

B I P R O S P E C T

Dvacátýdruhý ročník
Číslo 1/2012

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

BULLETIN BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)

a
člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)

Redakční rada

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

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

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B I P R O S P E C T

22th Volume
No. 1/2012

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

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

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

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

For more information contact the editorial board or directly:

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

ÚVODEM

Vážení přátelé,

vítáme Vás letos již ve dvacátém druhém čísle našeho Biopropectu a pevně věříme, že nadále budete spokojeni s jeho obsahem. Děkujeme Vám za Vaše komentáře a podněty a samozřejmě se těšíme na Vaše příspěvky. I nadále se vynasnažíme, aby obsah článků pokrýval co nejširší oblast biotechnologií a přinášel Vám informace i z oblastí, které nejsou sférou Vašeho běžného zájmu. Aktuální informace Vám budeme nadále poskytovat v našem e-mailovém servisu, ale jen těm z Vás, kteří o to projeví zájem.

Jako každoročně uspořádáme již tradiční seminář „Novinky v oblasti genetických modifikací“, který se uskuteční v úterý 22. května 2012 od 13 hod. v posluchárně AI VŠCHT v Praze. Předběžný program a další podrobnosti naleznete na vložené pozvánce.

Rádi bychom Vám připomněli, že je Vám stále k dispozici web našeho loňského mezinárodního symposia (www.biotech2011.cz), kde si můžete prohlédnout fotografickou dokumentaci. V těchto dnech se uzavírá recenzní řízení vybraných přehledných článků pro časopis *Biotechnology Advances*. O jejich publikaci Vás budeme informovat v dalším čísle *Biopropectu*.

Jak jsme Vás již koncem roku informovali, proběhnou v letošním roce volby Rady a revizní komise poprvé korespondenčním způsobem (e-mailem nebo písemně). O organizaci voleb budou všichni členové uvědomeni dopisem. Vaše nominace můžete posílat na adresu: danka.pokorna@vscht.cz (resp. poštou na adresu Ing. Dana Pokorná, CSc, Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Technická 3, 166 28, Praha 6). Na tyto adresy laskavě posílejte i veškeré změny poštovní adresy (posílání *Biopropectu*) i e-mailové adresy (pro snadnější komunikaci). Chcete-li být zařazeni do informačního servisu, uveďte to výslovně.

Pro Vaši informaci uvádíme, že prestižní český, resp. československý, chemický časopis „Collection of Czechoslovak Chemical Communication“ přestal vycházet pod tímto názvem, ale byl ve spolupráci

s Chemistry Publishing Society Europe a s nakladatelstvím Wiley-VCH (Verlag-Chemie) transformován do nového časopisu, který od 1. 1. 2012 vychází pod názvem *ChemPlusChem*.

Malé a střední biotechnologické firmy by se měly seznámit s projektem *CzechAccelerator 2011 – 2014* organizovaném *CzechInvestem* a Ministerstvem průmyslu a obchodu na internetových stránkách <http://www.czechaccelerator.cz>.

Zájemci o XXIII. Biochemický sjezd, který se bude letos konat v Univerzitním kampusu Masarykovy univerzity v Brně-Bohunicích (26.-28.8.2012) nalezou informace na webu www.csbmb2012.cz. Na témže webu je mnoho zajímavých informací o Brnu a jeho historii.

Ve dnech 11. – 13. 9. 2012 bude Zahradnická fakulta v Lednici pořádat národní konferenci Aplikované rostlinné biotechnologie ke 100. výročí založení geneticko-šlechtitelského pracoviště *Mendeleum* v Lednici. Bližší podrobnosti naleznete na webu: <http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/571/konference>.

V tomto čísle *Biopropectu* naleznete další zajímavý příspěvek Prof. Dr. Jeana Daussanta o zajímavých vlastnostech protilátek z velbloudovitých (velbloudi, lamy) a některých dalších živočichů. Dále bychom rádi obrátili Vaši pozornost na další články týkající se lipidových databází, mikrobiální produkce glukosaminu, antimikrobiálních peptidů, možností odstraňování sulfanu z bioplynu a možností jak zefektivnit produkci námelových alkaloidů.

Zároveň bychom Vás rádi požádali o uhrazení členských příspěvků, pokud jste tak dosud neučinili, a pokusili se získat nové členy naší společnosti, zejména členy institucionální.

Těšíme se na další spolupráci a přejeme Vám krásné prožití svátků jara – velikonoc.

S mnoha pozdravy Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠCHT

Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT

si Vás dovoluji pozvat na tradiční seminář

NOVINKY V OBLASTI GENETICKÝCH MODIFIKACÍ

konaný v úterý 22. května 2012 od 13 hod.

v posluchárně A I VŠCHT v Praze

(přímo proti vchodu do budovy),

Praha 6, Technická 3 (budova A naproti NTK)

(pěšky od stanice metra Dejvická, východ ve směru příjezdu vlaku)

Program:

Zahájení ve 13 hod.

Jan Káš, VŠCHT Praha:

Úvodní slovo

Radek Sedláček, ÚMG AV ČR v.v.i.:

Transgenní myší modely a encyklopedie funkce genů

Monika Baxa a Jan Motlík, ÚŽFG AV ČR v.v.i.:

Transgenní miniaturní prase jako model ke studiu Huntingtonovy choroby

Bohdan Schneider, Biotechnologický ústav AV ČR v.v.i.:

Zvýšení afinity vazby mezi proteiny racionální mutací

Závěr semináře

Vstup je volný.

ZA ORGANIZÁTORY SEMINÁŘE:

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
Biotechnologická společnost

Prof. Ing. Tomáš Ruml, CSc.
děkan FPBT

INCREASING INTEREST FOR THE HEAVY CHAIN ANTIBODIES AND THEIR RECOMBINANT PROTEINS (NANOBODIES)

Jean Daussant, F. Xavier Desvaux

Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemicala Technology, Prague, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, jean.daussant@akeonet.com, xavier.desvaux@upmc.fr

Antibodies composed of two heavy chains only, named "heavy chain antibodies" (hcAbs), were discovered at first in llamas in 1993 by Hammers-Casterman *et al.*¹ and found later on in camels and dromedaries. These hcAbs lack also the CH1-domain so that a single domain linked directly via a hinge region to the Fc-domain forms the antigen-binding site. These hcAbs constitute, in llamas, about 50% of the total antibodies besides the conventional antibodies with heavy and light chains.^{2, 3, 4} Heavy chain antibodies raised great interest concerning their applications, particularly in the domain of therapy. Indeed, hcAbs are now the object of many scientific papers as well as industrial development, e.g. with the first biopharmaceutical company, (Ablynx) created in 2001 in Belgium.

Such antibodies raised questions about their origin, structure and function. Concerning their origin, such antibodies already existed in sharks (Fig. 1), but their presence in Camelidae does not seem to be the result of resuscitation of dormant genes. They seem, rather, to be derived from the conventional antibodies within the Camelidae lineage, and are apparently the outcome of more recent adaptations occurring in the compartment of heteromeric antibodies⁵. In a more recent paper, the authors⁶ analyse the convergent causes resulting in the emergence and re-emergence of single-chain antibodies as well as the constraints that may have prevented their presence (which nevertheless should be advantageous for the organisms bearing these antibodies) in all vertebrates.

Concerning their polymorphism, Camelidae have indeed the V, D, J heavy chain gene system, but their genetic repertoire should be not nearly as large as the

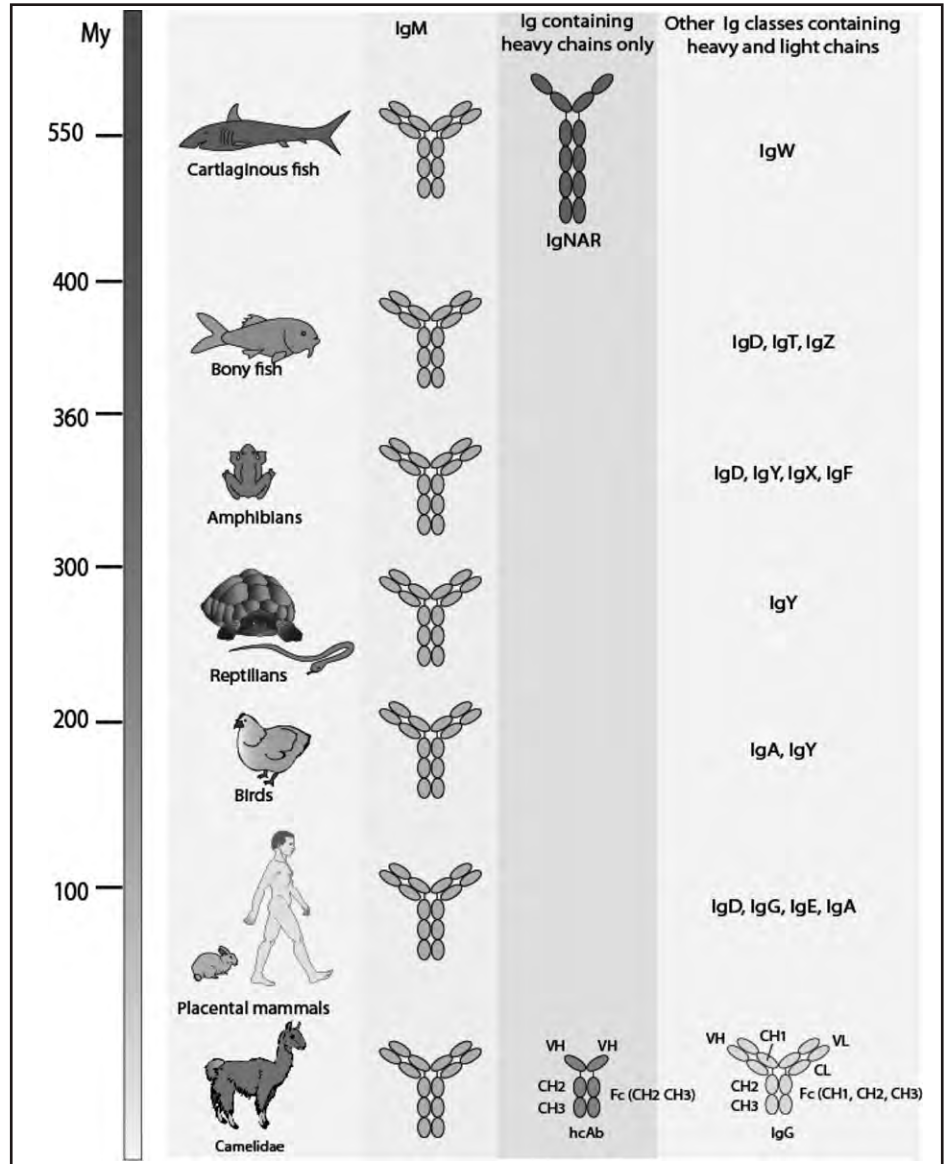


Fig. 1. Antibodies during evolution^{6, 7}. From the beginning of their appearance, in cartilaginous fishes like sharks, one class of Immunoglobulins (IgM) has been conserved during the evolution up to now with the same global structure (two heavy chains composed each of 5 domains and two light chains composed each of 2 domains). Besides, in these fishes e.g. sharks, another Ig class (IgNAR) appeared, composed of two heavy chains only with each 6 domains. This class of Ig disappeared already in bony fishes but emerged again in a family of mammals (Camelidae) nevertheless with a reduced number of domains (3). From Bony fishes on, several classes of Ig appeared and sometimes disappeared during evolution. They are all formed by two heavy and two light chains and differ by the number of domains on the heavy chains, the light chains being always composed of two domains.

one of the current antibodies, which results from the combination of the numbers of combinations of the gene numbers of each of the two (light and heavy) chains. However, evidence was produced⁸ for considering that, on a structural level, humoral immunity may rely more on well-developed maturation and selection (involving mutations on v genes) than on the acquisition of large primary repertoires.

From a functional viewpoint, paratopes of hcAbs (constituted only by a single domain termed VHH) have affinities comparable to those of current Abs. They have in addition several advantages. One of these advantages particularly concerns access to certain epitopes that are not accessible to current antibodies as cavities on protein surfaces e.g. the active site crevice of enzymes⁹. These unusual characteristics render hcAbs attractive for applications in the domains of research, immunodiagnostic and immunotherapy.

From a technical viewpoint, VHHs are easily produced as recombinant proteins -named sdAb or nanobodies- at higher levels than the recombinant conventional antibodies in *E. coli* or in other cells e.g. 1g/L of yeast culture². They have in addition several advantages reported in Table 1. One major advantage particularly concerns the nanobody affinity, which remains equivalent to the affinity of the hcAbs, one characteristic which is not the case for the recombinant conven-

tional antibodies that have a weak affinity compared to that of polyclonal or monoclonal antibodies. Applications in immunotherapy include programmes in oncology, pulmonary diseases, thrombosis, Alzheimer's disease^{4, 10}. Although so far no such antibodies have yet been validated for such applications, nevertheless many such hcAbs or nanobodies are presently developing, a few of them being already in phase I and II of assay. In 2010, Ablynx targeted 7 nanobodies in clinical assays for the year 2011.

Concerning their application for immunodiagnosis, nanobodies would be also useful, although at present to a lesser extent⁴: For instance, several reports mention their usefulness for identifying prostate specific antigen (PSA) employing ELISA or Biosensors^{11, 12, 13}. The sensitivities reported are similar to those obtained with current antibodies, namely in the range of subng/mL.

The functional characteristic of the hcAbs, similar and even superior to the other mammal antibodies as well as the preservation of the affinity of the nanobodies compared to the hcAbs, together with the ease with which nanobodies are produced, will probably pave the way towards a great future for hcAbs and nanobodies in the domain of research, immunotherapy and immunodiagnostic as well as in other fields e.g. food quality control.

Table 1. Advantages of nanobodies and their molecular basis³.

Advantage	Molecular basis
Facile genetic manipulation	Single-domain nature
Increased functional size of immune libraries	No decrease in library size because of reshuffling of VL and VH domains
Facile production of multivalent formats	More flexible linker design and no mispairing of VL and VH domains
Facile production of oligoclonal preparations from single cells	No mispairing of VL and VH domains
High physicochemical stability	Efficient refolding due to increased hydrophilicity and single-domain nature
High solubility	Increased hydrophilicity
Recognition of hidden antigenic sites	Small size and extended flexible CDR3
Rapid tissue penetration, fast clearance	Small size
Well expressed	Efficient folding due to increased hydrophilicity and single-domain nature

References

1. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al.: *Nature* 363 (6428), 446 (1993).
2. Gibbs WW: *Scientific American* 293(2), 79 (2005).
3. Harmsen MM and De Haard HJ: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(1), 13 (2007).
4. Wesolowski J, Alzogaray V, et al.: *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 157 (2009).
5. Viet KN, Chen Su, et al.: *Immunogenet.* 54, 39 (2002).
6. Flajnik MF: Deschacht N, Muyldermans S: *PLoS Biology* 9(8), e1001120 (2011).
7. Flajnik MF: *Nature Rev. Immun.* 2, 689 (2002).
8. De Genst E, Silence K, et al.: *J. Biol. Chem.* 280 (14), 14114 (2005).
9. De Genst E, Silence Ket al.: *Proc Natl Acad Sci USA* 103(12), 4586 (2006).
10. Ablynx 2011 <http://www.ablynx.com>; 2011, November 16
11. Pleschberger M, Saerens D, et al.: *Bioconjug. Chem.* 15(3), 664 (2004).
12. Huang L, Reekmans G, et al.: *Biosens. Bioelectron.* 21(3), 483 (2005).
13. Saerens D, Frederix F, et al.: *Anal. Chem.* 77 (23), 7547 (2005).

Summary

Daussant J. and Desvaux F. X.: Increasing interest for the heavy chain antibodies and their recombinant proteins

Antibodies composed of two heavy chains only, named "heavy chain antibodies" (hcAbs), were discovered at first in llamas in 1993 and found later on in camels and dromedaries. The short review paper informs the readers about their origin and occurrence during evolution, their advantages and application options in therapy, immunodiagnosics and research.

Keywords: heavy chain antibodies, nanobodies, Camelidae, recombinant proteins

Souhrn

Daussant J. a Desvaux F. X.: Zvýšený zájem o protilátky tvořené pouze dvěma těžkými řetězci a jejich rekombinantní analoga

Protilátky obsahující pouze dva těžké řetězce (hcAbs – "heavy chain antibodies") byly objeveny u lam v r. 1993 a později u jednohřbých i dvouhřbých velbloudů. Článek informuje čtenáře o jejich vzniku a výskytu během evoluce, jejich přednostech a aplikačních možnostech v terapii, imunodiagnostice a výzkumu.

Klíčová slova: protilátky s těžkými řetězci, nanočástice, Camelidae, rekombinantní proteiny

LIPIDOVÉ DATABÁZE A LIPIDOMIKA

Eva Jablonská

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, eva.jablonska@vscht.cz

Úvod

Lipidy hrají v živých organismech nezastupitelnou roli. Tvoří biologické membrány, slouží jako zdroj a zásoba energie a jako tepelná a mechanická izolace. Mají regulační funkce (neboť mezi lipidy patří steroidní hormony, eikosanoidy a vitaminy rozpustné v tucích) a také signalizační funkci (např. diacylglycerol patří mezi druhé posly ovlivňující vnitrobuněčné dění). I přesto v současné biochemii dosud hrály prim proteiny. Databáze jsou orientovány na proteiny (UniProt sdružující tři databáze: trEMBL, SwisProt a PIR) a jejich prostorové struktury (PDB, založeno 1971) a proteomika je všeobecně známý obor. Lipidy byly dlouho podceňovány pouze jako zdroj energie a součást biomembrán. Od roku 2001, kdy byl poprvé v odborném článku zmíněn termín lipidom¹, se lipidy konečně dostávají z ústraní na scénu, rozrůstají se on-line lipidové databáze a rozvíjí se obor zvaný lipidomika.

Lipidové databáze

Na internetu nalezneme více lipidových databází s různým zaměřením a používající různou klasifikaci lipidů. Klasifikace lipidů je totiž velmi nesnadný úkol, neboť lipidy jsou heterogenní skupina látek, které mají společné pouze to, že jsou omezeně rozpustné ve vodě a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Odborníci se snaží zavést přesnější definice lipidů, například: „Jedná se o malé hydrofobní či amfipatické molekuly, které jsou zcela či částečně tvořeny karbaniontovou kondenzací thioesterů (mastné kyseliny, polyketidy aj.) a/nebo karbaniontovou kondenzací isoprenových jednotek (prenoly, steroly, aj.)“². Komise IUPAC pro biochemické názvosloví sice zavedla dělení lipidů do čtyř skupin (mastné kyseliny a neutrální lipidy, fosfolipidy, glykolipidy a neuraminové kyseliny) a dále na podskupiny³, jednotlivé databáze však zavádějí vlastní modifikované systémy klasifikace vyhovující jejich konkrétním účelům. Následující odstavce se

budou věnovat čtyřem hlavním veřejně přístupným databázím lipidů.

Lipidová banka (angl. Lipid Bank) je japonský projekt fungující od roku 1996 a jedná se o obecnou databázi sdružující na 7 tisíc molekul přírodních lipidů rostlinného, živočišného i mikrobiálního původu. Obsahuje molekulové struktury lipidů, spektrální data (MS, UV, IR, NMR) a příslušnou literaturu. Databáze umožňuje vyhledávání lipidů podle různých kritérií (např. podle jména, přírodního zdroje, biologické aktivity, či molekulové hmotnosti). Banka zavádí vlastní systém klasifikace s rozřazením lipidů do 16 hlavních skupin⁴.

LIPIDAT je databáze obsahující informace o termodynamice přírodních i syntetických lipidů, zejména o jejich fázových přechodech a mísitelnosti (jsou zde tabelovány např. teploty fázových přechodů, změny entalpie a vliv pH či iontů na termodynamické hodnoty). LIPIDAT funguje od devadesátých let minulého století, sdružuje výsledky publikované ve více než padesáti vědeckých časopisech a dnes zahrnuje přes 20 tisíc záznamů. Klasifikace lipidů pro účely této databáze spočívá v rozlišení tří částí molekuly lipidu – na nepolární řetězec, polární hlavici a kostru nesoucí obě skupiny^{5,6}.

Lipidová knihovna (angl. Lipid Library) je internetová stránka o lipidech založená a vedená Dr. W. W. Christiem, skotským odborníkem na strukturní analýzu lipidů. Dr. Christie dělí lipidy do čtyř skupin: na mastné kyseliny a eikosanoidy, na jednoduché glycerolipidy, na složené glycerolipidy a na sfingolipidy. U každé skupiny jsou uvedeny informace o biosynthese, metabolismu, funkci i roli, jakou hrají při některých onemocněních. Dále jsou zde informace o analýze lipidů a technologii lipidů. Lipidová knihovna neumožňuje interaktivní vyhledávání⁷.

Databáze struktur LIPID MAPS (angl. The LIPID MAPS Structure Database) je orientována na metabolismus lipidů savčí buňky. Jedná se o databázi asociace s názvem LIPID Metabolites And Pathways Strategy (zkr. LIPID MAPS). Tohoto projektu se účastní více

pracovišť po celém světě a jedná se vlastně o nejrozsáhlejší lipidomický projekt. Databáze zahrnuje 30 tisíc biologicky důležitých lipidových struktur, což z ní činí největší světovou veřejně přístupnou čistě lipidovou databázi. Asociace založená v roce 2003 má za cíl lépe porozumět metabolismu lipidů člověka s ohledem na možné zlepšení léčby onemocnění spojených s lipidy (jedná se například o Alzheimerovu chorobu, artritidu, mrtvici, rakovinu a diabetes). V databázi se shromažďují data z experimentů v rámci projektu LIPID MAPS i relevantní data z jiných přístupných lipidových databází. Databáze zavádí vlastní systém klasifikace vhodný pro účely lipidomiky, bioinformatiky a zpracování dat, který zároveň respektuje doporučení komise IUPAC pro biochemické názvosloví. Lipidy jsou rozděleny do osmi kategorií – na mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, sterolové lipidy, prenolové lipidy, sacharolipidy a polyketidy s dalším dělením na třídy a podtřídy. Databáze LIPID MAPS – na rozdíl od jiných lipidových databází – obsahuje molekulové struktury v jednotném formátu. Každá lipidová struktura má v databázi přiřazený dvanáctimístný systematický identifikátor. Databáze umožňuje vyhledávání podle různých kritérií včetně struktury. Součástí je též databáze genů a proteinů zapojených v metabolických drahách lipidů^{8,9}.

Lipidomika

Lipidomika je definována jako „studium metabolických drah v buněčném systému“¹⁰ či přesněji jako „úplná charakterizace molekul různých druhů lipidů a jejich biologických funkcí s ohledem na expresi proteinů zapojených v metabolismu lipidů, včetně regulace genů.“¹¹

Literatura:

1. <http://lipidlibrary.aocs.org/lipidomics/omics.html>, staženo 23. ledna 2012.
2. <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/Nomen/index.htm>.
3. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/>, staženo 20. ledna 2012.
4. lipidbank.jp, staženo 20. ledna 2012.
5. Caffrey M, Hogan J. *Chem Phys Lipids*. 61(1), 1 (1992).
6. <http://www.lipidat.tcd.ie/homeLIPIDAT.asp>, staženo 20. ledna 2012.

Souhrn

Jablonská E.: Lipidové databáze a lipidomika

V současné době se rozvíjí lipidomika a on-line databáze lipidů. Nejvýznamnějším lipidomickým projektem je dnes LIPID MAPS. Asociace LIPID MAPS také spravuje největší lipidovou databázi. Mezi další lipidové databáze patří japonská Lipid Bank a LIPIDAT.

Klíčová slova: lipidomika, lipidové databáze, asociace LIPID MAPS

Summary

Jablonská E.: Lipid databases and lipidomics

Lipidomics and lipid databases are developing quickly. The most significant lipidomics project is LIPID MAPS consortium and its lipid database. There are also other on-line lipid databases, e.g. Lipid Bank or LIPIDAT.

Keywords: lipidomic, lipid databases, LIPID MAPS consortium

Hlavním nástrojem lipidomiky je hmotnostní spektrometrie a dále pak chromatografické techniky. Asociace LIPID MAPS se zabývá zejména určováním kvantitativních lipidových profilů v dané buňce. Jako modelové buňky jim slouží myši makrofágy a hlavním analytickým nástrojem je hmotnostní spektrometrie. Výhodou MS je, že rozsah spektrometrů vhodně koreluje s molekulovou hmotností lipidů, která se pohybuje do 1200 Da. Naopak problémem je již zmíněná klasifikace lipidů a lipidové standardy důležité pro zjištění výtěžku a ionizačního efektu. Asociace LIPID MAPS vyvinula více než 500 izotopově značených standardů, které jsou dnes i komerčně dostupné. Většinou se používá jeden vnitřní standard pro každou třídu lipidů a kvantitativní analýza lipidů je tak možná. V lipidomice se podobně jako v proteomice používají dva přístupy: MS analýze buď předchází kapalinová chromatografie, nebo se analyzuje směs lipidů bez předchozího rozdělení (tzv. „shotgun“ lipidomika). Za účelem zjištění přesné lokalizace určitých lipidů se používá i hmotnostní mikroskopie (MS imaging), která pracuje s tenkými řezy tkáně, jež jsou vystaveny ionizaci¹¹.

Závěr

V dnešní době je již lipidům věnována pozornost, kterou si zaslouží s ohledem na důležité funkce, které v organismech zastávají. Lipidomika je komplexnější než proteomika, neboť se sleduje nejen zastoupení samotných lipidů, ale také zastoupení proteinů a genů důležitých pro metabolismus lipidů. Nástrojem lipidomiky jsou lipidové databáze sdružující komplexní informace o přírodních lipidech. Článek aktualizuje informace podané v posledním čísle Bioprospectu v r. 2009.¹²

7. <http://lipidlibrary.aocs.org>.

8. <http://www.lipidmaps.org/data/structure/>, staženo 20. ledna 2012.

9. Sud M, Fahy E, Cotter D, et al.: *Nucleic Acids Res*. 35, D527 (2007).

10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 22. ledna 2012.

11. Arnaud CH. *Chem. Eng. News*. 89(41), 15 (2011).

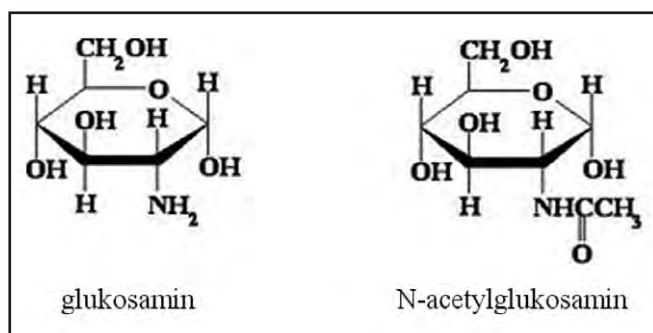
12. Junková P.: *Bioprospect* 19(3-4), 63 (2009).

MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE GLUKOSAMINU

Zuzana Vápeníková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Glukosamin (2-amino-2-deoxy –D-glukosa) patří mezi monosacharidy, jejichž jedna hydroxylová skupina je nahrazena skupinou aminovou¹. Glukosamin samotný i jeho acetylovaná forma N-acetylglukosamin (2-acetamido-2-deoxy-D-glukosa) jsou syntetizovány ve všech organismech jako bakterie, kvasinky, vláknité houby, ale i v rostlinách a živočiších. U člověka jsou glukosamin a N-acetylglukosamin stavebními jednotkami chitinu a mukopolysacharidů (glykosaminoglykanů). Do skupiny glykosaminoglykanů patří např. kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát či keratan sulfát². Tyto látky jsou nezbytné v pojivových tkáních – kůži, šlachách, vazivu a chrupavkách.



Obr. 1: Strukturální vzorec glukosaminu a N-acetylglukosaminu³

Význam glukosaminu

Hlavní význam nachází glukosamin při léčbě osteoartritidy, kdy napomáhá zmírňovat obtíže s ní spojené. Osteoartritida je onemocnění způsobené poškozením kloubní chrupavky. Chrupavka postupně ztrácí svou funkci a pohyb se pro pacienta stává bolestivým⁴. Nejčastěji bývá postižen kolenní a kyčelní kloub. Udává se, že v USA onemocnění postihuje každého sedmého člověka. Riziko nemoci roste s věkem. Až jedna třetina lidí starších šedesáti let trpí osteoartridou. Příčinami vzniku onemocnění jsou genetické dispozice, obezita, úrazy nebo např. přetěžování určitých kloubních skupin⁵. Komerčně je glukosamin dostupný ve třech formách: N-acetylglukosamin, glukosamin hydrochlorid a glukosamin sulfát. Podle dostupných studií je glukosamin bezpečný prostředek bez vedlejších účinků. Ani u vysokých dávek nebyl prokázán nepříznivý vliv na glukózový metabolismus⁶. Kromě glukosaminu bývá podáván jako chondroprotektivní látka, také MSM (methylsulfonylmethan), *Ribes nigrum* (černý rybíz) a silicon.

V současné době je glukosamin nejčastěji získáván kyselou hydrolyzou chitinu (lineární polymer N-acetylglukosaminu) z koryšů, zejména krabů a garnátů¹. Koncentrovaná kyselina chlorovodíková rozruší polymer a následnou deacetylací je získán glukosamin. Produkce glukosaminu z koryšů je limitována

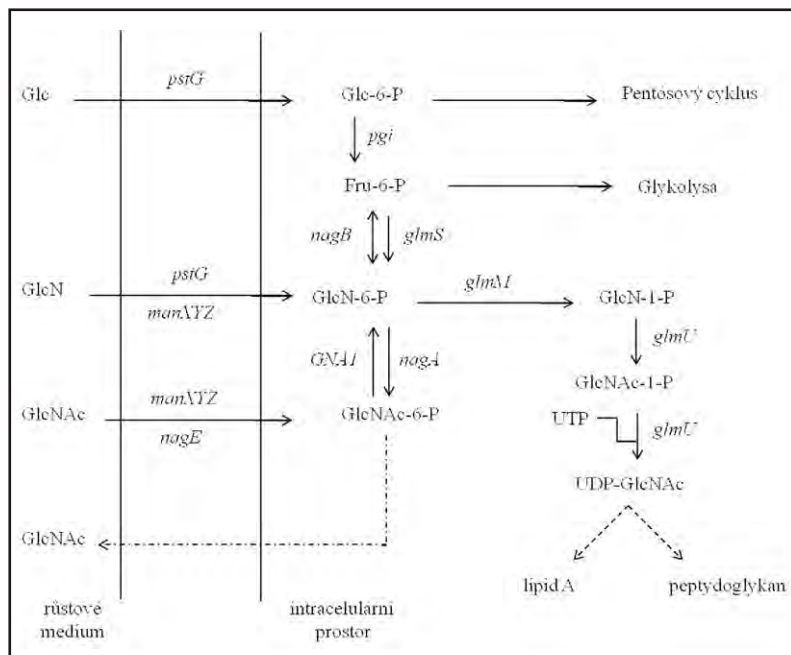
množstvím dostupného materiálu. Další nevýhodou této metody je, že někteří lidé jsou na koryše alergičtí a nemohou tak využívat ani glukosamin získaný tímto způsobem⁷. Je tedy nutné zajistit i jiné možné způsoby získávání glukosaminu. Jak bylo zmíněno výše glukosamin je produkován velkou škálou organismů, kteří mohou být využiti jako vhodný zdroj.

Bakteriální zdroj

Snaha získat kvalitní glukosamin, co možná nejlevnější cestou a zároveň v dostatečném množství, vedla k vývoji vysoce účinného bakteriálního kmene, který provádí kvasný proces, umožňující získání glukosaminu. Přesná cesta syntézy a metabolismu glukosaminu je podrobně prostudována u *Escherichia coli*. Proces syntézy začíná přeměnou fruktosy-6-fosfátu na glukosamin-6-fosfát (GlcN-6-P). Donorem amino skupiny je glutamin a reakce je katalyzována glukosamin-syntasou (glmS). Glukosamin-6-fosfát je konvertován na glukosamin-1-fosfát (GlcN-1-P) za pomoci fosfoglukosamin mutasy (glmM). Bifunkční enzym GlcN-1-P N-acetyltransferasa/GlcNAc-1-P uridiltransferasa (glmU) přeměňuje GlcN-1-P na N-acetylglukosamin-1-P (GlcNAc-1-P) a následně na UDP-GlcNAc⁸. Poslední produkt je prekursorem pro syntézu peptidoglykanů a lipopolysacharidů, které jsou pro gramnegativní bakterie esenciálními složkami.

E. coli byla modifikována k akumulaci glukosaminu, pomocí inaktivace genu účastnícího se katabolismu a transportu glukosaminu (*manXYZ*) a následnou nadexpresí genu důležitého pro syntézu glukosaminu (*glmS*). K vytvoření mutantů genu *glmS* *E. coli* byla využito metody PCR, při které byly vnášeny náhodné mutace (error-prone PCR). K dalšímu požití byly vybrány pouze klony produkující glukosamin ve větším množství.

Bylo zjištěno, že *glmS* je citlivá k inhibici produktem, především GlcN-6-P. Dalším poznatkem bylo zjištění, že na degradaci glukosaminu má velký vliv pH. Optimální pH pro růst buněk je 6,5-7. Pokud dojde ke snížení pH na 5, dochází k potlačení metabolické aktivity a tedy k potlačení samotné degradace. Jako jedna z možných variant je řešení využít pro syntézu kvasinky nebo mléčné bakterie, které rostou v kyselém pH. U *E. coli* byl problém vyřešen tak, že za vhodný produkt kvasného procesu byl místo samotného glukosaminu zvolen jiný produkt, N-acetylglukosamin. Výhodou je nejen jeho stabilita, ale také že nezpůsobuje inhibici *E. coli*. Následná hydrolyza N-acetylglukosaminu na glukosamin je snadná a probíhá za mírně kyselých podmínek. Kmen 7107-18 byl proto upraven na produkci N-acetylglukosaminu. Na rozdíl od bakterií, v kvasinkách a jiných eukaryotických organismech GlcN-6-P N-acetyltransferasa (kódovaná GNA1 genem) katalyzuje tvorbu GlcNAc-6-P. Kvasinkové a rostlinné



Obř. 2: Schéma vzniku N-acetylglukosaminu u *E. coli* (modifikováno z lit. 8) Glc: glukosa, Glc-6-P: glukosa-6-fosfát, Fru-6-P: fruktosa-6-fosfát, GlcN: glukosamin, GlcNAc: N-acetylglukosamin, *pstG*: glukosový transportér, *manXYZ*: manosový transportér, *nagE*: GlcNAc transportér, *pgi*: fosfoglukoisomerasa, *glmS*: glukosamin syntasa, *nagB*: GlcN-6-P deaminasa, *nagA*: GlcNAc-6-P dacetylasa, *GNA1*: GLcN-6-P N-acetyltransferasa, *glmM*: fosfoglukosamin mutasa, *glmU*: GlcN-1-P acetyltransferasa/GlcNAc-1-P uridylyltransferasa

GNA1 geny byly vneseny do *E. coli* a to mělo za následek zvýšenou produkci N-acetylglukosaminu. Nadexprese *GNA1* genu měla významný dopad na syntézu aminocukřů v *E. coli*. Fosforylované aminocukře totiž způsobují inhibici řůstu. K potlačení inhibice byl využit protokol pro dvoufázovou fermentaci (řůstová fáze následována fází produkce.). Krok acetylace katalyzovaný *GNA1* vedl ke snížení intracelulárního GlcN-6-P a tedy ke zvýšení produkce N-acetylglukosaminu (110 g/l), což bylo cílem celé práce.

Vláknité houby jako zdroj

Vláknité houby jsou řiroce vyuřivané pro produkci prospěřných komerčních produktů, jakou jsou organické kyseliny, enzymy, antibiotika, statiny pro sniřování hladiny cholesterolu a jiných. Jsou téř ideálním zdrojem glukosaminu.

Vláknité houby mají schopnost tvořit tzv. pelety (morfolořický útvar). Byla provedena studie o vlivu velikosti pelety na produkci glukosaminu. Ve velkých peletách je doba transportu látky delří a dochází v nich k poklesu spotřeby substrátu. To vede k nižří koncentraci biomasy, ve srovnání s peletami o menřím průměřu. Vláknité houby obsahují v buněčné stěně chitin a chitosan, proto bylo nasnadě vyvinout metody k získávání glukosaminu i z těchto organismů. Pro produkci glukosaminu byl použit např. *Aspergillus sp.* BCRC 31742. Kultivace probíhala v třepacích lahvích (T-baňkách). Výsledkem práce bylo zjiřtění vhodných kultivačních podmínek pro co nejvyšří produkci glukosaminu. Ideální průměr pelety 2,15 mm,

s pracovním objemem 50 ml, 30°C inkubační teplota, třepání při 200 rpm a pH 7. Za těchto podmínek bylo získáno nejvíce biomasy a koncentrace glukosaminu 7,05 g/l. Jako vhodná stimulační látka byl vybrán metanol. Koncentrace získaného glukosaminu vzrostla na 7,48 g/l⁸.

Účinek glukosaminu v kvasinkách

Chondrocyty jsou buňky vyskytující se v chrupavkách. Energetické vlastnosti těchto buněk jsou omezené. To má za následek sniřenou mitotickou aktivitu a redukovanou buněčnou syntézu. Jak všichni víme, ve většině buněk je ATP obvykle produkováno mitochondriemi (oxidativní fosforylací) přes Krebsův cyklus. V chondrocytech je nízké množství mitochondrií, což vede i k nižřímu množství ATP. Při zánětu, který často osteoartritidu doprovází, jsou postiřeny právě mitochondrie. Následkem je omezení elektronového transportu a syntézy ATP. Vhodný model ve světě kvasinek představuje podrobně prostudovaná *Saccharomyces cerevisiae*. Umořňuje napodobit podmínky v chondrocytech „in situ“ a objasnit primární metabolický efekt chondroprotektivních látek. Byl testován vliv řítomnosti glukosaminu v médiu na řůst

buněk, buněčnou odpověď na metabolické stresy. Bylo zjiřtěno, ře glukosamin má pozitivní účinky na řůst buněk na minimálním mediu s glukosou i na minimálním mediu s glycerolem. Dále byl pozorován ochranný vliv obsahu buněk před kyselými podmínkami. Glukosamin měl přířivný vliv na buněčnou resistenci k řůzným stresům (etanol, tepelný stres...)⁹.

Diskuse

Pokud se pro člověka stane pohyb bolestivým, je to velmi nepřířejmné. Zná to asi každý z nás. Jednou z možných přířčin je osteoartritida, degenerativní onemocnění kloubní chrupavky. Jeden z mnoha preparátů, které mohou být při tomto onemocnění podávány, je právě glukosamin. Jeho výhodou je, ře není řkodlivý ani ve vysokých dávkách a zároveň jsou mu přiřítány pozitivní účinky při potlačování bolesti, bývá proto často doporučován jako doplněk stravy.

Chrupavky jsou tvořeny buňkami zvanými chondrocyty. Tyto buňky mají omezený energetický metabolismus. Jako vhodný model pro studium chondrocytů a vlivu glukosaminu na ně byla zkoumána *Saccharomyces cerevisiae*.

Je zapotřebí zajistit dostatečné množství glukosaminu. K jeho získání vede několik zcela odlišných cest. Jednou je kyselá hydrolyza z mořských koryřů, ale mnohem zajímavěřší je např. cesta vyuřivající metabolické inženýřství. Pomocí této metody byl u *E. coli* inaktivován gen účastnící se transportu a katabolismu glukosaminu a nadexprimován gen důleřitý pro syntézu

(*glmS*). Tyto kroky vedly k 15-ti násobnému zvýšení produkce glukosaminu, ale stále pouze v jednotkách miligramů. Problém s inhibicí *glmS* glukosamin-6-fosfátem se stal kritickým při regulaci syntézy. Jako ideální řešení byl za výsledný produkt vybrán N-acetylglukosamin, jehož přeměna na požadovaný glukosamin je jednoduchá a jeho výtěžek vysoký.

Literatura

1. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/ /hesla/aminocukry.html, staženo 2. listopadu 2011.
2. Deng MD, Severson DK, Grund DA, et al.: *Metab Eng* 7, 201 (2005).
3. http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/08-Sacharidy/08-Sacharidy.htm, staženo 2. listopadu 2011.
4. http://www.bodybuilding.cz/svajgl/trenink_pri_postizeni_osteoartritidou.html, staženo 1. listopadu 2011
5. <http://www.ulekare.cz/clanek/osteoartritida-1-dil-2585>, staženo 30. října 2011.
6. Anderson JW, Nicolosi RJ, Brozellaca JF: *Food Chem Toxicol.* 43(2), 87 (2005).
7. Sitanggang AB, Wu HS, Wang SS, Ho YC: *Bioresource Technol.* 101, 3595 (2010).
8. Deng MD, Wassink SL, Grund AD: *Enzym Microbial Technol.* 39, 828 (2006).
9. Dillemans M, Appelboom T, Nederveelde LV: *Biomedicine&Pharmacotherapy* 62, 645 (2008).

Souhrn

Vápeníková Z.: Mikrobiální produkce glukosaminu

Třetina lidí ve věku nad šedesát let trpí bolestmi kloubů, které jsou způsobeny onemocněním zvaným osteoartritida. Dochází u nich k degenerativnímu poškození chrupavky a následkem je bolestivý pohyb. Jedním z mnoha chondroprotektivních přípravků, které si můžete koupit v lékárně jako doplněk stravy, a měli by pomoci při potížích způsobených osteoartritidou, je glukosamin. Glukosamin může být získáván např. z mořských korýšů. Nevýhodou je, že ne všichni pacienti mohou takto získaný glukosamin užívat. Je proto nutno najít nové cesty pro získání glukosaminu v dostatečné kvalitě a množství. Vhodným zdrojem mohou být bakterie nebo vláknité houby.

Klíčová slova: glukosamin, N-acetylglukosamin, glukosaminsyntasa, osteoartritida

Summary

Vápeníková Z.: Microbial production of glucosamine

A third of people aged over sixty years are suffering from joint pain, caused by disease called osteoarthritis. By this people leads it to degenerative cartilage involvement and resulting in painful movement. One of the many chondroprotective products you can buy in pharmacies as a dietary supplement, and should help with symptoms caused by osteoarthritis, is glucosamine. Glucosamine can be extracted from shellfish. The disadvantage is that not all patients can use the following derived glucosamine. It is therefore necessary to find new ways to get glucosamine in sufficient quality and quantity. A good source can be bacteria or filamentous fungi.

Keywords: glucosamine, N-acetylglucosamine, glucosaminsyntase, osteoarthritis

BIOLOGICKÉ ODSTRAŇOVÁNÍ SULFANU Z BIOPLYNU

Zábranská Jana*, Pokorná Dana*, Siglová Martina**, Minařík Miroslav**

*Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT Praha, **EPS biotechnologie, s.r.o., Kunovice

Síra v jakékoli formě je nežádoucí složkou zemědělských a průmyslových odpadů, kalů a odpadních vod zvláště v případě, kdy předpokládáme jejich anaerobní zpracování, neboť z ní za těchto podmínek vznikají činnosti sulfát-redukujících bakterií (SRB) sulfidy a vznikající sulfan přechází do bioplynu. Vznikající sulfidy mohou v kapalné fázi ovlivňovat činnost acetogenních a metanogenních mikroorganismů v anaerobním konsorciu a způsobovat korozi betonových a ocelových konstrukcí a v plynné fázi snižovat životnost částí kogenerační jednotky. Spalováním bioplynu, ve kterém jsou vyšší koncentrace sulfanu, navíc vznikají exhalace SO_x. Proto je žádoucí sulfan z bioplynu před jeho energetickým využitím odstranit. V současné době jsou poměrně

dost rozšířené a již dlouho úspěšně aplikované chemické a fyzikálně-chemické metody, jejichž nevýhodou jsou však vysoké provozní náklady a produkce nežádoucích odpadních látek, které je nutno následně likvidovat. Proto je snaha nahradit tyto metody levnějšími bez nežádoucích vedlejších efektů. Dosavadní zkušenosti ukazují, že vhodnou alternativou k těmto procesům mohou být biologické metody založené na činnosti sirných bakterií. Zkušenosti s jejich aplikací potvrzují, že tato metoda je reálnou a čistou alternativou klasických chemických metod, vhodnou zejména pro nižší koncentrace sulfidické síry jak v plynech, tak v kapalinách. V poslední době se objevují i aplikace biologického odsiřování na vyšší koncentrace sulfanu a je zřejmé,

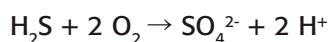
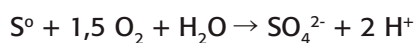
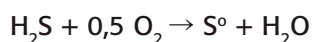
že siřné bakterie mají významný potenciál ve schopnosti adaptovat se na vysoké koncentrace sulfidické síry.

Mikrobiologie oxidace redukovaných sloučenin síry

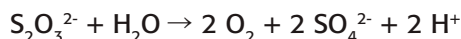
Biologické odstraňování sulfidů z kapalně nebo plyně fáze je založené na činnosti siřných bakterií – fotoautotrofních nebo chemolitotrofních, které jsou schopné oxidovat redukované formy síry v širokém koncentračním rozmezí a takto získanou energii využít pro svůj růst.

Fototrofní siřné bakterie tvořené zástupci purpurových siřných bakterií (*Allochromatium*, *Chromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thiorodococcus*, *Thiococcus*, *Thiocystis*, *Thiospirillum*,...) a zelených siřných bakterií (*Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Prosthecochloris*, *Pelodictyon* a *Ancalochloris*) nepředstavují významný potenciál pro jejich praktické využití.¹

Pro technologické účely biologického odstraňování sulfidů jsou nevhodnější chemolitotrofní siřné bakterie (*Thiobacillus*, *Sulfobolus*, *Thermothrix*, *Beggiatoa* a *Thiothrix*), známé také jako bezbarvé siřné bakterie, které jsou schopny růst na redukovaných anorga-



Meziprodukty oxidace sulfidů – thiosířany a polysulfidy – jsou tvořeny za podmínek vysokého zatížení a extrémnějších pH. Thiosířany se také mohou tvořit



Studium kinetiky odstraňování sulfidů v reaktoru s fluidním ložem s imobilizovanou kulturou *Thiobacillus denitrificans*^{4,5} potvrdilo, že konečný produkt oxidace sulfidů závisí na poměru rozpuštěného kyslíku a koncentrace přítomné sulfidické síry. Mikrobiální konsorcium, ve kterém převažoval *Thiobacillus*, oxidovalo sulfidy částečně na elementární síru při poměru koncentrace rozpuštěného kyslíku a sulfidů 0,5 – 1,5 a teprve poměr obou koncentrací 1,5 – 2,0 zajistil jejich úplnou oxidaci až na sířany. Ovšem v praxi je udržování stejného poměru kyslík/sulfidy poměrně obtížné, protože většinou se koncentrace sulfidů v čase mění. Mnohem přesněji může řídit oxidaci sulfidů udržování optimálního redox potenciálu⁶.

Produkováná elementární sířa

Bakterie typu *Thiothrix* nebo *Beggiatoa* akumulují elementární sířu v buňkách za podmínek přebytku sulfidů nebo nedostatku kyslíku, po vyčerpání sulfidů pokračují v oxidaci elementární sířy na sířanovou. Proto jsou tyto bakterie vhodné na příklad pro systémy, kde je biologická oxidace sulfidické sířy spojena s denitrifikací a žádaným oxidačním produktem jsou

nízkých siřných sloučeninách jako jsou sulfidy, sířa a thiosířany a v některých případech i na organických siřných sloučeninách jako je methanethiol, dimethylsulfid a dimethydisulfid.¹ Mají nejvyšší rychlosti oxidace sulfidů, skromné nutriční požadavky a extrémně vysokou afinitu k sulfidům a kyslíku, což jim dovoluje úspěšně soutěžit s chemickou oxidací sulfidů jak v přírodním prostředí, tak v bioreaktorech s limitovanou dodávkou kyslíku.²

Jednotlivé druhy bezbarvých siřných bakterií mají odlišné požadavky na pH a teplotu:

- rozsah hodnot pH je pro tento typ siřných bakterií poměrně velký: pH 1 – 9 s optimem pro většinu druhů 6,5 – 7,5.

- v případě teploty je možno říct, že většina siřných bakterií je mezofilních, ale některé druhy rodu *Sulfobolus*, *Acidianus* a *Thermothrix* mohou růst i za termofilních podmínek.³

Důležité reakce chemolitotrofní oxidace sulfidů, sířy a thiosířanů představují následující rovnice (rov. 1 – 4), z nichž je patrné, že univerzálním elektronovým akceptorem je pro bezbarvé siřné bakterie kyslík.



chemickou oxidací (autooxidací) sulfidů a polysulfidů za alkalických podmínek⁷ a dále pak mohou být bakteriální činností oxidovány až na sířany.



sířany, které pokračují dále ve vodní lince čištění odpadní vody.⁹

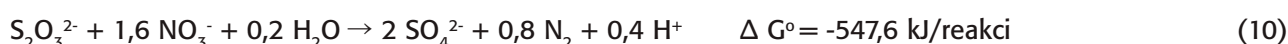
Pokud chceme ze systému sířu odstraňovat a dále ji využívat (např. jako hnojivo) jsou nevhodnější bakterie typu thiobacilů, které vylučují vyprodukovanou sířu vně buňky ve formě malých částic, které se mohou shlukovat do agregátů, dosahujících velikosti až 3 mm. Biologicky vytvořená sířa však má na rozdíl od anorganické sířy hydrofilnější charakter a může být dispergována do vodního roztoku. To může vést k tvorbě stabilní pěny, jejíž výška se rychle zvyšuje. Tato pěna může vzniknout v případě vyšší koncentrace sířy a vyšší koncentrace dodávaného kyslíku, kdy se místní koncentrace sířy blízko povrchu kapaliny blíží její kritické koncentraci, což vede ke tvorbě stabilní sířové struktury. Vzniká povrchový film, který zabraňuje praskání vzduchových bublin, které se dostaly k povrchu, ty se spojují a přispívají ke zvyšování výšky nestabilní pěny. Tento problém se projevuje zvláště u bioreaktorů, které pracují s biomasou v suspenzi. Antipěnicí účinky mohou vykazovat polysulfidy a to tím, že dokážou změnit povrchové vlastnosti biologicky produkované sířy, nebo tím, že chemickou oxidací dokážou tvořit hydrofobní elementární sířu.⁸

Některé druhy bezbarvých sírných bakterií mohou za anaerobních podmínek využívat jako konečný akceptor elektronů dusičnan, příp. dusitany. Koneč-

nými produkty oxidace redukované síry v tomto případě mohou být síra a sírany na jedné straně a dusitany a plynný dusík na straně druhé (rov. 5 – 9).



V přítomnosti dusičnanů může probíhat za anaerobních podmínek rovněž oxidace thiosíranů (rov.10).¹⁰



Technologická řešení biologické oxidace sulfanu

Vzhledem k tomu, že se v bioplynu může vyskytovat sulfan i v koncentracích od 500 ppmv do 20 000 ppmv (2%), je nutné hledat biologické metody, které jsou schopné jej odstraňovat v jeho širokém koncentračním rozmezí. Dlouhodobě jsou používány pro odstraňování sulfanu z plynů biofiltry, biopračky i biosprchy. Pro vysoké koncentrace sulfanu v plynech je však zatím vyvinuto jen málo typů provozně aplikovatelných zařízení, které byly vyvinuty speciálně pro odsiřování energetických plynů jako jsou bioplyny nebo jiné topné plyny – proces Thiopaq (Paques, Nizozemí) a Biopuric Proces (Biothane, USA).

Pro uspořádání odsiřovacího zařízení je rozhodující, zda se sírné bakterie nachází ve formě suspenzní kultury nebo jako nárůstová kultura ve formě biofilmu na vhodném nosiči. V obou případech je nutné vzít na zřetel, že sírné bakterie jsou schopné fungovat pouze ve vodném prostředí, takže je nutné i imobilizovanou kulturu, v případě odstraňování sulfanu z bioplynu v biofiltru, zkrápět.

Mikroaerace

V řadě zařízení produkujících bioplyn se zvýšenou koncentrací sulfanu se používá k jeho odstranění metoda mikroaerace, která spočívá v řízeném dávkování vzduchu přímo do plynového prostoru anaerobního reaktoru tak, aby sírné bakterie oxidovaly sulfan na elementární síru, kterou je možno odvést spolu s digestátem ze systému.¹¹ Dávka kyslíku musí být regulována tak, aby došlo k oxidaci sulfanu, ale aby přítomnost kyslíku nesnižovala výtěžnost metanu. Tato metoda je vzhledem k jednoduché realizovatelnosti a nízkým provozním a investičním nákladům vhodnou alternativou chemických metod, vhodnou zejména pro nižší koncentrace sulfidické síry v plynech, protože při vyšších koncentracích sulfanu by nutná větší dávka vzduchu mohla způsobit naředění bioplynu dusíkem.

Externí odsiřování suspenzní kulturou sírných bakterií

Na rozdíl od mikroaerace je v případě externího odsiřování oxidován sulfan přítomný v bioplynu vně anaerobního reaktoru, takže anaerobní prostředí reaktoru není kontaminováno kyslíkem a vznikající bioplyn, zvláště v případě vyšších koncentrací sulfanu v bioplynu, zředován dusíkem.

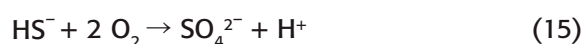
Prvním krokem při externím odsiřování bioplynu je absorpce sulfanu do alkalické vypírací kapaliny (rov. 11) a to nejen v případě suspenzního bioreaktoru, ale i v případě biofiltrů. Absorpční kapalina je vysoce pufrována HCO_3^- a CO_3^{2-} (rov. 12 a 13), a proto nedochází k výkyvům pH při spotřebě NaOH.



V druhém kroku se musí tato kapalina dostat do kontaktu s kulturou sírných bakterií, která sulfidickou síru v přítomnosti limitované dodávky vzduchu oxiduje na elementární (rov. 14).



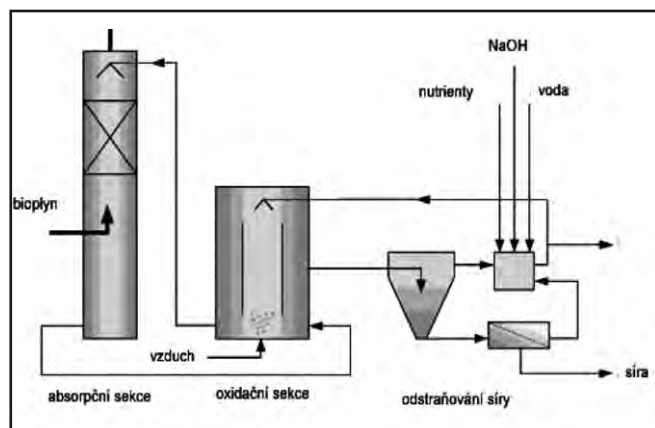
Pokud je v systému přebytek kyslíku, nastává tvorba síranů a s tím spojená nežádoucí acidifikace systému (rov.15).



Potom je třeba neutralizovat medium a vyrovnat koncentraci Na^+ iontů. V provozním měřítku se samozřejmě nelze vyhnout oxidaci části sulfidické síry až na sírany spojené s acidifikací, k čemuž dopomáhá i abiotická oxidace, která vede k tvorbě thiosíranů.

Proto musí být část absorpční kapaliny doplňována NaOH.

Tyto dva stupně procesu, absorpce i oxidace, mohou probíhat simultánně v jednom reaktoru nebo odděleně ve dvou zařízeních – pračce plynu a bioreaktoru (obr. 1).



Obr. 1: Schéma technologické linky biologické oxidace sulfidů¹²

Pokud proces probíhá v jednom zařízení – absorpce sulfanu z bioplynu i přívod vzduchu nebo kyslíku, je to jednodušší na provedení, tím i investiční náklady jsou menší, ale systém je velice náročný na řízení. Je potřeba dodávat jen takové množství vzduchu, které by bylo spotřebováno na oxidaci sulfidů, a eventuální přebytek neznečišťoval bioplyn. V každém případě je ve vyčištěném bioplynu více dusíku. Konstrukce reaktoru musí být uzpůsobena udržení biomasy sírných bakterií v reaktoru a průtočné rychlosti plynů musí vyhovovat kinetice jak absorpce, tak rychlosti oxidace sulfidů. Při kolísavé koncentraci sulfidů v plynu je možno provoz reaktoru efektivně řídit pomocí ORP spojeného s dodávkou vzduchu.

Rozdělení technického řešení do dvou stupňů přináší vyšší investiční náklady, ale každé zařízení je možno optimalizovat podle potřeb příslušného procesu, absorpce jako fyzikálně-chemický a chemický proces může probíhat velmi rychle, zařízení je menší a nedochází ke kontaminaci čištěného plynu ani kyslíkem ani dusíkem, navíc je z něj v případě bioplynu vypírán CO_2 , což je výhodné pro energetické využití. Aktivita sírných bakterií je závislá na teplotě a rychleji probíhá při 30 až 40 °C, takže je možno bioreaktor ohřívat, zatímco zvýšená teplota snižuje schopnost absorpce.

Jeden z prvních plnoprovozních bioreaktorů pro oxidaci síry byl realizován v Industriewater Eerbeek B. V. v Nizozemí, kde sloužil k odsíření bioplynu. Schéma technologické linky je na obr. 1. Průtok bioplynu byl 460 Nm^3/h a koncentrace sulfanu v bioplynu kolísala mezi 0,8 a 1,2 % v/v s koncentrací metanu kolem 80 %.

Externí odsiřování – zkrápěné biofiltry

Práce s biomasou v suspenzi může vést k vyplavování mikroorganismů z reaktoru, v některých případech i k tvorbě nežádoucí pěny. Proto je vhodné používat

imobilizovanou biomasu na různých typech nosiče. Tento způsob je možno volit nejen v biofiltrech, ale i v reaktorech s fluidním ložem.

Bioplyn je veden spolu s kyslíkem do části biofiltru s imobilizovanou biomasou, která je zkrápěná absorpční kapalinou s nutrienty. Tam dochází k absorpci sulfanu do kapaliny a následné biologické oxidaci imobilizovanou kulturou.

Pro udržení dostatečné koncentrace biomasy sírných bakterií v reaktoru se většinou používá nějaký materiál jako nosič a to jak v případech simultánní, tak v oddělené biooxidaci. Nosiče biomasy mohou být jak ve fluidních reaktorech tak v biofitrech, kde je náplň pevná. Jako nosiče biomasy byly zkoušeny různé materiály, společný požadavek na nosiče je dostatečná pórovitost, aby dobře probíhala imobilizace sírných bakterií, ale nevhodné jsou nosiče s tendencí k ucpávání. Vyprodukovaná elementární síra by se měla jednoduchou manipulací oddělit od kultury a odstranit ze systému.

Popsané a vyzkoušené materiály jsou na příklad porézní láva. Cho a kol. zkoušeli různé vzorky lávy a dostali podle porozity následující rychlosti odstraňování sulfidů: 396, 157 a 342 $\text{g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$ S^{2-} s imobilizovaným *Thiobacillus thiooxidans*.¹³ Další autoři zkoušeli čtyři typy anorganických nosičů, porézní keramiku, kalcinovaný cristobalit a obsidián a kalcinovanou a granulovanou zeminu. V mnoha případech se můžeme setkat s nosičem z polyuretanové pěny, bližší informace jsou zřídka dostupné, je to otázka patentů nebo individuálně připravených vzorků pro výzkum. Častý materiál je také aktivní uhlí v různých formách¹⁴, někdy i použité v jiných procesech.

Tlaková ztráta a rychlost proudění plynu jsou důležité parametry v určení provozních nákladů.¹⁴ Rychlost plynu se zvyšovala postupně od 20 do 200 h^{-1} při konstantní teplotě 30°C. Tlaková ztráta vzrůstala lineárně od 11,9 do 45,2 mm vodního sloupce. Reaktor s granulovaným aktivním uhlím vykazoval dobrý stav vzhledem ke zvyšování tlakové ztráty, protože má velký objem pórů a jednotný specifický povrch, takže žádná významná akumulace biomasy, která by zpomalovala růst *Thiobacillus denitrificans* se neprojevila. Aktivní uhlí slouží zároveň jako vyrovnávací medium při nárazovém zvýšení zatížení biofiltru, protože dokáže nasorbovat H_2S a při nižším zatížení ho uvolňovat sírným bakteriím k dispozici. Nárazové změny od 60 do 110 mg/l po dobu 3 hodin, potom znovu na 60 mg/l , neovlivnily nízkou koncentraci výstupu (10 – 20 mg/l). Doba zdržení plynu má podstatný vliv na účinnost při dosažení limitní kapacity bioreaktoru. Vysoká účinnost byla dosažena při době zdržení 50 – 25 s, při dalším zkracování se snižovala.

Thiobacillus thiooparus CH11 byl imobilizován v Ca-alginátu a vykazoval uspokojivé výsledky s účinností 98 % a zatížením 23 $\text{g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$ S^{2-} .¹⁵ Podobnou techniku použili při imobilizaci v PVA ve formě krychliček, maximální degradační kapacitu

dosáhli 8 g/(m³.h) při nezmenšené účinnosti 99 %. V tomto případě imobilizovali směsnou kulturu z aktivovaného kalu selekčně obohacenou 30denní předkultivací v sulfidovém mediu.¹⁶

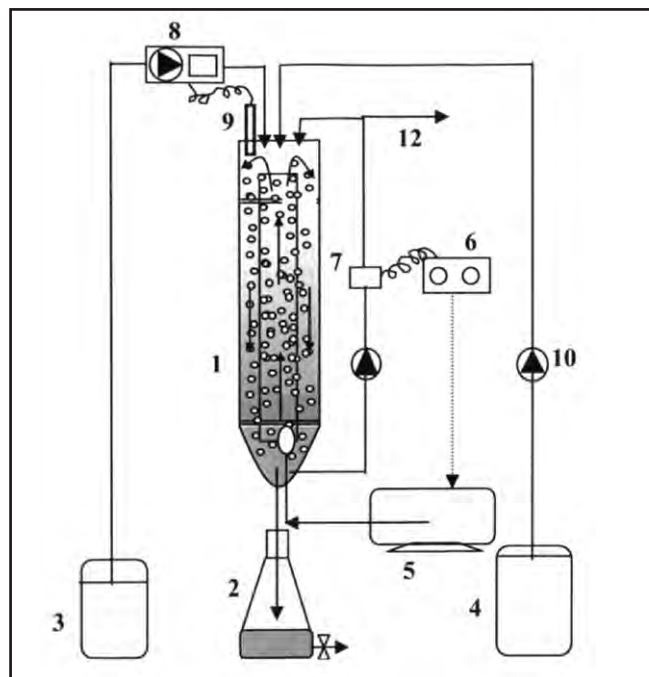
Buisman et al.¹⁷ zkoušeli systém biologické oxidace sulfidů ve třech typech reaktorů – CSTR, biorotor s horizontální klecí na nosič a probublávaná vertikální kolona. Jako nosiče do biorotoru zkoušeli polyuretanové krychličky 1,5 x 1,5 x 1,5 cm s 30ti póry na palec a specifickým povrchem 1375 m²/m³. Dalším nosičem byly Raschigovy kroužky – válečky o průměru 5 cm a výšce 3 cm. Povrch jednoho kroužku byl asi 180 cm². CSTR měl objem 8,3 l a 400 polyuretanových krychliček, biorotor měl 3 l mokrého objemu a v kleci z nerezové oceli bylo 640 polyuretanových částic. Klec byla ponořena z 50 %, plynový prostor byl vzduch pro oxidaci. Kolonový reaktor měl objem 20 l, (20 cm průměr a výška 87 cm) pracoval jako ponořený filtr s 2600 polyuretanovými částicemi. Hydraulika reaktorů byla stanovena s NaCl stopovačem s vodivostním měřením na výstupu. Tok byl charakterizován počtem ideálně míchaných reaktorů v sérii, pro kolonu bylo stanoveno $n = 2,1$, pro biorotor s polyuretanovou pěnou 3,7 a s Raschigovými kroužky 2,5.¹⁸ Kapacitu v odstraňování sulfidů zjistili z koncentrací sulfidů v přítoku a koncentraci sulfidů, sulfátů a thiosulfátů v odtoku po ustálení poměrů po změně zatížení sulfidy, což bylo 6 dní. Doba zdržení pro biorotor a kolonu byla 13 minut, pro CSTR 22 minut. U kolony a biorotoru existuje průtočný gradient v polovině průtočného profilu je koncentrace již jen kolem 10 % vstupu, počáteční koncentrace sulfidů byla 100 mg/l, HRT 13 min a pH 8,5. Autoři již v předchozích pracích uváděli, že vysoká koncentrace sulfidů inhibuje oxidaci až na sírany. Kapacita jednotlivých reaktorů byla 4,2, 4,6 a 5,1 mgS²⁻/((částice nosiče.hod), objemová rychlost 203, 492 a 662 mgS²⁻/(l.hod), účinnost byla 87, 96 a 95 %. Vyšší rychlost a vyšší účinnost u reaktorů s postupným tokem vysvětlují gradientem koncentrace sulfidů, při vyšší je i rychlost oxidace vyšší.

Také je velice důležitá biologická aktivita kultury sírných bakterií a její náchylnost k inhibičnímu působení vyšší koncentrace sulfidů. Pro všechny organismy se uvádí inhibiční konstanta (koncentrace, při které je specifická rychlost růstu poloviční než maximální) 60 – 120 mg/l S²⁻. Dvě použité kultury v experimentu Baspinara¹⁹ se velice lišily limitní koncentrací, kdy začala působit inhibice, reaktor pracující při nižších provozních koncentracích sulfidů (7 mg/l) vykazoval inhibiční konstantu 100 mg/l, zatímco bakterie v reaktoru pracujícím při 94 mg/l nevykazovaly žádný inhibiční efekt do koncentrace 600 mg/l S²⁻.

Fluidní reaktor s nosičem biomasy

Další možností, jak zafixovat biomasu uvnitř reaktoru je její imobilizace na drobný nosič ve fluidním reaktoru. Fluidní reaktor s interní cirkulací, ve kterém byly jako nosič použity 1mm částice extrudovaného nízkohustotního polyetyleny (990 kg/m³) s porcelánovou hlinou

s převažujícím *Thiobacillem denitrificans*, v imobilizované biomase je na obr. 2.¹²



Obr. 2: Schéma fluidního reaktoru s interní cirkulací (1 – reaktor, 2 – akumulární nádrž na síru, 3 – zásoba kyseliny, 4 – zásoba vstupní sulfidické kapaliny, 5 – vzduchový kompresor, 6 – řízení ORP, 7 – sonda ORP, 8 – řízení pH, 9 – sonda pH, 10 – dávkovací čerpadlo, 11 – čerpadlo recykluj, 12 – odtok)

Tubulární reaktor měl uvnitř další trubku, ke spodu které byl přiváděn vzduch. Aerační režim vytvářel vzestupné proudění ve vnitřní trubici a sestupné v prostoru mezi trubkami. Proudění bylo dostatečné na udržení částic nosiče s biofilmem ve vznosu. Fluidní reaktor s interní cirkulací byl vybaven nosičem biofilmu, který tvořily částice extrudovaného nízkohustotního polyetyleny s porcelánovou hlinou. Měly asi 1 mm v průměru a hustotu 990 kg/m³. Vstup sulfidické kapaliny byl svrchu reaktoru, vzduch byl dodáván jemnobublinným aerátorem na spodu reaktoru. Reaktor byl monitorován ORP sondou v recirkulačním proudu, požadovaný redox potenciál byl udržován regulací dodávky kyslíku do reaktoru. PH bylo také regulováno, při změně pH dodávalo zařízení 1N HCl. PH sonda byla přímo v reaktoru, aby byla odezva co nejkratší. Produkovaná síra se usazovala u dna reaktoru a byla z usazovací nádoby odstraňována.

Konstrukce reaktoru umožnila udržet aktivní biofilm bez ucpávání a výborný přenos z plynu do kapaliny a do biofilmu. Tubulární reaktor měl uvnitř další trubku, ke spodu byl přiváděn jemnobublinným aerátorem vzduch. Aerační režim vytvářel vzestupné proudění ve vnitřní trubici a sestupné v prostoru mezi trubkami. Proudění bylo dostatečné na udržení částic nosiče s biofilmem ve vznosu. Reaktor byl monitorován ORP (– 350 až – 400 mV) a pH sondou (pH 8). Produkovaná síra se usazovala u dna reaktoru a byla z usazovací nádoby odstraňována, což snižovalo možnost její další oxidace na sírany nebo tvorbu polysul-

fidů. Počáteční zatížení sulfidy bylo postupně zvyšováno z 2,1 kg/(m³.d) až na 20,5 kg/(m³.d) regulací rychlosti přítoku za konstantní koncentrace dávkovaných sulfidů. Do zatížení sulfidy 19 kg/(m³.d) byla účinnost téměř 100% a 80 % odstraněné síry se oxidovalo na elementární síru a pouze 3 % na sírany. Nad zatížení sulfidy 22 kg/(m³.d) se účinnost snižovala, pravděpodobně i vlivem toxicity sulfidů. Při zatížení 30 kg/(m³.d) klesla účinnost na 90 %, zvýšila se koncentrace thiosíranů (na 15 – 8 %) a v médiu se začaly objevovat polysulfidy. To znamená, že při nízkém zatížení biomasy sulfidy a nekontrolované dodávce vzduchu se převažující podíl oxidované síry vyskytuje ve formě síranů, naopak při vysokém zatížení biomasy klesá biologická aktivita sírných bakterií, zvyšuje se podíl chemické oxidace a tvorba thiosíranů a polysulfidů. *T.denitrificans* zvládal adaptaci na vysoká zatížení sulfidy a je považován za vynikajícího kandidáta na bioreaktory pro odstraňování sulfidů. Ukázalo

se, že tento reaktor může pracovat při mnohem vyšším zatížení, než doposud známé reaktory, neboť produkováná síra je efektivně odstraňována ze systému a je výhodný pro kumulaci sírných bakterií v biofilmu.

Závěr

Biologické odsiřování je vhodnou alternativou k běžně používaným chemickým a fyzikálně-chemickým metodám, neboť je ekonomicky i ekologicky výhodnější. Chemolitotrofní sírné bakterie, pomocí jejichž metabolismu je sulfidická síra přeměňována na oxidovanou formu síry – elementární síru resp. sírany, podle množství dodávaného oxidačního činidla, mají významný potenciál adaptovat se na široké rozmezí koncentrace sulfidů.

Žádoucím konečným produktem biologické oxidace je elementární síra, kterou lze ze systému odstranit a dále využít např. při výrobě hnojiv nebo v chemickém průmyslu při výrobě kyseliny sírové.

Tento příspěvek vznikl v rámci řešení grantu FR-TI1/327 Ministerstva průmyslu a obchodu.

Literatura

1. Madigan MT, Martinko JM.: *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, (2006)
2. Janssen AJH, Lens PNL, et al.: *Sci. Total Envir.* 407(4), 1333 (2009).
3. Tang K, Baskaran V, Nemat M.: *Biochem. Eng. J.* 44, 73 (2009).
4. Annachatre AP, Suktrakoolvait S: *Environ.Technol.* 22, 661 (2001).
5. van der Zee FP, Villaverde S, Garcia PA, Fdz-Polanco F: *Biosourc. Technol.*, 98(3), 518 (2007).
6. Janssen AJH, Meijer S, Bontsema J, Lettinga G: *Biotechnol. Bioeng.* 60(2), 147 (1998).
7. Steudel R: *Ind. Eng. Chem. Res.* 35, 1417 (1996).
8. Kleinjan WE, Marcelis CLM, de Keizer A, et al.: *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 275, 36 (2006).
9. Baspinar AB, Turker M, et al.: *Process Biochemistry. In Press, Corrected Proof.* (2011).
10. Cardoso RB, Sierra-Alvarez R, Rowlette P, et al.: *Biotechnol. Bioeng.* 95, 1148 (2006).
11. Jeníček P, Šmejkalová P, Zábranská J, et. al.: *Vodní hospodářství* 55(11), 331 (2005).
12. Krishnakumar BS, Majumdar, et al.: *Wat. Res.* 39(4), 639 (2005).
13. Cho K, Ryu HW, Lee NY: *J. Biosci. Bioeng.* 90, 25 (2000).
14. Jiang X, Yan R., et al.: *Chemosphere* 73(5), 698 (2008).
15. Ma Y, Zhao J, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57(2), 93 (2006).
16. Chung Y-C, Huang C, et al.: *J. Biotechnol.* 52(1), 31 (1996).
17. Buisman C, Uspeert P, et al.: *Wat. Res.* 24(5), 667 (1990).
18. Ji G, Liao B, et al.: *Bioresource Technol.* 100(21), 5056 (2009).
19. Baspinar AB, Turker M, et al.: *Process Biochemistry. In Press, Corrected Proof.*

Souhrn

Zábranská J., Pokorná D., Siglová M., Minařík M.: Biologické odstraňování sulfanu z bioplynu

Sulfan je nežádoucí složkou bioplynu z mnoha důvodů – toxicita, inhibice mikrobiální kultury v anaerobních reaktorech, korozivní účinky a produkce SO_x ve spalínách. Je proto nutné jej před energetickým využitím bioplynu odstranit. Mezi významné metody odsiřování se v poslední době dostávají stále více metody biologické, u kterých na rozdíl od konvenčních metod chemických a fyzikálně-chemických nevznikají problematické vedlejší produkty a jsou z hlediska investičních a provozních nákladů výhodnější. Biologický způsob odstraňování sulfanu z bioplynu je založen na činnosti sírných bakterií, které jsou schopné oxidovat sulfidickou síru a adaptovat se i na vysoké koncentrace sulfanu. Technologická uspořádání biologické oxidace sulfanu se liší hlavně ve formě použité biomasy – suspenzní nebo imobilizovaná kultura. Účinnost procesu závisí na mnoha faktorech, jako je poměr sulfidů a rozpuštěného kyslíku, teplota či pH, proto je nutné při řízení procesu udržovat technologické parametry v optimálním rozmezí.

Klíčová slova: sulfan, bioplyn, biologické odsiřování, sírné bakterie

Summary

Zábranská J., Pokorná D., Siglová M., Minařík M.: Biological removal of hydrogen-sulfide from biogas

Hydrogen-sulfide is an undesirable component of biogas for many reasons – toxicity, inhibition of microbial culture in anaerobic digesters, corrosive effects and production of SO_x in the flue gases. Its removal from biogas prior energetic utilization is therefore required. Biological desulfurization methods demand lower investment and operation costs compare to conventional chemical and physical-chemical processes. Methods of biological oxidation of hydrogen sulfide are based on the activity of sulfur bacteria that are able to oxidize sulfides and adapt to high concentrations of them. Technological configurations of the process differ mainly in the form of biomass used – bacterial culture in suspension or immobilized. The process efficiency depends on many factors such as the ratio of sulfides and dissolved oxygen, temperature and pH, consequently it needs proper technological process control.

Keywords: hydrogen-sulfide, biogas, biological desulfurization, sulfur bacteria

ANTIMIKROBIÁLNÍ A IMUNITU OVLIVŇUJÍCÍ PEPTIDY V PROTEKCI INFEKČÍ

Michaela Hradecká

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, HradeckM@vscht.cz

Úvod

První obranná bariéra, na kterou narazí patogen při napadení organismu, je vrozený imunitní systém. Řadí se tak mezi základní homeostatické mechanismy organismů. Je tvořen kůží, epiteliálními vrstvami, sekrety žláz, pohyby řasinek, kyselým pH v gastrointestinálním traktu a samozřejmě též vlastními mechanismy imunitního systému.^{1,2} Je nespecifický a evolučně starší než adaptivní imunitní systém. Tvoří ho část buněčná (fagocytující buňky, cytotoxické NK-buňky) a humorální (komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny). Imunitní odpověď se dostavuje zpravidla do několika minut nebo hodin. Tento druh imunitního systému zprostředkovává produkci antimikrobiálních peptidů.³

Naproti tomu adaptivní imunitní mechanismy jsou evolučně mladší a dokonce známé až u obratlovců. Representují ho složky buněčné (založené především na výběru specifických B- a T-lymfocytů) a humorální (protilátky). Chrání organismus až po plném rozvinutí imunitní reakce, což nastává po několika dnech nebo týdnech. Na rozdíl od vrozeného imunitního systému disponuje adaptivní mechanismus imunologickou pamětí.

Vrozený imunitní systém

Klíčovým principem vzniku imunitní reakce vrozeného imunitního systému je rozpoznání patogenního mikroorganismu prostřednictvím vazby tzv. molekulárních vzorů spojených s patogeny (PAMPs = pathogen-associated molecular patterns) na receptory rozpoznávající patogen (PRRs = pathogen recognition receptors), jako jsou například Toll-like receptory (TLRs). Zásadní je též vlastní zajištění mechanismu, jenž by mikroby ničil.⁴

Lidské TLRs jsou strukturně příbuzné Toll-like receptorům octomilky, jedná se o savčí homology.⁴ Členové TLR rodiny jsou charakterizovány přítomností extracelulárních domén bohatých na leucin a vysoce konzervovaných intracelulárních Toll/Interleukin (IL)-1 recep-

torových domén. Extracelulární část je zodpovědná za vlastní specifickou vazbu ligandu na receptor, intracelulární zajišťuje přenos signálu.⁴

PAMPs jsou molekuly zcela nezbytné pro přežití daného mikroorganismu nebo pro jeho patogenitu.⁴ Mezi typické příklady PAMPs patří lipopolysacharidy Gram-negativních (G⁻) bakterií, teichoová kyselina a peptidoglykan Gram-positivních (G⁺) bakterií nebo mannany kvasinek či hub.⁴

Mezi efekторы vrozeného imunitního patří antimikrobiální peptidy (AMPs) a proteiny jako například cytokiny. Ve zdravém organismu pracuje vrozený imunitní systém na základní úrovni a po průniku patogenu dochází ke zvýšené expresi látek podílejících se na imunitní odpovědi.⁵

Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMPs) jsou obecně malé (20 – 60 aminokyselin), pozitivně nabitě, a tedy polární (díky přítomnosti lysinových a/nebo argininových residuí), a amfipatické molekuly (obsahují jak hydrofilní, tak i hydrofobní domény).^{2,5}

Právě poslední vlastnost jim dovoluje dosáhnout vysoké koncentrace jak ve vodném prostředí, tak i na membráně. AMPs interagují s negativně nabitými částmi buněčných membrán mikrobů a jsou schopné je během několika vteřin zničit.^{4,5}

Jsou produkovány fagocytickými a všemi epiteliálními buňkami, které se dostanou do kontaktu s patogenem. Některé AMPs jsou produkovány konstitutivně, jiné se exprimují až po poranění organismu nebo po setkání s mikroorganismem.⁵

Cílové místo působení AMPs podléhá jejich specifitě vůči jednotlivým mikrobům a je dáno rozdílem v lipidovém složení mikrobiálních a lidských membrán.⁴ Důvodem je totiž skutečnost, že bakterie nebo houby mají plasmatickou membránu, která obsahuje fosfolipidy s negativně nabitými hlavicemi převážně na vnější straně. Naproti tomu buňky mnohobuněčných organismů včetně člověka jsou pokryté mem-

bránami s fosfolipidy, avšak polární hlavice mají sklon segregovat na vnitřní stranu. Navíc tato membrána obsahuje i určité množství cholesterolu. Vazba AMPs na bakteriální nebo fungální membránu je tedy na základě elektrostatických a hydrofobních interakcí silnější než hydrofobní vazba na membránu mnohobuněčných organismů.⁵

Například AMPs vytvářené na kůži poskytují v rámci zabránění vniku mikroorganismů jakousi rozpustnou bariéru. V případě infekce, zánětu nebo poranění dochází ke zvýšené produkci AMPs keratinocyty a jejich ukládání vlivem degranulace neutrofilů.⁴

Struktura:

Antimikrobiální peptidy vznikají jako tzv. prepropeptidy, které obsahují specifickou N-koncovou část, pro-segment a C-koncovou část. N-terminální část je zodpovědná za cílení preproteinu do endoplasmatického retikula. Naproti tomu C-koncová část má po štěpení vlastní antimikrobiální aktivitu. Pro-segment je často záporně nabitý a má několik biologických funkcí – jednak řídí správné sbalování C-terminální části a ovlivňuje její pohyb uvnitř buňky, a jednak též může inhibovat aktivitu zralého peptidu. Propeptid je štěpen během poslední fáze intracelulárních úprav nebo po uvolnění do extracelulárního prostoru.⁶

AMPs jsou skladovány jako propeptidy nebo jako zralé kladně nabitě C-koncové části propeptidu.⁶ AMPs se dělí podle několika kritérií – dle velikosti, struktury nebo dle aminokyselinové sekvence.

Podle 3D struktury je můžeme rozdělit do tří základních skupin: lineární a α -helikální peptidy bez cysteinů (kam patří například cathelicidin LL-37/hCAP18), peptidy s cysteiny a disulfidovými můstky (kam bychom mohli zařadit třeba defensiny, porciny) a peptidy s neobvykle velkým množstvím jedné nebo dvou aminokyselin.⁶ Další kritérium dělení je na základě jejich strukturních motivů – defensiny, cathelicidiny, histatiny⁶

Spektrum účinku:

Na základě pokusů, během nichž byly antimikrobiální peptidy izolovány převážně z vyšších organismů a následně charakterizovány, bylo zjištěno jejich široké spektrum účinku v boji proti mikroorganismům, mezi něž můžeme zahrnout Gram-positivní a Gram-negativní bakterie, houby, kvasinky a některé viry. Navíc bylo zjištěno, že některé AMPs vykazují inhibiční aktivitu i proti některým obaleným virům, čímž se podporuje teorie o afinitě AMPs se složkami membrány patogenu. AMPs uplatňují svůj vliv i v dalších krocích životního cyklu virů, jako je vstup do buňky nebo replikace virového genomu.¹

Kromě AMPs, které ničí mikroby prostřednictvím útoku na jejich membránu, byly objeveny i nemembránové rozkladné peptidy, které se účastní vnitřních dějů od inhibice syntézy makromolekul ke ztrátě ATP z aktivně respirujících buněk.¹

Antimikrobiální peptidy se nepodílí jen na vlastním ničení mikroorganismů, ale vykazují i další, možná překvapivé, aktivity.

Protinádorová aktivita: Obecně známá teorie o mechanismu působení AMPs je taková, že interagují s negativně nabitými částmi membrán. Nádorové buňky se mohou lišit co do složení od normálních, zdravých. Zjistilo se totiž, že membrána melanomové nebo karcinomové buňky obsahuje 3-7x více fosfatidylserinu než normální keratinocyt. Tyto rozdíly pak mohou vést k vyšší afinitě AMPs k membráně tumorové buňky a následně k její permeabilizaci. Byla objevena skupina kationických peptidů, tzv. magaininy, izolovaných z kůže obojživelníků, které byly schopny lysovat několik typů buněk v koncentraci 5-10x nižší, než jaká je vhodná pro normální buněčnou lysi. Magaininy se dnes produkují i synteticky.²

Mitogeny: První zmínka o tom, že by antimikrobiální peptidy mohly mít i mitogenní aktivitu, se objevila v roce 1993. Defensiny totiž mohou hrát při poranění kůže dvojí roli – kromě ochrany proti mikrobům se podílí i na procesu hojení tím, že podporují růst fibroblastů a epitelálních buněk. Byly zkoumány různé tkáně, a to jak plicní (u nichž se zjistil vliv defensinů na proliferaci epitelálních buněk), tak zdravé ledvinné a dokonce i buněčné linie karcinomu ledvin. Na základě pokusů *in vitro* bylo zjištěno, že α -defensiny pravděpodobně hrají roli v proliferaci buď normálních nebo tumorových buněk ledvin.²

Signální molekuly: Další funkce antimikrobiálních peptidů je modulace a přenos signálu. α -defensiny jsou potenciální inhibitory PKC (protein kinasa C), ale nemají téměř žádný nebo vůbec žádný efekt na aktivitu MYLK (myosin light-chain kinasa) a PKA. Specifita inhibice kinasové aktivity tedy umožňuje pohlížet na AMPs jako na molekuly, které se začleňují do cesty přenosu signálu.²

Spojník vrozené a adaptivní imunity: AMPs jsou též klasifikovány jako efektorové molekuly vrozeného imunitního systému, neboť kromě vlastní antimikrobiální aktivity dokážou modulovat další komponenty imunitního systému. Defensiny a PR-39 například přímo zvyšují činnost vrozeného imunitního systému, neboť fungují jako chemoatraktanty pro monocyty a neutrofilů. Defensiny navíc ovlivňují produkci cytokinů – v monocytech se produkuje TNF- α , IL-1 a v plicích se zvyšuje produkce IL-8.²

Defensiny využívají svou chemotaktickou aktivitu nejenom nespecificky vůči fagocytům, ale také specificky vůči buňkám adaptivního imunitního systému. Indukují totiž migraci nativních T-buněk a nezralých dendritických buněk. Defensiny se též používají jako adjuvanty, zvyšují tedy antigen-specifickou imunitní odpověď produkcí lymfokinů.²

Mechanismus:

Přesný mechanismus, jak AMPs ničí patogenní mikroorganismy, ještě není přesně známý, ale předpokládá

se, že AMPs umí tvořit póry v mikrobiálních membránách, a způsobí tak jejich lysi.⁴

Navržený model zahrnuje několik fází.

Atraktivita: Prvním krokem je jakési vzájemné přitahování obou komponent, které je dáno nábojem a amfipatickým charakterem peptidů. Předpokládá se, že se AMPs v případě bakteriální infekce navážou na negativně nabitě části membrány (jako jsou lipopolysacharidy a anionické lipidy u G^- bakterií a kyselina teichoová u G^+ bakterií) s vyšší afinitou než nativní dvojmocné kationty Mg^{2+} a Ca^{2+} .¹

Vazba: Předpokladem pro vlastní hydrofobní interakci je rozmístění polárních a nepolárních residuí. Například posice argininu a tryptofanu hraje klíčovou roli v rozrušení membrány, protože elektrostatické interakce postranního řetězce argininu s fosfátovými hlavicemi stabilizují interakci peptid-membrána, která je zvyšována přítomností residuí tryptofanu.¹

Model vniknutí: Principů průniku antimikrobiálních peptidů do patogenní buňky je hned několik, zde jsou však uvedeny dva hlavní mechanismy.

Prvním je tzv. kobercový model, který vysvětluje průnik membránou následovně. Peptidy se shlukují na povrchu membrány a při dosažení určité koncentrace se vmezeří do dvojvrstvy membrány. Ta se ohne a vytvoří se micela s vodním jádrem obklopeným jak vniklými peptidy, tak lipidovými hlavicemi. Peptidy uvnitř micely zahájí desintegraci buněčné stěny a zničí celý mikroorganismus.¹

Druhým typem je tzv. Barrel-stave model. Při něm AMPs tvoří svazčky v membráně a póry v jejich středu. Tím se zvyšuje vazba AMPs na membránu, tvorba stále většího množství pórů, čímž dochází ke zničení buňky. Na tomto principu je založena aktivita například magaininu-2.¹

Mezi nejvýznamnější lidské antimikrobiální peptidy patří defensiny a cathelicidiny. Savčí defensiny jsou kationické, neglykosylované peptidy relativně bohaté na arginin, s molekulovou hmotností kolem 3,5 – 4,5 kDa. Obsahují šest cysteinových zbytků, které tvoří tři charakteristické disulfidové můstky. Podle umístění disulfidových vazeb, jejich uspořádání a celkové struktury se defensiny dělí do tří skupin – α -defensiny, β -defensiny a γ -defensiny. Jsou obecně považovány za lidské neutrofilní peptidy (HNP = human neutrophil peptides) a exprimují se především v epiteliálních buňkách, Panethových buňkách tenkého střeva a v případě některých β -defensinů také například v zanícených kožních buňkách (například při psoriase) nebo v močovém ústrojí žen.^{7,8}

α -defensiny, HNP1-HNP4 (human neutrophil peptides), jsou přítomné ve vysoké koncentraci v neutrofilech a umožňují jim vykonávat jejich neoxidativní mikrobicidní aktivitu. Jiné α -defensiny, HD5 a HD6, jsou exprimovány v Panethových buňkách tenkého střeva.⁵

β -defensiny jsou považovány taktéž za lidské neutrofilní peptidy a jsou produkovány jako HBD1–HBD4.

Je možné je izolovat z epiteliálních, střevních a poškozených kožních (infekcí) buněk. Jejich účinek je tedy zaměřen hlavně na patogeny napadající kůži, ale samozřejmě i další typy epitelů.⁴

Naproti tomu byl u skupiny cathelicidinů izolován pouze jeden jediný lidský protein, a tím je α -helikální LL-37, který vzniká jako derivát proteolysy proteinu CAP18 (cationic antimicrobial protein). Cathelicidin LL-37 je exprimován v leukocytárních buňkách (v neutrofilech, monocitech, NK-, T- i B-buňkách), v epiteliálních buňkách kůže, gastrointestinálního traktu, dýchací soustavy a podobně. Antimikrobiální aktivita je zprostředkována vazbou na lipopolysacharidy G^+ i G^- bakterií a kromě toho působí chemotakticky na neutrofile, monocity, NK- a T-buňky a stimuluje obnovu epitelu.⁹

Cytokiny

Cytokiny, nebo také tkáňové hormony, jsou proteiny produkované především leukocytárními buňkami (lymfocyty, monocity) a řadí se mezi základní regulátory imunitního systému.

Působení cytokinů je především pleiotropií, což znamená, že má vliv na několik různých druhů buněk), kaskádovitě a často jsou jednotlivé složky celého systému do určité míry nahraditelné (tzn. je redundantní). Tyto látky působí jak autokrinně, tak parakrinně a také endokrinně.

Cytokiny mají své specifické receptory a mechanismus funguje na principu vazby ligandu (cytokinu) na receptor. Tyto receptory se skládají ze dvou až tří podjednotek, přičemž jedna z nich je zodpovědná za vlastní vazbu cytokinu a zbylé podjednotky zajišťují převod signálu specifickým intracelulárním molekulám. Existuje nějakolik typů, tzv. receptorových rodin, které mají podobnou strukturu (například receptory pro interleukiny, chemokiny, cytokiny podobné TNF,...).³

Připojení cytokinu způsobí konformační změnu v celém receptoru, autofosforylaci JAK kinasy (Janusova kinasa) a následnou agregaci tzv. STAT molekul (signal transducer and activator of transcription). STAT molekuly jsou fosforylovány, disociují od receptoru a následně dimerisují, čímž dochází k jejich aktivaci. Již aktivované STATs jsou dále translokovány do buněčného jádra, kde se navážou na DNA a spustí transkripci určitých genů, které podléhají právě STAT kontrole.¹⁰

Spektrum působení je velice různorodé vzhledem ke struktuře. Cytokiny se ještě nepodařilo jednotně rozdělit, tudíž se jednotlivé skupiny prolínají a nejsou jasně vytyčené hranice. Zde je nastíněno, jakým způsobem by se mohly tyto molekuly klasifikovat.

Interleukiny například stimulují nejrůznější typy buněk, od hematopoetických, přes T- i B-lymfocyty, jejich proliferaci, stimulují též růstové faktory a některé prekursorů, některé jsou chemotaktické, jiné zajišťují indukci dalších cytokinů, případně působí protivirově nebo jako inhibitory nádorů.³

Interferony zajišťují například protivirovou obranu, neboť inhibují replikaci napadené buňky a někteří zástupci aktivují makrofágy.³

Faktory stimulující kolonie se podílí na diferenciaci krevních buněk, a to jak monocytů, tak i granulocytů nebo myeloidních buněk.³

Cytokiny skupiny TNF jsou prozánětlivé, aktivují lymfocyty, spouští angiogenesi a mohou například způsobit i apoptosu aktivovaných T- a nádorových buněk.³

Chemokiny působí chemotakticky na granulocyty, monocyty, fibroblasty, neutrofilny a další buňky a následně je aktivují, tudíž je patogen zničen dříve, než se začne množit.³

Transformující růstové faktory stimulují nebo inhibují mitosu, mohou být prozánětlivé i protizánětlivé.³

Podle struktury se mohou cytokiny dělit na hematopoetiny (obsahují čtyři α -helikální úseky), interferony a rodinu IL-10 (pět α -helikálních úseků), skupinu IL-12 (které jsou tvořeny dvěma nekovalentními heterodimery, přičemž jedna je podobná hematopoetinům a druhá jednomu z receptorových fragmentů), skupinu TNF (tvořeny dvěma antiparalelními řetězci a většinou se vyskytují jako trimery), skupinu TGF- β (obsahující

tzv. cysteinový uzel), chemokiny (stabilizovány disulfidovými můstky) a ostatní, které se strukturně nedají zařadit do žádné z předešlých skupin.³

Závěr:

Antimikrobiální peptidy jsou považovány za multifunkční efektorové molekuly, které slouží nejenom jako endogenní antibiotika, ale také jako prozánětlivá agens. Jsou schopny zničit mikrobiální membránu a tím inhibovat jejich růst, mají vliv na expresi adhezních a imunomodulačních molekul, na angiogenesi a reparaci kůže. V každém případě však jejich funkce záleží na koncentraci. V nižších hladinách ovlivňují přenos signálu nebo proliferaci, zatímco ve vyšších mohou způsobit buněčnou lysi.

Stěžejní myšlenkou využití antimikrobiálních a imunomodulačních peptidů je vývoj inovativních antibiotik prostřednictvím biochemických a biotechnologických metod.⁶ V této oblasti výzkumu je poměrně velký potenciál, a to především kvůli zvyšující se rezistenci konvenčních antibiotik.¹ Navíc se zjistilo, že AMPs pracují synergicky s již existujícími antibiotiky.¹²

Literatura

1. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, et al.: *NIH Public Access* 15, 2377 (2009).
2. Kamysz V, Okrój M, Lukasiak J: *Acta Biochemica Polonica* 50, 461 (2003).
3. Hořejší V, Bartůňková J: *Základy imunologie* 4. vydání. Triton, Praha (2009).
4. Büchau AS, Gallo RL: *NIH Public Access* 25, 616 (2007).
5. Zasloff M: *Journal of the American Society of Nephrology* 18, 2810 (2007).
6. Bals R: *Respir Res* 1, 141 (2000).
7. De Smet K, Contreras R: *Biotechnology Letters* 27, 1337 (2005).
8. Jones DE, Bevins ChL: *Journal of Biological Chemistry* 267, 23216 (1992).
9. Braff MH, Bardan A, Nizet V, et al.: *Journal of the Investigative Dermatology* 125, 9 (2005).
10. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA: *Journal of Cell Science* 117, 1281 (2004).
11. Steinstraesser L, Koehler T, Jacobsen F, et al.: *Molecular Medicine* 14, 528 (2008).
12. <http://database.portal.modwest.com/item.php?table=strategy&id=1041>, staženo 8. 11. 2010.

Souhrn

Hradecká M.: Antimikrobiální a imunitu ovlivňující peptidy v protekci infekcí

Antimikrobiální peptidy můžeme charakterizovat jako endogenní peptidová antibiotika, která jsou produkována všemi organismy, jak prokaryoty (bakteriemi), tak i eukaryoty (nižšími a vyššími rostlinami a živočichy a též člověkem). Jejich spektrum působení je široké, mají vliv jak na vlastní zničení patogenů, tak i na mechanismy vrozeného imunitního systému. Mohou totiž vystupovat jako chemokiny, inhibitory proteas nebo jako neuropeptidy.

Tento článek slouží jen jako velice povrchní nahlédnutí do problematiky lidských antimikrobiálních a imunomodulačních peptidů a proteinů a podává základní informace o struktuře, mechanismech a principech působení.

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, cytokininy

Summary

Hradecká M.: Antimicrobial and immunity affecting peptides in protection of infections

Antimicrobial peptides we can characterize like endogenous peptides antibiotics that they are produced by the all organisms, both prokaryotes (bacteria) and eukaryotes (lower and higher plants, animals and also man). Their spectrum incidence is wide, they are affective both on the own destruction of pathogens and on mechanisms of the innate immunity system. They may occur like chemokins, protease inhibitors or like neuropeptides.

This article serves only as very superficial view into the problems of human antimicrobial and immunomodulatory peptides and proteins and serves primary as objective informations on structure, mechanisms and action principles.

Keywords: Antimicrobial peptides, cytokinin

GENETICKÁ MODIFIKACE *Claviceps purpurea* JAKO MOŽNOST ZEFEKTIVNĚNÍ PRODUKCE NÁMELOVÝCH ALKALOIDŮ

Helena Hulvová

Univerzita Palackého v Olomouci, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení molekulární biologie

Úvod

Účinky námelových, neboli také ergoidních alkaloidů obsažených mimo jiné např. v organismu *Claviceps purpurea* a látek z nich odvozených jsou lidstvu po staletí dobře známy. Můžeme je spojovat s četnými případy jejich mylného užití a následnou otravou potravinami vyrobenými z obilnin napadených touto parazitickou houbou, s jejich zneužitím ve formě syntetického diethylamidu kyseliny lysergové, známého pod zkratkou LSD, ale v první řadě je třeba zmínit jejich využití na poli farmaceutického průmyslu při výrobě léků.

Infekce žita houbou *C. purpurea* se v počátečním stádiu projevuje tvorbou medovice, viskózní tekutiny bohaté na cukry a konidie *C. purpurea* (Obr. 1 A), a vyúští tvorbou sklerocií, tedy rigidního stádia a produkční formy *C. purpurea* (Obr. 1 B, C).

Historie a využití

Biologická aktivita námelových alkaloidů je zapříčiněna strukturálními podobnostmi s neurotransmitery noradrenalinem, dopaminem a serotoninem. V historii byla zaznamenána řada hromadných otrav, mající za následek úmrtí až desetitisíců lidí. Následky intoxikace námelovými alkaloidy označujeme jako ergotismus a dle přítomných syndromů jej můžeme dělit na ergotismus konvulsivní projevující se svalovými křečemi, halucinacemi, pocením a horečkami a ergotismus gangrénový, dříve také označován jako oheň sv. Antonína¹. Intoxikace ergoidními alkaloidy a z ní vyplývající halucinace byly pravděpodobně také příčinou Salemských čarodějnických procesů v USA². Léky, založené na bázi námelových alkaloidů slouží např. k léčbě migrény, v porodnictví při stimulaci děložních stahů, jako prevence a léčba poporodního krvácení, ale také při léčbě neplodnosti jako inhibitory prolaktinu, jako antiparkinsonika, či jako vasodilatory při léčbě vysokého krevního tlaku.

Způsoby produkce námelových alkaloidů

V současné době je produkce námelových alkaloidů přibližně rovnoměrně rozdělena mezi produkci polní a produkci fermentační. Oba způsoby mají své výhody i svá úskalí. Fermentační produkce zajišťuje poměrně přesné výnosy dle momentálních potřeb trhu, cena fermentačně vyprodukovaných alkaloidů je však závislá na cenách energií a některé ergopeptiny nejsou produkovány dostupnými kmeny schopnými produkce v axenické kultuře. Výnosy polní produkce mají tendenci silně kolísat v rámci jednotlivých sezón i lokalit v závislosti na podmínkách počasí. Problematickou součástí polní produkce je rovněž nutnost použití pylově sterilního žita, jelikož *Claviceps purpurea* napadá neoplozená ovaria a pyl silně kompetuje se spory houby. V současné době je na trhu řada hybridních odrůd žita se samčí sterilitou vázanou na mitochondriální DNA. Při vhodných povětrnostních podmínkách může ale i malé množství pylu pocházející z okolních lokalit, či rostlin fertálních, vnesených mezi sterilní např. zrny zanesenými v zemědělských strojích, oplodnit velkou populaci sterilních rostlin a dát tak vznik-



Obr. 1: Infekce žita houbou *C. purpurea*: A) první makroskopicky viditelná známka infekce – tvorba medovice, tekutiny bohaté na cukry atraktivní pro hmyz, obsahující vysoké množství konidií houby (cca 7 dní po infekci); B) a C) tvorba sklerocií, rigidních stádií houby.

nout velkému množství zrna, namísto požadovaných sklerocií.

Také obsahy námelových alkaloidů ve sklerociích nejsou konstantní a sezónně se liší až o desetiny procent. V České republice je významným producentem námelových alkaloidů firma TEVA Czech Industries, Opava.

Možnosti uplatnění molekulárně genetických metod při produkci námelových alkaloidů

Jednou z možností zefektivnění produkce námelových alkaloidů je příprava nových kmenů metodami molekulární genetiky. Preferovanou metodou pro genetickou modifikaci tohoto organismu je transformace protoplastů (buňky zbavené buněčných stěn lytickými enzymy) za osmotického tlaku zvýšeného pomocí polyethylenglykolu³. Geny spojené s dráhou biosyntézy námelových alkaloidů jsou uloženy v klastru, a proto může být jejich exprese synergicky regulována. Klastř genů pro syntézu námelových alkaloidů se pravděpodobně nachází v oblasti heterochromatinu poblíž telomer chromosomů stejně jako řada klastřů pro sekundární metabolismus jiných hub⁴. Jedním z možných přístupů při pokusech o přípravu kmene se zvýšenou produkcí námelových alkaloidů je nadexprese (zvýšení míry přepisu genu do RNA a následně do cílového proteinu umístěním genu pod kontrolu silného promoteru) vybraných genů

dráhy pro biosyntézu nebo regulaci produkce námelových alkaloidů. Úspěšnost tohoto postupu může však být omezena regulačními mechanismy jako je zpětnovazebná inhibice enzymů dráhy produktem. Dalším přístupem je nadexprese genů umožňujících dekonkondenzaci chromatinové struktury, jejíž heterochromatinová (kondenzovaná) forma zabraňuje expresi požadovaných genů. Vhodným kandidátem pro tento postup je gen *laeA*, tedy gen pro histon methyltransferasu, jejíž nadexprese v řadě hub druhů *Aspergillus* vedla ke zvýšené expresi genů klastřů kódujících enzymy sekundárního metabolismu a ke zvýšené tvorbě produktu⁵. Dalšími kandidáty jsou geny pro proteiny VeA a VelB, tvořící s *LaeA* komplex ovlivňující strukturu chromatinu⁶.

Závěr

Námelové alkaloidy jsou početnou skupinou sekundárních metabolitů hub s farmakologickým využitím. Hlavními producenty těchto látek jsou druhy rodu *Claviceps*, přičemž je třeba zmínit nejvýznamnějšího zástupce, tedy druh *Claviceps purpurea*. Geneticky modifikované kmeny *C. purpurea* se zvýšenou schopností produkce námelových alkaloidů nebo vyšší susceptibilitou vůči svému hostiteli by mohly významným způsobem snížit náklady na výrobu léků z těchto látek připravovaných.

Literatura

1. Lee MR: *J R Coll Physicians Edinb* 39, 179 (2009).
2. Caporael LR: *Science* 192, 21 (1976).
3. Engelenburg F, Smit R, et al.: *Appl Microbiol Biotechnol* 30, 364 (1989).
4. Lorenz N, Wilson EV, et al.: *Appl Environ Microbiol* 73, 7185 (2007).
5. Bok JW, Keller NP: *Eukaryotic Cell* 3, 527 (2004).
6. Bayram Ö, Krappmann S, et al.: *Science* 13, 1504 (2008).

Souhrn

Hulvová H.: Genetická modifikace *Claviceps purpurea* jako možnost zefektivnění produkce námelových alkaloidů

Námelové alkaloidy, hojně využívané ve farmaceutickém průmyslu, jsou látky produkované především houbami rodu *Claviceps* s hlavním zástupcem, organismem *Claviceps purpurea*. K produkci dochází během infekce hostitelské rostliny, nejčastěji žita, nebo během fermentace mutovaných kmenů, schopných produkce alkaloidů v axenické kultuře.

Geneticky modifikovaná *Claviceps purpurea* se zvýšenou schopností tvorby námelových alkaloidů je možností, jak snížit náklady na výrobu léků, obsahujících námelové alkaloidy a jejich deriváty.

Klíčová slova: *Claviceps purpurea*, námelové alkaloidy, genetická modifikace

Summary

Hulvová H.: Genetic modification of *Claviceps purpurea* as a challenge to streamline the production of ergot alkaloids

Ergot alkaloids, widely used in the pharmaceutical industry, are substances produced by fungi of the genus *Claviceps*, with the main representative, *Claviceps purpurea*. The production occurs during infection of host plants, most typically sterile variety of rye or during fermentation of mutant strains capable to produce alkaloids in axenic culture. Genetically modified *Claviceps purpurea* with increased ability to synthesize ergot alkaloids is a challenge to reduce production costs of drugs containing ergot alkaloids and their derivatives.

Keywords: *Claviceps purpurea*, ergot alkaloids, genetic modification

O B S A H

Úvodem	1
Pozvánka na seminář „Novinky v oblasti genetických modifikací“	2
Daussant J. and Desvaux F.X.: Zvýšený zájem o protilátky tvořené pouze dvěma těžkými řetězci a jejich rekombinantní analoga	3
Jablonská E.: Lipidové databáze a lipidomika	5
Vápeníková Z.: Mikrobiální produkce glukosaminu	7
Zábranská J., Pokorná D., Siglová M., Minařík M.: Biologické odstraňování sulfanu z bioplynu	9
Hradecká M.: Antimikrobiální a imunitu ovlivňující peptidy v protekci infekcí	15
Hulvová H.: Genetická modifikace <i>Claviceps purpurea</i> jako možnost zefektivnění produkce námelových alkaloidů	19

C O N T E N T S

Editorial	1
Invitation to the workshop: „News in genetic modifications“	2
Daussant J. and Desvaux F. X.: Increasing interest for the heavy chain antibodies and their recombinant proteins (nanobodies)	3
Jablonská E.: Lipid databases and lipidomics	5
Vápeníková Z.: Microbial production of glucosamine	7
Zábranská J., Pokorná D., Siglová M., Minařík M.: Biological removal of hydrogen-sulfide from biogas	9
Hradecká M.: Antimicrobial and immunity affecting peptides in protection of infections	15
Hulvová H.: Genetic modification of <i>Claviceps purpurea</i> as a challenge to streamline the production of ergot alkaloids	19

POKYNY PRO AUTORY

Rukopisy je třeba zaslat v elektronické formě e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Rukopis musí být opatřen plným jménem autora, názvem jeho pracoviště a e-mailovou adresou autora.

Článek má tyto části: název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr (příp. poděkování), citace literatury, český souhrn, klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova.

Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu práce, a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Seznam citací musí být uveden v závěru článku. Zkratky časopisů se používají podle Chemical Abstract Service Source Index.

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *J.Biochem.* 148, 502 (1997).

Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.

Lowestein K A: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 1979.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 3. září 1999.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi. Každý obrázek musí být opatřen legendou umístěnou pod obrázkem, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky zasílejte **zvlášť** v některém z běžných formátů např. TIF, JPG, CDR, EPS.

Technické parametry: typ písma Arial velikost 11, řádkování jednoduché.

BIOPROSPECT

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

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:

MK ČR E 19409

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností