
B I P R O S P E C T

Sedmnáctý ročník
Číslo 3/2007

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

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

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

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

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

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

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

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

B I P R O S P E C T

17th Volume
No. 3/2007

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,

jako vždy jsme se pro Vás snažili připravit přehledné články, které by Vás informovaly o nejrůznějších aktuálních tématech. V tomto čísle budete mít možnost se seznámit s ideou možnosti využití DNA ke konstrukci počítačů i s perspektivami aplikace protilátkových čipů v diagnostice. Zobrazovací techniky dosáhly vysoké úrovně a stále se rychlým tempem vylepšují, ale k jejich plnému praktickému využití je třeba zvládnout metody analýzy obrazu. Další článek je tedy příspěvkem k objasnění tohoto tématu. Výskyt látek simulujících hormonální aktivitu je velmi aktuálním diskutovaným problémem, a proto jsme mu také věnovali pozornost. Poslední přehledný článek v tomto čísle Vás informuje o regulačních mechanismech u bakterií, jejichž pochopení umožní přípravu nových antimikrobiálních léků, které by mohly být alternativou k léčbě antibiotiky. Předpokládá se i minimalizace rozvoje rezistence bakterií k těmto nově vyvinutým lékům.

Kromě přehledných článků Vám v našem Bioprospectu přinášíme i informace o různých událostech. Tentokrát to bude stručná zpráva o právě proběhlém 13. Evropském biotechnologickém kongresu v Barceloně (17. – 19. 9. 2007). V této souvislosti Vám doporučujeme občas navštívit webové stránky Evropské federace biotechnologických společností (EFB, www.efb-central.org), kde najdete řadu zajímavých

informací. Pokud budete mít zájem můžeme Vám posílat i měsíční elektronický bulletin EFB.

Z dalších významných biotechnologických akcí si Vám dovoluujeme znovu připomenout **13th International Biotechnology Symposium – IBS 2008**, sponzorované IUPACem, které se koná **12. – 17. října 2008 v čínském Dalianu**. Bližší informace lze nalézt (druhý cirkulář) na www.ibs2008.org. Nezapomeňte, že abstrakta mají být zaslána již do 30. listopadu 2007. Srdečně Vás zveme na již tradiční **4th Swiss-Czech Symposium**, které se bude organizováno našimi švýcarskými kolegy **22. – 23. 5. 2008 ve Wadenswill**. Bližší informace lze získat na webové stránce http://www.swiss-czech.net/about/_scope/.

Nezapoměňte, že aktuální informace publikujeme též na webu naší společnosti <http://bts.vscht.cz> a také na biotechnologickém portálu www.gate2biotech.cz. Upozorňuji též na řadu zajímavých akcí pořádaných Českou vědeckotechnickou společností (ČSVTS) a sesterskými organizacemi, které jsou rovněž členy ČSVTS (viz www.csvts.cz).

Těšíme se na Vaše příspěvky i komentáře, jak našemu bulletinu Bioprospect, tak i k webovým stránkám.

Váš
Jan Káš

EVROPSKÝ BIOTECHNOLOGICKÝ KONGRES V BARCELONĚ

Ve dnech 16. až 19. září se v katalánské Barceloně při příležitosti konference „13th European Congress on Biotechnology“ sešlo v přívětivém prostředí Fira de Barcelona-Montjuic více než 1200 účastníků ze 65 zemí. „**European Congress on Biotechnology**“ pořádá každé dva roky „European Federation of Biotechnology“ (<http://www.efb-central.org>), letos navíc za podpory Evropské komise (European Commission DG Research). Centrální téma konference, „*Symbiosis*“, připravilo v 6 tematických okruzích („Global Food Supply“, „Global Health“, „Global Water Supply“, Bioenergy & Bioeconomy“, „Ethical Issues in Biotechnology“ a „Chronic Diseases in the Developing World“) platformu pro odbornou debatu o úlohách a perspektivách moderních biotechnologií při řešení potřeb rozvinutých zemí a zemí třetího světa se zvláštním zřetelem na oblasti medicíny, produkce potravin a využití obnovitelných zdrojů energie. Integrovanou součástí vedených diskusí bylo i řešení politických, ekonomických a etických otázek souvisejících s rozvojem biotechnologického výzkumu a se zaváděním biotechnologií do reálné praxe. Čistě vědecký program konference probíhal ve 4 paralelních okruzích – „Health and Medicine“, „Functional Genomics and System Biology“, „Industrial (White) Biotechnology“ a „Green Biotechnology“. Organizátorům se podařilo zajistit pro plenární přednášky a jednotlivé tematické okruhy vedoucí kapacity jednotlivých oborů a postavili tak účastníky před opravdu nelehké rozhodování, kterých přednášek se účastnit.

V rámci okruhu „**Health and Medicine**“ byl představen podnik iniciativy pro inovativní léčiva („Innovative Medicines Initiative“; <http://www.imi-europe.org>), který si klade za cíl posílení postavení Evropy ve farmaceutickém výzkumu, oživení evropského farmaceutického odvětví, ztraktivnění Evropy pro investice do výzkumu a v dlouhodobém výhledu poskytnout evropským občanům rychlejší přístup k lepším léčivým přípravkům. Za tento neziskový podnik s rámcovým rozpočtem 2 miliardy EUR budou společně zodpovědní Evropská komise a Evropská federace farmaceutického průmyslu a asociací („European Federation of Pharmaceutical Industries and Association“, EFPIA), přičemž se předpokládá, že podnik bude schválen Evropskou komisí

v roce 2008. Odborné příspěvky pak byly prezentovány v 5 blocích: „Antibody-based Therapeutics“, „System Biology & Biosimulation“, „Biomarkers, Including Diagnostics & Imaging“, „Advanced Drug & Gene Delivery Systems“ a „Nanotechnology in Medicine“.

Úvodní blok okruhu „**Functional Genomics and Technology**“, „EC FP6 Proteome Binders: Alternatives to Antibodies“, byl uveden prezentací projektu „ProteomeBinders“ (<http://www.proteomebinders.org>), který od r. 2006 spojuje 26 institucí Evropské unie a 2 partnery z USA. Tento projekt, podporovaný 1,8 miliony EUR z prostředků 6. rámcového programu, si klade za cíl vytvořit soubor dobře charakterizovaných a spolehlivých ligandů, nejen charakteru protilátek, pro analýzu lidského proteomu primárně s využitím microarray technologií, který by našel široké uplatnění v diagnostice, vývoji léčiv a monitorování léčby. Zvláštní blok byl věnován projektu „Human Atlas Project“ (<http://www.proteinatlas.org/org.php>) a další příspěvky byly prezentovány v blocích „Genome Technologies“, „Comparative Genomics“, „Nanobiotechnology and Systems & Synthetic Biology“.

Okruh „**Industrial Biotechnology**“ byl rozdělen do 6 „tradičních“ bloků („Novel Enzymes & Microorganisms“, „Biocatalyst Function & Optimization“, „Biocatalytic Process Design“, „Innovative Downstream Process“, „Metabolic Engineering & Applied System Biology“ a „Fermentation Science & Engineering“). Stejný počet bloků byl v programu vyhrazen i okruhu Green Biotechnology (Biomass to Biofuels & Biomaterials, Plant-based Pharmaceuticals, Molecular Plant Breeding, Plant System Biology, 20 Years of Insect Control With Bt Technology a Novel Perspectives of GM Plants). Více informací o programu konference a dalších doprovodných akcích lze nalézt na <http://www.ecb13.eu>. Součástí konference byla i prezentace více než 600 plakátových sdělení (25 z ČR), jejichž abstrakta byla publikována ve zvláštním čísle 2S ze 131. svazku časopisu Journal of Biotechnology.

Pavel Kotrba, VŠCHT Praha

BUDEME MÍT DNA POČÍTAČE ?

Martin Meluzín

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

DNA počítač je zařízení využívající molekuly DNA pro provádění výpočetních operací. DNA v těchto počítačích může nahrazovat buď přímo vlastní polovodiče, nebo funguje jako součást výpočtové jednotky, tedy jakéhosi analogu polovodičového čipu. Zvláštní aplikací použití DNA ve výpočetní technice je pak využití nukleových kyselin pro ukládání dat^{[1][2]}.

V prvním případě se nejedná o klasický počítač, protože dvouvláknová DNA zde nahrazuje pouze funkci běžných polovodičů. Bylo experimentálně zjištěno, že krátká asi 30ti nukleotidová dvouvláknová DNA, obsahující pouze cytosin a guanin, vykazuje za určitých podmínek stejné vlastnosti jako křemík nebo galium. Tato technologie by mohla být bezpochyby dalším krokem ve stávajícím trendu miniaturizace počítačových součástek^[8].

V druhém případě tvoří molekuly DNA vlastní výpočtový systém, přičemž řešení daného problému získáme buď sekvenováním výsledné DNA, případně na základě jiných vlastností tohoto systému. Hlavním rozhodujícím parametrem je potom párování dvou komplementárních řetězců DNA, přičemž dvěma spárovaným řetězcům můžeme přiřadit logickou hodnotu 1, nespárovaným 0, případně obráceně, což je analogie běžného algoritmu používaného při programování. V této práci se budeme zabývat převážně těmito výpočetními aplikacemi^{[2][9]}.

Za zakladatele oboru výpočetní techniky využívající DNA je považován Leonard Max Adleman. Je spoluautorem šifrovacího systému RSA, jež je využíván v současné době jako standard při šifrování dat v komerční sféře. Je držitelem Turingovy ceny za práce z oblasti kryptografie, známé jsou i jeho práce z oblasti kombinatoriky, výpočtových simulací a teorie pravděpodobnosti. Adleman první prokázal možnost využití DNA za použití běžných poznatků molekulární biologie a genetiky k řešení složitých výpočetních úkolů. Je autorem prvního fungujícího výpočtového algoritmu využívajícího DNA a prvního výpočtového DNA počítače^[7].

Fungování DNA počítačů

V závislosti na konstrukci můžeme zařadit stávající experimentální modely DNA počítačů do dvou skupin. Provedení na pevné fázi, kdy je použita DNA imobilizována na povrch polymerního nosiče, případně na tenké vrstvě inertního kovu, převážně zlata nebo platiny. Více využívanou variantou je však klasické provedení v roztoku^[5]. Pro správnou funkci DNA počítače musí platit několik předpokladů. První, nejdůležitější skupi-

nou, jsou základní funkční předpoklady, zahrnující obecné vlastnosti nukleových kyselin. Nejdůležitějším z nich je předpoklad párování jednotlivých basí dle jejich vzájemné komplementarity, přičemž předpokládáme, že množství chyb vzniklých při párování je nulové. Tato podmínka je však při velkém množství reakcí nespílitelná a je hlavním zdrojem chyb při provádění výpočtů. Druhým nezbytným předpokladem je vratnost tepelné denaturace dvouřetězcové DNA, přičemž za daných podmínek musí být stabilní obě jednořetězcová vlákna DNA^{[3] [7] [10]}.

Matematickým předpokladem správného fungování DNA počítače je pak předpoklad paralelní existence mnoha řešení dané úlohy, přičemž v daném systému jsou přítomna vždy všechna možná řešení. Četnost výskytu jednotlivých výsledků odpovídá Poissonovu rozdělení. Záleží pak už jen na výběru vhodného řešení vyhovujícího podmínkám zadání úlohy. Řešením výpočtu je v případě DNA počítače konkrétní sekvence nukleotidů (úsek dvouřetězcové DNA) vzniklá kombinací a komplementací úseků jednotlivých oligonukleotidů, případně zjištění, zda jsou dvě daná vlákna jednořetězcové DNA k sobě komplementární^{[3][10]}. Velké nároky jsou v případě DNA počítačů kladeny na technické vybavení. Jak již bylo nastíněno, při paralelním průběhu všech operací je výsledkem výpočtu obrovské množství kombinací jednotlivých sekvencí. Velké nároky jsou kladeny na separaci hledaného výsledku, přičemž se především vychází z konkrétních vlastností, které u takového řešení očekáváme. V principu se vychází ze dvou základních metod^[2].

První metoda je založena na různé pohyblivosti vzniklých úseků DNA v elektrickém poli v polymerním, nejčastěji agarosovém, gelu a jejich dělení dle molekulové hmotnosti. Druhou metodou jsou pak afinitní separace, kdy se využívá interakce značených primerů, navázaných na hledanou DNA, s jejich partnery. Příkladem jsou například systém – streptavidin-avidin, kdy využíváme DNA primer o známé sekvenci označený avidinem a imobilizovaný streptavidin, případně biotinylované DNA primery. Nejčastěji je ale využívána separace v magnetickém poli, přičemž používáme primery ukotvené na povrchu železných kuliček velkých jen několik mikrometrů^[2]. Všechny tyto separace musí poskytovat při dělení pokud možno co největší rozlišení a nesmí při nich dojít ke kontaminaci separované směsi vnějšími faktory, například bakteriálními nukleasami. Separace řešení je hlavním faktorem ovlivňujícím délku trvání celého výpočtu. Většina navrhovaných optimalizačních parametrů pro zkrácení délky výpočtu je soustředěna právě na tuto fázi^[4].

Dalším důležitým krokem je amplifikace získané DNA pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) na požadované množství, aby bylo možno provést její sekvenaci, případně testovat její další vlastnosti. PCR však může působit jako zdroj chyb při následné analýze řešení^[3]. Nejdůležitějším parametrem pro funkci DNA počítače je množství DNA. Vychází se především z požadavků na řešení konkrétní úlohy. V běžném případě vycházíme z množství odpovídajícího řešení úlohy o 70 proměnných (M_i) s binární konektivitou 1000. Binární konektivita udává celkový počet vztahů mezi jednotlivými proměnnými. Každá z proměnných je reprezentována řetězcem o délce 10 nukleotidů a může nabývat pouze dvou hodnot – pravda (T), pokud se řetězce párují, případně pokud je konkrétní proměnná modifikovaná (1) – nepravda (F), pokud se nepárují nebo pokud je proměnná v původním stavu (0). Ve směsi jsou dále přítomny 10ti nukleotidové úseky pro počátek (O_5) a konec sekvence (O_3). Celkově je tedy ve směsi obsaženo 2^{70} různých řešení o obecném složení $O_5 M_1 M_2 \dots M_{70} O_3$, každé o délce 720 nukleotidů, což při průměrné hmotnosti 300 Da na jeden nukleotid odpovídá přibližně 425 g DNA^[3]. Při použití zmíněného množství DNA dosahuje za definovaných podmínek počítač výkonu přibližně kolem $1,2 \times 10^{18}$ operací za sekundu. V tomto případě bylo použito všech 140 separačních kroků odpovídajících zvlášť každému stavu všech proměnných. Při použití Liptonova optimalizačního algoritmu dosahuje tento počítač rychlosti až $1,6 \times 10^{20}$ operací za sekundu. Principem algoritmu je selekce vhodných řešení při použití několika parametrů najednou, čímž je možné zefektivnit proces separace jednotlivých řešení úlohy a urychlit tak výpočet^[4].

Aplikace

Hlavním problémem při sestavování výpočetní úlohy pro DNA počítač je převod původního zadání úlohy do „řeči“ nukleotidů a následně zpětné převedení získaného řešení do jazyka původní úlohy. Vhodným příkladem tohoto procesu je Adlemanovo řešení tzv. „Hamiltonovy cesty“. Tato kombinatorická úloha je známa spíše pod názvem „Problém obchodního cestujícího“ a jde o první úlohu vypočítanou pomocí DNA počítače^[13]. Cílem výpočtu je najít ideální cestu mezi zvoleným počtem bodů za použití předem definovaných zadaných jednosměrných spojníc, přičemž žádným bodem se nesmí projít dvakrát. Startovní a koncový bod je rovněž pevně zadán. V této první úloze bylo použito čtyř bodů s celkem šesti spojkami. Jen pro srovnání, lidský mozek je schopen vyřešit tuto úlohu během asi 2 vteřin, její první výpočet na DNA počítači trval 8 dní. Při stoupajícím počtu bodů se však úloha stává pro člověka neřešitelnou, zatímco pomocí DNA počítače lze výsledek získat relativně rychle^{[2][3][13]}.

Při řešení úlohy byla každému bodu přiřazena identifikační sekvence o délce osmi nukleotidů, například pro bod 1 ACTTGCAG (komplementární řetězec TGAACGTC) a pro bod 2 TCGGACTG (komplementární

řetězec AGCCTGAC). Každé spojnici byla přiřazena sekvence rovněž osmi nukleotidů obsahující v první čtveřici nukleotidů vždy kód příslušející koncové sekvenci výchozího bodu, ve druhé čtveřici pak kód příslušející počáteční sekvenci koncového bodu. Spojnici z bodu 1 do bodu 2 by tedy byla přiřazena sekvence GCAGTCCG. Vzájemná kombinace sekvencí všech požadovaných spojníc a řetězců komplementárních s kódem pro jednotlivé body pak poskytne jednotlivá řešení úlohy. Podle zadání pak musíme pouze vybrat ta řešení, ve kterých se vyskytují všechny použité body právě jen jednou a počáteční a koncový bod cesty odpovídá zadání^[2]. Tato úloha je obecně použitelná například při hledání optimální nejkratší cesty mezi velkým počtem bodů, tedy řešení úlohy nazývané „Problém obchodního cestujícího“. Zde je ovšem nutné použít jiné kódování spojníc, přičemž délka jednotlivé spojnice je vždy úměrná skutečné srovnávané vzdálenosti. Při selekci řešení pak vybíráme nejkratší sekvenci obsahující všechny požadované body jen jednou^{[1][2]}.

Z uvedeného příkladu je dobře patrné, že DNA počítač je velice dobře použitelný při řešení úloh, kde je potřebné srovnávat velké množství parametrů najednou. Podobnými úlohami jsou například „Výběr automobilů“, kde srovnáváme velké množství parametrů u velkého množství jednotlivých značek nebo „Problém tří barev“, kde se hledá řešení, zda je možno definovanou plochu rozdělenou na definovaný počet sektorů vybarvit při použití tří barev aniž by mezi sebou přímo sousedily 2 sektory stejné barvy^[11].

Praktické využití

Většina úloh řešených pomocí DNA počítačů spadá do oblastí kombinatoriky a teorie grafů. Jedním z hlavních odvětví, kde bude pravděpodobně jednou tato technologie plně a efektivně využitelná, je kryptografie. Díky velkému paralelismu všech probíhajících dějů a velkému výpočetnímu výkonu by bylo tímto způsobem možné luštit složité kódy v krátkém čase. Například 64bitový kód s 56bitovým klíčem by bylo dle počtů možno rozluštit přibližně během dvou měsíců, zatímco při použití nejvýkonnějších nynějších počítačů by dešifrování trvalo dle odhadu necelých 130 let. Zde se však nabízí otázka, zda tato technologie nebude v tomto ohledu zneužitelná. V ideálním případě by naopak mohlo její použití vést k vytvoření nových efektivnějších a bezpečnějších kódovacích algoritmů^{[1][9][12][13]}.

Hlavní možnost využití DNA počítačů se nabízí při analýze genů a identifikaci genomových mutací. V současné době je ve zkušebním provozu DNA počítač sloužící právě k průzkumu a identifikaci genů. Zařízení bylo vyvinuto společností *Olympus Optical* ve spolupráci s *Novousgene*, přičemž prozatím se používá pouze pro výzkumné a testovací úlohy. Nicméně v blízké budoucnosti se pravděpodobně počítá s komerčním využitím^{[5][6]}.

Zvláštní odvětví aplikací DNA počítačů pak tvoří DNA čipy. Využívají se jako velice citlivé detektory v mnoha

oblastech výzkumu i ve zdravotnictví. V současnosti je k dispozici velké množství komerčně dodávaných senzorů pro různé účely, převážně se jich využívá pro identifikaci mutací genů, případně některých dědičných onemocnění. Jednou z velice nadějných současně testovaných aplikací, je použití DNA pro ukládání dat. Na 1 gram suché DNA by mohlo jít uložit dle předběžných propočtů až 7×10^{10} MB. Modifikací jednotlivých basí je možno řádově zvýšit již tak velkou kapacitu tohoto media. Zatím však nebyly plně vyřešeny problémy spojené s vlastním uložením dat a jejich opětovným získáním. Hlavním nedostatkem je zde chybovost modifikačních reakcí, stejně jako možný vznik chyb při komplementaci řetězců DNA. V takovém případě by došlo k nevratné ztrátě dat^[2].

Závěr

DNA počítače jsou velmi perspektivní technologií, využitelnou v budoucnu v mnoha oborech. Hlavní výhodou DNA počítačů je jejich velmi vysoký výpočetní výkon, dále pak rychlost a velmi malé rozměry v porovnání se současnými superpočítači. Hlavním záporem je relativní jednoúčelovost těchto zařízení. Současné DNA počítače jsou zatím schopny řešit pouze jednu konkrétní úlohu, případně kombinovat více jednoduchých úloh, nicméně v porovnání se současnou výpočetní technikou není tato aplikace použitelná pro globální

využití jakožto náhrada stávajících počítačů. Většina zde popisovaných řešených problémů má pouze výzkumný charakter a prozatím je není možné aplikovat do praxe. Každopádně však mají všechny velký význam pro bližší pochopení a realizaci některých dříve neřešitelných teoretických početních úloh. Dalším problémem, se kterým se toto odvětví potýká, je nezanedbatelná pravděpodobnost vzniku chyb v řešení ať už během separace řešení, komplementace řetězců, nebo při amplifikaci vlastní DNA. Při objevení mutace je pracně hledané řešení většinou ztraceno a pokus se musí opakovat, což při poměrně vysokém množství potřebné DNA působí nezanedbatelné finanční ztráty. Rovněž velké nároky jsou kladeny na použité enzymy pro práci s DNA.

Problémů, se kterými se prozatím toto odvětví potýká, je skutečně mnoho. Kromě využití DNA počítačů při analýze genů a použití DNA čipů jsou všechny výše zmíněné aplikace stále v experimentální, případně teoretické fázi. I tak lze předpokládat, že jednou budou komerčně využitelné, nicméně konkrétní časový horizont realizace těchto projektů je těžko odhadnutelný. Minimálně však v řádu deseti a více let. Stejně tak technologie nahrazující běžné polovodiče by mohla být v budoucnu realizovatelná, zde je však časový horizont globálního využití ještě vzdálenější, neboť tento výzkum je teprve v počátku^{[2][5][9][13]}.

Literatura:

1. Adleman L.M.: Science **266**, 1021 (1994).
2. Adleman L.M.: Sci. American **279**, 54 (1998).
3. Adleman L. M.: On constructing a molecular computer. Draft. Jan. 11, 1994
4. Lipton R.: Speeding up computations via molecular biology. Draft. Dec. 9, 1994
5. Amos M.: Theoretical and Experimental DNA Computation. Springer. ISBN 3-540-65773-8.
6. Boneh D., Dunworth Ch., Lipton R., Sgall J.: On the Computational Power of DNA. DAMATH: Discrete Applied Mathematics and Combinatorial Operations Research and Computer Science 71.
7. <http://www.usc.edu/dept/molecular-science/main.html> (2006)
8. <http://www.fi.muni.cz/usr/jkucera/pv109/2000/xfrolik.htm#nanotechnologie> (2004)
9. <http://www.scienceworld.cz/sw.nsf/ID/8E3DD9FDD2FB883FC1256E9700489ACD?OpenDocument> (2002)
10. <http://www.scienceworld.cz/sw.nsf/ID/436FED58C1AFF785C1256E9700489ACC?OpenDocument> (2003)
11. <http://www.scienceworld.cz/sw.nsf/ID/19FDF7B83CCDE6BDC1256E970048A0A8?OpenDocument> (2002)
12. <http://www.scienceworld.cz/sw.nsf/ID/453F0AAC63B86E4DC1256E9700489BA9?OpenDocument> (2002)
13. <http://www.scienceworld.cz/sw.nsf/ID/EA3B8E753865C105C1256E9700489BAA?OpenDocument> (2003)

PERSPEKTIVY VYUŽITÍ PROTILÁTKOVÝCH ČIPŮ V DIAGNOSTICE

Markéta Landová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

V posledních letech došlo k velkému rozvoji čipových technologií, a to nejen v oblasti DNA čipů, ale také v oblasti proteinových čipů. Hlavní výhodou těchto technologií je možnost simultánní analýzy tisíců molekul v jednom jediném rozboru, což přináší možnost komplexního pohledu na řešenou problematiku. Další výhodou je miniaturizace čipů, která umožňuje analýzu i malého množství sledovaného vzorku. To je důležité hlavně v medicínských aplikacích, kde často není možné větší vzorek odebrat. Na rozdíl od DNA čipů, kde jsou na pevném nosiči imobilizovány oligonukleotidy, PCR produkty či cDNA, jsou proteinové čipy tvořeny nosičem s ukotvenými proteiny (purifikovanými rekombinantními proteiny, protilátkami nebo proteiny získanými z celých nebo frakcionovaných buněčných lysátů). I přesto, že proteinové čipy jsou technologií mladší než DNA čipy, mají velkou perspektivu stát se vedoucí technikou v analýze exprese proteinů, diagnostice chorob či kvantitativní analýze. Jestli se této role zhostí úspěšně ukáže teprve budoucnost.

Co jsou to protilátkové čipy?

Protilátkové čipy (antibody microarrays) jsou jedním z typů proteinových čipů. Proteinové čipy totiž můžeme, podle typu imobilizovaných molekul, dělit na „standardní“ proteinové čipy s purifikovanými rekombinantními proteiny, protilátkové čipy s protilátkami a reversní proteinové čipy s imobilizovanými celými či frakcionovanými buněčnými lysáty. Ačkoliv se jejich aplikace mohou lišit, jejich společným cílem je detekce interakčních partnerů, kterými mohou být jak proteiny, tak protilátky a další diagnosticky zajímavé molekuly [1].

Protilátkové čipy mají dvě základní použití. První je použití čipu k analýze proteomu, kdy jsou na nosiči imobilizovány protilátky se známou interakcí k určitým proteinům. Takto vytvořené čipy slouží k porovnávání biologických vzorků, s cílem určit relativní rozdíly v expresi proteinů. Nejčastěji jde o porovnávání exprese proteinů ve zdravé a nemocné (či jiným způsobem ovlivněné) tkáni nebo porovnávání exprese proteinů v různých orgánech v rámci jednoho organismu. Dále lze tyto čipy použít např. k detekci různých diagnosticky zajímavých proteinů. Druhé využití je v charakterizaci protilátek, kdy jsou na čipu ukotveny protilátky, které jsou charakterizovány interakcí se známými purifikovanými proteiny.

Protilátky jako senzorové molekuly

Ideálním nástrojem pro analýzu proteomu by byl takový čip, který by obsahoval ligandy s vysokou afinitou a specifitou pro každý protein ve zkoumaném proteomu. Pro lidský proteom by to znamenalo nut-

nost izolace více než 100 000 ligandů, aby bylo možno detekovat všechny proteiny i s jejich různými posttranslačními modifikacemi [2].

Jako ligandy se často používají monoklonální protilátky, které mají současně vysokou afinitu i specifitu. Limitací jejich použití je jejich komerční dostupnost, jelikož množství na trhu dostupných monoklonálních protilátek je nedostatečné pro analýzu celých proteomů. Získání desítek tisíc monoklonálních protilátek potřebných pro protilátkové čipy by bylo velmi nákladné a časově náročné, a proto byly vyvinuty nové postupy k získávání rekombinantních protilátek [3].

Rekombinantní protilátky jsou získávány z DNA expresních knihoven a nejčastěji jsou produkovány jako scFv (single chain antibody fragment) nebo Fab fragmenty [4]. Zavedením tzv. display technologií (fágový display, ribozomální display nebo mRNA display), které zprostředkovávají fyzické propojení kódujícího genotypu s fenotypem, umožnilo velmi efektivní práci s velkými expresními knihovnami. Z těchto technologií je pro protilátkové čipy nejvíce používán fágový display, který umožňuje expresi celé knihovny protilátek ve fúzi s povrchově vystaveným obalovým proteinem vláknitého fága (např. s proteiny gpIII nebo gpVIII u vláknitého fága M13) [5]. Výhodou tohoto systému je velké množství klonů a možnost randomní mutagenese a následné selekce nejlépe interagujících partnerů, což umožňuje připravit protilátky s co nejvyšší afinitou a specifitou. Navíc je v tomto systému k dispozici odpovídající gen, který je možno dále klonovat do libovolného expresního vektoru. Další výhodou rekombinantních protilátek je jejich menší molekulární hmotnost a možnost orientovaného ukotvení k nosiči.

Pevné nosiče pro protilátkové čipy

Klíčovým krokem pro přípravu protilátkového čipu je ukotvení protilátek k povrchu pevného nosiče v biologicky aktivní formě. Výběr nosiče ovlivňuje nejen způsob imobilizace protilátek a jejich biologickou aktivitu, ale i kvalitu vlastní analýzy, protože odpovídá za vznik pozadí vzniklého nespecifickou vazbou proteinů k nosiči.

Jako pevné nosiče byly navrženy např. nosiče plastové (polystyrenové), skleněné či membránové (nitrocelulosové, nylonové) nebo nosiče s gelovým povrchem. Některé nosiče mají schopnost pasivní adsorpce protilátek (polystyrenové, membránové nosiče), jiné musí být pro vazbu protilátek modifikovány.

Nejběžněji používaným nosičem pro protilátkové čipy jsou skleněné nosiče, oblíbené pro jejich snadnou aplikovatelnost, stálost a optické vlastnosti. Protože skleněné povrchy nejsou vhodné pro pasivní adsorpci protilátek, byly navrženy různé způsoby jejich modifikace, z nichž se jako nejvhodnější pro vazbu protilátek jeví modifikace pomocí glycidoxypropyltrimethoxysilanu

(GPTS). Jinou často používanou modifikací je modifikace poly-L-lysinem (PLL).

Zajímavé jsou protilátkové čipy se skleněným nosičem s vrstvou porózního gelu. Tyto vysoce porózní gely mají vysokou kapacitu pro vazbu protilátky a díky homogennímu vodnému prostředí zabraňují denaturaci proteinů. Nevýhodou je jejich komplikovaná výroba.

Při imobilizaci protilátek na povrch čipu nespecifickou adsorpcí či kovalentním připojením dochází k navázání protilátek v náhodné orientaci a zvyšuje se pravděpodobnost konformačních změn a denaturace. I při dostatečné hustotě ukotvených protilátek může jejich náhodná orientace způsobit snížení přístupnosti volných vazebných míst. Proto je vývoj zaměřen na produkci čipů s uniformě orientovanými protilátkami, s cílem zajistit co nejlepší dostupnost jejich vazebných míst [3].

Orientovaná imobilizace přírodních protilátek

Protilátky mohou být orientovaně imobilizovány k povrchu čipu například pomocí karboxylových skupin na jejich Fc regionu. Takto ukotvené protilátky vykazují lepší vazebnou kinetiku než jsou-li ukotveny náhodně. Tato metoda však vyžaduje aktivaci protilátek krátce před imobilizací a následné přečišťovací kroky. Další alternativou je pomocí pepsinu odštěpit Fc doménu a rozštěpit pomocí slabého redukčního činidla disulfidové můstky, které váží dohromady Fab domény. Uvolněné cysteinové thiohy pak mohou být využity k vazbě Fab domén protilátky na povrch čipu [6]. Protilátky lze orientovaně imobilizovat také prostřednictvím proteinu, který váže Fc doménu protilátek. Tímto proteinem může být protein A, protein G nebo protilátka specifická pro Fc doménu. Nevýhodou této metody je nutnost dvou imobilizačních kroků (imobilizace vazebného proteinu a následně imobilizace protilátky), což mívá za následek nižší hustotu ukotvené protilátky. Další možností může být ukotvení biotinylovaných protilátek k streptavidinem modifikovanému povrchu [3].

Strategie pro ukotvení rekombinantních protilátek

Rekombinantní protilátky nabízejí, na rozdíl od přírodních protilátek, možnost fúze s kotvícím proteinem. Tento protein musí být ve fúzi s protilátkou tak, aby umožnil orientovanou imobilizaci a zároveň nezhoršil vazebné schopnosti protilátky, což může být klíčovým problémem. Jako kotvící proteiny byly použity např. β -galaktosidasa, vazebný protein pro maltosu (MBP) z *E. coli* a proteiny vázající kalmomodulin a celulosu [3].

Detekční systémy

Detekční systémy pro proteinové čipy se dělí na dvě základní skupiny, systémy využívající značení proteinů a tzv. bezznačkové systémy. Mezi systémy využívající značení proteinů patří i nejčastěji používaný systém značení proteinů pomocí fluoroforů. Většina dosud popsaných protilátkových čipů je založena právě na fluorescenčních či chemiluminiscenčních detekčních metodách. Výhodou je možnost vyhodnocování těchto čipů na čtečkách navržených původně pro DNA čipy. Nevýhodou může být nedostatečná senzitivita této metody pro proteiny vyskytující se

ve velmi nízkých koncentracích, jako např. cytokiny a chemokiny. Možností k zvýšení senzitivity je značení pomocí nové třídy fluorescenčních práb tzv. kvantových teček (QDs-quantum dots), kde QDs jsou enkapsulované nanokrystaly polovodičů. Tyto nové fluorescenční próby jsou dostupné pro mnoho různých vlnových délek a mají velký potenciál pro multiplexní analýzy mnoha různých vzorků na jediném čipu [1]. Zesílení signálu je možno dosáhnout prostřednictvím metody RCA (rolling circle amplification) nebo metody TSA (tyramide signal amplification). Obě tyto metody značně zvyšují senzitivitu detekce, jejich nevýhodou však je jejich časová náročnost a potřeba dvou specifických protilátek pro každý měřený protein (obě metody totiž využívají sendvičový model, nejde zde o přímé značení měřených proteinů) [3]. Hlavní nevýhodou přímého značení je nižší senzitivita detekce a také skutečnost, že některé proteiny jsou značeny efektivněji než jiné proteiny. K vyhodnocení signálu tedy potřebujeme kalibrační křivky vytvořené pomocí dobře charakterizovaných standardů; bez nichž by byly hodnoty signálu bezcenné. Z tohoto důvodu se při expresních analýzách často používá porovnávání testovaného vzorku se vzorkem standardním. K bezznačkovým systémům detekce patří např. hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF; matrix-assisted laser desorption/ionisation coupled with time-of-flight analyser, SELDI; surface-enhanced laser desorption/ionisation) nebo metoda využívající optického fenoménu povrchové plasmonové resonance (SPR). Poslední jmenovaná metoda umožňuje měření biospecifických interakcí v reálném čase [7].

Protilátkové čipy versus DNA čipy

Expresí proteinů lze studovat jak pomocí DNA čipů tak pomocí protilátkových čipů. Hlavní problém DNA čipů je ten, že množství mRNA ne vždy koreluje s množstvím sledovaného proteinu. Po objevu μ RNAs bylo nutno výsledky, do té doby získané pomocí DNA čipů, přehodnotit. V případech, kdy množstvím mRNA a proteinu přece jen koreluje, existuje časový posun. Tento časový posun je různý pro každý pár mRNA-protein. Výhodou protilátkových čipů je to, že detekujeme přímo studované proteiny. To nám umožňuje např. rozlišení jednotlivých posttranslačních modifikací, což není pomocí DNA čipů možné. Jejich nevýhodou je stále ještě nedostatečná standardizace a reprodukovatelnost a také kratší životnost proteinových čipů při skladování.

Využití protilátkových čipů v diagnostice

V současné době nejsou stále ještě proteinové a protilátkové čipy používány v rutinní diagnostice jako běžné analytické metody. Jsou spíše považovány za nástroje pro studium proteomu a ne pro rutinní praxi [3]. Aby mohly být proteinové čipy zavedeny ve větší míře do praxe, je potřeba zvýšit jejich senzitivitu, jelikož diagnostikované vzorky bývají často dostupné jen ve velmi malém množství. Většina publikovaných systémů s protilátkovými čipy pracuje s detekčním limitem v řádu jednotek až stovek nanogramů na mililitr, ale tato senzitivita není dostatečná např. pro mnohé klinicky zajímavé pro-

teiny [8]. Důležitými předpoklady pro zvýšení senzitivity protilátkových čipů jsou dostatečné množství protilátek s vysokou afinitou a specifitou a citlivé detekční systémy. Rekombinantní protilátkové čipy jsou velmi slibnou technologií, ale jsou zatím stále ve stádiu vývoje. Prakticky všechny protilátkové čipy existující v rutinní diagnostice jsou zatím založeny na tradičních monoklonálních a polyklonálních protilátkách. Důležitým předpokladem je také aplikovatelnost čipů na vzorky používané v diagnostice (tělní tekutiny, tkáňové vzorky a biopsie v klinické praxi) a zlepšení kvantifikace, standardizace [9] a opakovatelnosti experimentů. K oblastem s možností využití čipů v klinické diagnostice patří zejména detekce biomarkerů chorob z krevního séra (např. rakovinové biomarkery, cytokiny) a dále hodnocení průběhu léčby a její optimalizace. Mimo klinickou praxi mají protilátkové čipy velkou perspektivu v oblasti kontroly životního prostředí a kontroly kvality (např. v potravinářském průmyslu).

Literatura:

1. Hultschig C., Kreutzberger J. et al.: *Cur. Opin. Chem. Biol.* **10**, 4 (2006).
2. Kodadek T.: *Chem. Biol.* **8**, 105 (2001).
3. Pavlickova P., Schneider E.M., Hug H.: *Clin. Chim. Acta.* **343**, 17 (2004).
4. Konthur Z, Hust M, Dubel S: *Gene* **364**,19 (2005).
5. Ruml T, Rumlová M, Pačes V: *Genové inženýrství. VŠCHT Praha 2002*

Závěr

Proteinové a protilátkové čipy jsou velmi slibnými technologiemi pro další rozvoj diagnostiky. V klinické diagnostice povede jejich používání k lepšímu porozumění chorobných procesů, výzkumu rakoviny, vývoji nových léků a objevům a evaluaci nových biomarkerů chorob. V krajním pojetí bude možné navrhovat individuální čipy pro jednotlivé pacienty a testovat paralelně vzorky z různých částí těla nebo z různých časových období jejich onemocnění. Takto bude možné hodnotit zlepšení či zhoršení jejich stavu, navrhovat léčbu a optimalizovat podávání léků. Tímto způsobem by mohly proteinové čipy pomoci ke konceptu individualizované lékařské péče. V oblastech mimo klinickou diagnostiku mají protilátkové čipy velký potenciál v kontrole životního prostředí a v kontrole kvality potravin.

6. Peluso P., Wilson D. S. et al.: *Anal. Biochem.* **312**, 113 (2003).
7. Hock B., Seifert M., Kramer K.: *Biosens. Bioelectron.* **17**, 239 (2002).
8. Miller J. C., Zhou H., Kwekel J. et al.: *Proteomics* **3**, 65 (2003).
9. Eckel-Passow J. E., Hoering A. et al.: *Cancer Res* **65**, 2985 (2005).

METODA ANALÝZY OBRAZU

Tereza Krulíková

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, tereza.krulikovska@vscht.cz

Úvod

Lidský jedinec využívá primárně pro vnímání svého okolí zrak. A také se již od nepaměti snaží věrně napodobit objekty vyskytující se v jeho okolí. Nejprve k tomuto účelu využíval kresby, později fotografie a počátkem 20. století byla vyvinuta technologie, která umožnila vytvářet obrazy pomocí matice velkého počtu světlo generujících elementů různé světelné intenzity a barvy. Touto převratnou technologií je televize, jejíž princip byl převzat i monitory počítačů. V následujícím období došlo k prudkému rozvoji a hlavně zlevnění osobních počítačů, což umožnilo jejich rozšíření mezi širokou veřejnost, a tedy i do výzkumných laboratoří. Bouřlivý rozvoj zařízení sloužících k digitálnímu záznamu v posledním desetiletí vedl k rozvoji metody analýzy obrazu a jejímu zavedení do nových oblastí. Metoda analýzy obrazu v řadě aplikací usnadnila a zrychlila celý proces získávání dat, popř. dovolila rozvoj nových metodických postupů.

Tento stručný přehled by měl čtenáři poskytnout základní informace o metodě analýzy obrazu a jejím využití v oblastech mikrobiologie a potravinářství.

Co je obraz

Obraz chápeme jako vjem předmětu na sítnici lidského oka nebo obraz sejmutý TV kamerou. Můžeme jej matematicky popsat pomocí spojité skalární funkce dvou souřadnic v rovině $f(x,y)$ nebo tří proměnných $f(x,y,t)$ pokud se plošný obraz mění v čase nebo $f(x,y,z)$ v případě objemových obrazů. V počítači pracujeme s digitalizovanými obrazy, kde je funkce $f(x,y)$ nahrazena maticí. Prvky matice jsou obrazové elementy nazývané pixely.

Porozumění obrazovým datům

Člověk k vyhodnocování obrazových vjemů (dat) využívá mozek, ale k jejich správnému pochopení potřebuje i předchozí zkušenosti. Inteligence umožňuje využít dlouho nabyvané znalosti a zkušenosti o okolním světě a jejich využití k řešení nových úloh. Počítačová interpretace obrazů se snaží napodobit tento proces lidského vnímání a také na rozdíl od lidského vnímání musí překonat řadu překážek:

- převodem trojrozměrné scény do dvojrozměrné dochází ke ztrátě informace,
- mezi jasným měřeným kamerou a tvarem povrchu objektů neplatí jednoznačný vztah, jas bodu závisí

na odrazivosti povrchu, poloze, vlastnostech zdrojů světla, na orientaci povrchu předmětu vzhledem k pozorovateli,

- při počítačovém zpracování obrazu musíme počítat se šumem.

Metoda analýzy obrazu

V literatuře se setkáme se dvěma metodami zabývajícími se zpracováním obrazu. Jedná se o metody „image processing“ a obrazovou analýzu („image analysis“). Podstatou obou metod je získání nové informace z obrazu, rozdíl mezi metodami je určen charakterem této nové informace. V případě metody „image processing“ je představitelem nové informace obraz nesoucí novou informaci, která nebyla patrná před úpravou obrazu. V případě metody analýzy obrazu („image analysis“) je touto novou informací soubor dat, charakterizující objekty v obraze, např. jejich velikost, vzdálenost mezi nimi apod.

V této práci se podrobněji zaměříme na metodu analýzy obrazu a její aplikaci v mikrobiologii a potravinářském průmyslu. Tato metoda se skládá z několika kroků, jejichž stručný přehled je uveden na následujícím diagramu (Obr. 1).



Obr. 1. Schéma metody analýzy obrazu

1. Záznam obrazových dat

K záznamu se používají různá zařízení:

- skenery-pro stacionární předlohy (tisky, diapozitivy, negativy),
- digitální fotoaparáty- mikro a makro snímky,
- digitální kamery-záznam sekvencí.

U všech těchto aplikací můžeme najít společný záznamový prvek (CCD nebo CMOS senzor). Princip záznamu spočívá v konverzi světelného záření dopadajícího na jednotlivé obrazové elementy světločivného senzoru na elektrický náboj. Počet lokálně generovaných elektronů přitom odpovídá intenzitě dopadajícího světla.

2. Digitalizace

Při procesu digitalizace dochází ke vzorkování obrazu v matici $M \times N$ bodů a v kvantování spojité jasové úrovně každého vzorku do K intervalů. Díky kvantování nabývá jasová funkce v digitalizovaných obrazech celočíselných hodnot. Platí, že čím menší je vzorkování (větší $M \times N$) a kvantování, tím lépe je aproximován původní spojitý obrazový signál. Ze skutečnosti, že pixely mají konečnou velikost vyplývá, že pomocí matice pixelů nelze zobrazit větší detaily než je polovina vzdálenosti pixelů. Tato podmínka se nazývá Shannonův vzorkovací teorém.

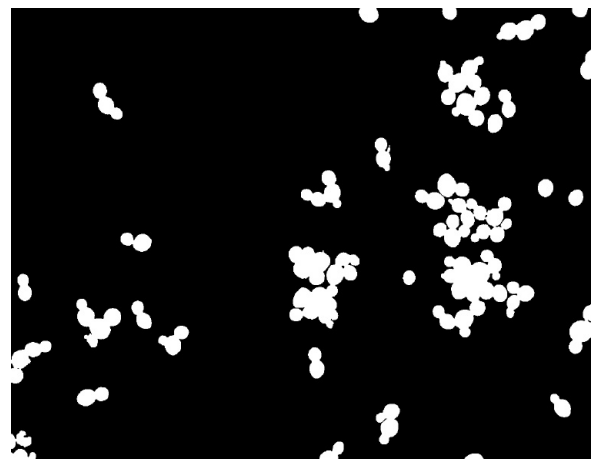
3. Úprava obrazu před vlastní analýzou

Ve většině případů je nutno obraz před vlastní analýzou předzpracovat. K tomuto účelu se využívá řada funkcí:

- rozklad na barevné složky: na jednotlivé složky RGB, do škály šedých odstínů apod.,
- bitové operace: jednoduché aritmetické, logické a podmíněné operace mezi barevnými složkami jednotlivých pixelů obrazu,
- využití filtrů: vyhlazovací, hranové, derivační nebo integračně derivační; podstata filtrace spočívá v modifikaci obsahu pixelu, tedy jeho barevné informace, s ohledem na nejbližší okolí; k úpravě se nejčastěji používá čtvercová matice.

4. Segmentace

Jedním z klíčových kroků zpracování obrazu je segmentace, tj. rozdělení obrazu na regiony, které pravděpodobně odpovídají objektům našeho zájmu. O segmentaci se často mluví jako o procesu, kdy dochází k separaci obrazu na pozadí a popředí. Segmentace obrazu se provádí pomocí funkce prahování (thresholding), kterou definujeme rozmezí hodnot jasu, vše uvnitř tohoto rozmezí je definováno jako popředí (objekty), vše mimo tento interval jako pozadí. Tímto procesem vzniká obraz, který nazýváme binární (Obr. 2).



Obr. 2. Binární obraz: objekty jsou definovány bílou barvou, pozadí je černé

5. Úprava binárního obrazu

Binární obrazy vytvořené procesem prahování jsou jen málokdy použitelné pro další zpracování a je nutná jejich následná úprava. K tomuto účelu se nejčastěji využívají metody matematické morfologie k nimž patří:

- erose
- dilatace
- jejich kombinace-např. uzavření, otevření.

Tyto operace můžeme popsat jako přidání nebo odstranění pixelů z binárního obrazu na základě určitých pravidel. Při erosi dochází k „vypnutí“ pixelů, které byly před touto operací „zapnuty“. Touto operací tedy odstraníme pixely, které již nadále v obraze nechceme. Dilatace je opakem erose. Používá se tam, kde je nutno přidat další pixely, které byly po procesu prahování součástí pozadí (např. přidání pixelů v okolí hranic objektu). Je nutné si uvědomit, že obě tyto operace zvětší, popř. zmenší plochu objektů.

Další operace matematické morfologie jsou již kombinací erose a dilatace. Jedná se např. o funkce otevření a uzavření. V případě otevření se jedná o erosi následovanou dilatací, výsledkem této operace je rozdělení dotýkajících se objektů. Uzavření představuje naopak dilataci následovanou erosí, funkci používáme k uzavření objektů nebo k propojení objektů nacházejících se těsně vedle sebe.

6. Měření

Až dosud popsané kroky jsou společné pro obě metody: „image processing“ i metodu obrazové analýzy. Následující krok měření již spadá pouze do metody analýzy obrazu. Rozeznáváme dva druhy měření: měření objektů a měření pole. Měření pole se uplatňuje při studiu trojrozměrných objektů zobrazených v podobě planárních řezů, metodu využíváme např. při studiu porosity materiálu nebo při sledování tvorby mikrobiálního biofilmu. Druhý typ měření se zabývá popisem jednotlivých objektů zobrazených v ploše, tedy určením velikostí objektů a vzdáleností mezi nimi.

Oblasti využití obrazové analýzy v mikrobiologii

Metoda analýzy obrazu má celou řadu uplatnění v oblastech mikrobiologie a potravinářství. Uvedme si stručný přehled oblastí aplikace této metody.

Kvantifikace růstu a buněčné viability

Pro svou značnou rychlost, efektivnost a přesnost je metoda využívána ke stanovení počtu a rychlosti růstu kolonií na pevné půdě, ke stanovení počtu, velikosti a viability jednotlivých buněk.

Stanovení koncentrace biomasy

Řada autorů popsala využití metody analýzy obrazu pro stanovení biomasy, která byla určena na základě odhadu objemu buněk. Objem buněk byl vypočítán z hodnot naměřené plochy a obvodu buněk. Pozdější experimenty však ukázaly, že tento odhad biomasy je nesprávný a že při stanovení koncentrace biomasy

je nutno přihlížet k trojrozměrné struktuře buněk. Významný potenciál metody lze spatřovat v on-line stanovení koncentrace biomasy v průběhu bioproduktu. Toto ovšem vyžaduje navržení on-line vzorkování a uplatnění rychlého zařízení pro získávání a archivaci dat.

Sledování citlivosti k antibiotikům

S úspěchem je metoda obrazové analýzy využívána ke stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik. Ze všech využívaných metod je tato nejrychlejší, protože poskytuje výsledky již během 4h.

Sledování vazby buněk na povrch

Technika dovoluje sledovat průběh tvorby biofilmu a kvantitativní analýzu prostorové distribuce organismů v průběhu adsorpce.

Modelování morfologie mycelia a jeho metabolismu

Vláknité houby a bakterie rostou v submersních populacích nebo mohou tvořit různé pelety rozličných velikostí a hustoty. Schopnost tvořit pelety je dána geneticky, ale je podmíněna také kultivačními podmínkami. Mikroskopické techniky a následná obrazová analýza může přispět k určení místa produkce a exkrece barevných produktů (antibiotik), což dovoluje pochopení optimální morfologie pro produkci dané látky. Obdobně, vliv růstových podmínek a složení média na morfologii a s ní spojenou produkci může být sledován za využití klasických kolorimetrických metod, nebo moderní metody analýzy obrazu.

Využití obrazové analýzy v oblasti potravinářství a studia biomateriálů

Potravinářství

Existuje celá řada aplikací obrazové analýzy v potravinářském průmyslu, jedná se např. o počítání mikrobiálních buněk, zhodnocení účinnosti čištění povrchů, analýzu surovin, určení velikosti částic práškových potravin, popis emulgate, perforace čajových sáčků apod. *Bio-materiály*

V oblasti studia struktury materiálu je metoda analýzy obrazu využívána k určení struktury makropórů v dřevěném uhlí, ultrafiltrů a dalších membrán, ke sledování procesu zanášení membrán.

Biotechniky

Metoda je využívána pro automatické vyhodnocení gelů po elektroforetické analýze, membrán a filmů. Může být použita ke kvantifikaci separace látek na HPTLC. Výhodou využití této metody je významné zrychlení celého procesu, naopak nevýhodou je celková cena zařízení.

Závěr

Z uvedeného výčtu je patrné, že možnosti uplatnění metody analýzy obrazu jsou nepřeberné. Zavedení této metody do praxe má oproti klasickým analýzám řadu

výhod, z nichž nejvýznamnější jsou: zrychlení a automatizace procesu analýzy, možnost archivace dat pro dodatečná měření a možnost kontroly výstupních dat. Nevýhodami jsou vyšší pořizovací náklady a vyšší nároky na znalosti z oblasti získání a zpracování digitálního sig-

nálu. Ovšem každou metodu se musíme naučit a získat určité zkušenosti s jejím využíváním. Metoda analýzy obrazu bude ze začátku vyžadovat více úsilí, ale určitě se to vyplatí. Zavedením metody analýzy obrazu do praxe se nám otevře řada nových možností.

Literatura: na vyžádání u autorky.

BAKTERIÁLNÍ BIOFILM A REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM

Olga Schreiberová

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT v Praze

Biofilmy jsou mikrobiální společenství vázaná na pevný povrch s charakteristickou strukturou a biochemickými vlastnostmi, odlišnými od volně rostoucích buněk¹. Podle některých studií je až 65 % všech bakteriálních onemocnění u lidí spojeno s biofilmem². Antibiotická rezistence bakteriálních buněk rostoucích ve formě biofilmu značnou měrou přispívá k chronickým onemocněním, která se často vyskytují ve spojitosti s implantáty. Mechanismy rezistence spojené s biofilmem se liší od mechanismů popsaných u volně rostoucích buněk, což způsobuje problémy při léčení. V biofilmu je rezistence závislá na organizaci buněk a komunikaci mezi nimi³.

I u pacientů s plně funkčním imunitním systémem jsou infekce spojené s biofilmem málokdy zcela odstraněny pomocí klasických terapií pomocí antibiotik. *In vitro* testy prokázaly schopnost buněk rostoucích v biofilmu tolerovat až tisíckrát vyšší koncentrace antibiotik než byly minimální inhibiční koncentrace u buněk rostoucích v suspenzní kultuře. Při aplikaci antibiotik *in vivo* dojde k potlačení symptomů infekce zabitím volně rostoucích buněk, nicméně buňky v biofilmu zůstanou nedotčené. Po skončení terapie zbývající buňky v biofilmu fungují jako ložisko, z něž se infekce znovu rozšíří. Nezbytným řešením bývá někdy i vyjmutí infikovaného implantátu z pacienta. Většina těchto infekcí je spojena s oportunními patogeny jako je *Pseudomonas aeruginosa* či *Staphylococcus epidermidis*⁴.

Mechanismy rezistence

Mechanismy rezistence známé u suspenzně rostoucích buněk, jako je efflux antibiotika pomocí pump, enzymové modifikace či cílené mutace, se nezdají být hlavním mechanismem rezistence biofilmu. Ani u bakterií, u nichž dosud nebyl objeven žádný ze známých mechanismů rezistence, jako například u β -laktamasa-negativního mutantu bakterie *Klebsiella pneumoniae*, byla pozorována snížená citlivost k antibiotikům v případě růstu v biofilmu. V suspenzní populaci rostoucí buňky vykazovaly minimální inhibiční koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu, zatímco buňky v biofilmu byly jen mírně ovlivněny (66 % zůstalo životaschopných) přítomností tohoto antibiotika o koncent-

raci 5000 $\mu\text{g/ml}$ po 4 hodiny, což je dávka, která spolehlivě usmrtí 100 % volně rostoucích buněk⁵. Skutečnost, že buňky uvolněné z biofilmu jsou stejně citlivé k antibiotikům jako buňky volně rostoucí naznačuje, že mechanismus odolnosti buněk v biofilmu nesouvisí s mutacemi. Studie zabývající se expresí genů kódujících efluxní pumpy pro antibiotika neprokázaly aktivaci těchto genů během růstu biofilmu, což bylo potvrzeno konstrukcí mutantů s deaktivovanými pumpami. Přestože klasické mechanismy rezistence nepochybně přispívají k rezistenci buněk v biofilmu, hlavní důvody je nutno hledat jinde⁶. Jednou z prvních teorií mechanismu rezistence byla pomalá či nedokonalá penetrace antibiotik maticí obklopující buňky v biofilmu. Tato teorie byla však prokázána pouze ve spojitosti se současnou inaktivací antibiotika, kdy bylo antibiotikum pronikající do biofilmu inaktivováno ve vrchních vrstvách rychleji než do něj pronikalo. Rovněž adsorpce antibiotika na matrix biofilmu může způsobit zpomalený průnik a tedy i sníženou účinnost, což je případ aminoglykosidových antibiotik, která se pravděpodobně váží na negativně nabitě skupiny exopolymerních látek v biofilmu^{4, 6}.

Dalším možným vysvětlením rezistence biofilmu je tvorba koncentračních mikrogradientů, což je charakteristický rys biofilmu. Lokální akumulace kyselých produktů metabolismu může vést k rozdílu až jedné jednotky pH mezi vnitřním prostředím biofilmu a vnější kapalinou a může způsobit změnu působení antibiotika. Spotřeba rozpuštěného kyslíku ve vnějších vrstvách biofilmu vede k vytváření anaerobních zón, což rovněž vede ke snížení účinnosti některých antibiotik, např. aminoglykosidových. Rozdíly mezi koncentracemi substrátů a inhibičních produktů metabolismu mohou způsobit přechod bakterií do klidového, nerůstového stavu, v němž jsou proti účinkům antibiotik chráněny. Například peniciliny, které působí na výstavbu buněčné stěny, tyto buňky neeliminují. Tato možnost byla potvrzena experimenty, při nichž byly pozorovány metabolicky inaktivní zóny uvnitř rostoucího biofilmu⁶.

Třetím možným mechanismem je vytváření specializovaných buněk s odlišným, vysoce specializovaným fenotypem. Pro tuto teorii mluví skutečnost, že re-

zistence je pozorována i u nově zformovaných biofilmů, které jsou příliš tenké na to, aby vytvořily bariéru pro průnik antibiotika. Byly objeveny intracelulární látky produkované pouze při růstu v biofilmu, které brání antibiotikům dosáhnout cílového místa. U bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byly identifikovány geny zodpovědné za tvorbu cyklických glukánů produkovaných do periplasmatického prostoru, které jsou schopné vázat a tak inaktivovat některá antibiotika, např. tobramycin¹.

Společným rysem všech mechanismů rezistence je mnohobuněčná organizace biofilmu. Antimikrobiální látky neproniknou biofilmem, pokud buňky nevytvoří agregáty. Lokální změny v koncentraci substrátů a produktů mikrobiálního metabolismu vzniknou pouze za situace, když shluk buněk dosáhne určité kritické velikosti a mikroorganismy svoji metabolickou aktivitu koordinují⁴. Je známo, že produkty určitých genů jsou potřebné při prvním kontaktu s povrchem, při počátečním přichycení. Mnoho genů je zapojeno nebo naopak potlačeno v souvislosti s zachycením bakterie na povrchu a bakterie přechází do přisedlého způsobu růstu. Motilita se zdá být kritickým bodem tvorby raného biofilmu. Koordinovány pomocí dosud většinou neznámých signálních molekul, bakterie se pomocí bičíků, pilů či jiných orgánů pohybu přichytávají k povrchu a k sobě navzájem. Další organizace růstu biofilmu je regulována výměnou chemických signálů – proces známý jako quorum sensing. Bylo pozorováno, že u quorum-sensing deficientních mutantů *Pseudomonas aeruginosa* byl biofilm tvořen pomaleji, obsahoval méně extracelulárního materiálu a byl snadněji eliminován za použití kanamycinu⁷. Tento rys – komunikace a kooperace mezi buňkami je nutné vzít v úvahu při hledání možností léčebných postupů vedoucích

k zamezení persistentních infekcí způsobených biofilmem.

Možnosti terapie

Při hledání účinných terapií je nutno se soustředit na fakt, že rezistence buněk v biofilmu nevychází z jednoho, ale z mnoha různých mechanismů, jež jsou schopné spolupracovat. Heterogenita biofilmu je společným základem všech mechanismů rezistence, buňky v biofilmu existují v mnoha různých stavech a prostředích. Různé prostředí se vytváří na několika úrovních – prostorová lokalizace extracelulární hmoty, gradienty nutrientů a odpadních produktů vytvářejí různorodé prostředí vedoucí k diferenciaci buněk do různých růstových stadií a fenotypů. Je tedy velmi nepravděpodobné, že jedno konkrétní antimikrobiální agens bude schopno zasáhnout všechny tyto typy buněk, včetně dormantních forem. Většina dnes používaných antibiotik byla identifikována na základě jejich působení proti individuálně rostoucím buňkám, takže již ze své podstaty nemohou být účinná při infekcích způsobených biofilmem. Screening stávajících či potenciálních antibiotik zaměřený na aktivitu proti biofilmu může objevit agens účinné proti biofilmu. Spolu s tím, jak jsou poznávány geny, které jsou zodpovědné za rezistenci, objevují se nové možnosti cílených terapií⁴. Další strategií může být snaha o rozbití mnohobuněčné struktury biofilmu, což by umožnilo standardním antibiotikům zasáhnout všechny buňky přítomné v těle pacienta a infekci eliminovat. Potenciální terapie zaměřené tímto směrem zahrnují enzymy, schopné narušit exopolymerní látky tvořící matrix biofilmu, látky blokující tvorbu matrix či analoga signálních molekul, blokující mezibuněčnou komunikaci nutnou k tvorbě biofilmu⁶.

Literatura

1. Mah et al.: Nature **426**, 306 (2003).
2. URL: <http://sciencedaily.com/releases>. Citováno 31. 5. 2007.
3. Costerton et. al.: Science **284**, 1318 (1999).
4. Stewart et al.: Lancet **358**, 135 (2001).
5. Anderl et al.: Antimicrob. Agents Chemother. **44**, 1818 (2000).
6. Ghannoum et al.: Microbial biofilms. Washington: ASM Press, 250 (2004).
7. Shih et al.: J. Antimicrob. Chemother. **49**, 309 (2002).

BAKTERIÁLNÍ QUORUM SENSING A JEHO INTERFERENCE

Filip Lukáš

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR

Quorum sensing

Během posledních třiceti let se náš pohled na bakterie výrazně změnil. Zatímco dříve byly bakterie studovány jako populace buněk, které se chovají navzájem nezávisle, nyní je zřejmé, že jednotlivé bakterie mohou během růstu komunikovat nejen mezi sebou, ale také s hostitelským organizmem. V posledních letech byla popsána skupina sekundárních metabolitů, které hrají klíčovou roli v regulaci genové exprese v závislosti na hustotě bakteriální populace.

Toto chování bylo pojmenováno jako quorum sensing (QS) a u bakterií představuje jeden z nejzajímavějších mechanismů mezibuněčné komunikace. V nejjednodušší formě můžeme quorum sensing popsat jako produkci a hromadění malých signálních molekul nazývaných autoinduktory (AI) v okolním prostředí bakterie. Koncentrace těchto molekul se v prostředí přímo úměrně zvyšuje se zvyšující se hustotou populace dané bakterie. Po dosažení kritické koncentrace se autoinduktory váží na receptory na povrchu či uvnitř

bakteriální buňky a to vede ke změně exprese řady genů. QS tak obecně můžeme definovat jako mechanismus koordinující chování bakterií v závislosti na hustotě bakteriální populace. Z dosavadních výsledků vyplývá, že QS je klíčovým mechanismem při adaptaci bakterie na určité prostředí a reguluje řadu fenotypových projevů, které jsou nezbytné pro úspěšnou kolonizaci a rozvoj symbiotických či patogenních vztahů mezi bakteriemi a hostitelem. V mnoha případech tak QS reguluje tvorbu biofilmu, pohyb, expresi faktorů virulence, sekreci toxinů, antibakteriálních látek a enzymů (Miller a Bassler, 2001; Waters a Bassler, 2005).

Quorum sensing gram negativních bakterií

Řada gram negativních bakterií ze skupin alfa, beta a gama proteobakterií používá jako autoinduktory acylované homoserin laktony. Tento systém byl poprvé popsán u luminiscentní mořské bakterie *Vibrio fischeri* (dříve *Photobacterium fischeri*). Tato bakterie žije buď volně v mořské vodě, nebo jako symbiont ve světelných orgánech mořských živočichů. V roce 1970 K. H. Nealson a J. W. Hastings (Nealson a kol., 1970) z Harvardské univerzity pozorovali, že tato bakterie neprodukuje světlo, pokud nedosáhne určité hustoty buněčné populace. Na základě toho předpokládali, že bioluminiscence je u této bakterie regulována molekulárním přenašečem, který putuje mezi buňkami. Pozdější výzkumy tuto teorii potvrdily a bylo zjištěno, že autoinduktor *V. fischeri* je N-(3-oxo-)-hexanoyl-L-homoserin lakton (AHL). Ve volném moři je produkována bazální hladina AHL AHL-syntázou LuxI. AHL difunduje vně buňky a následně je vyředěn v moři. Jakmile bakterie kolonizuje uzavřený prostor světelných orgánů hostitele, dosahuje vysoké hustoty populace (až 10^{11} buněk/ml). AHL se hromadí přímo úměrně s rostoucí hustotou bakteriální populace a po dosažení kritické koncentrace se váže na cytoplazmatický transkripční faktor LuxR. Aktivovaný LuxR se poté váže do specifických sekvencí DNA a to vede ke zvýšení transkripce genů luciferázy a dalších proteinů zapojených do bioluminiscence. Zajímavostí tohoto uspořádání je zapojení genu AHL-syntázy mezi geny regulované LuxR. Aktivace QS kaskády tak vede ke zvýšení exprese AHL-syntázy a tím ke zvýšené produkci AHL. Tato pozitivní zpětná smyčka významně zesiluje quorum sensing efekt (Stevens et al. 1994).

U ostatních gram negativních bakterií AHL-syntázy produkují AHL molekuly, které obsahují konzervovaný homoserin laktonový kruh a variabilní acylový řetězec. Ten se u jednotlivých bakterií liší délkou, nasyceností a substitucemi. Jako receptory AHL molekul slouží cytoplazmatické LuxR transkripční faktory, které vykazují vysokou specifitu pro AHL určité struktury. Bakterie tak mohou rozlišit a reagovat na určitou AHL molekulu i v prostředí osídleném smíšenou bakteriální populací, kde je přítomno více AHL molekul (Shaw a kol. 1997).

Quorum sensing gram pozitivních bakterií

Gram pozitivní bakterie využívají jako signální molekuly modifikované oligopeptidy, které jsou detekovány membránovými histidin kinázami. Přenos signálu dále do buňky je pak zprostředkován fosforylační kaskádou a vede ke změně aktivity DNA vazebného transkripčního regulačního proteinu a následně ke změně exprese cílových genů. Na rozdíl od AHL gram negativních bakterií, signální peptidy přes membránu volně nedifundují, ale jsou aktivně transportovány ABC transportérem (ATP binding cassette transporter). Ve většině případů dochází během transportu signálního peptidu k jeho úpravě a modifikaci. Funkční signální oligopeptid často obsahuje laktonový, případně thiolaktonový kruh a isoprenylové skupiny (Ansaldi a kol., 2002). Signální peptid je charakteristický pro určitou gram pozitivní bakterii a tím je zajištěna specifita tohoto systému pro vnitrodruhovou komunikaci.

Typický příklad QS mechanismu gram pozitivních bakterií představuje *Staphylococcus aureus*. Tato bakterie je v případě penetrace do tkání u osob s oslabeným imunitním systémem nebezpečným patogenem. Infekce, kterou vyvolává, má dvoufázový průběh. Při nízké hustotě populace *S. aureus* exprimuje proteiny napomáhající adhezi a kolonizaci, zatímco po dosažení kritické hustoty populace jsou tyto proteiny reprimovány a dochází namísto toho k sekreci toxinů a proteolytických enzymů. Tato změna je regulována Agr QS systémem. Na základě aminokyselinové sekvence a struktury signálního peptidu mohou být kmeny *S. aureus* rozděleny do 4 skupin. Kmeny jedné skupiny aktivují svými signálními peptidy receptory kmenů stejné skupiny a kompetitivně inhibují receptory kmenů ostatních tří skupin. V případě koinfekce hostitele dvěma či více kmeny *S. aureus* z různých skupin je QS využíván pro vnitrodruhovou kompetici a napomáhá rozvoji infekce vyvolané pouze QS-příbuznými kmeny (Lyon a Novick, 2004).

Vedle těchto dvou obecných QS systémů existuje celá řada látek, zejména sekundárních metabolitů, které u některých bakterií mají roli signálních molekul. Jedná se například o autoinduktor-2 (AI-2), který je využíván některými bakteriemi pro mezidruhovou komunikaci, cyklické dipeptidy, bradyoxetin, quinolony, atd.

Quorum quenching

Jak již bylo řečeno, QS bakterie využívají zejména ve smíšených bakteriálních populacích, kde regulace chování v závislosti na hustotě populace může být výhodou. Na druhé straně, v prostředí, kde bakterie kompetují o limitující zdroje, může být důležitým faktorem pro přežití schopnost narušit komunikaci jiné bakterie. Stejně tak může být pro hostitele výhodné narušit QS komunikaci patogenních bakterií a zabránit tak jejich adhezi a kolonizaci, případně expresi faktorů virulence. Proto je přirozené, že se

vyvinuly mechanismy schopné narušit QS komunikaci. Souborně tyto mechanismy bývají označovány jako quorum quenching (QQ).

Quorum quenching u prokaryot

Typickým příkladem QQ u prokaryotních organizmů je výše zmiňovaná cross-inhibice jednotlivých skupin *S. aureus*. Existují také enzymy, které jsou schopné degradovat signální molekuly. U rodu *Bacillus* byla popsána produkce laktonázy AiiA, která hydrolyzuje laktonový kruh a inaktivuje tak AHL signální molekuly gram negativních bakterií. Vlastní QS aparát bacilů postavený na signálních oligopeptidech zůstává plně funkční. Homology AiiA laktonázy byly popsány např. u *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter* sp., *Varivox paradoxus* a *Klebsiella pneumoniae* (McDougald a kol., 2007).

Vedle laktonáz byly u některých bakterií identifikovány AHL-acylázy (AiiD), které rozštěpují boční acylový řetězec AHL molekul. AiiD homolog byl popsán např. u *Ralstonia* sp., *Streptomyces* sp., a *Pseudomonas aeruginosa*. Zajímavé je, že substrát pro AiiD acylázu *P. aeruginosa* představuje vlastní AHL signální molekula. Tento enzym tak může být nástrojem pro kontrolu a regulaci intracelulární hladiny AHL molekuly a umožňuje *P. aeruginosa* přesněji kontrolovat svůj QS mechanismus v závislosti na podmínkách (Rasmussen a Givskov, 2006).

Quorum quenching u eukaryot

Bylo popsáno několik případů narušení QS systému bakterií eukaryotními organizmy. Australská červená řasa *Delisea pulchra* má na svém povrchu směs halogenovaných furanonů, které jsou strukturně podobné AHL molekulám. Transkripční faktor LuxR je po navázání těchto furanonů inaktivován a následně degradován. Tento mechanismus brání kolonizaci povrchu řasy bakteriemi a tvorbě bakteriálního biofilmu (Manefield a kol., 2002).

QQ byl prokázán také u epiteliálních buněk dýchacího traktu myši a člověka. Epiteliální buňky jsou schopné inaktivovat AHL molekulu *P. aeruginosa*. Ačkoliv přesný popis tohoto mechanismu chybí, zdá se,

že je zprostředkován AHL-laktonázou nebo AHL-acylá-
zou, případně součinností obou těchto enzymů. Tento mechanismus je podrobně studován jako jedna z možností léčby infekce vyvolané *P. aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou (Chun a kol. 2004).

Závěr

Využití těchto poznatků v praxi je zjevné. Představují možnost nových antimikrobiálních léků. Byly již provedeny pokusy s nadprodukcí AiiA laktonázy u tabáku a brambor. Tyto rostliny poté vykazovaly rezistenci k infekci vyvolané fytopatogenní bakterií *Erwinia carotovora*, jejíž virulence je regulována AHL signální molekulou. Podobně byla potlačena infekce u těchto rostlin v případě kokultivace *Erwinia carotovora* s *Bacillus thuringiensis* produkujícím AiiD acylázu. U myšičího modelu byl úspěšně vyzkoušen přidavek synteticky připraveného inhibitoru strukturně podobného signálním oligopeptidům *Staphylococcus aureus*, který inhiboval rozvoj stafylokokální infekce. Stejně tak přidavek halogenovaných furanonů inhiboval rozvoj infekce dýchacích cest vyvolané gram negativní bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (McDougald a kol., 2007). Tyto pokusy ukazují, že inhibice QS aparátu patogenních bakterií představuje alternativní léčbu k léčbě antibiotiky s minimalizovanými účinky na hostitele a s minimální možností rozvoje rezistence bakterií k těmto látkám.

Doposud byla většina prací zaměřena na popis QS patogenních bakterií. V naší laboratoři se zaměřujeme na QS komunikaci komenzálních bakterií osídlujících trávicí trakt člověka a zvířat. Výsledky ukazují, že i v tomto případě hraje QS důležitou roli v mezibuněčné komunikaci a regulaci genové exprese. Ukazuje se, že QS je jeden z důležitých faktorů podílejících se na udržení stability intestinální populace. Je také pravděpodobné, že existují mechanismy, které v případech kdy je to pro daný bakteriální druh či hostitele přínosné, podporují QS určitých bakterií a tím je ve smíšených bakteriálních prostředích zvýhodňují. Potvrzení této teorie ještě bude vyžadovat řadu dalších pokusů (González a Keshavan, 2006).

Literatura:

1. ANSALDI M., MAROLT D., et al.: *Mol. Microbiol.* 44, 1561 (2002).
2. GONZÁLEZ J.E., KESHAVAN N.D.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 859 (2006).
3. CHUN C.K., OZER E.A., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3587 (2004).
4. LYON G.J., NOVICK R.P.: *Peptides* 25, 1389 (2004).
5. MANEFIELD M., RASMUSSEN T.B., et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 445 (2007).
6. MILLER M.B., BASSLER B.L.: *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165 (2001).
7. NEALSON K.H., PLATT T., HASTINGS J.W.: *J. Bacteriol.* 104, 313 (1970).
8. RASMUSSEN T.B., GIVSKOV M.: *Microbiology* 152, 895 (2006).
9. SHAW P.D., PING G., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6036 (1997).
10. STEVENS A.M., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12619 (1994).
11. WATERS CH.M., BASSLER B.L.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319 (2005).

HORMONÁLNĚ AKTIVNÍ LÁTKY KOLEM NÁS

Eva Köhlerová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR

Úvod

V posledních padesáti letech roste výskyt hormonálně dependentních nádorových onemocnění a poruch reprodukce u lidí a volně žijících zvířat. Tato skutečnost je dávana do souvislosti se zvyšujícím se výskytem přirozených a syntetických hormonálně aktivních látek ve vnějším prostředí a v potravinovém řetězci. Vzhledem ke schopnosti těchto chemikálií napodobovat nebo blokovat působení endogenních hormonů jsou nazývány endokrinními disruptory (ED). Výsledkem působení těchto látek hlavně během perinatálního období je narušení delikátní hormonální rovnováhy, které vede k abnormální funkci hormonálně dependentních tkání a orgánů a k různým onemocněním v pozdějších stádiích ontogeneze a v dospělosti (Colborn a kol., 1993). ED mohou ovlivňovat hormonální systém organismu různými mechanismy. V organismu interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, působením nebo eliminací endogenních hormonů odpovědných za homeostázu, reprodukci, vývoj a chování. Na konferenci ve Weybridge v roce 1996 byly ED definovány jako exogenní látky, které působením na endokrinní systém narušují zdraví intaktního organismu nebo jeho potomků. Hilscherová a kol. (2000) rozdělili ED následovně:

- fytoestrogeny (genistein, kumestrol, daidzein atd.)
- mykoestrogeny (např. zearalenon)
- farmaceutické látky (např. tamoxifen, flutamid, nafoxidin)
- aditiva (např. parabeny, t-butylhydroxyanisol)
- pesticidy:
 - insekticidy (např. DDT, kepon, pyrethroidy)
 - fungicidy (např. vinklozolin, triadimefon)
 - herbicidy (např. atrazin, tributyltin, nonachlor)
- průmyslově vyráběné látky:
 - ftaláty (např. butylbenzylftalát, dibutylftalát)
 - alkylfenoly (např. nonylfenol, bisfenol A)
- organické látky znečišťující vnější prostředí (např. polychlorované bifenoly, polycyklické aromatické uhlovodíky)
- těžké kovy (např. kadmium, olovo)

Mechanismus působení ED

V posledních letech bylo objasněno několik možných mechanismů působení ED v organismu živočichů. V první řadě jde o přímou interakci ED s receptorem endogenního hormonu. Tato interakce může vést k agonistickému nebo k antagonistickému účinku ED. Dalším mechanismem působení ED je nepřímá interakce s endokrinním systémem. Tato interakce

může vést ke změnám v koncentraci hormonů nebo receptorů.

Vazba ED aktivuje receptor (agonistický účinek)

ED může působit jako ligand, který se váže a aktivuje receptor podobně jako endogenní hormon. Aktivace receptoru vede ke stejným změnám exprese genů jako aktivace endogenním hormonem. Potence exogenního agonisty závisí na jeho afinitě k receptoru a na jeho schopnosti receptor aktivovat a spustit expresi celé řady genů. Je třeba upozornit, že různé druhy zvířat mají strukturálně odlišné receptory, takže samotná vazba ligandu na receptor automaticky neznamená, že příslušná látka vykazuje stejnou afinitu pro stejný receptor u jiného druhu zvířat. Pokud různé látky vázající se na ER působí agonisticky je jejich účinek obvykle aditivní (Soto a kol., 1995), nebo synergický (McLachlan, 1997).

Vazba ED blokuje nebo snižuje působení agonisty (antagonistický účinek)

Antagonista je ligand, který blokuje nebo snižuje odpověď vyvolanou agonistou, protože receptor nemůže být plně aktivován. Receptor může být inhibován buď kompetitivně (endogenní agonista a exogenní antagonistista soutěží o stejné vazebné místo) nebo nekompetitivně (inhibitor se váže k receptoru nebo hormon-receptorovému komplexu, mimo aktivní vazebné místo). Kompetitivní inhibice může vést k celkové deaktivaci receptoru; nekompetitivní inhibice má za následek pomalejší nebo sníženou odpověď zprostředkovanou receptorem.

Vliv ED na koncentraci hormonů

Produkce hormonu může být narušena inhibicí reakce katalyzované enzymem. Xenobiotika mohou např. inhibovat aromatázu (katalyzuje přeměnu androgenů na estrogény), což má za následek zvýšení koncentrace androgenů a snížení koncentrace estrogenů (např. atrazin) (Hayes, 2005). Pozorovaný účinek xenobiotika je možno interpretovat jako antiestrogenní nebo androgenní (Toppari a kol., 1996). Tento mechanismus se pravděpodobně také uplatňuje při působení tributyltinů na aromatázu mořských hlavonožců, kdy samice mají typické pohlavní znaky samců (imposex). Metabolismus hormonů může být ovlivněn také indukci enzymů, které hormony metabolisují jako je skupina cytochromu P450 v játrech. Tyto enzymy hrají klíčovou roli v degradaci, produkci nebo aktivitě steroidních hormonů a mohou být ovlivněny různými xenobiotiky jako jsou polychlorované bifenoly a dioxin (Whitehead a Rice, 2006). Funkce endokrinního systému může být narušena i působením ED na transport hormonů v krevním řečišti. Chemikálie, které soutěží

o vazebná místa transportních proteinů, mohou zvýšit hladiny volných hormonů a tím zvýšit jejich účinek (Lintelmann a kol., 2003).

Vliv ED na koncentraci hormonálních receptorů

Počet hormonálních receptorů v buňce je kontrolován složitým mechanismem. Různé chemikálie mohou snížit nebo zvýšit počet receptorů a tím ovlivnit odpověď na působení endogenních hormonů. ED mohou také narušit procesy degradace (down-regulation) a syntézy receptoru (up-regulation) (Safe a kol., 1998).

Uvedené mechanismy interakcí mezi xenobiotiky a endokrinním systémem jsou pouze malou částí možných způsobů působení. Další výzkum v této oblasti přinese řadu dalších a mnohem komplexnějších vztahů mezi exponovanými organismy, endokrinním systémem a xenobiotiky.

Stanovení endokrinních disruptorů

Většina ED byla identifikována metodami *in vitro*. Jde o postupy nejen vysoce citlivé a specifické, ale i o postupy mnohem levnější než metody *in vivo* (Fertuck, 2002). Nevýhodou je, že data získaná *in vitro* nezahrnují komplexní mechanismus působení látky *in vivo*. Chybí i vliv metabolismu na testované látky, což může vést jak k falešně negativním tak k falešně pozitivním výsledkům (Gray a kol., 2002). Vliv metabolismu je velmi komplexní a závisí na mnoha faktorech jako je absorpce, vazba na bílkoviny, distribuce v tkáních a eliminace látky (Greenspan a Gordon, 1997). Různé látky, které nejsou estrogenní *in vitro*, mohou být metabolizovány na látky s estrogenní aktivitou *in vivo* (Ankley a kol., 1998). Z toho je zřejmé, že žádný test *in vitro* nemůže při stanovení biologických účinků ED nahradit testy *in vivo*. Tento závěr je dále podporován existencí multi-hormonálních/anti-hormonálních nebo antagonistických a parciálně agonistických aktivit ve stejné molekule. Výsledky testování látek *in vivo* mohou být použity pro stanovení jejich nebezpečí (hazardu) a rizik a dále mohou poskytnout

podklady pro komplexní extrapolaci na lidskou populaci (Ankley a kol., 1998). Pro testování environmentálních vzorků, ve kterých se hormonálně aktivní látky vyskytují zpravidla ve směsích, je třeba po stanovení biologické aktivity zařadit také kvalitativní a kvantitativní stanovení jednotlivých komponent směsi pomocí GC-MS analýzy.

Závěr

Agentura pro ochranu vnějšího prostředí USA (USEPA) a Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD) vyvinuly dvoustupňový postup hodnocení látek s možným účinkem na endokrinní systém. V prvním stupni (Tier I) jsou jak screeningové postupy *in vitro* (receptorové vazebné reakce, hormon-dependentní exprese genů a steroidogenese), tak postupy *in vivo* (uterotropní a Hershbergerovo stanovení, stanovení puberty u hlodavců, identifikace ED na rybách a žábách zahrnující agonisty, antagonisty a inhibitory syntézy steroidních hormonů a hormonů štítné žlázy). Chemikálie s pozitivním účinkem v prvním stupni testovacích postupů jsou dále hodnoceny ve stupni druhém (Tier II). Testy pro Tier II jsou navrženy tak, aby determinovaly účinky chemikálií na integritu a funkci reprodukčního systému samců i samic ve dvou nebo multigeneračních testech a zároveň stanovily vztahy mezi dávkou látky a jejím účinkem (Clode, 2006). Vzhledem k tomu, že v současné době je v komerčním použití zaregistrováno více než 80 000 syntetických chemikálií je nezbytné určit vysoce prioritní chemikálie, které mohou být do screeningového programu zařazeny. Výběr takových chemikálií však nemůže zahrnovat pokusy na živých zvířatech a to jak z ekonomického, tak z etického hlediska. Uvažuje se proto založit odhad schopnosti chemikálií interagovat s receptory steroidních hormonů na kvantitativním strukturně-aktivitním modelování nebo/a na vysoce účinném prescreeningu založeném na hormonálně dependentní expresi genů (Gray a kol., 2002).

Literatura:

1. Ankley G.T., Mihaich E., et al.: Environ. Toxicol. Chem. 17, 68 (1998).
2. Clode S.A.: Best Pract. Res. 20, 35 (2006).
3. Colborn T., et al.: Environ. Health Persp. 101, 378 (1993).
4. Fertuck K.C.: EPA Endocrine Disruptors Workshop, Screening and Testing Assays Symposium, (2002).
5. Gray L.E.J., Ostby J., et al.: Toxicol. 27, 371 (2002).
6. Greenspan F.S., Gordon J.S.: Introduction to endocrinology. In Reinhardt S., Langan S.: Basic and Clinical Endocrinology. Appleton and Lange, Stamford, 1-38, (1997).
7. Hayes T.B.: Integr.Comp.Biol. 45, 321 (2005).
8. Hilscherova K., Machala M., et al.: Environ. Sci. & Pollut. Res. 7, 159 (2000).
9. Lintelmann J., Katayama A., et al.: Pure Appl. Chem. 75, 631 (2003).
10. McLachlan J.A.: Science 277, 462 (1997).
11. Safe S., Wang F., et al.: Toxicol. Lett. 102-103, 343 (1998).
12. Soto A.M., Sonnenschein C., et al.: Environ. Health Persp. 103, 113 (1995).
13. Toppari J., Larsen J.C., et al.: Environ. Health Persp. 104, Suppl. 4, 741 (1996).
14. Whitehead S.A., Rice S.: Best Pract. Res. 20, 45 (2006).

V TOMTO ČÍSLE NAJDETE

Meluzín M.: Budeme mít DNA počítače ?	35
Landová M.: Perspektivy využití protilátkových čipů v diagnostice	38
Krulikovská T.: Metoda analýzy obrazu	40
Schreiberová O.: Bakteriální biofilm a rezistence k antibiotikům	43
Lukáš F.: Bakteriální „quorum sensing“ a jeho interference	44
Köhlerová E.: Hormonálně aktivní látky kolem nás	47

CONTENTS

Meluzín M.: Does come time for DNA computers?	35
Landová M.: Anticipated applications of antibody chips in diagnosis	38
Krulikovská T.: Imaging analysis	40
Schreiberová O.: Bacterial biofilms and antibiotic resistance	43
Lukáš F.: Bacterial quorum sensing and its interference	44
Köhlerová E.: Compounds simulating hormonal activities in our environment	47

POKYNY PRO AUTORY

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

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako "attachment" spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem.
2. Texty pište v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. 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. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
5. Připojte vždy svojí e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

Děkuji

L. Fukal

**BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST**
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

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