

B I P R O S P E C T

Dvacátýtřetí ročník
Číslo 2/2013

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

Doc. Ing. Petra Lipovová, 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)

Ing. Martina Nováková, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

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

Doc. 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)

<http://bts.vscht.cz>

BIOPROSPECT

23th Volume
No. 2/2013

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 jsme Vás již informovali, pokračují přípravy mezinárodního biotechnologického symposia BIOTECH 2014 a 6. Česko-švýcarského symposia, které se uskuteční příští rok, a to ve dnech 11. 6. – 14. 6. 2014 v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích. Tato symposia pořádáme se švýcarskými partnery každé 3 roky. V dnešním čísle Bioprospectu Vám přinášíme základní informace, podrobnější informace získáte na webových stránkách www.biotech2014.cz. Informace zde budou průběžně aktualizovány. Zajímavý vědecký program bude doplněn expozicí biotechnologických firem, dodavatelů přístrojů a pomůcek pro biotechnologický výzkum i výrobu, jakož i výstavou biochemické literatury. Nebude chybět ani atraktivní sociální program, který jistě zaujme domácí i zahraniční účastníky tohoto symposia. Na zmíněných webových stránkách si je možno připomenout i průběh předchozího symposia v r. 2011.

Co nejrůzněji zveme všechny zájemce o biotechnologie k aktivní i pasivní účasti, a dále k představení svých aktivit formou výstavních stánků, inzerátů, reklamních spotů i dalších forem propagace Vaší činnosti. Pořadatelé symposia jsou připraveni s Vámi projednat způsob propagace a domluvit se na podmínkách spolupráce. Od výrobních podniků, distributorů i dalších organizací bychom uvítali vypsání stipendií pro účast studentů (t. j. zaplacení účastnického poplatku).

Věříme, že nám pomůžete představit české biotechnologie v tom nejlepší světě a prokázat, že v mnoha směrech máme co nabídnout jak ve výzkumu, tak v biotechnologické produkci. Ze švýcarské strany se na přípravě symposia podílejí kromě akademické sféry (ZHAW, Wädenswil) dvě švýcarské biotechnologické asociace (Swiss Biotech Association a Biotech-net). Symposium tedy nabízí možnost navázání nejrozsáhlejších kontaktů, o které švýcarské biotechnologické organizace usilují. Vytvořme tedy pro navázání této spolupráce co nejlepší podmínky. Tím je bezpochyby především účast na symposiu.

Zkušeným vědeckým pracovníkům nabízíme možnost publikace přehledných článků z jejich oboru ve zvláštním čísle prestižního časopisu *Biotechnology Advances* (impakt faktor trvale kolem 10). V projednávání jsou i možnosti publikace původních sdělení.

Ve čtvrtek 24. 4. 2013 se uskutečnil velmi zajímavý a bohatě navštěvovaný tradiční seminář „Novinky v ob-

lasti genetických modifikací“. Bohužel se nám letos nepodařilo od přednášejících získat písemnou formu přednášek. Pokud se podaří získat alespoň souhrny, otiskneme je v příštím čísle Bioprospectu.

Na 49. valné hromadě naší zastřešující organizace Českého svazu vědeckotechnických společností byly zvoleny nové orgány pro volební období 2013 – 2016. Nově zvolené orgány jsou uvedeny na webových stránkách Svazu (www.csvts.cz). Za naši organizaci byl zvolen do revizní komise RNDr. Tomáš Vaněk, CSc. Svaz rovněž vytváří pro řešení jednotlivých problémů (ekonomických, investičních, vzdělávání, výzkum, vývoj a inovace, úpravu dokumentů ČSVTS a další) odborné komise. Pokud by měl někdo z našich členů zájem pracovat v některé komisi dle své odbornosti, prosíme ho, aby nám to dal co nejdříve vědět. Samozřejmě máme zájem se na organizačním zajištění funkcí Svazu aktivně podílet.

Je naší snahou Vás průběžně informovat i o aktivitách a významných výročích našich partnerů. V tomto čísle Vás seznamujeme s činností Biotechnologického ústavu AV ČR. Významné výročí (50 let činnosti) oslavil letos další ústav AV ČR, a to Ústav živočišné fyziologie a genetiky se svými pracovišti v Liběchově, Praze a Brně. Informaci o ústavu přineseme v dalším čísle. V tomto čísle Vás budeme rovněž informovat o oficiálním otevření Centra pro zemědělský a biotechnologický výzkum v Olomouci, které bylo vybudováno s přispěním Evropské unie, o Světovém biotechnologickém kongresu v Bostonu a symposiu „Plant Biotechnology: Green for Good II“ v Olomouci.

Odborné články v tomto čísle jsou věnovány přípravě rekombinantních protilátek, biopesticidům, atlasu lidských proteinů a přípravě různých vůní a ochucovadel fermentačními postupy.

Závěrem tohoto úvodníku bychom Vám rádi popřáli příjemné prožití léta, hezké dovolené a načerpání nových sil pro spokojený život a úspěchy ve Vaší práci ve zbývající části roku. Velice oceníme, když v době odpočinku naleznete čas k sepsání příspěvku pro náš bulletin.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

BIOTECHNOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, V. V. I.

Historie

Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., se sídlem v areálu Akademie věd v Praze – Krč, je mladým ústavem s pětiletou činností. Cílem ústavu je špičkový základní výzkum v oblasti molekulárně biologických věd a výhledový převod biotechnologických metod a molekulárních nástrojů k diagnostice a léčbě patologického stavu buňky do humánní a veterinární medicíny, případně dalších důležitých oblastí lidské činnosti.

Za pět let ústav dokázal, že je velmi dynamickým ústavem. Jeho vědečtí pracovníci publikovali řadu odborných článků v impaktovaných časopisech a jsou schopni získat v kompetitivních grantech finance na svoji výzkumnou práci. Tento trend má jasně vzestupnou tendenci a lze jednoznačně očekávat, že se Biotechnologický ústav zařadí mezi špičková pracoviště v oblasti základního výzkumu s důrazem na transfer technologií do biomedicínské praxe.

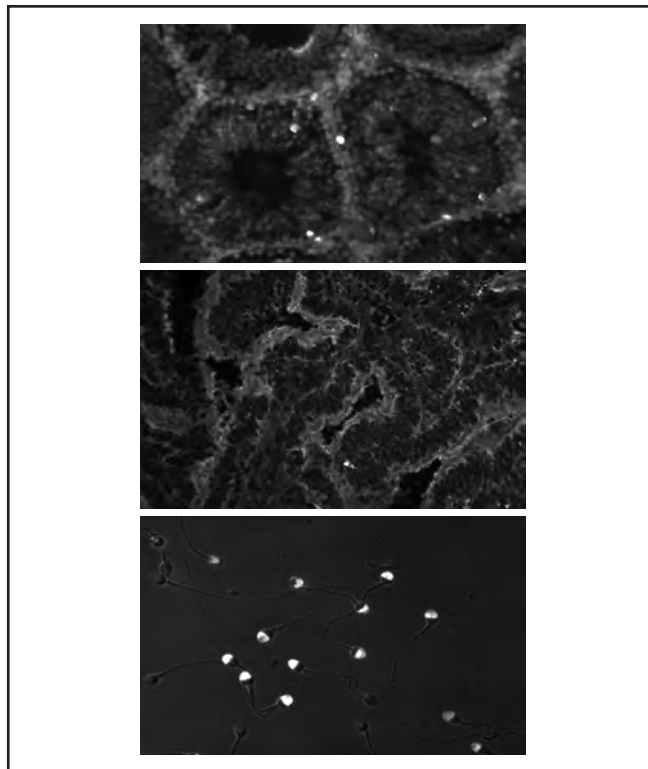
Současnost

Ústav má devět skupin, které jsou zaměřeny na základní výzkum v oblasti nádorového onemocnění, neplodnosti, autoimunních nemocí a embryopatie a vývoj nových biotechnologických metod a nástrojů na úrovni molekulární, genové, proteinového inženýrství a strukturní biologie k možnému využití v diagnostice a léčbě patologických stavů v klinické praxi.

Jedním ze dvou směrů základního výzkumu ústavu je objasnění příčin patologického stavu buňky, zjištění exprese vybraných genů, detekce změn v lokalizaci a modifikaci vybraných proteinů a identifikace dalších molekul, které souvisí s indukcí patologie. Výzkum vede k vytvoření nových metod a nástrojů pro prevenci, diagnostiku a terapii příslušného patologického stavu.

Laboratoř reprodukční biologie se dlouhodobě zabývá charakterizací procesů během oplodnění vajíčka na molekulární úrovni a vyvíjí nástroje (monoklonální protilátky) pro detekci mužské neplodnosti a pro detekci vybraných faktorů znečišťujících životní prostředí majících negativní dopad na reprodukci savců. Činnost **Laboratoře imunopatologie a imunoterapie** je zaměřená na humorální a genetické aspekty autoimunitních nemocí, na identifikaci cílových molekul využitelných v diagnostice a terapii autoimunitních chorob. **Laboratoř molekulární patogenetiky** identifikuje klíčové molekuly v patogenním embryonálním vývoji pomocí zvířecích modelů a umožňuje tak vypracovat nové postupy pro prevenci a diagnózu diabetické embryopatie. **Laboratoř molekulární terapie** se zaměřuje na rakovinné kmenové buňky a na vývoj nových protirakovinných látek, zejména analogů vitamínu E, které efektivně a selektivně působí proti maligně transformovaným buňkám tím, že navozují jejich buněčnou smrt (apoptózu). **Laboratoř nádorové rezistence** je nově ustavenou skupinou v ústavu. Hlavním tématem laboratoře je výzkum nádor iniciujících buněk jinak označovaných též jako nádorové kmenové buňky. Výzkum **Laboratoře genové exprese** je směřován k rozvoji nástrojů pro profilovou analýzu exprese genů pomocí vysokokapacitní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR) na tkáňové, jednobuněčné a sub-buněčné úrovni.

rové kmenové buňky. Výzkum **Laboratoře genové exprese** je směřován k rozvoji nástrojů pro profilovou analýzu exprese genů pomocí vysokokapacitní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR) na tkáňové, jednobuněčné a sub-buněčné úrovni.

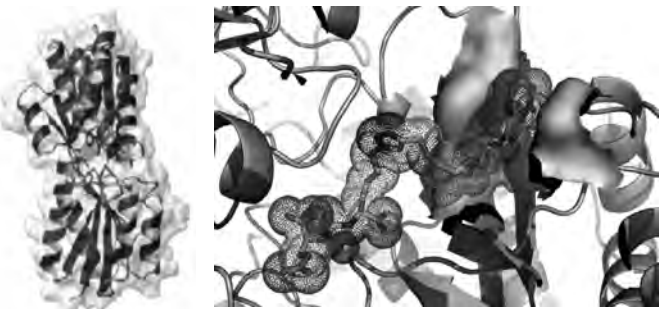


Druhým směrem výzkumu je příprava nových biotechnologicky, diagnosticky a lékařsky důležitých biomolekul, proteinů a nukleových kyselin, konstruovaných nejmodernějšími technikami molekulární biologie a proteinového inženýrství. Objasnění struktur studovaných biomolekul a jejich vzájemného působení umožní jejich modifikaci a využití pro diagnostiku nemocí, jako léčiva či jiné pokročilé materiály.

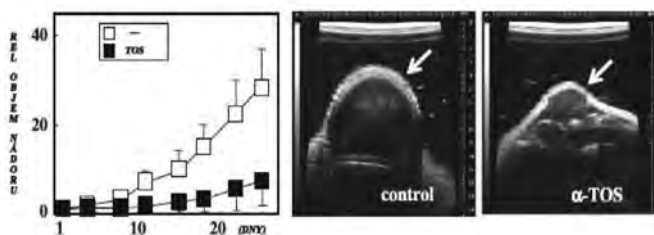
Laboratoř inženýrství vazebných proteinů se zabývá designem a zlepšováním vlastností vysoce afinitních vazebných proteinových ligandů zejména pro aplikace, ve kterých byly do současnosti neúspěšně používány monoklonální protilátky. **Laboratoř biomolekulárního rozpoznávání** studuje interakce biomolekul, proteinů a nukleových kyselin, biofyzikálními a bioinformatickými metodami. Výzkum se zaměřuje na ty aspekty interakcí, které vedou k specifickému rozpoznávání biomolekul s potenciálním diagnostickým, léčebným nebo biotechnologickým využitím. **Laboratoř strukturní biologie** směřuje výzkum do oblasti vztahů mezi strukturou a funkcí medicínsky relevantních proteinů. Výsledky výzkumu jsou využitelné pro návrh a optimalizaci sloučenin sloužících k detekci pevných nádorů, zejména pak nádorů rakoviny prostaty.

Ústav vlastní dva **unikátní špičkové přístroje**. Vysokokapacitní zařízení **BIOMARK** (výrobce Fluidigm), umožňující současnou analýzu exprese až 96

genů v rámci jednoho experimentu. Sledování exprese řady genů v jediné buňce urychlí objasňování regulačních mechanismů buňky, mechanismů diferenciací či mechanismů odpovědi buňky na farmaka nebo na nejrůznější stimuly, jako jsou např. environmentální vlivy. Druhým unikátním přístrojem je **Vevo 770** (Visual Sonics), který slouží k neinvazivnímu zobrazování a kvantitativnímu vyhodnocování modelů různých onemocnění, zejména nádorových a kardiovaskulárních.



Ústav spolupracuje v rámci různých projektů a dohod s ostatními akademickými ústavami i univerzitními pracovišti a má též řadu mezinárodních spoluprací, včetně dvoustranných dohod.



Pedagogická činnost

Důležitým úkolem ústavu jsou odborná školení pracovníků z různých institucí v biotechnologických technikách a výchova diplomantů a doktorandů biologických, biochemických, medicínských a zemědělských oborů. Pracovníci též přednáší na vysokých školách a pracují v Oborových radách různých fakult.

Aplikace výsledků do praxe

Výstupy činnosti skupin jsou nejen odborné publikace, ale také technologie zavedené do komerční sféry. Firmě EXBIO Praha, a. s. byly předány hybridomy k detekci proteinů na spermiích důležitých pro úspěšné oplození, které jsou používány v praxi v centrech asistované reprodukce. S firmami VIDIA, spol. s r. o., EXBIO Praha, a. s., r-Ecoli, spol. s r. o. byly připraveny kity k detekci vybraných polutantů životního prostředí. Na zvířecím modelu se testují nové protinádorové látky a nové terapeutické postupy. Pro diagnostické monitorování odpovědi pacienta na léčbu se vyvíjí nové metodické postupy pro genetické profilování na úrovni jedné buňky s cílem optimalizace individualizované terapie.

Budoucnost

Ve Vestci u Prahy bude realizován projekt BIOCEV v rámci Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace, na jehož přípravě se Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i. podílí s dalšími ústavami AV ČR a Univerzitou Karlovou. Začlenění ústavu v projektu BIOCEV je mimořádnou šancí k jeho dalšímu rozvoji. Ústav je též aktiv-



ním členem sdružení BIOCEV z. s. p. o. a CzechBio – asociace biotechnologických společností ČR, z. s. p. o. Více informací (<http://www.ibt.cas.cz>).

Kontakty

Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083,
142 20 Praha 4
Tel.: 241 063 613
Fax: 244 471 707
e-mail: btu-office@img.cas.cz
<http://www.ibt.cas.cz>

Ředitelka: doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

Zástupce ředitelky: Ing. Jan Škoda

Předseda dozorčí rady: RNDr. Miroslav Flieger, CSc.

Předsedkyně rady instituce:

doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

BioTech 2014

and 6th Czech-Swiss Symposium
with Exhibition

June 11-14, 2014
Prague
Czech Republic

Hosted by:

Zurich University
of Applied Sciences

zhaw

Life Sciences and
Facility Management

Institute of
Biotechnology

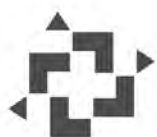


**INSTITUTE OF
CHEMICAL TECHNOLOGY
PRAGUE**

biotechnet
switzerland

Czech Biotechnology

BTS
Society



**Swiss Biotech
Association**



CZECHINVEST
Investment and Business Development Agency

www.biotech2014.cz

Scope of the Conference

The highly successful series of tri-annual BioTech conferences, inaugurated in 1999, promotes networking between academic and industrial sectors involved in biotechnology research and development. The BioTech 2014 conference will highlight life science technologies while identifying synergies amongst their different applications in human and animal health, nutrition, chemistry and sustainable energies from microorganisms.

As a platform for personal, scientific, technical and commercial contacts, this highly interactive event will foster new collaborations and provide opportunities for the fruitful continuation of long-term relationships between Czech- and Swiss-based biotechnologists. The official conference language will be English. BioTech 2014 also welcomes contributions from participants with complementary scientific interests and from any other country.

Venue

The conference will take place in the National Technical Library, located centrally in the university campus in Prague 6. The famous city of Prague lies in the heart of Europe and, due to its abundance of cultural attractions and rich historic architecture, is one of the most popular European tourist destinations.

The conference is organized under the patronage of:

Professor Karel Melzoch

(Rector of ICT Prague, Czech Republic)

Professor Urs Hilber

(Dean of the School of LSFM, ZHAW, Wädenswil, Switzerland)

The Swiss Ambassador

(Swiss Embassy in Prague, Czech Republic)

Scientific Program

BioTech 2014 will concentrate on **microbial biotechnology**, the key technology for 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 therefore focus on:

- **Bio-products for Pharma, Nutrition and Chemistry**
- **Bio-refineries for Food, Materials and Energy**

Specialized **workshops** (SIG) and round-table discussions will be organised upon request to further strengthen relationship between industry and academia. As long criteria of scientific and formal quality are met, contributions to the **poster session** are open to any biotechnology research topic beyond the main scope of the lectures.

Selection criteria for oral and poster presentations will be based on novelty, potential for practical application and scientific merit. All abstracts will be published in a Book of Abstracts (with own ISBN). Additionally, selected conference presentations will appear in a pre-booked **special issue** of Biotechnology Advances (ISSN: 0734-9750, Elsevier, 5-year Impact Factor: 10.959). Further space for publishing is offered in a special issue of Bioprospect, the peer-reviewed journal of the Czech Biotechnology Society (ISSN 1210-1737).

Social Program

- Gala dinner in the Břevnov monastery with a medieval brewing demonstration (€ 50)
- Guided tour of Prague (€ 20)
- Trip to Český Krumlov (UNESCO World Heritage site) with an excursion to an industrial plant (€ 50)

Exhibition

Booths for showcasing commercial products and laboratory equipment will be available in the main conference area. During the event, biotechnological, pharmaceutical and food companies, equipment or technology suppliers, and research institutions will have the opportunity to exhibit and promote their products, their latest technologies and recent achievements.

Sponsorship Benefits

You can promote your company as a key player in the biotechnology sector, build connections with clients and research partners, and participate in workshops and networking activities. The Organizing Committee will be pleased to provide further information or address particular requirements.

Important Dates

January 15, 2014 – Deadline for abstracts of oral presentations*

February 28, 2014 – Deadline for poster abstracts*

March 31, 2014 – Early bird registration & payment deadline

April 30, 2014 – Notification of acceptance

May 16, 2014 – Registration & payment deadline

June 11-14, 2014 – Conference

* Abstract submission forms will be available online from July 2013.

Registration Fee

The conference fee should be paid by bank transfer using the account details below.

The payee is responsible for covering all wire transfer fees.

	Up to March 31, 2014	Afterwards
Regular	€ 300	€ 350
Student	€ 200	€ 250
Accompanying person	€ 150	€ 200

Name of Account: BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST

KB Account Number: 107-4521440237/0100

IBAN: CZ04 0100 0001 0745 2144 0237

BIC (SWIFT): KOMBCZPPXXX

Recipient's note: enter BioTech 2014 and name(s) of participant(s)

ATLAS LIDSKÝCH PROTEINŮ

Barbora Jelínková

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

Studiem proteinů se zabývá proteomika, která je jednou z disciplín komplexní molekulární biologie. Jejím cílem je identifikace všech proteinů kódovaných genomem včetně jejich posttranslačních modifikací. Snaží se pochopit jejich vztah mezi funkcí a strukturou, stanovit jejich exprese v různých buňkách organismu a určit subcelulární lokalizaci jednotlivých bílkovin. Pojem „proteom“ jako kompletní sadu proteinů použil poprvé Marc R. Wilkins v roce 1994, spojením slov PROTEIn a genOM. Proteomika a genomika se vzájemně výrazně doplňují, neboť funkci proteinu nelze zcela určit na základě sekvence DNA nebo mRNA, stejně tak nelze popsat molekulární mechanismy pomocí studia samotného genomu. Proteom je velmi dynamický s nekonečným počtem různých variací, proto je oproti relativně konstantnímu genomu jeho studium mnohem obtížnější. V jedné savčí buňce může být najednou exprimováno až 35 tisíc genů a každý z těchto genů je schopný generovat až stovky různých proteinů prostřednictvím posttranslačních modifikací nebo alternativního sestřihu RNA.^{1,2,3}

The Human Protein Atlas

V roce 2003 ve Švédsku na Royal Institute of Technology vznikl velmi zajímavý proteomický projekt, koordinovaný panem profesorem Mathiasem Uhlénem a financovaný nadací Knut and Wallenberg, a to The Human Protein Atlas. Cílem tohoto projektu je systematické prozkoumání lidského proteomu pomocí proteomiky založené na protilátkách a vytvoření veřejně dostupné databáze s informacemi o expresi proteinů v 46 různých normálních tkáních, ve 20 různých typech rakoviny a 47 různých buněčných liniích, které jsou doprovázeny miliony snímků imunohistochemicky barvených preparátů. První online verze proteinového atlasu byla zveřejněna v roce 2005 a dodnes prošla 15 aktualizacemi.^{4,5} (Obr.1)

Hlavními centry jsou AlbaNova, SciLifeLab, Royal Institute of Technology (KTH) ve Stockholmu, Rudbeck Laboratory v Uppsale a Lab Surgpath v Bombaji. Každé centrum má své vlastní oblasti výzkumu, které jsou však vzájemně propletené a navazují na sebe. Ve Stock-

holmu dochází ke generaci vysoce kvalitní protilátky a imunofluorescenční analýzu, v Uppsale k profilování bílkovin v tkáních a buňkách pomocí imunohistochemie a v Bombaji jsou zodpovědní za anotaci k imunohistochemickým obrázkům.⁵

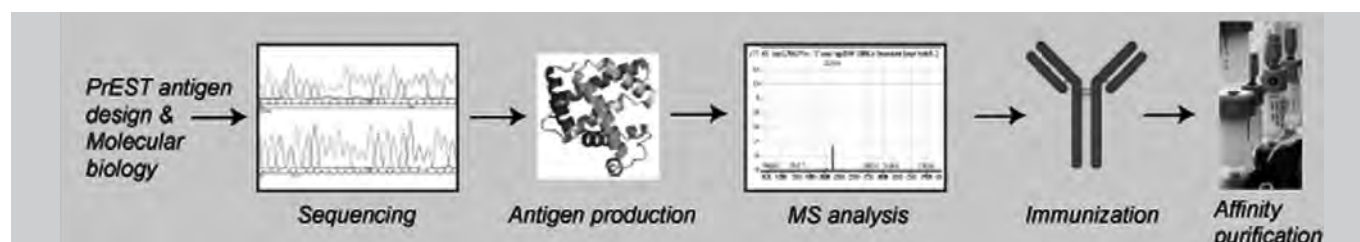


Obr.1. Proteinová online databáze. www.proteinatlas.org

Produkce protilátky

Proces začíná identifikací protein-kódující sekvence (100 – 150 aminokyselinová sekvence). Tato oblast se nazývá PrEST (Protein Epitope Signature Tag) a klonuje se standardními molekulárními metodami (cDNA knihovna, ligace, RT-PCR, transformace) do bakterií, které produkují rekombinantní PrEST-protein. PrEST se následně použije jako antigen pro imunizaci, ke konstrukci PrEST arrays, a pro afinitní purifikaci při tvorbě monospecifické protilátky (mAb).^{5,6}

Po imunizaci dochází k afinitní purifikaci polyklonálního antisera pomocí PrEST jako „návnady“, aby byly eliminovány nežádoucí a nespecifické protilátky. (Obr. 2.) Protilátky vázané na PrEST jsou uloženy pro další použití. Vzniklé monospecifické protilátky jsou testovány na PrEST arrays, kde je aplikováno 384 různých PrEST, specifita je detekována pomocí korespondujících PrEST. Poté se využívá metoda Western Blot a zkušební imunohistochemické barvení tkání. Schválené protilátky se používají k profilování bílkovin a k anotaci.⁷



Obr. 2. Schéma produkce protilátky.

Proteinové profilování

Schválené protilátky jsou v sériích aplikovány na desítky různých tkáňových mikročipů (TMAs) s imobilizovanými vzorky ze 48 normálních tkání, z 20 různých typů rakoviny (12 různých pacientů na jeden typ rakoviny), ze 47 různých buněčných linií a z 12 různých leukémií. To dává celkem 708 vzorků pro každou protilátku, které jsou pak skenovány v HD rozlišení.

Obrázky buněčných linií jsou zpracovány pomocí analytického softwaru pro obrázky a ručně anotovány certifikovanými patology. Současně probíhá konfokální mikroskopie, imunohistochemické a imunofluorescentní analýzy ke zjištění subcelulární lokalizace protilátky⁷ (Obr. 3.). Každé protilátce je ještě přiřazeno skóre spolehlivosti a konečně mohou být všechna zjištěná data, obrázky a informace o protilátce vloženy do databáze proteinů.⁷

Webové stránky

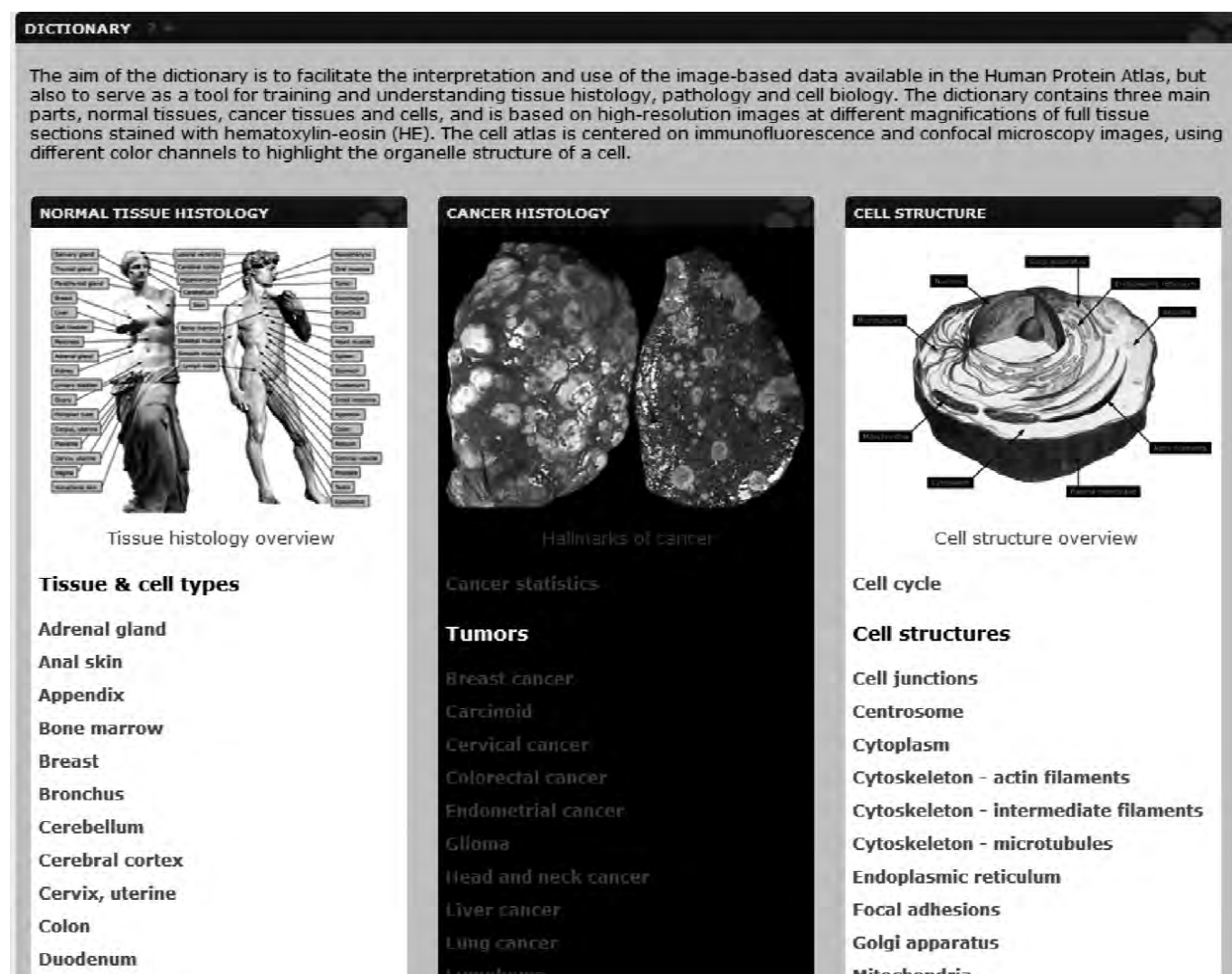
Všechna data jsou veřejně přístupná a dvakrát ročně aktualizovaná. Pro každou bílkovinu je vytvořena souhrnná stránka, která poskytuje obecný a rozsáhlý přehled o expresi. Z této stránky je možné dostat se hlouběji ke specifitějším informacím, které jsou doprovázeny obrázky ve vysokém rozlišení. Součástí databáze je i výkladový slovník pojmů.^{4,7} (Obr. 4.)

Závěr

The Human Protein Atlas je úspěšný proteomický projekt, který se neustále vyvíjí a svá data neustále aktualizuje. Kromě vědeckého využití proteinové databáze je možné ji díky výkladovému slovníku využít i jako nástroj pro vzdělávání.



Obr. 3. Schéma proteinového profilování.



Obr. 4. Výkladový slovník.

Literatura:

1. Jelínková B: Bakalářská práce, VŠCHT, Praha 2011.
2. <http://www.uhkt.cz/files/proteomika>, staženo 20. prosince 2010.
3. Maguire PB, Fitzgerald DJ: *J. Thromb. Haemost.* 1, 1593 (2003).
4. Uhlen M: *New Biotechnol.* 29, 23 (2012).
5. Barbe L, Lundberg E, Oksvold P, et al.: *Mol. Cell Proteom.* 7(3), 499 (2008).
6. <http://www.proteinatlas.org/about/project>, staženo 28. listopadu 2012
7. <http://www.atlasantibodies.com/hpa/portal>, staženo 28. listopadu 2012

Souhrn

Jelínková B.: Atlas lidských proteinů

Proteomický projekt The Human Protein Atlas vznikl v roce 2003 ve Stockholmu s cílem prostudovat lidský proteom pomocí proteomických metod využívajících protilátky. Jednotlivé kroky zahrnují generaci protilátky, imunizaci, afinitní purifikaci, imunohistochemickou a imunofluorescenční analýzu, tvorbu anotací a obrazové části. Vznikla tak veřejně dostupná databáze, kterou využívá celá řada laboratoří po celém světě.

Klíčová slova: atlas lidských proteinů, proteomika, profilování proteinů.

Summary

Jelínková B.: The Human Protein Atlas

Proteomic project The Human Protein Atlas was founded in 2003 in Stockholm to study the human proteome using antibody-based proteomics. The process includes the generation of antibodies, immunization, affinity purification, immunohistochemical and immunofluorescence analysis, annotation and image formation section. The result is the public database, which is used by many laboratories around the world.

Keywords: atlas of human proteins, proteomics, protein profiling.

VÔNE A OCHUCOVADLÁ PRIPRAVOVANÉ FERMENTÁCIOU

Katarína Hlat-Glembová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, katarina.hlat-glembova@vscht.cz

Úvod

Vône a ochucovadlá nachádzajú široké uplatnenie v potravinárskom, kozmetickom, chemickom a farmaceutickom priemysle. Mnohé látky sú získavané hlavne pomocou chemickej syntézy alebo pomocou extrakcie. V poslednom období ale došlo k rapidnému rozvoju prípravy látok pomocou biotechnologických metód. Medzi tieto metódy patrí napríklad príprava pomocou rastlinných bunkových kultúr, príprava látok pomocou reakcií katalyzovaných enzýmami, izolovanými alebo pripravenými rekombinantnými metódami, a tiež príprava látok s použitím mikrobiologických kultúr takzvanou mikrobiologickou fermentáciou. V tomto článku sa zameriame hlavne na vybrané látky pripravené pomocou mikrobiologickej fermentácie¹.

Vybrané látky pripravované pomocou mikrobiologickej fermentácie

Vanilín

Je jedným z najčastejšie používaných ochucovadiel, hlavne v potravinárskom priemysle. Je prítomný v strukoch rastliny *Vanilla planifolia*, z ktorej sa prvotne izoloval. Tento spôsob získavania sa ale javí ako veľmi neefektívny s nízkym výťažkom a je tiež pomerne dosť nákladný. Preto boli vyvinuté nové metódy získavania vanilínu. Chemická syntéza je ďalšia z metód získavania vanilínu použitím guajakolu. Táto reakcia poskytuje lepšie výťažky a získaný vanilín je cenovo dostupnejší ako vanilín izolovaný extrakciou z rastlinného zdroja. Nevýhodou látok pripravovaných chemickou syntézou

je ich možná toxicita, ktorá ich môže robiť rizikovými pre požívanie v potravinárskom priemysle². Práve to je jeden z dôvodov rapidného rozvoja prípravy vanilínu pomocou biotechnologických metód, hlavne využitím mikrobiologickej fermentácie. Na výrobu sa dá použiť hneď niekoľko prekursorov, najčastejšie používaná kyselina ferulová sa pomocou huby *Aspergillus niger* transformuje na kyselinu vanilovú tá je pomocou *Pseudomonas cinnabarinus* redukovaná na vanilín. Podobná dvojkroková konverzia kyseliny ferulovej na vanilín sa dá docieľiť aj s použitím baktérií a to konkrétne *Pseudomonas putida* a *Streptomyces setonii*. Medzi ďalšie prekursorov patrí napríklad koniferylaldehyd a isorhapontin, z ktorých sa použitím kmeňov baktérií *Arthrobacterium*, *Corynebacterium* a *Pseudomonas* vyrába vanilín pomocou jednokrokovej konverzie³.

Benzaldehyd

Je využívaný hlavne kvôli svojej schopnosti imitovať ovocné príchuť, hlavne čerešňovú príchuť. Ročne je spotrebovaných okolo 7 000 ton tejto látky. Prírodné sa benzaldehyd extrahuje z ovocných jadier. Pri tomto spôsobe extrakcie ale hrozí vznik neželanej kyseliny kyanovodíkovej. Chemicky je možné benzaldehyd pripraviť napríklad chloráciou a následnou oxidáciou toluénu. Biotechnologicky sa pripravuje z fenylalanínu pomocou baktérie *Pseudomonas putida*, alebo sa na jeho produkciu používajú huby *Trametes suaveolens*, *Polyporus tubrastrer*, *Bierkandera adusta* a *Phanerochaete chrysosporium*³.

4-(p-hydroxyfenyl)butan-2-on

Nazývaný triviálne aj malinový ketón, je prítomný hlavne v malinách a inom bobulovom ovocí z ktorého sa tiež extrahuje za účelom použitia v potravinárstve, na imitáciu malinovej príchute. Tento spôsob extrakcie však poskytuje veľmi malé výťažky. Z jedného kilogramu ovocia je možné získať približne asi len 35 mg cieľovej látky. Biotechnologicky sa pripravuje pomocou prekursoru betulosidu získavaného z kôry drevín ako javor a breza. Na konverziu sa používajú huby *Aspergillus niger* alebo *Candida boidinii* ².

Methylketony

Patria medzi skupinu látok ktoré môžu vznikáť aj priamo počas fermentačných procesov v niektorých syroch, ako napríklad Camembert, Roquefort alebo Stilton. Tvoria základ syrovej príchute. Produkované sú hlavne hubou *Penicillium roqueforti* ^{1,4}.

Diacetyl

Je neslávne známy hlavne pre jeho neželaný výskyt v pive. V potravinárskom priemysle je ale veľmi často používaný ako imitácia maslovej príchute, pridávaný najmä do pukancov a mliečnych výrobkov. Produkovaný je hlavne kmeňmi baktérií *Lactobacillus* a *Lactococcus* v médiách so škrobovým základom ¹.

Alkoholy

Medzi najvýznamnejšie alkoholy využívané hlavne v parfumérstve a kozmetickom priemysle patrí 2-fenylethanol. Významný je pre svoju arómu pripomínajúcu ruže, z ktorých je práve extrahovaný, avšak tento spôsob je dosť nákladný. Chemicky sa vyrába z toluénu, benzénu a styrénu. Čoraz väčší dopyt po prírodnom 2-fenylethanolu spôsobil rozvoj prípravy tejto vonnej látky biotechnologickou cestou a to fermentáciou 2-fenylalanínu pomocou kvasiniek ako *Sacharomyces cerevisiae* a *Kluyveromyces marxianus* ².

Terpény

Tvoria základné zložky pre rôzne vône napríklad citrionellol a geraniol pripravované v prítomnosti húb *Ceratocystis variispora* sú využívané pre ich ruži podobné arómy. Linalol pripravovaný fermentáciou pomocou *Kluyveromyces lactis* je cenený pre jeho citrusovú vôňu ⁵.

Laktony

Patria po chemickej stránke medzi cyklické estery odvodené od primárnych gama- a delta-hydroxykyselín. Ich biotechnologická syntéza je známa už od 60. rokov minulého storočia. Významné sú hlavne v potra-

vinárstve pre širokú škálu príchuť, ktoré môžu jednotlivé laktóny imitovať. Sú to rôzne ovocné príchute, ďalej kokosová, maslová, krémová alebo oriešková príchuť. Niektoré môžu vznikáť samovoľne, napríklad pri zahrievaní mlieka, a sú zodpovedné za charakteristickú arómu horúceho mlieka. Jedným z významných zástupcov laktónov je 6-pentyl-2-pyron cenený pre kokosovú arómu. Pripravovaný je použitím húb *Trichoderma viride* alebo *Cladosporium suaveolens*. Vznikajúci produkt pôsobí inhibične na použité bunkové kultúry producentov. Je preto nutné ho počas biokonverzie priebežne odčerpávať ^{1,5}.

Pyrazíny

Zvýšenie dopytu po látkach patriacich medzi pyrazíny môžeme sledovať hlavne v spojení so zavedením nových technológií tepelnej úpravy potravín. Jedná sa najmä o úpravu s použitím mikrovln, pri ktorej nedochádza v potravinách k Maillardovej reakcii (alebo karamelizácii) pri ktorej reagujú neredukujúce cukry s proteínmi sa vzniku hnedého zafarbenia a charakteristickej vône pečeného alebo smaženého jedla. Za túto vôňu a príchuť sú zodpovedné práve pyrazíny, ktoré je preto nutné do týchto jedál pridávať dodatočne, pre zachovanie ich atraktivity. Jedným z často používaných pyrazínov je napríklad tetramethylpyrazin so špecifickou arómou a príchuťou pripomínajúcou pečené jedlo a oriešky ^{1,6}.

Estery

Produkované hlavne kvôli ich ovocným príchuťam. Napríklad ethyl-2-methylbutyrát používaný ako jablková príchuť je produkovaný kvasinkami *Geotrichum klebahnii*. Isoamylacetát sa zase používa ako potravinárske aditívum pre jeho banánovú príchuť. Tvorí produkt fermentácie pomocou *Pichia anomala* ⁵.

Záver

V posledných rokoch došlo k rozvinutiu nových metód získavania látok používaných hlavne pre ich aromatické a senzorické vlastnosti. Sú to hlavne rôzne ochucovadlá používané v potravinárskom priemysle a vône využívané v kozmetickom priemysle a parfumérstve. Látky pripravované pomocou biotechnologických metód v tomto prípade konkrétne mikrobiologickou fermentáciou, sú vhodné tiež pre použitie v potravinárskom priemysle. Na rozdiel od látok pripravovaných pomocou chemickej syntézy, sú tieto látky považované za prírodné, čím sú spolu s látkami získavanými izoláciou s prírodných zdrojov považované za zdravie neškodlivé, a požívateľné.

Literatúra:

1. Longo MA, Sanromán MA: *Food Technol. Biotechnol.* 44, 335 (2006).
2. Vandamme EJ, Soetaert B: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 1323 (2002).
3. Van Den Brecht K, Gasarabi G, Delvaux F, et al.: *Belgian J. Brewing & Biotech.* 24, 31 (1999).

4. Hausler A, Munch T: *ASM-News* 63, 551 (1997).
5. Janssens L, De Pooter HL, Schamp NM, et al.: *Process Biochem.* 27, 195 (1991).
6. Demain AL, Jackson M, Trenner NR: *J. Bacteriol.* 94, 323 (1967).

Súhrn

Hlat-Glembová K.: Vône a ochucovadlá pripravované fermentáciou

Organické látky používané ako vône a ochucovadlá je možné získať izoláciou z prírodných zdrojov alebo pomocou chemickej syntézy. V posledných rokoch vzrástla produkcia týchto látok pomocou biotechnologických metód. Jednou z týchto metód je napríklad mikrobiologická fermentácia. Vône a ochucovadlá pripravované pomocou biotechnologických metód sú na rozdiel od látok získavaných extrakciou z prírodných zdrojov cenovo dostupnejšie. Na rozdiel od látok pripravovaných chemickou syntézou sú považované za prírodné, preto našli široké uplatnenie nielen v parfumérstve, kozmetickom a hlavne v potravinárskom priemysle.

Kľúčové slová: vône, ochucovadlá, fermentácia

Summary

Hlat-Glembová K.: Fragrances and flavors prepared by fermentation

Organic compounds used as flavours and fragrances could be extracted from their natural source or prepared by chemical synthesis. There is an increased production of these compounds by using biotechnology methods in last few years. One of these methods is microbiological fermentation. Fragrances and flavours prepared by biotechnology methods are cheaper than substances obtained by extraction from natural sources. In comparison to substances prepared by chemical synthesis, they are considered as natural products and are widely used in perfumery, cosmetic and food industry.

Keywords: fragrances, flavors, fermentation

PŘÍPRAVA REKOMBINANTNÍCH PROTILÁTEK

Fojtíková Lucie

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

Úvod

Produkce rekombinantních protilátek prochází revolučním vývojem, jenž je úzce spjat s rozmachem moderních molekulárně-biologických metod pro expresi rekombinantní DNA. Rekombinantní protilátky a fragmenty protilátek jsou všudypřítomné, hrají důležitou roli ve výzkumu, využívají se jako detekční činidla v metodách jako je imunoblot, imunohistochemie, průtoková cytometrie. Své uplatnění nachází v diagnostice některých onemocnění. V posledních letech se hojně využívají k terapeutickým účelům, zejména v oblasti onkologie, autoimunitních a infekčních chorob.

Rekombinantní protilátky

V souvislosti s protilátkami se můžeme setkat s pojmy polyklonální, monoklonální a rekombinantní. Polyklonální protilátky představují směs molekul imunoglobulinů různé afinity a specifity. Vznikají v organismu po vniknutí cizorodého imunogenu. Monoklonální protilátky lze charakterizovat jako chemické individuum. Všechny molekuly vznikající protilátek vykazují při interakci s antigenem stejnou afinitu a specifitu. Příprava těchto protilátek vyžaduje imunizaci zvířete a následnou selekci hybridomů. Hybridomy se připravují *in vitro* fúzí slezinových buněk imunizovaného zvířete s nádorovými buňkami. Namnožením hybridomových buněk vzniká hybridomová linie, která není omezena v počtu dělení, je tudíž nesmrtelná, a současně produkuje monoklonální protilátku s unikátní specitou^{1,2}.

Jako rekombinantní protilátky označujeme protilátky připravené rekombinantní technologií. Při jejich přípravě lze pomocí genových manipulací lépe ovlivnit specifitu vznikajících protilátek než změnou struktury imunogenu při tvorbě protilátek polyklonálních nebo selekcí hybridomových buněk při výrobě protilátek monoklonálních. Příprava rekombinantních protilátek vychází z izolace genů kódujících protilátku, klonování

izolovaných genů a jejich exprese. Produkovaný mohou být různé typy fragmentů imunoglobulinové molekuly obsahující vazebnou doménu pro antigen, jako je např. Fab fragment, scFv fragment nebo variabilní úseky $V_H + V_L$ řetězců^{1,2,3}.

Prvním krokem při produkci rekombinantních protilátek je izolace mRNA z buněk produkujících protilátku, může se jednat o lymfocyty pocházející z krve imunizovaných i neimunizovaných jedinců, hybridomové buňky nebo buňky slezinové. Podle templátu mRNA je reverzní transkripce syntetizován řetězec komplementární DNA (cDNA) a následně je pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) namnožen specifický gen pro vazebný fragment protilátky. Další postup spočívá v klonování genu do vhodného vektoru a vnesení vektoru do vhodných expresních systémů, mezi něž patří zejména bakteriální, kvasinkové, hmyzí a savčí expresní systémy^{1,4,5}.

Exprese v bakteriích

Bakterie *Escherichia coli* se stala prototypem buněk pro produkci protilátek, u nichž není vyžadována posttranslační modifikace. Pro klonování do *E. coli* se jako vektorů užívá fagemidů, plazmidů nebo fágů. Fagemid neobsahuje na rozdíl od fágové DNA informace k množení fágů, proto musí být buňky se zavedeným fagemidem infikovány tzv. pomocným fágem, který zajišťuje produkci fágových částic, ve kterých je obsažena DNA fagemidu. Klonování do fágových vektorů má výhodu v tom, že fágy obsahují genetickou informaci k dalšímu množení. Na základě této vlastnosti lze vypracovat účinné selekční systémy napodobující přirozenou selekci protilátek v imunitních systémech živočichů. Protilátky jsou v bakteriálních systémech exprimovány do cytozolu nebo ve formě inkluzních tělísek. Hlavními přednostmi bakterií je růst v levném médiu, vysoká výtěžnost a časová nenáročnost. Jistým omezením je absence eukaryotních posttranslačních systémů a malá

molekulová hmotnost exprimovaného proteinu, která dosahuje jen cca 150 kDa, což odpovídá velikosti jedné molekuly imunoglobulinu IgG^{1,3,5,6}.

Expres v kvasínkách

Kvasinky disponují na rozdíl od bakterií celou řadou mechanismů pro posttranslační úpravy podobné těm v buňkách vyšších eukaryot. Možnost pěstování kvasinek v haploidním i diploidním stavu umožňuje jejich křížení pro získání hybridního potomstva s kombinací genetické výbavy rodičovských buněk. Nejpožívanějšími a nejprostudovanějšími kvasinkami jsou *Pichia pastoris* a mutanti *Saccharomyces cerevisiae*. Protilátky mohou být v kvasínkách produkovány do cytozolu nebo secernovány do růstového média. Lokalizaci lze ovlivnit výběrem expresního vektoru. Předností je mimo vhodné posttranslační modifikace vznikajících protilátek schopnost produkce proteinů větších než 150 kDa a finanční dostupnost. Doba přípravy expresního systému je ve srovnání s *Escherichia coli* delší. Pro oba systémy je charakteristický rapidní buněčný růst, řádově desítky minut^{4,5}.

Hmyzí buňky

Hmyzí buňky představují všestranný eukaryotický systém pro expresi heterologních proteinů. Nejrozšířenějším vektorem pro hmyzí buňky je bakulovirový vektor. Posttranslační modifikace, které jsou často identické s procesy v savčích buňkách, se odehrávají v bakuloviry infikovaných buňkách jako je např. *Spodoptera frugiperda*. Bakuloviry nejsou pro savce infekční, proto není potřeba žádné zvláštní bezpečnostní opatření. Výhodou systému je rozpustnost produkovaných protilátek, na rozdíl od bakteriálních expresních systémů, kdy je většina produkovaných protilátek ve formě nerozpustných inkluzních tělísek. Bakulovirový systém je náročný na provedení a je nevýhodný z hlediska financí. Tyto nevýhody jsou však kompenzovány vyššími výtěžky ve srovnání s živočišnými expresními systémy^{5,6}.

Savčí buněčné linie

Savčí buněčné linie, zejména HEK (linie lidských embryonálních ledvinných buněk), CHO (linie ovariálních

buněk křečka čínského) se využívají k produkci protilátek určených k terapeutickým účelům. Pokud je mRNA izolována z hybridomové linie, jsou pomocí PCR amplifikovány úseky genů myšího imunoglobulinu, který kóduje hypervariabilní domény CDR nebo i části konstantních řetězců. V případě, kdy se hypervariabilními myšími úseky nahradí CDR lidského imunoglobulinu, mluvíme o humanizované protilátce. Pokud dojde k náhradě nejen hypervariabilních úseků, ale také části konstantních řetězců myšími sekvencemi, mluvíme o chimérických protilátkách. Možností je také příprava plně humánních protilátek připravených technikami fágového nebo ribozomálního displeje. Geny kódující chimerickou, humanizovanou, nebo plně lidskou monoklonální protilátku jsou pak vloženy do vhodné savčí buňky, ve které jsou syntetizovány. Takto připravené protilátky se staly nedílnou součástí léčby onkologických, autoimunitních a infekčních onemocnění, např. Rituximab, Alemtuzumab. Rituximab je jednou z prvních protilátek, které pronikly do klinického užití, využívá se k terapii folikulárního lymfomu. Alemtuzumab je humanizovaná protilátka určená k terapii chronické lymfatické leukemie s delecí krátkého raménka 17. chromozomu. Savčí expresní systémy jsou v produkci rekombinantních protilátek hojně rozšířeny, neboť zajišťují správnou posttranslační modifikaci protilátek, vysokou kvalitu protilátek a nízké riziko imunogenicity. Nedostatkem těchto systémů je časová náročnost, nízký výtěžek a finančně náročná kultivace^{5,6,7}.

Závěr

V posledních letech došlo k rozvoji různých expresních systémů pro produkci rekombinantních protilátek, avšak stále platí, že savčí buněčné linie jsou jedinou možností pro produkci protilátek určených k terapeutickým účelům. Důvod je prostý, správná posttranslační modifikace produkovaných protilátek. Pro účely jiné než terapeutické, kde správná posttranslační modifikace není nezbytně nutná, lze využít levnější alternativu, a to bakteriální, hmyzí nebo kvasinkové expresní systémy.

Literatura:

1. Fukal L, Holubová B (2007): *Imunochemie a imunoanalýza*. (Fukal L. ed.), Praha, 128, ISBN 978-80-239-8903-8.
2. Králová B (2001): *Bioanalytické metody*. 3. přeprac. vyd. Praha, 254 ISBN 80-708-0449-1.
3. <http://alttox.org/ttrc/emerging-technologies/cell-based/way-forward/echko-dozier>.

4. <http://www.springerprotocols.com>.
5. Schirrmann T: *Frontiers. Biosci.* 4576 (2008).
6. Fusek M (2012): *Biologická léčiva: teoretické základy a klinická praxe*. Grada, Praha, 219 ISBN 9788070808108.
7. Dübel S: *App Microbiol. Biotechnol.* 74(4), 723 (2007).

Souhrn

Fojtíková L.: Příprava rekombinantních protilátek

Rekombinantní protilátky jsou nejrychleji se rozvíjející třídou terapeutických proteinů, mimo to hrají klíčovou roli ve výzkumu a diagnostice. Z důvodu rostoucího zájmu o rekombinantní protilátky dochází k rozvoji různých produkčních systémů zahrnujících bakterie, kvasinky, hmyzí buňky a savčí buněčné linie. V současné době jsou rekombinantní protilátky, které jsou určené k terapeutickým účelům, produkovány výhradně savčími buněčnými liniemi z důvodu minimalizace rizika imunogenicity, která je u ostatních produkčních systémů způsobena nesprávnou posttranslační modifikací, zejména glykosylací. Nicméně pro účely *in vitro* diagnostiky je „správná“ posttranslační modifikace protilátek nepodstatná a tyto protilátky mohou být produkovány v ostatních expresních systémech. V článku jsou popsány různé expresní systémy pro produkci rekombinantních protilátek s ohledem na jejich výhody a omezení.

Klíčová slova: rekombinantní protilátky

Summary

Fojtíková L.: Preparation of recombinant antibodies

Recombinant antibodies are the fastest growing class of therapeutic proteins, besides that they play a key role in research and diagnostics. Various production systems including bacteria, yeast, insect cells and mammalian cell lines are being developed due to a growing interest in recombinant antibodies. Recombinant antibodies, which are intended for therapeutic purposes, are currently exclusively produced in mammalian cell lines to ensure minimal risk of immunogenicity caused by non-human posttranslational modifications, in particular glycosylation. However, the „correct“ posttranslational modification of antibodies is irrelevant for *in vitro* diagnostic purposes. These antibodies can be produced in other expression systems. The article describes the different expression systems for production of recombinant antibodies with respect to their advantages and limitations.

Keywords: recombinant antibodies

BIOPESTICIDY

Jan Andrejch

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

Biopesticid je výraz vzniklý ze spojení „biologický pesticid“. Jako biopesticidy jsou označovány látky přírodního původu, mikroorganismy, případně látky produkováné geneticky modifikovanými rostlinami, které slouží k hubení nebo kontrole populací škůdců rostlin. Hlavní předností biopesticidů je především jejich velmi vysoká specifita vůči konkrétním škůdcům, takže nehrozí nebezpečí otravy potravy, vody, zvířat nebo lidí. Ve většině případů neovlivňují negativně nebo vůbec fotosyntézu, růst nebo fyziologii ošetřovaných rostlin.

Zdrojem biopesticidů jsou různé produkty metabolismu mikroorganismů nebo některých druhů rostlin, které slouží pro daný druh jako obranné mechanismy nebo jsou příčinou jejich toxicity a patogenity vůči škůdcům. Principem použití biopesticidů je přenést tyto látky mimo oblast jejich normálního výskytu a využít je k ochraně cílových rostlin, ať již formou postřiku, pomocí osídlení rostliny či jejího životního prostředí daným mikroorganismem nebo genetickou modifikací, díky níž rostlina produkuje biopesticid sama.

Biopesticidy se dělí do třech hlavních skupin: mikrobiální, biochemické a biopesticidy začleněné do rostlin. Toto rozdělení však nemá ostré hranice a některé látky mohou spadat do více kategorií¹. Mnoho průmyslově produkováných biopesticidů obsahuje kombinaci různých účinných látek a mikroorganismů.

Druhou možností je biopesticidy dělit podle cílového organismu na bioinsekticidy, biorodenticidy, bioherbicidy a další.

Mikrobiální biopesticidy

Mezi mikrobiální biopesticidy se řadí bakterie, plísňe a viry napadající škůdce. Podle některých dělení do této kategorie patří také metabolické produkty bakterií či plísňí, jindy řazené mezi biochemické pesticidy, a často se do ní řadí entomopatogenní hlístice, přestože se jedná o mnohobuněčné organismy.

Nejnámějším a nejvyžívanějším mikrobiálním biopesticidem je Bt toxin izolovaný z bakterie *Bacillus thuringiensis*. Její spory byly od roku 1938 produkovány průmyslově jako insekticid, později byl identifikován Bt toxin jako složka působící toxicky proti hmyzu². Bt toxiny patří do skupiny tzv. Cry proteinů, které působí toxic-
ky po proteolytickém rozštěpení v trávicím traktu hmy-

zu. Jejich geny jsou ve většině kmenů *B. thuringiensis* přítomny na plasmidech³, což umožňuje jejich včlenění do genomu rostlin produkujících pak Cry proteiny a tedy odolných vůči široké škále škůdců. Bt toxiny jsou specifické vůči různým druhům motýlů (a jejich housenkám), hmyzu, dvoukřídlym, blanokřídlym, broukům a hlísticím, a bez potvrzeného toxického efektu vůči lidem, zvířatům nebo opylovačům rostlin⁴.

Hlístice lze rozdělit na škůdce, kteří napadají rostliny a slouží jako přenašeči dalších rostlinných patogenů, a na potenciálně prospěšné hlístice, které napadají housenky různých druhů motýlů a další škůdce páčající významné škody na úrodě. Jako příklad lze uvést běžně využívanou hlístici *Steinernema feltiae* napadající housenky různých motýlů⁵ a *Phasmarhabditis hermaphrodita* napadající slimáky⁶.

Dalším často využívaným mikrobiálním bioinsekticidem jsou některé druhy entomopatogenních plísňí, jejichž spory se uchycují na kutikule hmyzu a po čase prorůstají do tělní dutiny, což vede k jeho usmrcení. Jednou z takto využívaných plísňí je například *Metarhizium acridum*, která napadá kobylky. Je běžně využívána ke kontrole populací saranče pustinné v Africe, kde působí velké škody na úrodě. Nevýhodou využití *M. acridum*, a mykoinsekticidů obecně, je dlouhá doba, po které dojde k usmrcení napadených jedinců. Nicméně, na rozdíl od tradičních insekticidů, nedochází k následným otravám ptáků a dalších přirozených predátorů sarančat⁷.

Některé plísňe se využívají i při obraně proti chorobám rostlin, obvykle díky jejich vzájemné konkurenci, antibiose, hyperparasitismu nebo indukci rostlinné resistance. Většina používaných preparátů je odvozena od *Trichoderma* sp., především *T. harzianum*, endofytické symbiotické plísňe, indukující u rostlin odolnost vůči řadě patogenů⁸. Plíseň *Ampelomyces quisqualis* je běžně využívaným hyperparasitem, zpomalujícím nebo inhibujícím růst plísňí napadající řadu rostlin a způsobujících onemocnění zvané padlí⁹.

Populace některých hmyzích škůdců lze kontrolovat i pomocí vysoce specifických virů. Jako příklad lze uvést virus CpGV (Cydia pomonella granulosus virus), granulovirus napadající housenky obaleče jablečného, běžně používaný v zemědělství¹⁰, či vir AgDNV (Anopheles

gambiae densonucleosis virus), napadající komáry přenášející malárii, jehož využití je předmětem intenzivního výzkumu¹¹.

Pomocí mikrobiálních biopesticidů je možné kontrolovat i populace živočišných škůdců, jako jsou myši, syši a hraboši, nejčastěji s využitím bakterií rodu *Salmonella*. Biologické rodenticidy nicméně často trpí nespecifitou a při jejich použití může hrozit poškození zdraví lidí nebo domácích a hospodářských zvířat^{12,13,14}.

Existuje i nemalé množství bioherbicidů využívajících bakterie a plísňe specificky patogenní pro některé druhy trav a dalších plevelů, využívány jsou např. rody *Pseudomonas* a *Xanthomonas*^{15,16} a mnoho druhů plísní^{17,18}. Bioherbicidy naneštěstí někdy trpí nespecifitou, jak dokazuje případ plísně *Fusarium oxysporum*, jejíž užití se zvažovalo v boji proti produkci kokainu, protože je známa jako přirozený patogen koky, nicméně některé kmeny napadají i hospodářské plodiny a přesné mechanismy určující specifitu kmenů nejsou známy¹⁹.

Biochemické pesticidy

Do této kategorie se řadí přirozeně se vyskytující látky, toxické pro škůdce, jako jsou alkaloidy, terpenoidy, fenolické látky a metabolity mikroorganismů. Zároveň do této kategorie patří i přírodní látky, které ovlivňují hmyzí populace netoxickým způsobem, jako například feromony.

Mnoho extraktů z rostlin je známo pro své pesticidní účinky, jejich účinné látky byly často charakterizovány teprve nedávno. Jako příklady lze uvést např. alkaloidy z jerlínu žlutavého působící proti širokému spektru plísní, bakterií a hlístic²⁰, nebo naditce jehnědokvětého omezující plísňové infekce rostlin²¹. Za terpenoidy lze uvést linalool (3,7-dimethyl-1,6-oktadien-3-ol), který se vyskytuje např. v citrusích a je toxický pro klíšťata a vši.²² Fenolické látky mají obecně pesticidní účinky proti hmyzu a vyvíjené preparáty se zaměřují na jejich účinek proti mšicím. Druhou možností jsou látky zvyšující produkci fenolických látek v rostlinách, a tak zvyšují přirozenou resistenci rostlin^{23,24,25}. Pro své pesticidní účinky jsou využívány i přípravky z řepky²⁶ a česneku²⁷.

V zemědělství je při ochraně obilných zrn při skladování využíván přípravek Spinosad, obsahující Spinosyn A a D, izolovaný z bakterie *Saccharopolyspora spinosa*, který je při kontaktu i požití toxický pro řadu hmyzích škůdců²⁸.

Významným biochemickým pesticidem je polysacharid chitosan, získávaný deacylací chitinu ze schránek korýšů. Kromě jiného je využíván i v zemědělství pro své podpůrné účinky. Zvyšuje rychlost růstu rostlin a příjmu živin a zlepšuje přirozenou resistenci rostlin vůči škůdcům a chorobám²⁹.

Netoxickým způsobem kontroly populací hmyzu je využití feromonů. Použití feromonů je vysoce druhově

specifické a je využíváno v tzv. „feromonových pastech“, které mohou sloužit k odchytu hmyzu, ale také detekci přítomnosti daného druhu v oblasti, nebo naopak jeho odpuzování. Časté je také využití feromonů k narušení sexuálního chování jedinců daného hmyzu, nejčastěji rozprášením feromonu v dané oblasti. Hmyzí samci jsou pak přitahováni k rozprášenému feromonu přítomnému ve vysoké koncentraci a nikoliv k samicím, díky čemuž dochází k páření jen v omezené míře³⁰.

Specifické biochemické herbicidy užívané ve větším měřítku prakticky neexistují.

Látky začleněné do rostlin

Látky v této kategorii jsou někdy nazývány „PIP“ z anglického „Plant Incorporated Pesticides“. Jedná se o látky produkované přímo rostlinou díky začlenění cizího genu do jejího genomu. Jako zdrojové jsou používány často geny původní pro druhy zmiňované v sekci mikrobiálních biopesticidů zodpovědné za jejich toxické účinky nebo geny zlepšující přirozenou resistenci rostlin vůči škůdcům a patogenům. Použití PIP je prozatím velmi omezené, především kvůli legislativním problémům a špatnému přijetí veřejností. V současnosti jsou používány téměř výhradně geneticky modifikované rostliny obsahující geny pro již zmiňované Cry proteiny z *Bacillus thuringiensis*^{31,32}.

Pro ochranu před plevely se obvykle využívá genetických modifikací, které ale nespádají do kategorie biopesticidů. Do rostliny je vložen gen pro resistenci k tradičnímu herbicidu (např. glyfosát), kterým je následně pole ošetřeno a díky resistenci dochází k úhynu pouze plevelů. Tento přístup však vede ke stále se zvyšujícímu množství plevelů resistantních k tradičním herbicidům³³.

Závěr

Produkce biopesticidů v posledních několika desetiletích neustále narůstá a obzvláště v poslední době je jejich výzkumu a vývoji věnováno velké úsilí. Biopesticidy představují velmi lákavou alternativu k tradičním chemickým pesticidům, především kvůli své vysoké specifitě vůči škůdcům. U mnoha druhů škůdců se navíc stále častěji objevuje resistance na tradiční pesticidy a je nezbytný vývoj nových a účinnějších prostředků ke kontrole jejich populací. Biopesticidy proto poskytují velmi lákavou alternativu. Na trhu se již nyní vyskytuje řada biopesticidů a počet povolených přípravků i v Evropě stále narůstá. Je ovšem naprosto nezbytné před zahájením masového použití biopesticidů důkladně zvážit jejich případný dopad na ekosystém a ověřit jejich specifitu vůči škůdcům, aby nedocházelo k nevratným škodám na životním prostředí.

Literatura:

1. <http://www.agroenvi.cz/default.asp?ch=135&typ=1&val=34720&ids=0>, staženo 11. listopadu 2012.
2. Lambert B, Peferoen M: *BioScience* 42, 112 (1992).

3. Beegle CC, Takhashi Y: *Can. Entomol.* 124(4), 587 (1992).
4. http://biology.ucsd.edu/news/article_021903.html, staženo 9. listopadu 2012.

5. <http://www.bugsforgrowers.com/products/steinernema-feltiae>, staženo 11. listopadu 2012.
6. Wilson MJ, Glen DM, George SK: *Biocontrol. Sci. Tech.* 3(4), 503 (1993).
7. Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, et al.: *Annu. Rev. Entomol.* 46, 667 (2001).
8. Harman GE, Howell, CR, Viterbo, A, Chet, I, Lorito, M: *Nat. Rev. Microbiol.* 2(1), 43 (2004)
9. Falk SP, Gadoury DM, Pearson RC, et al.: *Plant., Dis.* 79, 483 (1995).
10. Bloomer LHM: *Annu. Rev. Entomol.* 39, 213 (1994).
11. Ren X, Rasgon JL: *J. Virol.* 84(15), 7726 (2010).
12. Wodzicki K: *Bull W H O* 48(4), 461 (1973).
13. http://www.ideassonline.org/pdf/br_24_18.pdf, staženo 10. listopadu 2012.
14. <http://www.biona.ua/en/production/bio-rodenticides/bakteroncid/>, staženo 10. listopadu 2012.
15. Jackson MA, Frymier JS, Wilkinson BJ, et al.: *J Ind Microbiol Biotechnol* 21, 237 (1998).
16. US patent 2006/0147438 A1
17. Kadir J, Charudattan R: *Biol. Control* 17(2), 113 (2000).
18. Moran PJ: *Weed Science Society of America Meeting Abstracts* (Abstrakt, 2007)
19. Bailey BA: *Phytopathology* 85, 1250 (1995).
20. Akdeniz D, Özmen A, Menderes A, et al.: *Caryologia* 64(1), 117 (2011).
21. Raghavendra MP, Satish S, Raveesha KA: *J. Biopestic. 2*(1), 56 (2009).
22. http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-128838_01-Jun-08.pdf, staženo 10. listopadu 2012.
23. Wójcicka A: *Pol. J. Environ. Stud.* 19(6), 1337 (2010).
24. Chrzanowski G: *Pestycydy*, 1(2), 127 (2008).
25. <http://www.marronebioinnovations.com/biopesticides/sample-products/>, staženo 11. listopadu 2012.
26. http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-011332_25-Nov-09.pdf, staženo 11. listopadu 2012.
27. US patent 2008/0214678 A1
28. Hertleina MB, Thompsona GD, Subramanyamb B, et al.: *J. Stored. Prod. Res.* 47(3), 131 (2011).
29. <http://www.yeacrops.com/Elicitor%20-%20Ethylene%20Reduction.pdf>, staženo 11. listopadu 2012.
30. <http://www.unce.unr.edu/publications/files/ag/other/fs9841.pdf>, staženo 11. listopadu 2012.
31. <http://www.epa.gov/scipoly/biotech/pubs/qanda.pdf>, staženo 11. listopadu 2012.
32. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/current_pip_eups.htm, staženo 11. listopadu 2012.
33. Duke SO: *Pest. Manage. Sci.* 61(3), 211 (2005).

Souhrn

Andrejch J.: Biopesticidy

Biopesticidy představují pesticidy založené na mikroorganismech, jejich produktech nebo genetických modifikacích rostlin. Oproti tradičním chemickým pesticidům se vyznačují vysokou specifitou a nízkou nebo žádnou toxicitou vůči nečlověkým druhům a zpravidla jsou založeny na toxickém či patogenním působení biopesticidů vůči škůdcům. Nejvýznamnějšími biopesticidy jsou různé druhy plísní využívané k likvidaci široké škály druhů hmyzu a Bt toxin, produkovaný bakterií *Bacillus thuringiensis* likvidující housenky a různé druhy hmyzu.

Summary

Andrejch J.: Biopesticides

Biopesticides are group of pesticides based on microorganisms, their products or genetic modifications of plants. They are characterized by their great specificity and very low or no toxicity for non-target species. Usually they are based on toxic or pathogenic effects of biopesticides on pests. Most important biopesticides are various fungi species used to eradicate vast spectrum of insects, and Bt toxin, produced by *Bacillus thuringiensis* bacteria and killing caterpillars and insects.

BIOCHEMICKÁ OSMISMĚRKA

Osmisměrka je zábavná hádanka (slovní hlavolam). Jedná se zpravidla o obdélník, ze kterého luštitel vyškrtnává slova, která bývají vypsaná vedle. Biochemická osmisměrka byla vytvořena pro Vaše potěšení v době dovolené. Při hledání vhodného ekvivalentu uvedených 16 pojmů doporučujeme konzultovat knihu M. Kodíčka „Biochemické pojmy“, vydanou vydavatelstvím VŠCHT Praha 2007. Kniha je v elektronické podobě volně přístupná na adrese http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid_isbn-80-7080-551-X/anotace/

M	T	I	R	I	A	L	D	O	S	A	A	C	S	P
G	H	I	S	T	O	N	G	B	I	O	T	I	N	G
K	D	Y	Y	M	O	H	R	E	J	P	Y	L	P	T
O	I	L	T	K	A	R	Q	E	N	A	G	T	J	Z
D	K	F	E	E	C	H	N	W	T	E	L	I	Y	D
O	X	O	F	P	S	K	B	I	P	I	T	D	J	O
N	I	K	L	T	E	T	D	R	T	O	N	I	J	F
T	N	D	N	A	E	K	O	E	E	H	T	O	K	E
K	H	X	O	J	G	T	D	S	N	R	I	I	L	A
R	I	Z	D	Z	E	E	A	Y	T	I	G	N	P	X
D	B	R	Z	A	H	D	N	A	O	E	E	R	U	E
R	I	B	S	Z	E	K	E	N	O	I	R	N	R	T
S	T	A	O	N	I	C	R	Z	U	R	C	O	Y	U
Q	O	J	I	S	U	A	R	B	B	F	T	V	N	D
X	R	N	U	U	I	Z	C	E	L	U	L	O	S	A

1. dusíkatá báze purinového typu
2. monosacharid obsahující aldehydovou skupinu
3. vitamin H, prosthetická skupina zajišťující karboxylaci různých substrátů
4. polysacharid, hlavní stavební materiál vyšších rostlin
5. protein pracující jako molekulární motor
6. konkrétní oblast antigenu, na kterou se váží protilátky
7. věda zabývající se dědičností
8. bazický protein, který se podílí na výstavbě chromatinu
9. látka zpomalující enzymovou reakci
10. označení tří za sebou jdoucích bází v mRNA
11. směs dvou bílkovin, gliadinu a gluteninu, které se nacházejí společně se škrobem v endospermu semen některých obilnin, především pšenice, žita a ječmene
12. alfa-aminokyselina, která není přirozenou součástí bílkovin, nicméně je přítomna v tělech živých organismů
13. enzym, který štěpí peptidové vazby v bílkovinách
14. vitamin A
15. mužský pohlavní hormon
16. extracelulární, ve vodě nerozpustná bílkovina, která je základní stavební hmotou pojivových tkání

O B S A H

Úvodem	17
Informace o Biotechnologickém ústavu, AV ČR	18
Pozvánka na konferenci BioTech 2014 a 6. Česko-švýcarské symposium	21
Jelínková B.: Atlas lidských proteinů	23
Hlat-Glembová K.: Vône a ochucovadlá připravované fermentacíou	25
Fojtíková L.: Příprava rekombinantních protilátek	27
Andrejch J.: Biopesticidy	29
Biochemická osmisměrka	32

C O N T E N T S

Editorial	17
Information about Institute of Biotechnology of the ASCR	18
Invitation to conference BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss symposium	21
Jelínková B.: The Human Protein Atlas	23
Hlat-Glembová K.: Fragrances and flavors prepared by fermentation	25
Fojtíková L.: Preparation of recombinant antibodies	27
Andrejch J.: Biopesticides	29
Biochemical WordFind	32

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.

Lowestein 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