

# B I P R O S P E C T

Dvacátý ročník  
Číslo 1/2010

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  
Ivax, 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

20<sup>th</sup> Volume  
No. 1/2010

---

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 v jubilejním 20. ročníku našeho bulletinu „Biopropect“. Domnívám se, že 20 let nepřetržitého vydávání tohoto media, které spojuje všechny naše členy, je slušný výkon, na který můžeme být právem hrdí. Přes všechny problémy, se kterými jsme se za tuto dobu setkali, jsme udrželi jeho dobrou úroveň a otiskli zde mnoho přehledných článků z nejrůznějších oblastí biotechnologií, a tak umožnili našim členům dozvídat se něco i o oblastech, které nejsou v bezprostředním okruhu jejich profesionálních zájmů. Jsem přesvědčen, že tento přístup je velmi pozitivní a budeme v něm nadále pokračovat. Bulletin také sleduje události v naší společnosti i v biotechnologiích na mezinárodním fóru, a tak jeho jednotlivá čísla zůstávají i významným zdrojem historických údajů o biotechnologiích. Smutnou skutečností je, že nedostatek finančních zdrojů omezil naši spolupráci se slovenskými kolegy a znemožnil distribuci Biopropectu na Slovensku. Plně věřím, že tato situace je jen dočasná a v budoucnu se jí podaří obnovit. Biopropect se snažíme, v rámci našich možností, stále vylepšovat, a tak i pro tento jubilejní ročník připravujeme menší technická vylepšení.

Jak jsme Vás již informovali, naše střešní organizace **Český svaz vědeckotechnických společností (ČSVTS), jejíž jsme zakládajícím členem, pořádá ve dnech 17. – 19. března 2010 oslavy 20. výročí založení spojené s 3. mezinárodní konferencí „Proměny Evropy 2010“ ve svém sídle na Novotného lávce 5 v Praze na Starém Městě**. Bližší informace o oslavách naleznete na webových stránkách [www.csvts.cz](http://www.csvts.cz) a o konferenci na stránkách [www.neweurope.cz](http://www.neweurope.cz). Vaši účast doporučujeme. Pro oslavy připravily všechny společnosti stručné informativní postery podle jednotného zadání. Poster naší společnosti publikujeme i v našem Biopropectu.

**Dne 18. května 2010 pořádáme na VŠCHT v Praze** (v posluchárně BII, budova B, od 13,15 hod) již tradiční seminář **„Novinky v oblasti genetických modifikací“**, na který Vás srdečně zveme. Podrobnosti jsou uvedeny v pozvánce publikované v tomto čísle. Pokračují i přípravy mezinárodního biotechnologického symposia **BIOT 2011** spojeného s 5. Česko-švýcarským symposiem, které se uskuteční **15. – 17. června 2011 v Národní technické knihovně v Praze 6 a bude následováno symposiem „Plant Biotechnology“ ve dnech 20. a 21. 6. 2011 v Olomouci**. Webové stránky pro obě akce jsou v přípravě.

Dovolujeme si upozornit, že deadline pro zaslání abstrakt na **„14. International Biotechnology Symposium and Exhibition“** pořádané pod heslem **„Biotechnology for the Sustainability of Human Society“** v italském Rimini ve dnech **14. – 18. září 2010** je již 1. března a registrace za snížené vložné je do 31. 5. 2010.

Pokud se týká problematiky transgenních plodin v České republice, rádi bychom Vás upozornili na publikaci Ministerstva zemědělství **„Dosavadní zkušenosti s pěstováním geneticky modifikované Bt kukuřice v ČR 2005 – 2009“**, která je k dostání nejen v tištěné formě na MZe, ale nově též v elektronické verzi na stránkách MZe – [www.mze.cz](http://www.mze.cz), položka "Zemědělství", položka "GMO"; případně lze použít přímý odkaz: [http://eagri.cz/public/eagri/pub/5b/1c/2e/42167\\_47669\\_Dosavadni\\_zkusenosti\\_Bt\\_kukurice\\_v\\_CR\\_2005\\_2009.pdf](http://eagri.cz/public/eagri/pub/5b/1c/2e/42167_47669_Dosavadni_zkusenosti_Bt_kukurice_v_CR_2005_2009.pdf)

V říjnu (přesný termín a místo konání fora nebyly dosud stanoveny) se má uskutečnit **„Global Forum on Genetically Modified Wheat“**, které se má zabývat problematikou pozitivních a negativních aspektů z hlediska možnosti uvedení geneticky modifikované pšenice, ale též ječmene a rýže do krmivářského a potravinářského řetězce. Zájemci jsou zváni poslat jednostránkový abstrakt pro navrhovanou přednášku či poster. Abstrakta budou vyhodnocena organizačním výborem. Fórum je otevřeno pro všechny zájemce o genetické modifikace. Bylo navrženo 10 témat k diskusi, které zahrnují: současný stav v oblasti genetických modifikací, regulace a předpisy v globálním kontextu, positiva a negativa GM technologií, otázky spojené s problematikou životního prostředí, alergenicity a etiky, stanovení bezpečnosti, důsledky pro mezinárodní obchod, systémy izolace, nejnovější výsledky testování geneticky modifikovaných cereálií, ekonomika, komunikace. Podrobnosti naleznete na webových stránkách sekretariátu konference: <http://www.bastiaanse-communication.com/html/gfgmw.html>, tel. +31 30 2294247, e-mailu: [info@bastiaanse-communication.com](mailto:info@bastiaanse-communication.com).

Zejména pro studenty je určena konference, kterou pořádají Přírodovědecká fakulta Masarykovy university v Brně a Biomania o.s. ve dnech 8. a 9. 4. 2010. Bližší informace naleznete na [www.biomania.cz/konference2010](http://www.biomania.cz/konference2010).

V tomto čísle naleznete opět řadu přehledných článků z oblasti aktuální problematiky biotechnologií. Byli bychom rádi, kdybyste nás upozornili na vhodná témata i možné autory příspěvků.

Těšíme se na pokračující spolupráci v tomto roce a doufáme, že jste nezapomněli zaplatit členské příspěvky (individuální i institucionální), neboť ani vydávání našeho Biopropectu není zadarmo.

Srdečně Vás zdraví

Váš  
Jan Káš

## Errata

V minulém čísle Biopropectu (3-4/2009) bylo v článku Lipidomika (str. 63) chybně uvedeno, že

fosfatidylcholin je majoritní složkou prokaryotních membrán. Pozorným čtenářům děkujeme za upozornění a za chybu se omlouváme.

# Biotechnologická společnost

Sídlo: VŠCHT v Praze | Technická 3 | 166 28 Praha 6

tel.: +420 220 443 151 | tel.: + 420 233 334 769

e-mail: [Danka.Pokorna@vscht.cz](mailto:Danka.Pokorna@vscht.cz) | <http://bts.vscht.cz>

## POSÍLÁNÍ ORGANIZACE:

Biotechnologická společnost je dobrovolná, nezávislá a nezisková organizace sdružující všechny zájemce o biotechnologie, včetně výzkumných pracovníků, pracovníků různých institucí, výrobců a distributorů biotechnologických produktů. Členství je individuální i institucionální. Vítání jsou též partneři spolupracující na dohodnutých společných aktivitách. Společnost vytváří prostor pro odborné kontakty, výměnu zkušeností, konzultace a expertízy. Snaží se informovat veřejnost o problematice biotechnologií a organizuje různé formy výukové i odborné činnosti (semináře, kurzy, symposia aj.). Spolupracuje s ostatními vědeckými a technickými společnostmi a je zakládajícím členem Českého svazu vědecko-technických společností ([www.csvts.cz](http://www.csvts.cz)).

## CÍLE:

Podpora rozvoje biotechnologií v České republice.

## AKTIVITY:

Mezi významné aktivity Biotechnologické společnosti patří pravidelné vydávání časopisu Bioprospect, který v r. 2010 vstupuje již do 20. ročníku. Časopis je dodáván zdarma všem členům společnosti a významným knihovnám v ČR. Jeho náplní jsou aktuální informace a především přehledné články o různých tématech biotechnologií, které jsou recenzovány odborníky v dané oblasti. Určitá část nákladu je věnována i na propagační účely při různých vědeckých setkáních a mezi vysokoškolskými studenty.

Další významnou aktivitou je internetový informační servis, kdy jsou formou e-mailů zasílány nejnovější informace z oboru všem členům, kteří o to projeví zájem. Tato forma předávání informací je mnohem účinnější než pouhé zveřejnění na internetových stránkách společnosti. Webové stránky společnosti mimo jiné poskytují zájemcům i informace o historii biotechnologií a celou řadu odkazů na webové stránky zabývající se problematikou biotechnologií.

Biotechnologická společnost organizuje řadu mezinárodních symposií i domácích seminářů od svého založení v r. 1990. Při řadě těchto odborných setkání spolupracuje s dalšími společnostmi, významnými institucemi i státními orgány, jako např. MŽP a MZE.

V posledních třech letech jsou vždy v květnu pořádány semináře „Novinky v oblasti genetických modifikací“. Byly též navázány úzké kontakty s nově založeným Biotechnologickým ústavem AV ČR a zejména Asociací biotechnologických podniků CzechBio.

## MEZINÁRODNÍ SPOLUPRÁCE:

Biotechnologická společnost je také členem Evropské biotechnologické federace (European Federation of Biotechnology, [www.efb-central.org](http://www.efb-central.org)).

Velmi úzká je spolupráce se švýcarskými biotechnology, jejímž výrazem bude v r. 2011 konání již 5. česko-švýcarského symposia, tentokrát opět v Praze. Prostřednictvím svých členů je Biotechnologická společnost zapojena i do činnosti dalších významných organizací jako je např. IUPAC, ACS a další.

## VÝZNAMNÉ UDÁLOSTI:

1990 Mezinárodní symposium o bioanalytických metodách (Praha)

1999 1st Czech - Swiss Symposium on Advanced Biotechnology (Praha)

2002 2nd Czech - Swiss Symposium on Advanced Biotechnology (Praha)

2005 3rd Swiss - Czech Symposium on Advanced Biotechnology (Wadenswil)

2008 4th Swiss - Czech Symposium: Biopharmaceuticals: why use yeast (Wadenswil)

2011 5th Czech - Swiss Symposium (Praha, 15-17.6. - v přípravě)



Český svaz vědeckotechnických společností

[www.csvts.cz](http://www.csvts.cz)

**Biotechnologická společnost  
Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠCHT  
Ministerstvo životního prostředí – Projekt UNEP/GEF**

si Vás dovoluji pozvat na 4. seminář

# **NOVINKY V OBLASTI GENETICKÝCH MODIFIKACÍ**

**organizovaný v rámci projektů  
UNEP/GEF „Support for the Implementation  
of the National Biosafety Framework for the Czech Republic“  
a VZ „Teoretické základy potravinářských a biochemických technologií“**

a konaný **v úterý 18. května 2010 od 13,00 hod**  
**v posluchárně B II VŠCHT v Praze,**

Praha 6, Technická 5 (budova B, posluchárna je v patře proti hlavnímu vchodu)

## **PROGRAM:**

- 13,00** Registrace
- 13,15** **J. Káš**, VŠCHT Praha: Úvodní slovo
- 13,30** **H. Pospíšilová a I. Frébort**, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Olomouc: Genetická modifikace ječmene
- 14,00** **H. Lipavská**, Katedra experimentální biologie, PŘF UK: Studium regulace buněčného cyklu u rostlin metodami genového inženýrství
- 14,30** Přestávka
- 14,45** **J. Kaňka**, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov: Transgenní zvířata
- 15,15** **J. Rubeš**, VÚ veterinárního lékařství, v.v.i., Brno: Příprava a využití DNA sond v molekulární cytogenetice živočichů
- 15,45** Závěr semináře

**Vstup je volný.**

Účastníci obdrží materiály s přednesenými přednáškami.

**Za organizátory semináře:**

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.  
VŠCHT

Ing. Milena Roudná, CSc.  
Projekt UNEP/GEF

**Schör Karsten: Acetylsalicylic Acid. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, Germany 2009, ISBN 978-3-527-32109-4**

Kniha popisuje skvělým způsobem naše současné znalosti o velmi úspěšném a všeobecně známém léku označovaném jako aspirin. Téma knihy je rozděleno do čtyř rozsáhlých částí: Obecné aspekty, Farmakologie, Toxicita a bezpečnost léku a Klinické aplikace aspirinu.

První část popisuje všeobecně historii používání salicylátů. Salicylová kyselina je látka přirozeně se vyskytující v rostlinách, kde jak nyní víme, hraje významnou úlohu v obraně rostliny (není uváděno v knize). Tak vrbová kůra a listy obsahující salicyláty byly používány jako antipyretikum a protizánětlivé léčivo již za života Hippokrata (asi 400 let před Kristem). Vzhledem k některým nepříjemným vedlejším účinkům salicylátů (zvracení, poruchy sluchu) i v purifikované formě se výzkum zaměřil na jejich modifikaci. Kyselina acetylsalicylová („aspirin“) byla při nejmenším stejně účinná a mnohem přijatelnější vzhledem k vedlejším účinkům. Historie jednotlivých objevů až do dnešních dní je hezky popsána v Tab.1.1 („The history of salicylates and acetylsalicylic acid“). Klíčová událost acetylace salicylové kyseliny je dokumentována presentací rukou psaných poznámek její přípravy v laboratorním deníku jejího objevitele Felixe Hoffmanna a kopií uděleného amerického patentu. Dále jsou zde popsány mechanismus působení aspirinu, témata současného výzkumu a chemie salicylátů, včetně jejich stanovení.

Druhá část věnovaná farmakologii se zabývá farmakokinetikou a působením aspirinu na buňky, orgány a tkáň. Podrobně jsou popsány absorpce, distribuce, biotransformace a vylučování aspirinu za různých podmínek. Výklad je doplněn hezkými obrázky a schémata.

Třetí část se věnuje systemickým vedlejším účinkům akutního a chronického předávkování, orgánovou toxicitou (v gastrointestinálním traktu, ledvinách, játrech a audiovestibulárním systému) a působením v závislosti na různých syndromech bez ohledu na dávkování.

Poslední čtvrtá část je nejobsáhlejší (140 stran) a popisuje jednotlivé druhy současných klinických aplikací aspirinu.

Nespornou předností knihy je, že jednotlivá témata jsou velmi dobře utříděna a čtenář se velmi dobře orientuje. Napomáhá mu zvýraznění nadpisů modrou barvou, stínování poznámek a stručných souhrnů, které doprovázejí jednotlivé podkapitoly. Výhodou je, že reference vždy následují za každou podkapitolou. Kniha obsahuje i dvě přílohy zkratk, z nichž prvá (Appendix A) se týká biochemických pojmů a druhá (Appendix B) pak pojmů klinických.

Závěrem mohu konstatovat, že kniha je vynikající jak obsahem, tak edičním zpracováním. Mohu ji doporučit k přečtení všem lékařům, biochemikům, chemikům i ostatním zájemcům, kteří se chtějí něco víc dozvědět o léku, se kterým jsme se během svého života jistě všichni již setkali.

**Jan Káš**

*Ústav biochemie a mikrobiologie  
VŠCHT v Praze*

# APLIKACE METOD BIOENKAPSULACE

Tereza Pilchová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

Enkapsulace představuje obalení nebo zachycení kapek nebo pevných částic látky přírodním nebo syntetickým materiálem. Průměr kapsule při enkapsulaci není v průměru větší než několik milimetrů. Při mikroenkapsulaci jsou buňky obalovány do mnoha sférických kapsulí o průměru 100 – 600  $\mu\text{m}$  a při makroenkapsulaci, představující enkapsulaci buněk nebo jejich klastrů do kapsulí řádově větších rozměrů a různých tvarů, nebo do dutých vláken o průměru 0,5 – 6 mm a celkové délce 0,5 – 10 cm. Enkapsulace tkání nebo biologicky aktivních látek v polopropustné membráně se nazývá bioenkapsulace. Provádí se z různých důvodů, např. pro ochranu nebo stabilizaci před nepříznivými faktory prostředí (např. ochrana citlivých látek před vlhkostí, ochrana vitamínu E před oxidací, světlem a vysokými teplotami), pro imobilizaci a strukturaci, pro pozvolné uvolňování hnojiv nebo herbicidů a také pro řízené uvolňování léčiv<sup>1, 2</sup>.

## Požadavky na materiály používané při enkapsulaci

Výroba kapsulí začíná výběrem vhodného enkapsulačního materiálu. Jedná se ve většině případů o přírodní nebo syntetické polymery. Výběr polymeru začíná popisem chemického složení monomerních jednotek. Množství a charakter funkčních skupin obsažených v monomerních jednotkách (jeden druh monomerních jednotek v případě homopolymerů, dvě a více monomerních jednotek v případě kopolymerů) definuje základní strukturu polymerů. Vodíkové vazby, elektrostatické a hydrofobní interakce jsou důležité pro vznik intra- a intermolekulárních interakcí. Díky těmto interakcím dochází ke vzniku kapslí. Nejběžnějším způsobem přípravy je tvorba komplexů elektrolytů, jejichž charakteristickým rysem je vznik párů opačně nabitých iontů, které drží celou trojrozměrnou strukturu elektrostatickými silami<sup>3</sup>. Polymery pro enkapsulaci musí splňovat celou řadu požadavků. Musí vykazovat velmi dobrou biologickou snášenlivost, dostatečnou mechanickou stabilitu, dobrou interakci s buňkami a vysokou odolnost vůči degradaci. Polymerní membrána musí být propustná pro nízkomolekulární živiny nezbytné pro enkapsulované buňky a produkty jejich sekrece. Zároveň musí zamezit kontaktu s cytotoxickými a imunologickými látkami. V žádném případě se nesmí jednat o látky toxické ani mutagenní a musí být splněn požadavek dobré tolerance polymeru buňkami, které mají být enkapsulovány. Z hlediska medicínského je potřeba mít na paměti nejen co nejdélejší životnost, ale i dobrou metabolickou aktivitu enkapsulovaných buněk. Buňky mají na svém povrchu celou řadu receptorů, pomocí kterých reagují na své nej-

bližší okolí. Při správných interakcích s polymerem dochází k rozptýlení buněk na polymerním povrchu a k dobré metabolické aktivitě, kdežto v opačném případě se buňky shlukují, neadherují na povrchu a jejich sekrece je omezená. Požadavků na výběr vhodného materiálu pro enkapsulaci je mnoho a jedná se o velmi náročný proces<sup>2, 4, 5</sup>.

## Metody používané při enkapsulaci

Existuje celá řada metod používaných k výrobě kapsulí. Na Obr. 1 jsou znázorněny metody používané pro enkapsulaci kapalných a pevných látek.



Obr.1: Schéma rozdělení metod používaných pro enkapsulaci kapek nebo pevných částic látky.

## Kapková metoda

Jedná se o nejjednodušší metodu pro výrobu kapsulí. Kapalina procházející tryskou určitého průměru je gravimetricky rozdělena na stejně velké kapky. Vzniklé kapičky jsou dále zpracovány za účelem tvorby kapsulí pomocí zesílení a polymerace (proces zpevňování) prekursorové kapaliny. Je požadováno, aby proces zpevňování proběhl velmi rychle a bylo dosaženo optimální kvality kapsulí. Tato metoda umožňuje výrobu monodisperzních kapsulí s rozdílnou konečnou strukturou (pevné, hydrogelové kapsle, tobolky s membránou...). Příkladem využití je například pomalé uvolňování antimikrobiálních látek v kapalných výrobcích nebo absorpce kontaminantů z prostředí<sup>6</sup>.

## Nanášecí metoda

Jedná se o metodu vyvinutou v roce 1930. Emulze se připravuje rozptýlením základního materiálu, zpravidla oleje nebo jiné účinné látky nemísitelné s vodou, v koncentrovaném roztoku obalovacího materiálu než dojde k vytvoření kapek požadované velikosti. Výsledná emulze je atomizována do spreje kapiček čerpáním suspenze přes rotující disk až do vytápěného prostoru, kde dojde k odpaření vodní části emulze a výtěžkem jsou vysušené kapsule různého tvaru obsahující rozptýlené kapky základního materiálu<sup>7</sup>.

## Emulzifikace

Při této metodě dochází k tvorbě kapsulí na základě mezifázové polymerace, gelovatěním nebo vypařováním rozpouštědla. Princip mezifázové polymerace spočívá v použití dvou vzájemně nemísitelných fází, které vytvoří disperzní fázi ve formě kapek a kontinuální fázi, která je obaluje. Kapsule, kapičky a pevné částice vyrobené touto technologií by mohly zlepšit kvalitu a vlastnosti výrobků. Tato technologie je hojně využívána v kosmetickém průmyslu<sup>8</sup>.

## Metoda potahovací

Použití této metody je omezeno pouze na látky z pevného materiálu, včetně kapalin absorbovaných v pórech pevné látky. Tato technika je ve velké míře používána k enkapsulaci léčiv. Pevné částice, jež mají být enkapsulovány, jsou suspendovány v proudu vzduchu a následně pokryty tekutým obalovacím materiálem. Po obalení jsou kapsule přesunuty do míst, kde dojde ke ztuhnutí obalu chlazením nebo vypařením rozpouštědla. Celý tento proces je opakován až do doby než dojde k vytvoření kapsule s požadovanou tloušťkou stěny<sup>7</sup>.

## Využití produktů enkapsulace

Oblast použití enkapsulace je široká. Kapsule jsou využívány v zemědělství, farmaceutickém a potravinářském průmyslu, kosmetice, textilním průmyslu, papírenství a mnoha dalších oborech. Ukázalo se, že enkapsulace je účinným nástrojem při napodobování přírodního prostředí pro mnohé kultury rostlinných buněk, čímž dochází ke zlepšení účinnosti výroby různých metabolitů pro průmyslové aplikace. Při fermentaci je bioenkapsulace použita pro zvětšování buněk, zlepšení aroma a kapacity systémů. Enkapsulace může být také

## Literatura:

1. <http://www.capsulae.com/microencapsulation.php>, staženo 22. 11. 2009.
2. Lukáš J, Fenclová T, et al.: *Chem. Listy* 98, 14 (2004).
3. De Vos P, Bučko M, Gemeiner P, et al.: *Biomaterials* 30, 2559 (2009).
4. Marsich E, Borgogna M, Donati I, et al.: *J. Biomed. Mater. Res.* 84, 364 (2008).
5. Thanos CG, Bintz BE, Emerich DF: *J. Biomed. Mater. Res.* 81, 1 (2007).
6. <http://www.preentec.ch/default.asp?navig=38>, staženo 18. 11. 2009.

## Souhrn

### Pilchová T.: Aplikace metod bioenkapsulace

Enkapsulace zahrnuje všechny technologie umožňující zachycení materiálu uvnitř částic. Oblast použití enkapsulace je široká. Enkapsulované materiály jsou využívány v zemědělství, farmaceutickém a potravinářském průmyslu, kosmetice, textilním průmyslu, papírenství a mnoha dalších oborech.

**Klíčová slova:** enkapsulace, použití enkapsulace

## Summary

### Pilchová T.: Application of bioencapsulation methods

Encapsulation includes all the technologies that allow entrapment of a material inside particles. The field of application of encapsulation is broad. Encapsulated materials are utilized in agriculture, pharmaceuticals, foods, cosmetics, textiles, paper and many other industries.

**Key words:** encapsulation, application of encapsulation

použita při konzervaci masa s cílem rozšíření stávajících způsobů uchovávání a při vývoji nových metod v boji s objevujícími se patogeny. Úspěch enkapsulace se zdá být založen na nějaké formě prostorové organizace, která zahrnuje ochranu a řízené uvolňování. Vytvoření mikroprostředí, které poskytuje požadované podmínky nebo populace a regulační systémy, minimalizuje vliv výkyvů v makroprostředí a chrání buňky před konkurencí a predátory. V medicíně je enkapsulace využívána při buněčné terapii, kterou lze charakterizovat jako terapeutické zavádění buněk do těla pacienta. Léčebné buňky bývají uzavřeny do polymerních mikrokapsulí a následně implantovány do těla pacienta. Předpokladem této technologie je imunoprotekce, tj. separace implantovaných buněk semipermeabilní membránou od buněk hostitele a ochrana před protilátkami a cytotoxickými buňkami imunitního systému hostitele. Tento způsob umožňuje úspěšnou implantaci buněk bez použití imunosupresiv. Pro úspěšnou buněčnou terapii lze použít jak vlastní buňky pacienta, tak rovněž buňky jiného lidského dárce nebo buňky zvířecí. Hlavní použití této technologie je v léčbě onemocnění způsobených selháním sekrečních mechanismů buněk, anémií, hemofilie B, selhání funkce ledvin, jater a na léčbu diabetes mellitus<sup>7, 9, 10, 11, 12</sup>.

## Závěr

I přes ohromný růst průmyslového a klinického využití enkapsulace v posledních deseti letech, je stále obtížné, ne-li nemožné definovat požadavky, které musí kapsule splnit k zajištění dlouhodobé funkčnosti obalených materiálů. Pro další rozvoj těchto technologií je nutno standardizovat technologie zabývající se výrobou těchto kapsulí.

7. [http://www.microteklabs.com/technical\\_overview.pdf](http://www.microteklabs.com/technical_overview.pdf), staženo 18.11. 2009.
8. Graaf S, Schröen CGPH, Boom RM: *J. Membrane Science* 251, 7 (2005).
9. Bodeutsch T, James EA, Lee JM: *Plant. Cell Rep.* 20, 562 (2001).
10. Doleyres Y, Lacroix C: *Int. Dairy J.* 15, 973 (2005).
11. De Vos P, Faas MM, Strand B, et al.: *Biomaterials* 27, 5603 (2006).
12. Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, et al.: *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 16, 491 (2005).



# UHPLC JAKO VÝZNAMNÝ NÁSTROJ METABOLOMIKY

Renata Balounová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

Metabolity jsou meziprodukty nebo konečné produkty metabolismu, obvykle malé molekuly. Jsou to látky fyzikálně i chemicky odlišné a zahrnují soli, cukry, kyseliny, base, lipidy, steroidy a další sloučeniny<sup>1</sup>. Tato diversita a dynamický koncentrační rozsah činí z biologických vzorků nesnadný předmět komplexní analýzy. Je známo, že i malé změny v aktivitách enzymů mohou vést k malým změnám metabolických toků, avšak mohou vést k velkým změnám koncentrací metabolitů<sup>2</sup>.

Metabolomika se jako nová vědní disciplína začala formovat v sedmdesátých letech 20. století a stále se rozvíjí. Termín „metabolom“ označuje soubor všech metabolitů, které jsou v buňce přítomny. Termín „metabolomika“ je definován jako komplexní charakterisace metabolomu v biologickém systému<sup>2</sup>. Jedná se o kvalitativní a kvantitativní analýzu všech nízkomolekulárních látek ( $M_w < 1000$  Da) přítomných v metabolismu<sup>3</sup>. Sleduje se jejich dynamika, složení a působení v buňkách, tkáních a tekutinách<sup>2</sup>. Metabolomika nalézá uplatnění především v toxikologii, fyziologii rostlin a v biomedicinském výzkumu<sup>1</sup>.

Velikost metabolomu je značně závislá na studovaném druhu organismu. Uvádí se, že *Saccharomyces cerevisiae* produkuje na 600 metabolitů, *Escherichia coli* 1170 metabolitů, metabolom rostlin je odhadován na 200 000 látek a předpokládá se, že lidský metabolom je ještě větší.

## Nástroje metabolomiky

Metabolomické experimenty zahrnují přípravu vzorku, samotnou analýzu a interpretaci dat<sup>3</sup>. Komplexnost metabolomu (stovky až tisíce sloučenin) neumožňuje využití jediné analytické metody a vyžaduje řadu separačních a detekčních technik<sup>1</sup>. Mezi nejčastěji využívané analytické nástroje metabolomiky se řadí NMR spektroskopie, CE/MS, GC/MS a HPLC/MS<sup>1,4</sup>. Zatímco metody založené na GC mohou být použity pouze pro těkavé sloučeniny (nebo sloučeniny derivatisované), výhodou LC/MS je využitelnost pro širší okruh molekul.

Separční techniky hrají kritickou, často podceňovanou, roli při studiích metabolomu. V současné době se více než jiných technik využívá HPLC. Ve spojení s MS detekcí představuje účinný nástroj, který umožňuje separaci a charakterisaci většiny metabolitů. HPLC jako separační metoda může být využita na separaci různých druhů sloučenin – hydrofilních i hydrofobních, solí, kyselin, basí, aj<sup>1,4</sup>.

## UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

Většina publikovaných metabolomických přístupů využívá tradičních HPLC systémů, s pumpami limitova-

nými 6000 psi (41 MPa) a s kolonami s reversní fází. V nedávné době byl však představen systém UHPLC s kolonami pracujícími nad 6000 psi, obvykle <15000 psi (<103 MPa)<sup>1</sup>. UHPLC tedy představuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s částicemi stacionární fáze menšími než 2  $\mu\text{m}$  a velmi vysokým provozním tlakem. Důvodem užití částic menších než při klasické HPLC je dosažení a udržení vysokých průtoků, kterých by se s běžně velkými částicemi nedalo dosáhnout. Vyšší průtoková rychlost je nezbytným základem pro rychlou analýzu. Pro separace se obvykle užívá kolon dlouhých 5 – 15  $\text{cm}^4$ .

Tento systém je velmi sensitivní, poskytuje velmi ostré píky, dosahuje lepšího rozlišení (vyšší účinnost separace) a za nebývale krátkých retenčních časů. UHPLC je tak vhodný nástroj pro komplexní metabolomické analýzy právě kvůli potřebě rozlišit značné množství metabolitů<sup>1</sup>.

## Využití UHPLC v biomedicinské metabolomice

Jednou z hlavních vědeckých výzev 21. století je určení vztahu mezi lidským genomem a rizikem rozvoje civilizačních onemocnění jako je například diabetes, rakovina, artritida atd.

LC/MS metody jsou vhodné pro analýzu biologických vzorků jako je například moč, která může být vstříknuta na kolonu bez zvláštních předběžných úprav. Krevní plasma také může být analysována s minimální předpřípravou vzorku, obvykle se jedná o deproteinaci precipitací. Dále i tkáňové extrakty jsou přístupné analýsám pomocí LC/MS<sup>4</sup>.

Pro diagnostiku rakoviny a následnou léčbu pacienta má velký význam včasný záchyt onemocnění. Metabolomické vyšetření moči by k včasnému záchytu mohlo přispět. Tato tekutina obsahuje metabolity mnoha biochemických drah. Mnohé studie odhalují spojitost mezi metabolickým profilem a typem tumoru, jeho proliferačními vlastnostmi a metabolickou aktivitou. V nedávno publikované práci<sup>5</sup> bylo využito různých analytických technik detekujících karcinom z renálních buněk, včetně UHPLC.

UHPLC/MS bylo využito i v jiné práci<sup>6</sup> zabývající se komplexní analýzou metabolitů z moče. Tato studie především demonstrovuje důležitost optimalisace experimentálních podmínek, jako je například předúprava vzorku a podmínky pro LC – různá průtoková rychlost a eluční gradienty, a jejich signifikantní vliv na kvalitu metabolického profilu.

Další pilotní studie<sup>7</sup> zabývající se metabolomickou analýzou využila metody UHPLC/TOF-MS k detekci nízkomolekulárních látek v moči u pacientů s kolorektálním karcinomem a u jedinců zdravých. Byl zaznamenán signifikantní nárůst množství nízkomolekulárních látek u skupiny pacientů ve srovnání se zdravými jedin-

ci. Tyto předběžné výsledky naznačují potenciál této metodiky pro budoucí možné využití jako nástroje vhodného pro diagnostiku kolorektálního karcinomu. Cílem je nalézt vhodné biomarkery, které by se daly využít k diagnostice tohoto onemocnění.

### Využití UHPLC v metabolomice rostlin

I v rostlinné metabolomice se dosud hojně využívalo strategie HPLC/MS a GC/MS. S rozvojem chromatografických metod v posledních letech se významně zlepšila účinnost separace a zkrátila doba analýzy komplexních rostlinných maticí.

Porovnáním technik HPLC a UHPLC se zabývala například práce srovnávající stanovení kyseliny *trans*-10-hydroxy-2-decenové (10-HDA) z extraktu mateří kašičky (*Royal Jelly*)<sup>8</sup>. Ze studie vyplývá zkrácení doby analýzy téměř o pětinu při použití metody UHPLC (velikost částic 1,7 μm) oproti použití konvenční HPLC (velikost částic 5 μm). Obě kolony byly temperovány shodně na 30°C. Retenční čas 10-HDA při použití HPLC činil téměř 6 min, v porovnání s UHPLC, kdy retenční čas byl 1,5 min. Kromě toho vykazovala UHPLC kolona výbornou stabilitu (dle stabilních retenčních časů) a neměnné tvary píků i po 100 analys. Také mez detekce a mez stanovitelnosti byla pro UHPLC stanovena nižší než pro HPLC.

V práci<sup>9</sup> popisující metabolomickou analýzu huseňičku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byla k dalšímu zvýšení výkonu UHPLC využita teplota kolony

na 90°C (HT-UHPLC). Doba analýzy se tak zkrátila na polovinu. K detekci bylo využito UV spektrometrie a hmotnostní spektrometrie (TOF-MS). Nebyla zaznamenána degradace metabolitů díky zvýšené teplotě, nicméně otázkou nadále zůstává stabilita vzorku, jež nebyla ještě úplně zhodnocena. I tak může být zvýšení teploty považováno za parametr vylepšující metabolické profilování.

### Závěr

Metabolomika, jak z názvu vyplývá, se zabývá analýsou metabolomu. Metabolom je soubor meziproductů a koncových produktů genové exprese a enzymatické aktivity. Nejhojněji využívanou analytickou metodou studující metabolom je kapalinová chromatografie, která může být aplikována na analýsu většiny druhů molekul. V nedávné minulosti byla představena alternativní forma vysokoúčinné kapalinové chromatografie, tzv. UHPLC. Ta využívá separace na koloně za vysokých tlaků při použití částic menších než 2 μm. Zavedení metody UHPLC znamená přínos zejména v oblasti zlepšení výkonu a rozlišení separace a zkrácení doby analýzy oproti klasické HPLC. UHPLC se v mnoha studiích ukázala jako vysoce výkonný analytický nástroj například při stanovení metabolitů moče. Své uplatnění však UHPLC nalézá i v dalších vědních oborech. Výkonnost chemické analýzy komplexních biologických vzorků může být dále zvýšena například kombinací UHPLC s MS.

### Literatura:

1. Issaq HJ, Van QN, Waybright TJ, et al.: *J. Sep. Sci.* 32, 2183 (2009).
2. Orešič M: *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* 1 (2009).
3. Xia JF, Liang QL, Hu P, et al.: *Chin. J. Anal. Chem.* 37, 136 (2008).
4. Theodoridis G, Gika HG, Wilson ID: *Trends. Anal. Chem.* 27, 251 (2008).
5. Kind T, et al.: *Anal. Biochem.* 363, 185 (2007).
6. Wong MCY, Lee WTK, Wong JSY, et al.: *J. Chromatogr. B* 871, 341 (2008).
7. Ma YL, Qin HL, Liu WJ, et al.: *Dig. Dis. Sci.* (2009).
8. Zhou J, Zhao J, Yuan H, et al.: *Chromatographia* 66, 185 (2007).
9. Grata E, Guillaume D, Glauser G, et al.: *J. Chromatogr. A* 1216, 5660 (2009).

### Souhrn

#### Balounová R.: UHPLC jako významný nástroj metabolomiky

Metabolomika je stále se rozvíjející vědní disciplína, jejímž cílem je komplexní analýza (identifikace a kvantifikace) všech metabolitů (nízkomolekulárních látek) přítomných v buňce. Nejčastěji využívanou separační technikou je v současné době vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Zajímavou alternativou jejího tradičního formátu je tzv. UHPLC, jejíž podstatou je použití částic menších než 2 μm v kombinaci s vysokým tlakem na koloně. Touto separační metodou lze analyzovat různé druhy sloučenin, nalézá tak uplatnění v mnoha vědních oborech.

**Klíčová slova:** metabolity, metabolomika, UHPLC.

### Summary

#### Balounová R.: UHPLC as important tool of metabolomics

Metabolomics is a firmly evolving science with an objective of complex analysis (identification and quantification) of any metabolites (low molecular substances) present in cell. Contemporaneously most exploited separation technique is a high performance liquid chromatography. One of the compelling alternatives of its traditional format is so called UHPLC, which principle is the usage of elements smaller than 2 μm combined with high pressure on column. Hereby separation method could analyze various forms of compounds, therefore its application is widely extended to many disciplines.

**Key words:** Metabolites, Metabolomics, UHPLC.

# GENETICKÉ MODIFIKACE OLEJNATÝCH ROSTLIN

Ilona Bíbová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

Genetická modifikace (GM) je cílená změna dědičného materiálu spočívající ve vnesení cizorodého dědičného materiálu do dědičného materiálu organismu nebo vynětí části dědičného materiálu organismu způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. Úpravou genomu rostlin vznikají tzv. transgenní rostliny, tj. rostliny, do jejichž dědičného základu byly metodami genového inženýrství vneseny geny z jiných organismů<sup>1</sup>. Vnesením vhodných genů, případně jejich částí lze dosáhnout požadované vlastnosti, která umožňuje rostlině odolávat herbicidům, škůdcům, extrémním podmínkám, bakteriálním, plísňovým a virovým infekcím. Modifikace dále může vést ke zvýšení nutriční hodnoty potravin a krmiv, technologických vlastností plodin, syntese léčiv a faktorů důležitých pro zdraví člověka a zvířat. Tyto změny vlastností rostlin by mohly významně přispět k řešení otázky nedostatku potravin pro stále se rozšiřující populace obyvatel zemí třetího světa a mohly by vést i ke snížení spotřeby chemických prostředků na ochranu rostlin, jejichž míra neúnosně stoupá na úkor zátěže životního prostředí. Vzhledem k potenciálnímu riziku možných nežádoucích účinků transgenních rostlin na ostatní organismy a člověka je vývoj, produkce a distribuce transgenních rostlin omezena legislativou.

## Genetické modifikace

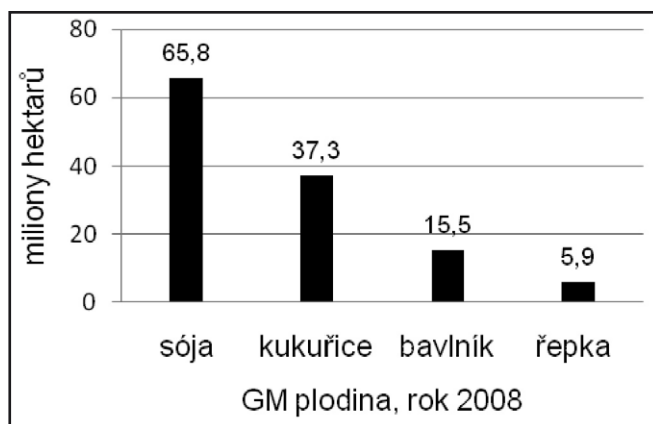
Nejčastějšími genetickými modifikacemi rostlin jsou modifikace vedoucí ke zvýšení jejich odolnosti vůči herbicidům a hmyzím škůdcům. Ve druhém případě se uplatňují především tzv. Bt technologie využívající některých genů dárcovské bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt), jež je sama v zemědělství používána k ochraně rostlin již po několik desetiletí. V rámci Bt technologií se v praxi používají různé varianty genů *cry* odvozené od několika kmenů *B. thuringiensis*. Obrovskou výhodou této strategie je, že genové produkty genů *cry* velmi specificky působí na úzký okruh hmyzích taxonů. Insekticidní Bt-proteiny dostupné v současných komerčních přípravcích jsou kódovány geny *cry1*, *cry2*, *cry3* a *cry4*. Obecně se dá říci, že toxiny kódované geny *cry1* jsou účinné proti motýlům (Lepidoptera), *cry2* jsou toxické pro Lepidoptera a Diptera, toxiny kódované geny *cry3* jsou toxické pro Coleoptera a *cry4* pro Diptera. Například toxin *cry1Ac* způsobuje rezistenci transgenního bavlíčku vůči jeho hlavním škůdcům z řádu Lepidoptera. Pro navození tolerance rostlin vůči herbicidům jsou nejčastěji využívány transgeny podmiňující odolnost ke glyfosatu (geny *cp4 epsps* a *gox*) a fosfotricinu (geny *bar* a *pat*), méně pak ke chlórsulfuronu (gen *csr1-2*) a bromoxynilu (gen *bxn*). Zatím v menší míře jsou využívány systémy zalo-

žené na potlačení projevu některých genů či tvorby virových částic na principu syntézy protismyslových nukleových kyselin (např. u řepky). Pro výrobu heterozního osiva našel u řepky uplatnění systém genů *barnasa-Barstar* pro navození samčí sterility rostlin a obnovu fertility. U sóji i řepky byly s úspěchem vyzkoušeny strategie zaměřené na dosažení změn ve složení mastných kyselin olejů (např. zvýšení obsahu linolenové)<sup>2, 3</sup>.

## Geneticky modifikované olejnaté rostliny

Mezi nejvíce pěstované GM olejnaté rostliny pro komerční účely patří sója, bavlník a řepka, v malé míře se pěstuje ještě len a slunečnice (Obr. 1). Celosvětově nejrozšířenější a nejvíce pěstovanou GM olejinou je sója. V současné době existuje 11 odrůd GM sóji, ne všechny jsou však povoleny a uvedeny na trh. V roce 2008 dosáhla pěstební plocha GM sóji 65,8 milionů hektarů, což představuje 72 % celkové pěstební plochy sóji. Země, které pěstují GM sóju, leží především v Severní a Jižní Americe (USA, Argentina, Brazílie, Kanada, Uruguay, Bolívie, Paraguay, Chile a Mexiko), pěstuje se ale i v jižní Africe a Číně. Téměř výhradními pěstiteli GM sóji jsou USA a Argentina. Evropská Unie (EU) dováží každý rok 40 milionů tun sóji hlavně z Brazílie, USA a Argentiny. Dovezená sója je používána převážně jako krmivo pro dobytek. Surové sójové boby jsou základem pro výrobu rostlinných olejů a tuků, lecithinu a jiných emulgátorů, tokoferolu, sojové moučky, tofu, mléka, potravinářských doplňků aj. Ze sójového oleje se vyrábí biopalivo, kosmetické výrobky, změkčovače, barvy, čisticí a mycí prostředky<sup>4</sup>. Všechna komerční GM sója nese transgen pro rezistenci k určitému herbicidu. Většina GM sóji obsahuje transgen pro rezistenci ke glyfosatu (N-fosfonomethylglycin). Glyfosat je účinnou látkou herbicidu Roundup a specificky inhibuje enzym EPSPsynthasu (enolpyruvylšikimátfosfátsynthasa), který je důležitým článkem syntézy aromatických aminokyselin. Po aplikaci glyfosatu tak rostlina umírá na nedostatek těchto aminokyselin. Živočichové tento enzym nemají, proto pro ně není glyfosat toxický. Do transgenní odrůdy sóji byl vložen gen *cp4 epsps*, což je varianta genu pro EPSPsynthasu, pocházející z půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tento enzym není glyfosatem blokován, proto se rostlina stává odolnou vůči herbicidu Roundup. Pro selekci této odrůdy sóji (tzv. Roundup Ready sója) byl použit přímo glyfosat, v GM sóji tak není žádný další selektovatelný gen pro rezistenci k antibiotikům. Sója s rezistencí ke glyfosatu byla jedinou GM plodinou, která byla legálně obsažena v potravinách prodávaných v České republice ještě před vstupem do EU. Další způsob genetické modifikace sóji je vložení genu *csr1-2* pocházející

z *Arabidopsis thaliana*, který kóduje variantu proteinu AHASL (velké podjednotky enzymu acetolaktátsynthasy). Transgen zajišťuje rostlině odolnost vůči imidazolínovým herbicidům, které inhibují právě enzym acetolaktátsynthasy, který je prvním enzymem v syntéze větvených aminokyselin. U netransgenních rostlin vede inhibice acetolaktátsynthasy k deficienci větvených aminokyselin a dalších sloučenin, což je fatální pro vývoj rostliny<sup>5, 6</sup>. Odolnost sóji vůči fosfinitricinu, který je také součástí některých herbicidů, zajišťuje transgen *pat* původem z bakterie *Streptomyces viridochromogenes*. Tento transgen kóduje enzym fosfinitricinacetyltransferasu (PAT). PAT inaktivuje acylaci herbicidy s účinnou složkou fosfinitricinem. Fosfinitricin blokuje glutaminyntasy, klíčový enzym metabolismu dusíku, který detoxikuje amoniak za vzniku glutamátu. Následné nahromadění amoniaku vede k bloádě fotosyntézy a rozpadu chloroplastů<sup>7</sup>. Dále u sóji existuje kombinace vnesených transgenů jako např. genu *cp4 epsps* (viz výše) a genu *cry1a(c)* z *B. thuringiensis*, který kóduje Bt-toxin Cry1Ac a tím zajišťuje rostlině ochranu proti hmyzím škůdcům<sup>4</sup>. Genetickou modifikací byla také docílena změna ve složení mastných kyselin sóji. Transkripce genu kódujícího enzym D12-dehydrogenasu byla inhibována přidáním další kopie tohoto genu. D12-dehydrogenasa katalyzuje dehydrogenaci olejové kyseliny na kyselinu linolovou. To umožnilo získat sójové boby s vysokým obsahem kyseliny olejové na úkor linolové, což je výhodou při smažení<sup>4</sup>.



**Obr. 1.** Souhrnné pěstební plochy GM plodin v roce 2008. Plocha sóji představuje 72 % celkové pěstební plochy sóji, plocha kukuřice představuje 23 % celkové pěstební plochy kukuřice, plocha bavlníku představuje 47 % celkové pěstební plochy bavlníku a plocha řepky představuje 21 % celkové pěstební plochy řepky<sup>4</sup>.

V roce 2008 dosáhla souhrnná pěstební plocha GM bavlníku 15,5 milionů hektarů, což představuje 47 % celkové celosvětové plochy oseté bavlníkem. Bavlník je hned za sójou a kukuřicí třetí nejpěstovanější GM plodinou na světě. Většina GM bavlníku je komerčně pěstována v Indii a USA, je pěstován i v Číně, Argentíně, jižní Africe, Austrálii, Mexiku a Kolumbii, zatím nikoliv v EU. Bavlník je po staletí pěstovaná rostlina, která si zasloužila pozornost díky vláknitým strukturám semen. V 19. století produkce bavlněných látek zapříčinila prudký pokles osevních ploch lnu setého ve střední

Evropě. Mimo produkce textilních látek jsou na olej bohatá semena bavlníku používána k výrobě kuchyňských olejů, margarínů a jsou zdrojem vitamínu E. Zbytky semen bohaté na proteiny se po vylisování oleje používají jako krmivo. Celulosa a methylcelulosa vláken, která jsou příliš krátká na výrobu textilií, jsou využita pro výrobu zahušťovadel, emulgátorů, stabilizátorů a plnidel. Většina pěstovaného GM bavlníku obsahuje kombinaci transgenů *cry1a(c)* a *cry2ab2* nebo *cry1a(c)* a *cry1f* kódující různé varianty Bt-toxinu, který chrání rostlinu proti hmyzím škůdcům, díky kterým byla výrazně snižována kvalita bavlny a výnosy. Po zavedení této genetické modifikace se o 25 % snížilo použití insekticidů. Často je přítomen i transgen *cp4 epsps* zajišťující odolnost vůči glyfosatu obsaženém v herbicidech a transgen *pat*, který zajišťuje odolnost vůči fosfinitricinu<sup>4</sup>.

Ještě donedávna byla řepka z potravinářského hlediska nevýznamnou plodinou. Potravinářský průmysl zaujala v roce 1994, když se šlechtitelům podařilo získat odrůdu s nízkou hladinou kyseliny erukové v tuku a současně i snížit hladinu glukosinolátů. Tyto nové odrůdy se označují jako takzvané „dvojnulkové“ (00). Kyselina eruková má nepříznivý vliv na resorpci při trávení, na růst a může být příčinou myokarditidy u zvířat. Glukosinoláty a jejich hydrolytické produkty představují hlavní překážku při použití řepkových šrotů a výlisků ve výživě hospodářských zvířat, popř. lidí. Ovlivňují nepříznivě činnost štítné žlázy a toxicky působí i na činnost jater. Negativní účinky adenylovaných glukosinolátů vysoce překračují pozitivní vlastnosti minoritního zastoupení indolových glukosinolátů v semeni řepky<sup>4, 8</sup>. V současné době není řepka zdaleka pěstována jen pro výrobu biopaliv, díky „00“ odrůdám má široké využití v potravinářském průmyslu. Rafinovaný řepkový olej, který je bohatý na jednosytné mastné kyseliny se využívá k výrobě margarínu. Jako krmivo pro zvířata se osvědčil řepkový šrot, který je hodnotným zdrojem proteinů. Pěstitelé GM řepky jsou hlavně Kanada, USA a Austrálie, pěstování GM řepky pro komerční účely v EU není dosud povoleno, její semeno a šrot se však do zemí EU dováží ke zpracování a jako krmivo. V roce 2008 dosáhla pěstební plocha GM řepky 5,9 milionů hektarů, což představuje 21 % celkové plochy oseté řepkou, a udržela si tak 4. místo v žebříčku nejvíce pěstovaných GM plodin na světě hned po sóji, kukuřici a bavlníku. V současné době existuje 12 variant GM řepky, ne všechny jsou však povoleny a uvedeny na trh. GM řepka často obsahuje transgen, který rostlinu chrání proti herbicidům používaným vůči běžným plevelům. Jde o geny *pat* nebo *cp4 epsps*. Proti samosprašení rostlin při výrobě heterozního osiva slouží gen *barnasa* z bakterie *B. amyloliquefaciens*, který kóduje ribonukleasu, která je produkována buňkami prašného váčku, kde brání vývoji pylu. Hlavním přínosem genetických modifikací řepky je změna složení mastných kyselin, které určují fyzikální a nutriční vlastnosti řepkového oleje. Jde o zvýšení obsahu mastných kyselin s dlouhým postran-

ním řetězcem, které udržují margarín v tuhém stavu při zvýšení teploty, což umožňuje zkrácení výrobního procesu margarínu a následného snížení nákladů. Novým výzkumným záměrem je vývoj GM řepky se zvýšeným obsahem vitamínu A<sup>4</sup>.

Pro komerční použití je povolen GM len setý (*Linum usitatissimum* L.), odrůdy *CDC Triffid*, který se pěstuje od roku 1996 v Kanadě a od roku 1998 v USA. Je pěstován pro výrobu lněného oleje a jako krmivo. GM len setý nese několik transgenů, z nichž první je transgen *als* z *A. thaliana* podmiňující toleranci rostlin vůči chlorsulfuronu. Tento transgen je zodpovědný za rezistenci k půdním reziduíům sulfonylmočoviny herbicidů jako je triasulfuron, metsulfuron-methyl a chlorsulfuron, které se vážou na enzym acetolaktátsynthasu a tím inhibují biosyntesu valinu, leucinu

a isoleucinu. Druhým transgenem je běžný selektovatelný gen *nptII*, který byl izolován z bakterie *Escherichia coli* a je zodpovědný za rezistenci ke kanamycinu. Tento transgen kóduje enzym neomycinfosfotransferasu II (NPTII), který fosforyluje kanamycin, což mu brání navázat se na ribosomy a poskytuje tak buňkám rezistenci k antibiotiku. Dalším (markerovým) transgenem je *nos*, který kóduje enzym nopalinsynthasu. Tento enzym katalyzuje syntésu nopalinu, což je opin, který je výsledkem kondenzace argininu  $\alpha$ -ketoglutarátu. Jestliže divoký typ *A. tumefaciens* infikuje hostitelskou rostlinu, začne opinsynthasa přítomná v T-DNA oblasti v Ti plasmidu bakterie řídit syntésu opinu (např. nopalinu) v hostitelské buňce<sup>9</sup>. Na následujícím obrázku (Tab. I) je souhrn většiny transgenů GM sóji, řepky, bavlníku, lnu a slunečnice<sup>4</sup>.

**Tab. I:** Souhrn většiny transgenů GM olejnatých rostlin<sup>4</sup>.

plodina	zkratka transgenu	protein	transgen z organismu
sója, řepka	<i>cp4 epsps</i>	enolpyruvylšikimátfosfátsynthasa	<i>Agrobacterium tumefaciens CP4</i>
sója, řepka	<i>pat</i>	fosfinotricin-N-acetyltransferasa	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
sója, len	<i>bla</i>	$\beta$ -laktamasa	bakterie
sója	<i>gm-fad2-1</i>	D12-dehydrogenasa	sója luštinatá
sója	<i>gm-hra</i>	acetolaktátsynthasa	sója luštinatá
sója	<i>gat4601</i>	glyfosat-N-acetyltransferasa	<i>Bacillus licheniformis</i>
sója, bavlník	<i>gus</i>	$\beta$ -D-glukuronidasa	<i>Escherichia coli</i>
sója, řepka	<i>bar</i>	fosfinotricin-N-acetyltransferasa	<i>S. hygrosopicus</i>
bavlník	<i>cry1Ac</i>	Cry1Ac $\delta$ -endotoxin	<i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (Btk)</i>
bavlník	<i>cry2Ab</i>	Cry2Ab $\delta$ -endotoxin	<i>B. thuringiensis subsp. kurstaki (Btk)</i>
bavlník	<i>aad</i>	9-O-aminoglykosidadenylyltransferasa	bakterie <i>E. coli</i>
bavlník, len	<i>nptII</i>	neomycinfosfotransferasa II	<i>E. coli</i>
len	<i>als</i>	acetolaktátsynthasa	<i>Arabidopsis thaliana</i> podmiňující toleranci rostlin vůči chlorsulfuronu
slunečnice	<i>als</i>	acetolaktátsynthasa	<i>Helianthus annuus</i>
len	<i>nos</i>	nopalinsynthasa	<i>A. tumefaciens CP4</i>
řepka	<i>gox</i>	glyfosatoxidas	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
řepka	<i>barnasa</i>	ribonukleasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
řepka	<i>barstar</i>	ribonukleasový inhibitor	<i>B. amyloliquefaciens</i>
sója	<i>csr1-2</i>	velká podjednotka acetolaktátsynthasy	<i>A. thaliana</i>

## Závěr

V současné době jsou pro komerční účely nejvíce pěstovanými GM plodinami na světě sója, kukuřice, řepka a bavlník. Nejčastějšími získanými vlastnosti GM rostlin jsou odolnost vůči herbicidům a hmyzím škůdcům. Přes 90 % plochy pěstovaných GM plodin najdeme na americkém kontinentu (USA, Argentina, Brazílie, Kanada), následuje Čína a Indie. GM plodiny pěstuje pro komerční účely více jak 20 zemí světa včetně České republiky, z nichž 14 je považováno za rozvojové. Pozitivními důsledky používání GM plodin je mimo jiné snížení množství používaných pesticidů o 224 000 tun ročně. Pěstování GM plodin na celém světě přispělo i ke snížení emisí oxidu uhličitého o 9 milionů tun. Zemědělci totiž při technologii bez orby uspoří nemalé množství paliva. Podrobné studie dokázaly, že zvířata krmená geneticky modifikovanými plodinami poskytují kvalitní, toxiny nekontaminované maso a další produkty. Pokud je krmivo dobytka kontaminováno plísněmi, toxiny z masa a mléka jsou následně konzumovány lidmi. V neposlední řadě GM plodiny zvyšují výnosy zemědělců<sup>10</sup>. Riziko geneticky modifikovaných rostlin je třeba srovnávat s rizikem původních rostlin, z nichž byl geneticky modifikovaný materiál odvozen. Stejně tak je nezbytné porovnávat přínosy a negativa pěstebních technologií na bázi GM plodin s konvenční

a ekologickou produkcí. I přes značné množství obav (zejména v Evropě) týkající se dopadu GM plodin na ekosystémy a zdraví živočichů včetně lidí, nebyl zatím prokázán žádný negativní účinek GM plodin. V současné době je patrné, že nastupuje tzv. druhá generace GM plodin, které sdružují dva či více nových znaků, které byly vloženy do jejich dědičné informace technikami genového inženýrství. Jedná se zejména o kombinace různých odolností k herbicidům a hmyzím škůdcům, případně sdruženým odolnostem k více škůdcům. Geneticky upravené odrůdy druhé generace zaujímaly v roce 2006 zhruba 20 % veškerých ploch GM plodin, v USA dokonce 28 %. Bezpochyby se tento trend bude čím dál více uplatňovat v praxi<sup>2</sup>. Před světovým zemědělstvím stojí nelehký úkol. V roce 2050 překročí pravděpodobně počet obyvatel Země 9 miliard a všechny bude nezbytné nasycit. Přitom je nutné snížit nepříznivé dopady pěstování plodin a chovu zvířat na životní prostředí. Pole a pastviny zabírají 40 % zemského povrchu a jejich zavlažování pohltí 70 % z celkové roční spotřeby vody. V zemědělství tak bude nutné hledat nové cesty ke zvýšení výnosů na jedné straně a snížení spotřeby vody, energie a emisí na straně druhé. Proto se využívání GM plodin v budoucnosti pravděpodobně nevyhneme<sup>11</sup>.

## Literatura:

1. Zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty ve znění pozdějších právních předpisů.
2. Rakouský S, Hraška M: Sborník ze semináře pořádaného Ministerstvem zemědělství ČR a Českou zemědělskou univerzitou v Praze (2007).
3. Gill S S, Cowles E A, Pietantonio P V: *Ann. Rev. Entomol.* 37, 615 (1992).
4. Databáze GMO Compass: [www.gmo-compass.org](http://www.gmo-compass.org), staženo 31.10. 2009
5. Sathasivan K, Haughn GW, Murai N: *Nucl. Acids. Res.* 18, 2188 (1990).
6. Pang SS, Duggleby RG, Guddat LW: *J. Mol. Biol.* 317, 249 (2002).
7. Příkrylová P: Bakalářská práce, Jihočeská universita České Budějovice (2004).
8. Vašák J: *Zemědělský týdeník* (2009).
9. Bíbová I: Bakalářská práce, VŠCHT v Praze (2008).
10. Gómez-Barbero M, Rodríguez-Cerezo E: *Economic Impact of Dominant GM Crops Worldwide: a Review* (2006).
11. Drobník J: *Revue politika*, 6 (2006).

## Souhrn

### Bíbová I.: Genetické modifikace olejnatých rostlin

Pěstební plochy geneticky modifikovaných (GM) plodin se rok od roku zvyšují. Ukázalo se, že genetické modifikace plodin vedou ke zvýšení jejich výnosů. Jedny z nejvíce pěstovaných rostlin jsou olejnaté plodiny sója, bavlník a řepka. Genetickou modifikací je možno získat nejen větší výnosy, ale i vyrobit produkty vyšší nutriční nebo materiálové kvality, zlepšit ekologické dopady zemědělství díky snížení množství používaných pesticidů, docílit snížení spotřeby paliv, vody, energií, emisí skleníkových plynů atd. Vzhledem ke zvyšujícímu se počtu obyvatel se používání GM plodin nejspíše nevyhneme.

**Klíčová slova:** GM plodiny, genetické modifikace, olejnin

## Summary

### Bíbová I.: Genetically modified oil plants

The cultivation areas of genetically modified (GM) crops increase year by year. Genetically modified crops lead to the yields enhancement and other benefits. Soybean, cotton and rape are the mostly grown commercial GM oil plants. The bigger yields, higher nutrition quality products and materials could be obtained due to the genetic modifications. Ecological consequences of agricultural production were improved because of decreasing pesticide quantity by their substitution. Considering to increasing population number we will be forced to use GM crops more widely.

**Key words:** GM crops, genetic modifications, oil plants

# GENETICKY MODIFIKOVANÉ BRAMBORY

Lucie Zmatlíková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

Brambor obecný (*Solanum tuberosum*) představuje v dnešní době společně s obilninami jednu z nejvýznamnějších potravinových plodin. Za svoji oblíbenost vděčí jak vysoké produktivitě, tak značné nutriční hodnotě spočívající ve vysokém obsahu škrobu, proteinů a vitaminů. Z těchto důvodů tak stále roste zájem na zlepšování vlastností bramboru. Jelikož je však brambor vysoce heterozygotní tetraploidní plodinou, je šlechtění tradičními metodami poměrně obtížné a stále více se proto využívá metod genového inženýrství<sup>1</sup>.

Do dnešní doby bylo vyvinuto mnoho způsobů transformace rostlin, ať už se jedná o techniky přímé, jakými jsou například bombardování rostlinné tkáně mikroprojektily s navázanou DNA či fúze rostlinných protoplastů s liposomy obsahujícími DNA, nebo nepřímé, které využívají přírodního transformačního systému vektorového organismu, nejčastěji pak bakterií rodu *Agrobacterium*. Poslední zmíněné se v případě brambor nejvíce osvědčily. Účinnost transformace i následná regenerace transgenních rostlin bramboru však značně kolísá a závisí na genotypu, fyziologickém stavu rostlinného materiálu, použitém kmeni agrobakterií apod<sup>1,2,3</sup>. Jako explantát se využívají obvykle bramborové hlízy či disky odvozené od listů a stonků bramboru<sup>4</sup>.

## Transformace pomocí bakterií

*Agrobacterium tumefaciens* je gramnegativní půdní bakterie známá jako původce tvorby nádorů u dvouděložných rostlin. Růst těchto nádorů je spojen s expresí T-DNA (transferred DNA), která je součástí bakteriálního Ti plasmidu (tumor-inducing), zodpovědného za virulenci bakterie. T-DNA kóduje enzymy katalyzující syntézu fytohormonů vyvolávajících diferenciaci rostlinných buněk a opinů sloužících jako zdroj uhlíku a dusíku pro bakterii. Samotný přenos T-DNA je kódován tzv. *vir* regionem, který je také součástí Ti plasmidu<sup>5,6</sup>.

Pro přenos cizorodých genů do rostlin pomocí agrobakterií se využívá tzv. kointegrativních či binárních vektorů. Metoda využívající kointegrativní vektor je založena na principu vytvoření malého plasmidu s vloženým úsekem T-DNA, tzv. intermediárního plasmidu. Do T-DNA se restrikcí štěpením a ligací vloží cílová sekvence DNA. Plasmid je následně konjugací přenesen do *A. tumefaciens*, kde dojde homologní rekombinací ke vzniku kointegrátu mezi odpovídajícími sekvencemi intermediárního plasmidu a Ti plasmidu. Cílové geny se tak stanou součástí plasmidu Ti<sup>7</sup>. Binární vektory mají plasmid Ti rozdělený na dva menší plasmidy. Jeden z nich obsahuje T-DNA, druhý pak samotný úsek virulence<sup>6</sup>.

Transformační účinnost bývá zpravidla nízká, v jednotkách, maximálně desítkách procent. Je proto nutné oddělit transformované rostliny od netransformovaných. K tomu se využívají selektovatelné geny, např. pro rezistenci k určité látce, které umožní transformované buňce v selekčním prostředí přežít a regenerovat, zatímco netransformované strádají, popřípadě hynou. Dříve se pro selekci využívaly především geny pro rezistenci k antibiotiku či herbicidu<sup>6</sup>. Ty však mají nevýhodu v možné toxicitě či alergenitě genových produktů, s čímž je spojeno nepředvídatelné riziko pro ekosystém a lidské zdraví. Navíc existuje možnost, že by se gen pro rezistenci k antibiotiku mohl rekombinací dostat zpět do bakteriálního genomu a způsobit tak rezistenci bakterie k danému antibiotiku. Proto byly v posledních letech vytvořeny nové typy selekčních systémů. V případě bramboru byl použit např. transgen pro rezistenci ke galaktose<sup>8</sup>, transgen pro xylosaisomerasu<sup>9</sup> či manosa-6-fosfátizomerasu<sup>10</sup>. Pro zjištění míry exprese transgenů se používají reportérové geny. Mezi nejčastější patří gen *gus* kódující  $\beta$ -glukuronidasu z *Escherichia coli*, *gfp* (green fluorescent protein) z medúzy *Aequorea victoria*, gen pro luciferasu či chloramfenikolacetyltransferasu<sup>6</sup>.

## Typy genetických modifikací bramboru

Geneticky modifikované plodiny je možné rozdělit podle získaných vlastností do tří základních skupin. První generace zahrnuje rostliny výhodné z hlediska zemědělské produkce (odolnost k herbicidům a biotickým i abiotickým stresům), druhá je charakteristická změněným složením produktu (vyšší obsah vitaminů, změny ve složení sacharidů či proteinů), třetí generace se vyznačuje zcela novými vlastnostmi využitelnými např. ve farmaceutickém průmyslu<sup>6</sup>.

Jednou z prvních komerčně využívaných geneticky modifikovaných plodin byla v polovině 90. let sója rezistentní vůči herbicidu glyfosátu, tzv. Roundup-Ready sója. Dnes již známe i Roundup-Ready obilí, kukuřici, bavlnu, salát, cukrovou řepu a také brambory<sup>6</sup>. V roce 2002 byly vyvinuty brambory s vloženým genem pro krysí P450 monooxygenasu, které jsou schopné metabolizovat xenobiotika. Tato modifikace umožňuje vznik plodin rezistentních k herbicidům, které navíc dokážou účinně odbourávat různé environmentální kontaminanty<sup>11</sup>.

Velkým problémem při pěstování plodin bývají patogenní organismy. Rezistence plodin vůči hmyzu je založena na syntéze antimetabolických proteinů rostlinného či mikrobiálního původu, které narušují proces trávení u hmyzu. Tyto proteiny mohou být syntetizovány konstitutivně v pletivech, která jsou často napadána hmyzem<sup>6</sup>. Příkladem takových plodin jsou bram-

bory nesoucí gen pro syntézu GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin), přírodního lektinu ze sněženky a jí příbuzných rostlin, či gen pro manosa-specifický lektin konkavalin A<sup>12</sup>. Jedním z nejpoužívanějších genů pro rezistenci k hmyzím škůdcům je gen pro Bt-toxin. Tento gen izolovaný z *Bacillus thuringiensis* kóduje insekticidní protein, který je po pohlcení hmyzem aktivován proteasami v alkalickém prostředí střeva. Následně se toxin váže na receptory buněk střevního epitelu. Dochází k lyzi membrány a poté k destrukci celého střeva. Výhodou Bt-toxinu je, že má toxické účinky pouze na hmyz a neohrožuje obratlovce. Problém představuje ale nebezpečí vzniku rezistence hmyzu na Bt-toxin, nejčastěji způsobená mutací genu kódujícího receptory, na něž se Bt-toxin váže<sup>13</sup>. Plodiny však mohou být ohroženy také mikrobiálními škůdci. Proto byly vyvinuty brambory rezistentní vůči plísním, které mají vložený gen *ac2* ze semen *Amaranthus caudatus* kódující Ac-AMP2, antimikrobiální peptid vázající chitin. Ac-AMP2 se váže na chitin v buněčné stěně plísní, čímž vyvolává změnu v její polaritě a následně inhibici růstu<sup>14,15</sup>. Známý jsou také brambory rezistentní vůči virovým infekcím<sup>16</sup>.

Další důležitou vlastností plodin je odolnost vůči biotickým stresům. V případě brambor se pracuje na výzkumu mrazuvzdornosti, založené na schopnosti syntetizovat nemrznoucí protein<sup>17</sup> či zvýšené toleranci vůči zasolení půd<sup>18</sup>.

## Literatura

1. De Block M.: *Theor. Appl. Genet.* 76, 767 (1988).
2. Ooms G, et al.: *Theor. Appl. Genet.* 73, 744 (1987).
3. Beaujean A, Sangwan RS, et al.: *J. Exp. Bot.* 49, 1589 (1998).
4. Visser RGF, et al.: *Plant. Mol. Biol.* 12, 329 (1989).
5. Zupan JR, Zambryski P.: *Plant. Physiol.* 107, 1041 (1995)
6. Ondřej M, Drobník J.: *Transgenoze rostlin*. Academia, Praha 2002.
7. Zambryski P, et al.: *EMBO J.* 2, 2143 (1983).
8. Joersbo M, Jorgensen K, Brunstedt J.: *Mol. Breed.* 11, 315 (2003).
9. Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT.: *Plant. Cell. Reports* 18, 76 (1998).
10. Joersbo M, et al.: *Mol. Breed.* 4, 111 (1998).
11. Yamada T, et al.: *Theor. Appl. Genet.* 105, 515 (2002).
12. Griffiths BS, Geoghegan IE, Robertson WM.: *J. Appl. Ecol.* 37, 159 (2000).
13. Tabashnik BE, et al.: *Nat. Biotechnol.* 26, 199 (2008).
14. Selitrennikoff CP.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2883 (2001).
15. Pribylová R, et al.: *Vet. med.* 52, 471 (2007).
16. Harrison BD.: *Eur. J. Plant. Pathol.* 98, 1 (1992).
17. Wallis JG, Wang H, Guerra DJ.: *Plant. Mol. Biol.* 35, 323 (1997).
18. Hmidia-Sayari A, et al.: *Plant. Sci.* 169, 746 (2005).
19. Bříza J.: *Biol. Plant* 51, 268 (2007).
20. Ji-Yong Z, et al.: *J. Virol.* 77, 9090 (2003).
21. <http://www.mzp.cz/AIS/web.nsf/pages/gmo>, staženo 18. června 2009.

## Souhrn

### Zmatlíková L.: Geneticky modifikované brambory

Prudký rozvoj metod genového inženýrství v posledních letech umožňuje vznik kulturních plodin s unikátními znaky, které by nemohly vzniknout běžným křížením. V případě bramboru se jedná například o plodiny rezistentní k hmyzím škůdcům, virovým chorobám, herbicidům, plodiny tolerantní k zasolení půd či nízkým teplotám. Velké uplatnění do budoucna mohou nalézt také transgené rostliny pro ochranu životního prostředí, schopné odbourávat environmentální kontaminanty či rostliny syntetizující farmakologicky využitelné proteiny. Uvolňování geneticky modifikovaných plodin do životního prostředí je však spojeno s jistými riziky pro lidské zdraví i ekosystém a je proto neustále potřeba zlepšovat jak transformační tak detekční metody.

**Klíčová slova:** brambor obecný, genetické modifikace, *Ti* plasmid, *Agrobacterium tumefaciens*, Bt-toxin

Současné výzkumy se zaměřují také na typy transformací, které by mohly být využitelné ve farmakologii a zdravotnictví. Jeden z nejnovějších experimentů zahrnuje produkci onkogenu E7 lidského papilomaviru 16. Tento virus způsobuje karcinom děložního čípku a je spojován také s karcinomem horního dýchacího a zažívacího ústrojí. Onkogen E7 exprimovaný rostlinami může být využit k imunizaci zvířat a výrobě protilátek proti papilomaviru 16 (lit. 19). Na stejném principu jsou založeny také brambory syntetizující S1 glykoprotein IBV (infekční bronchitický virus), který vyvolává vážné choroby respiračního a urogenitálního systému a ledvin<sup>20</sup>.

V České republice se v současné době testují v polních pokusech například brambory se změnou cukerného metabolismu, která by měla mít příznivý vliv na skladování za nižších teplot. Ty obsahují bakteriální fosfofruktokinasy, vykazující aktivitu při nízkých teplotách, což má za následek snížení obsahu rozpustných cukrů. Dalším testovaným typem jsou brambory se zvýšenou odolností vůči plísní bramborové (*Phytophthora infestans*) a brambory se změněným složením škrobu, ať už se jedná o posun k vyššímu podílu amylosy a nižšímu procentu amylopektinu či naopak. Poslední zmíněné obsahují fragment genu syntetasy škrobu vázané na škrobová zrna. Ta jsou v bramboru nezbytná pro syntézu amylosy. Genovou modifikací dojde k zablokování syntézy amylosy a zvýšení podílu amylopektinu. Tyto brambory by bylo možné využít pro technické účely<sup>21</sup>.



## Summary

### Zmatlíková L.: Genetically modified potatoes

In recent years the abrupt development of methods of genetic engineering has enabled the production of culture crops with unique characteristics that could not be produced by the traditional breeding. In the case of the potato there are, for example, crops resistant to insect pests, viral diseases, herbicides, or tolerant to salinization or low temperatures. In the future the transgenic plants, which are able to reduce the environmental contamination, could be used for the protection of the environment. Other plants could be used for synthesizing of proteins applicable in pharmacology. Because the deployment of the genetically modified crops in the environment poses certain risks for human health and the ecosystem, further improvements of the methods of the transformation and detection are necessary.

**Key words:** potato, genetic modification, *Ti* plasmid, *Agrobacterium tumefaciens*, Bt-toxine

# VYUŽITÍ METODY HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PRO IDENTIFIKACI MIKROORGANISMŮ

Jiří Koubek

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

Správné a rychlé identifikování mikroorganismů vždy patřilo mezi základní problémy mikrobiologie. U pacientů s infekčním bakteriálním onemocněním dochází k rizikům aplikace špatné antibiotické léčby, přítomnost patogenních mikroorganismů v potravinářském průmyslu je třeba též zavčas odhalit a provést proti nim co nejdříve opatření. V tomto ohledu se lékařská a potravinářská mikrobiologie spoléhá hlavně na klasické biochemické kultivační testy a testy imunochemické, které jsou náročné jak časově, tak z hlediska množství práce. Z tohoto důvodu se nabízí využití dalších metod jako lákavá volba, kde kromě relativně široce využívaných metod na bázi polymerasové řetězové reakce existují další alternativní metody. Jednou z těchto metod je metoda hmotnostní spektrometrie.

## Historie využití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci mikroorganismů

Myšlenka využití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci mikroorganismů na rodové, druhové či dokonce kmenové byla přednesena už v roce 1975. Anhalt a Fenselau použili elektronovou ionizaci pro analýzu malých molekul uvolněných z lyofilizovaných buněk po záhřevu<sup>1</sup>. Tento přístup studia mikroorganismů byl dále využit při studiu rozdílu mezi druhy rodu *Bacillus* pomocí ionizace elektrosprejem fosfolipidů<sup>2</sup>, či při studiu nenasycených mastných kyselin získaných bombardováním buněk rychlými atomy<sup>3</sup>.

Skutečný rozmach hmotnostní spektrometrie v biologických vědách s sebou přineslo až uvedení nového typu ionizace a desorpce laserem v přítomnosti matrice (MALDI z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)<sup>4</sup>, která umožňovala společně s analyzátozem typu Time-of-Flight (TOF) studium a identifikace makromolekul, jakými jsou např. proteiny<sup>5</sup>. Využití této techniky pro identifikaci mikroorganismů bylo představeno v polovině 90. let<sup>6,7,8</sup>, kdy byly lysované buňky smíchány s matricí a po krystalizaci

byla tato směs analyzována. Zjistilo se, že výsledná spektra jsou charakteristická pro daný mikroorganismus, přičemž procedura využívající celý buněk nemusí trvat déle než 10 minut<sup>7</sup>. Při zkoumání identity proteinů, které dávají odezvu v daném spektru, metodou srovnání hodnot  $m/z$  s daty získanými *in silico* analýzou genomu *E. coli*<sup>9,10</sup> a použitím tandemové hmotnostní spektrometrie<sup>11</sup> bylo zjištěno, že z velké části patří do skupiny ribosomálních proteinů či jiných bílkovin vyskytujících se v buňce ve vyšším počtu kopií. Další možnou cílovou molekulou pro hmotnostní spektrometrii mohou být nukleové kyseliny, kdy v kombinaci s polymerasovou řetězovou reakcí je možné studovat některé geny, ovšem vzhledem k vysokému nárůstu molekulové hmotnosti na jeden pár nukleotidů je použití kombinace hmotnostní spektrometrie-nukleová kyselina omezené.

## Reprodukovatelnost spekter

Zásadním problémem pro správnou identifikaci mikroorganismů je samotná opakovatelnost procesu, přičemž je důležité si uvědomit, že existuje celá řada proměnných, které mohou ovlivnit kvalitu spektra. Bylo zjištěno, že kvalita spektra záleží na použité matrici, použitím postupu lyse buněk, na rozpouštědlo přítomném v matrici, koncentraci analyzovaných buněk, fázi růstového cyklu<sup>12,13</sup>, na použitém přístroji<sup>13,14</sup>, typu měření (pozitivní mód, negativní mód)<sup>15</sup>, množství soli ve vzorku<sup>13</sup>, či na době uložení vzorku v lednici před analýzou<sup>16</sup>. Z tohoto důvodu je nutné si ujasnit podmínky měření už před samotným experimentem, zejména podmínky lyse. Mezi nejčastěji používané metody lyse patří extrakce ethanolem a kyselinou mravenčí, alternativou pro sporulující bakterie a bakterie vysoce patogenní je extrakce kyselinou trifluoroctovou<sup>17</sup>. Nejpohodlnějším přístupem ze všech se jeví tzv. technika celých buněk, kdy jsou vzorky přímo smíchány s matricí, která jako rozpouštědlo může obsahovat acetonitril či kyselinu trifluoroctovou<sup>18</sup>.

## Vyhodnocování spekter

Navzdory těmto překážkám došlo, společně s rozvojem metod vyhodnocování spekter, k velkému rozšíření hmotnostní spektrometrie do mikrobiologických laboratoří, a to jak v oblasti klinické a potravinářské, tak i v oblasti sledování bezpečnosti a kvality vody či v environmentální mikrobiologii<sup>18</sup>. Vyhodnocení spekter může být jak vizuální, tak i za pomoci různých algoritmů, což usnadňuje práci při manipulaci s velkým množstvím vzorků. Použité algoritmy mohou pracovat na bázi prostého srovnání existence signálů v dané pozici  $m/z$ <sup>19</sup>, či též mohou brát v potaz intenzity daných odezvy, což dokáže vylepšit citlivost metody pro rozlišení spekter až na úroveň kmene<sup>20</sup>. Od algoritmů je už jen krůček k zavedení databází a identifikaci neznámých mikroorganismů, zvláště při přihlídnutí k faktu, že některé charakteristické odezvy geneticky stejných bakterií byly zachovány i při změně několika ovlivňujících faktorů<sup>13</sup>, přičemž taxonomická souvislost mezi srovnatelnými spektry byla prokázána<sup>7</sup>.

Obecně řečeno, postupy vyhodnocující vzory (pattern recognition) vyžadují vyšší pozornost vůči experimentálním podmínkám, aby byla spektra získaná z neznámých vzorků a sbírkových kultur reprodukovatelná. Druhým možným postupem je zaměření se na menší počet „konzervovaných“ proteinů, což zaručí správnou specifitu daného spektra. Jako první tuto metodu použili Jarman et al.<sup>19,21</sup>, kdy za pomoci statistických nástrojů získali „otisk prstu“ u několika bakterií, kde posléze ověřili tuto metodu identifikací několika kmenů. Příkladem komerčně dostupných databází může být program BioTyper<sup>14</sup> či program Clin-ProTools<sup>22</sup>, ovšem jejich nevýhodou jsou podstatné náklady spojené se zakoupením. Další možnost přímé identifikace se nabízí při použití tandemové hmotnostní spektrometrie a následné přímé identifikaci analyzovaných proteinů vyhledáním v patřičných, volně dostupných, databázích<sup>11</sup>.

## Příklady použití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci mikroorganismů

Své využití v praxi nachází hmotnostní spektrometrie též při identifikaci virů, kdy kombinací polymerasové řetězové reakce a polymorfismu délky restričních fragmentů bylo odlišeno zastoupení jednotlivých genotypů viru hepatitidy typu C v populaci<sup>23</sup>. Hmotnostní spektrometrie pro identifikaci virů se dá použít i samostatně bez polymerasové řetězové reakce, což bylo demonstrováno na příkladu identifikace buněk nakažených herpes virem, při níž se zkoumaly rozdíly mezi proteiny nakažené a nenakažené buňky.<sup>24</sup> Podobným způsobem lze detekovat latentní virus HIV na základě specifických membránových proteinů na infikovaných buňkách.<sup>25</sup>

Mnohem širší uplatnění nabízí tato metoda na poli buněčných organismů. Pro identifikaci bakterií je též možné použít hmotnostní spektrometrii zaměřenou na nukleové kyseliny a jejich modifikace; např. Kirpekar, Douthwaite a Roepstorff<sup>26</sup> studovali molekulu

5S rRNA a její specifickou modifikaci archebakterií *Sulfolobus acidocaldarius*.

Mnohem zajímavější je studium bakterií pomocí hmotnostní spektrometrie s proteiny jako cílovými molekulami. Díky těmto technikám byla prokázána úspěšná identifikace zástupců rodů *Lactobacillus* na úroveň druhů a poddruhů<sup>27</sup>, byly provedeny identifikace velkého množství klinických izolátů získaných z pacientů s cystickou fibrosou<sup>28</sup>, či byly identifikovány anaerobní bakterie z biofilmu pod dásní<sup>29</sup>.

Důležitým prvkem v identifikaci mikroorganismů je též rozlišení mezi patogenními a nepatogenními zástupci stejného druhu či rodu. U rodu *Listeria* bylo popsáno 6 druhů, přičemž pouze *L. monocytogenes* a *L. ivanovii* vykazují patogenní vlastnosti, později jmenovaný pouze ve vzácných případech. Metoda hmotnostní spektrometrie dokázala tyto bakterie rozlišit až na úroveň jednotlivých kmenů<sup>30</sup>, stejně detailní zařazení se povedlo i u bakterií rodu *Salmonella*<sup>31</sup>.

Bylo ovšem zjištěno, že některé Gram-pozitivní bakterie při dnes zavedených postupech úpravy vzorku před analýzou poskytují kvalitativně horší spektra než Gram-negativní. Pro tyto případy Smole a kol<sup>32</sup> navrhli dodatečnou inkubaci s lysozymem, ovšem podle jiných stačí pouze další ošetření acetonitrem a trifluoroctovou kyselinou<sup>12,33</sup>.

Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie byla také popsána u eukaryotních mikroorganismů, kde výsledky u rodu *Aspergillus* naznačují, že tuto metodu lze použít i na odlišení na poddruhové úrovni<sup>34</sup>, a u druhů rodu *Penicillium* se však opět prokázala omezená opakovatelnost měření mezi laboratořemi<sup>35</sup>.

Jedním z problémů spojených s analýzou mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie je nutnost kultivace buněk před samotnou analýzou. Tímto je využít MALDI-TOF MS předurčeno pouze pro kultivovatelné mikroorganismy, kterých je méně než nekultivovatelných. Z tohoto důvodu by mohlo snižování počtu buněk nutných pro analýzu rozšířit pole působnosti této metody. Už Bundy a Fenselau<sup>36</sup> dokázali použít pro analýzu méně než 5000 buněk, ovšem největších úspěchů bylo na tomto poli dosaženo v oblasti tzv. bio-aerosolů<sup>37</sup>, kde se perspektivně uvažuje o využití jediné buňky pro samotnou analýzu. Ale to s sebou přináší další otázky spojené s reprodukovatelností spekter pocházejících z různých prostředí.

## Závěr

Metoda hmotnostní spektrometrie nabízí alternativu klasických postupů identifikace mikroorganismů. Její rychlost, snadná proveditelnost a přesnost z ní dělají výborný nástroj pro identifikace mikroorganismů jak v klinických laboratořích, v potravinářském průmyslu, tak i při zkoumání mikrobiální diverzity v životním prostředí. Zkoumané organismy mohou být bakterie, kvasinky, plísňe, ale i viry. Současné trendy spočívají hlavně ve snižování potřebného množství vzorku pro analýzu, kde je cílem dosáhnout spektrometrie co nejmenšího počtu buněk, ideálně pouze jedné.

## Literatura:

1. Anhalt JP, Fenselau C: *Anal. Chem.* 47, 219 (1975).
2. Black GE, Snyder AP, Heroux KS: *J. Microbiol. Methods* 28, 187 (1997).
3. Nichols DS, McMeekin TA: *J. Microbiol. Methods* 48, 168 (2002).
4. Karas M, Bachmann D, Bahr U, et al.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 78, 53 (1987).
5. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al.: *Anal. Chem.* 68, 850 (1996).
6. Cain TC, Lubman DM, Weber WJ Jr.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 1026 (1994).
7. Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 883 (1996).
8. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, et al.: *Nat. Biotechnol.* 14, 1584 (1996).
9. Ryzhov V, Fenselau C: *Anal. Chem.* 73, 746 (2001).
10. Holland RD, Duffy CR, Rafii F, et al.: *Anal. Chem.* 71, 3226 (1999).
11. Fagerquist CK, Garbus BR, Williams KE, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4341 (2009).
12. Vargha M, Takáts Z, Konopka A, et al.: *J. Microbiol. Methods* 66, 399 (2006).
13. Wang Z, Russon L, Li L, et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 456 (1998).
14. Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 46, 1946 (2008).
15. Demirev PA, Ramirez J, Fenselau C: *Anal. Chem.* 73, 5725 (2001).
16. Arnold RJ, Karty JA, Ellington AD, et al.: *Anal. Chem.* 71, 1990 (1999).
17. Lasch P, Nattermann H, Erhard M, et al.: *Anal. Chem.* 80, 2026 (2008).
18. Freiwald A, Sauer S: *Nat. Protoc.* 4, 732 (2009).
19. Jarman KH, Cebula ST, Saenz AJ, et al.: *Anal. Chem.* 72, 1217 (2000).
20. Arnold RJ, Reilly JP: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 630 (1998).
21. Jarman KH, Daly DS, Petersen CE, et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 1586 (1999).
22. Hsieh SY, Tseng CL, Lee YS, et al.: *Mol. Cell Proteomics* 7, 448 (2008).
23. Oh HB, Kim SO, Cha CH, et al.: *J. Med. Virol.* 80, 1712 (2008).
24. Erukhimovitch V, Karpasasa M, Huleihel M: *Biopolymers* 91, 61 (2009).
25. Berro R, de la Fuente C, Klase Z, et al.: *J. Biol. Chem.* 282, 8207 (2007).
26. Kirpekar F, Douthwaite S, Roepstorff P: *RNA* 6, 296 (2000).
27. Schmidt F, Fiege T, Hustoft HK, et al.: *Proteomics* 9, 1994 (2009).
28. Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 46, 3361 (2008).
29. Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, et al.: *Oral Microbiol. Immunol.* 23, 372 (2008).
30. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5402 (2008).
31. Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7767 (2008).
32. Smole SC, King LA, Leopold PE, et al.: *J. Microbiol. Methods* 48, 107 (2002).
33. Grosse-Herrenthey A, Maier T, Gessler F, et al.: *Anaerobe* 14, 242 (2008).
34. Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, et al.: *Anal. Biochem.* 380, 276 (2008).
35. Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 2555 (2008).
36. Bundy J, Fenselau C: *Anal. Chem.* 71, 1460 (1999).
37. Russell SC: *Mass Spectrom. Rev.* 28, 376 (2009).

## Souhrn

### Koubek J.: Využití metody hmotnostní spektrometrie pro identifikaci mikroorganismů

Přesná a rychlá identifikace mikroorganismů je důležitá v mnoha odvětvích. Vedle klasických metod a metod založených na analýze nukleových kyselin, přináší hmotnostní spektrometrie jinou možnost, jak tohoto cíle dosáhnout, přičemž tento souhrnný článek se zaměřuje především na metodu MALDI-TOF. Při správném zvládnutí laboratorního postupu a překonání obtíží zejména spojenými s reprodukovatelností spektra je možné identifikovat různé druhy mikroorganismů a to až na úroveň jednotlivých kmenů. Toto se děje na základě srovnání spekter se standardy, přičemž v současné době jsou dostupné různé databáze umožňující tuto identifikaci.

**Klíčová slova:** identifikace mikroorganismů, MALDI-TOF, hmotnostní spektrometrie

## Summary

### Koubek J.: Usage of mass spectrometry for identification of microorganisms

Rapid and reliable identification of microorganisms is important in many fields. Besides to the classical methods and methods based on nucleic acids analysis, mass spectrometry brings alternative possibility of reaching this goal. After mastering of standard laboratory procedure and overcoming troubles connected with spectra reproducibility, this method allows to identify various kinds of microorganisms up to the strain level. This identification process is based on spectra comparison with standards, nowadays there are various databases making this identification possible.

**Key words:** identification of microorganisms, MALDI-TOF, mass spectrometry

# LÉČIVA ZALOŽENÁ NA RNA INTERFERENCI

Magdalena Smětáková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

RNA interference je děj, při kterém dvouvláknová RNA (dsRNA) zasahuje do exprese genů tím, že je „utišuje“ (angl. silencing) a tak ovlivňuje, které geny jsou aktivní. Tento prastarý buněčný mechanismus se rozvíjel mnoho let a nyní se vyvinul v mocnou techniku použitelnou jako terapeutický nástroj. Poprvé byl tento jev popsán Jorgensenem a Napolim u květů transgenní petunie jako potlačení exprese endogenního genu vloženým genem. O několik let později Fire, Mello a kolegové objevili tento mechanismus v háďátku obecném. Také dokázali, že k degradaci mRNA dochází díky přítomnosti dsRNA.<sup>1</sup> V současné době probíhají ve farmaceutických firmách intenzivní výzkumy, které by měly vést k výrobě léčiv založených na principu RNA interference.

## Historie

Poprvé byla RNA interference (RNAi) popsána R. Jorgensenem a C. Napolim v roce 1990. Jejich cílem bylo stanovit, zda je chalkonsyntasa (CHS) enzymem limitujícím rychlost biosyntézy antokyanů. Ty jsou zodpovědné za fialovou barvu květů petunií. Přídavkem chimerního genu pro CHS se ovšem syntéza antokyanů zablokovala a většina květů byla zbarvena bíle. Tento neočekávaný výsledek vedl k hypotéze, že vpravení genu pro CHS do buněk může potlačit vliv endogenního genu pro CHS.<sup>2,3</sup>

V roce 1998 C. C. Mello a A. Fire publikovali klíčovou studii, která přinesla vysvětlení k dříve publikovaným pracím, zabývajícím se regulací vnitrobuněčné exprese genu. K testování požadavků na strukturu a přenos interferující RNA do buňky použili hlístici háďátka obecné. Zjistili, že dsRNA byla pro interferenci podstatně více účinná než každé její vlákno zvlášť. Po podání injekce do dospělé hlístice měly přečištěné jednořetězcové RNA (ssRNA) jen nepatrný vliv, zatímco směs dsRNA způsobila silnou a specifickou interferenci. Tato interference byla patrná také u jejich potomstva. Dále zjistili, že by se v procesu interference mohla vyskytovat katalytická složka. Za objev RNAi získali Mello a Fire v roce 2006 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.<sup>2,4,5</sup>

## Dvouvláknová RNA

Malá interferující RNA (small-interfering RNA, siRNA) je základní a dobře známou dsRNA, která se používá pro RNAi. Tato RNA se řadí mezi exogenní vlivy způsobující utišení genů, neboť není běžně přítomna v buňce, ale může být do organismu vložena uměle nebo se do něj dostat po infekci různými viry, jejichž genetický materiál je tvořen RNA. Pokud je dsRNA

vytvořena uměle, může sloužit také jako potenciální terapeutický prostředek. siRNA je produkována z dlouhého prekurzoru dsRNA. Vzniká obvykle dlouhá siRNA, která se není schopná přímo zapojit do mechanismu RNAi a způsobit tak utišení genů.<sup>1</sup>

MikroRNA (miRNA) je krátká nekódující RNA, která reguluje genovou expresi.<sup>6</sup> Nachází se uvnitř buněk, kde se jakákoliv ssRNA může sbalit do typické struktury stopky se smyčkou. Jsou to tedy endogenní spouštěče RNAi, avšak tento mechanismus může proběhnout až po určitém zpracování miRNA. RNA je pak rozštěpena pomocí ribonukleasy II (tzv. Drosha) za tvorby pre-miRNA, která je pomocí exportinu 5 transportována z jádra do cytoplasmy.<sup>1</sup> V lidském genomu již bylo objeveno přes 300 miRNA.<sup>6</sup>

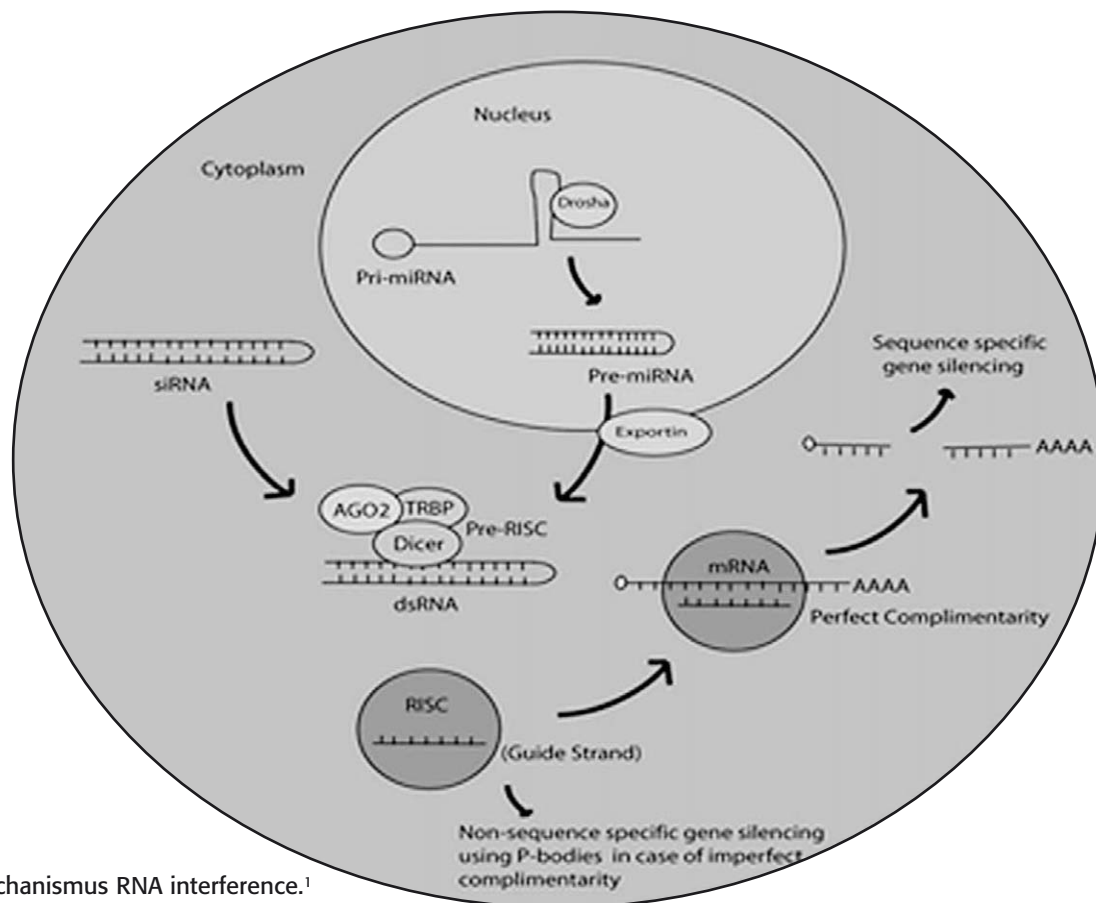
## Mechanismus RNA interference

Celý mechanismus můžeme rozdělit na dvě fáze – iniciační a efektorovou.

**Iniciační fáze:** dsRNA (siRNA nebo miRNA), která je exprimována v buňce nebo do ní zavedena, je pomocí ribonukleasy III, zvané Dicer, zkrácena na RNA o délce 21 – 23 párů basí (bp). Takto upravená dsRNA má na 3'konci dvou až tří nukleotidový převis. Tyto převisy a fosfáty na 5'koncích jsou nezbytné pro tvorbu komplexu podílejícího se na regulaci exprese genů (RNA-induced silencing complex, RISC). Enzym Dicer má u jednotlivých živočišných druhů různé homology. Aby vůbec fungoval, vyžaduje přítomnost domény RNA helikasy, DNA vazebného proteinu (např. TRBP) a v některých případech také ATP (ne u člověka).<sup>1</sup>

**Efektorová fáze:** Zkrácená, 21 – 23 bp dlouhá dsRNA se spolu s enzymem Dicer začlení do komplexu RISC. RISC nejprve způsobí rozdělení krátké dsRNA na jednotlivá vlákna a s vláknem, jež na komplex zůstalo navázáno (tzv. vedoucí vlákno, „Antisense“), se komplementárně naváže na cílovou mRNA. Druhé vlákno („Sense“) je rozštěpeno Argonaut proteiny. Součástí komplexu RISC je zvaná nukleasa zvaná Slicer, která pak cílovou mRNA rozštěpí (zhruba uprostřed komplementárního úseku). Takto rozštěpená mRNA je jinými buněčnými mechanismy již rozpoznána jako poškozená. Posléze je odbourána a gen kódující tuto mRNA není exprimován.<sup>1,7</sup>

**Role Argonaut proteinů:** Je to směs proteinů, které se chovají jako „stříhač“ (angl. slicer) a hrají rozhodující roli v mechanismu RNA interference, který by bez nich nemohl fungovat. Existuje několik podskupin Argonaut proteinů, např. AGO proteiny (odvozeno od fenotypu AGO mutants, huseníček), které jsou zodpovědné za sestřihání RNA.



Obr. 1: Mechanismus RNA interference.<sup>1</sup>

## Farmaceutický vývoj

Ještě před několika lety bylo jednoduché zaujmout farmaceutický průmysl terapeutickým potenciálem RNAi. Jediné, co potřebovaly laboratoře malých biotechnologických firem zjistit, bylo, jak dopravit siRNA do buněk. Jejich data ukázala, že technologie funguje jak ve zkumavce, tak ve tkáňových kulturách. Od té doby velké farmaceutické a biotechnologické společnosti investují miliony dolarů do výzkumu léčiv založených na RNAi. Vědci usilovně pracují na tom, aby se jejich výzkum přesunul z laboratorního stolu na živé objekty. Jenže použití RNAi jako terapeutika je mnohem ošidnější, než se předpokládalo. Nyní je na prvním místě vyřešení problému dopravy siRNA k cílovým buňkám.

Vědci si dříve mysleli, že pro utišení určitého genu stačí pacientům podat obnažené řetězce siRNA. Kromě lokálního podání či přímé dopravy do míst, jako jsou plíce, oči, nebo centrální nervový systém, neměl tento snadný přístup úspěch. Problémem je hlavně to, že RNA má molekulovou hmotnost přibližně 10 – 20x vyšší než běžně používaná léčiva a její molekula je vysoce záporně nabitá, tudíž nemůže projít přes podobně nabitou plasmatickou membránu.

Mezi nejvíce zavedené postupy v dopravování siRNA k cílovým buňkám patří lipidové či polymerní přenašeče. Alnylam Pharmaceuticals, společnost, která se mechanismem RNAi zabývá nejvíce, využívá k přepravě lipidové nanočástice (lipid nanoparticles, LPNs) vytvo-

řené firmou Tekmira Pharmaceuticals. LPNs jsou schopné maskovat náboj a velikost molekuly, kterou přenáší. Je to dáno tím, že obsahují různé složky: kladně nabitě lipidy, které interagují s plasmatickou membránou, polyetylen glykol, jenž tvoří kolem částice sterický obal a prodlužuje tak její čas v krevním oběhu, a lipidy jako cholesterol či fosfatidylcholin, které se přirozeně vyskytují v biologických membránách. Ty částice poskytnou vhodnou strukturu. Částice obsahující siRNA musí nejprve proniknout do buňky. Jakmile se dostanou do endosomu, je třeba, aby se z něj dostaly dříve, než jsou přeneseny k lysosomu, ve kterém by byly degradovány. Pro uvolnění siRNA z endosomu většina částic využívá jeho kyselého prostředí. Aminokupiny navázané na lipidech se při nízkém pH snadno protonují a tak fusují s negativně nabitou membránou endosomu. Tato fúze rozruší částice a volná siRNA se dostane do cytoplasmy.

Největšího úspěchu zatím dosáhly lipidové přenašeče v dopravení siRNA do jater, neboť tato tkáň má lehce přístupné stěny a částice tak snadno proniknou dovnitř. Podobnou strukturu mají také nádory cév nebo krevní tělíska, jež jsou předmětem intenzivního zkoumání. V massachusettském technologickém institutu, který spolupracuje s Alnylam Pharmaceuticals, se snaží vyvinout nové metody a materiály pro přenos siRNA k cílové buňce. Místo hledání, jaký polymer by měli zkonstruovat, vytvořili způsob, jak rychle k testování syntetizovat rozmanité typy polymerů. V roce 2003 tak vytvořili knihovnu polymerů.

Mezi další společnosti, zabývající se technologií LNPs, patří např. MDRNA, jež se zaměřuje na chemii aminokyselin. Ty mohou být modifikovány třemi různými způsoby za tvorby rozdílných částic. Karboxy- a aminoskupinu lze přes amidovou vazbu modifikovat alkylovými řetězci. Tato vazba se v těle snadno rozpadá. Hlavní skupina, organická skupina, která charakterizuje každou z 20 aminokyselin, může být kladně či záporně nabitá a její aktivita závisí na pH.

Také švýcarský gigant Roche se zapojil do farmaceutického výzkumu RNAi s použitím LNPs. V květnu oznámil, že by chtěl použít technologii Tekmira pro své první dvě siRNA léčiva. Cílem je zažádat o souhlas k testování léčiv u lidí koncem roku 2010. Roche také spolupracuje s Mirus Bio (nyní Roche Madison) na vlastním způsobu přenosu siRNA do buněk. Využívá k tomu technologii dynamických polykonjugátů (dynamic polyconjugate, DPC). Úskalím dříve byla toxicita polymerů. Jakmile se kladně nabitá molekuly dostaly do krve, zamířily přímo k nejvíce negativně nabitému orgánu – plicím. Proto Mirus maskuje kladné náboje připojením polyetylenglykolu a dalšími ligandy vazbami, které se rychle štěpí v kyselém prostředí endosomu. Tyto maskované polymery jsou také spojeny s cílicími molekulami, např. molekulou cukru, která navede částice přímo k jaterním buňkám. „Aby LPNs přenesly siRNA do určitých tkání, musí být nějakým způsobem modifikovány. Myslíme si, že základní DPC částice bude pro většinu buněk stejná,“ říká jeden z pracovníků Roche.

Navzdory počátečním slibným výsledkům mají systémy založené na lipidových a polymerních přenašečích několik omezení. Léčivo je podáváno injekčně a není vždy jisté, zda se dostane do požadované tkáně. Proto farmaceutické firmy neustále hledají lepší cesty pro využití siRNA jako léčiva. Například firma Merck má svůj vlastní systém na bázi lipidů, ale vytváří i další dopravní

systemy. Firma UMass společně s RXi Pharma zase vytváří nanočástice rozdílné od LNPs. RXi využívá jako cíl makrofágy. siRNA je zapouzdřena v obalu, který má na povrchu  $\beta$ -1,3-D-glukan vázající se na makrofágy. Z obalu se siRNA opět uvolní působením kyselého prostředí. Makrofágy mají obrovský potenciál uplatnit se jako cíl léčby, neboť hrají důležitou roli u rozličných nemocí.

Ostatní výrobci se snaží vyhnout použití jakéhokoliv obalu či nanočástice ve prospěch přenosu jediné rozpustné siRNA molekuly. Představou je přístupnost více tkání, větší spolehlivost a bezpečnost dopravovaného léčiva. Může se jednat například o technologii, která je založena na přírodním procesu zvaném makropinocytosa. siRNA se naváže na peptidovou transdukční doménu (PTD), která řídí makropinocytosu. Pro interakci s PTD však musí být na siRNA nekovalentně připojen kladně nabitý proteinový fragment, který se po vstupu do buňky oddělí. Ve společnosti Dicerna Pharmaceuticals zase využívají siRNA delší než 25 nukleotidů („DsiRNA“). Tato RNA slouží jako substrát pro enzym Dicer, který ji zkrátí na 21 nukleotidovou siRNA předtím, než s ní vytvoří komplex RISC. Výhodou je, že DsiRNA je mnohem účinnější než 21 nukleotidová siRNA a pro její dopravu není nutný žádný nosič. Stavba molekuly také umožňuje cílenou léčbu.<sup>5</sup>

## Závěr

V poznání mechanismu RNAi byl od jeho objevení v roce 1998 učiněn velký pokrok. Různá měření naznačují, že v buňkách je obsaženo velké množství dsRNA, které se aktivně podílejí na RNAi. Tento mechanismus má obrovský potenciál stát se použitelným v boji proti různým nemocem. Účinnost RNAi technologie jako terapeutika záleží na úspěšném dopravním mechanismu a stabilitě siRNA uvnitř buněk, na čemž usilovně pracují různé farmaceutické firmy po celém světě.

## Literatura:

1. Shrey K, Suchit A, Nishant M, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 273 (2009).
2. Sen GL and Blau HM: *FASEB J.* 20, 1293 (2006).
3. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R: *Plant Cell* 2, 279 (1990).
4. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al.: *Nature* 391, 806 (1998).

5. Chemical & Engineering News, 18, Sept. 7, 2009.
6. Hammond SM: *Cancer Chem. Pharm.* 58, 63 (2006).
7. [http://en.wikipedia.org/wiki/RNA\\_interference](http://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference), staženo 28. 11. 2009.

## Souhrn

### Smětáková M.: Léčiva založená na RNA interferenci

Bylo zjištěno, že RNA interference je účinným nástrojem pro inhibici určité sekvence pro expresi genu. Tento děj využívá krátkou dvouvláknovou RNA, hlavně malou interferující RNA a krátkou nekódující RNA, zvanou mikroRNA. Tyto RNA zasahují do exprese genů tím, že je „utišují“. Mechanismus RNA interference má obrovský potenciál stát se použitelným v boji proti různým nemocem.

**Klíčová slova:** RNA interference, siRNA, doprava k buňkám

## Summary

### Smětáková M.: Drugs based on RNA interference

RNA interference has been recognized to be an efficient mechanism for the sequence specific inhibition of gene-expression. This mechanism utilizes short double-stranded RNA, especially small-interfering RNA and short non-coding RNA called microRNA. These RNAs interfere with the expression of the genes in order to silence it. RNA interference mechanism has a great potential to be used as therapeutics against several disease.

**Key words:** RNA interference, siRNA, transport to cells

## O B S A H

Úvodem	1
<b>Recenze knih</b>	<b>4</b>
Pilchová T.: <b>Aplikace metod bioenkapsulace</b>	<b>5</b>
Balounová R.: <b>UHPLC jako významný nástroj metabolomiky</b>	<b>7</b>
Bíbová I.: <b>Genetické modifikace olejnatých rostlin</b>	<b>9</b>
Zmatlíková L.: <b>Geneticky modifikované brambory</b>	<b>13</b>
Koubek J.: <b>Využití metody hmotnostní spektrometrie pro identifikaci mikroorganismů</b>	<b>15</b>
Smětáková M.: <b>Léčiva založená na RNA interferenci</b>	<b>18</b>

## C O N T E N T S

Editorial	1
<b>Book reviews</b>	<b>4</b>
Pilchová T.: <b>Application of bioencapsulation methods</b>	<b>5</b>
Balounová R.: <b>UHPLC as important tool of metabolomics</b>	<b>7</b>
Bíbová I.: <b>Genetically modified oil plants</b>	<b>9</b>
Zmatlíková L.: <b>Genetically modified potatoes</b>	<b>13</b>
Koubek J.: <b>Usage of mass spetrometry for identification of microorganisms</b>	<b>15</b>
Smětáková M.: <b>Drugs based on RNA interference</b>	<b>18</b>

## 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 (jméno, název, souhrn a klíčová slova) a anglický souhrn (jméno, název, 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.

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

**ISSN 1210-1737**

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

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