
B I P R O S P E C T

Dvacátýdruhý ročník
Číslo 4/2012

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

**zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)**

a

**člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)**

Redakční rada

Ing. Petra Lipová, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Alena Čejková, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Milan Fránek, DrSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70, 621 32 Brno

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala
Teva, Ostravská 29, 747 70 Opava

Ing. Jan Kopečný, DrSc.
(Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.
(Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci)

Doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc.
(Ústav biochemie, PřF MU, Brno)

RNDr. Ivan Babůrek, CSc.
(Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.
(Katedra biochemie PřF UK, Praha)

Doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.
(Endokrinologický ústav, Praha)

BIOPROSPECT

22th Volume
No. 4/2012

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: COMB CZTPP

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the 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 and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology.

The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive 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 cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

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

For more information contact the editorial board or directly:

Petra Lipovová, PhD. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 443 028

e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

jak dobře víte, ve IV. čtvrtletí proběhly volby do Rady Biotechnologické společnosti a její revizní komise. Na základě našich nových stanov volby probíhaly poprvé korespondenčním způsobem. Členové, kteří se voleb zúčastnili, zvolili Radu i revizní komisi ve složení tak jak byly navrženy. Stručná zpráva volební komise o průběhu voleb je dále uvedena.

Rádi bychom vám sdělili, že vyšlo i tiskem (dříve přístupné on line na webu www.sciencedirect.com od 25. 4. 2012) zvláštní číslo biotechnologického časopisu „Biotechnology Advances“ (Volume 31, Issue 1, January/February 2013), kde jsou publikovány vybrané práce přednesené na našich symposiích BIOTECH 2011 konaných v Praze a Olomouci.

Jak jsme Vás již informovali, v r. 2013 proběhne v Olomouci konference Plant Biotechnology: Green for Good II (17. – 21. 6. 2013). Webová stránka <http://www.cr-hana.eu/G4G2> Vám poskytne další potřebné informace. Datum a program našeho pravidelného semináře „Novinky v oblasti genetických modifikací“ Vám přineseme v prvním čísle Bioprospectu 2013. Pro Vaši informaci dále uvádíme, že

členové naší společnosti se podílejí i na přípravě a aktivní účasti na „World Biotechnology Congress“, který se bude konat v americkém Bostonu ve dnech 3. – 6. 6. 2013 (www.worldbiotechcongress.com). Přípravný výbor začal připravovat symposium BIOTECH Prague 2014 a s ním spojené 7. Česko-švýcarské symposium, které se uskuteční opět v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích ve dnech 11. – 14. 6. 2014. Webová stránka s podrobnými informacemi (www.biotech2014.cz) bude zpřístupněna v prvním čtvrtletí.

Věříme, že Vás opět zaujmou naše stručné informace v rubrice „Víte, že.“ i články, které jsme pro Vás vybrali. Těšíme se na Vaše další příspěvky.

Rádi bychom Vám také popřáli pevné zdraví, spokojenost, štěstí a mnoho úspěchů osobních i pracovních v průběhu celého roku 2013.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

VOLBY DO RADY A REVIZNÍ KOMISE BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

Během listopadu letošního roku proběhly volby do Rady a Revizní komise Biotechnologické společnosti. Členové naší společnosti tentokrát poprvé na základě změn stanov mohli vyjádřit svůj názor korespondenční formou, písemně nebo prostřednictvím e-mailu. Kandidátka byla sestavena na základě návrhů došlých od členů společnosti tak, aby zastoupení jednotlivých kandidátů respektovalo co nejširší odborný záběr se snahou o zahrnutí našich významných institucionálních členů.

Volební komise, která se ujala sčítání došlých hlasů, pracovala ve složení:

Doc. Ing. Vladimír Sýkora, CSc. – předseda

Dr. Ing. Pavla Šmejkalová

Ing. Olga Schreiberová, Ph.D.

Na základě sečtení došlých hlasovacích lístků volební komise potvrdila zvolení všech navržených kandidátů.

VÍTE, ŽE...

- **v r. 2013 si připomínáme následující výročí:** před 60 lety Watson & Crick objevili strukturu DNA, před 30 lety byla objevena PCR (polymerasová řetězová reakce) a před 10 lety byl dovršen projekt lidského genomu.
- Novartis oznámil, že získal **souhlas k výrobě vakcíny proti sezonní chřipce** v buněčné kultuře. Vakcína pod názvem *Flucelvax*, je určena pro jedince od 18 let. Technologie přípravy vakcín v buněčných kulturách byla již dříve použita v řadě případů, ale pro přípravu vakcíny proti sezonní chřipce byla poprvé schválena k použití v USA. Hovoří se o tom, že se tato moderní technologie přípravy vakcíny proti chřipce stane standardní aplikací. (<http://www.biopharmainternational.com>, 5.12.2012)
- **Pití 3-4 šálků kávy denně** údajně může podle „Institute for Science Information on Coffee (ISIC) snížit riziko onemocnění diabetem 2. typu o 25 %“. (Podle „Food Engineering & Ingredients, December 2012“).
- Podle finských vědců může **strava bohatá na rajčata** (stejně tak jako ostatní zeleniny a ovoce bohaté na obsah lycopenu) snížit riziko infarktu. Tito vědci doporučují neméně pět (!!!) porcí ovoce či zeleniny denně (Podle „Food Engineering & Ingredients, December 2012“).
- Dosud nevyužívaný **akáciový olej** je údajně, z hlediska zdravotního, lepší alternativou než olej řepkový či slunečnicový. Obsahuje karotenoidy, tokoferoly, steroly a další nutričně významné minoritní složky. Z 1350 dostupných druhů akáciových semen byly analyzovány čtyři z tuniské provenience (Lipids in Health and Disease 2012, 11,49, doi:10.1186/1476-511X-11-49)
- Byl vyvinut cenově dostupný **biosenzor, který deteguje glukosu ve slinách, slzách a moči (v koncentraci až 0,3 μmol/l)** Je založen na grafenových nanovrstvách a glukosaoxidase vázané na platinových nanočásticích. (LabMedica International, November 2012, www.purdue.edu)
- Ukazuje se, že **existuje vazba mezi diabetem a rozvojem Alzheimerovy choroby**. Diabetes typu 1 přispívá k tvorbě beta amyloidu a tak způsobuje rychlejší stárnutí mozku (Salk Institute)
- Quorum sensing je známý jev ukazující, že **bakterie mohou** mezi sebou komunikovat pomocí molekul, které produkují. Vědci na universitě ve švédském Linköpingu předpokládají, že bakterie mohou podobným způsobem **kontrolovat procesy probíhající v lidských buňkách** (Elena Vikström, Linköping University)
- Byla identifikována **nová signální molekula**, a to **kyselina thidusitá (HSNO)**, která spojuje efekt NO a H₂S. Ovlivňuje regulaci nervových a srdečních signálů. (J.Am.Chem. Soc., DOI: 10.1021/ja3009693)
- **Znečištění ovzduší dopravou může být u těhotných žen jedním z rizikových faktorů vzniku autismu** u novorozenců (Los Angeles Daily News, November 26, 2012, <http://seattletimes.com>)
- **Evropská komise klasifikuje biomarkery do 4 skupin: diagnostický biomarker** (potvrzuje specifickou nemoc co nejdříve je to možné, např. HCV RNA po infekci), **biomarker rizika** (risk biomarker – kvantifikuje riziko vyvíjející se nemoci, např. beta amyloid pro Alzheimerovu chorobu či BRCA1 pro rakovinu plic), **prognostický biomarker** (naznačuje vývoj choroby: pomalý nebo rychlý, např. HER2 pro rakovinu plic), **předpovědní biomarker** (predictive biomarker – ukazuje, jaká bude reakce nebo toxicita vybrané léčby)
- Vědci z univerzity ve švédském Lundu ukázali, že u lidí majících v krvi zvýšenou koncentraci proteinu označovaného SFRP4 se v několika letech pravděpodobně vyvine diabetes. Uvedený protein omezuje sekreci inzulinu (Lund University Diabetes Centre)

NANOBIOTECHNOLOGIE

Tereza Krajčiová

tkrajciova@gmail.com

Úvod

Nanobiotechnologie je věda, která aplikuje nanotechnologie do oblasti biosystému a biologických metod, používá částice do velikosti 100 nm.^{1,2} Tento článek přináší přehled používaných nanomateriálů a jejich použití jak v medicíně, tak i jiných oborech.

Nanomateriály

Nanočástice zlata

Vyrábí se redukcí jednoduchých solí zlata. Využívají se ke značení nukleových kyselin, proteinů³ a částí buněk⁴. Navázáním protilátky anti-VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) na částice zlata dochází k indukci apoptózy B-lymfocytů u chronické lymfoidní leukémie.⁵

Nanočástice stříbra

Redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ se získají částice o velikosti 25 nm, které mají vysokou antimikrobiální aktivitu, ale nízkou toxicitu pro vyšší organismy.^{3,6} Uplatnění nanočástice stříbra je v povrchové úpravě lékařských nástrojů či impregnaci tkanin, fasádních omítek, kde zabraňuje šíření plísní.³ Pokud se nanočástice stříbra naváží na uhlíkaté materiály, mohou být použity k desinfekci vod.⁶

Kvantové tečky

Můžeme si je představit jako klastry několik set až tisíců atomů polovodičových materiálů, částice je tvořena jádrem, obalem jádra (polovodičový materiál) a povlakem z polymeru (pro lepší připojování biomolekul). Kvantové tečky jsou velmi stabilní fluorofory a díky tomu je jejich využití v zobrazovacích metodách (např. detekce rakoviny prsu markerem Her2) a k detekci abnormalit a mutací na chromozomech při *in situ* hybridizaci.^{1,3}

C_{60} fulleren

Je třetí modifikací uhlíku. Běžně je nevodivý, ale uzavřením alkalického kovu do své struktury se stává vodivým a celkově se tak změní vlastnosti uhlíku C_{60} . Mohou se změnit až do té míry, že se stanou odolné vůči metabolickým pochodům a mohou se využít pro zobrazování *in vivo*.³

Uhlíkové nanotrubic

Jedná se o čtvrtou allotropickou modifikaci uhlíku. Existují jednostěnné (single-wall carbon nanotube, SWCNT), dvojitěnné (DWCNT) a mnohostěnné uhlíkové nanotrubic (MWCNT). Polovodičové jednostěnné nanotrubic se využívají k detekci změn chemického složení atmosféry.³

Magnetické nanočástice

Používají se oxidy železa (magnetit, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), mající superparamagnetické vlastnosti. Jejich využití je jako kontrastní látka při *in vivo* zobrazování u NMR.³

Nanočástice hydroxyapatitu

Hydroxyapatit se běžně vyskytuje v kostech a zubech. Je tudíž biokompatibilní a jeho použití je v povlakování implantátů, kdy stimuluje růst kosti na rozhraní nanočástic hydroxyapatitu a kosti.^{3,4}

Dendrimery

Jsou synteticky připravené kulovité molekuly s přesně definovanou chemickou strukturou. Dendrimery se skládají z jádra, větví a koncových skupin. Kvůli své velikosti (lehce prochází stěnou cév a buněčnou membránou) a velkému množství dutin (kam se může uzavřít léčivá složka) se výborně hodí pro dopravování léků na místo určení.^{1,3}

Polyethylenglykol (PEG)

Není toxický a je biokompatibilní (používá se v kosmetických přípravcích, mýdlech a lécích). Etherický kyslík PEG je schopen se vázat na vodu a činit tak PEG rozpustným ve vodných roztocích. PEG se stává hydrofilním a tento charakter se využívá ve fyziologických systémech. Pokud je vázán na povrchu, tak snižuje adsorpci proteinů a adhezi buněk – tato vlastnost se využívá k úpravě povrchů v biomedicínských aplikacích *in vivo* i *in vitro*.³

Nanoporézní materiály

Mohou být vyrobeny z uhlíku, křemíku a minerálů. Mají póry menší než 100 nm. Hlavní výhodou nanoporézních materiálů je jejich velký povrch, díky němu jsou zlepšené katalytické a absorpční vlastnosti. Kupříkladu nanomateriály z křemíku mohou být využity jako součást implantátů, které se samovolně rozpadají.^{3,7,8,9}

Polymerní nanovlákn

Vyrábí se elektrospinningem, což je metoda, kdy se kapka polymerního roztoku rozbije elektrostatickou silou na tenká vlákna, která se zachycují na substrátu. Hojně se používá v lékařství jako obvazový a krycí materiál.³

Hedvábí

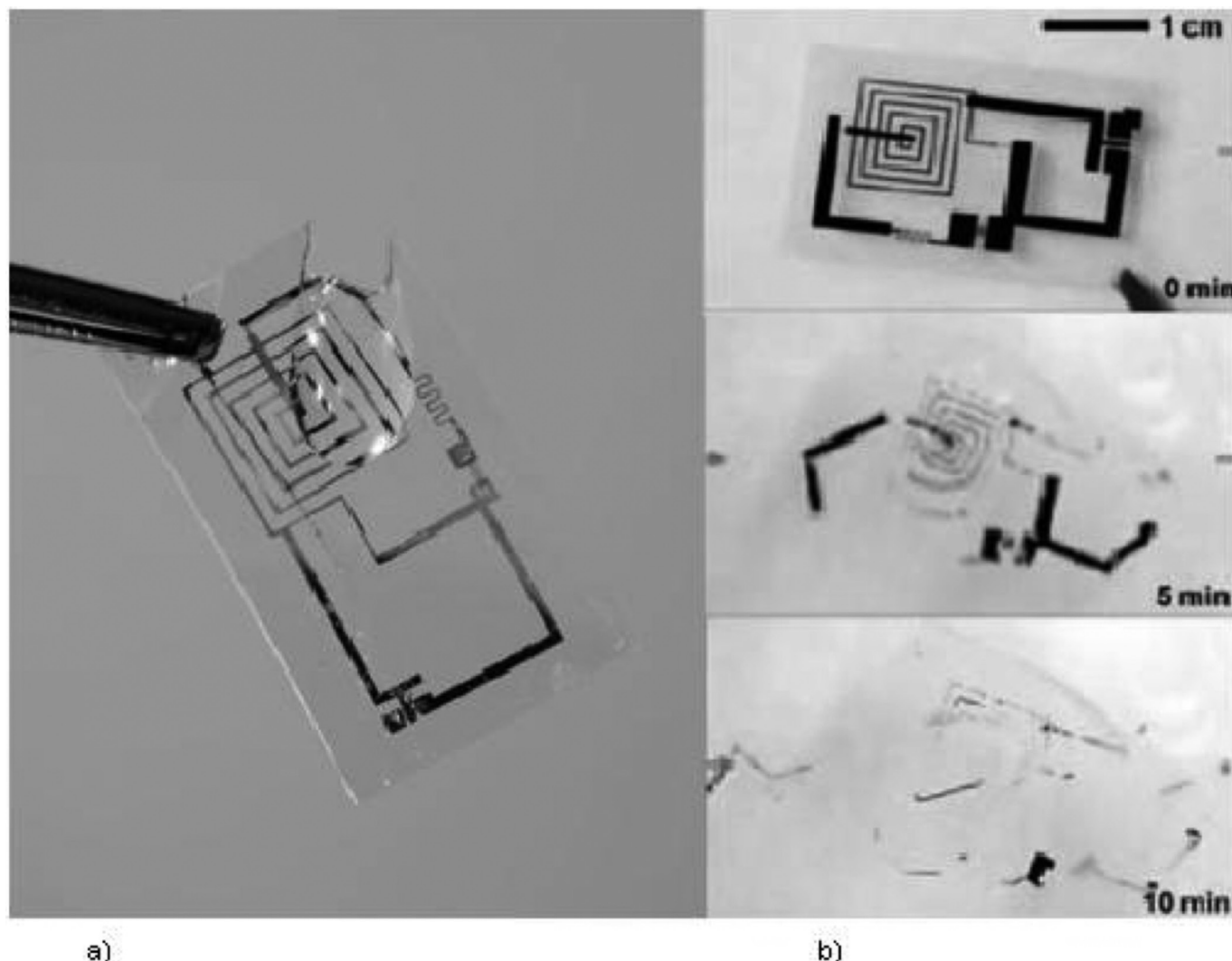
Je biokompatibilní a v poslední době se uplatňuje jako obalový materiál nanovrstev, např. spolu s křemičitými látkami u lékařských implantátů.⁷

Nanočástice oxidu křemičitého

Částice mají velký povrch díky kulovitému povrchu, chovají se hydrofilně, a proto se s nimi lépe manipuluje. Při deponaci na barevnou organickou sloučeninu se stávají nanočástice SiO_2 fotostabilními a velmi fluorescentními, proto se dají použít pro detekci DNA. Jejich další využití je v detekci patogenních mikroorganismů *in situ* ve vzorcích vody (SiO_2

nanočástice jsou konjugovány fluorescentním barvivem a na jejich povrchu jsou zachyceny protilátky proti bakteriálním antigenům).³ Významným objevem poslední doby je použití SiO_2 nanočástic v tzv. přechodné elektronice (transient electronics). Jedná se o elektrické obvody vyrobené z hořčíku (Obr.1a), tento obvod je kvůli vodivosti pokrytý křemičitou vrstvou a převrstven hedvábím, které je biokompatibilní, ve vodě rozpustné

a enzymaticky odbouratelné. Bezdrátovým signálem dojde k sepnutí obvodu a na rezistoru dojde k přeměně elektrické energie na tepelnou, což je podstatou tohoto zařízení. Teplem se totiž zničí bakterie, které by mohly být příčinou pooperačních komplikací po chirurgických zákrocích. Po zahojení rány se implantát sám rozloží (Obr.1b).^{7,8,9}



Obr.1: a) elektrický obvod z hořčíku, b) rozklad implantátu ve vodném prostředí¹⁰

Závěr

Využití nanobiotechnologií by mohlo najít široké uplatnění hlavně v medicíně. Je ale velkým otazníkem

nežádoucí reakce imunitního systému člověka, který reaguje na přítomnost nanočástic tak, že vyvolá zánětlivou reakci.

Literatura:

1. Fakruddin MD, Hossain Z, Afroz HJ Nanobiotechnol. 10, 31 (2012).
2. Roco MC Curr. Opin. Biotechnol. 14, 337 (2003).
3. Nanotechnologie: <http://www.nanotechnologie.cz/view.php?cislocclanku=2007080009>, staženo 14. listopadu 2012.
4. Salata OV J. Nanobiotechnol. 2, 3 (2004).
5. Soloviev M J. Nanobiotechnol. 5, 11 (2007).
6. Prucek R., Kvítek L., et al. Chem. Listy 536 (2012).
7. New Scientist: <http://www.newscientist.com/article/dn22314-silk-holds-the-key-to-devices-that-dissolve-after-use.html>, staženo 4.října 2012.
8. Chemical and Engineering News: <http://cen.acs.org/articles/90/i40/Implantable-Silicon-Devices-Designed-Disappear.html>, staženo 4.října 2012.
9. Hwang S.-W. et. al.: Science, 337:1640-1644 (2012).
10. <http://pharmakon.me/2012/10/01/transient-silicon-electronics-medical-implants-that-disappear/>, staženo 11.prosince 2012.

Souhrn

Krajčiová T.: Nanobiotechnologie

Nanotechnologie jako věda je v současnosti na vzestupu a to hlavně její podobor nanobiotechnologie, který využívá širokou škálu nanomateriálů aplikujících do biologického světa. Dostupné nanomateriály nachází využití v medicíně, kosmetice, ale i potravinářství. Významným objevem nanobiotechnologií je použití tepelného zařízení k prevenci pooperačních komplikací hojící se rány po chirurgickém zákroku.

Klíčová slova: nanomateriály, nanočástice, nanobiotechnologie, lékařské implantáty

Summary

Krajčiová T.: Nanobiotechnology

Nanotechnology is a scientific branch currently on the rise. Especially its subdiscipline nanobiotechnology, which is characterised by application of a great number of nanomaterials in biology, is seen as a fast developing field. Available materials are used in medicine, cosmetics and food industry. A significant discovery in nanobiotechnology is a usage of thermal devices for prevention of postoperative complications of wound healing after surgery.

Keywords: nanomaterials, nanoparticles, nanobiotechnology, implantable medical device

STANOVENÍ PROTEINŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE V LIDSKÉ PLASMĚ V NÍZKÉ KONCENTRACI

Denisa Mihalová

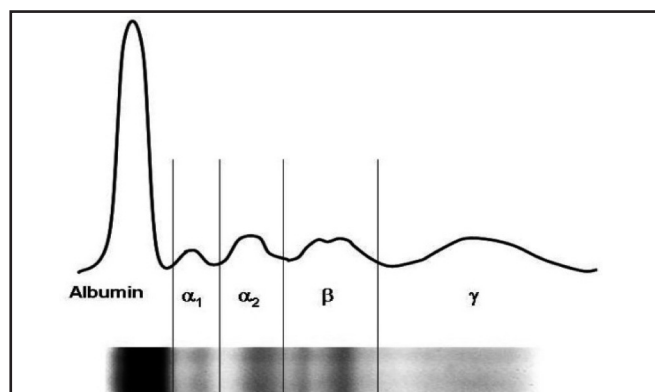
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, mihalovd@vscht.cz

Krevní plasma obsahuje poměrně velké množství proteinů, z nichž většinu tvoří samotný albumin. Ostatní proteiny se vyskytují jen ve velmi malých množstvích a označují se jako stopové proteiny. Biosyntéza většiny plasmatických bílkovin probíhá v játrech, menší část je syntetizována na jiných místech, např. v enterocytech nebo retikuloendoteliálním systému, především v plasmatických buňkách. Odbourávání probíhá v hepatocytech a mononukleárním fagocytárním systému, kde jsou degradovány především bílkoviny vytvářející komplexy (např. komplex haptoglobin-hemoglobin)^{1,2,3,4}.

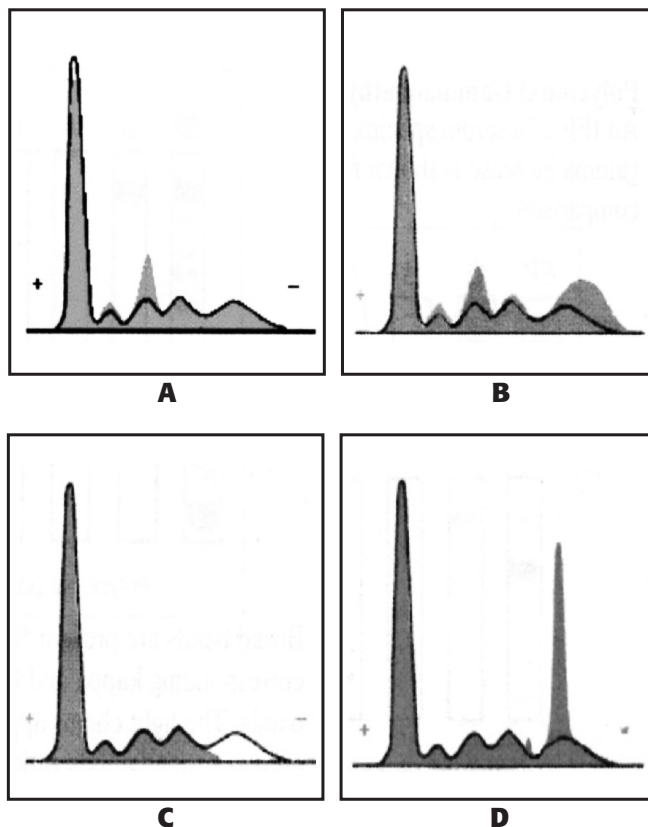
Funkce plasmatických proteinů jsou velmi rozmanité. Zajišťují transport nejrůznějších látek, podílí se na udržování acidobazické rovnováhy a koloidně osmotického tlaku, podporují hemokoagulaci nebo fibrinolýzu a v neposlední řadě jsou také důležité pro obranné reakce organismu³.

Charakterizace plasmatických proteinů

K charakterizaci plasmatických bílkovin se nejčastěji používá elektroforesa na různých nosičích (papír, škrobový gel, acetát-celulosa, folie, agarosový gel). Obarvením proteinovými barvivy a densitometrickým vyhodnocením získáme křivky znázorněné na Obrázku 1³.



Obr. 1: Elektroforeogram lidského séra. Spodní část obrázku představuje obarvený elektroforeogram, horní část ukazuje jeho densitometrické vyhodnocení.



Obr. 2: Elektroforesa plasmatických bílkovin za patologických stavů. A – akutní zánět (zvýšená syntéza reaktantů akutní fáze, a to α_1 -globulinů a α_2 -globulinů), B – chronický zánět (zvýšená syntéza imunoglobulinů zprostředkovaná B buňkami), C – hypogamaglobulinémie (snížená syntéza imunoglobulinů), D – monoklonální gamapatie (zvýšená hladina imunoglobulinů v důsledku výskytu mnohočetného myelomu).

Na základě těchto křivek je možné vypočítat relativní množství proteinů. Na základě elektroforetického dělení můžeme plasmatické proteiny rozdělit na 5 – 6 frakcí: albuminovou, frakce α_1 -globulinů, α_2 -globulinů, β a μ globulinů. Někdy se podaří rozlišit i frakce β_1 a β_2 globulinů. Jednotlivé frakce jsou tvořeny skupinou bílkovin, které mají podobnou elektroforetickou

pohyblivost. Výjimku tvoří první frakce, která představuje samotný albumin. Referenční hodnoty jednotlivých frakcí shrnuje Tabulka I³.

Tab. I: Referenční hodnoty jednotlivých elektroforetických frakcí.

Frakce	Zastoupení [%]	Koncentrace [g/l]
Albuminy	52 – 58	35 – 44
α_1 -globuliny	2,4 – 4,4	1 – 3
α_2 -globuliny	6,1 – 10,1	5 – 8
β globuliny	8,5 – 14,5	4 – 10
μ globuliny	10 – 21	5 – 12

Patologické stavy pozorované při vyhodnocení elektroforegramu

Elektroforesa plasmatických proteinů poskytuje nejen podrobné informace týkající se zastoupení jednotlivých proteinů, ale umožňuje také prokázat proteinémii, dysproteinémii a poukázat tak na různé patologické stavy. Přehled některých patologických stavů je zobrazen na následujícím obrázku².

α_1 -GLOBULINY

α_1 -kyselý glykoprotein (orosomukoid)

α_1 -kyselý glykoprotein je plasmatický protein s relativně nízkou molekulovou hmotností (41 kDa) a s vysokým obsahem sacharidů ve své struktuře (kolem 40 %). Cukerná složka má výrazný vliv na dobrou rozpustnost orosomukoidu, a také přispívá k mimořádné tepelné stabilitě této bílkoviny. V krevní plasmě se vyskytuje v koncentraci 0,6 – 1,2 mg/ml. Jedná se o citlivý reaktant akutní fáze, jehož koncentrace se může zvýšit až 3 krát při akutních zánětech, některých infekčních onemocněních, nádorech nebo po větších chirurgických výkonech. Jeho fyziologická funkce není doposud známa. Podporuje však růst fibroblastů a interaguje s kolagenem. Společně s haptoglobinem slouží k detekci slabé in vivo hemolýzy. Stanovení α_1 -kyselého glykoproteinu se využívá k posouzení aktivity akutního a přetrvávajícího zánětu, jakož i tumorů s nekrotizací buněk^{1,2,3,4}.

α_1 -antitrypsin (AAT)

AAT je plasmatický protein tvořený jako produkt dvou kopií genu proteasového inhibitoru. Každá kopie odpovídá za polovinu tvorby AAT v organismu. Dojde-li k mutaci jednoho nebo obou genů, vzniká tento plasmatický protein v nedostatečné koncentraci nebo v dysfunkční formě. Jeho nedostatek může vést ke vzniku plicního emfyzému, dysfunkční forma vede k cirhóze jater, z důvodu ukládání AAT v játrech. Úplný nedostatek je příčinou transplantací jater u malých dětí. Jedná se o reaktant akutní fáze, jehož hladina bývá zvýšena při akutních zánětech, nádorech a hepatopatiích. Normální koncentrace v plasmě činí 0,9-2,0 g/l. α_1 -antitrypsin patří mezi bílkoviny s antiproteinasovým účinkem. Inaktivuje proteiny uvolněné z lysosomů při rozpadu buněk, především kolagenasu a elastasu^{1,2,3,4}.

α_1 -fetoprotein (AFP)

α_1 -fetoprotein je glykoprotein o molekulové hmotnosti 70 kDa, strukturně i funkčně podobný albuminu. Fyziologicky je produkován ve žloutkovém vaku, později fetálními játry. Ve druhém trimestru těhotenství zaujímá místo hlavního sérového proteinu, do narození je pak postupně nahrazován albuminem. Po narození se jeho obsah výrazně snižuje, od jednoho roku věku se u 95 % jedinců pohybuje pod referenční hodnotou 10 μ g/l. Jeho zvýšenou hladinu můžeme pozorovat u hematomů a nádorů varlat či vaječníků. Z tohoto důvodu je také využíván jako tumorový marker. Stanovení AFP, společně s $\text{cg}+\beta$ a dalšími parametry, je také přínosné pro odhad rizika trisomie 21. chromosomu (Downův syndrom) ve druhém trimestru těhotenství^{1,2,3}.

α_1 -mikroglobulin (α_1 -M)

α_1 -mikroglobulin je nízkomolekulární glykoprotein s molekulovou hmotností 30 kDa. V glomerulech je filtrován a z 99,8 % zpětně resorbován. Při selhání ledvin dochází ke zvýšení jeho koncentrace v plasmě už od časných stádií. Používá se jako marker při diagnostice tubulo-intestinální nefropatie. Mezi jeho vlastnosti patří inhibice migrace leukocytů a proliferativní odpověď leukocytů na antigen^{1,2,3}.

α_2 -GLOBULINY

Haptoglobin

Haptoglobin je glykoprotein, který řadíme mezi reaktanty akutní fáze. V krevní plasmě se vyskytuje v koncentraci 0,3 – 2,0 g/l. Vychytává hemoglobin uvolněný z erytrocytů při zvýšené hemolýze a vytváří tak velmi pevný komplex Hp-Hb, který je vychytáván hepatocyty. Tento komplex má peroxidasový účinek. Haptoglobin tak zabraňuje ztrátám železa v organismu. Pokles hladiny haptoglobulinu v krvi indukuje intravaskulární hemolýzu^{1,2,3,4}.

Ceruloplasmin

Ceruloplasmin je modře zbarvený glykoprotein obsahující 8 atomů mědi na jednu molekulu. Jeho koncentrace v plasmě činí 0,2 – 0,6 g/l. Zajišťuje nejen transport mědi do tkání, ale také oxidaci železa (Fe^{3+} na Fe^{2+}), čímž zabraňuje vzniku volných hydroxylových radikálů. Při defektu tvorby ceruloplasminu dochází k ukládání mědi v játrech, což má za důsledek Wilsonovu chorobu. Ceruloplasmin řadíme mezi reaktanty akutní fáze, jeho hladina v plasmě narůstá při akutních a chronických zánětech a je doprovázena zeleno-modrým zbarvením séra^{1,2,3}.

α_2 -makroglobulin

α_2 -makroglobulin patří mezi plasmatické proteiny s vyšší molekulovou hmotností (820 kDa), který se v krevní plasmě vyskytuje v koncentraci 1,3 – 3,0 g/l. Díky vysoké molekulové hmotnosti neprojde ani poškozenou glomerulární membránou. Jedná se o reaktant akutní fáze, jehož koncentrace roste při akutních zánětech. Zajišťuje transport malých proteinů a slouží jako proteinasový inhibitor, zvláště jako inhibitor plasminu, trombinu a trypsinu^{1,2,3}.

β -GLOBULINY

Transferin (siderofilin)

Transferin řadíme mezi β_1 -globuliny, jeho koncentrace v plasmě činí 2,0 – 3,7 g/l. Zajišťuje vazbu a transport atomů železa. Váže se na transferinové receptory, do buněk je pak vstřebán díky endocytóze. Transferin řadíme mezi negativní reaktanty akutní fáze, tedy bílkoviny, jejichž koncentrace klesá při katabolických procesech. U sideropenické anémie se jeho koncentrace v plasmě absolutně zvyšuje, u hemosiderózy je naopak nižší. Slouží jako ukazatel stavu železa v organismu^{1,2}.

Fibrinogen

Fibrinogen je plasmatický protein z frakce β_2 -globulinů, jehož fyziologická koncentrace v plasmě se pohybuje v rozmezí 1,5 – 4,5 g/l. Je důležitým členem koagulační kaskády (koagulační faktor I), slouží jako prekurzor fibrinu. Ten vytváří nerozpustnou síť zabráňující vykrvácení. Jedná se o reaktant akutní fáze, jehož koncentrace narůstá při akutních zánětech^{1,2}.

C-reaktivní protein (CRP)

CRP patří mezi nejčastěji vyšetřované proteiny, jeho koncentrace v krevní plasmě se pohybuje mezi 1,5 – 5,0 mg/l. Řadíme ho do skupiny β_2 -globulinů. Svě jméno získal díky schopnosti vytvářet precipitát s tzv. C-polysacharidem pneumokoků. Jedná se o reaktant akutní fáze s nejrychlejší a nejvýraznější reakcí ze všech bílkovin akutní fáze. Jeho koncentrace stoupá při akutních bakteriálních infekcích, po operacích. Mírný vzestup CRP je patrný i u infarktu myokardu. Je užitečný také k monitorování autoimunních onemocnění (např. revmatoidní artritida)^{1,2,3}.

μ -GLOBULINY

Tato frakce sestává prakticky jen z imunoglobulinů. Mají specifickou schopnost vázat příslušný antigen, proti kterému byly vytvořeny. Mají další funkce patří vazba komplementu, vazba na neutrofilní leukocyty a makrofágy, aktivace fagocytózy. Na základě různé velikosti a obsahu sacharidů rozlišujeme pět tříd: IgG, IgA, IgD, IgE a IgM³.

IgM

Imunoglobuliny IgM tvoří 10 % všech protilátek v séru, přičemž jejich koncentrace činí 1 – 1,5 g/l. Mají pentamerní strukturu. Při zahájení specifické imunitní reakce se vytváří jako první. Mezi jejich funkce patří: aktivace komplementu, aglutinace a tvorba odpovědi na polysacharidové antigeny (ABO). Slouží k diagnostice akutních infekcí^{2,3}.

IgG

IgG tvoří 75 % všech protilátek v séru a jejich koncentrace se pohybuje okolo 7 – 16 g/l. Jako jediné procházejí fetoplacentární bariérou a chrání tak novorozence během prvních měsíců života. Po 6. Měsíci jejich hladina klesá. Zajišťují ozonizaci, aktivují komplement, zajišťují sekundární imunitní odpověď a neutralizují bakteriální toxiny. Jejich koncentrace roste při zánětech^{2,3}.

IgA

IgA patří mezi hlavní imunoglobuliny na sliznicích GIT, urogenitálního a respiračního traktu. Nachází se také v kolostru. Jejich koncentrace se pohybuje v rozmezí 1 – 2 g/l. Jejich hlavním úkolem je ochrana sliznic před bakteriemi a viry. Jejich hladina v krvi narůstá při chronických zánětech, cirhóze jater nebo při autoimunních chorobách^{2,3}.

IgD a IgE

Koncentrace imunoglobulinů IgD a IgE v krevní plasmě je poměrně nízká a jejich afinita k antigenům je velmi slabá. IgD se podílí na rozvoji senné rýmy a alergického astmatu, IgE odpovídají za reakce časné přecitlivělosti^{2,3}.

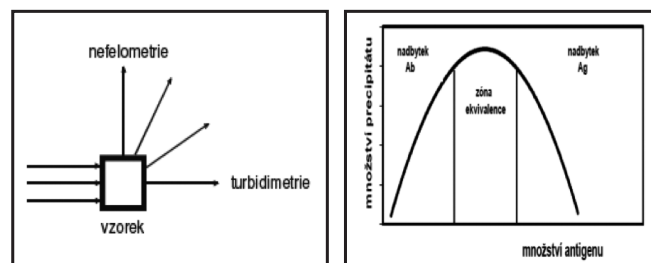
Stanovení plasmatických proteinů s nízkou koncentrací v lidské plasmě

Stanovení plasmatických bílkovin, které se v lidské plasmě vyskytují v nízké koncentraci, metodami chemie proteinů je poměrně obtížné. Proto je při stanovení využíváno jejich biologické aktivity chová se jako enzymy, hormony nebo složky koagulačního systému či systému komplementového. První místo mezi metodami vedoucími k jejich stanovení zaujímají imunochemické metody. Dále lze použít také metody hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS, MRM-MS).

Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie

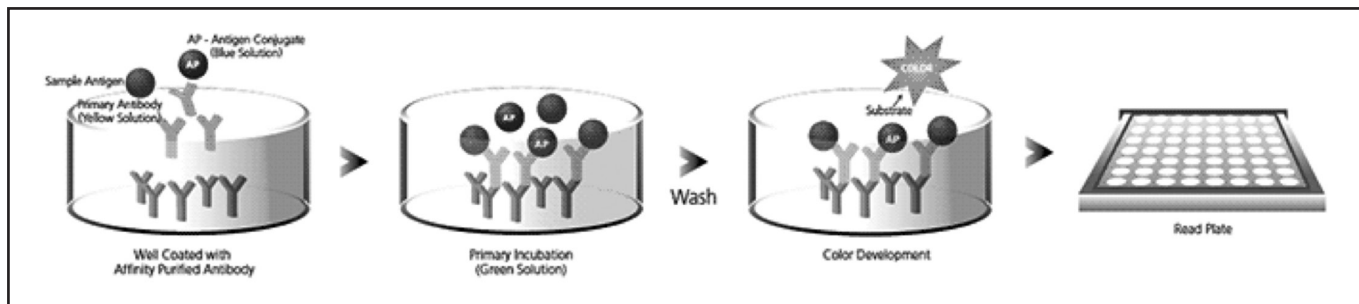
Imunoturbidimetrie je metoda založená na reakci plasmatického proteinu s monoklonální protilátkou za vzniku nerozpustného komplexu. Daný roztok se tedy zakalí. Měří se intenzita světla zeslabeného rozptylem. Množství zákalu je přímo úměrné změřené absorbanci, fotometrická citlivost je naopak nepřímo úměrná vlnové délce. Nejčastěji se měří při vlnové délce 340 nm. Tato metoda je rutinní, běžně používaná v klinické praxi. Mezi její hlavní výhody patří velká specifita, jednoduché a rychlé provedení, potřeba malého množství vzorku, dobrá cena. Nevýhodou této metody je nutnost před každým měřením zjistit optimální ředění Ab/Ag podle precipitační křivky^{2,5}.

Imunonefelometrie je založena na stejném principu, s tím rozdílem, že se měří intenzita světla rozptýleného pod určitým úhlem. Princip obou metod je znázorněn na Obr. 3⁵.



Obr. 3: Imunonefelometrie a imunoturbidimetrie⁵. Precipitační křivka v pravé části obrázku vyjadřuje, jaký poměru Ab/Ag vzniká precipitát.

Pomocí těchto metod můžeme stanovit např. orosomukoid, haptoglobin, transferin ceruloplasmin nebo C-reaktivní protein².



Obr. 4: Princip enzymové imunoanalýzy (EIA).

Radiální imunodifuze

Radiální imunodifuze je kvantitativní imuno-precipitační metoda. Plasmatický protein difunduje do agarosového gelu obsahujícího protilátku, přičemž průměr precipitačního kruhu je přímo úměrný koncentraci plasmatické bílkoviny. Tato metoda je však zdlouhavá a proto se od ní v poslední době upouští. Rozsah citlivosti metody je 3 – 100 mg/l. Je vhodná pro stanovení většiny plasmatických proteinů (imunoglobulinů IgA, IgG a IgM; transferinu, α_2 -makroglobulinu, ceruloplasminu)².

Enzymová imunoanalýza (EIA)

Enzymová imunoanalýza představuje citlivou imunochemickou metodu využívající enzymy na značení protilátky nebo antigenu. Plasmatický protein soutěží o vazebné místo na specifické protilátce s enzymaticky značeným plasmatickým proteinem. Schéma metody je zobrazeno na Obr. 4. Jedná se o metodu využívanou především ve výzkumu, existuje v heterogenním (ELISA) nebo homogenním provedení. Pomocí této metody můžeme stanovit např. transferin^{2,5}.

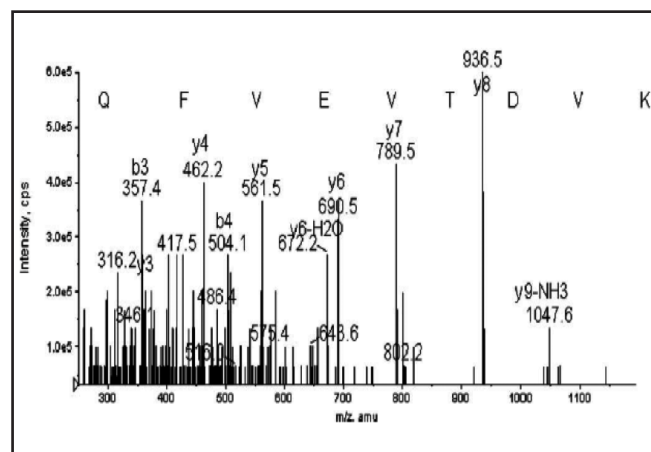
Další imunochemické metody

Kromě výše zmíněných imunochemických metod je možné použít pro stanovení proteinů krevní plasmy také bioluminiscenci, western-blot, radioimunoanalýzu (RIA) nebo latexovou aglutinaci².

Hmotnostní spektrometrie

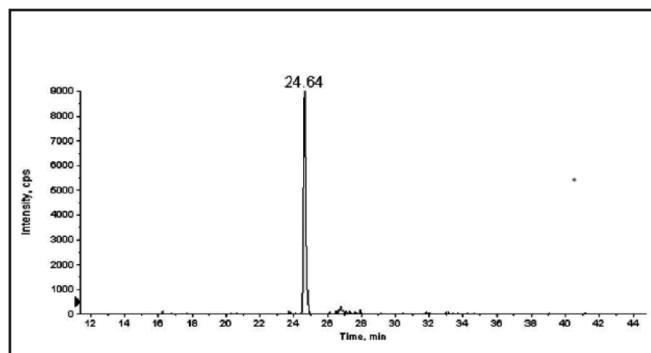
Hmotnostní spektrometrie poskytuje alternativní přístup k analýze plasmatických proteinů. Využívá vysoké specifity a přesnosti svých detektorů, které mají schopnost vybrat konkrétní analyt, jež má být kvantifikován. K ionizaci vzorku je využíván ve většině případů elektrosprej s následným dvoufázovým výběrem analytu. První výběr (MS1) zajistí selekci analytu v intaktní formě. Tato selekce je založena na molekulové hmotnosti analytu. Díky prvnímu výběru je tedy získán analyt označovaný jako „prekurzor m/z“. Po fragmentaci analytu, způsobené srážkou s atomy plynu, nastává druhý výběr (MS2), díky kterému je získán konkrétní iontový fragment, označovaný jako „fragment m/z“. Za pomoci izotopově značených vnitřních standardů je pak možné kvantifikovat množství analytu v krevním vzorku. Pro lepší výsledky je hmotnostnímu spektrometru předřazena kapalinová chromatografie, která zajišťuje nejen separaci, ale také zkoncentrování vzorku^{6,7,8}.

V případě kvantifikace plasmatických proteinů s vyšší koncentrací v krevní plasmě je využíváno kapalná chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Na základě MS1 jsou vybrány vysoké signály, které jsou následně podrobeny kvadrupólové hmotnostní spektrometrii. MS2 výběr se v tomto případě nepoužívá. Získaná hmotnostní spektra peptidových fragmentů jsou porovnána s databází referenčních spekter. Ukázka hmotnostního spektra získaného touto metodou je vidět na Obr. 5.



Obr. 5: MS/MS spektrum peptidových fragmentů fibrinogenu⁷.

U proteinů s velmi nízkou koncentrací v krevní plasmě je vhodné využít metodu MRM-MS (multiple reaction monitoring mass spectrometry), využívající trojitě kvadrupólové zapojení. Jedná se o jeden z typů hmotnostní spektrometrie využívaný především ke kvantifikaci léků a jejich metabolických produktů ve farmacii. Na základě MS1 a MS2 je získán iontový fragment, který je následně analyzován. Ukázka MRM spektra je uvedena na Obr. 6^{6,7,8}.



Obr. 6: MRM spektrum fibrinogenu⁷.

Závěr

Stanovení proteinů vyskytujících se v lidské plasmě v nízké koncentraci je poměrně obtížné. Stále jsou

v popředí imunochemické metody, na paty jim ovšem šlapou i nové postupy, využívající hmotnostní spektrometrie.

Literatura:

1. Zima T: Laboratorní diagnostika, Praha: Karolinum, 2007.
2. Skalický J.: Klinická biochemie – studijní materiály.
3. Karlson P, et al. Pathobiochemie. Academia Praha, 1987.
4. Lievens M, Bienvenu J, Buitrago JMG, et al. Clin Lab 42, 515 (1996).
5. <http://che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf>, staženo 8. prosince 2012.
6. Anderson L, Hunter ChL Mol. Cell. Proteomics 5, 573 (2006).
7. Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E, Carr SA Mol. Cell. Proteomics 6, 2212 (2007).
8. Cox DM, Zhong F, Duchoslav E, Sakuma T, McDermott JC J. Biomol. Tech. 16(2), 83 (2005).

Souhrn

Mihalová D.: Stanovení proteinů vyskytujících se v lidské plasmě v nízké koncentraci

Proteiny lidské plasmy tvoří rozsáhlou skupinu proteinů. Můžeme je rozdělit do 5 skupin: albuminy, α_1 -globuliny, α_2 -globuliny, β -globuliny a μ -globuliny. Dělení plasmatických proteinů pomocí elektroforesy je cenným diagnostickým nástrojem. Pro stanovení těchto proteinů jsou využívány imunochemické metody a hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova: plasmatické proteiny, albuminy, α_1 -globuliny, α_2 -globuliny, β -globuliny, μ -globuliny, imunochemické metody, hmotnostní spektrometrie

Summary

Mihalová D.: Quantification of proteins in low levels in human plasma

Plasma proteins comprise a large group of different proteins. They can be divided into 5 groups: alpha1 globulins, alpha2 globulins, beta globulins and gamma globulins. Separating serum proteins by electrophoresis is a valuable diagnostic tool. For the quantification of these proteins are used immunochemical methods and mass spectrometry.

Keywords: Plasma proteins, alpha1 globulins, alpha2 globulins, beta globulins, gamma globulins, immunochemical methods, mass spectrometry

EXPRESE REKOMBINANTNÍCH FOREM CRYPTOGEINU V SYSTÉMU KVASINKY *Pichia pastoris*

Michal Obořil, Kateřina Dadáková, Tomáš Kašparovský a Jan Lochman

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, 175648@mail.muni.cz

Úvod

Proteomika je rychle se rozvíjející vědní obor s velkým množstvím aplikací v průmyslu a ve zdravotnictví. S tím je spojena potřeba rychlé a nenákladné produkce proteinů v dostatečných množstvích, ať už pro průmyslové nebo vědecké účely.

Fakt, že průmyslový i vědecký zájem o proteomiku se rapidně zvyšuje, může doložit statistika ze stránek proteinové databáze TrEMBL; počet záznamů se od roku 2000 zvýšil více než padesátkrát a databáze již obsahuje víc než 27 milionů proteinů, z čehož pouze 24 % tvoří eukaryotické proteiny.¹

Výzkum eukaryotických proteinů ztěžuje složitější uspořádání eukaryotické DNA a obtíže s produkcí cílových proteinů v biologicky aktivním stavu. Biologická aktivita eukaryotních proteinů je podmíněna správným sbalením, které je při translaci zajištěno přítomností chaperonů. Dále jsou často nezbytné určité posttranslační modifikace, jako je glykosylace, tvorba disulfidických můstků či fosforylace.²

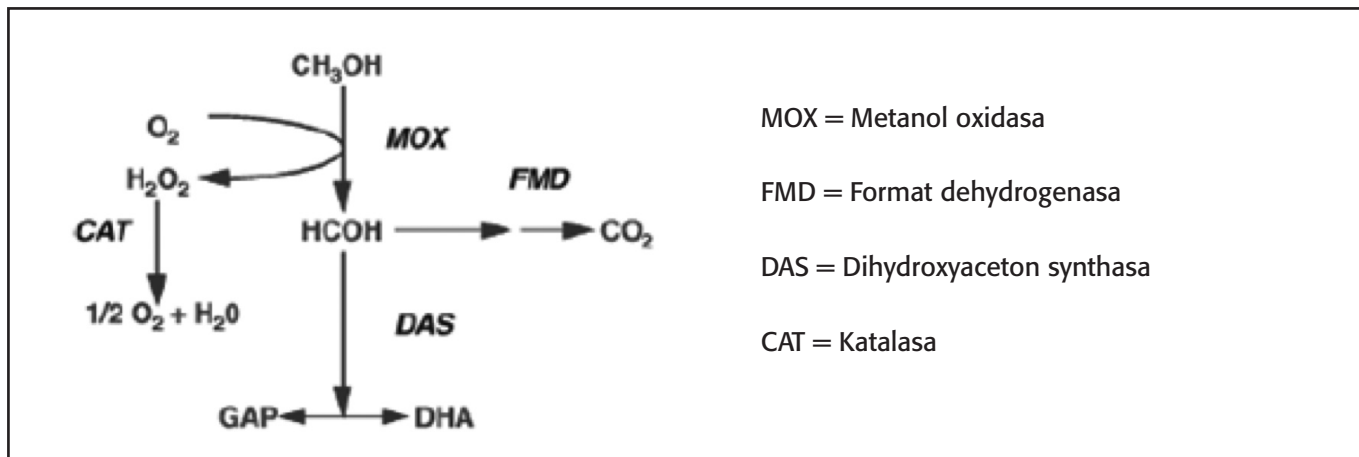
Dříve se i tyto proteiny produkovaly v prokaryotních expresních systémech, které jsou sice nenákladné

a snadno manipulovatelné, ale proteiny v nich produkované byly velmi často inaktivní. U některých z nich se tento problém nicméně podařilo vyřešit dodatečným sbalením pomocí organických činidel.

V dnešní době se tato procedura nahrazuje pokročilými eukaryotickými expresními systémy. Jedním z těchto systémů je expresní systém methylotrofní kvasinky *Pichia pastoris*. Tento systém disponuje řadou výhod, jako je silný indukibilní promotor, možnost extracelulární exprese, nízká sekrece nativních proteinů a snadnější kultivovatelnost než eukaryotické expresní systémy založené na tkáňových kulturách.³

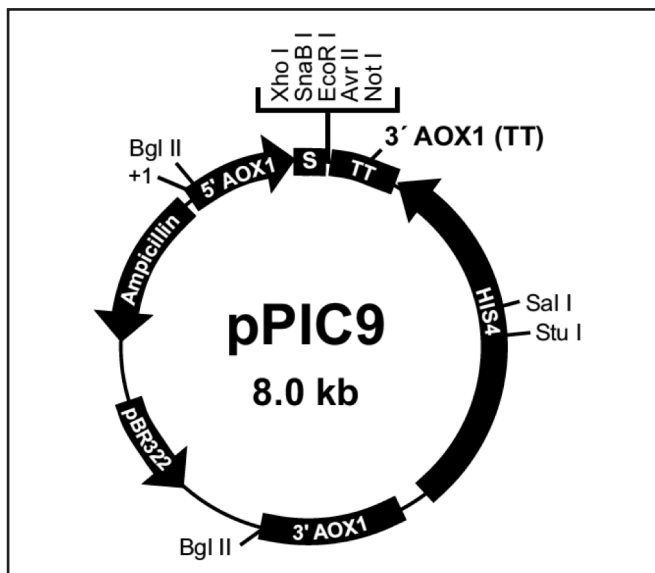
Kvasinka *P. pastoris* je schopna využívat jako jediný zdroj energie a uhlíku methanol. K tomu jí slouží speciální metabolická dráha, která je z důvodů toxicity meziproductů lokalizována ve specializovaných organelách, nazývajících se peroxisomy. (Obr. 1)

První krok této dráhy představuje oxidace methanolu na formaldehyd za účasti dvou isoforem enzymů alkoholoxidasy AOX1 a AOX2, přičemž enzym AOX2 je zodpovědný pouze za 15% celkové aktivity. Část formaldehydu je metabolizována řadou enzymatických



Obr. 1: Části metanolového metabolismu: Speciální metanolová metabolická dráha probíhající v peroxizomech *P. pastoris*

reakcí až na oxid uhličitý za vzniku NADH, zbytek formaldehydu v peroxisomech je dále metabolizován a slouží jako zdroj uhlíku pro budování biomasy. Enzymy AOX1 a AOX2 využívají jako elektronový akceptor kyslík, methanolvý metabolismus je proto náročný na přísun kyslíku. ⁴ Expresí genu *AOX1* je silně indukovaná přítomností methanolu v médiu, čehož se využívá při konstrukci expresních vektorů. Cílový protein je obvykle vložen za promotor *AOX1* genu. Vektor obvykle obsahuje kromě sekvenční cílového proteinu také další sekvenční nutné pro linearizaci, selekci, popřípadě sekvenční signál (Obr. 2). Tento přístup umožňuje efektivně oddělit růstovou a produkční fázi, kdy se kultura nejprve kultivuje na glycerolu a po dosažení požadované koncentrace biomasy se do kultury začne dávkovat methanol, čímž se indukuje exprese cílového genu vloženého za promotor *AOX1*. ⁵



Obr. 2: Struktura expresního vektoru pPIC9: Do tohoto vektoru byl naklonován gen X24, pocházející z *P. cryptogea*, vektor byl poté zintegrován do *P. pastoris*

Materiál a metody

Kultivace *P. pastoris*

Kultura kvasinky byla po rozmrazení kultivována na BMGY mediu (Tab. I), aby bylo dosaženo dostatečné

biomasy před zočkováním kultury do fermentoru (30°C / 16 hodin). 100 ml kultury bylo sterilně zaočkováno do bioreaktoru Biostat-DCU (Sartorius, Německo) s nádobou o objemu 2 litry obsahující 1000 ml sterilního expresního média (Tab. II). Z bioreaktoru byla pomocí softwaru kontinuálně sbírána data o teplotě, pH a aeraci. Pomocí získaných dat byla monitorována růstová i produkční fáze kultivace. Kultivace byla prováděna podle dříve publikovaného protokolu.

Tabulka I: Složení BMGY média

Jednotlivé složky:	Množství na 100 ml média
Fosfátový pufr o pH = 6	10 ml
Bakteriologický pepton	2 g
Kvasničný extrakt	1 g
Glycerol	1 ml
YNB (dusíkatý základ pro kvasinky)	1,34 g
Biotin 4 mg/100ml	0,2 ml
Voda	do 100 ml

Tabulka II : Složení expresního média

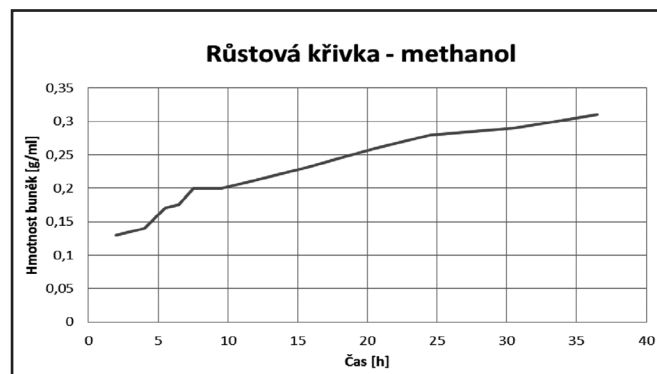
Jednotlivé složky:	Množství na 1 l média
H₃PO₄, 85 %	26,6 ml
CaCl₂	1,06 g
K₂SO₄	18,2 g
MgSO₄·7H₂O	14,9 g
KOH	4,13 g
Glycerol	40 g
Voda	do 1 l

Produkce proteinu v bioreaktoru

Standardní cryptogein byl exprimován pomocí vektoru pPIC9 s vloženým genem X24 pocházejícím z *P. cryptogea*. Gen X24 byl na N-konci doplněn o kodon pro glycin z důvodu lepšího štěpení signální sekvence proteasou Kex2. Ke konstrukci mutantních forem byla použita cíleně řízená mutagenese pomocí Quick chase II

XL kitu (Stratagene, USA). Produkt byl ověřen sekvenací a transformován do kmenu *P. pastoris* GS115.

Bioreaktor byl nastaven dle tabulky III. V průběhu kultivace byly odebrány v jednotlivých časových intervalech vzorky pro sestrojení růstových křivek a pro zjištění množství exprimovaného proteinu. V případě poklesu koncentrace kyslíku pod 20% byl do bioreaktoru zaváděn čistý kyslík z tlakové láhve.



Graf 1: Růstová křivka kultury na metanolu: Křivka vykazuje přibližně lineární trend, neboť nároky kultury na aeraci nebyly pokryty kontinuálně (dávkování kyslíku z tlakové láhve v pulzech)

Izolace produkovaných proteinů

Fermentační médium bylo po centrifugaci koncentrováno pomocí ultrafiltrace (3 kDa cut-off membrána) na desetinu objemu, následně dialyzováno přes noc (CelluSep T1-cut off 3,5 kDa). Odsolené médium bylo upraveno (5mM acetátový pufr, pH 5.0) a protein byl purifikován pomocí FPLC na matrici Source 15S (GE HealthCare, USA). K eluci byl použit gradient NaCl. Frakce obsahující cryptogein byla opět dialyzována a koncentrována na Speed-Vac systému (Thermo, USA). Dále byla ověřena čistota produktu pomocí PAGE-SDS a analýzy na MALDI-TOF.

Výsledky a diskuze

V rámci práce byl produkován elicitin cryptogein a jeho mutantní formy. Produkce proteinů probíhala v expresním systému kvasinky *P. pastoris* – eukaryotním expresním systémem vhodným k heterologní expresi rekombinantních proteinů. Na rozdíl od *E. coli* disponuje tento systém možnostmi správného skládání proteinů, posttranslačními modifikacemi a schopností velkého nárůstu buněk. Z důvodu nízkého výtěžku a časové náročnosti (1 – 2 mg za 7 dní) při kultivaci v baňkách jsme přistoupili k produkci ve větším měřítku – v bioreaktoru.

Růstová křivka kultury ve fermentoru

Hustota kultury byla stanovována v případě růstu na glycerolu

pomocí měření optické hustoty OD_{600} v produkční fázi byla stanovena pomocí vážení vlhké pelety. Růst kultury za optimálních podmínek (růstová fáze) je možné vyjádřit rovnicí:

$$N_t = N_0 \times 2^{\frac{t}{G_t}}$$

kde N_t = počet buněk v čase, N_0 = počet buněk na počátku log fáze, t = čas od počátku log fáze a G_t představuje generační čas za optimálních podmínek.

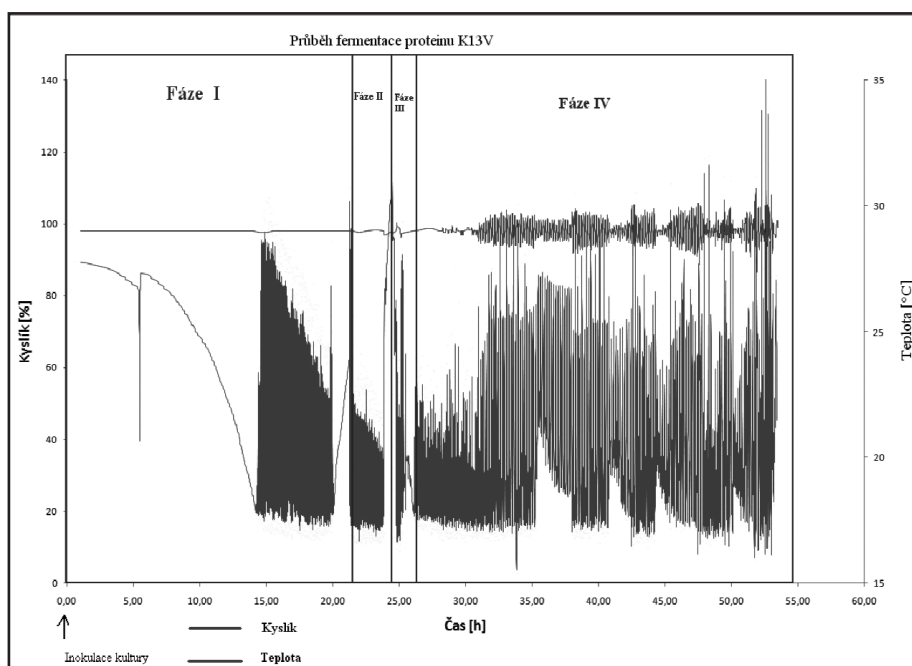
Na křivce sestavené z experimentálních dat je nástup log fáze vidět na počátku osmé hodiny. Generační čas pro *P. pastoris* je okolo 2 hodin (při optimálních podmínkách).⁵ Z experimentálních dat byl určen generační čas 2,91 hodin a tato hodnota byla použita k sestavení růstové křivky od počátku log fáze. Odchylna od teoretické hodnoty poukazuje na odklon od optimálních podmínek, pravděpodobně se jedná o nedostatečnou aeraci, nebo nedostačující míchání. Růstová křivka produkční fáze růstu na methanolu (Graf 1) podle očekávání vykazuje lineární trend, neboť se několikanásobně zvýší požadavky kultury na aeraci, kterou již nejsme schopni kontinuálně zajistit (dávky kyslíku v pulzech) a navíc je methanol méně efektivnější zdroj energie a uhlíku než glycerol; růst biomasy je tudíž značně omezen.

Celkový průběh kultivace v bioreaktoru

Během celého procesu byla pomocí softwaru sbírána data o koncentraci kyslíku, pH a teplotě v bioreaktoru (Obr. 3).

Na základě průběhu koncentrace kyslíku kultury ve fermentoru můžeme popsat čtyři základní fermentační fáze:

- Fáze I. růst kultury na bazálním médiu obsahujícím 3 % glycerolu
- Fáze II. růst kultury na přidávaném glycerolu
- Fáze III. adaptace kultury po indukci methanolem
- Fáze IV. vlastní produkce proteinu na methanolu.



Obr. 3: Záznam typického průběhu fermentace: data byla zaznamenávána pomocí softwaru v pravidelných intervalech během celého procesu fermentace.

V průběhu fáze I. je po inokulaci kultury do bioreaktoru spotřebován všechen glycerol obsažený v expresním médiu. Se zvyšující se buněčnou hustotou klesá koncentrace kyslíku ve fermentoru. Kolem patnácté hodiny je buněčná hustota tak vysoká, že koncentrace kyslíku v médiu klesá pod 20 % a do bioreaktoru se začne dávkovat čistý kyslík z tlakové láhve, což se projeví prudkými pulzy na kyslíkové křivce. Jakmile je glycerol téměř spotřebován, celkový metabolismus kultury se zpomalí, což je patrné ze stoupající koncentrace kyslíku ve fermentoru.

Jelikož se k zahájení produkční fáze doporučuje buněčná hustota 0,20 – 0,25 g/ml ⁶, je do bioreaktoru peristaltickou pumpou dávkován 50% (w/v) roztok glycerolu do té doby, než je vybudovaná požadovaná biomasa. Tato fáze II. trvá přibližně 4 – 5 hodin. Koncentrace kyslíku ve fermentoru je po většinu tohoto času pod 20 %.

Fáze III. představuje 2 – 3 hodiny dlouhou adaptaci kultury na methanol. Během této doby kvasinka zahájí exprese genů *AOX1*, *AOX2* a mutantního *cryptogeinu*, přídavky methanolu musí být velice nízké (pod 3 ml/h), neboť hromadí se methanol by mohl snadno dosáhnout pro kvasinku toxické hladiny. Tato fáze je spojena s nestabilní koncentrací kyslíku ve fermentoru.

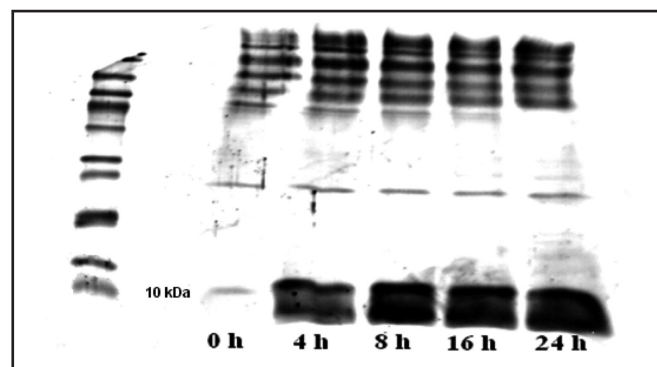
Po adaptaci metabolismu na methanol mohou být zvýšeny přídavky methanolu až na 10 ml/h. V této fázi je produkován cílový protein. Kulturu je třeba chladit, neboť methanolvý metabolismus je spojen s velkým výdejem tepla. Fáze IV. trvá 24 – 48 hodin, konečná buněčná hustota může být až 0,4 g/ml. (Tab. III)

Tabulka III: Nastavení parametrů bioreaktoru

Parametr:	Hodnota:
Teplota	30°C
pH	5.1
Aerace	8 – 10 litr za minutu
Otáčky	700 – 1000 otáček za minutu

Analýza množství sekretovaného proteinu pomocí SDS-PAGE

Vzorky proteinů jsme odebírali během produkční fáze po 4 nebo 5 hodinách. Vzorky byly odebrány ze supernatantu při určování buněčné hustoty.



Obr. 4: SDS-PAGE analýza vzorků z fermentace proteinu V84F/L41F: Vzorky byly odebírány v 4 hodinových intervalech, je patrné, že adaptační doba na metanol odpovídá zhruba čtyřem hodinám.

Separace byla prováděna na 15 % SDS-PAGE gelu. Z obrázku (Obr. 4) je patrná několikahodinová adaptace na methanol; v obou případech je exprese v momentě dávkování methanolu nulová a po 4 nebo 5 hodinách nízká. Při dalších odběrech je už koncentrace proteinu příliš vysoká.

Purifikace vyprodukovaných proteinů

Jelikož byla při konstrukci expresního vektoru použita signální sekvence α -MF, byl požadovaný protein sekretován kvasinkou extracelulárně do média. Protože *P. pastoris* sekretuje jen omezené množství nativních proteinů, je purifikace zjednodušena na jedнокrokovou purifikaci pomocí iontoměničové chromatografie FPLC. Po skončení fermentace bylo médium s narostlou kulturou *P. pastoris* centrifugováno a supernatant byl koncentrován na ultrafiltrační cele Model 202 (Amicon), kde byla použita celulosová membrána s cut-off hodnotou 3 kDa (Millipore).

Po centrifugaci bylo obvykle získáno 400 – 500 ml média, které bylo koncentrováno na objem cca 50 ml. Následně byla prováděna dialýza v membráně CelluSep (cut off 3,5 kDa). Poté byl protein obsažený v médiu purifikován pomocí iontově-výměnné FPLC na matici SOURCE S15 v koloně TriCorn 10 x 50 mm (GE). Protein byl po nanesení na kolonu vymýván gradientem chloridu sodného.

Po dokončení purifikace byly proteiny podrobeny MALDI-MS analýze, aby se prokázalo, že se opravdu jedná o očekávané mutantní formy *cryptogeinu*. Naměřené hodnoty molekulových hmotností souhlasily s teoretickými daty. Postupně se podařilo pomocí expresního systému kvasinky *P. pastoris* vyprodukovat mutantní formy *cryptogeinu* L41F, K13V, V84F a V84F/L41F. Průměrný výtěžek proteinu po 48 hodinové indukci methanolem byl 40 – 60 mg/l bazálního média; podařilo se nám dosáhnout kultur o vysoké buněčné hustotě a výtěžek byl přibližně desetinásobný (Tab. IV) ve srovnání s expresí v baňkách.

Tabulka IV: Výtěžky jednotlivých vyprodukovaných proteinů v mg na litr expresního média

Rekombinantní protein:	Vyprodukované množství v mg/l média:
X24	30
K13V	40
L41F	60
V84F	50
V84F/L41f	50

Závěr:

V bioreaktoru bylo vyprodukováno a purifikováno pět proteinů (X24, L41F, V84F, 84F/L41F a K13V) s průměrnými výtěžky 40-60 mg proteinu na litr bazálního média. Buněčné hustoty na konci fermentace dosahovaly 250-400 g/l. Expresní systém kvasinky *Pichia pastoris* se ve velkém měřítku používá na produkci rekombinantních proteinů již několik desetiletí.

Tato metodika bude použita na laboratorních workshopech projektu „BiochemNet – Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických obo-

rů v praxi“ (registrační číslo: CZ.1.07/2.4.00/31.0133), který je financován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem ČR v rámci OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost.

Literatura:

1. Uniprotkb/trembl Protein Database: Release Statistics [cit. 2012-11-13] dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/uniprot/TrEMBLstats/>
2. Daly R, Hearn MTW: J. Mol. Recognit. 18, 119 (2005).
3. Verma R, Boletia E, George AJT: J. Immunol. Methods 216, 165 (1998).
4. Cereghino JL, Cregg JM: FEMS Microbiol. Rev. 24, 45 (2000).
5. *Pichia* Expression Kit – invitrogen, Catalog no. K1710-01
6. *Pichia* Fermentation Process Guidelines – invitrogen

Souhrn

Obořil M., Dadáková K., Kašparovský T. a Lochman J.: Expres rekombinantních forem cryptogeinu v systému kvasinky *Pichia pastoris*

Expresní systém kvasinky *Pichia pastoris* se ve velkém měřítku používá na produkci rekombinantních proteinů již několik desetiletí. *Pichia pastoris* v sobě spojuje výhody eukaryotních i prokaryotních expresních systémů. V rámci této práce byly v bioreaktoru produkovány mutantní formy proteinu cryptogeinu. Bylo vyprodukováno a purifikováno pět proteinů: X24, L41F, V84F, V84F/L41F a K13V s průměrnými výtěžky 40-60 mg proteinu na litr bazálního média. Buněčné hustoty na konci fermentace dosahovali 250-400 g/l.

Klíčová slova: *Pichia pastoris*, fermentor, cryptogein, růstová křivka

Summary

Obořil M., Dadáková K., Kašparovský T. a Lochman J.: Production of recombinant forms of protein cryptogein by *Pichia pastoris* expression system.

Expression system *Pichia pastoris* has been used for decades to production of recombinant proteins in large scale. *Pichia pastoris* combines the advantages of eukaryotic and prokaryotic expression systems. In this work mutant forms of protein cryptogein were produced in the fermenter. Five proteins: X24, L41F, V84F, V84F/L41F and K13V were produced in the bioreactor and purified with average yields of 40-60 mg protein per liter of basal media. Cell density was reached 250-400 g/l at the end of fermentation.

Keywords: *Pichia pastoris*, bioreactor, cryptogein, growth curve

RETROVIRY A JEJICH ŽIVOTNÍ CYKLUS

Jan Prchal

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, jan.prchal@vscht.cz

Úvod

Retroviry jsou v současné době nejstudovanější skupinou virů. Hlavním důvodem je pandemie nemoci AIDS způsobená retroviry HIV-1 a HIV-2. Na světě je odhadem 40 milionů nakažených, z nichž tři čtvrtiny žijí v subsaharské Africe. Kromě toho je známo mnoho dalších retrovirů, které způsobují různé lidské a zvířecí nemoci, často spojené s tvorbou nádorů.

Retroviry patří mezi obalené RNA viry. Obsahují dvě identická vlákna lineární jednořetězcové RNA. Retroviry se vyznačují unikátním způsobem replikace, která začíná reversní transkripcí genomové RNA do DNA po vstupu do nově infikované buňky¹. Tomuto schématu se částečně vymykají retroviry z čeledi Spumaretrovirinae, u kterých probíhá reverzní transkripce ještě v původní

hostitelské buňce a jejich virové částice tedy obsahují dvojřetězcovou DNA. Vzniklá dvojřetězcová DNA je integrována do genomu hostitelské buňky ve formě proviru, kde může zůstat v latentní fázi po mnoho let. Dalším typickým znakem retrovirů je dozrávání virové částice až po opuštění hostitelské buňky.

Klasifikace retrovirů

Všechny retroviry patří do čeledi Retroviridae, která se dále dělí na dvě podčeledi a 7 rodů. Podčeď Orthoretrovirinae obsahuje šest rodů, zatímco podčeď Spumaretrovirinae obsahuje jediný rod (Tab. I). Zařazení virů do jednotlivých rodů je založeno na podobnosti jejich genomu, přirozeném hostiteli, imunologických hlediscích a jejich patogenicitě².

Tab. I: Rozdělení retrovirů a typičtí zástupci jednotlivých rodů

Rod	Morfogenese	Typičtí zástupci	
<i>Alpharetrovirus</i>	C typ	Avian Leukosis Virus	jednoduché retroviry
		Rous Sarcoma Virus	
<i>Betaretrovirus</i>	B/D typ	Mouse Mammary Tumor Virus	
		Mason-Pfizer Monkey Virus	
<i>Gammaretrovirus</i>	C typ	Murine Leukemia Virus	
		Viper Retrovirus	

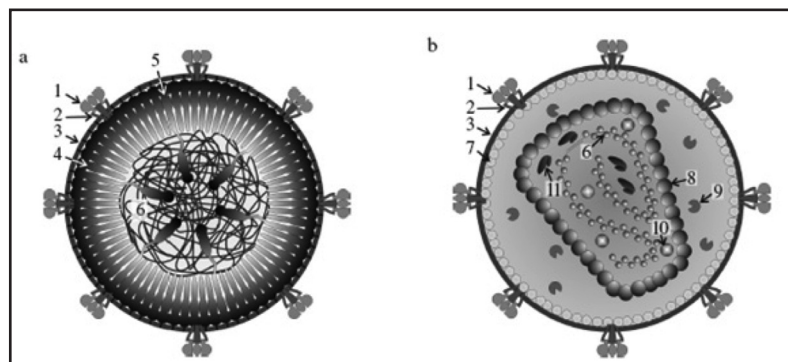
Tab. I: (pokračování)

Rod	Morfogenese	Typičtí zástupci	
<i>Deltaretrovirus</i>	C typ	Bovine Leukemia Virus Human T-Lymphotic Virus 1	komplexní retroviry
<i>Epsilonretrovirus</i>	C typ	Walleye Dermal Sarcoma Virus	
<i>Lentivirus</i>	C typ	Human Imunodeficiency Virus 1 Simian Imunodeficiency Virus	
<i>Spumavirus</i>	B/D typ	Simian Foamy Virus Feline Foamy Virus	

Retroviry lze na základě jejich komplexity dělit na retroviry komplexní a jednoduché a dále na základě jejich morfogenese. Komplexní retroviry obsahují spolu se strukturními proteiny také různé regulační proteiny interagující s hostitelem, usnadňující virovou infekci. Před zavedením současné klasifikace retrovirů bylo využíváno dělení retrovirů do šesti typů A-F na základě morfologických a morfogenických kritérií, hlavně podle tvaru jádra virové částice a místa skládání nezralé virové³. Dnes se z tohoto dělení v praxi využívá dělení na dvě skupiny a to na retroviry typu B/D a retroviry typu C. Nezralé virové částice retrovirů typu B/D se skládají v cytoplasmě a poté jsou transportovány k cytoplasmatické membráně, skrz kterou poté pučí ven z buňky. Příkladem je Mason-Pfizerův opičí virus (M-PMV). Nezralé virové částice retrovirů typu C se naproti tomu tvoří až současně pučením na cytoplasmatické membráně. Příkladem retroviru typu C je virus lidské imunodeficiency (HIV).

Morfologie retrovirů

Všechny retroviry mají podobnou stavbu virové částice. Zralá virová částice je sférická (průměr 80 – 140 nm) tvořená genomovou RNA obalenou několika vrstvami strukturních proteinů s virovou membránou na povrchu (Obr. 1 b). Virová membrána je tvořena fosfolipidy a pochází z cytoplasmatické membrány hostitelské buňky, avšak obsahuje vyšší podíl cholesterolu a sfingomielinu než průměrná cytoplasmatická membrána⁴. Virová membrána obsahuje virové obalové glykoproteiny (Env) skládající se z transmembránové (TM) a nekovalentně připojené povrchové podjednotky (SU).



Obr. 1: Schéma nezralé (a) a zralé (b) virové částice. 1-povrchový glykoprotein, 2-transmembránový glykoprotein, 3-dvojvrstva fosfolipidů, 4-polyproteinový prekurzor Gag, 5-prekurzor Gag-Pro-Pol, 6-genomová RNA, 7-matrixový protein, 8-core tvořené kapsidovým proteinem, 9-proteasa, 10-integrasa, 11-reversní transkriptasa. Převzato ze článku²³

SU při virové infekci interaguje s receptory na hostitelské buňce a je tak zodpovědná za specifitu viru vůči hostitelům. Vnější část TM je zodpovědná za fúzi virové membrány s membránou hostitelské buňky, poté co se SU naváže na receptor na jejím povrchu⁵.

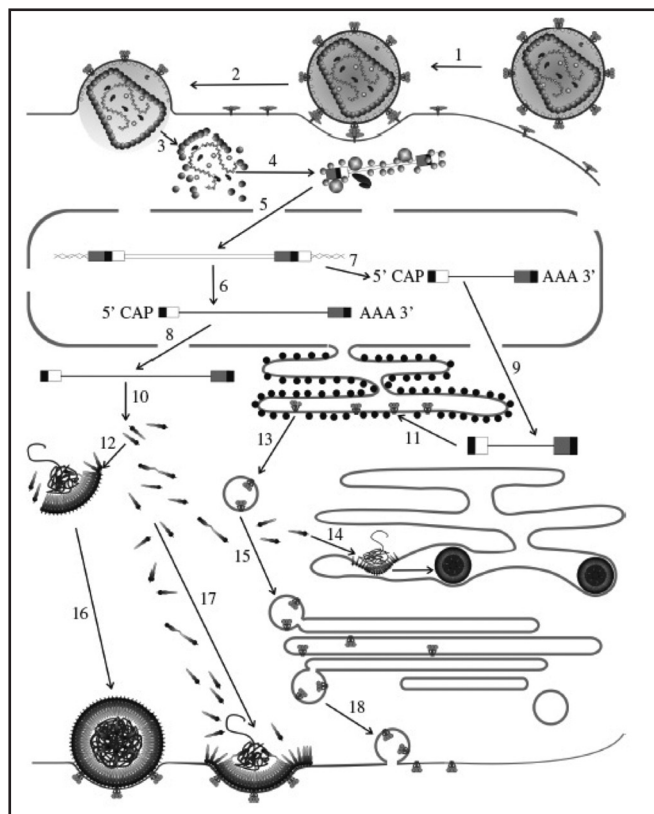
Nitro virové částice se skládá z několika vrstev proteinů a genomové RNA v jejím středu. Matrixový protein (MA) tvoří nejsvrchnější proteinovou vrstvu přímo asociovanou s virovou membránou. MA je k membráně nekovalentně vázán zbytkem kyseliny myristové připojeným k jeho N-konci a oblastí bazických aminokyselin, které interagují se záporně nabitými fosfolipidy z cytoplasmatické membrány. Uvnitř částice se nachází denzní jádro, dobře viditelné elektronovým mikroskopem, tvořené kapsidovým proteinem (CA). Tvar jádra se podle druhu viru liší podle druhu viru od sférického⁶ přes cylindrický⁷ až po kónický⁸. Uvnitř jádra je nukleoproteinový komplex tvořený genomovou RNA a silně bazickým nukleokapsidovým proteinem (NC) a také enzymy retroviru – reverzní transkriptasa (RT), integrasa (IN) a proteasa (PR).

Každá virová částice obsahuje dvě identické molekuly jednořetězcové (+) RNA. Genomová RNA všech retrovirů má podobnou organizaci. Geny pro proteiny retroviru jsou v jejím středu a na obou okrajích jsou dlouhé koncové repetice, které hrají roli při reverzní transkripci. Virová RNA také obsahuje 5'-methylovanou čepičku a 3'-poly A sekvenci.

Struktura nezralé virové částice je odlišná od struktury zralé částice (Obr. 1 a). Všechny strukturní proteiny tvoří jeden polyprotein Gag, který je vázán k virové membráně svojí N-terminální částí, budoucím MA.

Gag tvoří většinu proteinů nezralé virové částice, ale část molekul je prodloužena do formy Gag-Pro a Gag-Pro-Pol, které obsahují virové enzymy. Během zrání virové částice jsou polyproteiny štěpeny virovou proteasou z vzniku jednotlivých virových proteinů.

Kromě virových proteinů a RNA virová částice obsahuje také mnohé proteiny a RNA pocházející z hostitelské buňky. Bylo prokázáno, že některé pomáhají virové infekci například usnadněním uvolnění virové částice při pučení z buňky (ubiquitin, Tsg101), nebo při interakci viru s membránou hostitelské buňky během infekce (molekuly MHC), ovšem úloha většiny z nich zůstává neznámá^{9,10}.



Obr. 2. Životní cyklus retrovirů. Převzato ze článku²³

Životní cyklus retrovirů

Životní cyklus retrovirů může být rozdělen na dvě fáze: na časnou fázi (vstup do buňky, reversní transkripce a integrace proviru do genomu hostitelské buňky) a na pozdní fázi (exprese virových proteinů, skládání virové částice, její pučení z buňky a zrání).

Vstup viru do buňky

Prvním krokem životního cyklu retroviru je vazba SU podjednotky povrchového polyproteinu Env s receptory na povrchu hostitelské buňky (Obr. 2, krok 1). SU po navázání na receptor projde několika konformačními změnami, které vedou k jeho disociaci od TM. TM poté projde také konformační změnou vedoucí k odhalení fuzogenních částí, které zajistí splnutí virové membrány s membránou hostitelské buňky a uvolnění jádra virové částice do cytoplasmy hostitelské buňky (Obr. 2, krok 2)⁴.

Reversní transkripce a integrace

Jádro virové částice se po vstupu do hostitelské buňky rozpadne (Obr. 2, krok 3) a vznikne preintegrační komplex (PIC), který obsahuje genomovou RNA, RT, IN a některé další proteiny podle druhu viru. PIC je poté transportován do jádra (Obr. 2, krok 5). Tento transport vyžaduje přítomnost nukleárně-lokalizačního signálu v některém proteinu PIC (nejčastěji v IN nebo MA). V některých retrovirech není NLC přítomen a jejich PIC do jádra vstupuje pasivně během mitózy. Během transportu dochází k přepisu genomové RNA do DNA pomocí RT (Obr. 2, krok 4). Tento proces o většiny retrovirů probíhá v cytoplasmě, ale u některých probíhá i v jádře. Reversní transkripce je složitý proces, při

kterém je syntetizována DNA a současně s tím dochází k degradaci templátové RNA¹¹. Reversní transkripce je v porovnání s běžnou transkripcí a replikací relativně chybová, což vede ke vzniku mnoha mutací, které mohou způsobovat rezistenci viru proti léčivům. Poté co DNA dosáhne jádra buňky je pomocí IN integrována do genomu hostitelské buňky ve formě proviru (Obr. 2 krok 5), kde může zůstat latentní i po mnoho let.

Expresce

Pozdní fáze virového cyklu začíná v momentu, kdy je provirová DNA transkribována do RNA pomocí buněčné RNA polymerasy II. Část RNA je sestřižena buněčnými proteiny a slouží jako templát pro tvorbu obalových proteinů Env (Obr. 2, krok 7). Zbytek RNA zůstává nesestřižený a slouží jako templát pro virové strukturní proteiny a enzymy nebo jako genomová RNA pro nově vzniklé virové částice (Obr. 2, krok 6). U komplexních retrovirů může RNA ještě projít alternativním sestřihem, což vede ke vzniku různých regulačních proteinů. RNA je modifikována 5'-čepičkou a 3'-polyadenilací a transportována do cytoplasmy (Obr. 2, kroky 8 a 9). Gag je produkován na volných ribosomech v cytoplasmě a je následně posttranslačně modifikován (Obr. 2, krok 10). Nejvýznamnější modifikací je jeho N-terminální myristoylace, která umožňuje jeho interakci s cytoplasmatickou membránou během pučení¹².

Env protein je translatován podle sestřižené virové RNA. Na svém N-konci obsahuje hydrofobní signální sekvenci, která ihned směřuje nově syntetizovaný protein do drsného endoplasmatického retikula. V retikulu je signální sekvence odstraněna a Env je glykosilován (Obr. 2, krok 11). Po ukončení translace zůstává Env zakotven v membráně endoplasmatického retikula.

Skládání virové částice, transport a pučení

Virové polyproteiny Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol jsou spolu s virovou RNA transportovány do místa skládání virové částice. To kde se virová částice skládá, záleží morfogenním typu retroviru.

Proteiny retrovirů typu C jsou rovnou transportovány k cytoplasmatické membráně. Pro tento transport je nezbytná přítomnost N-terminální části Gag, matrixového proteinu a také myristoylace Gag^{13,14}. Přesný mechanismus transportu proteinu k membráně není znám, ale pravděpodobně je obdobný jako u buněčných myristoylovaných proteinů. Když Gag retroviru typu C dosáhne cytoplasmatické membrány a naváže se na ni pomocí zbytku kyseliny myristové a kladně nabitých aminokyselin z oblasti MA začne proces skládání virové částice (Obr. 2, krok 17). Skládání virové částice vyžaduje přítomnost genomové RNA, interakční domény přítomné v CA a NC¹⁵ a u retrovirů typu C i přítomnost buněčné membrány.

Některé retroviry (dříve označované jako inter-cysternální typ A) nepučí skrz cytoplasmatickou membránu, ale skládají se na membráně Golgiho aparátu a zároveň do něj pučí (Obr. 2, krok 14). Tyto částice jsou poté uvolněny z buňky mechanismem exocytosy. Protože skládání nezralých částic těchto virů probíhá na membráně, jsou dnes řazeny mezi retroviry typu C¹.

Gag retrovirů typu B/D obsahuje v MA doméně CTRS sekvenci (z angl. cytoplasmic targetin/retention signal). CTRS interaguje s molekulovým motorem dyneinem, který kotranslačně přepravuje vznikající Gag do pericentriální oblasti, kde probíhá skládání (Obr. 2, krok 12)^{16,17}. Bylo prokázáno, že mutace v CTRS M-PMV způsobí změnu morfogennického typu z B/D na C a částice nesoucí tuto mutaci se skládají na cytoplasmatické membráně¹⁸. Retroviry typu B/D, na rozdíl od retrovirů typu C nepotřebují ke skládání membránu. Složené nezralé virové částice jsou poté transportovány k cytoplasmatické membráně, skrz kterou pučí (Obr. 2, krok 16).

Během pučení nezralé virové částice získávají spolu s membránou také Env proteiny. Env po translaci zůstává v membráně endoplasmatického retikula, kde je glykosilován. Env v membráně tvoří trimery a je z retikula transportován do Golgiho aparátu (Obr. 2, kroky 13 a 15), kde je buněčnými proteasami štěpen na SU a TM¹⁹. Tyto proteiny zůstávají nekovalentně spojeny a jsou transportovány na cytoplasmatickou membránu a inkorporovány do membrán pučících virionů (Obr. 2, krok 18). Inkorporace Env je zajišťována MA a jsou známy mutace v MA, jež vedou ke ztrátě inkorporace Env^{18,20,21}. Pro finální odškrcení vznikající

virové částice od buňky jsou potřebné pozdní domény, které se nacházejí v různých částech proteinu Gag, a které interagují s proteiny endosomálního třídícího komplexu (ESCRT)²².

Zrání

Posledním krokem životního cyklu retroviru je zrání virové částice, které je nezbytné pro infektivitu nově vzniklé virové částice. Po opuštění hostitelské buňky dochází k aktivaci virové proteasy, která začne hydrolyzovat polyproteiny Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol na jednotlivé proteiny. Poté co je štěpení ukončeno proteiny ve virové částici projdou reorganizací a dojde ke vzniku denzního jádra virové částice.

Závěr

Je zřejmé, že retroviry jsou přes svoji malou velikost velmi komplexní částice, které obsahují mnoho proteinů s rozličnou funkcí. Dosavadní antiretrovirotika jsou cílena výlučně na enzymy RT, PR nebo IN. Vzhledem k narůstajícímu počtu rezistentních kmenů proti současným léčivům je zapotřebí aby se výzkum soustředil i na strukturní proteiny a hledali se látky, které mohou narušit životní cyklus retrovirů i v jeho jiných fázích, například během skládání virové částice.

Literatura:

1. Coffin J, Hughes S, Varmus H: Retroviruses. 1997
2. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA: Int. Commn Taxonomy Viruses. <http://www.ictvonline.org> (2012)
3. Bernhard W: Cancer Res. 5, 20 (1960).
4. Rawat SS, Viard M, Gallo SA, et al.: Mol. Membr. Biol. 3, 20 (2003).
5. Freed EO, Englund G, Martin MA: J. Virol. 6, 69 (1995).
6. Kingston RL, Olson NH, Vogt VM: J. Struct. Biol. 1, 136 (2001).
7. Chopra HC, Mason MM: Cancer Res. 8, 30 (1970).
8. Briggs JA, Wilk T, Welker R, et al.: EMBO J. 7, 22 (2003).
9. Ott DE: Rev. Med. Virol. 6, 12 (2002).
10. Gottwein E, Bodem J, Muller B, et al.: J. Virol. 17, 77 (2003).
11. Gotte M, Li XG, Wainberg M: Arch. Biochem. Biophys. 2, 365 (1999).
12. Bryant M, Ratner L: PNAS 2, 87 (1990).
13. Spearman P, Wang JJ, Vander HN, Ratner L: J. Virol. 5, 68 (1994).
14. Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD: J. Virol. 4, 68 (1994).
15. Scarlata S, Carter C: Biochim. Biophys. Acta 1, 1614 (2003).
16. Vlach J, Lipov J, Rumlova M, Veverka V, et al.: PNAS 30, 105 (2008).
17. Sfakianos JN, LaCasse RA, Hunter E: Traffic. 10, 4 (2003).
18. Rhee SS, Hunter E: Cell 1, 63 (1990).
19. Bradac J, Hunter E: Virology 2, 150 (1986).
20. Rhee SS, Hunter E: EMBO J. 3, 10 (1991).
21. Freed EO, Martin MA: J. Virol. 1, 70 (1996).
22. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD: J. Virol. 8, 77 (2003).
23. Strnad P, Haubova S, Ruml T: Chem Listy 9, 97 (2003).

Souhrn

Prchal J.: Retroviry a jejich životní cyklus

Retroviry představují viry s unikátním způsobem replikace a zároveň jsou původcem mnoha lidských i zvířecích onemocnění, na prvním místě AIDS způsobovaný retrovirem HIV. Článek shrnuje základy současného taxonomického rozdělení retrovirů a popisuje životní cyklus retrovirů.

Klíčová slova: retrovirus, virus, životní cyklus

Summary

Prchal J.: Retroviruses and their life cycle

Retroviruses are viruses with unique way of replication and they are the cause of many human and animal diseases. The most prominent example is AIDS caused by HIV retrovirus. The article summarizes the taxonomy of the retroviruses and describes retroviral life cycle.

Keywords: retrovirus, virus, life cycle

OBSAH

Úvodem	57
Káš J.: Víte, že...?	58
Krajčiová T.: Nanobiotechnologie	59
Mihalová D.: Stanovení proteinů vyskytujících se v lidské plasmě v nízké koncentraci	61
Obořil M., Dadáková K., Kašparovský T. a Lochman J.: Expres rekombinantních forem cryptogeinu v systému kvasinky <i>Pichia pastoris</i>	65
Prchal J.: Retroviry a jejich životní cyklus	69

CONTENTS

Editorial	57
Káš J.: Do you know ... ?	58
Krajčiová T.: Nanobiotechnology	59
Mihalová D.: Quantification of proteins in low levels in human plasma	61
Obořil M., Dadáková K., Kašparovský T. a Lochman J.: Production of recombinant forms of protein cryptogein by <i>Pichia pastoris</i> expression system	65
Prchal J.: Retroviruses and their life cycle	69

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: J.Biochem. 148, 502 (1997).

Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.

Lowenstein K A: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 1979.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 3. září 1999.

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

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

BIOPROSPECT

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

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

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností