

B I P R O S P E C T

Šestnáctý ročník
Číslo 3 – 4/2006

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

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

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

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

Redakční rada

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<http://bts.vscht.cz>

B I P R O S P E C T

16th Volume
No. 3 – 4/2006

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

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

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

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

For more information contact the editorial board or directly:

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

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 445 137

e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

ke konci letošního roku jsme pro Vás připravili dvojčíslo (č. 3 – 4) 16. ročníku našeho Biopropectu. Doufám, že se Vám bude líbit stejně jako předchozí dvě letošní čísla. Připravili jsme pro Vás opět řadu informačních článků z různých oblastí biotechnologie, tak snad každý z Vás zde najde něco co ho zaujme. Jedná se např. o tato témata: geneticky modifikované plodiny, biotechnologie v chemickém průmyslu, biomikronanotechnologie, enzymové modifikace fosfolipidů, acylace proteinů, oxidační stres a cytokiny v relaci s protinádorovou imunitní odpovědí. Po delší době jsme také zařadili jen článek v angličtině, jehož jedním z autorů je hostující vědecký pracovník ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně a týká se populárního tématu bioanalýzy. Nechybí ani aktuální informace, i když těžiště takovýchto příspěvků se chystáme přesunout jednak na naše webové stránky <http://bts.vscht.cz> nebo do e-mailového servisu.

V současnosti již pracujeme na přípravě Biopropectu 17. ročníku a uvítáme Vaše náměty, aby náš bulletin byl pro Vás ještě přitažlivější a samozřejmě se těšíme na Vaše příspěvky i krátké informace z Vašeho oboru či profesního okolí. Doufám, že jste si již prohlédli naši zpřístupněnou webovou stránku <http://bts.vscht.cz>, na které stále pracujeme. Je však řada informací, které přicházejí na poslední chvíli a vystavovat je na webu nemá valný význam, neboť asi nikdo z nás neotevírá webové stránky každý den. Pro tento účel je nejhodnější odeslání zprávy e-mailem. Máte-li zájem o informace („last moment“) sdělte nám to, a my Vás zařadíme do našeho e-mailového informačního servisu. V rámci tohoto servisu zasíláme zájemcům měsíční internetový bulletin Evropské federace biotechnologií, informace o přednáškách, kursech, oznámení o grantových projektech, možnostech mezinárodní

spolupráce, nabídkách podpory podnikatelům a další zajímavosti. V tomto směru spolupracujeme s řadou partnerů jako jsou např. CzechInvest (<http://www.czechinvest.org>), CzechTrade (www.czechtrade.cz), Inova-Pro (www.inovapro.cz), Ministerstvo životního prostředí (www.env.cz), Ministerstvo zemědělství (www.mze.cz), Jihomoravské inovační centrum (www.jic.cz a www.gate2biotech), Biotrin (www.biotrin.cz), university, výzkumné ústavy i sesterské společnosti.

Rád bych využil této příležitosti a pozval Vás na **13. Evropský biotechnologický kongres organizovaný Evropskou biotechnologickou federací ve dnech 17. – 19. září 2007** ve španělské (katalánské) Barceloně. Hlavním tématem kongresu je symbiosa mezi vědou, průmyslem a občanskou společností. Bližší informace naleznete na webových stránkách <http://www.ecb13.eu>. Vložené je přijatelné (300 EURO pro členy EFB, t.j. členy Biotechnologické společnosti a 200 EURO pro studenty, pokud se vložené zaplatí do 30. 6. 2007).

O dalších akcích Vás budeme průběžně informovat na našich webových stránkách a/nebo e-mailovým servisem.

Závěrem bych Vás rád požádal abyste laskavě informovali o činnosti naší společnosti všechny jednotlivce, podniky i instituce zajímající se o biotechnologie a požádali je o spolupráci. **Děkuji Vám všem za přízeň v r. 2006, přeji Vám příjemné prožití vánočních svátků a po celý rok 2007 mnoho úspěchů v soukromém i profesním životě.**

Váš

Jan Káš

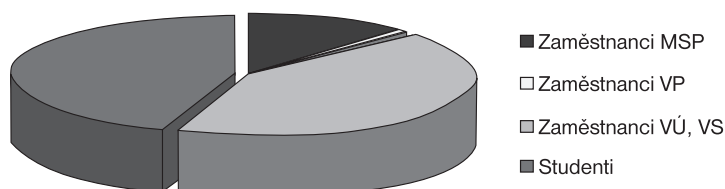
Projekt Biotechnologie pro Prahu bilancuje

Přes sedm stovek osob z více než 50 organizací navštívilo během posledních dvanácti měsíců odborné semináře, semestrální kurzy, přednášky, praktické kurzy a další akce pořádané v rámci projektu **Senzory a biosenzory pro biotechnologie, lékařskou diagnostiku a životní prostředí**. Dvouletý vzdělávací projekt, finan-

covaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR je zaměřený na oblast Prahy a odstartoval v říjnu 2005.

Řešiteli projektu, koordinovaného společností VIDIA spol. s r.o., jsou dále ÚRE AV ČR, ÚMCH AV ČR, MFF UK, VŠCHT Praha, Inova Pro, s.r.o a Safibra, s.r.o.

Koho projekt oslovuje:



Nejpočetnější cílovou skupinou jsou studenti (43 %), z převážné většiny studenti vysokých škol – hlavně VŠCHT Praha a Matematicko fyzikální fakulty Univerzity Karlovy. Přes 40 % účastníků některé z akcí projektu představují zaměstnanci výzkumných ústavů nebo vysokých škol. Zhruba každý desátý účastník byl zaměstnancem malého či středního podniku (MSP).

Některé z uskutečněných akcí:

Značnému zájmu odborné veřejnosti se těšily dva **odborné semináře Optické biosenzory a jejich využití**, pořádané Ústavem radiotechniky a elektroniky AV ČR. Více než stovka účastníků na nich získala přehled o tom, jak daleko dospěl výzkum, vývoj a komercializace optických senzorů. Na každou přednášku navazoval diskusní panel, v jehož rámci odpovídali odborníci z vysokých škol, Akademie věd i firem a diskutovali mimo jiné o tom, jak a kde využít biosenzorické technologie v moderní analytice.

Velmi příznivý ohlas měla též **tříhodinová seminární přednáška Mikrofluidní systémy, popis konstrukce a výroby mikrostruktur, vybrané biosenzorové a další aplikace** pořádaná VŠCHT Praha. Každý z 40 přítomných dostal k tomuto účelu vytvořený tištěný učební materiál v rozsahu 90 stran.

Na dvoudenním praktickém laboratorním kurzu se seznámila dvacítko účastníků s **moderními metodami**

diagnostiky systémem antigen-protilátka. Ve dvou laboratorních si vyzkoušeli různé imunoanalytické metody a polymerázovou řetězovou reakci.

Pro potřeby účastníků Laboratorního kurzu vydala VŠCHT Praha obsáhlá skripta. Jde o jeden ze čtyř praktických kurzů organizovaných v rámci projektu.

Seminář na téma **„Jak chránit duševní vlastnictví v oblasti biotechnologií“** organizovaný společností Inova Pro, byl příležitostí získat informace o licenční politice, o tom, jak podávat patent, ochrannou známku či užitečný vzor, jakož i o úskalích patentování a jeho financování ochrany duševního vlastnictví. Tři desítky účastníků z řad vysokých škol, výzkumných ústavů i biotechnologických firem vyslechly několik případových studií a v diskusi řešili další konkrétní příklady z oblasti duševního vlastnictví.

Více informací o pořádaných akcích na www.sbb.cz

Ing. Jiřina Shrbená, Ing. Daniela Vojtová, Inova Pro, s.r.o.

Mezinárodní konference New aspect in aquaculture

(11. – 13. 10. 2005, Plovdiv, Bulharsko)

Konference byla uspořádána ke 40. výročí založení plovdivského rybářského ústavu, který je nyní pobočkou ústavu ve Varně (Institut of Fisheries and Aquaculture, Varna, Branch of Freshwater Fisheries, Plovdiv). Konference se zúčastnilo 60 osob, z toho 10 zahraničních účastníků z celkem 7 zemí (ČR 3, SRN 2, Maďarsko 1, Bělorusko 1, Řecko 1, Chile 1, Makedonie 1). Prezentováno bylo celkem 32 příspěvků. Účastníci z VÚRH JU Vodňany prezentovali celkem 3 příspěvky (J. Hamáčková, J. Kouřil, Z. Stupka: Clove oil utilisation as an anaesthetic in aquaculture; J. Kouřil, J. Hamáčková, P. Lepič, A. Lepičová, T. Barth: Semiartificial and artificial propagation of European perch /*Perca fluviatilis*/ with GnRH analogues; Z. Stupka, O. Valentová, J. Hamáčková, P. Lepič, J. Kouřil: Total ammonium nitrogen

excretion in intensively cultured African catfish /*Clarias gariepinus*/ at different water temperatures). Jednáni konference probíhalo v sekcích: Kvalita rybiho masa a výživa ryb (celkem 8 příspěvků), Akvakultura a environment (7), Chov ryb (9), Nemoci ryb (4) a Genetika ryb (4). Všechny příspěvky byly prezentovány formou přednášek. Z konference nebyl vydán sborník abstraktů, plné znění příspěvků bude prezentováno v Bulgarian Journal of Agricultural Science. Na závěr konference byla uspořádána exkurse na farmu firmy Oscietra commerce Ltd. v Boliartzi u Plovdivu. Farma je zaměřena na chov generačních ryb 6 druhů jeseterů, produkci násadového materiálu, kaviáru a tržních ryb.

Tomislav Barth,

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha 6

BIOTECHNOLOGIE PŘI VÝROBĚ BATERIÍ

Jiří Patočka

Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice

Biotechnologie pronikají do stále nových oblastí a přináší dříve netušené možnosti. Takovou oblastí jsou např. elektrické baterie a akumulátory, kde podle nejnovějších výzkumů by se mohly uplatnit bakterie a možná i viry. Nápad na využití bakterií pro produkci elektrického proudu není nový, ale takovéto baterie zatím nedoznaly praktického využití (1 – 4). Bakterie *Rhodospirillum rubrum*, objevená v sedimentech ve Virginii, funguje jako mikrobiální palivový článok a přeměňuje energii cukrů na elektrickou energii s účinností 81 %. Chaudhuri a Lovley z Massachusettské univerzity použili *R. rubrum* k sestrojení unikátní „bakteriální baterie“. Kultura bakterií v nádobě s grafitovými elektrodami, živících se glukózou, produkovala dlouhodobě stabilní elektrický proud (5). Bakterie konvertovaly v elektrický proud i další cukry: fruktózu, xylózu a sacharózu. Tato cesta nabízí možnost zužitkování nejrozumnějšího bioodpadu k výrobě elektrické energie.

Neobvykle zajímavé možnosti nabízí některé modifikované viry, zejména při výrobě miniaturních baterií pro speciální účely. Bioinženýři z Massachusetts Institute of Technology (MIT) zveřejnili objev geneticky modifikovaného viru, který na sebe „nabaluje“ atomy kovu a může fungovat jako kovová elektroda. Takto upravené viry by mohly najít uplatnění i v tak odlehlém oboru, jako je výroba baterií. Základem pro genetickou úpravu

byl virus M13 (bakteriofág). Za to, že se virus obaluje vrstvičkou kovu, je zodpovědná uměle vložená DNA, respektive povrchový protein, který se podle ní syntetizuje. Nejdříve byly vyzkoušeny proteiny, které umožňují živočišným buňkám vázat vápník a pak byly hledány další, vážící i jiné kovy. Zatím vyzkoušené modifikace umožňují virům vychytávat z okolí kobalt a zlato, předpokládá se ale, že jiné dodané řetězce DNA povedou ke vzniku struktur, které budou vykazovat afinitu i k dalším kovům. DNA požadovaných vlastností se zjišťuje jednoduše tak, že směs různě modifikovaných virů se nalije na vrstvičku kovu na níž zůstanou nadějně varianty „přilepeny“, zatímco ostatní se odplaví. Elektrodu s tenkým kovovým povlakem lze ze záporně nabitých komplexů viru a kovu vytvořit tak, že se nechá tvarovat na kladně nabitým podkladu z plastu (6). Nová technologie má oproti stávající výrobě baterií celou řadu výhod. Proces výroby probíhá za pokojové teploty a normálního tlaku a bez použití nebezpečných chemikálií, což zlevňuje výrobu. Takto vytvořené baterie by mohly být lehčí a menší než jsou současné výrobky odpovídající energetické kapacity (7). Předností je, že viry mohou vytvářet elektrody od nanometrových měřítek až po centimetrové tyčinky. Uvažuje se také o tom, že by geneticky modifikované viry mohly být v budoucnu využity i ke stavbě solárních článků.

Literatura

1. Daumas S., Massiani Y., Crousier J., Corrosion Sci. 28: 1041-1050, 1988.
2. Scholz F., Schroder U., Nature Biotechnol. 21: 1151-1152, 2003.
3. Whitehouse D., <http://news.bbc.co.uk/1/low/sci/tech/3092754.stm> (10/09/2003).
4. http://www.sciencentral.com/articles/view.php?article_id=218392129 (23/04/2004).
5. <http://www.sciam.com/article.cfm?articleID=00054931-E680-1F58-905980A84189EEDF&sc=1100322>
6. Nam K.T. et al., Science 312: 885-888, 2006.
7. Nanotechweb. <http://www.nanotechweb.org/articles/news/5/4/4/1>.

BIOMIKRONANOTECHNOLOGIE

Boris Bartoš

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Biomikronanotechnologie je vědním oborem, který se za posledních deset let rapidně rozvinul v jednu z nejdůležitějších a do budoucna potenciálně významných výzkumných a průmyslových oblastí. Zjednodušeně by se tento obor dal definovat jako soubor technologií umožňujících práci v mikroskopických až nanoskopických měřících a kombinující přitom biologické materiály se zákonitostmi fyziky, chemie a genetiky a tvořící syntetické struktury analogické živým tkáním. Jelikož se jedná o soubor interdisciplinárních odvětví, není jednoduché je striktně rozdělit. Jednotlivá odvětví plynule přechází do druhých a vzájemně se prolínají. Velmi zhruba tedy můžeme biomikronanotechnologii rozdělit do několika velmi příbuzných kategorií: nanobiotechnologie, bioMEMs (biological micro-electromechanical systems), mikrofluidní systémy, biosenzory, bio(mikro)čipy a tkáňové inženýrství.

Nanobiotechnologie

Lze je definovat jako výrobu zařízení z organických nebo biologických materiálů, kde alespoň jedna funkční komponenta svou velikostí odpovídá molekulárním nebo dokonce atomárním rozměrům. Právě takové funkční rozměry nám mohou umožnit hlouběji porozumět biochemickým procesům dalo by se říci atom po atomu. To skýtá obrovské možnosti využití v medicíně a diagnostice. Dlouhodobým cílem, který si nanobiotechnologie ukládá, je sestavení vysoce funkčního systému biosenzorů, elektronických okruhů, nanoskopických čipů a molekulárních prepínačů a dále tkáňových analogů schopných nahrazovat nebo opravovat například poničené původní tkáň jako pokožka, kosti, svaly a další tělesné orgány. V rámci tohoto odvětví existují dva základní přístupy řešení problému. Prvním je tzv. „bottom up“. Tento typ využívá znalostí struktury a biochemických procesů biomolekul k vytváření nových funkčních materiálů, biosenzorů a bioelektroniky pro biologické a biomedicínské využití. Příkladem takového postupu jsou tzv. proteinové motory, které mohou umožnit chemicky poháněný pohyb dalším mikro- nebo nano- zařízením jako nanoskopické přenašeče nebo sondy pro povrchové skenování. Druhým typem je tzv. „top down“. V tomto případě se jedná o aplikaci nástrojů a postupů nano- a mikro- technologie k vytvoření zařízení pro studium nejrůznějších biosystémů. Příkladem takového zařízení je separace dlouhořetězcových polymerů pomocí mikrodestičky s hustou sítí tzv. nanopilířů. Poté se aplikuje dělená směs za působení elektrického proudu. Podle délky pulsu a podmínek během reakce se kratší molekuly plně inkorporují do sítě nanopilířů a delší jen částečně nebo vůbec. Přestane-li poté působit elektrické pole, málo inkorporované nebo neinkorporované proteiny se sbalí a z destičky snadno odstraní.

BioMEMs

Sdružují mikrostrojové elementy, většinou ze silikonových materiálů, obsahující různé převody, mikromotory, akční členy a další. Takové vysoce integrované mikrosystémy mohou vyřešit mnoho technických problémů, které jsou běžnými metodami neřešitelné. Příkladem takového zařízení jsou mikročerpádky různých typů a velikostí, ale také mnohem sofistikovanější mikročipy, tzv. „lab-on-chip“ zařízení. Jedná se o jednotku, kombinující reakční komory s detektory, schopné vlastní analýzy, vstupy a výstupy, vybavené i připojením na externí zařízení. Zjednodušeně řečeno, schopné nahradit celou laboratoř.

Mikrofluidní systémy

Jsou to zařízení kontrolující tok plyných nebo kapalných látek v malých množstvích a v miniaturních systémech. Jedná se obor úzce související s ostatními obory. Můžeme pod něj zahrnout mikrozařízení jako mikromísice, ať už pasivní, míchající pomocí různých štěpení a rotací tekutiny, nebo aktivní, využívající magnetohydrodynamického vlivu, elektroosmózy a dalších jevů. Dále sem patří tepelné mikrovýměníky, jejichž výhodou je ohřátí či ochlazení v řádech milisekund, chemické mikroreaktory, umožňující podstatně vyšší stupeň konverze a vyšší selektivitu, ale můžeme sem zařadit i již zmíněná mikročerpádky, mikroventily atd.

Biosenzory

Tak se nazývají zařízení kombinující element biologický jako prvek detekční a element fyzikální jako prvek převádějící měřený signál na zpracovatelné pulsy. Biosenzory mají široké uplatnění v biomedicíně, monitorování životního prostředí nebo při kontrole kvality produktů ve výrobě. Kromě notoricky známých biosenzorů, například na principu enzym – elektroda existuje celá řada dalších, často ještě experimentálních přístrojů tohoto typu. Takovým příkladem je tzv. biolaser, někdy též biokavitační laser. Jedná se o ultramalý laser kombinovaný s dalšími mikrostrukturami, případně biologickými prvky. V praktickém použití se využívá tzv. „smart scalpel“. Je to vlastně online průtokový cytometr, využívaný zejména na operačních sálech. Jeho výhodou jsou oproti běžným průtokovým cytometrům velmi malé rozměry. Díky němu je možné rozeznat u operací rakovinných nádorů, kde nádor končí a kde již začíná zdravá tkáň. Dále je možné podobně detegovat poruchy imunity skenováním povrchu buněk.

Mikro(bio)čipy

Jsou jednou z nejkomerčnějších technologií poslední doby. Opět, podobně jako u mikrofluidních systémů se jedná o obor velmi úzce spjatý s ostatními obory. Výhodou mikročipu jsou opět velmi malé dávky vzorků

a u některých také možnost urychlení reakce pomocí elektrického proudu. Velmi známým příkladem jsou tzv. DNA biočipy (DNA microarray). Na definované ploše (čipu) jsou navázány řetězce oligonukleotidů, k nimž se selektivně váží komplementární fragmenty DNA tzv. hybridizační reakcí. Dnes se jedná o standardní vybavení pro charakterizaci DNA. Existují i proteinové biočipy, využívající metod ELISA nebo western blotting, na principu interakcí antigen – protilátka a dalších.

Tkáňové inženýrství

Jeho cílem je vytvoření plně funkční a kontrolovatelné mikrostruktury analogické živé tkáni. Kombinuje přitom syntetické a biologické materiály, mikrostruktury a zařízení. Nachází uplatnění při přípravě umělých implantátů, regenerační medicíně, ale i při přípravě nových biosenzorů nebo mikročipů. Zajímavým příkladem je koncept „Animal-on-chip“. Jedná se o integraci mnoha tkáňových kultur jednoho organismu (včetně člověka) na jeden mikročip. Výsledkem by mohla být reprodukce možné odpovědi vlastního organismu na různá farmakologická nebo látky, přítomné v životním prostředí. Zde se ještě stručně pozastavím nad výběrem materiálů pro tkáňové inženýrství. Mohou být tři typy požadavků na materiál. Prvním je schopnost indukovat buněčnou migraci a tkáňovou regeneraci. Druhým je schopnost vytvořit tzv. imunoisolační bariéru, která by dovolila přístup k dané struktuře jen některým molekulám. Konečně třetí typ pak slouží jako podpůrná matrix, poskytující nosnou kostru a organizaci, jako jsou například vlákna lakto/glykolátového kopolymeru.

Materiály a technologie pro přípravu mikro- a nanostruktur

Co se týče základních materiálů, má výsostně postavení křemík. Jako monokrystalové jednotky má význam zejména v mikroelektronice. Ještě širší použití však mají silikony, a to při výrobě mikročipů a dalších mikrostruktur. Výhodou je hlavně obrovská variabilita silikonů různých vlastností.

Sklo je jedním z nejstarších využívaných materiálů. Je biologicky i chemicky stabilní, je transparentní. Nevýhodou je vyšší křehkost. Často využívaná je také keramika, která je značně chemicky a mechanicky odolná. Kovy se používají zejména k vytvoření aktivních vrstev například při galvanickém pokovování. Obtížně se s nimi pracuje při vytváření 3D struktur. Z oxidů kovů se nejčastěji používá tzv. alumina (Al_2O_3), ale i některé další jako BeO.

Velmi používaným materiálem jsou polymerní plasty. Jsou poměrně levné a tudíž snadno dostupné. Jejich nevýhodou je však nízká tvrdost a tepelná stabilita. K dispozici je řada plastů, od běžných plastů jako polyvinylchlorid (PVC), polyethylen (PE) nebo polypropylen (PP), přes technicko-inženýrské, které mají lepší vlastnosti než běžné plasty, hlavně vyšší tepelnou odolnost, což jsou například polyethylentereftalát (PET), polyamidy (PA) nebo polybutylentereftalát (PBT), až po speciální plasty jako polysulfonáty (PSU), polyether-

etherketo (PEEK) nebo kapalně krystalické polymery (LCP).

Zvláštní a v poslední době hojně využívanou skupinou jsou tzv. fotorezisty. Jedná se o materiály citlivé na některé druhy elektromagnetického záření. Dělí se na dva typy, a to fotorezisty negativní a fotorezisty pozitivní. Negativní fotorezisty se působením záření „vytvrdí“, dochází k zesíťování vazeb. Pozitivní fotorezisty se naopak dají odstranit lépe než neexponované části, vazby se působením záření narušují. Příkladem negativního fotorezistu je například komerční materiál SU8. Pozitivním fotorezistem je třeba komerční FOTURAN nebo polyimidy (PI).

Fotolitografie. Jedná se o metodu, při které dochází k selektivnímu ozáření fotorezistu, ať už pozitivního nebo negativního, naneseného na povrch substrátu a následné odleptání exponované (pozitivní fotorezist) nebo neexponované (negativní fotorezist) části. Celý postup se dá zhruba shrnout do těchto kroků: Prvním je čištění substrátu, kdy se odstraní veškeré nečistoty z povrchu materiálu třemi po sobě jdoucími chemickými čistěními. Druhým je nanesení fotorezistu na substrát pomocí tzv. spin coateru. Třetím krokem je vlastní expozice fotorezistu většinou UV zářením přes masku s požadovaným vzorem a konečně čtvrtým krokem je tzv. vývoj fotorezistu, kdy se odstraní nejčastěji leptáním. Fotolitografie je často používanou metodou při výrobě mikročipů různých druhů a mikrofluidních zařízení. O něco preciznější, ale také podstatně nákladnější metodou je rentgenová litografie (**RTG litografie**). Zde je rezist senzitivní na rentgenové záření, kterému je opět vystaven přes masku s požadovaným vzorem. Nutností je však působení kolineárního svazku RTG záření, produkovaného synchrotronem. Právě kvůli tomu je použití této metody značně omezené. Její výhodou jsou však nižší vlnové délky záření a z toho vyplývající větší rozlišení při výrobě.

Další metodou je tzv. **anizotropní mokré leptání**. Zde se substrát vloží do roztoku, kde dochází k leptání. U krystalických materiálů, jako je například křemík, závisí rychlost leptání na krystalografických rovinách., tzn. dutiny se vytváří jen podél určitých rovin. K leptání se využívá různých činidel, například KOH. Naproti tomu u izotropního mokrého leptání je rychlost leptání ve všech směrech stejná, zejména u amorfních materiálů jako sklo.

Tzv. suché leptání se provádí pomocí toku vysoce reaktivního ionizovaného plynu, plasmu. Jako masky se používá například SiO_2 nebo fotorezisty.

Jako už bylo zmíněno výše, **galvanické pokovování** se používá k vytváření aktivních kovových vrstev. Jedná se o elektrolytické nanášení kovů (hlavně Ni nebo Cu) na substrát, který tvoří jednu z elektrod.

Mikroobrábění se může provádět několika způsoby. Mechanicky, laserem nebo pomocí elektrojiskry. Mechanicky se provádí pomocí různých mikrofréz a mikrovrtáček, nevýhodou je však limitace rozlišení, která je maximálně v řádech stovek mikrometrů. O něco lepší je obrábění laserem, kdy se materiál

vpodstatě odpaří přes masku nebo přímo. Elektrojis-
krové mikroobrábění využívá erozivního působení elek-
trického výboje na svrchní vrstvy materiálu.

Existuje také celá řada metod replikace již hotových
výrobků. Jedná se zejména o vtlačování nebo vytlačo-
vání za tepla, vstřikování nebo odlévání. Při vtlačování
nebo vytlačování je forma vtisknuta do filmu z termo-
plastu, přičemž jak forma, tak termoplast jsou předem
zahřáty na teplotu blízkou skelnému přechodu plastu.
Příkladem může být výroba mikrokanálek. Provádí se
tak, že mezi dvě polymerní destičky se vloží tenký kovo-
vý drátek. Pak je sestava sevřena mezi dvě skleněné
desky a zahřáta na teplotu 90 °C. Destičky se spojí
a drát se vtiskne do nich. Metoda vstřikování je velmi
podobná výrobě plastů v makrosvětě. Do vakuově uza-
věřené formy se vstřikuje polymer, který se opět zahřívá.
Při tomto způsobu replikace je potřeba udržovat vyso-
ký stupeň čistoty, ale jinak jsou náklady na replikaci
nízké. Odlévání je standardní metodou. Samozřejmě je

Literatura

1. Šnita, D.: *Mikrofluidní systémy, popis konstrukce
a výroby mikrostruktur, vybrané senzorové a další
aplikace*. Odborný seminář, VŠCHT Praha, 2006.
2. Goodsell, D.S.: *Nature*, 430, 20 (2004).
3. Langer, R., Peppas, N.A.: *AIChE J.*, 49, 2990 (2003).
4. Gourley, P.L.: *Biotechnol. Prog.*, 21, 2, (2005).

potřeba vyrobit formu jako primární matici, nejčastěji
z kovu. Ta se poté zalije tekutým polymerem a nechá
ztuhnout. Poté se finální struktura oddělí od matrice. Je
to tudíž velmi jednoduchá metoda, která nevyžaduje
žádné zvláštní vybavení.

Další metody většinou spočívají v modelování 3D
struktur pomocí nanášení a zápisu (vytvrzení) vrstvy za
vrstvou jako například 3D printing (3DPTM), selektivní
slinování laserem (SLS) – zde je vrstva nanášena ve
formě prášku a některé další. Také existují i kombino-
vané technologie, tzv. „LIGA“ (lithografie), „Galvanoform-
mung“ (pokovování) a „Abformung“ (otisk). Souhrnně
se dá říci, že se jedná o různé variace výše uvedených
technik a samozřejmě některých dalších jako třeba
elektrodepozice.

Závěrem lze shrnout, že biomikronanotechnologie
jsou v současné době nesmírně dynamicky se rozvíjejí-
cí oblastí s obrovskými možnostmi.

5. He, X., Zhao, X.J., Drake, T.: *Med. Res. Rev.*, 24, 621
(2004).

6. Sharma, G., Mavroidis, C., Ferreira, A.: *Handbook of
Theoretical and Computational Nanotechnology*,
Vol X, 1-33 (2005).

BIOTECHNOLOGIE JAKO ALTERNATIVA PRO CHEMICKÝ PRŮMYSL

Pavel Vopálenký, VŠCHT Praha

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Na počátku 20. století, dříve než byla ropa označena
za univerzální surovinu a zdroj energie, se chemický
průmysl opíral o uhlí a obnovitelné zdroje. Do třicátých
let byla běžná výroba paliv a základních chemikálií jako
ethanol, butanol a různých organických kyselin usku-
tečňována biotechnologickými postupy. S nástupem
petrochemického průmyslu bylo však mnoho těchto
postupů nahrazeno chemickou syntézou. V sedmdesá-
tých letech, po první ropné krizi, začaly biotechnologie
opět přitahovat pozornost. Dle prognóz by mělo být
dosaženo maximální produkce ropy během příštích
desetiletí, přičemž se snižující se dostupností ropy
budou její ceny vzrůstat. Společně s tímto ekonomick-
kým faktorem vstupuje do popředí i faktor „ekologic-
ký“. Lidé „prostřednictvím svých ekonomických aktivit
a jednostranné environmentálně a sociálně bezohled-
né honbě za ekonomickým prospěchem zničili
významnou část svých existenčních podmínek“. (Návrh
strategie udržitelného rozvoje České republiky, Český
ekologický ústav). Lidé si začali uvědomovat, že zatím-
co jejich pohodlí je robustně zabezpečeno materiálně
a ekonomicky, environmentální a zdravotní podmínky
se stávají neudržitelnými. V roce 1987 byl poprvé

definován pojem udržitelný rozvoj: „Udržitelný rozvoj
znamená zlepšování životní úrovně a blahobytu lidí
v mezích kapacity ekosystémů při zachování přírodních
hodnot a biologické rozmanitosti pro současné a příští
generace.“ (Nařízení Evropského parlamentu a Rady
číslo 2493/2000 a číslo 2494/2000) Zachování udrži-
telného rozvoje znamená využívat co nejvíce obnovitel-
ných zdrojů, snížit produkci odpadů a přiblížit se tak co
nejvíce přírodním dějům na Zemi. Jediným prvotním
zdrojem energie na Zemi je Slunce a všechny přírodní
děje jsou dlouhým vývojem postaveny tak, aby co nej-
efektivněji tuto energii využívaly a transformovaly. Pře-
měny látek v živých systémech jsou tak jedny z nejučinně-
jších, které známe. Proto je zřejmé, že vhodně navr-
žený biotechnologický proces by, ve srovnání s tradiční
chemickou technologií, měl být teoreticky vždy účinněj-
ší a ekonomičtější, zejména pak při použití organismů
využívajících přímo energie Slunce. Z níže uvedených
příkladů biotechnologických výrob je však patrné, že
v současné době zatím není biotechnologie většinou
schopna ekonomicky konkurovat tradičním chemickým
výrobám. To je dáno špatným konceptem tzv. tržní eko-
nomiky, která „nepřisuzuje hodnotu věcem o sobě

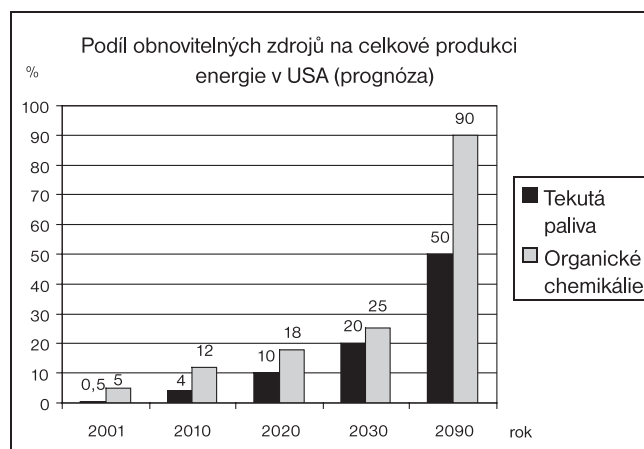
(včetně přírodních zdrojů), ale pouze věcem pro nás, věcem, které mohou mít pro nás nějaký konzumovatelný význam a v důsledku toho se mohou stát komoditou a je k nim možné exploatací či zpracováním přidat hodnotu“ (Návrh strategie udržitelného rozvoje České republiky, Český ekologický ústav), tedy v tržní ceně není nijak započítávána „vzácnost“ suroviny, dopad výroby na životní prostředí a příspěvek k udržitelnému vývoji. Tato situace se začíná pozvolna měnit např. zaváděním různých ekologických daní, které upravují cenu výrobku na základě dopadu jeho výroby, likvidace a recyklace na ekologii, a dále nalézáním nových, efektivnějších a ekonomicky výhodnějších biotechnologických procesů. Uvedené příklady ilustrují některé již používané a nově navržené biotechnologické postupy nahrazující tradiční průmyslovou výrobu.

Paliva

Paliva jsou jednou z nejdiskutovanějších otázek ve věci udržitelného rozvoje. Petrochemický průmysl v současné době produkuje tisíce barelů nafty a jiných fosilních paliv denně, nicméně již z podstaty těžby ropy je zřejmé, že nejde o obnovitelnou surovinu, navíc spalováním fosilních paliv vznikají organické polutanty. Proto je stále větší důraz kladen na vývoj a používání biopaliv. V dnešní době je podíl paliv pocházejících z biomasy na celkové produkci světové energie pouze 1 %, dle prognóz uvedených v grafu by však měl během sta let dosáhnout až 50 %. Nejpoužívanějším biopalivem je ethanol. Ten používal již Henry Ford ve svém prvním autě, v Brazílii tvoří 20 % obsahu pohonných hmot a v Evropské unii je na základě Kyotského protokolu stanoven cíl zvýšit obsah bioethanolu ve všech pohonných hmotách na 5,75 % do roku 2010. Ethanol je vyráběn biotechnologicky kvasným procesem pomocí buněk *Saccharomyces cerevisiae*. Jako substrát se používá hydrolyzovaný kukuřičný nebo obilný škrob, v jihoamerických státech cukrová třtina. Obrovské úsilí je vynakládáno na vývoj technologického postupu štěpení celulózy (biotechnologicky pomocí enzymu celulózy), který by umožnil použití velkého množství levných rostlinných odpadů na produkci ethanolu, žádná vhodná technologie však dosud nalezena nebyla. Genetickými manipulacemi byla připravena transgenní bakterie *Zymomonas mobilis*, která je vedle hexózy schopna využívat i pentózy, a tak poskytuje vysoké výtěžky ethanolu nejen ze škrobových hydrolyzátů, ale např. z rýžových stébel.

Jiné možnosti přípravy biopaliva jsou anaerobní procesy rozkladu biologických materiálů na tzv. bioplyn (přibližně 55 % methanu a 45 % oxidu uhličitého). Tyto anaerobní procesy zároveň slouží při čištění odpadních vod a jiných organických odpadů. Tzv. Weizmannovým procesem, vyvinutém na počátku dvacátého století, může vznikat ethanol, butanol a aceton (ABE). Butanol může být přidáván do paliv, v porovnání s ethanolem má dokonce výhodnější vlastnosti (vyšší spalné teplo, nižší tlak nasycených par a nižší rozpustnost ve vodě). Zlepšování Weizmannova procesu vedlo

k markantnímu snížení procesních nákladů. Další slibnou technologií je extrakce butanolu biodieslem z palmového oleje, poskytující biodiesel s obsahem 18 % ABE. Tato směs může být bez dalšího čištění použita jako palivo.



Zemědělství

Agrochemikálie, zejména pesticidy a hnojiva jsou hojně využívány po celém světě ke zvýšení výnosů. Kvůli tomuto masivnímu užívání představují agrochemikálie důležitý zdroj znečištění, zdravotní riziko a jejich výroba je spojena s velkou spotřebou energie. Proto je značná pozornost věnována přípravě tzv. biopesticidů a biofertilizérů. Biopesticidy jsou mikrobiální agens nebo látky odvozené od mikroorganismů, které regulují hmyzí škůdce, plevele nebo hlodavce. Jejich aplikace je podobná aplikaci chemických pesticidů. Biopesticidy obecně vykazují vyšší specifitu, nezanechávají v prostředí škodliviny a snižují riziko vzniku rezistence u škůdců. Z mikrobiálních biopesticidů je nejpoužívanější *Bacillus thuringiensis*, který brání rostlině před napadením hmyzem. Vnesením jeho genu, jehož produkt je pro hmyz toxický, do rostlinného genomu byly vytvořeny plodiny, které se samy brání napadení. Dále jsou používány tzv. biochemické pesticidy na bázi feromonů, které působí na škůdce odpudivě.

Většina biofertilizérů funguje na principu přeměny vzdušného dusíku na amonné soli v půdě a zvýšení dostupnosti fosforu pro plodiny. V praxi se využívá zejména mykorhiza – symbióza plísňe s kořeny rostliny. Rostlina poskytuje plísni některé intermediáty metabolismu a plíseň umožňuje rostlině lepší příjem fosforu a zajišťuje jistou ochranu proti suchu a vysoké salinitě půdy. Dalším používaným systémem je symbióza bakteriálního kmene *Rhizobium* s kořeny bobovitých rostlin, při které bakteriální buňky fixují vzdušný dusík a poskytují jej rostlině. Pro zúrodnění alkalických zemí v Indii byly úspěšně použity modrozelené řasy. Bylo tak využito jejich schopnosti fixovat vzdušný dusík a současně fotosynteticky produkovat organické látky a dodávat je do půdy.

Polymery

Plasty jako velkovýrobní produkty petrochemického průmyslu a současně špatně degradovatelné sloučení-

ny jsou pro biotechnologii velkou výzvou. V roce 1941 známý americký vynálezce Henry Ford představil prototyp vozu, jehož karoserie byla kompletně vyrobena z plastů pocházejícího ze sojových bobů. Fordovi se bohužel nikdy nepodařilo uvést do provozu výrobu plastu ze sojových bobů tak, aby mohl cenou konkurovat plastům petrochemického průmyslu.

Produkce biodegradovatelných polymerů – polyhydroxyalkanoátů (PHA) – v bakteriích (*Rastonia eutropha*) byla dobře známa již ve 20. letech minulého století. Japonští vědci vnesli vybrané geny této bakterie do *E. coli*, ve kterých poté tvořil PHA 96 % sušiny. V porovnání např. s polypropylenem (cena 1 USD za kg) je produkce tohoto biopolymeru (cca 4 USD za kg) stále ekonomicky nevýhodná. Redukci nákladů na výrobu by mohlo přinést vnesení potřebných genů do rostlin, které, na rozdíl od bakterií vyžadujících vhodný dodávaný substrát, získávají všechny potřebné organické látky pomocí fotosyntézy. Firmy DuPont a Genencor připravily geneticky modifikovanou bakterii *E. coli* (do níž byly vneseny geny ze tří různých organismů), která je schopná fermentačním procesem produkovat propan-1,3-diol z glukózoového sirupu získaného z kukuřičného škrobu. Propan-1,3-diol je používán k výrobě kopolymerního polyesteru Sorona, v němž druhou monomerní složku tvoří tereftalát, dosud získávaný z ropy. Tento nový typ polyesteru vykazuje dobré vlastnosti – pružnost, pevnost a je lehce barvitelný. Cargill-Dow Chemical Company otevřela v roce 2002 továrnu na Ingeo (polymléčná kyselina – PLA), jejíž monomery jsou produkovány bakteriemi využívajícími opět jako substrát kukuřičný škrob. Tento bioplast nebyl taktéž schopen cenou konkurovat petrochemickým plastům, nicméně společnost jej uvedla na trh jako zboží šetrné k životnímu prostředí, které je standardně prodáváno s vyšší cenou.

Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory vykazující oproti tradičním katalyzátorům vyšší selektivitu a účinnost za mírnějších reakčních podmínek. Ačkoliv jejich použití např. v produkci sýrů je známo už mnoho let, kvůli jejich složitě a nákladné izolaci došlo k širší aplikaci enzymů v průmyslu až v posledních 20. letech. V roce 1988 byl připraven první transgenní enzym (lipáza pro použití v detergentech) a byla tak zahájena éra využití metod genového inženýrství k rychlé a méně náročné přípravě enzymů v transgenních bakteriálních buňkách. Dnes již existuje ohromný celosvětový trh s enzymy a dle předpokladů poroste každý další rok o 5 – 10 %. V tabulce jsou uvedeny nejvýznamnější průmyslové enzymy a jejich aplikace. Většina z průmyslových enzymů jsou hydrolázy, přičemž kolem 75 % je slouží k výrobě detergentů, v potravinářství a zpracování škrobu. Přibližně 10 % trhu s enzymy tvoří speciální enzymy, které mají význam zejména ve farmacii a syntéze organických látek. Jejich aplikace výrazně snižuje počet reakčních kroků, které by byly vyžadovány při tradiční syntéze, a zvyšuje účinnost výroby.

Vybrané průmyslové enzymy a jejich aplikace (dle Gavrilescu M., Christi Y., 2005)

Enzymy	Katalyzovaná reakce	Průmyslová aplikace
Proteázy	Proteolýza	Detergenty, potravinářství, farmaceutický a chemický průmysl
Lipázy	Hydrolýza tuků na mastné kyseliny a glycerol	Potravinářství, detergenty
Pektinázy	Klarifikace ovocných šťáv	Potravinářství
Celulázy	Hydrolýza celulózy	Detergenty, krmivářství, textilní průmysl
Amylázy	Hydrolýza škrobu na cukru	Potravinářství

Další výhodou použití biokatalyzátorů je jejich stereospecifita umožňující selektivní produkci enantiomerů. Různé enantiomery mají obecně i různé biologické účinky – jedna forma vykazuje požadovanou aktivitu, zatímco druhá může být nebezpečná. Známý je příklad thalidomidu, jehož jeden enantiomer pomáhá těhotným ženám při ranních potížích, zatímco druhá forma zapříčiňuje deformace vyvíjejícího se plodu. Jiným příkladem aplikace enzymů je syntéza antibiotika cephalosporinu. Chemická syntéza vyžaduje 10 kroků za vzniku cca 50 kg odpadu na kilogram vyrobeného antibiotika. Použití čtyřkrokového enzymového postupu produkuje pouze 15 kg odpadu na kilogram antibiotika a nově vyvinutý fermentační proces produkuje pouze 2 kg odpadu na kg výrobku. Dalším úspěšným použitím biotechnologického postupu namísto chemického je výroba akrylamidu. Namísto tradiční chemické výroby vyžadující velké množství energie je používán imobilizovaný enzym nitrilhydratáza. Z následující tabulky jsou zřejmé výhody bioproduktu.

Porovnání parametrů chemické a biotechnologické výroby akrylamidu (dle Gavrilescu M., Christi Y., 2005)

Parametr	Chemický proces	Bioprodukt
Reakční teplota	70 °C	0 – 15 °C
Výtěžek	70 – 80 %	100 %
Koncentrace akrylamidu	30 %	48 – 50 %
Požadovaná energie (MJ/kg akrylamidu)	1.9	0.4
Produkce CO ₂ /kg akrylamidu	1.5	0.3

Stále větší uplatnění v průmyslu nacházejí enzymy izolované z extrémofilních organismů, které mají schopnost udržet si aktivitu i za nepříznivých podmínek (vyšší teplota, vyšší iontová síla). Enzymy vykazující aktivitu v nevodných prostředích našly použití v produkci modifikovaných tuků a olejů. Při hledání dalších enzymů extrémofilních organismů může v budoucnosti pomoci i nově vzniklá disciplína – metagenomika.

Metagenomika

Výzkumníci na palubě lodi *Sorcerer II* plující kolem východního břehu USA, skrz Panamský průplav a dále

kolem Galapág, odebírají každých 200 mil 200 litrů mořské vody, jejíž filtrací získávají mikroorganismy a posílají je do laboratoře v USA. Cílem projektu je sekvenace genomu každého organismu v každém vzorku. Zjištění DNA organismů v jednotlivých životních prostředích – metagenomika – pomůže lepšímu porozumění vztahů mezi organizmy a projevy jejich genů. Na živiny chudý vzorek vody ze Sargasového moře byl již touto technikou zpracován: bylo objeveno 1800 druhů (z toho 150 dosud neznámých) a 1,2 milionu nových genů. Díky metagenomice mohou být objeveny geny, jejichž projevy najdou využití v nových průmyslových aplikacích, výrobě antibiotik (nové antibiotikum turbomycin bylo objeveno právě díky metagenomice) a nových degradačních drahách.

Literatura

1. Gavrilescu M., Chisti Y.: *Biotechnol. Advance*, 23, 471 (2005).
2. Sasson A.: *Biotechnology: Current Achievements and Prospect, Social Acceptance of Biotechnology-derived Products*, 2004.
3. Willke T., Vorlop K. D.: *Appl. Microb. Biotechnol.* 66, 131 (2004).
4. Návrh strategie udržitelného rozvoje ČR, Český ekologický ústav (www.ceu.cz).

GENETICKY MODIFIKOVANÉ PLODINY

Jana Zlámalíková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Geneticky modifikované plodiny – ano či ne?

Na naší planetě žije v současné době asi 6 miliard lidí a toto číslo neustále stoupá. Již nyní existují oblasti trpící hladomorem. Bude v budoucnu dostatek potravy pro všechny? Idea geneticky modifikovaných organismů (GMO) vznikla, aby bylo v zemědělství dosaženo co nejlepších výsledků, tj. kvality a výnosů. Při klasickém šlechtění dochází k nekontrolované změně sta až tisíce genů na náhodném úseku DNA šlechtěného jedince, zatímco u metody genetické modifikace je modifikovaný organismus obohacen o jeden, maximálně několik genů, které jsou vkládány na určité místo molekuly DNA. Jde tedy o urychlené šlechtění.

Geny, které se vkládají do GMO, dávají většinou modifikovanému jedinci odolnost proti chemikáliím užívaných v zemědělství (herbicidy, pesticidy) nebo vyvolávají tvorbu látek, které jsou toxické pro škůdce dané plodiny.

GMO se po genetické modifikaci dlouho sledují. Gen, který má být vnesen do molekuly DNA modifikované zeleniny, nesmí být podobný žádnému genu pro známý toxin. Po modifikaci má upravená molekula DNA své původní vlastnosti, ale nový gen zajišťuje při proteosynté vznik bílkoviny, která v plodině dříve nevznikala. Tato bílkovina se zkoumá. Všechny GMO, u kterých se objeví jakákoliv vada, jsou zlikvidovány.

Nebezpečí geneticky modifikované zeleniny rezistentní vůči herbicidu spočívá v tom, že se tato zelenina může zkřížit s plevelem, který by se tak mohl stát nezni-

Závěr

Uvedené příklady ukazují postupné úspěšné začleňování biotechnologie do výrobních procesů. Současný mohutný rozvoj biologických věd a technik vede k dalšímu usnadňování zavádění biotechnologií do velko-
provozních měřítek. Tento proces však vyžaduje i změnu dosavadního ekonomického náhledu na svět směrem k doceňování dopadů výroby na životní prostředí, neboť zatím v mnoha případech není biotechnologie schopna konkurovat zavedeným, k životnímu prostředí však zcela nešetrným postupům. Biotechnologie nabízí velmi slibnou cestu k udržitelnému rozvoji.

čitelným. To se může stát jen ve zvláštním případě, protože většina geneticky modifikované zeleniny je zcela odlišná od plevelu, který je likvidován při jejím pěstování. V úvahu to přichází u řepky olejky, která se může zkřížit s planou ředkvičkou, planou vodnicí nebo planou kapustou. Ve Velké Británii byla objevena planá odrůda řepky olejky odolná proti třem herbicidům. To se mohlo stát pouze nesprávným zacházením s touto plodinou, protože řepka se sklízí po prvním roce pěstování a nevykvete. Také u geneticky modifikované rýže je hlavní problém v tom, že rýže má mnoho planých odrůd.

Druhým problémem je zkřížení geneticky modifikované zeleniny s nemodifikovaným druhem. Proto jsou pevně stanoveny hranice mezi poli s geneticky modifikovanou a nemodifikovanou zeleninou.

Další otázkou je, zda si plevel nemůže častým používáním herbicidů vytvořit odolnost proti těmto látkám. Většina herbicidů však pracuje na systému, kterému si plevel nikdy nemůže přivyknout. První GMO byl vyšlechtěn asi před 20 lety a dosud nebyl zjištěn jediný případ nebezpečnosti¹.

Současné formy GMO zajišťují především zvýšení výnosů. V budoucnosti přijdou na řadu také typy s vyšší kvalitou. Nové GM odrůdy budou např. odolnější k biotickým i abiotickým stresovým faktorům, přijdou na řadu plodiny se zvýšenou nutriční hodnotou (vitaminy, antioxidanty aj.), transgeny pro farmakologické využití produkující protilátky a samozřejmě transgeny pro průmyslové využití².

Geneticky modifikovaná kukuřice MON810

Tato kukuřice si díky genetické modifikaci vyrábí tzv. Bt-toxin a je proto odolná proti zavíječi kukuřičnému. Pokud housenka tohoto motýla napadne rostlinu, otráví se. Zavíječe kukuřičného není snadné zničit - jeho housenky se brzy zavrtají do rostliny a jsou tam dokonale chráněny. Člověk se Bt-toxinu nemusí bát. Důkladné testy prokázaly, že škodí právě jen housenkám motýlů. Lidem ani zvířatům neublíží ani v nejmenším. Navíc když kukuřice není prožraná zavíječem, tak se do ní nepouštějí plísňe a rostlina díky tomu neobsahuje mykotoxiny, které jsou na rozdíl od Bt-toxinu skutečně nebezpečné. Jejich konzumace je totiž spojena kromě jiného se vznikem rakoviny jater.

Bt-toxin byl objeven na počátku 20. století v bakterii *Bacillus thuringiensis*. Už desetiletí se používá v podobě sušených spor bakterií jako ekologický pesticid, kterým se „práškuje“ rozsáhlé plochy. V bakterii vzniká v netoxické formě. Na toxickou se přeměňuje ve střevu hmyzu (zásaditém prostředí). Účinným se stává po vazbě na receptor, který má ve střevní stěně jen vybraná skupina organismů. Dnes je k dispozici široké spektrum Bt-toxinů, které mají specifický účinek (na housenky motýlů, na brouky, na hádátka, aj.). Běžné insekticidy takovou specifitu nevykazují a účinkují tak na velké množství hmyzu. Díky tomu nenarušuje pěstování tzv. Bt-kukuřic biodiverzitu polí. Na polích s geneticky modifikovanou Bt-kukuřicí žije pestřejší společenství organismů než na polích s tradičními odrůdami kukuřice. Prokázaly to výzkumy ve Velké Británii a potvrdila to pro naše středoevropské podmínky i studie Entomologického ústavu AV ČR³.

V letošním roce bylo zahájeno pěstování Bt-kukuřice také v České republice. Byla vyseta na celkovou plochu 270 ha půdy. Jde jen o nepatrnou plochu, ale v příštím roce by se tato plocha mohla rozšířit. Geneticky upravenou kukuřici zkusilo jen několik pěstitelů, největší plochy jsou na jižní Moravě, některé také ve středních Čechách. Zemědělci museli plnit předepsaná pravidla, zejména dodržovat vzdálenosti mezi dvěma poli, na kterých se pěstovala geneticky modifikovaná plodina a plodina konvenční nebo v režimu ekologického zemědělství⁴. Pěstitelé čekají skvělou první úrodu. Na čtyřiceti hektarech kukuřičného pole u Čejče jsou rostliny jako ze škatulky. Ani jedna z nich není polámaná a napadená škůdci. Právě na tomto poli bez vědomí majitele pana Oldřicha Horáka Greenpeace modifikovanou kukuřici otestovalo. Modifikovanou kukuřicí krmí svá prasata, také on podporuje tvrzení, že tato kukuřice je ještě zdravější, protože neobsahuje nebezpečné mykotoxiny. Geneticky upravená kukuřice by se v budoucnu mohla uplatnit při výrobě bioethanolu - alternativy pohonných hmot z ropy. V tomto případě opravdu nezáleží na tom, zda je kukuřice geneticky modifikovaná⁵.

Čeští zemědělci letos poprvé sklízeli geneticky modifikovanou kukuřici. V rámci EU jsme se připojili k dalším čtyřem státům, kde zemědělci zaseli kromě tradičních odrůd také geneticky modifikované odrůdy

kukuřice. K dalším evropským státům pěstující geneticky modifikovanou kukuřici patří Španělsko (cca 50 000 ha), Portugalsko (cca 750 ha), Francie (cca 500 ha) a Německo (cca 360 ha)⁶.

Geneticky modifikované brambory

Geneticky modifikované brambory obsahující vakcínu proti hepatitidě typu B úspěšně zvýšily imunitu při prvních pokusech na lidech. Při testování efektivity vakcíny v bramborách se jednoznačně ukázalo, že pozměněné plodiny dokážou výrazně zvýšit množství protilátek v krevním oběhu. Všichni testovaní lidé však byli předtím proti hepatitidě B konvenčně očkováni, tedy bramborová vakcína výrazně posílila konvenčně získanou imunitu. GM plodiny by se tak staly levným zdrojem vakcíny, který by se mohl pěstovat a upravovat také v chudších oblastech světa. Výrobci léků jsou proti tomuto způsobu šíření vakcíny, hlavně pomocí dalších tržních plodin jako jsou banány, rajčata nebo právě brambory. Důvodem, proč s touto formou výrobců a jejich vývojové týmy nesouhlasí je to, že pokud by k distribuci došlo, plodiny by mohly být konzumovány v neuvážených množstvích s těžko odhadnutelnými následky. V současnosti se výzkumné týmy zaměřují na tvorbu vakcín v jedlých listech rostlin, které by se neprodávaly jako potravina. Listové pletivo by bylo poté uzavřeno v želatinových kapslích. Nejlepší výsledky se projeví zatím u rostliny *Nicotiana benthamiana*⁷.

Geneticky modifikované brambory v ČR

Šlechtitelé Sativy Keřkov navázali spolupráci s Ústavem experimentální botaniky AV ČR, který měl k dispozici gen z Francie pocházející z bakterie *Lactobacillus bulgaricus*. Tento gen kóduje enzym fosfofruktokinázu, který působí v cytoplazmě při odbourávání cukrů glykolytickou drahou. Enzym z bakterie má jednu podstatnou odlišnost, nevdá mu chlad. Rostlina bramboru má vlastní enzymy s aktivitou fosfofruktokinázy, ale oba jsou citlivé na chlad, takže při nízkých teplotách přestávají fungovat. Konzumní brambory se skladují při nízkých teplotách, aby nekličily. V hlízách pak dochází k hromadění jednoduchých cukrů, protože enzymy s fosfofruktokinázovou aktivitou nepracují, a proto brambory sládnou. Při smažení pak brambory obsahující více jednoduchých cukrů hnědnou, a to je jeden z problémů při výrobě lupínků. Byl připraven konstrukt vhodný k použití u brambor a po mnoha experimentech se podařilo vnést jmenovaný gen z *Lactobacillus bulgaricus* do dvou odrůd brambor - Kamýk a Korela⁸. V roce 2001 byly různé transgenní klony těchto odrůd pěstovány v malém polním pokusu na Šlechtitelské stanici v Keřkově. Do pokusu byly vysázené pro kontrolu i netransformované odrůdy Kamýk a Korela.

Ve spolupráci s VÚB v Havlíčkově Brodě byla provedena analýza obsahu jednoduchých cukrů u transgenních klonů. První analýza byla provedena jeden měsíc po sklizni, kdy teplota při skladování hlíz neklesla pod 10 °C. U Kamýku vykazovalo 5 klonů nižší hladinu cukrů než kontrola. U Korely neměl žádný transgenní

klon nižší hladinu cukrů než kontrola. Druhá odrůda má však vyšší přirozený obsah cukrů v hlízách a větší množství cukrů může být výrazněji změněno při déle trvajícím působení bakteriálního enzymu. Můžeme tedy očekávat, že výraznější změny v transgenních klonech obou odrůd nastanou až při dlouhodobém skladování při 4°C, což je konečná teplota skladování. Tato teplota nevede enzymu bakterie, ale vyřazuje z činnosti oba enzymy rostliny⁸.

Rajčata produkující více β-karotenu

Mezinárodní výzkumný tým zahrnující pracovníky ze Spojeného království, Japonska a Německa, vyvinul odrůdu rajčat s trojnásobným množstvím β-karotenu proti běžným odrůdám. β-karoten patří do skupiny karotenoidů - rostlinných pigmentů, které jsou příčinou žlutého až červeného zbarvení ovoce, zeleniny a květin. β-karoten se v lidském těle mění na vitamin A, jehož nedostatek může být příčinou poruch oběhového systému, některých druhů rakoviny a rovněž degeneračních změn očí, které mohou vést až k oslepnutí. Vyšší příjem β-karotenu může příznivě ovlivňovat imunitní systém a snižovat případné poškození kůže slunečním zářením.

Jedna z možností zvýšení příjmu karotenoidů je zvýšit jejich obsah v ovoci a zelenině. Skupina vědců pod vedením prof. P. Bramleye z Londýna (Royal Holloway, Univ. of London) pozměnila syntézu karotenoidů rajčaty přenosem genu jisté bakterie do rostliny. Tento gen mění sloučeninu phytoen na lykopen, který je příčinou jasně červené barvy rajčat a dále se účastní syntézy β-karotenu. Rajčata poté obsahují až 3,5krát více β-karotenu. Modifikace nemá vliv na růst nebo vývoj rostlin a přenáší se i na další generace. Dalším zjištěním je, že tepelně zpracovaná rajčata a výrobky z nich mají zvýšenou nutriční hodnotu, protože umožňují lepší absorpci karotenoidů v zažívacím traktu⁹.

Genetická modifikace rajčat

První geneticky modifikovaná rajčata byla vypěstována v polovině 90. let. Měla delší skladovací dobu a údajně lepší chuť. Na trh se dostala pod názvem „Flavr Savr“. V současné době se pracuje na širší modifikaci, která má dát rajčatům a jiným plodům látky důležité pro lidské zdraví.

Mezinárodní vědecké konsorcium se snaží získat úplný genom rajčete. Rajče se má stát modelem pro práci na jiných plodech. V čele projektu stojí vědečtí pracovníci z Cornell University (Ithaca, stát New York) ve spolupráci s vědci z Kanady, Evropy i Číny. V roce 2003 začala práce na „Mezinárodním projektu pro studium genomu rodu Solanacea“. Podle Jima Giovannoniho, amerického zemědělského molekulárního biologa, by měl být znám úplný genom do 2 let. Cílem následné modifikace je, aby rajčata produkovala větší množství vitaminů a antioxidantů jako jsou např. karotenoidy, které pozitivně působí proti vzniku rakoviny. Plody jiných rostlin mají vyšší obsah těchto látek, rajčata však byla vybrána pro poměrně jednoduchou strukturu své DNA a pro podobnost s mnoha druhy zeleni-

ny i ovoce. Na základě poznatků získaných na rajčatech se očekává mnohem rychlejší postup při modifikacích melounů, banánů a dokonce kávových bobů¹⁰.

Zlatá rýže

Nový druh geneticky modifikované „zlaté rýže“ tvoří, ve srovnání se svojí čtrnáct let starou předchůdkyní, mnohonásobně více provitaminu A (β-karotenu). Zlatou rýží poprvé připravili v roce 1999 švýcarští a němečtí vědci (I. Potrykus z Technical University ve švýcarském Zurichu s kolegou P. Beyerem z německé University of Freiburg)¹¹. Byla vytvořena, aby produkovala β-karoten, ze kterého vzniká v těle vitamin A. Tento vitamín má antioxidační účinky, chrání zejména buňky sliznice a kůže, kde se podílí na ochraně před UV zářením. β-karoten je také důležitou látkou v obraně organismu proti nádorům, infekčním chorobám, dně, překyselení organismu a je nezbytný pro správnou funkci zraku. Hladina provitaminu v této rýži dosahuje 1,6 μg/g rýže. Nová odrůda ho vytvoří více - 37 μg/g rýže. Vyšší výkonnost nové rýže byla dosažena výměnou genu. Původně byl do rýže vložen gen pro tvorbu β-karotenu z narcisu. Zmíněný gen má však svůj protějšek také v kukuřici a vědci zjistili, že právě ten dokáže u rýže výrazně zvýšit produkci provitaminu. Tvrdí to Rachel Drakeová, která pracuje ve firmě Syngenta Seeds v anglickém Cambridge, a jejíž tým novou rýží vytvořil. Rýže vznikla na požadavek humanitární organizace Humanitarian Rice Board, která se snaží řešit problémy s nedostatkem potravy v nejchudších částech naší planety¹¹.

Rýže odolná vůči hmyzím škůdcům

Pěstování geneticky modifikované rýže odolné vůči hmyzím škůdcům přináší čínským farmářům nejen vyšší úrodu a dramaticky nižší výdaje za insekticidy, ale zároveň jim šetří zdraví. Výzkum provedli vědci z čínské akademie věd s americkými kolegy z University of California v Davisu a Rutgers University v New Brunswicku. Využili „poloprovozních“ zkoušek geneticky modifikované rýže a prověřili nejen ekonomické, ale i zdravotní následky pěstování GM rýže pro čínské farmáře. Šlo o linie Xianyou 63 a Youming 86, které jsou odolné vůči hmyzím škůdcům díky modifikovanému genu pro trypsinový inhibitor. Výnosy jsou u geneticky modifikované rýže jen nepatrně vyšší, ale náklady za insekticidy jsou podstatně nižší. Také šetří čas čínským farmářům, který by strávili postřikováním rýžoviště (viz. následující tabulka).

Ukazatel	Pěstitelé GM rýže	Pěstitelé konvenční rýže
Počet ošetření pesticidy (kolikrát se za rok stříkalo)	0,5krát	3,7krát
Výdaje za pesticidy (v juanech na hektar)	31	243
Množství spotřebovaných pesticidů (kg/ha)	2,0	21,2
Práce vynaložená na postřiky (dny/ha)	0,73	9,1
Výnos rýže (kg/ha)	6 364	6151
Počet zúčastněných farmářů	123	224

Farmáři pěstující konvenční odrůdy trpí mnohem více chorobami vyvolanými otravou pesticidy. V následující tabulce jsou procenta farmářů, kteří utrpěli újmu na zdraví v důsledku používání pesticidů (počítají se jen problémy, které měl farmář bezprostředně po postřiku rýžoviště, nezapočítávají se možné trvalejší následky na zdraví). Pěstitelé geneticky modifikované rýže na tom byli výrazně lépe¹².

ROK	Farmáři pěstující výhradně GM rýži	Farmáři pěstující GM i konvenční rýži		Farmáři pěstující výhradně konvenční rýži
		Na pozemcích s GM rýži	Na pozemcích s konvenční rýži	
2002	0	0	7,7	8,3
2003	0	0	10,9	3,0

Káva bez kofeinu

O kávu bez kofeinu je na světovém trhu stále větší zájem, spotřebitel požaduje kávu, která by mu nezvyšovala krevní tlak, a po které by bez problémů usnul, i když si jí dá večer před spaním. V roce 2002 byly vysázeny geneticky modifikované kávovníky, které budou produkovat kávová zrna s minimálním obsahem kofeinu. Tyto rostliny nemají gen pro tvorbu kofeinu a kávová zrna obsahují o 50 až 70 % této stimulační

látky méně než zrna pocházející z klasické rostliny. Káva vyrobená ze zrn geneticky modifikované rostliny by se dostala obsahem kofeinu na hladinu prodáváných produktů u nichž je kofein odstraňován fyzikálními metodami.

Extrakci kofeinu z kávy je možné dělat dvěma způsoby. Buďto levnou procedurou s organickými rozpouštědly (používaná organická rozpouštědla jsou ale karcinogenní a v takto připravované kávě stopy rozpouštědla mohou zůstat), nebo technologicky náročným postupem pomocí CO₂, kdy je získáván zdravotně zcela nezávadný a aromaticky bohatší produkt. Při výrobě kávy bez kofeinu z geneticky modifikovaného kávovníku by nevznikaly další vedlejší náklady oproti její výrobě z klasické plodiny. Autoři výzkumu jsou z Nara Institute of Science and Technology v Japonsku, vedoucím týmu je Shinjiro Ogita. Kávovníkové keře se sníženým obsahem kofeinu náleží ke kávovníku *Coffea canephora*. Na tvorbě kofeinu v rostlinách se podílí tři enzymy. Výzkumníci zabránili expresi genu pro theobrominsyntázu, neboli CaMXMT1. Nyní Japonci již pracují na tom, aby stejnou metodou upravili rostliny kávy náležející ke *Coffea arabica*¹³.

Literatura

1. <http://www.vupp.cz> (zdroj: Spolana noviny č.7, červenec 2005).
2. Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy (editor: J. Káš, 2004).
3. <http://www.osel.cz> (J. Petr, 10. 9. 2004).
4. <http://www.agris.cz> (zdroj: ČTK, 28.07.2005).
5. Mladá fronta Dnes, 03.10.2005.
6. <http://www.agris.cz> k (11.10.2005).
7. <http://www.uzpi.cz>
8. <http://www.agroweb.cz> (zdroj: Úroda, 18. 2. 2002).
9. <http://www.vupp.cz> (zdroj: FOODTODAY–EUROPIAN FOOD INTERNATIONAL COUNCIL NEWSLETTER, č. 23, září 2000).
10. Britské listy, 16. 7. 2004.
11. <http://www.osel.cz> (J. Pazdera, 3. 4. 2005).
12. <http://www.osel.cz> (J. Petr, 2. 5. 2005).
13. <http://www.osel.cz> (J. Pazdera, 25. 6. 2003).

GENETICKY MODIFIKOVANÁ JABLKA

Jitka Najmanová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

V posledních letech a hlavně v posledním roce se hned několik vědeckých pracovišť zabývá výzkumem jabloní. Tento ovocný druh mírného pásma má několik podstatných nevýhod pro šlechtění, jako je vysoce heterozygotní charakter genomu a dlouhý reprodukční cyklus. Na molekulární bázi se vědci snaží vylepšovat barvu plodů, odolnost vůči patogenům, ale třeba i zavést přesné metody pro určování původu nových odrůd vzniklých křížením.

Alely kontrolující barvu jablek

Barva je jedním z nejdůležitějších parametrů pro obchod s jablky, neboť zákazník upřednostňuje červe-

nou barvu před žlutou a zelenou. Červená barva jablka je podmíněna množstvím antokyaninu, zelená a žlutá množstvím a poměrem karotenoidů a chlorofylu. Barva je u jabloní řízena jedním genem a přítomnost červeného pigmentu je dominantní. Na chromozomu jsou přítomny dva fragmenty kódující červenou barvu – A¹ (1160 bp) a A² (1180 bp) a dva fragmenty kódující žlutou barvu - a¹ (1230 bp) a a² (1320 bp). Melounová a kol.¹ kontrolovali pomocí PCR zbarvení u 21 českých odrůd jabloní s cílem ověřit genetický původ jednotlivých barev, neboť variabilita červené či žluté barvy je velmi často geneticky nepodmíněna.

Tab. 1: Charakteristika barev pokožky jablek a detekované složení A-alel.

varianta	barva pokožky	klasifikace podle Cheng a kol.	detekovaný genotyp
Aneta	převážně tmavě červená	červená	A ¹ a ²
Angold	žlutozelená s červeným nádechem	žlutá	a ² a ²
Biogolden	čistě žlutá	žlutá	a ¹ a ²
Goldstar	čistě žlutá	žlutá	a ¹ a ¹
James Grieve Red	převážně tmavě červená	červená	A ¹ A ¹
Jantar	převážně šarlatově červená	červená	A ¹ a ¹
Jonalord	převážně tmavě červená	červená	A ¹ A ¹
Julia	převážně tmavě červená	červená	A ¹ A ¹
Karmína	šarlatově červená po celém ovoci	červená	A ¹ A ¹
Klára	převážně tmavě červená	červená	A ¹ a ²
Melodie	převážně nachově červená	červená	A ¹ A ¹
Nabella	převážně karmínově červená	červená	A ¹ A ¹
Nela	převážně tmavě červená	červená	A ¹ A ¹
Otava	žlutá s oranžovým nádechem	žlutá	a ¹ a ²
Rajka	převážně jasně červená	červená	A ¹ a ¹
Rosana	převážně karmínově červená	červená	A ¹ a ¹
Šampion	červenopruhovaná	červená	A ¹ a ²
Selena	převážně tmavě červená	červená	A ¹ a ¹
Sparjon	převážně tmavě červená	červená	A ¹ a ¹
Vanda	převážně jasně červená	červená	A ¹ a ¹
Zuzana	převážně oranžovočervená	červená	A ¹ a ¹

Zbarvení jablek bylo hodnoceno podle Cheng a kol.². V Tab. 1 vidíme, že pouze u 4 odrůd byla zjištěna žlutá barva. Z toho 2 jablka měla červený nebo oranžový nádech, ačkoli PCR analýza neprokázala A-alelu. Tmavě červené zbarvení bylo typické pro homozygoty A¹A¹. Alela A² se v žádné z 21 testovaných českých odrůd jablek nevyskytovala. Tato alela pochází z odrůdy White Angel z Asie.

Alely kontrolující neslučitelnost stejných genů

Neslučitelnost genů je způsob, jak se rostliny chrání před opylením jejich vlastním nebo příbuzným pylem. Neslučitelnost je řízena skupinou S-alel, které jsou lokalizovány na multifunkčním lokusu (S-lokus) na pestíku. Opylení a růst je inhibován, pokud pyl a pestík mají ty samé S-alely. Do dnešní doby bylo na světě popsáno 25 typů S-alel. Běžně se vyskytují S1 – S11, ostatní pouze u samostatných kultivarů. Pomocí PCR analýzy Melounová a kol.¹ zjišťovali typ S-alely jednotlivých odrůd, aby tak ověřili pravost rodičovských odrůd. Např. u odrůdy Jantar byly zjištěny alely S3S7. Jako rodičovské odrůdy jsou udávány Golden Delicious x Jonathan, tomu odpovídá známé složení S-alel: S2S3 x S7S9. Obě dvě rodičovské odrůdy se však podařilo ověřit pouze ve dvou případech. U většiny odrůd byl ověřen jeden z rodičů (11 odrůd), u zbylých se nepodařilo ověřit původ S-alel vůbec.

Pomocí této analýzy je možné také určit ty odrůdy jabloní, které jsou si navzájem špatnými opylovači. Blažek³ popsal odrůdy Vanda a Rosana jako špatné opylovače, což se také PCR analýzou prokázalo. Obě odrůdy

mají S5 alelu. Z určených odrůd lze následně vybrat ty, které mají ojedinělou S-alelu, neboť ty budou dobrými opylovači pro druhy s obvyklou S-alelou.

Alely kontrolující rezistenci vůči strupovitosti

Další trend ve šlechtění jabloní je získávání odrůd, které jsou rezistentní vůči strupovitosti. Původcem strupovitosti jabloní je vřecovkýtrusná houba *Venturia inaequalis*. Houba napadá listy i plody jabloní. Na plodech se objevují různě velké šedočerné skvrny, pokožka v místě napadení korkovatí a někdy praská. Silně napadené listy, květy a mladé plůdky předčasně opadávají. K získání této rezistence se používá dominantní Vf-alela. Častý donor této alely je *Malus floribunda* Sieb. klon 821 (Vejl a kol.⁴). Pro detekci tohoto genu se používá PCR metoda navržená Vejl a kol.⁴ a Melounová a kol.¹. Opět 21 českých odrůd jabloní bylo podrobeno této analýze. U všech rezistentních odrůd Melounová a kol.¹ detekovali heterozygotní genotyp VfVf. Ve všech citlivých odrůdách a v odrůdách s částečnou polygenní tolerancí vůči strupovitosti detekovali genotyp vfvf. Homozygotní genotyp VfVf není popsán u žádné české odrůdy jabloní.

Další možností jak vyšlechtit rezistentní odrůdu, je vložení Vm genu z odrůdy OR 45 T 132. Tento gen však nebyl nalezen v žádné z nových českých odrůd jabloní.

Identifikace podnoží jabloní pomocí SSR-markerů

SSR („simple sequence repeat“) izolované z jabloní se používají pro identifikaci kultivaru, pro posouzení

genetické rozmanitosti a k sestavování genetických map potomků roubování. Kvůli nekontrolovanému volnému opylování, nesprávnému určování štěpů a jednodučnosti s jakou se rostlinný materiál přenáší mezi zeměmi, je složité určit pravou identitu mnoha klonů a podnoží. Oraguzie a kol.⁵ provedli PCR analýzu se sedmi SSR-markery u šedesáti šesti podnožních klonů jabloní z celého světa. Sedm SSR-lokusů dávalo jeden až dva slabé produkty u všech testovaných podnoží. Analýza původu ukázala, že všechny hybridní klony získaly po jedné alele z každého rodiče, kdežto subklony měly identický genotyp s jejich virem infikovaným rodičem. Výsledky také ukázaly, že klon Mpumila M1, který byl považován za rodiče klonu USA Mac1, jím pravděpodobně není, neboť se lišil ve čtyřech ze sedmi alel. Tento výzkum prokázal, že SSR-markery mohou být užitečné při ověřování původu klonů, a že příbuznost podnoží je primárně založena spíše na genetickém než na geografickém původu podnože. Tento výsledek koresponduje s faktem, že se pro šlechtění využívá pouze několik běžných druhů. Některé klony se bohužel nepodařilo zařadit vůbec. Pro vylepšení metody je pravděpodobně zapotřebí optimální počet SSR-markerů.

PCR-RFLP analýza DNA z *Candida phytoplasma prunorum*

Candidatus phytoplasma prunorum neboli fytoplasma evropské žloutenky peckovin („European stone fruit yellows“ – ESFY) infikuje různé druhy rodu *Prunus*. V minulosti dostala několik jmen podle druhu a rozdílných symptomů (leptonekróza slivoní, Molierova nemoc u třešní, fytoplasma chlorotického svinování listů meruněk). Příbuzná fytoplasma je známá také u hrušek (pear decline) a u jabloní (proliferace jabloní - AP). Běžné symptomy ESFY jsou žloutnutí a svinutí listů v létě, mimosezónní růst v zimě, odumírání až úplný rozklad rostliny. Hlavním přenašečem je člověk při vegetativním rozmnožování.

Poprvé identifikoval primery pro PCR a RFLP analýzu fytoplazmy u ovocných stromů Jarausch a kol.⁶ v roce 1994. Použil k tomu chromozomální fragment (1–8 kbp) z AP fytoplazmy. PCR ukázala, že AP fytoplasma může být rozdělena do třech podtypů s odlišnou DNA. Některé z těchto primerů se ukázaly být schopné

amplifikovat homologní fragment u ESFY fytoplazmy. U ní však nebyly zjištěny žádné rozdíly v DNA isolátů z devíti podtypů (rozděleny podle druhu rostliny, na kterou působí). V roce 2000 analyzovali Jarausch a kol.⁷ 175 fytoplazem (izolovaných ze čtyř jihoevropských zemí, z různých druhů rodu *Prunus*). Jeden primer se ukázal vhodný pro všechny druhy, tvoří produkt o velikosti 237 bp. Tento produkt tvořily všechny analyzované vzorky, což prokázalo infekci ESFY fytoplazmou, ačkoliv se charakteristické letní symptomy u nich neobjevily. Tím byl také potvrzen výskyt této nemoci v zemích, kde se zatím neobjevila (např. Turecko). Jelikož byla infekce prokázána u všech vzorků, vyplývá z toho, že nemoci meruněk a slivoní ve Španělsku a Itálii (fytoplasma chlorotického svinování listů meruněk, leptonekróza slivoní) jsou také způsobeny fytoplazmou ESFY. Tento výsledek je překvapující, neboť se předpokládalo, že se fytoplasma u různých druhů a různých symptomů bude geneticky lišit stejně jako AP fytoplasma. Do dnešní doby není znám a rezistence vůči ESFY fytoplazmě.

Závěr

Velkým problémem pěstitelů jsou stále více se rozšiřující nemoci téměř všech ovocných stromů. To může být způsobeno křížením malého počtu odrůd mezi sebou. Nové odrůdy jsou méně vitální, mají abnormální morfologii květů, jsou snadněji napadnutelné patogeny a stávají se až neplodnými. Genetické manipulace poskytují nové možnosti, jak vylepšit požadovanou vlastnost bez výše zmíněných negativních dopadů. Naděje svítá i pro alergiky, neboť se začalo pracovat na potlačení exprese genu kódujícího alergen Mal d 1, na který se váží protilátky IgE, a tím aktivuje alergickou reakci. Studie Gilssen a kol.⁸ prokázala významně vyšší alergickou reakci na původní klíčnicí rostlinu než na jimi připravené transformanty. Úplně jiné potlačení exprese genu se podařilo Bulley a kol.⁹ Potlačení exprese genu pro enzym syntetizující gibberelin (gibberelin-20-oxidasa) se vědcům podařilo výrazně snížit výšku jabloně za použití minimálního množství chemických retardantů růstu. Potomek zůstane zakrslý i po naroubování na normální speciálně vyšlechtěnou podnož, která může nést například rezistenci vůči patogenu či pesticidu.

Literatura

1. Melounová M. et al., Plant Soil Environ. **51**, 65 (2005).
2. Cheng F.S. et al., Theor. Appl. Genet. **93**, 222 (1996).
3. Blažek J.: Pěstujeme jabloně, Brázda, s.r.o., Praha 2001.
4. Vejl P. et al., Plant Soil Environ. **49**, 427 (2003).
5. Oraguzie N.C. et al., Plant Breeding **124**, 197 (2005).
6. Jarausch W. et al., Appl. Environ. Mikrob. **60**, 2916 (1994).
7. Jarausch W. et al., Mol. Cell. Probe **14**, 171 (2000).
8. Gilissen L.J.W.J. et al., J. Allergy Clin. Immun. **115**, 364 (2005).
9. Bulley S.M. et al., Plant Biotechnol. J. **3**, 215 (2005).

BIO-RECEPTOR BASED METHODS (BIO-ASSAYS) FOR FOOD, ENVIRONMENT AND CLINICAL ANALYSIS

Vivek Babu Kandimalla, Nagamani Kandimalla, Milan Fránek

Veterinary Research Institute, Hudcova 70, Brno 621 00, Czech Republic,

e-mail: franek@vri.cz

Abstract

An escalating demand exists for simple, quick and reliable screening methods in food and environment monitoring. Although several chemical methods such as gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC), GC-MS etc. have been introduced for trace level detection of analytes, bio-analytical methods holds an advantage in that they are faster and cheaper. In bio-analysis, enzymes, antibodies, aptamers, peptides, microbial, plant and animal cells are employed as bio-receptor molecules. Advances in biochemistry, molecular biology, and immunochemistry have expanded the range of biological recognition elements. To design the biosensors, bio-receptor molecules are interfaced with various transducing surfaces. By employing these receptor molecules quick detection tools such as dipstick and protein microarrays have been introduced.

Introduction

The importance of environmental and food analysis has become increasingly evident during the last decade for many purposes, such as the diagnosis of pathogens, toxins, pollutants etc. The most commonly used methods for the detection of harmful chemical residues are Gas Chromatography (GC), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), GC-Mass Spectroscopy (GC-MS), LC-MS/MS etc. These methods are highly sensitive and reliable, however, costly and time-consuming because they usually require complicated sample preparation steps. The development of new methods for rapid and inexpensive determination of analytes is therefore required.

Bioassays are a potential alternative to the expensive chemical methods, as they are reliable, accurate, rapid, inexpensive and simple. Bioreceptors can be divided into three distinct groups: biocatalytic, bioaffinity, and microbe/cell-based systems and play a key role in bioassays as they recognize the target analyte. Biocatalysis-based bioassays depend on the use of enzymes to moderate a biochemical reaction. Bioaffinity-based biosensors rely on the use of proteins or DNA to recognize and bind a particular target. Microbial / cell based biosensors use microorganisms as the biological recognition element. These cell based systems generally involve the measurement of microbial respiration, or its inhibition, using the analyte of interest. Compared to enzyme-based approaches, microorganism-based bioassays / biosensors are relatively inexpensive to construct and can operate over a wide range of pH and temperature.

Enzymes

Enzymes are globular proteins that serve as catalysts. Their folded conformation creates an area known as the active site. The nature and arrangement of amino acids in the active site make it specific for only one type of substrate. Once the enzyme has bound its substrate (much like a key in a lock), a reaction occurs to modify the substrate in some way. The modified substrate is then released as a „product“ and the enzyme is free to catalyse another reaction.

Enzymes are the most commonly used bio-receptors in bioassays. The analyte can be the enzyme, whose enzymatic activity is determined, or the substrate or the enzyme cofactors. Enzymatic assays are mainly based on either inhibition of the enzyme activity or catalysis. For example variety of enzymes such as organophosphorous hydrolase (OPH), alkaline phosphatase, ascorbate oxidase, tyrosinase and acid phosphatase have been employed in design of pesticide bioassays and biosensors. Cholinesterases, acetylcholine esterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), have been widely used in bioassays due to their stability and sensitivity and are used in bioassays against pesticides and insecticides based on the pollutants inhibiting action. The reaction is monitored by measuring the color intensity in spectrophotometer, by measuring acid production in potentiometric systems or direct oxidation of thiocholine on the electrode surface in amperometric detection systems (Kandimalla and Ju, 2006). Some amperometric based methods use dual enzyme systems such as AChE and choline oxidase. OPH catalyzes the hydrolysis of a wide range of organophosphate (OP) pesticides, and as a result of its versatility, this enzyme has been incorporated into a number of assays and sensors for the detection of OP compounds and nerve destroying agents. Additional enzymes can be used to detect other environmental and food contaminants such as nitrate, nitrite, sulfate, phosphate, heavy metals and phenols. Tyrosinase is frequently used to determine phenols, chlorophenols, cyanide, carbamates and atrazine.

Aptamers

Aptamers are oligonucleic acid (DNA or RNA) sequences that bind a non-nucleic acid targets with high specificity and affinity. Aptamers are generally produced through an *in vitro* evolutionary process called „systematic evolution of ligands by exponential enrichment“ (SELEX) (Hamula, 2006). In many cases RNA libraries yield aptamers with higher binding affinities than DNA libraries due to the ability of RNA to take on a wider

variety of conformations than DNA. In 1990, the discovery of aptamers by Tuerk and Gold and subsequently by Ellington and Szostak spawned significant interest and were entered into therapeutic and diagnostic applications and emerged as a valuable research tools. Aptamers have been selected for a wide array of targets including proteins, carbohydrates, lipids or small molecules. Aptamers may mimic antibodies in a number of applications, such as flow cytometry, ELISA, cell sorting, fluorescence microscopy, western blotting, and biosensors or chips. Aptamers have a number of advantages compared to antibodies as they are smaller in size, their sensitivity can be increased, the possibility for *in vitro* production, and thus lack of immunization and animal hosts. The binding affinity, specificity and stability of aptamers can be improved by rational design or molecular evolution techniques (Kandimalla and Ju, 2004). Due to specificity and ease in labeling with fluorescence, radio isotope, or modification of nucleic acid sequence, aptamers are excellent receptor candidates for bioassays and biosensors. One of the best approaches is the development of molecular aptamer beacon (MAB), with which real time target recognition and quantification is possible. In ELISA, immunoglobulins are the primary recognition agents; using the same principle, enzyme linked oligonucleotide assay (ELONA) can be prepared using aptamers as the recognition agents. MABs are similar to the molecular beacons (MBs). Like MBs the 5 and 3 ends in MABs can also be tagged or conformationally changed and/or a distance increase between quencher and fluorophore, leading to a detectable signal. The fluorescence signal increased or quenched is directly proportional to the target concentration. Li et al., (2002) reported an anti-thrombin aptamer beacon capable of recognizing thrombin, with a detection limit of 112 pM in a homogeneous solution.

Polypeptides / Protein scaffold

Natural biopolymers such as proteins and DNAs frequently have helical conformations that contribute to the three-dimensional ordered structure and the specific function of the biopolymer. As a part of the cell signaling pathways and enzymatic reactions, conformational alterations of biomolecules are very important in biological systems. Likewise the artificially and specifically folded polypeptide structures are other attractive receptor molecules in biosensing and screening systems. These are robust and easily synthesized by well-established methods and because of the huge chemical diversity that can be generated in a short time with modest synthetic cost and effort. The amino acid sequence can be varied over a wide range to provide access to a variety of scaffold (binding domain) structures, and highly specific recognition sites and reporter groups can be introduced post-synthetically by orthogonal (controlled synthesis) strategies on the solid phase. Fluorescent probes, chromophores, oligonucleotides, sugars, lipids etc can be introduced in different configurations, turning into a very attractive and general tool for the development of

a wide range of ligand receptor systems. Enander et al., (2002) reported a folded ligand modified helix-loop-helix polypeptide scaffold for the detection of human carbonic anhydrase II (HCAII), which catalyses the reversible hydration of carbon dioxide. The fluorescence of the peptide modified with a benzenesulfonamide (inhibitor of HCAII) derivative and a fluorescent probe was monitored as a function of HCAII concentration and the dissociation constant (K_d). The fluorescence of polypeptide increases in the presence of HCAII, due to a change in the molecular environment of the dansyl group upon binding with HCAII, whereas the probe is partially quenched in the absence of the HCAII.

Antibodies

Antibodies have made a substantial contribution towards the advancement of diagnostic assays and have become indispensable in most diagnostic tests that are used routinely today. Antibodies are capable of exhibiting very specific binding capabilities for desired structures. The past few years have seen an increase towards greater use of antibody based assays such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the field of food and environmental monitoring (Fránek et al., 2006). The efficiency and accuracy of the immunoassay (IA) is dependant on the stability and affinity of the employed antibody (Tetin and Stroupe 2004). Antibodies are highly complex and made up of hundreds of individual amino acids arranged in a highly ordered sequence. The immune system of mammals and other vertebrates is able to recognize an extremely large number of different molecules and respond to immunogenic stimuli by secreting specific antibodies into the blood stream. When animals are immunized with a strong immunogen for a relatively long period of time their blood serum will contain high concentrations of highly specific polyclonal antibodies. Introduction of hybridomas for monoclonal antibody production in the mid 1970s revolutionized immunochemistry and brought antibody-based techniques to a higher level of specificity, sensitivity and of key importance, manufacturability. The recent progress in construction of recombinant antibodies leads to exciting new fields of antibody design. In addition, plants and crop species in particular, have the potential to enable extremely cost-effective and efficient production of antibodies (plantibodies). Phage display technology has proved to be robust and is able to produce the recombinant antibody fragments, for example single-chain antibody variable region fragment (ScFv) and fragment antigen binding region (Fab) (variable domains plus the two of the constant domains).

Some IAs work in homogeneous phases (in solution or gels), whereas the majority are heterogeneous assays, involving the adhesion of antibodies and/or antigens to a solid surface. The surfaces used in the heterogeneous assays are usually the walls of microtiter plates with 96 or more wells. Some assays are competitive, in which labeled analyte competes for the binding sites of antibodies with analyte in samples, where the decrease in

bound (or increase in free) labeled antigen is measured. Noncompetitive (sandwich) IAs, which are based on two antibodies to different epitopes, are known to work well for high-molecular-weight analytes. Compared with competitive immunoassays they have many advantages, for example improved speed, sensitivity, and specificity.

The first IA used iodine radioisotopes (^{125}I or ^{131}I), however enzymatic labels are now more common such as, horse radish peroxidase, β -D-glucose oxidase and alkaline phosphatase. Enzymatic labels are eco-friendly whereas radioisotopes are toxic and have a short half-life. Fluorescent materials such as fluorescein isothiocyanate (FITC) etc are employed as labels in fluorescence based assays.

Chiefly, IAs provides a rapid and cost effective analysis for the determination of a variety of environmental contaminants. In addition IA provides high sensitivity and specificity due to the powerful catalytic ability of enzyme and the extraordinary discriminatory capabilities of antibodies. IA methods are fast and relatively easy, compared to conventional GC/MS and HPLC as they don't require a multi-step cleanup process. One disadvantage is that ELISA is usually performed in a laboratory using microtitre plates and, thus are not suitable for on-site monitoring.

Polyclonal and monoclonal antibodies have been successfully developed in the Department of Analytical Biotechnology, Veterinary Research Institute (VRI). Their application in ELISA and immunosensor development has been directed especially towards phenoxyacetic acid herbicides, s-triazine herbicides, sulfonylurea herbicides, polychlorinated biphenyls, surfactants (linear alkylbenzene sulphonates) and toxic metabolites (nonylphenol), and selected veterinary drugs (namely nitrofurans and sulfonamides). More information and technical discussion can be found in papers by Fránek, 1998 and Fránek and Hruska, 2005.

Whole cells

For the biological assay of antibiotics, cup plate bioassay was widely used. In this method the added antibiotic inhibits the growth of microorganisms, seeded in the agar. The resulting inhibition zone (in the agar) is directly proportional to the logarithm of the concentration of antibiotic. In recent years, luminescent bacteria-based bioassays have been introduced for the detection of various compounds such as drugs or toxins. Depending upon the analyte action on the microbial cell, luminescence may increase or decrease. The major advantage with whole cell bioassay is that they can act as a bag of enzymes, whereas protein conformation of the enzyme is more stable, as they are in a native environment. At the same time this technique can reduce the purification costs and the ease of encapsulation. Recombinant luminescent bacteria are generally used in environmental pollutants analysis e.g dioxines. Stability of the cell can be increased by entrapping it in a suitable matrix (i.e sol-gel etc), which allows for the repeated use of whole cells.

Plant cells (tissues) have also been employed in bioassays, for the determination of organophosphorus pesticides. A study of cucumber tissue scrapings (ascorbate oxidase) were interfaced with an oxygen electrode. In the presence of pesticide, the reduced enzyme activity was measured amperometrically. The output voltage of the biosensor is proportional to the pesticide concentration (Rekha et al., 2000). The physiology of the some animal cell lines changes in the presence of ligands / pathogens / viruses. The physiological changes in presence of viruses in African green monkey kidney cell lines were correlated using Bioelectric Recognition Assay (Kintzios et al. 2004). Recombinant Mouse hepatoma cells have been employed for the direct detection of halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons such as dioxines. In this system, the induction of firefly luciferase takes place in presence of halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons (Ziccardi et al., 2000)

Applications of Bioreceptors

Biosensors

For practical food and environmental monitoring, health protection and medical applications, the development of low cost, rugged and practical biosensors that can be used in the field can be a major driving force for the expansion of biosensors. A biosensor is made from a biological sensing element attached to a signal transducer. The sensing element may be an enzyme, antibody, DNA fragment, or microorganism, whereas the transducer may be electrochemical, optical, piezoelectrical or acoustic. Electrochemical transducers measure changes in current or voltage, optical transducers measure changes in fluorescence, absorbance or reflectance, and acoustic transducers measure changes in frequency resulting from small changes in the mass bound to their surface.

Immunosensors transduce antigen-antibody interactions directly into physical signals. The design and preparation of an optimum interface between the biocomponents and the detector material is a key part of sensor development. Most of immunosensors require the labeling of antigen or antibody, whereas piezoelectric immunosensors allow direct label-free and real-time monitoring of affinity interactions and is the economic alternative to the overpriced optical systems. Distinct immobilization methods can be employed for the attachment of biomolecules to the transducer surface such as cross-linking, covalent binding, entrapment etc. The immobilization method must be mild, should reduce steric hindrance and be biocompatible (Kandimalla et al., 2006).

Microarrays

Microarray technology offers the opportunity to rapidly and cost-effectively test for a wide variety of gene and protein targets on a platform little bigger than a postage stamp, using extremely small sample volumes. Protein arrays are rapidly becoming established as a powerful means to detect proteins, pathogens and other contami-

nants. Protein arrays have been designed as a miniaturization of familiar immunoassay methods such as ELISA and dot blotting, often utilizing a fluorescent readout, and facilitated by robotics and high throughput detection systems to enable multiple assays to be carried out in parallel. Commonly used physical supports include glass slides, silicon, microwells, nitrocellulose membranes, and magnetic amongst other microbeads. Miniaturisation of detection tools facilitates easy transportation, onsite analysis, cost reduction, improved detection limits and low volumes of reagents. DNA arrays are based on the hybridisation technique. Oligonucleotides or PCR probes are immobilized on a solid support (the matrix) and due to their specificity to a target gene they detect complementary sequences present in the sample to be analyzed. Hybridization signals are detected, depending upon the type of labeling, by either radiography or fluorescence, then quantified. Microarrays are not limited to DNA analysis; protein microarray, antibody microarray, and chemical compound microarray can also be produced using biochips. It depends on the used bioreceptor molecule. A biochip consists of an array of individual biosensors that can be individually monitored and are generally used for the analysis of multiple analytes. As previously mentioned a bioreceptor can be a biological molecular species (e.g., an antibody, an aptamer, an enzyme etc) that utilizes a biochemical mechanism for recognition.

Dipstick assay

On-site analysis is a more efficient approach than taking a sample, transporting it to a laboratory and then performing the determinations, as is the common practice. On-site analysis can reduce errors and eliminate the possibility of sample change and time delays which are associated with both sample transport and storage, resulting in more accurate, precise and rapidly available analytical data. Although most biosensors offer quick and fast analysis within a laboratory, they are typically poorer at on-site determination due to the influence of environmental factors i.e temperature, humidity etc. Compared to biosensors, the dipstick method is simple, and an instrument-independent method for the visual detection and highly amicable at on-site identification / semi quantification of analytes.

References

1. Enander K. et al., 2002, *J. Org. Chem.* 67: 3120-3123.
2. Fránek M., 1998, In *Biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in field*, Kluwer publishers, Netherlands, 115-126.
3. Fránek M. and Hruska K., 2005, *Vet. Med.* 50: 1-10.
4. Fránek et al., 2006, *Anal. Chem.* 78: 1559-1567.
5. Hamula C. L. A. et al., 2006, *Trends Anal. Chem.* 25: 681-691.
6. Kandimalla V. B. and Ju H. X. 2004, *Anal. Lett.* 37: 2215-2233.
7. Kandimalla V. B. et al., 2006, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36:73 -106.

Dipstick immunoassays also follow the standard ELISA procedure, but use a membrane as the antibody-coating support and the color development (colored spot or line) can be visualized with an unaided eye. Their use as a diagnostic tool for detecting pesticides and other groups of contaminants is becoming more common. A substantial limitation of these rapid dipstick immunoassays, however, is usually their low sensitivity.

Conclusion

Enzyme and antibody-based assays have been extensively used in clinical applications since the early-1970's. Countless studies have demonstrated the correlation between immunoassay results and traditional methodologies based on the instrumental analysis such as gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Immunoassays have proven to be simple, rapid and inexpensive methods for monitoring harmful residues. Further development in food and environmental screening depends almost entirely on the ability to develop novel antibodies in a more cost effective way. Other bioreceptors i.e aptamers (DNA / RNA), polypeptides, whole cells (microbial, plant and animal) are also offering excellent detection capabilities in clinical, food and environmental analyses, however constructive efforts are needed to improve bioreceptor sensitivity and stability. This may be possible through recombinant DNA technology, allowing effective changes in the protein active site. An increased interest in the development of class-specific (generic) bioreceptor reagents is also being observed. Currently one of the focuses is to develop on-site devices, as seen in the present trend in instrumentation research and developments in imaging monitoring, miniaturisation, integration, nanotechnology, computerised data analysis and wireless communication.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. MZE 0002716201) and from the European Commission (Project No. NMP4-CT-2006-017333, CARE-MAN), and wish to thank Eloise H. Kok for careful reading of the manuscript to improve the quality of article.

8. Kandimalla V. B. and Ju H. X. 2006, *Chem. Eur. J.* 12: 1074-080.
9. Kintzios S. et al. 2004, *Biosens. Bioelectron.* 20: 907- 916.
10. Li JJ. et al. 2002, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 31-40.
11. Rekha K et al., 2000, *Biosens. Bioelectron.* 15: 499-502.
12. Tetin S.Y. and Stroupe S. D. 2004, *Curr. Pharmaceu. Biotechnol.* 5: 9-16.
13. Ziccardi M. H. et al., 2000, *Toxicological Sci.* 54:183-193.

CYTOKÍNY V CHARAKTERIZÁCI PROTINÁDOROVEJ IMUNITNEJ ODPOVEDE V UNIKÁTNYM ŽIVOČÍŠNOM „MeLiM“ MODELI MELANÓMU

Ján Strnádel^{1,2}, Hana Reisnerová², Jana Hlučilová¹, Dušan Usvald¹, Vratislav Horák¹

¹Ústav živočíšnej fyziológie a genetiky AV ČR, Liběchov

²Česká zemědělská univerzita v Praze

Úvod

Nádorové choroby ročne spečatia osudy miliónov ľudí na celom svete. Vo vyspelých krajinách sú v poradí druhou najčastejšou príčinou úmrtia hneď po kardiovaskulárnych chorobách. I napriek snahe veľkého množstva výskumných onkologických pracovísk sa na tomto fakte za posledných niekoľko desaťročí nič podstatné nezmenilo – naopak, podľa údajov z American Cancer Society a Svetovej zdravotnej organizácie (WHO) sa incidencia nádorov za posledných dvadsať rokov zvýšila z 238 registrovaných prípadov (rok 1980) na 668 prípadov (rok 2004) na 100 000 obyvateľov. Každoročne pribudne 160 000 nových prípadov nádorov u detí. V dosledku chýbajúcich onkologických registrov v niektorých krajinách je toto číslo pravdepodobne orientačné a skutočný počet detí s nádormi je ešte väčší. Výskyt niektorých nádorov má v celosvetovom meradle neustále stúpajúcu tendenciu. Typickým príkladom je malígny melanóm, zhubný nádor kože, u ktorého je každoročný nárast novo diagnostikovaných prípadov v belošskej populácii takmer 5 percent! Počet nádorových ochorení v Českej a Slovenskej republike, spolu s percentom mortality, zaraďuje tieto krajiny na popredné miesta v svetovom rebríčku. Štandardné prístupy k liečbe nádorov ako chirurgická excízia, chemoterapia, rádioterapia, či novšie tzv. biochemoterapeutické prístupy (chemoterapia kombinovaná s niektorými cytokínmi alebo protilátkami proti cytokínom) sú účinné predovšetkým v začiatkových štádiách ochorenia. K manifestácii prejavov nádorového ochorenia však často dochádza až v štádiu diseminácie primárneho nádoru a tvorby sekundárnych nádorových ložísk (metastáz), ktoré postihujú životne dôležité orgány. Mnoho pacientov tak vyhľadáva pomoc lekára až v okamihu, kedy je už akákoľvek forma terapie neúčinná. Vzniká tak neustála potreba hľadať nové prístupy k liečbe rakoviny a poznávania ich účinkov na viacerých zvieracích modeloch pred ich zavedením do štádia klinického skúšania.

Cytokíny v imunoterapii nádorov

Do centra pozornosti sa v poslednom období dostáva výskum terapií, pri ktorých dochádza k modulácii imunitného systému – tzv. imunoterapií. Vhodnou stimuláciou prirodzenej protinádorovej imunity napr. pomocou nádorových vakcín, či aplikáciou autológnych imunitných buniek (dentritických buniek a cytotoxických T-lymfocytov) aktivovaných *in vitro* dochádza k aktivácii bunkovej a hormonálnej zložky imunitného

systému. Podstatnú úlohu v procese imunologickej odpovede na nádory zohrávajú cytokíny – malé proteínové molekuly, sekretované leukocytmi a inými bunkami. Podľa účinku na rast nádoru ich možno principiálne rozdeliť na dve skupiny – na cytokíny, ktoré posobia imunostimulačne (prozápalové cytokíny, so stimulačným účinkom na bunky imunitného systému), a imunosupresívne (protizápalové, potláčajúce vývoj imunitnej odpovede).

Vzájomný pomer imunostimulačných a imunosupresívnych cytokínov rozhoduje o úspešnosti protinádorovej liečby. Pokiaľ je tento pomer v prospech imunostimulačných cytokínov, je prognóza vo väčšine prípadov dobrá. Imunologické štúdie ukázali, že progresia nádorov závisí na interakcii zložiek imunitného systému s nádorovými bunkami. Pomer cytokínov produkovaných pri imunologickej odpovedi bunkami imunitného systému a cytokínov produkovaných samotnými nádorovými bunkami môže rozhodnúť o postupujúcej progresii alebo naopak regresii nádoru. Imunosupresívne cytokíny – IL-8 (interleukín 8), IL-10, TGF- β 1 (transforming growth factor) – sú produkované nádorovými bunkami a majú významnú úlohu pri prekonávaní imunitného dozoru (inhibujú proliferáciu T-lymfocytov – IL-10, TGF- β 1) a posobia ako angiogénne faktory pri neovaskularizácii rastúceho nádoru (IL-8, TGF- β 1). Naproti tomu protinádorové cytokíny – TNF- α („tumour necrosis factor alpha“), IFN- γ (interferon gamma), IL-4, IL-12 – inhibujú rast nádoru, zvyšujú jeho antigénne vlastnosti a potencujú diferenciáciu imunokompetentných buniek. Sledovanie pomeru hladín prozápalových a protizápalových cytokínov v priebehu terapie a po nej má aj dôležitý význam v určení prognózy ochorenia.

V posledných rokoch sa cieľom zásahu v rámci protinádorovej terapie stáva mikroprostredie obklopujúce nádor (tzv. „tumour microenvironment“). To produkuje celé spektrum cytokínov, ktorých prítomnosť je výsledkom zložitých interakcií medzi nádorom, stromatickými a endoteliálnymi bunkami, fibroblastmi a zložkami zápalového infiltrátu. Pokusy, pri ktorých sa pomocou umele pripravených špecifických protilátok zablokoval VEGF (vascular endothelial growth factor) alebo receptor viažúci VEGF, viedli k indukcii imunitnej odpovede na bunkovej aj hormonálnej úrovni. Konečný terapeutický efekt takýchto postupov na pacientoch však mnohokrát zlyháva v dosledku zložitých autoregulačných mechanizmov v organizme. Zásahom do jednej zložky (cytokínu) sa totiž zvyčajne vyvolá odozva

v celej kaskáde funkčne podobných, ale i protichodne posobiacich komponentov cytokínovej siete.

Posobenie určitého cytokínu môže byť aj celkom protichodné v závislosti od podmienok, v ktorých dochádza k jeho produkcii. Typickým príkladom je TNF- α , ktorého vysoké lokálne koncentrácie v nádore (indukované napr. hypoxiou) ničia cievny systém nádoru, ale na druhej strane, nízke hodnoty chronicky sa tvoriaceho TNF- α (pri chronickom zápale) prispievajú k remodelácii a rozvoju stromatickej matrice, potrebnej na rast a šírenie nádoru. TNF- α okrem toho stimuluje rast fibroblastov, ktoré následne produkciou rastových faktorov môžu potencovať i rast samotného nádoru v mieste chronického zápalu. Spomenutá vlastnosť cytokínov tak značne komplikuje snahu o charakterizáciu ich úloh v imunoterapiách.

Devitalizácia - jedna z možností, ako stimulovať protinádorovú odpoveď

Medzi experimentálne študované terapeutické postupy so stimulačným účinkom na imunitný systém a následnou deštruktívnou odozvou na niektoré typy nádorov, kde zásadnú úlohu pravdepodobne hrajú cytokíny, možno zaradiť aj devitalizáciu. Tento originálny prístup k terapii solídnych nádorov vyvinul český chirurg MUDr. Karel Fortýn. Spočíva v ischemizácii nádoru podviazaním jeho arteriálneho a venózneho krvného zásobenia. Takto ošetrovaný nádor sa ponechá *in situ* bez následnej excízie. Účinok devitalizácie bol experimentálne testovaný na miniatúrnych prasatách línie MeLiM (Melanoma-bearing Libechov Minipigs) s dedičným malígnym melanómom na Ústave živočíšnej fyziológie a genetiky (ÚŽFG) Akademie věd ČR. Nádor zbavený krvného zásobenia postupne zanikal bez toho, aby spôsobil sepsu alebo smrť jedinca. Doposiaľ získané experimentálne výsledky svedčia o tom, že devitalizácia vedie k aktivácii bunkami sprostredkovanej protinádorovej imunitnej odpovede.

Prasa línie MeLiM v biomedicínskom výskume melanómu

Vo výskume malígneho melanómu sa vo svete používa viacero živočíšnych modelov. Medzi najčastejšie modelové zvieratá patrí myš a potkan, ale používa sa i morča (*Cavia porcellus*) a dokonca akvarijné ryby (rod *Xiphophorus*). Miniprasa línie Sinclair (odvodené od kmeňa Hormel) je model podobný MeLiM, ale na rozdiel od MeLiM v tejto línii spontánne regreduje až 100% postihnutých zvierat s nádorom. MeLiM miniprasa je preto na výskum melanómu vhodnejšie.

Línia miniatúrnych prasiat MeLiM vznikla cieľovou selekciou jedincov, u ktorých sa pozoroval spontánny výskyt malígneho melanómu. Chov miniprasiat na ÚŽFG v Liběchove začal v roku 1967 importovaním a krížením miniatúrnych prasiat kmeňa Hormel (Hormel Institute, University of Minnesota, USA) s göttingenským miniatúrnym kmeňom (University of Göttingen, Germany). Postupne sa do chovu (primárne kvôli výskumu dedičnosti krvných skupín) introdukovali viet-

namské prasatá, ďalej jedince plemena Landrace a Cornwall. V roku 1989 došlo k udalosti, ktorá viedla k ustanoveniu línie MeLiM. Bol pozorovaný výskyt niekoľkých jedincov s kožnými nádormi. Čiastočným príbuzenským krížením (inbreedingom) sa vytvorila originálna línia MeLiM vyznačujúca sa genetickou predispozíciou k tvorbe malígneho melanómu.

Melanóm sa v tejto línii vyskytuje u takmer 50 % zvierat vo forme mnohopočetných, tmavo pigmentovaných kožných nádorov na roznych častiach tela. Približne jedna tretina zvierat uhynie v dôsledku rozsiahlej diseminácie melanómu a vzniku metastáz predovšetkým na slezine, pľúcach a lymfatických uzlinách počas prvých dvoch mesiacov života. Pokiaľ sa však na takéto jedince aplikuje devitalizácia, dojde k vymiznutiu primárneho nádoru i orgánových metastáz. Vyliečené jedince sa stávajú základom pre ďalší chov.

V línii MeLiM je však možné pozorovať i druhú skupinu zvierat, u ktorej dochádza k neskoršiemu vývinu nádoru s jeho následnou spontánnou regresiou. V porovnaní s ľudskými melanómami, pri ktorých sa uvádza jedno percento spontánne regredujúcich nádorov, v prípade línie MeLiM k tomuto javu dochádza takmer u dvoch tretín postihnutých jedincov. Podobne ako u devitalizovaných jedincov, aj pri spontánnej regresii melanómu dochádza k lokálnemu vybieleniu kože - tzv. vitiligu. Pravdepodobne ide o autoimunitný proces (pozorovaný aj u ľudských pacientov), ktorý je možno sekundárne iniciovať u prvej (devitalizáciou ošetrenej) skupiny zvierat a ktorý sa zatiaľ neznámym mechanizmom uplatňuje aj v druhej skupine zvierat, spontánne regredujúcich. Mechanizmus spontánnej regresie nádoru na MeLiM modele skúmajú na molekulárno-genetickej úrovni v spolupráci s liběchovským pracoviskom vedci z ústavu CEA-INRA v Jouy-en-Josas (Francúzsko).

V ÚŽFG v Liběchove sa výskumná činnosť pracovníkov Laboratoře biologie nádorů sústreďuje na histopatologickú, imunohistochemickú a biochemickú charakterizáciu línie MeLiM a na analýzu imunitnej odpovede organizmu po devitalizácii melanómu. Fenotypizáciou lymfocytov v krvi a tumor-infiltrujúcich lymfocytov v nádore pomocou CD povrchových antigénov sa na prietokovom cytometri zisťujú zmeny v zastúpení CD8⁺ (cytotoxických T-lymfocytov) a CD4⁺ (pomocných, helper T-lymfocytov) po devitalizácii. Pracuje sa na rozšírení použitia cytometrie na detekciu niektorých intracelulárnych antigénov a cytokínov. Nepriamym imunofluorescenčným značením kryorezov nádorov sa detekujú zmeny v expresii proteínov teplotného šoku (HSP-70, gp96 - pre ich významnú úlohu pri zahájení imunitnej odpovede), niektorých cytokínov (napr. IFN-gamma - podporuje Th1 bunkovú odpoveď proti nádoru) a proteínov extracelulárnej matrix (uplatňujúcich sa v metastatickom procese). Kvantifikácia relevantných cytokínov v krvnom sére a lyzátach z nádorov sa realizuje pomocou sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) súprav. V procese optimalizácie je aj metóda Western-blottingu na potvrdenie zmien v expresii vyš-

šie spomenutých proteínov. Pokusným zvieratám sa počas celého experimentu sledujú základné hematologické parametre (množstvo lymfocytov, erytrocytov, hodnota hematokritu, množstvo hemoglobínu) a časti odobraných nádorov sa spracovávajú aj štandardnými histologickými technikami.

Záver alebo „Quo vadis, MeLiM?“ a budúcnosť prasačieho melanómového modelu

Incidencia ľudského melanómu má zrejme „vďaka“ enviromentálnym faktorom (zvýšené hodnoty UV žiarenia v dôsledku defektov v ozónovej vrstve) neustále stúpajúcu tendenciu. Keďže ide o veľmi agresívnu formu nádoru, v štádiu metastáz (štádium III a IV) tak-

mer neliečiteľnú, je snaha o nájdenie nových terapeutických prístupov veľmi aktuálna. Prítomnosť vhodných živočíšnych modelov vo výskume melanómu hrá v tomto procese kľúčovú úlohu. Miniprasatá línie MeLiM spĺňajú vďaka histopatologickej a biochemickej podobnosti nádoru s ľudským melanómom požiadavky na takýto model. V budúcnosti môže tento model slúžiť na vývoj a testovanie nových terapeutických postupov. Väčšie nároky na chov, manipuláciu i operačný personál pri štúdiu na tomto modeli (v porovnaní s drobnými laboratórnymi hlodavcami) vyvažuje väčšia miera podobnosti a prenositeľnosti výsledkov na ľudských pacientov.

Literatúra

1. <http://www.cancer.org>.
2. Atkins, M.B., Clin. Cancer Res. 12, 2353s-2358s (2006).
3. Crowe, N.Y., Coquet, J.M. et al., Exp. Med. 202, 1279-1288 (2005).
4. Riemer, A.B., Forster-Waldl, E. et al., Eur.J.Immunol. v tisku (2006).
5. Atkins, M.B.:Semin. Oncol. 29 (Suppl.7), 12-17 (2002).
6. Atkins, M.B., et al., Cancer J. Sci. Am. 6 (Suppl.1), S11-14 (2000).
7. Bar-Eli, M., Pathology 67: 12-18 (1999).
8. Huang, S., Mills, L., Mian, B. et al., Am. J. Pathol. 161, 125-34 (2002).
9. Fortýn, K., Hradecký, J. et al., Z. Exp. Chir.Transplant. Kunstl. Organe 18, 42-50 (1985).
10. Fortýn, K., Hruban, V., Hradecký, J., Tichý, J., Klin. Onkol. 2, 7-10 (1989).
11. Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V., Tichý, J., Klin. Onkol. 1, 11-15 (1995).
12. Horák, V., Soukupová, P., Šinkora, J. et al., Pigment Cell Res. 16, 583 (2003).
13. Strnádel, J., Hradecký, J. et al., J. Appl. Biomed., (Suppl.1), 3, 44-45 (2005).

Táto práca bola podporená finančnými prostriedkami z Výskumného záměru MSM č.6046070901, Výskumného záměru ÚŽFG AV ČR č. AV0Z50450515, projektu GAČR 524/04/0102 a projektu IGA ÚŽFG/06/03.

ENZYMOVÉ MODIFIKACE FOSFOLIPIDŮ

Tomáš Podzimek

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Lipidy tvoří velkou skupinu látek vyznačující se bohatou strukturní různorodostí. Kromě energetické role hrají, také důležitou roli u řady buněčných pochodů (buněčné rozpoznávání, intracelulární komunikace apod.). Tato velká skupina látek se dělí na podskupiny (např. fosfolipidy, lipoproteiny, mastné kyseliny atd.).

Fosfolipidy se vyskytují jak u savců, rostlin a kvasinek, tak i u prokaryot. Zajišťují stabilitu buněčných membrán a pomáhají vykonávat jejich funkce. Jejich významnost je dána také tím, že poruchou jejich metabolismu vznikají různé metabolické a neurologické nemoci, které mohou být i dědičné. Dále se účastní regulace některých biologických procesů jako signální molekuly. Proto je jejich výzkum důležitý pro lékařství a farmaceutický průmysl.

Velký zájem průmyslu je dnes zaměřen na vývoj nových derivátů lipidů a procesů s tím spojených. Výzkum je zaměřen hlavně na enzymové modifikace lipidů. Pro průmyslové účely se používají imobilisované

systemy lipas a fosfolipas. Fosfolipidy jsou používány v potravinářství jako emulsifikátory a ve formě liposomů ve farmaceutickém odvětví a v kosmetice (součást pleťových vod). Jsou získávány z přírodních zdrojů jako směs látek obsahující různé mastné kyseliny. Příkladem je směs fosfolipidů zvaná lecithin izolovaná z vaječného žloutku a sojových bobů.

Charakteristika fosfolipidů

Fosfolipidy lze rozdělit podle toho, jaký páteřní alkohol obsahují. V případě, že jsou tvořeny glycerolem, nazývají se **fosfoacylglyceroly**, jestliže obsahují sfingosin, nazývají se **sfingolipidy**. Do skupiny fosfoacylglycerolů patří etherové fosfolipidy, u kterých je jeden alifatický řetězec připojen na glycerol etherovou vazbou namísto esterové. Všechny fosfolipidy se vyznačují amfifilní povahou, kterou způsobují na jedné straně dlouhé řetězce mastných kyselin a na straně druhé fosfátová polární hlavice, na kterou lze navázat další molekuly.

Fosfoacylglyceroly, jak už bylo řečeno obsahují troj-
sytný alkohol glycerol. V poloze sn-1 a 2 je navázán
zbytek mastné kyseliny (nasycený nebo nenasycený)
esterovou vazbou a v poloze sn-3 je vázán fosfát.
U etherových fosfolipidů se nachází etherová vazba
(*O*-alkyl nebo *O*-alkenyl) v poloze sn-1. Vazbou různých
molekul (např. cholinu, serinu, ethanolaminu atd.)
na fosfátovou skupinu vznikají látky s různými biologickými
účinky.

Sfingolipidy jsou odvozeny od alkoholu sfingosinu,
což je dvojsytný alkohol s dlouhým nenasyceným řetězcem
a jednou aminoskupinou. Hydroxylové skupiny
jsou v poloze 1, 3, a aminoskupina v poloze 2. Pokud
je aminoskupina acylována mastnou kyselinou, nazývá
se tento derivát ceramid. Ceramidy pak mohou být
fosforylovány v poloze 1. Pokud je na fosfátu navázán
cholin, pak se taková molekula nazývá sfingomyelin.
Je součástí myelinového pouzdra, které chrání axony
nervových buněk.

Z těchto strukturních poznatků vyplývá ohromné
množství kombinací, z kterých vznikají strukturně
podobné, ale vlastnostmi se lišící molekuly.

Něco o enzimech

Enzymům, které štěpí fosfoacylglyceroly se říká **fosfolipasy**.
K nim ještě můžeme přiřadit **lipasy**, které sice
obvykle štěpí triacylglyceroly (TAG), ale mají afinitu
i k fosfolipidům (obsahují stejně vázané mastné kyseliny
jako TAG). Nejznámější fosfolipasy jsou **fosfolipasa A₁, A₂, B, C, D**
a **lysofosfolipasa**. Enzymy, které zpracovávají
sfingolipidy jsou např. **sfingomyelinasa, sfingomyelinasa D, ceramidasa**.

Fosfolipasa A₁ (PLA₁) – odštěpuje zbytek mastné
kyseliny z polohy sn-1 fosfoglycerolu. PLA₁ z bakterie
E. coli je dimer s katalytickou triadou His-Ser-Asn. Patří
do rodiny serinových hydrolas. K tvorbě dimeru
a ke katalyze potřebuje Ca²⁺ ionty. Tato hydrolasa má
širokou substrátovou specifitu (štěpí fosfolipidy i lysofosfolipidy).

Fosfolipasa A₂ (PLA₂) – odštěpuje zbytek mastné
kyseliny z polohy sn-2 fosfoglycerolu. Byla první objevenou
a popsanou fosfolipasou. Přednostním substrátem
je pro ni fosfolipid mající v poloze sn-2 navázanou
kyselinu arachidonovou. Ta po uvolnění působí jako
"druhý posel" nebo slouží jako prekursor k syntese
ikosanoidů. PLA₂ tvoří skupinu enzymů, které se dají
rozdělit podle toho, jestli používají katalytickou aminoskupinu
serin nebo histidin. Štěpí nejenom fosfolipidy,
ale i lysofosfolipidy.

Fosfolipasa B (PLB) a lysofosfolipasa – oba enzymy
hydrolyzují fosfolipidy i lysofosfolipidy. Například
PLB z *Cryptococcus neoformans* je extracelulární enzym,
nezávislý na iontech, hydrolyzující všechny fosfolipidy,
s výjimkou kyseliny fosfatidové.

Fosfolipasa C (PLC) – hydrolyzuje vazbu mezi fosfátem
a glycerolem. Vyskytuje se u mnoha organismů. Významný
rozdíl ve struktuře a mechanismu

reakce je mezi bakteriální a savčí PLC. Zatímco
bakteriální PLC se skládá z jedné domény, savčí
PLC má několik různých domén. Eukaryotický enzym
používá ke stabilizaci transitního stavu Ca²⁺, kdežto
u bakteriálního tuto funkci vykonává arginin v analogické
poloze. Jedna z katalytických aminokyselin je
u PLC histidin.

Fosfolipasa D (PLD) – štěpí vazbu mezi fosfátovou
skupinou a alkoholem (např. cholin, ethanolamin).
Předpokládá se, že konservativní aminokyseliny
His-Lys-Asp jsou katalytickými skupinami. Téměř
všechny PLD jsou závislé na Ca²⁺ iontech a vzájemně se
liší potřebnou koncentrací tohoto iontu. PLD má
afinitu k fosfatidylcholinu (PC), fosfatidylethanolaminu
(PE), fosfatidylinositolu (PI), fosfatidylserinu (PS)
atd.

Sfingomyelinasa (SM), sfingomyelinasa D (SMD)
a ceramidasa –SM hydrolyzuje vazbu mezi fosfátem
a sfingosinem. SM lze rozdělit na kyselé s pH optimem
kolem 4,5, neutrální s pH optimem 7,5 a basicke s pH
optimem 9,0. Pro katalysu je důležitý histidin. Stejnou
specifitu k sfingolipidům vykazuje i PLC, která rovněž
obsahuje katalytický histidin. SMD štěpí vazbu
mezi fosfátovou skupinou a alkoholem. Tutéž reakci
provádí i PLD. Ceramidasa odštěpuje zbytek mastné
kyseliny z aminoskupiny sfingosinu. Tímto způsobem
je možné syntetizovat různé ceramidy nebo sfingolipidy.

Lipasy – představují velmi různorodou skupinu enzymů
používaných v průmyslu. Jedná se o potravinářský
průmysl (modifikace tuků a olejů), výroba detergentů,
papírenský a farmaceutický průmysl. Katalytická triáda
se obvykle skládá z Ser-His-Asp/Glu. Tyto enzymy mají
čtyři vazebná místa pro TAG. Tři z nich jsou pro jednotlivé
mastné kyseliny vázané na glycerol. Zajímavým
strukturním prvkem aktivního místa je „víčko“, které
uzavírá aktivní místo v inaktivním stavu enzymu. Lipasy
bývají specifické pro polohy 1,3 TAG, což znamená, že
mohou štěpit esterovou vazbu v poloze sn-1 také u fosfolipidů.

Některé z těchto enzymů (hlavně PLA₁, PLA₂, lysofosfolipasy
a lipasy) mají za určitých podmínek také transacylasovou
aktivitu, tzn., že jsou schopny esterovou vazbu tvořit.
Tento proces má velké uplatnění v průmyslu k výrobě
nových látek s odlišnými vlastnostmi než mají původní
molekuly.

Faktory ovlivňující aktivitu enzymů

Zásadní význam pro reakce fosfolipas a lipas má
obsah vody v reakční směsi, která se vyjadřuje jako
aktivita vody. Je to vlastně procento vody obsažené
ve směsi. Pro enzymy štěpící tuky je, v porovnání s
ostatními hydrolasami (glykosidasy, proteasy) výhodnější
přítomnost menšího množství vody z důvodu
reversní hydrolysy. Zatímco glykosidasy vyžadují
hodnotu vodní aktivity nejméně 0,6, lipasy a fosfolipasy
se mohou přiblížit téměř k 0. Samozřejmě je vždy
nutný určitý obsah vody k udržení enzymu v aktivním
stavu.

U lipas z *Rhizopus oryzae* a *Candida rugosa* byla studována transesterifikace ethyldekanóátu na hexyldekanóát s hydrolysou na kyselinu dekanovou jako kompetitivním procesem. Jako reakční prostředí byl použit diisopropylether se stanoveným množstvím vody. Lipasa z *Rhizopus oryzae* měla nejvyšší transesterifikační aktivitu při aktivitě vody 0,06. Lipasa z *Candida rugosa* měla nejvyšší aktivitu při aktivitě vody 0,53 a nejvyšší poměr transesterifikace/hydrolysa při aktivitě 0,11. V podobných podmínkách byly testovány některé glykosidasy, jejichž nejvyšší aktivita byla při aktivitě vody blízko 1,0.

Dále záleží na tom, jestli je reakce řízena termodynamicky nebo kineticky. Při esterifikaci nebo transesterifikaci mohou vznikat lysofosfolipidy, jejichž rovnovážná konstanta ovlivňuje výtěžek plně acylováných fosfolipidů. Rovnovážné konstanty nejsou pro všechny fosfolipidy stejné. Znamená to, že některé se budou modifikovat s lepším výtěžkem a jiné s horším. Vliv zde má opět aktivita vody a také koncentrace mastných kyselin. V souladu s výše uvedenými skutečnostmi, by měla být koncentrace mastných kyselin vyšší a aktivita vody nižší. Reakce, které jsou z hlediska termodynamického nevýhodné, jsou řízeny kineticky. To je případ PLD a znamená to, že lze dosáhnout dobrého výtěžku i při vyšší aktivitě vody. Tyto reakce se dějí ve dvoufázovém systému voda-organické rozpouštědlo.

Ostatními faktory jsou vhodná teplota pro enzym, která i ovlivňuje migraci acylů a snižuje viskozitu reakčního média, reakční doba, donor acylu apod.

Modifikace fosfolipidů

V případě výměny jedné mastné kyseliny za jinou je možné použít jedнокrokovou nebo dvoukrokovou metodu. První metoda je založena na transesterifikaci přidáním volné mastné kyseliny do reakční směsi. K tomuto účelu jsou vhodné hlavně lipasy (např. z *Rhizopus arrhizus*), které jsou specifické pro polohu sn-1 fosfolipidů a také PLD. Principem druhé metody je nejprve hydrolysa a poté reesterifikace fosfolipidu. Zde se využívají také lipasy.

Lysofosfolipidy (lyso-PL) je možné připravit pomocí **hydrolysy, esterifikace, migrace acylu** nebo **alkoholysy**.

Hydrolysa – pro tento děj jsou důležité typ enzymu, koncentrace substrátu a aktivita vody. Protože PLA_1 je termolabilní, používají se k tomuto účelu PLA_2 a lipasy. Porovnáním 19 komerčních lipas bylo zjištěno, že nejvhodnějšími jsou enzymy z plísní *Mucor* a *Rhizopus*. Co se týče polární hlavice lyso-PL, ta může být modifikována PLC nebo PLD.

Esterifikace – esterifikací glycerofosfocholín lipasou lze získat 1-acyl lyso-PC, totéž provedené enzymem PLA_2 povede k 2-acyl lyso-PC. Udržování aktivity vody a odstraňování produktů je důležité pro posunutí rovnovážného stavu. K této reakci bývá používána PLB z *Candida antarctica*. Reakce je prováděna v prostředí

50 % (v/v) terc-butanolu za přítomnosti vinyllesteru kyseliny laurové jako donoru acylu. V přebytku donoru a za vhodné teploty lze dosáhnout vysokého výtěžku. Limitujícím faktorem zde je reakční doba. Pokud je reakce prováděna více než 24 hodin, dochází ke vzniku většího množství PC v důsledku migrace acylu v molekule.

Migrace acylu – bývá nežádoucím aspektem reakcí. Může totiž probíhat neenzymaticky, jen za katalýsy kyselinami nebo basemi. Někdy tento děj podporují i nosiče, na kterých jsou imobilisovány příslušné enzymy. Jednou z možností jak toto potlačit je přidání borátu, dále je možné produkt konvertovat do pevného stavu během reakce. Ukázalo se, že 1-acyl lyso-PC je stabilnější než 2-acyl lyso PC.

Alkoholysa – alkoholysou PL můžeme získat lyso-PL a estery mastných kyselin. Akceptorem zbytků mastných kyselin může být např. glycerol, methanol nebo ethanol. Alkoholysou pomocí lipasy z *Thermomyces lanuginosa* bylo dosaženo dobrého výsledku. Akceptorem byl oktanol. Zajímavostí je, že aktivita lipasy klesala s kratší délkou akceptorového alkoholu.

Další příklady

Kombinací dvou enzymů (PLD a PLC) byly připraveny tyto lyso-PL: 1-lauroyl-*rac*-glycerofosfát (1-LGP) a 1-lauroyl-dihydroxyacetonfosfát (1-LDHAP). Reakce probíhala ve dvou krocích. Nejprve byla použita PLD ze *Streptomyces* sp. na reakci PC s 1-monolauroyl-*rac*-glycerolem. Vznikl 1-lauroyl-fosfatidylglycerol (1-LPG) a cholin. 1-LPG byl hydrolysován PLC z *Bacillus cereus* na 1-LGP a diacylglycerol. Stejným postupem vznikl 1-LDHAP. Dále byly studovány PLD z hlávkového zelí a burských oříšků. Obě se efektivně účastnily transfosfatidylační reakce. Aplikace PLC je omezena úzkou specifitou a neschopností štěpit syntetické substráty. Substrát musí obsahovat etherovou nebo esterovou vazbu v pozici sn-1, esterovou vazbu v pozici sn-2 a fosfocholin v pozici sn-3.

K přípravě lysofosfatidové kyseliny byl použit také systém dvou enzymů. Mastná kyselina byla odštěpena PLA_2 a lyso-PL byl potom hydrolysován PLD. Pokud je substrátem přírodní fosfatidylcholin, získáme směs fosfatidátů s různými mastnými kyselinami.

Jiným příkladem přípravy lysofosfatidové kyseliny je využití lipasy specifické pro polohy 1,3 (lipasa z *Rhizopus arrhizus*). Esterifikací glycerol-3-fosfátu vinyl esterem kyseliny laurové při aktivitě vody 0,53 docházelo k přednostní tvorbě lysofosfatidové kyseliny (lysoPA) a ke spontánní migraci acylu v molekule. Následnou acylací vznikla kyselina fosfatidová (PA), také ve velkém množství. Konverze činila > 95 %. Jestliže se kyselina laurová zaměnila za kyselinu olejovou, konverze byla 55 %. Zvýšením zastoupení glycerol-3-fosfátu ve směsi se zvýšil poměr lysoPA/PA, ale zároveň se snížilo jeho zreagované množství. Lysofosfatidovou kyselinu se podařilo přečistit jednoduše precipitací.

Zpracováním lecithinu z vaječného žloutku se dnes získává mnoho užitečných produktů, hlavně lysofosfolipidů. Používají se enzymy PLA₁ a PLA₂. Přitom se zlepšují emulsifikační, teplotní a viskozitní vlastnosti produktů, což zvyšuje jejich aplikovatelnost v průmyslu. Jiné uplatnění těchto enzymů se nachází při rafinaci olejů. K tomuto účelu byly vybrány PLA₂ z vepřového pankreatu a bakteriální PLA₁.

Literatura

1. Zheng Guo, Anders F. Vikbjerg, Xuebing Xu: *Biotechnology Advances* 203-259, 23 (2005).
2. Adlercreutz P. et al., *J. Molec. Catal. B: Enzymatic* 11, 173 (2001).
3. Xu X. , in *Lipid Technology and Enzymology*.
4. Ma L., Persson M., Adlercreutz P., *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1024 (2002).

Zmínil jsem zde dobré uplatnění fosfolipidů v průmyslu, ale zatím jde především o fosfoacylglyceroly. Nynější studie o sfingolipidech se spíše zabývají jejich buněčnými funkcemi, metabolismem a regulacemi, stejně tak jako purifikací a charakterisací příslušných enzymů (sfingomyelinasy) a proto zatím neexistuje širší využití těchto látek v průmyslu.

5. Virto C., et al., *Enzyme Microb. Technol.* 24, 651 (1999).
6. Virto C., et al., *Enzyme Microb. Technol.* 26, 630 (2000).
7. Virto C., et al., *Chem. Phys. Lipids* 104, 175 (2000).

OXIDAČNÍ STRES, LIDSKÉ CHOROBY A BIOMARKERY

Alžběta Havelková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Organismy žijící v aerobním prostředí jsou neustále vystavovány celé řadě reaktivních molekul - volným radikálům (VR). Tyto částice, vznikající různými způsoby, napadají intracelulární biomakromolekuly, modifikují je a tím poškozují organismus. Organismy jsou proti tomuto nebezpečí vyzbrojeny efektivním a sofistikovaným antioxidačním systémem.

Oxidační stres

Oxidační stres vzniká v buňkách a tkáních v důsledku porušení rovnováhy mezi oxidačním a antioxidačním systémem. Výsledkem nerovnováhy je vznik volných radikálů, které napadají organismus a způsobují závažná poškození buněk. Oxidační stres je spojen s progresí řady onemocnění jako jsou kardiovaskulární choroby, aterosklerosa, poruchy centrální nervové soustavy (Parkinsonova a Alzheimerova choroba), diabetes mellitus, záněty, nádorové bujení, poškození jater, ledvin a další.

Příčiny vzniku volných radikálů

Mezi exogenní příčiny vzniku VR patří γ -záření, UV záření, sluneční světlo, radiové frekvence, mikrovlny. Rentgenovo a radioaktivní záření při normálním ozařování v malých dávkách nepředstavuje závažné nebezpečí, avšak při intenzivním ozařování může vzniknout tzv. radiační syndrom, což je soubor patologických jevů připomínající zrychlené stárnutí. Podle teorie Denhama Harmana (1956, 1984, 1987) jsou VR primární příčinou stárnutí organismu. K zevním vlivům je nutno započítat i výživu.

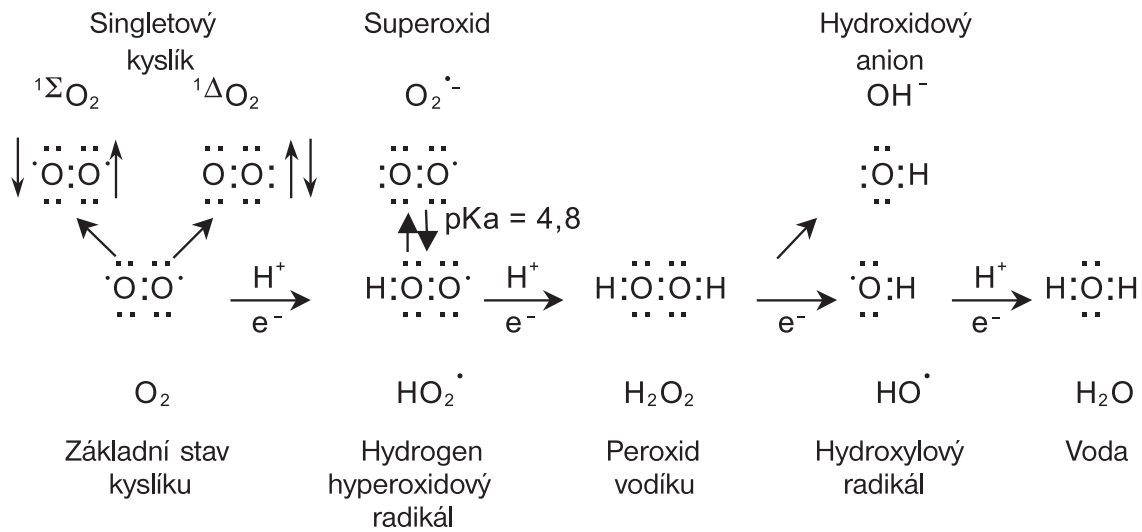
K endogenním příčinám patří tvorba VR abnormálním působením cytochromoxidasy v dýchacím řetězci (uvolnění meziproductů z aktivního centra enzymu). VR dále vznikají při zánětlivé odpovědi organismu, např. fagocyty a makrofágy využívají VR k usmrcování bakterií, virů a kvasinek.

Volné radikály

VR jsou atomy nebo molekuly s jedním či více nepárovými elektrony ve vnějších orbitalech. Jedná se o velmi reaktivní sloučeniny s krátkým poločasem rozpadu. VR vznikají získáním či uvolněním elektronu nebo reakcí s nějakou další sloučeninou (iniciace). Výsledkem je vždy další VR a rozbíhá se řetězová reakce (propagace), která je ukončena ve chvíli reakce dvou VR za vzniku stabilní molekuly (terminace), či přítomností zhášeče VR (scavengera), který je schopen řetězovou reakci ukončit.

Aktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species)

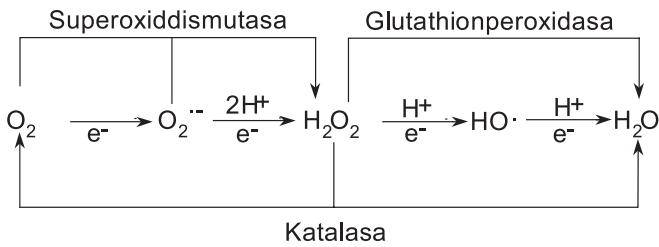
Hlavní sloučeninou, která iniciuje reakce VR je molekulární kyslík, který je konečným akceptorem elektronů v dýchacím řetězci. Přeměnu O₂ na H₂O katalyzuje metaloenzym cytochromoxidasa tvořící IV. kotvený komplex v membráně mitochondrií. Tato přeměna je uskutečněna čtyřmi po sobě jdoucími kroky, kdy v každém kroku dochází k redukci kyslíku jedním elektronem za vzniku velmi reaktivních meziproductů (Obr. 1)¹. Za normálních podmínek ale nejsou meziproducty reakce uvolňovány z aktivního místa enzymu.



Obr. 1: Čtyřelektronová redukce molekuly kyslíku včetně meziproduktů.

Antioxidační obranné mechanismy

Jako obrana proti VR v organismu slouží sofistikovaný antioxidační systém, který zahrnuje tyto enzymy (Obr. 2)²: superoxidodismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GSHPx) a katalasa (CAT). A dále se obrany účastní celá řada dalších sloučenin (tzv. zhášeče nebo také lapače volných radikálů): vitamín C, A a E, glutathion, flavonoidy, fenoly, karotenoidy, ferritin a metalothionein.



Obr. 2: Enzymový obranný mechanismus buňky.

Monitorování oxidačního poškození, biomarkery

Měření volných radikálů je velmi problematické kvůli jejich krátké životnosti. Mezi metody využívané k měření aktivity VR se řadí elektronová paramagnetická resonance (EPR). Jedná se však o velice pracnou a časově i finančně velmi náročnou metodu.

Další metodou je monitorová biomarkerů, produktů vzniklých působením VR. VR napadají celou řadu bio-

molekul v organismech, modifikují je a výsledky napadení lze detegovat. Příkladem biomarkerů jsou například produkty lipoperoxidace. Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií lze využít pro analýzu konjugovaných dienuů a aldehydů po derivatizaci 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH). Alkany (ethan, pentan), další produkty lipoperoxidace, se stanovují plynovou chromatografií.¹ Výsledkem modifikace proteinů jsou nově vzniklé karbonylové skupiny v postranních aminokyselinových řetězcích proteinu. V neposlední řadě dochází i k napadení nositelky genetické informace – DNA. Hlavní poškození DNA je rozpletení dvouvláknové struktury a vznik modifikovaných purinových a pyrimidinových bazí. Nejpoužívanějším biomarkerem je 8-oxo-2Ě-deoxyguanosin.

K účinnému monitorování oxidačního poškození organismů lze využít FORM systém³ zahrnující tzv. FORT test. Metoda měření je založena na schopnosti chromogenní látky tvořit barevné produkty po reakci s VR. Intenzita zabarvení je mírou oxidačního stavu měřeného vzorku. Výsledky lze interpretovat jako ekvivalenty koncentrace H₂O₂. Tato metoda je dobře reprodukovatelná a není časově náročná (cca 8 minut). Lze ji využít pro testy v klinických laboratořích a hlavně pro monitorování rizikových kategorií pacientů, kterými jsou kuřáci, diabetici a pacienti s vysokým krevním tlakem.

Literatura

1. Joseph M.: Immunopharmacology of Platelets, s. 209, Academic Press, New York 1996.
 2. Holeček V., Racek J.: Klin. Biochem. Met. 2, 137 (1994).

3. Torri C.: Oxidative stress, human diseases and biomarkers, INT- Sept. 2003.

ACYLACE PROTEINŮ A JEJÍ TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ

Aleš Hnízda

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Acylací se na proteiny připojují zbytky kyseliny myristové (14:0), palmitové (16:0), stearové (18:0), arachidové (20:4) a dalších mastných kyselin. Nejčastěji se vyskytuje modifikace kyselinou myristovou a palmitovou. Dochází tím ke zvýšení hydrofobicity modifikovaných molekul, a to často vede k jejich nasměrování a inkorporaci do biomembrán. Acylace bývá také příčinou konformačních změn proteinů, někdy se tím zvyšuje jejich odolnost vůči nespecifické proteolyse.

Terapeutické využití myristoylace

Nejprostudovanějším mechanismem acylace je myristoylace. Mezi takto modifikované proteiny patří např. protein kinasa A, NADH – cytochrom b5 reduktasa, jedna z NO synthas, většina α -podjednotek G-proteinů a také strukturní proteiny retrovirů (např. Gag). Modifikace potom hraje zásadní roli při onkogenezi, buněčné signalizaci nebo skládání retrovirů.

Mechanismus

N-myristoylace je specifická k N-koncovému glycinu, probíhá kotranslačně v endoplazmatickém retikulu. N-myristoyltransferasa (NMT) je monomerní enzym (50 – 60 kDa). Mechanismus enzymové reakce je následující: 1. vazba myristoyl-CoA na NMT, 2. vazba proteinu na enzym, 3. přenos myristoylu na glycin proteinu 4. uvolnění CoA z aktivního centra enzymu, 5. uvolnění modifikovaného proteinu. Kyselina myristová se vždy specificky váže na N-konec za vzniku amidové vazby. Na NMT se váže také stearyl-CoA, nedochází ale k acylaci proteinu.

Specifita

Substrát NMT převážně obsahuje sekvenci Met-Gly-X-X-X-Ser(Thr) (menší část myristoylovaných proteinů může obsahovat v pozici 5 některou další aminokyselinu). Počáteční methionin je odstraněn aminopeptidasou a Gly se tedy stává N- koncovou aminokyselinou. Některé proteiny (např. G-proteiny) mají v sekvenci mezi Gly a Ser zbytky cysteinů, které mohou podléhat palmitoylaci. To pak hraje důležitou úlohu při inkorporaci do membrány. Specifita myristoylace výrazně odlišuje savce od ostatních organismů, přestože NMT vykazuje vysokou míru homologie (savci s kvasinkami

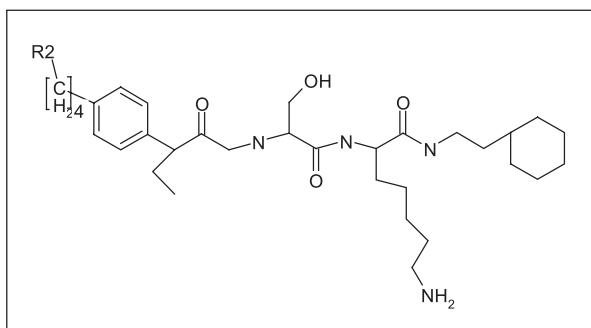
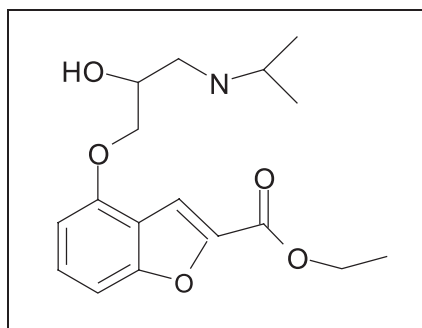
44 %). Tato rozdílná specifita umožňuje selektivní inhibici myristoylace, čehož se může využít při léčbě některých onemocnění. Tato možnost se úspěšně studovala na dvou rodech kvasinek, které způsobují úmrtí lidí s oslabenou imunitou – *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*.

Myristoylace je také důležitá při replikaci virových částic, čehož se dá využít při antivirové terapii. Znalosti této modifikace se také dají využít při vývoji chemoterapeutik, zvláště při léčbě karcinomu tlustého střeva.

Candida albicans

Jedním z významných patogenů mezi kvasinkami je *Candida albicans*, jež bývá častou příčinou úmrtí pacientů s AIDS. K léčbě se používají hlavně fungistatické triazoly, hrozí ale vytvoření rezistentního kmene. Alternativním terapeutickým přístupem je inhibice právě NMT. Studie se značenou [³H] kyselinou myristovou totiž ukázaly, že NMT je důležitá pro životaschopnost *Candida albicans*. Byl kultivován kmen, u něhož byl v jednom chromozomu gen pro NMT deletován, v druhém potom byla zavedena mutace Gly⁴⁴⁷ → Asp. Tato záměna aminokyseliny způsobila snížení katalytické aktivity NMT, způsobená sníženou afinitou enzymu k myristoyl-CoA. Kmen s mutací potom potřebuje ke svému růstu médium obsahující kyselinu myristovou. Tak se prokázalo, že životaschopnost kmene koreluje s mírou N-myristoylace proteinů *C. albicans*. Snížila se také její patogenita v oslabeném hostiteli. Nemutovaný kmen způsobil smrt imunodeficientní myši za 7 dní, zatímco kmen s mutací nebyl letální ani 21 dnů po intravenózním podání.

Jako inhibitory NMT byly navrženy jak analogy myristoyl-CoA, tak molekuly peptidové povahy. Ukázalo se, že doména rozpoznávající acyl-CoA je velmi konzervovaná a selektivní inhibici tímto způsobem není možné provést. V úvahu tedy připadá působení molekuly podobné peptidu, který rozpoznává NMT *Candidy albicans*, zatímco aktivita lidské formy zůstává zachována. Při návrhu a syntéze inhibitorů se vycházelo z N-koncového fragmentu Arf2p (ADP ribosylační faktor), neboť myristoylace je pro biologickou funkci tohoto proteinu klíčová. Kromě inhibitorů vycházejících z koncového oktapetidu byly nedávno navrženy sloučeniny obsahující jádro benzpyranu. (Příklady látek z obou skupin níže).



Inhibitor na bázi benzofuranu a inhibitor odvozený z oktapetidu

Junin virus

Junin virus, který řadíme mezi RNA viry, je původcem argentinské hemoragické horečky. Ta se dnes léčí pomocí ribavirinu, který má ale jako analog nukleosidů řadu vedlejších účinků. Jako alternativní antivirální prostředky byly zkoumány analogy kyseliny myristové, 2-hydroxymyristová kyselina a 13-oxamyristová kyselina. První z nich působí jako kompetitivní inhibitor NMT, druhá ovlivňuje strukturu modifikovaných proteinů – znemožňuje inkorporaci do biomembrán. Obě látky inhibovaly replikaci virů a *in vitro* nebyly pozorovány žádné negativní účinky na hostitelské buňky.

Myristoylace a boj s HIV

Myristoylace hraje také důležitou roli během rozmnožování viru HIV, modifikují se takto virové proteiny p17^{gag} a Nef. Proteinu Nef se využívá při snahách o vyvinutí vakcíny proti HIV. Jedná se o 30 kDa molekulu, která se inkorporuje do cytoplazmatické membrány. Nef zajišťuje řadu biologických dějů, souvisejících s patogenitou viru: mění transdukcí signálu, aktivuje T-lymfocyty a snižuje expresi CD4 a MHC I. Tyto vlastnosti znemožňují použít nezměněný Nef jako imunogenní látku. Byl proto izolován rekombinantní protein, u něhož byl akceptorový glycin zaměněn za alanin (nemůže tak docházet k myristoylaci) a dileucinový motiv byl deletován. Takto změněný Nef nevykazoval vlastnosti důležité pro patogenitu viru. Naneštěstí měl i nižší imunogenní reakci, což by měla vyřešit fúze s TPA (tissue plasminogen activator). NMT je poteciálním cílem antivirálních látek i sama o sobě, neboť snížením její aktivity způsobuje nižší viabilitu hostitelské buňky. Využívá se skutečnosti, že během chronické i akutní formy infekce HIV se snižuje hladina exprese NMT v napadených T-lymfocytech. Působením derivátu serinalu docházelo k selektivnímu zneškodnění hostitelských buněk HIV, neboť vzhledem ke snížení exprese jsou napadené buňky k působení inhibitoru citlivější.

Karcinom tlustého střeva

Karcinom tlustého střeva je jedno z nejčastěji se vyskytujících nádorových onemocnění a Česká republika drží smutný primát země s nejvyšší incidencí. V buňkách tlustého střeva bylo definováno několik myristoylovaných proteinů. Zdravé buňky obsahují například pp60^{src}, pp60^{c-yes} a anexiny. Na význam myristoylace při onkogenezi upozornila práce, jež se zabývala myristoylací virového onkogenního produktu pp60^{v-src}. Ta je nezbytná pro inkorporaci do membrány a následnou transformaci buněk. Protein potom zůstává v cytoplazmatické membráně a nemůže vykonávat svoji regulační funkci. Blokování modifikace lidského proteinu pp60^{src} také vede k potlačení růstu a proliferace buněk. To, že myristoylované proteiny pp60^{src} a pp60^{c-yes} hrají významnou úlohu při patogenezi nádorových onemocnění, potvrdilo zjištění, že jejich tyrosin kinasová aktivita je vyšší v nádorových buňkách v porovnání se zdravými.

Dalším důležitým objevem je to, že už v časných stádiích karcinomu dochází ke zvýšení aktivity NMT, což je způsobeno zvýšením exprese enzymu. Nedávno pak byly izolovány endogenní inhibitory z hovězího mozku.

Jejich podání inhibovalo krysí karcinom tlustého střeva.

Terapeutické využití palmitoylace

Připojení kyseliny palmitové na proteiny není ve srovnání s kyselinou myristovou tak důkladně prostudováno. Nedaří se totiž izolovat všechny odpovědné enzymy, zároveň také dochází v buňce k nespecifické reakci.

Palmitoylace – mechanismus a specifita

Je známo, že palmitoyl se většinou váže na thiolovou skupinu cysteinu za vzniku thioesterové vazby. Modifikovaný zbytek se v primární struktuře nachází blízko N- nebo C-konce a zároveň musí být součástí nebo blízko transmembránové domény.

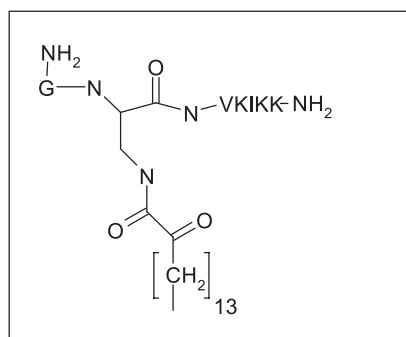
Zároveň je známo, že palmitoyl-transferasa preferuje myristoylované proteiny. Připojení je dynamické, může být odstraněno protein palmitoyl protein thioesterasou (PPT). PPT štěpí thioesterovou vazbu v proteinech navázaných na plazmatickou membránu a ty jsou potom transportovány do lysozomu.

Biologické důsledky

Změny modifikace kyselinou palmitovou mají také významné biologické důsledky. Deficience PPT způsobuje metabolické změny, které negativně ovlivňují nervovou činnost (onemocnění vede ke slepotě a nakonec k úmrtí ve věku 3 let). Příčinou onemocnění je akumulace palmitoylovaných proteinů, které se se nacházejí hlavně v lysozomální frakci a jejich přítomnost snižuje aktivitu proteas v organele. Inhibitory tohoto enzymu mohou být také použity k destrukci nádorových buněk lokalizovaných v mozku. Palmitoylace též hraje důležitou roli při replikaci virů způsobujících chřipku. Znalosti v této oblasti však dosud nepostačují k tomu, aby se daly použít k lékařským účelům.

Inhibitory PPT jako chemoterapeutika pro nádory mozku

Inhibice depalmitoylace vede k porušení mezibuněčných signálů a buněčné smrti. Jako inhibitory se používají nehydrolyzovatelné analogy palmitoyl-thioesterů (AcG-alfa-ketoamido-palmitoyl diamino propionát-VKIKK; zkráceně DAPKA (viz strukturální vzorec na obrázku). Působení této látky zvyšovalo účinek doposud používaných chemoterapeutik (etoposid, adriamycin). Ty vyvolávají apoptosu a aktivita PPT ji inhibuje. Snížení aktivity PPT tedy zvyšuje účinek terapie. Nevýhodou inhibitorů PPT jsou jejich vedlejší účinky, mezi něž patří hlavně poškození myokardu.



DAPKA

Závěr

Výše uvedené příklady ukazují, že poznání acylace má velké uplatnění ve vývoji nových léčiv proti řadě onemocnění. Byly vyvinuty inhibitory myristoylace, které potlačují růst *Candidy albicans* u pacientů s osla-

benou imunitou. Myristoylace se také studuje v souvislosti s léčbou infekce HIV nebo karcinomu tlustého střeva. Důležitá je také modifikace kyselinou palmitovou. Poznání tohoto problému má potenciál hlavně v léčbě nádorů mozku.

Literatura

1. Resh, M.D., *Biochimica et Biophysica Acta* 1451 (1999), 1-16.
2. McWherter, C.A. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 11874-11880.
3. Sogabe, S. et al., *Chemistry & Biology* 9 (2002), 1119-1128.
4. Takamune, N. et al., *FEBS Letters* 527(2002), 138-142.
5. Liang, X. et al., *Vaccine* 20 (2002), 3413-3421.
6. Cordo, S.M et al., *Microbes and Infection* 1 (1999), 609-614.
7. Raju, R.V.S. et al., *Experimental Cell Research* 235 (1997), 145-154.
8. Dawson, G. et al., *Cancer Letters* 187 (2002), 163-168.

V TOMTO ČÍSLE NAJDETE

ÚVODEM	1
PROJEKT BIOTECHNOLOGIE PRO PRAHU BILANCUJE	2
MEZINÁRODNÍ KONFERENCE NEW ASPECT IN AQUACULTURE	2
BIOTECHNOLOGIE PŘI VÝROBĚ BATERIÍ	3
BIOMIKRONANOTECHNOLOGIE	4
BIOTECHNOLOGIE JAKO ALTERNATIVA PRO CHEMICKÝ PRŮMYSL	6
GENETICKY MODIFIKOVANÉ PLODINY	9
GENETICKY MODIFIKOVANÁ JABLKA	12
BIO-RECEPTOR BASED METHODS (BIO-ASSAYS) FOR FOOD, ENVIRONMENT AND CLINICAL ANALYSIS	15
CYTOKÍNY V CHARAKTERIZÁCI PROTINÁDOROVÉJ IMUNITNEJ ODPOVEDE V UNIKÁTNO M ŽIVOČÍŠNOM „MeLiM“ MODELI MELANÓMU	19
ENZYMOVÉ MODIFIKACE FOSFOLIPIDŮ	21
OXIDAČNÍ STRES, LIDSKÉ CHOROBY A BIOMARKERY	24
ACYLACE PROTEINŮ A JEJÍ TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ	26

POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,

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

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

Děkuji

L. Fukal

BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

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