

Bio

Ročník 24 • Číslo 1/2014

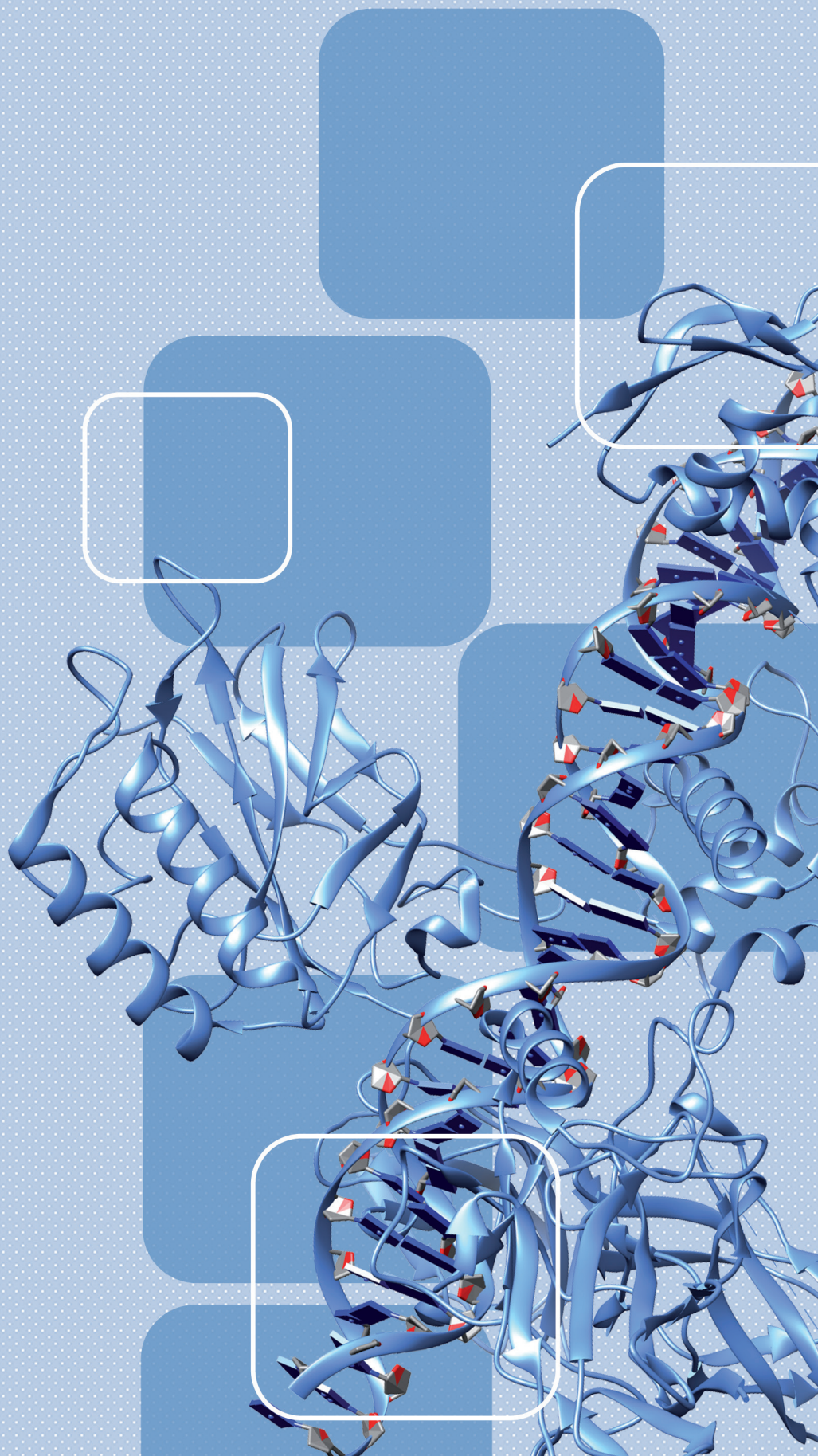
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

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

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech 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. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation 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 Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (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 ve dvacátém čtvrtém ročníku časopisu „Bioprospect“, který se nás snaží čtvrtletně informovat o významných událostech naší společnosti a přinášet zejména krátké přehledné články i původní práce z různých oblastí biotechnologií. Pevně věřím, že se Vám bude líbit formální inovace našeho časopisu, zejména změna obálky. Přispívajícím bychom rádi připoměli, že Bioprospect byl Radou pro výzkum a inovace zařazen do seznamu recenzovaných (neimpaktovaných) časopisů pro r. 2014 (<http://www.vyzkum.cz>), což jistě uvítají ti, kterým tato skutečnost pomůže získávat body do jejich profesionálního hodnocení. Naš časopis je v elektronické formě dostupný i na webových stránkách naší společnosti (<http://bts.vscht.cz>), takže pokud Bioprospect ztratíte či někam založíte, můžete jej kdykoliv nalézt na internetu. Dále bychom Vás rádi informovali, že tyto naše webové stránky jsou archivovány Národní knihovnou a jsou tedy dostupné i tímto způsobem <http://webarchiv.cz>). V tomto prvním čísle publikujeme práce, které byly výsledkem projektu Operační program Praha – Adaptabilita (Praha-EU), který probíhá na VŠCHT v Praze. V letošním roce dále počítáme s tím, že vydáme speciální číslo, které bude obsahovat vybrané články prací prezentovaných na symposiu Bio-Tech 2014.

Znovu připomínáme, že přípravný výbor pokročil v přípravě mezinárodního symposia BioTech 2014 a s ním spojeného 6. Česko-švýcarské symposia s výstavou, které se uskuteční opět v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích ve dnech 11. – 14. 6. 2014. Webová stránka (www.biotech2014.cz) přináší podrobné informace včetně detailního programu symposia. Rádi uvítáme další účastníky, kteří mají zájem o posterovou prezentaci či jen pasivní účast. Organizace a biotechnologické firmy mohou využít možnosti vystavovat či se prezentovat svými spoty, reklamou v knize abstrakt či distribucí propagačních materiálů dle dohody s organizátory. Věříme, že nám pomůžete informaci o symposiu rozšířit doma i v zahraničí a přispějete tak k jeho úspěchu.

Naš každoroční jarní seminář se uskuteční 15. 5. 2014 ve 14 hod v posluchárně B II na VŠCHT v Praze (viz přiložená pozvánka). Přednáška, přednesená p. Ing. Václavem Štěpánkem z MBÚ AV ČR, má název „Aplikace metagenomiky v biotechnologiích“.

Koncem minulého roku, a to 19. listopadu zemřel ve svých 95 letech nositel dvou Nobelových cen za chemii, průkopník studia struktury bílkovin a nukleových kyselin – Frederick Sanger.

Frederick Sanger studoval v anglické Cambridge, kde se stal „major in biochemistry“ v r. 1938 a kde později také dokončil i svá doktorská studia. Nejprve se úspěšně věnoval studiu struktury peptidů a bílkovin, které vyvrcholilo stanovením primární struktury insulinu. Stanovil sekvenci všech 51 aminokyselin a zahájil tím éru stanovování primární struktury nejrozličnějších bílkovin v padesátých a šedesátých letech. Všem chemikům je

dobře známa jeho metoda stanovení N-koncové aminokyseliny pomocí 2,4-dinitrofenylderivátu peptidu. Tato průkopnická práce byla oceněna Nobelovou cenou v r. 1958, kdy bylo Sangerovi 40 let.

Sanger pak obrátil svou pozornost na studium metod sekvenování DNA. Při svém studijním pobytu v dánské Carlsbergské laboratoři v r. 1965 jsem měl možnost se s Fredem Sangrem setkat a vyslechnout si jeho přednášku o jeho dosavadních výsledcích ve vývoji metod sekvenace DNA. První versí použitelné sekvenační metody DNA navrhl již v r. 1975, dva roky před konkurenční metodou Waltera Gilberta a spol. Jeho metoda využívající DNA-polymerasy I (z *E.coli*) k vytvoření komplementárních kopií sekvenované jednovláknové DNA byla dovedena k dokonalosti v sedmdesátých letech, později byla automatizována a v podstatě umožnila spuštění projektu lidského genomu. Za tyto průkopnické práce v úsilí o sekvenaci DNA získal Sanger v r. 1980 druhou Nobelovu cenu za chemii. Tuto druhou cenu získal společně s Američany Woldemarem Gilbertem a Paulem Bergem.

Sanger získal řadu dalších ocenění z nichž bych rád jmenoval: „Fellow of the Royal Society“ (1954), „Commander of the Order of the British Empire“ (1963) a „Member of the Order of Merit“ (1986). Nehynoucí poctou pro Freda Sangera je však jistě „jeho“ Sanger Institute (později Centre), který intenzivně pokračuje v jím započatém díle rozvoji genomiky.

V r. 1992 se dvě britské instituce „Wellcome Trust“ a UK Medical Research Council rozhodly založit výzkumné centrum, které by mapovalo, sekvenovalo a dekodovalo lidský genom a genomy ostatních organismů. Ustavení tohoto centra napomohlo i rozhodnutí Evropské molekularně biologické laboratoře (EMBL) umístit ve velké Británii Evropský bioinformační institut (EBI). Bylo rozhodnuto, že nové genomické výzkumné centrum ponese Sangerovo jméno a bude lokalizováno v malé vesničce Hinxton asi devět mil na jih od anglické Cambridge. Fred Sanger oficiálně otevřel „Sanger Centre“ 4. října 1993, tedy zhruba před deseti lety.

Hlavní cílem Sangerova centra je zabývat se významem genomiky pro zdraví a nemoc, objasňovat podstatu genetických a infekčních nemocí, navrhovat jejich diagnosu, možnosti léčby a prevence.

Sanger Centre po jeho otevření zaměstnával asi 50 lidí, dnes zde pracuje asi 900 lidí a v přilehlém Evropském bioinformačním centru kolem 300 lidí. Centrum se významně podílelo na projektu lidského i myšního genomu. Genomický výzkum je samozřejmě závislý na sofistikované výpočetní technice, která rovněž zajišťuje prezentaci dostupných dat a jejich zpřístupnění ostatním vědeckým pracovníkům. Sanger Institute, spolu s kolegy z dalších institucí vytvořil plejádu asi 18 databází (viz <http://www.sanger.ac.uk/resources/databases>).

Široký vědecký program probíhá v 33 pracovních skupinách, jejichž náplň zde nebudu popisovat. Přes tuto

ohromnou vědeckou kapacitu je třeba zdůraznit širokou spoluprací s dalšími institucemi. Uvádí se, že přes 90 % vědeckých publikací zahrnuje spolupráci s dalšími organizacemi. Současně probíhá více než 100 projektů sekvence DNA patogenů. Ústav je schopen realizovat denně sekvenaci 10 bilionů basí a ročně produkuje cca 280 původních vědeckých prací.

Sanger Centre je také významným školicím pracovištěm. Mimo jiné realizuje 4 – letý PhD program, při němž studenti jsou registrováni na University of Cambridge. Centrum věnuje velkou pozornost komunikaci s veřejností. Ročně jej navštíví více než 1 500 studentů, učitelů a skupin veřejnosti. Návštěvníci se setkávají s vědeckými pracovníky, mají možnost navštívit laboratoře a zúčastnit se nejrušnějších diskusí (zejména o etických problémech) a dalších aktivit. Jsou pořádány videokonference, kursy pro učitele. Pro veřejnost byla vytvořena informační webová stránka www.yourgenom.org.

www.yourgenom.org, která má pomoci porozumět genetice a genomice a pochopit jejich význam pro společnost. Je také zdrojem informací pro učitele středních škol.

Závěrem našeho úvodníku bychom, již tradičně, rádi připomněli témata článků, které naleznete v tomto letošním prvním čísle. Prvním příspěvkem bude článek o hmotnostní spektrometrii, ve kterém se populární formou dočtete o rozdílu mezi MALDI-TOF/TOF a LC-Q-TOF a možnostech jejich použití. Další články pojednávají o kyselině salicylové, o využití hypertenzního potkana jako modelového systému lidských kardio-vasculárních a metabolických onemocnění a o metodě stanovení bakterií *Campylobacter* spp. pomocí qPCR. Všechny tyto články vznikly za podpory OPPIA.

Se srdečnými pozdravy se těší na Vaše příspěvky
Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

**Biotechnologická společnost
Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠCHT
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.**

si Vás dovoluji pozvat na seminář

**Aplikace metagenomiky
v biotechnologiích**

konaný **ve čtvrtek 15. května 2014**
v posluchárně B II VŠCHT

Praha 6, Technická 3/1905, Budova B

stanice metra Dejvická, výstup ve směru příjezdu vlaku do ulice Šolínova,
druhou ulicí doleva, první budova vlevo je budova B VŠCHT,
posluchárna je přímo proti vchodu do budovy

PROGRAM:

14,00 **J. Káš**, VŠCHT Praha: Úvodní slovo

14,10 **V. Štěpánek**, MBÚ AV ČR, v.v.i.: **Aplikace metagenomiky v biotechnologiích**

15,20 Diskuse a závěr semináře

Vstup je volný

Za organizátory semináře:
prof. Ing. Jan Káš, DrSc.



BioTech 2014 will concentrate on latest achievements in microbial biotechnology, the key technology for bio-based economies.

Lectures will focus on:

- Large and Small Molecules for Pharma
- Food, Feed and Nutrition
- Biomaterials and Biochemicals
- Environmental Biotechnology
- Biorefinery
- Microalgae Biotechnology

Specialised **workshops** (SIG) and **round-table discussions** can be organised upon request to further strengthen relationship between industry and academia.



Registration Fee

Registration fee includes: Opening session, welcome party, all conference sessions, workshops, book of abstracts, lunches and refreshment during breaks.

Regular	€300	€350
Students	€200	€250
Accompanying person	€150	€150



VĚDECKO-PEDAGOGICKÉ ODPOLEDNE U PŘÍLEŽITOSTI 60. VÝROČÍ ZALOŽENÍ KATEDRY BIOCHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY UK

Miroslav Šulc a Marie Stiborová

Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, miroslav.sulc@natur.cuni.cz

V závěru loňského roku, ve středu 11. prosince 2013, se u příležitosti 60. výročí založení katedry biochemie Přírodovědecké fakulty UK uskutečnilo vědecko-pedagogické odpoledne. V posluchárně CH2 budovy chemických kateder PřF UK, nesoucí jméno zakladatele katedry biochemie prof. J. V. Koštíře, byly dvěma významnými absolventy katedry biochemie, profesorem Václavem Hořejším, současným ředitelem Ústavu molekulární genetiky AVČR, a profesorem Václavem Pačesem, ředitelem tohoto ústavu v letech 1999 – 2005, předsedou Akademie věd České republiky v letech 2005 – 2009, předneseny poutavé přednášky a jejich osobní vzpomínky. První řečník se s námi ve své přednášce „Vzpomínání vděčného stárnoucího absolventa katedry biochemie“ podělil o své osobní vzpomínky na katedru biochemie, zmínil osobnosti bývalých vedoucích, prof. J. Kocourka a prof. M. Tiché, a zavzpomínal i na ve své době unikátní metodiky a výsledky z výzkumu lektinů. Přiblížil nám též dobu počátku svého působení na ústavech AVČR. Profesor V. Pačes se ve své přednášce „Josef Koštík a poválečná biochemie“ zaměřil nejen na osobnost zakladatele katedry, profesora J.V. Koštíře, ale připomenul i události předcházející založení katedry biochemie, které ovlivňovaly její budoucí vědecké i pedagogické směřování. Současně byla zmíněna řada osobních vzpomínek na dobu jeho studia a výzkumné činnosti na katedře. Přednášku uzavřel vzpomínkou na jeho nedávné setkání s paní profesorkou S. Leblovou, zakladatelkou výzkumu biochemie rostlin na naší katedře.

V průběhu setkání byla v přednášce současného vedoucího katedry, docenta Miroslava Šulce „Ka-

tetra biochemie PřFUK – přítomnost a budoucnost“ představena pedagogická a vědecká činnost katedry. Kromě programů studia, tématického zaměření vědeckých skupin na katedře a projektového zabezpečení výzkumu a přístrojového rozvoje katedry zazněla i vzpomínka na docenta Z. Šípala, zakladatele výzkumu cytochromu P450 na katedře biochemie. Po přednáškách pokračovalo setkání v přátelské atmosféře diskusí a osobními vzpomínkami řady absolventů. Profesor S. Zadražil vzpomínal osobnost docenta A. Jindry a jím pořádané „spanilé jízdy po českých farmaceutických laboratořích“. Závěrem byly proneseny pozdravy a přání přítomných zástupců biochemicky či chemicky orientovaných pracovišť z celé České republiky (prof. J. Káš, prof. P. Anzenbacher, prof. J. Barek, Doc. F. Šmíd a řada dalších). Setkání bylo zakončeno slavnostním přípitkem a pohoštěním, během kterého probíhala v příjemné atmosféře řada osobních rozhovorů a setkání.

Dovolte nám co nejsrdečněji poděkovat všem hostům pořádaného setkání a aktivním účastníkům diskuse za připomenutí historie a současnosti katedry biochemie PřF UK a společně příjemně strávený čas. Jejich vzpomínky nám připomněly historii, ze které můžeme s úctou čerpat i do budoucnosti, a můžeme snad i věřit v úspěšné směřování katedry v následujících letech. Závěrem nám dovolte popřát nejen katedře biochemie, ale i celé biochemické komunitě a katedrám zaměřeným na výuku biochemie a biochemicky orientovaným pracovištím co nejvíce šikovných studentů a absolventů, mnoho pedagogických i vědeckých úspěchů, a dostatek entusiasmů do dalších let.



OPERAČNÍ PROGRAM PRAHA
ADAPTABILITA



IMPLEMENTACE NOVÝCH METOD VE VÝUCE BIOCHEMIE A FORENZNÍ ANALÝZY

Štěpánka Hrdličková Kučková, Lucie Coufalová, Lucie Maršálová

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, kuckovas@vscht.cz

V rámci 6. výzvy Operačního programu Praha – Adaptabilita, prioritní osy Modernizace počátečního vzdělávání, získala naše škola finanční zdroje, které budou využity v projektu „Implementace nových metod ve výuce biochemie a forenzní analýzy“, jež bude realizován v termínu 1. 7. 2013 – 28. 2. 2015.

Projekt je zaměřen na rozvoj moderního forenzně-biochemického zázemí, kdy budou v rámci klíčových aktivit inovovány odborné předměty: Laboratoř analýzy biologických materiálů, Forenzní mikroskopie, Bioanalytické metody a Bakalářská práce. Součástí inovace, prostředkem pro studium doktorandů a zároveň dalším dílčím cílem projektu je realizace a uvedení do provozu dvou výukových zařízení, která budou zakoupena z prostředků projektu a to konkrétně fluorescenční mikroskop a infračervený (FTIR) spektrometr. Inovovaná výuka pak bude představovat seznámení a práci studentů s těmito zařízeními, která budou umístěna v laboratoři fluorescenční a infračervené mikroskopie.

Nedílnou součástí tohoto projektu je zároveň i finanční podpora studentů bakalářského a doktorského studijního programu Fakulty potravinářské a biochemické technologie, a to především formou stipendijních programů. Jedná se o klíčové aktivity „Podpora týmové spolupráce studentů“, „Podpora studentů bakalářské-

ho studijního programu“, „Rozvoj publikačních schopností studentů“, příprava a realizace přednášek „Studenti studentům“.

Cílem projektu je dosažení systematické kvalitní výuky bioanalytických technik na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze a rozšíření obecného povědomí o významu forenzní analýzy, což by mělo mimo jiné motivovat studenty, aby posílili řady odborných pracovníků v celé řadě biochemických odvětví a rovněž také co nejvíce ulehčilo vstup absolventů na trh práce. Toho má být dosaženo zvýšením úrovně bioanalytického zázemí pro výuku forenzních technik, implementace nových metod do výuky včetně vytvoření nových laboratorních úloh zahrnujících i fluorescenční mikroskopii a infračervenou spektroskopii a navazující zpracování získaných dat. K dalšímu rozvoji forenzně analytických metod má přispět rovněž přenesení nejmodernějších znalostí z oblasti bioanalytické chemie prostřednictvím stáží studentů doktorského studijního programu Vysoké školy chemicko-technologické v Praze na zahraničních pracovištích, které jsou plně hrazeny z finančních prostředků projektu.

Evropský sociální fond
Praha a EU – Investujeme do vaší budoucnosti



OPERAČNÍ PROGRAM PRAHA
ADAPTABILITA



NENÍ HMOŤÁK JAKO HMOŤÁK ANEB POROVNÁNÍ MALDI-TOF/TOF MS A LC-Q-TOF MS

Radovan Hynek

VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, radovan.hynek@vscht.cz

K sepsání tohoto článku mě vedla rostoucí potřeba po objasnění rozdílů mezi hmotnostní spektrometrií na principu MALDI-TOF (případně TOF/TOF) a hmotnostní spektrometrií na principu LC-Q-TOF. Cílem článku není přílišné zabíhání do detailů, ale naopak stručné objasnění zmíněných metod na takové úrovni, aby bylo užitečné i pro čtenáře, kteří nemají k hmotnostní spektrometrii příliš blízko. Článek je členěn do tří částí. V první části je stručně popsán rozdíl obou hmotnostně-spektrometrických metod, druhá část se zabývá příklady jejich využití a třetí je pak zaměřena na praktické záležitosti, jakými jsou příprava vzorků a komunikace s obsluhou přístrojů.

V čem se liší MALDI-TOF (TOF/TOF) a LC-Q-TOF

Princip metody MALDI-TOF je zřejmý již z překladu této anglické zkratky (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation–Time of Flight), tedy matricí podporovaná laserová desorpce/ ionizace–doba letu. Bylo zjištěno, že určité organické sloučeniny (označované jako matrice), například deriváty kyseliny skořicové nebo kyselina dihydroxybenzoová, mohou do svých krystalů zakomponovat molekuly analytu (například peptidy nebo proteiny). Po ozáření laserem pak dojde k šetrné ionizaci, aniž by došlo k rozpadu molekuly na fragmenty. Při vhodně zvolené intenzitě laseru, tak získá část molekul analytu kladný jednotkový náboj. Ve stejnosměrném elektrickém poli je pak všem vzniklým iontům se stejným nábojem udělena stejná kinetická energie bez ohledu na jejich hmotnost. Protože ovšem platí, že kinetická energie je rovna také $\frac{1}{2}mv^2$, bude rychlost hmotnějších částic menší než rychlost částic méně hmotných. Bude jim tedy trvat déle, než dopadnou na detektor. A právě čas letu je měřenou veličinou, ze které je pak spočtena hmotnost. Délka letu může být, zejména u menších molekul, jakými jsou například peptidy, prodloužena takzvaným reflektorem. Ten má stejný náboj, jako proti němu ležící částice, a tudíž je odrazí na detektor pro reflektorový mód. Tím se prodlouží dráha letu, čímž se značně zpřesní měření. Hmotnostní spektrometr na principu MALDI-TOF umožňuje velmi rychlé a přesné stanovení hmotností molekul. Nejčastěji je využíván pro analýzy proteinů a peptidů;

lze jej ovšem využít také pro analýzy jiných typů molekul. Výhodou je relativně jednoduchá příprava vzorků a krátká doba analýzy. Přístroj na principu MALDI-TOF/TOF navíc umožňuje získat sekvenční data vybraných peptidů. Pokud chceme například identifikovat proteiny na základě hmotností peptidových fragmentů získaných specifickým enzymovým štěpením, například trypsinem, jsou získaná hmotnostní data následně porovnávána s databází aminokyselinových sekvencí získaných překladem ze sekvencí nukleových kyselin. Podobně mohou být identifikovány mikroorganismy na základě souboru specifických hmotností jejich proteinů.

Metoda LC-Q-TOF (Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight) využívá kapalinovou chromatografii (obvykle nanokapilární chromatografie na reverzní fázi C_{18}) k separaci molekul analytu před vstupem do hmotnostního spektrometru. Ionizace v hmotnostním spektrometru je obvykle elektrosprejová, k separaci molekul uvnitř přístroje je využit kvadrupól a k měření hmotností nabitých částic je využit výše popsaný princip TOF. Při analýze je navíc značná část molekul fragmentována, což například v případě peptidů vede k získání velkého množství sekvenčních dat. Jedná-li se nám o identifikaci proteinů, jsou získaná data opět porovnávána s databází odvozenou od známé genetické informace. Výhodou této metody je možnost jejího využití i pro analýzy velmi komplexních směsí. Naopak úskalím této metody je její značná časová, technická a personální náročnost. Například ze sepětí nanokapilární chromatografie a hmotnostní spektrometrie vyplývají časté technické komplikace a vysoké požadavky na čistotu vzorků. Značná doba analýz znamená malou propustnost přístroje, což vede k často dlouhým čekacím dobám na analýzy zejména v exponovaných obdobích, jako je čas doměřování diplomových prací. Náročné je ovšem i kvalifikované vyhodnocení získaných dat. K provozu tohoto typu přístroje je tedy nezbytný zkušený, s přístrojem dostatečně sžitý, operátor na plný úvazek.

Z výše zmíněných odstavců je zjevné, že pokud je třeba řešit problém proteomického charakteru, je nutné nejprve kvalifikovaně rozhodnout, zda bude analýza prováděna na přístroji MALDI-TOF/TOF nebo LC-Q-TOF. Díky jisté komplementaritě obou metod může v některých případech vyvstat potřeba použít metody obě.

Oblasti využití MALDI-TOF/TOF a LC-Q-TOF

Obecně lze konstatovat, že v dnešní době jsou oba zmíněné přístroje s vyškolenými operátory běžnou součástí pracovišť zabývajících se biochemií, mikrobiologií či molekulovou genetikou. To ovšem neznamená, že v jiných oblastech tyto přístroje využití nenacházejí. Níže uvedené příklady jsou rozděleny podle typu přístroje. Toto rozdělení nevnímejte ovšem příliš striktně, neboť až v některých případech je nutné použít buďto jeden nebo druhý přístroj, tak pro řešení některých bioanalytických oříšků může být výhodné či dokonce nutné nasadit přístroje oba.

Příklady využití MALDI-TOF/TOF

Rychlá identifikace mikroorganismů

Hmotnostní spektrometr na principu MALDI-TOF ve spojení se softwarem pro biotypizaci je hojně využíván pro rychlou identifikaci mikroorganismů na základě charakteristických hmotností jejich intaktních proteinů. Rychlá identifikace mikroorganismů se může uplatnit například v následujících oblastech: kontrola potravinářských procesů využívajících mikroorganismy (rychlá identifikace mikrobiální kontaminace potravin), sledování produkce léčiv a obecně jakýchkoliv biotechnologií využívajících mikroorganismů, identifikace patogenních mikroorganismů (identifikace nemocničních patogenů, možnost využití též např. při napadení biologickými zbraněmi nebo při epidemiích), sledování výskytu mikroorganismů v životním prostředí, sledování mikrobiální kontaminace vody (technologie vody).

Rychlá identifikace proteinů

Ve spojení s metodou peptidového mapování umožňuje přístroj rychlou identifikaci proteinů na základě analýz směsi peptidových fragmentů vzniklých specifickým enzymovým štěpením. Získaná data jsou následně porovnána s příslušnou databází odvozenou ze sekvence DNA. Rychlá identifikace proteinů může nacházet uplatnění například: ve forenzní analýze (zejména tam, kde je třeba identifikovat proteiny a peptidy – tj. např. při odhalování padělků uměleckých děl), při kontrole proteinů produkovaných technologiemi využívajícími rekombinantní DNA, při kontrole kvality léčiv založených na proteinech nebo peptidech, při studiu vazby těžkých kovů na proteiny u různých druhů hub a rostlin nebo pro ověření efektivity úpravy molekul enzymů (v enzymovém inženýrství).

Studium struktury proteinů

Přístroj lze využít rovněž ke studiu posttranslačních (obecně kovalentních) modifikací proteinů, protože každá modifikace představuje specifickou změnu hmotnosti přístrojem zjistitelnou. Příklady: studium prostorového uspořádání proteinů (prostřednictvím umělých modifikací povrchových aminokyselinových postranních řetězců), identifikace fosforylací a myristoylací, ve virologii při studiu proteinů nadmolekulových struktur a při studiu interakcí virů s buněčnými membránami;

Studium peptidů

Jak již vyplývá z výše uvedeného, lze přístroj využít také pro studium peptidů, ať už se jedná o ověřová-

ní čistoty syntetických peptidů, nebo studium peptidů izolovaných z živých organismů. Příklady: studium biologicky aktivních peptidů nebo identifikace peptidů vážících kovy v potravinách.

Stanovení molekulových hmotností tam, kde jiné metody hmotnostní spektrometrie selhávají

Z této oblasti lze jako příklad uvést identifikaci a ověřování úspěšnosti syntézy derivátů hemu, studium některých barviv či návykových nízkomolekulárních látek v pevné fázi.

Příklady využití LC-Q-TOF

Hmotnostní spektrometr na principu LC-Q-TOF najde uplatnění všude tam, kde je třeba ve složitých směsích identifikovat velké množství proteinů. Nasazení LC-Q-TOF bývá tedy nezbytné v případech, kdy je obtížné nebo nemožné čisté proteiny získat, nebo kdy u značně velkých molekul proteinů potřebujeme získat značné sekvenční pokrytí.

Analýza membránových proteinů

Analýza membránových proteinů je typickým příkladem, kdy je nutné nasadit LC-Q-TOF. Proteiny se silně hydrofobními transmembránovými doménami totiž nelze rozdělit klasickou 2-DE (kvůli srážení těchto proteinů při IEF). Navíc bývají membránové proteiny značně glykosylovány, což ještě dále snižuje manévrovací prostor při jejich identifikaci. Na tomto místě je vhodné podotknout, že ačkoliv je studium membránových proteinů z analytického hlediska velmi obtížné, lze předpokládat, že vynaložené úsilí za to stojí vzhledem k výjimečným rolím, které vyplývají z lokalizace těchto proteinů na hranici dvou světů.

Kvantifikace proteinů

Kromě výše zmíněné identifikace je možné hmotnostní spektrometr LC-Q-TOF využívat také pro kvantifikaci proteinů nebo peptidů. Ta má obzvláštní význam opět u proteinů, které nemůžeme dělit pomocí 2-DE a získat tak alespoň představu o jejich kvantitě z intenzity spotů na gelu. Hmotnostní spektrometr LC-Q-TOF umožňuje využít ke kvantifikaci proteinů rovněž tak zvanou label-free techniku (bez nutnosti použít pro kvantifikaci značení např. pomocí iTRAQ).

Analýza proteinů tvrdých tkání

Další obtížnou analytickou oblastí, kde jsou služby přístroje LC-Q-TOF neocenitelné je oblast proteomiky tvrdých tkání. Jedná se zejména o nové metodické přístupy, kdy jsou proteiny specificky štěpeny přímo v zubní (např. dentin) nebo kostní (např. čelistní kost) tkáni. Tam je pak třeba analyzovat obrovské množství peptidových fragmentů původem z různých proteinů.

Podobně jako membránová proteomika je i proteomika tvrdých tkání metodicky velmi náročná. Nicméně i zde lze očekávat, že vynaložené úsilí přinese své ovoce s možnou aplikací například pro efektivnější vhojování zubních implantátů do čelistní kosti.

Analýza proteinů z dalších nerozpustných maticí

Podobná situace, jako již byla zmíněna, nastává obecně vždy, je-li třeba analyzovat větší množství proteinů obsažených v nerozpustných maticích. To se týká na-

příklad mineralizátů srdečních chlopní, barevných vrstev historických obrazů, historických malt atd

Studium kovalentních modifikací proteinů

Pokud nejsme schopni získat čisté proteiny, je v této oblasti nasazení přístroje LC-Q-TOF holou nutností. Pokud máme k dispozici čistý protein, může být užitečné použít kombinaci analýzy pomocí MALDI-TOF/TOF a LC-Q-TOF.

Příprava vzorků a komunikace s obsluhou

Pokud jste dočetli až sem, a potřebujete-li řešit nějaký proteomický úkol, tak pravděpodobně alespoň tušíte, zda bude směřovat spíše na MALDI-TOF či na LC-Q-TOF. Každopádně bude vhodné nejprve kontaktovat někoho z proteomické laboratoře a o možném řešení zmíněného problému si pohovořit. Přípravu vzorku je pak nutné konzultovat přímo s operátorem, který bude měření provádět. Obecně lze konstatovat, že připravit vzorek pro LC-Q-TOF analýzu je časově mnohem náročnější z důvodů nulové tolerance k jakýmkoliv mechanickým nečistotám (nebezpečí ucpání kolony). Nejen mechanické nečistoty ovšem pro LC-Q-TOF představují riziko; problémem může být i přítomnost určitých polymerů, které by se trvale vázaly na náplň kolony (obvykle reverzní fáze C₁₈). Přítomnost takových polymerů může

být ovšem zdárně odhalena pomocí MALDI-TOF. Často se jeví jako užitečný přístup právě nejprve analyzovat vzorek pomocí na MALDI-TOF a na základě získaných informací rozhodnout zda provést i analýzu na přístroji LC-Q-TOF. Analýzy pomocí LC-Q-TOF jsou podstatně náročnější na přístrojový čas, a proto na řadě pracovišť jsou vzorky zařazeny do „waiting line“. Při plánování pokusů je třeba počítat s tím, že na výsledky analýz pomocí LC-Q-TOF si můžete počkat až několik měsíců. Není tudíž divu, že v univerzitním prostředí tato skutečnost zejména v době dokončování diplomových prací vytváří jisté napětí. Pokud nejste sami kovaní v proteomice, počítejte s tím, že Vaše komunikace s operátorem změřením vzorků neskončí; budete ho/jí potřebovat ještě na kvalitní interpretaci získaných dat.

Z výše uvedeného vyplývá, že k provozování špičkové proteomické laboratoře jsou nezbytné nejen kvalitní přístroje, ale také zkušenosti operátorů či operátorky.

Poděkování

Podpořeno CZ.2.17/3. 1. 00/36021 Implementace nových metod ve výuce biochemie a forenzní analýzy.

Souhrn

Hynek R.: Není hmoták jako hmoták aneb porovnání MALDI-TOF/TOF MS a LC-Q-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie je neodmyslitelnou součástí moderní proteomiky. Při analýzách proteinů, ale i jiných biochemických molekul, nacházejí uplatnění různé typy hmotnostních spektrometrů. Článek se zabývá porovnáním hmotnostních spektrometrů na principu MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation–Time of Flight) a LC-Q LC-Q-TOF (Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight) z různých hledisek.

Klíčová slova: Hmotnostní spektrometrie, proteiny, proteomika, peptidové mapování

Summary

Hynek R.: Special aspects of mass spec.

Mass spectrometry is inseparable part of modern proteomics. Different types of mass spectrometers are involved in analysis of proteins or the other biomolecules. The article compares mass spectrometers based on principles MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation–Time of Flight) and LC-Q LC-Q-TOF (Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight) from different point of views.

Keywords: Mass spectrometry, proteins, proteomics, peptide mapping

KYSELINA SALICYLOVÁ

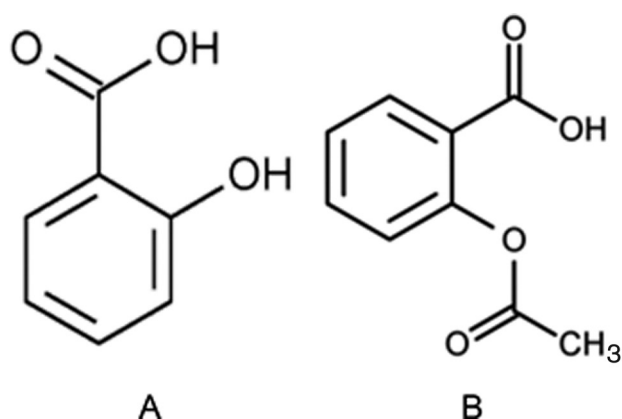
Martin Janda^{1,2}, Olga Valentová¹

¹Laboratoř biochemie rostlin, Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,

²Laboratoř patofyziologie rostlin, Ústav experimentální botaniky AV ČR v.v.i., martin.janda@vscht.cz

Úvod

Kyselina salicylová (SA), chemicky kyselina 2-hydroxybenzoová (Obr. 1), je fenolická sloučenina, jejíž název je odvozen od latinského názvu pro vrbu (*Salix*).



Obr. 1: **A)** kyselina salicylová (SA), **B)** kyselina acetylsalicylová (aspirin).

Již ve starověku byly Hippokratem rozpoznány blahodárné účinky odvaru z kůry vrby a tento slavný lékař jej předepisoval jako lék proti horečce. V roce 1828 Johan Andreas Buchner izoloval malé množství žluté substance, kterou nazval salicin. O deset let později Andrea Pirilio převedl salicin na kyselinu salicylovou. V rámci lékařských aplikací kyseliny salicylové se stal přelomovým rok 1899, kdy byl v německé společnosti Bayer jejich chemikem Felixem Hoffmanem synteticky připraven derivát kyseliny salicylové, kyselina acetylsalicylová, která je účinnou složkou jednoho z nejrozšířenějších léků, ne-li nejrozšířenějšího, aspirinu¹. V tomto přehledném článku se však nebudeme zabývat medicínskými aspekty spojenými s SA, ale velmi významnou rolí této látky spojenou s odpovědí rostlin na biotický stres, kde hlavním stresorem je napadení patogenem (Box 1).

Box 1. Patogeni

Patogeni jsou velmi často rozděleni na biotrofy a nekrotrofy. Stále více se jako třetí skupina uvádějí tzv. hemibiotrofové. Biotrofové se živí živou hostitelskou tkání, zatímco nekrotrofové ničí hostitelskou tkáň a živí se jejími zbytky. Zjednodušeně si to můžeme představit tak, že když rostlina spustí hypersenzitivní reakci (HR) ústící v programovanou buněčnou smrt a tato situace se nelíbí biotrofům, nekrotrofové se budou naopak vesele živit. Z toho vyplývá i rozmanitá rostlinná reakce na napadení. Mnoho patogenů se řadí mezi biotrofy

až nekrotrofy v závislosti na podmínkách a na stávající fázi životního cyklu a právě z toho důvodu se čím dál více mluví i o tzv. hemibiotrofech, kteří se zprvu zdají být biotrofy, ale přecházejí v nekrotrofy⁵.

Kyselina salicylová v rostlinách

SA je rostlinný hormon, který reguluje mnoho fyziologických procesů jako je klíčení semen, buněčný růst, dýchání, zavírání průduchů, senescenci, výnos plodů. Účastní se ale také odpovědi na abiotické stresové faktory a jak již bylo řečeno, je jednou z klíčových molekul regulujících reakci rostlin na infekci patogenními mikroorganismy. Působení kyseliny salicylové v některých uvedených procesech je dáno jejím efektem na jiné rostlinné hormony¹.

Při popisu zapojení SA v rostlinné signalizaci v reakci vůči biotickému stresu je klíčový rok 1979. White et al. (1979) popsali v krátkém článku propojení mezi SA a rezistencí tabáku vůči viru tabákové mozaiky (TMV)². Přelomovým se stal rok 1990, kdy byly ve stejném čísle časopisu *Science* publikovány dvě práce ukazující SA jako klíčovou komponentu systémově získané rezistence^{3,4} (SAR, Box 2).

Box 2. Systémově získaná rezistence (SAR)

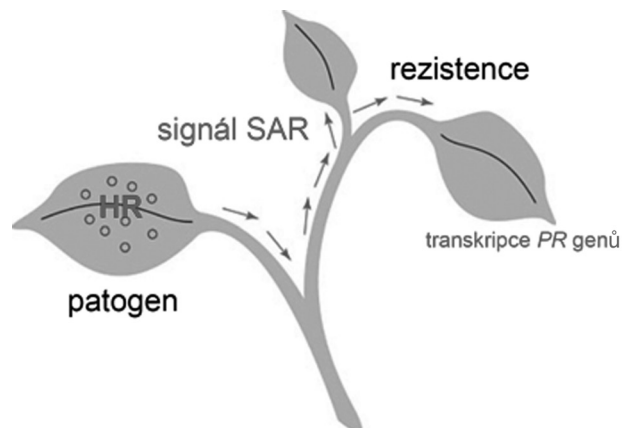
Systémově získaná rezistence je indukovaný imunitní mechanismus v rostlinách, kdy na rozdíl od obratlovců a jejich adaptivní imunity je SAR širokospektrá s žádnou specifitou v počáteční fázi infekce. SAR není spojena s programovanou buněčnou smrtí (PCD) naopak podporuje záchranu a přežití rostlinné buňky. Bylo popsáno, že jednou spuštěná SAR je schopná přetrvávat týdny či měsíce, dokonce současné poznatky ukazují, že by se tato indukce rezistence mohla přenášet i z generace na generaci (tzv. transgenerační imunitní paměť). Výsledkem SAR je produkce obranných PR (pathogenesis related) proteinů^{1, 6}. Jak v místě infekce, tak i v nenapadených částech rostliny.

SAR jako rostlinný fenomén ukazuje, že rostlina v jedné části napadená patogenem přenáší dosud neznámým mobilním signálem do jiných částí rostliny informaci o napadení. V těchto nenapadených částech rostlin se pak spouští obranné reakce, které vedou k tomu, že rostlin je více rezistentní k následnému napadení patogenem (Obr. 2). Při obranné odpovědi na napadení je SA zprostředkující molekulou speciálně v odpovědi na napadení biotrofními patogeny. Rostlina se obecně proti těmto druhům patogenů

brání tím, že v místě infekce dochází k hypersenzitivní reakci a k programované buněčné smrti⁵. Ovšem je třeba toto rozdělení brát s rezervou, neboť nic není černobílé a již byly publikovány studie ukazující zapojení SA i v reakci na nekrotrofní patogeny.

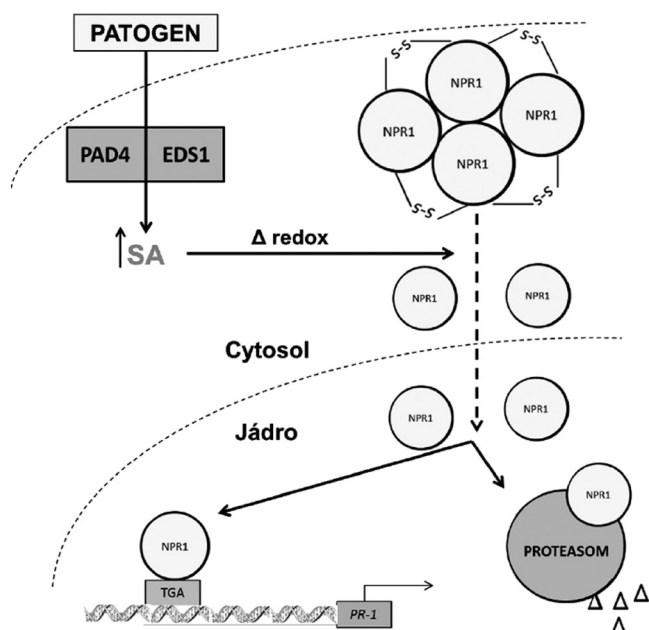
Vhled do signalizace zprostředkované kyselinou salicylovou

Po napadení patogenem dochází k tvorbě kom-



Obr. 2: Systémově získaná rezistence (SAR). HR – hypersenzitivní reakce, PR – „pathogenesis-related“.

plexu, který je zodpovědný za zvýšenou biosyntézu SA. Součástí tohoto komplexu jsou dvě komponenty: lipasa PAD4 (phytoalexin deficient 4) a EDS1 (enhanced disease susceptibility 1)¹. V roce 1994 byl popsán protein v signální dráze spouštěné SA, který byl nazván NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related 1)⁷. Tento protein byl uváděn jako klíčový pro transkripci genu *PR-1* (pathogenesis-related 1). *PR*-geny představují početnou skupinu rozdělenou do 17 podskupin.



Obr. 3: Molekulární signalizace SA. Zjednodušené schéma signalizace SA po napadení rostliny patogenem. SA – kyselina salicylová, NPR1 – nonexpressor of pathogenesis-related 1, PAD4 – phytoalexin-deficient 4, EDS1 – enhanced disease susceptibility 1, PR-1 – pathogenesis-related 1.

Kódují proteiny s antimikrobiálními účinky, jako jsou enzymy degradující buněčné stěny patogenů (glukanasy či chitinasy)⁸, defensiny, lipidy transportující proteiny a další. U mnoha z nich nebyla zatím jejich biologická aktivita vůbec zjištěna. NPR1 se vyskytuje v cytosolu rostlinné buňky jako oligomer. Ve chvíli, kdy dojde ke zvýšení hladiny SA v buňce, dochází k monomerizaci tohoto oligomeru (Obr. 3). Tento jev je připisován efektu SA na změnu redoxního potenciálu v buňce. Vzniklý monomer následně přechází do jádra, kde se akumuluje a indukuje transkripci *PR*-genů (jako hlavní markerový gen pro SA dráhu je používán *PR-1*). NPR1 není transkripčním faktorem, váže se dosud neznámým způsobem na TGA transkripční faktory. Hladina monomeru NPR1 v jádře je regulována jeho degradací proteasomem. Ovšem tato degradace neslouží pouze ke snížení množství NPR1 a tím k zeslabení obranné reakce ve chvíli, kdy k žádnému napadení nedošlo, ale zároveň je nezbytná a přispívá k efektivní obraně v době napadení, neboť pro indukci transkripce *PR-1* je vyžadován vždy „čerstvý“ monomer NPR1⁹ (Obr. 3).

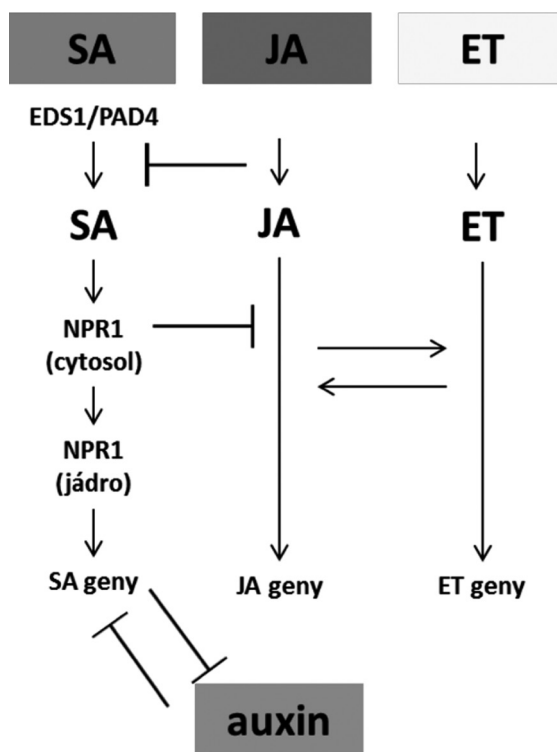
Ačkoliv u jiných významných fytohormonů (auxin, cytokininy, etylén, kyselina jasmonová) jsou známy receptory, na které se tyto hormony přímo váží, pro SA se ho dlouho nedařilo nalézt. Nejžhavějším kandidátem byl logicky ihned od svého objevení NPR1, avšak jeho afinita k SA nebyla prokázána. V roce 2012 byly jako možné receptory popsány proteiny homologní k NPR1, a sice NPR3 a NPR4. Fu a kol. (2012) popsali, že NPR3 a NPR4 vykazují různou vazebnou afinitu k SA a zároveň jsou schopny se vázat na NPR1 a buď ho stabilizovat, nebo je právě tato jejich vazba jakousi značkou pro následnou degradaci NPR1 proteasomem^{6,10}. Prakticky současně s publikací Fu a kol. (2012) bylo publikováno Wu a kol. (2012), že NPR1 váže SA a je jejím receptorem¹¹. Zajímavostí je, že tuto možnost Fu a kol. (2012) explicitně ve svém původním článku zamítají a přehledný článek Fu a Dong (2013) se o NPR1 a jeho vazbě k SA zmiňuje jen letmo. O tom, zda NPR1 je nebo není receptorem pro SA, proto stále panují pochybnosti.

Komunikace SA a dalších fytohormonů

Mezi fytohormony v rostlině při napadení patogenem nepanuje hrobové ticho, ba naopak, je to jako při kolektivním sportu, kdy dochází k významné komunikaci mezi hráči (Obr. 4). Díky ní mohou rostliny efektivně regulovat či posilovat odpověď na napadení a tedy svou obranu. Nejznámější „komunikace“ je popsána mezi signálními drahami SA a kyseliny jasmonové (JA).

Ve většině publikací je vztah mezi těmito fytohormony popisován jako antagonistický (Box 3), kdy odpověď skrze SA je připisována reakci na biotrofního patogena, zatímco JA je spojována s obranou proti nekrotrofním patogenům (Box 1)^{5,12}. Jednu z ústředních rolí v tomto „rozhovoru“ hraje cytosolický NPR1¹³. Ovšem Mur a kol. (2006) provedli podrobnou studii a ukázali, že antagonismus mezi JA a SA je velmi závislý na načasování a především na koncentraci, kdy při nižších koncentracích působí tyto dva fytohormony synergisticky¹⁴. Z toho vyplývá, že stejně jako u rozdělení patogenů na biotrofy a nekrotrofy není ani komunikace mezi SA a JA jednoznačná. Dále byl popsán antagonistický vztah mezi

SA a auxinem¹⁵, kdy zablokování auxinového receptoru zvyšuje odolnost vůči patogenům spojeným s SA a naopak ošetření auxinem působí, že rostliny jsou k patogenům náchylnější (Obr. 4).



Obr. 4: „Cross-talk“ mezi fytohormony. Zjednodušené schéma, které je upraveným schématem z Pieterse et al. 2009. SA – kyselina salicylová, JA – kyselina jasmonová, ET – etylén, NPR1 – nonexpressor of pathogenesis-related 1, PAD4 – phytoalexin-deficient 4, EDS1 – enhanced disease susceptibility 1, PR-1 – pathogenesis-related 1.

Box 3. SA x JA ↔ Aspirin x Prostaglandiny

Antagonismus mezi signalizací SA a JA v rostlinách ukazuje velkou podobnost s efektem acetylsalicylové kyseliny (aspirinu) na prostaglandiny v živočišných buňkách. Prostaglandiny jsou hormonálními posly přenášejícími informaci o bolestech, jsou strukturně podobné JA a hrají roli v reakci na zánětlivém

místě infekce nebo při poranění tkáně. Obojí, JA i prostaglandiny, jsou syntetizovány oxylipinovou biosyntetickou cestou z vícenenasycených mastných kyselin. V živočišných buňkách aspirin působí proti vzniku prostaglandinů za cílením na enzymovou aktivitu a genovou expresi cyklooxygenasy (COX, EC 1. 14. 99.1). Analogem COX v rostlinách pro tvorbu JA je allen oxid synthasa (AOS, EC 4. 2. 1.92). Nicméně žádný inhibiční efekt SA na AOS nebyl pozorován. Navíc antagonismus SA a JA působí v signalizaci až po AOS, což naznačuje, že mechanismus působení JA a SA v rámci reakce na napadení patogenem bude jiný než u interakce mezi aspirinem a prostaglandiny¹⁶.

Závěr

Kyselina salicylová není „pouze“ aspirin, i když i to samo o sobě by stačilo, aby si řekla o své místo na slunci. Je i velmi významnou sloučeninou pro život rostlin. Hraje podstatnou úlohu při signalizaci po napadení rostlin patogenem. Od nalezení souvislosti mezi SA a SAR bylo díky intenzivnímu výzkumu popsáno několik významných „hráčů“ v signalizaci SA. Mezi nimi hraje prim NPR1 protein, který se současně účastní i komunikace mezi SA a JA. Nejnovějším inspirativním objevem bylo popsání NPR3 a NPR4 proteinů jako receptorů pro vazbu SA, přičemž těmito dvěma proteinům byla přiřknuta významná role v regulaci dráhy závislé na NPR1 a v SAR. Avšak i přes tyto významné pokroky stále zůstává dost věcí neznámých. Jednou z takových je signální dráha SA nezávislá na NPR1.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P501/11/1654, z účelové podpory na specifický výsokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 21/ 2013) a z CZ.2.17/3. 1. 00/36021 Implementace nových metod ve výuce biochemie a forenzní analýzy.

Zkratky: SA – kyselina salicylová, JA – kyselina jasmonová, ET – etylén, SAR – systémová získaná rezistence, HR – hypersenzitivní reakce, PCD – programovaná buněčná smrt.

Literatura:

1. Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF.: *Ann. Rev. Phytopathol.* 47, 177 (2009).
2. White RF.: *Virology* 99, 410 (1979).
3. Metraux JP, Signer H, Ryals J, et al.: *Science* 250, 1004 (1990).
4. Malamy J, Carr JP, Klessig DF, et al.: *Science* 250, 1002 (1990).
5. Glazebrook J.: *Ann. Rev. Phytopathol.* 43, 205 (2005).
6. Fu ZQ, Dong X.: *Ann. Rev. Plant Biol.* 64, 839 (2013).
7. Cao H, Bowling SA, Gordon AS, et al.: *Plant Cell* 6, 1583 (1994).
8. Sels J, Mathys J, De Coninck BM, et al.: *Plant Phys. Biochem.* 46, 941 (2008).
9. Spoel SH, Mou Z, Tada Y, et al.: *Cell* 137, 860 (2009).
10. Fu ZQ, Yan S, Saleh A, et al.: *Nature* 486, 228 (2012).
11. Wu Y, Zhang D, Chu JY, et al.: *Cell Rep.* 1, 639 (2012).
12. Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, et al.: *Nat. Chem. Biol.* 5, 308 (2009).
13. Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, et al.: *Plant Cell* 15, 760 (2003).
14. Mur LA, Kenton P, Atzorn R, et al.: *Plant Physiol.* 140, 249 (2006).
15. Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, ACuller AH, et al.: *Curr. Biol.* 17, 1784 (2007).
16. Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, et al.: *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 28, 489 (2012).

Souhrn

Janda M., Valentová O.: Kyselina salicylová

Napadení zemědělsky významných rostlin patogeny patří mezi důležité faktory snižující jejich výnos. Jedním ze způsobů jak tomuto problému čelit, je pochopit molekulární mechanismy obranných reakcí rostlin při napadení a umět této znalosti využít. Při infekci rostlin patří mezi klíčové molekuly kyselina salicylová. Studium signální dráhy SA ukázalo, že tato látka je součástí systémově získané rezistence a že není pouze lineární drahou, ba naopak, že je velmi těsně provázána i s jinými fytohormonálními signálními drahami. V nedávné době byly konečně popsány receptory SA, kterými jsou proteiny NPR3 a NPR4. Zajímavostí je, že BTH (benzothiadiazol), funkční analog SA, je komerčně prodáván jako induktor rezistence rostlin vůči patogenům.

Klíčová slova: kyselina salicylová, systémově získaná rezistence, patogen, „cross-talk“

Summary

Janda M., Valentová O.: Salicylic acid

Infestation of crops by pathogens belongs among the major factors decreasing their yield. One way how to solve that problem is to understand the plant's defense against infection and be able to take advantage of this knowledge. Salicylic acid is a key molecule participating in the defense against infection. In the study of SA signalling pathway it was shown that SA is a part of systemic acquired resistance and that this is not only a linear path; on the contrary, SA signalling is very closely connected with the pathways mediated by other phytohormones. In the year 2012 NPR3 and NPR4 proteins were described as receptors for SA. Interestingly BTH (benzothiadiazole), functional analog of SA, is commercially used as the induktor which enhances the resistance plants toward pathogens.

Keywords: Salicylic acid, pathogens, NPR1, plant defence, resistance



OPERAČNÍ PROGRAM PRAHA
ADAPTABILITA



SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍ POTKAN JAKO MODEL LIDSKÝCH KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ A METABOLICKÉHO SYNDROMU

Petr Svoboda^{1,2}, Edita Křížová¹, Vojtěch Škop¹, Jarmila Zídková¹, Václav Zídek²

¹Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze;

²Fyziologický ústav Akademie věd České republiky v.v.i.; svoboda-petr@tiscali.cz

Úvod

Obezita, hypertenze, diabetes a poruchy metabolismu lipidů patří po celém světě k nejčastějším poruchám. Společně tvoří metabolický syndrom, který se stal jedním z hlavních zdravotních témat 21. století. Metabolický syndrom představuje soubor rizikových faktorů pro výskyt chorob kardiovaskulárního systému¹. Faktorem, který je zodpovědný za nárůst prevalence metabolického syndromu, je současný životní styl. Nedostatečná fyzická aktivita, nadměrný příjem kaloricky bohatých potravin, kouření a chronický stres jsou běžnou součástí dnešního života, což má negativní vliv na organismus².

Nejrozšířenějším zvířecím modelovým organismem esenciální hypertenze, který pomáhá objasnit příčiny vzniku chorob kardiovaskulárního systému, je spontánně hypertenzní potkan³. Jeho charakteristickým znakem je defekt transportu mastných kyselin s dlouhým řetězcem u adipocytů s následnou dyslipidemií a insulinovou rezistencí. Poruchy tak mohou vyústit v diabetes mellitus II. typu⁴. Díky typickým lidským příznakům, tj. abnormalitám v metabolismu sacharidů a lipidů, se spontánně hypertenzní potkan stal modelovým organismem pro metabolický syndrom^{3,4}.

Tento článek podává ucelené informace o fyziologických a patofyziologických příznacích spontánně hypertenzního potkana a o jeho použití jako zvířecího modelu kardiovaskulárních onemocnění.

Primární hypertenze

Odhady ukazují, že hypertenzí je postiženo až 85 % pacientů s metabolickým syndromem⁵, totéž platí o 40 – 80 % diabetiků I. i II. typu, u nichž může hypertenze způsobovat až 70 % veškerých zdravotních komplikací⁶. Vysoký krevní tlak (KT) je příčinou celé řady vážných onemocnění, jako jsou hypertrofie srdečního svalu, ateroskleróza, infarkt myokardu, trombóza nebo selhání ledvin. V mnoha případech je u pacientů se zvýšeným krevním tlakem příčina hypertenze multifaktoriální a není detailně objasněna. Taková hypertenze se nazývá primární nebo také esenciální^{1,3,7}.

Systolický KT během života lineárně stoupá a jeho hodnota po 50. roce života se stává kritickou. Jedná se o podstatné riziko vzniku onemocnění kardiovaskulárního systému (cardiovascular diseases, CVD) stoupající na dvojnásobek s každým nárůstem KT o 20/10 mm Hg, počítáno od počáteční hodnoty 115/75 mm Hg⁸.

Napětí hladké svaloviny v cévní stěně podléhá nejen regulaci na úrovni sympatického nervového systému, ale i vlivu buněk endothelu (EB), které tak netvoří pouhou bariéru mezi krví a cévní stěnou. K místní regulaci průsvitu cév dochází na základě interakce vazoaktivních látek s receptory na povrchu EB⁹. Vysokými nároky na prokrvení se vyznačují ledviny, zvláště díky značné energetické potřebě pokrývající filtraci a transport látek z primární moči do krve. Nutnost stability filtračního tlaku a průtoku krve proto ledviny úzce spojuje s regulací arteriálního KT prostřednictvím vazodilatace a vazokonstrikce¹⁰.

S obezitou a abnormálním hromaděním viscerální tukové tkáně je spojena vyšší senzitivita centrálních chemoreceptorů a porušení baroreceptorového reflexu. Kromě toho se vyskytuje zvýšená hladina leptinu, angiotensinu II, insulinu, volných (neesterifikovaných) mastných kyselin (free fatty acids, FFA) a snížená produkce oxidu dusnatého (NO). Leptin způsobuje zvýšenou aktivitu sympatického nervového systému a renin-angiotensin-aldosteronového systému (RAAS). Angiotensin II také stimuluje aktivaci RAAS. Insulin, RAAS a vysoká aktivita sympatického nervového systému ovlivňují zpětnou resorpci sodíku a vody v ledvinách¹¹. Předpokládá se, že právě dysregulace ve filtraci a vylučování solí a vody v renálních tubulech ledvin, by mohla být nejzávažnější příčinou esenciální hypertenze^{7,11}.

Jiná teorie je založena na předpokladu, že sympatický nervový systém je aktivován insulinem a leptinem. Při hyperinsulinemii pak dochází ke zvýšení srdeční výdeje, urychlení srdeční frekvence a zvýšení kontraktility myokardu^{12,13}.

Odlišnou možností pro vznik hypertenze u osob s hyperinsulinemii je snížená schopnost vazodilatace v důsledku nedostatečné produkce NO. Příčinou procesu je zvýšená hladina FFA (vyskytující se u obezity a hyperinsulinemie) inhibující endotheliální syntézu NO. Následně dochází k vazokonstrikci a zhoršené funkci endothelu^{1,11}.

Ledviny pacientů s esenciální hypertenzí nejsou zpravidla schopny vyloučit odpovídající množství vody a soli při normálně vysokém krevním tlaku. Proměnlivost KT je rovněž podmíněna řadou faktorů prostředí, demografickými faktory (ekonomickými podmínkami a celkovým způsobem života) a do značné míry i geneticky⁷. Genetické studie ukázaly, že normální úroveň KT je podmíněna mnoha geny malého účinku. Podobně je podmíněna i esenciální hypertenze³.

Laboratorní potkan

Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) byl první savčí druh domestikovaný pro vědecký výzkum. První využití potkana v experimentu se uvádí přibližně v polovině 19. století¹⁴. Během téměř 200 let se stal primárním pokusným zvířecím modelem pro biomedicínský, biochemický, neurobiologický, fyziologický a farmakologický výzkum^{15,16,17}. Laboratorní potkan má pro svoji dostupnost klíčovou roli v interpretaci savčího genomu. Výhodné je jeho užití v genové identifikaci nemocí a tvorbě transgenických jedinců opět s možností využití v mapování genů. Transgenické kmeny jsou vhodné pro

studium vzájemné interakce mezi genetickými faktory a vlivy vnějšího prostředí^{16,18}.

Mezi nejčastěji používaná experimentální zvířata pro výzkum hypertenze patří dva inbrední kmeny laboratorních potkanů. Kmen spontánně hypertenzního potkana a Dahlův kmen SS (salt-sensitive), který je citlivý na sůl v potravě a reaguje na ni zvýšením KT. Byly vyšlechtěny i další kmeny jako například lyonský, milánský nebo pražský. Všechny tyto kmeny byly získány z původně nehomogenních populací potkanů soustavou, řadu generací trvající selekcí jedinců s nejvyšším KT. Pomocí příbuzenského křížení byl vysoký KT zafixován. Po 20 a více generacích sourozeneckého páření se kmeny staly inbredními. Současně s hypertenzními modely byly vytvořeny i normotenzní kontrolní kmeny, z nichž nejznámější jsou kmeny Brown Norway a Wistar Kyoto¹⁹.

Spontánně hypertenzní potkan

Spontánně hypertenzní potkan (spontaneously hypertensive rat, SHR) je zvířecí model lidské esenciální hypertenze a je široce používán ke studiu CVD. Stejně jako u lidí, vzrůstá u tohoto kmene KT s věkem. Příčina hypertenze není přesně známa²⁰.

Kmen SHR byl získán v 60. letech 20. století v japonském městě Kjóto pářením hypertenzního samce a samice z outbredního kmene Wistar. Rozhodujícím kritériem pro výběr jedinců byla hypertenze trvající nejméně po dobu jednoho měsíce a hodnota systolického KT přesahující 150 mm Hg^{21,22}. Rozvoj hypertenze u kmene SHR nastává přibližně mezi 5. a 6. týdnem života. U dospělého jedince může hodnota systolického KT dosahovat 180 až 200 mm Hg^{20,21,22,23}. Mezi 40. a 50. týdnem se přidávají renální dysfunkce a poruchy kardiovaskulárního systému jako je srdeční selhání a hypertrofie srdce a cév. Na druhou stranu SHR nevykazují sklon k cévní mozkové příhodě, ateroskleróze nebo trombóze^{20,23}.

Prvním faktorem podezřelým z patofyziologie vysokého KT u SHR je porucha na úrovni ledvin, podobně jako tomu je u hypertenze lidské. V případě transplantace ledviny od dárce SHR do normotenzního potkana WKY dochází k přenosu vysokého krevního tlaku na příjemce. Opačná transplantace z WKY na SHR normalizuje krevní tlak u hypertenzního příjemce. Tyto poznatky naznačují, že hlavní úlohu v patogenezi primární hypertenze u kmene SHR mají ledviny. Genetické rysy ledvin dárce v souvislosti s genetickou predispozicí hypertenze významně ovlivňují KT. Zajímavým faktem také je, že ledviny z kmene SHR vykazují schopnost adaptovat se a kompenzovat určité změny. Ledviny transplantované z SHR do hypertenzního příjemce se přizpůsobují vysokému krevnímu tlaku a zachovávají si své strukturální vlastnosti lépe, než ledviny přenesené od normotenzních potkanů WKY^{23,24}.

Potkani kmene SHR mají nejenom vysoký KT, ale i řadu abnormalit v metabolismu lipidů a sacharidů. Z analýz vazeb genů rekombinantních inbredních kmenů odvozených z kmene SHR a normotenzního kmene Brown Norway vyplynulo, že se geny odpovědné za zmíněné poruchy nacházejí v téže oblasti 4. chromozomu. To vedlo k hypotéze, že za všechny uvedené

abnormality je odpovědný jediný gen. Hypotéza byla následně experimentálně potvrzena studiem kongenního kmene SHR4, který je s kmenem SHR geneticky identický až na jeden úsek 4. chromozomu. Tento úsek byl na genetické pozadí SHR přenesen z kmene Brown Norway. Vzniklý kongenní kmen SHR-4 má ve srovnání s rodičovským kmenem SHR nižší KT, nižší hladiny sérových triacylglycerolů, mastných kyselin a sníženou insulinovou rezistenci. Díky tomu, že se kmeny SHR a SHR-4 liší jen v jediném úseku 4. chromozomu, poskytují rozdíly mezi nimi důkaz pro přítomnost onoho odpovědného genu^{25,26,27}.

K identifikaci předpokládaného genu na 4. chromozomu nakonec přispěly cDNA biočipy, které umožnily porovnat expresi genů v tukové tkáni obou kmenů (spontánně hypertenzního i kongenního). Pozorost vzbudil gen kódující protein CD36, který vykazoval u rodičovského kmene SHR významně snížený (o více než 90 %) hybridizační signál ve srovnání s normotenzním kmenem Brown Norway nebo kongenním kmenem SHR-4. Z výsledků vyplývá, že gen CD36 je jedním z genů velkého účinku podmiňujících poruchy sacharidového a lipidového metabolismu^{3,25,26}.

Spontánně hypertenzní potkan – náchylný k cévní mozkové příhodě

Hypertenze je hlavním rizikovým faktorem pro cévní mozkovou příhodu (CMP). V dnešní době není neobvyklé, že lidé mladší 40 let mají vysokou pravděpodobnost vzniku CMP. Tato pravděpodobnost se zvyšuje s věkem. Výrazný nárůst je pozorovatelný po 65. roce života²². V roce 1971 byl získán kmen spontánně hypertenzního potkana-náchylného k cévní mozkové příhodě (spontaneously hypertensive rat – stroke prone, SHR-SP). Selektivním pářením potkana z kmene SHR s potkanem se spontánní CMP byl připraven kmen SHR-SP s pozitivní korelací mezi výskytem mozkových lézí a KT²⁸. Vzhledem k tomu, že je velmi výrazná odlišnost mezi potkany kmene SHR-SP a SHR, je SHR-SP označován jako podkmen SHR²³.

Potkani SHR-SP jsou od 5. týdne hypertenzní, u samců dosahuje systolický KT minimálně hodnoty 250 mm Hg. Podávání soli v dietě způsobuje u potkanů zrychlený vývoj hypertenze a výskyt CMP^{22,28,29}. Mezi počáteční příznaky CMP patří vzrušení, podráždění, následující behaviorální a psychologické deprese, poruchy pohybu, apatie, kóma a smrt. Po smrti jsou vždy nalezeny léze a trombóza v kůře koncového mozku v laloku čelním, týlním a temenním²⁸. Vzhledem k podobnosti s lidskými lézemi, je SHR-SP používán k vývoji účinné prevence a léčebných režimů CMP a srdeční hypertrofie v důsledku závažné hypertenze²². Dále bylo zjištěno, že ledviny SHR jsou daleko méně poškozeny než u SHR-SP²⁹. Nicméně SHR-SP se dožívá velmi nízkého věku (52-64 týdnů, v případě stravy se solí pouze 14 – 20 týdnů), na rozdíl od SHR (2 roky) a WKY (3 roky)²².

Wistar Kyoto

Wistar Kyoto (WKY) představuje albinotický normotenzní kmen laboratorního potkana. Je velmi často využíván jako kontrolní kmen k SHR ve studiích zabývajících se hypertenzí a metabolickým syndromem^{22,30,31}.

Inbrední kmen WKY byl připraven sestersko-bratrským křížením outbredního kmene Wistar až v roce 1971, jako normotenzní kmen v japonském městě Kjóto. Komerční distribuce je zajišťována ve Spojených státech amerických Národním institutem zdraví (National Institutes of Health, NIH)³¹.

Použití WKY jako kontrolního kmene k SHR je založeno na předpokladu, že je WKY plně inbrední kmen. Ukázalo se však, že NIH uvolnilo WKY k chovu ještě předtím, než byl kmen plně inbrední. Kmen SHR byl uvolněn po 20 generacích křížení. Kmen WKY byl pravděpodobně uvolněn již po 6. generaci páření. Vzhledem k tomu může být biologická variabilita WKY mnohem větší než u SHR³¹.

Mnoho desetiletí řada vědců při studiu patogeneze hypertenze porovnává kmen SHR s jeho normotenzní kontrolou WKY. Pokud by hypertenzní kmen byl totožný s kontrolním kmenem ve všech genech, s výjimkou genů k regulaci krevního tlaku, bylo by porovnání mezi kmeny přínosnější. Nicméně míra genetické podobnosti nebo odlišnosti mezi SHR a WKY nebyla nikdy jasně definována³². V posledních letech bylo zjištěno, že ačkoliv mají kmeny stejný původ, je jejich genetická odlišnost srovnatelná v maximálním rozdílu jako u nepříbuzných lidí³³. Někteří autoři to přisuzují širokému rozpětí (10 let) mezi získáním kmene SHR a WKY³⁴. Tyto poznatky mnohdy naznačují, že významné patofyziologické rozdíly mezi SHR a WKY mohou být způsobeny biologickou variabilitou WKY³¹. I proto má hodnota systolického KT u dospělých jedince široký rozsah, a to mezi 120 až 150 mm Hg^{31,35,36}.

Vzhledem k tomu, že jsou SHR a WKY odvozeny ze stejného outbredního kmene Wistar, je možné, že se může spontánně projevit hypertenze u WKY, protože WKY a SHR mohou společně sdílet geny odpovědné za hypertenzi. Proto se nabízí také otázka, zda je při studiu vzniku patogeneze esenciální hypertenze vhodné a přínosné srovnávat kmeny SHR a WKY^{22,34}.

Závěr

Onemocnění kardiovaskulárního systému jsou jednou z hlavních příčin úmrtí na světě. Použití vhodných modelů pro lidská kardiovaskulární onemocnění může poskytnout užitečné informace o vzniku, progresi onemocnění a také o potenciálních léčebných postupech. Nejčastější poruchy asociované s lidskou kardiovaskulární soustavou jsou vysoký krevní tlak, srdeční selhání a cévní mozková příhoda.

K dispozici je široká paleta zvířecích modelů, které napodobují příslušné lidské onemocnění. Nejrozšířenějším zvířecím modelovým organismem spontánní hypertenze, který pomáhá objasnit příčiny vzniku chorob kardiovaskulárního systému, je spontánně hypertenzní potkan a jeho normotenzní kontrola Wistar Kyoto.

Vyšlechtění potkanů SHR je důležitý mezník ve výzkumu esenciální hypertenze. Nicméně použití SHR a WKY má řadu nedostatků, které tento článek nastiňuje, a které dříve nebyly zřejmé. Za uvolněním WKY předtím, než byl kmen plně inbrední, je možné nalézt naléhavou potřebu vlastnit geneticky příbuzný normotenzní kontrolní kmen. K SHR by bylo v ideálním případě vhodné připravit několik inbredních kmenů: normotenzní, který není

geneticky příbuzný s SHR; geneticky příbuzný k SHR s nízkým krevním tlakem a nejlepší variantou je normotenzní geneticky příbuzný k SHR, který se liší pouze v genech pro hypertenzi. Bohužel žádný zvířecí model není ideální a my nežijeme v ideálním světě.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory grantů GAČR 13-04580S, IAA600110902, dále byla financována z účelo-

vé podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2013).

Podpořeno CZ.2.17/3. 1. 00/36021 Implementace nových metod ve výuce biochemie a forenzní analýzy.

Evropský sociální fond

Praha a EU – Investujeme do vaší budoucnosti

Literatura:

1. Svačina Š, et al. (2006): Metabolický syndrom, 3.vyd., TRITON, Praha, Česká republika.
2. Zimmet P, Alberti KGMM, Serrano Ríos M: Rev. Esp. Cardiol. 58, 1371-1376, 2005.
3. Kontrová K, Zídková J, Palečková P, Sajdok J: Chem. listy 100, 17 (2006).
4. Gautam S, Banerjee M: Mol Genet Metab. 102, 389 (2011).
5. Duvnjak L, Bulum T, Metelko Ž: Diabetol. Croat. 37, 83 (2008).
6. Olšovský J: Interní med. 3, 102 (2002).
7. Pravenec M: Vesmír 77, 515 (1998).
8. Bakris GL: J. Manag. Care Pharm. 13, S3 (2007).
9. Púzerová A, Kopincová J, Bernátová I: Cesk. Fysiol. 57, 2 (2008).
10. Ševela K: Kardioforum 4, 30 (2006).
11. Masopust J: Labor Aktuell 2, 4 (2006).
12. Pelikánová T: Postgraduální medicína 4, 7 (2002).
13. Bartoš V, Pelikánová T (2000): Praktická diabetologie. 2, Maxdorf Jessenius, Praha, Česká Republika.
14. Lindsey JR (1979): Historical foundations in the laboratory rat. In: The laboratory rat (ed. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH), 1-36, Academic press, New York, NY, USA.
15. Jacob HJ: Genome Res. 9,1013 (1999).
16. Jacob HJ, Brown DM, Bunker RK, et al.: Nat Genet. 9, 63 (1995).
17. Steen RG, Kejtek-Black AE, Glenn C, et al.: Genome Res. 9, AP1 (1999).
18. Lazar J, Moreno C, Jakob HJ, Kejtek AE: Genome Res. 15, 1717 (2005).
19. Krylov V, Pravenec M: Vesmír 74, 485 (1995).
20. Pinto YM, Paul M, Ganten D: Cardiovasc. Res. 39, 77 (1998).
21. Okamoto K, Aoki K: Jpn. Circ. J. 27, 282 (1963).
22. Doggrell SA, Brown L: Cardiovasc. Res. 39, 89 (1998).
23. Kundu S, Rao JP: Al Ameen J. Med. Sci. 1, 65 (2008).
24. Rettig R: J. Hum. Hypertens. 7, 177 (1993).
25. Aitman TJ, Pravenec M, Křen V et al.: Nature gen. 21, 76 (1999).
26. Pravenec M: Vesmír 78, 555 (1999).
27. Ganten D: Hypertens 9, (suppl 1) 1 (1987).
28. Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka A: Circ. Res. 34/35 (Suppl. 1),143 (1974).
29. Churchill PC, Churchill MC, Griffin KA, et al.: Kidney Int. 61, 1794 (2002).
30. Kurtz TW, Montano M, Chan L, et al.: Hypertension 13, 188 (1989).
31. Kurtz TW, Morris RC Jr: Hypertension 10, 127 (1987).
32. St Lezin E, Simonet L, Pravenec M, et al.: Hypertension 19, 419 (1992).
33. Johnson ML, Ely DL, Turner ME: Hypertension 19, 425 (1992).
34. Louis WJ, Howes LG: J. Cardiovasc. Pharmacol. 16 (Suppl. 7), S1 (1990).
35. Henry R, Casto R, Printz MP: Hypertension 16, 422 (1990).
36. Maris ME, Melchert RB, Joseph J: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 32, 35 (2005).

Souhrn

Svoboda P., Křížová E., Škop V., Zídková J., Zídek V.: Spontánně hypertenzní potkan jako model lidských kardiovaskulárních onemocnění a metabolického syndromu

Skutečným problémem přelomu druhého a třetího tisíciletí, vybírajícím si stále rostoucí počet obětí, je skupina zdravotních poruch zahrnující diabetes mellitus II. typu, dyslipidemii, hypertenzi a obezitu. Jedná se o rizikové faktory pro výskyt chorob kardiovaskulárního systému, souhrnně nazývané metabolický syndrom. Nejrozšířenějším zvířecím modelovým organismem, který pomáhá objasnit příčiny vzniku metabolického syndromu, spontánní hypertenze a chorob kardiovaskulárního systému je spontánně hypertenzní potkan a jeho normotenzní kontrolní kmen Wistar Kyoto. Nicméně použití potkanů kmene Wistar Kyoto a spontánně hypertenzního potkana má řadu nedostatků, které dříve nebyly zřejmé.

Klíčová slova: metabolický syndrom, kardiovaskulární onemocnění, hypertenze, spontánně hypertenzní potkan, Wistar Kyoto

Summary

Svoboda P., Křížová E., Škop V., Zídková J., Zídek V.: The spontaneously hypertensive rat as a model of human cardiovascular diseases and metabolic syndrome

The real problem of the turn of the third millennium, withdrawing a growing number of victims, is a group of health disorders including type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, hypertension and obesity. These risk factors for cardiovascular diseases are known as a metabolic syndrome. Most widely used animal model organism, which helps to clarify the causes of the metabolic syndrome, spontaneous hypertension and cardiovascular diseases is the spontaneously hypertensive rat and its normotensive control Wistar Kyoto. However, the use Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rat has a number of imperfections that were not previously known.

Keywords: metabolic syndrome, cardiovascular diseases, hypertension, spontaneously hypertensive rat, Wistar Kyoto

STANOVENÍ TERMOTOLERANTNÍCH *Campylobacter* spp. POMOCÍ qPCR

Lucie Vondráková, Jarmila Pazlarová, Kateřina Demnerová

VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie,
vondrakl@vscht.cz

Historický vývoj a taxonomie *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. byl od počátku dvacátého století, kdy byl poprvé izolován, považován za příčinu vzniku veterinárních onemocnění, ke kterým patřily například průjem, či infekční potraty u skotu a ovcí. Spojitost s lidskými krevními kulturami byla před rokem 1950 ještě poměrně vzácná, a proto byl označen jen za oportunistického lidského patogena schopného vyvolat onemocnění pouze u oslabených osob. Nicméně s rozvojem sofistikovanějších technik kultivace a detekce bylo prokázáno, že jeho schopnost infikovat lidského hostitele je mnohem vyšší, než se předpokládalo¹⁻³.

První zevrubnou identifikaci provedli veterinární chirurgové McFayden a Stockman v roce 1913 v souvislosti s potraty u ovcí, kdy zveřejnili objev neznámé bakterie často izolované z uhynulých plodů. Opravdu průkazné testy však byly provedeny až Smithem v roce 1918, který nezávisle na nich izoloval totožný mikroorganismus z uhynulých plodů hovězího dobytka. Bakterie byla původně kvůli tvaru zakřivené tyčinky přiřazena k rodu *Vibrio* a Smithem nazvána *Vibrio fetus*. Roku 1947 byla prokázána její patogenita i pro člověka, když byla tato izolována Vinzentem a spol. z krve těhotných žen, které trpěly dlouhodobým horečnatým onemocněním a následně spontánně potratily^{1,4,5}.

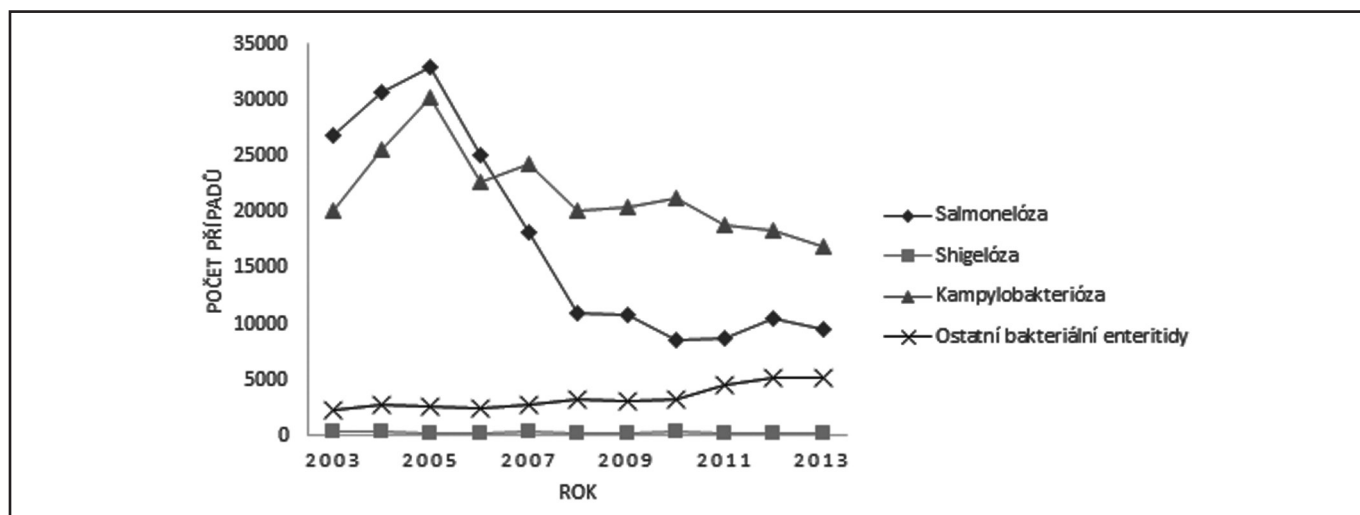
V roce 1957 navrhla Elizabeth King na základě rozborů izolátů krve pacientů rozlišení dvou skupin tohoto mikroorganismu podle odlišných optimálních teplot růstu. První ze skupin odpovídala typickému

V. fetus. Druhá, termotolerantní skupina, měla optimální teplotu růstu kolem 42 °C a pocházela z pacientů trpících průjmy. V roce 1963 pak byla druhá skupina pány Sebaldem a Véronem překlasifikována na nově vytvořený rod *Campylobacter*. Dalšími důvody byla i odlišnost některých biochemických vlastností (např. neschopnost fermentace sacharidů) a dále rozdíly v obsahu G/C basí od rodu *Vibrio* spp.^{2,5-7}.

Práce E. King byla později, roku 1972, potvrzena Dekeyserem a Butzlerem, kteří také jako první sepsali postup izolace termotolerantních kampylobakterů i ze vzorků stolice, a to za použití diferenciální filtrace fekální suspenze přes 0,65 µm filtr. Tato metoda byla dále vylepšena Skirrowem, jenž popsal přímou techniku kultivace v mikroaerofilní atmosféře (5% O₂, 10% CO₂ a 85% N₂) na krevním agaru obsahujícím vancomycin, polymyxin a trimethoprim^{2,6}.

Současný stav

V současné době spadá rod *Campylobacter* do ε – podtřídy proteobakterií a zahrnuje celkem 27 druhů. Termotolerantní druhy (zejména *C. jejuni* a *C. coli*; v menší míře též *C. lari* a ojedinělých případech i *C. upsaliensis*) jsou významnými patogeny, které u lidí způsobují vážné alimentární onemocnění střevního traktu s průjemovým charakterem zvané kampylobakteriáza. Četnost výskytu tohoto onemocnění v České republice zhruba od roku 2007 převyšuje výskyt obdobné střevní infekce bakteriálního původu – salmonelózy (Obr. 1). Nicméně tento stoupající trend je evidován prakticky ve všech vyspělých zemích^{1,3,8}.



Obr. 1: Výskyt bakteriálních střevních infekcí v ČR v letech 2003-2013.

Přirozeným rezervoárem termotolerantních kampylobakterů je zažívací trakt domestikovaných i divoce žijících teplokrevných zvířat. Odtud se bakterie mohou šířit dál do potravinového řetězce a způsobit danou infekci. Nejčastější příčinou vzniku kampylobakterií u lidí je požití nedostatečně tepelně upraveného kuřecího (*C. jejuni*) resp. vepřového (*C. coli*) masa. Samozřejmě však existují i další známé zdroje nákazy (např. přímý kontakt s domácími mazlíčky – nejčastěji štěňata, či hospodářskými zvířaty, dále environmentální i pitná voda, syrové mléko, mořské plody, různé druhy ovoce apod.)⁴⁻⁶.

Klinické projevy onemocnění (horečka, bolest břicha a hlavy, nevolnost, akutní průjem, svalová či celková slabost) většinou sami od sebe zhruba do týdne odezní, aniž by bylo nutné zahájit antibiotickou léčbu. Tato je indikována pouze u vleklého onemocnění, u těhotných žen, HIV pozitivních, či jinak imunodeficientních osob. Známým faktem je možnost rozvoje tzv. post-infekčních onemocnění, mezi které patří například reaktivní artritida (ReA), kopřivka či záněty podkoží. Nicméně nejzávažnějšími post-infekčními komplikacemi, spojovanými především s nákazou *C. jejuni*, jsou Guillain – Barrého (GBS) a Miller – Fisherův (MFS) syndrom. V obou případech se jedná o zánětlivé autoimunitní onemocnění postihující periferní nervový systém. Jelikož je na buněčné stěně *C. jejuni* exprimován lipooligosacharid strukturně podobný gangliosidům periferních nervů, je zde uplatňován mechanismus molekulárních mimiker, tedy zkřížené imunitní reakce^{4,6,9-12}.

Stanovení termotolerantních *Campylobacter* spp.

Alimentární infekce způsobené potravinovými patogeny obecně představují nezanedbatelnou hrozbu veřejného zdraví. Z tohoto vyplývá, že dostupnost metod rychlé spolehlivé detekce, identifikace a kvantifikace, zejména v potravinářském a zemědělském průmyslu, je bezesporu aktuální otázkou dne. Standardizované ISO metody používané pro kontrolu potravin běžně spočívají v selektivním pomnožení hledaných mikroorganismů následovaném izolací a biochemickou, fenotypovou, či sérologickou identifikací. Ačkoli výše uvedené techniky založené na kultivaci vykazují relativně vysoký stupeň specifity, jejich velkým nedostatkem zůstává především časová náročnost¹³⁻¹⁶.

V případě termotolerantních *Campylobacter* spp. může být využití kultivačních metod poněkud problematické a celková doba potřebná pro zjištění těchto konkrétních bakterií velmi dlouhá (7 – 10 dní). Toto je dáno především nadstandardními požadavky pro růst (mikroaerofilní atmosféra, inkubace při 42°C, kultivace po dobu minimálně 48 hodin, obecná neochota k růstu v laboratorních podmínkách). K dalším komplikacím dochází, je-li požadavek na určení jednotlivých druhů, a to zejména kvůli velmi nízké biochemické aktivitě, a tudíž i omezenému výběru biochemických testů, které mohou být pro druhovou identifikaci využity. Jediným testem odlišujícím *C. jejuni* od *C. coli* je schopnost prvního zmíněného hydrolyzovat kyselinu hippurovou. V současné době jsou často evidovány kmeny

C. jejuni, které nejsou schopny v laboratorních podmínkách hippurát hydrolyzovat¹⁷⁻¹⁹. Dále jedinou možností jak dle normy odlišit *C. lari*, je jeho přirozená rezistence k antibiotiku kyselině nalidixové. Nicméně zvyšující se počet rezistentních *C. jejuni* a *C. coli* k tomuto antibiotiku, či naopak výskyt senzitivních kmenů *C. lari* k tomuto antibiotiku představuje riziko nepřesné identifikace^{16,20}.

V případě kvantifikace pomocí ISO je nutné brát v potaz dvě skutečnosti. V první řadě, jak již bylo zmíněno výše, pomnožení je zde nedílnou součástí a tudíž se jedná pouze o kvantifikaci relativní a není možné zjistit absolutní počet mikroorganismů v původním vzorku. Velký problém též vyvstává v nemožnosti pomocí kultivačních metod zjistit přítomnost tzv. živých, ale nekultivovatelných bakterií (VBNC – viable but non-culturable). Speciálně u *C. jejuni* byla zjištěna schopnost přecházet do tohoto stavu v případě hladovění, poškození buňky, či jiného stresu. Z hlediska mikrobiálních infekcí, není tento jev ještě zcela prozkoumán, a proto je předpokládána schopnost regenerace bakterie do původního stavu, dostane-li se tato do příznivých podmínek. Pro stanovení rizika je tedy nutné brát ohled i na buňky nacházející se ve stavu VBNC²¹⁻²³.

Praktickým řešením výše popsaných nedostatků spojených s postupy založenými na klasické kultivaci a jejich vhodnou alternativou jsou rozličné molekulárně-genetické techniky. Mezi jejich hlavní výhody obecně patří vysoký stupeň specifity, senzitivity a krátká doba nutná k provedení analýzy. Nejběžnější metodou sloužící nejen k rychlé detekci různých organismů je tzv. polymerázová řetězová reakce (PCR). Jedná se o enzymovou metodu založenou na opakované amplifikaci konkrétního úseku nukleové kyseliny vymezeného specifickými oligonukleotidy (primery). Výběr cílové sekvence je velmi významným parametrem určujícím míru specifity reakce, kterou sami definujeme. Je-li požadavek určení bakterie pouze na úroveň rodu, používají se primery komplementární k oblastem kódujícím vysoce konzervované sekvence (např. gen kódující 16S rRNA), naopak je-li žádoucí určit jednotlivé druhy, využívají se primery komplementární k úsekům kódujícím druhově specifické geny (enzymy pro utilizaci konkrétního substrátu, faktory virulence apod.). Další nespornou výhodou je možnost provedení PCR ve formě multiplexu, tzn. simultánní detekce několika cílů (např. různých genů jednoho, či několika druhů) během jedné reakce. V tomto případě je však nezbytné důkladně optimalizovat reakční protokol, zajistit vzájemnou kompatibilitu reagensů a zabránit kompetici jednotlivých komponent.

V případě identifikace *C. jejuni* bývá typickým cílem amplifikace gen *hipO* kódující enzym hippurikasu, jehož aktivita je využívána i při identifikaci pomocí ISO (viz výše). Méně často bývají detekovány i geny kódující membránový protein (*mapA*), porin (*omp50*), flagelin (*flaA*) apod. V případě *C. coli* je nejčastějším cílem gen pro serinhydroxymethyl transferasu (*glyA*) a vnější membránový protein (*cadF*). U *C. lari* pak gen kódující peptidazu T (*pepT*). I v případě multiplexové PCR je možné využít genu kódujícího totožný produkt u všech druhů, avšak pouze za předpokladu sekvenční

odlišnosti kdy je možné navrhnout druhově specifické primery, přičemž výsledný produkt má odlišnou délku i sekvenci, a je tudíž odlišitelný od ostatních (např. gen *lpxA* pro lipid A, či *cdt* geny kódující jednotlivé podjednotky cytotoxinu)^{20,24-32}.

Klasická PCR s koncovým vyhodnocením pomocí gelové elektroforézy je používána primárně k detekci či identifikaci, nikoli však ke kvantifikaci bakterií. K tomuto účelu je možné využít tzv. kvantitativní real-time PCR (qPCR), kdy je možné pozorovat přírůstek amplifikovaného produktu v reálném čase, tzn. v průběhu reakce. Existuje několik možností, jak aktuální množství vznikajícího produktu monitorovat, v každém případě je však využíván určitý fluorescenční marker v reakční směsi, který se váže na DNA (interkalační barvivo SYBR Green I, fluorescenčně značené hydrolyzační sondy, hybridizační sondy, značené primery apod.). Konečným porovnáním s definovanými standardními křivkami je následně možné určit počáteční množství bakterií v původním vzorku³³.

V průběhu několika posledních let již bylo publikováno několik studií využívajících metodiku real-time PCR pro stanovení termotolerantních *Campylobacter* spp.³⁴⁻⁴² Nicméně pouze velmi málo z nich bylo prove-

deno ve formě kvantitativní multiplexové PCR, a žádná z nich doposud zcela nesplňovala nároky naší laboratoře. Z tohoto důvodu byl navržen protokol multiplexové qPCR pro simultánní detekci, identifikaci a kvantifikaci všech tří hlavních termotolerantních *Campylobacter* spp. bez nutnosti předchozího pomnožovacího kroku. Na základě analýz *in silico* byly zvoleny primery komplementární k úsekům kódujícím geny pro hipurikasu *C. jejuni*, hydroxymethyl transferasu *C. coli* a peptidasu *T. C. lari*. S ohledem k amplifikované sekvenci byly zvoleny příslušné fluorescenčně značené hydrolyzační sondy, čímž bylo umožněno provedení reakce v multiplexu. Limity detekce byly ve všech případech nižší než 10 genomových kopií (KTJ ekvivalent) na reakci a hodnoty efektivit se pohybovaly v rozmezí 91 – 97%. Samozřejmostí bylo ověření funkčnosti protokolu na komplexních maticích potravinových vzorků (kuřecí oplachy).

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický výsokoškolský výzkum (MŠMT č.21/2013). Podpořeno CZ.2.17/3. 1. 00/36021 Implementace nových metod ve výuce biochemie a forenzní analýzy.

Literatura:

1. EFSA: European Food Safety Authority. (2013)
2. Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, et al.: *Vet. Res.* 36, 351 (2005).
3. NIPH: The National Institute of Public Health. (2013), staženo 17. ledna 2014.
4. Ketley JM: *Microbiology-Uk.* 143, 5 (1997).
5. Penner JL: *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 157 (1988).
6. Butzler JP: *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 868 (2004).
7. Veron M, Chatelain R: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 122 (1973).
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=194>, staženo 31. ledna 2014
9. Godschalk PCR, Bergman MP, Gorkink RFJ, et al.: *BMC Microbiol.* 6 (2006).
10. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M: *Int. J. Food. Microbiol.* 117, 237 (2007).
11. Allos BM: *Clin. Infect., Dis.* 32, 1201 (2001).
12. Wassenaar TM, Blaser MJ: *Microb. Infect.* 1, 1023 (1999).
13. Fukushima H, Katsube K, Hata Y, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 92 (2007).
14. He YP, Yao XM, Gunther NW, et al.: *Food Anal. Methods.* 3, 321 (2010).
15. Malorny B, Tassios PT, Radstrom P, et al.: *Int. J. Food Microbiol.* 83, 39 (2003).
16. Anonymous: International organization for standardization. ISO 10272 (2006).
17. Rautelin H, Jusufovic J, Hänninen M-L: *Diagn. Microbiol. Infect., Dis.* 35, 9 (1999).
18. Totten PA, Patton CM, Tenover FC, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 25, 1747 (1987).
19. Caner V, Cokal Y, Cetin C, et al.: *Antonie Van Leeuwenhoek.* 94, 527 (2008).
20. Dedieu L, Pages JM, Bolla JM: *J. Clin. Microbiol.* 42, 2301 (2004).
21. Bovill RA, Mackey BM: *Microbiology-Uk.* 143, 1575 (1997).
22. Jones DM, Sutcliffe EM, Curry A: *J. gen. Microbiol.* 137, 2477 (1991).
23. Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1110 (1999).
24. Asakura M, Samosornsuk W, Taguchi M, et al.: *Microb. Pathog.* 42, 174 (2007).
25. Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 37, 1646 (1999).
26. He Y, Yao X, Gunther NW, et al.: *Food Anal. Methods.* 3, 321 (2010).
27. Inglis GD, Kalischuk LD: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3435 (2003).
28. Klena JD, Parker CT, Knibb K, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 5549 (2004).
29. Lawson AJ, Logan MJ, O'Neill GL, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 37, 3860 (1999).
30. Lawson AJ, Shafi MS, Pathak K, et al.: *Epidemiol. Infect.* 121, 547 (1998).
31. Nayak R, Stewart TM, Nawaz MS: *Mol. Cell Probes.* 19, 187 (2005).
32. Wang G, Clark CG, Taylor TM, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 40, 4744 (2002).
33. Dorak MT: Real-time PCR. Taylor & Francis Group, Abingdon 2007
34. Bonjoch X, Calvo L, Soler M, et al.: *Food Anal. Methods.* 3, 40 (2010).
35. Debretsion A, Habtemariam T, Wilson S, et al.: *Mol. Cell Probes.* 21, 177 (2007).
36. Hong J, Jung WK, Kim JM, et al.: *J. Food Prot.* 70, 2015 (2007).
37. LaGier MJ, Joseph LA, Passaretti TV, et al.: *Mol. Cell Probes.* 18, 275 (2004).

38. Leblanc-Maridor M, Beaudeau F, Seegers H, et al.: *BMC Microbiol.* 11 (2011).
39. Nogva HK, Bergh A, Holck A, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4029 (2000).
40. Perelle S, Josefsen M, Hoorfar J, et al.: *Mol. Cell Probes.* 18, 321 (2004).
41. Persson S, Petersen HM, Jespersgaard C, et al.: *Diagn. Microbiol. Infect., Dis.* 74, 6 (2012).
42. Toplak N, Kovač M, Piskernik S, et al.: *J. Appl. Microbiol.* 112, 752 (2012).

Souhrn

Vondráková L., Pazlarová J., Demnerová K.: Stanovení termotolerantních *Campylobacter* spp. pomocí qPCR

Alimentární infekce způsobené různými potravinovými patogeny v dnešní době obecně představují nezanedbatelnou hrozbu pro veřejné zdraví. Nicméně využití tradičních a standardizovaných ISO metod pro kontrolu potravin postrádá potřebnou rychlost a spolehlivost pro detekci, identifikaci a kvantifikaci těchto mikroorganismů. Zejména v případě termotolerantních *Campylobacter* spp., jež jsou v současné době nejčastější příčinou lidských gastroenteritid bakteriálního původu, je využití těchto metod v praxi obzvláště problematické. Praktickým východiskem výše popsaných nedostatků kultivačních metod je bezesporu zavedení rozličných molekulárně-genetických technik.

Klíčová slova: termotolerantní *Campylobacter* spp., kampylobakterióza, qPCR

Summary

Vondráková L.: Determination of thermotolerant *Campylobacter* spp. using qPCR

Alimentary infections caused by various food-borne pathogens generally pose a threat to public health. The standardised ISO methods usually used for food control sometimes lack swiftness and reliability necessary for detection, identification and quantification of these microorganisms. Especially in the case of thermotolerant *Campylobacter* spp., which are the most common cause of human bacterial gastroenteritis worldwide, usage of these methods in practice is somehow problematic. Practical solution of abovementioned issues linked with cultivation based methods are indisputably various molecular-genetic techniques.

Keywords: thermotolerant *Campylobacter* spp., campylobacteriosis, qPCR

OBSAH

Úvodem	1
Pozvánka na seminář	2
Pozvánka na konferenci BioTech 2014 a 6. Česko-švýcarské symposium	3
Šulc M., Stiborová M.: Vědecko-pedagogické odpoledne u příležitosti 60. výročí založení katedry biochemie Přírodovědecké fakulty UK	4
Hrdličková Kučková, Š., Coufalová L., Maršálová L.: Implementace nových metod ve výuce biochemie a forenzní analýzy	5
Hynek R.: Není hmoták jako hmoták aneb porovnání MALDI-TOF/TOF MS a LC-Q-TOF MS	6
Janda M., Valentová O.: Kyselina salicylová	9
Svoboda P., Křížová E., Škop V., Zídková J., Zídek V.: Spontánně hypertenzní potkan jako model lidských kardiovaskulárních onemocnění a metabolického syndromu	12
Vondráková L., Pazlarová J., Demnerová K.: Stanovení termotolerantních <i>Campylobacter</i> spp. pomocí qPCR	16

CONTENTS

Editorial	1
Invitation to seminar	2
Invitation on conference BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss symposium	3
Šulc M., Stiborová M.: Meeting at the occasion of the 60th anniversary of the Biochemistry Department of the Charles University (in Prague)	4
Hrdličková Kučková Š., Coufalová L., Maršálová L.: Implementation of new methods in teaching of biochemistry and forensic analysis	5
Hynek R.: Special aspects of mass spec.	6
Janda M., Valentová O.: Salicylic acid	9
Svoboda P., Křížová E., Škop V., Zídková J., Zídek V.: The spontaneously hypertensive rat as a model of human cardiovascular diseases and metabolic syndrome	12
Vondráková L., Pazlarová J., Demnerová K.: Determination of thermotolerant <i>Campylobacter</i> spp. using qPCR	16

REDAKČNÍ RADA

Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Martina Nováková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albrechtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i. Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

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 a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: Trends Biotechnol. 28, 485 (2010)

Lowestein KA: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 2006

Fujiki M. (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry 248. (Soai K. ed.), Springer, Berlin, 119-201.

Novák Z.: Disertační práce. VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: Trends Biotechnol. 28, 485 (2010)

Lowestein KA: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 2006

Fujiki M. (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry 248. (Soai K. ed.), Springer, Berlin, 119-201.

Novak Z.: Diploma Thesis, ICT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

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

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR platnému pro rok 2014.

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (www.bts.vscht.cz)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).