

Bio

Ročník 26 • Číslo 3/2016

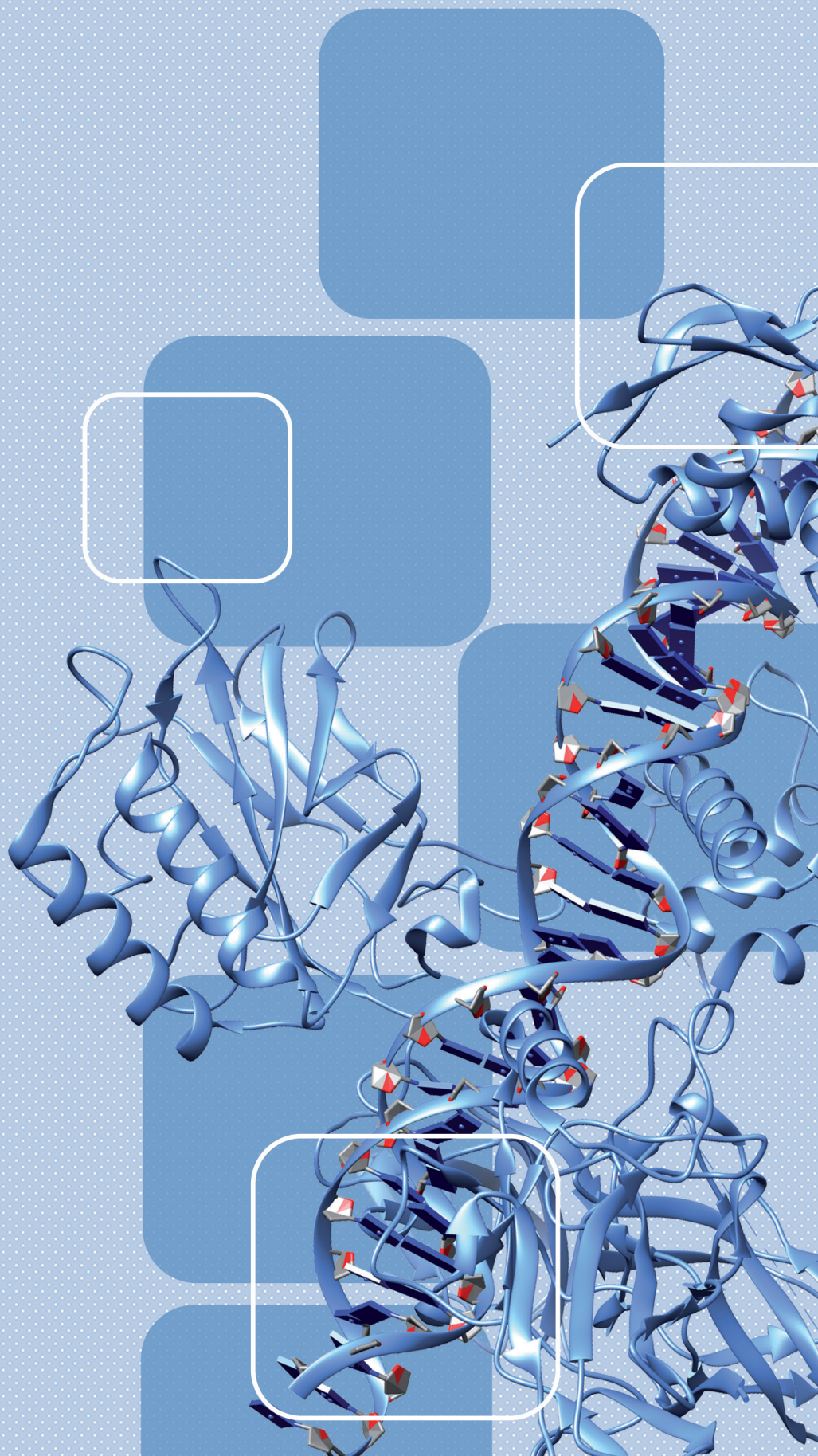
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

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

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

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

Vážení přátelé,

v období od 3. do 6. července 2016 jsme se zúčastnili velmi zajímavého 17. biotechnologického kongresu pořádaného naší zastřešující organizací „European Federation of Biotechnology“ v polském Krakově. Zprávu o této účasti naleznete v samostatném příspěvku. Zde bychom jen chtěli zdůraznit, že kongres probíhal za podpory významných domácích i zahraničních osobností a organizací jako např. polského prezidenta Andřeje Dudy, starosty města Krakova profesora Jaceka Majchrowského, prezidenta Polské akademie věd profesora Jerzy Duszyńskiego, zástupců USDA (U.S. Department of Agriculture), významných polských univerzit, britské (královské) biologické společnosti, biochemické a mikrobiologické společnosti. Bohatá byla i účast mediálních partnerů a vystavovatelů. Pro nás byla zejména zajímavá možnost navázat kontakt se zástupci Asian Federation of Biotechnology (www.afob.org) a pozvat jejich členy k účasti na našem biotechnologickém sympoziu, které připravujeme pro příští rok (www.biotech2017.cz). Asian Federation of Biotechnology (AFOB) má 12 následujících divízí: Agricultural and Food Biotechnology, Applied Microbiology, Biopharmaceutical and Medical Biotechnology, Biocatalysis and Protein Engineering, Bioprocess and Bioseparation Engineering, Bioenergy and Biorefinery, Environmental Biotechnology, Marine Biotechnology, Nanobiotechnology, Biosensors and Biochips, System and Synthetic Biotechnology, Tissue Engineering and Biomaterials a Bioeconomy and Biobusiness. AFOB působí ve 13 asijských zemích (Indie, Indonesie, Korea, Čína, Tchaj-wan, Vietnam, Malajsie, Singapur, Mongolsko, Thajsko, Japonsko, Filipíny a Nepál), kde má AFOB regionální kanceláře (viz uvedený web) obdobně jako EFB. Doporučujeme Vám si jejich webové stránky prohlédnout a pokusit se navázat kontakty. AFOB pořádá krátce po nás „13th Asian Congress on Biotechnology and 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products“ ve dnech 25. – 29. července 2017 v Khon Kaen v Thajsku (<http://fervaap.kku.ac.th>).

Příští „18th European Congress on Biotechnology“ (ECB 2018) se bude konat 1. – 4. července 2018 ve švýcarské Ženevě a vzápětí 7. – 12. 7. 2018 se bude konat 43rd FEBS kongres v Praze.

U příležitosti 100 let od prvního průmyslového využití aceton-butanolové fermentace pomocí klostridií, vydává Oxford University Press speciální tematické číslo FEMS Microbiology Letters o biobutanolu (editor Michael Sauer). Články podávají přehled o vývoji tohoto postupu od jeho zavedení až do dnešní doby a jistě se stanou inspirací pro rozvoj obdobných průmyslových technologií.

Zájem vědců o „mikrobiom“ dostal v nedávné době významnou podporu tím, že v USA byl vyhlášen „Bílým

domem“ nový program „National Microbiome Initiative“ (C & EN, June 27, 2016). Tento program vytváří podmínky pro studium a pochopení komplexu vzájemných interakcí komunit mikroorganismů v lidském těle i na jeho povrchu (lidský mikrobiom), ale i v půdě, oceánech, ve vzduchu, rostlinách, živočiších i jinde, a tím přispívá k osvětlení jejich vlivu na naše zdraví, ale také zemědělství, podnebí a další oblasti. Vyhlášení tohoto programu předcházely dlouhé diskuse a návrhy vědců a inženýrů koordinované Kavli Foundation pod vedením mikrobiologa Jo Handelsmana, ředitele pro „White House Office of Science & Technology Policy“. Program iniciativy byl v zásadě formulován ve článku „Tools for the Microbiome: Nano and Beyond“ (ACS Nano 2016, DOI: 10.1021/acsnano.5b07826). Program mimo jiné zahrnuje i chemickou signalizaci, syntetickou biologii, vědy o atmosféře, zemi a oceánech, vědu o sběru a uchování dat aj. Pamatuje i na propagaci u veřejnosti („promotion of citizen science“). Různé nadace, univerzity a další instituce se připravují tento program finančně podpořit.

Zneužívání antibiotik způsobuje rezistenci mikroorganismů na látky, které byly dříve účinné. Proto se hledají nové zdroje antibiotik, které by nahradily ty stávající. Jejich producenti se hledají například v exotických lokalitách, včetně dna moří. V tomto úsilí je velmi zajímavý objev zcela nového typu antibiotika. Toto antibiotikum nazvané lugdunin (cyklický peptid obsahující thiazolidin) pochází z bakterie *Staphylococcus lugdunensis*, která byla nalezena v nose, a je účinné proti *Staphylococcus aureus* (Nature 2016, DOI: 10.1038/nature18634). Jedná se o první antibiotikum produkované bakterií izolované z lidského těla. Může být získáváno butanolovou extrakcí z kultur *S. lugdunensis* a následnou chromatografickou izolací, ale je možná i totální chemická syntéza.

Evropská komise schválila dovoz 3 nových odrůd geneticky modifikovaných sójových bobů pro potravinářské a krmné účely v 27 zemích EU na 10 let. Tyto plodiny nesmí být ovšem v EU pěstovány. Všechny výrobky obsahující tyto boby musí být řádně označeny. Odrůdy jsou upraveny tak, aby při jejich pěstování tolerovaly použití glyfosátu, který je aktivní komponentou herbicidu Roundup produkovaného firmou Monsanto. Již dříve Evropská komise schválila dovoz obdobné odrůdy sóji produkované fy. Bayer CropScience.

EPA by ráda rozhodovala o bezpečnosti nových chemikálií během 90 dnů. Při testech na zvířatech se to však nedá stihnout. Chemikálie jsou po vstupu do lidského těla transportovány do jater a zde jsou metabolizovány obvykle na méně toxické sloučeniny. V některých případech jsou však transformovány na více toxické sloučeniny (např. methoxychlor, který byl aplikován jako náhrada persistentního pesticidu DDT). Nový přístup testování chemické toxicity by tedy měl být založen na testování vznikajících metabolitů pomocí lidských

aterních buněk na mikrotitračních destičkách s 96 či 384 jamkami. V současnosti bylo EPA vybráno v „semi-finále“ 10 „high-throughput chemical screening assays“, které budou nyní testovány, a v příštím roce bude vybrána ta nejvhodnější. Stručnou charakteristiku těchto metod a jména jejich autorů lze nalézt v Chemical & Engineering News z 8. 8. 2016.

V závěru našeho úvodníku bychom Vás rádi opětovně pozvali k účasti na našem symposiu Biotech 2017 (www.biotech2017.cz), které se bude konat ve dnech 13. – 17. června 2017 v Národní technické knihov-

ně v Praze. Připomínáme, že na tomto webu již byla otevřena registrace. Prosíme Vás, abyste k účasti pozvali své spolupracovníky a známé z ČR i ze zahraničí. Těšíme se na Vaši účast a přejeme Vám úspěšné dny po jistě příjemné dovolené.

Srdečně Vás zdraví
Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

ZPRÁVA ZE 17. EVROPSKÉHO BIOTECHNOLOGICKÉHO KONGRESU V KRAKOVĚ

Michaela Holecová

Univerzita Palackého v Olomouci; michaela.holecova@upol.cz

Ve dnech 3. – 6. července hostil polský Krakov téměř 900 účastníků jednoho z nejprestižnějších evropských setkání na poli biotechnologií, které s dvouletou periodicitou pořádá Evropská biotechnologická federace. Sedmáctý Evropský biotechnologický kongres se konal v moderních prostorách výstaviště EXPO a zúčastnili se jej vědci z 62 zemí světa. Přijelo více než 30 zvaných přednášejících, kteří zahájili 25 sympózií a vystoupili na plenárních přednáškách. Součástí programu byly i prezentace 170 krátkých přednášek a téměř 450 posterů.

Hlavním cílem kongresu bylo představit nejnovější výzkumné výsledky v oblasti biotechnologií, které představují perspektivu pro budoucí využití při technologických inovacích. Za neméně důležité však organizátoři považují umožnění mladým vědcům a studentům setkat se se špičkami ve svých oborech a navázat kontakty pro budoucí spolupráci.

Zahajovací přednášky kongresu patřily Dr. Emmanuelle Charpentier z Max Planck Institutu a Umeå University, která představila metodiku genového inženýrství pomocí CRISPR-Cas9, a prof. Patricku Schnablemu z Iowa State University, jenž přiblížil principy prediktivní fenomiky rostlin. Za vyzdvihnutí však stojí i další plenární přednášky, například na téma Elektronický nos: Integrace biotechnologie a nanotechnologie, kterou přednesl prof. Tai Hyun Park z Seoul National University. Velký zájem vzbudil i Dr. Luke Alphey z Velké Británie, který hovořil o možnostech genetické regulace počtu komárů.

Česká biotechnologie byla na kongresu zastoupena především předsedou Biotechnologické společnosti prof. Janem Kášem. Dále se zúčastnili například zástupci VŠCHT prof. Jana Zábranská nebo prof. Olga

Valentová. Nejpočetnější skupinu však tvořili vědci z olomouckého Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (CRH), které je společným pracovištěm Univerzity Palackého a olomouckých poboček Ústavu experimentální botaniky AV ČR a Výzkumného ústavu rostlinné výroby a funguje jako Regional Branch Office Evropské biotechnologické federace pro Českou republiku. Na kongresu jej reprezentovalo šest přednášejících. Většina z nich vystoupila v sekci Genomika obilovin, kterou řídil děkan Přírodovědecké fakulty UP a ředitel CRH prof. Ivo Frébort a již svojí zvanou přednáškou zahájil vědecký ředitel CRH prof. Jaroslav Doležel. Vědci z CRH se věnovali například problematice mapování jaderného proteomu ječmene v různých fázích buněčného cyklu či zlepšování vlastností ječmene modelováním cytokininového mechanismu.

Krakovské setkání biotechnologů posloužilo i k navazování kontaktů pro přípravu konference Green for Good, která se v příštím roce již počtvrté uskuteční v Olomouci. Jejím spolupořadatelem bude stejně jako v roce 2015 Evropská biotechnologická federace, nově je pak k její organizaci přizvána i Evropská fytochemická společnost.

Proběhlo zasedání Valného shromáždění a Výkonné rady Evropské biotechnologické federace

V úvodu kongresu proběhlo v prostorách sálu Praga výstaviště EXPO pravidelné zasedání Valného shromáždění a Výkonné rady Evropské biotechnologické federace (EFB). Prezident EFB prof. Mathias Uhlen členům přednesl zprávu o činnosti EFB za uplynulé období a připomněl rovněž tři hlavní úkoly fede-

race, které spočívají v podpoře excelentního výzkumu prostřednictvím pořádání pravidelného evropského biotechnologického kongresu a vydávání žurnálu New Biotechnology, dále v umožnění užší komunikace mezi jednotlivými akademickými a výzkumnými komunitami na poli biotechnologií a v neposlední řadě v předávání korektních a relevantních informací o aktuálních tématech evropské veřejnosti. Připomněl delegátům rovněž, že by EFB měla věnovat zvýšenou pozornost své roli v evropském kontextu výzkumu v oblasti funkční genomiky, která nabízí řadu perspektivních aplikací ve výzkumu a medicíně a byla reflektována vznikem nové tematické sekce ve struktuře EFB. Při této příležitosti se diskutovalo i o zahrnutí problematiky zkoumání živočišných buněk do oblasti zájmu EFB a o perspektivních aktivitách EFB na poli rostlinné biotechnologie.

Caroline Windsor z TFI Group informovala členy Výkonné rady o přípravě osmnáctého ročníku Evropského biotechnologického kongresu, který se uskuteční v létě 2018 ve švýcarské Ženevě. Představila rovněž uchazeče o pořádání následujícího ročníku v roce 2020, kterými jsou Lipsko a Maastricht.

Důležitým bodem zasedání Výkonné rady byla volba členů pro příští dvouleté funkční období, kde pozici voleného zástupce Regional Branch Offices obhájil ředitel českého zastoupení prof. Ivo Frébort.

Evropská biotechnologická federace se do budoucna chystá rozšířit spolupráci s Asian Federation of Biotechnology (AFOB), a to v nejbližší perspektivě například podílem na tvorbě vědeckého programu třináctého Asijského biotechnologického kongresu, který se uskuteční v červenci 2017 v Thajsku.





Jedním z největších světových výrobců kyseliny hyaluronové je biotechnologická společnost Contipro sídlící ve východních Čechách. Contipro není jenom výrobcem této látky, ale také firmou zabývající se výzkumem v oblasti farmacie a biochemie. Jeho cílem je stát se největším odborníkem na kyselinu hyaluronovou, od ní odvozených derivátů a jejich aplikací na světě.

Přední výrobce kyseliny hyaluronové

Česká společnost Contipro se od svého založení již 25 let specializuje na produkty pojivových tkání. Vlajkovou lodí portfolia je kyselina hyaluronová, která se v Contipru vyrábí fermentací bakteriálního druhu *Streptococcus equi*. Díky své špičkové kvalitě se tato surovina prodává farmaceutickým a kosmetickým společnostem ve více než 60 státech světa, což společně s vysokým objemem výroby řadí Contipro mezi její největší světové producenty.

Contipro jde cestou objevů a inovací

Protože Contipro nikdy nechtělo být pouze výrobce hyaluronanu, téměř polovinu zaměstnanců společnosti tvoří kvalifikovaní výzkumní pracovníci zabývající se studiem vlastností hyaluronanu a vývojem jeho derivátů. Druhou velkou oblastí výzkumu jsou aktivní kosmetické látky účinné v boji proti stárnutí. Současné portfolio tak zahrnuje nejen inovativní produkty na bázi hyaluronanu pro humánní a veterinární použití, ale i ucelenou nabídku aktivních kosmetických látek založených přírodních polysacharidech a biologicky aktivních peptidech.

Úroveň výzkumu odráží fakt, že společnost za svou existenci získala více než 80 patentů a užitných vzorů a v loňském roce zaměstnanci přispěli celkem k 15 odborným publikacím v impaktovaných časopisech. Kvalitu výzkumu vhodně doplňují výrobní prostory certifikované dle GMP, ISO, FDA atd.

Pět forem hyaluronanu pro medicínu

Díky svým jedinečným vlastnostem a výborné biokompatibilitě představuje hyaluronan slibnou látkou pro použití v medicíně. Protože aplikace nativní formy hyaluronanu naráží na mechanická omezení (jedná se viskózní kapalinu), vyvinulo Contipro 5 různých forem této látky, které její uplatnění výrazně rozšiřují. Získané hydrogely, tenké filmy, nanovlákná, mikrovlákná a polymerní micely jsou testovány pro aplikace v tkáňovém inženýrství či regenerativní medicíně, a to nejen interně, ale také v rámci evropských výzkumných projektů (např. FP7 a H2020).

Contipro podporuje vzdělávání

Společnost Contipro sídlí v Dolní Dobručce ve východních Čechách, kde probíhá veškerá výzkumná a výrobní činnost. Velké úspěchy také slaví svými vzdělávacími programy pro studenty každého věku. Středoškolských programů FYBICH každoročně přináší medailová umístění v největších vědeckých soutěžích světa a Institut Contipro nabízí vysokoškolákům možnost přímé spolupráce na výzkumné činnosti.

Návštěvníci z řad studentů a odborné veřejnosti jsou každoročně zváni na den otevřených dveří, při kterém vidí nejen 4000 m² laboratorní vybavených nejnovějším zařízením. Zájemci o produkty pravidelně vídají zástupce Contipra na světových výstavách CPhI, in-cosmetics, EWMA a dalších.

**Seznamte se s rozsahem činnosti Contipra na webu www.contipro.cz,
nebo zavítejte do Dolní Dobručky osobně!**

**Biotechnologická společnost
a
Ústav biochemie
PřF Masarykovy univerzity v Brně**

si Vás dovolují pozvat
na sérii následujících přednášek, které se budou konat
vždy od 12 hod
**v Univerzitním kampusu Brno-Bohunice, Kamenice 5,
pavilon A 11, místnost č. 205**
Spojení: nejlépe autobusem č. 25
(z Mendlova náměstí)

- | | |
|--------------|--|
| 10. 11. 2016 | doc. Petr Skládal (UBCH PřF MU):
Svět biosensorů
(seminář k životnímu jubileu prof. Dr. Lumíra Macholána, DrSc) |
| 24. 11. 2016 | Dr. Jaroslav Turánek (VUVeL):
Liposomy pro konstrukci cílených terapeutik a vakcín
(habilitační přednáška) |
| 1. 12. 2016 | Dr. Tomáš Kašparovský (UBCH PřF MU):
Fytoalexiny a fytoestrogeny (habilitační přednáška) |
| 8. 12. 2016 | Dr. Pavel Bouchal (UBCH PřF MU):
Proteomika v molekulární onkologii a biotechnologii
(habilitační přednáška) |
| 15. 12. 2016 | Dr. Jan Lochman (UBCH PřF MU):
The puzzle of plant-microbe interactions (habilitační přednáška) |

Za organizátory:

prof. Ing. Jan Káš, DrSc.

Doc. Ing. Martin Mandl, CSc.

BioTech 2017

and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition



June 13-17, 2017

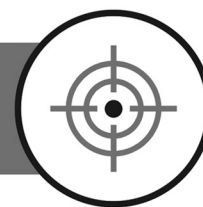


www.biotech2017.cz

Important dates

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

Scope



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

Lectures will be organized in following sessions:

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

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

Plenary lectures



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

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

For Exhibitors and sponsors

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

For detailed offer for Exhibitors see the conference website.

Hosted by



scienceINDUSTRIES
SWITZERLAND

Czech Biotechnology
BT
Society

**SWISS+
BIOTECH™**
National Thematic Network

Zurich University
of Applied Sciences

zhaw

Life Sciences and
Facility Management
Institute of
Biotechnology

MICROARRAYS VERSUS NOVÁ GENERACE SEKVENOVÁNÍ, SOUBOJ DAVIDA S GOLIÁŠEM?

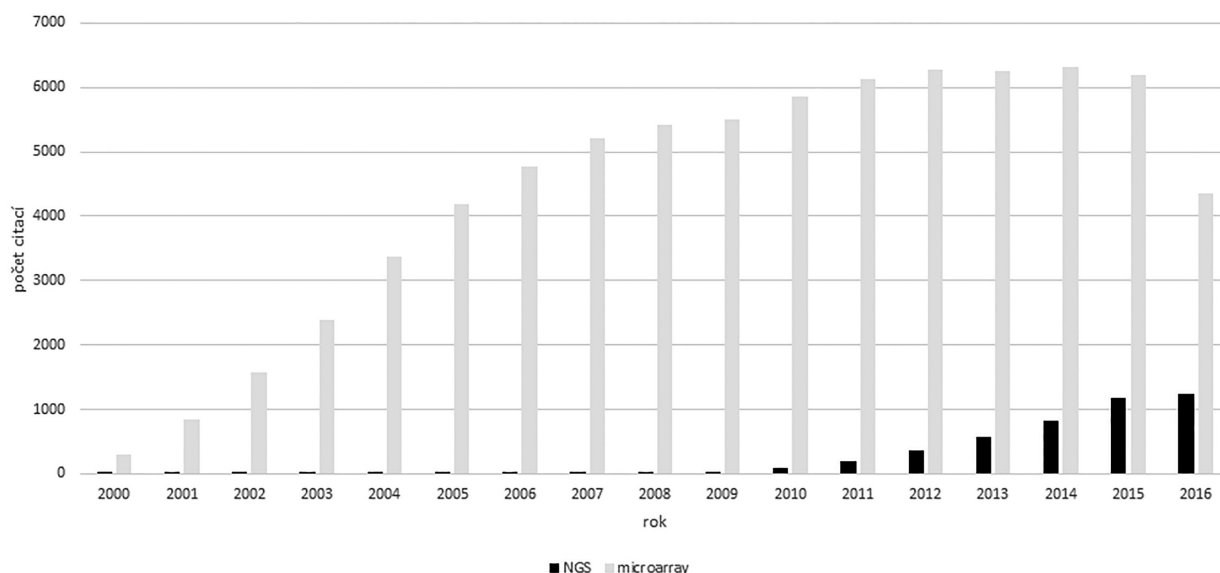
Jan Boroň^{a,b}, Petr Novotný^{a,b}, Petr Kačera*

^aVysoká škola chemicko-technologická v Praze, ^bESSENCE LINE, s. r. o.; Petr.Kacer@vscht.cz

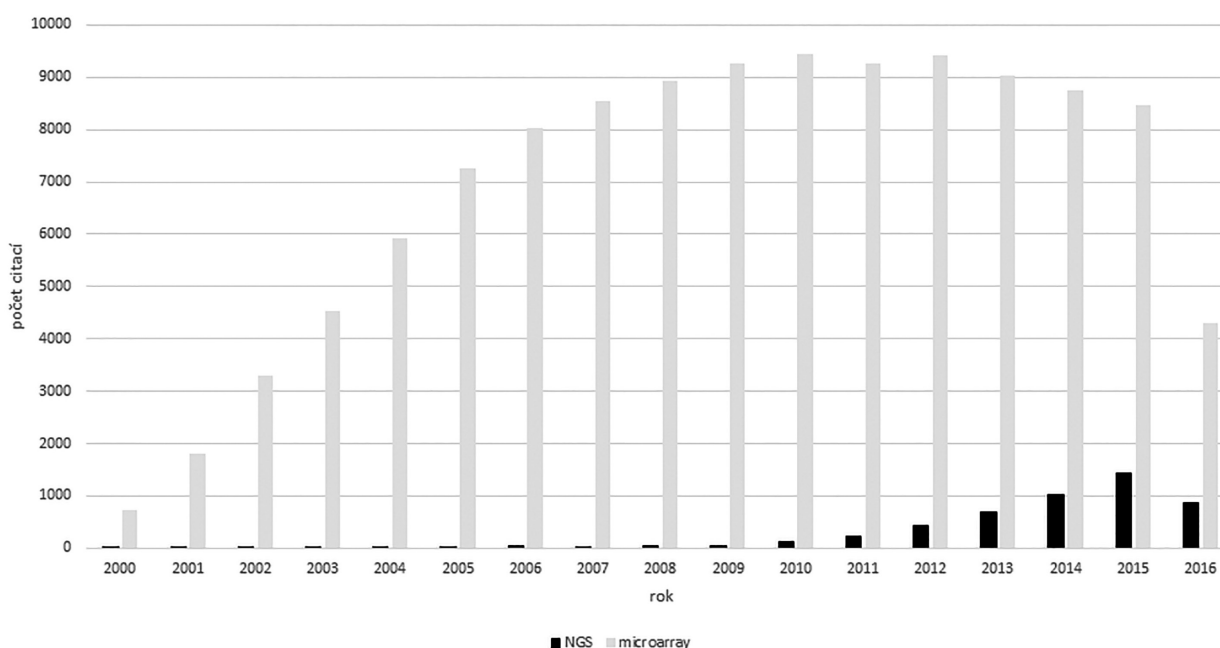
Úvod

Microarrays, historicky nejvíce využívaná platforma zejména pro měření exprese genů, přinesla za poslední dvě desetiletí mnoho významných aplikací hodných širšího shrnutí. V současné době se jejich využití významně posunulo do mnoha dalších odvětví a to jak ve výzkumných tak klinických pracovištích a stalo se poměrně robustním a zavedeným diagnostickým nástrojem. S objevem NGS (New Generation Sequencing), který jako klíčový produkt je podporován výrobcí se silným postavením na globálním trhu, se objevily argumentace směřující ke snížení významu microarrays jako

technologie již překonané a to právě NGS, respektive mnoho vědeckých i klinických pracovišť si kladlo otázku, která platforma je pro dané pracoviště vhodnější k použití. Tento článek se zabývá současným využitím obou těchto platform, které za současného state of the art ve skutečnosti vynikají vzájemnou výhodnou komplementaritou, a tato situace pravděpodobně potrvá několik příštích desetiletí. Analýza počtu citací z DB PubMed a Web of Science od roku 2000 (Obr. 1 a Obr. 2) ukázala, že počet publikací na bázi NGS mírně narůstá, jakkoliv publikace s microarrays jsou stále přibližně 4 – 9 krát četnější. Podobně bylo možné vy-



Obr. 1: PubMed – porovnání počtu publikací NGS (černá) a microarrays (šedivá).



Obr. 2: Web of Science – porovnání počtu publikací NGS (černá) a microarrays (šedivá)

sledovat trend, dle kterého roste počet nových aplikací microarrays, které navazují na předchozí výzkum pomocí NGS. Objev microarrays, který je primárně připisován Dr. Schenovi¹, nyní prezidentu originálního výrobce Arrayit, dodávajícího vysoce přesné robotické systémy do předních světových výzkumných i akademických center a farmaceutických firem (University Harvard, Tel Aviv, Griffith, Genentech a mnoho dalších), není třeba dlouze představovat. Jedná se o dvourozměrně uspořádané matrice, které obsahují vysokou hustotu (desítky tisíc až miliony) sond (DNA, cDNA, PNA – peptidová nukleová kyselina, proteiny, protilátky, ad.) obvykle ukotvených na chemicky upraveném skleněném nebo plastovém podkladu. Princip analýzy je založen na selektivní hybridizaci imobilizovaných sond s cílovými biochemickými látkami nebo jejich fragmenty obsaženými v biologickém vzorku (v humánním případě moč, sérum, plazma, mozkomíšní mok nebo tkáň) za použití nejčastěji fluorescenční nebo luminiscenční detekce.

Díky zcela novému přístupu k microarray technologii, uplatňovanému zejména v posledních letech, nachází uplatnění aplikace na bázi tzv. populačních čipů, umožňující ekonomicky provádět screening populace až desítek tisíc jedinců (od lidí až po mikroorganismy). Jedná se o obrácenou platformu na bázi tzv. VIPTM čipů (Variation Identification Platform)² umožňující testovat až desítky tisíc biologických vzorků na jednom čipu (na rozdíl od pouze jednotek pomocí jejich klasických předchůdců), čímž se řádově podařilo snížit ekonomiku analýzy na jeden biologický vzorek. V neposlední řadě je třeba zmínit, že díky modifikacím směrem k HTS (high throughput screening), zejména proteinové čipy umožnily analýzu až 96 biologických vzorků (jeden biol. vzorek představující např. jednoho pacienta) během jedné analýzy vyžadující přibližně několik hodin až jeden den.

Microarrays

Microarrays, nazývané též obecnější skupinou „biočipy“, je možné základním způsobem rozdělit dle hustoty sond a spotů (nízko, středně až vysoko hustotní), typu a účelu imobilizovaných molekul (protilátky, antigeny, bakteriální komponenty, sacharidy, DNA/cDNA, lipidy, oligonukleotidy, peptidy, proteiny, další malé molekuly, celé buňky a vzorky tkání), způsobu výroby (*insitu*, kontaktní, bezkontaktní, „ink-jet“, litografická, „BeadArrays“, elektrochemická syntéza)² a počtu možných aplikací biologických vzorků (jednotlivé, HTS, VIPTM). V tomto článku se omezíme na dělení dle typu sond s ohledem na jejich nejrozšířenější využití i ve vztahu komplementarity s NGS a to na DNA a proteinové microarrays.

Současné DNA microarrays

Za přibližně dvacet let existence DNA microarrays, tedy od první publikace Dr. Scheny o DNA microarray dedikované genům *Arabidopsis thaliana* uveřejněné v Science v říjnu 1995¹, s dnes více než 5 tis. citacemi, byly DNA microarrays aplikovány v několika prominentních skupinách. Jedná se zejména o tzv. RNA aplikace

(exprese RNA, exonů a krátkých řetězců), CGH (comparative genomic hybridization), genotypizační nebo-li SNP (single nucleotide polymorphism), Chip-on-Chip, resekvenační, k analýze DNA metylací a VIPTM (populační čipy). Tím, že umožňují simultánní analýzu tisíců parametrů v rámci jednoho pokusu, DNA microarrays jsou vhodné pro celou řadu aplikací s velkým souborů vzorků. Příkladem těchto aplikací je patentovaná platforma VIP čipu pro novorozenecký screening, kde během jedné analýzy na jednom čipu je možné provést screening 1 tis. novorozenců pro 80 různých dědičných onemocnění najednou. Dle generálního ředitele Affymetrixu, tedy firmy zaujímající vedoucí postavení v seriově vyráběných DNA microarrays litografickou metodou, microarrays jsou ideální platformou pro genomové studie, které vyžadují zpracování velkého množství vzorků, rychlé zpracování, přesná data a příznivé náklady. Právě klinické aplikace, jako je genetická analýza v oblasti reprodukčního zdraví (prenatální, preimplantační a postnatální), onkologie (solidních nádorů a hematologických nádorů), a transplantace jsou zářné příklady, kdy čas, přesné údaje, a cenová dostupnost jsou rozhodující.³

Dalším odvětvím, ve kterém využití DNA microarrays zvláště v posledním desetiletí velmi rychle roste je zemědělsko-potravinářský průmysl. Často na bázi předchozího druhového sekvenování, které slouží zejména ke zmapování druhových genomů, úlohu následných šlechtitelských programů a selekcí genotypů s kýženými znaky přebírají DNA microarrays dedikované na cílené sondy. Z důvodů často sezónních požadavků na selekce prostřednictvím markerů, microarrays jednoznačně vychází lépe z důvodu schopnosti rychle, robustně a efektivně zpracovat velký počet vzorků. Dle sdělení vedení Illuminy, která je výrobcem obou platform, tedy microarrays i NGS, DNA microarrays hrají více a více klíčovou roli v translačních vědách, jelikož umožňují efektivně přenést nové objevy v laboratoři do klinického využití a oblastí s rutinními aplikacemi³. Ve skutečnosti různé čipy již umožňují rostlinnou a živočišnou genotypizaci a zaujímají primární místo v rychle rostoucích oborech agri- a agro-genomiky, tedy v různých aplikacích pro hospodářská zvířata a plodiny. Tento výzkumně aplikační postup byl aplikován v několika případech^{4,5} včetně českého týmu pod vedením doc. Řepkové z Masarykovy univerzity, který jako první na světě získal pomocí NGS celogenomovou informaci jetele lučního (*Trifolium pratense*)⁶, která byla posléze aplikována ve spolupráci s ESSENCE LINE a Arrayit na konstrukci SNP microarrays dedikovaných pro výběry kýžených genotypů jetele s vybranými kvalitativními znaky. V současné době je připravována ve spolupráci se šlechtitelským podnikem i konstrukce VIPTM čipu (Variation Identification Platform)² pro řádově tisíc jedinců *Trifolium pratense* k cílené selekci vhodných genotypů s danými parametry. Microarrays jsou zde jako primární robustní nástroj využívány ke genomové selekci i díky rostoucí přesnosti fenotypové predikce.

Další známou oblastí je využití techniky microarray ke screeningu geneticky modifikovaných organismů (GMO) v potravinovém řetězci, která v budoucnu může

sloužit k rutinním analýzám zejména v souvislosti s označováním výrobků obsahujících GMO.

Jak již bylo zmíněno, zvláštní postavení mezi DNA microarrays zaujímá technologie VIP čipu neboli populační čip. Populační čip využívá oproti původním DNA čipům, které jsou schopny testovat maximálně jednotky biologických vzorků, obrácené uspořádání volných sond a imobilizovaných vzorků, čímž se kapacita technologie diametrálně liší, tj. je možné testovat až 10 000 biologických vzorků (jedinců populace) během jedné analýzy, každý v min. 10ti lokusech. Tím tato platforma umožňuje významně snížit časové a finanční nároky na jednoho pacienta v rámci určité populace. Další výhodou je v přizpůsobivosti počtu vzorků a rychlosti získání genotypových informací (typicky 24 – 48 h od získání vzorku). Tato platforma umožňuje identifikaci jakékoliv amplifikované nukleové kyseliny z jakéhokoliv organismu a již nyní aplikace zahrnují populační screening za účelem personalizované medicíny, racionální personální preskripce, korelaci genotypů napříč populacemi jedinců s určitým zdravotním fenoménem (např. soubory mutantních genů u schizofreniků s následnou racionalizací preskripce, předpověď terapeutické účinnosti imunoglobulinové terapie u jednotlivých pacientů s relapsující remitující roztroušenou sklerózou (RRMS)⁷, hodnocení úrovně rizika vývoje autismu⁸, diagnostiku chorob, predikci onemocnění, neonatální screening, transplantační testy (HLA), forenzní využití, parentální testy, genealogické testy). V oblasti veterinární a rostlinné se jedná zejména o populační screening za účelem šlechtění, nicméně do budoucna je pravděpodobné, že vznikne i v tomto odvětví poptávka po populačním screeningu za účelem genotypové diagnostiky. Technologie není druhově omezená, může se uplatnit v genetických studiích humánních, živočišných, rostlinných, bakterií i virů se zaměřením na detekci specifických sekvencí nebo menších sekvenčních variant včetně SNP, mutací, insercí, delecí a inzerčně-delečních mutací. O tomto trendu svědčí i fakt, že patent na původní technologii VIPTM byl již využit u několika dalších patentovaných postupů a to zejména v oblasti zemědělství, šlechtění a humánní diagnostiky^{2,4,5}. O tom, že využití populačních čipů je současným trendem v molekulární biologii svědčí i fakt, že v literatuře lze nalézt několik aplikačních patentů a četné publikace z posledních let. Vybrané lokusy jsou amplifikovány pomocí PCR, imobilizovány na čipu a hybridizovány fluorescenčně značeným syntetickým oligonukleotidem. Následně je hybridizovaný čip skenován fluorescenčním skenerem. Při správném provedení je udávána 99,99 %-ní přesnost. Jak již bylo zmíněno VIPTM technologie má hlavní výhodu při vysokém počtu vzorků, kde je možno provést screening prakticky celé populace jedinců na jednom biočipu.

Dle vyjádření předních světových odborníků v oblasti microarrays, jsou biočipy bezpochybně lepší pro studie s vysokým počtem vzorků, pro rychlé zpracování, přesná data, cenovou efektivitu a klinické aplikace³. S nástupem NGS došlo i k zajímavému trendu, tedy využití dat z NGS rozšiřující databáze pro microarrays jako například miRBase a microRNA databáze³.

Proteinové microarrays

Zatímco DNA biočipy jsou mimo jiné použitelné pro měření hladin mRNA exprimovaných v buňce, nejsou schopny přímo měřit množství produkovaných bílkovin po translaci. To vedlo k vývoji proteinových biočipů. Charakterizace proteomu představuje jedinečnou výzvu vzhledem ke své dynamické povaze způsobené částečně posttranslačními modifikacemi proteinů, jako jsou fosforylace a glykosylace. Z tohoto důvodu analýza proteinů v biologickém vzorku představuje důležitý doplněk genomové analýzy, při které je zjišťována exprese mRNA. Proteinové biočipy tedy umožňují rozmanitou funkční analýzu proteinů pomocí interakce proteinů s imobilizovanými molekulami, například bílkovinami, peptidy, nízkomolekulárními látkami, oligosacharidy nebo DNA. Proteinové biočipy využívají podobných konceptů a principů jako DNA čipy, nicméně fyzikálně-chemické rozdíly mezi DNA a proteiny vyžadují různé postupy při manipulaci s biologickým vzorkem. Z tohoto důvodu tisk a imobilizace bílkovin na substrátu vyžadují mnohem více pozornosti. Proteinový svět je komplexnější, jelikož vedlejší řetězce aminokyselin umožňují mnohem více možností interakcí, než párování nukleobází. Dynamické posttranslační modifikace mají další dopad na proteinové interakce a aktivity.

Velkého pokroku bylo dosaženo u proteinových microarrays z hlediska jejich citlivosti a přesnosti, což napomohlo k rozvoji nových proteinových microarray technologií. V současné době využití těchto prostředků narůstá zejména ve farmaceutickém výzkumu (včetně identifikace účinku a cílů léčiv, antigen-specifických terapií pro autoimunitní onemocnění, rakoviny a alergie; identifikace cílů s malými molekulami, které by mohly být použity jako nové léky ad.), diagnostice (na bázi detekce antigenů a protilátek v krevních vzorcích), proteomice (exprese proteinů a celo-proteomové studie), funkčních analýzách proteinů (proteinové interakce), racionalizace léčby a imunitních odpovědí. Příkladem posledních proteinových microarrays jsou *OvaDx*[®] pro včasnou diagnostiku ovariální rakoviny, čekající na schválení FDA, a microarray obsahující 420 antigenů pro monitoring roztroušené sklerózy vyvinutý Harvardovou Univerzitou⁹.

Nutno dodat, že společnost Oxford Nanopore Technologies získala v roce 2008 licencovanou technologii od Harvardu, UCSC a dalších vysokých škol¹⁰, na jejímž základě vyvíjí protein- a „solid-state-“ nanopore technologii za účelem analýzy řady biologických molekul včetně DNA, RNA a bílkovin. Tato platforma je ovšem stále ve vývoji. Z výše uvedeného lze tedy konstatovat, že sekvenační technologie zatím principiálně nejsou schopny poskytnout data o proteinech, což je další argument proč NGS a microarrays jsou neporovnatelné, ale komplementární platformy.

Závěr

V důsledku současných pokroků v sekvenování, které se stává více a více dostupným, microarray technologie je ve specifických případech nahrazována NGS a to zejména v oblasti mapování neznámého genomového a transkribovaného materiálu, nicméně byly vyvinu-

ty zcela nové nástroje jako je VIP™ čip a HTS protei-
nové čipy, které poskytují zcela novou dimenzi využití
microarrays. Microarray technologie je dále vnímána
jako metoda robustnější s již vybudovaným zázemím
ať již s ohledem na zpracování dat, tak standardní
protokoly. Posledním trendem je též synergie micro-
arrays s NGS, kdy microarrays přijímají roli robustnější,
komplementární a aplikační metody. S nástupem NGS
a zvláště sekvenování transkriptomu (whole transcrip-
tome shotgun sequencing) došlo tedy k nové specia-
lizaci microarray technologie, jejímu rozvoji k novým
prakticky nenahraditelným nástrojům diagnostiky a ke
komplementárním aplikacím s hlavním záměrem na
vysokou kapacitu vzorků a cenovou efektivitu. Kromě
tohoto trendu, rozvoj microarrays umožnil vznik zce-

la nových nástrojů jen obtížně porovnatelných s NGS
např. na bázi tzv. populačních čipů, umožňující eko-
nomicky provádět screening populace až desítek tisíc
jedinců (od lidí až po mikroorganismy). Tím bylo umož-
něno efektivně generovat řešení pro personalizovanou
medicínu, studie s mnohačetnými populacemi pacien-
tů, živočišných i rostlinných jedinců a tedy více se při-
blížit k objasnění molekulárních mechanismů různých
onemocnění a jejich terapií, a efektivnímu šlechtění
hospodářských zvířat a plodin.

Poděkování: Tato práce se uskutečnila v rámci Národ-
ního programu udržitelnosti (NPU I LO1215) MŠMT –
34870/2013).

Literatura

1. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: *Science*. 270, 467 (1995).
2. Schena M.: Telechem International Inc. US6913879 B1
3. Heiden L: *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 34, 28 (2014).
4. Butruille D, et al.: Monsanto Technology LLC. EP2476763A2
5. Baley GJ, et al.: Monsanto Technology LLC. WO2009132089A2
6. Ištvanek, J., Jaroš, M., Křenek, A., Řepková, J.: *Amer. J. Bot.* 101, 327 (2014).
7. Meuer S., Giese T., Jacobi Ch., Wietek S.: Octapharma Ag. WO 2013186352
8. Carayol J.: Integragen. WO2013132074A3
9. Bakshi R, et al.: *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 3(2) e200 (2016).
10. <http://www.medicalnewstoday.com/releases/117827.php>, staženo 24. 8. 2016

Souhrn

Boroň J., Novotný P., Kačer P.: Microarrays versus nová generace sekvenování, souboj Davida s Goliášem?

S nástupem NGS a zvláště sekvenování transkriptomu došlo k nové specializaci microarray technologie a jejímu rozvoji k novým prakticky nenahraditelným nástrojům diagnostiky. Jakkoliv se objevují názory, že NGS zcela nahradí microarrays, trendy vyplývající z odborných článků, výzkumné a klinické praxe hovoří o výrazně rozdílném vývoji. NGS zejména v oblasti měření DNA exprese a transkriptomu skutečně přináší potenciál získání relativně kvalitativně bohatší informace, která se využívá zejména při hledání neznámých sekvencí, nicméně u analýz aplikovaných a známých sekvencí si microarrays naopak udržují dominantní postavení. Zcela unikátní platformou jsou tzv. VIP™ čipy, které přinesly možnost provádět populační studie s DNA až 10 tisíc jedinců v 10 lokusech. Zároveň je opomíjen fakt, že současné sekvenační technologie mohou přinést informace pouze o DNA, na rozdíl od široké škály biomarkerových sond, které lze kotvit a tudíž analyzovat na substrátu microarrays, včetně proteinových biočipů, které zaznamenali velký boom především v poslední dekádě a těší se praktickému a klinickému využití.

Klíčová slova: Microarrays, nová generace sekvenování, VIP biočip

Summary

Boron J., Novotny P., Kacer P.: Microarrays versus Next Generation Sequencing, David and Goliath battle?

With the advent of NGS and especially the transcriptome sequencing, a novel specialization of microarray technology has taken place and its development towards new practically indispensable diagnostic tools. Although it has been argued that NGS will eventually replace microarrays, the trends inferred from scientific articles, the research and clinical practice as well as the actual principal difference between these technologies, corroborate a significantly different development. In particular, in the measurement of DNA expression, NGS has brought the potential of obtaining a relatively richer qualitative information, which is used mainly for finding unknown sequences, however, microarrays conversely maintain dominance in the case of applied analyses and of known sequences. Furthermore, in the last decade, an entirely unique platform, called VIP™ microarrays, has been developed, which enabled to carry out cost-effectively population-based studies of DNA of up to 10,000 individuals in 10 loci. Moreover, another fact has been condoned, i.e. the current sequencing technologies can address only information related to DNA. Microarrays, to the contrary, permit immobilizing a wide spectrum of biomarker probes on the substrate and thus analyze a variety starting from DNA through proteins, small molecules, cells, tissues and others. As a consequence, the two technologies seem to be rather in a convenient complementarity than in any real competition.

Keywords: Microarrays, Next Generation Sequencing, VIP Biochip

LIPID KINASA PI4KB A 14-3-3 PROTEINY

Andrea Eisenreichová, Evžen Bouřa

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.; aeisenreichova@uochb.cas.cz, boura@uochb.cas.cz

Úvod

14-3-3 proteiny

Rodina 14-3-3 je tvořena kyselými (pI se dle isoformy pohybuje kolem hodnoty 4,7), evolučně vysoce konzervovanými regulačními proteiny o velikosti 26-29 kDa o přibližně 250 aminokyselinách, jež jsou exprimovány ve všech studovaných eukaryotických organismech¹. Jejich jméno je odvozeno od čísla frakce při chromatografii na DEAE-celulose a následné škrobové elektroforese.

V savčích buňkách je rodina 14-3-3 tvořena sedmi isoformami (β , ϵ , η , γ , τ , ζ , σ)^{2,3}, z nichž každá je kódována vlastním genem. U isoform původně označených jako α a σ , se později ukázalo, že odpovídají formám β a ζ s fosforylovaným Ser186 v isoformě β či Ser184 v isoformě ζ ⁴. Pět isoform se vyskytuje převážně v mozku, isoforma σ (také známý jako stratifin) je exprimována hlavně v epiteliálních buňkách a isoforma τ v T buňkách⁵. Na subcelulární úrovni se 14-3-3 nachází nejvíce v cytoplasmě, ale byl nalezen i v jádru, perinukleárním prostoru, Golgiho aparátu a dokonce i na cytoplasmatické membráně⁶. 14-3-3 vykazuje vysokou homologii nejen mezi savčími isoformami (70 – 90 %), ale i mezi savčími a kvasinkovými formami (přibližně 70 %)⁷.

Funkce 14-3-3 a jejich vazební partneři

Hlavní funkcí 14-3-3 je vazba na proteinové ligandy, čímž regulují buněčné procesy, v nichž se tyto ligandy uplatňují. Množství a variabilita funkcí a struktur proteinů vázajících 14-3-3 ukazuje na obrovskou regulační schopnost 14-3-3, viz tab. 1. Vazebních partnerů bylo

identifikováno již více než 700⁸ a 14-3-3 se tak zapojuje do dějů jako je apoptosa, signalizace, regulace buněčného cyklu a dělení, buněčný metabolismus, transkripce a dalších.

14-3-3 se však neváže pouze na proteiny, vazbou na DNA kruciformy regulují i replikaci DNA⁹. DNA kruciformy jsou sekundární struktury DNA vyskytující se na eukaryotických počátcích replikace DNA. Tato interakce je závislá na fázi buněčného cyklu, jelikož se kruciformy formují na počátku S fáze, a je největší při G1-S interfázi. 14-3-3 regulují replikaci DNA nejen vazbou na DNA kruciformy, ale také na proteiny prereplikačního komplexu, jako jsou MCM (z angl. minichromosome maintenance) proteiny a replikační faktor C.

14-3-3 je spojován s některými nemocemi. Skrze své ligandy, z nichž některé jsou onkogeny, tumorsupresorové geny či jejich produkty, má vliv v tumorigenese¹⁰. 14-3-3 má určitý význam i v neurodegenerativních procesech a onemocněních jako je Creutzfeld-Jakobova nemoc, Parkinsonova nemoc a Alzheimerova choroba¹¹.

Mechanismus regulace 14-3-3 proteiny

Způsobů, jakým 14-3-3 reguluje efektorový protein, je několik a mohou se vzájemně kombinovat. 14-3-3 může zakrývat vazebná místa ligandu pro jiné proteiny či DNA a tím snižovat schopnost ligandu se na tyto partnery vázat. Tento mechanismus se uplatňuje například při interakci 14-3-3 a BAD (Agonista buněčné smrti asociovaný s Bcl-2), kdy vazba 14-3-3 znemožňuje interakci BAD a Bcl2 (z angl. B cell lymphoma 2) a inhibuje tak iniciaci apoptosy¹¹.

Tab. 1: Některé proteiny vázající se s 14-3-3 a jejich úloha: Raf-1 – z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma proto-oncogene serine/threonine-protein kinase 1, BAD – agonista buněčné smrti asociovaný s Bcl-2, z angl. Bcl2-associated agonist of cell death, Bcl2 – z angl. B cell lymphoma 2, Cdc25C – z angl. cell division cycle 25 homolog C, MAP3K5 – mitogeny aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa 5, PTPN3 – tyrosin-protein fosfatasa nerekceptorového typu 3, PKC μ – protein kinasa C isoforma μ , IGF1 – inzulinu podobný růstový faktor 1, p53 – buněčný tumorový antigen p53. Převzato a upraveno¹⁰.

Ligand	Vlastnost	Vazebná sekvence	Efekt navázání 14-3-3
Raf-1	S/T kinasa	RSTS ²⁵⁹ TP, RSAS ⁶²¹ EP	Udržování aktivní i neaktivní konformace
BAD	Bcl-2 homolog	RHSS ¹¹² YP, RSRS ¹³⁶ AP	Inhibice proapoptických funkcí
Cdc25C	Y/T fosfatasa	RSPS ²¹⁶ MP	Blokace vstupu buňky do M-fáze
MAP3K5	S/T kinasa	RSIS ⁹⁶⁷ LP	Inhibice proapoptických funkcí
PTPN3	Y fosfatasa	RSLS ³⁵⁹ VE, RVDS ⁸⁵³ EP	Inhibice kinasové aktivity
PKC	S/T kinasa	RLS ²⁰⁵ NVS ²⁰⁸ , RTSS ²¹⁹ AELS ²²³	Inhibice kinasové aktivity
IGF-1 receptor	Y kinasa	SVPLDPSASSSS ¹²⁸³ LP	–
p53	Transkripční faktor	KGQSTS ³⁷⁸ RH	Zvýšení interakce s DNA

V některých případech, jako je regulace Cdc25 (z angl. cell division cycle 25 homolog C) či telomerasy, může být vazebné místo pro 14-3-3 v blízkosti jaderné lokalizační nebo jaderné exportní sekvence. Tehdy vazba 14-3-3 na ligand ovlivní transport proteinů mezi jednotlivými kompartmenty buňky¹¹.

Vazba 14-3-3 také chrání proteiny před proteolysou nebo defosforylací. Takto jsou chráněny např. PI4KB (fosfatidylinositol 4-kinasa B), histony nebo Raf-1 (z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma proto-oncogene serine/threonine protein kinase 1)¹².

Dalším mechanismem je konformační změna v enzymu po navázání 14-3-3, kdy 14-3-3 funguje jako alosterický kofaktor a moduluje katalytickou aktivitu enzymu. Vazba 14-3-3 může mít aktivující efekt (např. u tyrosin hydroxylasy) ale i inhibující efekt (např. u kinasové aktivity MAP3K5 (mitogeny aktivovaná protein kinasa kinasa 5))¹¹.

Díky svému rigidnímu uspořádání a tvorbě dimerů fungují 14-3-3 také jako strukturní lešení a poskytují tak prostor, na kterém spolu mohou asociovat proteiny a vytvářet komplexy. Takto se vytváří komplex např. Raf a PKC ζ (Protein kinasa C isoforma ζ)¹³.

Sekvence na cílovém proteinu

14-3-3 se váže na specifické sekvence obsahující fosforylovaný serin nebo threonin, byly však pozorovány i vazby na nefosforylované ligandy. Jako první identifikovali specifickou vazebnou sekvenci cílových proteinů 14-3-3 Muslin a kol. jako RSXpSXP, kde X je jakákoli aminokyselina a pS fosfoserin¹⁴. V následujících letech došlo k upřesnění této sekvence díky zjištěným preferencím k určitým aminokyselinám v pozicích -1, -2, +1 (vztaheno k fosfoserinu) na podobu R[S/Ar][+/Ar]pS/pT[L/E/A/M]P, kde Ar je jakákoli aromatičká aminokyselina, pT fosfoserin a + značí bazickou aminokyselinu^{10,15}. Fosforylace serinu na pozici -2 nepřispívá k interakci¹³. Přítomnost argininu na -3 nebo -4 pozici je velmi důležitá, kdežto prolin se nachází v 50 % cílových sekvencí a vytváří na struktuře fosfopeptidu ohyb. Na -5 pozici se nejčastěji vyskytuje arginin nebo leucin¹⁶. Dále byly charakterizovány další sekvence obsahující RX[Ar][+pS/pT[L/E/A/M]P¹⁷.

Výše popsané sekvence či sekvence jim podobné se vyskytují u vazebných partnerů 14-3-3 nejčastěji a jsou rozpoznávány všemi 14-3-3 isoformami¹⁵.

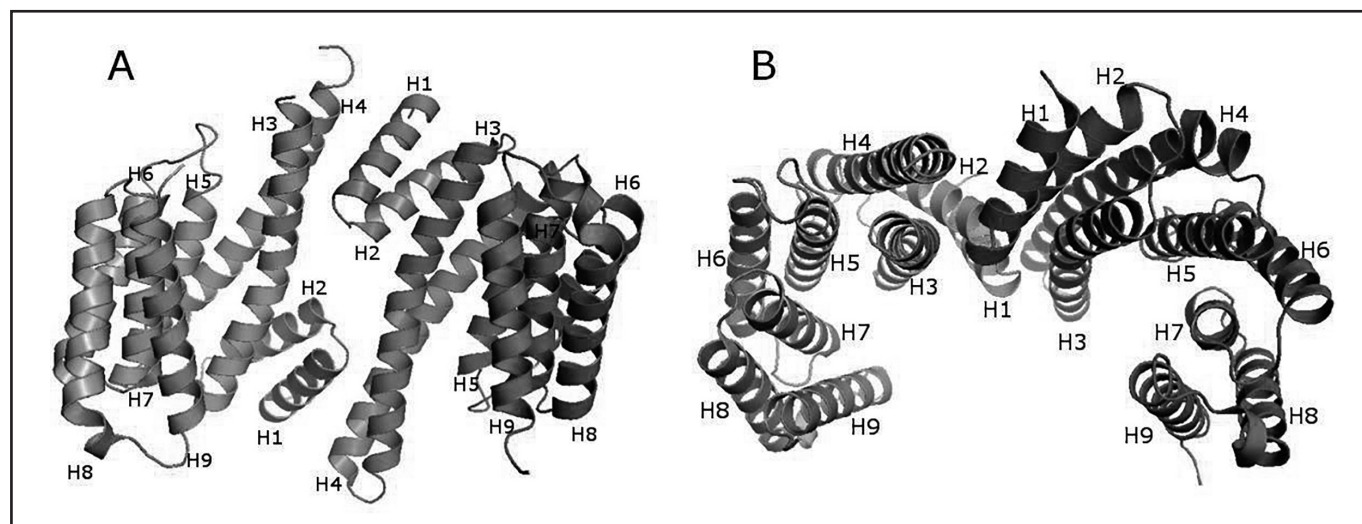
Dále byly identifikovány další, méně zastoupené motivy, například C-terminální sekvence SW(pT)X-COOH³. Proteiny obsahující tuto sekvenci vážou 14-3-3 slaběji. U rostlin se vyskytuje také vazebná sekvence LX(R/K)SX(pS/pT)XP¹⁶.

Některé vazebné proteiny 14-3-3 obsahují těchto specifických sekvencí více a mohou tak interagovat s oběma monomery dimerního 14-3-3, výsledkem může být změna konformace ligandu. Je pravděpodobné, že jeden z těchto motivů je hlavním vazebným motivem, na jehož fosforylaci závisí vazba na 14-3-3. Další sekvence váže 14-3-3 mnohem slaběji a samotná neposkytuje dostatečnou afinitu k 14-3-3 pro vazbu, vazba této sekvence se může uskutečnit až po navázání hlavní sekvence na 14-3-3¹⁸. Celkově však posiluje interakci mezi proteinem a 14-3-3, která tak může být několikrát silnější¹⁷.

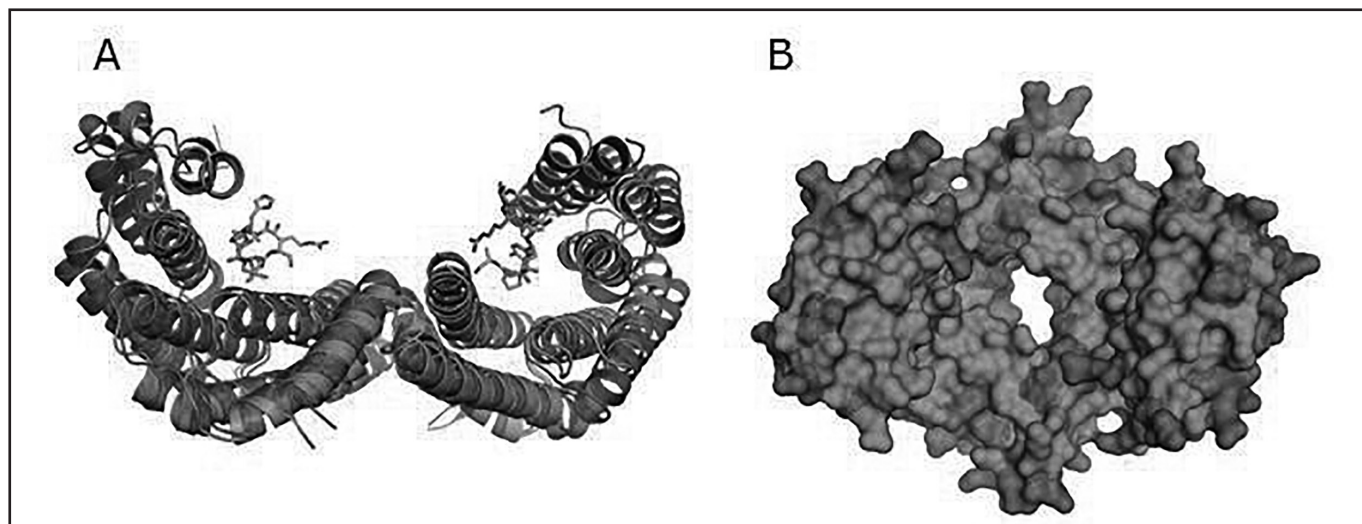
Struktura 14-3-3

14-3-3 má vysoce helikální strukturu. Je tvořen devíti antiparalelními α helixy, jež se označují H1-H9 a jsou spojeny krátkou β otáčkou, viz obr. 1. Všechny devět α helixů formuje strukturu vazebného žlábků, kdy čtyři směřují dovnitř žlábků (H3, H5, H7, H9) a zbylých pět ven (H1, H2, H4, H6, H8), viz obr. 1 B. Nejdelší jsou α helixy H3 a H4. Helixy lemující žlábek vytváří amfipatickou oblast, H3 a H5 obsahují nabitě nebo polární aminokyselinové zbytky, H7 a H9 představují hydrofobní část vystavující na svém povrchu několik leucinových zbytků¹⁹. H3 α helix je ohnutý v konzervovaném Gly53, což koresponduje s prolinem na +2 pozici k fosforylovanému serinu ve specifických vazebných sekvencích pro 14-3-3^{11,19}.

Aminokyselinová sekvence α helixů opisující žlábek je vysoce konzervovaná, viz obr. 2 B. U 17 studovaných isoforem 14-3-3 je 104 aminokyselinových zbytků konzervovaných a většina spadá právě na jeho amfipatickou oblast¹⁹. Právě tato oblast 14-3-3 je zodpovědná za vazbu ligandu. Méně je konzervovaná sekvence α helixů nacházejících se na vnějším povrchu 14-3-3, kte-



Obr. 1: (A) boční pohled, (B) pohled shora. Identifikační PDB kód 1QJB²⁰.



Obr. 2: Shody a odlišnosti isoformem 14-3-3.

ré mohou dále interagovat s ligandem 14-3-3 a zajišťovat tak isoformní specifitu vazby.

Sekvenčně nejvíce variabilní částí isoformem 14-3-3 je C-konec, který je ale i přesto vždy kyselý a reguluje interakce 14-3-3 interakcí s vazebným žlábkem volného 14-3-3²¹, pravděpodobně s jeho basicou oblastí tvořenou lysinovým a několika argininovými zbytky, jež se jinak přímo podílejí na vazbě ligand¹⁹. Na C-terminálním konci u isoformem ζ a τ bylo nalezeno fosforylační místo na pozici 232 pro kasein kinasu I α , což naznačuje další možnost regulace 14-3-3 proteinů prostřednictvím jeho C-konce (v sekvenci 14-3-3 se vyskytují další fosforylační místa, jež se účastní regulace jeho dimerizace a vazby na ligand²¹).

Strukturní odlišnosti jednotlivých isoformem 14-3-3 jsou velmi malé s odchylkami u vázaných 14-3-3 menšími než 2 Å, nejvíce se liší délka smyček spojující α helixy a délka α helixů H3 a H4¹⁵. Největší rozdíl je mezi strukturami 14-3-3 τ a 14-3-3 β , která zaujímá více otevřenou strukturu (RMSD mezi páteřemi 14-3-3 τ a 14-3-3 β dosahuje hodnoty 3,143), viz obr. 2 A.

Ze studií krystalových struktur 14-3-3 vyplývá, že rozdíl mezi volným a vázaným 14-3-3 je minimální, což poukazuje na velkou rigiditu jeho struktury, jež je zajištěna nejspíše velkým množstvím interakcí mezi jeho α helixy¹¹.

14-3-3 jako dimer

14-3-3 se vyskytuje ve formě dimeru, v němž je jeden monomer otočen o 180° vůči druhému monomeru, viz obr. 1 A. Dimer tvoří velký negativně nabitý kanál 35 Å vysoký, 35 Å široký a 20 Å hluboký²³, viz obr. 1 B. Na tvorbě dimeru se podílejí konzervované N-koncové oblasti 14-3-3 monomerů a to tak, že H1 a H2 jednoho monomeru interaguje s H3 a H4 druhého monomeru¹⁹. Dimerní struktura je udržována pomocí solných můstků, jejichž počet se liší mezi isoformami 14-3-3. U všech isoformem se nachází solný můstek mezi Arg18-Glu89 a s výjimkou isoformy ϵ i mezi Asp21-Lys85 (aminokyselinové zbytky číslovány podle isoformy ζ)¹⁵. U isoformy ζ je navíc vytvořen solný můstek mezi Glu5-Lys74¹⁵. Interakce je dále zajištěna dalšími polárními i hydrofob-

ními aminokyselinami na rozhraní monomerů, u 14-3-3 ζ jsou to Leu12, Ala16, Ser58, Val62, Ile65, a Tyr82¹⁵.

Tvorba homodimerů a heterodimerů je isoformově specifická. Přestože je N-konec 14-3-3 poměrně konzervovaný, obsahuje malé rozdíly v sekvenci, jež jsou však důležité pro preferenci partnera k tvorbě dimeru. Výskyt postranních řetězců neobvyklých pro 14-3-3 v isoformě σ určuje 14-3-3 σ k tvorbě homodimerů. Naopak isoforma ϵ se vyskytuje výhradně ve formě heterodimerů.

Přestože je dimerní struktura 14-3-3 základem pro funkci 14-3-3, mohou v závislosti na své stabilitě některé isoformy 14-3-3 existovat i v monomerní podobě, isoformy β a η jsou monomerní až ve třiceti procentech případů²².

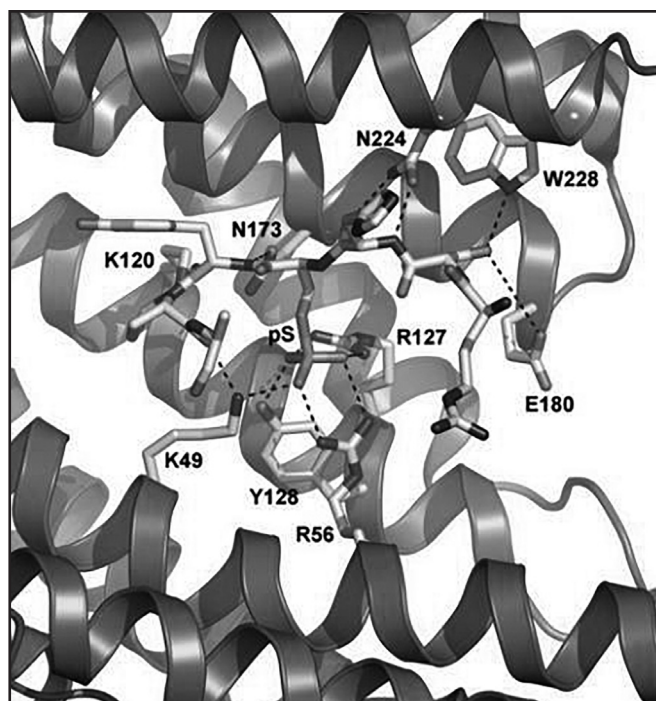
Fosforylace 14-3-3 – regulace funkce

Fosforylace 14-3-3 na jeho serinových, threoninových i tyrosinových zbytcích je (společně s existencí více na sobě nezávisle exprimovaných isoformem 14-3-3 a jeho různou subcelulární i tkáňovou lokalizací) jedním ze způsobů jeho regulace. Fosforylační místa jsou mezi isoformami poměrně variabilní²⁴, což umožňuje specifickou regulaci isoformem 14-3-3. Fosforylace 14-3-3 ovlivňuje nejen vazbu ligandu, ale i dimerizaci 14-3-3¹⁵. Například sfingonin-dependentní kinasa 1 a MAPK aktivovaná kinasa 2 fosforylují Ser58 isoformy ζ a jemu odpovídající aminokyselinové zbytky u isoformem β a η . Jelikož se Ser58 účastní interakcí důležitých pro dimerizaci 14-3-3, vede fosforylace v tomto místě k rozpadu dimerní struktury 14-3-3¹⁵. Dalším fosforylačním místem je Ser184 isoformy β , σ a ζ (aminokyselinový zbytek číslován podle isoformy ζ)²⁴. Fosforylace tohoto serinu c-Jun N-terminální kinasou má často za následek snížení afinity k ligandu, vede k rozpadu např. komplexu 14-3-3 a BAD²⁴. Stejně tak fosforylace na Ser232 respektive Thr232 14-3-3 τ a ζ kasein kinasou I α vede k inhibici vazby ligandu²⁴. Dále je vazebná schopnost 14-3-3 regulována autoinhibičním mechanismem, kdy C-konec 14-3-3 interaguje s aminokyselinovými zbytky vazebného žlábků a blokuje ho¹⁹.

Vazba ligandu na 14-3-3

Interakci s ligandem zajišťují na 14-3-3 hlavně vysoce konzervované aminokyselinové zbytky Lys49 a Arg56 nacházející se na α helixu H3 a Arg127 a Tyr128 na α helixu H5¹⁷ (aminokyselinové zbytky číslovány podle 14-3-3 ζ). Arg56, Arg127 a Lys49 vytváří solné můstky s fosfátem fosfopeptidu a hydroxyskupina Tyr128 vytváří s fosfátem vodíkovou vazbu¹⁵, viz obr. 3. Aminokyselinové zbytky Lys49, Arg127 a Tyr128 se podílejí na vazbě fosforylovaného i nefosforylovaného ligandu u všech isoform 14-3-3¹⁵. Další aminokyselinové zbytky se mohou zapojovat do vazby ligandu interakcí s jeho páteří, u 14-3-3 ζ např. Asn173, Asn224 a Lys120 skrze své amid- či aminoskupiny na postranních řetězcích.

Poté, co se ligand naváže do vazebného žlábků, může interagovat i s dalšími oblastmi 14-3-3. Bylo identifikováno několik takových oblastí, mezi nejdůležitější patří smyčka mezi H8 a H9, jež se významně sekvenčně liší jen u isoformy σ a určuje selektivitu 14-3-3 σ ¹⁵.



Obr. 3: Na vazbě se podílejí helixy H3 (residua K49 a K56), H5 (K120, R167 a Y128), H7 (N173 a E180) a H9 (N224 a W228). Identifikační PDB kód 1QJB²⁰. Převzato¹¹.

14-3-3 mohou vázat velké množství partnerů, mezi které patří např. fosfatidylinositol 4-kinasa III β , proteiny Raf, BAD či PKC. Skrze tyto interakce participuje 14-3-3 na regulaci celé řady buněčných procesů.

Fosfatidylinositol kinasy

Fosfatidylinositol kinasy patří do skupiny "lipid-kinas" a jsou zodpovědné za fosforylaci fosfatidylinositolu na hydroxylových skupinách třetího, čtvrtého nebo pátého uhlíku inositolového kruhu. V savcích buňkách tak tvoří sedm různých fosfátových derivátů fosfatidylinositolu, tzv. fosfoinositidů²⁵. Fosfatidylinositol 4-kinasy (PtdIns4K) katalyzují přenos fosfátové skupiny na hydroxylovou skupinu čtvrtého uhlíku nefosforylovaného inositolového kruhu. Fosfatidylinositol-4-fosfát (PI4P)

je nejen prekursorem fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfátu, ale účastní se i různých signálních drah, vesikulárního transportu či metabolismu lipidů²⁵. Právě v důsledku syntézy PI4P hrají PtdIns4K důležitou roli v buněčné regulaci.

V savcích buňkách existují čtyři PtdIns4K, které se podle svých biochemických vlastností dělí do dvou typů. Typ II zahrnující PtdIns4KII α a PtdIns4KII β je inhibován adenosinem, kdežto kinasy typu III, kam spadají PtdIns4KIII α a PtdIns4KIII β , jsou inhibovány wortmanninem a dalšími inhibitory PtdIns3K (fosfatidylinositol 3-kinasa)²⁶. Inhibice PtdIns4KIII inhibitory PtdIns3K se odvíjí od sekvenční podobnosti těchto enzymů, zejména v jejich katalytické doméně^{26,27}.

Výskyt a funkce fosfatidylinositol 4-kinasy III β

Fosfatidylinositol 4-kinasa III β je rozpustný protein o velikosti přibližně 92 kDa exprimovaný především v srdci, pankreatu a kosterní svalovině²⁸. Na subcelulární úrovni se PI4KB nachází převážně vázaný na cytosolické straně membrán Golgiho aparátu, v menší míře se nachází i v jádře a v nedávné době byla nalezena i na membránách lysosomů²⁹. Zakotvení PI4KB na membránu Golgiho aparátu je zprostředkováno proteiny ACBD3 (z angl. acyl-CoA-binding domain containing protein 3) a NCS-1 (z angl. neuronal calcium sensor, také známý jako frequenin)²⁷. Vazba ACBD3 i NCS-1 s PI4KB také pozitivně reguluje lipid-kinasovou aktivitu PI4KB³⁰.

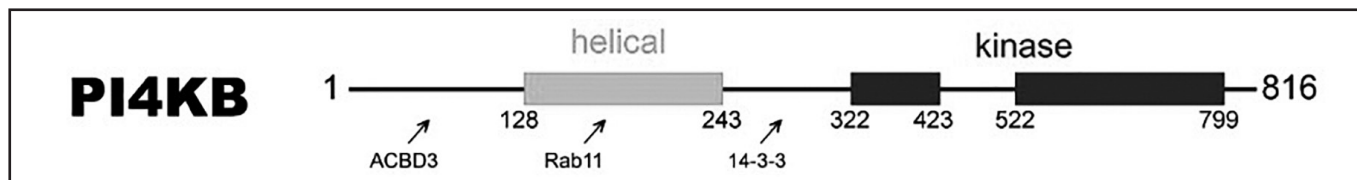
PI4KB má v Golgiho aparátu několik funkcí, z nichž se většina odvíjí od její katalytické aktivity. Skrze syntézu PI4P a jeho vazebné proteiny reguluje vesikulární transport na plasmatickou membránu, biosyntézu lipidů a jejich nevesikulární export z Golgiho aparátu^{25,31}. Přítomnost PI4KB je také nutná pro zachování struktury a organizace Golgiho aparátu³². Další, nekatalytickou funkcí PI4KB je vazba GTP vázaného Rab11 (Ras-příbuzné proteiny Rab)³³. Rab proteiny se podílí na vesikulárním transportu^{26,33}.

PI4KB se podílí se na syntéze PI4P i v jádře. Díky dvěma nukleárním lokalizačním sekvencím a jedné nukleární exportní sekvenci je transportována přes jadernou membránu a pohybuje se v obou směrech mezi jádrem a cytoplasmou³⁴. Fyziologická funkce PI4KB v jádře však dosud nebyla objasněna^{34,35}.

V lysosomech koordinuje třídění materiálu pro vesikulární transport a tvorbu vesikulů²⁹.

Struktura fosfatidylinositol 4-kinasy III β

V převážně helikální struktuře PI4KB se vyskytuje několik domén či regionů, viz obr. 4, z nichž některé vykazují podobnost s PtdIns3K. To se týká především poměrně konzervované C-koncové katalytické domény, méně již tzv. LKU (z angl. lipid kinase unique) domény, jež se vyskytuje blíže N-konci a je tvořena α helixy^{26,36}. Katalytická doména na svém N-konci tvoří antiparalelní β strukturu a na C-konci má helikální strukturu³⁶. Centrální Hom2 region (homologní region 2) s vazebným místem pro Rab11 (viz obr. 4) vykazuje vysokou podobnost s kvasinkovým homologem Pik1 (1-fosfatidylinositol 4-kinasa)^{26,27}.



Obr. 4: Číselná osa označuje pořadí aminokyselin. Pro – oblast bohatá na Prolin, LKU – LKU doména, z ang. lipid kinase unique, Fq – vazebné místo pro Frequentin (NCS), Ser – oblast bohatá na Serin, vazba 3-3-14, Hom2 – Hom2 doména, vazba Rab proteinu, catalytic. – katalytická doména. Převzato a upraveno³⁶.

Mezi katalytickou a Hom2 doménou se nachází vazebné místo pro NCS a oblast s množstvím serinů²⁶, viz obr. 4. V této oblasti se nachází několik fosforylačních míst, např. Ser258, Ser266 a Ser294. Fosforylace Ser258 a Ser266 má vliv na směřování PI4KB kinasou na membrány Golgiho aparátu, fosforylace Ser294 protein-kinasou D významně zvyšuje lipid-kinasovou aktivitu a podmiňuje vazbu 14-3-3²⁷. Na N-konci se nachází jaderná lokalizační a exportní sekvence a oblast bohatá na proliny^{35,26}.

Interakce PI4KB s 14-3-3

Phosphatidylinositol 4-kinasa asociuje se všemi sedmi savčími isoformami 14-3-3³⁵. 14-3-3 se váže na PI4KB v místě Ser294, který je součástí sekvence RTAS-NP podobající se vazebné sekvenci 14-3-3 R[S/Ar][+ / /Ar]pS/pT[L/E/A/ M]P. Vazba 14-3-3 v tomto místě je závislá na předešlé fosforylaci Ser294 protein kinasou D, avšak 14-3-3 se v menší míře váže i na PI4KB s mutovaným Ser294, což naznačuje možnost existence dalšího vazebného místa³⁶.

14-3-3 funguje jako pozitivní regulátor PI4KB, jeho vazba chrání pSer294 před působením fosfatasy³⁵. Defosforylace má za následek zásadní snížení lipid-kinasové aktivity PI4KB. Vazba 14-3-3 na PI4KB tak zajišťuje nepřetržitou syntézu PI4P v Golgiho aparátu.

Interakce s 14-3-3 nejen stabilizuje PI4KB v aktivní formě, ale umožňuje i tvorbu většího komplexu 14-3-3γ, PI4KB a BARS (brefeldin A-ADP ribosylovaný substrát) proteinů, kde dimerní 14-3-3γ funguje jako struk-

turní lešení³⁷. Tento komplex se uplatňuje v transportu z Golgiho aparátu na basolaterální plasmatickou membránu polarizovaných buněk za pomoci velkých, neopláštěných, post-Golgi přenašečových vesikul, tzv. PGC (z angl. post-Golgi carrier)³⁷.

Další možnost regulace PI4KB 14-3-3 vyplývá ze skutečnosti, že kinasu obsahuje ve své primární struktuře jaderné lokalizační a exportní sekvence. Interakcí s těmito sekvencemi mohou 14-3-3 ovlivňovat transport svých vazebných partnerů mezi jádrem a cytoplasmou. Studie v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* prokázaly závislost množství kvasinkového homologa PI4KB Pik1 v jádře na interakci s homology 14-3-3 *Saccharomyces cerevisiae* Bmh1 a Bmh2 (z angl. brain Modulosignalin Homologue)³⁹. V případě nedostatku živin se nachází Pik1 v cytoplasmě, kde vytváří komplex s Bmh1 a Bmh2. Vazba 14-3-3 znemožňuje transport Pik1 do jádra a zvyšuje tak její množství dostupné pro Golgiho aparát³⁸. Na membráně vázaná Pik1 interaguje s 14-3-3 v menší míře³⁸. V savčích buňkách nebyl mechanismus regulace podobný výše popsanému PI4KB pozorován³⁵.

Interakce mezi 14-3-3 a PI4KB byla zatím studována převážně molekulárně-biologickými a biochemickými metodami, především na úrovni enzymatické aktivity PI4KB a jejích mutantů, avšak detailnější pohled na strukturní hledisko interakce 14-3-3 a PI4KB dosud chyběl.

Poděkování

Financováno z projektu LO 1302 od MŠMT.

Literatura

1. Van Hemert MJ, Steensma HY, Van Heusden PH: *Bioessays* 23, 936 (2001).
2. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7084 (1988).
3. Martin H, Patel Y, Jones D, et al.: *Febs Lett.* 331, 296 (1993).
4. Howell S.: *J. Biol. Chem.* 270, 5706 (1995).
5. Aitken Y.: *Semin. Cancer Biol.* 16, 162 (2006).
6. Moreira JM, Shen T, Ohlsson G, et al.: *Mol. Cell Proteomics* 7, 1225 (2008).
7. Takahashi Y.: *Neurochem. Res.* 28, 1265 (2003).
8. Uhart M, Bustos DM: *PLoS one* 8, e55703 (2013).
9. Zannis-Hadjopoulou M, Yahyaoui W, Callejo M: *Trends Biochem. Sci.* 33, 44 (2008).
10. Fu H, Subramanian R, Masters SC: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 617-647 (2000).
11. Obšil T, Obšilova V: *Semin. Cell dev. Biol.* 22, 663 (2011).
12. Tzivion G., Avruch J.: *J. Biol. Chem.* 277, 3061 (2002).
13. Tzivion G, Shen YH, Zhu J.: *Oncogene* 20, 6331 (2001).
14. Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, et al.: *Cell* 84, 889 (1996).
15. Gardino AK, Smerdon SJ, Yaffe MB, et al.: *Semin. Cancer Biol.* 16, 173 (2006).
16. Johnson C, Crowther S, Stafford MJ, et al.: *Biochem. J.* 427, 69 (2010).
17. Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, et al.: *Cell* 91, 961 (1997).
18. Yaffe MB: *Febs Lett.* 513, 53 (2002).
19. Liu D, Bienkowska J, Petosa C, et al.: *Nature* 376, 191 (1995).
20. Rittinger K, Budman J, Xu J, et al.: *Mol. Cell.* 4, 153 (1999).
21. Šilhan J, Obšilova V, Večer J, et al.: *J. Biol. Chem.* 279, 49113 (2004).
22. Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, et al.: *Nature* 376, 188 (1995).

Literatura (pokračování)

23. Yang X, Lee WH, Sobott F, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17237 (2006).
24. Aitken A: *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 673 (2011).
25. Kanaho Y, Suzuki T: *J. Biochem.* 4, 503 (2002).
26. Balla A, Balla T: *Trends Cell Biol.* 16, 351 (2006).
27. Minogue S, Waugh MG: *Subcell. Biochem.* 58, 1 (2012).
28. Meyers R, Cantley IC: *J. Biol. Chem.* 272, 4384 (1997).
29. Sridhar S, Patel B, Aphkhasava D, et al.: *Embo J.* 32, 324 (2013).
30. Altan-Bonnet N, Balla T: *Trends Biochem. Sci.* 37, 293 (2012).
31. Graham TR, Burd CG: *Trends Cell Biol.* 21, 113 (2011).
32. Godi A, Pertile P, Meyers R, et al.: *Nat. Cell Biol.* 1, 280 (1999).
33. De Graaf P, Zwart WT, Van Dijken RA, et al.: *Mol. Biol. Cell.* 15, 2038 (2004).
34. De Graaf P, Klapisz EE, Schulz TK, et al.: *J. Cell Sci.* 115, 1769 (2002).
35. Hausser A: *J. Cell Sci.* 119, 3613 (2006).
36. Burke JE, Inglis AJ, Perisic O, et al.: *Science* 344, 1035 (2014).
37. Valente C, Turacchio G, Mariggio S, et al.: *Nat. Cell Biol.* 14, 343 (2012).
38. Demmel L, Beck M, Klose C, et al.: *Mol. Biol. Cell.* 19, 1046 (2008).

Souhrn

Eisenreichová A., Bouřa E.: Lipid kinasa PI4KB a 14-3-3 proteiny

14-3-3 proteiny jsou důležitými regulačními bílkovinami, jež se nacházejí ve všech eukaryotních organismech, v lidských buňkách tvoří rodinu 14-3-3 proteinů sedm isoform. Funkce 14-3-3 proteinů spočívá v interakci s jejich vazebnými partnery, jichž zatím bylo identifikováno několik set. Tito partneři mají klíčové role v mnoha buněčných pochodech, jako je signalizace, regulace buněčného cyklu a dělení, apoptosa a další. PI4KB (fosfatidylinositol 4-kinasa B), nacházející se na cytosolové straně membrán převážně Golgiho aparátu, katalyzuje připojení fosfátové skupiny na čtvrtý uhlík inositolového kruhu fosfatidylinositolu. Aktivita PI4KB je závislá na fosforylaci serinu v pozici 294. Tato fosforylace nejen, že zvyšuje kinasovou aktivitu PI4KB, ale také je podmínkou pro vazbu 14-3-3 proteinů. Tato interakce zajišťuje ochranu PI4KB před defosforylací a tak zaručuje nepřetržitou syntézu fosfatidylinositol 4-fosfátu, významné signalizační molekuly a prekursoru pro další fosfátové deriváty fosfatidylinositolu.

Klíčová slova: 14-3-3, PI4KB, interakce, regulace, PI4P

Summary

Eisenreichová A., Bouřa E.: Lipid kinase PI4KB and 14-3-3 proteins

The family of 14-3-3 proteins is one of great regulatory significance and can be found in all eukaryotic organisms and consists of seven isoforms in human cells. The function of 14-3-3 proteins rests in the interaction with their ligands of which several hundreds have been identified. The key role of these partners comes to pass in many cellular processes such as signalization, regulation of a cell cycle and division, apoptosis and others. Phosphatidylinositol 4-kinase B (PI4KB) is situated on the cytosolic side of mostly Golgi apparatus membranes and catalyzes attachment of a phosphate group to the fourth carbon of inositol group of phosphatidylinositol. The activity of PI4KB depends on the phosphorylation of Ser294. Not only this phosphorylation increases the kinase activity PI4KB, but is the condition for 14-3-3 proteins binding as well. This interaction provides the protection of PI4KB against dephosphorylation and this way it guarantees continuous synthesis of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P), a major signalization molecule and the precursor of other phosphate derivatives of phosphatidylinositol.

Keywords: 14-3-3, PI4KB, 14-3-3 interaction, regulation, PI4P

METAGENOM JAKO ZDROJ NOVÝCH GENŮ

Jan Čapek

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

Úvod

Mikroorganismy v životním prostředí jsou extrémně bohatým zdrojem genů kódujících enzymy s potenciálně novými biokatalytickými aktivitami. Pomocí klasických metod mikrobiologie založených na kultivaci mikroorganismů za laboratorních podmínek lze však studovat pouze přibližně 1 % přítomných mikroorganismů, zbylých 99 % je takto nekultivovatelných nebo podmínky pro jejich kultivaci nebyly zatím objeveny¹. Metagenomika nabízí řešení tohoto problému spočívající ve studiu veškeré DNA izolované z různých životních prostředí (tento směsný vzorek DNA se nazývá metagenom) namísto zkoumání čistých mikrobiálních kultur. Existují dva základní přístupy, které jsou využívány pro studium metagenomové DNA: (i) metody nezávislé

na znalosti části sekvence neboli funkční screening, anebo (ii) metody závislé na znalosti části sekvence. Oběma metodami je možné z komplexního vzorku metagenomové DNA získat nové geny kódující enzymy, které mohou nalézt své uplatnění v mnoha biotechnologických procesech^{2,3}. Tyto metody mají své výhody a nevýhody, které budou zmíněny v příslušných odstavcích, dále pak budou detailněji probrány pouze metody závislé na znalosti části sekvence.

Metody nezávislé na znalosti části sekvence

Základním principem funkčního screeningu je vložení fragmentů metagenomové DNA do vhodných expresních vektorů, tedy vytvoření metagenomové knihovny

(nejčastěji v *Escherichia coli*), a následný screening pro hledaný fenotypový projev u jednotlivých kolonií¹. V tomto postupu se vyskytují dvě hlavní překážky a to je komplexní problematika vytvoření cizího proteinu v hostitelské buňce a navržení vhodného screeningového postupu. Problém vytvoření cizího proteinu v hostitelské buňce lze řešit buď vyzkoušením alternativního hostitele⁴, nebo se lze pokusit upravit expresní podmínky či využít jiný kmen *E. coli*, který může být vhodnější pro heterologní expresi^{5,6}. Klíčovou roli ve funkčním screeningu dále hraje výběr vhodného vektoru, ten se řídí především zamýšlenou délkou inzertu. Velmi oblíbené se v tomto ohledu staly umělé bakteriální chromozomy (BAC)⁷.

Navrhování screeningového postupu se řídí především typem katalyzované reakce, jež je vykonávána cíleným enzymem. Například při hledání nových hydrolas se uplatnila přeměna substrátů přítomných v růstovém mediu na barevné produkty⁸, inhibicí růstu indikátorové bakterie byly nalezeny nové antimikrobiální enzymy⁹ a komplementace mezi metagenomovou DNA a endogenní chromozomovou či plasmidovou DNA byla využita při objevu nových katabolických enzymů¹⁰. Velká výhoda těchto metod spočívá v tom, že pozitivní kolonie již hledaný enzym exprimuje v nativní konformaci. Navíc metodami funkčního screeningu je možné získat zcela nové enzymy bez zjevné homologie s doposud známými proteiny. Naopak podstatnými nevýhodami se staly značná pracnost a časová náročnost¹¹.

Metody závislé na znalosti části sekvence

Jak název napovídá, tak v případě metod závislých na znalosti části sekvence je vstupním požadavkem znalost krátké vnitřní sekvence cíleného genu. Získání sekvence vnitřního úseku cíleného genu je založeno na faktu, že enzymy vykonávající stejné či podobné reakce obsahují konzervativní sekvence nejčastěji definující tvar aktivního místa, či domény nezbytné pro vazbu kofaktorů. Nejlépe jsou tyto konzervativní sekvence vizualizovány zarovnáním co největšího počtu sekvencí pocházejících z co nejvzdálenějších mikrobiálních zástupců. Jakmile jsou tyto konzervativní sekvence odhaleny, tak jsou na ně navrženy příslušné, často degenerované primery¹². Následnou PCR s využitím degenerovaných primerů vzniká směs ampliconů (zpravidla o určitém, nevelkém rozsahu délek) reprezentující geny kódující cílené enzymy mikrobiálních zástupců přítomných ve studovaném prostředí. Tato směs ampliconů může být sekvenována pomocí metod vysokokapacitní sekvenace nebo mohou být vzniklé fragmenty pomocí TA-klonování vloženy do vektorů a po transformaci jsou jednotlivé kolonie sekvenovány klasickou Sangerovou metodou¹³. Tímto jsou známy sekvence krátkých vnitřních úseků cílených genů. Poté jsou pomocí různých metod založených na PCR získány sekvence obklopující známý vnitřní úsek, což vyústí v získání kompletní sekvence hledaného genu. Někdy bývají tyto metody v anglické literatuře označovány jako „genome walking“ metody (GW-metody)^{13,14}. Právě různé GW-metody budou stěžejním tématem v následujících odstavcích.

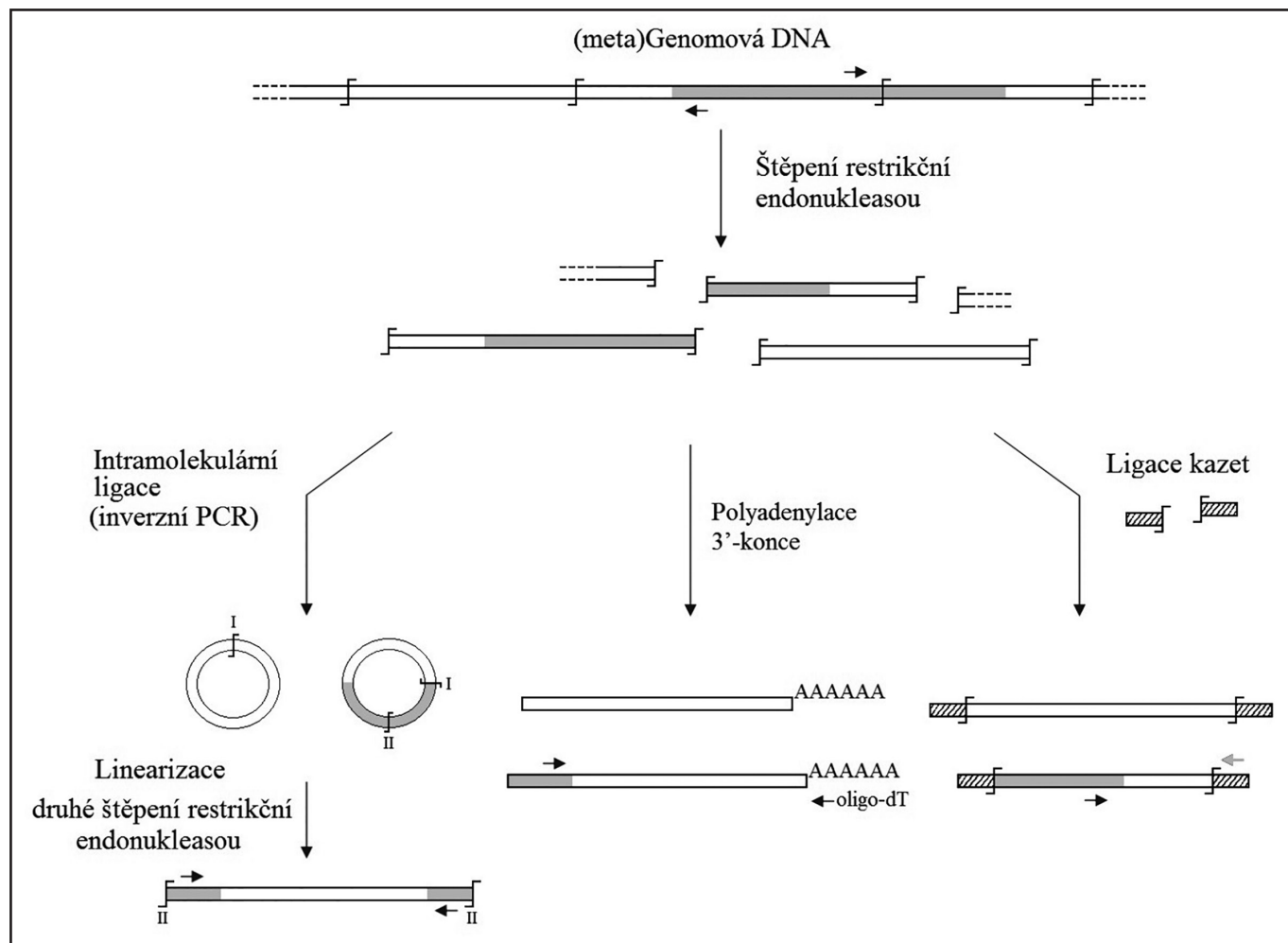
Z předešlého odstavce vyplývá, že metody závislé na znalosti části sekvence se obejdou bez nutnosti konstrukce velkých metagenomových knihoven a že nové geny jsou objevovány bez ohledu na jejich expresi v hostitelském organismu. To jsou dvě největší výhody oproti funkčnímu screeningu. Nicméně tyto metody trpí zkreslením, které je v úvodu do experimentu zaneseno návrhem degenerovaných primerů (ten je totiž vždy omezen pouze na známé sekvence) a následným PCR s jejich použitím, protože efektivita amplifikace nebude nikdy u všech vnitřních úseků stejná a tím může dojít k značnému znevýhodnění především minoritních sekvencí¹. Další podstatný problém nastává v případě využití některé z GW-metod, neboť tyto metody generují množství nespecifických produktů, což je v případě, kdy jsou tyto metody aplikovány na metagenomovou DNA, tedy na heterologní templát, značně umocněno. Ačkoliv nové geny získané těmito metodami jsou do určité míry homologní s již známými enzymy (kvůli úvodnímu návrhu degenerovaných primerů), tak přístup závislý na znalosti sekvence je ideálním prostředkem jak vytvořit kolekci enzymů lišících se v substrátové specifitě, katalytické aktivitě, enantioselektivitě, regiospecifitě, termostabilitě, stabilitě při různých pH nebo v různých rozpouštědlech a v dalších důležitých charakteristikách¹³.

Restrikční GW-metody

Prvním krokem těchto metod je vždy enzymatické štěpení vzorku metagenomové DNA. Vždy se vybírájí restrikční endonukleasy zanechávající lepivé konce a obecně nezáleží na tom, zda se restrikční místo bude nebo nebude nacházet uvnitř známé sekvence. Nicméně kvůli místu pro návrh primerů není možné použít restrikční endonukleasu štěpící příliš blízko hranice mezi známou a neznámou sekvencí. V následujících odstavcích budou zmíněny tři důležité restrikční GW-metody: inverzní PCR, použití kazet a metoda využívající terminální transferasu (Obr. 1)¹⁴.

První ze tří možností je inverzní PCR. Po štěpení jsou vzniklé fragmenty nařaděny a intramolekulárně ligovány za vzniku cirkulárních molekul DNA. Následující krok je volitelný a spočívá v opětovném štěpení, ale pouze restrikční endonukleasou rozpoznávající jedno restrikční místo uvnitř známého úseku. Tímto se cirkulární DNA přemění v lineární, jejíž vnější okraje jsou tvořeny známými úseky, které byly původně uvnitř. Nakonec proběhne amplifikace klasickou PCR s primery, jenž jsou v přirozeném uspořádání DNA orientovány 3'-konci směrem vně známé vnitřní sekvence¹⁵.

Druhou možností je ligace dvouvláknových oligonukleotidů s přesahy komplementárními ke štěpeným místům (tzv. kazety), které slouží jako uměle vytvořená místa pro nasedání primerů. Následně je pak nutné určitým způsobem zvýhodnit amplifikaci mezi kazetovým primerem a primerem komplementárním ke známé vnitřní sekvenci oproti nespecifické amplifikaci mezi dvěma kazetovými primery. Běžně se využívá modifikace kazet spočívající v odstranění fosfátové skupiny na 5'-konci (např. LA PCR *in vitro* Cloning Kit, Takara Co., Japonsko), tím dojde k znemožnění ligace 3'→5' vlákna kazety k substrátu, které by v násled-

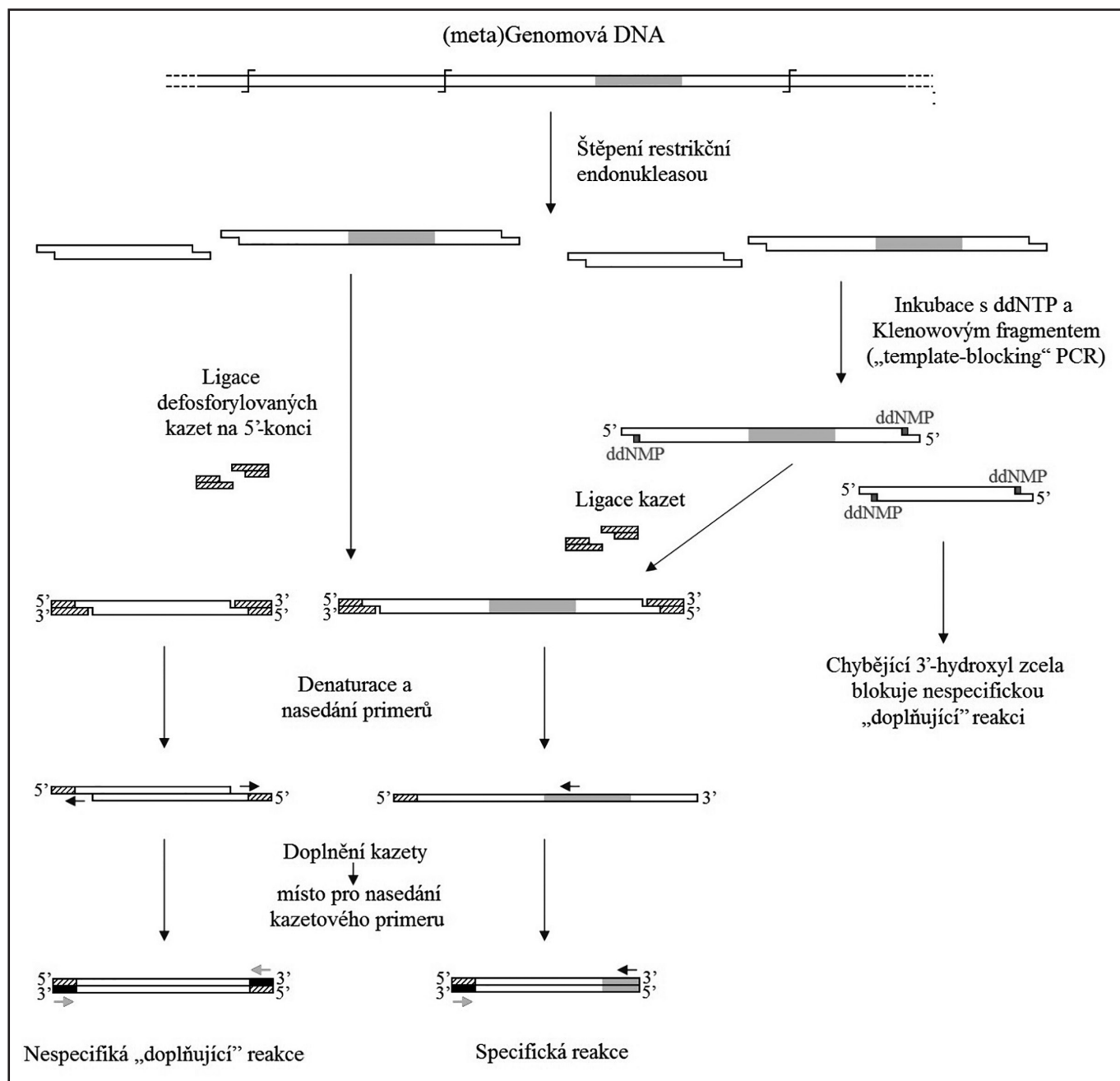


Obr. 1: Rozdělení restrikčních GW-metod. Šedá barva reprezentuje známou sekvenci a bílá neznámou. Kazety jsou znázorněny vyšrafovaným obdélníkem. Černé krátké šipky značí primery specifické ke známé sekvenci, šedá šipka značí primer komplementární ke kazetovému oligonukleotidu. Římské číslice v místech, kde dochází ke štěpení, naznačují použití jiné restrikční endonukleasy. Adice deoxyribonukleotidů probíhá lépe po denaturaci DNA, pro jednoduchost není zakresleno. Na obrázku je zakresleno použití kazet bez speciálních úprav, a proto by také probíhala nespecifická amplifikace mezi dvěma kazetami. Pro přehlednost není tato amplifikace zaznamenána.

dujícím amplifikačním kroku sloužilo jako místo pro nasedání kazetového primeru. Pro úspěšnou amplifikaci je nutné, aby bylo nejdříve syntetizováno vlákno pomocí primeru nasedajícího na známý úsek. Po denaturačním kroku PCR bude doplněna jen ta kazeta, která je ligována s molekulou DNA obsahující známou sekvenci (Obr. 2)¹⁶. Ačkoliv se kazety postrádající 5'-fosfátovou skupinu ukázaly jako velmi užitečný nástroj, tak tato jediná modifikace není dostatečně účinná, aby se kompletně zabránilo tvorbě nespecifických produktů. Ty vznikají tak, že místa pro nasedání primerů jsou generována i u fragmentů DNA neobsahujících známý vnitřní úsek mechanismem tzv. doplňující reakce (anglicky „fill-in reaction“, Obr. 2). Jako odpověď na tento problém byla navržena tzv. „template-blocking“ PCR¹⁷. Jedná se o metodu poměrně jednoduchou a produkující minimum nespecifických produktů. Po štěpení genomové DNA jsou výsledné produkty inkubovány s dideoxynukleotidtrifosfátem (ddNTP), jenž je přidán na 3'-konec kratšího vlákna Klenowovým fragmentem. To znamená, že příslušný ddNTP se vybírá v souladu s danou restrikční endonukleasou. Po odstranění neinkorporovaných ddNTP jsou ligová-

ny kazety. Výsledkem je substrát, jenž může podstoupit jen jedinou možnou amplifikaci a to s využitím primeru komplementárního ke známé sekvenci. V prvním cyklu PCR je doplněno dvojlátko až po kazetu a pak již následuje klasická exponenciální PCR za pomoci kazetového primeru a primeru komplementárního ke známé sekvenci. Navíc po začlenění ddNTP vznikají nekomplementární konce (vzniklé po štěpení) a tím pádem nemůže dojít k multimerizaci štěpené DNA a také se netvoří kazetové dimery, neboť kazety jsou navrženy na substrát již s inkorporovaným ddNTP (Obr. 2).

Třetí možností je metoda využívající terminální transferasu. Po štěpení DNA následuje denaturace a inkubace s terminální transferasou a dATP, vznikají jednovláknové produkty se známou sekvencí na 5'-konci a s polyadenylovaným 3'-koncem. Následujícím krokem je PCR s primerem komplementárním ke známé sekvenci a primerem obsahujícím oligo-dT sekvenci¹⁸. Tato metoda byla také upravena tak, aby nevyžadovala restrikční štěpení, pak bývá řazena do speciální skupiny extenzních GW-metod (zde toto dělení není zavedeno). V tomto případě je prvním krokem lineární amplifikace pomocí primeru komplementárního ke známé



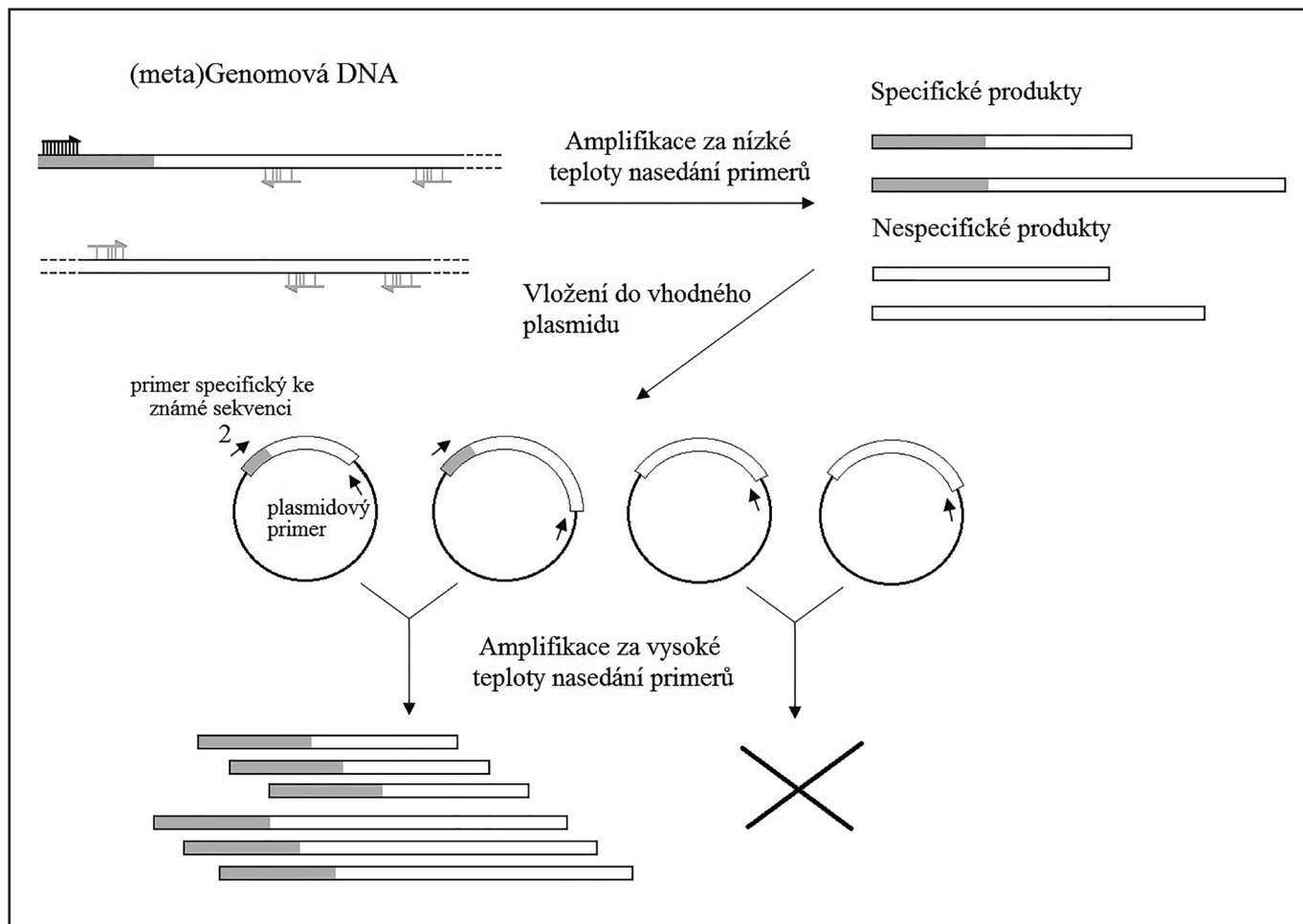
Obr. 2: Princip využití kazet defosforylovaných na 5'-konci (vlevo) a princip „template-blocking“ PCR (vpravo). Šedou barvou je znázorněna známá vnitřní sekvence a bílou neznámá sekvence. Kazety jsou zachyceny jako šrafované obdélníky. Malá mezera mezi kazetou a štěpenou DNA zdůrazňuje nemožnost ligace kvůli chybějícímu fosfátu nebo přítomnosti ddNMP. Při specifické reakci je nutná nejdříve extenze primeru komplementárního ke známé sekvenci, aby bylo vytvořeno místo pro nasedání kazetového primeru (černý obdélník). Nicméně tato místa mohou být vytvořena i mechanismem, kde jako primer slouží templátová DNA v případě využití defosforylovaných kazet. V případě blokování pomocí dideoxynukleotidů je nespecifická reakce inhibována.

sekvenci, pak následuje inkubace s terminální transferasou a nakonec PCR s využitím specifického primeru a homooligonukleotidového primeru¹⁹. Tato metoda se jeví jako velmi zajímavou alternativou k ostatním GW-metodám při získávání nových genů z metagenomu, neboť nevyužívá kazety ani degenerované primery (viz níže), jenž jsou zdrojem častých nespecifických dějů v případě směsné templátové DNA.

Primerové GW-metody

Tyto metody nevyžadují úvodní štěpení restriční endonukleasou a jsou charakteristické využitím různých

navržených primerů obsahujících degenerované, anebo náhodné sekvence. Takovéto primery jsou v páru s primerem specifickým ke známé vnitřní sekvenci v různých PCR strategiích. Nasedání degenerovaného nebo náhodného primeru vyžaduje snížení teploty, což samozřejmě vyústí v tvorbu mnoha nespecifických produktů, proto je selektivní krok u těchto metod klíčovým faktorem¹⁴. Zajímavým řešením je například vložení všech produktů hned po nespecifické PCR do plasmidů (například TA-klonováním). Poté následuje druhá PCR, přičemž jako templátová DNA slouží celkový soubor plasmidů s inserty v jediné amplifikační reakci obsahu-

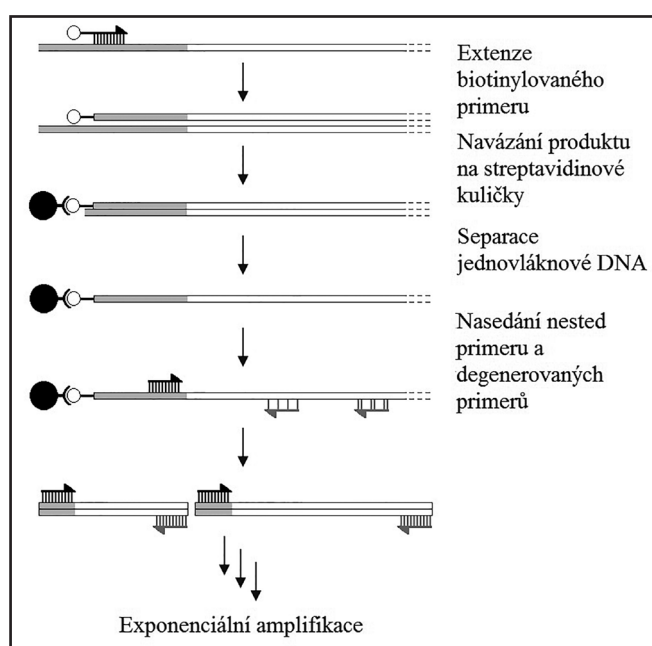


Obr. 3: Primerová GW-metoda využívající inserci amplikonů do plasmidů. V prvním kroku černé šiky značí primery komplementární ke známé sekvenci (šedá barva), šedými šípkami jsou zachyceny místa nasedání primeru s náhodně zvolenou sekvencí na neznámý úsek DNA (bílá barva). Vznikají specifické i nespecifické produkty, jenž jsou následně vloženy do vhodného plasmidu. Selektivním krokem je amplifikace ze souboru plasmidů pomocí primerů hybridizujících se známou sekvencí a s částí plasmidu.

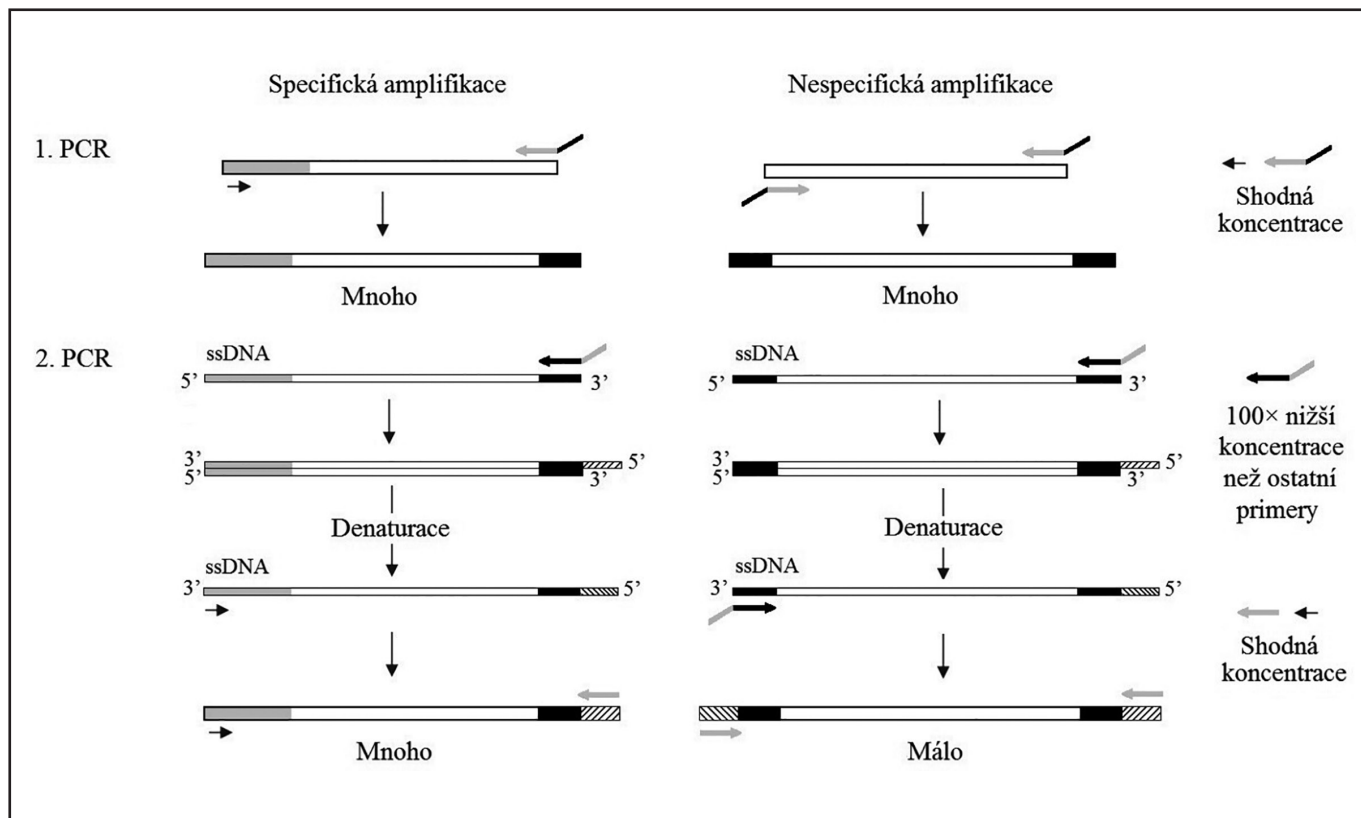
jící primer specifický ke známé sekvenci a primer specifický k plasmidové DNA (Obr. 3). Tím je zajištěno, že během druhé reakce vznikají pouze produkty obsahující známý vnitřní úsek²⁰.

Jiná strategie spočívá v úvodní lineární amplifikaci pouze s jedním primerem specifickým ke známé sekvenci s navázaným biotinem na 5'-konci. Vznikají tak jednovláknové různě dlouhé molekuly DNA začínající na 5'-konci známou sekvencí s navázaným biotinem (Obr. 4). Výsledné produkty jsou separovány z reakční směsi za pomoci magnetických kuliček pokrytých streptavidinem. V následujícím kroku je iniciace syntézy komplementárního vlákna umožněna nasednutím degenerovaného nebo náhodného primeru za nižší teploty. Jakmile proběhne první cyklus PCR, tak může být již teplota zvýšena. Nezbytné je také přidat primer specifický ke známé sekvenci²¹.

Poněkud komplikovanější metoda, nazývaná následná hybridní primerová PCR, se skládá ze dvou až tří PCR, přičemž jako templátová DNA slouží vždy produkt před-



Obr. 4: Primerová GW-metoda využívající úvodní lineární amplifikaci biotinylovaným primerem. V prvním kroku dochází k amplifikaci pomocí biotinylovaného primeru (černá šipka s bílým kruhem) navrženého tak, aby ve známé sekvenci (šedá barva) zbyl ještě prostor pro nested primer (černá šipka). Jednovláknový DNA produkt je separován z reakční směsi pomocí magnetických kuliček s navázaným streptavidinem (černý kruh). Pro vytvoření dvouvláknové DNA je použit nested primer a degenerovaný primer za nízké teploty nasedání. V posledním kroku jsou již místa pro nasedání degenerovaných primerů přítomna na obou koncích DNA, teplotu nasedání lze tedy zvýšit.



Obr. 5: Následná hybridní primerová PCR. Šedá barva reprezentuje známý vnitřní úsek a bílá neznámou sekvenci, krátká černá šipka symbolizuje primer specifický ke známé sekvenci. Složené primery jsou naznačeny zalomenými šipkami, přičemž přečínávající konec obsahuje adaptorovou sekvenci. Na tuto adaptorovou sekvenci je vždy navržen složený primer v následující PCR. Ve 2. PCR se objevuje krátký primer (šedá šipka) nasedající na právě vytvořený adaptorový přesah. Nízká tvorba nespecifického produktu je dosažena velkým nepoměrem mezi koncentracemi složeného primeru (obsahuje předchozí i následující adaptorovou sekvenci) a krátkého primeru (kompletně tvořen pouze adaptorovou sekvencí). Lze si povšimnout, že k tomu, aby docházelo k amplifikaci nespecifického produktu pomocí krátkého primeru (vhodná koncentrace), musejí být nejprve využity dva složené primery (nízká koncentrace). Naopak v případě tvorby cíleného produktu musí být použit pouze jeden složený primer, aby docházelo k amplifikaci primery o optimálních koncentracích.

chozí reakce (Obr. 5). V první reakci je využito primeru specifického ke známé sekvenci a složeného primeru, který na 3'-konci obsahuje degenerovanou sekvenci a na 5'-konci obsahuje adaptorovou sekvenci. Oba primery jsou při první PCR použity ve stejné koncentraci, což generuje značné množství nespecifických produktů. Zvýhodnění amplifikace pouze fragmentů obsahujících známý vnitřní úsek dochází v následujících PCR. V těchto reakcích jsou primery tři: (i) primer specifický ke známé vnitřní sekvenci, (ii) složený primer ve 100× nižší koncentraci než zbylé dva primery, jenž obsahuje sekvenci komplementární k první zabudované adaptorové sekvenci z předchozí reakce na 3'-konci a s druhou adaptorovou sekvencí na 5'-konci, (iii) krátký primer, který je tvořen pouze druhou adaptorovou sekvencí, ve stejné koncentraci jako primer specifický ke známé vnitřní sekvenci. Amplifikace je pak řízena především primery o vyšších koncentracích, což v tomto uspořádání upřednostňuje tvorbu ampliconů obsahující známou sekvenci. Dalším faktorem znevýhodňující amplifikaci fragmentů ohraničených pouze degenerovanými primery je skutečnost, že při narůstající délce adaptorových sekvencí se tvoří komplementární oblasti na obou koncích DNA, což ve výsledku vyústí v intramolekulární hybridizaci a tedy tvorbu smyčky²².

Závěr

Metagenomika využívá dva základní přístupy pro objev nových genů v závislosti na tom, zda je či není známa část sekvence. Pomocí metod závislých na znalosti části sekvence bylo získáno mnoho nových genů z neznámých mikroorganismů bez nutnosti nákladného a pracného vytváření metagenomových knihoven a jejich následného screeningu²³⁻²⁵. GW-metody, jakožto nejdůležitější součást metod závislých na znalosti části sekvence, slouží pro získání kompletního genu jen na základě znalosti krátké vnitřní sekvence. Samozřejmě u žádné GW-metody není zaručen jistý úspěch, ale díky velké rozmanitosti, flexibilitě a nízké ceně používaných strategií v této oblasti je možné velmi rychle vyzkoušet více přístupů, přičemž délka celého experimentu zřídka kdy přesáhne jeden den. Cílem vývoje těchto metod je především zvýšení specifity, aby byly snáze dosažitelné i minoritně zastoupené sekvence v metagenomu. Další vývoj efektivnějších DNA polymeras s vyšší přesností společně s dokonalejšími postupy pro izolaci a purifikaci metagenomové nepochybně pomohou zvýšit úspěšnost GW-metod.

Poděkování

Autor příspěvku děkuje grantu LH14004 od MŠMT ČR.

Literatura

1. Culligan EP, Sleator RD, Marchesi JR, Hill C: *Virulence* 5, 399 (2014).
2. Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A: *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2015.00672
3. Kotrba P, Uhlík O., Ječná K., et al.: *Chem. listy* 102, 960 (2008).
4. Liebl W, Angelov A, Juergensen J, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8099 (2014).
5. Gaida SM, Sandoval NR, Nicolaou SA, et al.: *Nat. Commun.* 6, 7045 (2015).
6. Sørensen HP, Mortensen KK: *Microb. Cell Fact.* 4, 1 (2005).
7. Wang L, Nasrin S, Liles M, Yu Z (2014): Use of Bacterial Artificial Chromosomes in Metagenomics Studies, Overview. In: *Encyclopedia of Metagenomics* (Nelson KE ed.), Springer, New York, 1-12.
8. Kračun SK, Schückel J, Westereng B, et al.: *Biotechnol. Biofuels* 8, 70 (2015).
9. Iqbal HA, Craig JW, Brady SF: *FEMS microbiol lett* 354, 19 (2014).
10. Nagayama H, Sugawara T, Endo R, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4453 (2015).
11. Ferrer M, Belouqui A, Timmis KN, Golyshin PN.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16, 109 (2009).
12. Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S: *Nucleic Acids Res.* 31, 3763 (2003).
13. Kotik M: *J. Biotechnol.* 144, 75 (2009).
14. Leoni C, Volpicella M, De Leo F, et al.: *FEBS J.* 278, 3953 (2011).
15. Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ: *Nucleic Acids Res.* 16, 8186 (1988).
16. Kilstrup M, Kristiansen KN: *Nucleic Acids Res.* 28, e55 (2000).
17. Bae JH, Sohn JH: *Anal. Biochem.* 398, 112 (2010).
18. Cormack RS, Somssich IE: *Gene* 194, 273 (1997).
19. Leoni C, Gallerani R, Ceci LR: *Biotechniques* 44, 232 (2008).
20. Ge Y, Charon NW: *Gene* 189, 195 (1997).
21. Hermann SR, Miller JAC, O'Neill S, et al.: *Biotechniques* 29, 1176 (2000).
22. Martin-Harris MH, Bartley PA, Morley AA: *Anal. Biochem.* 399, 308 (2010).
23. Bell PJL, Sunna A, Gibbs MD, et al.: *Microbiology* 148, 2283 (2002).
24. Uchiyama T, Watanabe K: *Biotechniques* 41, 183 (2006).
25. Yamada K, Terahara T, Kurata S, et al.: *Environ. Microbiol.* 10, 978 (2008).

Souhrn

Čapek J.: Metagenom jako zdroj nových genů

Metagenomické metody představují nástroj, kterým je možné zkoumat mikroorganismy skrze analýzu jejich DNA, jež je izolována přímo z daného životního prostředí. To znamená, že není potřeba získat čistou kulturu. Tyto metody jsou používány zejména pro objev nových genů kódujících enzymy, které mohou najít široké uplatnění v současných biotechnologiích. V tomto článku je věnována pozornost především metodám závislých na znalosti části sekvence, jejichž součástí jsou tzv. GW-metody.

Klíčová slova: metagenom, metody závislé a nezávislé na znalosti části sekvence, GW-metody

Summary

Čapek J.: Metagenome as a source of novel genes

Metagenomic methods represent a molecular tool suitable for studying microorganisms via analysis of their DNA, which is isolated directly from an environmental sample, without the requirement to obtain a pure culture. These methods are used mainly for discovering novel genes coding for enzymes with potential applications in current biotechnological processes. This minireview discusses primarily sequence-based methods with genome walking methods being the major focus of the study.

Keywords: metagenome, sequence-based methods, sequence-independent methods, genome walking

METODY URČENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Lucia Gharwalová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; gharwall@vscht.cz

Úvod

Antioxidanty jsou látky, které inhibují nebo zpomalují oxidaci jiných molekul tím, že zabraňují iniciaci nebo propagaci oxidačních reakcí. Oxidační reakce mohou produkovat volné radikály, což vede k tvorbě řetězových reakcí, které poškozuji buňky. V potravinářském průmyslu způsobují tyto jevy znehodnocení potravin procesem oxidativního žluknutí tuků¹. Kromě tuků však antioxidanty chrání před degradací i proteiny, sacharidy a DNA². Existují dvě základní kategorie antioxidantů, syntetické a přírodní, které se přirozeně vyskytují v živočišných a rostlinných tkáních. V poslední době se mnoho výzkumných týmů zaměřuje na sledování obsahu a funkce přírodních antioxidantů, především fenolů a polyfenolů, z pohledu jejich vztahu k volným radikálům, oxidačnímu stresu, rakovině a dlouhověkosti u lidí.

Existuje několik metod, jejichž pomocí se dá určit antioxidační kapacita látek. Antioxidanty působí různými mechanismy, a proto jsou i metody jejich určení založené na rozdílných principech³. Obecně může docházet k reakci antioxidantů s volnými radikály, redukcí hydroperoxidů či k vazbě antioxidantů do komplexů s katalyticky působícími kovy¹. Metody stanovení antioxidační kapacity látek můžeme primárně rozdělit na spektrofotometrické, elektrochemické a chromatografické.

Spektrofotometrické metody

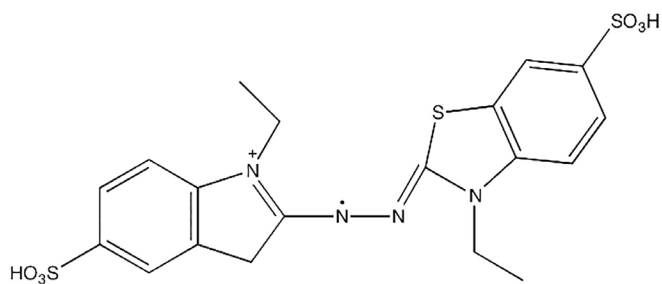
Při stanovení antioxidační kapacity pomocí spektrofotometrických metod jsou sledovány změny absorpčních spekter v průběhu chemické reakce. Díky změně spektrofotometrických vlastností je možné sledovat změnu složení jednotlivých látek.

Metoda ABTS

U této metody je využívána schopnost antioxidantů zhaset volné radikály. Kation chemické sloučeniny 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) (ABTS)^{•+} (Obr. 1) je v tomto případě radikálem, který vytváří modrozelený roztok a je zhasen látkami, které jsou donory vodíku. Úbytek modrozeleného zbarvení reakční směsi, ke kterému dochází vlivem zreagovaných antioxidantů, je vyjádřen jako absorbance a je přímo úměrný antioxidační aktivitě sledovaného vzorku. Měření absorbance probíhá při 734 nm⁴.

Pro hodnocení antioxidační kapacity u ABTS metody se využívá parametr „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“ (TEAC). TEAC je taková antioxidační kapacita vzorku, která odpovídá definovanému množství troloxu (syntetický derivát vitamínu E). Parametr TEAC je u čistých látek daný jako koncentrace 1 mmol/l troloxu, který vykazuje stejnou antioxidační kapacitu jako 1 mmol/l zkoumané látky. U směsí je parametr TEAC definován jako milimolární koncentrace troloxu, která je rovná antioxidační aktivitě vzorku⁵.

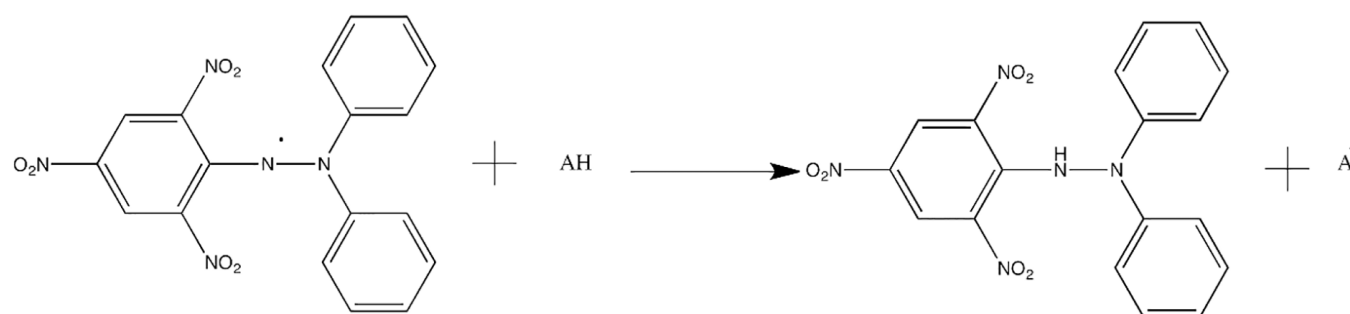
Stanovení lze provádět jak v hydrofilním, tak lipofilním prostředí. Tuto metodu lze tedy využít pro měření antiradikálové aktivity směsných vzorků, zejména extraktů přírodních materiálů.



Obr. 1: Struktura (ABTS)^{•+} 6

Metoda DPPH

DPPH, aneb 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl, je stabilní volný radikál. U DPPH metody se využívá schopnost antioxidantů zhaset DPPH. Přítomnost antioxidantů s antiradikálovou aktivitou způsobí redukci fialově zbarveného DPPH na bezbarvou neutrální molekulu difenylpicrylhydrazin (Obr. 2), při současném poklesu absorbance (měřené při 515 nm). Tento pokles absorbance, odpovídající rychlosti a rozsahu barevné změny, je úměrný antioxidační účinnosti dané látky či extraktu. Antiradikálová aktivita je vyjádřena jako kon-



Obr. 2: Reakce DPPH s antioxidantem (AH)⁸

centrace antioxidantu, která je potřebná k redukci 50 % radikálu DPPH⁹. Měření antiradikálové aktivity může probíhat po uplynutí konstantního času nebo je možné jej provádět kineticky. K detekci se může použít i HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), při které se hodnotí pík radikálu DPPH, a je především vhodná u barevných vzorků, u nichž může docházet k rušení spektrofotometrického stanovení⁵.

Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Pomocí této metody je hodnocena eliminace kyslíkových radikálů antioxidanty. K měření je využita oxidačně degradovatelná fluorescenční molekula (β -fykoerytrin, fluorescein nebo dichlorofluorescein) přidaná do sledované matrice. Testované antioxidanty chrání fluorescenční molekulu před oxidační degradací a stupeň jejich aktivity je následně kvantifikován pomocí fluorometru¹⁰. Je měřena změna v intenzitě fluorescence způsobená přítomností antioxidantu. Tato metoda kombinuje posouzení míry inhibice oxidace fluorescenční molekuly s inhibičním časem tvorby volných radikálů způsobenou antioxidanty¹¹.

Metoda HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity)

Metoda HORAC je založená na oxidaci fluoresceinové molekuly (fluorescein) hydroxylovým radikálem. Hydroxylové radikály jsou produkovány hydroxylovým radikálovým iniciátorem (H_2O_2) a Fentonovým činidlem. Přítomné antioxidanty blokují oxidaci fluoresceinu, dokud není jejich antioxidační aktivita vyčerpána. Antioxidační kapacita vzorku koreluje s křivkou úbytku fluorescence a je využívána ke kvantifikaci celkové radikálové hydroxylové antioxidační kapacity. Jako standard na sestavení kalibrační křivky se využívá kyselina gallová⁴.

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential)

Jedná se o jednoduchou metodu, pomocí níž je měřena redukční schopnost antioxidantů. Antioxidanty redukují komplex Fe^{3+} [2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin] (Fe^{3+} -TPTZ), což se projeví zbarvením původně bezbarvé reakční směsi do modra. Následně je sledován nárůst absorbance při 593 nm, který odpovídá množství vzniklého komplexu Fe^{2+} -TPTZ. Získané výsledky nemusí odpovídat celkové antioxidační kapacitě vzorku, vzhledem k tomu, že tahle metoda odráží jenom schopnost antioxidantů redukovat železité ionty⁸. Jedním z limitů téhle metody je, že stanovení vzorků probíhá v nefyziologickém pH (3,6), což představuje problém při stanovení fyziologických vzorků⁵.

Metoda TRAP (Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter)

Tato metoda monitoruje schopnost antioxidantů interferovat s reakcí mezi peroxylovými radikály a fluorescenční molekulou R-fykoerytrinem. Míra oxidace R-fykoerytrinu je stanovena spektrofotometricky, přičemž je sledovaný úbytek fluorescence. R-fykoerytrinu je zhasen molekulou ABAP (2,2'-azo-bis (2-amidinopropan) dihydrochlorid) za tvorby radikálu. Tahle reakce je také sledována v přítomnosti antioxidantů, které inhibují rozklad fykoerytrinu a tím oddálí pokles fluorescence. Výsledky jsou zpravidla vyjádřeny jako časový rozdíl mezi rozzážením signálu sondy v reakční směsi v přítomnosti nebo nepřítomnosti antioxidantu ve srovnání s odpovídajícím časem pro Trolox, který se využívá jako standard pro tuto metodu¹². Metoda TRAP využívá radikály, které se nacházejí v živých systémech, a je proto výhodnější než metody využívající syntetické radikály. Dříve se tato metoda také používala pro stanovení aktivity neenzymových antioxidantů jako je glutathion, kyseliny askorbové, β -karotenu a tokoferolu¹³.

Metoda stanovení TPC (Total Phenolic Content)

Tahle metoda, také nazývaná „Folin-Ciocalteu metoda“, se využívá na stanovení celkových fenolů především ve víně. Fenolické látky jsou nejrozšířenějšími sekundárními metabolity rostlin. Jde o přírodní antioxidanty, jež se hojně vyskytují jak ve víně, tak v odpadních meziproduktech vzniklých při zpracování hroznů vinné révy *Vitis Vinifera*. Pro tuto metodu je nutné sestavit kalibrační křivku z různých koncentrací kyseliny gallové. Celkové množství fenolických látek se následně určí jako ekvivalent koncentrace kyseliny gallové (vyjádřené v jednotkách mg kyseliny gallové/g sušiny extraktu). Princip metody je založen na reakci specifického činidla, složeného ze směsi kyseliny fosfomolybdenové a kyseliny fosfomolybdenové, s hydroxylovými skupinami analyzované látky bez přístupu světla. Změna absorbance během této reakce je dle literatury zaznamenána při 750 nm¹⁴ či 650 nm¹⁵.

Elektrochemické metody

Elektrochemické metody také patří mezi metody sloužící k určení antioxidační aktivity sloučenin. Mezi nejvyužívanější patří cyklická voltametrie a biamperometrie.

Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je vhodná pro určení, zda je daná látka schopná odevzdávat elektrony. Při této metodě je plynule zvyšován potenciál pracovní elektrody od počátečního ke zlomovému, a následně snižován ke konečnému potenciálu, přičemž je sledována intenzita elektrického proudu. Potenciál vložený na elektrodu může způsobit oxidaci přítomných látek⁵. Výsledkem měření je závislost elektrického proudu protékajícího elektrodou na jejím potenciálu, tzv. polarizační křivka⁴.

Redukční schopnost antioxidantu se vyhodnocuje potenciálem anodického oxidačního píku E_a a anodického proudu I_a . Čím lepší antioxidant, tím snadněji ode-

vzdává elektrony a tím nižší hodnotu E_a budou tyto sloučeniny mít. Z hodnoty výšky píku anodického proudu je možné určit koncentraci studovaných látek v roztoku⁵.

Chromatografické metody

Chromatografické metody byly pro stanovení celkové antioxidační kapacity využívány ještě před spektrofotometrickými a elektrochemickými metodami. Principem chromatografie je distribuce složek dané směsi mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární (sorbent)⁵.

HPLC je vhodná pro dělení organických, méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. Měřenou veličinou v průtokové cele detektoru může být fluorescence, absorbance, index lomu či elektrická vodivost¹².

Plynová chromatografie je běžným typem chromatografie používaným pro separaci a analýzu plynů, kapalin i pevných látek s bodem varu do zhruba 400 °C. K procesu separace sloučenin ve směsi dochází mezi kapalnou stacionární fází a mobilní plynou fází. Mobilní fáze je obvykle inertní plyn, jako je helium nebo dusík. Stacionární fáze je mikroskopická vrstva kapaliny nebo polymeru na inertním pevném nosiči⁵.

Stanovení jednotlivých fenolických látek metodou HPLC

Fenolické látky se převážně stanovují pomocí HPLC s UV detekcí (HPLC/UV). Měřením absorbance světla vzorku při různých vlnových délkách je možné spolehlivě identifikovat analyt. Tato metoda je pro účely stanovení dostatečně citlivá a selektivní¹⁶.

Kromě již zmíněné HPLC/UV je možné využití i jiných typů detektorů, například spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí – HPLC/MS¹⁷. Podstatou tohoto typu separace látek je interakce částic s povrchem adsorbentu. Tento typ chromatografie je vhodnou kombinací separační schopnosti HPLC a schopnosti hmotnostního spektrometru selektivně detekovat a potvrzovat identitu molekul.

Chromatografie na reverzní fázi je charakterizovaná kolonou s nepolární stacionární fází a polární mobilní fází. Vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze k ní mají větší afinitu látky nepolární. Pomocí této metody jsou separovány polární látky, mezi něž řadíme i látky fenolické¹⁵. Pro vyhodnocení se využívají kalibrační křivky sestavené ze standardů fenolických látek¹⁸.

TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity)

Tato metoda umožňuje kvantifikaci antioxidační kapacity vůči 3 silným oxidačním činidlům, tj. hydroxylovým a peroxylovým radikálům a peroxyinitritu. Oxidovaný substrát v tomto testu je α -keto- γ -methiolmásečná kyselina, která, ze které vzniká etylen. Časový průběh tvorby etylenu je analyzován pomocí plynové chromatografie. Antioxidační kapacita je kvantifikována jako schopnost antioxidantu inhibovat tvorbu etylenu vzhledem ke kontrolnímu vzorku¹². Vyhodnocení antioxidační kapacity je možné i pomocí parametru TEAC²⁰.

Závěr

Existují různé metody pro stanovení obsahu antioxidantů a jejich antioxidační kapacity, především metody spektrofotometrické, elektroanalytické a chromatografické. Uvedené metody jsou přehledem nejčastěji využívaných technik k účelu stanovení antioxidantů. Kom-

binace uvedených technik může poskytnout kompletní profil antioxidačního obsahu přírodních látek ve studovaných vzorcích.

Poděkování

Tato práce byla vypracována za finanční podpory grantu GAČR 14-23597S a MŠMT č. 20-SVV/2016

Literatura:

1. Velíšek J, Hajšlová J: *Chemie potravin* 2. OSSIS, Praha 2009.
2. Halliwell B: *Free Radic. Res. Commun.* 9, 1–32 (1990).
3. Domínguez-Perles R, Teixeira A, Rosa E, et al.: *Food Chem.* 164, 339 (2014).
4. Pisoschi AM, Negulescu GP: *Biochem. & Anal. Biochem.* 1, 1 (2011).
5. Paulová H, Bochořáková H, Táborská E: *Chem. Listy* 94, 174 (2004).
6. Oliveira S, Souza GA, Rodrigues C, et al.: *Quím. Nova.* 37, 497 (2014).
7. Musa K, Abdullah A, Al-Haiqi A: *Food Chem.* 194, 7005 (2016).
8. Cao G, Sofic E, Prior R: *J. Agric. Food Chem.* 44, 3426 (1996).
9. Fidler M, Kolářová L, Holčápek M: *Chem. Listy* 103, 232 (2009).
10. Ruiz-Moreno MJ, Raposo R, Cayuela JM, et al.: *Ind. Crops. Prod.* 63, 152 (2015).
11. Cao G, Verdon CP, Wu AHB, et al.: *Clin. Chem.* 41, 1738 (1995).
12. Prior R, Wu X, Schaich K: *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290 (2005).
13. Wayner D, Burton G, Ingold K et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 924, 408 (1987).
14. Alonso AM, Guilln DA, Barroso CG, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 5832 (2002).
15. Baba SA and Malik SA: *J. Taibah Univers. Sci.* 9, 449 (2015).
16. Anastasiadi M, Pratsinis H, Kletsas D, et al.: *Food Sci. Technol.* 48, 316 (2012).
17. Galea C, Mangelings D, Heyden YV: *Anal. Chim. Acta* 886, 1 (2015).
18. Fritz JS, Hedrick CE: *Anal. Chem.* 37, 1015 (1965).
19. Kolouchová-Hanzlíková I, Melzoch K, Filip V, et al.: *Food Chem.* 87, 151 (2004).
20. Lichtenthäler R and Marx F: *J. Agric. Food Chem.* 53, 103 (2005).

Abstrakt

Gharwalová L.: Metody určení celkové antioxidační aktivity

Antioxidanty se využívají především ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, díky jejich schopnosti zpomalovat, případně inhibovat oxidační reakce. Zabraňují tím tvorbě volných radikálů, které mohou způsobovat poškození buněk. Ve farmaceutickém průmyslu pomáhají antioxidanty například při prevenci onemocnění způsobených oxidativním stresem. Různé mechanismy působení antioxidantů vyžadují různé metody stanovení antioxidační kapacity. Kromě eliminace kyslíku, mohou antioxidanty reagovat s volnými radikály, redukovat hydroperoxydy, anebo se vázat do komplexů s katalyticky působícími kovy. Metody určení antioxidační kapacity látek mohou být rozděleny na spektrofotometrické, elektrochemické a chromatografické.

Klíčová slova: Antioxidant, antioxidační kapacita, antioxidační test

Abstract

Gharwalová L.: Methods for determination of total antioxidant activity

Antioxidants are mainly used in pharmaceutical and food industry due to their ability to slow down, eventually inhibit oxidation reactions, and thereby prevent the formation of free radicals that can cause cell damage. Antioxidants, used in the pharmaceutical industry, help to prevent ailments caused by oxidative stress. Antioxidants have various mechanisms of action and therefore require different methods of determining their antioxidant capacity. Apart from elimination of oxygen, antioxidants can react with free radicals to reduce hydroperoxides or can bind to complexes with catalytically active metals. Methods of determination of antioxidant capacity can be divided into spectrophotometric, chromatographic and electrochemical techniques.

Keywords: Antioxidant, antioxidant capacity, antioxidant assay

QUORUM SENSING SYSTÉM KVASINKY *CANDIDA ALBICANS*

Martina Paldrychová

Ústav Biotechnologie, VŠCHT v Praze; paldrycm@vscht.cz

Úvod

Quorum sensing (QS) neboli populačně-dependentní genová exprese je jevem poměrně dobře prostudovaným u gram-negativních bakterií¹. Jakmile koncentrace signálních molekul, které závisí na optické hustotě bu-

něk, dosáhnou prahové úrovně, dojde k aktivaci nebo potlačení určitých genů, které indukují komplexní odpověď bakteriální buňky. Příkladem může být exprese faktorů virulence: sekrece extracelulárních enzymů, bioluminiscence, transfer plasmidu, biosyntéza antibiotika, vývoj biofilmu nebo změna morfologie.

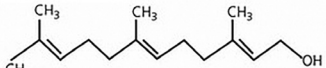
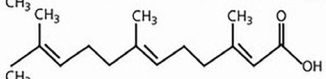
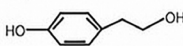
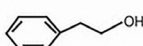
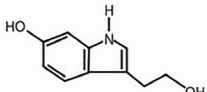
Vzhledem k významu QS pro bakteriální virulenci jsou tyto systémy studovány převážně za účelem vývoje nových léčebných strategií. Této by se dalo využít u kvasinek, u kterých bylo doposud rozpoznáno pouze malé množství QS systémů (např. u *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*). V těchto systémech je QS spojován s morfologickými změnami, tedy přechodem kvasinkové formy na vláknitou nebo naopak².

QS systém u kvasinky *C. albicans*

Eukaryotický QS systém byl nejdůkladněji prostudován u *C. albicans*, oportunně patogenní kvasinky, která je čtvrtou nejčastější příčinou nosokomiálních infekcí. Běžně je izolována z imunokompromitovaných pacientů (infekce HIV, léčba rakoviny, diabetes, apod.)³. *C. albicans* disponuje celým arzenálem virulencních faktorů, které způsobují u citlivých jedinců perzistentní infekce. Tyto faktory virulence zahrnují produkci proteáz, adhezínů a také schopnost podléhat změnám morfologie⁴.

Prvními identifikovanými komunikačními molekulami u této kvasinky byly tryptofol a fenethylalkohol. Jedná se o aromatické alkoholy, které byly identifikovány také jako QS molekuly *S. cerevisiae*⁵. Tato „autoantibiotika“ schopná blokovat filamentaci a inhibovat růst byla popsána již před více než 40 lety³. Hazen a Culter v roce 1979 dále charakterizovali morfogenezi auto-regulující látku (MARS) ovlivňující filamentaci. O struktuře této látky je doposud známo jen to, že obsahuje dusíkatý heterocyklus, je poměrně termostabilní (70 °C, 30 minut), pokud není bezprostředně po izolaci využita (do 48 h) ztrácí svou schopnost inhibovat filamentaci a byla také identifikována u *C. tropicalis*⁶. Později byly izolovány tři další QS molekuly, a to: farnesol, tyrosol a kyselina farnesová (Tab. I), i když u této látky Scchepin a kol. demonstrovali, že má v porovnání s farnesolem pouze 3 % aktivitu⁷.

Tab. 1: Látky vylučované *C. albicans* ovlivňující její morfogenezi³

LÁTKA	STRUKTURA
MARS	neznámá
FARNESOL	
KYSELINA FARNESOVÁ	
TYROSOL	
FENETHYL-ALKOHOL	
TRYPTOFOL	

Někteří autoři řadí mezi QS molekuly *C. albicans* také dodekanol⁸. Mezi další faktory, které ovlivňují morfologii *C. albicans* a podporují tvorbu hyf, patří např. vyšší pH (při nízkém pH převládá kvasinková forma, zatímco při pH vyšším než 7 je indukována tvorba hyf), přítom-

nost séra, N-acetylglukosaminu a tedy i peptidoglykanu, CO₂⁸ a přítomnost estrogenních hormonů⁹.

Farnesol – hlavní signální molekula *C. albicans*

Seskviterpen farnesol je kvasinkou *C. albicans* vylučován kontinuálně, jeho akumulace poté při vysoké buněčné densitě blokuje morfologickou přeměnu kvasinkové formy na vláknitou¹⁰. Blokuje klíčení pouze u buněk, u kterých nejsou ještě patrné zárodky klíčení, nedokáže zvrátit změnu morfologie u buněk, které již mají viditelné pupeny, tyto buňky pokračují v tvorbě mycelia. Farnesol neinhibuje růst a prodloužování již existujícího mycelia ani po aplikaci vyšších koncentrací¹¹. Farnesol inhibuje přichycení kvasinky k povrchu a ovlivňuje tak počáteční tvorbu biofilmu, ale má již naprosto minimální efekt na růst buněk v biofilmu. V pozdním stadiu vývoje biofilmu (tam kde je vysoká hustota propletených buněk) poté inhibuje filamentaci a podporuje dispergaci biofilmu a osídlení nového prostředí¹². Farnesol také v této fázi zodpovídá za aktivaci exprese genů kódujících komponenty efluxních systémů¹³.

Biosyntéza farnesolu

Počátek biosyntetické dráhy sterolů (ergosterolu u kvasinek, cholesterolu u savčích buněk) a farnesolu je stejný. Prvním krokem při biosyntéze sterolu je kondenzace acetyl-CoA a acetoacetyl-CoA za vzniku 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA. Následuje sedm reakcí, jejichž konečným produktem je farnesyl pyrofosfát, prekursor biosyntézy farnesolu (enzym potřebný k syntéze farnesolu nebyl kupodivu ještě popsán)². Stejně tak ani systémy, kterými je farnesol vypuzován z buňky, QS receptory nebo induktory¹⁴.

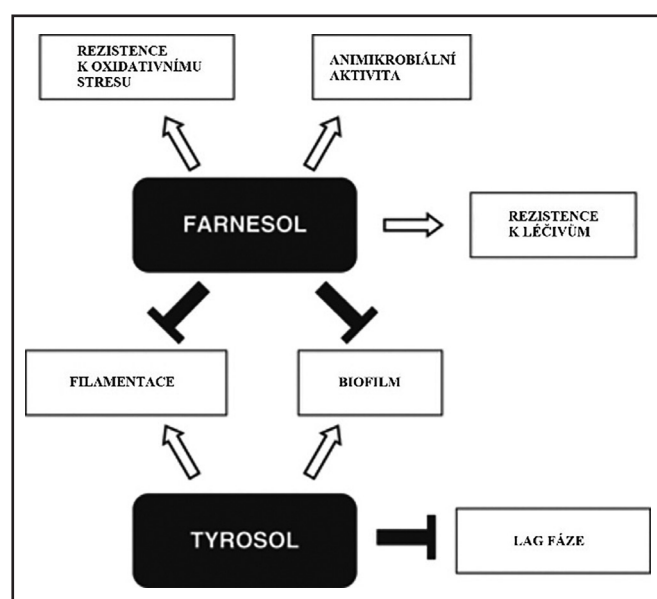
Kvasinkové a savčí buňky sdílí biosyntetickou dráhu, která je zodpovědná za produkci zymosterolu z farnesyl pyrofosfátu. Kvasinková 24-C-methyltransferasa poté zodpovídá za přeměnu zymosterolu na fekosterol, zatímco 24-dehydrocholesterol reduktáza savčích buněk řídí biosyntézu směrem k produkci cholesterolu, který slouží jako prekursor steroidních hormonů (androgeny a estrogeny)². Zajímavé je, že přítomnost estrogenů má zásadní vliv na morfogenezi *C. albicans*. Přídavek 17-β-estradiolu nebo ethynyl estradiolu vede u této kvasinky k navýšení počtu buněk tvořících vlákna, tedy vytvoření formy, která u této kvasinky představuje významný faktor virulence⁹.

C. albicans je nejčastějším původcem vulvo-vaginální kandidózy (VVK). Odhaduje se, že přibližně 75 % všech žen prodělá alespoň jednou v životě VVK¹⁵. Z výše uvedených důvodů se VVK objevuje u žen častěji v průběhu těhotenství, kdy je hladina estrogenů v těle vysoká. Nízká hladina estrogenů u mužů je jedním z důvodů, proč se jim infekce touto kvasinkou vyhýbají⁹. Estrogen má vliv také na infekce způsobené dalším dimorfním patogenem *P. brasiliensis*, u kterého je naopak za virulenci zodpovědná kvasinková forma. Estrogen potlačuje přeměnu vláknité formy této kvasinky na kvasinkovou formu, a proto se infekce tímto patogenem vyskytují častěji u mužů než u žen, které mají v těle více estrogenních hormonů¹⁶.

Sekundární regulace morfogeneze prostřednictvím tyrosolu

Tyrosol (2-(4-hydroxyfenyl) ethanol), který je odvozen od aminokyseliny tyrosinu, byl identifikován jako druhá signální molekula kvasinky *C. albicans*. Je stejně jako farnesol uvolňován do růstového média v průběhu růstu. Je schopen eliminovat lag fázi, která je normálně pozorována po přenesení kultury kultivované přes noc do čerstvého média¹⁷. Tyrosol stimuluje tvorbu hyf hlavně v časně fázi tvorby biofilmu (1 – 6 h). Produkce tyrosolu poté dále koreluje s množstvím vytvořeného biofilmu a podporuje tak závěr, že tyrosol skutečně je QS molekulou jak pro buňky rostoucí v biofilmu, tak pro buňky planktonní. Nicméně biofilmové uspořádání buněk produkuje až o 50 % více tyrosolu. Tento jev prokázali Alem a kol. u čtyř kmenů *C. albicans*¹.

Morfogeneze *C. albicans* je tedy pod komplexní pozitivní/negativní kontrolou tyrosolu respektive farnesolu¹⁷, jak demonstruje také Obr. 1.



Obr. 1: Schematické znázornění vlivů farnesolu a tyrosolu na fyziologii *C. albicans*. Šipky reprezentují pozitivní regulaci, zatímco tmavé čáry negativní regulaci¹⁸.

I při zvýšení koncentrace tyrosolu v prostředí tyrosol nepřekoná účinky farnesolu blokujícího filamentaci. Z tohoto důvodu je regulace morfogeneze tyrosolem považována za sekundární, projevující se pouze tehdy, je-li přítomnost farnesolu v životním prostředí limitována nebo jestliže farnesol v prostředí zcela chybí¹⁹.

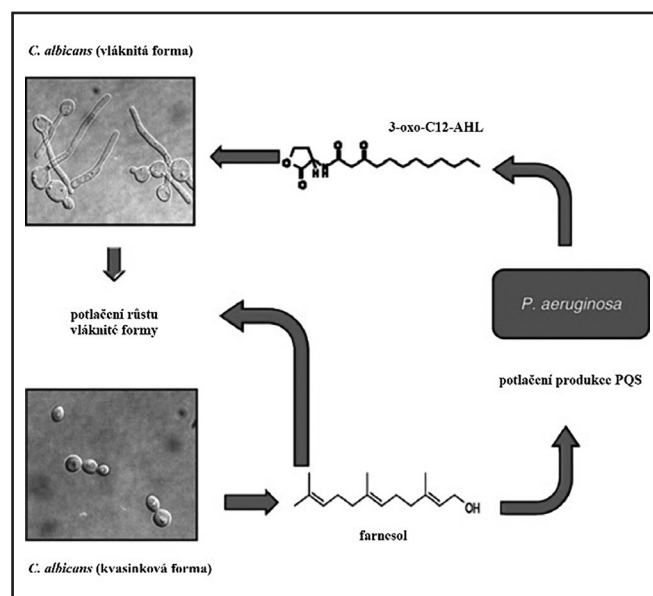
C. albicans ve smíšeném biofilmu

C. albicans a bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se běžně vyskytují ve smíšených biofilmech. Oba mikroorganismy se zapojují do složitých interakcí, které zahrnují jejich QS systémy.

Více než 600 genů *P. aeruginosa* je kontrolováno systémem QS. Hlavními signálními molekulami této bakterie jsou N-acyl-homoserinové laktony (AHL) aktivující geny, kterými jsou kódovány faktory virulence a další proteiny potřebné pro přežití v lidském hostiteli a pro destrukci hostitelské tkáně během infekčního procesu. Mezi tyto faktory patří např. elastáza, proteáza, dále

exotoxin A nebo alkalická fosfatáza²⁰. *P. aeruginosa* produkuje kromě AHL také 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolon, neboli *Pseudomonas* chinolon signál (PQS). PQS se podílí např. na biosyntéze a sekreci pyocyaninu a významným způsobem ovlivňuje patogenitu této bakterie během infekcí močových cest²¹.

Hogan a jeho spolupracovníci zjistili, že 3-oxo-C12-AHL potlačuje filamentaci *C. albicans* a rovněž inhibuje růst její vláknité formy, zatímco na kvasinkovou formu nemá vliv²² (Obr. 2).



Obr. 2: Schematické znázornění cross-komunikace mezi *C. albicans* a *P. aeruginosa*¹⁸.

Morfologická změna *C. albicans* je spuštěna jakmile kvasinka rozpozná přítomnost *P. aeruginosa* a velice pravděpodobně jí slouží jako strategie pro přežití²³. Na druhou stranu, přidavek farnesolu, který je produkován *C. albicans* a má antimikrobiální vlastnosti, do smíšené kultury, inhibuje biosyntézu PQS a v důsledku toho snižuje produkci faktoru virulence pyocyaninu²⁴.

Závěr

Objevem quorum sensing systémů regulujících virulenci mikroorganismů bylo již poukázáno na zcela novou možnost přístupu k léčbě infekcí způsobených virulencí bakterií (např. *P. aeruginosa*). Cestou identifikace QS molekul a pochopení mechanismů, které jsou důležité pro nástup virulence oportunně patogenní kvasinky *C. albicans*, by se v budoucnu dalo přistupovat např. k léčbě vulvo-vaginální kandidózy, jehož je právě kvasinka *C. albicans* nejčastějším původcem. Proces QS u kvasínek doposud nebyl uspokojivě popsán, ale po jeho detailnějším prostudování by bylo možné navrhnout např. látky schopné interference s tímto systémem a bránící tak nástupu virulence.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokýškolský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2016) a GAČR grantu 14-23597S.

Literatura

1. Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, et al.: *Eukaryotic Cell* 5, 1770 (2006).
2. Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG: *Fungal Genet. Biol.* 48, 747 (2011).
3. Kruppa M: *Mycoses* 52, 1 (2009).
4. Calderone RA, Fonzi WA: *Trends Microbiol.* 9, 327 (2001).
5. Chen H, Fink GR.: *Genes Dev.* 20, 1150 (2006).
6. Hazen KC, Cutler J: *Infect. Immun.* 24, 661 (1979).
7. Shchepin R, Hornby JM, Burger E, et al.: *Chem. Biol.* 10, 743 (2003).
8. Mayer FL, Wilson D, Hube B: *Virulence* 4, 119 (2013).
9. Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL: *Eukaryotic cell* 5, 180 (2006).
10. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2982 (2001).
11. Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4938 (2005).
12. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5459 (2002).
13. Enjalbert B, Whiteway M: *Eukaryotic Cell* 4, 1203 (2005).
14. Cho T, Nagao J, Imayoshi R, et al.: *J. Oral Biosci.* 52, 233 (2010).
15. Sobel JD: *The Lancet* 369, 1961 (2007).
16. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, et al.: *Trends Microbiol.* 10, 80 (2002).
17. Chen H, Fujita M, Feng Q, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5048 (2004).
18. De Sordi L, Mühlischlegel FA: *FEMS Yeast Res.* 9, 990 (2009).
19. Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3805 (2006).
20. Suga H, Smith KM: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 586 (2003).
21. Bala A, Gupta RK, Chhibber S, et al.: *J. Chromatogr.* 930, 30 (2013).
22. Hogan DA, Vik Å, Kolter RA: *Mol. Microbiol.* 54, 1212 (2004).
23. Albuquerque P, Casadevall A: *Med. Mycol.* 50, 337 (2012).
24. Cugini C, Calfee M, Farrow JM, et al.: *Mol. Microbiol.* 65, 896 (2007).

Souhrn

Paldrychová M.: Quorum sensing systém kvasinky *Candida albicans*

Velký počet oportunně patogenních bakterií využívá během nástupu infekce systém quorum sensing (QS). Pomocí signálních molekul (u gram-negativních bakterií N-acylhomoserinových laktonů) je řízeno chování celé populace bakterií (hlavně exprese faktorů virulence). Díky studiu QS systémů u gram-negativních bakterií byly již popsány látky se schopností interference s těmito systémy, představující nové léčebné strategie. Téhož by se dalo využít u kvasinek, kde by identifikace QS molekul a pochopení jejich mechanismů působení mohlo vést k efektivnější léčbě kvasinkových infekcí, např. vulvo-vaginální kandidózy způsobované převážně *C. albicans*. Doposud byly popsány struktury a funkce dvou hlavních signálních molekul účastnících se systému QS u *C. albicans*, a to farnesolu a tyrosolu. Vzhledem k tomu, že se rezistence mikroorganismů k antibiotikům a dezinfekčním látkám stává stále aktuálnější, je zapotřebí podrobnějšího popisu struktury, funkcí a metabolických drah dalších molekul účastnících se systému QS u kvasinek.

Klíčová slova: *Candida albicans*, quorum sensing, farnesol, tyrosol, vulvo-vaginální kandidóza

Summary

Paldrychová M.: Quorum sensing in *Candida albicans*

A large number of opportunistic pathogenic bacteria uses quorum sensing (QS) during the beginning of infection process. Signaling molecules (gram-negative bacteria used N-acyl-homoserine lactones) control the behavior of the whole population of bacteria (especially virulence factors expression). Due to the study of QS systems of gram-negative bacteria, compounds which have the ability to interfere with these systems have been described and they represent new treatment strategy. The same approach could be used in the case of yeast, wherein the identification of QS molecules and their mechanism of action could lead to developing much more effective treatment of yeast infections, e.g. vulvo-vaginal candidosis, which is caused mainly by *C. albicans*. Until now, the structure and function of two main signaling molecules (farnesol and tyrosol) in the *C. albicans* QS system were described. Since the resistance of microorganisms to antibiotics and disinfectants becomes more current, detailed description of the structures, functions and the metabolic pathways involved in QS system in yeast is required.

Keywords: *Candida albicans*, quorum sensing, farnesol, tyrosol, vulvo-vaginal candidosis

METABOLOMIC MONITORING OF PROCESSES IN THE IMMATURE BRAIN

Grygoriy Tsenov^a, Katerina Vondrakova^{b,c}, Paolo Francesco Fabene^a, Petr Kacer^d

^aDepartment of Neurosciences, Biomedicine and Movement, School of Medicine, University of Verona, Italy,

^bDepartment of Physiology, Faculty of Sciences of Charles University, Prague, Czech Republic, ^cDepartment of Developmental Epileptology, Institute of Physiology Academy of Sciences, v. v. i., Prague, Czech Republic, ^dInstitute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic; Petr.Kacer@vscht.cz

Introduction

It is well known that rodent neonates undergo many important developmental changes before and after birth, which resemble those observable in humans¹. Namely perinatal period is a critical and vulnerable phase of life. In early developmental stages many maturational processes on molecular, cellular and organ level take place. Although many years of research were dedicated to this topic, the clarification of numerous mechanisms and their roles in later development is still lacking.

In particular, brain undergoes many developmental changes after birth², e.g. cellular reorganisation, functional and structural changes of neurotransmitter system, maturation of immune system, vascularisation or myelination, etc. Moreover, these processes are highly important for normal functionality and even small influences can lead to life-changing consequences. Immature brain is characterized by higher plasticity, nevertheless is very sensitive to little disruption of inner environment (e.g. ion or neurotransmitter disbalance) or outer influences³. It was found that preconditions for several diseases become established during or shortly after birth^{4,5}. It is therefore important to examine mechanisms and background of processes associated with such pathologies that related to early development. Likewise, we need to identify in time any pathological deviation in ongoing dynamic changes in brain biochemistry and metabolism.

Hence, advanced techniques are mandatory to bring a new light into secrets of immature brain working and its pathologies. The lack of information regarding brain maturation processes is the principal limit to the development of effective treatment in many infant diseases.

Discussion

Microdialysis, in combination with sample analysis by HPLC-MS, does represent a suitable method for studying of sequential or real-time changes in tissue biochemistry. This new methods can broaden our opportunities and knowledge in studies of physiology and pathophysiology of developing brain.

This method is based on permeation of small organic and anorganic substances through semipermeable membrane according to their concentration gradient. Collected sample needed to be subsequently analyzed. Choice of the analytic method and analytic assay depend on our requirements, however might be limited by available technologies. Nowadays, almost all endogenous compounds can be measured.

Among others, capillary electrophoresis, ELISA or quantitative liquid chromatography in combination with mass spectrometry could be used as analytical method. However, HPLC/MS seemed to be the best option with the most possible options of the analysable metabolites in immature brain^{6,7}. The analytical technique of high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detector is due to the concentration levels in which the substances in the analyzed matrices present an ideal tool for the accurate, sensitive and rapid determination. Performed derivatization of analytes of the interest improves chromatographic separation and reduces the value of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The high selectivity of mass spectrometers in combination with low-detection limits, as well as their compatibility with separation techniques and their ability to deliver quantitative data makes mass spectrometry an ideal tool for metabolomic applications. So far, several excellent scientific contributions have been published demonstrating the enormous power of mass spectrometry applied to metabolomics⁸.

Different dynamic of metabolism, water content, underdeveloped tissue vascularisation and innervation and other immature vs adult brain differences should be taken into account when to determine the parameters of sampling and analysis. Way of sampling and choice of suitable analytic method should be tailor-made to age and developmental stage of the patient or animal. Microdialysis has many potential uses, from monitoring of *in vivo* physiological tissue biochemistry, changes of metabolites during various pathologies, tumor oncology to pharmacokinetics, monitoring of drug delivery, etc.

Clinical trials with microdialysis on adults gradually expand. It is widely used on patients in neurointensive cares^{9,10}. The combination with other technique, as Doppler flowmetry, PET or EEG allows to multimodal monitoring of the patient. There are several clinical trials with microdialysis in neonates, but almost all are based on inserting microdialysis probe subcutaneously or intraperitoneally¹¹. However, data about non gastric diseases can be obtained mainly from statistical mapping of patients. From ethical point of view clinical trials of diseases in neonates are hardly realisable. Current knowledge of tissue biochemistry (basal levels of several essential compounds) in immature brain is from tissues sampled postmortem or by biopsies which do not fully respond to physiological conditions in tissue. Thus, animal models represent a great opportunity for the study of immature brain physiology and pathologies.

In neurobiology is used in behavioural studies, studies of neurological disorders (Alzheimer's, Huntington's or Parkinson's disease, brain trauma, epilepsy, ischemia, spinal cord injury), studies of neuropsychiatric diseases (depression, schizophrenia), pain research, studies of BBB (disruption and transport through the barrier) and many others¹². This innovative and less invasive technique has a great advantage of possibility for measurements on living animal in anesthesia or freely moving.

Conclusion

Technological advances in microdialysis and in parallel with mass spectrometry have opened a new chapter in neurochemistry by introducing metabolomics as an approach to study metabolism and its regulation in relation to disease, genetic, and environmental factors. Since the metabolome is the most predictive of phenotype, metabolomics holds the promise to extensively contribute to the understanding of phenotypic changes as an organism's answer to disease, genetic changes, and nutritional, toxicological, environmental, and pharmacological influences. With regards to human health alone, multiple benefits of metabolomics investigations can be envisioned. It can deliver new tools to diagnose disease or monitor the success of nutritional and pharmacological interventions, for example, by using an unbiased metabolic fingerprinting approach. Based on research studies, metabolomics can provide new biomarkers to assess human health, and over time a powerful list of diagnostic markers will evolve, which can be measured using high-throughput assays. However, in order to proceed from the single biomarker concept to the global metabolome evaluation outside a research environment, the technology has yet to be

developed to provide the clinician with the tools to assess entire wide classes of metabolites in biofluids and automatically process the data to evaluate the biochemical status of an individual.

From our point of view the already-mentioned combination of both methods (MD and HPLC/MS) have unique possibility for the monitoring of tissue biochemistry and metabolomic mapping in immature brain in almost real-time condition. Using MD and following HPLC/MS analysis we successfully mapped levels of amino acids and other low molecular weight molecules in discrete regions of immature brain⁶. Moreover, due to high sensitivity of HPLC/MS method can be applied for determination of D and L stereoisomers of amino acids⁷, which are important not only for a normal brain development but also play a role in some pathologies^{13,14}. A potential of proposed method can found a place in clinical practice and for biomarkers monitoring of various CNS diseases. For example, we proved efficiency of both techniques in the study of neurochemical correlates of focal cerebral ischemia development and ischemia outcome in immature brain¹⁵.

However the potential of this methodology is not fully explored, we believe that it might be extremely effective in the drug delivery to the discrete regions (reverse microdialysis), that can help in a selective and considerate treatment. In addition, this methodology might serve as a great base for the development of age and condition specific "fast-detection" kits/chips, etc.

Acknowledgments

This work was carried out within the framework of the National Programme of Sustainability NPU I LO1215, MSMT – 34870/2013 and Charles University Grant Agency (165115).

References

1. Semple BD, Blomgren K, et al.: *Prog. Neurobiol.* 106-107, 1 (2013).
2. Himwich WA: *Develop. Neurobiol.* Springfield, Illinois, USA Charles C Thomas Publisher (1970).
3. Jablonski SA, Williams MT, Vorhees CV: *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 29, 183 (2016).
4. Cannon M, Murray RM: *Arch., DiS. Child.* 78, 1 (1998).
5. Rakhade SN, Jensen FE: *Nat. Rev. Neurol.* 5, 380 (2009).
6. Vondrakova K, Uttl L, Kubova H, et al.: *Chem. Lett.* (under review) (2016a).
7. Vondrakova K, Mikoska M, Syslova K, et al.: *J. Chromatogr. A* (under review) (2016 b).
8. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD: *Mass Spectrom. Rev.* 26, 51 (2007).
9. Müller M: *BMJ* 324, 588 (2002).
10. Ungerstedt U, Rostami E: *Curr. Pharm. Des.* 10, 2145 (2004).
11. Baumeister FA, Rolinski B, Busch R, et al.: *Pediatrics* 108, 1187 (2001).
12. Erdo F: *Clin. Exp. Pharmacol.* 5, 1 (2015).
13. Lewerenz J, Maher P: *Front. Neurosci.* 9(469), 1 (2015).
14. Paul P, de Belleruche J: *Front. Synaptic. Neurosci.* 6(10), 1 (2014).
15. Vondrakova K, Mikoska M, Syslova K, et. al.: The role of ET receptors in neurochemical changes during focal cerebral ischemia induced by intrahippocampal infusion of the ET-1 in immature rats. *Submitted*.

Summary

Tsenov G., Vondrakova K., Fabene P. F., Kacer P.: Metabolomic monitoring of processes in the immature brain

In early developmental stages of brain, many maturational processes on molecular, cellular and organ level take place. Although many years of research were dedicated to this topic, the clarification of numerous mechanisms and their roles in later development is still lacking.

Combination of microdialysis (MD) and high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry (HPLC/MS) represents a unique possibility for the monitoring of tissue biochemistry and metabolomic mapping in immature brain in almost real-time condition. Hence, it has a great potential to broaden our knowledge in physiology and pathophysiology of immature brain and can help to develop effective treatment of many infant diseases.

Keywords: Microdialysis, HPLC-MS, Immature Brain, Metabolomics

Souhrn

Tsenov G., Vondráková K., Fabene P. F., Kačer P.: Metabolomické monitorování procesů v nezralém mozku

Během vývoje mozku dochází v průběhu dospívání k mnoha významným změnám na úrovni molekulární, buněčné i orgánové. Přestože výzkum v této oblasti probíhá již řadu desetiletí, nejsou zcela objasněné některé mechanismy a probíhající vývojové změny. Mikrodialýza (MD) v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) umožňuje monitorování tkáňové biochemie, t.j. metabolomické mapování, v nezralém mozku téměř v reálném čase. Úspěšná aplikace kombinace těchto dvou metod má vysoký a unikátní potenciál rozšířit znalosti v oblasti fyziologie a patofyziologie nezralého mozku a dokonce pomoci vyvinout účinnou léčbu mnoha dětských nemocí.

Klíčová slova: mikrodialýza, HPLC-MS, nezralý mozek, metabolomika

O B S A H

Úvodem	33
Holecová M.: Zpráva ze 17. Evropského biotechnologického kongresu v Krakově	34
Informace o společnosti CONTIPRO	36
Pozvánka na přednášky	37
Biotech 2017	38
Boroň J., Novotný P., Kačer P.: Microarrays versus nová generace sekvenování, souboj Davida s Goliášem?	39
Eisenreichová A., Bouřa E.: Lipid kinasa PI4KB a 14-3-3 proteiny	43
Čapek J.: Metagenom jako zdroj nových genů	48
Gharwalová L.: Metody určení celkové antioxidační aktivity	54
Paldrychová M.: Quorum sensing systém kvasinky <i>Candida albicans</i>	57
Tsenov G., Vondráková K., Fabene P. F., Kačer P.: Metabolomické monitorování procesů v nezralém mozku	61

C O N T E N T S

Editorial	33
Holecová M.: The report from the 17th Congress of the European Biotechnology in Krakow	34
Information about the company CONTIPRO	36
Invitation to the lectures	37
Biotech 2017	38
Boron J., Novotný P., Kačer P.: Microarrays versus Next Generation Sequencing, David and Goliath battle?	39
Eisenreichová A., Bouřa E.: Lipid kinase PI4KB and 14-3-3 proteins	43
Čapek J.: Metagenome as a source of novel genes	48
Gharwalová L.: Methods for determination of total antioxidant activity	54
Paldrychová M.: Quorum sensing in <i>Candida albicans</i>	57
Tsenov G., Vondraková K., Fabene P. F., Kačer P.: Metabolomic monitoring of processes in the immature brain	61

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, Albertov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., 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.: Diploma Thesis, UCT Prague 2008.

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

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

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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

Novak Z.: Diploma Thesis, ICT Prague 2008.

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

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

BIOPROSPECT

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

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

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

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