BIOPROSPECT

Dvacátýprvní ročník
Číslo 1/2011

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)

http://bts.vscht.cz

B
I
PROSPECT

21th Volume
No. 1/2011

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 vitaly 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 commitee 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 již ve 21. ročníku bulletinu naší společnosti, který nás tedy více jako 20 let spojuje a přináší nám aktuální informace. Stal se také úspěšným fórem, kde publikují své příspěvky jak začínající, tak i zkušení autoři. Nejvýznamější událostí v životě naší společnosti bude v tomto roce mezinárodní biotechnologické symposium Biotech 2011 spojené s již 5. Česko-švýcarským symposiem. Úvodní informaci publikovanou v předchozím čísle doplňujeme nyní kompletním programem a podrobnými informacemi. K permanentní aktualizaci dochází na webových stránkách symposia www.biotech2011.cz. Věříme, že se v hojné míře tohoto symposia zúčastníte a pomůžete nám ukázat, že biotechnologie mají v naší zemi nejen dlouholetou tradici, ale také úspěšnou současnost. Těšíme se na Vaše posterové příspěvky, které mohou být i z jiných biotechnologických oblastí než byly zařazeny do přednáškových sekcí. Nejlepší postery budou vyhodnoceny a na závěrečném zasedání odměněny. Počítáme také s paralelními workshopy, o jejichž náplni Vás budeme informovat na zmíněných webových stránkách. Vyzýváme různé organizace, firmy a společnosti, aby využily tohoto symposia k informaci o svých činnostech a výrobcích formou informačního stánku, posteru, distribucí informací v registračních materiálech symposia, inserci v knize abstraktů, promítáním informačního šotu či presentací při přestávkách. Konkrétní formu presentace lze dohodnout s organizátory. K dotazům slouží též dotazníkový formulář na webové stránce symposia.

Další zajímavou akcí naší společnosti je již tradiční seminář „Novinky v oblasti genetických modifikací", který se uskuteční v pátek 22. dubna 2011 v Národní technické knihovně. Pozvánka k semináři je rovněž publikována v tomto čísle Bioprospectu. Jako obvykle budou na semináři předneseny čtyři zajímavé přednášky z různých oblastí praktických aplikací genového inženýrství našimi předními odborníky. Využijte proto této vyjímečné příležitosti si doplnit znalosti i z té oblasti biotechnologií, ve které nepracujete. Všechna vybraná témata se bezprostředně dotýkají našeho současného života. Seminář též vřele doporučujeme všem studentům z oborů zahrnovaných do klastru „věd o životě". Přístup na seminář je volný (neplatí se žádné vložné).

Kromě pokroků v aplikaci genového inženýrství v oblastech, o kterých budeme na semináři hovořit, byly v minulém roce dosaženy i významné úspěchy v genové modifikaci mikroorganismů. Novinové články, trochu nadneseně, psaly o konstrukci umělé bakterie v laboratořích Craiga Ventera. Uvidíme, co v tomto směru přinese tento rok a do programu semináře v r. 2012 určitě zařadíme nějakou přednášku na toto téma.

Koncem minulého roku jsme zaznamenali, ne tak atraktivní, ale velmi významné výročí, které se bezprostředně dotýká nejen všech přírodních věd, ale života všech občanů v běžném denním životě. Uplynulo 50 let od přijetí mezinárdní soustavy (systému) jednotek. The International System of Units (Le Syst me International d unités). Známá SI soustava byla přijata na konferenci „vah a měr" (CGPM, zkratka francouzských názvu Conférénce G n rale des Poids et Mesures) konané ve dnech 11 – 20. 10.1960. Práce komise však již začala v r. 1875 a v r. 1889 byla přijata definice metru a kilogramu na základě známých prototypů-artefaktů (tehdy vytvořenýchn z čisté platiny). Definice jednotek byly postupně s rozvojem vědy měněny a do soustavy zařazovány další jednotky. Tato historie bude však předmětem samostaného článku.

V letošním roce také vstupujeme do druhé dekády podrobnějšího poznávání lidského genomu. Officiální oznámení o naší znalosti lidského genomu se událo za přítomnosti amerického prezidenta Billa Clintona v r. 2000 a šlo o průnik dvoun konkurenčních projektů, a to soukromého projektu Celery representovaného Craigem Venterem a veřejným projektem zastupovaným Francisem Collinsem. Za těchto 10 let se mnoho změnilo v přístupech k analyze genomu, v technikách sekvenování i v přístupech využívání vlastností genomu a jeho jednotlivých částí. Stručně můžeme konstatovat, že objevitelská cesta teprve začala.

Letošní první číslo našeho Bioprospectu přináší zajímavý článeček našeho dlouholetého spolupracovníka p. prof. Jeana Daussanta o nové imunochemické technice, informaci o geneticky modifikovaném lososu – pravděpodobně prvním geneticky modifikovaném živočichovi, určeném pro lidskou výživu na americkém trhu, články o využívání cyklických peptidů v terapii, mikrobiální produkci kyseliny hyaluronové, indukované rezistenci jako alternativní ochraně rostlin, o biotechnologické výrobě karotenoidů a syntetické biologii.

Závěrem bych Vás chtěl všechny požádat, abyste nezapomněli zaplatit členské příspěvky za tento rok, resp. se přesvědčili, zda byl zaplacen institucionální příspěvek, pokud jste členy institucionálního člena. Děkujeme Vám v tomto směru za spolupráci a těšíme se, že v našem bulletinu naleznete zajímavé čtení po celý rok.

S mnoha pozdravy se těší na další spolupráci

Jan Káš a Petra Lipovová

Fakulta potravinářské a biochemické technologie
VŠCHT Praha
a
Biotechnologická společnost

si Vás dovolují pozvat na tradiční seminář

NOVINKY V OBLASTI GENETICKÝCH MODIFIKACÍ

konaný **v pátek 22. dubna 2011**
v Ballingově sále
Národní technické knihovny
Praha 6 – Dejvice, Technická 6
(naproti budově A VŠCHT)

9:15	Registrace
9:30	**J. Káš**, VŠCHT Praha: Úvodní slovo
9:45	**M. Minarik,** Centrum aplikované genomiky solidních nádorů (CEGES) Genomac International, Praha: Mutace, variace, odchylky a polymorfismy lidského genomu aneb naše tajemství, známá i neznámá
10:15	**V. Vonka**, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha: Problémy genové terapie
10:45	Přestávka
11:00	**J. Petr**, Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i., Praha-Uhříněves: Geneticky modifikovaná hospodářská zvířata
11:30	**F. Sehnal,** Biologické centrum AV ČR, České Budějovice**:** Genetické modifikace hmyzu
12:00	Diskuse a závěr semináře

Vstup je volný.

Přednášky budou otištěny v bulletinu Biotechnologické společnosti „Bioprospect"

ZA ORGANIZÁTORY SEMINÁŘE:

Prof. Ing. Karel Melzoch, CSc.
FPBT VŠCHT Praha

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
FPBT VŠCHT Praha

Biotech 2011 and 5th Czech-Swiss Symposium Prague, 15 – 17 June 2011 www.biotech.cz

Wednesday, June 15, 2011 afternoon

14:00 – 18:30	Registration
16:00 – 16:15	Symposium opening
16:15 – 17:30	Report on current state of Biotechnology in Switzerland and Czech Republic Information about Swiss Biotech Association (Hans-Peter Meyer) Information about Czech Biotechnology (*CzechInvest*, *CzechBio* and *MedChemBio*)
17:30 – 18:30	Opening Lecture: Marek Minarik (*Genomac, CZ*) What can the analysis of the individual human genomes tell us
18:30 –	Welcome Party

Thursday, June 16, 2011 morning

Session: **Biotechnology in Pharmacy**
Chairpersons: Hans-Peter Meyer (*Lonza, CH*), Marek Moša (*Sevapharma, CZ*)
Lectures:

08:30 – 09:00	Sergio Schmid (*HES-SO Valais, CH*) Recombinant peptide production
09:00 – 09:30	Reto Stöcklin (*Atheris Laboratories, Bernex-Geneva, CH*) Peptides from venomous marine snails for health
09:30 – 10:00	Pavel Trefil (*RIBVD, CZ*) Transgenic poultry as possible tool for drug production
10:00 – 10:30	Tomáš Ruml (*ICT Prague, CZ*) Gene therapy – assembly and transport of retroviral particles
10:30 – 11:00	*Break and company presentations*
11:00 – 11:30	Hilmar Ebersbach (*Novartis, Basel, CH*) Next generation protein therapeutics
11:30 – 12:00	Wilfried Weber (*University of Freiburg, G*) Synthetic biology in mammalian cell technology and materials science
12:00 – 12:30	Karel Ulbrich (*IMC AS CR, Prague, CZ*) Targeted polymeric systems
12:30 – 13:30	*Lunch*

Thursday, June 16, 2011 afternoon

Session: **Biotechnology in Nutrition**
Chairpersons: Pavel Dostálek (*ICT Prague, CZ*), Hans Kocher (*Novartis, CH*)
Lectures:

13:30 – 14:00	Šárka Horáčková (*ICT Prague, CZ*) Probiotics in dairy products
14:00 – 14:30	Jitka Ulrichová (*Palacký University, Olomouc, CZ*) Plant nutritional supplements
14:30 – 15:00	*free for proposal*
15:00 – 15:30	*Break, company presentations*
15:30 – 16:00	Leo Meile (*ETH Zurich, CH*) Development of starter cultures for food fermentation: safety first, then function
16:00 – 16:30	Peter Niederberger (*formerly Nestlé Research Centre, Lausanne, CH*) Status and perspectives for recombinant proteins in food industry
16:30 – 20:00	*Poster session & Beer Party*

Friday, June 17, 2011 morning

Session: **Biotechnology for sustainable growth**
Chairpersons: Mojmír Rychtera (*ICT Prague, CZ*), Tobias Merseburger (*ZHAW, CH*)
Lectures:

08:30 – 09:00	Murray Moo Young (*University of Waterloo & ISEB, Canada*) Biomass-derived biofuels
09:00 – 09:30	Tomáš Brányik (*ICT Prague, CZ*) The use of flue gas CO_2 for starch rich biomass production: An alternative source of bioethanol
09:30 – 10:00	František Kaštánek (*ICPF AS CR, CZ*) Recent advances in outdoor high-density cultivation of novelty micro-alagae strain with high content of lipids
10:00 – 10:30	*Break, company presentations*
10:30 – 11:00	Petra Patáková (*ICT Prague, CZ*) Evaluation of sustainable production of biobutanol as renewable fuel
11:00 – 11:30	Jiří Blažek (*IOCB AS CR, CZ*) Enzyme synthesis of prodrugs
11:30 – 12:00	Urs Baier (*ZHAW, Wadenswill, CH*) Membrane bio-digesters for enhanced efficiency of biogas production
12:00 – 13:00	*Lunch*

Friday, June 17, 2011 afternoon

Session: **Novel Approaches in Bioprocessing**
Chairpersons: Rick Mommers (*Lonza, CZ*), Karin Kovar (*ZHAW, CH*)
Lectures:

13:00 – 13:30	Jiří Damborský (*Masaryk University, Brno, CZ*) Engineering robust and efficient protein catalysis
13:30 – 14:00	Miroslava Čikošová (*Lonza, CZ*) High throughput manufacturing of proteins and enzymes
14:00 – 14:30	Jiří Vohradský (*IMG AS CR, CZ*) Modeling of genetic networks
14:30 – 15:00	*Break, company presentation*
15:00 – 15:30	Alain D. Meyer (*ROOTec Bioactives Ltd.,Witterswill, CH*) ROOTec: High-value plant-derived compounds for human health and well-being
15:30 – 16:00	Erich Hochuli (*formerly Roche/Genentech, Basel, CH*) Manufacturing of Avastin
16:00 – 16:30	Radek Stloukal (*LentiKat's, CZ*) Encapsulation of biologically active compounds
16:30 – 17:00	*Closing, poster awards*

Additional Program

Workshop on student exchange opportunities in Swiss and Czech Republic
Workshops on industry-academia relationships and job opportunities
The Journal Club – publishers-authors workshop (Dr. Anthony Newman, Elsevier)

Social Program

Prague sightseeing
Excursion to Lonza Biotec Kouřim and Kutná Hora sightseeing

Post-symposium program

Olomouc Biotech 2011 – Plant Biotechnology: Green for Good
June 19-21, 2011, Olomouc, Info: http://www.cr-hana.eu/G4G

NEW CONCEPT OF ELISA – "DIGITAL ELISA"

Jean Daussant
Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague
jean.daussant@akeonet.com

In the current ELISA plate assay, sensitivity is limited mainly by the large assay volume in which the final enzyme reaction takes place (usually 100 μL). Thus, large amounts of enzyme-labelled antibody are necessary for observing a signal. This implies a minimum amount of target antigen, hence a limit in sensitivity. The new design overcomes that difficulty by isolating and confining each immune complex in a small space (50 fL) before adding the substrate which, furthermore, permits use of low concentrations of enzyme-labelled antibody solutions, hence reducing the background.

Practically, the new concept named "digital ELISA" makes use of a classical sandwich ELISA: Microscopic magnetic beads coated with "capture" antibodies are incubated in the mixture containing the antigen (Fig. 1 a, 1). As the technique will count the beads presenting an antigen, each bead should have captured only one antigen or none. According to the Poisson law distribution, this would be the case in extremely low concentration of antigen where the number of beads would greatly exceed the number of antigen molecules. For instance, the authors indicate that, for 3000 molecules and 200 000 beads, 1.5 % of the beads will

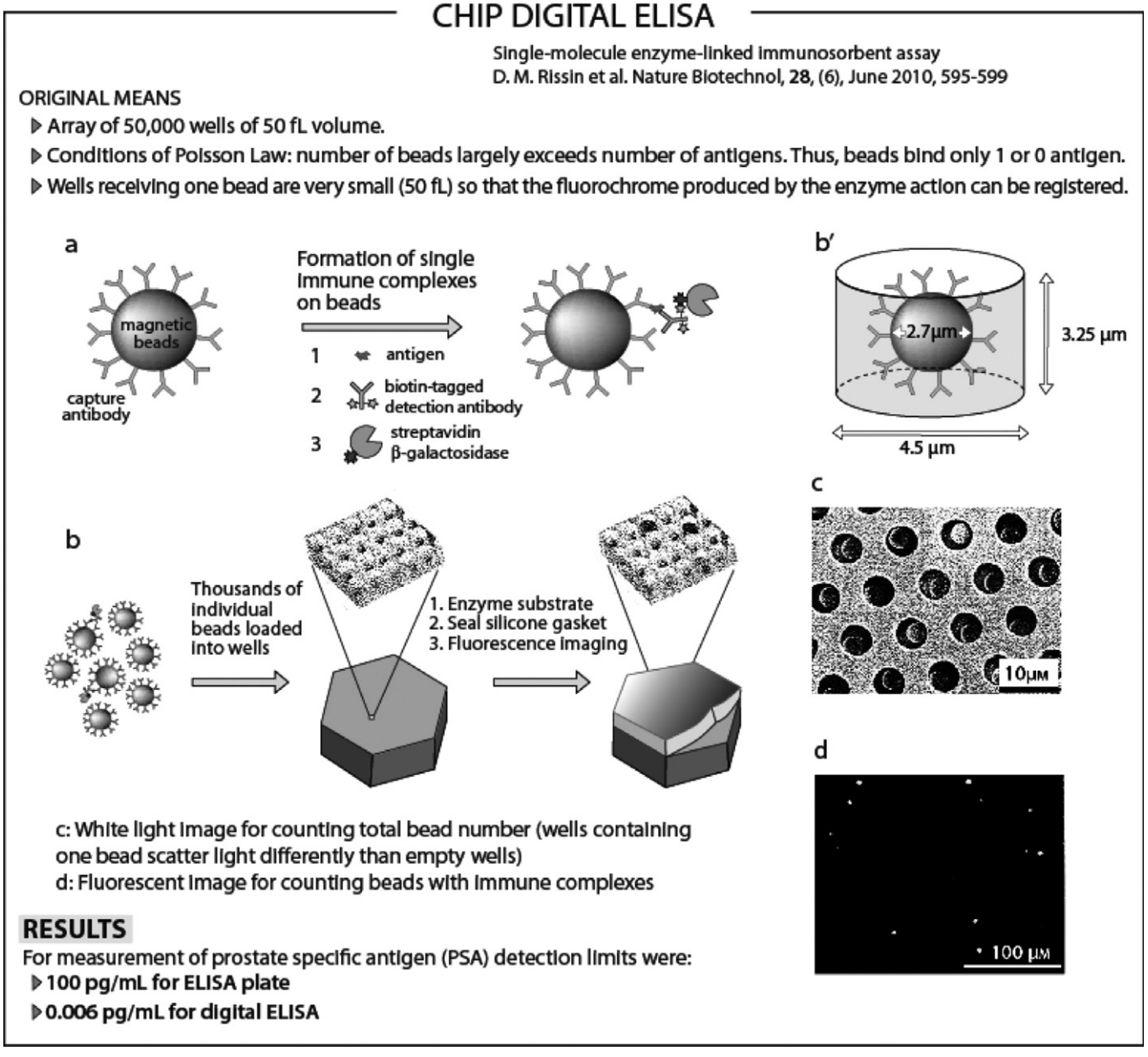


Fig 1: according to Rissin et al. 2010, somewhat modified

carry one molecule and 98.5 % will not carry any molecule. On the other hand, the number of beads necessary for ensuring high capture efficiency is discussed (200 000 beads / 100 μL). After that first incubation, the beads are submitted to a second one in a solution of "signal" antibodies which are labelled with an enzyme (by means of the avidin-biotin system) for identifying beads having captured one antigen molecule (Fig. 1 a, 2, 3). Beads are then driven towards an array –named "single-molecule array" – with 50 000 micro-wells (Fig. 1, b) each designed to hold one bead only (Fig 1 b'). A further incubation -in the micro-wells- with the enzyme substrate will produce fluorescence in the micro-wells containing beads marked with an enzyme-immune complex. White light imaging (Fig. 1 c) is used to identify wells with one bead (light being scattered differently for empty wells than for bead-containing wells). Fluorescence imaging is used to identify which of those beads have an associated bound enzyme (Fig 1 d). The protein concentration in the test sample is determined by counting the number of wells containing a fluorescent bead relative to the total number of wells containing beads. Background is obtained the same way but without antigen in the first incubation solution (background being due to unspecific binding of enzyme-antibody complexes with the beads).

Digital ELISA, indeed, considerably increases sensitivity. For instance, comparison concerning detection of the prostate specific antigen (PSA) indicates the detection limits for the current ELISA technique (100 pg) and for the digital ELISA (0.006 pg). This remarkable increase in sensitivity will be of interest in certain domains of medical diagnosis (cancer and neurodegenerative diseases) as well as in a few domains of other fields (e.g. life science research and perhaps food quality control and environmental testing). Further developments for increasing sensitivity as well as for simplifying the assay logistic are on-going.

References:

1. Rissin DM, et al.: *Nat. Biotechnol.* 28, 595 (2010).

Summary

Daussant J.: New concept of ELISA ("Digital ELISA")

New concept of ELISA allows the counting of antigen molecules present in a solution at very low concentration, e.g. while the detection limits for the current ELISA technique is for the prostate specific antigen (PSA) 100 pg novel approach of the digital ELISA makes possible to detect it in the concentration of 0.006 pg.

Souhrn

Daussant J.: Nová technika ELISA („Digitální ELISA")

Nová technika ELISA umožňuje stanovení velmi nízkých koncentrací antigenu přítomného v roztoku. Např. zatímco detekční limit běžné ELISA techniky umožňuje stanovení specifického prostatického antigen v koncentraci 100 pg nová technika umožňuje snížit limit stanovení na 0,006 pg.

BUDEME JÍST GENETICKY MODIFIKOVANÉHO LOSOSA?

Kateřina Hložková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, katerina.hlozkova@vscht.cz

Úvod

Ačkoli jsou geneticky modifikované (GM) rostliny běžně dostupné na trhu, s GM živočichy to je mnohem složitější a dosud žádný z nich nebyl povolen k prodeji. Nejblíže potenciálně komerčnímu využití jsou transgenní ryby, protože jejich genetická modifikace je jednodušší než u jiných živočichů. Je to hlavně proto, že se celý jejich život odehrává ve vodě a protože mají spoustu vajíček, která jsou snadno přístupná[1].

K transgenním rybám, které se už podařilo vytvořit, patří ty, které mají zvýšený a zrychlený růst, odolnost vůči různým nemocem, změněnou barvu, jinou stavbu těla, které mohou přežít v chladu, působit jako bioindikátory pro znečištění vody nebo produkovat farmaceuticky významné proteiny[2]. Dále je zde snaha o vytvoření GM ryb, které budou sterilní[3].

V dnešní době se nejvíce mluví o transgenních rybách, které exprimují růstový hormon (GH), a tudíž mají zvýšený a zrychlený růst (např. losos, tilapie, kapr, pstruh, sumec atd.). U mnohých z nich byl pozorován až 30násobný nárust hmotnosti oproti netransgenní kontrole[2]. V USA byla podána žádost o uvedení GM lososa na trh a FDA (Food and Drug Administration) se touto záležitostí zabývala[1].

Chov lososa a proč jej geneticky modifikovat

Losos je po tuňákovi druhou nejčastěji konzumovanou rybou. 90 % lososů na našich talířích pochází z chovu a uměle chovaný losos tvoří 60 % ze všech chovaných ryb[4]. Nejvýznamnější světoví producenti lososa jsou: Norsko (460 t/rok), Chile (260 t/rok), Velká Británie (140 t/rok) a Kanada (110 t/rok). Tyto 4 země představují více než 90 % produkce chovaného lososa na celém světě. Nejvýznamnějšími chovnými druhy lososa jsou losos obecný (*Salmo salar*), losos čavyča (*Oncorhynchus tshawytscha*)

a losos kysuč (*Oncorhynchus kisutch*), přičemž nejčastěji chovaným druhem je losos obecný[1].

Ve volné přírodě dosáhl růst lososa svého maxima (v závislosti na podmínkách), vylepšení jeho růstu je však předmětem mnoha výzkumů, protože představuje značné výhody pro umělý chov[5]. Existuje mnoho přístupů pro zvýšení růstu: křížení, krmení nebo např. exogenní dodávání růstových faktorů. Posledně jmenovaný byl docela úspěšný ve zvýšení růstu lososa, je zde však složitá aplikace růstových faktorů (krmení nebo injekčně), že se nedá v průmyslovém měřítku uplatnit. Abychom dosáhli co možná nejvyššího růstu lososa v co nejkratším čase, je transgenní losos produkující GH dobrým řešením. Je to však geneticky modifikovaný organismus, a proto je třeba zohlednit jeho výhody i nevýhody, zejména nebezpečí pro lidské zdraví nebo životní prostředí[6].

Transgenní losos produkující GH

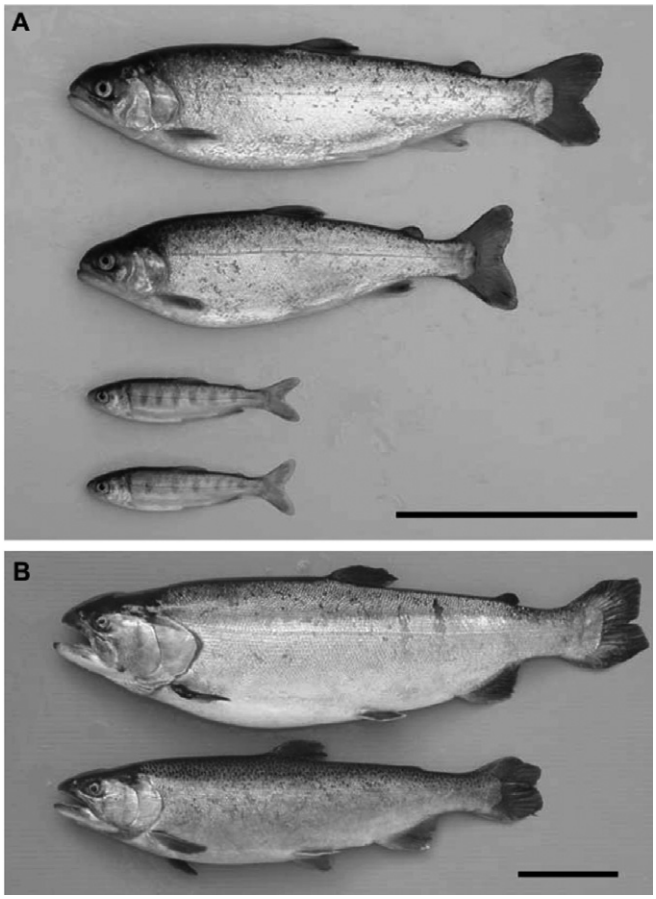
Současný umělý chov lososů je časově velmi náročný, sestává se z 12 – 18 měsíců chovu ve sladké vodě následovanými dalšími 12 – 24 měsíci chovu ve vodě slané. Z komerčního hlediska je výhodné co nejvíce snížit náklady na chov, a to zkrácením doby růstu lososů při zachování nebo dokonce zvýšení jejich velikosti a hmotnosti. Toho lze dosáhnout použitím GM lososa exprimujícího GH[7].

Transgen se sestává z kódující sekvence pro GH, promotoru a terminátoru. Mezi často používané promotory patří např. promotor metallothioneinu-B[6] nebo promotor „antifreeze" proteinu[7]. Velmi často pochází kódující i promotorové sekvence transgenu ze stejného rodu, který je příbuzný hostitelskému organismu[6,7]. Připravený transgen je vpraven mikroinjekcí do oplozených vajíček, lososi jsou pěstováni ve sladké vodě až do smoltifikace a poté jsou transgenní ryby detekovány pomocí PCR. Dále jsou transgenní lososi několikrát zpětně kříženi, a tím dojde ke stabilní inkorporaci transgenu do genomu lososa[6].

Vlastnosti transgenního lososa

Transgenní losos je několikanásobně větší a těžší (2krát – 10krát) než netransgenní kontrola a dosáhne toho v mnohem kratší době[6]. Rozdíly ve velikosti transgenních ryb jsou pravděpodobně způsobeny místem integrace transgenu do chromosomu, počtem integrovaných genů v tandemu a typem a efektivitou použitého promotoru[7]. U transgenních lososů také dochází ke smoltifikaci už v 6. – 12. měsíci života[6], zatímco u netransgenních k ní dochází až ve 2. – 3. roce života[8]. Toto urychlení smoltifikace může pozitivně ovlivnit umělý chov lososů, protože zkrátí čas potřebný k růstu ve sladké vodě[6]. Na obr. 1 lze vidět rozdíl ve velikosti transgenního a netransgenního lososa.

Z hlediska délky života žijí transgenní lososi oproti netransgenní kontrole kratší dobu, neplatí to však vždy. Avšak, neprokázala se souvislost mezi hmotností lososa a jeho délkou života. Obsah látek a energie v transgenním a netransgenním lososovi se také liší. Transgenní losos obsahuje více vody a naopak méně proteinů, lipidů, anorganických látek a energie. Jelikož transgenní losos obsahuje méně fosforu, lze usuzovat, že u něj dochází k neúplné mineralizaci kostí[7].



Obr. 1: Velikost transgenního lososa. 1a) transgenní losos (horní pár) v porovnání s netransgenní kontrolou (spodní pár) v 10 měsících věku. 1b) 21-měsíční transgenní losos (horní) v porovnání s 33-měsíční netransgenní kontrolou (spodní). Převzato z lit. [6].

Transgenní losos má větší běžnou spotřebu kyslíku oproti netransgenní kontrole. Tato vyšší spotřeba je zčásti způsobena tím, že transgenní losos spotřebuje větší množství potravy než kontrolní ryby. Celková spotřeba kyslíku až do doby dosažení smoltifikace je ale u transgenních lososů o 42 % nižší než u netransgenní kontroly[9].

Minimalizace vlivu na životní prostředí

Předpovědět, co se stane v případě úniku transgenního lososa do volné přírody, je nadlidský úkol. Od dob Darwina je všeobecně známo, že jediná vlastnost může změnit celou populaci a dnes se také ví, že existuje nespočet interakcí mezi organismy v ekosystému. Bylo vypracováno několik teorií, které se pokoušejí předpovědět konkrétní důsledky úniku GM organismů do volné přírody. Jelikož nechceme ohrozit ani vyhubit populaci divoce žijících lososů, je třeba zabránit křížení transgenních druhů s volně žijícími[1].

Existují 3 základní přístupy, které mohou zabránit křížení GM organismů s volně žijícími. První 2, fyzikální a fyzikálně-chemické omezení, jsou založeny na zne-

možnění úniku transgenních organismů do volné přírody. Třetí přístup, biologické omezení, neboli navození sterility, zabrání rozmnožování v případě úniku. Nejúčinnější je samozřejmě kombinace těchto přístupů, přičemž pro omezení reprodukce se nejčastěji používá navození triploidie, a to zvýšeným tlakem, teplotou nebo elektrickým šokem v určité době po oplození vajíček[3].

Losos *AquAdvantage* (AAS)

AAS je geneticky modifikovaný losos obecný, GH z lososa jako transgen je stabilně intergrovaný v jedné kopii do genomu a tento transgenní losos vykazuje větší růst než netransgenní kontrola. AAS byl vytvořen pro komerční účely a je určen ke konzumaci. Výzkum a vývoj AAS trval přibližně 15 let a nyní sponzor celého projektu (Aqua Bounty Technologies, Inc.) žádá v USA o povolení k prodeji a komerčnímu použití[10].

AAS byl vytvořen vložením transgenu do genomu lososa obecného, transgen obsahuje kódující sekvenci pro GH pocházející z lososa čavyči, která je pod kontrolou promotoru „antifreeze" proteinu ze slimule americké. Produktem určeným k prodeji je populace triploidních samic, což zabrání rozšíření transgenu mezi volně žijící druhy v případě úniku AAS z chovné stanice. Pravděpodobnost úniku a rozšíření AAS do volné přírody je však velmi malá, protože byl vypracován celý systém omezení, který zabrání úniku[10].

K produkci oplozených vajíček a vývoji AAS ve sladké vodě bude docházet v Kanadě, kolem této sladké vody bude všude voda slaná, která zabrání úniku mladého lososa. Po dosažení smoltifikace se růst AAS přesune do slané vody v Panamě, kde se také bude zpracovávat, a nakonec budou ryby dopraveny do USA. Prostředí okolo chovné stanice v Panamě je nevhodné pro život lososa kvůli vysoké teplotě vody a fyzickým bariérám, takže by zde uniklý AAS nemohl přežít. Byla vypracována studie, která vyhodnotila možná nebezpečí plynoucí z chovu a konzumace AAS. Výsledkem této studie je, že pokud se celý proces produkce, růstu a likvidace AAS bude držet stanoveného postupu, je jeho vliv na životní prostředí minimální[10]. FDA v září 2010 předběžně rozhodla, že AAS nepředstavuje žádné nebezpečí pro lidskou populaci ani životní prostředí[11]. Nicméně, samozřejmě existují i odpůrci, kteří např. tvrdí, že studie je neúplná a dostatečně se nezabývá bezpečností pro lidskou populaci[12].

Závěr

Lososi určení ke konzumaci pocházejí buď z volné přírody nebo z umělých chovů. Vzhledem ke stále větší spotřebě se zvětšuje počet chovných stanic lososa. Jelikož jeho chov až do velikosti pro konečnou spotřebu trvá několik let, uvažuje se o využití GM lososa nadměrně produkujícího růstový hormon. Takto modifikovaný losos roste a dospívá mnohem rychleji a dosahuje větší hmotnosti než volně žijící. V současné době čeká jeden konkrétní projekt GM lososa (*AquAdvantage* losos), na povolení k prodeji v USA a jestli jej dostane, bude to první GM živočich určený ke konzumaci na světě. Povolením tohoto projektu se posunou hranice využití živočichů, a to představuje obrovský potenciál pro budoucnost.

Literatura:

1. Le Curieux-Belfond O, Vandelac L, Caron J, Séralini GE: *Environ. Sci. Pol.* 12, 170 (2009).
2. Dunham AR: *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 139 (2009).
3. Wong AC, Eenennaam Van AL: *Aquaculture* 275, 1 (2008).
4. Ofimer: Bilan angel De la consomation des produits de la peche at de l'aquaculture. Paris, (2005).
5. Damsgaard B, Dill LM: *Behav. Ecol.* 9, 26 (1998).
6. Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY: *Aquaculture* 236, 607 (2004).
7. Cook JT, McNiven MA, Richardson GF, Sutterlin AM: *Aquaculture* 188, 15 (2000).
8. http://hgf10.vsb.cz/546/Ekologicke%20aspekty//loticky_system/migrace_ryb.htm, staženo 20. prosince 2010.
9. Cook JT, McNiven MA, Sutterlin AM: *Aquaculture* 188, 33 (2000).
10. http://www.fda.gov/downloads//AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/VeterinaryMedicineAdvisoryCommittee/UCM224760.pdf, staženo 20. prosince 2010
11. http://www.sourcewatch.org//index.php?title==AquAdvantage_Salmon_FDA_Approval_Process, staženo 20. prosince 2010.
12. http://www.truth-out.org/new-study-claims-fda-review-gm-salmon-incomplete65405, staženo 20. prosince 2010.

Souhrn

Hložková K.: Budeme jíst geneticky modifikovaného lososa?

Ačkoli jsou geneticky modifikované rostliny běžně dostupné na trhu, dosud žádný geneticky modifikovaný živočich nebyl povolen k prodeji. Nejblíže potenciálně komerčnímu využití je projekt transgenního lososa, *AquAdvantage* losos, v nadbytku produkující růstový hormon. Takto geneticky modifikovaný losos je několikanásobně větší a těžší než volně žijící a dosáhne toho v mnohem kratší době. U tohoto projektu byl také vypracován celý systém různých omezení úniku do volné přírody, takže pravděpodobnost ovlivnění životního prostředí je velmi malá.

Klíčová slova: transgenní ryby, losos, růstový hormon, *AquAdvantage*

Summary

Hložková K.: Will we eat genetically modified salmon?

Even though genetically modified plants are commonly available on the market, so far none of the genetically modified organisms received permission to be sold. Potentially nearest to be used commercially is project of transgenic salmon, *AquAdvantage* salmon, which produces growth hormones. That way genetically modified salmon is several times heavier and bigger than wild one and archives that in much shorter time period. Regarding this project has as well been created a full system of limitations to prevent escape of transgenic species into wild life, thus the possibility of having impact on environment is very small.

Keywords: transgenic fish, salmon, growth hormone, *AquAdvantage*

CYKLICKÉ PEPTIDY JAKO ÚČINNÁ ANTIBAKTERIÁLNÍ LÉČIVA

Anna Macůrková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, anna.macurkova@vscht.cz

Úvod

Všechny živé organismy na naší planetě jsou neustále vystaveny působení patogenních organismů. Tento evoluční tlak vedl k vytvoření efektivního imunitního systému účinného proti virům, prokaryotním i eukaryotním organismům[1]. Imunitní systém tvoří dvě složky, konstitutivní a induktivní. Konstitutivní imunita je vývojově starší, vždy přítomná, ale nespecifická, induktivní imunita je vývojově mladší, specifická a aktivuje se až po průniku patogenu do hostitelského organismu. Součástí konstitutivní imunity jsou krátké kationické peptidy, které vykazují širokou antimikrobiální specifitu. Antimikrobiální peptidy tvoří v podstatě druhou linii obrany hned po obtížně proniknutelných bariérách, jako jsou například kůže nebo epitel sliznic. Tyto peptidy jsou exprimovány v organismech od bakterií až po člověka. Do současnosti bylo izolováno více jak 1600 peptidů s antimikrobiálními účinky[2], nejvíce zastoupenými jsou hmyzí peptidy.

Pole aktivity takovýchto peptidů je velmi široké, vykazují nejenom antimikrobiální účinek, ale mohou také neutralizovat endotoxiny, ničit nádorové buňky či působit jako chemoatraktanty[3].

Podle struktury se antimikrobiální peptidy dělí na lineární, se strukturou α-šroubovice nebo β-listu, a cyklické, stabilizované disulfidovými můstky. Rozmanitost jejich struktur a sekvencí je značná. Přesto najdeme jisté podobnosti v obsahu některých aminokyselin, jako je prolin, arginin či lysin, nebo v tvorbě amfipatických struktur či vystavování hydrofobních aminokyselin na jedné straně struktury. Další společnou vlastností antimikrobiálních peptidů je schopnost reagovat s buněčnou membránou patogenů. Tuto interakci usnadňuje jejich jednoduchost, amfipatický charakter pak umožňuje inkorporaci do membrány a její porušení s následkem depolarizace a narušení iontové rovnováhy buňky. Specifita této interakce je závislá na složení membrány patogenu, přičemž přednostní selektivita je vůči prokaryotním membránám, vzhledem k jejich kyselosti, struktuře, obsahu aniontových fosfolipidů a nepřítomnosti cholesterolu[4]. Vůči savčím buňkám vykazují antimikrobiální peptidy malou nebo dokonce žádnou toxicitu.

Všechny dříve zmíněné vlastnosti a malá možnost vzniku bakteriální rezistence, dělají z antimikrobiálních peptidů vhodné kandidáty pro vývoj nových terapeutických látek. Jejich nevýhodou jsou vyšší účinné koncentrace (oproti konvenčním antibiotikům), možnost proteolýzy, nebezpečí vzniku imunitních reakcí a výrobní cena. Přesto jsou některé peptidy již komerčně využívány (například v potravinářském průmyslu) nebo procházejí klinickými testy[5].

Cyklické antimikrobiální peptidy

Mnoho malých peptidů, které zaujímají strukturu β-listu a nejsou schopny kompenzovat ztrátu entropie vhodnými intramolekulárními interakcemi, našly výhodnější cestu a ztrátu entropie vyrovnávají tvorbou cyklických struktur. Kruh vzniká buď pomocí disulfidových můstků, v případě tachyplesinů, protegrinů a lactoferricinu, nebo cyklizací peptidové kostry, například u gramicidinu S, polymyxinu B nebo tyrocidinů. Pokud je cyklus plně uzavřen, hovoří se o „end-to-end" cyklizaci, pokud je částečně otevřen, případně části řetězce nejsou součástí cyklu, pak jde o „open-end" cyklizaci. Na tvorbě cyklu se podílí nejčastěji 2 až 8 cysteinových zbytků, ale existují i peptidy obsahující 12 cysteinových zbytků, kdy všechny tvoří disulfidové můstky[6].

Přírodní cyklické antimikrobiální peptidy

Velkou skupinou přírodních antimikrobiálních peptidů tvořících cyklus pomocí disulfidových můstků, jsou defensiny, poslední dobou klasifikované spíše jako thioniny. Byly popsány jak u rostlin, tak u hmyzu a savců. U rostlinných a hmyzích defensinů se vyskytuje také α-helikální struktura[7]. Několik bakteriálních peptidů obsahuje uvnitř struktury malé cykly tvořené thioeterovými vazbami. Tyto peptidy jsou známy jako lantibiotika, protože jednou z aminokyselin, které tvoří jejich řetězec je vždy lantionin. V čeledi mořenovitých (*Rubiaceae*) byly nalezeny 4 makrocyklické peptidy o délce 30 aminokyselin. Tyto 4 peptidy, patřící mezi cyklotidy (kalata, circulin A a B, cyclopsychotride) mají motiv cysteinové smyčky, kdy jeden ze 3 disulfidových můstků se provléká skrze další dva[8].

Co se antimikrobiální aktivity týče, vykazují přírodní peptidy velmi široké spektrum účinku. Vyskytují se zde peptidy účinné proti gram-negativním i gram-pozitivním bakteriím, a to i proti rezistentním bakteriím jako jsou například methicilin- či vancomycin-rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* nebo *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimikrobiální aktivita je zprostředkovávána dvěma možnými mechanismy působení, a to intracelulárně, kdy peptid působí na intracelulární cíle, jako je například proteosyntetický aparát či tvorba buněčné stěny, nebo lyticky, kdy se peptid inkorporuje do buněčné membrány a tvoří póry, následně dojde k porušení membrány, změně její permeability, narušení membránového potenciálu a iontové rovnováhy[9].

Rostlinné antimikrobiální peptidy jsou obecně efektivní hlavně proti fungálním infekcím, antimikrobiální peptidy izolované z jiných organismů nemají takto striktně vymezenou aktivitu. Některé peptidy vykazují antivirální aktivitu, kdy v současné době se upřednostňuje výzkum aktivity proti HIV[10], cytomegaloviru, případně herpes simplex viru. U několika peptidů byla pozorována i antiparazitická aktivita.

Cyklické antimikrobiální peptidy – syntetické

Cyklické D,L-α-peptidy vykazují unikátní strukturu, která se v přírodě nevyskytuje. Mají nízkou molekulovou hmotnost a délku 6 – 8 aminokyselin. V jejich sekvenci se střídají D- a L-aminokyseliny a tvoří tak plochou kruhovou konformaci, kdy amidy aminokyselin jsou orientovány na vnější straně kruhu. Skládají se ze tří konstitutivních hydrofilních zbytků a opakujících se aminokyselin L-tryptofanu a D-leucinu. Na základě popsané konformace jsou syntetické peptidy schopny se skládat do tubulární supramolekulární struktury.

Cyklické D,L-α-peptidy jsou proteolyticky stabilní a jejich syntéza je relativně snadná. Unikátní abiotická struktura a rychlý baktericidní účinek se podílejí na limitaci získání bakteriální rezistence. Díky nízké molekulové hmotnosti a délce pak rychle difundují k cíli.

Tyto peptidy byly zkonstruovány tak, aby byly schopny se selektivně zacílit, inkorporovat se do bakteriální membrány a projevit antibakteriální aktivitu zvýšením permeability membrány. Jejich účinné (minimální inhibiční) koncentrace se pohybují v jednotkách či desítkách g/ml, což přibližně odpovídá hodnotám klasických antibiotik, nicméně v koncentracích vykazujících antibakteriální aktivitu jsou tyto peptidy hemolytické[11].

Klinické testy

S rostoucím problémem bakteriální rezistence vůči klasickým antibiotikům, roste zájem o vývoj a začlenění antimikrobiálních peptidů mezi komerčně používané antimikrobiální látky. Pro vývoj těchto látek ve farmaceutickém průmyslu to ale znamená mnoho překážek, jako je například orgánová či systémová toxicita, proteolýza, vrozená rezistence. Z těchto důvodů se v nyní spíše než na hledání nových látek zaměřuje výzkum na modifikace těch již nalezených a ovlivnění jejich nežádoucích vlastností například imobilizací či změnami primární sekvence a podobně.

I přes tyto překážky postoupilo již několik antimikrobiálních peptidů do fáze klinických testů, nebo jsou běžně využívány, například nisin, který se uplatňuje v potravinářském průmyslu jako konzervant, nebo bacitracin aplikovaný jako léčivo ve veterinární i humánní medicíně. Prozatím se uvažuje spíše o topickém než o systémovém využití. Dokladem toho je i následující přehled cyklických antimikrobiálních peptidů procházejících klinickými testy.

Bacitracin je směs příbuzných cyklických antimikrobiálních peptidů (bacitracin A, B1, B2, C, F) vylučovaných licheniformními bakteriemi druhu *Bacillus subtilis*. Je primárně používán ve veterinární medicíně spolu s tetracyklinem, neomycinem a prednisolonem k intramamární léčbě mastitidy skotu. Je přidáván do krmiva březích prasnic jako prevence proti klostridiové enteritidě selat. Orální podání není prozatím dostatečně účinné, při průchodu bacitracinu trávicím traktem dochází k jeho degradaci na deaminokyseliny a kratší peptidy, které nejsou antimikrobiálně aktivní. V humánní medicíně je bacitracin používán pro léčbu lokalizovaných topických a očních infekcí a také jako prevence zanícení ran[12].

Daptomycin je lipopolysacharidové antibiotikum, tvořící póry v membráně bakterií a inhibující jejich oxidativní metabolismus, na trh dodávané firmou Cubist pharmaceuticals pod názvem Cubicin® od roku 2003. Daptomycin je účinný pouze proti gram-pozitivním bakteriím. V klinické praxi je indikován pro léčbu infekcí kůže, sliznic, bakteremií a endokarditid způsobených bakterií *S. aureus*. V roce 2007 byla identifikována eozinofilní pneumonie spojená s podáváním Cubicinu®. Ve veterinární medicíně je používán k léčbě infekcí způsobených senzitivními bakteriemi u králíků, drůbeže a skotu[13,14].

Gramicidin je antibioticky působící směs (gramicidin A, B, C, D a S). Všechny složky mají lineární strukturu, s vyjímkou gramicidinu S, který je cyklický. Gramicidin je aplikován proti topickým infekcím způsobeným převážně gram-pozitivními bakteriemi (rod *Bacillus*), případně některými gram-negativními bakteriemi (rod *Neisseria*) a je jednou ze tří složek neosporinového očního roztoku (neomycin, polymyxin B sulfát, gramicidin). Tento peptid je hemolytický a proto nemůže být podáván vnitřně[15,16].

Iseganan (IB-367) je syntetický analog protegrinu, antimikrobiálního peptidu izolovaného z prasečích leukocytů. Americká firma Intrabiotics testovala tento peptid na plicní choroby jako jsou záněty plic spojené s připojením pacientů na mechanické ventilátory, pro aplikaci při chronických zánětech plic pacientů s cystickou fibrózou, kdy docházelo ke zlepšení funkce plic. Iseganan byl testován i pro lokální použití při zánětech ústní dutiny a to i u pacientů léčených stomatotoxickou chemoterapií. Pro tyto aplikace byly klinické testy ukončeny ve III. fázi kvůli vysoké úmrtnosti

pacientů , kterým byl iseganan podáván (o 29% vyšší úmrtnost než u kontrolní skupiny)[17,18,19].

Mersacidin jako další lantibiotikum uvádí do preklinických testů firma Novacta Biosystems. Prozatím se předpokládá využití proti methicillin-rezistentní bakterii *S. aureus* a dalším gram-pozitivním bakteriím[20,21].

Nisin jak již bylo zmíněno, je využíván v potravinářském průmyslu jako konzervant, aplikuje se na povrch párků, tepelně upraveného masa a drůbežích produktů určených ke spotřebě bez další úpravy[22]. Nisin se váže na lipid II a inhibuje tak syntézu buněčné stěny bakterií, současně ve vysokých koncentracích tvoří póry v bakteriální membráně. Firmy Astra a Merck vyvíjejí nisin pro léčbu infekcí způsobených bakterií *Helicobacter pylori*. Varianty nisinu A a Z vstoupily do preklinických testů pro léčbu infekcí způsobených vancomycin-rezistentními enterokoky[18].

Syntetický derivát protegrinu **PG-1** vykazuje 100% systémovou protekci proti intraperitoneálním infekcím způsobeným bakteriemi *P. aeuginosa*, S. *aureus* a methicillin rezistentní *S. aureus*[18].

Plectasin uvedla do preklinických testů dánská firma Novozyme. Tento peptid patří mezi defensiny, je vylučován askomycetní houbou *Pseudoplectania nigerella*. Jeho využití je prozatím cíleno proti gram-negativním bakteriím[23].

Polymyxin E známý také jako **Colistin** případně **Colymycin** je již komerčně využíván při léčbě kožních infekcí způsobených gram-negativními bakteriemi. Jako na trh je dodáván firmou RX Generic drugs. Polymyxiny byly objeveny roku 1947 a roku 1960 byly postoupeny do klinických testů. Colistin je účinný převážně proti gram-pozitivním bakteriím a některým aerobním gram-negativním bakteriím (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*). Lék Coly-Mycin® S Otic obsahující colistin (colistin A, B sulfát, neomycin sulfát, thonzonium bromid, hydrocortison acetát ušní suspenze) je používán na léčbu povrchových infekcí zevního zvukovodu. Pro parenterální podání byl vyvinut lék Coly-Mycin® M (colistimethát sodný, případně colistinmethansulfonát pentasodný), aplikovaný intravenózně při chronických infekcích způsobených bakteriemi rodu *Bacillus*. Zatím nebyla prokázána žádná bakteriální rezistence. Colistin je vysoce toxický a je využíván jen zřídka, byla u něj prokázána nefrotoxicita, teratogenita, je vylučován do mléka, proto nesmí být užíván kojícími ženami. Obecně se toxicita kolistinu projevuje v celém organismu, gastrointestinálními obtíženi, horečkou, problémy s řečí, závratěmi, parestezií, svěděním, kopřivkou, dýchacími obtížemi a apneou[24-27].

Závěr

Antimikrobiální peptidy jsou již od svého objevení považovány za dobré kandidáty pro boj s patogeny rezistentními proti konvenčním antibiotikům. Na základě znalosti jejich vlastností, jako je široké spektrum antimikrobiálního účinku a jeho mechanismus, jsou již některé začleněny do běžného lidského života, a to aniž bychom si to plně uvědomovali.

Antimikrobiální peptidy se používají v různých průmyslových odvětvích, přidávají se do krmiv, pracích prášků, slouží jako konzervanty potravin. Také v medicíně našly tyto peptidy své uplatnění, a to jak v humánní tak veterinární, kde jsou používány proti mnoha druhům nemocí způsobených viry, bakteriemi i parazity. Reálná je i jejich aplikace jako nosičů jiných léčiv chemoatraktantů, protirakovinných agens a v neposlední řadě v boji proti viru HIV. V současnosti nacházejí největší uplatnění jako účinná antibakteriální léčiva.

Literatura:

1. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW: *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491 (2006).
2. http://aps.unmc.edu/AP/statistic/ /statistic_function.php, staženo 12. ledna 2011.
3. Izadpanah A, Gallo RL: *J. Am. Acad. Deramtol.* 52, 381 (2005).
4. Christensen B, Fink J, Merrifield RB, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5072 (1988).
5. Gordon YJ, Romanowski EG: *Curr. Eye. Res.* 30, 505 (2005).
6. Bulet P, Stöcklin R, Menin L: *Immunol. Rev.* 198, 169 (2004).
7. Cornet B, Bonmatin JM, Hetru C, et al.: *Structure* 3, 435 (1995).
8. Tam JP, Lu YA, Yang JL, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8913 (1999).
9. Yeaman MR, Yount NY: *Pharmacol. Rev.* 55, 27 (2003).
10. Gustafson KR, Sowder RC, Henderson LE, et al.: *J.AmChem.Soc.* 116, 9337 (1994).
11. Fernandez-Lopez S, Kim HS, Choi EC: *Nature* 412, 452 (2001).
12. http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/ /085702en.pdf, staženo 12. ledna 2011.
13. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/ document_library/EPAR__Summary_for_the_public /human/000637/WC500036050.pdf, staženo 12. ledna 2011.
14. http://www.fda.gov/ohrms/DOCKETS/ac/06/ /briefing/2006-4209B1_02_01-FDA-Background.pdf, staženo 12. ledna 2011.
15. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ /dockets/04p0349/04p-0349-ref0001-38-Tab-34--CDER-Drug-Info-vol7.pdf, staženo 12. ledna 2011.
16. Bourinbaiar AS, Coleman CF: *Arch. Virol.* 142, 2225 (1997).
17. McPhee JB, Hancock REW: *J. Pept. Sci.* 11, 677 (2005).
18. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C: *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536 (2004).

19. http://www.fda.gov/downloads/Drugs/News-Events/UCM169943.pdf, staženo 12. ledna 2011.
20. Hancock REW, Sahl HG: *Nat. Biotechnol.* 24, 1551 (2006).
21. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF: *Cent. Eur. J. Biol.* 2, 1 (2007).
22. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/ /gras_notices/grn0065.pdf, staženo 12. ledna 2011.
23. Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM: *Nature* 437, 975 (2005).
24. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/ /document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500012961.pdf, staženo 12. ledna 2011
25. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/ /document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500012998.pdf, staženo 12. ledna 2011
26. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/ /label/2009/050356s050lbl.pdf, staženo 12. ledna 2011
27. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/ /label/2009/050108s026lbl.pdf, staženo 12. ledna 2011

Souhrn

Macůrková A.: Cyklické peptidy jako účinná antibakteriální léčiva

Antimikrobiální peptidy jsou látky běžně se vyskytující v přírodě, které slouží organismům jako obrana proti patogenům. Od 80. let minulého století, kdy byl izolován a charakterizován první krátký peptid s antimikrobiálními účinky cecropin, byly podrobně zkoumány a navrženy jako vhodní kandidáti v dalším boji proti infekčním chorobám způsobeným hlavně rezistentními kmeny bakterií, jako je například methicilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus*. Do současnosti bylo identifikováno více jak 1600 antimikrobiálních peptidů. Některé z nich jsou již využívány v průmyslu i jako účinná léčiva. Tento článek se zabývá jen jednou z mnoha skupin antimikrobiálních peptidů, cyklickými peptidy, které vykazují vysokou aktivitu proti bakteriím a jsou již komerčně využívány nebo se o jejich využití uvažuje a procházejí klinickými testy.

Klíčová slova: cyklické antimikrobiální peptidy, peptidová antibiotika, hostitelská obrana, terapeutický potenciál

Summary

Macůrková A.: Cyclic peptides as an effective antibacterial drugs

Antimicrobial peptides are substances commonly occurring in nature, they serve as defense agents against pathogens. Since the 80s of the last century, when the first short peptide with antimicrobial effect, cecropin, was isolated and characterized, they were investigated and proposed as suitable candidates to further fight against infectious diseases mainly caused by resistant strains of bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Until now more than 1600 antimicrobial peptides were identified. Some of them are already used in industry and as an effective drug. This article is engaged in only one of many groups of antimicrobial peptides, cyclic peptides, which showed high activity against bacteria and are already commercially available or their use is contemplated and they are undergoing clinical trials.

Keywords: cyclic antimicrobial peptides, peptide antibiotics, host defense, therapeutic potential

INDUKOVANÁ REZISTENCE JAKO ALTERNATIVNÍ OCHRANA ROSTLIN

Jana Fajmonová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, j.fajmonova@gmail.com

Úvod

Rostliny podobně jako živočichové i zástupci mikrosvěta mají svou imunitu a dokážou se vůči patogenům a škůdcům bránit. Kromě stále přítomných fyzických a chemických bariér mají však rostliny také schopnost zachycení signálu spojeného s jejich napadením a dokážou spustit vhodné obranné reakce. Prvotní interakce s patogenem bohužel mnohdy nevzbudí v rostlině dostatečně včasnou a silnou obranou reakci a tak tato konfrontace dopadá pro rostlinu fatálně.

Indukovaná rezistence jako alternativní ochrana rostlin se nabízí jako nadějná a přirozená cesta jak ochránit rostliny před jejich patogeny bez užití pesticidů či genetických modifikací. Principem ochrany rostlin tímto způsobem je vystavení rostliny oslabenému patogenu či pouze jeho elicitorům, dojde tak k indukci posílení obranyschopnosti až k zisku rezistence vůči tomuto patogenu a při reálném ataku patogenem má rostlina šanci na přežití až o 95 % vyšší.

Indukovaná rezistence

V přírodě je indukovaná rezistence výsledkem úspěšně překonané infekce způsobené patogenem, která zaktivovala rostlinný obranný mechanismus, zvláště pak došlo-li k hypersenzitivní reakci. Vhodně stimulovat obranný aparát rostlin mohou některé chemické sloučeniny, nepatogeny, avirulentní formy a jiné nekompatibilní rasy patogenů, nebo i virulentní patogeny, jejich virulence ale musí být závislá na přírodních podmínkách, které jsou zrovna takové, že neumožňují patogenu plně rozvinout infekci.

Schopnost odolávat napadení může být v rostlinách přítomna stále bez předchozího setkání s potogenem, pak se jedná o tzv. konstitutivní, neboli preinfekční

rezistenci[1]. Na druhé straně indukovaná rezistence v rostlinách je však výsledkem procesu tzv. rostlinné imunizace, ten lze přirovnat k imunizaci živočichů[1]. Vhodným podnětem je tak možné v rostlině vyvolat velmi široké spektrum obranných reakcí, které v ní zůstanou připravené zakročit, okamžitě jakmile rozpozná signál o napadení. Tato indukovaná schopnost rychlé a účinné obrany je někdy pouze krátkodobá, avšak mnohdy může v rostlinách přetrvat po velmi dlouhou dobu, v některých případech i po celý jejich život.

Podle místa, kde se indukované obranné reakce odehrávají, lze rozlišit lokálně a systémově získanou rezistenci. Pokud se zvýšená odolnost proti napadení projevuje pouze v místě původní infekce, označuje se tento typ rezistence za lokálně získanou rezistenci (LAR – local acquired resistance)[2]. Tento typ rezistence je většinou aktivní pouze po krátkou dobu. Nejčastějším projevem lokální obranné reakce je hypersenzitivní reakce[3]. Při ní dochází k tvorbě lézí, vysychání odumřelého pletiva a tak ke zpomalení a někdy i úplnému zastavení šíření infekce.

Jestliže se získaná odolnost projeví i v jiných částech rostliny, než pouze v těch kde proběhla primární infekce, vykazuje rostlina schopnost systémově získané rezistence (SAR – systematic acquiered resistance) jak to bylo prokázáno už v roce 1961 na rostlinách tabáku ošetřených TMV (Tobaco Mosaic Virus). Jestliže rostlina dokáže opakovaně odolávat napadení patogenem, stává se vůči němu rezistentní[2]. Při bližší charakterizaci se ukázalo, že je to rezistence dlouhodobá (může trvat od několika týdnů až po celý život rostliny) a funkční vůči širokému spektru patogenů, jež může být vyvolána elicitory biotického i abiotického typu. Jejím předpokladem je indukce obranných mechanismů nejen v místě napadení, ale systémově po celé rostlině, díky nimž rostlina reaguje při dalším napadení rychleji a intenzivněji. Proto je efekt této rezistence označován jako tzv. "zcitlivění" (z anglického "priming", "conditioning" nebo "sensitization")[4]. Pro tento typ resistence je zásadní tvorba kyseliny salicylové, která má také přímý vliv na tvorbu PR proteinů.

Elicitory

Jako induktory rezistence se označují chemické látky, které nejsou běžně uvolňovány během interakce rostliny s patogenem, přesto však vyvolávají obranné reakce, které mohou rostlinu dovést až k rezistenci[1]. Tyto látky, kterými se dá indukovat rezistence a vyvolávají v rostlinách jejich následné fyziologické a morfologické změny, se nazývají elicitory. Jsou to chemické sloučeniny či biologické faktory nejrůznějšího původu[1]. Však ne vždy musí být látka, jež je elicitorem, pro rostlinu toxická, ačkoli mnoho z nich po překročení hraniční koncentrace tuto vlastnost má. Elicitory lze obecně rozdělit na abiotické a biotické. Abiotické elicitory zahrnují kovové ionty a anorganické sloučeniny. Biotické elicitory pocházejí z organismů, které buď rostlinu napadají, tj. z bakterií, hub, virů a herbivorů (primární elicitory), nebo ze samotné atakované rostliny v místě napadení (sekundární elicitory), jedná se především o složky její buněčné stěny.

Rozpoznání elicitorové signální molekuly receptorem neboli vnímání elicitorového signálu je první podmínkou pro spuštění signální dráhy vedoucí k obranné reakci rostliny. Nyní je známo několik rozličných skupin látek, které mohou svými elicitačními účinky zcela nahradit houbové elicitory. Jsou to poly a oligosacharidy jako je chitin, chitosan a jejich fragmenty, xyloglukany, laminarin a další glukany, oligogalaktouronidy, proteiny (např. harpin či elicitiny jako je cryptogein) či peptidy (např. systemin a flg22). Patří mezi ně i lipidové deriváty jako jsou Nod faktory a lipopolysacharidy. Nejlépe jsou zatím prostudovány poly a oligosacharidy. Mnoho elicitorů, jako chitin, xyloglukany, chitosan, β-glukan a oligogalaktouronid, vykazují elicitační aktivitu napříč různými druhy rostlin a velmi zřetelně v nich vyvolávají tvorbu látek toxických pro patogeny. Tyto elicitory jsou označovány jako nespecifické[5].

Různé rostliny zřejmě mají velmi podobné receptory, protože dokáží rozpoznat stejný elicitor. Po rozpoznání elicitoru receptorem a jejich vzájemné interakci dochází k aktivaci receptoru a následných efektorů, jako jsou iontové kanály, GTP-vazebné proteiny (G-proteiny) a proteinkinasy. Tyto efektory přenáší elicitorový signál k tzv. druhým poslům (second messengers), kteří tento signál dále amplifikují[7].

Do signalizace vyvolané elicitorem je zapojena mnohočlenná spletitá síť látek a různých následných reakcí vedoucích k účinné obranné reakci rostliny. Tato signalizace zahrnuje několik paralelních a křížících se signálních drah, které se odlišují vnímáním různých elicitorových signálů nebo cílem a výsledkem svého působení[5]. Události, ke kterým dochází po elicitaci, lze obecně rozdělit na obranné reakce časné.

Časné a dlouhodobé obranné reakce

Časná obranná reakce je specifická významnou expresí obraných látek, jako jsou fytoalexiny. Specifické jsou pro ni také vratná fosforylace či defosforylace plazmatických membránových a cytosolických proteinů, náhlé zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu, depolarizace plazmatické membrány, odtok Cl^- a K^+ a přítok H^+, extracelulární alkalizace a intracelulární acidifikace, aktivace NADPH oxidasy a produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species)[8]. Mezi časné obranné reakce patří také zvýšená produkce kyseliny salicylové a jasmonové, ethylenu a aktivace fosfolipidového signálního systému. Na produkci kyseliny jasmoné a etylenu závisí Indukovaná Systémická Resistence (ISR – Induced Systemic Resistance), ta může být spuštěna pouze biotickými faktory.

Jednou z časných reakcí po napadení rostliny patogenem je tzv. oxidativní vzplanutí[9]. Tímto termínem je označena vysoká hladina reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) v buňce. Jedná se především o superoxidový anion (O^{2-}), silně oxidační

peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (OH^-). ROS mají různé účinky v závislosti na jejich koncentraci. Vysoká koncentrace reaktivních forem kyslíku vede až k programované buněčné smrti, zatímco při nízkých koncentracích dochází ke spuštění signálních drah[9]. Programovaná smrt více buněk, označovaná jako hypersenzitivní reakce, se projeví tvorbou nekrotických lézí v místě a někdy i v okolí infikovaného pletiva. Tímto způsobem je patogen v mrtvých buňkách polapen a degradován, čímž je rostlina ochráněna před jeho dalším šířením z místa počáteční infekce[2]. Regulovaná tvorba ROS může mít však i přímý antimikrobiální účinek a může významně přispívat ke zpevnění buněčné stěny. Peroxid vodíku je totiž nezbytný pro lignifikaci a navíc se podílí na vzniku pevných vazeb mezi proteiny v buněčné stěně a zvýšení jejich nerozpustnosti[9].

Dalším krokem v kaskádě obranných reakcí je transport iontů a Ca^{2+} signalizace. Transport iontů nastává okamžitě během 5-ti minut po ošetření elicitory. Stále však není dostatečně prozkoumáno, jakým způsobem dochází k jeho stimulaci. Výměna kationtů, intracelulárních K^+ za extracelulární H^+, a transport Cl^- z buňky a Ca^{2+} do buňky jsou obecně pozorovány jako jedny z nejčasnějších reakcí na avirulentní patogeny[7]. Cytoplazmatická acidifikace s náležitou extracelulární alkalizací patří k dalším raným obranným reakcím. Acidifikace cytoplazmy je nezbytný krok v signální dráze vedoucí k tvorbě ROS a biosyntéze některých rostlinných sekundárních metabolitů[11].

Mezi dlouhodobé obranné reakce lze zařadit zpevnění buněčné stěny, tzv. lignifikaci. Významnou roli sehrává také produkce antimikrobiálních sloučenin – fytoalexinů. Jsou to nízkomolekulární sekundární metabolity s lipofilním charakterem, což jim umožňuje pronikat plazmatickou membránou patogenů. Právě poškození membránových funkcí patří k nejvýznamnějším mechanismům jejich toxického působení. K akumulaci fytoalexinů dochází krátce po napadení v místě infekce[12].

Skupinou látek, jejichž produkce je spojována s dlouhodobými obrannými reakcemi rostlin indukovanými patogeny jsou tzv. proteiny související s patogenezí, neboli PR proteiny (pathogenesis related). Akumulace těchto proteinů je pozorována ve vakuolách a extracelulárním prostoru, a to lokálně i systémově, tedy nejen v infikovaných částech rostlin. Jejich účinek je velmi pestrý a často nespecifický. Některé z nich vykazují schopnost štěpit hlavní složky buněčných stěn houbových patogenů, jiné PR proteiny nepoškozují patogeny přímo, pouze účinkují jako zprostředkovatelé signálu, že došlo k napadení. Toho dosahují např. tak, že svou hydrolytickou aktivitou uvolňují elicitory z patogenu[13]. Významným spojujícím článkem mezi ISR a SAR je protein NPR1 (anglicky "non expresser of *PR* genes1"). Jeho funkce je nezbytná pro indukci SAR i pro SA signální dráhu samotnou. V přítomnosti SA se NPR1 přemisťuje z cytoplazmy do jádra, kde působí jako transkripční koaktivátor v proteinovém komplexu[14].

Cross resistence

Indukovaná rezistence může být vyvolána mnoha různými elicitory a zároveň pak může být rostlina rezistentní vůči několika patogenům či arbovirům, tento jev se nazývá Cross resistence či Trade-off. Jinými slovy napadení rostliny spásavým hmyzem může indukovat obranu proti likvidaci hmyzem anebo i proti infekci jako tomu je u *Rumex obtusifolius* (šťovík tupolistý). Dalším příkladem jsou rostliny tabáku, jež byly ošetřeny TMV. Ty po té vykazovaly mimo snížené akumulace JA po mechanickém poškození i zvýšenou citlivost k herboviru *Manduca sexta*. Dalšími příklady jsou okurka ošetřená *Pseudomonas lachrymas* či TMV vykazující resistenci vůči širokému spektru patogenů, ječmen ošetřen patogeny pšenice a kukuřice resistentní vůči padlí či kukuřice ošetřená patogeny ječmene resistentní vůči patogenu typickému pro kukuřici. Trade-off může být pozorován i po ošetření rostlin chemickými induktory resistence jako jsou ASM (acibenzolar-S--methyl), INA (methyl-2,6-dichlorisonicotinic acid) či BTH (benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester)[15].

Nasnadě by bylo ošetřit rostlinu chemickým induktorem resistence a imunizovat ji proti širokému spektru jejích patogenů. Bohužel ale běžné chemické induktory, jež jsou využívány v laboratorní praxi, jsou uživatelsky nevhodné, protože dávají vzniknout trpasličím fenotypům, celkově snižují úrodu či spouštějí hypersenzitivní reakce. Přímé ošetřování SA se též neosvědčilo pro supresi až blokaci JA dráhy a postřikovat pole oslabenými či deaktivovanými viry a patogeny se též nejeví jako bezpečná metoda imunizace[15]. Proto je stále třeba se zabývat hledáním a izolací konkrétním elicitorů a hlouběji probádávat výše popsanou tématiku.

Literatura

1. Kothari IL, Patel M: *Indian Jrn. Exp. Biol.* 42, 244 (2004).
2. Agrios GN (ed.): Plant Pathology. Academic Press, San Diego (1997).
3. Kombrink E, Schmelzer E: *Eur. Jrn. Plant Pathol.* 107, 69 (2000).
4. Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP: *Annu. Rev. Phytopathol*. 35, 235 (1997).
5. Zhao J, Lawrence CD, Verpoorte R: *Biotech. advances.* 23, 283 (2005).
6. Okada M, Matsumura M, Ito Y, Shibuya N: *Plant Cell Physiol*. 43, 505 (2002).
7. Ebel J, Mithoeter A: *Planta.* 206, 335 (1998).
8. Procházka S, Macháčková I, Krekule J, et al.: Fyziologie rostlin. Academia Praha (1998).
9. Grant JJ, Loake GJ: *Plant Physiol*. 124, 21 (2000).
10. Delledonne M et al.: *Nature.* 394, 585 (1998).
11. Sakano K: *Int. Rev. Cytol.* 206, 1 (2001).
12. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (ed.): Biochemistry and molecular biology of plants.

American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. (2000).
13. Keen N. T., Yoshikawa M.: Plant Physiol. 71, 460 (1983).
14. Dong X.: *Curr. Opin. Plant Biol.*. 7, 547 (2004).
15. Walers D, Newton A, Lyon G: *Biologist*. 52 (2005).

Souhrn

Fajmonová J.: Indukovaná rezistence jako alternativní ochrana rostlin

Rostliny od pradávna tvoří významnou součást lidské obživy a jsou tak nejen z tohoto hlediska nepostradatelnou částí naší společnosti. Bohužel stejně jako každý jiný živý organismus, i ony podléhají chorobám, které už v minulosti zapříčinily nemalé ztráty na úrodách. Díky nesčetným interakcím s patogeny si však rostliny vyvinuly několik typů obranných mechanismů. Látky, které vyvolávají obrannou reakci rostliny a její následné fyziologické a morfologické změny se nazývají elicitory a právě ony spouští signální dráhy vedoucí k obranné reakci až k indukované rezistenci. Snaha ochránit úrodu je pradávným bojem přetrvávajícím do současnosti a využití indukovaná rezistence jako alternativní ochrany rostlin je možností jak omezit škody na úrodách bez užití pesticidů či genetických modifikací.

Klíčová slova: Indukovaná rezistence, rostliny, systémová získaná rezistence, kyselina salicylová, kyselina jasmonová, NO, elicitor, reaktivní formy kyslíku

Summary

Fajmonová J.: Induced resistence like an alternative plant defence strategy

Since ancient times, plants have been an important part of the human diet and hence also an essential component of human society. Unfortunately, just like every other living organism they are subject to disease. In the past, diseases have caused huge crop losses. Thanks to countless interactions with pathogens, however, plants have evolved several types of defensive mechanisms. Substances that induce a defensive reaction in plants and subsequent physiological and morphological changes are called elicitors. It is these elicitors which initiate signaling pathways leading to defensive reactions and induced resistance. The effort to protect crops is an ancient battle which still goes on today. The use of induced resistance as alternative means of plant protection is one way to limit damage to crops without the use of pesticides or genetic modifications.

Keywords: Induced Resistance, Plants, Systematic Acquired Resistance, Salicylic Acid, Jasmonic Acid, NO, Elicitor, Reactive Oxygen Specie

MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE KYSELINY HYALURONOVÉ

Martina Hamšíková

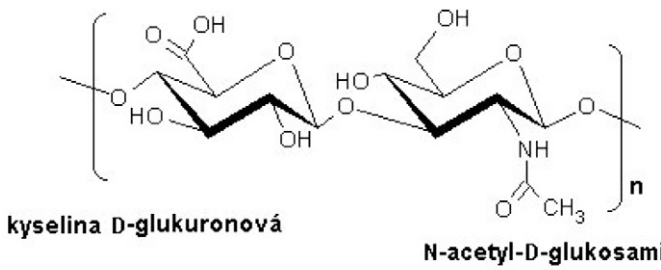
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, martina.hamsikova@vscht.cz

Úvod

Kyselina hyaluronová je přirozeně se vyskytující biopolymer, přesněji jde o lineární nesulfátovaný glykosaminoglykan. Poprvé byla struktura kyseliny hyaluronové popsána v roce 1934 (lit.[1,2]). Díky svým unikátním vlastnostem jako je například biokompatibilita, hydrofilita a viskoelasticita se kyselina hyaluronová využívá ve zdravotnictví (v oční chirurgii, při artroskopických operacích nebo v plastické chirurgii), dále pak v kosmetickém průmyslu a také v potravinářství. Kyselina hyaluronová je důležitou složkou mezibuněčného prostoru pojivové epiteliální a nervové tkáně. Významnou biologickou funkcí kyseliny hyaluronové je aktivní účast při imunologických procesech, čehož se využívá například k urychlení hojení. Komerčně se kyselina hyaluronová získává mikrobiální fermentací využívající rod *Streptococcus*[1].

Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid o vysoké molekulové hmotnosti, jde o nesulfátovaný glykosaminoglykan. Do skupiny glykosaminoglykanů se také řadí například chondroitin sulfát nebo heparin sulfát, farmaceuticky významné látky, avšak ty ve své molekule obsahují sulfátovou skupinu. Strukturně je kyselina hyaluronová složena ze dvou tisíc až dvaceti pěti tisíc jednotek disacharidů kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou střídavě spojeny (1→3)- a (1→4)- β-D-glykosidovou vazbou, jak je vidět na obrázku 1 (lit.[1, 2]).



Obr. 1: Opakující se disacharidová jednotka hyaluronové kyseliny obsahující kyselinu β-(1,3)-D-glukuronovou a β-(1,4)-N-acetyl-D-glukosamin[3]

Poprvé byla kyselina hyaluronová izolována v roce 1934 ze sklivce (řecky hyaloid), odtud také pochází její název hyaluronová, v roce 1954 pak byla popsána její přesná struktura. Trvalo dalších deset let, než byl tento polysacharid syntetizován *in vitro*[3,4]. Kromě sklivce je kyselina hyaluronová obsažena například v synoviální tekutině a v intercelulárním prostoru buněk epidermis. Kvantitativně se více než 50 % nachází v kůži, konkrétně v dermis a epidermis a méně pak ve svalech a kostech. Kyselina hyaluronová má široké rozmezí hodnot molekulových hmotností (1000 – 10^6 Da). Dlouhé řetězce kyseliny hyaluronové se štěpí v průběhu metabolického odbourávání především ve tkáních, lymfatických cévách, dále pak v krvi, játrech a ledvinách. Hlavní biologické funkce kyseliny hyaluronové jsou založeny právě na základě její molekulové hmotnosti. Hlavní role této kyseliny o vysoké molekulové hmotnosti je zadržovat obsah vody v extracelulárním prostoru a také vyplňovat místa v měkkých pojivových tkáních a udržovat tak buněčnou integritu. Kyselina hyaluronová se totiž podílí na organizaci proteoglykanových komplexů, konkrétně interaguje nekovalentně s těmito komplexy přes daný protein. Nízkomolekulární kyselina hyaluronová má mnoho dalších významných biologických funkcí, za které jsou zodpovědné interakce s takzvanými HA-specifickými receptory (specifické receptory pro kyselinu hyaluronovou), jako jsou například CD44 a RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility). Interakce těchto receptorů na buněčném povrchu s kyselinou hyaluronovou pravděpodobně zodpovídá za proces migrace zánětlivých a nádorových buněk, a také ovlivňuje jejich adhezivitu a proliferaci[5].

Díky svým vlastnostem jako je například vysoká viskoelasticita, schopnost vázat na sebe vodu, biokompatibilita nebo schopnost biodegradace, se kyselina hyaluronová využívá v medicíně při léčbě artritidy nebo v oční chirurgii a dále také například v kosmetickém průmyslu a potravinářství[1,3,5].

Tradičně se kyselina hyaluronová získává extrakcí živočišných tkání, především z kohoutích hřebenů, což ale ukazuje několik nevýhod. Jednak je to riziko mezidruhové virové kontaminace a dále pak vysoké náklady spojené s komplikovanou purifikací kyseliny hayluronové, limitní může být ale také omezený zdroj živočišných tkání pro extrakci. Z těchto důvodů se zdá být výhodnější mikrobiální produkce[1].

Možnosti produkce kyseliny hyaluronové

Klíčovým enzymem v biosyntéze kyseliny hyaluronové je HA synthasa, která byla identifikována nejen u obratlovců, ale také u různých mikroorganismů a virů. Za biodegradaci kyseliny hyaluronové jsou zodpovědné specifické enzymy, hyaluronidasy[4].

Díky svým významným vlastnostem a možnosti využití ve farmaceutickém průmyslu, medicíně, kosmetickém průmyslu nebo potravinářství, roste snaha produkovat kyselinu hyaluronovou, a to co nejefektivnějším způsobem. V současné době se využívá extrakce živočišných tkání (kohoutích hřebenů) a především mikrobiální fermentace, nejčastěji pomocí kmenů rodu *Streptococcus*[5]. Obě tyto metody mohou být spojeny s určitými komplikacemi. Konkrétně extrakce živočišných tkání je časově náročná a drahá metoda, která představuje také problém s redukcí kontaminace hyaluronidasami. Ačkoliv bylo výše zmíněno, že mikrobiální produkce se zdá být výhodnější oproti extrakci živočišných tkání, existuje zde jistá obava z kontaminace exotoxiny. K průmyslové produkci se totiž využívá kmen *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* a stejně jako další kmeny (*Streptococcus pyogenes nebo Streptococcus equi*), které mají enzym HA synthasu a schopnost produkovat kyselinu hyaluronovou, jsou řazeny do Lancefield-sérologických skupin A a C a jsou to tudíž patogenní mikroorganismy. Alternativní cestou je využívání nepatogenních kmenů k produkci rekombinantní kyseliny hyaluronové[6,7]. Například bylo publikováno, že gen pro HA synthasu z bakterie *Streptococcus pyogenes* byl exprimován v bakterii *E. coli*. Laboratorně byla také testovaná produkce rekombinantní kyseliny hyaluronové pomocí *Bacillus subtillis*[8]. Velkým pokrokem je také izolace nepatogenního kmene *Streptococcus thermophillus*, který se tradičně využívá v potravinářském průmyslu, při výrobě mléčných produktů. Tento kmen produkuje velká množství exopolysacharidů s vysokým obsahem kyse-liny hyaluronové, kdy její koncentrace byla ověřována pomocí metody využívající vazbu specifického proteinu k této kyselině (HABP, hyaluronic acid binding protein)[7].

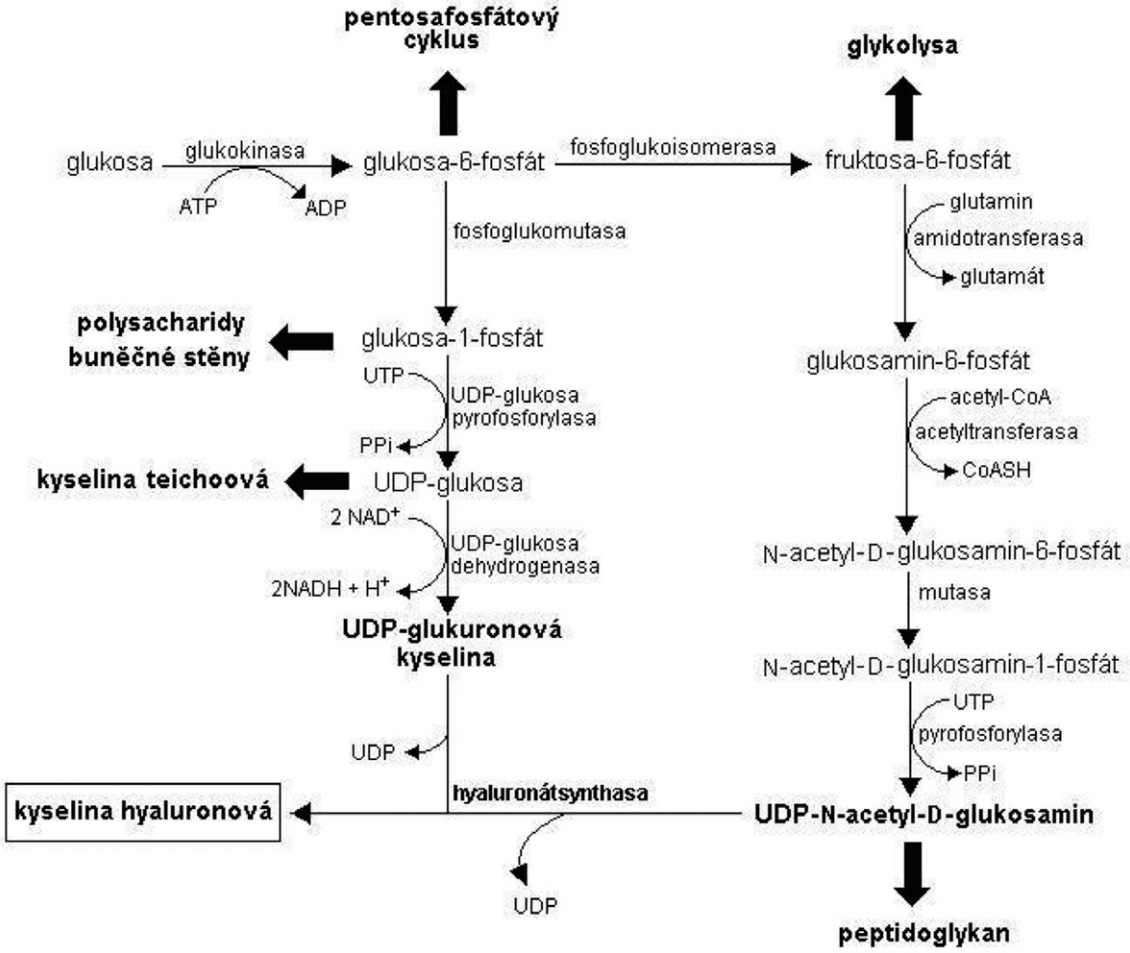
Jak již bylo zmíněno, kyselina hyaluronová se získává především mikrobiální fermentací, která využívá patogenní kmen *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* a to od počátku osmdesátých let. V České republice je největším výrobcem kyseliny hyaluronové a rovněž i výrobcem farmaceutických produktů na bázi kyseliny hyaluronové firma *Contigo group*.

Bakterie rodu *Streptococcus* syntetizují kyselinu hyaluronovou v extracelulárních kapsulích, které jsou uvolňovány do média. Rod *Streptococcus* se řadí mezi tzv. fakultativně anaerobní bakterie, z tohoto důvodu byla testována jak aerobní, tak anaerobní kultivace bakterií. Potvrdilo se, že aerobní podmínky se jeví jako vhodnější, neboť vedou k vyššímu výtěžku kyseliny hyaluronové. Samozřejmě, že další otázkou je i vhodný výběr kultivačního média. Obecně se používá takové médium, které obsahuje glukosu jako zdroj uhlíku, značné množství komplexního zdroje dusíku, dále také růstové faktory, jako například kvasničný extrakt, pepton, hydrolyzát kaseinu a v neposlední řadě zdroj minerálů. Další možností je nahradit tato poměrně drahá kultivační média za tzv. *znovuvyužitelná média*, kterými mohou být například zdroje zemědělského původu. Touto tématikou se zabývala studie, která současně testovala produkci kyseliny hyaluronové pomocí bakterií *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* v různých typech médií, jako například koncentrovaný hydrolyzát sojových proteinů, koncentrát syro-

vátkové bílkoviny a šťáva z nepravých plodů ledvinovníku západního, které poskytují jedlé nažky (ořechy kešu), a právě toto poslední médium poskytlo největší výtěžek kyseliny hyaluronové. Kontrolou bylo médium s glukosou a kvasničným extraktem, ve kterém bylo docíleno přibližně stejných výsledků[1].

Biosyntéza kyseliny hyaluronové u bakteriálního kmene *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Kyselina D-glukuronová a N-acetyl-D-glukosamin, složky kyseliny hyaluronové, jsou odvozeny od glukosa-6-fosfátu a fruktosa-6-fosfátu. Na obrázku 2 je pak znázorněna biosyntéza kyseliny hyaluronové u bakterie *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. V prvním kroku reakce vzniká klíčový produkt, glukosa-6-fosfát, touto cestou, která je společná pro mnoho organismů vznikají zásobní polysacharidy. Za katalýzy α-fosfoglukomutasy (EC 5.4.2.2) dochází ke konverzi glukosa-6-fosfátu na glukosa1-fosfát. UDP-glukosapyrofosforylasa (EC 2.7.7.9) katalyzuje reakci UTP a glukosa-1-fosfátu za vzniku UDP-glukosy. Dalším meziproduktem v biosynthese kyseliny hyaluronové je kyselina UDP-glukuronová, která vzniká specifickou oxidací primární hydroxylové skupiny UDP-glukosy za přítomnosti UDP-glukosadehydrogenasy (EC 1.1.1.22). Synthetická dráha, která vychází z fruktosa-6-fosfátu poskytuje aminocukry. Z obrázku je vidět, že aminoskupina glutaminu je přenášena na fruktosa-6-fosfát za vzniku glukosamin-6-fosfátu. Tato reakce je katalyzována amidotransferasou (EC 2.6.1.16). V dalším kroku dochází k přenosu acetylové skupiny za přítomnosti acetyltransferasy (EC 2.3.1.4), vzniká N-acetyl-D-glukosamin-6-fosfát. Při této reakci dochází ke štěpení thioesterové vazby v molekule acetyl-CoA. Přemístěním fosfátové skupiny pomocí mutasy (EC 5.4.2.3) vzniká N-acetyl-D-glukosamin-1-fosfát. A konečně, pyrofosforylasa (EC 2.7.7.23) poskytuje UDP-N-acetyl-D-glukosamin odštěpením pyrofosfátu z jednotky UTP. Výslednou reakcí biosyntetické dráhy kyseliny hyluronové je polymerace aktivovaných molekul kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu katalyzovaná hyaluronátsynthasou. K produkci 1 molu kyseliny hyaluronové, která obsahuje dvě opakující se disacharidové jednotky je zapotřebí 4 moly ATP. Dva moly jsou spotřebovány při fosforylaci glukosy enzymem glukokinasou a další dva moly ATP jsou využity k regeneraci UTP. Oxidační reakce katalyzovaná UDP-glukosadehydrogenasou poskytuje dva moly NADH na jeden mol kyseliny hyaluronové. Kromě toho, že na obrázku 2 je demonstrována syntetická dráha kyseliny hyaluronové, je zde také naznačená syntéza strukturních molekul bakteriální buněčné stěny (peptidoglykan, teichoová kyselina a antigenní polysacharidy buněčné stěny)[3].



Obr. 2: Biosyntetická dráha kyseliny hyaluronové u bakterií *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[3]

Závěr

Kyselina hylauronová je biokompatibilní, biodegradabilní, neimunogenní lineární polysacharid. Díky těmto jedinečným vlastnostem bývá kyselina hyaluronová využívána v medicíně, kosmetickém průmyslu a také v potravinářství. V současné době se ustupuje od tradiční extrakce kohoutích hřebenů a převažuje produkce kyseliny hyaluronové pomocí mikrobiální fermentace využívající patogenní bakterie *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Hlavní limitací mikrobiální produkce kyseliny hyaluronové může být kontaminace exotoxiny. Řešením je například produkce rekombinantní kyseliny hyaluronové pomocí nepatogenních kmenů, což je laboratorně testováno.

Literatura:

1. Pires A M B, Macedo A C, Eguchi S Y, Santana M H A.: *Bioresour. Technol*., 101, 6506 (2010).
2. Liu L, Du G, Chen J, Zhu Y, Wang M, Sun J.: *Bioresour. Technol*., 100, 363 (2009).
3. Chong B F, Blank L M, Mclaughlin R, Nielsen L K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 66, 341 (2005).
4. Price R D, Berry M G, Navsaria H A.: J*. Plast. Reconstructive Aesthetic Surg*., 60, 1110 (2007).
5. Oh E J, Park K, Kim K S, Kim J, Yang J A, Kong J H, Lee M Y, Hoffman A S, Hahn S K.: *J. Controlled Release*, 141, 2 (2010).
6. Huang W Ch, Chen S J, Chen T L.: *J. Chin. Inst. Chem. Eng*., 38, 355 (2007).
7. Izawa N., Hanamizu T, Iizuka R, Sone T, Mizukoshi H, Komára K, Chiba K.: *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 119 (2009).
8. Yu H, Stephanopoulos G.: *Metab. Eng.*, 10, 24 (2008).

Souhrn

Hamšíková M.: Mikrobiální produkce kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je nesulfátovaný glykosaminoglykan, který se skládá z opakujících se jednotek disacharidů kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, spojených (1→3)- a (1→4)-β-D-glykosidovou vazbou. Tento polysacharid je hlavní složkou mezibuněčné hmoty. Kyselina hyaluronová se jako signální molekula také účastní imunologických procesů. Díky svým unikátním vlastnostem jako je biokompatibilita, hydrofilita nebo viskoelasticita je kyselina hyaluronová velice cenným biopolymerem v medicíně, například v oční a plastické chirurgii, dále je také využívána v kosmetickém průmyslu a potravinářství. V současné době se kyselina hyaluronová komerčně získává především mikrobiální fermentací pomocí bakteriálního kmene *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Ke kultivaci se obecně používá syntetické médium obsahující glukosu a kvasničný extrakt. Byly testovány také některé zdroje zemědělského původu, které by mohly nahradit toto médium a být dále využity jako zdroj bioenergie nebo pro přípravu cenných bioproduktů.

Klíčová slova: kyselina hyaluronová

Summary

Hamšíková M.: Microbial production of hyaluronic acid

Hyaluronic acid is non-sulfated glycosaminoglycan which is composed of alternating disaccharide units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine joined by (1→3)- and (1→4)-β-D-glycosidic bonds. This polysaccharide is abundant in the extracellular matrix. Hyaluronic acid as a signal molecule also participates immunological process. Thanks to its unique properties such as biocompatibility, hydrofility or viscoelasticity hyaluronic acid is very valuable medical biopolymer (e.g. in eye surgery and plastic surgery) and it is also used in the cosmetic and food industry. Currently hyaluronic acid is commercially obtained by microbial fermentation of the pathogenic *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. For cultivation is generally used synthetic cultivation medium containing glucose and yeast extrakt. Some agricultural resources derivates which can be converted into bioenergy or valuable bioproducts were also tested as a compensation for synthetic medium.

Keywords: hyaluronic acid

BIOTECHNOLOGICKÁ VÝROBA KAROTENOIDŮ

Petr Svoboda

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, svoboda-petr@tiscali.cz

Úvod

Karotenoidy jsou důležitá rostlinná barviva, která mají pro rostliny životní význam. Tyto strukturně různorodé pigmenty mají mnoho rozmanitých biologických funkcí: účastní se fotosynthesy, fungují jako antioxidanty, a slouží jako prekurzory pro mnoho hormonů a vitaminů. Jsou produkovány především rostlinami, houbami, řasami a mikroorganismy. Karotenoidy zbarvují červeně, oranžově, žlutě či hnědě listy rostlin, květy nebo ovoce. Jako potrava se dostávají do zvířecích těl, kde mohou zbarvit kůži, ptačí peří, rybí maso, žloutek nebo ulity korýšů.

Karotenoidy jsou používány v oblasti farmacie, potravinových doplňků (tzv. nutraceutik) a krmných aditiv. Dále se využívají jako barviva potravin nebo v kosmetice. Pro vědce jsou tyto pigmenty zajímavé z hlediska příznivého vlivu na lidské zdraví. Snižují riziko vzniku rakoviny a posilují imunitní systém.

V posledních několika letech se zvyšuje zájem spotřebitelů o přírodní aditivní látky, proto se hledají vhodné postupy jak efektivně vyrábět karotenoidy[1,2,3,4].

Struktura karotenoidů

Chemické složení karotenoidů je odvozeno ze 40 uhlíkového polyenového řetězce, se systémem konjugovaných dvojných vazeb, tvořeného z isoprenoidních jednotek. Modifikací konců isprenoidního řetězce mohou vznikat rozličné druhy karotenoidů (obr. 1). Mezi modifikace patří např: cyklizace koncových struktur (α-karoten, β-karoten, lykopen), kde může být přítomna jako funkční skupina kyslík (kantaxanthin). Tyto sloučeniny se potom nazývají xanthofyly. Karotenoidy mohou také obsahovat hydroxy skupinu (lutein, β-kryptoxanthin) nebo obě zároveň (astaxanthin)[2,5]. Tyto skupiny jsou zodpovědné za antioxidační a barevné vlastnosti. Vzhledem k přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb, se karotenoidy mohou vyskytovat jako cis nebo trans izomery. Ačkoliv jsou trans izomery v potravinách běžnější, a jsou i chemicky stabilnější, je známo jen velice málo o biologickém vlivu cis a trans izomerů na lidské zdraví[5].

Biosynthetická dráha karotenoidů

Veškeré karotenoidy jsou odvozeny od isoprenoidů. Pomocí dvou různých drah se synthetisují první isoprenoidní jednotky, což jsou isopentenyl difosfát (IPP) a jeho izomer dimethylallyl difosfát (DMAPP)[1,3,6].

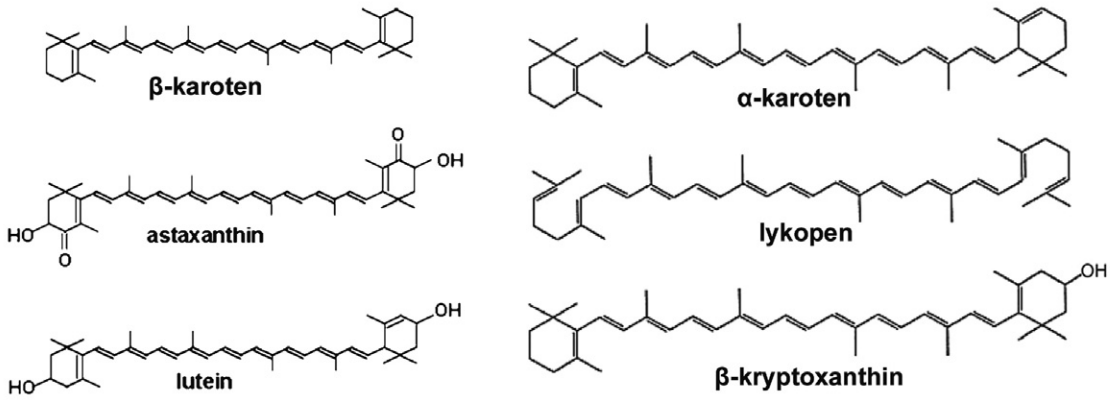
První dráha začíná reakcí 3 molekul acetyl-CoA, ze kterých přes acetoacetyl-CoA a β-hydroxy-β-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) vzniká mevalonát (obr. 2). Proto se tento sled reakcí nazývá řetězec mevalonátu (MVA). MVA dráhu využívají především eukaryota. V roce 1993 byl naznačen nový řetězec[7], jenž využívají prokaryota. Řetězec byl pojmenován 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát (MEP) a byl v roce 1999 potvrzen[8]. Dráha začíná reakcí glyceraldehyd-3-fosfátu (G3P) s pyruvátem a vzniká 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát (DXP) s nálednou redukcí na MEP. Rostliny a některé kvasinky využívají obě dráhy k synthese isopentenyl difosfátu[1,3,6].

Následujícím krokem při synthese karotenoidů je prodlužování řetězce isoprenoidních jednotek (obr. 2). Probíhá kondenzací dimethylallyl disfosfátu, což je reaktivnější izomer isopentenyl difosfátu. Izomerace je katalyzována enzymem isopentenyl difosfát izomerasou (IDI). Synthesa řetězce je katalyzována prenyl tranferasami (ispA a crtE). Krátký polyprenyl difosfátový řetězec je prodlužován na geranyl difosfát (GPP), který má 10 uhlíků. Následuje farnesyl difosfát (FPP), 15 uhlíků a geranylgeranyl difosfát (GGPP), 20 uhlíků. GGPP je prekurzorem pro synthesu mnoha látek, např. terpenů, chinonů, karotenoidů, gibberelinů, tokoferolů, chlorofylů[1,3,6].

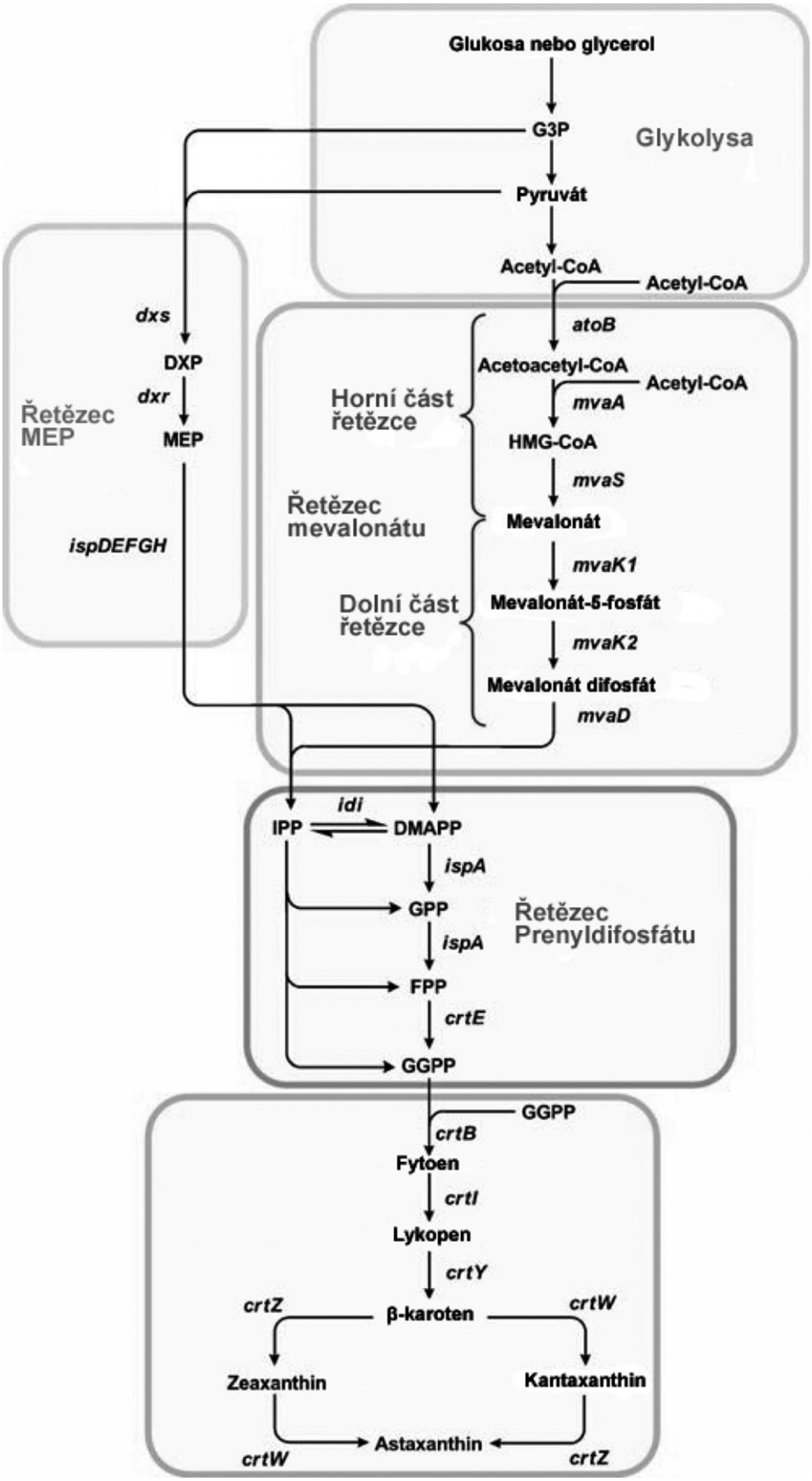
Kondenzace dvou molekul geranylgeranyl difosfátu katalyzovaná fytoen synthasou (crtB) se eliminují dvě difosfátové skupiny a vzniká fytoen. Enzymem fytoen desaturasou (crtI) se vnášejí do fytoenu čtyři dvojné vazby a vytvoří se lykopen. Lykopen β-cyklasou (crtY) se katalyzuje reakce, při níž se na koncích lykopenu tvoří cyklická struktura a produkuje se β-karoten, který může být dále přeměněn β-karoten hydroxylasou (crtZ) na zeaxanthin nebo β-karoten ketolasou (crtW) na kanthaxantin, ze kterých následně vzniká astaxanthin (obr. 2). Popřípadě může být lykopen konvertován lykopen β-cyklasou a lykopen ε-cyklasou na α-karoten a následně přeměněn pomocí β-karoten hydroxylasy a ε-karoten hydroxylasy na lutein[1,3,6,9].

Biotechnologická výroba karotenoidů

Nejběžnější karotenoid β-karoten je ve velkém množství zastoupen v zelených rostlinách (petržel, špenát nebo brokolice), v ovoci (mandarinka, broskev) a zelenině (mrkev, dýně). Některé mikroorganismy jako např.: houby *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora*, kvasinky *Phaffia rhodozyma*, *Rhodotorula*, řasy *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, akumulují β-karoten ve vysoké koncentraci. Nicméně tato produkce je velmi nedostačující, proto se geneticky modifikují známé mikroorganismy např.: oblíbená bakterie *Escherichia coli* nebo kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida utilis*, které karotenoidy běžně nesynthetisují. V poslední době se vědecký zájem zaměřil i na genetickou úpravu rostlin jako jsou brambory, rýže, rajčata, atd., u kterých je snaha o *overexpresi* karotenoidů, díky čemuž by se již karotenoidy nemusely přidávat do potravin jako aditiva[1,2,4,6].



Obr. 1: Chemická struktura a příklad modifikace koncových struktur řetězců karotenoidů u α-karotenu, β-karotenu, lykopenu, luteinu, astaxanthinu a β-kryptoxanthinu[2,5].



Obr. 2: Schéma synthesy karotenoidů s řetězcem mevalonátu a 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátovým (MEP) řetězcem. *G3P* glyceraldehyd-3-fosfát, *DXP* 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát, *HMG-CoA* β-hydroxy-β-methylglutaryl-CoA, *IPP* isopentenyl difosfát, *DMAPP* dimethylallyl difosfát, *GPP* geranyl difosfát, *FPP* farnesyl difosfát, *GGPP* geranylgeranyl difosfát, *dxs* DXP synthasa, *dxr* DXP reduktasa *ispDEFGH* (enzymy katalyzující přeměnu MEP na IPP), *atoB* acetyl–CoA thiolasa, *mvaA* HMG-CoA synthasa, *mvaS* HMG-CoA reduktasa, *mvaK1* mevalonát kinasa, *mvaK2* fosfomevalonát kinasa, *mvaD* mevalonát difosfát dekarboxylasa, *ispA* FPP synthasa, *crtE* GGPP synthasa, *crtB* fytoen synthasa, *crtI* fytoen desaturasa, *crtY* lykopen β-cyklasa, *crtZ* β-karoten hydroxylasa, *crtW* β-karoten ketolasa[3].

Biotechnologickou výrobu karotenoidů je možno rozdělit na 3 skupiny:

- Výroba v karotenoidních organismech
- Výroba v nekarotenoidních organismech
- Výroba v rostlinách

Jako u každé biotechnologické produkce jsou i u výroby karotenoidů určité nevýhody. Pracuje se s biologickým materiálem, tudíž se výsledný produkt musí zpracovávat a čistit. Proto je tento postup dražší než chemická synthesa. Z těchto důvodů je snaha produkovat karotenoidy v organismech, které nemají takové nutriční nároky a vylučují karotenoidy do média. Což je jedním z klíčových faktorů, hromadění karotenoidů je totiž pro buňky toxické, až smrtelné. Vysoká koncentrace produktu může vést k negativní zpětné inhibici enzymů odpovědných za synthesu produktu. A v neposlední řadě by mohla výroba probíhat kontinuálně. Nicméně se zatím nepodařilo tuto překážku vyřešit[4].

Výroba v karotenoidních organismech

- ***Dunaliella salina***

Jedná se o nejdůležitější organismus pro přirozenou produkci β-karotenu. *Dunaliella salina* je jednobuněčná řasa, u které je míra akumulace závislá na vysoké salinitě, intenzitě světla, přísunu dusíku a ideální teplotě. Při těchto podmínkách je *D. salina schopna* hromadit β-karoten v chloroplastech až do výše 12% sušiny biomasy. Produkuje β-karoten, který je složen ze dvou stereoizomerů (celý izomer je trans a 9-cis izomer), přibližně ve stejné koncentraci. Tento poměr má vynikající biologickou dostupnost, antioxidační vlastnosti a fyziologické účinky, což je doloženo vysokým obchodním zájmem o tento produkt.

Výrobní podniky se nachází především v oblastech s teplým podnebím, vysokým slunečním zářením, minimální oblačností a s hypersalinní vodou, např: v Číně, Izraeli, USA a Austrálii. Kultivace *D. saliny* je založena na autotrofním růstu v médiích, která obsahují anorganické živiny a oxid uhličitý jako zdrojem uhlíku. Celosvětová roční produkce *D. saliny* je 1200 t/rok[2,4].

- ***Haematococcus pluvialis***

Jednobuněčná řasa, která je jedním ze dvou organismů, které se používají pro výrobu astaxanthinu. *H. pluvialis*, který skladuje astaxanthin v tukových kapénkách v cytoplasmě, je citlivý na kontaminaci jinými mikroorganismy, a také na stresové podmínky (vysoká, nízká teplota nebo světlo). Za stresových podmínek začne řasa akumulovat právě astaxanthin až do úrovně 3% sušiny biomasy. Ale pro tuto koncentraci produktu musí být *H. pluvialis* několik týdnů kultivovaný v podmínkách s dostatkem světla a živin. Poté se biomasa vystaví stresovým podmínkám (nedostatek živin, především dusíku a fosforu, nedostatek světla, vysoká teplota nebo přidání soli). Výrobní podniky se nachází především na Havaji, ve Švédsku a Izraeli[2,4].

- ***Phaffia rhodozyma***

Druhým významným producentem astaxanthinu je kvasinka *Phaffia rhodozyma***.** Její schopnost akumulace není tak vysoká jako u předchozích dvou mikroorganismů. Dokáže hromadit produkt až do výše 0,03% sušiny biomasy. Také byly vyvinuty geneticky upravené kmeny *P. rhodozymy*, které produkují kantaxanthin, což je meziprodukt synthesy astaxanthinu[2,4].

Výroba v nekarotenoidních organismech

- ***Escherichia coli***

Většina genů nutných pro synthesu karotenoidů byla klonována z bakterií rodu *Erwinia* do *Escherichia coli*. Produkce karotenoidů v buňkách *E. coli*, transformovaných pomocí heterologních genů, je však obvykle nízká ve srovnání s několika set krát vyšší akumulací produktu u karotenoidních organismů jako je *Dunaliella salina* a *Haematococcus pluvialis*. Tato potíž je způsobena omezenou zásobou isoprenoidních prekurzorů pro synthesu metabolitů jako je chinon nebo dolichol, které jsou potřebné pro buňku v malém množství. Proto se využívá MEP dráhy, kde se výnosy mohou zvýšit až 6 krát. Další překážkou v produkci karotenoidů je omezená skladovací schopnosti buňky. Jelikož jsou karotenoidy lypofilní sloučeniny, skladuje je *E. coli* v buněčné membráně. Což při zvýšené akumulaci produktu vede k zastavení růstu buněk, popřípadě až ke smrti.

Prozatím poskytuje *E. coli* dobré výsledky v produkci lykopenu, β-karotenu a zeaxanthinu, a tím i perspektivního producenta karotenoidů do budoucnosti[1,3,4].

- ***Saccharomyces cerevisiae* a *Candida utilis***

I u těchto mikroorganismů byly použity geny pro synthesu karotenoidů z bakterií rodu *Erwinia* a *Rhodobacter.* Na rozdíl od *E. coli* mají kvasinky dostatek skladovacích prostor pro karotenoidy v membránách a velkou zásobu isprenoidních prekurzorů pro synthesu produktu. Díky tomu jsou považovány za vhodné producenty karotenoidů pro farmaceutický průmysl a krmná aditiva. *S. cerevisiae* a *C. utilis* se využívají jako producenti lykopenu, β-karotenu, astaxanthinu a zeaxanthinu[1,3,4].

Výroba v rostlinách

- **Rajče**

Použitím genů pro enzymy lykopen β-cyklasu z *Arabidopsis thaliana* a β-karoten hydroxylasu z pepře se podařilo zvýšit produkci v plodu u β-karotenu až 13 krát a u zeaxanthinu, astaxanthinu a luteinu až 10 krát. Vyšší produkce β-karotenu je způsobena enzymovou přeměnou lykopenu pomocí lykopen β-cyklasy z *Arabidopsis thaliana*, a tím i změny barvy dužiny z červeně barvícího lykopenu na oranžově barvící β-karoten. Zvýšení xanthofilů (zeaxanthinu, astaxanthinu a luteinu) je umožněno díky β-karoten hydroxylasu z pepře[6,9].

• Řepka

U řepky se podařilo genetickou úpravou zvýšit produkci β-karotenu až 316 krát, což v porovnáním s bramborem (7 krát) a rajčetem (13 krát) je velice neočekávaný výsledek. Zatímco koncentrace fytoenu se snížila a koncentrace luteinu (hlavní karotenoid v netransgenní rostlině) zůstala téměř beze změny. Současně s těmito změnami se neočekávaně modifikovalo i složení mastných kyselin, čehož by se nechalo využít pro snadnější izolaci karotenoidů z tohoto producenta[6].

• Rýže

Transgenní rýže je opravdu velikým úspěchem, neboť rýže není běžným producentem -karotenu. U „zlaté rýže" 1. typu byla produkce karotenoidů ještě velmi nízká (1,6 mg/g rýže), což bylo způsobeno genem pro enzym fytoen synthasu, která byla použita z rostliny narcisu. Tento gen pro enzym byl u „zlaté rýže" 2. typu vyměněn za fytoen synthasu z kukuřice. A to způsobilo zvýšení produkce karotenoidů až na úroveň 35 mg/g rýže[6].

Závěr

Tento článek nastiňuje současnou problematiku v biotechnologické výrobě karotenoidů, ale i možné budoucí využití geneticky modifikovaných organismů. Protože je biosynthetická dráha u karotenoidů a její regulace stále velmi nejasná, nedaří se zvýšit produkci u nekarotenoidních organismů, u kterých je potíž i s omezenou skladovací kapacitou. Toto vše brání k širšímu komerčnímu využití rekombinantních organismů produkujících karotenoidy[1,2,3,4].

Vzhledem k tomu, že se na celém světě potýkáme s nedostatkem karotenoidů přijímanými v potravě, a tím vhodných prekurzorů zvláště pro vitamin A bylo by schválení a přijmutí transgenní „zlaté rýže" nebo rajčete spotřebiteli, zásadním krokem v boji proti tomuto nedostatku[6].

Literatura:

1. Lee PC, Schmidt-Dannert C: *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 1 (2002).
2. Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG: *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 1163 (2007).
3. Das A, Yoon SH, Lee SH, Kim JY, Oh DK, Kim SW*: Appl Microbiol Biotechnol* 77, 505 (2007).
4. Ausich RL: *Pure & Appl Chem* 69, 2169 (1997).
5. Rao AV, Rao LG: *Pharmacol Res* 55, 207 (2007).
6. Botella-Pavia, P, Rodriguez-Concepcion M: *Physiol Plant* 126, 369 (2006).
7. Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H: *Biochem J* 295, 517 (1993).
8. Rohmer M: *Nat Pro Rep* 16, 565 (1999).
9. Wurbs D, Ruf S, Bock R: *Plant J* 49, 276 (2007).

Souhrn

Svoboda P.: Biotechnologická výroba karotenoidů

Karotenoidy jsou důležité rostlinné pigmenty. Jsou to esenciální látky pro mnoho živočichů, včetně člověka. Jejich produkce je tedy nezbytnou součástí průmyslové výroby, protože se přidávají jako aditiva do potravin a krmných směsí. Mezi nejdůležitější producenty karotenoidů patří *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* a *Phaffia rhodozyma.* Nicméně se vědci pokoušejí pro výrobu geneticky modifikovat i jiné organismy např: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* nebo rostliny, jako je rajče, brambor, řepka nebo rýže.

Klíčová slova: karotenoidy, xanthofyly, biotechnologická výroba karotenoidů, geneticky modifikované organismy

Summary

Svoboda P.: Biotechnological production of carotenoids

Carotenoids are important plant pigments. They are substances essential for many animals, including humans. Their production is therefore an essential part of industrial production, because they are added as additives for food and feed mixtures. *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* a *Phaffia rhodozyma* belong to the most important producers of carotenoids. However, scientists are trying to modify genetically other organisms for production, such as: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* or plants such as tomatoes, potatoes, canola or rice.

Keywords: carotenoids, xanthophylls, biotechnological production of carotenoids, genetically modified organisms

SYNTETICKÁ BIOLOGIE

Jana Hofmeisterová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, jana.hofmeisterova@vscht.cz

S rozvojem společnosti je spojen vznik nových vědních oborů a disciplín, které pak nacházejí uplatnění v různých průmyslových aplikacích. Jedním z těchto novějších oborů je syntetická biologie, která však stále ještě skrývá řadu tajemství. Velký vliv na tento nový obor mají zejména rozšiřující se znalosti v oblasti genetiky bakterií, a to proto, že díky těmto znalostem budou vědci schopni vytvořit unikátní formy života, které nám pomohou lépe porozumět nejen přírodě, ale i samotným dějům, které v přírodě probíhají. Dodnes však neexistují přesné hranice mezi klasickými genovými manipulacemi a syntetickou biologií.

Co to vlastně je syntetická biologie

Syntetická biologie, která bývá často označována pouze zkratkou „Synbio", je novou oblastí výzkumu, ve které se vědci snaží modifikovat stávající organismy tím, že navrhují a syntetizují umělé geny nebo proteiny, za účelem porozumění základním molekulárním mechanismům biologických systémů. Využívají tedy přírodu jako velký zdroj tzv. stavebních kostek a tvoří s jejich pomocí organismy se zcela novými vlastnostmi[1].

Jde o multi-disciplinární obor spojující poznatky z různých vědních oborů jako je genetika, chemie, fyzika, genové inženýrství, biomolekulární inženýrství, biochemie a řada dalších. Každý z těchto oborů s sebou přináší jiný pohled na danou problematiku, což umožňuje hlubší proniknutí do daného problému [2,3,4].

Pojem syntetická biologie byl poprvé použit v roce 1974 Waclawem Szybalskim jako synonymum pro technologie rekombinantní DNA, využívané pro přípravu modifikovaných bakterií [1].

Dnes se tento pojem používá pro tzv. redesign života, který slouží k syntéze nových molekul a systémů se zcela novými funkcemi a vlastnostmi, které nejsou v samotné přírodě prováděny. Jde zejména o studie spojené s modelací, počítačovou simulací a následným porovnáním s experimentem prováděným v laboratoři. Syntetická biologie má tedy potenciál jak vědecký (např. podpora Darwinovy teorie), tak i technologický. [1,3]

Za vůdčí postavu syntetické biologie je považován Jonh Craig Venter, který se narodil 14. října 1946 v Salt Lake City. J. Craig Venter je biolog, podnikatel a zakladatel J. Craig Venterova Institutu, Celera Genomics a ústavu pro výzkum genomu. Je také považován za průkopníka sekvenace genomů. V roce 1995 jako první přečetl kompletní genom bakterie *Haemophilus influenza.* Podílel se na přečtení lidského genomu. V roce 2009 vznikl partnerský program mezi J. Craig Venter Institutem a Exxon Mobil s cílem vyvinout nová biopaliva [5,6].

Dva rozdílné přístupy v syntéze nových molekul

V současné době existují dva rozdílné přístupy využívané při syntéze nových molekul. Jedním z nich je tzv. **Top – down** přístup, který se snaží nalézt co nejmenší možný počet genů tak, aby byl organismus schopen přežít, rozmnožovat se a vložit jej do prázdné buňky. Vychází tedy z již existujícího organismu a mění ho s cílem vytvořit zcela nový a odlišný. Tímto přístupem se zabývá J. Craig Venter Institut, který má už v dnešní době na svém kontě řadu úspěchů[3,6,7].

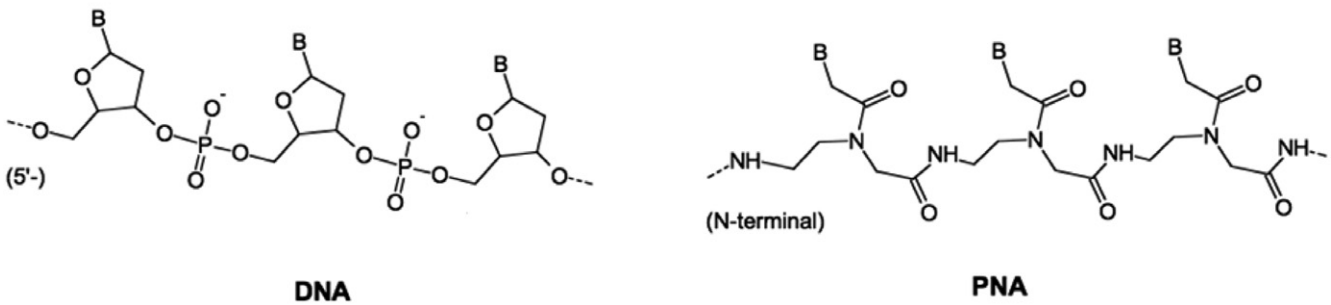
Druhým z přístupů je tzv. **Botton – up**, který hledá jednodušší struktury tzv. biocihly, které by bylo možné využít ke konstrukci nového umělého organismu. Snaží se vytvořit buňku, ve které budou základní elementy (geny a veškeré metabolické dráhy) vázány na povrch této struktury. Tento přístup využívá Stenn Rasmussen z Los Alamos National Laboratory[3,7].

Jako stavební prvky při syntéze nových molekul vědci využívají tektony a PNA (tzv. peptid nukleové kyseliny). Tekton je část sekundární struktury nesoucí informaci o spojení do struktury vyššího řádu. Jde o termín ze supramolekulární chemie, kde se používá k popisu naprogramovaných molekulárních komponentů a nanometrických stavebních kamenů. Hlavním cílem tohoto spojování je vytvořit nový syntetický postup, kdy by se jednotlivé struktury spojovali ve vyšší úroveň složitosti a vytvořily by tak syntetický biologický prostor (nejsložitější a co nejméně přirozený)[4].

PNA (Obr. 1) je uměle syntetizovaný polymer podobný nukleové kyselině DNA nebo RNA. Má zachované klasické párování, pouze s tím rozdílem, že místo ribosy nebo deoxyribosy je N-(2-aminoethyl)-glycin propojený peptidovými vazbami. Snahou syntetické biologie je využívat zcela odlišné stavební bloky než ty, které můžeme nalézt běžně v přírodě a využít je při syntéze unikátních forem života[4].

Cíle syntetické biologie

Cílem syntetické biologie je co nejlépe a do detailu porozumět biologickým systémům. Dále pak příprava nových léčiv, které by byly využity při léčbě doposud nevyléčitelných nemocí. Rychlé generování různých subtypů vakcín proti mikrobiálním chorobám, které by bylo možné kdykoliv, rychle a v jakémkoliv množství připravit. Vývoj vyspělých biopaliv jako alternativních zdrojů energie, díky kterým by nedocházelo ke stále většímu zatěžování planety a zabránilo by se tak možným následkům globálního oteplování. Příprava komplikovaných chemických sloučenin, které není schopen organismus sám syntetizovat nebo je není schopen syntetizovat v dostatečném množství a v neposlední řadě likvidace nebezpečných toxických odpadů, které by jinak mohly způsobit nezvratné změny na naší Zemi [2,7,8,9].



DNA PNA

Obr. 1: Srovnání DNA a PNA. [11]

Dosavadní úspěchy

Nejvíce úspěchů bylo dosaženo za pomoci tzv. Top-down přístupu při syntéze nových molekul. Stěžejním úspěchem syntetické biologie byly diagnostické nástroje pro HIV a hepatitidy a první uměle syntetizovaný genom bakterie *Mycoplasma mycoides*, který patří mezi nejdelší chemicky definovanou strukturu syntetizovanou v samotné laboratoři. K dalším úspěchům patří syntetizovaný kompletní genom infekčního bakteriofága X174 a viru obrny a v neposlední řadě také úspěšný proces transformace jednoho druhu bakteriální buňky do druhého pomocí genové transplantace. Všechny tyto úspěchy jsou připisovány právě J. Craig Venterovu Institutu[1,5,8].

Závěr

Syntetická biologie na svůj největší rozkvět teprve čeká. Zatím spíše vyvolává vlnu skeptismu a potenciálních etnických obav z možného úniku nově vytvořených organismů a případného zneužití této nové technologie při přípravě biologických zbraní. S prolomením těchto předsudků a s postupným rozšiřováním syntetické biologie na další kontinenty je očekávána technická revoluce. Předpokládá se, že v roce 2015, nastane zlom v celém chemickém průmyslu a že celá jeho jedna pětina bude závislá právě na syntetické biologii a jejím využití. Jednou z největších výzev v oblasti syntetické biologie je schopnost postavit větší a složitější sítě různých složek.

Literatura

1. Benner SA, et al.: C. R. Chimie (2010), doi:10.1016/j.crci.2010.06.013.
2. http://syntheticbiology.org/.
3. O'Malley MA: C. R. *Chimie* (2010), doi:10.1016/j.crci.2010.06.021.
4. Channon K, et al.: *Current Journal in Structural Biology* 18, 491 (2008).
5. Gibson DG, et al.: *Science* 329, 52 (2010).
6. http://www.career-bios.com/science-and-technology/john-craig-venter.
7. http://www.syntheticgenomics.com.
8. http://www.jcvi.org.
9. Stähler P, et al.: *Journal of Biotechnology* 124, 206 (2006).
10. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8f/Craigventer2.jpg.
11. http://mtin.de/DNA/DNA2008/images/abstracts/nielsen.png.

Souhrn

Hofmeisterová J.: Syntetická biologie

Syntetická biologie je multi-disciplinární vědní obor, jehož cílem je syntetizovat unikátní formy života, které napodobují ty přirozené, na podporu Darwinovy evoluční teorie. Při syntéze nových molekul vědci využívají nové stavební bloky, tzv. tektony a PNA. Existují dva rozdílné přístupy v syntéze nových molekul, z nichž nejdůležitějším je Top – down přístup. Vůdčí postavou syntetické biologie je J. Craig Venter, biolog a zakladatel J. Craig Venterova Institutu.

Klíčová slova: syntetická biologie, tekton, PNA, Top – down přístup, J. Craig Venter

Summary

Hofmeisterová J.: Synthetic biology

Synthetic biology is a multi-disciplinary field of science, which aim is to synthetize the unique life forms, that simulates the natural forms, to support Darwinian evolution theory. Researchers use the new building blocks, so-called tectons and PNA, by synthesis of new molecules. There are two different approaches in the synthesis of new molecules, in which is the most important the Top – down approach. A leading figure of synthetic biology is J. Craig Venter, a biologist and the founder of J. Craig Venter Institute.

Keywords: synthetic biology, tecton, PNA, Top – down approach, J. Craig Venter

O B S A H

Úvodem	1
Pozvánka na seminář **„Novinky v oblasti genetických modifikací“**	2
Program symposia Biotech 2011	3
Daussant J.: **Nová technika ELISA („Digitální ELISA“)**	5
Hložková K.: **Budeme jíst geneticky modifikovaného lososa?**	6
Macůrková A.: **Cyklické peptidy jako účinná antibakteriální léčiva**	9
Fajmonová J.: **Indukovaná rezistence jako alternativní ochrana rostlin**	12
Hamšíková M.: **Mikrobiální produkce kyseliny hyaluronové**	15
Svoboda P.: **Biotechnologická výroba karotenoidů**	18
Hofmeisterová J.: **Syntetická biologie**	22

C O N T E N T S

Editorial	1
Invitation for the seminar **„News in genetic modifications“**	2
Program of the symposium Biotech 2011	3
Daussant J.: **New concept of ELISA („Digital ELISA“)**	5
Hložková K.: **Will we eat genetically modified salmon?**	6
Macůrková A.: **Cyclic peptides as an effective antibacterial drugs**	9
Fajmonová J.: **Induced resistence like an alternative plant defence strategy**	12
Hamšíková M.: **Microbial production of hyaluronic acid**	15
Svoboda P.: **Biotechnological production of carotenoids**	18
Hofmeisterová J.: **Synthetic biology**	22

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *J.Biochem.* 148, 502 (1997).
Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.
Lowestein K A: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 1979.
http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics, staženo 3. září 1999.

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

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

BIOPROSPECT

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

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

MK ČR E 19409

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

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