
B I P R O S P E C T

Dvacátýtřetí ročník
Číslo 1/2013

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 Lipová, 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)

<http://bts.vscht.cz>

BIOPROSPECT

23th Volume
No. 1/2013

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: COMB CZTPP

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,

dovolte nám připomenout, že náš bulletin Bio-prospect nás již doprovází dvacátým třetím rokem a pevně věříme, že bude ještě dlouho vycházet v tištěné formě. Stále si totiž myslíme, že je příjemné dostat přímo do ruky, čtyřikrát do roka, příjemný pozdrav ve formě nového čísla a užít si pár hezkých chvil nad stránkami nových informací, které pro nás vybrali naši přátelé.

Letošní rok (2013) je poměrně bohatý na výročí, která můžeme označit jako významné mezníky lidského poznání, které napomohly rozvoji moderních biotechnologií. **Je to právě 60 let, co v dubnovém čísle časopisu Nature James D. Watson a Francis Crick poprvé popsali strukturu DNA jako dvojitou šroubovici a navrhli možnost kopírovacího mechanismu pro genetický materiál.** Ve stejném čísle byly publikovány ještě dva články související s touto problematikou. Wilkins, Stokes a Wilson podali krystalografický důkaz, že takováto struktura existuje v biologických systémech. Rosalind Franklin a Ray Gosling potvrdili existenci helikální struktury DNA a ukázali, že fosfátová kostra leží vně této struktury. V dalším článku Watson a Crick naznačili, jak párování ve dvoušroubovici umožňuje replikaci DNA. Později Franklin a Gosling publikovali rozdíly v A a B struktuře dvoušroubovice. Tato pětice článků v r. 1953 tedy kompletuje zásadní poznatky o struktuře DNA, které podepřely dříve publikovaný důkaz v J. Exp. Med, v r. 1944, že DNA je nositelem dědičné informace, neboť dlouho přetrvával názor, že geny jsou proteiny.

Letos si rovněž připomínáme **30 let od popsání polymerasové řetězové reakce (PCR).** Metoda vyvinutá Kary Mullisem byla během jejího používání v mnoha směrech vylepšována. Velkým pokrokem techniky bylo např. nalezení termorezistentní DNA polymerasy (vydrží teplotu až 96 °C). Využití PCR je mnohostranné: v sekvenování, klonování, genovém inženýrství, v diagnostice, v průkazu genetických modifikací, mutací aj.

Trojici výročí velice významných pro rozvoj moderních biotechnologií připomíná **10 let od ukončení projektu lidského genomu.**

Projekt „Lidský genom“ (The Human Genome Project – HGP) začal v r. 1990 a byl ukončen v dubnu 2003. Jeho cílem bylo stanovit sekvenci 3 miliard basí (stavbních kamenů či také „písmen“) lidské DNA. Je to velký úspěch, ale využití jeho výsledků je na samém začátku. DNA je obsažena v každé naší buňce a nese informace, jak se utvářejí a udržují jednotlivé buňky.

Genomy dvou lidí jsou z více jak 99 % stejné. Ta malá frakce genomu, v čem se lišíme, je velmi důležitá a dělá nás jedinečnými. Ovlivňuje barvu očí, vlasů, kůže, riziko onemocnění, využití léčiv a další vlastnosti. Přesto náš genom nedeterminuje vše, záleží na prostředí, ve kterém žijeme, stravě, životním stylu, atd. Hlubší poznání lidského genomu umožní osobní přístup ke stanovení rizik onemocnění, jejich předcházení, detekci i léčení. S perspektivou skvělých výhod přinášejících nových poznatků však vznikají i obavy z možných rizik zneužití osobních informací.

Paralelně se studiem lidského genomu probíhalo a probíhá stanovení genomů řady dalších organismů, především organismů modelových (t.j. používaných ve výzkumu) jako např. myši, octomilky, škravky, některých mikroorganismů i rostlin. Podařilo se zjistit i genomy neandrtálce a denisovanů, což napomůže odpovědět na dosud nejasné otázky o průběhu evoluce moderního člověka. Pro biotechnologie je však důležitější hledat geny, které umožňují po vnesení do organismu (mikroorganismu, rostliny či živočicha) získat novou potřebnou vlastnost nebo naopak nežádoucí vlastnost eliminovat. I na tomto poli bylo v poslední době získáno mnoho nových vědomostí.

Náš každoroční seminář „Novinky v oblasti genetických modifikací“ se uskuteční ve čtvrtek 25. 4. 2013 od 14:30 v posluchárně BII na VŠCHT v Praze (viz příložená pozvánka).

Znovu připomínáme, že přípravný výbor pokročil v přípravě mezinárodního symposia BIOTECH Prague 2014 a s ním spojeného 7. Česko-švýcarského symposia, které se uskuteční opět v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích ve dnech 11. – 14. 6. 2014. Webová stránka s podrobnými informacemi (www.biotech2014.cz) bude zpřístupněna v nejbližších dnech. Těšíme se, že nám pomůžete informací o symposiu rozšířit doma i v zahraničí a přispějete k jeho úspěchu.

Jako obvykle jsme pro Vás připravili zajímavé články týkající se sekvenování DNA, epigenetických změn, které mohou být příčinou vzniku diabetu, možností predikce progresu Alzheimerovy choroby, bioinsekticidů a monolitické chromatografie.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

VÍTE, ŽE...

- **EC povolila první genovou terapii v Evropě.** Jedná se o vzácné genetické onemocnění („lipoprotein lipase deficiency – LPLD“) vyskytující se v 1 – 2 případech z milionu, pro něž není jiná léčba. Lék „Glybera“ byl doporučen Evropskou lékařskou agenturou (EMA) pro aplikaci ve „výjimečných případech“. Glybera je lék, který pomocí virálního vektoru vnáší gen pro syntézu lipoproteinlipasy ve svalových buňkách. (BioPharm International 6. 11. 2012)
- Vzhledem k nárůstu bakteriální rezistence vůči antibiotikům se hledají další způsoby potlačení bakteriálních infekcí. Povzbudivým přístupem se zdá být narušení chemické komunikace mezi mikroorganismy (quorum sensing) např. isothiokyanáty v brokolici. Sulforaphan a erucin vazbou na důležitý protein přeruší komunikační mašinerii u *Pseudomonas aeruginosa*. (MedChemComm, DOI: 10.1039/c2md20196h)
- WHO (Světová zdravotnická federace) a UNEP (Organizace Spojených národů pro ochranu životního prostředí) ve své zprávě **varují před rizikem chemikálií poškozujících endokrinní regulaci** („endocrine-disrupting chemicals“), jež má za následek poruchy reprodukce, rakovinu i diabetes typu 2. (C & EN, February 25, 2013, p. 23)
- Nanočástice s vázanou alkoholdehydrogenasou a katalasou umožní profylaxi **alkoholové intoxikace** i její eliminaci. Systém testovaný na myších nabízí řadu dalších aplikací. (Nat. Nanotechnol., DOI:10.1038/nnano.2012.264)
- Škrty v rozpočtu USA pro r. 2013 (cca 9 % v oblasti mimo obranu) postihnou i podporu vědy. **Grantová agentura NSF udělí o 1000 grantů méně** (C & EN, February 25, 2013, p. 4). Naproti tomu federální vláda USA zdvojnásobí investice do zemědělského výzkumu. Bylo vytyčeno 7 R & D priorit: škůdci, patogeny, invazivní rostliny, hospodaření s vodou, dopad na životní prostředí, klimatické změny, produkce výživných potravin a celková bezpečnost potravin. (C & EN, December 17, 2012, p. 25)
- **55 % léčiv předepsaných Američanům nefunguje tak, jak by mělo.** Důvodem je, že léky nepůsobí u všech pacientů stejně. Velké farmaceutické firmy (např. Pfizer, Astra Zeneca) proto zřizují novou funkci „vicepresident of real world data“, která by měla situaci podrobně monitorovat. (C & EN, February 25, 2013, p. 17)
- Vědci syntetizovali peptid, který vázán na cizí těleso (např. nanočástici) ošálí imunitní systém. Navržený postup by mohl být využit při cíleném transportu léčiv k nádorům. (C & EN, February 25, 2013, p. 5)
- Obamova administrace ustanovila 30člennou Národní komisi pro forenzní vědu, která bude navrhovat **strategii rozvoje forenzní vědy**. (C & EN, February 25, 2013, p. 23)
- Holding Renova plánuje v blízkosti Moskvy vybudovat **nový závod na výrobu biologicky odbouratelných polymerů**. (www.techtydenik.cz, www.plasticportal.eu)
- **Ceny Akademie věd ČR za r. 2012** v oblasti související s rozvojem biotechnologií převzali: I. Kategorie (vynikající výsledky velkého vědeckého významu) Autorský tým Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR za vědecký výsledek „Klonální obratlovci: objev, mechanismy, biodiverzita a rekonstrukce modelu sekavcovitých ryb“, II. Kategorie (pro mladé vědecké pracovníky) Ing. Václav Mahelka, Ph.D. z Botanického ústavu AV ČR za projekt „Genomy polyploidních trav: na stopě netušených předků“. (www.techtydenik.cz, Technický týdeník 22/2012, s.15)
- **Federální soud v USA rozhodl, že izolované lidské geny mohou být patentovány.** Bylo tím zvráceno soudní rozhodnutí z r. 2011. Splnil se tak sen velkých biotechnologických firem. (C & EN, August 27, 2012, p. 8). Nicméně spor dále pokračuje. Nejvyšší soud by měl rozhodnout v létě 2013, zda budou lidské geny patentovatelné. V každém případě se jedná o velmi vážné rozhodnutí, které ovlivní další rozvoj vědy, lékařskou péči a tím i každého jednotlivce. (více na C & EN, December 10, 2012, p. 12)

- **Itálie velmi investuje do biotechnologického průmyslu.** Podle zprávy Ernst & Young publikované v r. 2012 je druhým státem v Evropě (po Německu) v počtu biotechnologických firem. Třetí je Velká Británie. (C & EN, August 27, 2012, p. 22)
- **Retinal vázaný na modifikované proteiny absorbuje různé barvy v závislosti na jejich primární struktuře.** Tento objev může umožnit konstrukci nových biosensorů, přípravu proteinů pro získávání solární energie i sond pro biologický výzkum. (Science, DOI:10.1126/science.1226135)
- **Výrobu biopaliva z odpadů plánují 3 firmy.** DuPont z listů a palic kukuřice, LanzaTech z odpadního plynu a Fulcrum BioEnergy z komunálního odpadu. (C & EN, December 10, 2012, p. 10)
- **Nejprodávanejším lékem v r. 2012 byl Lipidor** (aktivní složka Atorvastatin) firmy Pfizer používaný k léčbě hypercholesteremie. Také čtvrtý nejprodávanejší lék Crestor (Rosuvastatin) firmy AstraZeneca je indikován k léčbě hypercholesteremie. Druhý nejprodávanejší lék Seretide (Fluticasone & salmeterol) firmy Glaxo-SmithKline se používá k léčbě astmatu. Třetí nejprodávanejší lék Plavix (Clopidogrel) firmy BMS & Sanofi pak léčí různé aterosklerotické stavy. (C & EN, December 10, 2012, p. 16)
- **Microbiom zažívacího traktu velkých pand a dalších vegetariánských živočichů** (získaný z jejich stolice) **může být zdrojem enzymů štěpících celulosové substráty.** Přenesením jejich genetické informace pro jejich expresi v produkčních mikroorganismech mohou být získány podmínky pro ekonomickou kompatibilitu výroby biopaliv z celulosových substrátů s jejich výrobou z jednoduchých substrátů (cukrů). (C & EN, December 10, 2012, p. 13)
- **Firmy využívající při své produkci biomateriály založili ve Filadelfii novou organizaci „Society for the Commercial Development of Industrial Biotechnology (SCD-IBIO).** Skupina je členem „Society of Chemical Manufacturers & Affiliates“. (C & EN, December 10, 2012, p. 24-25)
- **Nové technologie umožní USA podstatně zvýšit těžbu přírodního plynu a ropy.** Ovlivní to energetickou situaci ve světě? (C & EN, December 10, 2012, p. 30-31)
- **Nematod *Caenorhabditis elegans* se ubrání účinku toxinů patogenních mikroroganismů.** Vědci prokázali, že si zachrání život tím, že umí tyto toxiny glykosylovat. Pochopením mechanismu této glykosylace může vést k novým lékům proti parazitickým infekcím. (C & EN, December 10, 2012, p. 33)
- **Informace o nanotechnologiích** lze najít na portále www.cen.acs.org/nanofocus
- **CAS (Chemical Abstracts Service) zaregistroval k 6. 12. 2012 již 70 milionů sloučenin.** (<http://cenm.ag/b126>)
- **Nekontrolované pití nápojů s obsahem kofeinu, zejména různých „energetických nápojů“, může způsobit zdravotní problémy.** V USA se za posledních 5 let zvýšil počet návštěv lékařské pohotovosti jako následek nadměrného pití kofeinových nápojů více než 2x. Doporučená denní dávka kofeinu pro zdravého člověka je 400 mg, pro těhotné ženy pak po polovina (200 mg), pro děti nad 10 let 80 mg. Běžný šálek kávy obsahuje kolem 100 mg kofeinu. (C & EN, February 4, 2013 p. 9 – 12)
- **FDA schválila v r. 2012 39 nových léků, převažují nízkomolekulární substance.** Mezi nimi je 11 léků pro onkologickou terapii. (C & EN, February 4, 2013 p. 15 – 17)
- **British Airways vytvořily alianci s firmou Solena Fuels, která do konce r. 2015 postaví ve východním Londýně továrnu na výrobu biopaliv z městského odpadu** (500 000 t ročně). Aerolinie odeberou ročně 50 000 t paliva. (C & EN, December 17, 2012, p. 18)
- **Nanostrukturovaný polymerní film umožní přechod velkých proteinů do tkáně.** Tato technika umožní aplikaci proteinových léčiv. (Nano Lett., DOI:10.1021/nl3037799)

**Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT
Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠCHT
Biotechnologická společnost**

si Vás dovoluji pozvat na tradiční seminář

NOVINKY V OBLASTI GENETICKÝCH MODIFIKACÍ

konaný **ve čtvrtek 25. dubna 2013 od 14:30 hod**

v posluchárně BII VŠCHT v Praze

(v mezipatře přímo proti vchodu do budovy B),

Praha 6, Technická 3 (budova B je blíže Vítěznému náměstí)

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

PROGRAM:

Zahájení ve 14:30 hod.

Jan Káš, VŠCHT Praha:

Úvodní slovo

Petr Svoboda, ÚMG AV ČR v.v.i., Oddělení epigenetických regulací:

Úvod do epigenetiky

Stanislav Kmoch, 1. LF UK, Ústav dědičných a metabolických poruch:

Diagnostika dědičných chorob a metabolických poruch

Závěr semináře

Vstup je volný.

ZA ORGANIZÁTORY SEMINÁŘE:

prof. Ing. Jan Káš, DrSc.

Biotechnologická společnost

prof. Ing. Tomáš Ruml, CSc.

děkan FPBT

SEKVENOVÁNÍ DNA

Pavel Oborský

Ústav biochemie a mikrobiologie, e-mail: oborskyp@vscht.cz

Úvod

Sekvenování DNA patří dnes v biochemii mezi nepostradatelné techniky. Proto je i pokrok biochemie do jisté míry svázán s vývojem technik sekvenování DNA. Metody sekvenování jsou rozděleny do tří generací. První generace zahrnuje techniky vycházející ze Sangerovy metody sekvenování. Metody označované za druhou generaci jsou metody zavedené kolem roku 2005, při nízkých nákladech dokáží produkovat vysoké množství dat, ale za cenu vyšší chybovosti oproti generaci první.¹ Metody třetí generace jsou nově vyvíjené metody, které mají potenciál překonat druhou generaci v některém z podstatných parametrů jako jsou maximální délka fragmentů, spotřeba činidel nebo rychlost sekvenace.

První generace

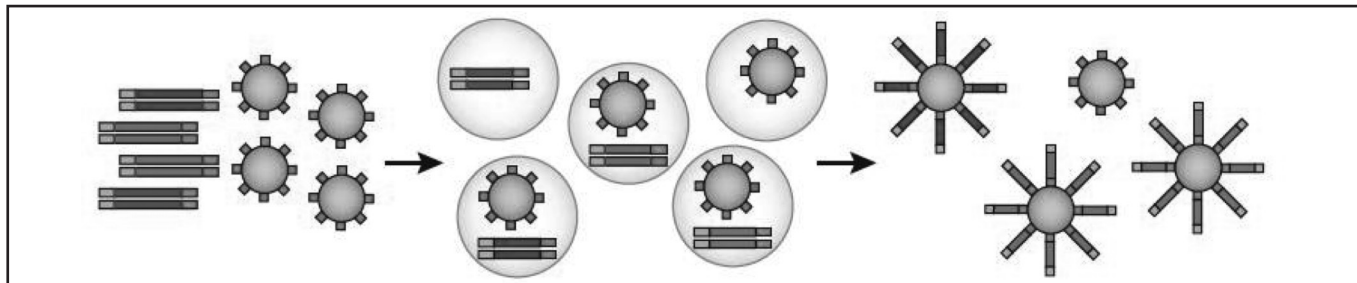
Sangerova metoda byla vypracována v roce 1975 a dlouhou dobu byla v různých modifikacích jedinou praktickou metodou pro sekvenování DNA. Za svou dobu prošla řadou optimalizačních kroků.^{2,3} Pro tuto

metodu jsou v současnosti používány automatická zařízení, která pro separaci fragmentů využívají kapilární elektroforézu.⁴ Na těchto zařízeních lze analyzovat paralelně až 384 sekvencí o délce 600 až 1000 nukleotidů s přesností 99,999 % a s cenou kolem 0,5 \$ za tisíc nukleotidů.⁵ Hlavními omezeními jsou časová náročnost, vysoká spotřeba materiálů a náročnost přípravy vzorků.⁶

Druhá generace

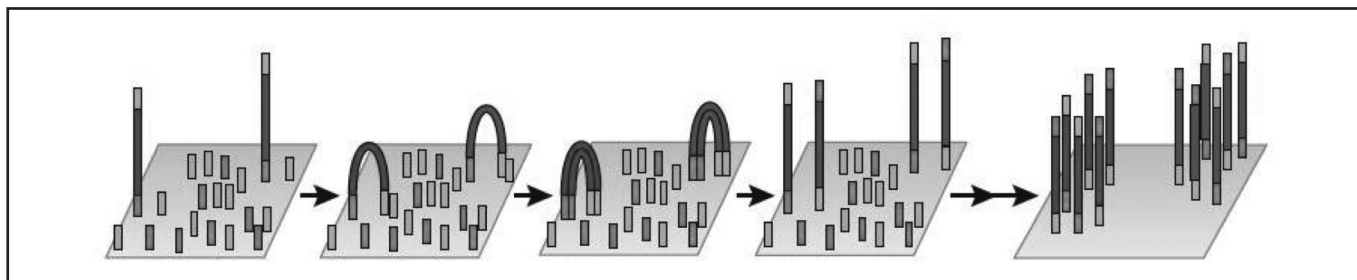
Metody druhé generace sekvenování začaly vznikat kolem roku 2005 s cílem překonat omezení metod generace první. Dokáží tedy získat velké množství dat při nižších nákladech, mají ale vyšší chybovost oproti první generaci.¹ Principy sekvenování druhé generace jsou tři: pyrosekvenování (454 pyrosequencing), sekvenace s využitím reverzibilních terminátorů (Solexa) a sekvenace ligací (SOLiD). Tyto principy využívají dvou metod přípravy vzorku DNA: emulzní PCR (Obr. 1) a amplifikaci na pevné fázi (bridge PCR) (Obr. 2).

Emulzní PCR



Obr. 1: Emulzní PCR. DNA určená k sekvenaci se roztěpí na menší fragmenty, které je již možné sekvenovat. K těmto fragmentům se ligují adaptéry – úseky DNA sloužící jako primery. Směs fragmentů DNA a polymerních kuliček s navázanými primery se smíchá v emulzi v takovém poměru, aby vodný roztok obsahoval jednu kuličku a jeden fragment, nebo jednu kuličku a žádný fragment. Následně jsou fragmenty 5' koncem přichyceny na povrch kuličky a proběhne několik cyklů PCR tak, že fragment hybridizuje s primery navázanými na kuličky. Po rozbití emulze se tak získají kuličky, kde každá kulička na sobě váže pouze jeden zmnožený fragment.⁷

Amplifikace na pevné fázi



Obr. 2: Amplifikace na pevné fázi. Začátek postupu je obdobný jako u emulzní PCR. DNA k sekvenování se fragmentuje a k fragmentům se ligují adaptéry. Na pevnou fázi jsou imobilizovány dva druhy primerů (komplementární k oběma adaptérům na každém konci fragmentu DNA) s vysokou hustotou. Následně se na pevnou fázi imobilizují fragmenty DNA tak, aby byly dostatečně daleko od sebe pro pozdější optickou identifikaci. Imobilizované fragmenty hybridizují s primery v okolí a pomocí PCR se DNA replikuje. Takto v několika cyklech PCR vzniknou vzájemně oddělené soubory identických fragmentů DNA.^{8,9}

Pyrosekvenování

Pyrosekvenování^{10,11} využívá DNA-polymerázu pro zabudování nukleotidů. Při zabudování nukleotidu je uvolněn pyrofosfát, ten v reakci s adenyl sulfátem katalyzované ATP-sulfurylázou produkuje ATP. ATP je substrátem pro enzym luciferázu, který se štěpením ATP excituje a emituje světlo. Aby ATP, které by bylo přidáno do reaktoru, nespustilo funkci luciferázy, využívá se deoxyadenosin-5'-thiotrifosfát který je substrátem DNA polymerázy, ale není přijímán luciferázou. 454 platforma využívající pyrosekvenování používá amplifikaci pomocí emulzní PCR. Kuličky jsou náhodně rozmístěny do jamek – reaktorů – o velikosti v řádu pikolitrů a jsou k nim přiváděny roztoky obsahující vždy jeden nukleotid a v mezistupních jsou omývány od neinkorporovaných nukleotidů. V případě detekce světla z určitého reaktoru prodlouží počítač sekvenci, která danému reaktoru náleží, o přítomný nukleotid v reaktoru. Hlavní limitace metody je spojená s existencí homopolymerů – úseků, kde za sebou následují stejné báze. Tyto úseky jsou doplněny při jedné inkubaci odpovídajícího nukleotidu. Síla signálu je v určitých limitech úměrná počtu přiřazených nukleotidů. Hlavní nevýhodou pyrosekvenování je právě inserce či delece spíše než substituce. Výhodou pyrosekvenování oproti dalším metodám druhé generace je délka fragmentů, která může být 200 až 300 bp. Nevýhodou je vyšší cena.

Sekvenace s využitím reverzibilních terminátorů

Sekvenace s využitím reverzibilních terminátorů¹² je založena na cyklické syntéze komplementárního vlákna. Po zabudování nukleotidu DNA-polymerázou se syntéza zastaví, protože nukleotid obsahuje skupinu na 3'-hydroxyly, která syntézu blokuje, a fluorescenční značku. Detekce probíhá buď na základě vlnové délky světla emitovaného flouroforu specifického pro každý nukleotid (v tomto případě jsou přítomny všechny nukleotidy ve vzorku), nebo na základě detekce světla v případě přítomnosti jednoho nukleotidu v cyklu. Polymerace se opět rozběhne po odštěpení blokující skupiny a flouroforu. Tato metoda využívá obvykle amplifikaci na pevné fázi. Omezená je délka fragmentů z různých důvodů, jako je nedokonalé odštěpení fluorescenčních nebo blokujících skupin.

Sekvenace ligací

Sekvenace ligací^{13,14} využívá DNA-ligázu pro prodloužení vlákna. V případě emulzní PCR jsou fragmenty přichyceny na kuličky, které jsou opět rozmístěny do malých reaktorů. Na univerzální adaptory je hybridován primer. Pak je přidána směs úseků DNA (oktamerů), které mají různé báze na prvních dvou pozicích a jsou fluorescenčně značeny, a DNA-ligáza. DNA-ligáza preferenčně připojí na rostoucí řetězec ten oktamer, který bude mít komplementární první dva nukleotidy. Po zobrazení fluorescence se poslední 3 nukleotidy, které nesou flourofor, odštěpí. Primer je tak prodloužen o 5 nukleotidů a známe sekvenci prvních dvou. Po vícenásobné ligaci (až deset cyklů) se nový řetězec uvolní a následuje stejný postup s primery o 1 až 4 nukleotidy kratší. Tím se dosáhne přiřazení nukleotidu ke každé pozici.

Třetí generace

Do třetí generace se řadí nově vyvíjené metody, které mají potenciál v důležitých parametrech překonat me-

tody z generace druhé. Tyto metody často pracují s jednotlivými molekulami DNA bez potřeby zastavování procesu mezi jednotlivými kroky detekce. Patří sem: Ion Torrent's sekvenátor, sekvenování syntézou (HeliScope, sekvenování v reálném čase), sekvenování přímým zobrazením, sekvenování pomocí nanopórů.

Ion Torrent's sekvenátor

Ion Torrent's sekvenátor¹⁵ sestává z křemíkového čipu stavěného jako polovodič. Tento čip obsahuje jamky (400 na šířku lidského vlasu). Na dně těchto jamek je iontově senzitivní vrstva – pH metr, pod kterou je vodivá vrstva. V jamce je DNA určená k sekvenování, primer, DNA-polymeráza a v cyklech se střídá přítomnost čtyř nukleotidů. Pokud je nukleotid připojen, je uvolněn jeden vodíkový ion, který je čipem rozeznán jako změna napětí. Využívají se zde přirozené nukleotidy, ani světlo či optika, tím se proces sekvenování zjednodušuje. Opět je ale třeba cyklického procesu a amplifikace DNA.

Sekvenování syntézou

HeliScope sekvenátor¹⁶ již pracuje s jednotlivými DNA fragmenty, a tedy není nutno DNA amplifikovat, ale stále je u něj nutná cyklizace. Fragmenty DNA jsou přichyceny přes připojený konec polyA k pevnému povrchu a jsou přidány primery (úseky polyT). DNA-polymeráza připojuje speciálně značené nukleotidy. Tato značka zastavuje polymeraci a je chemicky štěpitelná, takže po detekci se odštěpí a může se pokračovat v syntéze. Délka sekvenovaného úseku je okolo 32 nukleotidů. Chybovost určení správného nukleotidu je sice více než 5 %, ale metoda umožňuje sekvenovat úsek paralelně mnohokrát a vyloučením chyb dosáhnout přesnosti více než 99 %. Oproti druhé generaci je hlavní výhodou možnost sledovat až okolo miliardy úseků DNA a to, že není nutné, aby byl komplementární nukleotid vždy se 100% výtěžkem přiřazen. Sledují se jednotlivé molekuly DNA, takže se nižším výtěžkem nezvyšuje šum.

Sekvenování v reálném čase

Sekvenování v reálném čase¹⁷ je postup, kdy se sleduje syntéza komplementárního řetězce jedné molekuly DNA bez přerušení reakce. Tento přístup musí překonat dvě překážky: fluorescenční značka musí být odstraněna bez zastavení reakce a musí se zaznamenat signál pouze jednoho právě přiřazovaného nukleotidu a ne nukleotidů jiných přítomných v reaktoru. První překážka byla vyřešena připojením flouroforu na fosfáty nukleotidů. Tak se přirozenou cestou syntézy flourofor odštěpí a syntéza může pokračovat. Druhá překážka se vyřešila použitím malého detekčního objemu, jehož průměr je průměr jamky (desítky nm) a hloubka je vzdálenost, kam světlo efektivně pronikne evanescenční vlnou (~30 nm). Na dně každé jamky je přichycena jedna DNA polymeráza a v roztoku jsou přítomny všechny čtyři nukleotidy s charakteristickými flourofory. Volně pohybující se nukleotid je v detekčním objemu několik mikrosekund, kdy může emitovat světlo, zatímco nukleotid, který je komplementární, a zachytí ho DNA-polymeráza, se v detekčním objemu zdrží několik milisekund. Přiřazovaný nukleotid tedy je v detekčním objemu přibližně 1000 krát delší dobu a emituje i úměrně více fotonů. To dává dobrý poměr signálu k šumu. Takto sekvenované fragmenty mohou být víc než 1000 bp dlouhé.

Sekvenování přímým zobrazením

Alternativou může být i čtení sekvence pomocí elektronové¹⁸ či tunelové mikroskopie¹⁹. Vlákno DNA by se natáhlo na pevném povrchu a mikroskopem o dostatečném rozlišení by se četly jednotlivé báze. Využití těžších atomů by mohlo vést k snazší identifikaci. Potenciál této technologie je v čtení úseků dlouhých až několik milionů páru bazí při nízkých nákladech.

Sekvenování pomocí nanopórů

Přes nanopór může procházet buď celá molekula DNA, nebo jednotlivé nukleotidy. Nukleotidy procházející přes pór mají vliv na elektrický proud, který je poté detekován. Systém, v kterém procházejí jednotlivé nukleotidy, je složen z lipidové dvojvrstvy, ve které je modifikovaný α -hemolysin a z jedné strany membrány exonukleáza a z druhé strany syntetický cyklodextrin. Při změně potenciálu na membráně se aktivuje exonukleáza, která odštěpuje jednotlivé nukleotidy. Nukleotidy charakteristicky narušují tok iontů přes nanopór.²⁰

Literatura:

1. Kircher M, Kelso J: *Bioessays* 32, 524 (2010).
2. Sanger F, Coulson AR: *J. Mol. Biol.* 94, 441 (1975).
3. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 (1977).
4. George KS, Zhao X, Gallahan D et al.: *J. Chromatogr. B* 695, 93 (1997).
5. Emrich CA, Tian H, Medintz IL, et al.: *Anal. Chem.* 74, 5076 (2002).
6. Herd DG, Fredlake CP, Barron AE: *Electrophoresis* 29, 4618 (2008).
7. Dressman D, Yan H, Traverso G, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8817 (2003).
8. Shendure J, Hanlee J: *Nat. Biotechnol.* 26, 1135 (2008).
9. Fedurco M, Romieu A, Williams S, et al.: *Nucleic Acids. Res.* 34, e22 (2006).
10. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P: *Science* 281, 363 (2003).
11. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al.: *Nature* 437, 376 (2005).
12. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al.: *Nature* 456, 53 (2008).
13. Tomkinson AE, Vijayakumar S, Pascal JM, et al.: *Chem. Rev.* 106, 687 (2006).
14. Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T, et al.: *Genome. Res.* 18, 1051 (2008).
15. <http://www.iontorrent.com/>
16. Braslavsky I, Hebert B, Kartalov E, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3960 (2003).
17. Eid J, Fehr A, Gray J, et al.: *Science* 323, 133 (2009).
18. Krivanek OL, Chrisholm MF, Nicolosi V, et al.: *Nature* 464, 571 (2010).
19. Blow N: *Nat. Methods* 5, 267 (2008).
20. <http://www.nanoprotech.com/>
21. Derrington IM, Butler TZ, Collins MD, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16060 (2010).
22. Polonsky S, Rossnagel S, Stolovitzky G: *Appl. Phys. Lett.* 91, 153103 (2007).
23. Luan B, Peng H, Polonsky S, et al.: *Phys. Rev. Lett.* 104, 238103 (2010).

Souhrn

Oborský P. : Sekvenování DNA

Druhá a třetí generace sekvenování DNA přinášejí nebo mají potenciál zlepšení důležitých parametrů jako je přesnost, rychlost nebo cena. Každá z konkrétních metod je zaměřena na různé dlouhé fragmenty DNA. Metody první generace vycházejí ze Sangerovy metody. Metody druhé generace k sekvenaci využívají stejný přístup jako generace první a to syntézu komplementárního vlákna, ale liší se principem získání signálu (pyrosekvenování), terminací (pyrosekvenování, sekvenace s využitím reversibilních terminátorů, sekvenace ligací), či způsobem syntézy komplementárního vlákna (sekvenace ligací). Třetí generace přináší i metody s jiným přístupem než je syntéza komplementárního vlákna a to sekvenování přímým zobrazením v elektronovém, či tunelovém mikroskopu a sekvenování pomocí přechodu DNA, nebo jednotlivých nukleotidů přes nanopór. Zatímco některé metody třetí generace jsou stále ve vývoji, jiné metody jsou již komerčně dostupné.

Klíčová slova: sekvenování DNA, první generace, druhá generace, třetí generace

Summary

Oborský P. : DNA sequencing

Second and third generation of DNA sequencing bring improvement in important parameters such as accuracy, speed and price. Every specific method is focused to the specific length of DNA fragments. The methods of first generation are based on Sanger's principle. The methods of second generation are based on the same approach towards sequencing as the first generation i.e. synthesis of complementary strands. Difference between the first and second generations is in the gaining signal (pyrosequencing), termination (pyrosequencing, The Solexa, SOLiD) or in manner of the sequencing complementary strand (SOLiD). The third generation brings methods with different approach, i.e. sequencing through direct display using electron or tunneling microscope and sequencing by DNA strand, or separate nucleotides passing nanopore. Some of the methods of the third generations are still in the development stage, some are already available.

Keywords: DNA sequencing, first generation, second generation, third generation

Pro průchod celé DNA se využívá systému, kde je v lipidové dvouvrstvě Porin A. Problémem je příliš rychlý přechod vlákna přes pór převyšující rychlost spolehlivé detekce.²¹

Další struktura nanopóru navržená firmou IBM pro průchod celé DNA je pór, kde se v podélných vrstvách střídá kov a dielektrikum. Vhodným modulováním proudu prochází DNA přes nanopór. Zbývá jen dořešit rozeznání signálu jednotlivých bazí.^{22,23}

Závěr

Původní přístup sekvenování DNA pomocí komplementární syntézy druhého vlákna byl postupně vyvíjen a obměňován v prvních i druhých generacích sekvenování, zatímco třetí generace se vydala i jinými přístupy. Zdá se, že vývojem postupů druhé i třetí generace se otevírají možnosti levnější, rychlejší nebo přesnější sekvenace.

JSOU EPIGENETICKÉ ZMĚNY DNA PŘÍČINOU VZNIKU DIABETU TYPU II?

Pavla Táborská

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, pavla.horejsi@seznam.cz

Úvod

Diabetes mellitus typu II (dříve noninsulin-dependentní diabetes mellitus (NIDDM) nebo diabetes dospělých) je závažné metabolické onemocnění, jehož výskyt ve vyspělých zemích neustále narůstá spolu s obezitou. V roce 2010 mělo onemocnění 285 milionů lidí ve srovnání s 30 miliony nemocných v roce 1985.^{1,2} Podstatou choroby je relativní nedostatek insulinu spojený s insulinovou resistencí, což je snížená citlivost tkání vůči insulinu. Oproti tomu diabetes mellitus typu I souvisí s absolutním nedostatkem insulinu z důvodu destrukce beta buněk v pankreatu. Diabetes typu II tvoří přibližně 90 % všech případů diabetu.

Insulin

Insulin je peptidový hormon, který hraje důležitou úlohu nejen v metabolismu glukosy, ale také tuků i bílkovin a jako takový je pro život nezbytný. Jeho klíčová úloha spočívá především v umožnění vstupu glukosy do buněk a udržování správné hladiny cukru v krvi. Tvoří se v β buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu. Je složen ze dvou peptidových řetězců (A a B), spojených dvěma disulfidovými můstky, třetí disulfidový můstek je uvnitř řetězce A. Rozštěpení obou disulfidových můstků mezi řetězci A a B ruší biologickou aktivitu insulinové molekuly.

Příznaky diabetu typu II

Z počátku onemocnění mohou být příznaky nevýrazné a často dochází k záchytu onemocnění náhodou. Mezi typické příznaky patří nadměrná žízeň, časté močení, zvýšený příjem tekutin a nadměrný pocit hladu, únava. Někdy bývá přítomno nechutenství a hmotnostní úbytek. Může se objevit neostře vidění a pocit mravenčení v různých částech těla.³

Příčiny vzniku diabetu typu II

Příčiny vzniku této choroby nejsou ještě zcela objasněny, působí zde genetické faktory. Klíčovou úlohu zde hraje také nesprávný životní styl, obezita, stres, kouření, nedostatek pohybu, nadměrný příjem kalorií, zejména tučného masa a další civilizační choroby.

Komplikace diabetu typu II

Komplikace spojené s vysokou hladinou glukosy v krvi zahrnují poškození ledvin, poškození sítnice, poškození nervů, srdeční onemocnění, mozkovou mrtvici, poškození tkání končetin, vedoucí až k jejich amputaci.

Epigenetika

Epigenetika je podobor genetiky, který studuje změny v genové expresi (a tedy obvykle i ve fenotypu), které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA. Epigenetické faktory ovlivňují fenotyp bez změny

genotypu. Epigenetická informace je přenášena z jedné generace na další generace jak na buněčné úrovni, tak na úrovni organismu bez zakódování této informace do nukleotidové sekvence. Předávání informace je podmíněno buněčnou pamětí. Epigenetické mechanismy jsou spontánní a reversibilní. Mohou být indukovány genetickými faktory i faktory prostředí. Epigenetické procesy zasahují na úrovni transkripční aktivity genů (DNA metylace, modifikace histonů) i na úrovni postranskripční (RNAi).

Epigenetické změny DNA

1. DNA metylace

DNA metylace je typ modifikace DNA, která je děděna beze změny sekvence DNA. Počet a uspořádání metylovaných cytosinů ovlivňuje funkci genů, nízká metylace vede k vysoké aktivitě a naopak. Enzymy skupiny DNA-metyltransferas udržují po replikaci DNA identický typ metylace, jaký byl před replikací.

Přibližně 60 – 70 % CpG je metylováno. CpG jsou seskupeny do shluků, ostrůvků, které jsou přítomny v oblasti promotoru, což je regulační oblast mnoha genů na straně 5'-konce.

DNA metylace genu *PGC-1 α* (*PPARGC1A*)

Gen *PGC-1 α* je zapojen do regulace genů energetického metabolismu. V jedné studii byla zjištěna zvýšená metylace v buňkách pankreatu diabetiků typu II. Snížená exprese mRNA měla souvislost s nižší sekrecí insulinu.⁴ V dalších studiích byly zkoumány rizikové faktory diabetu – fyzická inaktivita a nízká porodní váha, na změny exprese téhož genu.^{5,6} Ve všech případech byla zjištěna zvýšená metylace genu, která vedla ke snížené expresi mRNA.

2. Modifikace histonů

Utlumení transkripční aktivity na úrovni modifikace histonů vede k vytváření transkripčně neaktivního heterochromatinu. Struktura chromatinu je velmi důležitá pro regulaci transkripce.

NH₂-skupina lysinu má basický charakter, a proto se lysiny mohou vázat s negativně nabitými fosfáty DNA. Iontovou vazbou se DNA v oblasti lysinů těsně váže k histonům a tím se zamezí transkripci. K zesílení útlumu transkripční aktivity dále dochází i za přítomnosti proteinů, které se mohou vázat k metylovaným CpG. Tyto proteiny stimulují deacetylasy histonů a v kooperaci s dalšími proteiny modulují histony a dochází tak k tvorbě inaktivního chromatinu.

Acetylase histonů, které tvoří nukleosom, představuje regulační mechanismus transkripce genů. Acetylase lysinů v histonech eliminuje jejich pozitivní náboj a těsná interakce DNA-histon se poruší. Transkripční faktory tak mají k DNA přístup, umožní funkci RNA-polymerasy a transkripce genů může nastat.

Histon-acetyltransferasy a histon-deacetyltransferasy

Bylo zjištěno, že histon-acetyltransferasy (HATs) a histon-deacetyltransferasy (HDACs) v souvislosti s diabetem hrají klíčovou roli. Speciálně SIRT1 (HDACs) ovlivňuje několik faktorů souvisejících s metabolismem, adipogenesí a sekrecí insulinu. Zdá se, že histonová acetylace podporuje genovou expresi spojenou s diabetickým stavem. Ukázalo se, že kultivace monocytů při vysoké koncentraci glukosy vede ke zvýšené acylaci histonů na promotorech COX-2 a TNF genů. To vede ke zvýšené genové expresi. K podobně zvýšené histonové acylaci těchto promotorů dochází u diabetiků při porovnání se zdravými dobrovolníky.⁷

3. Postranskripční utlumení aktivity genu – (RNAi) interference

Postranskripční utlumení aktivity genů má vztah k funkci mRNA. Pokud dojde k destrukci mRNA, neproběhne translace a nedojde k tvorbě produktu genu. Tento typ utlumení endogenních genů je pravděpodobně evolučně velmi starý jev, který chránil organismus např. před infekčními viry.

RNAi je jeden z epigenetických mechanismů vyvolaný přítomností určitých fragmentů dvouvláknové RNA (dsRNA). dsRNA je enzymově separována na dvě samostatná vlákna, která jsou schopná zničit jednovláknovou RNA buňky obsahující komplementární oblasti k fragmentu dsRNA.

miRNA

miRNA neboli microRNA jsou jednovláknové řetězce nekódující RNA o délce 21 – 23 nukleotidů, které se podílejí na regulaci genové exprese. Molekuly miRNA jsou komplementární k části jedné nebo několika mRNA. Když se spárují odpovídající řetězce miRNA a mRNA, je obvykle inhibována translace této mRNA v protein.⁷ Špatná funkce či regulace miRNA může způsobit v některých případech vážné choroby.

Literatura:

1. Williams textbook of endocrinology, 12th ed., Philadelphia: Elsevier/Saunders 1371 (2012).
2. Smyth S, Heron A: *Nat Med* 12 (1), 75 (2006).
3. Vijan S: *Ann Inter Med* 152 (5) ITC31–15; quiz ITC316 (2010).
4. Ling C, et al.: *Diabetologia* 51 (4), 615 (2008).
5. Alibegovic AC, Sonne MP, Hojbjerre L, et al.: *Am J of Physiol – Endocrinol and Metab* 299 (5), E752 (2010).
6. Brøns C, Jacobsen S, Nilsson E, et al.: *J Clin Endocrinol Metab* 95 (6), 3048 (2010).

Souhrn

Táborská P. : Jsou epigenetické změny DNA příčinou vzniku diabetu typu II?

Diabetes mellitus typu II je závažné metabolické onemocnění, jehož výskyt ve vyspělých zemích neustále narůstá v závislosti na obezitě. Bylo zjištěno, že epigenetické změny, jako je metylace DNA, histonová modifikace a RNA interference regulují expresi genů. Tyto epigenetické mechanismy mají souvislost s vývojem diabetu typu II.

Klíčová slova: diabetes mellitus typu II, epigenetika, epigenetické změny

Summary

Táborská P. : Is there relation between epigenetic changes in DNA and development of diabetes type II?

Diabetes mellitus type II is a serious metabolic disorder. Rates of type 2 diabetes have increased markedly in parallel with obesity. It has been found that epigenetic changes are involved in the regulation and expression of genes such as DNA methylation, histone modification and RNA interference. These epigenetic mechanisms are linked to diabetes type II.

Keywords: diabetes mellitus type II, epigenetics, epigenetic changes

miR-375 (miRNA) je specificky exprimována v buňkách Langerhansových ostrůvků a inhibuje sekreci insulinu inhibicí exprese proteinu myotrofinu. Zvýšená exprese miR-375 může kompletně potlačit glukosou indukovanou sekrecí insulinu.⁸ Dále bylo zjištěno, že zvýšená hladina miR-9, další miRNA, vede k vážným defektům glukosou stimulované sekrece insulinu.⁹

Experiment na myších:

Dědění sklonu k diabetu po otci?

V experimentech provedených na laboratorních myších vyšlo najevo, že vysoký příjem tuků a následná obezita vyvolávají epigenetické změny ve spermiích. Potomstvo obézních otců postižených dysfunkcí beta-buněk pankreatu dědí s těmito epigenetickými změnami rovněž silný sklon k dysfunkci beta-buněk. A to i v případě, že potomstvo není krmeno dietou s vysokým obsahem tuku a není zatíženo obezitou.

Samci získali působením podmínek vnějšího prostředí (stravy) nové vlastnosti – obezitu, narušenou toleranci ke glukose a sníženou citlivost k inzulinu. Dispozici k těmto změnám pak předali v dědičné informaci potomstvu.

Sekvence příslušných genů se u otců ani jejich potomků nezměnily. Dědění dispozic je pravděpodobně dáno epigeneticky, tedy změnami, jež proběhly „na povrchu“ dvojité šroubovice DNA a změnily expresi příslušných úseků dědičné informace.¹⁰

Závěr

Z uvedených experimentů vyplývá, že změny v prostředí nebo ve výživě jsou schopny aktivovat nebo deaktivovat transkripci různých genů. Životní styl rozhoduje o tom, které geny budou „zapnuty“ a které budou „vypnuty“. Epigenetické změny se podílí na vzniku diabetu typu II.

7. Villeneuve LM, Natarajan R: *Am J Physiol Renal Physiol* 299 (1), 14 (2010).
8. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeld J, et al.: *Nature* 432 (7014), 226 (2004).
9. Muhonen P, Holthofer H: *Nephrol Dial Transplant* 24(4), 1088 (2009).
10. Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, et al.: 467(7318), 963 (2010).

BIOINSEKTICIDY

Kristýna Poncová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, k.poncova@gmail.com

Úvod

Pěstované plodiny ohrožuje asi 30 000 druhů plevelu a 10 000 druhů hmyzu. Používání pesticidů zachrání ročně asi 40% zemědělské produkce, přičemž insekticidy hrají nezastupitelnou úlohu.¹ Dříve se používaly hlavně syntetické chemické insekticidy, které mají dozajista mnoho výhod, ovšem mohou negativně ovlivňovat lidské zdraví a životní prostředí, což je v dnešní „bio-eko“ době opravdu pádný argument. Naštěstí existují alternativní metody ochrany pěstovaných plodin, a to bioinsekticidy – neboli insekticidy obsahující mikroorganismus či jeho sekundární metabolit s žádaným účinkem. Jejich velkou výhodou představuje to, že vykazují selektivní toxicitu téměř výhradně na hmyz, a to ještě na přesný druh, takže neovlivňují například hmyz prospěšný. Reprezentují je druhy napříč celou říší – jedná se o bakterie, viry, prvoky, plísně a hlísty a jimi produkované toxiny. V současné době bylo poznáno asi 1500 přirozeně se vyskytujících entomogenních druhů, insekticidní účinek má asi 100 zástupců.

Mechanismus jejich účinku se liší; tak například entomopatogenní bakterie a viry způsobují septikémii po průniku do trávicího traktu hostitele – množí se v něm a produkují toxiny. Entomopatogenní houby zase produkují spory, které klíčí a prorůstají tělem hostitele, čímž ho usmrtí.

Na následujících stránkách se dočtete něco krátce o historii mikrobiálních insekticidů, přehled nejčastěji používaných insekticidních druhů, jejich hlavní výhody a nevýhody a v neposlední řadě i o slibných výzkumných směrech v této oblasti.

Tabulka I.: Výhody a nevýhody bioinsekticidů.²

Výhody BI	Nevýhody BI
Vysoká specifita na cílový organismus	Pouze 100 známých látek Asi 20 látek EPA registrováno
Žádný efekt na prospěšné hmyzí populace	Pomalá smrt (někdy až 20 dní)
Neukládají se v životním prostředí	Nestálé v životním prostředí
Vhodné k biotechnologické přípravě	Nevhodné na kontrolu více škůdců najednou
Obtížný vznik resistance Žádná fytoxicita	Citlivost na UV, teplotu, vyschnutí

Historie

Ač první plísňové insekticidní účinky na bource morušového popsal už Aristoteles ve svém díle *Historia Animatum* ve čtvrtém století před naším letopočtem, k jejich rozšíření a velkoplošnému používání bylo ještě velice daleko. Více se toto odvětví začalo rozvíjet v 18 – 19. století, kdy již řada vědců přišla s popisem insekticidních účinků některých plísní. Zvláště v tomto ohledu proslul Ital Agostino Bassi, jemuž se také dodnes

prezdívá otec hmyzí patologie. Společně s Pasteurem shromáždili poznatky, od kterých byl pak již jen krůček ke kontrolovanému využívání mikrobiálních zdrojů k ochraně zemědělské produkce.³

Opravdu se toho však začalo využívat teprve s objevem insekticidních účinků bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt), objevené Ernstem Berlinerem v Thuringenské oblasti, na jejíž počest také nese tato bakterie název. Dodnes se tento bakteriální kmen používá jako standard pro jednotku insekticidní aktivity (HD-1).⁴ V roce 1991 bylo v USA zaregistrováno již 33 patentů a Bt gen byl izolován a vnášen do řady rostlinných buněk. V současné době existuje řada poddruhů této bakterie, přičemž každý z nich vykazuje insekticidní účinek na něco jiného, viz sekce Bakteriální insekticidy.

Viry jako bioinsekticidy mají mnohem pomalejší historii vývoje. První pozorování insekticidního účinku v závislosti na virové infekci pozorovali v larvách bource morušového v roce 1856 A. Maestri a E. Cornalia. V roce 1926 se pak podařilo popsat francouzskému vědci A. Paillotovi kompletně celý proces virové infekce evropského běláška řepového. V roce 1975 pak Edward Steinhaus položil opravdové základy využití virů jako bioinsekticidů.²

Bakteriální insekticidy

Následující krátký přehled bakteriálních insekticidů ani zdaleka není vyčerpávající, ovšem postihuje základní zástupce v této oblasti.

Bacillus thuringiensis

Jedná se o G+ bakterii hojně se vyskytující v půdě, tvořící eliptické spory a současně o nejvíce využívaný bakteriální kmen pro tyto účely. Insekticidní vlastnosti jsou připisovány **δ-endotoxinu, který se syntetizuje během sporulace. Jinak se mu také říká crystal protein nebo také Cry protein, kódovaný cry geny, jež jsou lokalizovány na plasmidu.** Cry toxiny jsou specifické a jsou aktivní na celou řadu můr, molů a na mnoho housenek škůdců, včetně importovaných housenek ožirajících listy hlávkové zeleniny, housenek píďalek (kapusta), lišaje, zavíječe kukuřičného, předivky polní, vakonošum a bekyni velkohlavé. Menší účinky má na zavíječe jablečného a broskvového a na vrtáka révového. Varianta Bt *tenebrionis* zaznamenala účinky proti larvám mandelinky bramborové a larvám brouka napadajícího listovní jilmů. Varianta Bt *izraelensis* se prodává proti muchničkám, komárům a pakomárům, varianta Bt *aizawai* se používá pro kontrolu larev zavíječe voskového ve včelích úlech a proti jiným housenkám.^{5,6}

Nejvíce vnímavé jsou obvykle mladé larvy. Určení, kdy je většina škůdců ve vnímavém vývojovém stadiu, je většinou klíčovým krokem aplikace. Ne všechny druhy housenek jsou náchylné k infekci Bt. Účinky Bt mohou být deaktivovány působením UV záření ze slunečního světla a zůstávají aktivní pouze po dobu 2 – 3 dnů.

Účinek Cry toxinů se projeví po požití hmyzem, kdy se působením alkalického pH v hmyzím trávicím traktu protein aktivuje. Po aktivaci tyto toxické proteiny působí nikoli nepodobně antimikrobiálním peptidům – membranolyticky, to znamená, že tvoří v membránách póry. Jejich velkou výhodou je selektivita na škodlivé druhy hmyzu. Lze je používat jednak formou postřiku na rostliny, či lze do rostlin přímo zabudovat gen, podle kterého se budou exprimovat Cry proteiny. Toto poprvé vyrobila v roce 1985 firma Plant Genetic Systems – vyvinula geneticky modifikovaný tabák, který exprimoval Cry proteiny.² Jedním z nejznámějších případů plodiny exprimující Bt toxin je Bt kukuřice, v ČR povolená od roku 2005 (kmen MON810), účinkující proti zavíječi kukuřičnému (viz obrázek 1) (*Ostrinia nubilalis*).⁷ Dále se také hlavně v USA pěstuje Bt bavlník (více než 70 % obdělávané půdy s bavlníkem v USA).



Obr. 1: Housenka zavíječe kukuřičného ve stonku.⁸

První použití Bt jako pesticidu bylo ale již v roce 1958, tedy o téměř 30 let dříve než GM plodiny, a od té doby se na trhu vyskytuje nepřeberné množství produktů, odvozených od Cry-proteinů, jichž bylo v dnešní době identifikováno více než 150. Patří sem například produkty Bactur, Bactospine, Bioworm, Dipel, Futura, M-One, M-Track, LarvX.

Bacillus sphaericus

G⁺ striktně aerobní bakterie, postrádá glukosový metabolismus. Byla prvně izolována v polovině 60-tých let z komárů, much a kobytek. Dělí se na řadu různých kmenů, produkujících různě účinné toxické intracelulární proteiny – například BinA, BinB a 100kDa proteiny Mtx (Mtx 1, 2 a 3). Tyto posledně jmenované toxiny vykazují homologii s ADP-ribosyl transferázovým typem toxinů a jsou lokalizovány na membráně.

Dále využívané jsou například *Paenibacillus popilliae* a *Paenibacillus lentimorbus*, jež se dříve hromadně nazývaly *Bacillus*. Jejich velkému rozšíření brání hlavně nutnost kultivace *in vivo* v hemolymfě hmyzu; *in vitro* kultivace neprobíhala úspěšně ve velkém měřítku. V současné době se používají hlavně proti larvám listokazu japonského.²

Víry jako bioinsekticidy

Existuje kolem 700 dosud poznáných virů, specifických pro bezobratlé – nejvíce jich je proti Lepidoptera – 560 (motýli), dále pak Hymenoptera (blanokřídli – například vosy, mravenci – asi 40), Orthoptera (rovnokřídli – kobylky) a Diptera (dvoukřídli – například mouchy). Všechny tyto viry mají potenciál jako bioinsekticidy a desítky z nich se také tak využívají. Jedná se jak o RNA, tak i o DNA viry, ss (single stranded) i ds (double stranded), s velikostí napříč celým spektrem. Nejvýznamnější je však čeleď *Baculoviridae* se 2 rody s insekticidním účinkem, a to Nukleopolyhedrosis viry (NPV) a Granuloviry (GV). NPV napadají housenky píďalek, kukuřičné housenky, housenky napadající hlávkovou zeleninu, bavlnu, tabák, housenky zavíječe kukuřičného a housenky škodící na jehličnanech. Granuloviry byly izolovány z několika druhů housenek snovačů, komárů, housenek hlávkové zeleniny a mnoha dalších.

K infikování hostitele dochází většinou požitím, po němž následuje uvolnění virionu z okluzních tělísek v trávicím traktu hmyzu. Smrt nastává v závislosti na stadiu vývoje hmyzu a množství pozřených virů od 48 hodin až do jednoho týdne. Přirozeně se vyskytující viry napadají housenky většiny nejzávažnějších škůdců. Viry nepříznivě ovlivňuje UV záření, a proto je jejich aplikace nejvhodnější později odpoledne.⁹

V současnosti se virové bioinsekticidy vyrábí *in vivo* kultivací, ač *in vitro* příprava je také možná, ale je velice nákladná. Dostatečné množství purifikovaného viru kontaminuje potravu podávanou hmyzím larvám, které po jejím požití zemřou dříve, než dosáhnou dospělosti. Poté jsou sesbírány, semlety a je z nich vytvořen insekticidní prášek či tekutý koncentrát na postřik. Někdy se do formulací také přidává sojový olej či kvasničný extrakt, aby se podpořila trvanlivost insekticidního preparátu.

Jejich nevýhodou je, že ohrožují pouze rostlinu kousající hmyz, a nikoli hmyz, který rostlinu vysává, neboť přes kutikulu kusadel se virus aplikovaný na povrch rostliny nedostane.

Některé z produktů jsou například CYD-X pro obaleče jablečného (Medex pro distribuci pro ČR), Neocheck-S pro hřebenuli ryšavou.

Plísň jako bioinsekticidy

Nejvýznamnější charakteristikou této skupiny je obsah chitinu v jejich buněčné stěně. Také mechanismus vyvinutí resistance k houbovým insekticidům patří mezi nejméně pravděpodobné.

Houbové onemocnění zpravidla začíná uchycením spor na těle hostitele. Za vhodných podmínek (záleží hlavně na teplotě a vlhkosti) dojde k jejich klíčení, přičemž klíčící konidie může na konci klíčku vytvářet různé penetrační struktury (např. zduřelou špičku klíčku či extracelulární pouzdro). Z těchto struktur se dále formuje



Obr. 2: Hmyz infikovaný *Beauveria bassiana*.¹⁰

penetrační hyfa, která proniká do těla hostitele a vykazuje velkou biochemickou aktivitu – produkuje řadu enzymů – chitináz, proteáz a kolagenáz. Smrt hmyzu je tedy způsobena úplnou destrukcí jeho tkání. Tímto okamžikem také končí parazitická fáze a začíná fáze saprofytní, houba prorůstá na povrch těla, mumifikuje usmrčený hmyz a vytváří fruktifikační orgány. Tato fáze končí úplnou sporulací a opětovným šířením spor, nejčastěji pasivně za pomoci vzduchu a vody.²

Zmíním jen pár zástupců, například *Beauveria bassiana* (pojmenovaná na počest zde již zmíněného A. Bassiho) – jedná se o entomopatogenní houbu,

Literatura:

1. <http://www.croplifeamerica.org/crop-protection/pesticide-facts>, staženo 29. 1. 2013
2. Schaechter M, et al: Encyclop. Microbiol. 3rd edition. Elsevier Inc., 2009.
3. Tanada Y, Kaya HK: Academic Press Inc., San Diego 1993.
4. Dulmage HT: *Bull. ESA* 19, 4 (1973).
5. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3), 775 (1998).
6. Saraswathy N, Kumar PA: *Electron J. Biotech.* 7, 2 (2004).

Souhrn

Poncová K.: Bionsekticidy

Bioinsekticidy jsou moderní prostředky boje proti hmyzím škůdcům, které mají oproti chemickým prostředkům řadu výhod. Nezpůsobují například resistenci hmyzích druhů, jsou šetrné k životnímu prostředí, neohrožují člověka a ani prospěšné druhy hmyzu. Radíme mezi ně bakteriální, virové a plísňové hmyzí patogeny, jejichž přehled je shrnut v tomto článku.

Klíčová slova: bioinsekticidy, Bt toxin, GMO rostliny, škůdci, *Beauveria bassiana*.

Summary

Poncová K.: Bioinsecticides

Bioinsecticides form a group of modern agents against insect pests. They offer several advantages over chemical insecticides. Among them for instance: safety to non target organisms, including beneficial insects, they are environmentally friendly and they do not cause resistance. They can be divided into 3 groups, entomopathogenic bacteria, viruses and fungi.

Keywords: bioinsecticides, Bt toxin, GMO plants, pests, *Beauveria bassiana*.

přírozně se vyskytující v půdě. Infekce je podporována teplým, vlhkým počasím. Infikované larvy se zbarví do šedo-bílé barvy. *Beauveria* je používána jako insekticid v mnoha zemích. Má rozsáhlý hostitelský okruh, který zahrnuje důležité škůdce jako jsou molice, mšice, kobylky (můžete vidět na obrázku č.2), termiti, mandelinka bramborová, nosatec paličkový, štěnice, kůrovci, zavíječ jablečný, kukuřičný, atd. V ČR se používá v boji proti kůrovci na Šumavě.⁹

Aschersonia aelrodís – účinná na molici citrusovou, poprvé použita na Floridě, zachráněny velké plantáže citrusů. Vyskytuje se přírozně hlavně v tropických a subtropických oblastech.¹¹

Verticillium lecanii je další z kosmopolitních hub parazitujících na hmyzu. Produkuje toxin bassianolid, který je toxický na bource morušového, některé z poddruhů účinkují také na molici citrusovou.

Závěr

Z textu je zřejmé, že vývoj a používání nových bioinsekticidů je nezbytnou součástí trvale udržitelného rozvoje naší planety. Stále narůstající populace a nutnost minimalizace negativních dopadů používání insekticidů na životní prostředí dává jasný signál, proč investovat do výzkumu a vývoje nových bioinsekticidů. Vždyť právě chemické insekticidy patří do skupiny s největším dopadem na životní prostředí. Nezbývá než doufat, že tento vývoj bude úspěšný.

7. http://www.agroweb.cz/Geneticky-modifikovana-kukurice-v-Ceske-republice__s263x32116.html, staženo 10. 12. 2012.
8. http://www.zipcodezoo.com/hp250/Ostrinia_nubialis_16.jpg, staženo 10. 12. 2012.
9. Šedrllová A.: Diplomová práce. MU, Brno 2008.
10. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/staženo> 29. 1. 2013.
11. Liu M, Chaverri P, Hodge K: *Mycol. Res.* 110, 537 (2006).

MOŽNOSTI PREDIKCE PROGRESE ALZHEIMEROVY CHOROBY

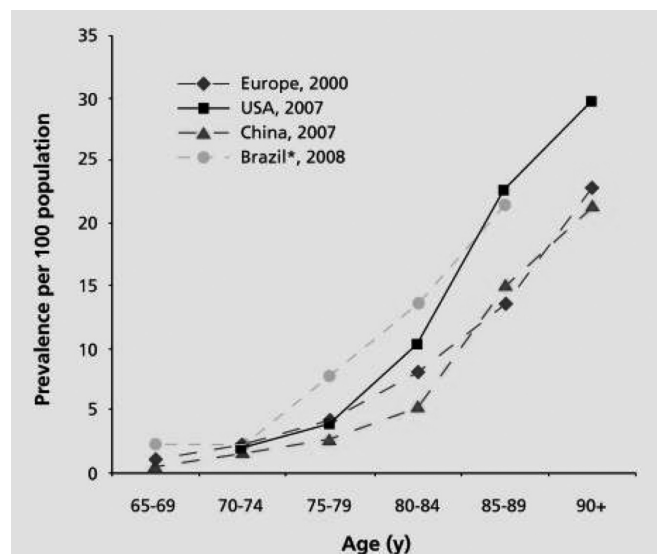
Kateřina Čížková

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, cizkovat@vscht.cz

Alzheimerova choroba (dále jen AD) je neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém dochází k postupné demenci. Vůbec poprvé toto onemocnění popsal Alois Alzheimer roku 1906. Důležitou skutečností je fakt, že AD začíná latentně, asi o 10 – 20 let dříve, než se objeví první klinické příznaky. Vzhledem k omezeným diagnostickým možnostem bývá AD rozpoznána většinou až v době, kdy již v mozku proběhly významné, většinou nevratné změny. Samotný nástup nemoci je plíživý, nejčastěji kolem 65. roku věku. Změny chování provází emoční nestabilita, narůstá porucha paměti (zvláště pro nové poznatky) a objevují se nepřesnosti při běžné práci. Dochází ke ztrátě úsudku, pacient se přestává orientovat v čase i prostoru, kognitivní funkce se dále zhoršují a pacient se stává naprosto závislým na svém okolí. Výjimkou nejsou ani nekognitivní poruchy jako deprese, halucinace, agresivita a epileptické záchvaty. Častá je i anozognozie (tj. neschopnost uvědomit si vlastní onemocnění), která je důvodem, proč mnoho pacientů léčbu odmítá. V pokročilém stadiu onemocnění pacienti nejsou schopni dorozumět se s okolím, bývají apatičtí, přestávají poznávat přátele či příbuzné. Nakonec přijdou i o schopnost udržet oční kontakt s lidmi, kteří o ně pečují. Dochází k celkovému rozpadu osobnosti, ztrátě řeči a inkontinenci. Pacient s AD většinou umírá po 7 až 10 letech od stanovení diagnózy.

Rizikové faktory a výskyt

Mezi hlavní rizikové faktory patří věk. Stejně jako se zvyšuje počet obyvatel starších 65 let – podle odhadů jejich počet v celosvětovém měřítku vzroste ze 420 milionů (v roce 2000) až na 1 bilion (v roce 2030) – zvyšuje se i výskyt pacientů s AD (viz. Obr.1). Na grafu si lze povšimnout, že nejvíce pacientů s AD se vyskytuje v USA (celkem 5,4milionů obyvatel), za ní se řadí Evropa (především západní) a Čína. Naopak v Indii,



Obr. 1: Prevalence Alzheimerovy choroby (na 100 obyvatel) v závislosti na věku. *zahrnuje všechny typy demence (Qui Ch. 2009).

Africe nebo Latinské Americe je výskyt tohoto onemocnění podstatně menší (o více než polovinu).

Dalšími rizikovými faktory jsou genetické dispozice (v centru zájmu výzkumu je hlavně alela APOE ϵ 4), vysoký krevní tlak, vysoké BMI, cukrovka, ale také úroveň vzdělání a sociální aktivita. Mezi méně významné patří životní styl – kouření, konzumace alkoholu a omamných látek, stravovací návyky apod.

Léčba

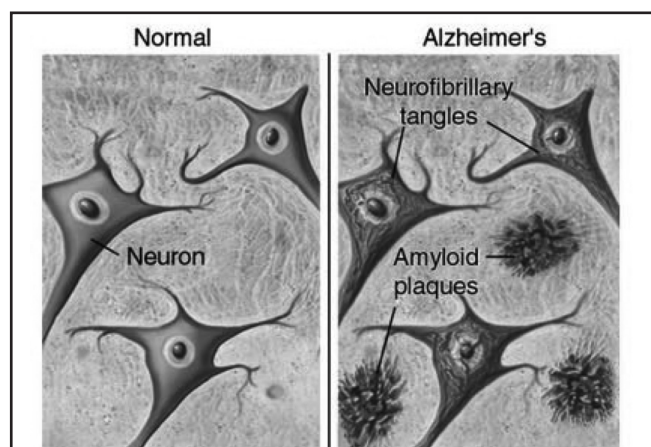
Zatím nebyl objeven lék, který by dokázal postup nemoci úplně zastavit, nicméně jsou možnosti, jak zpomalit její průběh. Mezi hlavní patří zlepšení metabolismu mozku (podáváním hormonů), ovlivnění acetylcholinergního systému (inhibitory acetylcholinesteras), eliminace τ -proteinu (většina těchto léčiv je ve fázi klinického testování) a likvidace volných radikálů (podáváním antioxidantů).

Diagnostika

Jedinou možností, jak diagnostikovat AD se 100% jistotou je histologické vyšetření mozkové tkáně pacienta. Anatomické změny zahrnují redukci hmotnosti a velikosti mozku (zejména spánkového laloku), dále úbytek neuronů a synapsí, a v neposlední řadě poškození entorhinální kůry. Mikroskopické změny jsou senilní plaky tvořené β -amyloidem a neurofibrilární klubka tvořená hlavně proteinem τ (Obr. 2).

Pro správnou diagnostiku je velmi důležité odlišit od sebe normální projevy stárnutí, symptomy AD a stadium, které se nachází mezi nimi – MCI. MCI (anglicky mild cognitive impairment) znamená mírnou kognitivní poruchu, kdy jsou sice zhoršeny kognitivní funkce (jako paměť, schopnost koncentrace, komunikace a orientace), ale nemá vliv na každodenní aktivity (jako je oblékání, koupání, apod.). Nicméně rizikové faktory a mozkové změny jsou u AD a MCI velmi podobné; u většiny pacientů s MCI se AD vyvine do pěti let.

AD se diagnostikuje podle mezinárodních kritérií, jsou zde 3 hlavní metody – neuropsychologické testy –



Obr. 2: Mikroskopické změny v mozku pacienta s Alzheimerovou chorobou (American Health Assistance Foundation 2012)

vání, zobrazovací metody a využití biomarkerů. Samozřejmě součástí je základní neurologické a fyzikální vyšetření. Protože neexistuje žádný dostatečně spolehlivý a jednoduchý test, lékaři se zpočátku soustředí na vyloučení ostatních možných onemocnění, které by odpovídaly symptomům. Jedná se zejména o mozkovou mrtvici, mozkový nádor, tepenná výduť, infekci, poškození mozku po úrazu hlavy, apod.

Neuropsychologické testování

Pomocí neuropsychologických testů lze získat informace o vztahu mezi mozkem a chováním a určit tak úroveň případného poškození. Zvláštní pozornost je věnována kognitivním funkcím a aktivitám denního života (ADL = Activities of Daily Living), dále se hodnotí poruchy chování a jiné psychiatrické potíže. Mezi hojně využívané testy patří CANTAB (Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery), který zahrnuje 13 nezávislých testů, s jejichž pomocí lze nejen určit úroveň poškození, ale i odhalit případné varovné signály před vypuknutím nemoci. Dalšími jsou ADAS-Cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive), který prověřuje pozornost, jazykové schopnosti, orientaci a paměť; Blessed Test zaměřený na každodenní aktivity a COGNISTAT (Neurobehavioral Cognitive Status Examination), který zkoumá schopnost úsudku, jazykové vyjadřování a představivost ve dvou- a třídimenčním prostoru. Neuropsychologické testování nelze použít samo o sobě k určení správné diagnózy, vždy je nutné provést další testy.

Zobrazovací metody

Metody řazené do této kategorie využívají různých technik k získání obrazu struktury nebo funkce mozku (dle toho je dělíme na strukturní a funkční). K metodám, používaným v souvislosti s AD, patří magnetická rezonance, tzv. CT a PET.

NMR (nukleární magnetická rezonance) využívá radiových vln a silného magnetického pole k produkci detailního obrazu mozku. Pomáhá vyloučit jiná onemocnění, která odpovídají pacientovým symptomům, hlavně cévní mozkovou příhodu, tumor, mozkové infekce a poškození po úrazu. Dále ukáže strukturní změny, např. atrofii některých mozkových částí.

CT (computed tomography) umožní zobrazit mozek ve formě plošných řezů pomocí rentgenového záření (opět strukturní metoda). Stejně jako NMR se používá hlavně k vyloučení jiných příčin (cévní mozková příhoda, nádor, krevní sraženina).

PET (positron emission tomography) patří mezi funkční metody, dokáže detekovat např. metabolické změny v mozku, což je v souvislosti s predikcí AD velmi cenné. Má velký potenciál, protože lékaři jsou s její pomocí schopni identifikovat mozkové změny předtím, než sám pacient rozpozná obtíže. Lze určit, která část

mozku je poškozena a jak toto poškození souvisí s pacientovými symptomy. Protože AD většinou nevykazuje zpočátku změny, které by byly viditelné na CT a NMR, mohl by se využívat právě PET. Bohužel pro svou náročnost (lékařskou i finanční) ještě není rutinně využíván. Principem metody je detekce rentgenových paprsků, které jsou vyzářeny díky anihilaci pozitronů (uvolněných podaným radiofarmakem) a elektronů. Detekce je uspořádána tak, že lze vizualizovat aktivitu radiofarmaka v mozku. Využívaná radiofarmaka mají velmi krátký poločas rozpadu, radionuklidy ^{11}C (20 min), ^{13}N (10 min), ^{15}O (2 min) a ^{18}F (110 min) jsou integrovány do látek tělu vlastních (glukosa nebo voda). Nejčastěji se používá FDG (fluorodeoxyglukosa), kde je kyslík na pozici 2, nahrazen izotopem ^{18}F . FDG je pak vychytávána buňkami tím víc, čím je vyšší jejich metabolismus, to se na výsledných obrazech promítne barevnými změnami.

Biomarkery

Podle definice NIH (National Institutes of Health USA) je biomarker charakteristika, která je objektivně měřitelná a uznávaná jako indikátor normálních biologických či patologických procesů nebo odpovědí na terapeutickou intervenci. V souvislosti s AD se v ideálním případě jedná o látku, která je vysoce specifická (tzn. nevyskytuje se u zdravých osob), citlivá (začne se zvyšovat v samém počátku onemocnění), koreluje se stadiem choroby, koreluje s prognózou a má spolehlivou předpovědní hodnotu. Taková látka zatím bohužel neexistuje. Používanými biomarkery pro AD jsou β -amyloid, τ protein a neurální protein AD7C-NTP; všechny jsou detekovány v mozkomíšním moku. Ani jeden z nich není dostatečně specifický a citlivý, navíc je nutné provést invazivní vyšetření (lumbální punkci), které přináší další rizika.

V současnosti je pozornost zaměřena na nový biomarker – protein SAPP β (soluble amyloid precursor protein beta), který je znatelně zvýšen u pacientů s AD. Na základě mnoha experimentů byla vyvinuta metoda, která kombinuje hodnoty koncentrace proteinu SAPP β a proteinu τ . Tato predikce vykazuje 80%-ní úspěšnost. Zvýšená koncentrace proteinu SAPP β detekuje první fázi nástupu Alzheimerovy choroby, kdežto biomarkery používané v minulosti jsou spojeny s fázemi pozdějšími.

Závěr

Žádná z dosud používaných metod není sama o sobě dostatečně specifická a citlivá, aby mohla být použita k predikci Alzheimerovy choroby. Výzkumná centra, která se zabývají touto problematikou, nejčastěji kombinují různé přístupy (nejčastěji biomarkery a zobrazovací metody), a ačkoliv se mnoho z nich jeví jako potenciálně využitelných, je nutná ještě spousta času, než budou zavedeny do klinické praxe.

Literatura:

1. Iliev R: *Alzheimerova choroba z pohledu molekulární biologie*. 1, 4 (2010).
2. Chand MS, Sahadevan S: *Lancet. Neurol.* 4, 576 (2005).
3. Rabin LA, Wang C, et al.: *J. Am. Geriatric Soc.* 60, 1128 (2012).
4. Vondrejs V, Cápal C: *Vesmír* 83, 46 (2004).
5. Sunderland T, Hill J, et al.: *J. Am. Geriatric Soc.* 37, 725 (1989).
6. Heister D, Brewer JB, et al.: *Neurology* 77, 1619 (2011).

7. Perneczky R, Tsolakidou A, et al.: *Neurology* 77, 35 (2011).
8. Robbins T, Mueller J, et al.: *Dementia* 5, 266 (1994).
9. Knopman DS: *Alzheimer's disease and other dementias*. 24, 409 (2011).
10. Weiner MW, Veitch DP: *Alzheimers demet.* 1, 1 (2012).
11. Qiu CH, Kivipelto M, et al.: *Dialogues. Clin. Neurosci.* 11, 111. (2009).
12. Nordberg A, Rinne J, et al.: *Nat. Rev. Neurology* 6, 78 (2010).

Souhrn

Čížková K.: Možnosti predikce progresu Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, při kterém dochází k postupné demenci. Největším diagnostickým problémem je, že nemoc začíná již 10 až 20 let před objevením prvních příznaků, a že dosud neexistuje spolehlivý test, který by dokázal rozpoznat rané stadium AD. Jedinou možností, jak diagnostikovat AD se 100% jistotou je prozkoumat mozek pacienta po jeho smrti. Pro správnou diagnostiku je velmi důležité odlišit od sebe normální projevy stárnutí, symptomy AD a stadium, které se nachází mezi nimi – MCI. AD se diagnostikuje podle mezinárodních kritérií, jsou zde 3 hlavní metody – neuropsychologické testování, zobrazovací metody a využití biomarkerů. Žádná z dosud používaných metod není sama o sobě použitelná pro predikci Alzheimerovy choroby.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, neuropsychologické testy, zobrazovací metody, biomarkery pro AD

Summary

Čížková K.: Prediction of Alzheimer's disease progression.

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease leads to progressive dementia. The biggest diagnostic problem is that the disease begins 10 – 20 years before symptoms and that reliable test for detection early stage of AD doesn't exist. The only option how we can diagnostic AD with 100% sureness is to look into patients brain after his death. For right diagnosis is important to distinguish symptoms of aging, of AD and of MCI (which is between). AD is usually diagnosed by international criteria, there are 3 methods – neuropsychological testing, neuroimaging and biomarkers. None of these methods is applicable for prediction AD by itself.

Keywords: Alzheimers's disease, neuropsychological testing, neuroimaging, biomarkers for AD

MONOLITICKÁ CHROMATOGRAFIE

Petr Valenta

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, petr.valenta@vscht.cz

Úvod

Chromatografie je separační technika, která využívá rozdílné distribuce částic separovaných látek mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Pro účely izolace, purifikace a charakterizace makromolekul je v současné době nejčastěji používána chromatografie v systému pevná látka/kapalina nebo kapalina/kapalina na nosiči. Pak jde o distribuci částic separovaných látek mezi mobilní a stacionární fázi. Kolony jsou jako stacionární fázi plněny materiálem v podobě jednotlivých pevných částic, s nimiž separované částice interagují různým způsobem. Tento způsob přípravy stacionární fáze má však své limity, co se týče efektivity nebo rychlosti separace nebo průtoku mobilní fáze resp. vstupnímu tlaku. Efektivitu lze ovlivnit např. délkou kolony, ovšem kvůli hydrodynamickým hlediskům ji nelze zvyšovat příliš a naopak snaha o zrychlení separace se děje právě na úkor efektivity¹. To jsou důvody, proč se po celou dobu od rozšíření chromatografie hledají způsoby, jak tyto nedostatky odstranit nebo alespoň omezit. První výraznějším průlomem v této oblasti jsou experimenty s monolitickou chromatografií, čili použitím jednoho bloku materiálu pro stacionární fázi.

Teorie monolitické chromatografie

Princip monolitické chromatografie je podobný klasickým plněným kolonám. Monolit stacionární fáze v sobě obsahuje pospojované kanály, kudy protéká mobilní fáze, tedy obdobu prostor mezi částicemi stacionární fáze v „klasické“ koloně a póry v materiálu. Vzhledem k tomu, že použití monolitických kolon bylo zamýšleno jako náhrada „klasických“ kolon, případně jejich vylepšení, je samotná technika chromatografie velmi podobná. Interakce stacionární fáze se separovanými látkami probíhá v pórech monolitu buď prostým zadržováním částic, nebo např. iontovými interakcemi¹.

Monolit má vysokou hustotu kanálů a jejich průměrnou velikost a je tak dostupnější pro mobilní fázi. V porovnání s „klasickou“ kolonou chybí značná část prostor nedostupných pro mobilní fázi, jako jsou místa, kde se částice stýkají nebo kde se obecně vyskytují. Díky

tomu použití monolitu místo jednotlivých částic dává koloně vysokou externí porozitu a tím vyšší permeabilitu¹. Efektivita kolony je ovlivňována velikostí kanálů a pórů. Jejich velikosti, resp. jejich průměrné hodnoty, lze upravovat nezávisle na sobě během procesu přípravy monolitu změnou podmínek². Toto je jedna z největších výhod, které monolitická chromatografie přináší.

Druhy kolon

Sílanové „rod“ kolony

Sílanové kolony byly prvními připravenými monolitickými kolonami. Pokusy s nimi pocházejí již z počátku 90. let, kdy byl v Japonsku objeven způsob přípravy². Nezávisle byly podobné kolony vyrobeny i firmou Merck KGaA.

Příprava monolitu spočívá v kyselé hydrolýze alkoxyilanů, buď jednotlivých, nebo jejich směsi. Používá se tetraetoxysilan nebo tetrametoxysilan. Jedná se o polykondenzaci. Důležitou součástí reakční směsi je tzv. porogen. Je to inertní složka tvořící vlastní kanály a póry monolitu. Změnou koncentrace porogenu, nebo úpravou reakční směsi (množství vznikajících alkoxyilanů při polykondenzaci) je možné ovlivnit morfologii kanálů a velikost pórů. Nejpoužívanějším poroginem je v současnosti polyetylenoxid².

Ukazuje se, že reprodukovatelnost výsledků z těchto kolon, experimentálně ověřovaná pomocí retenčních faktorů, je velmi vysoká i po několika měsících³.

Výsledky srovnání efektivity kolon ukazují, že při zvětšující se rychlosti průtoku mobilní fáze není pokles efektivity tak značný, jako u „klasických“ kolon⁴.

V současnosti existuje již druhá generace sílanových monolitů, která se od první odlišuje mírnou úpravou výrobního procesu, což poskytuje monolit s menšími kanály a větší homogenitou, což přispívá ke zvýšení efektivity.

Hlavní oblast použití těchto kolon je separace organických látek. Při separaci polypeptidů se ukázalo značné zkrácení potřebného času¹. Další odpovídající využití je především v separaci rostlinných extraktů¹.

Polymerové kolony

Dalším přístupem k přípravě monolitu je použití hydrofilních resp. hydrofobních gelů. Polyakrylamidové gely, jako zástupci hydrofilních, byly připraveny pro dělení biomakromolekul, aby se vyvarovalo nespecifickým interakcím se vzorkem⁵. To však již není rozhodující kritérium výběru, díky vývoji moderních hydrofobních gelů složených z polystyrenu a divinylbenzenu⁶.

Příprava obou typů gelů se skládá ze tří kroků. Nejprve je nutné ošetřit stěny kolony, aby bylo zajištěno dobré přilnutí materiálu ke stěnám. Druhým krokem je samotná tvorba polymeru. V případě polyakrylamidových gelů se jedná o polymeraci

N,N'-metylenbisakrylamidu nebo piperazindisakrylamidu za přítomnosti katalyzátoru polymerace a porogenu. Porogem je v tomto případě dextran nebo polyetylen glykol. Při přípravě hydrofobních gelů jde o polykondenzaci styrenu a divinylbenzenu také s pomocí katalyzátoru. Jako porogen slouží propanol, cyklohexanol atd., nebo jejich směs. Závěrečným krokem je případná úprava povrchu polymeru pro vlastní potřeby chromatografie. Značně se tedy liší v závislosti na konkrétní chromatografické technice (iontově-výměnná, RPC atd.) Více viz¹ nebo další literatura.

Separace s využitím polymerních kolon jsou obdobné jako u silanových, především v biochemických aplikacích např. při purifikaci sérových a membránových proteinů, analýze přírodních látek a dalších. Tyto kolony se staly široce používanými díky jejich snadné přípravě in situ.

Ostatní materiály

Při experimentální přípravě monolitů se věnovala pozornost i dalším materiálům, především oxidům hliníku, zirkonia a hafnia⁷ nebo monolitům z uhlíku⁸. Příprava monolitů z oxidů kovů je ovšem hlavně experimentální bez většího praktického použití. Příprava uhlíkových monolitů se ukázala být slepou uličkou, neboť jejich parametry nejsou vhodné pro chromatografii a jejich úprava je příliš náročná, než aby byl možný jejich větší rozvoj.

Narrow-bore kolony

Narrow-bore kolony jsou zvláštním případem jak silanových, tak polymerových kolon. Jejich menší vnitř-

ní průměr oproti obyčejným monolitickým kolonám umožňuje připravovat je delší, což zvyšuje jejich efektivitu. V porovnání s „klasickými“ narrow-bore kolonami je další jejich velkou výhodou snadná příprava a vyšší reprodukovatelnost výsledků. To jsou hlavní důvody, proč je tento typ kolon dnes široce používán a „klasické“ kolony už v podstatě nahradil.

Současnost

V nynější době máme dva odlišné přístupy k přípravě kolon – silanové monolity a polymerové monolity. Kolony se silanovými monolity jsou velmi dobře charakterizovány a popsány z hlediska fyzikálně-chemických vlastností, nicméně jejich širšímu rozšíření brání několik věcí. Jsou chráněny patenty, které vyprší až za několik let, případně vypršely teprve nedávno. Dalším důvodem je existence jen málo odlišných monolitů, co se týká distribuce a odlišnosti pórů.

Patenty na silanové monolitické kolony byly příčinou vývoje polymerních, které jsou připravovány v mnoha různých variantách. Experimentální popis jejich fyzikálně-chemických vlastností je nicméně velmi malý. Staly se však velmi rozšířenými, právě díky absenci patentů a navíc snadné přípravě v konkrétní laboratoři, a oblíbenými mezi biochemickou komunitou k separaci biomakromolekul.

Monolitické kolony se staly prvním velkým průlomem v přípravě chromatografických kolon. Mimo jiné to vedlo i k tomu, že další pozornost byla upřena ke zdokonalování „klasických“ kolon a vývoji stacionárních fází s menšími částicemi. První generace silanových monolitů byla překonána novými „klasickými“ kolonami, které mají díky menším částicím dostatečnou efektivitu i propustnost mobilní fáze. Druhá generace je po stránce vlastností zdatnou konkurencí nejlepších současných kolon, které jsou však obtížněji připravovatelné.

Monolitické kolony mohou nakonec převládnout. Nejenom polymerové, ale po vypršení patentů i druhá generace silanových. Umožňují totiž dobrou systematickou modifikaci morfologie stacionární fáze, tedy velikosti kanálů a pórů, pro potřeby chromatografické separace.

Literatura:

1. Georges G: *J. Chromatogr. A* 1168, 101 (2007).
2. Kazuki N, Naohiro S: *J. Non-Cryst. Solids*. 139, 1 (1992).
3. Kele M, Guiochon G: *J. Chromatogr. A* 960, 19 (2002).
4. Schulte M, Dingenen J: *J. Chromatogr. A* 923, 17 (2001).
5. Hjertén S, Liao JL, Zhang R: *J. Chromatogr. A* 473, 273 (1989).

6. Sýkora D, Svec F, Fréchet JM: *J. Chromatogr. A* 852, 297 (1999).
7. Hoth DC, Rivera JG, Colón LA: *J. Chromatogr. A* 1079, 392 (2005).
8. Liang C: Synthesis and Applications of Monolithic HPLC Columns, Ph.D. thesis, University of Tennessee, Knoxville, TN, 2005.

Souhrn

Valenta P. : Monolitická chromatografie

Monolitická chromatografie je nový přístup k přípravě kolon. Využívá stacionární fáze tvořené jedním kusem materiálu, což umožňuje dosáhnout lepších separačních vlastností. Monolity jsou vyrobeny ze silanů nebo polymerů. V některých oblastech se tento typ kolon již prosadil, díky možnosti snadného uzpůsobení vlastností pro konkrétní potřebu.

Klíčová slova: monolitická chromatografie, kapalinová chromatografie, chromatografické kolony

Summary

Valenta P. : Monolithic chromatography

Monolithic chromatography is a new way to make chromatographic column. Stationary phase is made of one block which allows to achieve better separative properties. Monoliths are silica-based or polymer-based. This type of columns have already arrived in some areas because of possibility to adjust them for actual situation.

Keywords: monolithic chromatography, liquid chromatography, chromatographic columns

O B S A H

Úvodem	1
Káš J.: Víte, že...?	2
Pozvánka na seminář „ Novinky v oblasti genetických modifikací “	4
Oborský P.: Sekvenování DNA	5
Táborská P.: Jsou epigenetické změny DNA příčinou vzniku diabetu typu II?	8
Poncová K.: Bioinsekticidy	10
Čížková K.: Možnosti predikce progresu Alzheimerovy choroby	13
Valenta P.: Monolitická chromatografie	15

C O N T E N T S

Editorial	1
Káš J.: Do you know ... ?	2
Invitation to the workshop: „ News in genetic modifications “	4
Oborský P.: DNA sequencing	5
Táborská P.: Is there relation between epigenetic changes in DNA and development of diabetes type II?	8
Poncová K.: Bioinsecticides	10
Čížková K.: Prediction of Alzheimer's disease progression	13
Valenta P.: Monolithic chromatography	15

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.

Lowenstein 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