹. Pomocí čtyřnásobného mutantu (*dde2/ein2/pad4/sid2*) se zablokovánými signálními drahami SA, JA a ET bylo ukázáno, že všechny tři dráhy jsou pozitivně spojeny s imunitou vyvolanou flg22 a že jimi vyvolaná MTI závisí na synergistických interakcích těchto signálních drah⁴⁰. Aktivaci fytohormonálních drah je možné sledovat pomocí T-DNA inzerčních mutantů *A. thaliana*, kdy vložením T-DNA sekvence dojde ke snížení produkce vybraného enzymu sledované dráhy. Zda daný protein (enzym, receptor) je či není opravdu zapojen v MTI lze zjistit dle toho, zda po ošetření některým, respektive určitým MAMP a následné inokulaci rostliny patogenem je mutant méně rezistentní nežli WT či naopak. K tomu lze použít různé bakteriální biotesty (Obr. 1 B)^{5, 23}.

Změny transkriptomu rostlin

Změny na úrovni transkripce jsou považovány za přechod mezi signální transdukcí (MAPkinasová kaskáda) a indukovanou obranou (produkce a sekrece antimikrobiálních látek). Transkripce je vysoce dynamický proces řízený transkripčními faktory, chromatinovými regulátory a interakcí mnoha výše zmíněných signálních

komponent⁴¹. MAMP vyvolávají masivní změny v transkripci/expresi rostlinného genomu (Obr. 1D). V rostlinách *A. thaliana* dochází po ošetření flg22 ke změnám v transkripci u několika tisíc genů v závislosti na době po ošetření⁴². K pozorování změn transkriptomu se využívá metody RT-PCR. Nejprve se z rostlinného materiálu izoluje RNA, která je následně pomocí enzymu reversní transkriptasy přepsána do cDNA, tu lze kvantifikovat pomocí RT-PCR²⁶.

Akumulace kalosy

Kalosa je amorfni, vysokomolekulární polymer složený z jednotek β -(1,3)-glukanu. Buněčná stěna obsahující kalosu je účinnou obrannou mechanickou bariérou vznikající v místě napadení po rozpoznání MAMP. Tato vrstva zároveň slouží jako síť zachytávající antimikrobiální složky, jako jsou glukosinoláty. Ukládání kalosy bylo zevrubně studováno například na hydroponickém systému *A. thaliana*, kde došlo ke srovnání tohoto jevu vyvolaného flg22 a chitosanem za různých růstových podmínek. Bylo například zjištěno, že přítomnost antioxidantů v mediu snižuje tuto obrannou odpověď vyvolanou jak flg22, tak chitosanem⁴³, což koreluje s dřívější studií, která ukázala, že ukládání kalosy závislé na PMR4 (kalosasynthasa 12) je aktivováno ROS závislými na RBOHD, jejichž vznik je stimulován MAPK kaskádou⁴⁴. K ukládání kalosy do buněčné stěny dochází například po rozpoznání flg22 či chitosanu. Metodou, kterou lze využít pro měření kalosy, je barvení pomocí anilinové modři, kterou předchází odbarvení chlorofylu. Anilinová modř se váže na jednotky β -(1,3)-glukanu, následuje mikroskopická analýza pomocí fluorescenčního mikroskopu (Obr. 1C)⁴⁵.

Literatura:

1. Boller T, Felix G: *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379 (2009).
2. Gomez-Gomez L, Boller T: *Mol. Cell* 5, 1003 (2000).
3. Robatzek S, Chinchilla D, Boller T: *Genes Dev.* 20, 537 (2006).
4. Beck M, Zhou J, Faulkner C, et al.: *Plant Cell* 24, 4205 (2012).
5. Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, et al.: *Nature* 428, 764 (2004).
6. Ferrari S, Galletti R, Denoux C, et al.: *Plant Physiol.* 144, 367 (2007).
7. Felix G, Duran JD, Volko S, et al.: *Plant J.* 18, 265 (1999).
8. Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, et al.: *Cell* 125, 749 (2006).
9. Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, et al.: *Plant Cell* 16, 3496 (2004).
10. Lee SW, Han SW, Sriyanum M, et al.: *Science* 326, 850 (2009).
11. Zipfel C, Robatzek S: *Plant Physiol.* 154, 551 (2010).
12. Erbs G, Silipo A, Aslam S, et al.: *Chem. Biol.* 15, 438 (2008).
13. Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 19824 (2011).
14. Liu B, Li JF, Ao Y, et al.: *Plant Cell* 24, 3406 (2012).
15. Newman MA, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, et al.: *Plant J.* 29, 487 (2002).
16. Silipo A, Molinaro A, Sturiale L, et al.: *J. Biol. Chem.* 280, 33660 (2005).
17. Bedini E, De Castro C, Erbs G, et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2414 (2005).
18. Desaki Y, Miya A, Venkatesh B, et al.: *Plant. Cell. Physiol.* 47, 1530 (2006).
19. Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11086 (2006).
20. Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, et al.: *Plant J.* 64, 204 (2010).
21. Miya A, Albert P, Shinya T, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19613 (2007).
22. Shinya T, Motoyama N, Ikeda A, et al.: *Plant Cell Physiol.* 53, 1696 (2012).
23. Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, et al.: *Front. in Plant Sci.* 4, 139 (2013).
24. Hann DR, Rathjen JP: *Plant J.* 51, 607 (2007).
25. Nguyen HP, Chakravarthy S, Velásquez AC, et al.: *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 991 (2010).
26. Lloyd SR, Schoonbeek HJ, Trick M, et al.: *Mol. Plant Microbe Interact.* 27, 286 (2014).
27. Monaghan J, Matschi S, Romeis T, et al.: *Plant Signal. Behav.* 10, e1018497 (2015).

Inhibice růstu

Rostliny po ošetření některým z MAMP inhibují svůj růst, tato inhibice je obecně spojována s fenoménem dialogu mezi obranou a růstem rostlin. Bylo zjištěno, že míra inhibice růstu semenáčků *A. thaliana* pěstovaných *in vitro* ošetřených flg22 se liší v závislosti na koncentraci flg22 (Obr. 1 B)⁴⁶.

Závěr

Fytopatogeni mohou mnohonásobně zredukovat biomasu, snížit plodnost či dokonce zapříčinit úmrtnost pro nás nepostradatelných plodin, jako jsou například obiloviny. Z tohoto důvodu je nezbytné se věnovat výzkumu obrany rostliny, nehledě na fakt, že světová populace stále roste a zemědělských ploch ubývá. Bylo by tedy velice příhodné, kdyby se podařilo identifikovat co nejvíce MAMP a jejich receptorů a popsat obranné dráhy zahrnuté v MTI u co nejširšího spektra rostlin. Jsou známy a hojně využívány efektivní metody, které umožňují studovat různé obranné reakce, jež jsou součástí MTI. Kromě studia patogenních organismů se také velice zajímavé jeví studium způsobu, jakým symbionti kooperují s mechanismy MTI.

Poděkování:

Děkuji doktorům Martinu Jandovi a Lucii Trdce za odborné rady a korektury. Také děkuji prof. Olze Valentové a doc. Lence Burketové za možnost pracovat v jejich laboratořích. Tato práce byla podpořena grantem 17-05151S.

Literatura (pokračování)

28. Coursol S, Fromentin J, Noirot E, et al.: *New Phytol.* 205, 1239 (2015).
29. Smith JM, Heese A: *Plant Methods* 10, 6 (2014).
30. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolf SP: *FEBS Lett.* 268, 69 (1990).
31. Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, et al.: *Plant J.* 11, 1187 (1997).
32. Yun BW, Feechan A, Yin M, et al.: *Nature* 478, 264 (2011).
33. Ma W, Smigel A, Tsai YC, et al.: *Plant Physiol.* 148, 818 (2008).
34. Mur LA, Mandon J, Cristescu SM, et al.: *Plant science* 181, 509 (2011).
35. Bigeard J, Colcombet J, Hirt H: *Mol. Plant* 8, 521 (2015).
36. Glazebrook J: *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205 (2005).
37. Nováková M, Šašák V, Dobrev PI, et al.: *Plant Physiol and Bioch.* 80, 308 (2014).
38. Tsuda K, Sato M, Glazebrook J et al.: *Plant J.* 53, 763 (2008).
39. Liu Y, Zhang S.: *Plant Cell* 16, 3386 (2004).
40. Tsuda K, Sato M, Stoddard T et al.: *PLoS Genet.* 5, e100077 (2009).
41. Moore JW, Loake GJ, Spoel SH: *Plant Cell* 23, 2809 (2011).
42. Denoux C, Galletti R, Mammarella N, et al.: *Mol. Plant* 1, 423 (2008).
43. Luna E, Pastor V, Robert J, et al.: *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 183 (2011).
44. Zhang J, Shao F, Li Y, et al.: *Cell Host microbe* 1, 175 (2007).
45. Clay NK, Adio AM, Denoux C, et al.: *Science* 323, 95 (2009).
46. Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T: *Plant J.* 18, 277 (1999).
47. Wang GF, Seabolt S, Hamdoun S, et al.: *Plant Physiol.* 156, 1508 (2011).
48. Trdá L, Fernandez O, Boutrot F, et al.: *New Phytol.* 201, 1371 (2014).
49. Nuhse TS, Peck SC, Hirt H, et al.: *J. Biol. Chem.* 275, 7521 (2000).

Souhrn

Lamparová L.: První vlna obrany v rostlinách vůči napadení patogeny a možnosti jejího sledování

V přírodě neustále probíhá boj mezi rostlinou a patogenem. Patogenu je rostlina schopna se ve většině případů ubránit pomocí své vyvinuté sofistikované imunity. Klíčovým bodem je rozpoznání patogenních vzorů MAMP, jež spouští obranné reakce. Tento článek byl zacílen právě na imunitu vyvolanou MAMP, které jsou rozpoznány receptory. Především na projevy vyvolané v rostlinné buňce tímto rozpoznáním a současně se zaměřením na typické metody testování těchto projevů.

Klíčová slova: imunita, MAMP, MTI, PRR

Summary

Lamparová L.: Plant MTI and its detection methods

There is a neverending fight between a plant and pathogens in nature. The plant is mostly able to resist due to developed sophisticated immunity. The key point is MAMP recognition by a plant receptor, which triggers defence mechanisms. This article is focused on MAMP triggered immunity, especially on the effects which are triggered in the plant cell after recognition of MAMP by its receptor. Additionally the article is focused on typical methods for detection of these effects.

Keywords: immunity, MAMP, MTI, PRR

RAB GTPASES AS POTENTIAL TARGETS IN PLANT BIOTECHNOLOGIES

Martina Růžicková^{a, b}, Michal Hála^{*a, b}

^a Institute of Experimental Botany, The Czech Academy of Sciences, ^b Department of Experimental Botany, Faculty of Science, Charles University; *halam@natur.cuni.cz, martinakruzickova@gmail.com (*- corresponding author)

Introduction

From very ancient times, plants have been a source for food, textile and construction materials for mankind. With the onset of modern technologies, plants have become a source for chemicals in developing industry. Plants are current object of fast developing biotechnologies.

Although plants naturally produce a broad range of useful compounds, this can be further expanded through appropriate genetic manipulations of plant species. Additionally, the number of plant species that can be used genetically engineered continuously increases providing an ever-expanding genetic engineering toolbox. Transgenic plants are now used for the

production of nutritional components (e.g. vitamins, fatty acids, amino acids), therapeutic products (e.g. edible vaccines, antibodies, enzymes, growth factors, drugs), biodegradable plastics (e.g. starch-based polymers), and other industrial products. For the production and storage of such produced materials, different plant parts are being used. For example, crop grains are ideal for the production and storage of different proteins because there is no pressure to process them immediately after harvest, which is often a limiting factor for proteins produced in leaves or other vegetative parts of plants. In ripe seeds, proteins are protected against proteolysis and can be stored for a long time before processing¹.

There are several *in vitro* techniques that can be used to efficiently produce useful biological compounds in plant model systems. Calli or suspension cultures containing non-differentiated plant cells are widely used for production of different compounds that are secreted to the medium from the transgenic plant cells, and the system can be used for the continuous production of the desired compounds. In this way, mosses with a humanized glycosylation pattern of proteins are used to produce important glycoproteins¹.

Very interesting modification of a transgenic approach is the conversion of plastids, especially chloroplasts, into bioreactors. This approach is beneficial in many ways. Chloroplasts possess relatively small genomes that can be easily regulated and exhibit a very low level of gene silencing allowing for higher accumulation of the product of interest. Finally, the maternal inheritance of chloroplasts in most angiosperm plants limits unwanted spread of the transgene into the nature².

Utilizing plants in biotechnology is not only focused on compound production but also on the introduction of favourable traits including the plant resistance against biotic and abiotic stress factors which are frequently encountered by the plant. Plants as sessile organisms have to deal with different forms of external abiotic and biotic factors. When the level of external factor reaches certain level it becomes stressor for the plant causing internal stress. Although plant responses vary based on stress type, common aspects of these stress responses are lower biomass production, reduced growth, and premature senescence. Stressors can cause serious losses in agricultural production. Some studies estimate that various stresses are responsible for up to 50% decline in agricultural production of major crops³.

Two basic mechanisms provide plants with resistance against stress - avoidance and tolerance. The avoidance mechanism is the ability of plants to avoid transmission of an external stress into an internal stress by forming protective barriers (e.g. the cuticle on the surface of plant body protect the plant against water loss), movements (e.g. thigmonasty), or by simply avoiding the impact of periodic stress conditions by acceleration or postponing of their important ontogenetic stages (usually germination or flowering). The tolerance mechanism, on the other hand, involves the active recruitment of defence and adaptation mechanisms at the cellular level by adjusting the metabolism level, modifying the internal structures (e.g. membrane composition), and production of protective compounds, which can be either proteins or low molecular chemicals⁴.

Any of the mentioned aspects of plant biotechnologies are connected with the vesicle transport inside the cell. Production of transgenic proteins is often connected to its transport to storage compartments or secretion outside the cell, which requires functional vesicle transport. Similarly, stress responses are connected with membrane system reconstitution, transport of different cargoes inside the cell, and cargo secretion out of the cell. In all these cases, vesicle transport is organized and regulated by very complicated protein machinery as well as other factors. Our research topic

is RAB (Ras of Brain) GTPases, which are small GTP-hydrolysing proteins that work as organizers of vesicle transport, thus we focus this mini-review on their potential for employment in plant biotechnologies. The authors remind readers from different scientific areas that rules for writing protein names in plant literature require full name in capital letters (RAB), while literature concerning other organisms only capitalize the first letter (Rab). We follow these rules throughout the text.

Rab GTPases

Rab GTPases are small monomeric G-proteins that belong to the Ras superfamily, which also includes Ras, Ran, Rho and Arf families. All Ras-related GTPases are characterized by conserved G regions that are responsible for binding of guanosine triphosphate (GTP) and harbour the GTPase activity. The mechanism of GTP/GDP binding is very conserved. The GTP/GDP binding site creates a pocket that is associated with two domains, the Switch I domain and the Switch II domain, which undergo conformational changes upon GTP binding or hydrolysis⁵.

Other region responsible for effectors binding specificity is also conserved in Rab GTPases across eukaryotes. The Rab GTPase effector domain interacts with GTPase-activating proteins (GAP) and is important in determining the functional specificity of small GTP-binding proteins⁶. Complementation studies have shown that the Rab GTPase from *Arabidopsis thaliana* is able to complement a mutation in the yeast Rab GTPase providing strong evidence for conserved effector and regulator recognition mechanisms across eukaryotic phyla⁷.

The third structural feature of Rab GTPases is a hypervariable C-terminal region that is important for the localization of Rab proteins to the specific membrane compartments. Rab GTPases mostly occur as peripheral membrane proteins, although their amino acid composition implies a hydrophilic nature. This localization is achieved by their post-translational modification of attachments with lipids moieties. Rab proteins typically contain two C-terminal cysteine residues that undergo post-translational modifications by the covalent attachment of geranylgeranyl (C20 isoprenoid) groups via thioether linkage. The geranylgeranylation facilitates membrane association and in some cases also plays a major role in specific protein-protein interactions⁸.

The geranylgeranylation reaction is mediated by the protein prenyl transferase family that includes protein farnesyl transferase (FT), protein geranylgeranyl transferase type I (GGT-I), and Rab geranylgeranyl transferase (RabGGT or GGT-II). All prenyl transferases are heterodimers consisting of α - and β -subunits. Rab GTPases are unique substrates of RabGGT because the process of Rab GTPase geranylgeranylation requires the presence of the Rab escort protein (REP). First, REP binds a newly synthesized Rab protein and forms a stable Rab-REP complex. Second, RabGGT is able to recognize the Rab-REP complex as its protein substrate and catalyses the transfer of geranylgeranyl moieties to the relevant cysteine residues. After geranylgerany-

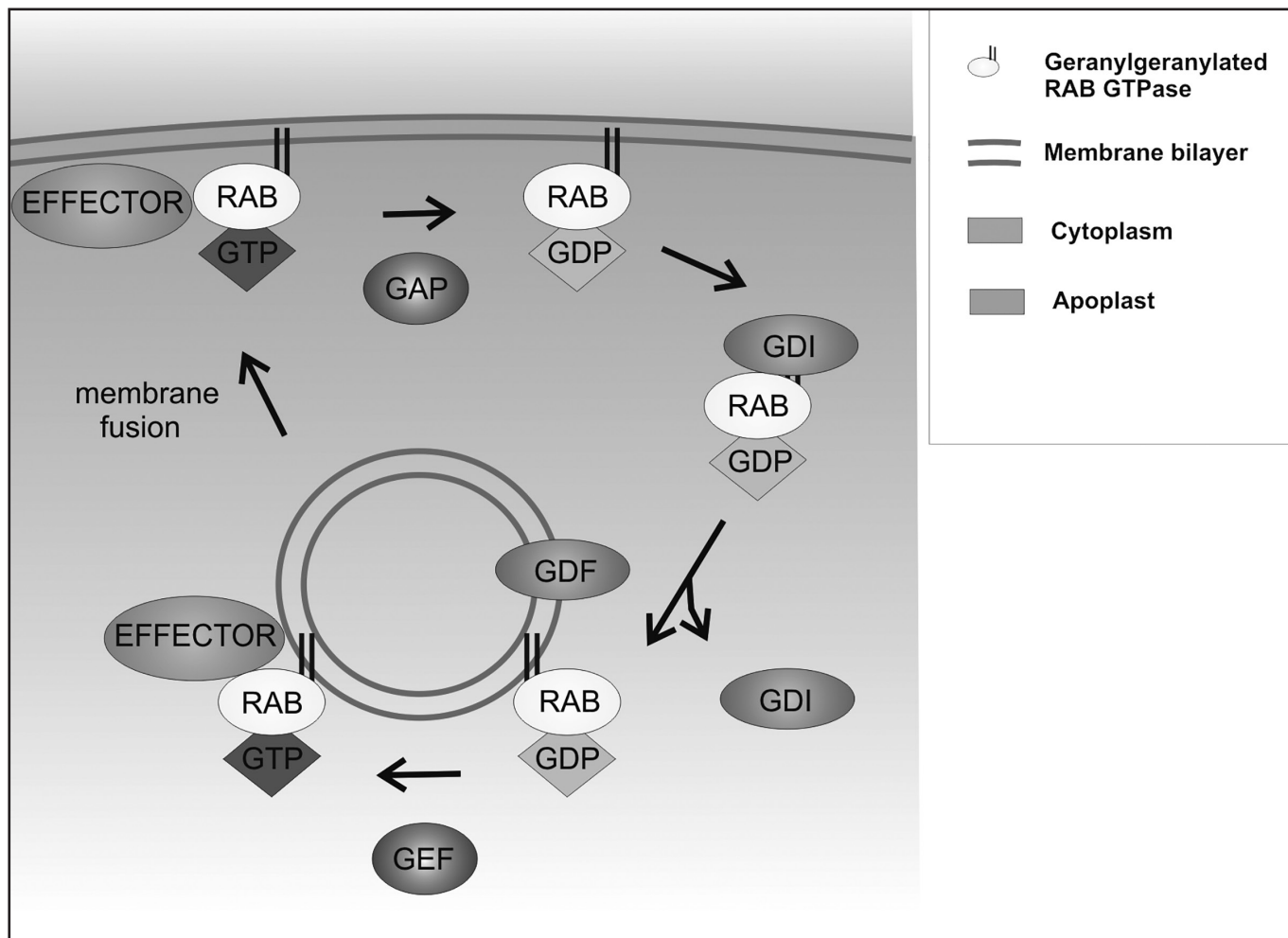


Fig.1: Schematic view of Rab GTPase cycling between GTP- and GDP-bound forms and among different membrane compartments. Rab GTPase is first activated by exchange of GDP for GTP through the action of GEF in a donor compartment (e.g. secretory vesicle). It allows binding of effectors and membrane fusion with a acceptor compartment (e.g. plasma membrane). Upon fusion, Rab GTPase is inactivated through the action of GAP and retrieved from the membrane by GDI. Back at the donor compartment, GDF releases GDI from the complex with Rab GTPase and the Rab GTPase is localized to the membrane again.

lation, Rab GTPase is delivered to a donor membrane compartment in the same manner as during its regular cycling⁹.

Cycling of Rab GTPases

Rab GTPases enter cycling immediately after translation. The first cycle is represented by the switching between GDP- and GTP-bound forms while the second cycle includes the translocation of the RAB GTPase from a donor membrane compartment to a target membrane compartment (Fig.1). Both RAB cycles are tightly connected.

First, the GDP-bound form of Rab GTPase interacts with a Guanine nucleotide exchange factor (GEF) that facilitates release of the bound GDP and replaces it with GTP, changing the conformation of Switch I and II domains. This allows the GTP-bound Rab protein to interact with the effector proteins. Upon this interaction, Rab GTPase is transported from the donor membrane compartment to a target membrane compartment via vesicle transport. To be able to continue in the cycle, the Rab GTPase has to be converted back to the GDP-

-bound form as its internal hydrolytic activity is very weak. This is achieved by an interaction with a Rab GTPase activating protein (RabGAP) that catalyzes hydrolysis of GTP. The now GDP-bound Rab GTPase is then extracted from the target membrane by a Rab GDP dissociation inhibitor protein (RabGDI) that transports Rab GTPase through the cytoplasm and back to the donor membrane compartment to complete the cycle. A GDI Displacement Factor (GDF) facilitates release of Rab GTPase from RabGDI by a yet unknown mechanism. Generally, substrate specificity of GEFs, GAPs and GDFs is usually limited to few Rab GTPases, while GDIs are promiscuous⁵.

The function of Rab GTPases as vesicle trafficking regulators is based on exchange of one type of Rab GTPases on the vesicle surface for another type, which is achieved through so called RabGEF and RabGAP cascades. First, a Rab GTPase in the regulatory pathway is activated by an appropriate RabGEF. Once activated, it recruits other RabGEFs that activate a next Rab GTPase in the cascade and simultaneously is inactivated by a corresponding RabGAP. The whole process continues until the vesicle reaches the target membrane¹⁰.

Classification of RAB GTPases in plants

Although it seems that Rab GTPases are present in all eukaryotes, the number of paralogues significantly differs among organisms. Generally, the number is lower in unicellular organisms and it increases with higher organism complexity. In yeast *Saccharomyces cerevisiae*, there are eleven paralogues while mammalian genomes encode about 60 Rab paralogues. In these organisms, Rab GTPases are classified numerically (e.g. Rab1) in order of when they were discovered.

In plants, the number of paralogues is similar to that in animals but the overall structure of the group differs. For instance, 57 RAB GTPases have been identified in the *Arabidopsis thaliana* genome and they can be grouped into eight subgroups related to only eight Rab GTPases from animals (RAB-A to RAB-H subgroups), each containing several paralogues⁷. Similar number of Rab GTPases is encoded in other Angiosperm plant genomes. On the other hand, there are only about ten to twenty Rab GTPases in Bryophytes and green algae.

Structural homology also corresponds to functional classification. The subgroup RAB-A (Rab11 homologue) functions in the trans-Golgi network and in the vesicle transport to the plasma membrane (PM), the RAB-B subgroup (Rab2 homologue) organizes vesicular transport between the Golgi apparatus (GA) and the endoplasmic reticulum (ER), the RAB-C subgroup (Rab18 homologue) associates with peroxisomes, the RAB-D subgroup (Rab1 homologue) regulates vesicle transport between ER and GA, the RAB-E subgroup (Rab8 homologue) participates in TGN to PM transport, the subgroup RAB-F (Rab5 homologue) regulates endocytosis, the subgroup RAB-G (Rab7 homologue) affects vesicle transport to the vacuole, and the subgroup RAB-H (Rab6 homologue) is localized in GA¹¹. Further text will focus on those subgroups involved in plant stress responses and cell wall component deposition.

RAB GTPases and plant stress tolerance

Stress conditions put more demand on membrane recycling. Maintaining integrity of the biological membranes is the first priority during stress onset. At the same time, a spectrum of membrane proteins changes and endocytosis is the most effective way of recycling them.

One of the endocytotic RAB GTPases, RAB-G3e, is transcribed under oxidative stress. At the same time, its transcription can be induced by salicylic acid treatment. This implies its involvement in biotic stresses. Overexpression of this RAB results in acceleration of endocytosis and the increased resistance of transgenic plants to osmotic stresses. Transgenic plants grown on high salinity media accumulate significantly more sodium in shoots than WT (wild type) plants, indicating an enhanced accumulation in vacuoles. Similarly, increased tolerance occurs when these plants are cultivated on media containing high sorbitol concentration, indicating that the primary effect is in osmotic tolerance and not ion toxicity due to the salt stress¹².

The subgroup RAB-F is also involved in the regulation of endocytosis. Moreover, it includes a plant-specific

RAB GTPase RAB-F1 (known also as Ara6), which is not geranylgeranylated in a canonical manner but instead it is palmitoylated¹³. The structural difference is accompanied by a functional difference. Unlike the rest of the family, RAB-F1 plays a role in recycling from endosomes to the plasma membrane¹³. In the same study, it was shown to be involved in the proper response to elevated salinity conditions. Overexpression of RAB-F1 significantly helped plants overcome root growth arrest both on media with high sodium chloride and sorbitol concentrations. Surprisingly, even such specialization does not make it unique in the plant cell. Knock-out mutants in this gene showed no phenotypic deviation from WT¹³. This illustrates how redundant RAB GTPases are across subfamilies, making such research more difficult. RAB-F1 was recently shown to be a part of the extrahaustorial membrane, the membrane that surrounds fungal haustorium, and protects plant cell against invading fungus¹⁴.

The RAB-F subgroup is also important for salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*). Transformed lines over-expressing OsRAB7 have significantly higher tolerance to salt stress represented by faster shoot growth and higher lateral root number. This effect was connected to a 3.5 fold higher accumulation of proline, which is known to play role in osmotic adjustment as well as an antioxidant. However, the direct mechanism connecting RAB GTPases and proline accumulation remains unknown¹⁵.

Recent finding shows that some members of the secretion-involved RAB-A1 subgroup are required for tolerance to salinity stress, which implies that these RAB GTPases might regulate the localization of proteins integral to the plasmatic membrane, such as proton pumps and ion channels¹⁶.

RAB GTPases involved in cell wall biogenesis

Plant cell wall components are important materials for many industrial branches and are therefore subjects of research. The plant cell wall is a complex structure composed typically of cellulose (1,4- β -D-glucan), hemicelluloses (xyloglucans, gluconarabinoxylans, glucomannans), and pectins (homogalacturonans, xylogalacturonans, rhamnogalacturonans I and rhamnogalacturonans II). Cellulose combines with different types of hemicelluloses and pectins depending on the plant species and the tissue type. In special cases, cellulose is substituted or supported by callose (1,3- β -D-glucan). Synthesis of cellulose or callose occurs directly on the plasma membrane where functional complexes of cellulose synthase or callose synthase reside having been delivered as cargoes of vesicle transport. Synthesis of other cell wall components is generally localized to the GA where products are then transported to the apoplast via vesicle trafficking. There are a number of proteins in the cell wall too (e.g. expansins, extensins, pectin-modifying enzymes etc.) that are delivered to the apoplast via vesicle transport. Biogenesis of the cell wall is rather complex process that requires the orchestration of many steps that are surprisingly plastic in respects to

external manipulation. Experiments focused on investigating the affects of specific cell wall properties through knock-down of pectin modifying enzymes only had very limited success. Only combining the knock-down of multiple genes causes that the phenotypic deviation can be observed, which shows how dynamic cell wall structure and organization is¹⁷.

RAB GTPases as organizers of vesicle trafficking are also potential targets for biotechnology manipulations. For years, the role of RAB GTPases in fruit ripening has started to be studied. Fruit ripening is an economically important process that is accompanied by significant cell wall modification. The RAB GTPases in the two subgroups, RAB-A and RAB-D, were shown to play a role in tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit ripening. Three paralogues of LeRAB1 (RAB-D subgroup) were detected depending on the stage of fruit development. While LeRAB1a was expressed in green growing fruits, the other two paralogues were highly expressed during ripening¹⁸. Moreover, they seemed to not be fully redundant in their GTPase function. More interesting are data obtained for LeRAB11a (RAB-A subgroup). Transgenic plants expressing antisense mRNA for *LeRAB11a* under a constitutive promoter produced fruits that changed colour properly upon ripening but remained firm for a long time. The authors also observed reduced activity of the pectinesterase and polygalacturonase in the apoplast¹⁹.

Intensively growing pollen tube is an interesting model for studying the relationship between secretory events and cell wall biogenesis. Compromising Rab11b (homologous to the RAB-A subgroup) function led to the arrest of secretion and accumulation of soluble cell wall protein, invertase, in the cytoplasm²⁰. Moreover, this paper showed the potential of point mutations in RAB GTPases that led to changes in the binding capacity of the guanine nucleotide. These mutants include the constitutively active (CA) form that has compromised hydrolytic activity, which leads to accumulation of GTP-bound forms of the RABs. On the other hand, the dominant negative form (DN) is unable to stabilize binding of the third phosphate group in the nucleotide-binding pocket and is considered to be GDP-bound. Some DN RAB GTPases tend to lose the guanine nucleotide and become nucleotideless⁵. Over-expression of these forms in living cells is often lethal, requiring the use of transient expression or inducible promoters to express these GTPases in plants.

Another pollen-specific RAB GTPase from the RAB-A subgroup is RAB-A4d, which was shown to localize to the growing tip of *Arabidopsis* pollen tubes. Knock-out mutations of the gene revealed it is required for the proper development of the pollen tube and showed a disturbed localization pectin in the cell wall²¹.

Direct involvement of RAB GTPases in cell wall biogenesis was tested in the pioneering work of Lunn et al²². They analyzed the proportion of basic cell wall components in numerous *Arabidopsis* single knock-out RAB GTPases mutants belonging to different RAB-A subgroups. Their results show that cell cell walls of RAB mutants in the RAB-A1 clade had a lower amount of pectin, in mutants from the RAB-A2 subgroup had a lower amount of cellulose, and mutants from the

RAB-A4 subgroup had a lower amount of hemicelluloses. This simple experiment suggests a specialization of RAB GTPases for different vesicular cargoes.

Finally, RAB-A4c was connected to the defence against fungal pathogens by showing an interaction with its effector, PMR4. PMR4 is a callose synthase and its enzymatic activity is activated after translocation to a location on the plasma membrane where the fungal pathogen forms an appressorium to penetrate the cell²³. The role of RAB-A4c is then seen in the translocation of the callose synthase. This observation nicely connects cell wall modification and biotic stress tolerance.

Conclusion

RAB GTPases are undoubtedly important regulators of vesicle trafficking. On the other hand, their potential for biotechnologies is limited. To improve plant responses to stress, the most promising subgroups are RAB-F and RAB-G, which regulate the endocytotic routes. Recycling proteins from the plasma membrane and decision of whether these proteins should be degraded in vacuole or stored, is obviously very important to the plant stress responses.

On the other hand, cell wall material travels through the transport route controlled by the RAB-A subgroup. Moreover, it seems that different components of the cell wall use different routes to the cell surface. Experimental data implies there are ways to change or affect composition of the cell wall by simply changing the equilibrium among various RAB-A paralogues. Cell wall biogenesis regulation is very complex and has high plasticity to genetic manipulation. In this respect, RAB GTPases offer very interesting tools represented in their CA and DN mutant forms, and the expression of these forms can shift the process out of equilibrium.

Not commented in this text but an important part of RAB GTPase potential is their participation in the interaction between plants and surrounding biosphere. Roles of RAB GTPases in pathogen resistance were already mentioned in the text, but as they become focus of many researchers, interesting discoveries can be expected in the near future.

Moreover, RAB-A2 GTPase is crucial for legumes nodulation in the presence of symbiotic bacteria (e.g. genus *Rhizobium*), which is important for fixing atmospheric nitrogen and its utilization by plant. As the first step of the nodulation process, reorientation of the root hair axis and induction of nodulation genes can be observed. In bean plants with knocked-down levels of a RAB-A homologue, the nodulation was disabled in the first step of interaction²⁴.

Although we present many examples of how RAB GTPases are involved in plant responses to stress or during cell wall biogenesis, the main question is still if or how RAB GTPases can be employed for plant biotechnologies and it remains the topic for further research.

Acknowledgement

The authors thank Dr. Emily Larson for manuscript critical reading. This work was supported by Ministry of Education, Youth and Sports project NPUI01417.

References

1. Sharma AK, Sharma MK: *Biotechnol. Adv.* 27, 811 (2009).
2. Miao Y, Ding Y, Sun QY, et al.: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 25, 363 (2008).
3. Boyer JS: *Science* 218, 443 (1982).
4. Lichtenthaler HK: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851, 187 (1998).
5. Olkkonen VM, Stenmark H: *Int. Rev. Cytol.* 176, 1 (1997).
6. Moore I, Schell J, Palme K: *Trends Biochem. Sci.* 20, 10 (1995).
7. Pereira-Leal JB, Seabra MC: *J. Mol. Biol.* 313, 889 (2001).
8. Anant JS, Desnoyers L, Machius M, et al.: *Biochemistry* 37, 12559 (1998).
9. Alexandrov K, Horiuchi H, Steele-Mortimer O, et al.: *EMBO J.* 13, 5262 (1994).
10. Novick P: *Small GTPases* 7, 252 (2016).
11. Woollard AA, Moore I: *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 610 (2008).
12. Mazel A, Leshem Y, Tiwari BS, et al.: *Plant Physiol.* 134, 118 (2004).
13. Ebine K, Fujimoto M, Okatani Y, et al.: *Nat. Cell Biol.* 13, 853 (2011).
14. Inada N, Betsuyaku S, Shimada TL, et al.: *Plant Cell Physiol.* 57, 1854 (2016).
15. Peng X, Ding X, Chang T, et al.: *Sci. World J.* 2014, ID483526 (2014).
16. Asaoka R, Uemura T, Ito J, et al.: *Plant J.* 73, 240 (2013).
17. Lycett G: *J. Exp. Bot.* 59, 4061 (2008).
18. Loraine AE, Yalovsky S, Fabry S, et al.: *Plant Physiol.* 110, 1337 (1996).
19. Lu C, Zainal Z, Tucker GA, et al.: *Plant Cell* 13, 1819 (2001).
20. de Graaf BH, Cheung AY, Andreyeva T, et al.: *Plant Cell* 17, 2564 (2005).
21. Szumlanski AL, Nielsen E: *Plant Cell* 21, 526 (2009).
22. Lunn D, Gaddipati SR, Tucker GA, et al.: *PLoS One* 8, e75724 (2013).
23. Ellinger D, Glöckner A, Koch J, et al.: *Plant Cell* 26, 3185 (2014).
24. Blanco FA, Meschini EP, Zanetti ME, et al.: *Plant Cell* 21, 2797 (2009).

Summary

Růžičková M., Hála M.: RAB GTPases as potential targets in plant biotechnologies

Plants are not only a food resource but are also a valuable source of different materials. Plant biotechnologies help improve food or material yield and increase the number of compounds obtained from plants. Affecting plant secretory machinery is one of the ways we can modify plant bio-production. Rab GTPases are important organizers of vesicle transport through their cycling between GDP- and GTP-bound forms as well as between membrane compartments. Here, we discuss whether RAB GTPases can be targets for biotechnology research. We focus on the involvement of RAB GTPases in plant stress responses and cell wall biogenesis, which are two aspects that highly influence plant development. We conclude that the complexity of RAB GTPase families and their regulation make these proteins difficult targets for biotechnologies.

Keywords: Plant biotechnology, RAB GTPases, plant stress, plant cell wall biogenesis

Souhrn

Růžičková M., Hála M.: Potenciál RAB GTPas v rostlinných biotechnologiích

Rostliny poskytují lidstvu nejenom potravu, ale jsou i cenným zdrojem surovin pro různá odvětví průmyslu. Rostlinné biotechnologie pomáhají zlepšovat výnosy jak potravin, tak surovin získávaných z rostlin a také rozšiřovat jejich spektrum. Jedním z nástrojů je ovlivňování buněčného sekrečního aparátu. Rab GTPasy mají důležitou funkci právě při organizaci váčkového transportu, důležité je zejména jejich cyklování mezi různými formami s navázaným GDP či GTP a také mezi různými membránovými kompartmenty. Jak název naší práce napovídá, chceme zvážit možné využití RAB GTPas v biotechnologiích. V naší práci ukazujeme na vybraných příkladech z literatury úlohu RAB GTPas v odpovědích rostlin na stres a ve tvorbě buněčné stěny u rostlin, což jsou procesy zásadně ovlivňující rostlinnou produkci. Naším závěrem je, že využití RAB GTPas v biotechnologiích by bylo možné, ale, vzhledem k dosud ne zcela probádané a velmi komplexní síti regulací, vyžaduje další výzkum.

Klíčová slova: Rostlinné biotechnologie, RAB GTPasy, stresová odpověď rostlin, tvorba buněčné stěny.

OBSAH

Úvodem	1
Biotech 2017	2
Sotio: Představení společnosti	3
Pokorná D.: Chemická oxidace sulfidů jako nedílná součást biologické oxidace sulfidů	4
Buchtová P.: Chladově aktivní enzymy a jejich biotechnologické využití	5
Gharwalová L.: Obsah a distribuce fenolových sloučenin s antioxidační aktivitou v rostlině <i>Vitis vinifera</i>	10
Lamparová L.: První vlna obrany v rostlinách vůči napadení patogeny a možnosti jejího sledování	13
Růžičková M. and Hála M.: Potenciál RAB GTPas v rostlinných biotechnologiích	18

CONTENTS

Editorial	1
Biotech 2017	2
Sotio – Introduction of the Company	3
Pokorná D.: Chemical oxidation of sulfides as an integral part of the biological oxidation of sulphide	4
Buchtová P.: Cold-active enzymes and their biotechnological applications	5
Gharwalová L.: Content and distribution of phenolic compounds with antioxidant activity in plant <i>Vitis vinifera</i>	10
Lamparová L.: Plant MTI and its detection methods	13
Růžičková M., Hála M.: RAB GTPases as potential targets in plant biotechnologies	18

REDAKČNÍ RADA

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

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

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

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

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

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

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

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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

Novák Z.: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

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

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

BIOPROSPECT

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

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

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

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