
B I PROSPECT

Devatenáctý ročník
Číslo 2/2009

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

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

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

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

Redakční rada

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIOPROSPECT

19th Volume
No. 2/2009

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

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

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

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

For more information contact the editorial board or directly:

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

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 445 137

e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

Jak jste byli všichni informováni, 17. června 2009 se v posluchárně BIII VŠCHT v Praze uskutečnila naše valná hromada podle programu na Vám zasláných pozvánkách. Účastníci valné hromady si vyslechli informaci o CzechBio-národní asociaci biotechnologických společností ČR z.s.p.o. přednesenou jejím prezidentem p. Dr. Markem Mošou, PhD., následovaly zprávy o činnosti za uplynulé období, o plánovaných aktivitách, zpráva o hospodaření společnosti a zpráva revizní komise. Uvedené dokumenty byly schváleny bez připomínek. Valná hromada zvolila novou radu a schválila změny stanov, které již byly v zásadě navrženy na minulé valné hromadě. Tyto změny navrhuji nahradit volby na valné hromadě korespondenčním, resp. elektronickým („per rollam“) hlasováním, které je v současné době běžné u většiny společností. Korespondenční hlasování umožní se aktivně zúčastnit hlasování většímu počtu členů. Materiály běžně prezentované na valné hromadě budou zasílány členům v písemné formě předem. Tříletý termín pro obnovu Rady i revizní komise zůstává zachován.

Jako nejvhodnější, nejrychlejší a čas šetřící komunikační prostředek je v současné době využívána elektronická pošta, a proto prosíme všechny členy, pokud mají elektronickou (e-mailovou) adresu a zatím nám ji nesdělili, aby ji zaslali na sekretariát Biotechnologické společnosti Danka.Pokorna@vscht.cz. Na tuto adresu laskavě sdělte i změny Vašich adres. Uveďte také zda chcete být zařazeni do informačního servisu nebo chcete zasílat jen základní informace. Dalšími komunikačními prostředky zůstávají webové stránky (aktuality), Bioprospect (4x ročně) a pozemní pošta. Běžné poště se snažíme vyhnout vzhledem k náročnosti přípravy dopisů a především značným nákladům spojeným s vysokým poštovním.

Dne 28. dubna 2009 jsme spolu s FPBT VŠCHT v Praze, Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. a Ministerstvem životního prostředí uskutečnili již třetí seminář s názvem „Novinky v oblasti genetických modifikací“. Seminář byl velmi zajímavý z hlediska připraveného programu a měl vysokou návštěvnost. Rozšířené abstrakty přednášek byly publikovány v tištěné formě i na CD (ISBN 978-80-7080-712-5). Menší počet CD z tohoto i loňského semináře jsou pro zájemce ještě k dispozici. Čtvrtý seminář na toto téma plánujeme na květen 2010 a těšíme se na Vaše tematické návrhy. Uvažujeme též o prodloužení semináře na celý den a jeho rozšíření o posterovou sekci.

Připomínáme, že je ještě možné se přihlásit k účasti na **14th European Congress on Biotechnology, který se koná ve španělské Barceloně od 13. do 16. 9. 2009** pod heslem „Symbiosis“ of Science, Industry and Society. Je pořádán EFB (Evropskou biotechnologickou federací). Podrobnosti na www.ecb14.eu. Další podzimní akcí je **Biotechnika 2009 Hannover** (konference a výstava), která se koná 6. – 8. 10. 2009 v Hannoveru (viz www.biotechnica.de). Zde je možné vystavovat ve společném českém stánku. Informace zájemcům podá p. Ing. Eva Václavíková (tel.: 220 510 057 nebo 220 517 837, e-mail: info@hf-czechrepublic.com), resp. na www.hf-czech-republic.com a www.czechtrade.cz.

Jak jsme Vás již informovali začali jsme připravovat 5. Česko-švýcarské biotechnologické symposium, jehož konání je plánováno na 15 – 17. června 2011 v Praze. Se švýcarskými partnery byla dohodnuta následující 4 nosná témata:

Biotechnology in pharma:biologics and small molecular weight compounds

Biotechnology in nutrition

Biotransformations

Novel radical approaches in bioprocessing.

Žádáme Vás o spolupráci při návrhu zvaných řečníků, kteří by mohli reprezentovat naši zemi v uvedených tématech. Posterová sekce nebude tematicky omezena. Budou prezentována všechna biotechnologická témata a zvláště vítány budou prezentace biotechnologických institucí všeho druhu i prodejců biotechnologických zařízení. Podrobnější informace budou zveřejněny na podzim a počítáme i se spuštěním webových stránek pro toto symposium.

Kolegové v Olomouci připravují samostatné symposium, které bude časově navazovat. Bude se tedy konat ve dnech 20 a 21. června 2011 v Olomouci pod názvem Plant Biotechnology: Green for Good. Bližší informace poskytne p. prof. Ivo Frébort (ivo.frebort@upol.cz). I o tomto symposiu Vás budeme později podrobně informovat.

Těšíme se na další spolupráci a Vaše náměty

Váš

Jan Káš

BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST

Člen ČSVTS a Evropské federace biotechnologických společností (EFB)

Rada Biotechnologické společnosti a revizní komise zvolené na valné hromadě dne 17. 7. 2009

Rada:

Ing. Iva Pichová, CSc.	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha
Prof. RNDr. Jaroslav Drobník, DrSc.	Sdružení Biotrend
Doc. Ing. Martin Fusek, CSc.	Life Science Capital
Doc. Ing. Radovan Hynek, CSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha
RNDr. Milan Fránek, DrSc.	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno
Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha
Doc. Ing. Pavel Kotrba, CSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha
Ing. Dr. Jaromír Klančík	Farmaceutický poradce
RNDr. Pavel Kyslík, CSc.	Mikrobiologický ústav AV ČR
Ing. Martin Bláha	Lonza Biotec, s.r.o., Kouřim
Doc. Ing. Martin Mandl, CSc.	Přírodovědecká fakulta Masarykovy university, Brno
RNDr. Jiří Plachý, DrSc.	v důchodu (dříve VÚ antibiotik a biotransformací)
Ing. Dana Pokorná, CSc.	Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Praha
Ing. Leona Paulová, PhD.	Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT, Praha
Prof. Ing. Karel Melzoch, CSc.	Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT, Praha
Doc. Ing. Ivo Šafařík, DrSc.	Ústav ekologie krajiny AV ČR, České Budějovice
Doc. Ing. Jiří Sajdok, CSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha
Doc. RNDr. Lenka Tůmová, CSc.	Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové
Ing. Peter Šebo, CSc.	Biotechnologický ústav AV ČR
RNDr. Vladimír Vala	Ivax Pharmaceuticals, a.s.
RNDr. Tomáš Vaněk, CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, Praha
Prof. Ing. Karel Voříšek, CSc.	Česká zemědělská universita, Praha-Suchbát
Prof. Ing. Jana Zabranská, CSc.	Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Praha
RNDr. Ludmila Zajoncová, CSc.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc

Revizní komise :

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

ALGINÁTY – MOŽNOSTI JEJICH PŘÍPRAVY A APLIKACE

Ludmila Jiráková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Úvod

Algináty jsou přírodní polysacharidy, které nacházejí uplatnění v širokém spektru oblastí – přes textilní průmysl, potravinářství a kosmetiku až po průmysl farmaceutický. Poprvé byly získány v 19. století izolací z hnědých mořských řas a pro některé obory jsou stále hnědé řasy dostačujícím a levným zdrojem k získávání alginátů. Farmaceutický průmysl ovšem vyžaduje materiál vykazující konkrétní vlastnosti s definovaným složením. To však algináty izolované z mořských řas zajistit nedokáží. Řasy produkují algináty o nejednotné struktuře, a tak přišli na řadu bakterie, které jsou také schopny produkovat tento polysacharid přesně definovaného složení, a to výrazně levněji než to dokáží hnědé řasy.

Struktura a fyzikální vlastnosti

Algináty patří mezi nevětvené polysacharidy tvořené β -D-manuronovou a α -L-guluronovou kyselinou vázanými 1 $\rightarrow$ 4 vazbou (Obr. 1). Tyto kyseliny mohou tvořit řetězce o různém složení a struktuře. Produkce alginátů byla prokázána u dvou bakteriálních rodů – *Azotobacter* a *Pseudomonas*. Společným znakem mikrobiálních alginátů je acetylace některých zbytků kyseliny D-manuronové, což u alginátů hnědých řas nenalzáme. Algináty se skládají z bloků, které jsou tvořeny buď pouze kyselinou manuronovou (tzv. M-bloky) nebo pouze kyselinou guluronovou (G-bloky) (Obr. 1), a které jsou prokládány blokem střídajících se

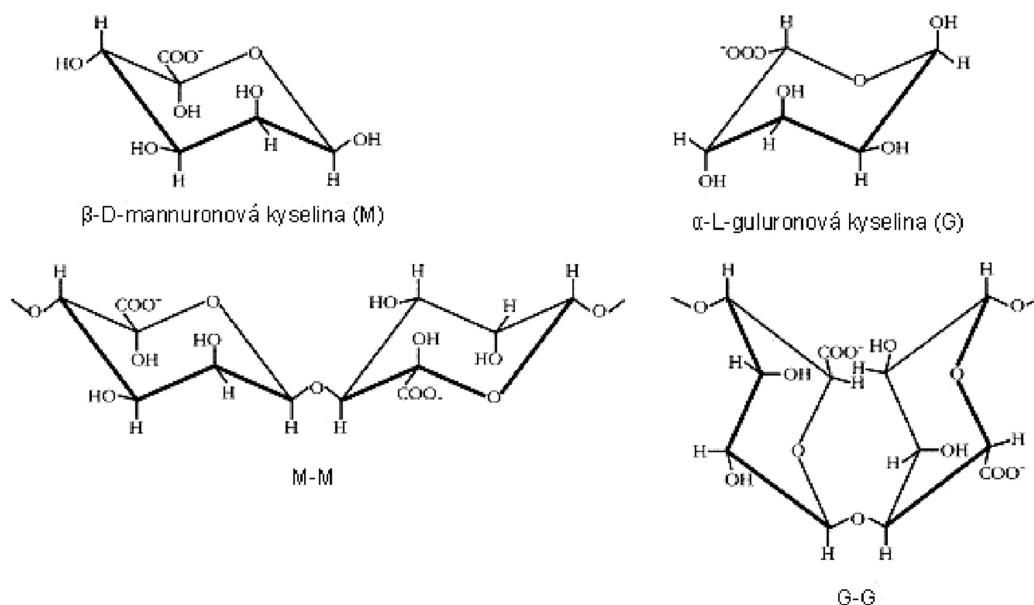
kyselin (MG-bloky). Zvláštností je, že G-blok se nachází pouze u *Azotobacter*, NMR analýzou alginátů *Pseudomonas* bylo prokázáno, že G-blok neobsahují.

Alginát je viskózní materiál, schopný tvořit gel. Tyto vlastnosti jsou dány blokovou strukturou a délkou řetězce alginátů. Algináty obsahující polyguluronát tvoří v přítomnosti vápníku rigidní gely. Dále bylo zjištěno, že pevnost gelů závisí na stupni zesílení mezi řetězci, typu prokřivujících iontů a délce bloků mezi spojeními. To činí algináty produkované *Pseudomonas* méně zajímavými pro jejich aplikaci jako gelujících prostředků. Nicméně hlavní vliv na viskozitu má molekulová hmotnost^{1,2}.

Hlavní geny nutné pro biosyntézu alginátů v bakteriích

Většina poznatků o biosyntéze alginátů pochází ze studia *Pseudomonas aeruginosa*. Tato bakterie se vyskytuje v plicích pacientů s cystickou fibrózou a z tohoto důvodu byla také zkoumána. Právě algináty hrají významnou, ale ne jedinou, úlohu jako faktor virulence během infekce.

Ačkoliv regulační geny, geny genotypového přesmyku a geny biosyntézy nejsou v bakteriích kolokalizované, všechny strukturální geny nutné pro biosyntézu alginátů jsou seskupené. Operon pro biosyntézu alginátu v *P. aeruginosa* zahrnuje 12 genů (*algD* – *algA*) pod společných alginátovým promotorem³. Geny *algA*



Obr. 1: Chemické struktury mannuronové (M) a guluronové (G) kyseliny a sekundární struktury M-bloků a G-bloků v řetězcích alginátů.

a *algD* kódují enzymy nutné pro syntézu prekurzoru – kyseliny manuronovou. Dále jsou zde umístěny geny kódující enzymy, které modifikují nascentní řetězce alginátu při průchodu periplazmou – acetylační proteiny (kódované geny *aglI*, *algJ* a *algF*), epimerizační enzym (*algG*) a degradační protein (*algC*) – a protein vnější membrány (*algE*). Dalšími geny tohoto operonu jsou *algK* a *algX* kódující periplazmatické proteiny, které pravděpodobně směřují algináty a chrání je před degradací. Poslední dva geny *alg8* a *alg44* jsou nejspíše nutné pro transfer GDP-manuronové kyseliny přes cytoplazmatickou membránu. Uvádí se, že Alg8 a Alg44 hrají významnou roli při polymerizaci jednotlivých alginátových řetězců⁴.

Biosyntéza alginátů u bakterií

Z důvodů uvedených již výše, popíšeme biosyntézu alginátů u *P. aeruginosa*. K biosyntéze prekurzoru alginátů, GDP-manuronové kyseliny, dochází v cytozolu bakteriální buňky. Zdroj uhlíku je oxidován na acetyl-CoA, který vstupuje do citrátového cyklu. Z něj vycházející oxalacetát je procesem glukoneogeneze postupně přeměněn na fruktosa-6-fosfát a ten je dalšími kroky konvertován až na GDP-manózu. Zajímavým proteinem účastnícím se této přeměny je bifunkční enzym fosfomanóza-izomeráza (PMI)/guanosin-difosfomanóza-pyrofosforyláza (GMP), který je kódován genem *algA*. Reakce katalyzovaná PMI (přeměna fruktóza-6-fosfátu na manóza-6-fosfát) je klíčovým bodem pro „utrnutí“ fruktóza-6-fosfátu (molekuly, která je substrátem v mnoha dalších bakteriálních metabolických drahách) na tvorbu alginátů. Fosfomanomutázou je katalyzována konverze manóza-6-fosfátu na manóza-1-fosfát a GMP. Enzym AlgA konvertuje manózu-1-fosfát na GDP-manózu za současné hydrolýzy GTP. GDP-manóza je pak oxidována na GDP-manuronovou kyselinu a ta je poté přenesena přes cytoplazmatickou membránu a polymerizována na polymanuronát. Tato reakce je katalyzována enzymovým komplexem vykazující polymerázovou aktivitu zakotveným v cytoplazmatické membráně. V další fázi jsou řetězce modifikovány.

Modifikační enzymy jsou nejlépe prostudované proteiny v biosyntéze alginátů, což by mohlo pomoci při cílené syntéze alginátů, které vykazují žádané vlastnosti. Materiálové vlastnosti závisí převážně na struktuře a složení alginátu, tedy tvorba gelu, vazba vody a imunogenní vlastnosti polymeru jsou určeny relativním množstvím a sekvenční distribucí manuronových a guluronových kyselinových zbytků. Modifikace bakteriálních alginátů se odehrává téměř výhradně v periplasmě. Transacetylace na hydroxylových skupinách na C2 a C3 zbytků kyseliny manuronové vede k ochraně těchto zbytků před epimerizací na guluronovou kyselinu a před degradací alginát lyázou. Tato periplazmatická acetylace nepřímo kontroluje epimerizaci a degradaci alginátového polymeru. Čím vyšší je stupeň acetylace, tím více vody je alginát schopen vázat. V posledním kroku jsou algináty exportovány přes póry tvořené proteinem AlgE⁴.

Izolace alginátů z hnědých řas

Algináty jsou přítomné v buněčných stěnách hnědých řas ve formě draselných, hořečnatých a sodných solí kyseliny alginové. Při extrakci alginátů jsou řasy nasekány na kousíčky a rozetřeny s horkým alkalickým roztokem (obvykle to bývá roztok uhličitanu sodného). Během dvou hodin se algináty rozpustí na řídkou kaši, která obsahuje také nerozpuštěné složky (hlavně celulózu), které musí být odstraněny. Filtrace se provádí po naředění velkým množstvím vody. Cílem extrakčního procesu je získat suchý alginát sodný ve formě prášku, který je rozpustný ve vodě. Principem extrakce je tedy přeměna všech alginátových solí na soli sodné a následné odstranění zbytků řas filtrací. Rozpuštěný alginát se poté musí regenerovat – dehydratovat. Toho se dosahuje dvěma různými postupy.

Kyselá metoda je zahájena přidáním kyseliny, která reaguje se solemi alginátu za tvorby kyseliny alginové. Ta není rozpustná ve vodě a proto může být flotací separována. Alginová kyselina se v této fázi nachází ve formě gelu. Poté je přidán alkohol a následně uhličitán sodný, který konvertuje kyselinu alginovou na alginát sodný. Ten není ve směsi alkoholu a vody rozpustný, je z roztoku separován, usušen a namlet na částice vhodné velikosti.

Druhým způsobem získání regenerovaného alginátu sodného je tzv. metoda alginátu vápenatého. Chlorid vápenatý reaguje s alginátem za vzniku alginátu vápenatého, který po opatrném zamíchání reakčního roztoku vytvoří vlákna nerozpustná ve vodě. Ta jsou následně jednoduše separována a suspendována ve vodě. Přidáním kyseliny je alginát přeměněn na kyselinu alginovou ve formě vláken, která jsou lisována. Tím se získá relativně suchá hmota, která se umístí do speciální planetové míchačky s alkoholem a postupně je přidáván uhličitán sodný, dokud není všechna kyselina konvertována na alginát sodný. Ten vytvoří peletu, která je následně usušena a namleta. Nevýhodou této metody ve srovnání s „kyselou metodou“ je jeden krok navíc, ovšem tato nevýhoda je kompenzována tím, že není třeba přidávat alkohol, který je poměrně drahý⁵.

Využití alginátů v praxi

Všechny algináty používané pro komerční účely jsou v této době vyráběny z hnědých řas. Jejich cena není příliš vysoká a zdá se, že nebude jednoduché zavést výrobu alginátů produkovaných bakteriemi ve stejném cenovém rozmezí. Nicméně existují minimálně dva důvody, které umožní bakteriálním alginátům stát se komerčními produkty. První souvisí se zasahováním do životního prostředí těžbou hnědých mořských řas, druhým důvodem je kvalita finálního alginátového produktu.

Jak již bylo řečeno v úvodu, algináty jsou používány v mnoha oblastech. Přibližně polovina komerčně produkovaných alginátů je zpracovávána v potravinářském průmyslu. Zahušťovacích vlastností alginátů se využívá například v omáčkách, sirupech a polevách na zmrzliny. Přidáním alginátů do náplní koláčů se snižuje navlhnu-

tí těsta. Algináty přidané do polev jim umožňují vytvořit hladkou vrstvu, která se nelepí. V majonézách a salátových dresincích udržují emulzi a zabraňují tak jejímu rozdělení na olejovou a vodnou fázi. Mimo jiné také zlepšují konzistenci jogurtů. V některých ovocných nápojích, do kterých se přidává dužnina, ji algináty pomáhají udržet v suspenzi a zabraňují tak usedání dužniny na dně. Stejným způsobem udržují také kakao v suspenzi v čokoládových nápojích. Malé množství alginátu pomáhá zahustit a stabilizovat šlehačku.

Kyselina alginová ve formě prášku váže vodu, čehož se využívá v dietních potravinách jako jsou sušenky. V žaludku nabobtná a vyvolává pocit nasycení⁵. Zajímavou kuriozitou je použití alginátů k výrobě tzv. „ovocného kaviáru“, se kterou přišel francouzský šéfkuchař Ferran Adria⁶. Algináty mají také další využití, která nesouvisí s jejich viskozitou nebo gelujícími vlastnostmi. Používají se jako stabilizátory ve zmrzlínách, kde redukuje tvorbu ledových krystalků během zamrazování. Malé množství alginátů se přidává i do piva – zde pomáhají vytvořit pěnu, která déle vydrží.

V textilním průmyslu se algináty používají při tištění na látky, přidávají se jako zahušťovadlo do barev. Z hotových potištěných látek se poté snadno odmyjí. V papírenském průmyslu jsou algináty používány pro dosažení hladkého spojitého povrchu papíru⁵.

Vedle tradiční aplikace alginátů, která je uvedena výše, se stále zvyšuje jejich využití v lékařském odvětví. Alginát sodný a draselný tvoří v roztoku chloridu draselného vlákna, která jsou silná jak ve vlhkém, tak i v suchém stavu. Tento materiál je používán k obvazování ran a popálenin. Vykazují dobré hojivé a hemostatické vlastnosti, díky kterým se obvaz

na poškozenou tkáň nepřilepí a umožňují obvaz sundat i z rozsáhlých ran a popálenin. Dále jsou algináty používány ke kontrolovanému uvolňování léků. Aktivní látky zachycené v kuličkách alginátu sodného jsou pomalu uvolňovány. Poslední dobou se pro kontrolované uvolňování léků aplikovaných orálně používají alginátové mikrokuličky potažené chitosinem pro zvýšení mechanické odolnosti. Kyselina alginová je používána ve výrobcích jako je Gaviscon – tablety, které pomáhají proti pálení žáhy a špatnému trávení. Kyselina v žaludku nabobtná, udržuje obsah žaludku na správném místě a tím redukuje možnost refluxu.

V kosmetickém průmyslu jsou algináty přidávány do masek, příkladem je mořská alginátová maska proti rozšířeným cévkám BIO CPK nebo mořská alginátová maska zklidňující, proti zčervenání pleti, oboje od firmy SynCare s.r.o.⁷.

Mnoho komerčních chemických syntéz a konverzí je dosahováno použitím enzymů nebo celých buněk imobilizovaných v alginátu. Jsou to například konverze glukózy na fruktózu, produkce L-aminokyselin, syntéza nových penicilinových antibiotik nebo použití celých buněk při konverzi škrobu na etanol.

Závěr

Vývoj metod molekulární genetiky pro manipulaci s bakteriálními geny a genomy nabízí hlubší pohled na molekulární mechanismy mikrobiální biosyntézy alginátů. Ačkoliv současné komerční využití alginátů závisí na jejich produkci hnědými řasami, porozumění jednotlivým krokům bakteriální biosyntézy alginátů umožní produkci alginátů tvořených „na míru“ konkrétnímu využití.

Literatura

1. Sabra W., Zeng A.-P., Deckwer W.-D.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56,315 (2001).
2. Remminghorst U., Rehm B. H. A.: *Biotechnol. Lett.* 28,1701, (2006).
3. Chitnis Ch. E., Ohman D. E.: *Mol. Microbiol.* 8, 583, (1993).
4. Rehm B. H. A., Valla S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 281, (1997).
5. McHugh D. J.: A guide to the seaweed industry: *FAO Fisheries Technical Paper* 441 pp.39-49, (2003).
6. Obruča S.: ALGINÁT – organické zlato. *BIOTech* 4, A1, (2008).
7. http://shop.iportal.info/index.php?main_page=product_info&products_id=15 (28.1.2009)

Souhrn

Algináty jsou přírodní polysacharidy produkované hnědými mořskými řasami, které jsou jejich hlavním zdrojem, a také některými bakteriemi. V článku je popsána struktura, vlastnosti a metody získávání alginátů z hnědých řas, a jejich biosyntéza u *Pseudomonas aeruginosa*. V neposlední řadě jsou zde uvedeny možnosti využití alginátů v lékařství a v potravinářském, kosmetickém a textilním průmyslu.

klíčová slova: algináty; příprava alginátů; aplikace alginátů

Abstract

Jiráková L.: Alginates – Ways of preparation and application

Alginates are natural polysaccharides produced by some bacteria and brown seaweeds, which are its major source. In this article the structure, properties, and methods of obtaining of alginates from seaweeds are described, as well as its biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. The application of alginates in alimentation, cosmetic, medicine and textile industry is also presented.

key words: alginates; alginate preparation; alginate application

BIOLÉČIVA

Šárka Techlovská

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Biologická léčiva začínají tvořit podstatnou část moderního farmaceutického průmyslu a ačkoliv v nejbližší době budou zaujímat až celého farmaceutického trhu¹, podvědomí široké veřejnosti v České republice je o těchto nových lécích velmi malé. V tomto článku se pokusím přehledně a srozumitelně nastínit celou komplikovanou tematiku bioléciv. Mým cílem je aby si čtenář mohl utvořit ucelený názor na tuto aktuální tematiku a mohl odhadnout, co může v nejbližších letech od tohoto progresivně se vyvíjejícího odvětví očekávat. Bioléčiva jsou analoga přírodních peptidů a proteinů. Jsou vyráběna za pomoci nejmodernějších poznatků v mnoha vědeckých odvětvích genetiky, genového a tkáňového inženýrství, biochemie, molekulární biologie, imunologie, farmakologie a fyziologie. Některá bioléciva (zvláště velké molekuly) vznikají na pomezí lidského vědění což vnáší do této tematiky lehkou kontroverzi a z ní plynoucí problémy.

Prvním přírodním proteinem, který byl využit pro terapeutické účely, byl insulin pro substituční terapii diabetes mellitus I. typu. Účinky tohoto malého peptidového hormonu byly prokázány již v roce 1922 kanadským vědcem Frederickem G. Bantingem. Pro terapeutické účely se ukázal být nejvhodnější insulin izolovaný z hovězích a prasečích pankreatů. Po něm následovali ještě některé biologicky aktivní proteiny, které našly terapeutické využití, ovšem vždy se jednalo o izoláty z materiálů živočišného původu. Až koncem 20. století rozvoj biologicko-chemických vědeckých disciplín umožnil změnu přístupů a zefektivnil přístup k jinak těžko dosažitelným zdrojům terapeutických proteinů. V posledních dvaceti letech dochází spolu s rozmachem biotechnologického průmyslu k dynamickému nárůstu produkce léčiv na proteinové úrovni. Dnes je již na trhu široké spektrum přírodních a modifikovaných proteinů. V současné době je na farmaceutickém trhu 165 schválených bioléciv, a odhaduje se, že 2500 dalších je ve fázi výzkumu a 1600 v preklinických a klinických testech³. Bioléčiva byla podávána již 50 miliónům pacientů s pozitivními výsledky⁴. Některá moderní bioléciva jsou jedinou alternativou kauzální léčby některých onemocnění, která do té doby byla považována za neléčitelná (non-Hodgkin lymfom, Fabryho choroba, neplodnost atd.). Mezi již rozšířeně používaná bioléciva patří rozličné peptidy (*rekombinatní insulin* – diabetes mellitus), proteiny (*srážecí faktor VIII* – hemofilie, *interferon* – roztroušená skleróza), rozmanité proteiny protilátek (*protilátka proti receptoru CD20* – non-Hodgkin lymfom) a vakcíny (*proteinový konjugát antigenů* – proti meningokoku a hepatitidě B, *rekombinatní vakcína* – proti hepatitidě B, *inaktivovaná vakcína* – proti

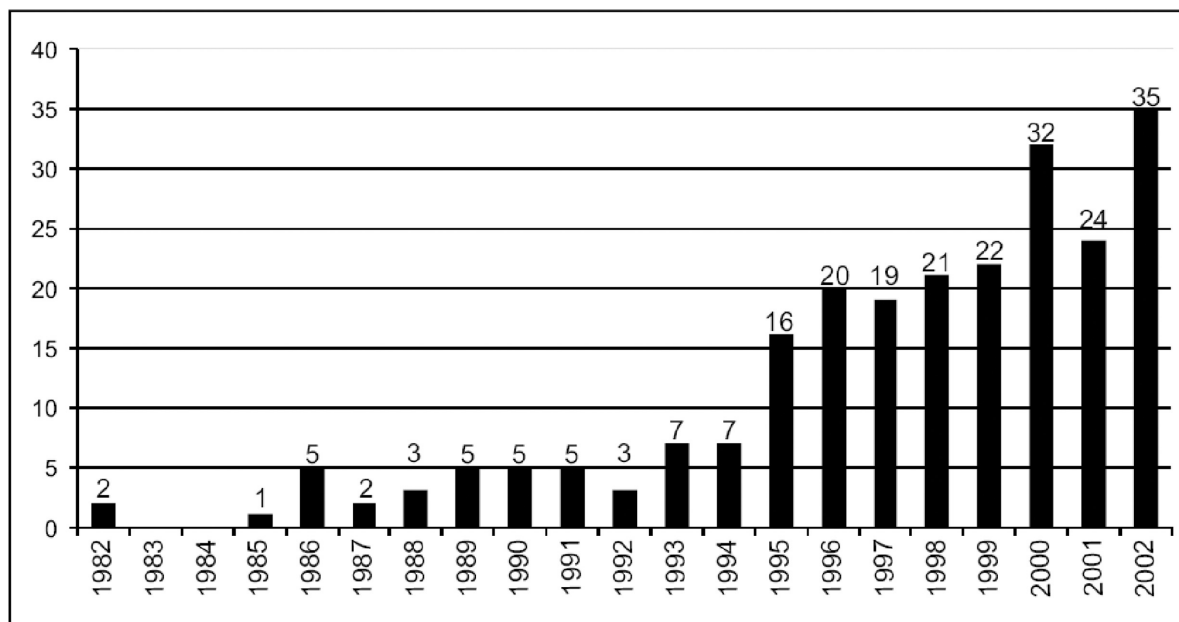
hepatitidě A)⁵. Patenty některých těchto léčiv vypršely nebo vyprší v blízké budoucnosti, tudíž se očekává brzké spuštění výroby „generických“ verzí bioléciv. Otázkou zůstává, zda je možné (zvláště u složitějších proteinových struktur) striktně zachovat dané strukturní vlastnosti původního medikamentu. Jedním z hlavních důvodů vpuštění generických verzí léků na trh je vznik konkurenčního prostředí, které vyústí ve snížení ceny produktu a tím umožní vyšší dostupnost pro spotřebitele. U klasických nízkomolekulárních léků jsou generická analoga identickými sloučeninami s originálním léčivem, mají stejné kvantitativní a kvalitativní složení z hlediska aktivní substance, která je v generiku obsažena ve stejné chemicko-fyzikální formě⁶. V důsledku této esenciální podobnosti se mohou výrobci generik odkazovat na klinické testy, kterými prošlo původní léčivo a tím se snížit náklady na vývoj a výrobu spojenou s testováním. Podmiňujícím faktorem je kvalitní identifikovatelnost molekuly, která není u nízkomolekulárních substancí (např. kyselina acetylsalicylová) obtížná. Přesně definovat je lze standardními analytickými metodami, nejčastěji na bázi chromatografie. Pro malé peptidové struktury jsou dnes rovněž metody, které umožňují přesné stanovení strukturních charakteristik, ovšem u velkých proteinů je přesné určení někdy na hranici poznatků moderní analytické chemie¹⁵. Výrobci „generických“ verzí bioléciv proto stojí před velkým problémem, jak zachovat přesnou konfiguraci a konformaci terapeutického proteinu a tím i jeho účinek a hlavně bezpečnost. Je známo, že se vlastnosti bioléciv (ačkoliv se jedná o stejný protein) mohou velmi lišit výrobce od výrobce⁵. „Generické“ verze bioléciv se tedy pokoušejí kopírovat existující originální lék, což vzhledem k velmi složitému výrobnímu procesu, nemusí nutně znamenat, že výsledný produkt bude s originálním identický². Zde platí, že když dva dělají totéž, nemusí to ve svém důsledku znamenat totéž a u tak náchylných a složitých struktur jakými jsou proteiny to platí dvojnásob.

Farmaceutický trh v Evropě zaštituje Evropský Úřad pro schvalování léčebných produktů EMEA (European Agency for Evaluation of Medical Products) jehož obdobou ve Spojených státech amerických je US The Food and Drug Administration, FDA⁶. Jim připadá schvalování a registrace nových produktů farmaceutického průmyslu a legislativa s tím spojená. Po velkém rozmachu nového odvětví bylo rovněž nutné určit a sjednotit názvy nových produktů, pro nichž vzniklo nepřehledné množství označení, přičemž s některými se můžeme chybně setkávat dodnes, např. „biogeneric“, „second entry biological“, „non-patented biological produkt“ či „multisource produkt“. Na to reagovala EMEA, která

pro generika původních biologických léků schválila označení „biosimilars“, v zámoří FDA upřednostnila termín „follow-on biologics“⁶. Česká terminologie trochu pokulhává a přesné hranice pro označení nejsou dosud určeny. Pro originální léčiva se v této oblasti vžilo označení biologická léčiva neboli biol léčiva, pro jejich „generické“ formy ale zatím žádný český ekvivalent není.}

podmínek může dojít k vzniku velmi odlišných proteinů (posttranslační modifikace, mutace, pozměněná 3D struktura, vznik nežádoucího epitopu, odlišná isoforma), které již nebudou mít terapeutický efekt, v horším případě mohou způsobit zdravotní komplikace užívajícím pacientům (vznik imunitní odpovědi).

Značná citlivost biologických léčiv na změny externích vlivů podmiňuje i způsob užívání. Zatímco klasické



Obr. 1: Počet nově povolených biotechnologických léčiv nebo nových indikací biotechnologických léčiv v USA 1982-2002¹⁴.

Biologická léčiva jsou na rozdíl od klasických nízkomolekulárních léků peptidové nebo proteinové povahy. Nejen konečná forma (protein), ale rovněž výrobní proces je „biologický“. Klasická léčiva jsou získávána chemickými syntézami, biol léčiva jsou produkty živých buněk. Proto ve výrobním procesu biol léčiv hrají významnou roli dva faktory nejen ten lidský, ale i buněčný, který člověk může jen limitovaně ovlivňovat oproti dobře kontrolovatelným syntetickým postupům. Produkce prostřednictvím živých buněk je komplikovaná a velmi náročná, buňky jako živý organismus velmi citlivě reagují na jakékoliv externí podmínky a změny. Úspěšnost a reprodukovatelnost produkce je velmi závislá na udržení konstantního prostředí (pH, teploty, složení média) během celého výrobního procesu. Tato skutečnost zatěžuje výrobní náklady. Proces, který je jednou otestován již nesmí být měněn, tudíž není možné snadno optimalizovat jeho charakteristiky (levnější růstová média, jiné buňky), které by vedly ke snížení výrobní ceny a dosažení vyšších zisků¹⁶. Další aspekt promítající se do konečné ceny biol léčiv je obtížná purifikace. V porovnání s výstupy ze syntetické výroby léčiv je kroků k získávání a přečištění produktu z buněk větší množství a komplikuje je rovněž skutečnost, že proteinové struktury jsou (stejně jako buňky) náchylné k chemicko-fyzikálním změnám. Je nutné mít na paměti, že jediné nativní, neporušená konformace zajišťuje kýžený efekt a bezpečnost produktu. Dojde-li k nedodržení přesných výrobních

nízkomolekulární léky jsou z převážné většiny aplikovány perorálně, jedinou osvědčenou metodou aplikace biol léčiv je injekční nebo subkutánní. Perorální podání není možné, jelikož by docházelo k degradačním reakcím v trávicím traktu. U rekombinantního insulinu byly zaznamenány pokusy o neinvazivní inhalační aplikaci, které ovšem selhaly na nepřesnostech, jež jsou způsobeny individualitami jednotlivých užívajících pacientů (rozdílná prokrvenost nosní sliznice, nedůsledná aplikace atd.). Samotná aplikační dávka se připravuje těsně před podáním pacientovi. Biol léčiva jsou distribuována v lyofilizované formě spolu s vhodným rozpouštědlem a injekční stříkačkou či subkutánní jehlou⁶. Nevhodné zacházení s biol léčivem, nevhodná aplikace mohou vést rovněž k nežádoucím změnám terapeutických proteinů, je nutné držet se podmínek garantovaných výrobcem.

Ačkoliv by se mohlo zdát, že v tomto odstavci byla biol léčiva velice striktně vymezena od nízkomolekulárních léčiv, bylo to pro pouhé orientační srovnání. Účelem biol léčiv není vytlačit nízkomolekulární léčiva, naopak vykrývat oblasti medicíny, ve kterých užívání klasických léčiv nepomáhá či není možné. Obecnou snahou zůstává nalezení synergie, která se již v některých případech potvrdila jako velice efektivní (*monoklonální protilátky nesoucí nízkomolekulární léčiva nebo toxiny – cílené terapie*)¹⁴.

Modifikace rekombinantních proteinů

V některých specifických případech je řízená změna struktury bioléčiva žádaná. Polovinu bioléčiv dnešní doby tvoří proteiny, které byly oproti přírodním formám nějakým způsobem upraveny. Úpravy mohou spočívat ve změnách posttranslačních modifikací, až po substituci či delecii jedné nebo i více aminokyselin v řetězci (rekombinantní interferon α). Účelem těchto modifikací může být snaha o optimalizaci terapeutických vlastností (zvýšení stability, změna rychlosti eliminace z organismu, zpomalení nástupu, snížení imunogenicity, ochrana před proteolytickou degradací atd.).

Částečného pozměnění konfigurace bylo využito u rekombinantních analogů insulinu. Důsledkem úpravy C-koncové sekvence peptidového řetězce bylo ovlivnění rychlosti nástupu těchto modifikovaných insulinů a vznikly formy tzv. zrychleného insulinu či inzulinu s prodlouženým uvolňováním¹⁴. U rekombinantního plazminogenu, jež indukuje štěpení fibrinu, byla dokonce odstraněna celá doména zodpovídající za rychlou eliminaci plazminogenu v organismu a tím se značně prodloužila doba působení. Další obecně aplikovatelnou metodou prodloužení doby působení je modifikace rekombinantních proteinů pegylací, která spočívá v navázání polymerní matrice složené z polyethylenglykolu na cílový protein. Příkladem pegylovaných bioléčiv jsou terapeutické interferony nebo: Velký význam pro terapeutické vlastnosti má kvantita i kvalita glykosylace proteinů. V současné době se využívá následujících tří přístupů k ovlivnění glykosylace: 1./ úprava glykosylačních míst (zavedení nového glykosylačního místa); 2./ enzymatická modifikace *in vitro*; 3./ genové manipulace s buněčným glykosylačním mechanismem⁸.

Na proteinové molekuly mohou být navázána klasická nízkomolekulární léčiva nebo toxiny. Konjugáty monoklonálních protilátek s nízkomolekulárními toxiny jsou využívány u pacientů s nemocí ohrožujícími život jakými jsou např. myeloidní leukémie, nebo non-Hodgkinův lymfom, u kterého je léčivo (protilátka proti povrchovým antigenům rakovinných buněk) značeno radioaktivním jódem I¹³¹.

Na trhu se rovněž objevily monoklonální protilátky proti receptoru CD20 konjugované s chelatační skupinou, která velmi specificky váže In¹¹¹ nebo Y⁹⁰, přičemž receptory CD20 jsou velmi silně kumulovány na povrchu B-buněk non-Hodgkinova lymfomu¹⁴. Tyto speciálně modifikované protilátky tak ničí nežádoucí B-buňky β -zářením. Některé rekombinantní terapeutické proteiny, myšleno monoklonální protilátky, jsou značené fotosenzibilátory. To umožňuje velmi přesnou diagnostiku některých onemocnění (zejména nádorů).

Bezpečnost použití

Původní terapeuticky využívané proteiny, které jsou izolovány z přírodních zdrojů (krev, slinivka) v sobě nesou řadu potencionálních rizikových faktorů pro pacienty a to především nebezpečí přenosu virových

onemocnění. Rozvoj rekombinantní produkce bioléčiv proto byl motivován, kromě jiného (efektivita výroby, omezenost zdrojů), zvýšením bezpečnosti terapií při použití bílkovin. Typickým příkladem byl přenos infekce HIV u pacientů trpících hemofilií při používání koagulačních faktorů izolovaných z krve dárců, kteří byli nositeli HIV. U zvířecích zdrojů existuje zase nebezpečí přenosu ještě neznámých onemocnění a tuto obavu velmi silně podporují informace o souvislosti mezi nemocí šílených krav a Creutzfeldt-Jakobovou chorobou.

I přes velký přínos rekombinantních výrob existují stále určitá možná rizika spojená s užíváním bioléčiv. Jedním z hlavních problémů moderních rekombinantních bioléčiv je jejich potencionální imunogenita, přičemž faktorů, které mohou ovlivnit imunogenní potenciál je mnoho. Rozdělujeme je na faktory spřažené s léčbou a faktory spřažené s výrobním procesem. Vezmeme-li v potaz, že daný terapeutický protein byl schválen jako léčivo s nízkou imunogenicitou, potom objeví-li se nežádoucí imunitní reakce může být způsobena mnoha faktory – nepatrná změna výrobních podmínek, nežádoucí nakládání, možné kontaminanty či s procesem spřažené nečistoty, nevhodné skladování nebo faktory spojenými s užitím léku pacientem – způsob podání, příprava finální dávky, doba skladování atd. Příkladem vzniku imunogenicity terapeutického proteinu, jež prošel imunologickými testy je případ mezi lety 1998-2003, kdy se u pacientů, kterým byl subkutánně podáván erythropoetin, objevovala nežádoucí imunitní reakce, což bylo následně připsáno použití předpřipravených injekčních stříkaček⁶, které měly v přímém kontaktu s bioléčivem obnažený pryžový píst. Imunitní odezva může být rovněž způsobena doprovodnými nemocemi pacienta (infekční onemocnění-senzibilace imunitního systému) nebo vrozenými vadami.

Expresní systémy

Většina používaných expresních systémů je založena na jednom typu prokaryotních *Escherichia coli* a několika typech eukaryotních buněk : kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, buňky CHO (Chinese hamster ovary; buňky izolované z vaječníků samičky křečka), BHK (Baby hamster kidney; ledvinové křeččí buňky) a NCI (Namalwa cell line; lidské lymfoblastoidní buňky)¹⁶. Vedle těchto hlavních zdrojů se hledají další organizmy vhodné pro výrobu bioléčiv jakým jsou např. transgenní zvířata, transgenní rostliny, kvasinky (*Pichia pastoris*) atd.

Typ expresního systému udává mnoho vlastností výsledného produktu. Ačkoliv je řada terapeuticky aktivních proteinů posttranslačně modifikována (N-glykosylované), pro produkci velkého množství biologických léčiv se používají bakteriální buněčné linie. Nejčastěji využívaným bakteriálním expresním systémem je *Escherichia coli*. Výhodami bakteriálního systému je nízká cena (levnější živná média), vysoká výtěžnost požadovaného produktu, rychlý růst buněk. Obecné metody produkce v těchto buňkách zahrnují přímou intracelulární expresi, sekreci proteinu

do periplazmatického prostoru a expresi fúzních proteinů zajišťujících lokalizaci produktu buď v cytoplasmě, nebo v membráně hostitelských buněk¹². Nevýhodou, kromě deficiencie posttranslačních modifikací, je produkce proteinů ve formě inkluzních tělísek, což velmi komplikuje purifikační kroky a především správné sbalení daného proteinu. I přesto se tímto způsobem vyrábí řada originálních bioléciv a biosimilars např. lidský rekombinantní insulin a jeho analogy, lidský růstový hormon, interferony, parathyroidní hormon a fragmenty protilátek.

Eukaryotní expresní systémy umožňují efektivní posttranslační modifikace a zaručují správné sbalení nativní konformace. Problémem zůstává, že s odlišnostmi buněčného zdroje se odlišují i posttranslační modifikace. Některé druhy buněk obsahují jiné sacharidové jednotky než jaké nacházíme v savcích, natož lidských buňkách, což může způsobovat nežádoucí imunogenicitu terapeutických proteinů. Jako eukaryotní expresní systémy se využívají převážně savčí buňky a kvasinkové buňky. Hmyzí buňky, transgenní zvířata a rostlinné produkční systémy jsou využívány jen okrajově nebo je jejich potenciální využití ve stádiích výzkumu.

Ačkoliv je produkce v savcích buňkách finančně velice náročná, mnoho bioléciv jsou jejich produkty. Jako savčí expresní linie se hojně využívají linie Chinese Hamster Ovary (CHO), Baby Hamster Kidney (BHK), v některých výroбах se uplatňují myší buňky NS0 a Sp2/0 a Namalwa cell line (NCL)¹⁰. Tyto buňky jsou taxonomicky příbuznější lidským, jejich posttranslační modifikace zahrnují efektivní glykosylaci vznikajících proteinů, navíc v CHO probíhá modifikace proteinů zbytkem kyseliny sialové, což je ovšem možné eliminovat následnou úpravou proteinů *in vitro*. Značná finanční náročnost těchto expresních linií je dána vysokými nároky na sterilitu, enormní spotřebou sterilního plastového materiálu a vysokými cenami složek kultivačních médií.

Generační doba savcích buněk je mnohonásobně delší než je tomu u bakterií a jiných potenciálních kontaminantů. Růst kontaminace podporuje složení velmi bohatých médií. Rovněž mohou savčí buňky přenášet infekční částice, jako jsou viry nebo priony. I přes všechna negativa je v CHO produkována řada terapeutických proteinů, například srážecí faktor VIII a srážecí faktor IX pro léčbu hemofilie, erythropoetin pro anemické pacienty, interferon pro léčbu roztroušené sklerózy, tkáňový aktivátor plasminogenu pro léčbu trombolýzy, β -glukocerebrosidasa pro léčbu Gaucherovy choroby a řada monoklonálních protilátek pro léčbu rakoviny prsu, tlustého střeva, lymfatického systému a různých autoimunitních onemocnění. BHK buňky se zase v mnoha výrobních procesech uplatnily jako efektivní expresní systémy krevních koagulačních faktorů VII, VIII, IX. V Lidských lymfoblastoidních buňkách (Namalwa cell line) se v některých výroбах exprimují interferony.

Hlavním rozdílem mezi použitím eukaryotních a prokaryotních buněk z hlediska provozního je cena produkce. Použití především živočišných buněk znamená výrazné navýšení ceny výroby, které vyplývá ze složitějších živných médií a z citlivosti živočišných buněk v porovnání například s *E. coli*.

Kvasinkové expresní systémy zastupuje kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* popř. *Pichia pastoris*. Jedná se o rychle rostoucí, vysoce produkující buňky, jejichž živná média nejsou tolik finančně náročná. Produkované proteiny jsou lokalizovány intracelulárně, nebo jsou sekretovány do média, což velice usnadňuje purifikaci⁹. Nevýhodou je odlišná glykosylace proteinů a přítomnost mannosy. U kvasinek *Pichia pastoris* bylo docíleno eliminace syntézy nežádoucích cukrů během glykosylace a rovněž bylo dokázáno, že kvasinky je možné upravit tak, aby jejich glykosylace byly velmi podobné glykosylacím lidských proteinů⁹. Ovšem komerční využití kvasinky *Pichia pastoris* je zatím

Tab. I: Příklady komercializovaných bioléciv a jejich expresních systémů¹³.

Insulin	E.coli	Krevní koagulační faktory VII,VIII,IX	BHK buňky
Interferon alfa, beta, gama	E.coli		CHO buňky
Interleukin 2	E.coli	Erythropoetin	CHO buňky
Plazminogen aktivátor	E.coli	FSH	CHO buňky
Tumor Necrosis faktor (TNF)	E.coli	Luteinizační hormon (LH)	CHO buňky
Růstový hormon	E.coli	Gonadotropin	CHO buňky
Kalcitonin	E.coli	Interferon beta	CHO buňky
		Tkáňový aktivátor plazminogenu	CHO buňky
Glukagon	S.cerevisiae	Glukocerebrosidáza	CHO buňky
Eutropin	S.cerevisiae	Interleukin 11-agiosta	ROMI 8866
Růstový faktor	S.cerevisiae		(lidská buněčná linie)
Vakcína proti Hepatitidě B	S.cerevisiae		
Vakcína proti Hepatitidě B	P.pastoris		
Insulin	P.pastoris		
Streptokináza	P.pastoris		

Firmy: Novo-Nordisk, Roche, Janssen, Amgen, Boeringer, Serono, Genzyme, Lilly, Novartis, Avensis, Chiron, Genentech, Wyeth, GSK.

omezené. *Saccharomyces cerevisiae* je nejpoužívanějším kvasinkovým expresním systémem, který je využíván pro produkci lidského insulinu, růstového hormonu a faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů, využívaného při chemoterapiích. V modifikovaných kmenech *Pichia pastoris* se produkuje například insulin, vakcína proti Hepatitidě B.

Hmyzí buňky mají podobné výhody jako kvasinkové. Jejich značnou výhodou je velikost bakulovirového genomu (~130kbp) jehož prostřednictvím se do hmyzích buněk vnáší DNA. To umožňuje vložení delšího úseku DNA, kódující cílený terapeutický protein. Přičemž si hmyzí buňky zachovávají veškeré výhody kvasničných buněk. Nevýhodami je opět rozdílný typ glykosylace, která rovněž pramení z přítomnosti nehumánních sacharidů respektive α -1,3-fukosy, jež může zvýšit imunogenicitu produktu. Hmyzí buňky nejsou vhodné pro expresi glykoproteinů u nichž je požadována dlouhá doba přítomnosti v séru, jelikož N-glykany hmyzích buněk jsou v lidském organismu rychle eliminovány. Nicméně tyto expresní linie se používají převážně na výrobu některých veterinárních vakcín.

Produkce terapeutických proteinů v transgenních zvířatech je zatím ve fázích vývoje, tudíž bez velkého komerčního využití. Expres některých glykoproteinů již byla v transgenních zvířatech testována např. v roce 2002 byla publikována studie monitorující přípravu transgenní myši, která produkovala lidské monoklonální protilátky¹¹ nebo roku 2005 bylo docíleno produkce monoklonálních protilátek v kuřeti a jejich sekrece do vajec.

Transgenní rostliny jsou další alternativou expresních systémů dnes velmi studovanou, ale rovněž jako v předchozím případě, komerčně nevyužívanou. Hlavní limitací jejich využití je produkce nehumánních struktur. V současné době se pracuje na vývoji transgenních rostlin s potlačenou produkcí nehumánních cukrů a s produkcí jinak deficientního sacharidu galaktosy a kyseliny sialové.

Terapeutické využití

Některá moderní bioléčiva přinášejí dramatickou změnu ve způsobu léčení, kdy se začínají léčit příčiny choroby a nikoliv, jak je v dnešní době časté, důsledky. V dnešní době ovládá trh s bioléčivy 6 klíčových tříd produktů: *lidský rekombinantní insulin*, *lidský růstový hormon*, *faktor stimulující kolonie (CSF)*, *erythropoetin*, *interferon* a *interferon*¹⁵. Zatímco nejprodávanějšími produkty v minulosti byly erythropoetin a insulin, v budoucnu se předpokládá, že to budou monoklonální protilátky a terapeutické vakcíny. Monoklonální protilátky představují nejrychleji se vyvíjející skupinu, která zahrnuje široké spektrum aplikací: cílená léčba rakoviny, léčba autoimunitních onemocnění blokad některých proteinů až po léčbu některých infekčních onemocnění blokad specifických povrchových receptorů infekčního agens¹⁴. Podle způsobu účinku je

možné většinu bioléčiv klasifikovat do jedné z následujících sedmi kategorií. Historicky první skupinou terapeutických proteinů tvoří proteiny, které substituují funkce přirozeně se vyskytujících peptidů či proteinů u pacientů s jejich deficiencí nebo poškozením např. rekombinantní insulin (diabetes), růstový faktor (nanismus). Druhou kategorií jsou terapeutické proteiny, které váží vhodné cílové epitopy a tím mohou blokovat funkci cílových struktur (monoklonální protilátky). Třetí kategorií je zatím rozvíjející se skupina, která využívá genů pro léčení chorob geneticky podmíněných (genové terapie). Mezi bioléčiva jsou, možná překvapivě, řazeny i buněčné transplantace, kdy jsou namísto celého orgánu pacientovi implantovány speciální kmenové buňky, jež jsou schopné rozdiferenciovat se na daný typ tkáně, proliferovat a tím vytvořit zcela nový funkční orgán. Další dvě kategorie bioléčiv se soustředí na imunitní systém jsou to stimulatory/blokatory imunitního systému. V některých případech je nutné podpořit imunitní systém (infekční onemocnění, rakovina) v jiných ho specificky potlačit (autoimunitní onemocnění). Poslední kategorií jsou regenerativní terapeutické proteiny např. erythropoetin pro stimulaci růstu červených krvinek nebo kmenové buňky schopné regenerovat části poškozených tkání.

Závěr

Moderní biotechnologická léčiva představují nové pojetí léčby a nové přístupy v boji proti některým chorobám, které do té doby byly neléčitelné a vkládají do rukou lékařů nové zbraně proti širokému spektru onemocnění od onkologických, autoimunitních a infekčních chorob až po náhradu či opravu mutovaného genu (vrozené deficeience či mutace genů). Rekombinantní výroba zvýšila dostupnost těchto léků, před tím limitovanou živočišnými zdroji.

Biologická léčba je ekonomicky náročná. Jednak se do výsledné ceny promítají vysoké výrobní náklady spojené se složitým výrobním procesem a jednak jsou zvýšené náklady na jejich aplikaci (nitrožilní aplikace například u terapeutických protilátek pod dozorem lékaře). K postupnému snižování cen bioléčiv bude docházet s nástupem generických verzí na trh, ovšem cena bude neustále neporovnatelná s průměrnými klasickými léky. Problémem je vysoká citlivost proteinových struktur, které jsou velmi náchylné k denaturaci, jež by vedla k nežádoucí imunitní reakci pacienta. To zvyšuje náklady na skladování a také na výstupní kontrolu. Dalším velkým nákladem jsou citlivé buněčné linie, které jsou zdroji biologických léčiv (růstová média, kultivátory, sterilita). Celý výrobní proces musí být po celou dobu zakonzervovaný v původním, osvědčeném stavu, co je rovněž nevýhodné. Nejsou myslitelné i sebemenší optimalizace (nákup levnějšího média, změna dodavatele plastových nádob), které by mohly snížit výrobní náklady. I přes vysokou cenu těchto léčiv, jejich přínos je nevyčísitelný. Přísliby, které nám dávají do budoucna jsou hnacím motorem dalšího výzkumu.

Literatura

1. Nowicki M.: *Kidney Blood Press Res* 30, 267 (2007).
2. Schellekens H.: *Off. J. Europ. Assoc. Hospital Pharmacists* pp.12-13 (2006).
3. Walsh G.: *Nature Biotechnol.* 24, 769 (2006,).
4. Covic A., Kuhlmann M. K.: *Inter. Urol. Nephrol.* 39, 261 (2007).
5. Roger S. D.: *Nephrology* 11, 341 (2006).
6. Ronco C.: *Int. J. Artif. Organs* 28, 552 (2006).
7. <http://www.scribd.com/doc/2409904/Biotechnology-Report-Medicines-in-Development-2006?page=1> (26. 10. 2008).
8. Chrástilová Z., Macková M., et al.: *Chem. Listy* 101, 25, (2007).
9. Sethuraman N., Stadheim T. A.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 341 (2006).
10. Chu L., Blumentals I., Maheswari G.: *Methods Mol. Biol.* 308 (2005).
11. He Y., Honen W. J., et al.: *J. Immunol.* 169, 595 (2002).
12. Birch J. R., Onakunle Y.: *Methods Mol. Biol.* 308 (2005).
13. <http://www.usp.org/pdf/EN/meetings/asMeetingIndia/proteinsPolyBB.pdf> (17. 1. 2009).
14. Beneš L.: *Chem. Listy* 101, 18 (2007).
15. Cvak M., Fusek M.: *Chem. Listy* 98, 1087 (2004).
16. Fusek M., Káš J., Ruml T.: *Bioléčiva, VŠCHT Praha*, 2008.

Souhrn

Mezi bioléčiva se řadí rekombinantní peptidy a proteiny, které našly využití v terapeutické praxi. Prvním takovým terapeutickým peptidem byl insulin, ten byl ovšem izolován z přírodních zdrojů, která sebou přinášely značná rizika a omezení. Dnes jsou bioléčiva kompletně vyráběna na biotechnologické bázi za pomoci vhodných expresních vektorů je možné získat neomezené zdroje hormonů, protilátek a jiných biologických molekul. Jediným z posledních omezení je jejich vysoká cena, která je dána náročností podmínek přičemž nejpodstatnější z nich je vysoká konzervovanost výrobních podmínek. Přesto jsou bioléčiva velkým přínosem pro moderního člověka jelikož udávají nový směr v léčení některých chorob, kdy již nejsou potlačovány pouze následky nýbrž je léčena příčina jako taková.

klíčová slova: bioléčiva; výroba bioléčiv; bioléčiva v terapeutické praxi

Abstract

Techlovská Š.: Biosimilars

All proteins and peptids which are used in therapeutic practice we can identify as biosimilars. The first one was peptidic hormone insulin, which was isolated from native tissues and brought considerable hazards and limitations. Every biosimilar today is produced by special expression vectors and it allow to acquire unlimited source of hormones, antibodies and of the others biologic molecules. One of the last disadvantages is high purchase price, which is related with proces of manufacture, which should be very unchangeable. However, it is necessary to say that biosimilars bring large contribution to medicine because they are, in some cases, only one alternative of causal treatment.

key words: biosimilars; production of biosimilars; biosimilars in therapeutic practice

KLONOVANÁ ZVÍŘATA A JEJICH PRODUKTY VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA (MOŽNOSTI A SOUČASNÝ STAV)

Miroslava Strmisková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Klonování zvířat skýtá obrovský výdělečný potenciál. I když je zatím počet klonovaných druhů relativně omezený, možné budoucí aplikace slibují vysoké tržní obraty. U chovných zvířat bylo klonování za účelem obdržení nových jedinců se stejnou genetickou výbavou poprvé provedeno v roce 1986 u ovce, kde byl použit transfer jader embryonálních buněk¹ do bezjaderných oocytů. Následovalo klonování hovězího dobytka s narozením osmi telat ze stejného embrya². Vytváření klonů z jader časných embryí má nicméně jistá úskalí z důvodu velmi malého počtu disponibilních jader (asi třicet). Velký pokrok byl učiněn poté, co bylo možno obdržet jádra somatických buněk, jak to bylo

dokázáno klonováním ovce Dolly³. Somatické klonování spočívá v použití diferenciovanych buněk dospělého zvířete jako zdroje diploidních jader, která jsou vložena do vajíček příjemce, předem zbavených jejich vlastních chromozomů⁴.

Techniky klonování a transgeneze⁵

Klonování je vytváření přesných genetických kopií živých organismů. Jako první a relativně zaostalá byla popsána metoda dvojení embrya, při které je uměle napodoben vznik jednovaječných dvojčat, který v přírodě existuje naprosto běžně. V přirozeném procesu dochází k rozdělení jednobuněčného embrya v těle

matky ihned po oplození vajíčka, zatímco pro umělé rozdělení je třeba embryo přenést na Petriho misku, kde je manuálně rozděleno na dvě buňky, které jsou vpraveny zpět do těla matky a dále se vyvíjejí samostatně. Jelikož tyto dvě buňky pochází ze stejné zygoty, narození potomci jsou geneticky naprosto identičtí.

Dělení embrya je ovšem z hlediska využití méně zajímavé než metody transgeneze, protože se vlastnosti obou klonů nedají přesně předpovědět, zatímco transgeneze umožňuje vytvoření identické kopie již existujícího dospělého jedince a všech jeho geneticky daných charakteristik.

Mikroinjekce DNA

Prvními transgenními zvířaty byly myši v roce 1980, jejichž geny byly transferovány přímou mikroinjekcí DNA do prvojader embryí ve stádiu jedné buňky. Tato technika je ještě zdaleka nejpoužívanější u myši, králíků a prasat. Integrace genů není kontrolovatelná a často dochází k inaktivaci některých genů hostitele. Obvykle je také integrace genů z velké části náhodná a jejich exprese bývá ovlivněna geny v blízkosti integračního místa. Prvojádra jsou viditelná pouze u savců. U vejcorodých zvířat může být DNA vpravena pouze do cytoplasmy, což také vede k nekontrolované integraci s velmi variabilními výtěžky.

Použití integračních vektorů

Pro zvýšení počtu integrací mohou být cizí geny nejprve vloženy do transpozonů nebo do retrovirálních vektorů. V prvním případě jsou transpozony injikovány do jádra embryí ve stejný okamžik jako enzym integraasa, který komplementuje defektní transpozony⁶. V druhém případě jsou defektní virální partikule připraveny v buňkách obsahujících chybějící virální proteiny. Nejsofistikovanější verze využívají lentiviry, nejčastěji HIV. Virové částice obsahující cizorodý gen se vpravují mezi zónu pellucidu a membránu embryonu. Výtěžky takovéto transgeneze mohou dosáhnout až 80 % (citace⁷⁸). Tyto vektory se mohou použít u různých živočišných druhů, včetně ptáků.

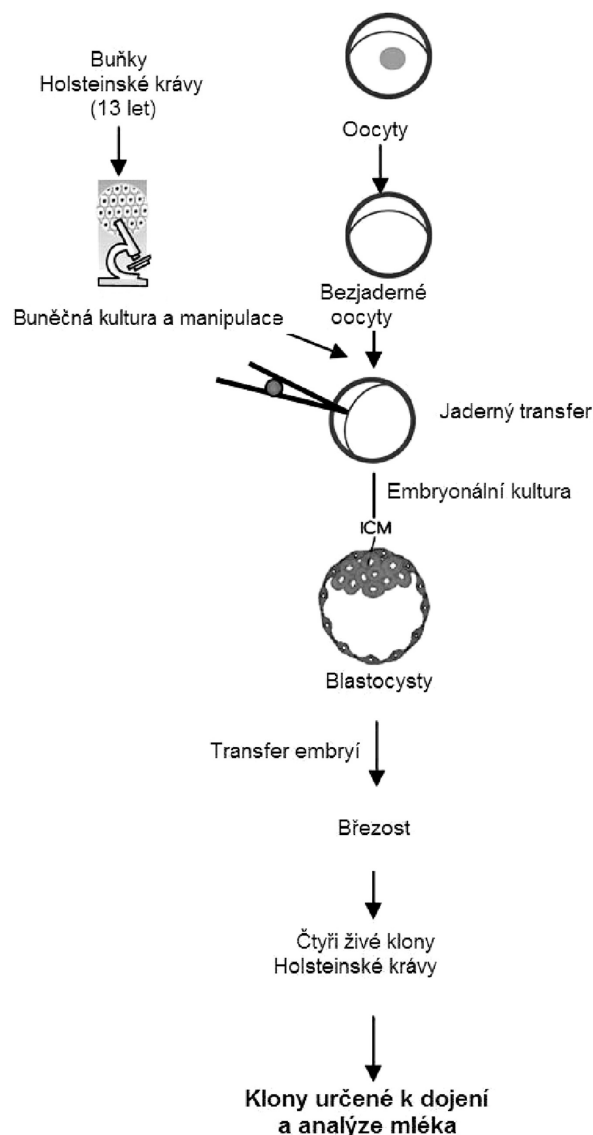
Použití spermií jako nosičů DNA

Incubace izolovaných spermií s cizím genem následovaná oplozením *in vitro* nebo *in vivo* vede v některých případech k velmi dobrým výtěžkům⁹. Částečné narušení membrány spermie napomáhá DNA ke snadnějšímu průniku. Neaktivní spermie je použita k oplodnění metodou ICSI (intracytoplasmic sperm injection).

Použití pluripotentních nebo somatických buněk (Obr. 1)

Cizí geny mohou být integrovány do předkultivovaných pluripotentních nebo somatických buněk, které jsou posléze použity k vytvoření transgenních embryí. Pluripotentní buňky jsou přirozeně schopné se diferencovat a vytvářet všechny buněčné typy, mimo jiné také pohlavní gamety. Pluripotentní buňky mohou být

vpraveny do embrya v raném stádiu (morula nebo blastocyt), kde se smísí s hostitelskými buňkami a tak dají vznik chiméřním potomkům. Somatické buňky mohou být použity ke klonování zvířat, po přenesení jejich jádra do bezjaderných oocytů. Transfer genu do buněk, realizovaný před přenosem jádra, umožňuje vytvoření klonovaných transgenních zvířat (Obr. 1). Tato technika i přes svou vyšší komplexitu zásadně zjednodušila transgenezi přežvýkavců a napomohla k lepším výtěžkům.



Obr. 1: Somatické klonování a klony – zdroj a procedura klonování dojníc¹⁶.

Aplikace v agronomii

Použití transgeneze pro zvýšení produkce zemědělských zvířat je v porovnání s geneticky modifikovanými rostlinami na svém počátku. Příčinou je v první řadě nedostatečná znalost potřebných metod. Některé aplikace transgeneze jsou stejné pro chovná zvířata i rostliny. Obvykle se jedná o různá vylepšení, kterých se snažíme dosáhnout běžnými postupy. Boj proti chorobám je stěžejní oblast využití transgenetických modifikací.

Boj proti chorobám

Krávy, v jejichž buňkách mléčné žlázy jsou exprimovány antibakteriální geny, byly již vytvořeny. Tyto geny kodují proteiny lysostafin¹⁰, lidský laktoferin a lidský lysozym¹¹. Tyto proteiny redukují s větší či menší intenzitou opakované mastitidy (záněty vemene u zvířat), ale také by mohly ochránit lidské i zvířecí konzumenty před infekcemi zažívacího traktu.

Zvýšení produkce zvířat

Nejrozvinutější projekty v této oblasti se zabývají urychlením růstu některých chovných ryb, využitím působení transgenu růstového hormonu. Toto se v dnešní době provádí u lososů, pstruhů, tilapií, kaprů a sumců. Tato zvířata potřebují méně potravy a prostoru, a jejich maso se podobá kontrolním zvířatům. Průmyslové využití těchto ryb může být povoleno pouze v momentě, kdy bude dostatečně zabráněno jejich úniku do volných vod. Šance, že takovýto únik by měl fatální dopad na životní prostředí, se zdají být velmi malé, ale nemohou být dokázány s jistotou ve všech případech.

Myostatin je protein omezující svalový růst. Přirozené mutanty tohoto genu mají abnormálně vyvinuté kosterní svalstvo, zatímco nadexprese genu kodujícího pro část tohoto proteinu má transdominantně negativní efekt a způsobuje svalovou hypertrofii. Tento fakt je zajímavý v právě v případě, kdy muskulární hypertrofie může být indukována až po narození jedince, čímž se předejde případným císařským řezům. Tento model je v současné době rozvinutý jak u velkých savců, tak u lososů. Zajímavou perspektivou by byla integrace transdominantního genu myostatinu do chromozomu Y u dojníc. Samice těchto linií by produkovaly mléko jako doposud a samci by se stali zajímavým zdrojem hovězího masa. Důkazem, že tato myšlenka není pouhou utopií, jsou podobné výsledky pokusů u myši¹².

Zlepšení kvality živočišných produktů

Mléko obsahující méně laktózy, která je špatně tolerována nezanedbatelnou částí lidské populace, bylo obdrženo expresí genu kodující pro laktasu v mléku nebo snížením exprese genu α -laktalbuminu. Krávy, u kterých byl gen β -laktoglobulinu inaktivován, jsou momentálně podrobovány testům. Mléko těchto zvířat by mělo být ochuzeno o jeden z jeho alergenů¹¹. Nadexprese genu kaseinu K u krav má za následek zmenšení micel, což může zlepšit kvalitu směsi k výrobě sýra. Výše zmíněná mléka obsahující antibakteriální proteiny mohou přispět k ochraně konzumentů, zvířat, ale také mléčných a cukrárenských produktů proti bakteriálním infekcím.

Pokusy s vepří exprimujícími gen Δ -12 desaturasy špenátu ukázaly, že tato zvířata mají více kyseliny linoleové v tukových buňkách¹³. Myši, jejichž buňky exprimují geny Δ -12 desaturasy a Ω -3 desaturasy, mají větší obsah kyseliny linoleové v mateřském mléku¹¹. Tyto

produkty by mohly přispět k protekci konzumentů před kardiovaskulárními chorobami.

Kuřata a monogastriční savci by mohli být schopni syntetizovat svůj vlastní lysin a methionin. Snížily by se tak náklady na jejich výživu.

Problém biologického nebezpečí

Transgeneze, stejně jako genetická selekce, vytváří zvířata, jejichž biologické vlastnosti nejsou zcela známy. Jsou prováděny specifické a velmi rigorózní testy, které by měly odhalit případné nežádoucí účinky na spotřebitele¹⁴. Nemůžeme však vyloučit, že nekontrolovaná integrace transgenu nebo jeho produkt neposkytnou zvířatům náchylnost k infekčním chorobám přenosným na celé stádo nebo na člověka. Sledovací opatření používaná do této doby se zdají být dostačující k potlačení takovýchto efektů.

Vliv klonování na kvalitu a obsah živočišných produktů

Tian *et al.*¹⁵ uvádějí ve své studii výtěžky a složení nadojeného mléka od klonovaných krav, jejich buněčných dárců a normálních krav stejného plemene. Byla provedena analýza celkového složení proteinů a tuků, laktózy, dusíku a somatických buněk. Produkce mléka a jeho kvalita je naprosto srovnatelná u klonovaných krav a jejich dárců, jak bylo předpokládáno. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl ve složení mléka od klonovaného a normálního zvířete. Obsah hlavních sledovaných proteinů (α -kasein, β -kasein, κ -kasein a β -laktoglobulinu) a protilátek (IgG, IgA a IgM) je téměř identický u všech testovaných zvířat.

V jiné studii² bylo také provedeno srovnání kvality a složení masa od klonovaných či neklonovaných býků. Ve věku tří měsíců byly býci vykastrováni a krmeni standardní krmnou směsí. Po porážce byly vyhodnoceny tyto faktory: celková váha a váha orgánů, celková porce masa a tuku, proteinový a tukový obsah v šesti různých svalech, složení mastných kyselin aj.

Více než 90%-ní podobnost všech examinovaných parametrů byla zaznamenána u sledovaných zvířat, nicméně se objevily rozdíly u 12-ti parametrů: obsah tuku v mesenteriu, obsah vody ve svalech, obsah proteinů v pološlachovitém svalu, proporce podélného hrudního svalu vůči celkové hmotnosti, obsah kyseliny linoleové v ledvinovém tuku, podélném hrudním svalu a v pološlachovitém svalu, a nakonec obsah kyseliny palmitové, palmitoleové a linoleové v pološlachovitém svalu. Všechny zmíněné parametry byly mnohem vyšší u klonovaných zvířat, s výjimkou obsahu proteinů a vody v pološlachovitém svalu.

Pro určení zdravotního stavu a patologie všech orgánů byly tyto orgány podrobeny histologickým analýzám. Všechny orgány klonovaných zvířat byly prokazatelně v normálním stavu, sledovány byly játra, ledviny, plíce, srdce, slinivka a nadledvinová a štítná žláza. Jediné pozorované abnormality se vyskytly ve formě několika ledvinových kamenů, které jsou ale u hovězího dobytka běžné.

Závěr

Klonovaná zvířata sice představují zdroj mnoha společenských predsudků a obav, většina studií ale dokazuje že jejich produkty používané pro lidskou výživu jsou nerozeznatelné od původních dárcovských, či náhodně vybraných jedinců. Navíc byl počet somatických buněk v mléce naprosto normální u všech klonovaných jedinců, což ukazuje, že klonovaná zvířata nejsou více náchylná k mastitidě než srovnávaná normální zvířata.

Autoři sami však vyzvedli fakt, že tato pilotní studie byla provedena na menším počtu zvířat, a že klonování jedinci pocházeli ze stejného dárce. Další podrobnější studie jsou netrpělivě očekávány vědeckou i spotřebitelskou veřejností.

Vytváření identických kopií zvířat všeho druhu je tedy již známou oblastí výzkumu. K opravdovému rozletu jí schází odstranění nejistoty co se týče dobrého zdravot-

ního stavu vytvořených klonů. Uvedení na trh masa nebo mléka pocházejících z klonovaných zvířat je zatím zakázáno americkou *Food and Drug Administration*¹⁶, zatímco si někteří chovatelé slibovali provést tuto etapu již v roce 2003. Můžeme ale s naprostou jistotou očekávat souboj mezi podniky, ekology a kontrolními orgány, přinejmenším srovnatelný i s debatami o zavedení GMO rostlin na trh. FDA svěčila provedení studie na toto téma *National Research Council*, která je součástí samotné Národní Akademie Věd Spojených Států Amerických. Publikovaná studie pouze zmiňuje, že klonovaná zvířata nepředstavují pravděpodobně žádné nebezpečí, v případě GMO zvířat je bude potřeba podrobovat důkladným studiím a kontrolám¹⁶. Zatím však zůstává veškerá komercializace zakázaná a podniky, které se přeorientovaly na tento trh jako např. *Infigen*, musí hledat alespoň krátkodobě náhradní zdroj zisku.

Literatura

1. Willadsen S.M.: *Nature* 320, 63 (1986).
2. Bondioli K.R., Westhusin M.E., Looney C.R.: *Theriogenology* 33,165 (1990).
3. Wilmut I., Schnieke A.E., et al.: *Nature* 385, 810 (1997).
4. Heyman Y., Chavatte-Palmer P., et al.: *INRA Prod. Anim.* 18, 339 (2005).
5. Houdebine L.M.: *Bull. Acad. Vét. France* 158 (2005).
6. Dupuy A.J., Clark K., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4495 (2002).
7. Whitelaw C.B.A.: *Trends Biotechnol.* 22, 157 (2004).
8. Whitelaw C.B., Radcliffe P.A., et al.: *FEBS Lett.* 571, 233 (2004).
9. Lavitrano M., Forni M., et al.: *Mol. Reprod. Dev.* 64, 284 (2003).
10. Wall R.J., Powell A.M., et al.: *Nat. Biotechnol.* 23, 445 (2005).
11. Transgenic Animal Research Conference. *Transgenic Research* (2005).
12. Pirottin D., Grobet L., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 102, 6413 (2005).
13. Saeki K., Matsumoto K., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 101, 6361 (2004).
14. FAO/WHO, Expert consultation on the Safety assessment of Foods derived from genetically modified animals, including fish. Rome. (2003).
15. Tian X.C., Kubota C., et al.: Meat and milk compositions of bovine clones, *PNAS*, 2005.
16. Jordan B.: *M/S Médecine Sci.* 18 1215 (2002).

Souhrn

Klonování zvířat se zdařile vyvíjí již více než 50 let a dalo vznik několika vysoce účinným metodám vytváření geneticky stejných jedinců. Vědcům se zatím podařilo na testech s mnohými zvířecími druhy úspěšně prokázat, že lze klonování a genetických modifikací využít především v boji proti zvířecím chorobám, lidským alergiím na některé složky zvířecích produktů, ale také pro zvýšení zvířecí produkce a kvality těchto produktů pro lidskou výživu.

Jakékoliv modifikace a vytváření identických kopií existujících jedinců vzbuzuje ve značné části populace obavy. Avšak prozatím žádná publikovaná studie neodhalila značné rozdíly mezi klonovanými a kontrolními živočichy, ani prokazatelné biologické nebezpečí pro ostatní jedince či člověka. Prováděné podrobnější testy by mohly potvrdit předchozí pozitivní závěry a pomohly by také ustanovit legislativní a etické normy ohledně využití těchto živočichů a jejich produktů pro společnost.

klíčová slova: klonování; klonovaná zvířata

Abstract

Strmisková M.: Cloned animals and their products in human nutrition (options and present status)

Animal cloning has been evolving since 50 years and several high-performance cloning techniques have been developed. Scientists point out that utilization of genetically modified or artificially selected organisms could help to fight many animal diseases, to increase animal production or to improve animal product quality for consumers. Several long range studies with fish, cattle, pigs and poultry have been performed leading to very encouraging results.

Artificial creation of identical organism raises fear in a part of the society, nevertheless, any of published studies has not revealed a potential danger for human being related to consumption of meat or other products from cloned animals. Further studies focusing on this subject are to be done in order to confirm these results and to permit an introduction of legislative and ethic norms clearly defining domains and restrictions of utilization of animal clones.

key words: cloning; cloned animals

JEDLÉ VAKCÍNY

Josef Tichý

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Úvod

Vakcíny jsou doposud komerčně vyráběny především v geneticky upravených bakteriích, kvasinkách nebo savčích buňkách. S vývojem genetického inženýrství vyšších rostlin byly učiněny pokusy zařadit na tento seznam i rostliny. Cílem je produkce upravených rostlinných orgánů (listy, plody), surových extraktů (sušený materiál) nebo přečištěných proteinů, které orální (ústí) nebo parenterální (injekce, infuze) cestou dopraví jeden nebo více imunogeních proteinů do organismu, kde spustí imunitní reakci. Způsobu použití rostlin jako producentů vakcíny je celá řada. Prvním případem produkce antigenní vakcíny v geneticky modifikované (GM) rostlině byla produkce povrchových proteinů *Streptococcus mutans* v tabáku (Curtisse & Cardineau; 1990). Brzy pak následovaly pokusy o produkci povrchových antigenů hepatitidy B (HbsAg), teplotně labilního enterotoxinu *E. coli* (Walmsley & Arntzen; 2000) a glykoproteinů viru vztekliny (McGarvey et al, 1995). Proteiny produkované těmito rostlinami podané orálně myšim i člověku indukovaly syntézu specifických protilátek, slizničních IgA a sérových IgG. V rostlinách začaly být také produkovány autoantigeny pro orální terapii autoimunitních onemocnění (Carter & Langridge; 2002). Dále se pak

dnes pozornost obrací k produkci epitopů, zaměřených na cytotoxickou protinádorovou aktivitu (McCormick et. al; 1999). Rostliny mohou být též použity k produkci protilátek používaných k imunoterapiím (Ma; 2001).

Produkce vakcín v rostlinách

Produkce vakcín pomocí vyšších rostlin přináší nesporné výhody (Tab. I). Jedlé vakcíny mohou řešit řadu problémů, které jsou spojeny s využitím tradičních vakcín, např. přináší lepší cenovou dostupnost, zjednoduší je transport vakcíny od výrobce a nahrazují injekční podání. Výhodné může být použití rostlinných preparátů i v rozvojových zemích, kde jsou kritickými parametry bezpečnost a stabilita preparátu. Nízké náklady na vakcinaci pak umožní levnou plošnou vakcinaci široké populace. Rostlinné preparáty jsou vhodné i pro aplikace ve veterinární praxi (Dalsgaard et al; 1997).

K produkci vakcín je používána řada rostlin. Zpočátku to byl tabák a brambor, později pak rajče, banánovník, kukuřice, salát a další. Výběr rostliny (a pletiva ve kterém je cílový antigenní protein akumulován) spočívá na způsobu aplikace vakcíny. Například pro přímou konzumaci syrové rostliny je třeba, aby byla jedlá a stravitelná. Naopak pro extrakci proteinu,

Tab. I: Výhody využití rostlinných jedlých vakcín (Sala et. al.; 2003).

Výhoda	Charakteristika
Orální podání	Stěna rostlinné buňky, skládající se z celulózy a cukrů, poskytuje ochranu v žaludku a umožňuje postupné uvolňování ve střevech.
Sušené plody či jiné orgány	Pletivo rostliny obsahující vakcínu může být použito jako syrová potrava, sušené nebo jinak upravené, proteiny mohou být částečně nebo zcela přečištěny a podávány v kapslích jako prášek.
Snadné uchovávání	Extrakty z rostlin obsahující vakcínu mohou být skladovány a přepravovány za pokojové teploty.
Slizniční i sérologická imunitní odpověď	Vakcíny z rostlin jsou prvotně navrženy ke spuštění slizničního imunitního systému (IgA), brání vstupu patogenů do tkání, též spouštějí sérologickou odpověď a zřejmě i odpověď na cytotoxický stres.
Poměr cena/výkon	Výrobní cena je 100-1000krát nižší v porovnání s tradičními vakcínami.
Optimální expresní systém	Rostliny mohou být navrženy k akumulaci antigenu ve vnitrobuněčných kompartmentech (endoplasmatické retikulum, chloroplasty).
Snadná genetická manipulace	Výrobci ze zásady trvají na zavedených protokolech molekulární a genetické manipulace, ty jsou již k dispozici i v rozvojových zemích.
Snadná produkce	Rostliny lze skladovat jako semena. Neomezené množství vakcíny může být vyprodukováno v omezeném čase, produkce je vhodná pro rozvojové země.
Bezpečnější než běžné vakcíny	Není nebezpečí kontaminace savčími patogeny.
Ochrana před biologickými zbraněmi	Díky bezpečnost a cenová dostupnost nabízejí rostlinné vakcíny jako ideální nástroj proti bioterorismu.
Veterinární využití	Dostupná cena a možnost využití jako potravinový doplněk.

Tab. II: Genetické modifikace pro optimální produkci vakcín v GM rostlinách (Sala et. al.; 2003).

Optimalizace použitých kodonů	Adaptovat kodon na preferované rostlinami.
Optimalizace sekvence nukleotidů	Eliminovat sekvence, které destabilizují nebo se podílí na sestřihu mRNA. Minimalizovat výskyt vlásenkových struktur.
Výběr promotoru	Měl by být vlastní rostlinám, specifický pro pletivo, indukovatelný faktory v prostředí.
Využití 3-polyA konce	Druhotné signály ovlivňující akumulaci proteinu.
Nasměrování proteinu do chloroplastu	Integrace DNA sekvence do jaderné DNA a nebo použití N-koncové signální sekvence pro cílení cytoplasmatických proteinů do chloroplastů.
Nasměrování proteinu do ER	Využití retenčního signálu endoplasmatického retikula.
Integrace epitopu do DNA v chloroplastu	Integrace DNA sekvence do chloroplastové DNA s potřebnými expresními signály: protein je exprimován a akumulován v chloroplastu.
Integrace epitopu do virové DNA	Využití virového promotoru při integraci epitopu do rostlinného viru. Využití defektního viru k zvýšení výtěžku a ochraně prostředí.
Expresce polycys mRNA	Integrace více epitopů pod jedním expresním signálem.
Výběr selekčních markerů	Využití vhodných selekčních genů s možností jejich eliminace z genomu po selekci.

spojené s jeho dalším zpracováním, tyto podmínky být splněny nemusí. Tepelné zpracování je možné pouze tam, kde nedojde ke ztrátě funkčnosti (Daniell et al; 2001).

Vakcíny podle cílového působení

Vakcíny proti infekčním onemocněním

Existuje řada antigenů, jak proti mikrobiálním tak proti virovým onemocněním, jejichž producenty jsou rostliny. Počáteční pozornost byla věnována lidským patogenům, avšak současný výzkum se věnuje též zvířecím. Produkce antigenu není nijak limitována je-li známa sekvence DNA kódující cílový antigen.

Vakcíny proti autoimunitní reakci

Při autoimunitním onemocnění nerozezná imunitní systém, která tkáň je jeho vlastní a která je cizí, a tak dochází k rozsáhlému poškození vlastních orgánů. Příkladem takového onemocnění je artritida, mnohočetná skleróza a diabetes I typu. Snahou je orálně podanou dávkou autoantigenů z rostlin inhibovat protilátky imunitního systému a tím i rozvoj onemocnění (Carter & Langridge; 2002).

Vakcíny proti lidským nádorům

Většina nádorů je velmi variabilní v diagnóze i léčbě, v rámci jedné skupiny ale existují společné znaky, tzv. specifické markery tumorů (povrchové imunoglobuliny specifické pro danou skupinu nádorů), s jejichž pomocí lze u jedince vyvolat tvorbu specifických protilátek. Složitá struktura celého imunoglobulinu však brání jejich většímu využití. Namísto celé víceřetězcové molekuly lze k imunizaci použít jednořetězcový hypervariabilní úsek (scFv, „single-chain variable region“). Přirozeně získané, indukované nebo pasivně přijaté protilátky proti těmto úsekům pak mohou eliminovat cirkulující metastázy. Vývoj těchto antigenů je však

komplikován skutečností, že mnohé úseky jsou též auto-antigeny. V posledních desetiletích imunologové identifikovali řadu specifických epitopů, z nichž některé se pokoušejí použít k syntéze a vyvolání imunitní odpovědi organismu (např. rostlinná vakcína proti mela-nomu) (Zhang et. al., 1998; McCormick et. al., 1999).

Biotechnologické postupy

Produkce vakcín v rostlinách závisí na dostupnosti sekvence DNA kódující antigen a na přípravě vhodné GM rostliny. Stabilní způsoby transformace rostlin zatím existují dva: integrace heterologního genu do jaderné nebo do plastidové (chloroplastové) DNA. Rostlinu lze též transformovat pomocí infekce virem s modifikovaným genomem. Rostliny produkující dva nebo více antigenů mohou být získány použitím více konstruktů nebo pohlavním křížením. Způsoby transformace závisí na požadovaném cíli.

Integrace genu do rostlinného genomu

Expresi genu může ovlivnit mnoho faktorů, jako jsou použité spektrum kodonů, typ promotoru, sekvence směřující antigen do buněčných kompartmentů a další (Tab. II). Využití transportních proteinů může být též nutné, zejména pro malé fragmenty vakcinačních antigenů. Lokalizace integrovaného genu v genomu má na produkci a akumulaci antigenu v rostlině též určitý vliv. *Agrobacterium tumefaciens* a technologie agroinfekce je nejvíce používaným prostředkem k dosažení permanentní integrace genu, ale při procesu integrace dochází k zavádění heterologní DNA v náhodných pozicích genomu, což může mít vliv na míru exprese cílového genu (Walmsley & Arntzen; 2000).

Další možností je vpravení genu nebo sekvence nukleotidů do cirkulární DNA chloroplastu (cpDNA), která je přítomna v mnoha kopiích v dané buňce. V tomto

případě je transformace dosaženo nastřelením částic s DNA, která se integruje do genomu ve specifických pozicích mechanismem homologní rekombinace, která využívá postraních sekvencí (Daniell et al.; 2002). Integrace do cpDNA je cílená za pomoci homologií rekombinace s využitím postraních sekvencí. To zamezuje variabilní expresi genu a utišování důležitých genů, jevy ke kterým dochází při integraci do jádra. Použití cpDNA nabízí množství výhod. Nukleotidová sekvence cpDNA je pro řadu důležitých plodin známa a je přítomna až v buňce je obsažena až v 10 000 kopiích. Dále pak bylo u chloroplastu dokázáno správné zpracování eukaryotických proteinů, včetně správného sbalení a tvorby disulfidických můstků. Další zásadní výhodou je zvýšená akumulace proteinu (až 47 % veškerých rozpustných proteinů, v porovnání s 0,01 – 0,4 % u jaderných transformací). Tato akumulace přitom nemá negativní vliv na fotosyntetické vlastnosti chloroplastu. V současnosti je limitujícím faktorem skutečnost, že rutinní postup je znám pouze u tabáku a že produkce proteinů v chloroplastech neumožňuje některé posttranslační úpravy (např. glykosylaci) (Daniell et al.; 2001).

Využití rostlinných virů k transfekci

Jedno vláknové RNA viry se ukázaly být efektivními vektory pro produkci vakcín v rostlinách. Podstatou využití rostlinných virů je vložení cílového genu do genomu viru a to většinou ve formě genetických fúzí se sekvencemi kódujícími obalové proteiny viru. Infekce rostliny takto upraveným virem vyústí ve vnitrobuněčnou akumulaci cílového produktu. Proteinová sekvence ani virový genom není nikdy integrován do rostlinného genomu a protein je tedy produkován jen infikovanými buňkami. Tento přístup však neumožňuje vkládání příliš dlouhých sekvencí. Výhodou je ale možnost poměrně rychlé konstrukce modifikovaných virů a možností infikovat virem více druhů rostlin. (Yusibov et al.; 1997).

Způsob aplikace a reakce protilátek

Většina infekčních agens se dostává do těla resorpcí na slizničních epitelech. Indukce slizniční imunity se nejlépe dosáhne přímým (orálním) podáním vakcíny, která stimuluje tvorbu IgA, nejhojnější protilátky slizničních sekretů. Zatímco klasické vakcíny jsou úspěšné při vyvolání systémové imunitní odpovědi (IgG), u sliznic již tomu tak není. Rostlinné vakcíny se ukázaly jako vhodné prostředky k vyvolání obou imunitních odpovědí. Velkým problémem orálního podání vakcín je jejich degradace v žaludku. Tu lze eliminovat pomocí ochrany vakcíny stěnou rostlinných buněk, která umožňuje průchod do střev, kde je pak antigen pozvolna uvolňován. Dalším problémem orálního podání vakcín je nízká imunogenita a možnost vyvolání tolerance k podávané dávce. To lze řešit využitím směrovaných molekul nebo připojením peptidové nadstavby, např. u antigenů hepatitidy B, a tím snížení diluce imunogenu během vstřebávání. Další studovanou možností

je injekční podání rostlinných extraktů (Walmsley & Arntzen; 2000).

Bezpečnost a veřejné mínění

Není znám případ kontaminace rostlinných antigenů živočišnými. Není známa interakce rostlinné DNA se zvířecí a rostlinné viry nenapadají živočišné buňky. I přesto panují v současnosti mnohé obavy z použití GM rostlin, především pak v Evropě. Jednou z obav je možnost zkřížení GM rostlin s divokými druhy a možné ovlivnění biodiverzity. Tomu lze zabránit např. samčí sterilitou, použitím cpDNA, která pochází vždy jen od samičích rostlin. Dalšího zvýšení bezpečnosti lze dosáhnout přidáním barevných pigmentů odlišujících rostliny geneticky modifikované a nemodifikované (Daniell et al. ; 2002). Je důležité si uvědomit, že rostliny produkující vakcíny spadají do kategorie medicínálních produktů a měly by být pěstovány, zpracovávány a regulovány jako farmaceutické produkty. S růstem množství akumulovaného proteinu, klesají nároky na prostor a je možné, že v brzké době se produkce jedlých vakcín omezí pouze na uzavřené skleníkové kultury, kde lze většinu podmínek regulovat.

Hrozba biologických zbraní

V poslední době vzbudily pozornost mnohé infekční nemoci, jako jsou neštovice, antrax a mor, jejichž původci jsou použitelní jako biologické zbraně. Ohrožené země nyní stojí před nutností být připraveny vakcinovat část nebo celé své obyvatelstvo v krátkém čase. To znamená připravit miliony vakcín, uskladnit je a čas od času obnovovat. Ekonomické a technické výhody rostlinných vakcín (Tab. I) je předurčují jako ideální náhradu tradičních vakcín. Výzkum vakcín proti potenciálním hrozbám již započal.

Budoucí perspektivy

Ačkoliv je vývoj jedlých vakcín ještě v počátcích, dosavadní výsledky naznačují, že by mohly brzy nalézt široké uplatnění v klinické praxi. Další výzkum ukáže zda budou splňovat standardy definované Světovou zdravotnickou organizací (Milstien; 2002). Kdy to bude? Vývoj některých vakcín je nyní ve fázi klinických testů. Dalším krokem je vývoj efektivních způsobů produkce, pokrývající poptávku po rekombinantních vakcínách a úpravy produktu pro účinné podání vakcíny. Využití syrových částí rostlin k orálnímu podání se ukazuje jako nedostatečně účinné z důvodu obtížné standardizace vakcinační dávky v rámci jedné sklizně. Problematická je i omezená doba použitelnosti čerstvých produktů. Sušené produkty, zejména zrna, však nabízí jak dlouhou trvanlivost se zachováním účinnosti vakcíny tak účinnou standardizaci vakcinačních dávek, připravovaných z mletých zrn.

Důležitou otázkou zůstává, kdo tímto vývojem získá? Kdo se bude schopen a ochoten zabývat výzkumem, výrobou a kontrolou rostlinných jedlých vakcín? Budou pak tyto vakcíny dostupné i pro rozvojové země?

Literatura

1. Carter J.E., Langridge W.H.R.: *Critical Reviews Plant Sci.*, 21, 93 (2002).
2. Curtiss R.I., Cardineau C.A.: Oral immunisation by transgenic plants, *World Patent Application*, WO 90/02484. (1990).
3. Dalsgaard K., et al.: *Nature Biotechnol.*, 15, 248 (1997).
4. Daniell H., Streatfield J., Wycoff K.: *Trends Plant Sci.*, 6, 219 (2001).
5. Daniell H., et al.: *Current Genetics*, 39, 109 (2001).
6. Daniell H., Khan M.S., Allison L.: *Trends Plant Sci.*, 7, 84 (2002).
7. Kong Q., et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 98, 11539 (2001).
8. Ma J.K.C.: *Nature Biotechnol.*, 18, 1141 (2001).
9. McGarvey P.B., et al.: *Biotechnology*, 13, 1484 (1995).
10. Milstien J., Dellepiane N., Lambert S.: *Vaccine*, 20, 1000 (2002).
11. Sala F., et al.: *Vaccine*, 21, 803 (2003).
12. Walmsley A.M., Arntzen C.J.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 126 (2000).
13. Yusibov V., et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 94, 5784 (1997).
14. Zhang H., Zhang S., et al.: *Cancer Res.*, 58, 2844 (1998).

Souhrn

V tomto přehledu je popsán současný stav výzkumu produkce vakcín pomocí rostlin. Zároveň jsou diskutovány vhodné experimentální přístupy, hodnocení rizik a očekávané trendy. Vyšší rostliny (např. banánovník, brambor, tabák nebo rajče) mohou být transformovány na bioreaktory produkující vakcíny stabilní inkorporací heterologních genů do jaderné nebo plastidové DNA. Stejného cíle může být dosaženo pomocí rekombinantních rostlinných virů jako vektorů umožňujících expresi požadovaného genu v rostlině. Orální či parentální podání rostlinných preparátů nebo přímá aplikace modifikovaného rostlinného pletiva při vakcinaci může řešit i některé problémy vyskytující se při obvyklém způsobu vakcinace proti původcům chorob jako jsou např. autoimunitní reakce či proliferace rakovinných buněk. Tento přístup může zároveň nabídnout účinnou obranu proti bioteroristickým útokům.

Summary

Tichý J.: Edible vaccines

In this review, the current status of research is described in the field of plant-based vaccine production. Suitable experimental approaches, risk assessment, and future perspectives are also discussed. Higher plants (e.g., banana-tree, potato, tobacco, or tomato) could be converted into vaccine-producing bioreactors by stable integration of specific heterologous gene in nuclear or plastid DNA. Same goal could be achieved when recombinant plant viruses are used as vectors allowing for expression of the gene-of-interest in plant. Oral or parenteral administration of plant-based preparations or direct use of modified plant tissues in vaccination can resolve some problems occurring on common vaccination against causative agents of diseases, autoimmune responses and against cancer proliferation. Such strategy could simultaneously offer a potent defense tool against bioterrorism threats.

MITOSOM – NOVÁ ORGANELA

Martin Švéda

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Úvod

Z fylogenetického a taxonomického hlediska rozdělujeme živé organismy do tří základních domén: eubakteria (bakteria), archaea a eukaryota. Jednotlivé organismy můžeme na úrovni buňky dělit podle vnitřní organizace na prokaryota a eukaryota, kdy eubakteria a archaea postrádají vnitřně diferencované jádro (mají tzv. prokaryotický typ buněk), zatímco pro eukaryota je typická přítomnost ohraničeného jádra jako organely a také dalších organel (představují tedy eukaryotický typ vnitrobuněčného uspořádání). Mezi základní organely řadíme jádro, endoplasmatické retikulum (hladké, drsné), Golgiho aparát, chloroplasty, lysosomy, peroxisomy nebo mitochondrie. U chemoorganotrofních organismů, které získávají energii ve formě ATP pomocí oxidační fosforylace, hrají v energetickém metabolismu mitochondrie klíčovou

roli. U nižších jednobuněčných eukaryot jako např. *Trichomonas vaginalis* nenacházíme v cytoplasmě mitochondrie, ale příbuzné hydrogenosomy. Druhy *Giardia lamblia* (syn. *G. intestinalis*) nebo *Entamoeba histolytica* byly až donedávna považovány za prosté organely příbuzných mitochondriím nebo hydrogenosomům a označovaly se jako amitochondriální. To platí dodnes, ovšem v roce 1999 byla nezávisle dvěmi výzkumnými skupinami objevena u druhu *E. histolytica* nová organela, která stavbou buněčné membrány a dalšími, především molekulárními, znaky připomíná mitochondrie. Na základě této analogie byla nová organela pojmenována mitosom (krypton) [1, 2].

Pro lepší pochopení vztahu mitochondrie a mitosom, je vhodné se alespoň v krátkosti zmínit charakteristiku těchto organel.

Mitochondrie

Na základě mnoha vědeckých poznatků se předpokládá, že mitochondrie jsou evoluční pozůstatek prastaré proteobakterie (aerobní nebo anaerobní), která do hostitelské (patrně již eukaryotické) buňky vnikla procesem endosymbiosy před asi 2 miliardami let. Přestože mitochondrie prošly dlouhou evolucí, stále si zachovávají znaky svého bakteriálního prapředka a určitou míru autonomie. Mitochondrie je od okolí ohraničena vnější a vnitřní membránou; vnitřní membrána zvyšuje svůj povrch tvorbou meandrovitých záhybů, tzv. krysty, které obsahují enzymovou kaskádu nezbytnou pro vznik membránového potenciálu, a současně vymezuje matrix mitochondrie. Na rozdíl od ostatních buněčných organel (mimo chloroplastů) obsahují mitochondrie vlastní proteosyntetický aparát a část původního genomu ve formě cirkulární DNA. V průběhu soužití s hostitelem došlo ke ztrátě části vlastního genomu endosymbiota, která byla integrována do jaderné chromosomální DNA hostitele. V důsledku toho muselo dojít ke vzniku nového transportního mechanismu (komplexy TIM a TOM), který by translokoval původně mitochondriální proteiny, dnes syntetizované v cytoplasmě, do mitochondrie [3]. Tvorba membránového potenciálu a jeho následná přeměna na molekuly ATP pomocí ATP synthasy není jedinou funkcí mitochondrií, jakkoliv je nejvíce skloňovaná. Tvorba a maturace Fe-S proteinů, regulace buněčného cyklu a metabolismu, či účast mitochondrií v procesu apoptosy, jsou další životně důležité funkce, které mitochondrie v buňce zastávají [4, 5]. Mitochondrie jsou navíc se v reakci na metabolický stav buňky schopny nezávisle dělit a znovu „spájet“ [6].

Hydrogenosomy

Hydrogenosomy byly poprvé popsány v roce 1973, a jsou taktéž ohraničeny dvojitou membránou [7]. Nalézáme je u anaerobních protozoí jako *T. vaginalis*, *Trichomonas foetus*, *Psalteriomonas lanterna* nebo *Nyctotherus ovalis*. Podobně jako mitochondrie se hydrogenosomy podílí na tvorbě ATP, ovšem nikoliv mechanismem oxidační fosforylace, ale energeticky méně výhodné substrátové fosforylace, kde jako klíčové enzymy vystupují acetosukcinátCoA transferasa a succinylCoA synthetasa. Název hydrogenosom je odvozen od skutečnosti, že jako konečný produkt metabolismu vzniká kromě CO_2 a acetátu, také plynný vodík (H_2) [8]. Hydrogenosomy obecně nenesou v matrix žádnou vlastní genetickou informaci, a jsou tedy závislé na proteosyntetickém aparátu v cytoplasmě. Tento fakt významně komplikuje analýzu původu hydrogenosomů. Jsou výsledkem nezávislé endosymbiosy anaerobní eubakterie nebo adaptace proto-mitochondrií na neustále se měnící životní podmínky? Přítomnost genu pro chaperon Hsp70 bakteriálního typu v chromosomální DNA *T. vaginalis* poukazuje na možný mitochondriální původ hydrogenosomu [9]. Pod označení protozoa řadíme pestré škálu organismů, a tedy není nijak překvapující, že u *N. ovalis*

byla objevena hydrogenosomální DNA [10]. Můžeme se tedy těšit na další teorie o původu hydrogenosomu.

Mitosomy

Prvním krokem při vývoji buňky eukaryotického typu z buňky prokaryotní byla izolace genetické informace do organely ohraničené biologickou membránou, do jádra. Vznik mitochondrií a další změny v buněčné stavbě vedly ke vzniku buňky eukaryotického typu, jak ji dnes známe z odborné literatury. Dlouhou dobu se předpokládalo, že lidský patogen *G. lamblia* je amitochondriální, vývojově starý a tvoří onen nutný spojovací článek – první jaderná eukaryota. Ovšem v roce 1998 byla u *G. lamblia* prokázána exprese genu pro chaperonin 60 (*cpn60*), tj. genu mitochondriálního původu. Objevil se tak první náznak, že endosymbiosa proteobakterie, která položila základ budoucích mitochondrií, nastala mnohem dříve, než se dosud předpokládalo [11].

Nabízí se otázka, jak se do amitochondriálního organismu dostala DNA kódující mitochondriální protein? V úvahu připadají dvě vysvětlení: buď proběhl horizontální přenos genetické informace mezi proteobakterií a nově vznikající eukaryotickou buňkou, nebo po procesu endosymbiosy proteobakterie došlo k „redukční“ evoluci, jejichž následkem došlo ke ztrátě proteobakteriální DNA její kompletní translokací do chromosomálního genomu a dále ke ztrátě některých funkcí a změně velikosti, což byla patrně největší překážka k jejich objevení. Tyto úvahy vedly k experimentům, jejichž výsledkem bylo v roce 1999 popsání neznámé organely u *Entamoeba histolytica* – mitosomu [1, 2]. Metodou imunofluorescenční mikroskopie, která byla použita u obou výše uvedených studií, ovšem nelze detailně poznat strukturu mitosomu. Proto byla při využití analogického přístupu specifické detekce, tj. použití protilátky specificky interagující s „mitochondriálními“ proteiny (Hsp70, IscU, IscS), realizována vizualizace mitosomů pomocí imunoelektronové mikroskopie. Lokalizace provedené u *G. intestinalis* a *Trachipleistophora hominis* odhalily, že mitosomy jsou podobně jako mitochondrie ohraničeny dvojitou membránou. Jejich velikost je přibližně 140×65 nm a četnost se pohybuje v rozmezí 25 – 100 mitosomů na buňku [12, 13].

Podobně jako hydrogenosomy nemají mitosomy vlastní genetickou informaci a jsou tedy odkázány na transport všech esenciálních proteinů z cytoplasmy. U eukaryot mají proteiny, které jsou předurčeny k transportu do mitochondrie N-koncovou cílicí presekvenčí, jež je rozpoznávána transportním komplexem TOM a TIM a která je u maturovaného proteinu odštěpena specifickou proteasou. Nabízí se tedy otázka: jakým způsobem jsou mitosomální proteiny transportovány?

U proteinů IscU a ferredoxinu z *G. lamblia* je na N-konci mitosomální cílicí presekvence, jejíž přítomnost je pro transport do mitosomu naprosto klíčová. V mitosomu, stejně jako u mitochondrií dochází k odštěpení této cílicí presekvence zatím bližší nespecifikovanou metalloproteasou. Cílení heterologního proteinu IscU a ferredoxinu z *G. intestinalis* do hydrogeno-

somu v *T. vaginalis*, a dokonce transport proteinu GFP jehož N-konec je extendován mitosomální cílicí pre-sekvencí ferredoxinu z *G. lamblia* do mitochondrií v savčích buňkách HEK 293 potvrzuje konzervovanost transportního mechanismu od mitochondrií po mitosomy a vzájemnou příbuznost těchto organel [14, 15]. Na druhou stranu proteiny IscS, Hsp70 a Cpn60, které jsou prokazatelně přítomny v mitochondriích i mitosomech, postrádají nám známou N-koncovou cílicí presekvenci nebo aspoň její homolog [14]. Ovšem ani to není nijak překvapující, jelikož mitochondriální proteiny jako chaperinin10 nebo thiolasa, nemají na svém N-konci odštěpitelnou cílicí presekvenci. Jejich transport do mitochondrií je zprostředkován N-koncovou sekvencí, která je součástí maturovaného proteinu a není proteolyticky odštěpena [16, 17].

Na rozdíl od mitochondrií a hydrogenosomů, nejsou mitosomy schopny vytvářet ATP a jediným zdrojem energie je substrátová fosforylace v cytoplasmě daného anaerobního protozoa. Mitosomální proteiny Hsp70 a Cpn60 jsou pro výkon své funkce (napomáhají sbalování transportovaných proteinů) závislé na ATP. Z mitochondrií známe přenašeče (MCF), které jsou schopny transportovat pestré škálu substrátů včetně ATP a to v obou směrech. U *E. histolytica* byl identifikován homolog MCF, který se podílí na transportu ATP/ADP. Mitosomální MCF je poháněna koncentračním gradientem a membránovým potenciálem, ovšem u *E. histolytica* nedochází ke vzniku membránového potenciálu a mechanismus výměny ATP/ADP zatím nebyl objasněn [18].

V genomu *Encephalitozoon cuniculi* ovšem žádný homologní gen pro MCF nalezen nebyl [19]. Jak tedy mitosomy *E. cuniculi* získávají tolik potřebné molekuly ATP? Možné vysvětlení není třeba hledat daleko, stačí odvrátit zrak od eukaryotických parazitů k prokaryotickým. Na základě dříve charakterizovaných transpor-

térů ATP/ADP u bakteriálních parazitů rodů *Rickettsia* nebo *Chlamydia*, byly *in silico* vybrány čtyři domnělé transportéry ATP/ADP nazvané EcNTT1 až EcNTT4. Zatímco EcNTT1, 2 a 4 lokalizují na povrchu *E. cuniculi*, tak EcNTT3 je lokalizován v cytoplasmě a navíc svoji distribucí připomíná mitosomy. Tato domněnka byla následně potvrzena pomocí *E. cuniculi* orthologu Hsp70. A navíc byla prokázána schopnost EcNTT1 až 4 transportovat ATP/ADP [20]. Není nijak překvapující, že EcNTT1, 2 a 4 jsou přítomny na povrchu *E. cuniculi*, kde ochotně plní funkci transportéra molekul ATP z cytoplasmy hostitele. O to víc je překvapující, kam až může dojít „redukční“ evoluce – mitosom místo tvorby ATP alespoň pro vlastní potřebu, je plně závislý na transportu ATP z cytoplasmy pomocí EcNTT3.

Závěr

Mitosomy jsou orgány ohraničené dvojitou membránou a nalézáme je u některých anaerobních protozoí jako *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *E. cuniculi* nebo *T. hominis*. Svoji stavbou se až na malý rozměr podobají mitochondriím, ovšem nejsou schopny vytvářet ATP. Zdá se, že mitosomy navíc neobsahují vlastní genetickou informaci, jakkoliv jsou takové závěry vždy „riskantní“. Nicméně mitosomy obsahují proteiny IscU a IscS, které se zde podobně jako v mitochondriích podílí na skládání a maturaci Fe-S proteinů. Předpokládá se, že právě tato funkce byla klíčová pro zachování „degenerovaných“ (nesmíme podléhat iluzi, že mitochondrie to co umí dnes, uměla i před 2 miliardami let) mitochondrií v podstatě adaptovaných na anaerobní životní styl hostitele. Mitosom bude zanedlouho mít na krku první křížek. Snad můžeme konstatovat, že jsme se s ním měli možnost poměrně dostatečně poznat. Ovšem otázek o původu a funkci mitosomů, či nemocí, které jejich hostiteli mohou způsobit je mnoho.

Literatura

1. Mai Z., Ghosh S., et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2198 (1999).
2. Tovar J., Fischer A., Clark C. G.: *Mol. Microbiol.*, 32, 1013 (1999).
3. Dolezal P., Likic V., et al.: *Science*, 313, 314 (2006).
4. McBride H. M., Neuspiel M., Wasiak S.: *Curr. Biol.*, 16, 551 (2006).
5. Lill R., Mühlenhoff U.: *Trends Biochem. Sci.*, 30, 133 (2005).
6. Detmer S. A., Chan D. C.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8, 870 (2007).
7. Lindmark D. G., Müller M.: *J. Biol. Chem.*, 248, 7724 (1973).
8. Hackstein J. H., Akhmanova A.: *Trends. Microbiol.*, 7(11), 441 (1999).
9. Germot A., Philippe H., Le Guyader H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93, 14614 (1996).
10. Akhmanova A., Voncken F., et al.: *Nature*, 396, 527 (1998).
11. Roger A. J., Svärd S. G., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 95, 229 (1998).
12. Tovar J., León-Avila G., et al.: *Nature*, 426, 172 (2003).
13. Williams B. A., Hirt R. P., et al.: *Nature*, 418, 865 (2002).
14. Dolezal P., Smíd O., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 102, 10924 (2005).
15. Regoes A., Zourmpanou D., et al.: *J. Biol. Chem.*, 280, 30557 (2005).
16. Jarvis J. A., Ryan M. T., et al.: *J. Biol. Chem.*, 270, 1323 (1995).
17. Amaya Y., Arakawa H., et al.: *J. Biol. Chem.*, 263, 14463 (1988).
18. Chan K. W., Slotboom D. J., et al.: *Curr. Biol.*, 15, 737 (2005).
19. Katinka M. D., Duprat S., et al.: *Nature*, 414, 450 (2001).
20. Tsaousis A. D., Kunji E. R., et al.: *Nature*, 453, 553 (2008).

Seznam zkratk

Fe-S proteiny (IscS, IscU) – proteiny obsahující komplexy železa se sulfidovými ionty; slouží jako přenašeče elektronů např. v dýchacím řetězci.

Hsp70 (z angl. „heat shock protein“) – chaperon; účastní se sbalování proteinů resp. brání špatnému sbalení.

Cpn60 (Hsp60) – chaperonin; účastní se sbalování proteinů, resp. aktivně napomáhá správnému sbalení.

TIM (z angl. „translocase of the inner membrane“) – transport biomakromolekul přes vnitřní mitochondriální membránu (IM), usnadňují ukotvení MCF do IM.

MCF (z angl. „mitochondrial carrier family“) – selektivní přenašeče ATP, ADP, aminokyselin, ketolátů, aj. přes IM.

TOM (z angl. „translocase of the outer membrane“) – transport biomakromolekul přes vnější mitochondriální membránu.

GFP (z angl. „green fluorescent protein“) – protein vykazující zelenou fluorescenci po excitaci modrým světlem.

Souhrn

Jednobuněčná eukaryota jako *Giardia intestinalis* nebo *Entamoeba histolytica* byly a jsou považovány za amitochondriální. Ovšem v roce 1999 byla u těchto druhů popsána nová organela – mitosom. Morfologicky je podobný mitochondriím, ale na druhou stranu neobsahuje vlastní DNA a není schopen tvořit energii ve formě ATP. Jakou má mitosom funkci? Jaký je původ mitosomu? Existuje příbuznost mezi mitochondrií a mitosomem? Odpověď na tyto otázky budou hledat následující řádky.

klíčová slova: mitosom; mitochondrie; hydrogenosom

Summary

Švédá M: Mitosome – a new organelle

Unicellular eucaryotes (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and next) were and still are considered to be amitochondrial. However, a new organelle, mitosome, was described in these species, in 1999. Morphologically, mitosome looks like mitochondria, but on the other hand mitosome has no intrinsic DNA and it is unable to produce energy in the form of ATP. What is function of mitosome? What is the origin of mitosome? Does any relationship exist between mitosome and mitochondria? This article searches the answers.

key words: mitosome; mitochondria; hydrogenosome

POMŮŽE GENOVÁ TERAPIE LÉČIT CIVILIZAČNÍ CHOROBY?

Kateřina Váňová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Každý jedinec dědí své geny od svých rodičů a dále je předává svým potomkům. Z těchto důvodů rozdíly v lidském genomu určují rozdíly mezi jednotlivci. Některé změny, obvykle jednoho genu, mohou způsobit závažná onemocnění jako je cystická fibróza či thalasémie. Mnohem častěji však varianty genů interagují s prostředím, což činí některé jedince citlivé k rakovině, srdečnímu selhání či jiné civilizační chorobě [1].

Genová terapie poskytuje novou možnost v léčbě lidských chorob. Přímým přenosem genetického materiálu do cílových buněk může být využito funkcí na úrovni genů a molekul.

Předpokládá se, že genová terapie bude široce využívána v protirakovinné léčbě aktivací primární a adaptabilní imunity, inhibicí onkogenů a angiogenů, a také při dalších onemocněních. Navzdory tomuto léčebnému potenciálu prokázanému u zvířecích modelů a v některých pilotních klinických studiích je genová terapie stále podrobována intenzivní diskuzi pro vedlejší účinky a etické problémy. Techniky a využití

genového inženýrství, design vektorů a zavedení standardních protokolů zůstává stále výzvou pro mnohé vědce. Jak na tuto výzvu odpovíme rozhodne o dalším osudu genové terapie v moderní klinické medicíně [2].

Civilizační choroby

Civilizační choroby jsou definovány jako skupina onemocnění, které se spíše než popisem vymezují výčtem, i když v obecnosti lze patrně říci, že se jedná o choroby, které jsou spojeny s životním stylem především moderní doby a větších měst. Hlavními příčinami vzniku těchto chorob jsou průmyslová velkovýroba a druhotně i příjem kaloricky bohatých potravin zejména tučných a slaných a přeslazených jídel, které jsou převážně z živočišných zdrojů, dále pak významný úbytek fyzického pohybu, nadměrná konzumace jídla, a cigaret a zvýšený stres.

Mezi nejčastěji se vyskytující civilizační choroby patří hlavně cévní onemocnění, předčasná ateroskleróza, infarkt myokardu, obezita, diabetes mellitus, nádory, deprese, vysoký krevní tlak, předčasné stárnutí, závažná revmatická onemocnění kloubů, chronický únavový syndrom a další [3].

Bylo zjištěno, že kardiovaskulární onemocnění je příčinou úmrtí 17 milionů lidí ročně ve světě a je jednou z nejběžnějších příčin smrti v rozvinutých zemích (WHO, 2006). Epidemie kardiovaskulárních onemocnění stále probíhá a odhaduje se, že za deset let bude hlavní příčinou úmrtnosti v rozvinutém světě (WHO, 2006) [4].

Revmatická artróza (RA) je nejběžnějším zánětlivým onemocněním postihujícím přibližně 0.5 – 1% dospělé populace v Severní Americe. Vyvolává významnou patologii a poškození funkcí u postižených jedinců. RA je multifaktoriální onemocnění, jehož hlavní rizikové faktory zahrnují genetickou náchylnost, pohlaví, věk, kouření, infekční činitele, hormony, stravování a socioekonomické a etnické faktory. Onemocnění RA snižuje kvalitu života provázenou přetrvávající bolestí, funkční nepohyblivostí, vyčerpaností, depresí a neschopností zvládat každodenní činnost. Artróza patří mezi hlavní příčiny invalidity v rozvinutém světě. Léčba pro tuto nemoc neexistuje a současná terapie spočívá ve zpomalení progresu onemocnění a ulehčení symptomatických projevů [5].

Vysoký krevní tlak je jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění (KVO). KVO se rozšiřují ve všech populacích a představují hlavní příčinu úmrtí v průmyslově vyspělých zemích. Hypertenze zvyšuje riziko onemocnění periferních artérií, kardiomyopatie, infarktu a selhání ledvin [6].

Genové inženýrství

Genová terapie využívá preparační metody pro přípravu genů či genových segmentů používaných pro léčbu nemocí. Běžným přístupem v genové terapii je identifikovat nefunkční gen a nahradit jej kopií funkčního genu. Jiné přístupy zahrnují spouštění či vypínání specifických genů. Cílem genové terapie pro všechny metody je vložit terapeutický materiál do cílených buněk, kde se stane aktivním a vyvolá očekávané léčebné účinky [1].

Genová terapie je nově vyvinutý přístup k léčbě chorob, který se objevil na konci 20. století a snaží se léčit lidské choroby přesunem genetického materiálu do buněk. Genová terapie zahrnuje řadu nedávno vyvinutých technologií jako je separace genů a jejich purifikace, volba vektoru (virové a nevirové povahy), techniky transferu atd. Tato terapie se velmi rychle rozvíjí a má potenciál nastolit novou éru v léčbě lidských chorob. Stejně jako běžná terapie, genová terapie podléhá Norimberskému kodexu (1974) a Helsinské deklaraci (1964), které ustanovují základní etiku výzkumu zahrnující zranitelnost a zájmy pacientů stejně jako výhodu nezávislého posouzení výzkumu. Avšak genová terapie také vyvolává etické otázky a obavy veřejnosti na třech hlavních frontách. Za prvé, zda existuje riziko, že v důsledku záměrné změny v lidské zárodečné linii může dojít ke změně dědičných vlastností lidské bytosti. Za druhé, různé nové technologie nadále pohánějí tyto debaty. Například genová terapie užívaná v děloze je nezbytnou a používanou technikou pro léčbu některých genetických poruch během fetálního vývoje, ale obavy z rizika transgenerace v zárodečné linii a otázky

bezpečnosti plodu zkomplikovali její vývoj. Zatřetí, dopad nepříznivých účinků udržuje diskuzi o etice.

V září 1999 mladý dobrovolník Jesse Gelsinger zemřel po přijetí adenovirového vektoru pro léčbu zděděného onemocnění z deficience ornitin-transkarbamy-lasy na univerzitě v Penn State. O tři roky později, v říjnu a prosinci 2002, nemocnice Necker v Paříži oznámila, že se u dvou chlapců po genové terapii pro X-SCID (těžká kombinovaná imunodeficience) vyvinula forma leukémie. Další důkazy se objevily ve stejném roce, kdy Li Z *et al.* oznámili, že retrovirální vektory mohou způsobit onkogenní transformaci.

V roce 1988 Evropská rada pro lékařský výzkum vydala první oficiální prohlášení proti genové terapii zárodečných buněk, které bylo následováno prohlášením Rady Evropy v roce 1991 o porušení základního lidského práva na dědění přírodní a nezměněné genetické struktury od rodičů. Navzdory těmto prohlášením má mnoho jednotlivých zemí svou vlastní politiku. V Nizozemí (1989) a v USA (1982) odložili zárodečnou genovou terapii kvůli etickým a technickým překážkám, zatímco v Německu (1987) získala genová terapie status trestného činu v důsledku důraznější politiky země. Nicméně s vývojem v oblasti biomedicíny, etické a politické analýzy, pojem a praktiky genové terapie byly přehodnoceny. Ukázalo se, že somatická genová terapie je velkým přínosem v léčbě různých lidských onemocnění, což představuje pro vědce velkou výzvu v kontrole jejích výhod a nevýhod. Další související otázkou je morální hodnocení rizik provádět výzkum v oblasti genové terapie. Většina zemí podporuje morální legitimitu genové terapie somatických buněk pro léčbu nemocí. Ačkoliv genová terapie sebou nese zmíněná rizika při aplikaci na lidské jedince, její potenciální přínos by mohl být realizován naším zvýšeným úsilím [2].

Pokroky genové terapie v rámci léčby civilizačních chorob

Nádory jater se řadí na páté místo ve výskytu maligních onemocnění na celém světě a jsou příčinou úmrtí přibližně jednoho milionu lidí ročně. Pokud progresse nádoru znemožňuje chirurgickou resekci a použití dalších konvenčních metod, jako je transarteriální chemická embolizace a systémová chemoterapie, je těžké je léčit kvůli nízké účinnosti a vysoké míře komplikací pak přenos terapeutických genů do nádorových či přednádorových tkání otevírá nové dveře k léčbě. Byla vyvinuta velká snaha na podporu tohoto přístupu na preklinické i klinické úrovni. Velký počet metod může být zvolen pro genovou terapii včetně aktivace tumor-supresorových genů, inhibice karcinogeneze a nádorové angiogeneze, podpory specifické citlivosti genu na léky, přenosu onkolytického viru a stimulace protirakovinné imunity. Přestože genová terapie nádoru jater byla prokázána jako účinná u většiny zvířecích modelů, stále chybí dostatečná informace o účinnosti a bezpečnosti této léčby u lidí. Terapeutické geny, dávání a administrace, typ vektoru a nádoru samotného jsou všechno složky, které je nutno pečlivě zvážit.

Genová terapie se používá hlavně jako doplněk konvenční léčby, a mnohé pokusy byly prováděny u pacientů s pokročilými nádory. Pro nedostatek údajů o léčbě rakoviny v počátečním stádiu může být podhodnocen reálný účinek genové terapie nádorů. Nicméně s prudce rostoucím klinickým testováním budeme mít dostatek informací pro analýzu a určení genové terapie. Ačkoliv pokusy na zvířecích modelech a některé pilotní klinické studie poukazují na slibnou budoucnost, genová terapie je stále na počátku [2].

Doposud při většině studií, které zkoumaly využití genové terapie při léčbě ischemické choroby, bylo použito dodání jediného genu. Tyto geny jsou buď rozhodujícími kontrolními body v základní patologii nebo představují začátek kaskády účinků. Další potenciální metody, které byly zkoumány v preklinických modelech, zahrnují užití více než jednoho aktivního genu nebo použití transkripčního faktoru pro expresi, což by mělo za následek indukci souboru genů. Elegantní metody pro zlepšení vývoje cévního systému byly předloženy v preklinických modelech s využitím vektorů nesoucích cévní endotheliální růstový faktor (VEGF) a angiopoetin nebo pomocí více izoform VEGF v různých poměrech. Tyto údaje naznačují, že revaskularizace může být efektivně dosaženo prostřednictvím komplexní simultánní aktivace různých cest. Potenciál byl rovněž prokázán pomocí *ex vivo* genové terapie fibroblastů s využitím adenovirových vektorů.

Studie zahrnující genovou terapii vedoucí ke stimulaci angiogeneze byly provedeny u pacientů s onemocněním periferního cévního systému. Účinnost terapeutické angiogeneze s využitím VEGF pro přenos genů byla zaznamenána u lidských pacientů s kritickou ischemií končetiny. Ačkoliv účinnost byla prokázána u zvířecích modelů a bezpečně ve fázi I v klinických studiích, jednoznačné důkazy o účinnosti nebyly prokázány u pokusů s placebo kontrolami. V budoucnosti bude potřeba optimalizovat vektory pro přenos genů, využití alternativních genů a/nebo rodinných genů a využití *in vivo* nosičů genů, což bude mít za výsledek efektivní doručení genu do cílových tkání. Tyto pokusy budou muset být po pečlivém vyhodnocení zvířecích modelů doplněny vhodnými klinickými testy [4].

V posledních několika letech bylo dosaženo značného pokroku ve využití genové terapie při léčbě artritidy. Existuje však mnoho překážek, které musí být překonány, než se stane možnost léčby realitou. Budoucí studie budou muset vyřešit zlepšení cíleného přenosu vektorů, regulace exprese transgenů, získání dlouhodobého transgenního projevu a zlepšení bezpečnosti a účinnosti vektorů před tím, než se genová terapie stane životaschopnou metodou pro klinickou léčbu u revmatoidní arteriální. Fáze I klinického hodnocení byla provedena pomocí retrovirálních vektorů dodávajících IL-1 receptory (IL-1ra) do fibroblastů. Buňky byly následně vpuštěny do kloubů RA pacientů. Při plánované arthroplastii o 1 týden později byl pozorován významný projev transgenu u ošetřených kloubů. Žádné nežádoucí účinky nebyly hlášeny [5].

Během let se v genové terapii hypertenze objevily dvě strategie: strategie vyřazení či snížení exprese genu a strategie zahrnující stimulaci či indukci přepisu genu. Avšak teprve transgenní strategie změny genetické sestavy byly úspěšné při snižování vysokého krevního tlaku nebo prevenci nárůstu krevního tlaku u pokusných zvířat. Předklinické studie na zvířatech s využitím kódující DNA (antisense – AS) byly mimořádně úspěšné a byly rozhodující při zajišťování koncepční podpory pro tuto strategii. AS má mnoho omezení, a proto nemusí být ideální pro použití u člověka. Například přestože systémové doručování virových vektorů obsahujících prověřenou a bezpečnou sekvenci je možné, systémové doručení AS u lidí není žádoucí, protože může nespecificky zacílit geny na nežádoucí místa [6].

Naštěstí je možné pracovat na zlepšení účinnosti a bezpečnosti současných protokolů, a tento vývoj je očekáván v klinických studiích poměrně brzy.

Výstavba nových vektorů používaných pro přenos genů je samozřejmě důležitá a jsou možné změny, které omezí riziko mutagenese, jako je začlenění DNA a RNA izolačních sekvencí do integračních vektorů, použití autoinaktivačních vektorů potlačujících silné virové enhancerové sekvence, nebo bezpečné cílení do oblastí genomu. Nakonec vývoj homologních rekombinací nebo genových oprav tak, aby přesně opravily genetické mutace, nebo výstavba mitoticky stabilních mimochromozomálních vektorů by odstranily mnohé z těchto problémů, ale současné technologie jsou nedostatečné.

Potenciál genové terapie v léčbě onemocnění člověka je zřejmý a klinická data jsou získávána. Nemělo by být zapomenuto, že doba mezi návrhem a potvrzením terapeutického úspěchu ani pokračující výskyt nežádoucích účinků spojených s dosavadními přístupy se neliší od dalších významných zdravotnických pokroků, jako je tomu například i u transplantace kostní dřeně a orgánů. Nepochybně podobné strategie budou použity i na další těžké smrtelné nemoci, ale také na větší počet nemocí spojených s významným zdravotním postižením [7].

Závěr

Z předloženého přehledu lze usuzovat, že využití genové terapie v léčbě civilizačních chorob je výzkumným zájmem mnoha vědců. Úspěchy pozorované u zvířecích modelů však ještě neznamenají jistý úspěch pro léčbu lidských nemocí, avšak podporují probíhající klinické studie. Pro přesné zhodnocení úspěšnosti chybí stále dostatek údajů. Některé modely se jeví jako velmi slibné, jiné byly zavrženy ihned v počátcích. Otázky etiky a bezpečnosti genové terapie by samozřejmě měly být zvažovány, ale na prvním místě by měl stát především zájem o bezpečnou léčbu pacienta a sledování jeho zájmů. Na konečnou odpověď vědců ohledně využití genové léčby nejen civilizačních chorob si budeme tedy muset ještě chvíli počkat.

Literatura

1. Mammen B., et al.: *Indian J. Dent. Res.*, 18, 196 (2007).
2. Jin X., et al.: *World J. Gastroenterol.*, 14, 2303 (2008).
3. http://cs.wikipedia.org/wiki/Civilizacni_choroba (12.10.2008).
4. Gaffney M. M., et al.: *Br. J. Pharmacol.*, 152, 75 (2007).
5. Traister R. S., Hirsch R.: *Mod. Rheumatol.*, 18, 2 (2008).
6. Raizada M. K., Der Sarkissian S.: *Hypertension*, 47, 6 (2006).
7. Thrasher A. J.: *Med. J. Aust.*, 182, 440 (2005).

Souhrn

V posledních letech se v důsledku moderního života, mimo jiné spojeného se zvyšováním příjmu kaloricky bohaté stravy a současným snižováním fyzického pohybu, rozvinula řada onemocnění nazývaná civilizační choroby. Použití genové terapie, která využívá manipulaci s genetickým materiálem pro léčbu civilizačních chorob, se stalo výzvou pro mnohé vědce a dosavadní výsledky výzkumů jsou shrnuty v této práci. Navzdory léčebnému potenciálu prokázanému u zvířecích modelů a v některých pilotních klinických studiích je genová terapie stále podrobována intenzivní diskuzi pro vedlejší účinky a etické problémy.

klíčová slova: genová terapie; civilizační choroby

Summary

Váňová K.: May the gene therapy help to treat civilization diseases?

In recent years, as a result of modern lifestyle associated with increased intake of energy-rich diet and reduced physical movement, a number of diseases has developed referred to civilization or lifestyle diseases. The introduction of gene therapy that uses the manipulation of genetic material, in the treatment of these diseases has become a challenge for many scientists. The present results of this research are summarized in this paper. Despite the demonstrated therapeutic potential in animal models and in some pilot clinical trials, gene therapy is still subject to intense debate for the side effects and ethical issues.

key words: gene therapy; civilization diseases

O B S A H

Káš J.: Úvodem	29
Rada Biotechnologické společnosti a revizní komise	30
Jiráková L.: Algináty – možnosti jejich přípravy a aplikace	31
Techlovská Š.: Bioléčiva	34
Strmisková M.: Klonovaná zvířata a jejich produkty ve výživě člověka (možnosti a současný stav)	39
Tichý J.: Jedlé vakcíny	43
Švéda M.: Mitosom – nová organela	46
Váňová K.: Pomůže genová terapie léčit civilizační choroby?	49

C O N T E N T S

Káš J.: Editorial	29
Executive Committee of the Biotechnology Society	30
Jiráková L.: Alginates – ways of their preparation and application	31
Techlovská Š.: Biosimilars	34
Strmisková M.: Cloned animals and their products in human nutrition (options and present status)	39
Tichý J.: Edible vaccines	43
Švéda M.: Mitosome – a new organelle	46
Váňová K.: May the gene therapy help to treat civilization diseases?	49

POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,

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

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako "attachment" spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem. Na konci článku uveďte **krátký souhrn** a klíčová slova. A to česky a **anglicky**.
2. Texty pište v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. Zarovnání do bloku, styl **NORMÁLNÍ**, nečíslovat stránky. Nerozdělujte slova na konci řádků. V textu lze používat zvýraznění některých termínů tučným písmem či kurzívou, a také horní a dolní index. Řádkování jednoduché. Odsazení odstavců a mezery mezi nimi nepoužívejte (nastavení = 0).
3. **Nepoužívejte** automatické číslování, tabulátory, ani „tvrdé“ definice stránek.
4. **CITACE** v textu uvádějte pouze číselným odkazem. Rozsah seznamu literatury nesmí být disproporční k rozsahu článku. Citace ve zkrácené formě **bez názvu práce**, pouze první 3 autory + et al., časopis oficiální zkratkou a Volume, 1. strana (Rok).
Např. Heath WR, Galli C, Smith JS, et al.: Appl Environ Microbiol 71, 182 (2005).
5. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
6. Připojte vždy svojí e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

Děkuji

L. Fukal

BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

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