

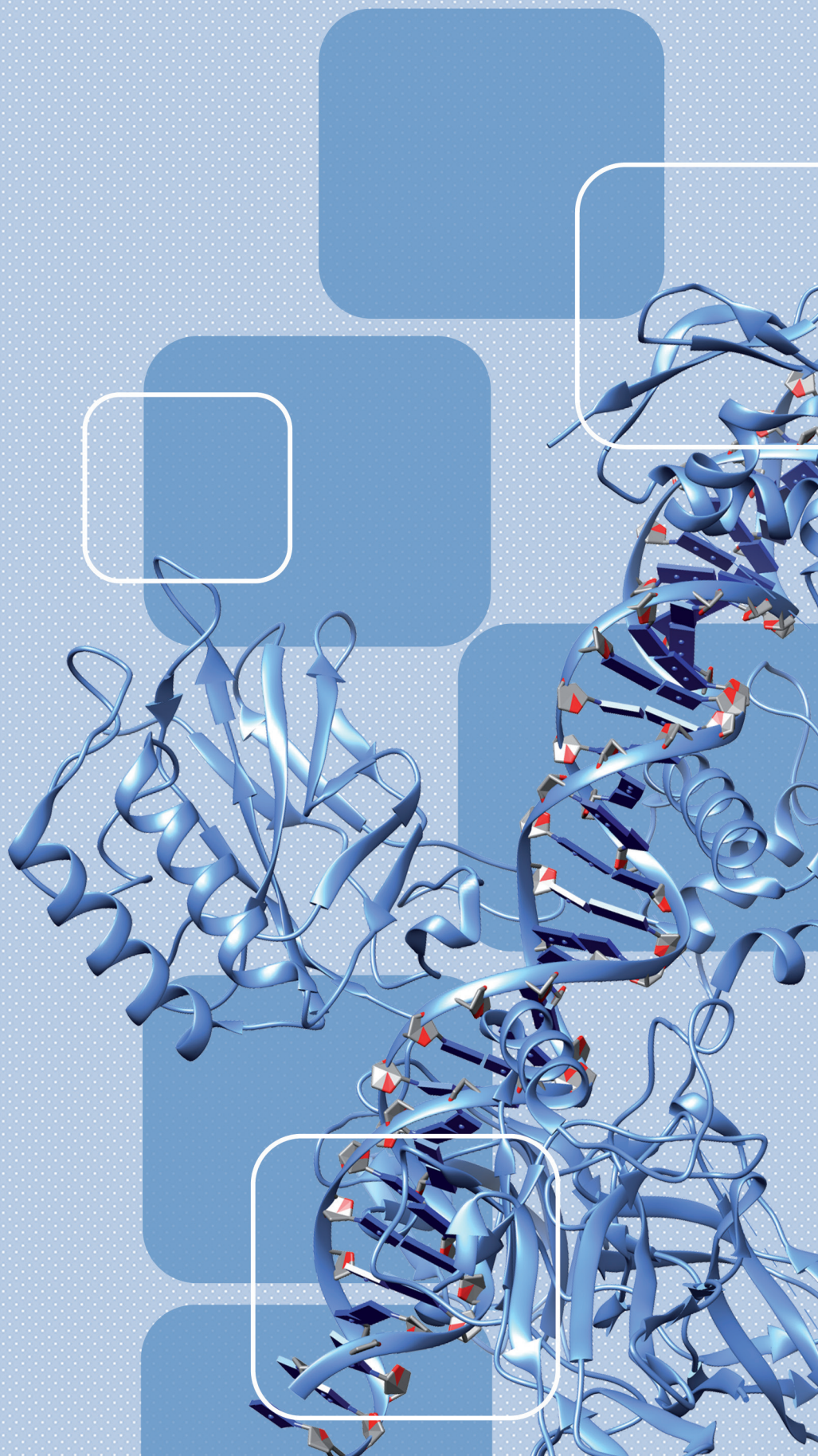
Bio

Ročník 27 • Číslo 2/2017

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,

dovolte nám, abychom Vás stručně seznámili s úspěšným průběhem mezinárodního symposia BioTech 2017, které se konalo spolu s již 7. ročníkem česko-švýcarského symposia a výstavou nejvýznamnějších dodavatelů biotechnologického vybavení a materiálu v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích ve dnech 13. – 17. 6. 2017.

Ještě před vlastním zahájením symposia proběhlo několik zajímavých akcí. Švýcarští partneři z Institute of Chemistry and Biotechnology, ZHAW zorganizovali veřejnosti přístupný workshop „New Business Opportunities: **Reinforcing the links between industry, research and biotechnology**“. Pracovníci Ústavu biotechnologie VŠCHT využili účasti čínských partnerů na této mezinárodní konferenci a prodiskutovali možnosti vzájemné spolupráce na bilaterálním projektu „**Production of biobutanol and succinic/lactic acid from lignocellulose biomass**“. Ve spolupráci s nakladatelstvím Taylor & Francis nabídli organizátoři symposia všem zájemcům z vysokých škol i výzkumných ústavů dozvědět se, jak úspěšně publikovat ve vědeckých časopisech. Přednášku „**Publishing in academic journals: tips to help you succeed**“ přednesla Jenifer Stokes.

Oficiální zahájení konference proběhlo ve slavnostním rámci. Po zahájení (jménem organizátorů vystoupili Dr. Paulová a prof. Branyik) připoměl tradice česko-švýcarské spolupráce v chemii a biotechnologiích prof. Káš a pozdravil účastníky za Biotechnologickou společnost a ČSVTS. Poté přednesli zdravice významní hosté, kteří převzali patronát nad konferencí, a to místopředseda vlády Dr. Pavel Bělobrádek, předsedkyně AV ČR prof. Eva Zažímalová a starosta Prahy 6 Mgr. Ondřej Kolář. Za VŠCHT promluvil její rektor prof. Karel Melzoch a za Zurich University of Applied Sciences prof. Urs Hilber. Za švýcarské biotechnologické organizace pak vystoupil s velmi zajímavým projevem vicepresident Swiss Biotech Association Ulf Grawunder. Zahajovací den byl pak zakončen plenární přednáškou prof. Eda Bayera z Weizmann Institute of Science (Israel). Ve své přednášce provedl účastníky zajímavou historií výzkumu systému avidin-biotin, která vytvořila předpoklady k významným praktickým aplikacím.

V dalších třech dnech probíhala jednání vždy současně ve 3 odborných sekcích. Podrobnosti o jednotlivých přednáškách (jejich abstrakta) může zájemce nalézt v „Book of Abstracts“, kterou si lze prohlédnout či stáhnout z webové stránky symposia (<http://www.biotech2017.cz/domains/biotech2017.cz/data/uploads//>

[BioTech2017_abstractbook_web.pdf](http://www.biotech2017.cz/domains/biotech2017.cz/data/uploads//BioTech2017_abstractbook_web.pdf)). V této publikaci (ISBN 978-80-7080-989-1) lze najít i abstrakta všech prezentovaných posterů, informace o sponzorech, vystavovatelích a doprovodném programu. Ve fotogalerii, která je k dispozici také na webových stránkách (<http://www.biotech2017.cz/photo-gallery>) mohou zájemci nahlédnout do atmosféry symposia, kde kromě přednášek byl i dostatek času k diskusím při přestávkách, v posterové sekci nebo při doprovodném programu. V této souvislosti bychom rádi poděkovali všem, jejichž štědrá podpora přispěla k příjemné atmosféře, která během celé akce panovala. Jedná se zejména o sponzory, kteří podpořili buď jednotlivé studenty, dodali potravinářské výrobky či finančně podpořili konání této akce. Dále děkujeme všem vystavovatelům, kteří během symposia ukázali novinky z oblasti přístrojů a materiálů biotechnologické aplikace a všem s polupracovníkům za to, že vytvořili podmínky pro úspěšný průběh celé akce.

Této mezinárodní konference se účastnilo 270 registrovaných účastníků z 37 zemí. Bylo předneseno 93 ústních sdělení a vystaveno 107 posterů. Velice pozitivním jevem bylo, že zhruba polovina posterů (přesně 52) bylo prezentováno studenty z různých zemí. V této kategorii se podařilo nejlepší postery ocenit hodnotnými cenami (jak finančním oceněním, tak odbornými knihami). V tomto ohledu patří dík následujícím společnostem: Fondation Zdenek et Michaela Bakala, Competence Centre for Biocatalysis ZHAW a Taylor & Francis.

Účastníci symposia měli možnost v rámci doprovodného programu navštívit také různé kulturní akce. Velký zájem byl o gala dinner v Kaisersteinském paláci, jehož prostředí i výhled na noční Prahu z jeho terasy přítomné nadchnuly. Zájem byl i o večerní prohlídku pražských památek a exkursi do Plzeňského Prazdroje spojenou s návštěvou nově restaurovaného kláštera v Kladrubech.

Tímto výčtem však aktivity spojené se symposiumem nekončí. Vybraní účastníci symposia budou mít možnost podat přehledné články do speciálního čísla časopisu Biotechnology Advances vydávaného nakladatelstvím Elsevier, které vyjde začátkem příštího roku.

Redakce Bioprospectu přeje všem svým čtenářům příjemné prožití dovolených a zve vás na další ročník této akce, BioTech 2020, který se bude konat opět za tři roky.

Srdečně Vás zdraví

Vaši

Jan Káš a Petra Lipková

Biotech 2017

and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition

Prague Czech Republic



biotechnet
switzerland

DANONE

IOCB TTO
www.iocb-tto.cz



BRUKER



TEVA

LONZA

MILKO

FONDATION
ZDENEK ET MICHAELA
BAKALA

CC
BIO

Competence Center
for Biocatalysis

Sotio
MEMBER OF PPF GROUP

FERDINAND
SKUTEČNÉ PIVO

Roche

VTU
technology

CarolinaBiosystems

H Immobilien
IH Immobilien s.r.o.

NOVARTIS

LOBKOWICZ
Pivovary

chemgineering

securecell

SHIMADZU
Excellence in Science

SAVENCIA
FROMAGE & DAIRY

CZECH REPUBLIC

CZECH
UNIVERSITY
OF LIFE SCIENCES PRAGUE

fermentation
an open access journal by MDPI

m2p
labs

Microbioreactors

ENZYMEXT

VWR
We Enable Science

MERCK

UNIPRO
ALPHA

Taylor & Francis Group
an informa business

EBSCO
INFORMATION SERVICES

Schoeller
INSTRUMENTS

MANEKO

SOCOREX
SWISS

P-LAB

UNIVERSITY OF
CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
PRAGUE

Zurich University
of Applied Sciences

zhaw
Life Sciences and
Facility Management
Institute of
Chemistry and Biotechnology

Czech Biotechnology

Society

SWISS+
BIOTECH™
National Thematic Network

THE CZECH ASSOCIATION OF
SCIENTIFIC AND
TECHNICAL
SOCIETIES

scienceINDUSTRIES
SWITZERLAND

satw

ŽIVOTNÍ JUBILEUM prof. Ing. JANY ZABRANSKÉ, CSc.



Foto: Michal Ureš

Je to neuvěřitelné, ale stále skvěle mladistvě vypadající, plná energie a ve všem „up to date“ se dožila 1. dubna letošního roku 75 let. Den narození trochu připomíná, že je to žert, že to není pravda, ale snad je to návod, že být neustále v pohybu, řešit nové problémy, učit a psát publikace je lék na to být dlouho mlád. **Prof. Ing. Jana Zabranská, CSc.** dokončila inženýrské studium na VŠCHT v Praze v roce 1964, doktorské studium v r. 1969. Na Ústavu technologie vody a prostře-

dí nadále pracovala jako vědecký pracovník a odborný asistent (1969 – 1994). Od roku 1995 po úspěšné habilitaci zde působila jako docent a od roku 2004 jako profesor. Absolvovala zahraniční stáže v Itálii (1990) a USA (1993). Byla místopředsedkyní akademického senátu VŠCHT, členkou vědecké rady Fakulty technologie ochrany prostředí a řady komisí. Je členkou CzWA (České asociace pro vodu), CzBA (České bioplynové asociace), Biotechnologické společnosti, IWA (International Water Association, odborné skupiny Anaerobic Digestion, Sludge Treatment and Disposal. Hlavními tématy aktivit ve vědecké a pedagogické činnosti jsou anaerobní technologie – aplikace na čistírenské kaly a čištění odpadních vod, produkce bioplynu z bioodpadů a organických materiálů, anaerobní fermentace komunálního odpadu, bioplynové stanice, zemědělské odpady, rostlinná biomasa. Také se zabývá problémy vysoké koncentrace amoniakálního dusíku v anaerobní fermentační směsi a metodami jejího snižování, biologického odstraňování sulfanu z bioplynu a autotrofní denitrifikace se sulfidy. V poslední době se zabývá biologickými metodami zušlechťování bioplynu na biomethan. Je uznávaným odborníkem v této dnes tak významné oblasti podílející se na ochraně životního prostředí, vedla mnoho diplomových i doktorských disertačních prací. Je autorkou nebo spoluautorkou více než 270 vědeckých článků, 3 technologických patentů, 6 skript a 2 monografií. V naší Biotechnologické společnosti zastávala řadu funkcí (sekretáře, pokladníka, tajemníka, místopředsedkyni a člena organizačních výborů mezinárodních konferencí). Vždy byla klíčovou osobností Biotechnologické společnosti bez níž si její činnost ani nedovedu představit. Do dalších let přejeme Janě pevné zdraví a mnoho sil do dalšího aktivního života.

Jan Káš

ROLE NMR SPEKTROSKOPIE PŘI ZKOUMÁNÍ BÍLKOVIN

Richard Hrabal

Laboratoř NMR spektroskopie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; hrabalr@vscht.cz

Úvod

Historické začátky NMR spektroskopie

Základy spektroskopie nukleární magnetické resonance (NMR) položil svým objevem nukleárního magnetismu americký fyzik Isidor Isaac Rabi¹. NMR spektroskopie v podobě takové, jakou jí známe dnes, byla objevena v roce 1945 Felixem Blochem a Edwardem Purcellem, kteří byli za tento počin odměněni v roce 1951 Nobelovou cenou za fyziku^{2, 3}. Tehdy si málokdo dokázal představit, jak by mohla být tato metoda užitečná při zkoumání bílkovin. Po pravdě řečeno, v letech, těsně po svém objevu, byla NMR spektroskopie spíše jakousi hračkou pro fyziky bez valného praktického významu. Toto se změnilo již na přelomu 40. a 50. let minulého století, kdy byly učiněny zásadní objevy, jako např. chemický posun, nepřímá spin-spinová interakce, apod., které změnily NMR spektroskopii v účinný nástroj pro zkoumání kovalentní struktury molekul. V roce 1952 vyrobila americká firma Varian první komerční NMR spektrometr, který pracoval s rezonanční frekvencí 30 MHz pro jádro ^1H a byl vybaven elektromagnetem. Protože v tehdejší době ještě nebylo nic známo o využití Fourierovy transformace ve spektroskopii, jednalo se o tzv. CW přístroj (z anglického „continuous wave“). Takovéto NMR spektrometry pracovaly tak, že se buď zafixovala hodnota magnetického pole a kontinuálně se měnila ozařovací frekvence nebo naopak, přičemž NMR spektrum se rovnou zaznamenávalo na milimetrový papír. Tento přístup měl několik nevýhod. Za prvé, měření trvalo poměrně dlouho, např. záznam jednoho ^1H spektra (jeden spektrální průchod-sken) trval řádově minuty, za druhé, bylo možné měřit jen jádra s vysokou citlivostí jako např. ^1H , případně ^{19}F a za třetí, tento způsob měření neumožňoval provádět složitější experimenty. Nicméně i přesto NMR spektroskopie ve své tehdejší podobě přispěla k řešení mnoha vědeckých problémů spojených se zkoumáním fyzikálně-chemických vlastností molekul.

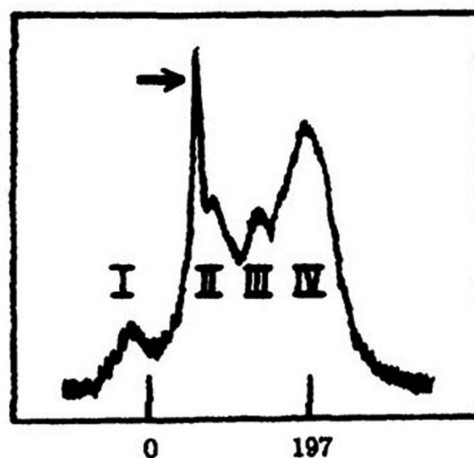
Zavedení Fourierovy transformace do NMR spektroskopie Richardem Ernstem v polovině 60. let minulého století změnilo tuto metodu od základů⁴. Vzhledem k tomu, že jeden průchod spektra (sken), se zkrátil řádově na 1-2 s, umožňuje tento způsob snímání dat tzv. koherentní střádání, kdy jsou data z jednotlivých skenů (průchodů) načítány do paměti přístroje. Vzhledem k tomu, že spektrální šum je náhodný, kdežto signál nikoliv, je možné vícenásobným opakováním skenu a načítáním dat dosáhnout většího odstupu signálu od šumu a tím pádem naměřit NMR spektrum i ze vzorku s nízkým obsahem měřené látky nebo měření málo citlivých jader, jako např. ^{13}C nebo ^{15}N . Dalším pozitivem zavedení Fourierovy transformace byla skutečnost, že tento způsob snímání dat vedl k vývoji složitějších experimentů, které pracují i s několika různými frekven-

cemi (jádry) najednou. Vývoj takovýchto experimentů vedl zákonitě k tzv. korelační spektroskopii, která se stala základem multidimensionální spektroskopie.

Ruku v ruce s vývojem metodiky šel i vývoj hardwaru. V dnešní době se již pro vysoko rozlišenou NMR spektroskopii nepoužívají elektromagnety. Byly nahrazeny supravodivými magnety, které umožnily dosáhnout vyšší magnetické pole a tím pádem i vyšších rezonančních frekvencí, pro ^1H až 1 GHz. Dalším přelomovým bodem, a to nejen pro NMR spektroskopii, bylo zavedení výpočetní techniky, bez jejíhož využití by nebylo možné složitě pulsní experimenty vůbec realizovat a naměřená data zpracovat. A nebyla to jen výpočetní technika, která posunula NMR spektroskopii na kvalitativně vyšší úroveň, metoda těžila a těží z rozvoje elektroniky, protože i ten nejjednodušší NMR spektrometr je velmi sofistikované a komplikované elektronické zařízení.

NMR v biologických systémech

První NMR spektrum bílkoviny, konkrétně se jednalo o ^1H spektrum ribonukleasy A, bylo naměřeno v roce 1957 na přístroji s pracovní frekvencí 40 MHz (Obr. 1)⁵.



Obr. 1: První NMR spektrum proteinu. 20%ní roztok ribonukleázy A v D_2O , ^1H spektrum měřeno na přístroji 40 MHz.

Z takovéhoho spektra nebylo možné vyčíst žádné nové informace a paradoxně se stalo brzdou dalšího rozvoje využití NMR spektroskopie při zkoumání bílkovin. Teprve později se ukázalo, že se jednalo o velký přelom, který otevřel cestu pro využívání NMR spektroskopie pro zkoumání biomolekul. Další rozvoj oboru byl intimně spjat s vývojem techniky pro měření NMR spekter, protože komplikovaná vodíková spektra, což byl v té době jediný výstup z měření biomolekul, nebylo možné jednoduše interpretovat. Z tohoto důvodu se většina prací z přelomu 50. a 60. let, zaměřila na porovnávání NMR spekter nativních proteinů a jejich denaturovaných forem^{6, 7}. Prvním, opravdu reálným využitím NMR spektroskopie, kdy skutečně neexistovala náhrada v podobě jiné metody, se stala acidometrická titrace

za účelem stanovení pK_a histidinu 15 v sekvenci lysozymu z vaječného bílku⁸. Poněkud odlišným přístupem se od počátku 60. let zabývala Mildred Cohn, která se snažila využít paramagnetických iontů pro studium bílkovin⁹. Paramagnetické ionty v komplexu s proteinem způsobují, díky svému volnému elektronovému páru, separaci některých NMR signálů od ostatních, což bylo tehdy velmi výhodné, protože se daly snadněji identifikovat. Po prvních úspěších této metody dokonce existovaly velmi odvážné předpovědi, že právě pomocí paramagnetických iontů a jejich vlivu na NMR signály proteinů by mohlo být možné identifikovat většinu signálů ve spektru a určit tak prostorovou strukturu bílkovin¹⁰.

Jeden z největších přelomů však nastal až v roce 1985, kdy Kurt Wüthrich publikoval první prostorovou strukturu bílkoviny, která byla vypočtena výhradně na základě experimentálních dat získaných pomocí NMR spektroskopie¹¹. Jednalo se o poměrně malou molekulu, konkrétně inhibitor trypsinu a vzhledem k tomu, že vzorek byl připraven izolací z přírodního materiálu (hovězího pankreatu), bylo možné využít pouze ^1H spektroskopii. Avšak, díky skutečnosti, že již byly k dispozici dvoudimensionální NMR experimenty, bylo možné ^1H -spektra interpretovat ve smyslu přiřazení signálů jednotlivým atomům vodíku a následně získat data, která byla využita při výpočtu struktury inhibitoru. Tato práce odstartovala nebývalý zájem o využití NMR spektroskopie pro zkoumání nejen proteinů, ale všech biologicky aktivních substancí a brzy byla následována mnoha dalšími. Zájem o využití NMR spektroskopie pro studium biomolekul se brzy stal hnací silou vývoje stále výkonnějších NMR spektrometrů, rozvoje metodiky, zpracování dat, apod.

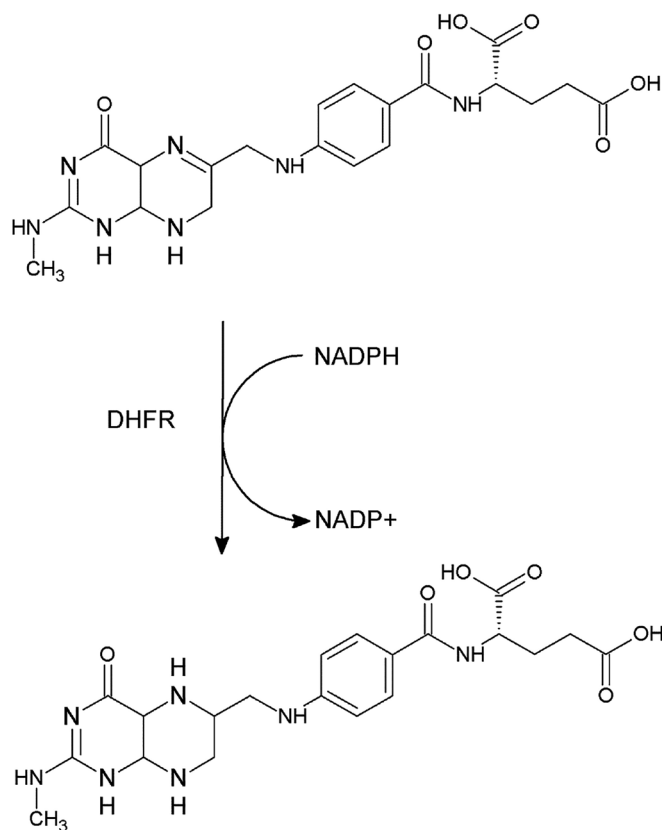
Dalším z přelomových momentů na začátku 90. let minulého století se stal nový způsob přípravy vzorků pro NMR experimenty^{12, 13}. Jednotlivé proteiny se začaly připravovat expresí příslušného genu ve vhodném expresním systému. Tento způsob přípravy vzorků přinesl mnoho výhod. Jednak vedl k odstranění zdlouhavé manipulace s přírodním materiálem, ať už to byly živočišné nebo rostlinné tkáně, ale zejména umožnil zvýšit obsah izotopů ^{13}C a ^{15}N až na 100%, což bylo klíčové pro jejich využití v NMR experimentech. Tento počin měl dalekosáhlé důsledky, protože vedl k vývoji multiresonančních, vícerozměrných NMR experimentů, které umožnily interpretovat spektra mnohem větších molekul. Takovéto experimenty poskytly také mnohem více experimentálních dat, což vedlo ke zpřesnění výsledných struktur. Zahrnutí izotopů ^{13}C a ^{15}N otevřelo cestu k využití NMR spektroskopie nejen pro řešení struktur bílkovin, ale vedlo i ke studiu dynamického chování molekul, umožnilo provádět experimenty, které vedly k objasnění struktur komplexů a způsobu interakcí molekul navzájem. Nutno dodat, že rozšíření tohoto způsobu přípravy vzorků pro NMR studie mělo za následek i dramatické zlevnění celého procesu přípravy, takže v dnešní době se všechny vzorky, až na velmi vzácné výjimky, připravují právě metodami genetického inženýrství.

Vzhledem k tomu, že multidimenzionální NMR experimenty jsou naprosto klíčové pro získání a interpretaci

dat molekul proteinů, bylo potřeba nalézt nový způsob jejich akvizice. Tradiční způsob se ukázal jako velmi pomalý, což bylo a stále je překážkou při využití multidimenzionální NMR spektroskopie pro studium nestabilních vzorků, při zkoumání dynamických dějů, apod. Během posledních 5 – 10 let jsou uváděny do praxe četné alternativní způsoby snímání multidimenzionálních experimentů, z nichž mnohé se již staly nedílnou součástí komerčních softwarů pro akvizici a zpracování NMR dat. Jako příklad mohu uvést lineární predikci dat v nepřímých doménách, nelineární vzorkování nepřímých domén¹⁴, případně metodu, která se nazývá „Projection reconstruction“, a která vychází z principu rekonstrukce obrazu v MRI¹⁵.

Příklad 1: Dihydrofolátreduktasa – detekce minoritních intermediátů v katalytickém cyklu

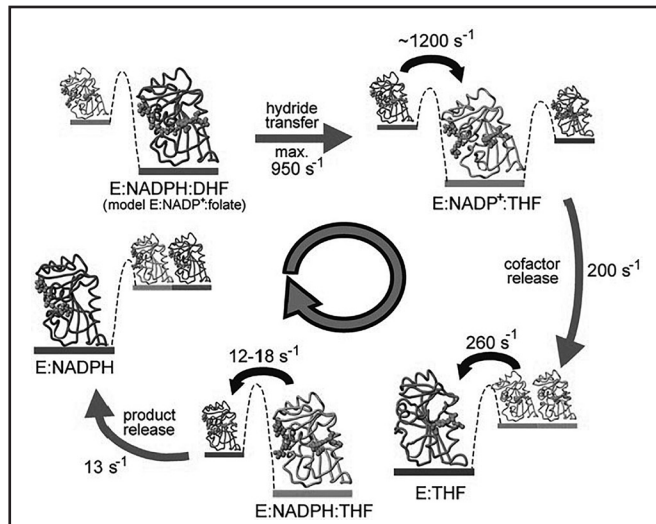
Téměř školním příkladem využití NMR spektroskopie pro řešení biologických problémů je velmi komplexní studie katalytického cyklu enzymu dihydrofolátreduktázy (DHFR)¹⁶. DHFR je jedním z klíčových enzymů všech živých organismů. Jeho úlohou je redukce kyseliny 5,6-dihydrolistové na metabolicky využitelný 5,6,7,8-tetrahydrofolát, což je výchozí látka pro syntézu pyrimidinových a purinových sloučenin, tedy např. nukleových kyselin (Obr. 2).



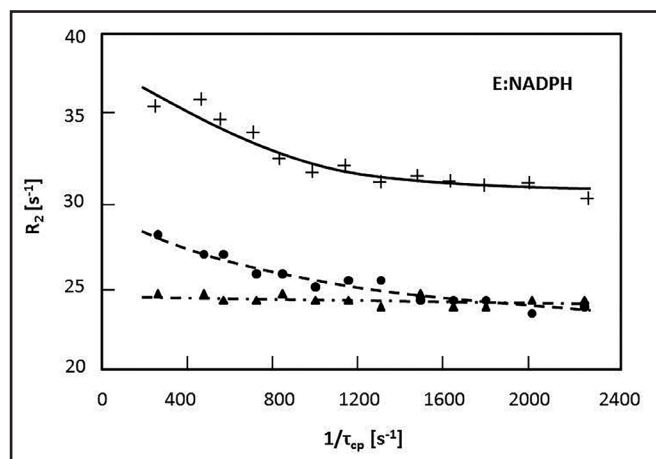
Obr. 2: Schéma redukce kyseliny 7,8-dihydrolistové na kyselinu 5,6,7,8-tetrahydrolistovou pomocí enzymu dihydrofolát-reduktázy.

Jako zdroje vodíku pro redukci využívá tento enzym kofaktor NADPH. Katalytický cyklus enzymu zahrnuje pět různých intermediátů, jejichž struktura byla postupně určena pomocí rentgenové krystalografie

(Obr. 3)^{17, 18}. Jedná se o binární, případně ternární komplexy enzymu s kofaktorem, výchozí látkou, případně produktem. Pro detailnější prozkoumání kinetiky katalytického cyklu byla využita NMR metoda, která vychází z měření disperze spin-spinové relaxace R_2 ¹⁹, resp. jejího ovlivnění chemickou výměnou mezi dvěma nebo třemi stavy, z nichž jeden je vždy základní majoritní stav, který má konformační výměnu s mnohem méně populovanými stavy o vyšších energiích.



Obr. 3: Schéma katalytického cyklu dihydrofolát reduktázy. Majoritní komplexy jsou označené symboly, které je tvoří: E-enzym, NADPH/NADP⁺-kofaktor, DHF-kyselina dihydrofolátová, THF-kyselina tetrahydrofolátová. Číslo u šipek označuje rychlost přeměny v s⁻¹, minoritní stavy jsou indikovány menšími symboly ve srovnání s majoritními stavy. Převzato z publikace¹⁶.



Obr. 4: Příklad experimentálních křivek z měření relaxační disperze. Exponenciálně klesající křivky vyjadřují chemickou výměnu odpovídajících aminokyselin mezi minimálně dvěma stavy, kdežto lineární průběh indikuje aminokyseliny bez výměny. Plnou čarou a křížky je vyznačena křivka jedné vybrané aminokyseliny, která se nachází ve vazebném místě enzymu s výchozí látkou, případně produktem, přerušovaná čára a kolečka indikují data pro aminokyselinu v aktivním místě enzymu a čerchovaná čára a trojúhelníčky představují aminokyselinu z vazebného místa enzymu s kofaktorem. Převzato z publikace¹⁶.

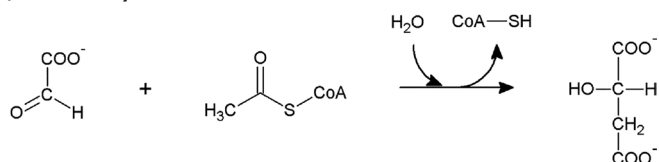
Experimentální data byla naměřena na spektrometrech 500 a 800 MHz. Na obrázku 4 je příklad naměřených experimentálních křivek pro jeden ze základních

stavů, konkrétně binární komplex E:NADPH. Matematickým fitováním experimentálních dat při použití vhodného kinetického modelu byly poté získány informace o populaci minoritních stavů, rychlosti jejich vzájemné výměny a rozdílech v chemických posunech jednotlivých ¹H a ¹⁵N atomů mezi těmito stavy. Rozdíly v chemických posunech a znalost struktury základních stavů potom umožnily vypočítat strukturu intermediátů. Na tomto konkrétním příkladu (Obr. 4) je patrné, že aminokyseliny z oblasti vazebného místa výchozí látky/produktu (plná čára) a aktivní smyčky (přerušovaná čára) mají konformační výměnu s jedním, případně více intermediáty, kdežto aminokyseliny z oblasti, kde se váže kofaktor NADPH (čerchovaná čára) nejsou v tomto případě ovlivněny žádnou chemickou výměnou. Takto se podařilo identifikovat a charakterizovat všech pět základních stavů, které mají výměny s odpovídajícími intermediáty, jejichž populace je většinou velmi nízká (< 5 %), ale které hrají důležitou úlohu při přechodech mezi jednotlivými základními stavy katalytického cyklu. DHFR obsahuje dvě vazebná místa. Do prvního z nich se váže kofaktor a do druhého substrát/produkt. Ve většině případů struktura intermediátů velmi dobře koresponduje se strukturou v katalytickém cyklu následných ternárních komplexů, jako je tomu v případě komplexu E:NADPH – intermediát – E:NADPH:DHF. Rozdíly v chemických posunech mezi stabilními komplexy, tj. E:NADPH a E:NADPH:DHF velmi dobře korelovaly s rozdíly v chemických posunech mezi E:NADPH a příslušným intermediátem. Skutečnost, že v roztoku existují již konformace, které jsou přímo kompatibilní s vazbou ligandů, a že existuje rovnováha mezi základními stavy a těmito intermediáty o vyšších energiích, svědčí pro vazebný mechanismus tzv. konformační selekce²⁰ spíše, než indukované přispůsobení²¹. Kompletní katalytický cyklus se všemi základními stavy i stavy o vyšších energiích jsou přehledně zobrazeny na obrázku 3.

Příklad 2: Malátsyntáza G – strukturní studie

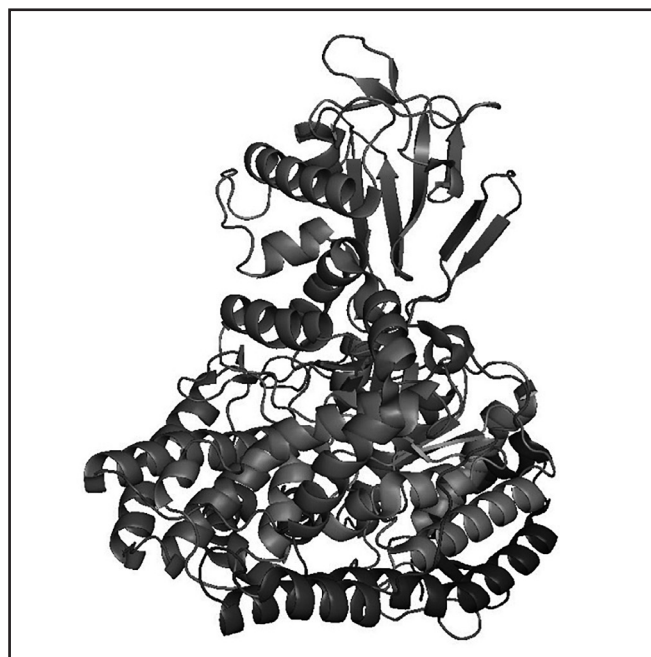
Určení kompletní třídimenzionální struktury enzymu malátsyntázy G (MSG) v roce 2005 bylo dalším milníkem ve využití NMR spektroskopie pro studium biologických systémů. MSG je enzym, který katalyzuje Cleisenovu kondenzaci glyoxalátu a acetylkoenzymu A za vzniku kyseliny maleinové, což je jeden z meziproduktů citrátového cyklu (Obr. 5). MSG je typickým multi-doménovým proteinem sestávajícím ze 723 aminokyselinových zbytků o celkové hmotnosti 82 kDa. Právě jeho velikost představuje velkou výzvu pro NMR spektroskopii v roztoku. Komplikace při práci s většími molekulami ($M_w > 30$ kDa) způsobují jednak složitá spektra s četnými překryvy signálů, ale zejména rychlá spin-spinová relaxace, v jejímž důsledku dochází k rychlému zániku NMR signálu. Zatímco komplikovaná spektra mohou být interpretována pomocí různých kombinací multidimenzionálních, multiresonančních NMR experimentů, rychlou spin-spinovou relaxaci lze obejít např. záměnou alifatických vodíků za atomy deuteria nebo použitím speciální techniky snímání NMR experimentů, která se nazývá TROSY²². Tato technika v kombinaci s obohacením zkoumané molekuly deu-

teriem umožňuje posunout limit velikosti studovaných molekul daleko za hranici 30 kDa. V tomto konkrétním příkladu byly připraveny NMR vzorky, které byly nespecificky obohacené ^{15}N , alifatické vodíky byly vyměněné za deuterium a methylové skupiny Leu, Ile, Val a Ala byly specificky obohacené ^{13}C a ^1H . Nejprve byly nasnímány 3D-, případně 4D TROSY (^1H , ^{13}C , ^{15}N) NMR experimenty, který byly interpretovány ve smyslu přiřazení NMR signálů příslušným atomům páteře molekuly MSG²³. Takto se podařilo přiřadit až 97 % všech signálů, i přestože spektra byla poměrně velmi komplikovaná. Ze znalosti chemických posunů byl poté vypočten tzv. index chemického posunu („chemical shift index“ – CSI), který udává odchylky jednotlivých hodnot chemických posunů vybraných atomů páteře proteinu od hodnot srovnatelné aminokyseliny, pokud není zabudována v žádném prvku sekundární struktury²⁴. Ze znalosti těchto hodnot lze velmi jednoduše zjistit přítomnost prvků sekundární struktury, tj. α - nebo β -struktury.



Obr. 5: Schéma Cleisenovy kondenzace glyoxalátu a acetylkoenzymu A.

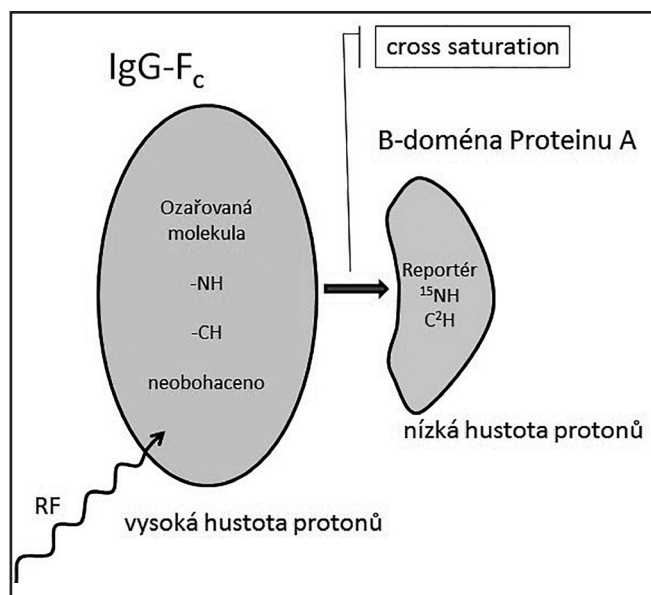
Další fází celého procesu bylo získání dostatečného množství experimentálních dat, ze kterých by bylo možné vypočítat prostorovou strukturu MSG. Nejběžnějším parametrem je vzdálenost mezi dvěma atomy vodíku, kterou lze získat z velikosti tzv. nukleárního Overhauserova efektu²⁵. Za tímto účelem byly nasnímány různě modifikované experimenty NOESY a tyto vzdálenosti byly extrahovány z intenzit příslušných krospliků ve spektru. Pokud se pracuje se vzorkem, který obsahuje atomy vodíku, využívají se všechny interakce, které lze jednoznačně identifikovat. Ovšem vzorky MSG obsahovaly jen amidické vodíky H_N a vodíky methylových skupin Leu, Val, Ile a Ala, kdežto ostatní atomy vodíku byly nahrazeny za deuteria (viz předchozí odstavec). Proto byly do výpočtu zahrnuty jen kombinace HN-H_N , HN-CH_3 a $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ interakcí. Experimentální data byla proto dále doplněna o hodnoty páteřních dihedralních úhlů ϕ a ψ , které byly získány z chemických posunů N, C_α , CO ²⁶. Navíc bylo do výpočtu zahrnuto 415 hodnot tzv. $1\text{H-}^{15}\text{N}$ zbytkových dipolárních interakcí („residual dipolar coupling“-RDC), které podávají informace o orientaci vazeb H-N v prostoru, a které byly ještě doplněny o 300 hodnot anizotropie chemických posunů karbonylových skupin²⁷. Struktura MSG byla poté vypočtena obvyklým postupem, tj. metodou simulovaného žihání při zapojení všech výše uvedených experimentálních dat (Obr. 6). Srovnáním se strukturou získanou pomocí rentgenové krystalografie vyplynulo, že rozdíl mezi nimi je poměrně malý ($\text{RMSD} = 3,31 \pm 0,47 \text{ \AA}$, pro těžké atomy v uspořádaných oblastech α/β domén). Vyřešením kompletní třídimenzionální struktury tohoto enzymu prokázala NMR spektroskopie, že dokáže být srovnatelnou strukturní metodou s rentgenovou krystalografií.



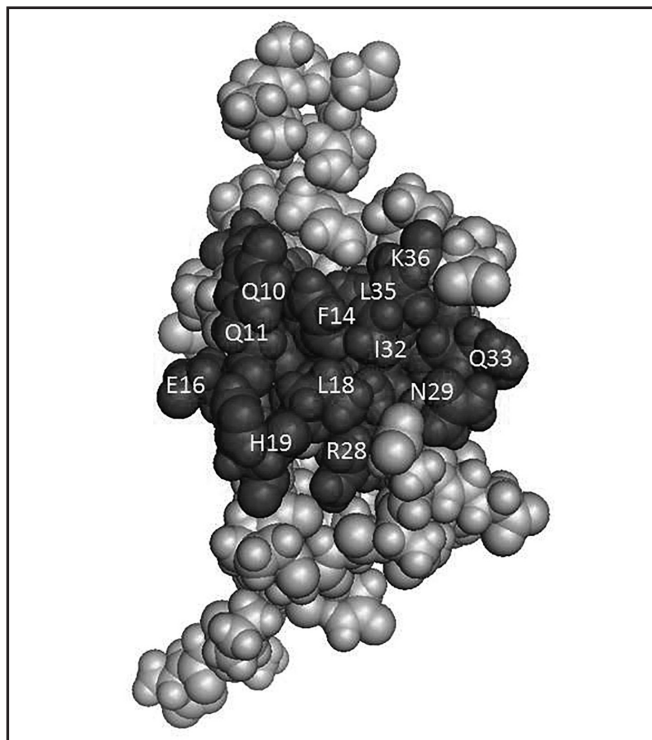
Obr. 6: Struktura malátsyntázy G. Identifikační PDB kód 2jqx.

Příklad 3: Interakce Proteinu A s Imunoglobulinem – mapování vazebného místa metodou přenosu saturace

Protein A je součástí buněčné stěny bakterie *Staphylococcus aureus*. Jeho hlavní úlohou je zabránit rozpoznání tohoto patogenu imunitním systémem vyšších organismů. V podstatě funguje na principu jakéhosi imunologického převleku, čímž zvyšuje šanci patogenu na přežití²⁸. Interaguje prostřednictvím svých N-terminálních domén (B-doména) s imunoglobulinem IgG a to konkrétně s jeho těžkým řetězcem F_c . Tato interakce byla studována jednou z NMR metod, která se nazývá přenos saturace. Metoda je, z hlediska NMR spektroskopie, poměrně jednoduchá (Obr. 7), ale vy-



Obr. 7: Princip NMR metody přenosu saturace. Nejprve jsou ozařeny vodíkové atomy výhradně jedné části komplexu. Díky spinové difúzi dojde k rozšíření magnetizace po celé molekule. V případě, že je tato molekula navázána na jinou, dojde k přenosu saturace/magnetizace i na tuto molekulu, kde ji lze detekovat.



Obr. 8: Struktura B-domény proteinu A s vyznačeným vazebným epitopem pro interakci s F_c řetězcem lidského imunoglobulinu G. Aminokyseliny tvořící vazebné místo jsou vyznačeny tmavou barvou, spolu s jednopísmenným kódem a pozicí v sekvenci.

žaduje poměrně náročnou přípravu vzorku²⁹. Řetězec F_c byl připraven neobohacený o isotopy ^{13}C a ^{15}N , naopak ligand, což byl v tomto případě Protein A, resp. jeho B-doména byl nespecificky, tj. 100 %ně obohacen o izotop ^{15}N a všechny alifatické vodíky byly vyměněny za deuterium, tak aby byla dosažena nízká hustota protonů. Vysoká hustota protonů na jedné straně (řetězec F_c) je nezbytným předpokladem pro účinnou spinovou difúzi, aby došlo k rychlému rozšíření magnetizace po celé molekule. Naopak nízká hustota protonů v druhé části komplexu, tj. na straně ligandu (B-doména) je nutná pro potlačení spinové difúze, aby se magnetizace nerozšiřovala po celé molekule a nebyly tím zkresleny výsledky. Nejprve bylo nasnímáno dvoudimensionální ^1H - ^{15}N HSQC spektrum samotného ligandu, kde každá

aminokyselina byla reprezentována jedním kroskíkem (kromě prolinu, který nemá amidický vodík). Potom byla přidána druhá část komplexu, v tomto případě řetězec F_c a znovu bylo změřeno ^1H - ^{15}N spektrum, s tím rozdílem, že pulsní sekvence tentokrát obsahovala ještě předřazený modul, který zabezpečil ozáření atomů vodíku pouze řetězce F_c a rozšíření magnetizace díky spinové difúzi na ligand. Toto mělo za následek redukci intenzity některých kroskíků ligandu ve výsledném ^1H - ^{15}N spektru ligandu. Nejvíce byly ovlivněny signály, které odpovídaly vodíkovým atomům aminokyselin, které tvořily vazebné místo (jsou fyzicky nejbližší). Projekcí těchto změn na předem známou strukturu B-domény Proteinu A byla získána informace o vazebném epitopu na straně ligandu. Na obrázku 8 jsou velikosti změn intenzit vyznačeny tmavou barvou (největší pokles intenzity), přičemž nejvíce ovlivněné aminokyseliny jsou označeny jednopísmennými kódy a jejich pořadím v sekvenci. Výsledky této studie byly porovnány jednak s výsledky z rentgenostrukturní analýzy a jednak z analýz, kde byly využity další NMR metody, jako např. mapování změn v chemických posunech způsobených vazbou tohoto proteinu na imunoglobulin nebo výměny amidických vodíků za atomy deuteria. Ve všech případech byly výsledky srovnatelné.

Závěr

NMR spektroskopie se v dnešní době stala naprosto nepostradatelnou součástí výzkumu bílkovin. Na předložených příkladech jsem chtěl demonstrovat potenciál této metody, ale myslím, že se mi podařilo ukázat jen zlomek možností, které ve skutečnosti nabízí. Jak je vidět, není to jen metoda, která je využitelná pro řešení struktury proteinů, ale její záběr je mnohem širší a zahrnuje velice účinné nástroje pro zkoumání dynamického chování peptidových řetězců, výzkum protein-proteinových interakcí, ale i interakcí s jinými molekulami, jak je ukázáno ve zmíněných příkladech. Vzhledem k tomu, že celkový záběr NMR spektroskopie je velice intimně spjat s rozvojem přístrojové techniky, vidíme, jak se portfolio řešených problémů, kde tato metoda vystupuje jako metoda první volby, velmi významně rozšiřuje, a nejenak tomu bude i v blízké budoucnosti.

Literatura

1. Rabi II: *Phys. Rev.* 51, 652 (1937).
2. Bloch F, Hansen WW, Packard ME: *Phys. Rev* 69, 127 (1946).
3. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV: *Phys. Rev* 69, 37 (1946).
4. Ernst RR, Anderson WA: *Rev. Sci. Instrum.* 37, 93 (1966).
5. Saunders M, Wishnia A, Kirkwood JK: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3289 (1957).
6. Kowalsky A: *J. Biol. Chem.* 237, 1807 (1962).
7. Jardetzky O, Wade NG, Fischer JJ: *Nature* 197, 183 (1963).
8. Meadows DH, Markley JL, Cohen JS, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1307 (1967).
9. Cohn M, Leigh JS: *Nature* 193, 1037 (1962).
10. Campbell ID, Dobson CM, Williams RJP, et al.: *Ann. Ny. Acad. Sci.* 222, 163 (1973).
11. Wuthrich K, *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (Wiley, New York, 1986).
12. Clore GM, Gronenborn AM: *Annu. Rev. Biophys. Bio.* 20, 29 (1991).
13. Clore GM, Kay LE, Bax A, et al.: *Biochemistry* 30, 12 (1991).
14. Orekhov VY, Ibraghimov I, Billeter M: *J. Biomol. NMR* 27, 165 (2003).
15. Kupce E, Freeman R: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 6429 (2004).
16. Boehr DD, McElheny D, Dyson HJ, et al.: *Science* 313, 1638 (2006).
17. Sawaya MR, Kraut J: *Biochemistry* 36, 586 (1997).

Literatura (pokračování)

18. Venkitakrishnan RP, Zaborowski E, McElheny D, et al.: *Biochemistry* 43, 16046 (2004).
19. Palmer AG, III: *Chem. Rev.* 104, 3623 (2004).
20. Tsai CJ, Kumar S, Ma B, et al.: *Protein Sci.* 8, 1181 (1999).
21. Bosshard HR: *News Physiol. Sci.* 16, 171 (2001).
22. Pervushin K, Riek R, Wider G, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12366 (1997).
23. Tugarinov V, Muhandiram R, Ayed A, et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 10025 (2002).
24. Wishart DS, Sykes BD, Richards FM: *Biochemistry* 31, 1647 (1992).
25. Giesen AW, Homans SW, Brown JM: *J. Biomol. NMR* 25, 63 (2003).
26. Cornilescu G, Delaglio F, Bax A: *J. Biomol. NMR* 13, 289 (1999).
27. Clore GM, Gronenborn AM, Bax A: *J. Magn. Reson.* 133, 216 (1998).
28. Muthukrishnan G, Quinn GA, Lamers RP, et al.: *J. Proteome Res.* 10, 2064 (2011).
29. Takahashi H, Nakanishi T, Kami K, et al.: *Nat. Struct. Biol.* 7, 220 (2000).

Souhrn

Hrabal R.: Role NMR spektroskopie při zkoumání bílkovin

NMR spektroskopie se v posledních 25 letech stala nepostradatelnou instrumentální metodou při výzkumu bílkovin. Metodu lze využít pro strukturní analýzu, ale i zkoumání dynamických jevů, jako např. pohyblivosti peptidového řetězce, studium vzájemných interakcí molekul, rychlosti vzniku a zániku komplexů, atd. V úvodu článku je nastíněn historický vývoj jednak NMR spektroskopie samotné, ale zejména jejího využití při zkoumání bílkovin. Článek je doplněn třemi příklady, které dokumentují různorodost problematiky, kde může být s úspěchem NMR spektroskopie využita.

Klíčová slova: NMR spektroskopie, bílkovina, struktura, komplex, enzym

Summary

Hrabal R.: The role of NMR spectroscopy in protein research.

During the last 25 years NMR spectroscopy has become an indispensable instrumental method for protein research. It can be utilised for structural analysis, investigation of dynamic properties, e.g. flexibility of protein molecules, study of mutual interactions of molecules, i.e. creation and break up of complexes, etc. The introduction of the paper contains description of important milestones in the development of NMR spectroscopy together with an overview of history of utilization of the method in the protein research. The paper is supplemented by three case studies showing the broad range of problems where NMR spectroscopy can be successfully used.

Key words: NMR spectroscopy, protein, structure, complex, enzyme

SOUČASNÝ POHLED NA ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

Viviana Fuchsová, Kamila Zdeňková, Kateřina Demnerová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; vfuchsova@vscht.cz

Úvod

Antibiotika jsou látky, které usmrcují mikroorganismy nebo inhibují jejich růst a množení. Tento název v současné době zahrnuje látky přírodního původu, i látky připravené chemickou syntézou. Přírodní antibiotika jsou sekundární metabolity mikroorganismů, produkováné většinou v průběhu stacionární fáze jejich růstu. Jedná se především o produkty mikromycet a některých bakterií. Jedním z největších producentů přírodních antibiotik jsou vláknité bakterie tzv. aktinobakterie, zejména rod *Streptomyces*. Je známo, že jeden mikroorganismus může produkovat i více druhů antibiotik, a rovněž stejný typ antibiotika může být tvořen více mikroorganismy. Tyto antimikrobiální látky jsou různé chemické struktury. Platí, že chemicky si podobná antibiotika mívají podobný mechanismus účinku, což však nelze tvrdit naopak. Antibiotika mohou negativně působit na syntézu buněčné stěny, proteosyntézu, syntézu nukleových kyselin nebo cytoplazmatickou membránu. U napadených mikroorganismů vyvolávají rozličné obranné mechanismy. Nadměrné a často neodůvodněné používání a nevhodná manipulace s antibiotiky, vede ke vzniku a rozvoji rezistentních kmenů mikroor-

ganismů. Jen za poslední půlstoletí byly do životního prostředí uvolněny odhadem miliony tun antibiotik¹. Tento vysoký výskyt v životním prostředí podporuje adaptaci a přežívání mikroorganismů. Vznikají rezistence, zakódované v genetické informaci. Geny rezistence (R geny) mohou být následně vzájemně předávány mezi různými mikroorganismy a šířeny po okolí. Seznam z ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database) z roku 2008 uvádí existenci již více než 20 000 potenciálních R genů². V nemocnicích se v dnešní době proti používaným antibiotikům tvoří multirezistentní druhy. Mezi časté multirezistentní nozokomiální bakterie způsobující závažné infekce patří například gram negativní bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* a gram pozitivní bakterie *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Streptococcus pneumoniae*³.

Původ a rozvoj rezistencí

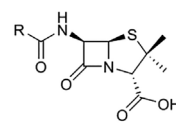
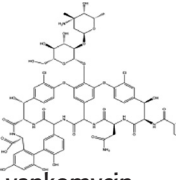
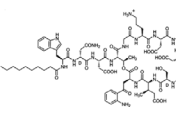
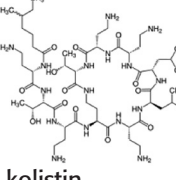
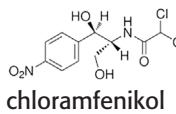
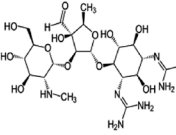
Éra antibiotik začala v roce 1940 a podle některých vědců spěje ke konci¹. Již od počátku své existence si bakterie zdokonalují a vyvíjejí nové a nové mechanismy adaptace pro přežití v prostředí, přičemž vznikají rezistentní kmeny. Příkladem jsou sami producenti přírodních antibiotik, nositelé genů kódujících rezistenci proti antibiotikům, které vytváří. Již Sir Alexander Fleming objevitel penicilinu tvrdil, že dříve či později si bakterie proti cizorodým látkám cíleně vyvinou obranné mechanismy. Metagenomickými studiemi bakteriálních vzorků permafrostu byla dokumentována existence genů rezistence již před 30 000 lety⁴. Z jeskyně Lechuguilla v Novém Mexiku, která byla přes 4 miliony let izolována od okolního světa a lidské činnosti, byl kultivován mikrobiom, zahrnující bakterie vysoce multirezistentní k široké škále antibiotik a vykazující i dosud neobje-

né mechanismy rezistence⁵. Je známo, že se na Zemi nacházejí druhy mikroorganismů, které nebyly ještě popsány, stejně tak jako přirozené rezistentní formy, které nám prozatím nejsou známy. Jednáním člověka však výskyt rezistence rapidně roste.

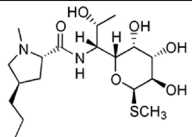
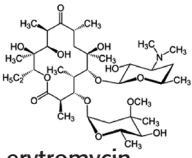
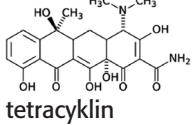
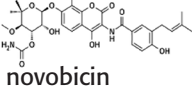
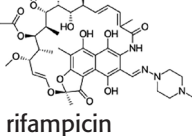
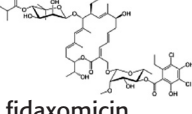
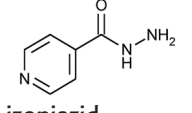
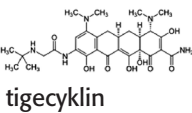
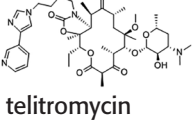
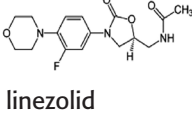
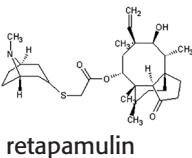
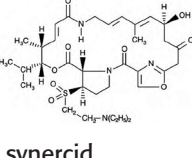
Rozdělení antibiotik

V současnosti je známo více než 9000 látek s antibiologickým účinkem, ale jen asi několik desítek z nich našlo uplatnění v humánní a veterinární medicíně, ostatní mají příliš výrazné nežádoucí účinky. Antibiotika působí především proti bakteriím, některá jsou účinná také proti houbám a parazitickým prvokům, ale neza-
bírají na onemocnění virového původu. Z chemického hlediska jsou antibiotika různorodou skupinou látek, většinou však mají molekulovou hmotnost menší než 2000 Da. Pro názorný přehled byla sestavena Tab. I.

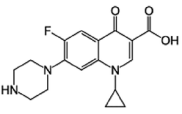
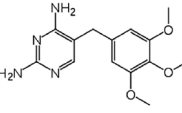
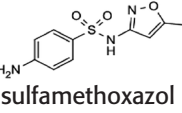
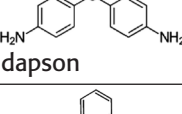
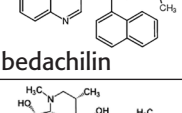
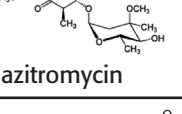
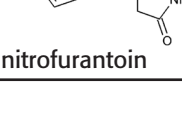
Tab. I: Organizace antibiotik. Tabulka zahrnuje název třídy, příklady zástupců, cílové místo působení antibiotika, rok objevu, původ a strukturu vybraného zástupce třídy.

Struktura	Třída antibiotik	Zástupci	Cílové místo působení	Rok objevu	Původ vybraného zástupce
 penicilin	β-laktámy	Peniciliny (ampicilin), Peniciliny rezistentní k penicilinase (methicilin), Cefalosporiny (cefamycin), Karbapenemy (meropenem), Monobaktamy (aztreonam)	Biosyntéza peptidoglykanu buněčné stěny	1928	<i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>
 vancomycin	Glykopeptidy	vancomycin, teikoplanin	Biosyntéza buněčné stěny – blokáda esenciálního substrátu	1956	<i>Amycolatopsis orientalis</i>
 daptomycin	Lipopeptidy	daptomycin	Cytoplazmatická membrána – vazbou způsobuje depolarizaci, ukončení syntézy bílkovin, nukleových kyselin, lipoteichové kyseliny a smrt v důsledku efluxu draslíku	1980	<i>Streptomyces roseosporus</i>
 kolistin	Polymyxiny	kolistin	Cytoplazmatická membrána – poškození důsledkem kationické aktivity	1947	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
 chloramfenikol	Amfenikoly	chloramfenikol	Inhibice syntézy bílkovin, translace – vazba na 50S podjednotku ribozómu	1946	<i>Streptomyces venezuelae</i>
 streptomycin	Aminoglykosidy	streptomycin, gentamycin, amikacin, netilmicin, isepamycin, tobramycin, spektinomycin	Inhibice syntézy bílkovin, translace – vazba na 30S podjednotku ribozómu	1943	<i>Streptomyces griseus</i>

Tab. I: (pokračování)

Struktura	Třída antibiotik	Zástupci	Cílové místo působení	Rok objevu	Původ vybraného zástupce
 linkomycin	Linkosamidy	linkomycin, klindamycin	Inhibice syntézy bílkovin, translace – vazba na 50S podjednotku ribozómu	1962	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
 erythromycin	Makrolidy	erytromycin, spiramycin, roxitromycin, klaritromycin Azalidy (azitromycin)	Inhibice syntézy bílkovin, translace – vazba na 50S podjednotku ribozómu	1949	<i>Streptomyces erythreus</i>
 tetracyklin	Tetracykliny	tetracyklin, doxycyklin	Inhibice syntézy bílkovin, translace – vazba na 30S podjednotku ribozómu	1945	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
 novobicin	Aminokumariny	novobicin, klorobiocin	Inhibice syntézy nukleových kyselin, replikace – inhibice DNA gyrasy	1950	<i>Streptomyces niveus</i>
 rifampicin	Ansamyciny	rifampicin, rifabutin, rifaximin	Inhibice syntézy nukleových kyselin, transkripce – inhibice DNA dependentní RNA polymerasy	1959	<i>Amiclatopsis rifamycinica</i>
 fidaxomicin	Makrolaktony	fidaxomicin	Inhibice syntézy nukleových kyselin, transkripce – inhibice RNA polymerasy	1948	<i>Dactylosporangium aurantiacum ssp. hamdenesis</i>
 izoniazid	Antituberkulotika	izoniazid, pyrazinamid, ethambutol, ethionamid, cykloserin	Biosyntéza buněčné stěny	1912	syntetické antibiotikum
 tigecyklin	Glycylcykliny	tigecyklin	Inhibice syntézy bílkovin, translace – blokace ribozómů	1990	polosyntetický derivát tetracyklinů
 telitromycin	Ketolidy	telitromycin	Inhibice syntézy bílkovin, translace – blokace ribozómů	1998	polysyntetický derivát erytromycinu
 linezolid	Oxazolidinony	linezolid	Inhibice syntézy bílkovin, translace – blokace 50S podjednotky ribozómu	1995	syntetické antibiotikum
 retapamulin	Pleuromutiliny	retapamulin	Inhibice syntézy bílkovin, translace – vazba na 50S podjednotku ribozómu	1950	polosyntetický derivát pleuromutilinu
 synercid	Streptograminy	streptograminy A a B (synercid)	Inhibice syntézy bílkovin, translace – vazba na 50S podjednotku ribozómu	1963	odvozený od pristinamycinu <i>Streptomyces pristinaespiralis</i>

Tab. I: (pokračování)

Struktura	Třída antibiotik	Zástupci	Cílové místo působení	Rok objevu	Původ vybraného zástupce
 ciprofloxacin	Chinolony	ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, pefloxacin, moxifloxacin, prulifloxacin	Inhibice syntézy nukleových kyselin – DNA replikace	1962	syntetické antibiotikum
 trimetoprim	Pyrimidiny	trimetoprim, pyrimetamin	Inhibice syntézy nukleových kyselin – metabolismus C1 kyseliny listové	1952	syntetické antibiotikum
 sulfamethoxazol	Sulfonamidy	sulfamethoxazol, sulfasalazin, sulfathiazol, sulfisoxazol, sulfadiazin	Inhibice syntézy nukleových kyselin – inhibice kyseliny listové	1932	syntetické antibiotikum
 dapson	Sulfony	dapson	Metabolismus C1 kyseliny listové	1908	syntetické antibiotikum
 bedachilin	Diarylchinoliny	bedachilin	Inhibice F1F0 ATPasy	1997	syntetické antibiotikum
 azitromycin	Nitroimidazoly	azitromycin, metronidazol, ornidazol	Produkce toxických metabolitů	1953	polysyntetický derivát erytromycinu
 nitrofurantoin	Nitrofurany	nitrofurantoin, furazolidon, nitrofurazon, nifuroxazid, nifuratel	Inhibice bakteriálních enzymů	1940	syntetický derivát nitrofuranu

Co si pod pojmem rezistence představujeme a jaké rozeznáváme druhy

V tomto článku je pozornost věnována především výskytu rezistencí a jejich možným druhům se zaměřením na bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*.

Rezistence neboli schopnost odolávat nepříznivým vlivům mohou být vrozené nebo získané. Při rezistenci vrozené, **primární**, bakterie částečně nebo úplně **postrádají cílová místa** pro navázání antibiotik. Růst gram negativních bakterií, u kterých peptidoglykan tvoří vnitřní vrstvu buněčné stěny, není ovlivněn β -laktámovými antibiotiky cílenými na **penicilin vázající proteiny** (z angl. penicillin binding protein, PBP) zodpovědnými za tvorbu peptidové vazby a stabilizaci peptidoglykanových řetězců. Dalším faktorem znesnadňujícím správné působení β -laktámových antibiotik je **obtížný** průnik hydrofilních sloučenin do bakteriálních buněk daný hydrofobicitou lipopolysacharidové vrstvy vnější membrány gram negativních bakterií a **modifikací** hydrofilních porinových transportních **kanálů**.

Rezistence získaná, **sekundární**, často vzniká působením určitých impulzů, které mohou vyvolat různé

molekulární modifikace. Nejčastější jsou modifikace na ribosomech. U buněk *Staphylococcus aureus* rezistentních k antibiotikům patřících mezi makrolidy, linkosamidy, streptograminy a u buněk *Escherichia coli* rezistentních k aminoglykosidům byly pozorovány metylace ribozomálních podjednotek 23S a 16S rRNA⁶. Poměrně frekventované jsou i bodové mutace, které mají minimální vliv na životaschopnost mikroorganismů. **Genovou mutací**, doprovázenou změnou v sekvenci kódující cílové místo, může být následně snížena **penetrace antibiotik** do buňky, **afinita** produktu k antimikrobiální látce, ovlivněna **metabolická dráha** léčiva, zvýšen počet **opravných mechanismů** nebo může dojít k narušení **tvorby, funkce** či **struktury** cíle, který se tak pro antibiotikum stává nerozpoznatelným⁷⁻⁹. Sekundární rezistence vzniká často až v průběhu terapie nebo jako její následek. Zvláště pak při podávání subinhibičních koncentrací antibiotik¹⁰. Bylo prokázáno, že subinhibiční koncentrace β -laktámového antibiotika u *S. aureus* zvyšuje 100 až 1 000 násobně konjugativní přenos plasmidů s tetracyklinovou rezistencí¹¹. Přítomnost nízké koncentrace tetracyklinu v pitné vodě zase 10 násobně zvýšila frekvenci přenosu transpozonu Tn 1545, který propůjčuje rezistenci ke kanamycinu,

erytromycinu a tetracyklinu, z bakterie *Enterococcus faecalis* na *Listeria monocytogenes*¹².

U genově kódované rezistence se vedle mutací setkáváme i s tzv. **horizontálním genovým přenosem (HGT)**, kdy přenos genetické informace může být zprostředkován prostřednictvím plazmidů, malých autonomních kruhových DNA nacházejících se v cytoplazmě bakterií. Transpozony, nebo-li skákavé geny (ang. jumping genes), mohou přenášet geny např. z plazmidu na chromosom. Přenos může dále probíhat i pomocí genových kazet, mobilními elementy s genem pro rezistenci k antibiotiku a specifickým rekombinačním místem pro přemístění.

K přenosu genů rezistence může docházet i mezi jednotlivými buňkami v populaci mikroorganismů. Může probíhat i v prostředí jejich přirozeného výskytu. Ve většině případů však nedochází k přenosům genů rezistence mezi gram negativními a gram pozitivními bakteriemi, což je ovlivněno různým složením buněčné stěny¹³.

Přenos genů pro rezistenci může být uskutečněn při konjugaci bakterií, transdukci virem nebo transformací, kdy bakterie přijímají geny z okolního prostředí, kam mohou být uvolněny například po rozpadu mrtvých buněk. Přenos rezistence plazmidem byl prokázán například u β -laktamových antibiotik. Pravděpodobně se jedná o hlavní způsob rezistence bakterie *S. aureus*, která je u 90 % kmenů zprostředkována tvorbou enzymů, β -laktamas, porušujících β -laktamový kruh antibiotika^{1, 14, 15}.

Specifické enzymy modifikující (acetylase, fosforylace, methylase atd.) či dokonce narušující strukturu antibiotika byly detekovány u kmenů *S. aureus* rezistentních na aminoglykosidy, sulfonamidy, amfenikoly, aminocyklitoly a pyrimidiny¹⁴. Specifické enzymy byly prokázány i u kmenů *E. coli* rezistentních na β -laktamová antibiotika včetně karbapenemů, na aminoglykosidy, amfenikoly, a pyrimidiny nebo u kmenů *L. monocytogenes* rezistentních na aminoglykosidy, makrolidy, amfenikoly a pyrimidiny¹⁶⁻²⁰.

Dalším důležitým mechanismem, který přispívá k bakteriální rezistenci vůči antibiotikům, jsou specifické **molekulární pumpy**, tzv. efluxní pumpy zakotvené v cytoplazmatické membráně buněk, které za aktivní spotřeby energie vyčerpávají toxické látky z buňky do vnějšího prostoru. Efluxní systém byl prokázán u kmenů *E. coli*, *S. aureus* a *L. monocytogenes* s rezistencí k tetracyklinům a chinolonům, u kmenů *S. aureus* a *E. coli* dále k makrolidům, linkosamidům, streptograminům a amfenikolům. U *E. coli* byly také detekovány transportéry efluxních pump způsobujících rezistenci k β -laktamovým antibiotikům včetně cefalosporinů, aminoglykosidům, sulfonamidům, ansamycinům a aminokumarinům^{15, 19, 21}.

Jakou úlohu v rezistenci hraje biofilm?

V přirozeném prostředí se bakterie namísto volně pohyblivých planktonních buněk vyskytují převážně ve formě tzv. biofilmu. Jedná se o mnohobuněčné konsorcium vzájemně spojených buněk, adherovaných k určitému biotickému či abiotickému povrchu. Buňky jsou

v tomto společenství obalené vrstvou matrice, tvořenou velkým množstvím vody a vysokomolekulárním komplexem exogenních polymerních látek (angl. extracellular polymeric substance, EPS), zahrnujících převážně polysacharidy, bílkoviny, povrchově aktivní látky, lipidy, fosfolipidy, huminové kyseliny a extracelulární DNA^{22, 23}.

Skladba biofilmu poskytuje mikrobiální populaci určité výhody projevující se **změnami fenotypu a fyziologie**, vysokou stabilitou a rezistencí. Předpokládá se, že biofilmy jsou původci mnoha chronických onemocnění, vzhledem k vysoké rezistenci k dostupným antibiotikům²⁴.

V biofilmu dochází ke **změnám chemického mikroprostředí**, reprezentovaným např. různou koncentrací kyslíku, která může zvýhodňovat či potlačovat různé metabolické pochody, například v případě aminoglykosidům je jejich funkce v anaerobním prostředí spodních vrstev biofilmu velmi omezená. Snížené množství nutričních a kyslíku vyvolané vysokou hustotou mikrobiální populace zralého biofilmu nebo stresovými podmínkami (teplotní šoky, působení chemických látek, změny pH) vede ke zpomalení nebo dokonce zastavení růstu a reprodukce mikroorganismů se současným zvýšením rezistence²⁵. Názorným příkladem jsou β -laktamová antibiotika jako je penicilin, který je schopen baktericidní aktivity pouze u rostoucích bakterií, u kterých probíhá syntéza buněčné stěny. Osmotické podmínky, stres a produkce stresových proteinů mohou souviset se změnou struktury porinů a buněčné permeability. Bylo dokonce prokázáno, že stres podporuje HGT, indukuje mobilní transpozony a integraci genových sekvencí¹⁸.

Vzájemné soužití různých mikroorganismů v rámci vícedruhového biofilmu je doprovázeno řadou **přímých a nepřímých interakcí**, které ještě více zvyšují odolnost buněk k antimikrobiálním látkám. Může se jednat například o různé druhy kooperace jako je ko-metabolismus, syntropie, kokolonizace, HGT či reakci signálních molekul tzv. systému quorum sensing (QS). Při QS dochází k mezibuněčné komunikaci, kdy buňky na základě hustoty společenstva a množství EPS regulují genovou expresi a následně i tvorbu, tloušťku a rozvoj biofilmu.

Předpokládá se, že nejčastějším projevem rezistence u vícedruhových biofilmů je **snížení penetrace antibiotika**, kdy matrice biofilmu nebo určitý druh mikroorganismu mohou vytvářet „ochrannou síť“. U pozitivně nabitých aminoglykosidových antibiotik byly detekovány elektrostatické interakce s následnou iontovou vazbou k negativně nabití matici biofilmu. Ve vícedruhovém mikrobiálním biofilmu byla zase prokázána rezistence *S. aureus* k vankomycinu indukovaná prorůstáním stafylokoků mezi hyfami *Candida albicans*²⁶.

Vzájemné soužití mikroorganismů může být zprostředkováno i přeměnou antibiotika rezistentním mikroorganismem na produkt neškodný pro citlivé jedince mikrobiální populace jiného druhu²⁷⁻²⁹.

U bakteriálních biofilmů byly také detekovány **cíleně syntetizované mobilní elementy**, jako například části do okolí vysílaných fosfolipidových membrán buněk *S. aureus*, na něž se váže daptomycin a biofilm přitom zůstává neporušený. Kromě ochrany mobilními agens, může antibiotikum interagovat s volnými planktonními

buňkami při povrchu biofilmu. Buňky bakterií zakomponované v biofilmu tak zůstávají nepoškozené a po snížení koncentrace antibiotika v těle pacienta dochází k opětovnému propuknutí nemoci³⁰.

Závěr v odrazu statistik

Organismy v prostředí představují environmentální zásobárnu genů rezistence, které mohou být potenciálně přenášeny do cílových mikroorganismů. Rezistentní kmeny se následně mohou dostat do potravinového řetězce a vést až k závažným alimentárním onemocněním člověka. Příkladem je *S. aureus* rezistentní k methicilinu (MRSA), který byl detekován v hovězím, kuřecím a vepřovém mase a v některých mléčných produktech. Kontaminace potravin MRSA jsou však vzácné.

Antibiotická rezistence, která se podílí na zvýšené nemocnosti a úmrtnosti, jakož i na zvýšení nákladů terapie, je považována za jeden z hlavních celosvětových problémů ohrožujících veřejné zdraví³¹. Každý rok následkem rezistentních bakterií na celém světě zemře 700 000 lidí^{32, 33}, z čehož v USA 23 000 lidí a v Evropě se jedná o 25 000 lidí³⁴⁻³⁶. V roce 2014 byl ECDC (angl. European Centre for Disease Prevention and Control) hlášen nárůst *E. coli* rezistentních k aminopenicilinům, kdy hodnota váženého populačního průměru odvoze-

ná z počtu 73 624 invazivních izolátů 28 zemí Evropy odpovídala 57,1 %. V České republice se jednalo konkrétně o 54,4 % rezistentních izolátů z celkového počtu 2 978 testovaných. U izolátů MRSA byl v Evropě zaznamenán vážený populační průměr o hodnotě 17,4 % rezistentních z celkového počtu 40 414 invazivních izolátů z 29 zemí Evropy. V ČR bylo detekováno 13 % MRSA rezistentních k β -laktámům a 14 % izolátů *S. aureus* rezistentních k cefoxitinu¹⁶.

Rezistentní bakterie se po dlouhé době nepoužívání antibiotik mohou stát opět citlivými. Jedná se však o mnohonásobně dlouhodobější proces, než je rychlý vývoj jejich rezistence. Vzhledem k současné situaci stoupajícího trendu rezistentních mikroorganismů, nárůstu multirezistentních kmenů a počtu antibiotiky neléčitelných onemocnění, by však omezení dostupnosti, snížené používání antimikrobiálních přípravků a využívání alternativní léčby, jako je například fágová terapie, stimulace imunity a modifikované protilátky, mohlo vést ke sníženému výskytu rezistencí.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem GAČR projektu 17-15936S.

Literatura:

1. Davies J, Davies D: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417 (2010).
2. Liu B, Pop M: *Nucleic Acids Res.* 37, 443 (2009).
3. Bueno J. (2015): Nanotechnology in diagnosis, dreatment and prophylaxis of infectious diseases. Chapter 2 – Antimicrobial models in nanotechnology: from the selection to application in the control and treatment of infectious diseases. Elsevier, Amsterdam, 19-38.
4. D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al.: *Nature.* 477, 457 (2011).
5. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, et al.: *PLoS One.* 7, e34953 (2012).
6. Kon K, Rai M. (2016): Antibiotic Resistance – Mechanisms and new antimicrobial approaches. Elsevier, London, 1-413.
7. Sedláček MJ, Walker C: *Oral Microbiol. Immunol.* 22, 333 (2007).
8. Amábile-Cuevas CF, Cárdenas-García M, Ludgar M: *Am. Sci.* 83, 320 (1995).
9. Cloete TE: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 51, 277 (2003).
10. Davies J, Spiegelman GB, Yim G: *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 445 (2006).
11. Barr V, Barr K, Millar MR, et al.: *J. Antimicrob. Chemother.* 17, 409 (1986).
12. Doucet-Populaire F, Trieu-Cuot P, Dosbaa I, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 185 (1991).
13. Spížek J: *Vesmír.* 78, 27 (1999).
14. Lyon BR, Skurray R: *Microbiol. Reviews.* 51, 88 (1987).
15. Lowy FD: *J. Clin. Invest.* 111, 1265 (2003).
16. European Centre for Disease Prevention and Control (2015): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Reproduction, Stockholm, 1-118.
17. Odeh R, Kelkar S, Hujer AM, et al.: *Clin. Infect., Dis.* 35, 140 (2002).
18. Aminov RI, Mackie RI: *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 147 (2007).
19. van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, et al.: *Front. Microbiol.* 2, 203 (2011).
20. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2728 (2010).
21. Vaidya VK: *J. Lab. Physicians.* 3, 37 (2011).
22. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2950 (2002).
23. Steinberger RE, Holden PA: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5404 (2005).
24. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, et al.: *J. Clin. Invest.* 112, 1466 (2003).
25. Mah T-FC, O'Toole GA: *Trends Microbiol.* 9, 34 (2001).
26. Harriott MM, Noverr MC: *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3746 (2010).
27. Burmølle M, Ren D, Bjarnsholt T, et al.: *Trends Microbiol.* 22, 84 (2014).
28. Elias S, Banin E: *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 990 (2012).
29. Røder HL, Sørensen SJ, Burmølle M: *Trends Microbiol.* 24, 503 (2016).
30. Pader V, Hakim S, Painter KL, et al.: *Nat. Microbiol.* 2, 1 (2016).

Literatura (pokračování)

31. Lin J, Nishino K, Roberts MC, et al.: *Front. Microbiol.* 6, 1 (2015).
32. Laxminarayan R, Amabile-Cuevas CF, Cars O, et al.: *The Lancet.* 388, 218 (2016).
33. O'Neill J (2016): Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance, London, 1-84.
34. Cars O, Hedin A, Heddini A: *Drug Resist. Updates.* 14, 68 (2011).
35. Fauci AS, Marston HD: *JAMA.* 311, 1853 (2014).
36. Aminov RI: *Front. Microbiol.* 1, 134 (2010).

Souhrn

Fuchsová V.: Současný pohled na antibiotickou rezistenci

Antibiotika se v dnešní době běžně používají při léčbě infekčních nemocí. Nelze si však nevšimnout povzrostlého trendu v počtu přežívajících bakterií, které i přes aplikaci antibiotik nadále perzistují v těle pacientů a ohrožují jejich zdraví. Důvodem může být nevhodný výběr používaného antibiotika. Častější příčinou je však zvýšená odolnost mikroorganismů vůči těmto antimikrobiálním látkám, zprostředkovaná různými mechanismy vzniku a přenosu rezistence, jako jsou změny cílových míst antibiotik, genové mutace, horizontální genový transfer genů rezistence, specifické enzymy degradující antibiotika či efluxní systém. K snadšímu a rychlejšímu šíření rezistencí přispívá i schopnost některých mikroorganismů tvořit biofilm, útvar o vysoké stabilitě, který může být i rezervoárem genů nesoucích rezistenci k antibiotikům.

Klíčová slova: antibiotika, rezistence, biofilm

Summary

Fuchsová V.: The current perspective on antibiotic resistance

Antibiotics are commonly used for the treatment of infectious diseases. It is evident that the number of bacteria resistant to antibiotic remarkably increased and pathogenic strains persists in the body of patients and endangering their health. The reason may be the inappropriate use of antibiotics. However, the more common cause is increased resistance of microorganisms mediated by various mechanisms of resistance, such as changes in the target sites of antibiotics, gene mutations, horizontal gene transfer of resistance genes, specific enzymes degrading the antibiotic, or efflux system. The ability of some microorganisms to form a biofilm (a structure of high stability, which can form a reservoir of genes carrying resistance to antibiotics) also contributes to easier and more rapid spread of bacterial resistance to antibiotics.

Keywords: antibiotics, resistance, biofilm

LAKASY: MODRÉ ENZYMY S RŮZNORODOU FUNKCÍ

Klára Herkommerová, Iva Pichová

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, v. v. i., Praha; klara.herkommerova@uochb.cas.cz

Úvod

Lakasy (EC 1. 10. 3.2, benzodiol:kyslík oxidoreduktasy) patří do skupiny oxidoreduktas, do které se řadí i ceruloplasmin, askorbát oxidasa, bilirubinoxidasa a ferroxidasa. Atomy mědi, přítomné v aktivním centru lakas, dodávají těmto enzymům charakteristické modré zabarvení, a proto jsou často označovány také jako „modré více-mědné“ enzymy. Lakasy byly doposud identifikovány u hub, bakterií, rostlin, i u hmyzu, ale zastávají zde rozdílné fyziologické funkce. Lakasy jsou někdy označovány také jako „zelené“ katalyzátory, protože mohou oxidovat různé substráty bez vzniku vedlejších toxických produktů. Jako akceptor elektronu využívají molekulu kyslíku ze vzduchu a tak jediným vedlejším produktem reakcí katalyzovaných lakasami je voda. Díky tomu mají lakasy velký biotechnologický potenciál a nabízí se řada jejich aplikací v různých odvětvích průmyslu¹.

Většina lakas používaných v praxi je původem z hub a jsou produkovány v poměrně velkém množství. V některých případech však může být výhodnější heterologní produkce lakas. Houby syntetizují často několik isoform lakas, které mají rozdílné vlastnosti a velmi obtížně se od sebe oddělují. Lakasy jsou během různých biotechnologických procesů vystaveny extrémním podmínkám (zvýšená teplota, přítomnost solí, rozpouštědel apod.), které snižují jejich aktivitu. Me-

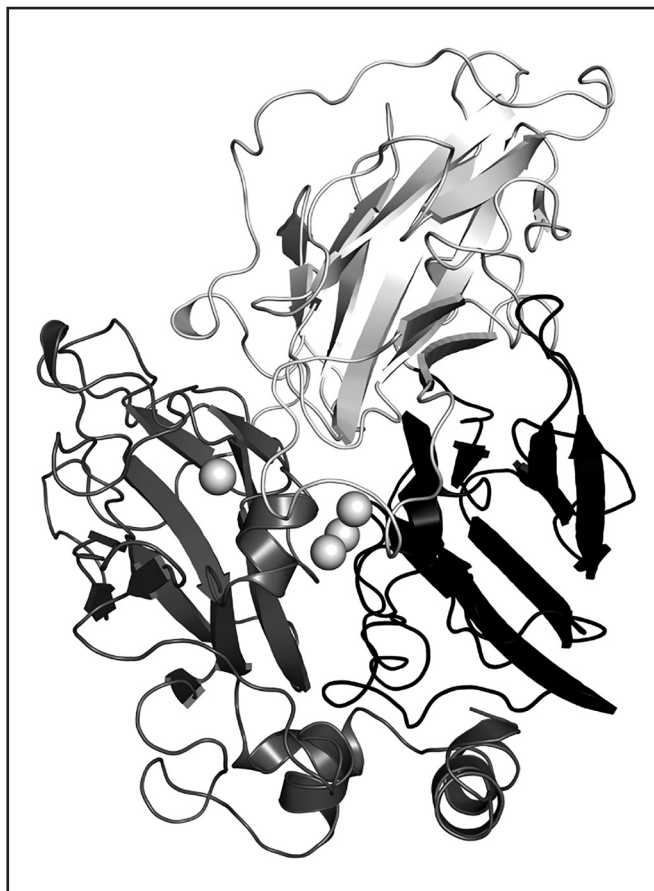
todami genového inženýrství lze pozměnit vlastnosti těchto enzymů a zlepšit jejich stabilitu, zvýšit aktivitu nebo změnit substrátovou specifitu. Následně výběrem vhodných kultivačních podmínek (teplota, pH, složení kultivačního média) lze zvýšit i produkci rekombinantních enzymů. V současné době se pro produkci rekombinantních lakas používají bakterie, houby a kvasinky. Zároveň probíhá i snaha zvýšit produkci lakas u původních organismů².

Biochemické vlastnosti a struktura lakas

Lakasy mají molekulovou hmotnost mezi 50 – 70 kDa a mohou se vyskytovat ve formě monomeru, dimeru nebo tetrameru. Míra glykosylace se pohybuje mezi 10 – 25 % (výjimečně až 30 %). Glykosylace přispívá k teplotní stabilitě, ovlivňuje jejich sekreci a citlivost k proteolytické degradaci^{3,4}. Termotabilní a termotolerantní lakasy jsou především bakteriálního původu, např. u lakasy z bakterie *Streptomyces lavendulae* byla naměřena aktivita i po 100 min při 70 °C, u CotA lakasy z *Bacillus subtilis* dokonce po více než 100 min při 80 °C. Nižší teplotní stabilitu s teplotním rozmezím 30 – 50 °C vykazují lakasy z hub a nejméně stabilní při vyšších teplotách jsou lakasy rostlinné. Liší se i optimálními pH hodnotami, kdy bakteriální lakasy mají vyšší aktivitu při hodnotách pH 6 – 8, zatímco lakasy z hub jsou stabilnější v mírně kyselém prostředí (pH optimum 4 – 6),

neboť při vyšším pH je aktivita těchto lakas inhibována hydroxidovými ionty. Mezi nejúčinnější inhibitory lakasové aktivity patří i ionty azidu, kyanidu a fluoru, které se vážou do aktivního místa enzymu a brání vazbě molekuly kyslíku (obecný mechanismus reakcí je popsán v následující kapitole). Dalšími látkami, které mají negativní vliv na aktivitu těchto enzymů, jsou mastné kyseliny, kyselina kumarová, kojová a EDTA⁵.

V současné době jsou k dispozici 3D struktury bakteriálních lakas z *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Nitrosomonas europaea* a *Streptomyces coelicolor*, a také struktury lakas houbových. Vůbec první kompletní 3D struktura byla určena u lakas z *Trametes versicolor* (Basidiomycota) a z *Melanocarpus albomyces* (Ascomycota). Všechny lakasy mají podobnou molekulovou strukturu, tvořenou 3 doménami (A, B, C), z nichž každá má strukturu β -listu ve tvaru řeckého klíče. V katalytickém místě enzymu se nacházejí 4 rozdílně koordinované atomy mědi, které sehrávají důležitou roli při katalýze⁵. Obr. 1 znázorňuje typickou 3D strukturu lakas. Struktura lakasy *Melanocarpus albomyces* umožnila vysvětlit roli C-terminální části enzymu, obsahující sekvenci bohatou na bazické aminokyseliny (13 – 14 AK), která překrývá aktivní místo a brání vazbě měďnatých kationtů do aktivního místa. Jejím proteolytickým odštěpením, účinkem buněčných serinových proteas, nejspíše vzniká aktivní forma enzymu³. N-terminální část je společně s glykosylací naopak důležitá pro sekreci proteinu⁶.

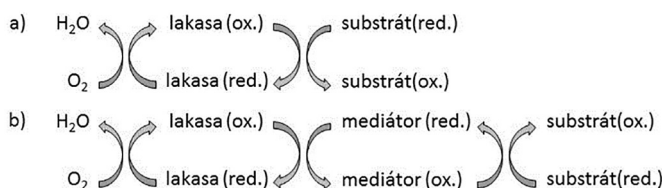


Obr. 1: Krystalová struktura lakasy z *Trametes versicolor* (PDB 1GYC) je tvořena 3 doménami (A – černá, B – světle šedá, C – tmavě šedá) z nichž každá má strukturu β -listu ve tvaru řeckého klíče. V katalytickém místě enzymu se nacházejí 4 rozdílně koordinované atomy mědi, které sehrávají důležitou roli při katalýze.

Reakce katalyzované lakasou

Základem „zelené“ chemie jsou chemické procesy, které snižují nebo dokonce zcela eliminují používání a produkci nebezpečných látek. Příkladem je enzymová oxidace jako alternativa k anorganické chemické oxidaci. Enzymy samy o sobě nejsou toxické a navíc minimalizují vznik toxických produktů. I proto se výzkum v posledních letech zaměřil na lakasy a na jejich využití pro „zelené“ syntézy. Na rozdíl od chemických látek používaných pro oxidaci, mají lakasy vyšší oxidační kapacitu, jsou více specifické, redukuje vznik vedlejších produktů a během reakcí není zapotřebí organických rozpouštědel, zvýšené teploty, tlaku či extrémních hodnot pH. Lakasy katalyzují oxidaci řady substrátů, mezi něž patří především fenoly, aromatické a alifatické aminy a sloučeniny kovů⁷.

Mechanismus reakce spočívá v katalytickém cyklu redukce jedné molekuly kyslíku na dvě molekuly vody a následné oxidaci čtyř molekul substrátu za vzniku příslušných radikálů. Z těchto reaktivních intermediátů mohou vznikat postupně dimery, oligomery až polymery. Substráty jsou oxidovány buď přímo v aktivním místě (Obr. 2a) nebo v případě, že je molekula substrátu příliš velká, aby se dostala do katalytického místa enzymu nebo má velký redoxní potenciál, přidávají se do reakce tzv. chemické mediátory. Jedná se o nízkomolekulární látky, které umožní přenos elektronů mezi lakasou a substrátem (obr. 2 b)⁸. Mezi nejúčinnější syntetické mediátory patří ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), HBT (1-hydroxybenzotriazol), NHA (N-hydroxyacetanilid), VLA (5-hydroxyimino-1,3-diazinane-2,4,6-trione). Tento lakasa/mediátorový systém se využívá především v papírenském průmyslu pro bělení celulóзовých vláken (buničiny) a v průmyslu textilním pro odbarvování tkanin. Přírodními mediátory jsou většinou fenolické látky, které vznikají během lakasové oxidace ligninu nebo to mohou být i jednotlivé monomery tvořící lignin. Tyto látky pak v oxidovaném stavu napomáhají lakasám katalyzovat degradaci i nefenolových aromatických struktur, které tvoří až 80 % tohoto polymeru. Jedná se např. o acetosyringon, syringaldehyd, vanilin a felurovou, sinapovou a p-kumarovou kyselinu. Velkou výhodou přírodních mediátorů je jejich malý dopad na životní prostředí, neboť jsou to látky, které se v přírodě běžně vyskytují. V některých případech jsou syntetické mediátory mnohem účinnější, ale byly popsány i případy, kdy bylo kombinací lakasy a přírodního mediátoru dosaženo lepších výsledků než s mediátory syntetickými. Velmi účinný se zdá být systém lakasy a syringaldehydu nebo lakasy s acetosyringonem pro dekolizaci barev v textilním průmyslu nebo pro oxidativní dehalogenaci pesticidů⁹.



Obr. 2: Schématické znázornění oxidace substrátu katalyzované lakasou bez mediátoru (a) a s mediátorem (b). Převzato a upraveno⁸.

Zdá se tedy, že aplikace lakas pro „zelené“ syntézy má velký potenciál, navíc v kombinaci s přírodními mediátory, které nezatěžují životní prostředí a jsou snadno dostupné z lignocelulosové biomasy.

Fyziologická funkce a možné aplikace lakas

Fyziologická funkce lakas se u všech organismů značně liší. Obecně lze ale říci, že se podílí na polymerizačních a depolymerizačních procesech. Produkce většiny lakas je u hub, rostlin a hmyzu extracelulární, zatímco bakterie produkují lakasy intracelulárně.

Lakasy z hub jsou nejlépe popsanou skupinou lakas. V současnosti bylo izolováno a charakterizováno více než 100 lakas, převážně z oddělení Ascomycota nebo Basidiomycota. Tyto enzymy se podílí na sporulaci hub, tvorbě pigmentu a u hub bílé hniloby na degradaci ligninu, celulosy a hemcelululose¹⁰. Ukázalo se, že lakasy jsou také důležitým faktorem virulence u mnoha chorob způsobených houbami. Produkci lakas se patogenní houby brání účinkům fytoalexinů, které rostliny syntetizují v odpovědi na mikrobiální infekci. Mechanismus působení lakas spočívá v oxidaci fytoalexinů, a tím i jejich detoxifikaci. U patogenní kvasinky *Cryptococcus neoformans* se předpokládá, že lakasovou aktivitou vzniká melanin, který chrání kvasinku před imunitním systémem hostitele¹¹.

Houbové lakasy se prozatím jako jediné využívají v biotechnologiích, a to především díky relativně vysokému redoxnímu potenciálu a extracelulární produkci těchto enzymů. Příkladem je použití lakas v textilním průmyslu pro odbarvování tkanin, namísto chemických prostředků na bázi chlóru. Další možnou aplikací lakas nebo spíše hub produkujících lakasy, je bioremediace zeminy kontaminované organickými polutanty, jakými jsou polycyklické aromatické uhlovodíky a chlorfenoly, které dokážou lakasy oxidovat. Dále se tyto enzymy využívají v organických syntézách a pro modifikaci povrchů různých polymerů¹².

Rostlinné lakasy mají odlišné pH optimum (pH 7 – 10), nižší redoxní potenciál a vyšší míru glykosylace (20 – 45%). Díky těmto vlastnostem se podílejí na stavbě buněčné stěny rostlin (syntézou ligninu), čemuž odpovídá i lokalizace těchto enzymů v apoplastu. Popsána byla rovněž i role lakas v odpovědi rostlin na nepříznivé podmínky prostředí (sucho, zvýšená koncentrace soli a mechanické poškození)¹³.

Využití rostlinných lakas v biotechnologiích je prozatím stále ve fázi základního výzkumu. Pozornost se upírá především na analýzu jednotlivých genů kódujících lakasy a ověřování jejich přesných funkcí u různých druhů rostlin. Předpokládá se, že díky schopnosti lakas oxidovat fenolické látky, mohou být pro remediaci organických polutantů ze životního prostředí použity transgenní rostliny se zvýšenou produkcí extracelulárních lakas. Další možná aplikace se nabízí v oblasti „druhé generace“ biopaliv využívající rostlinou lignocelulosovou biomasu. Velké množství ligninu v biomase značně snižuje produkci biopaliv. Řešením mohou být transgenní rostliny s pozměněným obsahem ligninu či jeho složením¹³.

První prokaryotní lakasa byla popsána u rhizosféry bakterie *Azospirillum lipoferum* a předpokládá se její zapojení v oxidaci fenolových sloučenin rostlin, transportu elektronů a v pigmentaci bakteriálních buněk. U *Pseudomonas syringae* a *Escherichia coli* hraje lakasa roli při rezistenci bakterií k mědi, a při morfogenezi u *Streptomyces* spp. Nejlépe prostudovanou lakasou je ale termotabilní CotA z *Bacillus subtilis*, jenž se účastní syntézy hnědého pigmentu u endospor, které jsou pak více odolné vůči působení UV záření a účinkům peroxidu vodíku¹⁴.

Bakteriální lakasy se vyznačují vysokou aktivitou a stabilitou při vyšších teplotách a hodnotách pH a zároveň jsou odolné vůči zvýšeným koncentracím iontů chlóru a mědi. To značně přispívá k využití bakteriálních lakas v biotechnologických procesech. Ovšem nevýhodou, a tím i omezením pro průmyslové využití, je jejich intracelulární produkce, čímž se zvyšují náklady na získání aktivního enzymu, a dále pak také jejich nízký redoxní potenciál, který omezuje použití těchto lakas pro oxidaci širší škály substrátů. Ve většině případů je tedy nutné použití mediátorů, což celý biotechnologický proces opět prodražuje¹⁵. V současné době se uvažuje o aplikaci lakas/mediátorového systému v oblasti textilního průmyslu, např. bělení textilních vláken pomocí lakas z bakterií *Pseudomonas stutzeri* a *Streptomyces cyaneus*¹⁶.

U hmyzu byly identifikovány dvě hlavní formy více-mědných oxidas (MCO). Forma lakas MCO1 je více komplexní a je zapojena do procesů imunitní odpovědi hmyzu, metabolismu železa a kyseliny askorbové, detoxifikace stravy a oxidaci fenolových substrátů¹⁷. Druhá forma MCO2 (lakasa 2) má hlavní podíl na sklerotizaci kutikuly, kde díky lakasové aktivitě dochází ke vzniku vysoce reaktivních chinonů, které mohou buď polymerizovat a vytlačovat z kutikuly vodu a/nebo mohou reagovat s nukleofilními postranními řetězci aminokyselin a vytvářet tak prokřížení bílkovinných vláken, které jsou spolu s chitinem základem kutikulu. Tato funkce lakas byla popsána např. u rodu *Manduca*, *Anopheles*, *Tricholium*¹⁸. Termiti rodu *Neocapritermes taracua* naopak využívají lakasu při obraně termitiště. Starší dělníci mají na povrchu těla jakousi kapsu, která obsahuje modré krystaly lakasy a v labiálních žlázách hromadí hydrochinony. V případě napadení termitiště, dojde nárazem na tělo termitů k poškození kapsy a promísení lakasy s hydrochinony za vzniku vysoce toxických benzochinonů, které jsou vystříknuty na protivníky¹⁹. Přestože jsou informace o hmyzích lakasách dostupné, patří tyto enzymy mezi nejméně prostudovanou skupinu lakas obecně.

Závěr

Už řadu let se využívá katalytických vlastností lakas v různých odvětvích průmyslu. V nadcházejících letech se proto předpokládá, že se výzkum zaměří především na jejich úpravu/zlepšení. Rekombinantní produkce lakas „na míru“ určitému biotechnologickému procesu je určitě jedním z klíčových bodů výzkumu. Další nové poznatky by mohlo přinést studium molekulové dynamiky těchto enzymů a studium mechanismu účinku

na molekulové úrovni, kde stále zůstává řada nezodpovězených otázek. Velký prostor pro výzkum se nabízí rovněž v oblasti hmyzích lakas, kde je zatím k dispozici jen minimum informací, v porovnání s dobře popsány-
mi lakasami z hub.

Literatura

1. Mate DM, Alcalde M: *Biotechnology Advances* 33, 1 (2015).
2. Antosova Z, Sychrova H: *Mol Biotechnol* 58, 2 (2016).
3. Giardina P, et al.: *Cell Mol Life Sci* 67, 3 (2010).
4. Shraddha, et al.: *Enzyme Research* 2011, (2011).
5. Gasparetti C: *VTT Science* 16, (2012).
6. Bulter T, et al.: *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2 (2003).
7. Jeon JR, et al.: *Microb Biotechnol* 5, 3 (2012).
8. Riva S: *Trends in Biotechnology* 24, 5 (2006).
9. Canas AI, Camarero S: *Biotechnol Adv* 28, 6 (2010).
10. Rivera-Hoyos CM, et al.: *Fungal Biology Reviews* 27, 3–4 (2013).

Souhrn

Herkommerová K., Pichová I.: Lakasy: modré enzymy s různorodou funkcí

Lakasy jsou enzymy s velkým biotechnologickým potenciálem. Katalyzují oxidaci řady substrátů, mezi které patří např. fenoly, aromatické a alifatické aminy, a to buď přímou interakcí, nebo zprostředkovaně pomocí mediátorů. Fyziologická funkce lakas se značně liší v závislosti na organismu. Izolace lakas z původních producentů přináší relativně vysoké výtěžky, na druhou stranu rekombinantní produkci mohou být získány enzymy s vyšší aktivitou, lepší stabilitou nebo rozdílnou substrátovou specifitou.

Klíčová slova: lakasy, biotechnologie, „zelená“ chemie, mediátory, oxidoreduktasy

Summary

Herkommerová K., Pichová I.: Laccases: blue enzymes with different function

Laccases are enzymes with a great potential for biotechnological applications. Laccases oxidize a number of substrates, mainly phenols, aromatic and aliphatic amines and can catalyze reactions by direct interaction with substrates or by mediators. Physiological function of these enzymes is different in various organisms. Isolation of laccases from nature sources provide relatively high levels of active enzymes, but on the other hand, the recombinant production can bring engineered enzymes with higher activity, better stability or different substrate specificity.

Keywords: laccases, biotechnology, „green“ chemistry, mediators, oxidoreductases

CRISPR/Cas9 REVOLUČNÍ NÁSTROJ NEJEN PRO EDITACI GENOMU

Sofie Kolibová, Zuzana Stehlíková a Kamila Zdeňková

Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha; kamila.zdenkova@vscht.cz

Úvod

Dlouhou dobu zůstávaly snahy o přesné zasažení cílového místa dědičné informace spíše náhodnou záležitostí. Například při využití virových vektorů pro vnášení určitého úseku DNA pro genové terapie byl často požadovaný úsek s virovým vektorem začleněn na nevhodné místo v genomu pacienta a u některých pacientů se pak po slibných výsledcích genové terapie rozvinula leukémie¹.

Ve 21. století byl zaznamenán velký pokrok ve vývoji nových metod umožňujících přesné cílení modifikace na vybrané místo v genomu. Techniky, jako jsou zinkové prsty s nukleasou (angl. Zinc Finger Nuclease, ZFN) nebo technika TALEN (angl. Transcription Activator-Like Effector Nucleases) umožňují přesné cílení a usnadňují vědeckou práci s genetickým materiálem. Obě zmi-

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem NPU LO 1302 od MŠMT.

11. Mayer AM, Staples RC: *Phytochemistry* 60, 6 (2002).
12. Viswanath B, et al.: *Enzyme Research* 2014, (2014).
13. Wang J, et al.: *Biotechnology for Biofuels* 8, (2015).
14. Forootanfar H, Faramarzi MA: *Biotechnol Prog* 31, 6 (2015).
15. Sharma P, et al.: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 6 (2007).
16. Narayanan P, et al.: *Biotechnology* 13, (2014).
17. Liu X, et al.: *Scientific Reports* 5, (2015).
18. Dittmer NT, Kanost MR: *Insect Biochem Mol Biol* 40, 3 (2010).
19. Bourguignon T, et al.: *Mol Biol Evol* 33, 3 (2016).

ňované techniky využívají k vyhledání cílové sekvence specificky navržené proteiny, které interagují s DNA v cílovém místě a následně pak štěpí jedno vlákno dvojšroubovice DNA. Přesnost štěpení DNA prostřednictvím těchto metod je vysoká, avšak příprava experimentu spojená s návrhem proteinů pro každý cílový DNA lokus je dosti náročná a je hlavní překážkou pro rutinní používání v laboratoři. Zásadní přelom jak v účinnosti, tak i v usnadnění práce přinesla nová metoda využívající k vyhledání cílové sekvence krátký řetězec ribonukleové kyseliny, která je dnes ve světě známá jako CRISPR, nejčastěji ve spojení s Cas9 nukleasou².

CRISPR/Cas je zkratka z anglického originálu clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated genes, tedy segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitivních/CRISPRu asociovaných genů. Jed-

ná se o adaptabilní imunitní systém některých bakterií a především archeí na obranu proti virovým infekcím. Vyskytuje se přibližně u 50 % známých bakterií a až u 90 % archeí. Umožňuje specifickou obranu, kdy buňka po předchozí konfrontaci s cizorodým genetickým materiálem, získává informaci o daném patogenu. Je schopna tuto informaci uložit a při dalším setkání s patogenním virem může spustit silnou obranu odezvu a cizorodou DNA degradovat^{3,4}.

Informace o cizorodém genetickém materiálu se ukládá ve formě tzv. mezerníku (angl. spacer), který je nově zařazený do tzv. CRISPR lokusu. Přepisem RNA z tohoto lokusu pak vzniká pre-crRNA obsahující několik mezerníků. Jejím rozštěpením vzniká několik crRNA, obsahujících pouze jeden konkrétní mezerník. Komplex schopný rozpoznat cizorodou DNA, navázat se k ní a zapříčinit její rozštěpení je složen z naváděcích RNA, rozpoznávané DNA a enzymu endonukleasy. Nezbytným složkami komplexu jsou tracrRNA a PAM sekvence cizorodého organismu a bakteriální crRNA společně s endonukleasu Cas9, která provádí vlastní štěpení cizorodé DNA. Celý tento princip je obdobou RNA interference u eukaryotních organismů⁵.

PAM (z anglického protospacer adjacent motif) je krátká sekvence o délce 2 – 6 párů bází a je důležitá pro správné fungování endonukleasy. Nepochází z bakteriálního CRISPR lokusu, nýbrž z invazivního organismu, chrání tedy vlastní DNA před degradací. Pokud jí Cas9 nerozpozná u komplementární sekvence genomové DNA cizorodého organismu, neproběhne štěpení. Nejčastěji používaná Cas9 endonukleasa má poměrně jednoduchou PAM sekvenci a to 5'-NGG-3' (kde N je libovolná báze). Pro správné fungování Cas9 endonukleasy je tedy potřeba nalézt ve štěpeném genomu krátkou sekvenci dvou bází (GG). Tyto krátké sekvence se v genomech vyskytují často, přibližně každých 8 bází²⁴.

Historie

Jako první byly objeveny nahromaděné repetitivní sekvence v *E. coli*, to můžeme datovat do roku 1987, nicméně jejich funkce byla v té době neznámá⁶. Samotná identifikace cas genů proběhla až v roce 2002, v tomto roce byl i poprvé použit termín CRISPR. V té době se už začaly objevovat hypotézy, že se jedná o analogii s eukaryotním systémem adaptivní imunity, nicméně tyto hypotézy nebyly zpočátku přijímány. Až v roce 2005 se podařilo prokázat původ mezerníků v CRISPR lokusech. Bylo potvrzeno, že mezerníky pocházejí z extrachromosomální DNA, převážně z virových fágů nebo plasmidů. Tedy teorie, že by se mohlo jednat o analog k adaptivní imunitě a RNA interferenci, nebyla tak neuvěřitelná. V roce 2007 byly provedeny první experimenty týkající se získané adaptivní imunity. Dostáváme se ke zlomovému roku 2012, kdy se podařilo získat purifikovaný enzym Cas9 ze *Streptococcus thermophilus* a *Streptococcus pyogenes*. Takto připravený Cas9 štěpil DNA po navedení pomocí crRNA ve specifických místech *in vitro*. Tímto experimentem se otevřela cesta k použití CRISPRu jako nástroje pro genové inženýrství, metodu začalo rozvíjet velké množství laboratoří po celém světě. Rozběhlo se rozsáhlé studium složek CRISPRu

a i jeho detailnější klasifikace a pochopení molekulární podstaty funkce tohoto systému.

Právě bakteriální duplex tracrRNA:crRNA byl vzorem pro navržení a vytvoření jednořetězcové naváděcí RNA (angl. single guide RNA, sgRNA). Jednořetězcová RNA je navržena tak, aby sekvence o dvaceti nukleotidech na 5' konci určovala cílové místo a sekvence blíže k 3' konci vázala endonukleasu Cas9. Vhodnou volbou naváděcí sekvence sgRNA je možné zacílit komplex s nukleasou Cas9 na vybrané místo v řetězci editované DNA⁷.

Klasifikace

Informace o cizorodé DNA se ukládá ve formě tzv. mezerníku uložených v CRISPR lokusu, kromě mezerníků jsou pro činnost CRISPR důležité také cas geny. Byla objevena řada cas genů, pojmenovaných podle asociace s CRISPR, které kódují helikasy nebo nukleasy. Imunitní odpověď mikroorganismů můžeme rozdělit do tří navazujících stadií a to adaptaci, expresi a interference. Během adaptativní fáze dochází k inkorporaci cizorodých fragmentů DNA v podobě spacerů. Druhou fází je syntéza prekurzorových transkriptů (pre-crRNA), které pak maturují na CRISPR RNA (crRNA). V poslední fázi, interferenci, pomocí crRNA a Cas proteinů dochází k zacílení a štěpení komplementárního místa v cizorodé DNA. V současné době je známo velké množství Cas proteinů různých bakterií a archeí, které můžeme rozdělit do dvou tříd, pěti typů a 16 podtypů³.

První třída obsahuje multipodjednotkové efektorové komplexy crRNA. Obsahuje typ I, III a IV. Lokus typu I obsahuje gen *cas3*. Lokus typu III obsahují zase gen *cas10* a poslední typ IV obsahují pouze některé bakterie a funkčně je zatím tento typ necharakterizován. Druhá třída má všechny funkce uloženy v jediném proteinu (např. Cas9), jsou do ní řazeny typy II a V. Charakteristický gen pro typ II je *cas9*, který kóduje multidoménový protein účastnící se jak maturace crRNA tak i následné interference. Mimo *cas9* CRISPR lokusy druhé třídy, které byly nalezeny jen u některých bakterií, obsahují také geny *cas1* a *cas2*. Poslední typ V obsahuje gen *cpf1* kódující Cpf1 protein, společně s geny *cas1* a *cas2*. Funguje podobně jako Cas9, nicméně jsou mezi nimi některé podstatné rozdíly. Cpf byl objevený relativně nedávno a jeho rozdílné vlastnosti oproti Cas9 jsou popsány níže.

Cas9 byl izolovaný z bakterií *Streptococcus thermophilus* a *Streptococcus pyogenes*. Patří do typu II, jak již bylo uvedeno. K procesu maturace crRNA vyžaduje trans aktivaci tracrRNA (tracrRNA), jejíž příslušné geny se nachází v blízkosti CRISPR lokusu. Jedná se o přibližně 25 párů bází dlouhé úseky RNA komplementární k crRNA sekvenci. Cas9 umožňuje snadnější párování a tvorbu RNA duplexu mezi tracrRNA a pre-crRNA. Na tento duplex je pak zacílená buněčná endonukleasa RNasa III, ta následný duplex rozštěpí a uvolňuje se maturovaná crRNA. Ve fázi interference je tedy vyžadována jak crRNA tak nukleasa Cas9 ale i tracrRNA. Ve výsledku pak Cas9 rozštěpí cílovou DNA na dvě části s tupými konci. Cas9 systém tedy vyžaduje ke své funkci dvě RNA molekuly – crRNA a tracrRNA⁸. Endo-

nukleasa Cas9 je enzym mající dvě důležité funkční domény, doména HNH slouží pro štěpení komplementárního řetězce k sgRNA a doména Ruv C-like slouží pro štěpení protějšího řetězce. K rozpoznání cílové sekven-
ce je důležité kromě párování bází ještě vyhledání krátké sekvenčního motivu PAM^{7, 9, 10}.

Cpf1 byla izolovaná ze dvou bakterií *Prevotella* a *Francisella*, odtud zkratka Cpf1, a ke své funkci vyžaduje pouze jednu molekulu RNA. Od Cas9 se liší ve třech zásadních parametrech. Prvním z rozdílů je, že Cpf1 systém pracuje rovnou s maturovanou crRNA bez nutnosti trans aktivační RNA. Druhým rozdílem je PAM sekven-
ce, která je u Cas9 v G-bohatých oblastech a u Cpf1 se jedná o krátké T-bohaté oblasti, kde dochází k jedno-
duššímu štěpení. Posledním významným rozdílem je, že po štěpení cílové DNA vznikají konce s přesahy nebo-
li lepivé konce. Ve výsledku nám tedy CRISPR/Cpf1 poskytuje efektivní nástroj s odlišnými vlastnosti než
dosud nejčastěji používaný Cas9 a má také velice silný potenciál pro úspěšné používání v molekulární biologii¹¹.

Modifikace enzymu Cas9 mají různé využití

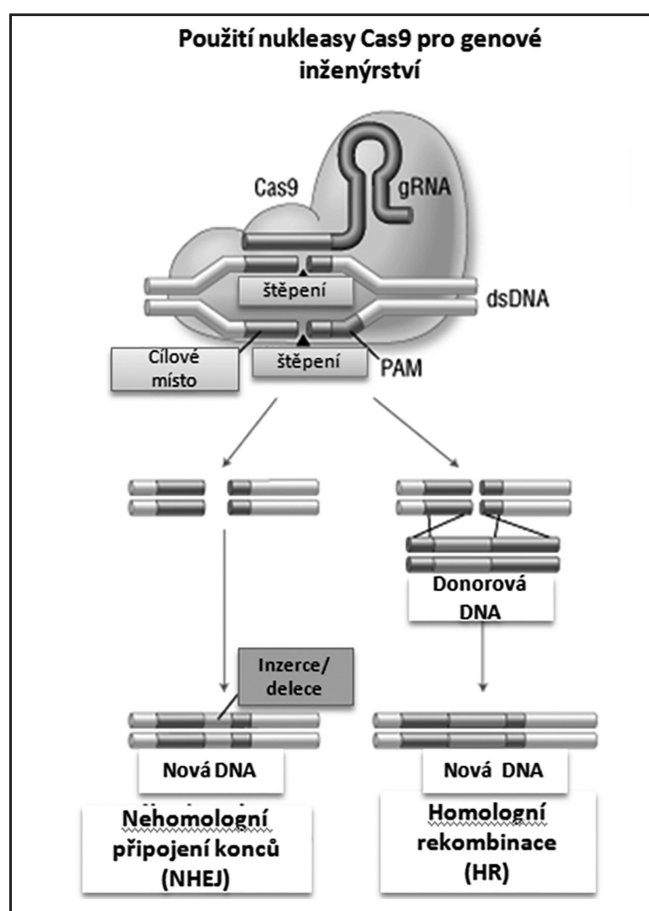
V současné době jsou nejčastěji používány tři různé varianty nukleasy Cas9. První varianta využívá enzym Cas9 v nezměněné podobě (Obr. 1), který místně specifickým štěpením generuje dvouvláknové zlomy. Vytvořené dvouvláknové zlomy aktivují v buňce repa-
rační mechanismy nehomologního spojování konců¹² (NHEJ). Výsledkem oprav DNA jsou pak inserce nebo
delece, které naruší cílové místo. Pokud je poskytnut donorový homologní templát je dalším opravným
mechanismem, který buňka může použít homologní rekombinace^{12, 13}.

Druhá varianta používá enzym s mutací ve funkční doméně. Mutace v jedné z domén dávají vznik enzymu štěpícímu pouze jedno vlákno. Pro opravu jednořetěz-
cových zlomů pak není aktivován systém NHEJ, namísto toho oprava probíhá pomocí homologní rekombina-
ce^{7, 14, 15}. Pro zvýšení specifčnosti zacílení se v některých případech používají dva komplexy sgRNA a enzymu
Cas9 s mutací ve funkční doméně¹⁶.

Třetí variantou je použití enzymu Cas9 (dCas9), který postrádá nukleasovou aktivitu¹⁷, což je zapříčiněno
mutacemi H840A v HNH doméně a D10A v doméně Ruv C^{7, 18}. dCas 9 je poté možno využít k fúzi s různými
efektorovými doménami. Takto připravený protein se může stát nástrojem pro umlčení nebo naopak aktivaci
genů^{17, 19, 20, 21, 22}.

Literatura

1. Cavazzana-Calvo M, Fischer A: *J. Clin. Invest.* 117(6), 1456 (2007).
2. Doudna JA, Charpentier E: *Science* 346, 0036 (2014).
3. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al.: *Nat. Rev. Microbiol.* 13(11), 722 (2015).
4. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel Ch: *Nucleic Acids Res.* 35 (2007).
5. Wright AV, Nunez JK, Doudna JA: *Cell* 164, 29 (2016).



Obr. 1: Základní aplikace CRISPR-Cas9 pro genové inženýrství. Cas9 nukleasa místně specificky štěpí dvouřetězcovou DNA a aktivuje opravní mechanismy. V nepřítomnosti homologního templátu jsou vlákna opravena nehomologním spojením konců (NHEJ). Tato oprava může vést k narušení cílové sekven-
ce nejčastěji jednobázovou delecí nebo insercí (tzv. indel mutace).

Fúze dCas9 se zeleným fluorescenčním proteinem EGFP se ukázala jako dobrý nástroj pro vizualizaci sek-
vencí. Chenova vědecká skupina takto úspěšně vizuali-
zovala repetitivní a nerezpetitivní úseky DNA²³.

Závěr

Metoda CRISPR-Cas9 patří mezi nejmodernější me-
tody pomocí kterých lze provádět modifikace geno-
mu. Tato metoda je jedinečná díky použití komplexu
krátké naváděcí sekven-
ce RNA a nukleasy např. Cas9. Další variace metody zahrnující mutace v jedné nebo
obou funkčních doménách umožňují použití metody
pro umlčení nebo aktivaci genů a vizualizaci některých
úseků DNA.

6. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A: *J. Bacteriol.* 169, 5429 (1987).
7. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al.: *Science* 337, 816 (2012).
8. Richter H, Randau L, Plagens A: *Int. J. Mol. Sci.* 14(7), 14518 (2013).
9. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, et al.: *Nature* 507, 62 (2014).

Literatura (pokračovanie)

10. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M: *Nature* 513, 569 (2014).
11. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al.: *Cell* 163, 759 (2015).
12. Overalle-Petersen S, Harms K, Orlando LA, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 19860 (2013).
13. Gong C, Bongiorno P, Martins A, et al.: *Nat. Struct. & Mol. Biol* 12, 304 (2005).
14. Cong L, Ran FA, Cox D, et al.: *Science* 339, 819 (2013).
15. Davis L and Maizels N: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, E924 (2014).
16. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al.: *Cell* 154, 1380 (2013).
17. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al.: *Cell* 152(5), 1173 (2013).
18. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(39), 2579 (2012).
19. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al.: *Nat. Methods* 10, 977 (2013).
20. Gilbert LH, Morsut L, Liu Z, et al.: *Cell* 154, 442 (2013).
21. Hu J, Lei Y, Wong WK, et al.: *Nuc. Acids Res.* 42(7), 4375 (2014).
22. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, et al.: *Nat. Methods*, 10(10), 973 (2013).
23. Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, et al.: *Cell* 155, 1479 (2013).
24. Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM: *Elife* 3, e03401 (2014).

Souhrn

Kolibová S., Stehlíková Z., Zdeňková K.: CRISPR/Cas9 revoluční nástroj nejen pro editaci genomu

CRISPR/Cas je zkratka z anglického originálu Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated genes čili segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitivních/CRISPRu asociovaných genů. Pomocí techniky CRISPR lze cíleně zasahovat do genetické informace vybraných organismů, umožňuje štěpení obou vláken dvojšroubovice DNA na konkrétním vybraném místě genomu. Rozvinutí použití umožnilo důkladné pochopení adaptivní imunity bakterií a archeí. Je známo několik variant této metody založených především na modifikacích nukleasy. Pomocí metody CRISPR je možné vyřadit z funkce konkrétní geny, editovat DNA, regulovat transkripci nebo označit vybrané místo v genomu.

Klíčová slova: CRISPR, Cas, editace genomu

Summary

Kolibová S., Stehlíková Z., Zdeňková K.: CRISPR/Cas9 a revolutionary tool not only for the genome editing

CRISPR/Cas is a shortcut from English original: Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated genes. Using a CRISPR technique we can specifically manipulate with the hereditary information of selected organisms, the technique allows the cleavage of both strands of the double helix of DNA at a specific site in the genome. Developing application allows a deeper understanding of adaptive immunity of bacteria and archaea. Using the CRISPR method is possible to disable the function of specific genes, edit or regulate DNA transcription or mark selected location in the genome.

Keywords: CRISPR, Cas, genome editing

OZNAČENIE „GMO-FREE“

Soňa Středanská

Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha; sonastredanska@gmail.com

Úvod

Výrobu a odbyt poľnohospodárskych geneticky modifikovaných organizmov (GMO) po celom svete sprevádza množstvo diskusií. Mnohí spotrebiteľia sa totiž obávajú, že potraviny získané z geneticky modifikovaných organizmov môžu byť nezdravé alebo že produkcia takýchto organizmov môže mať negatívne environmentálne alebo sociálne dopady. V dôsledku toho sa množstvo predpisov o povoľovaní a označovaní GMO zvýšilo, a marketing s GMO-free surovinami začal rapídne narastať vo viacerých krajinách¹.

USA

Od roku 2012 získali anti-GMO hnutia v Spojených štátoch amerických značnú podporu v ich úsilí označovania geneticky modifikovaných potravín. Podarilo sa im získať volebné iniciatívy na označovanie takýchto potravín v mnohých štátoch, avšak nakoniec ich úsilie, zaviesť federálnu legislatívu, bolo z veľkej časti neúspešné.



Obr. 1: Označenie „GMO-free“ produktu (<http://organicaegypt.com/no-gmo/>, stiahnuté 22. 10. 2016)

Americký Úrad pre potraviny a liečivá, vládna agentúra zodpovedná za bezpečnosť geneticky modifikovaných potravín, určila, že tieto potraviny sú v podstate podobné (tzn. že nie je žiadny materiálny rozdiel) geneticky nemodifikovaným potravinám a preto nie je vyžadované označovanie. Naproti tomu zástancovia označovania argumentujú, že spotrebiteľia majú právo vedieť, čo kupujú, mali by byť schopní si vybrať či chcú potraviny s geneticky modifikovanými prísadami a označovanie by prinieslo väčšiu transparentnosť v potravinovom systéme. Na podporu týchto tvrdení, zástancovia označovania poukazujú na rad prieskumov, ktoré ukazujú, že americkí spotrebiteľia by privítali istú formu označovania GMO (Obr. 1). Poľnohospodársko-potravinársky priemysel je

v drivej väčšine opačného názoru. Argumentujú tým, že GM potraviny sú bezpečné a povinné značenie by bolo nákladné a malo by negatívny vplyv na spotrebiteľov a výrobcov potravín. Potravinárske spoločnosti, ako napríklad Nestlé, spolu s biotechnologickými firmami akou je Monsanto, minuli viac ako 100 miliónov amerických dolárov na porazenie štyroch štátnych petícií za vyhlásenie referenda. V stávke je veľa, preto povinné označovanie GMO bude mať obrovský vplyv na poľnohospodársko-potravinársky systém USA, kde 90% produkovanej kukurice, sóje a cukrovej repy sú geneticky upravované a 80 % všetkých spracovaných potravín zahŕňa aspoň jednu zložku odvodenú z geneticky modifikovaných plodín².

Najnovšie však Oddelenie pre inšpekciu a bezpečnosť potravín Ministerstva poľnohospodárstva prijalo dokument, na základe ktorého povoľuje firmám označenie, že ich výrobky neobsahujú ingrediencie z geneticky modifikovaných potravín alebo sú inak bioinžiniersky upravené. Jedná sa len o spoločnosti produkuje výrobky z mäsa, hydiny a vaječné výrobky. Preto sú povolené označenia typu: „Kurča bolo kŕmené stravou bez obsahu geneticky modifikovaných zložiek“ alebo „Krávy boli vychované na pastvinách, kde sa nevyskytovali geneticky modifikované produkty“. Tieto označenia budú však schválené až po odsúhlasení zodpovednej organizácie (napr. National Organic Program) a pokiaľ označenie uvádza aj adresu webovej stránky, kde môžu spotrebiteľia získať ďalšie informácie týkajúce sa procesu certifikácie³.

„The Non-GMO Project“

Non-GMO Project je nezisková organizácia, ktorej cieľom je zachovať a postupne budovať zdroje produktov bez GMO a zároveň vzdelávať spotrebiteľov o voľbách bez geneticky modifikovaných produktov. Tvrdia, že každý má právo vedieť čo sa nachádza v ich jedle a zároveň by mal mať možnosť výberu jedla bez GMO. Projekt bol vytvorený v roku 2007 dvoma obchodnými reťazcami – The Natural Grocers a The Big Carrot Natural Food Market, ktorí sa spojili s cieľom vytvoriť jednotné ohraničenie „GMO-free“ produktov v potravinárskom priemysle. Na dodanie vedeckého základu a technickej podpory na svetovej úrovni začala organizácia spolupracovať s Global ID Group, svetovou špičkou v testovaní a certifikovaní non-GMO produktov.



Obr. 2: Značka produktu overeného Non-GMO Projektom (<https://www.nongmoproject.org/about/>, stiahnuté 22. 10. 2016)

overené Non-GMO Projektom zostávajú aj naďalej jedným z najrýchlejšie rastúcich sektorov na trhu a Motýľ je jedným z naj dôveryhodnejších značiek, ktoré zamedzujú GMO medzi nakupujúcimi⁴.

Prvé výrobky, ktoré niesli znak Motýľa (Obr. 2), sa dostali na trh v roku 2010. Odvtedy Program na overovanie produktov neustále rastie a v súčasnosti ho predstavuje viac ako 2800 overených značiek s takmer 40 000 výrobkami. Vzhľadom na dopyt spotrebiteľov v celej Severnej Amerike, výrobky

Európska únia

Pre celú Európsku úniu platí od roku 1997 nariadenie, podľa ktorého je označovanie geneticky modifikovaných potravín povinné. Zreteľne označené geneticky modifikované produkty (napr. Flavr Savr paradajky) musia byť označované aj keď sú predávané voľne bez obalu. K dnešnému dňu však takéto produkty na trhoch nie sú. Označené musia byť aj produkty, ktoré sú len čiastočne vyrábané z GMO, to znamená že obsahujú len prísady z nich. Avšak napríklad krmivá obsahujúce GM rastliny alebo zložky z GM mikroorganizmov musia byť označené, ale potraviny vyrobené zo zvierat chovaných týmto krmivom, ako je mäso, vajcia a mliečne výrobky už nevyžadujú označenie. Sú považované za potraviny vyrobené „s pomocou geneticky modifikovaných organizmov“ a preto sú vyňaté s požiadaviek na označovanie.

Neúmyselné a technicky nevyhnutné miešanie potravín s GM potravinami musí byť značené len v prípade že obsah GMO presahuje 0,9 % z pôvodnej látky. Toto pravidlo je možné len za podmienok toho, že výrobca preukáže, že pridanie GMO bolo naozaj technicky nevyhnutné alebo neúmyselné, (ak sú GMO primiešavané úmyselne je značenie nutné) a GMO musí byť zároveň registrované v rámci EÚ a tým je považované za bezpečné. Príroda je totiž otvorený systém, žiadne plodiny tak nemôžu byť v úplnej izolácii a tak sa vetrom môžu preniesť peľové častice aj na ostatné plodiny. Tak bola vďaka najnovším citlivým metódam zistená stopová prítomnosť GMO aj v biopotravinách, avšak bola pod hodnotou 0,9 % preto nedošlo k označeniu⁵.

Označovanie „GMO-free“ na obaloch potravín Európska únia nijak neobmedzuje, za predpokladu, že informácia nie je zavádzajúca pre spotrebiteľov, avšak jednotlivé krajiny si tento prístup môžu obmedziť. Napríklad Francúzsko a Holandsko v národnej legislatíve určujú konkrétne slová, ktoré môžu byť použité na identifikáciu výrobku bez GMO ale nešpecifikujú logo, v Rakúsku a Nemecku vnútroštátne právne predpisy stanovujú slová a zároveň aj právne nezáväznú logá. Vo všetkých štyroch krajinách si súkromné subjekty môžu použiť vlastné logo, ak dodržiavajú vnútroštátne pravidlá⁶.

Diskusia

Postoj spotrebiteľov voči GMO je vo svete väčšinou negatívny. Niektorí veria, že geneticky modifikované produkty môžu mať neznáme a potenciálne dlhodobé riziko ako aj pre zdravie ľudí, takisto aj pre životné prostredie. Prevláda tak názor, že spotrebiteľ by mal mať možnosť zvoliť si výrobok, ktorý neobsahuje a ani nie je vyrobený z GMO. V dôsledku toho niektorí prejavujú ochotu platiť viac za „GMO-free“ produkt, alebo naopak čakajú zníženú cenu za výrobok ktorý obsahuje GMO⁷. Je preto potrebné aby sa ľudia o genetických modifikáciách v potravinách dozvedeli viac a tak hneď neodcuďzovali jednotlivé produkty, len preto že sú „modifikované“ a nie prirodzené.

Záver

V súčasnosti je pojem geneticky modifikovaný organizmus veľmi kontroverzný. Predovšetkým vďaka nedo-

statočnej informovanosti verejnosti dochádza k tomu, že tento pojem je považovaný za negatívny, pretože dochádza k narušeniu prírodných procesov, ktoré môže mať nepredvídateľné následky v životnom prostredí alebo v zdraví človeka. Označenie „GMO-free“ na potravinách je preto veľmi výnosným marketingovým ťahom, ktorý má prilákať odporcov týchto genetických manipu-

lácii a zároveň odradiť konkurenciu, ktorá toto označenie nemá. S pribúdajúcim množstvom pestovaných geneticky modifikovaných plodín je preto otázne, či toto označenie bude v budúcnosti na všetkých potravinách bez GM kvôli marketingu alebo ľudstvo dôjde do štádia, že sa tieto potraviny stanú bežnou súčasťou nášho jedálnička a zmiznú voči nim naše predsudky.

Literatúra

1. Bullock DS, Desquilbet M: *Food Policy* 27, 81 (2002).
2. Bain C, Dandachi T: Governing GMOs: The (Counter) Movement for Mandatory and Voluntary Non-GMO Labels. In: *Sustainability* 6. MDPI, Bazilej 9456-9476 (2014).
3. <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/regulatory-compliance/labeling/claims-guidance/procedures-nongenetically-engineered-statement> stiahnuté 22. 10. 2016.
4. <http://www.nongmoproject.org/> stiahnuté 22. 10. 2016.
5. Schermer M: *Mountain Research and Development* 21, 140 (2001).
6. http://www.gmocompass.org/eng/regulation/labelling/93.new_labelling_laws_gm_products_eu.html, stiahnuté 22. 10. 2016
7. http://ec.europa.eu/food/plant/docs/gmo-traceability-gm-final_report_en.pdf stiahnuté 22. 10. 2016.

Súhrn

Stredánská S.: Označenie „GMO-free“

Geneticky modifikovaný organizmus je organizmus, ktorého genetický materiál bol úmyselne zmenený. Počet pestovaných geneticky modifikovaných rastlín v súčasnosti vo svete neustále narastá. V roku 2010 boli geneticky modifikované plodiny pestované na 10% svetovej ornej pôdy. Právne a regulačné predpisy ohľadom GM potravín sa líšia podľa krajiny, pričom niektoré ich zakazujú alebo obmedzujú, zatiaľ čo v iných je pestovanie značne rozšírené. S narastajúcim počtom GMO narastá aj počet odporcov voči týmto organizmum a produktom z nich. Oponenti argumentujú bezpečnosťou životného prostredia a zdravia človeka. Označených produktov ako „GMO-free“ sa tak objavuje na trhu stále viac predovšetkým z dôvodu výhodného marketingového ťahu.

Kľúčové slová: geneticky modifikované plodiny, legislatíva, „GMO-free“ potraviny

Summary

Stredánská S.: „GMO-free“ labeling

The genetically modified organism is the organism whose genetic material has been deliberately changed. The number of cultivated genetically modified plants is growing in the world today. In 2010, genetically modified crops were grown on 10% of the world's arable land. Legal and regulatory rules on GM food differ from one country to another, while in some are forbidden or restricted, in others the growing is much widespread. With the increasing number of GMOs, the number of respondents against these organisms and their products also increases. Opponents argue for the safety of the environment and human health. Therefore, marked products such as „GMO-free“ appear on the market more mainly due to a favorable marketing trend.

Keywords: genetically modified crops, the legislation, „GMO-free“ foods

VYUŽITÍ BIOTECHNOLÓGIÍ A MOLEKULÁRNÍCH ANALÝZ VE ŠLECHTĚNÍ ČESNEKU

Jaroslava Ovesná^a, Vojtěch Hrbek^b, Katarína Mítrová K^a, Jana Hajšlová^b

^aVýzkumný ústav rostlinné výroby, AV ČR, ^bVysoká škola chemicko-technologická, Praha; ovesna@vurv.cz

Úvod

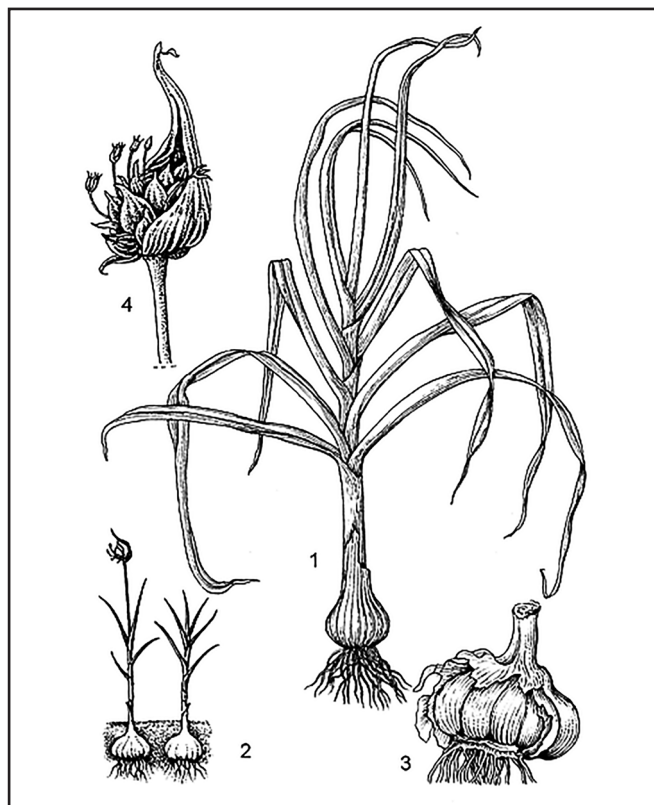
Šlechtění rostlin je tradiční proces, který vychází z Mendlových zákonů. Základem je výběr perspektivních materiálů, jejich křížení a výběr potomstva. V druhé polovině minulého století byla objevena struktura DNA, pochopen význam genů a byly vyvinuty sofistikované postupy cíleného zlepšování kulturních rostlin. Kromě tradičních postupů a mutagenese se začaly využívat regenerace *in vitro*, které na straně jedné mohou zvyšovat variabilitu rostlinných buněk, na straně druhé umožňují klonovat identické materiály. Vědci dokázali popsat a využít možnost přenosu cizorodé DNA do buňky, kde se žádaný úsek DNA dokáže integrovat a je-li opatřen příslušnými regulačními oblastmi i exprimovat. Je tak možné měnit znaky výsledného organismu. Takové organismy se pak označují jako geneticky mo-

difikované (GMO). Ve světě je možné pěstovat více než 300 odlišných typů GMO s různě pozměněnými vlastnostmi. Většinou se jedná o ekonomicky významné druhy jako je sója, kukuřice, řepka nebo bavlník. Zeleniny a ovocné druhy se ve svých GM formách vyskytují zatím sporadicky. Je přitom jednoduché přenést gen podmiňující žádanou vlastnost z jednoho, třeba příbuzného druhu do odrůdy ekonomicky významné.^{1, 2} Některé zeleniny lze geneticky modifikovat poměrně snadno, příkladem je rajče, první GM potravina uvedená na trh, která však měla velmi malý komerční úspěch. Je známa celá řada GM linií mrkve nebo papáji. Zeleniny r. *Allium*, které jsou obecně zdrojem cenných látek podporujících zdraví člověka, nebyly ve větším rozsahu modifikovány. Pro česnek (*A. sativum* L.), který během domestikace ztratil schopnost kvést, jsou moderní postupy biotechnologie velmi žádoucí.

Charakteristika česneku setého

Většina rostlin rodu *Allium* je známa svou výraznou, charakteristickou chutí, díky níž získaly svůj název – keltský výraz „all“ znamená štiplavý³. Kromě česneku (*Allium sativum* L.) se k tomuto rodu řadí z kulturních rostlin cibule (*A. cepa* L.), pórek (*A. porrum* L.), cibule zimní, tzv. „ošlejš“ (*A. fistulosum* L.) a také pažitka (*A. schoenoprasum*), z planě rostoucích druhů například u nás se často vyskytující česnek medvědí (*A. ursinum*).

Česnek setý pochází pravděpodobně ze střední Asie, Džungarska (severní Číny), části Tádžikistánu a Uzbekistánu, kde roste v určitých formách planě dodnes⁴. Jedná se o jednoděložnou rostlinu. Patří do čeledi amaryllkovitých (*Amaryllidaceae*) a rodu česnek (*Allium*), který má po celém světě více než 600 druhů^{5, 6}, s podobným chemickým složením, liší se chutí, tvarem i barvou⁷. Jedná se o vytrvalou, obvykle 0,2 – 0,5 m vysokou rostlinu (Obr. 1).



Obr. 1: Česnek setý. 1, 2 – celá rostlina, 3 – cibule, 4 – květenství¹³.

Podle starší klasifikace je dělení založeno na schopnosti rostliny vytvářet květní stvol a květenství⁴. **Typ H** (varieta *sagittatum* Kuzněcov) – **paličák**. Obvykle tvoří květní lodyhu a tvrdý krček („hardneck type“). Zahrnuje ekotyp kavkazský, východokavkazský, středněasijský a karpatský. Sklizeň by měla probíhat v době, kdy jim zbývají zelené 4 horní listy. Nevýhodou je kratší skladovatelnost⁸. **Typ U** (var. *vulgare* Kuzněcov) – širokolistý nepaličák. Pouze po silnější vernalizaci tvoří krátkou květní lodyhu. Květy tvoří výjimečně, semena nevznikají. Do této skupiny patří ekotyp jižně-ruský a středomořský. Doba sklizně je u nepaličáků charakterizována žloutnutím vrchních listů, v plné zralosti listy

padají k zemi. **Typ A** (var. *variabilis* Kon.) – úzkolistý nepaličák. Při jarní sadbě netvoří květní lodyhy, při podzimní obvykle ano. Má velmi pevné cibule a dlouhou klidovou periodu, je velmi dobře skladovatelný. K typu A se řadí kontinentální ekotyp⁴.

Současná klasifikace rozlišuje druhy *A. sativum* L. ssp. *sativum* kam lze obvykle přiřadit typy U a A a *A. sativum* L. ssp. *ophioscorodon*, kam lze přiřadit Typ H. Některé typy H se přiřazují k *A. sativum* ssp. *longicuspis* L. Na správném botanickém začlenění jednotlivých klonů a odrůd nepadají celosvětově shoda.

Česnek obsahuje více než 200 známých látek a stále jsou objevovány nové^{9,10}. Většinu cibule česneku tvoří voda (přibližně 65 %); sušina obsahuje především fruktany a další sacharidy (okolo 28 %), dále pak sirné sloučeniny, proteiny a vlákninu, především pektin. Z volných aminokyselin je dominantní arginin, následuje kyselina glutamová a asparagová, methionin a threonin¹¹. Allistatin a garlicin mají antibiotický účinek⁹. Obsah jednotlivých látek výrazně kolísá v závislosti na odrůdě, půdě, počasí, hnojení, ošetřování aj.⁴. Mezi další významné látky patří kromě sirných sloučenin také vitaminy (A,B,C a E), stopové prvky (K, Cu, Mo, Se a Ge), flavonoidy, enzymy a adenosin.

Právě látky obsahující síru způsobují typickou chuť a vůni česneku. Je k tomu ale zapotřebí poškození jeho přirozené struktury a aktivní enzym alliinasa. V neporušených pletivech jsou hlavními sirnými sloučeninami (+)-S-alk(en)yl-L-cysteinsulfoxidy (ACSO), které obsahují více než polovinu veškeré organické síry v cibuli česneku¹². Jedná se o neproteinové sirné aminokyseliny, v přírodě se vyskytují pouze L(+)-izomery¹³. V česneku jsou přítomny následující sirné aminokyseliny – alliinu [(+)-S-(2-propenyl)-L-cysteinsulfoxidu], methiinu [(+)-S-methyl-L-cysteinsulfoxidu], isoalliinu [(+)-S-trans-(1-propenyl)-L-cysteinsulfoxidu] a propiinu [(+)-S-propyl-L-cysteinsulfoxidu]. Tyto látky jsou samy bez zápachu, přesto významně ovlivňují olfaktorické vlastnosti.

Tak jako u všech přírodních produktů je i u česneku složení proměnlivé. Je ovlivněno průběhem vegetačního období, klimatem, složením půdy, hnojením, genetickými předpoklady i dobou skladování. Důležitá je i správná úprava před konzumací, nevhodným způsobem lze i kvalitní česnek z pohledu biologické aktivity znehodnotit.

Česnek je jednou z prvních rostlin používaných od starověku pro své pozitivní účinky na lidské zdraví. Mnohé výzkumy indikují antioxidační, protizánětlivé a antimikrobiální účinky, což jsou bezpochyby vlastnosti, které jsou užitečné v působení proti mnoha nemocem¹⁴. Výčet prospěšných účinků zmiňovaných v souvislosti s česnekem je obsáhlý, z nejčastěji diskutovaných lze zmínit schopnost snižovat hladinu cholesterolu a lipidů v krvi, snižovat krevní tlak, zmírňovat symptomy nachlazení, působit jako antidotum při otravách těžkými kovy a proti rakovině^{15 16 17}.

Šlechtění česneku

Šlechtění česneku dosud vycházelo z pečlivé charakterizace genetických zdrojů česneku a kmenů

v rámci registrovaných odrůd. Vybrané genotypy jsou množeny a testovány ve větších souborech. Běžnou rekombinací genů nelze využít. Perspektivou jsou tzv. nové techniky ve šlechtění rostlin. Takové technologie však vyžadují efektivní transformační protokoly, stejně jako rozsáhlé genomické zdroje a přesné znalosti, dříve než je lze účinně využít v praktických šlechtitelských programech^{18 19}.

Analýza diverzity v rámci kolekcí česneku je prováděna vcelku standardně pomocí popisu fenotypu daného klonu a jeho hospodářských vlastností, výnosu nebo obsahu nutrientů, a to s využitím více či méně sofistikovaných metod. Pozornost se klade zejména na obsah látek s antioxidačními účinky a na obsah sirných aminokyselin. Nejvíce se využívají metody založené na analýze DNA.

Charakteristika diverzity odrůd a genetických zdrojů česneku

Od počátku století se využívají jako u ostatních druhů analýzy DNA. První studie byly postaveny na studiu polymorfismu náhodně amplifikovaných fragmentů ohraničených specifickými krátkými úseky DNA – primery (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA), později byla použita metoda kombinující amplifikaci náhodných fragmentů s restrikcí štěpením DNA (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism). Česnek jako diploidní druh s genomem větším než je genom hexaploidní pšenice obsahuje řadu repetitivních sekvencí, proto není problém odvodit markery založené na délkové variabilitě mikrosatelitů (SSR – Single Sequence Repeats). Použití těchto metod umožnilo popsat diverzitu klonů a odrůd česneků pocházejících z různých oblastí světa (Izrael, Argentina, Írán, Tunís, Egypt, Evropa, USA, Turecko) a uložených v kolekcích genetických zdrojů rostlin, i aktivně využívaných farmáři. Je zřejmé, že diverzita stále umožňuje další výběr žádaných genotypů a jejich využití ve šlechtění²⁰. I když každá plodina i česnek je přizpůsoben svému prostředí, analýza velkých kolekcí genetických zdrojů ukázala, že místo původu (sběru genetického zdroje) nereflexuje genetický základ položek sbírek. U registrovaných odrůd je shlukování odrůd podle místa původu odrůdy (země první registrace) častější. V tomto směru jsme prokázali specifický základ česneků typu paličák vyšlechtěných v ČR²¹. Jedná se o česneky požadované lokálními spotřebiteli a adaptované na místní půdně klimatické podmínky. Analýza SSR rovněž umožnila sestavit metodiku pro jednoznačnou identifikaci odrůd česneku, které jsou pěstovány na území ČR včetně francouzských a španělských. Pro úspěšné využití genetických zdrojů a variability odrůd ve šlechtění je třeba sledovat mikroklonální variabilitu v rámci odrůd, což uvedené postupy umožňují.

Charakterizace polymorfismu DNA česneku

I když sekvenování podle Sangerova umožňuje získat informace o nukleotidových sekvencích rostlinného genomu u modelových a ekonomicky významných druhů, jedná se o časově náročnou práci. V současné době jsou k dispozici rozsáhlé datové množiny získané z různých mo-

delových a ne-modelových rostlinných druhů na základě sekvenování celých genomů a / nebo aplikací strategií redukce genomu (tj. sekvenování RNA, obohacení založené na hybridizaci, obohacení na bázi restrikcí enzymů atd.). Seznam zelenin s veřejně dostupnými úplnými nebo částečnými sekvencemi genomu roste velmi rychle²². Znalosti o sekvencích genomu amarýlkovitých jsou však stále spíše kusé. Tuto skutečnost pravděpodobně ovlivňuje přílišná velikost jejich genomu. U česneku lze považovat za velký úspěch sekvenování transkriptomu linie, u které se po letech úsilí podařilo indukovat kvetení a popsat skupiny transkriptů, které jsou diferenciatně exprimovány v odlišných částech česneku a za odlišných fyziologických stavů²³. *De facto* se jednalo o druhý úspěšný pokus indukovat kvetení u česneku. První pokus vedl k tvorbě F2 generace, která byla analyzována a sledována asociace markerů, genů a znaků, Byla získána rodina 84 rostlin z jediné samčí fertální heterozygotní rostliny z USA, které byly použity k identifikaci prvních genetických vazeb v česneku na základě nukleotidových polymorfismů, opakování krátkých repetitivních sekvencí a náhodně amplifikovaných polymorfních DNA. Třicet sedm markerů tvořilo devět vazbových skupin zahrnujících 415 centimorganů (cM) s průměrnou vzdáleností 15 cM mezi lokusy. Další 16 lokusů zůstalo nezařazeno²⁴. Tyto linie přestaly být využívány.

Pro šlechtění je významné disponovat liniemi, které mají charakterizovány mutace v jednotlivých alelách lokusů. Takových prací, které charakterizují polymorfismus alel u česneku, je skutečně málo. Jedna z nich popisuje polymorfismus v rámci rodiny genu pro alliinazu, enzym, který odpovídá za přeměnu neaktivního alliinu na biologicky aktivní allicin²⁵. Byl nalezen polymorfismus nejen mezi alelami, ale i rozdílný počet lokusů u odrůdami a genetických zdrojů. Bylo pozoruhodné, že shlukování klonů na základě polymorfismu v rámci této genové rodiny korelovalo se shlukováním, provedeném pomocí AFLP na stejném souboru 136 klonů česneku. Navíc byla nalezena korelace mezi příslušností k jednotlivým shlukům a obsahem sirných aminokyselin. Je zřejmé, že schopnost syntetizovat sirné aminokyseliny závisí mimo jiné na genotypu česneku^{26 27}.

Protože jedním z velmi sledovaných znaků je zastoupení biologicky aktivních, zdraví prospěšných látek v jednotlivých odrůdách a genotypech česneku, metody jejich stanovení jsou významné. Informace lze dobře využít ve šlechtění.

Hodnocení zastoupení metabolitů v odrůdách česneku

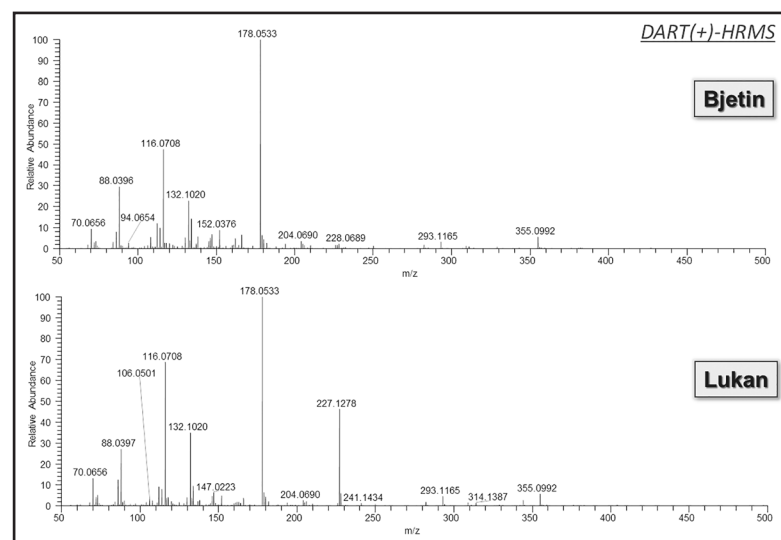
Metabolity lze v česneku buď určit cílovou analýzou, která je zaměřena na konkrétní látku – metabolit nebo tzv. necílovou analýzou s širokým rozsahem analyzovaných látek. I když první metoda vycházela ze senzorických vlastností česneku²⁸ je v dnešní době dáván důraz spíše na sofistikovanější analytické postupy, z nichž jeden z nejpoužívanějších je pomocí chromatografických metod např. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ať již s konvenčními detektory či hmotnostně spektrometrickým detektorem^{26, 29}. Zhu

et al. 2016³⁰ popsali využití LC-MS/MS-SRM pro hodnocení sirných aminokyselin. Necílová analýza se opírá o tzv. metabolomiku (těž metabolomika či metabolické profilování) což je nově se vyvíjející vědní obor, zabývající se zpracováním vzorků pro zmapování co možná nejvíce přítomných nízkomolekulárních látek v biologických matricích. Výsledná analýza poskytuje základní informace o složení vzorků, může však sloužit i jako prostředek k rozlišení vzorků podobného druhu, či za pomoci matematických modelů, sestavených na základě souboru naměřených dat, identifikovat/ověřit například původ testovaného vzorku^{31,32}. Metabolomické fingerprinty se nemusí nutně zabývat identifikací jednotlivých metabolitů, ale lze využít porovnání získaných záznamů, např. hmotnostních spekter. Pomocí těchto záznamů lze hledat odlišnosti charakterizující změny mezi danými vzorky způsobenými např. geografickým původem. Výhodou moderních analytických metod je možnost zaznamenat spektrum až stovek metabolitů ve vzorku za současné kvantifikace alespoň některých z nich^{32, 33, 34}.

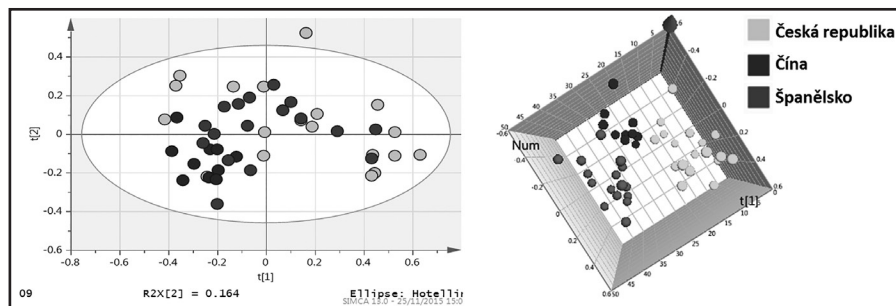
Pro získání metabolomického fingerprintu se v současné analytické chemii dá využít několik technik³². V naší práci byla využita technika přímé analýzy v reálném čase ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Direct Analysis in Real Time – Mass Spectrometry, DART-MS). Tato technika umožňuje analýzu extraktu vzorku bez předchozí separace. Analýza je velmi rychlá a jednoduchá, současně poskytuje komplexní informaci o vzorku.

Využití metabolomického fingerprintu pro charakterizaci česneku

Charakteristický metabolomický fingerprint česneku je velmi komplexní a lze ho využít jednak pro porovnání složení metabolomu u hodnocených položek, ale také lze identifikovat přítomné látky, jak je ukázáno na obrázku 2.



Obr. 2: Hmotnostní spektra, metabolomické fingerprinty DART-HRMS v pozitivní ionizaci, odrůdy Bjetin a Lukan, m/z 50-500.



Obr. 3: PLS-DA model pro klasifikaci česneku dle jeho geografického původu (vzorky z České republiky, Číny a Španělska) sestavený z dat získaných měřením fingerprintů technikou DART-MS v pozitivním módu ionizace.

Primárních dat je možné využít například pro sledování rozdílů v obsahu a poměru určitých látek. Uvedenou metodou byly analyzovány vzorky česneku původem ze Španělska (n = 17), Číny (n = 11) a České republiky (n = 19). Analýza dat s využitím příslušného matematického modelu jasně ukázala odlišnosti mezi třemi skupinami. Obrázek 3 dokumentuje rozdíly mezi česneky podle geografického původu pěstování. Metabolomický fingerprinting není však schopen jednoznačně identifikovat bez řady komparátorů příslušnost analytu k jednotlivé odrůdě, protože zastoupení látek závisí kromě genotypu také na environmentálních podmínkách.

Tato skupina analytických metod může dobře korelovat s výsledky transkriptomických analýz. Identifikace funkce a struktury odpovídajících genů – enzymů umožní směřovat další šlechtění česneku včetně využití biotechnologických metod. Identifikace genů, jejich úprava závisí nejen na přesné znalosti struktury a funkce jednotlivých alel, ale i na možnosti manipulace s genomem.

Nástroje pro transformaci nebo editaci genomu

Pro vývoj GM česneku nebo použití postupů editace genomu je nutné disponovat regeneračním protokolem, který využívá totipotence rostlinných buněk, tj. schopnost regenerovat celý organismus z jediné buňky. *In vitro* regenerace a transformace jednoděložných je obvykle obtížnější než regenerace a transformace dvouděložných, i když i zde u řady druhů bylo dosaženo pokroku. Česnek v tomto směru není příliš prozkoumán. Využívají se sice meristémové kultury, které slouží k regeneraci rostlin po kryokonzervaci nebo pro ozdravení³⁵, ale regenerace z jiných pletiv se příliš nedaří. Byla popsána běžná fyziologická porucha (hyperhydricita) během kultivace rostlin *in vitro*, která vážně ovlivňuje regeneraci a mikropropagaci rostlin. Česnek je k hyperhydricitě velmi náchylný. Ovšem faktory, které ji navozují u česneku, zůstávají nejasné. Teprve v r. 2017 byl publikován vysoce účinný regenerační systém česneku³⁶, který byl vyvinut systematickým zkoumáním vlivu typu explantátů, složek médií a podmínek kultivace. Pokusy transformovat česnek nebyly zatím popsány a zřejmě bude potřeba věnovat další úsilí vývoji transformačního protokolu nebo přenosu nástrojů pro editaci genomu do jednotlivých buněk.

Závěr

Znalosti nutné pro moderní šlechtění cenné zeleniny česneku zatím nedosáhly požadované úrovně. Pro využití genetických modifikací nebo cílené editace genomu naráží jednak na omezenou znalost kódujících sekvencí a limitující znalosti o schopnosti regenerace *in vitro* jednotlivých genotypů česneku. Analýza polymorfismu DNA nám pomůže zhodnotit význam jednotlivých sek-

vencí – genů a metabolitů. I když je česnek druh s dostatečnou diverzitou pro cílené šlechtění bude třeba ještě získat komplexí informaci o jeho genomu, regulacích a regeneraci. Přesto tuto cestu bude vzhledem k významu česneku nutné podstoupit.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem QJ 1210158.

Literatura

1. Dalal M, Dani RG, Kumar PA: *Sci. Hortic.* 107, 215 (2006).
2. Ricroch A, Henard-Damave MC: *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 675 (2015).
3. Singh VK, Singh DK: *ARBS Annu. Rev. Biomed. Sci.* 10, 6 (2008).
4. Konvička O (1998): Česnek (*Allium sativum* L.); Vlastním nákladem: Olomouc
5. Block E, Naganathan S, Putman D, Zhao S: *Pure & Appl. Chem.* 65, 625 (1993).
6. Rahman K: *Ageing Res. Rev.* 2, 39 (2003).
7. Benkeblia N: *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 753 (2005).
8. Horníčková J, Velíšek J, Ovesná J, Stavělíková H: *Czech J. Food Sci.* 27, 232 (2009).
9. Goncagul G, Ayaz E: *J. Anim. Vet. Adv.* 9, 1 (2010).
10. Zhou MY, Wu ZJ, Li WQ, et al.: *J. Asian. Nat. Prod. Res.* 16, 323 (2014).
11. Sendl A: *Phytomedicine* 4, 323 (1995).
12. Hughes J, et al.: *Plant Foods Hum. Nutr.* 61, 81 (2006).
13. Krest I, Glodek J, Keusgen M: *J. Agric. Food Chem.* 48, 3753 (2000).
14. Martín-Lagos RA, Olea Serrano MF, Ruiz Lopez MD: *Food Chem.* 53, 91 (1995).
15. Bozin, B.; et al.: *Food Chem.* 111, 925 (2008).
16. Capasso A: *Molecules* 18, 690 (2013).
17. Xiao H, Parkin KL: *J. Agric. Food Chem.* 50, 2488 (2002).
18. Hanci F, Cebeci E: *Acta Hortic.* 1145, 75 (2016).
19. Cardi T, D'Agostino N, Pasquale T: *Frontiers in Plant Science.* 8, 241 (2017).
20. Chinnappareddy LRD, Khandagale K, Chennareddy A: *CJGPB.* 49, 131 (2013).
21. Ovesna J, Leisova-Svobodova L, Kucera L: *CJGPB.* 50, 226 (2014).
22. Michael TP, VanBuren R: *Curr. Opin. Plant Biol.* 24, 71 (2015).
23. Kamenetsky R, London Shafir I, et al.: *Biodiversity & Conservation* 14, 281 (2005).
24. Zewdie Y, Havey MJ, Prince JP, et al.: *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130, 569 (2005).
25. Ovesna J, Mitrova K, Kucera L: *BMC Genetics.* 16, 53 (2015).
26. Hornickova J, Kubec R, Cejpek K, et al.: *Czech J. Food Sci.* 28, 298 (2010).
27. Ovesna J, Kucera L, Hornickova J, et al.: *Sci. Hortic.* 129, 541 (2011).
28. Krest I, Keusgen M: *Anal. Chim. Acta.* 469, 155 (2002).
29. Ichikawa M, Ide N, Yoshida J, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 1535 (2006).
30. Zhu Q, Kakino K, Nogami Ch, et al.: *Food Anal. Methods.* 9, 3378 (2016).
31. Zhang J, Wang P, Wei X, et al.: *Food Res. Int.* 76, 489 (2015).
32. Cubero-Leon E, Peñalver R, Maquet A: *Food Res. Int.* 60, 95 (2014).
33. Berrueta LA, Alonso-Salces R, Heberger K: *J. Chromatogr. A* 1158, 196 (2007).
34. Ku KM, Choi JN, Kim J, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 418 (2010).
35. Pramesh D, Baranwal VK: *Biotechnology* 90, 180 (2015).
36. Liu M, Jiang F, Kong X, et al.: *Scientia Horticulturae* 217, 285 (2017).

Souhrn

Ovesná J., Hrbek V., Mitrová K., Hajšlová J.: Využití biotechnologií a molekulárních analýz ve šlechtění česneku

Požadavky na výnos, stabilitu a kvalitu rostlinné produkce rostou. Proto se stále hledají nové přístupy jak je zvýšit. Aplikuje se celá škála postupů od prostého výběru, křížení s následnou selekcí, přes mutagenesi, *in vitro* kultury a tvorbu geneticky modifikovaných organismů až po cílenou editaci genomu. U některých plodin jako je česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.), který je oblíben pro svůj obsah sirných aminokyselin, jsou možnosti šlechtění omezené. Jedná se o vegetativně množený druh bez schopnosti kvést a tedy rekombinovat. Možnosti zlepšování proto spočívají pouze ve využití klonálních variant. Proto je významná přesná charakterizace klonů na úrovni DNA, RNA i metabolitů. Na základě znalostí o podmíněnosti znaků určitými sekvencemi, lze připravit i nástroje pro cílenou editaci genomu. Článek shrnuje současné poznatky o genomu a metabolomu česneku a příspěvek autorů k této problematice.

Klíčová slova: česnek (*Allium sativum* L.), diverzita, DNA polymorfismus, metabolom, šlechtění

Summary

Ovesná J., Hrbek V., Mitrová K., Hajšlová J.: Possible use of biotechnology and molecular analyzes in garlic breeding

Requirements for yield, stability and quality of plant production are increasing. That is why more and more precise tools are being used. A whole range of procedures is applied ranging from simple selection, cross-selection followed by another round of selection, through mutagenesis, *in vitro* cultures and the formation of genetically modified organisms to targeted genomic editing. For some crops such as *Allium sativum* L., which is popular for its sulfur amino acid content, breeding possibilities are limited. It is a clonally propagated that lost ability to bloom and ability to produces seeds. The possibilities for improvement therefore lie only in the use of clonal variants. Therefore, the exact characterization of clones at DNA, RNA and metabolite levels is significant. On the basis of knowledge on linkage of traits with certain DNA sequences, tools for targeted genomic editing can be introduced. The article summarizes current knowledge about genome and metabolome of garlic and author's contribution to this field.

Keywords: garlic (*Allium sativum* L.), diversity, DNA polymorphism, metabolome, breeding.

O B S A H

Úvod	25
Biotech 2017	26
Životní jubileum	27
Hrabal R.: Role MNR spektroskopie při zkoumání bílkovin	28
Fuchsová V.: Současný pohled na antibiotické rezistence	33
Herkommerová K., Pichová I.: Lakasy: modré enzymy s různorodou funkcí	39
Kolibová S., Stehlíková Z., Zdeňková K.: CRISPR/Cas9 revoluční nástroj nejen pro editaci genomu	42
Středanská S.: Označení „GMO-free“	45
Ovesná J., Hrbek V., Mitrová K., Hajšlová J.: Využití biotechnologií a molekulárních analýz ve šlechtění česneku	47

C O N T E N T S

Editorial	25
Biotech 2017	26
Life anniversary	27
Hrabal R.: The role of NMR spectroscopy in protein research	28
Fuchsová V.: The current perspective on antibiotic resistance	33
Herkommerová K., Pichová I.: Laccases: blue enzymes with different function	39
Kolibová S., Stehlíková Z., Zdeňková K.: CRISPR/Cas9 a revolutionary tool not only for the genome editing	42
Středanská S.: „GMO-free“ labeling	45
Ovesná J., Hrbek V., Mitrová K., Hajšlová J.: Possible use of biotechnology and molecular analyzes in garlic breeding	47

REDAKČNÍ RADA

doc. 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 Skácel, 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, Albertrtov 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., Videňská 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., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
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.

Novák Z: Diploma thesis, UCT 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).