

Bio

Ročník 26 • Číslo 2/2016

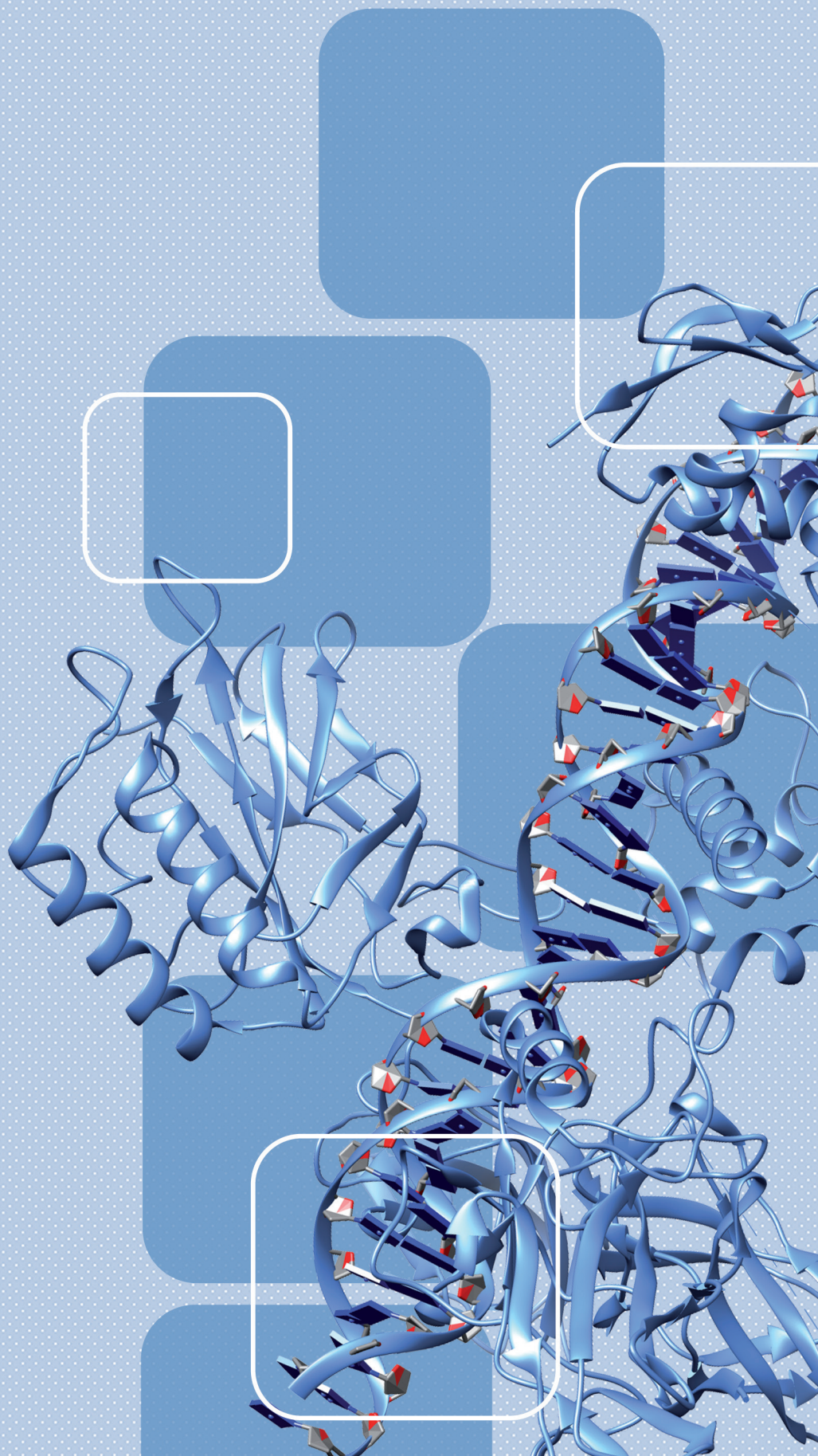
prospect

**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,

Jako každý rok jsme v květnu uspořádali náš obvyklý jarní seminář, tentokrát opět na téma genetických modifikací, protože toto téma je stále velmi aktuální. Seminář jsme pořádali ve spolupráci se spolkem Biotrin a Fakultou potravinářské a biochemické technologie. O seminář byl velký zájem, což nás utvrdilo v názoru, že jsme vybrali vhodné téma. Tentokrát jsme se věnovali genetickým modifikacím zvířat a hmyzu (prof. Ing. J. Petr, DrSc.) a geneticky modifikovaným plodinám (prof. RNDr. Z. Opatrný, CSc.). Po úvodních přednáškách se rozvinula široká a plodná diskuse.

Otázka genetických modifikací je permanentně diskutovaným tématem. Léta se táhne spor o odmítání DNA rekombinantních kultivarů zemědělských plodin, zatímco fyzikální a chemická mutagenese je bezproblémově tolerována. V prosazování tohoto názoru je často zneužíván termín „předběžné opatrnosti“ (precautionary principle), takže vzniká dojem, že tento princip je uplatnitelný pouze pro „GMO“ (geneticky modifikované organismy). To je ovšem velký omyl. Princip předběžné opatrnosti musí být uplatňován nejen pro všechny biotechnologie, ale ve všech oblastech průmyslových činností. V tomto směru doporučujeme si přečíst velmi hezký článek G. Tagliabue „The Precautionary principle: its misunderstandings and misuses in relation to GMO“ v časopise *New Biotechnology*, Vol. 33, No. 4, 437 – 439 (June 2016). Lze jej najít na www.elsevier.com/nbt. Vzhledem k velmi rozdílnému názoru na tuto otázku v USA (a dalších amerických státech) a v Evropě je tato neshoda jedním z velkých problémů při projednávání obchodní dohody mezi USA a EU.

Rada Biotechnologické společnosti po dohodě se švýcarskými partnery projednala přípravu dalšího mezinárodního biotechnologického symposia „Biotech 2017 and 7th Czech–Swiss symposium with exhibition“, které se bude konat opět v Národní technické knihovně v Praze 6 v Dejvicích, a to ve dnech 13. – 17. 6. 2017. Organizační výbor intenzivně pracuje na jeho přípravě a informace o této významné události jsou k dispozici na nově koncipovaných webových stránkách www.biotech2017.cz. (Připomínáme, že web minulého symposia s fotogalerií je také dosud dostupný na www.biotech2014.cz). Organizační výbor připravuje s vědeckým výborem velmi hodnotné plenární přednášky i přednášky v jednotlivých sekcích, podmínky pro příjemnou atmosféru jednání a tradičně i kvalitní sociální program. Vyzýváme všechny členy a naše příznivce, aby využili této příležitosti k vzájemnému setkání a pozvali své přátele z České republiky a zejména ze zahraničí. Na rozdíl od obdobných mezinárodních akcí jsme zvolili velmi nízký účastnický poplatek. Doufáme proto, že to bude pobídkou k účasti na akci konané v Praze a v atraktivní části roku.

Závěrem našeho úvodníku nám opět dovolte upozornit Vás na některé novinky diskutované v odborném tisku. Jedním z aktuálních problémů v oblasti vývoje

léčiv je nepochybně léčba Alzheimerovy choroby. Jen v USA touto chorobou trpí nejméně 5,3 milionu lidí (z toho 65 % žen). I když ve fázi III neuspělo 51 léčiv, situace v jejich vývoji se nezdá být tak zlá. Úspěchem je, že zřejmě dnes již celkem dobře známe její příčiny. Důvodem onemocnění je akumulace amyloidního povlaku na povrchu mozku. Akumulace amyloidu na povrchu mozku může probíhat 10 až 15 let bez jakýchkoliv projevů nemoci. Nemoc spustí až protein tau, který vyvolá konformační změny amyloidu. Bylo zjištěno, že u zdravých lidí brání akumulaci β -amyloidu protilátka tvořená B-lymfocyty vznikajícími v kostní dřeni. Tyto poznatky se staly návodem k vývoji léčiv vhodných k léčbě Alzheimerovy choroby. Jedná se o léky schopné bránit formě plaku nebo/a jej rozpouštět. Aducanumab (Biogen) je protilátka, která odstraňuje amyloidní plak z mozku a zpomaluje rozvoj nemoci, solanezumab (monoklonální protilátka od Eli Lilly) se váže na rozpustnou formu proteinu a tím brání tvorbě agregátu. Tuto „anti-amyloidní terapii“ se snaží realizovat i další léčiva jako protilátka crenezumab (Genentech), která váže jak monomerní, tak i agregovanou formu amyloidu- β . Jak již bylo uvedeno, velmi důležitou součástí vzniku Alzheimerovy choroby je protein tau. Z těchto důvodů se vyvíjejí léčiva na základě přípravy protilátek proti němu. Úspěch v tomto směru by přiblížil možnost léčby nemoci i v jejím pokročilém stadiu. Budoucnost jistě leží v uplatnění kombinace obou léčebných přístupů. Tomu však dosud brání skutečnost, že dosud neznáme vzájemné vztahy mezi oběma typy proteinů.

Vývoji léčiv Alzheimerovy choroby mohou přispět i výsledky dosažené díky rozsáhlé akci BRAIN Initiative (Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies), jejímž cílem je lépe porozumět funkci mozku pomocí vývoje nových technologií. Na tento projekt, iniciovaný prezidentem Obamou již v r. 2013, bude v letošním roce věnováno pět americkými federálními agenturami 300 milionů dolarů a v roce 2017 dokonce 434 milionů dolarů. Neurologové dosud neznají všechny sloučeniny, které se aktivně podílejí na činnosti mozku, a zde se proto nabízí prostor pro chemiky pomoci lépe porozumět chemické signalizaci mezi neurony. Chemická divize NSF zvýšila v r. 2016 částku na projekty spojené s výzkumem mozku na 4,9 milionu dolarů proti 3,6 milionu dolarů v r. 2015.

Redakce Biopropectu přeje všem svým čtenářům příjemné počtení článků, příjemné prožití letních dnů a načerpání nových sil do všech dalších aktivit.

Se srdečnými pozdravy
Vaši

Jan Káš a Petra Lipová

LONZA PŘINÁŠÍ ZÁKAZNÍKŮM ODBORNÉ ZNALOSTI BIOTECHNOLOGIE A VÝROBY SPECIÁLNÍCH CHEMICKÝCH LÁTEK A INGREDIENCÍ

Společnost Lonza je jedním z předních a nejvíce důvěryhodných světových dodavatelů na farmaceutický a biotechnologický trh a trh speciálních přísad. Využíváme vědu a technologie k vytváření produktů, které podporují bezpečnější a zdravější život a které zvyšují celkovou kvalitu života.

Jsme nejen výrobci a vývojáři dodávající na zakázku, ale také nabízíme služby a produkty, které sahají od aktivních farmaceutických látek a nejmodernější léčby pomocí kmenových buněk až k prostředkům pro čištění pitné vody, od sloučenin vitamínu B a organických přísad do produktů osobní péče po produkty pro zemědělce, a od průmyslových konzervačních látek až po prostředky mikrobiální kontroly, které bojují proti nebezpečným virům, bakteriím a jiným patogenům.

Společnost Lonza byla založena v roce 1897 ve švýcarských Alpách a dnes je uznávanou globální společností s více než 40 významnými výrobními závody a výzkumně vývojovými pracovišti a s přibližně 9.800 zaměstnanci po celém světě. V roce 2015 dosáhly prodeje společnosti ve dvou tržních segmentech Pharma & Biotech a Specialty Ingredients 3,8 mld. švýcarských franků. Více informací je k dispozici na www.lonza.com.

Lonza Biotec, s. r. o., se sídlem v Kouřimi, se specializuje na výrobu výchozích materiálů pro léčiva, specializovaných výživových doplňků pro lidskou výživu i výživu zvířat a produktů zlepšujících výnosy zemědělských plodin a kvalitu potravin. Společnost nabízí svoje výrobní kapacity zákazníkům z oblasti biotechnologií nebo potravinářství.

Výroba v Lonze Biotec probíhá na pěti výrobních linkách, které mají různou produkční kapacitu i technickou složitost. Portfolio výrobků zahrnuje malé molekuly, složité biomolekuly jako jsou např. enzymy nebo přímo živé mikrobiální kultury. Základní součástí všech technologií je fermentace, kdy jsou činnosti různých typů mikroorganismů produkovány požadované látky.



Foto: Lonza Ltd

Linky jsou schopné pracovat s geneticky modifikovanými organismy a jedna z linek rovněž s potenciálními patogeny klasifikovanými jako BSL2. Objemy fermentorů jsou 15, 50 a 75 m³, celková nominální fermentační kapacita závodu je 475 m³. Po ukončení fermentace se fermentační půda dále zpracovává. Vzhledem k různorodosti produktů jsou následné technologické kroky vždy specifické k danému produktu. Typicky po fermentaci následuje tzv. harvesting, kdy dochází k odstranění balastní biomasy. Následně je produkt izolován a zakonzentrován, k čemuž se používají např. membránové filtrace, odstředování na talířových odstředivkách či odpařování. Po zakonzentrování se produkty dále purifikují tak, aby splnily požadavky definované propouštěcí specifikací. Typické purifikační kroky používané v Lonze Biotec jsou např. různé varianty krystalizací, odbarvování s aktivním uhlím, elektrodialýza, popř. iontově výměnná chromatografie. Poslední technologické kroky související s finalizací produktu jsou obvykle formulace přídatkem pomocných látek nebo sušení. Lonza Biotec disponuje celou řadou sušáren, jako např. lískovou sušárnou, dvoukuželovou rotační sušárnou, mechanicky promíchávanou kulovou sušárnou nebo sprejovou sušárnou. K dispozici je i velký lyofilizátor. Výroba na všech výrobních linkách je automatizovaná.

Lonza Biotec, s. r. o. exportuje téměř veškerou produkci na světové trhy – zejména do USA, Indie, zemí EU, Kanady a Švýcarska. Závod je certifikován systémem řízení kvality podle ISO 9001:2000 a systémem řízení bezpečnosti potravin podle ISO 22000.

kouřimské Lonze pracuje více než 200 zaměstnanců a Lonza je nejenom významným zaměstnavatelem ve Středočeském kraji, ale také partnerem města Kouřim, jehož projekty každoročně podporuje významnými finančními částkami.

Pavel Havelka





Koncem roku 2015 vyšla v nakladatelství Vysoké školy chemicko-technologické v Praze naše nová učebnice „Biochemie – chemický pohled na biologický svět“ (ISBN 978-80-708-927-3). Přináší netradičním způsobem zpracované základy biochemie, nepřetížené nadbytkem faktografických údajů. Je především určena pro vysokoškolské studenty bakalářských studijních programů, kteří již zvládli základy obecné, organické a analytické chemie. Ve dvanácti kapitolách postupuje výklad od základních stavebních struktur biologických systémů (aminokyseliny, peptidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy) přes membránové děje a molekulovou genetiku až k nejdůležitějším metabolickým procesům. Mimořádná pozornost je věnována enzymologii a bioenergetice, jejichž pochopení umožňuje interpretovat metabolismus jako jediný systém katalyzovaných chemických reakcí. Text výkladu je doplněn četnými zajímavostmi a nadhledovými úvahami ve formě podepsaných vsuvek, na jejichž vypracování se kromě autorů podílela řada kolegů z různých institucí. Jednotlivé kapitoly obsahují též otázky s uvedeným řešením; průřezovým problémům je věnována i celá závěrečná kapitola, ambiciózně nazvaná „Generální opakování formou otázek a odpovědí“. Text je doplněn více než 250 převážně barevnými obrázky a vzorci, které jsou volně k dispozici v elektronické podobě na stránkách nakladatelství VŠCHT tak, aby je kolegové mohli využít při vysokoškolských přednáškách.

Biotech 2017

and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition



June 13-17, 2017



www.biotech2017.cz

Scope



Biotech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium with exhibition will cover all important aspects of advanced biotechnologies. **Attention will be paid to the key technologies playing important role in bio-based economies.** Microorganisms such as bacteria, yeast, and microalgae, and their enzymes, are used for manufacturing a wide range of products in sustainable, forward-looking bioprocesses. These products represent high-performance chemicals or ingredients in demand for foodstuffs, animal feed, cosmetics and pharmaceuticals.

Lectures will be organized in following sessions:

- **Medical and Pharmaceutical Biotechnology**
- **Microalgae Biotechnology**
- **Environmental Biotechnology**
- **Food and Agriculture Biotechnology**
- **Biorefinery**
- **Industrial Biotechnology**

Selection criteria for oral and poster presentations will be based on novelty, potential for practical application and scientific merit. The official conference language will be English.

Plenary lectures



Wilhelm Ansorge (ETH Lausanne):
PERSPECTIVES FOR DNA SEQUENCING TECHNIQUES, APPLICATIONS IN GENOMICS and MEDICINE

Martin Jinek (University of Zurich):
MOLECULAR MECHANISM OF THE GENOME EDITOR NUCLEASE CAS9

Important dates

February 28, 2017	Early bird registration deadline
May 18, 2017	Registration and payment deadline
June 13-17, 2017	Conference

For Exhibitors and Sponsors

Participation in this event will help to promote your company as a key player in the biotechnology sector, build connections with new clients, and seek research partners or future employees among the top students attending this event.

For detailed offer for Exhibitors see the conference website.

Hosted by



scienceINDUSTRIES
SWITZERLAND

SWISS+ BIOTECH
National Thematic Network

Czech Biotechnology
BTS
Society

Life Sciences and
Facility Management
zhaw
Institute of
Biotechnology

ROSTLINNÁ IMUNITA

Lucie Trdá², Martin Janda^{1*}

¹Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, Praha 6 – Dejvice, 166 28, ²Ústav experimentální botaniky rostlin AV ČR, v. v. i., Rozvojová 263, Praha 6 – Lysojaje, 165 02; *e-mail: martin.janda@vscht.cz; jandam@ueb.cas.cz

Úvod

Podle odhadů bude v roce 2050 obývat planetu Zemi přibližně devět až deset miliard obyvatel a bude nutné je uživit. V souvislosti se zjevnými klimatickými změnami se tento vývoj stává jednou z nejzávažnějších výzev, které současná věda nabízí. Rostliny, coby autotrofní organismy, hrají v řešení tohoto problému klíčovou roli. Je jisté, že nejde donekonečna zvyšovat zemědělsky obdělávané plochy, ale že řešení spočívá především ve zvyšování výnosů a zamezování jeho ztrátám.

Na výnosy mají vliv jak abiotické, tak biotické stresy. Mezi abiotické stresory patří sucho, vlhko, změna teplot či kontaminace zemin těžkými kovy a jinými toxickými látkami produkovanými zejména člověkem. Mezi biotické stresory patří napadení rostliny různými druhy patogenních mikroorganismů (bakterie, oomycety či houby), viry, hmyzem či bezobratlými živočichy (hádátka). Ačkoli úzce specializované patogeny mohou decimovat dlouhodobě šlechtěné zemědělské plodiny, obecně je u rostlin úspěšný rozvoj choroby po infekci spíše výjimkou než pravidlem. Rostliny za to vděčí velmi komplexnímu a efektivnímu imunitnímu systému. Tato imunita je podobná imunitě živočichů a lidí. Rostliny jsou, stejně jako živočichové, vybaveny receptory schopnými detekovat přítomnost napadajícího mikroorganismu (ale i dalších výše zmíněných organismů). Na rozdíl od živočichů, rostliny nemají specializované mobilní imunitní buňky a nedisponují takzvanou adaptivní imunitou, jaká se vyvinula u čelistnatých obratlovců. Zato je v podstatě každá rostlinná buňka schopna rozpoznat napadení patogenem a aktivovat svoji vlastní imunitní odpověď.

V tomto přehledném článku stručně shrnujeme současné poznatky a názory týkající se základních molekulárních mechanismů rostlinné imunity.

Rostlinná imunita

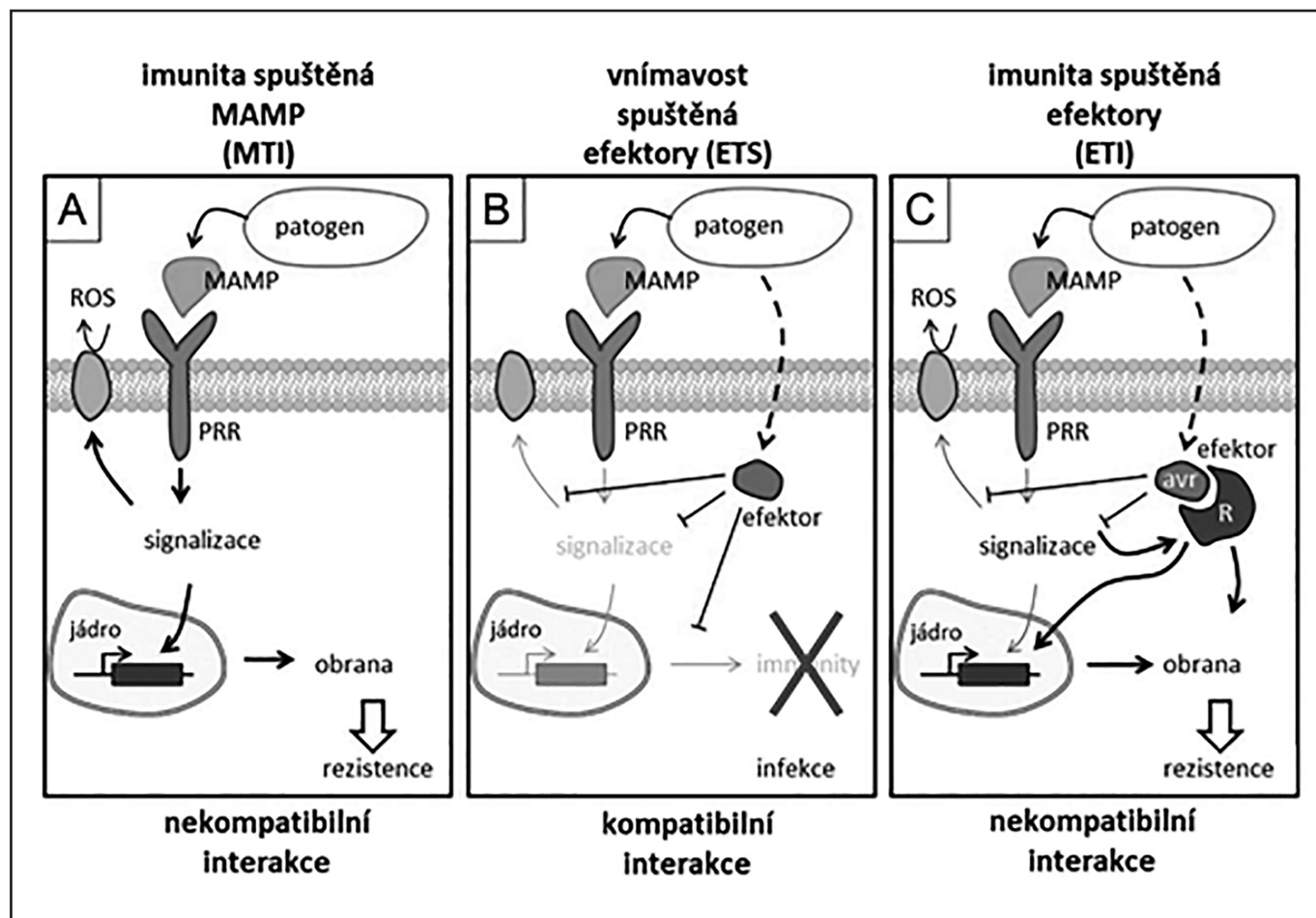
Obrana rostlin při napadení patogeny využívá konstitutivní bariéry a indukovatelné obranné odpovědi. Konstitutivní obranná linie je trvale přítomná a zahrnuje fyzické bariéry (např. hydrofobní kutikula, vosky, buněčná stěna) nebo nízkomolekulární konstitutivně syntetizované toxické látky. Indukované obranné odpovědi jsou aktivovány až po rozpoznání patogenu rostlinou. Je tedy zřejmé, že rozpoznání přítomnosti mikroorganismu zajišťované různými druhy receptorů, je klíčové pro spuštění efektivní imunitní odpovědi s cílem kolonizaci pletiva patogenem zabránit/potlačit či ji kompletně eliminovat. Imunitní systém rostliny detekuje různé imunogenní ligandy, které znamenají „proces invaze“. Tyto ligandy jsou buď produkovány přímo mikroorganismem, nebo v důsledku invaze vznikají. V současnosti se nejčastěji setkáváme s popisem rostlinného imu-

nitního systému, který jej dělí na dvě „větve“, na MAMP spuštěnou imunitu (MTI; „MAMP triggered immunity“) a efektoru spuštěnou imunitu (ETI; „effector triggered immunity“)¹.

MTI

První z těchto „větví“ imunity rozpoznává útočící mikroorganismy pomocí obecných molekulárních motivů spojených s mikroorganismy (MAMP, „microbe associated molecular patterns“). V literatuře se setkáme i s pojmem PAMP („pathogens associated molecular patterns“), jenž je limitován na motivy patogenů. PAMP je historicky starší termín², reflektující prvotní studie rostlinné imunity s patogenními mikroorganismy. Další práce ale ukazují, že tyto molekulární motivy jsou konzervované v celých třídách mikroorganismů a i mutualistické mikroorganismy vyvolávají imunitu prostřednictvím svých MAMP. Tyto dva pojmy bývají v literatuře často zaměňovány jeden za druhý a zdálo by se, že jsou ekvivalentní, ale je zřejmé, že MAMP jsou nadřazeny pojmu PAMP. Setkáme se i s pojmem obecný elicitor (či elicitor) jakožto synonymem pro MAMP, vyjadřující schopnost „elicitovat“ obranné reakce. My bychom se v budoucnu chtěli pojmu PAMP vyhnout a užívat vždy jen pojem MAMP.

Tato imunitní odpověď se nazývá imunita spuštěná rozpoznáním MAMP (MTI, „MAMP triggered immunity“; obr. 1 A) a má se za to, že je evolučně starší. MAMP jsou imunogenní motivy konzervované v širokých třídách mikroorganismů, a jsou součástí mikrobiálních molekul důležitých pro jeho životní kondici (např. součásti strukturních proteinů orgánů mobility nebo polysacharidů buněčných stěn). Mezi typické MAMP se řadí flagellin, elongační faktor či chitin. Protein flagellin je hlavní stavební jednotou bakteriálního bičíku. Bylo ukázáno, že jeho konzervovaná sekvence čítající 22 aminokyselin (flg22) nalézajících se na jeho N-konci je velmi silným elicitorem obranných reakcí rozpoznávaným mnoha rostlinnými druhy³. Elongační faktor EF-Tu je nejvíce zastoupený bakteriální protein, mající zásadní roli v biosyntéze proteinů. U EF-Tu byl popsán minimální epitop čítající 18 aminokyselin (elf18) vyvolávající obranné reakce⁴. Chitin je homopolymer N-acetylglukosaminu a je hlavní složkou buněčných stěn hub⁵. Je patrné, že MAMPs jsou různé povahy např. proteiny, sacharidy či lipopolysacharidy. Rozpoznání těchto molekul se děje extracelulárně, na plasmatické membráně pomocí transmembránových receptorů rozpoznávajících motivy (PRR, „pattern recognition receptors“). PRR jsou strukturně kinasy podobné receptorům (RLK; receptor like kinase) či proteiny podobné receptorům (RLP; receptor like proteins). PRR jsou složeny z extracelulární domény pro vazbu MAMP, jednoho transmem-



Obr. 1: Schéma interakce mezi rostlinou a patogenem. A) Imunita spuštěná rozpoznáváním MAMP (MTI); B) Vnímavost spuštěná efektyry (ETS); C) Imunita spuštěná rozpoznáváním efektorů (ETI); MAMP – molekulární motivy spojené s mikroorganismy; PRR – receptory rozpoznávající motivy; ROS – reaktivní formy kyslíku; R – protein rezistence rozpoznávající efektyry.

bránového úseku a intracelulární kinasové domény, v případě RLK. Častou ligand vázající doménou je doména složená z repetitivních sekvencí bohatých na leucin (LRR, leucin rich repeat), jež rozpoznává proteinové motivy, jako např. velmi dobře charakterizovaný receptor pro flg22, FLS2⁶. LysM domény pak zprostředkovávají rozpoznání MAMP sacharidové povahy. Typickými představiteli jsou CERK1, receptor pro rozpoznání fungálního chitinu, nebo LYM2 receptory pro rozpoznání bakteriálního peptidoglykanu⁷. PRR jsou na membráně organizovány do receptorových komplexů, jež vazbou MAMP mění konformaci, která vede (pomocí kinasové domény/domén) k transdukcii buněčné signalizace a aktivaci obrany. Právě u PRR typu RLP, tedy bez kinasové aktivity, vykonává transdukcii kinasových ko-receptorů, s nimiž je daný PRR v komplexu.

Receptory typu PRR rozpoznávají motivy spojené s poraněním (DAMP; „damage-associated molecular patterns“). Mezi DAMP se řadí oligogalakturonidy či monomery kutinu, vznikající jako fragmenty hydrolyzou poškozeného pektinu nebo kutikuly z buněčných stěn rostlin⁵. V poslední době se ukazuje velmi přísná regulace lokalizace PRR receptorů na plasmatické membráně, kdy je striktně regulována jak sekreční dráha cílící receptor z endoplasmatického retikula přes Golgiho aparát a trans Golgiho síť až na plasmatickou membránu⁸.

ETI

V průběhu evoluce byly patogeny donuceny, pokud chtěly obstát, narušit a překonat rostlinnou MTI. To se děje především sekretováním efektorových molekul patogenem do buněk hostitelské rostliny. Efektor je obecně definován jako mikrobiální molekula, jež svou aktivitou působí vně mikroorganismu a podílí se na vzniku/udržení symbiózy mezi hostitelem a útočníkem. Těchto efektorů je známa celá řada, přičemž nejvíce popsány je efektorový systém bakterie *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (<http://pseudomonas-syringae.org/>). Tato bakterie, stejně jako další, sekretují efektyry do rostlinné buňky převážně takzvaným T3 sekrečním systémem. Tyto efektyry mají různé aktivity a působí na různé aspekty MTI. Jsou to např. proteasy, kinasy, fosfatasy nebo ubiquitin ligasy, jež mohou svou aktivitou blokovat funkci samotných PRR a asociovaného receptorového komplexu či blokovat procesy a důležité komponenty v obranné signalizační kaskádě. Jiné efektyry mohou narušovat biosyntézu a rovnováhu fytohormonů či zavírání průduchů⁹. Efektyry vyvolávají v rostlině tzv. efektyry spuštěnou vnímavost (ETS, „effector triggered susceptibility“; obr. 1 B). Rostlina si však vyvinula receptory schopné efektyry detekovat. Na tomto rozpoznání je založena druhá „větev“ rostlinné imunity – efektyry spuštěná imunita (ETI, „effector triggered immunity“).

immunity"; obr. 1C)¹⁰. Efektory jsou v rostlině rozpoznávány tzv. R-proteiny. Popsané R-proteiny jsou nejčastěji lokalizovány nitrobuněčně v cytoplazmě a obsahují NB-LRR strukturu, jež nese sekvenci vázající nukleotidy (NB, „nukleotid binding“) a LRR doménu. Efektory jsou rozpoznány buď přímo nebo nepřímo pomocí detekce integrity a přesné struktury „hlídané“ hostitelské molekuly či procesů, klíčových pro hostitelskou buňku. V případě nepřímé detekce R-protein funguje jako „hlídač“ („guardee“), jak je ilustrováno v „guard“ modelu¹¹. Nepřímé rozpoznání je velice výhodné, protože umožňuje s minimálním počtem receptorů detekovat aktivitu velkého množství efektorů, tj. detekovat různé typy invaze. Různé efektory v hostitelské buňce totiž mohou cílit stejnou hostitelskou komponentu, jako např. RIN4².

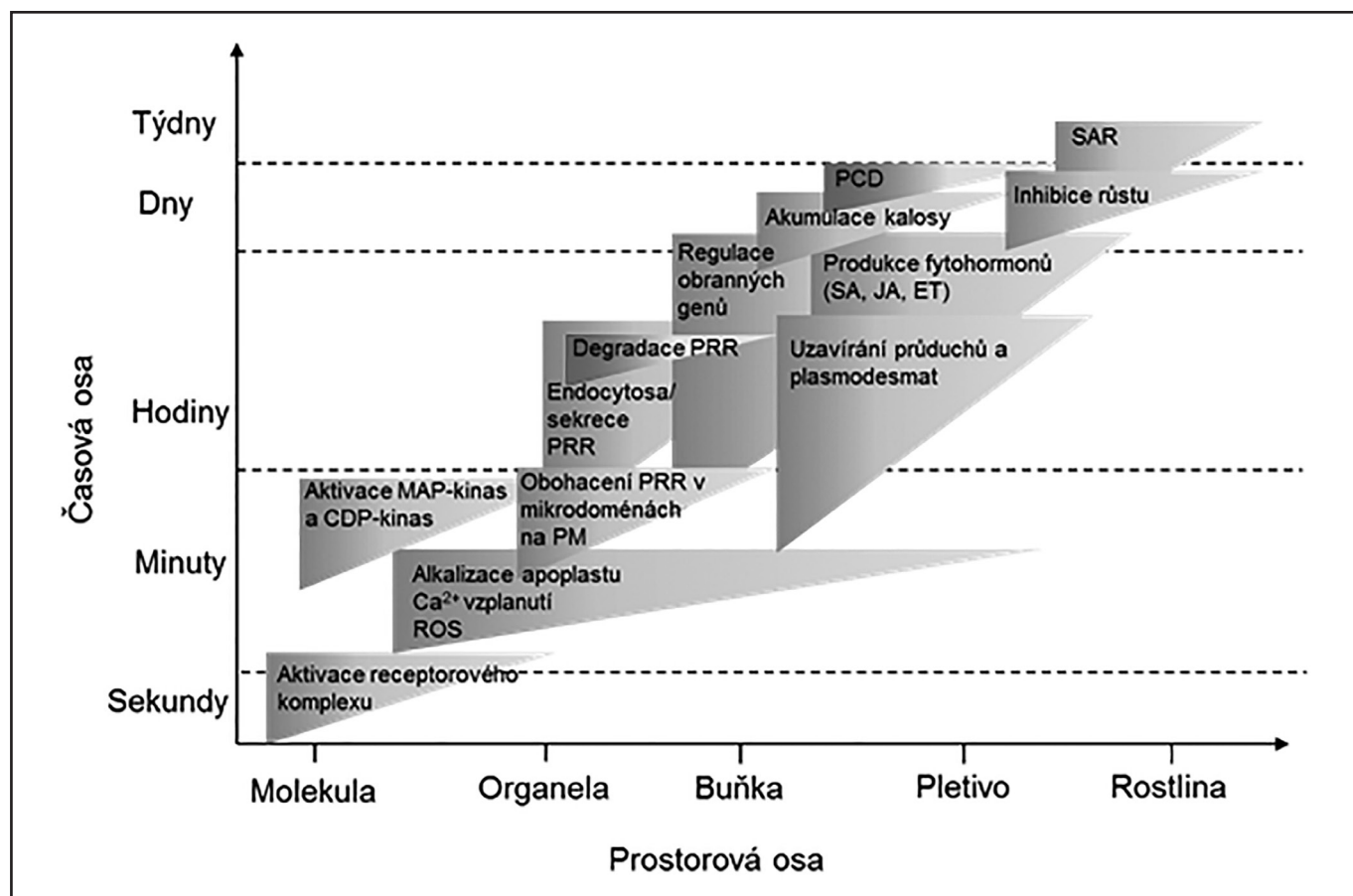
Ačkoli mají efektory funkci ve virulenci, často se můžeme setkat s termínem gen avirulence (*Avr* gen), jakožto synonymem pro efektor. Důvod je historický. Rozpoznání *Avr* genu vede k potlačení virulence, tj. rezistenci, v případě, že má rostlina odpovídající R-proteinový receptor. Pojem R-protein („Resistance protein“) pak ilustroval stav odolnosti rostliny. Pro rostliny disponující takovýmto *R*-genem je pak mikroorganismus mající *Avr* gen avirulentní.

Interakce mezi rostlinami a patogenem tak může být klasifikována podle mechanismů „molekulárního dialogu“ a jeho výstupu, kterým může být onemocnění

(„susceptibilita“) nebo rezistence. Nehostitelská rezistence je ustanovena mezi rostlinou a neadaptovaným patogenem, který postrádá specializované efektory. V tomto případě je MTI imunita dostatečná k potlačení patogenu a nevede k onemocnění (obr 1 A). O kompatibilní reakci hovoříme, pokud specifický patovar patogenu naruší MTI a rostlina nemá vyvinutou schopnost detekce takového efektoru (obr. 1 B). Kompatibilní reakce je tak synonymem pro rozvoj onemocnění. Nakonec hovoříme o nekompatibilní reakci, pokud je efektor patogenu rozpoznán R-proteinem rostliny a vede k indukci ETI a následné rezistenci (obr 1C).

Události spuštěné MTI a ETI

Spuštění imunitní odpovědi, ať už se jedná o MTI, či ETI, vede často k podobným odpovědím. Reakce na rozpoznání MAMP (ale velmi často i efektorů) by se z časového hlediska dala rozdělit do několika fází. Transdukce signálu z PRR vede nejdříve k velmi časným reakcím, které nastávají v řádu sekund a minut (obr. 2). Téměř okamžitou odpovědí je aktivace receptorového komplexu PRR na plasmatické membráně. Následuje alkalizace apoplastu (mezibuněčného prostoru), zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v buňce, tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS, „reactive oxygen species“), dochází také k aktivaci cytosolické signalizační kaskády MAP-kinas a CDP-kinas (na vápníku závislých proteinkinas)⁸.



Obr. 2: Časoprostorový průběh událostí spuštěných MAMP. Trojúhelníky ukazují lokaci událostí spuštěných flg22. Zelená barva reprezentuje tranzitní události. Červená barva reprezentuje permanentní události. PCD – programovaná buněčná smrt; SAR – systémově získané rezistence; CDP-kinasy – na vápníku závislé proteinkiny; MAP-kinasy – mitogenem aktivované proteinkiny; SA – kyselina salicylová; JA – kyselina jasmínová; ET etylén; ROS – reaktivní formy kyslíku; PM – plasmatická membrána; PRR – receptory rozpoznávající motivy. Modifikováno podle [8].

Akumulace imunitních signálů pak vede ke změnám odehrávajícím se v jádře buňky. Následuje střednědobá odpověď (v řádu hodin od rozpoznání), jež zahrnuje přeprogramování transkripce genů na obranný režim rostliny. Tyto změny v transkriptomu rostliny pak vedou k syntéze proteinů spojených s patogenezí (PR proteinů, „pathogenesis related proteins“), biosyntéze a změně regulace fytohormonů, jako je např. kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA) nebo etylén (ET), vyztužování buněčné stěny polysacharidickou kalosou nebo fenolickým ligninem, produkci antimikrobiálních fytoalexinů nebo uzavírání plasmodesmat a průduchů. V případě rozpoznání MAMP, nastává endocytosa PRR. PRR se může následně recyklovat, čímž dochází k reaktivaci a návratu na plasmatickou membránu, či může být degradován ve vakuole¹². Tato negativní regulace PRR po vazbě ligandu umožňuje autoregulaci intenzity odpovědi a předchází excesivní aktivaci obrany. Později může nastávat až hypersenzitivní reakci (HR), kdy rostlina spustí programovanou buněčnou smrt (PCD, „programmed cell death“) v okolí napadení patogenem, aby zabránila jeho dalšímu šíření. Fenomén PCD je zejména popsán po rozpoznání cytosolických efektorů bakterií, ale byl popsán i u některých MAMP¹³. Dále v rámci pozdní odpovědi, pozorovatelné v řádu dní, může být vyvolána systémově získaná rezistence (SAR, „systemic acquired resistance“), kdy dochází k šíření systémových signálních molekul a spuštění obrany i v pletivu jiných částí rostliny, než ve kterých byla původně mikrobiální invaze rozpoznána. Důsledkem aktivace obranných reakcí je i inhibice růstu rostliny. Například přidání imunogenního peptidu flg22 mimikujícím flagelin do živného média k *in vitro* kultuře, vyvolá inhibici růstu rostlin⁸.

Ačkoliv se ligand a receptor spouštějící imunitu liší, dochází k podobným imunitním odpovědím. Má se za to, že ETI je silnější a více robustní než MTI a jejím dominantním projevem determinujícím odolnost/susceptibilitu je právě PCD, účinná proti mikroorganismům s biotrofní životní strategií¹⁰.

Modely popisující rostlinou imunitu

Pohled na rostlinou imunitu prochází neustálým vývojem. Od počátku 20. století jsme svědky několika náhledů na ni. Je důležité si uvědomit, že každý model, jakkoli se zdá být komplexní, je pouze zobrazením. O to spíše jedná-li se o model něčeho tak komplexního jako je imunita. V první polovině dvacátého století poukázal Harold Flor díky pokusům s houbovým patogenem *Melampsora lini*, že rostlinné a patogenní geny spolu „interagují“ v jasných kombinacích. Tento model byl nazván „gen proti genu“¹⁴. Ukazuje, že jeden dominantní hostitelský gen rezistence (R) aktivuje fenotypový projev rezistence v odpovědi na patogen exprimující jeden dominantní gen avirulence (Avr)². Tento náhled na rostlinnou imunitu byl ve své době velmi revoluční, i když již tenkrát nebyl schopen zodpovědět některá pozorovaná fakta. Například, že tehdy takzvané obecné elicitory z mikrobů byly rozpoznány mnoha rostlinnými druhy a neukazovalo to tedy na druhovou (či dokonce rostlinou) specifitu, jako předpokládal koncept „gen proti genu“.

Velmi důležitým konceptuálním pokrokem popisujícím rostlinou imunitu byl vznik tzv. „zig-zag“ modelu. Tento model navrhli v roce 2006 pánové Jones a Dangl ve svém, v dnešní době již „kánonickém“ přehledném článku, na němž demonstrovali dvě hlavní větve rostlinné imunity, MTI a ETI (viz kapitoly výše), které se mezi sebou liší rozpoznáváním signálu, načasováním a silou, ale už méně výslednými efekty spouštěnými v rostlině¹.

Ve světle nových studií s širším spektrem identifikovaných MAMP, efektorů a jejich receptorů se však obecně uznávaný „zig-zag“ model¹ stává limitující, zejména co se týče rozlišení mezi MTI a ETI. Časté rozpory nacházíme zejména v přiřazení k MAMP nebo efektoru. To se děje obvykle na základě i) výskytu a konzervace motivu v mikrobiální populaci, ii) lokalizace ligandu při interakci (cytoplasma/extracelulární), nebo iii) role při virulenci, což není vždy jednoznačné.

Mnoho klasických MAMP je hojně rozšířeno v celých třídách mikroorganismů, jako např. flg22 nebo chitin. Jiné MAMP se ale vyskytují jen v rámci menší taxonomické jednotky (rod, rodina nebo druh), jako např. pep13 (epitop z transglutaminasy *Phytophthora infestans*) nebo Ax21 z xylanasy sekretované bakteriemi *Xanthomonas*¹¹. Efektory byly naopak dlouho považovány za úzce specifické a vyskytující se pouze v určitém mikrobiálním druhu nebo patovarů. Ovšem např. efektor typu NLP (Nep1-like proteins) indukující nekrosy a etylén jsou kódovány jak geny bakterií, tak hub i oomycet². Zatímco efektor byl dlouho považován za rychle se evolučně vyvíjející, MAMP byly původně považovány jako neměnné motivy. Rozpoznávané MAMP motivy jsou totiž umístěny v místech klíčových k bioaktivitě dané mikrobiální molekuly. Např. sekvence flg22 je klíčová pro řádné složení flagelinu a celkovou mobilitu bičíku. Nedávné práce ale odhalují, že např. proteinové MAMP se v průběhu evoluce vyvíjí rychleji, než se původně předpokládalo^{15, 16}. Přestože jsou MAMP pod silným tlakem negativní selekce pro zachování mikrobiální životaschopnosti, podléhají i silné pozitivní selekci způsobené odpovídajícími PRR receptory. Např. v populaci bakteriálních druhů i kmenů byla popsána diverzita v aminokyselinové sekvenci epitopů flg22 a elf18, a to vyšší než v ne-imunogenních částech MAMP proteinu. Tato diverzita pak koreluje se schopností elicitovat rostlinou imunitu, kdy evolučně mladší modifikace vedly ke snížení nebo úplné ztrátě rozpoznání rostlinou. Vedle modifikací v sekvencích MAMP si mikroorganismy vyvinuli i další cesty jak snížit jejich imunogenicitu. Častým mechanismem jsou i) posttranslační modifikace proteinových MAMP, jakou je glykosylace; ii) sekrece enzymů, jež umí degradovat MAMP, jako např. alkalické proteasy AprA degradující flagelin; iii) sekrece glyko-konjugátů (např. extracelulární polysacharid EPS) nebo toxinů, jež inhibují aktivaci MTI. Klasický „zig-zag“ model také nereflektuje schopnost rostlinné imunity vyvinout detekci nových epitopů na mikrobiálních molekulách, jako je např. nově popsáný epitop flagelinu *Pseudomonas* (flgII-28) nebo další imunogenní epitop elongačního faktoru EF-Tu (EFa50). Tyto epitopy jsou pak rozpoznány jinými nezávislými receptory, než jsou klasičtí FLS2 a EFR⁵.

Jiné rozšířené dogma je, že PRR receptory jsou konzervovány a rozšířeny v různých rostlinných druzích, zatímco R-proteiny jsou specifické pro daný patosystém. Ukázalo se, že PRR rozpoznání MAMP je druhově specifické a může se lišit např. mechanismem vazby ligandu a receptoru, jako bylo popsáno pro rozpoznání flg22 receptory FLS2 huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) a rajčete. Např. FLS2 vína se vyvíjel společně s flg22 epitopem mutualistické bakterie *Burkholderia phytoformans* a po jeho rozpoznání indukuje pouze slabou MTI ve srovnání s flg22 epitopy patogenních bakterií¹⁷. Zajímavé studie na R-genech naopak ukázaly, že jeden R-protein pak může být zodpovědný za širokospektrou rezistenci. Takto např. je NLR gen *Rxo1* kukuřice zodpovědný za rezistenci proti různým bakteriálním patogenům, *Burkholderia* či *Xanthomonas*. Jiné R-proteiny, jako je např. pár RRS1/RPS1 poskytují rezistenci jak proti fungálním, tak bakteriálním patogenům².

Často deklarovaný rozdíl mezi MTI a ETI je také lokalizace receptorů. Zatímco MTI by se dala z hlediska lokalizace nazvat „povrchovou imunitou“, neboť receptory rozpoznávající MAMP se nalézají na plasmatické membráně buňky, ETI receptory by zajišťovaly „vnitrobuněčnou imunitu“. Avšak nic není černobílé, a tak byly popsány i receptory efektorů nalézající se na plasmatické membráně, např. Cf-2, monitorující integritu hostitelského proteinu v apoplastu². MAMP mohou být také vyžadovány pro mikrobiální virulenci, což bylo dlouho považováno za jasný znak efektorů^{11,18}.

Ve světle těchto příkladů je jasné, že určit podle našich definic, co je MAMP/efektor, PRR receptor/R-protein není jednoznačné^{2,18}. Na to reaguje nový, zajímavý, více zobecňující koncept rostlinné imunity, tzv. invazivní model (IM; „Invasive Model“), jenž byl

nedávno představen prof. Thommou z Wageningenu². Podle něj rostlina aktivuje svou imunitu po rozpoznání širokého spektra motivů spojených s invazí (IP; „Invasion Patterns“), ať jsou mikrobiálního nebo rostlinného původu. Tento model tedy nerozlišuje mezi MTI a ETI, a IP motivy rozumí MAMP, efektor, modifikované hostitelské proteiny, jež jsou cílem efektorů, ale i DAMP vznikající při infekci.

Tento koncept imunity je s výhodou aplikovatelný i na jiné invazivní organismy, jako např. viry, herbivory, mutualistické nebo nekrotrofní mikroorganismy či různé bezobratlé organismy, pro něž bylo obtížné definovat, zda aktivují MTI nebo ETI obranu.

Závěr

Interakce rostlin s patogeny je neustále se vyvíjející souboj. Rostliny v průběhu evoluce zefektivňují rozpoznávání patogenů, zatímco na druhé straně se patogen snaží rozpoznání vyhnout.

Ještě větší komplexitu do příběhu vnáší fakt, že i mutualistické mikroorganismy indukují obranné reakce rostliny, je zajímavou otázkou, jakým způsobem rostlina dokáže rozeznat jeho prospěšnost. I přes významné pokroky v popisu mechanismů rostlinné imunity stále o tomto komplexním fenoménu nevíme zdaleka vše a bude velmi vzrušující sledovat jakých nových a nečekaných poznatků se na tomto poli výzkumu v blízké budoucnosti dočkáme.

Poděkování

Tato práce byla podpořena granty GAČR číslo 13-26798S (LT) a GA14 09685S (MJ).

Literatura

1. Jones JDG and Dangl JL: *Nature* 444(7117), 323 (2006).
2. Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ: *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 541 (2015).
3. Felix G, et al.: *Plant J.* **18**(3), 265 (1999).
4. Kunze G, et al.: *Plant Cell* 16(12), 3496 (2004).
5. Trda L, et al.: *Front Plant Sci.* 6 (2015).
6. Gomez-Gomez L and Boller T: *Mol. Cell* 5(6), 1003 (2000).
7. Gust AA, et al.: *Trends Plant Sci.* 17(8), 495 (2012).
8. Ben Khaled S, Postma J, Robatzek S: *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 379 (2015).
9. Xin XF and He SY: *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**, 473 (2013).
10. Cui HT, Tsuda K., Parker JE: *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 487 (2015).
11. Boller T, FelixG: *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379 (2015).
12. Beck M, et al.: *Plant Cell* 24(10), 4205 (2012).
13. Naito K, et al.: *Mol. Plant Microbe. In.* 21(9), 1165 (2008).
14. Flor HH: *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275 (1971).
15. Cai RM, et al.: *Plos Patholog.* **7**(8), (2011).
16. McCann HC, et al.: *P. Natl. Acad. Sci. USA* **109**(11), 4215 (2012).
17. Trda L, et al.: *New Phytol.* **201**(4), 1371 (2014).
18. Thomma BPHJ, Nurnberger T, Joosten MHAJ: *Plant Cell.* **23**(1), 4 (2011).

Souhrn

Trdá L., Janda M.: Rostlinná imunita

Stejně jako živočichové, i rostliny mají svou imunitu. Díky ní jsou rostliny schopny efektivně reagovat na napadení různými patogeny mikroorganismy, či jinými invazivními organismy, jako jsou např. viry nebo herbivoři. Klíčovou roli v rámci rostlinné imunity hraje rozpoznání patogena a následné spuštění obranných reakcí. V tomto přehledném článku jsme se zaměřili na současné poznání molekulárních mechanismů, jakými rostliny vykonávají obranu. Na závěr představujeme vývoj modelů rostlinné imunity, s tím jak naše poznání roste.

Klíčová slova: efektor, imunita, MAMP, MTI, PRR

Summary

Trdá L., Janda M.: Plant immunity

Similarly to animals, plants possess an immune system that allows plants to efficiently react to various pathogenic microorganisms or other invading organisms, such as viruses or herbivores. The plant immunity relies on immediate pathogen detection and consecutive activation of defence responses. This review focuses on the actual knowledge of mechanisms by which plants execute defence. In addition, we summarise models of plant immune system as they have been evolving in the time course with our raising knowledge.

Keywords: effector, immunity, MAMP, MTI, PRR

ANALÝZA A CHARAKTERIZACE BIOMOLEKUL A BIOČÁSTIC KAPILÁRNÍMI ELEKTROMIGRAČNÍMI METODAMI

Tereza Tůmová^{1,2*}, Václav Kašíčka¹

¹Ústav organické chemie a biochemie, v. v. i., Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6,

²Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Technická 5, 166 28 Praha 6; tumova@uochb.cas.cz

Úvod

Kapilární elektromigrační (CE) metody se od doby průlomových experimentů na počátku osmdesátých let minulého století^{1,2} vyvinuly ve vysoce účinné a vysoce citlivé separační metody, široce využívané pro analýzu a charakterizaci mnoha druhů biologicky aktivních látek – aminokyselin, peptidů, bílkovin, nukleosidů, nukleotidů, nukleových kyselin, sacharidů, lipidů, steroidů, flavonoidů a jiných biomolekul³. V bioanalytickém výzkumu se staly významnou alternativou resp. doplňkem nejrozšířenějších separačních metod, vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) a klasické elektroforézy v polyakrylamidových gelech (PAGE). Ve srovnání s těmito metodami CE techniky vykazují řadu předností – vysokou separační účinnost dosahující stovek tisíc až milionů teoretických pater, krátkou dobu analýzy (typicky 5 – 20 minut), malou spotřebu chemikálií ve většinou ekologicky šetrném vodním prostředí a zejména vysokou citlivost na úrovni femtomol-attomol analytu v nano- až pikolitrovém nastříkovaném objemu vzorku. CE metody zahrnují několik separačních technik: zónovou elektroforézu ve volném roztoku (CZE) nebo v síťovacích (gelových) médiích (CSE resp. CGE), afinitní elektroforézu (ACE), izotachofózu (CITP), izoelektrickou fokusaci (CIEF), elektrokinetickou chromatografii (CEKC) a elektrochromatografii (CEC).

Základní experimentální uspořádání CE metod

Základní experimentální uspořádání je společné pro všechny výše uvedené CE metody⁴⁻⁷. Separace obvykle probíhá v tenké křemenné kapiláře o vnitřním průměru 25 – 100 μm a délce 20 – 80 cm. Kapilára je potažena tenkým vnějším polyimidovým povlakem, který zajišťuje její mechanickou pevnost a ohebnost. Oba konce kapilár jsou ponořeny do elektrodových nádobek, do kterých je prostřednictvím platinových elektrod zaváděno z vysokonapěťových zdrojů elektrického proudu separační napětí 10 – 30 kV, které vytváří elektrické pole o intenzitě několika set až 1000 V/cm. Použití takto vysokých intenzit elektrického pole je umožněno relativně nízkými hodnotami procházejícího elektrického proudu (většinou menšími než 100 μA) a účinným odvodem Jouleova tepla v důsledku příznivého poměru povrchu a objemu kapilárního separačního prostoru. Kapilára se plní pneumaticky vyvolaným přetlakem (1 – 5 bar) nad roztokem základního elektrolytu v elektrodové nádobce. Vzorek se do kapiláry zavádí hydrodynamicky stejným způsobem jako při plnění kapiláry, tj. přetlakem nad hladinou roztoku v mikrozkuřavce vzorku, avšak mnohem nižším tlakem, 5 – 20 mbar, po krátkou dobu,

5 – 20 s. Vzorek lze zavádět též elektrokineticky ponořením kapiláry a elektrody do nádoby vzorku a připojením elektrického pole na dobu jednotek až desítek sekund. Po připojení elektrického pole se jednotlivé látky vzorku v důsledku svých různých nábojů, rozměrů a tvarů začnou pohybovat různými rychlostmi a na tomto principu se od sebe oddělí. Separované látky jsou poté on-line detekovány pomocí tzv. on-column nebo end-column detektorů. On-column detektory využívají krátký úsek kapiláry přímo jako detekční celu, jsou jimi např. detektory spektrofotometrické, fluorometrické a bezkontaktní vodivostní. End-column detektory, např. hmotnostně spektrometrické (MS) a elektrochemické, detekují látky na výstupu z kapiláry. Častým doprovodným jevem CE separací je elektroosmotický tok (EOF). EOF vzniká působením elektrického pole na volný, v křemenné kapiláře s neupraveným vnitřním povrchem kladný náboj v difúzní části elektrické dvojvrstvy na rozhraní kapalně a pevné fáze. Kladný volný náboj je důsledkem částečné nebo úplné disociace silanolových skupin na vnitřní stěně kapiláry. Elektrické pole unáší kladně nabitě složky dvojvrstvy a v důsledku vnitřního tření v kapalině i celý objem roztoku v kapiláře směrem ke katodě. EOF unáší nabitě i nenabitě složky roztoku stejnou rychlostí, působí tedy jako separačně neselektivní síla, ale významně ovlivňuje dobu analýzy.

Separací principy CE metod

Kapilární zónová elektroforéza ve volném roztoku (CZE)

CZE je nejjednodušší kapilární elektromigrační technikou. Kapilára i elektrodové nádoby jsou naplněny homogenním základním elektrolytem (BGE) – obvykle pufrům. Vzorek je zaveden jako krátká zóna na počáteční krátký úsek kapiláry (cca 1 – 2 % její celkové délky). Po připojení vysokého napětí se po určitém čase jednotlivé složky vzorku oddělí do samostatných zón na základě svých různých pohyblivostí (rychlostí pohybu vztažených na jednotkovou intenzitu elektrického pole). Pohyblivosti látek jsou přímo úměrné jejich náboji a nepřímo úměrné jejich velikosti a viskozitě prostředí, ve kterém putují. Pohyblivosti látek ovlivňuje i tvar jejich molekul. Zóny jednotlivých složek vzorku postupně procházejí detektorem, nejčastěji UV-vis spektrofotometrickým. Z časového záznamu signálu detektoru, tzv. elektroforeogramu, je získávána kvalitativní i kvantitativní informace o složení daného vzorku. Kvalita daného analytu v daném BGE je dána migračním časem jeho zóny (píku), zatímco výška nebo plocha píku jsou přímo úměrné množství resp. koncentraci daného analytu¹⁻².

Kapilární zónová elektroforéza v síťovacích médiích (CSE resp. CGE)

CSE (CGE) je kapilární verze klasické elektroforézy v plošných polyakrylamidových a agarosových gelech. BGE pro CSE obsahuje kromě pufrujících složek dlouhé polymerní molekuly, např. polyakrylamid, polyethylenoxid, dextran, aj., jež svými vzájemně propletenými řetězci vytváří molekulární síto, zvané též fyzikální gel, ve kterém dochází k dělení středně velkých a vysokomolekulárních látek podle velikosti jejich molekul⁸. CSE v BGE obsahujícím navíc anionický detergent, sodium dodecyl sulfát (SDS), představuje kapilární alternativu velmi oblíbené a rozšířené klasické elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti tohoto detergentu (SDS-PAGE), často užívané pro dělení bílkovin a pro určování přibližné hodnoty jejich relativní molekulové hmotnosti.

Afinitní kapilární elektroforéza (ACE)

ACE zahrnuje několik módů, které využívají (bio)specifické interakce určitých složek vzorku s aditivem BGE⁹. Přitom dochází k selektivnímu ovlivňování pohyblivosti těchto složek vzorku, na jehož základě se od sebe a od ostatních složek vzorku oddělují. Typickým příkladem ACE je dělení enantiomerů opticky aktivních látek v BGE s přidavkem chirálních selektorů, nejčastěji cyclodextrinů. Ze závislosti pohyblivosti analytů na koncentraci chirálního selektoru či jiného aditiva (ligandu, receptoru) v BGE lze určovat vazebné konstanty komplexu analyt-selektor resp. analyt-ligand nebo analyt-receptor¹⁰.

Kapilární izotachoforéza (CITP)

CITP je elektroforéza probíhající v diskontinuálním systému elektrolytů¹¹. Vzorek se zavádí mezi vedoucí elektrolyt a koncový elektrolyt, přičemž pohyblivost složek vzorku musí být nižší než pohyblivost vedoucího elektrolytu a vyšší než pohyblivost koncového elektrolytu. Působením elektrického pole dojde po určitém čase k vytvoření ustáleného stavu, kdy jednotlivé složky vzorku putují stejnou rychlostí v ostře oddělených bezprostředně sousedících zónách. Nejčastěji používaným detektorem pro CITP je bezkontaktní vodivostní detektor. Časová závislost jeho signálu má charakteristický stupňovitý charakter, ve kterém výška stupně odpovídá kvalitě analytu a délka stupně jeho kvantitě. CITP je vhodná zejména pro kvantitativní analýzu malých iontů, např. nízkomolekulárních ionogenních příměsí a protiiontů léčiv, peptidů a bílkovin¹².

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

CIEF dělí amfoterní biomolekuly, proteiny a peptidy, podle jejich izoelektrických bodů v BGE složeném z nosných (poly)amfolytů vytvářejících gradient pH¹³. Zóna analytu se v ustáleném stavu zakoncentruje (zastří) v takovém místě separačního prostředí, jehož pH je rovno izoelektrickému bodu (pI) tohoto analytu. Poté jsou zóny hydrodynamicky nebo elektroelucí mobilizovány ve směru k detektoru, kterým jsou vizualizovány a kvantifikovány. Alternativně lze použít vizualizaci celé kolony pro simultánní zobrazení všech analytů bez nutnosti jejich mobilizace. CIEF ve spojení s MS de-

tekci představuje kapilární alternativu ke klasické dvoudimenzionální elektroforéze (2-DE) kombinující izoelektrickou fokusaci v prvním dělicím směru s elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti výše uvedeného detergentu SDS (IEF x SDS-PAGE) ve druhém směru kolmém na první směr. Obě metody se často využívají pro proteomické studie komplexních směsí bílkovin a peptidů.

Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC)

CEKC je kombinovaná technika využívající elektrokinetické jevy, elektroosmózu a elektroforézu, a chromatografický princip distribuce analytu mezi mobilní a pseudostacionární fázi¹⁴. Nejčastějším módem CEKC je micelární EKC (MEKC), která dělí látky na základě jejich rozdílné distribuce analytu mezi mobilní fázi tvořenou základním elektrolytem a v něm homogenně rozptýlenou micelární pseudofází anionického nebo kationického detergentu, např. SDS nebo cetyl trimethylammonium bromidu (CTAB). Přitom relativní pohyb těchto fází vůči sobě je zajištěn elektroosmotickým tokem obou fází jako celku a elektroforetickým pohybem micelární pseudofáze ve směru opačném. Zásadní výhodou MEKC je, že vedle látek elektricky nabitých umožňuje i dělení látek elektroneutrálních.

Kapilární elektrochromatografie (CEC)

CEC je rovněž kombinovaná technika využívající chromatografický princip distribuce analytu mezi stacionární a mobilní fázi a EOF jakožto hybnou sílu mobilní fáze¹⁵. Díky pravoúhlému rychlostnímu profilu EOF v téměř celém průřezu kapiláry (na rozdíl od parabolického rychlostního profilu tlakem vyvolaného toku mobilní fáze) dosahuje CEC vyšší separační účinnosti než s ní rozměrově srovnatelná kapilární kapalinová chromatografie (CLC). Podobně jako MEKC, i CEC může dělit jak látky ionogenní, tak i elektroneutrální.

Aplikace CE metod pro analýzu a charakterizaci biomolekul a biočástic

Aplikační možnosti CE metod jsou neobyčejně široké. Lze je využít pro separaci, analýzu a charakterizaci všech typů rozpustných, ionogenních i neionogenních, nízkomolekulárních biologicky aktivních látek i biočástic³. Dále budou stručně popsány možnosti CE metod pro nejčastěji analyzované typy biomolekul a biočástic.

Aminokyseliny, peptidy a bílkoviny

Aminokyseliny¹⁶, peptidy^{10,17,18} a bílkoviny¹⁸⁻²⁰ jakožto ve vodných pufrách dobře rozpustné amfoterní (poly) elektrolyty patří mezi nejčastější a nejvýznamnější biomolekuly analyzované CE metodami. Tyto metody jsou hojně využívány pro kvalitativní i kvantitativní analýzu aminokyselinových, peptidových i proteinových preparátů včetně léčiv a pro jejich stanovení v komplexních biologických matricích (krev, moč, buněčné a tkáňové extrakty). Významně se uplatňují při studiu posttranslačních modifikací bílkovin a při sledování enzymatických reakcí. Lze je využít i pro stanovení aminokyselinového složení a sekvence peptidů a bílkovin. Velmi důležité je také stanovení fyzikálně-chemických vlastností peptidů

a bílkovin (efektivních pohyblivostí a nábojů, izoelektrických bodů, disociačních konstant ionogenních skupin, relativních molekulových hmotností, Stokesových poloměrů, aj.), které přispívá k lepšímu pochopení vztahu mezi jejich strukturou a funkcí.

Detekce peptidů a bílkovin probíhá obvykle pomocí UV spektrofotometrie, fluorescenční spektroskopie a hmotnostní spektrometrie (MS). UV-detekce je založena na absorpci UV-záření peptidovou vazbou a aromatickými aminokyselinami (Trp, Tyr, Phe). Přítomnost těchto aromatických aminokyselin v peptidech a bílkovinách umožňuje jejich fluorescenční detekci s excitací v UV-oblasti kolem 250 – 280 nm. Pro fluorescenční detekci s excitací při vyšších vlnových délkách je nutné peptidy a bílkoviny derivatizovat fluorescenčními značkami²¹, které však mohou způsobit změnu náboje, což ovlivňuje rozlišení a kvantifikaci analytů a komplikuje využití této detekce v CIEF. Pro spojení CE-MS se nejčastěji používají techniky elektrosprejové ionizace (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI). UV spektrofotometrie obvykle poskytuje mikromolární až submikromolární koncentrační detekční limity, fluorescenční a MS detekce může být o 2 – 4 řády citlivější.

Nukleobáze, nukleosidy a nukleotidy

Nukleobáze, nukleosidy a nukleotidy rovněž patří mezi biomolekuly často analyzované CE metodami, jde o rozpustné ionogenní látky, tedy vhodné pro analýzu²². Aplikační oblasti jsou podobné jako v případě aminokyselin, peptidů a bílkovin, tj. jejich kvalitativní a kvantitativní analýza a stanovení v komplexních biomatricích. Významná je také jejich chirální analýza, studium jejich acido-bazických vlastností a určování fyzikálně-chemických parametrů.

Polynukleotidy a nukleové kyseliny

Polynukleotidy a nukleové kyseliny jsou polyelektrolyty s téměř konstantním poměrem náboje a velikosti molekuly v širokém rozsahu délky jejich řetězců, tudíž s minimálními rozdíly jejich elektroforetických pohyblivostí ve volném roztoku. K jejich dělení se proto využívá CSE resp. CGE v síťovacích prostředích^{8,23}. V devadesátých letech minulého století se CGE separace polynukleotidů a fragmentů DNA stala základní metodou pro sekvenování DNA a výrazně přispěla k urychlení zjištění sekvence lidského genomu. V jednom CGE experimentu bylo možno určit sekvenci fragmentu DNA obsahujícího více než tisíc nukleotidů²⁴. V dnešní době jsou pro sekvenování DNA používány podstatně rychlejší metody, tzv. next generation sequencing methods²⁵, ale CGE je stále velmi ceněnou metodou pro přesné stanovení sekvence určitých úseků DNA²⁶ a pro studium polymorfismu a methylace DNA a analýzu mikroRNA²⁷.

Sacharidy

Sacharidy představují pro CE metody poněkud méně vhodné analyty. Je tomu tak proto, že ve svých molekulách nemají chromofory nebo fluorofory, a proto nemohou být detekovány nejběžnějšími technikami založenými na měření absorpce UV záření nebo fluorescenci. K jejich detekci je nutno použít méně často rozšířený

univerzální bezkontaktní vodivostní detektor nebo je nutné sacharidy derivatizovat UV-absorbujícími nebo fluorescenčními značkami. Nevýhodou je rovněž omezená ionizovatelnost jejich funkčních skupin, např. hydroxylové skupiny běžných mono- a oligosacharidů disociují až v silně alkalickém prostředí, pH > 12, které je elektricky silně vodivé a k CE separacím méně vhodné. K elektroforetickému dělení sacharidů se využívá jejich komplexace s boráty, která jim udělí elektrický náboj a zvýrazní rozdíly v jejich elektroforetických pohyblivostech i v méně alkalickém prostředí. I přes výše uvedené problémy jsou CE metody využívány pro analýzu mono-, oligo- i polysacharidů²⁸⁻³⁰.

Další biologicky aktivní látky

CE metodami lze analyzovat i řadu dalších biologicky aktivních látek, např. biogenní aminy³¹, lipidy³², steroidy³³, flavonoidy³⁴, aj.

Léčiva

CE metody jsou hojně využívané jako vysoce účinné a vysoce citlivé analytické techniky pro kvalitativní i kvantitativní analýzu léčiv, zejména při kontrole čistoty aktivních léčivých preparátů a při stanovení přídatných látek a protiiontů^{12,35,35}. Při ověřování struktury analyzovaných látek se využívá spojení CE metod s MS detekcí. Výběr vhodné CE metody a experimentálních podmínek se odvíjí od typu výše uvedených biologicky aktivních látek a jejich chemického složení. Ionogenní látky jsou analyzovány elektroforetickými metodami (CZE, CSE, ACE, CIP, CIEF), neutrální látky kombinovanými elektrochromatografickými metodami (CEKC a CEC). Při vývoji léčiv jsou CE metody využívány i pro stanovení jejich fyzikálně-chemických parametrů, např. relativních molekulových hmotností, efektivních nábojů, izoelektrických bodů, disociačních konstant a konstant stability jejich komplexů s různými ligandy či receptory.

Biočástice

CE metody nabízejí široké možnosti i pro analýzu biočástic: buněk, buněčných organel, bakterií a virů³⁷⁻³⁹. Tyto částice se v elektrickém poli pohybují a oddělují v důsledku svých různých povrchových nábojů, rozměrů a tvarů. Manipulace s jednotlivými buňkami je velmi náročná, proto bylo k zavedení jednotlivých buněk do kapiláry vyvinuto několik nových mikrotechnik, jako např. nanopipety, levitace, optické pinzety a laserové mikropipety. Buňky i ostatní biočástice jsou nejčastěji detekovány pomocí UV-spektrofotometrického nebo fluorescenčního detektoru. Miniaturní rozměry kapilárního separačního prostoru umožňují i analýzu obsahu jednotlivých buněk⁴⁰. Viry jsou obaleny lipidovo-proteinovou kapsidou, která chrání jejich DNA nebo RNA genom. Aminokyseliny této kapsidy nesou elektrický náboj, který umožňuje jejich pohyb v elektrickém poli a elektroforetickou analýzu. Pomocí CE byla analyzována řada virů, např. virus tabákové mozaiky, lidský rhinovirus, adenovirus, aj.³⁸. Byly stanoveny koncentrace virových a subvirových částic i kapsidových proteinů, jejich elektroforetické mobility a izoelektrické body a byly též studovány jejich interakce s protilátkami a receptory.

Závěr

Z výše uvedených příkladů vyplývá, že kapilární elektromigrační metody představují mocný nástroj pro vysoce účinnou separaci, vysoce citlivou kvalitativní i kvantitativní analýzu a fyzikálně chemickou a bio-

chemickou charakterizaci širokého spektra biologicky aktivních látek. Uplatnění nacházejí v biologickém, biochemickém a biomedicinském výzkumu i v analytické praxi ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu a ve zdravotnictví.

Literatura

1. Jorgenson JW, Lukacs KD: *Anal. Chem.* 53, 1298 (1981).
2. Jorgenson JW, Lukacs KD: *Science* 222, 266 (1983).
3. Harstad RK, Johnson AC, Weisenberger MM et al.: *Anal. Chem.* 88, 299 (2016).
4. Kasicka V: *Chem. Listy*. 91, 320 (1997).
5. Lauer HH, Rozing GP: *High Performance Capillary Electrophoresis. A primer*, Agilent Technologies 2009.
6. Garcia CD, Chumbimuni-Torres KY, Carrilho E: *Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis: Principles, Applications, and Limitations*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2013.
7. Kasicka V (2015): *Capillary electromigration techniques: Capillary electrophoresis*, In: Anderson, J. L., Berthod, A., Estevez, V. P., and Stalcup, A. M. (Eds.), *Analytical Separation Science*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015, pp. 505-529.
8. Chung M, Kim D, Herr AE: *Analyst* 139, 5635 (2014).
9. Albishri HM, El Deeb S, AlGarabli N et al.: *Bioanalysis* 6, 3369 (2014).
10. Stepanova S, Kasicka V: *J. Sep. Sci.* 38, 2708 (2015).
11. Bahga SS, Santiago JG: *Analyst* 138, 735 (2013).
12. Stepanova S, Kasicka V: *J. Sep. Sci.* 37, 2039 (2014).
13. Silvertand LHH, Torano JS, van Bennekorn JW et al.: *J. Chromatogr. A* 1204, 157 (2008).
14. Silva M: *Electrophoresis* 34, 141 (2013).
15. Cikalo MG, Bartle KD, Robson MM et al.: *Analyst* 123, 87R (1998).
16. Poinot V, Ong-Meang V, Gavard P et al.: *Electrophoresis* 37, 142 (2016).
17. Kasicka V: *Electrophoresis* 37, 162 (2016).
18. Righetti PG, Sebastiano R, Citterio A: *Proteomics* 13, 325 (2013).
19. Stepanova S, Kasicka V: *J. Sep. Sci.* 39, 198 (2016).
20. Zhu ZF, Lu JJ, Liu SR: *Anal. Chim. Acta* 709, 21 (2012).
21. Ban E, Song EJ: *J. of Chrom. B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 929, 180 (2013).
22. Chen XJ, Yang FQ, Wang YT et al.: *Electrophoresis* 31, 2092 (2010).
23. Lian DS, Zhao SJ: *J. of Chrom. B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 978, 29 (2015).
24. Carrilho E, Ruizmartinez MC, Berka J et al.: *Anal. Chem.* 68, 3305 (1996).
25. Niedringhaus TP, Milanova D, Kerby MB et al.: *Anal. Chem.* 83, 4327 (2011).
26. Hert DG, Fredlake CP, Barron AE: *Electrophoresis* 29, 4618 (2008).
27. Ban E, Song EJ: *Anal. Chim. Acta* 852, 1 (2014).
28. Hu YY, Wang T, Yang XB et al.: *Carbohydrate Polymers* 102, 481 (2014).
29. Galeotti F, Coppa GV, Zampini L et al.: *Electrophoresis* 35, 811 (2014).
30. de Souza IM, da Silva MN, Figueira ES et al.: *Electrophoresis* 34, 3221 (2013).
31. Daniel D, dos Santos VB, Vidal DTR et al.: *J. Chrom. A* 1416, 121 (2015).
32. Otieno AC Mwangela SM: *Anal. Chim. Acta* 624, 163 (2008).
33. Nyakubaya VT, Durney BC, Ellington MCG et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6985 (2015).
34. Liu XG, Wu SQ, Li P et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113, 212 (2015).
35. El Deeb S, Watzig H, Abd El-Hady D et al.: *Electrophoresis* 35, 170 (2014).
36. Tamizi E, Jouyban A: *Electrophoresis* 36, 831 (2015).
37. Kremser L, Blaas D, Kenndler E: *Electrophoresis* 25, 2282 (2004).
38. Kremser L, Blaas D, Kenndler E: *Electrophoresis* 30, 133 (2009).
39. Horka M, Tesarova M, Karasek P et al.: *Anal. Chim. Acta* 868, 67 (2015).
40. Kleparnik K, Foret F: *Anal. Chim. Acta* 800, 12 (2013).

Souhrn

Tůmová T., Kašíčka V.: Analýza a charakterizace biomolekul a biočástic kapilárními elektromigračními metodami

Tento příspěvek stručně popisuje základní principy, instrumentaci a metodologii vysokoúčinných kapilárních elektromigračních metod (zónové elektroforézy, izotachoforézy, izoelektrické fokusace, afinitní elektroforézy, elektrokinetické chromatografie a elektrochromatografie), a jejich využití pro vysoce účinné separace, vysoce citlivé kvalitativní a kvantitativní analýzy a fyzikálněchemické a biochemické charakterizace široké škály biologicky aktivních sloučenin, např. aminokyselin, peptidů, proteinů, nukleobází, nukleosidů, nukleotidů, nukleových kyselin, sacharidů a dále biočástic – buněk, buněčných organel, bakterií a virů.

Klíčová slova: Kapilární elektroforéza; bioanalýza; léčiva; biomolekuly; biočástice

Summary

Tůmová T., Kašíčka V.: Analysis and characterization of biomolecules and bioparticles by capillary electromigration methods

This article briefly describes the basic principles, instrumentation and methodology of high-performance capillary electromigration methods (zone electrophoresis, isotachopheresis, isoelectric focusing, affinity electrophoresis, electrokinetic chromatography and electrochromatography) and their applications to high-efficient separation, high-sensitive qualitative and quantitative analysis and physicochemical and biochemical characterization of a wide range of biologically active compounds, such as amino acids, peptides, proteins, nucleobases, nucleosides, nucleotides, nucleic acids, saccharides, as well as bioparticles – cells, cell organelles, bacteria and viruses.

Keywords: Capillary electrophoresis, bioanalysis, drugs, biomolecules, bioparticles

METODY ANALÝZY OLIGOSACHARIDOVÉHO ŘETĚZCE GLYKOPROTEINŮ

Tereza Přerovská

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Technická 5, 166 28 Praha 6; tereza.prerovska@vscht.cz

Úvod

Glykosylace hraje důležitou roli v mnoha biologických procesech, a klíčem k jejich porozumění je zjištění primární struktury glykokonjugátů.¹ Kromě porozumění funkci glykanů v biologických procesech může zjištění jejich složení a struktury vést k objasnění experimentálních nesrovnalostí, jako jsou molekulová hmotnost, náboj a retenční čas proteinů předpovězených z polypeptidové sekvence.² V porovnání s proteiny a nukleovými kyselinami je analýza oligosacharidů mnohem komplikovanější, což je způsobeno jejich komplexitou. Tato komplexita vyplývá zejména z velkého množství možných vazeb mezi monosacharidy, které mohou tvořit lineární i větvené struktury, a také z možných modifikací sacharidů zahrnujících sulfataci, fosforylaci a acetylaci. Na rozdíl od proteinů, jejichž struktura je kódovaná v genomu, nemají glykany žádný templát a jsou syntetizovány skupinou kompetujících enzymů, což vede k tvorbě různých glykoform. Zmíněná strukturní heterogenita je další komplikací analýzy struktury oligosacharidů. V současné době není žádná univerzální, rychlá a spolehlivá metoda identifikace struktury oligosacharidů. Pouze je možné na základě požadavků výzkumu zvolit nejlepší metodu nebo jejich kombinaci.^{1,2,3}

Detekce glykanů

Přítomnost glykosylace proteinů je prokazována PAS reakcí (periodic acid-Schiff), jejíž principem je oxidace glykolových skupin cukru kyselinou jodistou na aldehydové skupiny, které následně reagují se Schiffovým činidlem za vzniku červenofialové nerozpustné sraženiny. Tato reakce může být provedena po SDS-PAGE, Western blotu nebo histochemických metodách, a ačkoliv není použitelná na všechny glykokonjugáty, tak se velmi často používá pro prvotní stanovení. Komerčně dostupné soupravy umožňují detekci 5 – 10 ng glykoproteinu.^{2,4}

Další možností je využití lektinů, které se používají k detekci glykoproteinů separovaných pomocí SDS-PAGE a následně imobilizovaných na membránu pomocí Western blotu. Díky specifitě lektinů nám toto stanovení dává předběžnou informaci o přítomných strukturách oligosacharidů. Při kolorimetrické detekci jsou vyžadovány mikrogramy glykoproteinu, a pokud je použita chemiluminescenční detekce, jsou dostačující nanogramy.^{2,3,4,5}

Stanovení monosacharidového složení oligosacharidů

Před stanovením monosacharidového složení glykanů je obvykle glykan odštěpen z proteinu, ačkoliv často mohou být získány zajímavé informace z analýzy celého glykokonjugátu. N-oligosacharidy všech typů mohou být enzymově odštěpeny pomocí amidasy zvané

PNGasa F, která štěpí amidovou vazbu v asparaginu, na kterém je navázán první N-acetylglukosamin, za vzniku aspartátu. Pokud je na první N-acetylglukosamin navázána (α 1-3) Fuc PNGasa F není schopna N-oligosacharid odštěpit a musí být použita PNGasa A. Denaturace glykokonjugátu před tímto štěpením je výhodná z důvodu lepší enzymové přístupnosti. Enzymové štěpení glykanů se většinou používá v případě N-oligosacharidů, i když je možné použít i chemické metody, které se používají spíše v případě O-oligosacharidů, které nemají jednotné jádro. Zatím je známa pouze jedna specifická α -N-acetylgalaktosaminidasa odštěpující O-oligosacharidy s jádrem typu 1. Z tohoto důvodu se u O-oligosacharidů většinou používá hydrazinolýza nebo alkalická β -eliminace.^{2,4,5}

Následuje rozštěpení glykosidových vazeb oligosacharidu, nejčastěji kyselou hydrolýzou. Metodika kyselé hydrolýzy se liší, ale obvykle se uvádí použití kyseliny chlorovodíkové při teplotě 80 °C po dobu 18 hodin nebo 4 M trifluoroctové kyseliny při teplotě 100 °C po dobu 4 hodin. Pro přesnou analýzu je důležité, aby hydrolýza byla kompletní a nedošlo k poškození uvolněných monosacharidů. U aminosacharidů je obvykle po kyselé hydrolýze vyžadována re-N-acetylace.^{2,4,5}

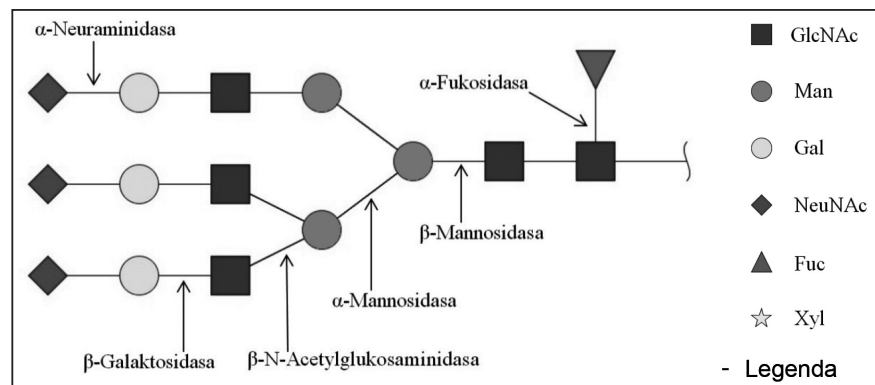
Získané monosacharidy mohou být identifikovány vysokoúčinnou iontově výměnnou chromatografií na aniontovém měnič spojenu s pulzní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD), plynovou chromatografií (GC), fluoroforem asistovanou elektroforézou sacharidů (FACE) nebo vysoce citlivou a reprodukovatelnou vysokoúčinnou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC).^{2,4,5,6} Ačkoliv má HPAEC-PAD výhodu citlivé detekce i bez derivatizace, může zde být problém s nestabilitou základní linie, ztrátou citlivosti kvůli šumu, použitím vysokých pH a vysokých koncentrací solí. Navíc je PAD nespecifický vůči různým typům sacharidů.^{2,7} Citlivost detekce metod HPLC nebo FACE může být zvýšena derivatizací monosacharidů fluorescenčními značkami jako jsou kyselina 2-aminobenzoová, 2-aminobenzamid, kyselina 8-aminonafthalen-1,3,6-trisulfonová a další.^{4,5,7,8} Díky vysokému rozlišení je často používána plynová chromatografie, která ovšem vyžaduje těkavé látky. Jelikož sacharidy jsou poměrně málo těkavé, zvyšuje se jejich těkavost derivatizací, jako je oximace, přímá silylace, převedení na acetáty nebo trimethylsilylery a další. Analýza vazby je možná, pokud byl oligosacharid derivatizován před kyselou hydrolýzou permethylací. Nejčastější detektory používané pro analýzu sacharidů jsou plamenový ionizační detektor (FID) a hmotnostní spektrometr (MS).^{2,9}

Stanovení struktury oligosacharidů pomocí štěpení exoglykosidasami

Výše uvedené metody poskytují užitečnou informaci o molární koncentraci monosacharidů vyskytujících se

v oligosacharidu, avšak pomocí nich obvykle nezjistíme typy vazeb. Informace o vazbách mezi jednotlivými sacharidy můžeme zjistit pomocí exoglykosidas.⁵ Exoglykosidas jsou enzymy štěpící koncové sacharidy z neredukujícího konce oligosacharidu, jsou vysoce specifické vůči

minimalizované použitím dextranového žebříčku značeného 2-aminobenzamidem jako vnitřního standardu. Získaná data jsou snadno reprodukovatelná. Struktura glykanů může být analyzována po štěpení skupinou exoglykosidas.^{2, 11, 12}



Obr. 1: Příklad možného štěpení exoglykosidasami.

anomerům, často také vůči typu monosacharidu či vazbě, někdy dokonce i vůči dalším strukturním faktorům, jako je například větvení.¹⁰ Použitím specifických exoglykosidas dojde k postupnému odštěpování monosacharidů z oligosacharidu, což nám na základě použitých enzymů a úspěšnosti štěpení dá informaci o anomericitě a pozici vazby mezi jednotlivými monosacharidy (Obr. 1). Metoda RAAM (Reagent Array Analysis Method) místo jednotlivých exoglykosidas používá jejich skupinu, kdy je vzorek rozdělen do několika alikvot a každá z nich je inkubována s jinou skupinou exoglykosidas. V každé reakční směsi vznikne fragment, který již dané exoglykosidas nejsou schopné dál štěpit. Tímto způsobem vznikne unikátní set fragmentů, který může být rekonstruován, většinou pomocí softwaru.^{5, 10} Pokud je štěpení exoglykosidasami kombinováno s vysokoúčinnými separačními metodami, jako je chromatografie nebo elektroforéza, jedná se o rychlou a nákladově efektivní charakterizaci oligosacharidů. Při detekci metodou laserem indukované fluorescence mohou být sekvenována pikomolární množství purifikovaného glykoproteinu.

Detailní analýza sekvence a vazeb oligosacharidů

K detailnější analýze se využívají zejména tři metody: *hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)*, *kapilární elektroforéza (CE)* a *hmotnostní spektrometrie (MS)*. Na rozdíl od výše zmíněných metod založených na vysokoúčinné kapalinové chromatografii, hydrofilní interakční chromatografie umožňuje kvalitnější separaci glykanů. Retenční časy se liší dle hydrofilního charakteru molekuly, který je závislý na velikosti, náboji, složení, struktuře, vazbě a větvení oligosacharidu. Hlavní výhodou je schopnost separace strukturních izomerů. Jelikož většina sacharidů neabsorbuje v UV oblasti, je pro citlivou detekci nutná derivatizace. Z tohoto důvodu se využívají fluorescenční značky jako například 2-aminobenzamid, který má oproti ostatním značkám několik výhod. Mezi ně patří kompatibilita s jinými metodami, možnost zjištění relativních množství jednotlivých oligosacharidů při stechiometrii 1:1 a současná analýza neutrálních a nabitých oligosacharidů. Odchylky jsou

Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE-LIF) se stala velmi úspěšným analytickým nástrojem s širokým uplatněním, včetně analýzy sacharidů. Na základě schopnosti ionizace se sacharidy dělí do dvou skupin, jednou z nich jsou sialové kyseliny nazývané kyselé sacharidy a druhou skupinou jsou neutrální sacharidy, které se ionizují pouze slabě, a proto je jejich separace obvykle založena na komplexaci boráty, což jim propůjčí negativní náboj. Případně mohou být separovány za vysokého pH, kdy dojde k jejich deprotonaci a již není potřebná komplexace. Z důvodu detekce je nutná derivatizace obvykle reduktivní aminací, obzvláště výhodné je využití *kyseliny 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonové*, kdy dojde k vytvoření nabitých fluorescenčních derivátů, což umožní migraci v elektroforetických podmínkách i detekci. Hlavními výhodami této metody jsou krátké časy analýz, dobré rozlišení, nízká spotřeba drahých reagensů i rozpouštědel a v neposlední řadě malá množství vzorků potřebných pro analýzu. CE-LIF umožňuje detekci 10^{-15} – 10^{-18} mol sacharidu.^{2, 13, 14, 15, 16, 17}

Široce rozšířenou metodou analýzy glykanů je i tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), pomocí které se analyzují buď samotné glykany, nebo celé glykoproteiny. Jedná se o jednu z nejvýkonnějších metod díky její specifitě, nízké spotřebě vzorků a kompatibilitě s chromatografickými separačními metodami. Nejčastěji používané ionizační techniky jsou *ionizace laserem* za účasti matrice (MALDI) a *ionizace elektrosprejem (ESI)*. Zatímco spektrometry s ESI mohou být kombinované s širokým spektrem hmotnostních analyzátorů, což umožňuje různé přístupy k analýze glykanů, spektrometry s MALDI bývají většinou kombinovány s analyzátozem doby letu (TOF). MALDI je relativně tolerantní vůči solím i kontaminantům a vyžaduje minimální úpravu vzorku, ale během ionizace dochází ke ztrátám sialových kyselin. ESI je vhodná pro přímou analýzu kyselých sacharidů, produkuje lépe rozlišitelné píky, ale je více náchylná vůči solím, vyžaduje větší úpravu vzorku a produkuje komplexní vzorec stavů nábojů. Jako slibné alternativní technologie fragmentace byly nedávno představeny elektronem aktivované disociační metody (ExD), mezi které patří disociace záchytem elektronu (ECD) a disociace přenosem elektronu (ETD). ECD a ETD selektivně fragmentují pouze peptidové vazby a zachovávají glykosidové vazby intaktní, což umožňuje identifikovat pozice, které byly glykosylovány. Před analýzou je vhodné separovat glykany například pomocí RP-HPLC, HILIC, CE a dalších. Výhodná je permethylace glykanů, pomocí které se stanou hydrofobní, což zlepšuje jejich odezvu vůči ionizaci, učiní je stabilnější a také sjednotí jejich chemické vlastnosti. K permethylaci se využívá deuterovaný methyljodid, pomocí kterého je zavedena stabilní izotopová značka kvůli kvantitativním

důvodům. Během tandemové hmotnostní spektrometrie nám permethylace umožňuje zjistit, která vazba byla štěpená, neboť všechny ostatní OH a NH skupiny budou derivatizované. Spektra celých glykoproteinů se získávají pomocí ESI nebo MALDI, ale jednotlivé glykoformy mohou být rozlišeny pouze z malých proteinů okolo 30 kDa obsahujících nejlépe pouze jedno místo pro glykosylace. Pokud je známa hmotnost proteinu, mohou být získány hmotnosti glykanů z rozdílu hmotností glykoproteinu a proteinu. Jelikož glykany obsahují pouze limitované množství monosacharidových typů, dávají jejich kombinace unikátní hmotnosti, na jejichž základě může být identifikováno složení glykanu. Větší glykoproteiny s několika místy pro glykosylace obvykle vykazují nerozlišitelné piky, a z tohoto důvodu je třeba tyto glykoproteiny štěpit proteasami. Obvykle se používá trypsin, případně je možné použít nescifickou proteasu, jako je proteinasa K. Před analýzou glykanů se obvykle jejich redukující konce derivatizují fluorescenčními nebo jinými značkami, které pomohou detekci. Složení je zjištěno přímou analýzou a strukturní detaily mohou být získány postupným štěpením exoglykosidázami a následnou analýzou. Interpretace získaných dat je hlavním problémem, proto je silná snaha o vytvoření softwaru, který bude schopen tyto data vyhodnotit a určit strukturu glykanu. Bohužel zatím žádný z nich se neprokázal jako plně funkční nástroj pro glykomiku. Příkladem je software GlycoWorkbench, který pomáhá

manuální interpretaci dat, kdy zhodnotí navržené struktury přiřazováním odpovídajících teoretických hmotností fragmentů k pikům nalezeným ve spektru.^{2,18,19,20,21,22}

Stanovení terciární struktury oligosacharidů

Pro popis 3D struktury glykanů je nezbytná kombinace experimentálních technik a molekulového modelování. Rentgenová krystalografie, která se běžně používá pro analýzu proteinů, má problémy s flexibilní strukturou glykanů. Jelikož sacharidy obsahují dvě přirozeně aktivní jádra ^{13}C a ^1H , poskytuje nukleární magnetická rezonance (NMR) doplňující informace. Jedná se o nedestruktivní metodu, pomocí které jsou získány informace týkající se struktury oligosacharidů. Mezi tyto informace se řadí typy sacharidů, velikost kruhů, anomerní konfigurace, pozice vazeb, a jejich sekvence. Po zjištění těchto základních dat je užitečné zjistit 3D relativní vzájemné uspořádání monosacharidů (konformaci), jejich flexibilitu a také dynamiku. K jejich objasnění byla použita kombinace NMR spektroskopie kapalného stavu a simulace pomocí molekulární dynamiky. Hlavní nevýhodou této metody je požadavek vysoké čistoty glykanů, velké množství vzorku (obvykle více než 1 miligram) a komplexita analýzy získaných dat. Ačkoliv už jsou dostupné NMR databáze a také specializovaný software, tak tato metoda není běžně používána.^{2,5,23}

Literatura:

- Hyun JA, et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 421 (2009).
- Mariño K, et al.: *Nature* 6, 713 (2010).
- Krishnamoorthy L, Mahal LK: *ACS Chem. Biol.* 4, 715 (2009).
- Mulloy B, et al.: Chapter 47 *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY) 487 (2009).
- Brooks SA, et al: *Functional and Molecular Glycobiology*, 1st ed.; BIOS Scientific Publishers Limited: Oxford (2002).
- Saddic GN: Carbohydrate Composition Analysis of Glycoproteins Using Highly Sensitive Fluorescence Detection Methods. *Post-translational Modifications of Proteins*, 1st ed.; Humana Press 23 (2002).
- Anumula KR, Dhume ST: *Glycobiol.* 8, 685 (1998).
- Man P, Bezouška K: *Chem. Listy* 100, 1084 (2006).
- Ruiz-Matute AI, et al.: *J. Chrom. B* 1 (2010).
- Prime S, Merry T: *Methods Mol. Biol.* 76, 53 (1998).
- Mariño K, et al.: *Glycobiol.* 21, 1317 (2011).
- Pabst M, Altmann F: *Proteomics* 11, 631 (2011).
- Krylov SN, Dovichi NJ: *Anal. Chem.* 72, 111 (2000).
- Hilz H, et al.: *J. Chrom. A* 1 (2006).
- Chapman J, Hobbs J: *Magazine Separation Sci.* 17, 86 (1999).
- Altria KD, Elder D: *J. Chrom. A* 1023, 1 (2004).
- Rassi Z: *High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*; Beckman Instruments (1996).
- Yu X, et al.: *Anal. Chem.* 85, 10017 (2013).
- Ceroni A, et al.: *J. Proteome Res.* 7, 1650 (2008).
- Zaia J: *J. Integrative Biol.* 14, 401 (2010).
- Harvey DJ: *Proteomics* 5, 1774 (2005).
- Leymarie N, Zaia J: *Anal. Chem.* 84, 3040 (2012).
- Widmalm G: *Carbohydrate Res.* 378, 123 (2013).

Souhrn

Přerovská T.: Metody analýzy oligosacharidového řetězce glykoproteinů

Analýza struktury oligosacharidů je komplikovaná jejich komplexitou, která je daná velkým počtem možných vazeb mezi monosacharidy, množstvím různých typů monosacharidů a možností jejich modifikací zahrnujících sulfataci, fosforylaci a acetylaci. V současné době neexistuje žádná univerzální, rychlá a spolehlivá metoda na identifikaci struktur oligosacharidů. Jako nejslibnější metody se jeví hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), kapilární elektroforéza (CE) a hmotnostní spektrometrie (MS). Těmito metodami lze určit sekvenci a vazby monosacharidů v oligosacharidu. Pro popis 3D struktury je nezbytná kombinace nukleární magnetické rezonance (NMR) a molekulového modelování.

Summary

Přerovská T.: Methods of analysis of the oligosaccharide chains of glycoproteins

Analysis of the structure of the oligosaccharides is complicated by their complexity, which is given by a large number of possible linkages between monosaccharides, many different types of monosaccharides and their possible modifications, including sulfation, phosphorylation, and acetylation. Currently, there is no universal, fast and reliable method to identify oligosaccharide structures. As the most promising methods seem to be hydrophilic interaction chromatography (HILIC), capillary electrophoresis (CE) and mass spectrometry (MS). These methods can determine the sequence and links between monosaccharides in oligosaccharide. For a description of the 3D structure is essential combination of nuclear magnetic resonance (NMR) and molecular modeling.

OBSAH

Úvodem	17
Havelka P: Lonza přináší zákazníkům odborné znalosti biotechnologie a výroby speciálních chemických látek a ingrediencí	18
Trdá L., Janda M.: Rostlinná imunita	20
Tůmová T., Kašička V.: Analýza a charakterizace biomolekul a biočástic kapilárními elektromigračními metodami	25
Přerovská T.: Metody analýzy oligosacharidového řetězce glykoproteinů	29

CONTENTS

Editorial	17
Havelka P: Lonza brings the expertise in biotechnology and production of special chemicals and ingredients to its customers	18
Trdá L., Janda M.: Plant immunity	20
Tůmová T., Kašička V.: Analysis and characterization of biomolecules and bioparticles by capillary electromigration methods	25
Přerovská T.: Methods of analysis of the oligosaccharide chains of glycoproteins	29

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. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
Doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (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, Albertov 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

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).