

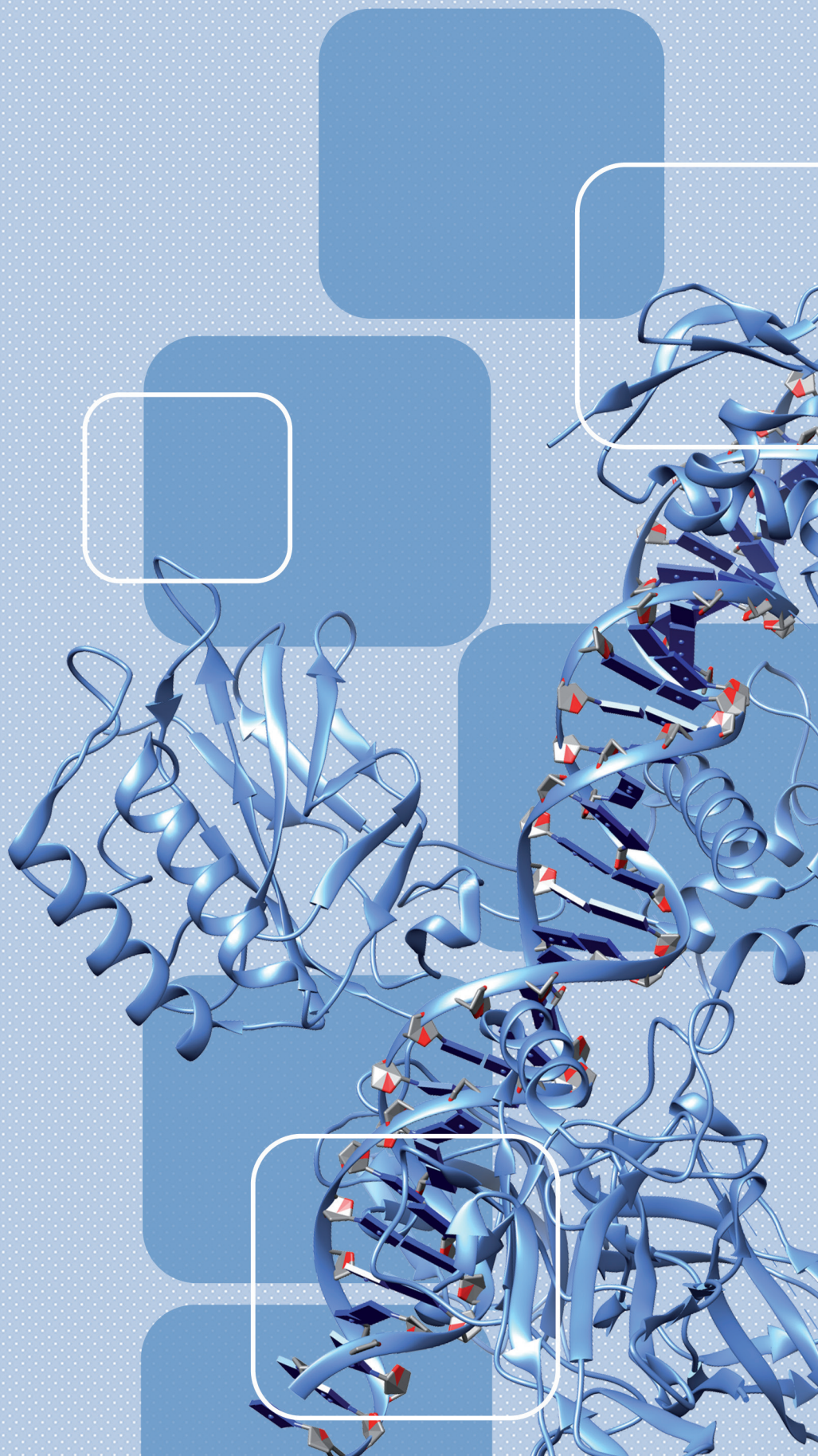
Bio

Ročník 31 • Číslo 1/2021

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)
a
člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

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

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

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

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efbiotechnology.org>**

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

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

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

For more information contacts the editorial board or directly:

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

ÚVODEM

Vážení přátelé,

prvním letošním číslem našeho Biopropectu již vstupujeme do 31 ročníku a rovněž si připomínáme, že máme za sebou již 30 let existence naší společnosti. Doufali jsme, že tuto událost oslavíme organizací již osmého mezinárodního symposia „BIOTECH“, které pravidelně organizujeme se švýcarskými partnery. Když v březnu minulého roku znenadání začala coronavirová pandemie a bylo evidentní, že symposium nebude možné v červnu realizovat, odložili jsme jej o rok v naději, že pandemie COVIDU-19 do té doby odezní. Bohužel jsme se velmi mylili. Na začátku tohoto roku bylo zřejmé, že jej můžeme realizovat pouze ve virtuální formě. Naše původní webové stránky <https://www.biotech2020.cz> jsme upravili na aktuální situaci, tj. na konání symposia ve virtuální formě ve dnech 16. – 18. 6. 2021. Na webových stránkách naleznete nové informace popisující postup při realizaci symposia tímto novým přístupem. V případě účasti na symposiu věnujte těmto novým informacím pozornost.

První onemocnění způsobené koronaviry bylo prokázáno v r. 1930 u kuřat, u lidí až kolem r. 1960. Jednalo se o koronaviry (229E, OC43, NL63 a HKU1), které způsobovaly 10 – 15 % běžných nachlazení, zejména v zimě. V r. 2004 byl u dítěte s bronchitidou v Holandsku prokázán kmen NL63 a v r. 2005 u staršího pacienta s pneumonií v Hongkongu kmen HKU1, který však byl zřejmě rozšířen celosvětově.

V listopadu 2002 se ukázalo, že ne všechny koronaviry způsobují pouhá nachlazení, ale mohou způsobit i smrt. Tento kmen byl označen jako SARS-CoV-2 způsobující „severe acute respiratory syndrome“.

Genom tohoto viru byl identifikován o rok později kanadskou národní mikrobiologickou laboratoří. Tento „smrtící kmen“ vykazuje mnoho podobností se současným pandemickým COVIDEM-19. Další coronavirus označený MERS-CoV (Middle East respiratory syndrom) se vyskytl v Saudské Arábii, Jižní Koreji a pak opět v Saudské Arábii, zde byli infikováni lidé, kteří byli ve styku s velbloudy.

Vakcíny proti SARS-CoV-2 byly připraveny všemi možnými postupy (proti virovému proteinu, mRNA a DNA, inaktivovanému viru i oslabenému viru). Tyto zkušenosti pak byly využity při přípravě vakcíny proti COVIDU-19. Příprava vakcín obvykle trvá 10 – 15 let, před pandemií COVIDU-19 se uvádí nejkratší doba přípravy vakcíny 4 roky. Pandemie COVIDU-19 propukla v březnu 2020 a za 9 měsíců byly schváleny 2 vakcíny v USA (Pfizer/BioNTech and Moderna), v Anglii ještě Astra-Zeneca/Oxford. Dále 64 vakcín je v klinickém testování a z toho 20 již ve třetí fázi.

Masivní proočkování populace se zdá být tím nejúčinnějším způsobem, jak pandemii zkontrolovat. Bohužel nepatříme k zemím, které očkují tak masivně jako USA, Anglie či Izrael. Musíme proto věnovat zvýšenou pozornost opatřením, které brání šíření onemocnění, což je ovšem, mimo jiné, spojeno se zvyšováním zadlužení našeho státu. Věříme, že tuto těžkou situaci zvládneme a vrátíme se brzy ke způsobu života, který máme rádi. Všem Vám přejeme pevné zdraví a těšíme se na osobní setkávání co nejdříve.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

Errata

V Biopropect, 2020, vol. 30, no. 2. v článku **Mikroorganismy kontaminující audiovizuální a fotografické památky kulturního dědictví: izolace a identifikace** byl chybně uveden seznam autorů.

Správně je kolektiv autorů následující: Branyšová, T., Demnerová, K. Durovič M, Stiborová, H.

PROTEOMIKA JAKO HLAVNÍ NÁSTROJ PŘI HLEDÁNÍ BIOMARKERŮ RAKOVINY PANKREATU

Martina Hošková, Tatiana Smirnova

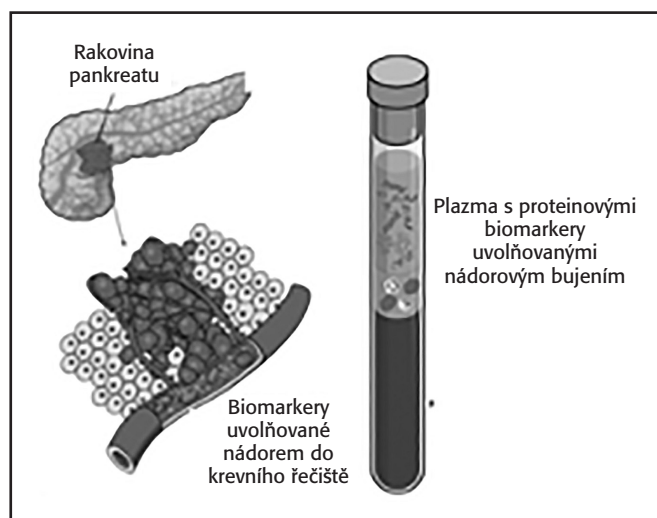
Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; hoskovam@vscht.cz

Úvod

Rakovina pankreatu je vzhledem ke zvyšující se celosvětové incidenci a neklesající mortalitě sedmou nejčastější příčinou úmrtí v souvislosti s onkologickými onemocněními¹. S diagnózou se u pacientů jen zřídka setkáváme v době, kdy je stále možnost chirurgické resekce, která je bohužel vzhledem k velmi invazní a metastatické povaze karcinomu velmi obtížná. Mezi hlavní příčiny obtížné diagnostiky řadíme především pozdní klinické projevy onemocnění, kdy musí dojít ke zničení více než 50 % pankreatické tkáně, nežli bude patrný vliv na trávení^{2,3}. Projevy jsou navíc nespecifické a řadíme mezi ně mimo jiné bolesti břicha a zad a také úbytek hmotnosti⁴. Vzhledem k uložení pankreatu v dutině břišní je i při samotné diagnostice značně omezená přístupnost pro zobrazovací metody⁵. Důležitou roli při včasné diagnostice mají bezpochyby i biomarkery, které mohou být využity již při screeningu populace, avšak v případě rakoviny pankreatu tomuto využití brání malá specifita jediného rutinně používaného biomarkery CA19-9⁶. Z těchto důvodů se v době diagnózy přibližně u 80 % pacientů setkáváme s karcinomem a dobou přežití pouhých 6 měsíců⁷.

Biologický marker

Biologickým markerem (biomarkerem) rozumíme charakteristiku, která je objektivně měřena a hodnocena jako indikátor fyziologických procesů, patologických procesů nebo léčebné odpovědi na terapeutický zásah⁸. Na poli onkologie se nejčastěji setkáváme s biomarkery, které obvykle nejsou přítomny v krevní plazmě, ale v případě rakovinného bujení se zde mohou akumulovat (obr. 1).



Obr. 1: Biomarkery uvolňované nádorem do krevního řečiště.

Této skutečnosti se hojně využívá již při screeningu i u nesymptomatických pacientů, a to především při vyšetření rakoviny prostaty (PSA), rakoviny tlustého střeva (kolonoskopie), rakoviny děložního čípku (Papův nátěr), rakoviny prsu (mamogram). Zavedené a léty ověřené screeningové testy nám zdůrazňují významný potenciál, který biomarkery při včasné diagnostice, která je v souvislosti s rakovinou pankreatu klíčová, bezpochyby mají⁹. Cílem je vyvinout jednoduché a neinvazivní testy, které umožní včasnou detekci, monitorují průběh léčby a také možnou regresi a recidivu onemocnění¹⁰. Obecně mohou panely kombinující jediný rutinně používaný biomarker CA19-9 s jinými novými biomarkery představovat ideální strategii pro zlepšení citlivosti a specifity CA19-9 a jejich následného využití při včasné diagnostice, která je v tomto případě klíčovou^{11,12}.

Proteomika jako hlavní nástroj při studiu biomarkerů

Proteomika se zabývá studiem proteinů, především se zaměřuje na jejich složení, strukturu, funkce, ale také jejich detekci, identifikaci, měření koncentrace a jejich vzájemné interakce^{13,14}. Proteiny, které se za daných podmínek vyskytují v buňce, jsou vzhledem k dynamickým vlastnostem proteomu odrazem jejího aktuálního fyziologického stavu^{15,16}. Díky tomu bylo možné v případě rakovinného bujení identifikovat odlišně exprimované proteiny, které nám mohou sloužit jako biomarkery a významně pomoci při včasné diagnostice a prognóze onemocnění¹⁷. Vzhledem k velkému rozvoji proteomických technik jsou nově identifikované biomarkery většinou právě proteiny¹⁸. Prvním krokem při jejich studiu je separace komplexních vzorků. K následné detekci jsou využívány metody hmotnostní spektrometrie. Posledním krokem při analýze je vzhledem k velkému množství takto získaných dat využití bioinformatických technologií¹⁹.

Biologické vzorky vhodné ke studiu biomarkerů

Současné přístupy při studiu biomarkerů za pomoci proteomického profilování jsou v případě karcinomu pankreatu založeny především na rozdílně exprimovaných proteinech, a to v séru/plazmě, pankreatické šťávě a také přímo v tkáni pankreatu^{20, 21}.

Koncentrace exprimovaných proteinů je nejvyšší v tkáni pankreatu a je zde i největší šance jejich úspěšné detekce. Takto detekované biomarkery mohou být skvělým vodítkem při screeningu běžné populace. Mezi proteiny identifikované v tkáni nalézáme S100 vápník vázající protein A6, annexin A4, cyklofilin A, katepsin D, galektin-1, peroxiredoxin I. Pankreatická tkáň

je však velmi obtížně dostupná a v případě indikace histologického vyšetření se zároveň jedná o značně nepříjemný zákrok pro samotného pacienta^{22, 23}.

Vzhledem k tomu, že patologické změny v organismu je možné identifikovat již v proteinovém složení séra/plazmy a díky relativně snadné a levné dostupnosti tohoto materiálu, je sérum z lékařského hlediska nejbohatším a nejvhodnějším informativním zdrojem. Další předností je, že téměř všechny buňky komunikují s krví a u mnoha z nich dochází při poškození nebo smrti k uvolňování jejich obsahu do krevního řečiště²⁴. Na základě toho bylo identifikováno množství potenciálních biomarkerů rakoviny pankreatu i v séru či plazmě pacientů²¹. Bylo prokázáno, že na základě sérové hladiny α -řetězce proteinu vázajícího se na C4b, je možné od sebe odlišit pacienty s rakovinou od pacientů s chronickou pankreatitidou²⁵. Dalšími identifikovanými jsou proteiny vázající inzulinové růstové faktory IGFBP2 a IGFBP3, které mají schopnost rozlišit od sebe pacienty v rané fázi rakovinného bujení od zdravých kontrol. Kromě toho je diagnostika pomocí kombinace CA 19-9, IGFBP2 a IGFBP3 významně účinnější²⁶.

Zároveň je třeba zdůraznit, že sérum/plazma je zároveň i nejobtížnějším materiálem při studiu potenciálních biomarkerů, a to především kvůli obrovskému koncentračnímu rozsahu přítomných proteinů. Malá skupina abundančních proteinů zde přítomná brání při identifikaci těch, které jsou zastoupeny jen v malém množství²⁷. Z toho důvodu se před samotnou identifikací setkáváme s řadou separačních a deplečních kroků, které jsou často ztěžujícím krokem celé analýzy. Kompromisem mezi těžko přístupnou tkání, a naopak běžně dostupným sérem/plazmou je pankreatická šťáva²¹. Vylučována je přímo z pankreatu, a je tedy bohatým zdrojem specifických proteinů, a to ve vysoké koncentraci. Mezi proteiny identifikované v pankreatické šťávě se řadí například lipocalin 2²⁸. Takto identifikované proteinové biomarkery lze využít při screeningu vysoce rizikových pacientů podstupujících endoskopická vyšetření²¹.

Velké množství takto identifikovaných potenciálních biomarkerů však musí ujít dlouhou cestu s velkým množstvím překážek, nežli bude možné jejich využití v klinické praxi²⁹. Jejich úspěšná validace je nejen finančně a časově velmi náročná, ale také je zde zapotřebí úzké spolupráce mezi výzkumnými pracovníky a těmi v klinické praxi^{30, 31}.

Proteomická analýza

Hmotnostní spektrometrie spolu se separačními metodami jsou ústředními metodami proteomických metod. Během posledních let bylo dosaženo obrovského pokroku jak v separačních technikách a v přístrojové technice hmotnostní spektrometrie, tak v následné analýze naměřených dat pomocí bioinformačních technologií³². Tento pokrok umožnil identifikovat a kvantifikovat velké množství kandidátních biomarkerů onkologických onemocnění. Cílem je objevit rozdíly v proteinovém složení mezi vzorky získanými od zdravých pacientů a pacientů s rakovinou, ale také najít

rozdíly vzhledem ke stadiu onemocnění, ve kterém se pacient právě nachází³³.

Separace proteinů

Vzhledem ke značné komplexnosti biologických vzorků je vhodné před hmotnostní detekcí zavedení separačních kroků, čímž dochází ke zlepšení schopnosti identifikace méně abundančních proteinů, které však mají diagnostický potenciál³¹. Ve skutečnosti tyto proteiny zájmu tvoří pouze 1 % všech proteinů přítomných v séru/plazmě³⁴. Mezi základní typy separace patří elektroforetické a chromatografické metody a také deplece abundančních proteinů^{35, 36}.

Elektroforetické metody

Dvourozměrná elektroforéza (2-DE) se již od svého zavedení v roce 1975 stala jednou z nejběžnějších metod při separaci a analýze proteinů^{14, 37}. Během 2-DE dochází nejdříve v gradientu pH k separaci proteinů dle jejich izoelektrického bodu. Takto separované proteiny jsou následně rozděleny na základě své molekulové hmotnosti v polyakrylamidovém gelu s příměsí dodecylsírany sodného^{38, 39}.

Mezi hlavní nevýhody 2-DE patří časová náročnost, omezený rozsah detekce, špatná reprodukovatelnost a nízká citlivost, kdy dochází k identifikaci pouze nejhodněji se vyskytujících proteinů⁴⁰.

Setkáváme se i s problémy při analýze velmi kyselých, nebo naopak zásaditých proteinů⁴¹. Navzdory těmto nevýhodám je 2-DE velmi často metodou první volby, a to především díky možnosti vizualizace velkého množství proteinů současně. Zároveň je tato metoda schopna porovnat jejich množství a izoformy, které jsou důležité při studiu posttranslačních modifikací, a to v rámci jednoho gelu³⁷.

Chromatografické metody

Jako alternativní metoda k separaci proteinů, vzhledem k nevýhodám 2-DE, se začala hojně využívat kapalinová chromatografie (LC).

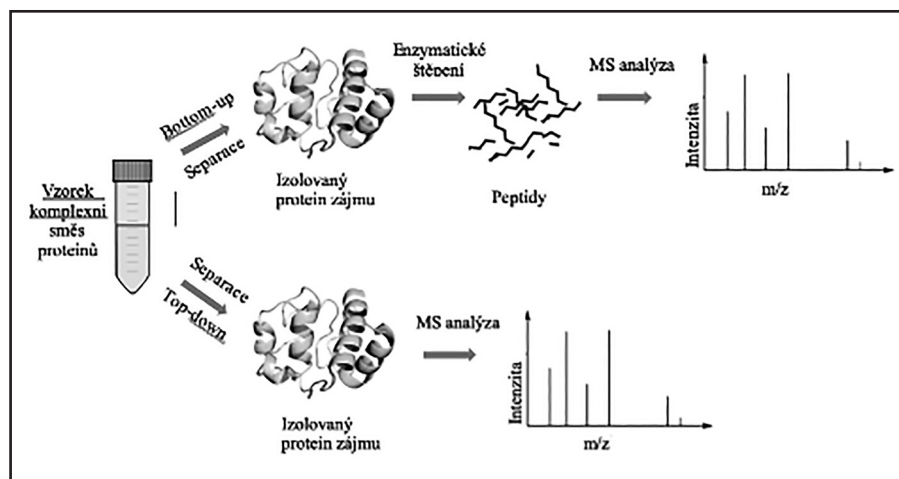
Kapalinová chromatografie poskytuje vysokorychlostní, vysoce citlivé rozdělení s velmi dobrým rozlišením proteinů. Analyty jsou nejdříve přivedeny a zadrženy na koloně, ze které jsou za pomoci vhodné mobilní fáze postupně eluovány⁴². U jednorozměrné kapalinové chromatografie se nejčastěji využívá separace pomocí reverzní fáze, která je založena na hydrofobní interakci proteinů ze vzorku se stacionární fází, která je nepolární. Eluce se provádí mobilní fází – gradientem vody s vodou mísitelným organickým rozpouštědlem, například acetonitrilem. Chromatografii s reverzní fází lze také použít k zakoncentrování nebo odsolení vzorků. V případě dvojrozměrné kapalinové chromatografie jsou proteiny rozděleny nejdříve pomocí chromatografické fokusace a následně pomocí reverzní fáze. Díky tomu dochází ke zvýšení rozsahu proteinové frakcionace, která dramaticky zvyšuje počet detekovaných proteinů s nízkým výskytem, umožňuje detekovat jejich specifické izoformy a posttranslační modifikace. Je zde také umožněno přímé spojení s hmotnostním spektrometrem^{43, 44, 45}.

Deplece proteinů

Deplece abundantních proteinů, které brání identifikaci biomarkerů, je založena na afinitě mezi konkrétním proteinem a jeho ligandem. Pro albumin je vzhledem k jeho nižším nákladům nejčastěji využíváno chlorotriazinové barvivo Cibacron blue⁴⁶. Další možnost představuje použití imunoafinitní chromatografie za použití protilátek anti-HSA, které pomáhají i při identifikaci proteinů na albumin vázaných⁴⁷. Afinitní chromatografie se využívá i při depleci IgG. Jako ligand je zde využíván imobilizovaný protein A nebo protein G^{35, 48}. V dnešní době jsou komerčně dostupné depleční kity pro současné odstranění albuminu a IgG⁴⁹. Předpokládá se, že při depleci 6 až 12 nejhojněji zastoupených proteinů dojde k odstranění přibližně 85 % celkového obsahu přítomných proteinů⁵⁰. Je však nutné zdůraznit, že i přesto, že deplece může pomoci při identifikaci proteinů s nízkým výskytem, může při ní docházet i k jejich nespecifickému odstranění v případě jejich vazby na depleční proteiny⁵¹.

Proteomické přístupy využívané při identifikaci proteinů

K identifikaci proteinů se nejčastěji využívají dvě základní strategie (obr. 2).



Obr. 2: Srovnání proteomických přístupů bottom-up a top-down.

Bottom-up

V přístupech zdola nahoru jsou purifikované proteiny nebo směs komplexních proteinů nejdříve podrobeny proteolytickému štěpení. Takto vzniklé peptidy o veli-

Literatura

1. Bray F, Ferlay J, et al.: *Ca-Cancer J. Clin.* 68(6), 394 (2018).
2. Canto MI, Harinck F, et al.: *Gut* 62(3), 339 (2013).
3. Pansky B: *Int. J. Pancreatol.* 7(1), 101 (1990).
4. Vincent A, Herman J, et al.: *Lancet* 378(9791), 607 (2011).
5. Honda K, Hayashida Y, et al.: *Cancer Res.* 65(22), 10613 (2005).
6. Ballehaninna UK and Chamberlain RS: *J. Gastrointest. Oncol.* 3(2), 105 (2011).
7. Stathis A and Moore MJ: *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7(3), 163 (2010).

kosti přibližně 500 – 2 000 Da jsou následně analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie, a to především matricí asistované laserové desorpce/ionizace (MALDI) a elektrosprejového ionizátoru (ESI). Identifikace původních proteinů probíhá díky porovnání hmotnostních spekter peptidů s proteomickou databází. Vzhledem k obrovskému množství vzniklých fragmentů je touto metodou možné identifikovat jen část původních proteinů s pokrytím sekvence v rozmezí 50 – 70 %, což znamená, že až polovina proteinů zůstává neznámá⁵². Počáteční fragmentace navíc znemožňuje detekci izoform a posttranskripčních a posttranslačních modifikací^{53, 54}.

Top-down

Při tomto přístupu je snaha o eliminaci problémů, které mohou nastat u předchozího přístupu. Hlavní rozdíl spočívá v analýze intaktních proteinů. Proteiny jsou nejdříve separovány z komplexní směsi a následně analyzovány pomocí metod hmotnostní spektrometrie. V tomto případě je možné identifikovat posttranslační modifikace proteinů, které jsou však zásadní při objasnění jejich funkce. Tímto přístupem je také zaručeno 100 % pokrytí sekvence. Problémem je však úspěšnost separace intaktních proteinů^{55, 52}.

Závěr

Vzhledem k obtížné diagnostice rakoviny pankreatu v raném stadiu onemocnění je v tomto případě zásadní nalézt vhodný screeningový test, který by mohl pomoci odhalit onemocnění v době, kdy je stále možná chirurgická resekce a šance na záchranu pacienta je největší. Jednou z možností může být nalézt vhodný biomarker (panel biomarkerů) s vysokou senzitivitou a specifitou již v brzkém stadiu onemocnění. Velmi nadějným přístupem se zdá být proteomické profilování tělních tekutin, a to především pacientovy plazmy či séra.

Díky velkému rozvoji proteomických technik bylo možné identifikovat množství kandidátních biomarkerů rakoviny pankreatu. Klíčová však stále zůstává jejich náročná a značně zdlouhavá implementace do klinické praxe.

8. Biomarkers Definitions Working Group: *Clin. Pharmacol. Ther.* 69(3), 89 (2001).
9. Loomans-Kropp H and Umar A: *npj Precis. Oncol.* 3 (2019).
10. Geng R, Li Z, et al.: *Int. J. Proteomics*, 365350 (2011).
11. Chan A, Diamandis EP, et al.: *J. Proteomics* 81, 126 (2013).
12. Swords DS, Firpo MA, et al.: *OncoTargets Ther.* 9, 7459 (2016).
13. Weledji EP, Enoworock G, et al.: *Oncol. Rev.* 10(1), 294 (2016).

14. Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). Introduction to proteomics. In: *Concepts and techniques in genomics and proteomics*, Woodhead Publishing, 147-158.
15. Cho WCS: *Genomics, Proteomics Bioinf.* 5(2), 77 (2007).
16. Kojima K, Asmellash S, et al.: *J. Gastrointest. Surg.* 12(10), 1683 (2008).
17. Hudler P, Kocivar N, et al.: *Sci. World J.*, 260348 (2014).
18. Rosty C and Goggins M: *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 16(1), 37 (2002).
19. Hale JE, Gelfanova V, et al.: *Briefing Funct. Genomics Proteomics* 2(3), 185 (2003).
20. Pawa N, Wright J, et al.: *J. Pancreas* 11, 423 (2010).
21. Chen R, Pan S, et al.: *Mol. Cell. Proteomics* 4(4), 523 (2005).
22. Shen J, Person MD, et al.: *Cancer Res.* 64(24), 9018 (2004).
23. Shekouh AR, Thompson CC, et al.: *Proteomics* 3(10), 1988 (2003).
24. Anderson NL, Polanski M, et al.: *Mol. Cell Proteomics* 3(4), 311 (2004).
25. Sogawa K, Takano S, et al.: *Br. J. Cancer* 115(8), 949 (2016).
26. Yoneyama T, Ohtsuki S, et al.: *PLoS One* 11(8), e0161009 (2016).
27. Hortin GL, Sviridov D, et al.: *Clin. Chem.* 54(10), 1608 (2008).
28. Grønborg M, Bunkenborg J, et al.: *J Proteome Res.* 3(5), 1042 (2004).
29. Teutsch SM, Bradley LA, et al.: *Genet. Med.* 11(1), 3 (2009).
30. Kulasingam V and Diamandis EP: *Int. J. Cancer* 123(9), 2007 (2008).
31. Rifai N, Gillette MA, et al.: *Nat. Biotechnol.* 24(8), 971 (2006).
32. Bhat K, Wang F, et al.: *Curr. Pharm. Des.* 18(17), 2439 (2012).
33. Henry NL and Hayes DF: *Mol. Oncol.* 6(2), 140 (2012).
34. Tirumalai RS, Chan KC, et al.: *Mol. Cell Proteomics* 2(10), 1096 (2003).
35. Govorukhina NI, Keizer-Gunnink A, et al.: *J. Chromatogr. A* 1009(1-2), 171 (2003).
36. Matt P, Fu Z, et al.: *Physiol. Genomics* 33(1), 12 (2008).
37. Marko-Varga G and Fehniger TE: *J. Proteome Res.* 3(2), 167 (2004).
38. Liu W, Yang Q, et al.: *Clin. Chim. Acta* 431, 179 (2014).
39. Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, et al.: *Clin. Proteomics* 11(1), 16 (2014).
40. Hanash S: *Proteomics* 1(5), 635 (2001).
41. Bae SH, Harris AG, et al.: *Proteomics* 3(5), 569 (2003).
42. Nilsson CL and Davidsson P: *Mass Spectrom. Rev.* 19(6), 390 (2000).
43. Matt P, Fu Z, et al.: *Physiol. Genomics* 33(1), 12 (2008).
44. Shi Y, Xiang R, et al.: *J. Chromatogr. A* 1053, 27 (2004).
45. Matt P, Fu Z, et al.: *Physiol. genomics* 33, 12 (2008).
46. Ahmed N, Barker G, et al.: *Proteomics* 3(10), 1980 (2003).
47. Steel LF, Trotter MG, et al.: *Mol. Cell Proteomics* 2(4), 262 (2003).
48. Björck L and Kronvall G: *J. Immunol.* 133(2), 969 (1984).
49. Yocum AK, Yu K, et al.: *J. Proteome Res.* 4(5), 1722 (2005).
50. Echan LA, Tang HY, et al.: *Proteomics* 5(13), 3292 (2005).
51. Bellei E, Bergamini S, et al.: *Amino acids* 40, 145 (2011).
52. Armirotti A and Damonte G: *Proteomics* 10(20), 3566 (2010).
53. Chait BT: *Science* 314(5796), 65 (2006).
54. Aebersold R and Mann M: *Nature* 422(6928), 198 (2003).
55. Catherman AD, Skinner OS, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445(4), 683 (2014).

Souhrn

Hošková M., Smirnova T: Proteomika jako hlavní nástroj při hledání biomarkerů rakoviny pankreatu

Proteomické techniky se v posledních letech staly ústředním nástrojem při hledání kandidátních biomarkerů rakoviny pankreatu. Nalezení účinného screeningového testu založeného na biomarkerech je ústředním zájmem výzkumu posledních let. Biomarkery s vysokou specifitou a senzitivitou by mohly diagnostikovat rakovinu pankreatu již v raném stadiu onemocnění, kdy je stále k dispozici chirurgická resekce, která významně zvyšuje šance pacienta na přežití.

Klíčová slova: rakovina pankreatu, biomarker, proteomická analýza, hmotnostní spektrometrie

Summary

Hošková M., Smirnova T: Proteomics as a major tool in the search for biomarkers of pancreatic cancer

In recent years, proteomic techniques have become the central tool in the search for candidate biomarkers of pancreatic cancer. Finding an effective biomarker-based screening test has been in focus of research in recent years. Biomarkers with high specificity and sensitivity would be able to diagnose pancreatic cancer at an early stage when surgical resection is still available and that could significantly increase the patient's chances of survival.

Key words: pancreatic cancer, biomarker, proteomic analysis, mass spectrometry

OOMYCETY – PATOGENY ČI BIOKONTROLNÍ ČINIDLA?

Markéta Kulišová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; kulisovm@vscht.cz

Úvod

Oomycety tvoří různorodou skupinu eukaryotních mikroorganismů podobnou houbám, která zahrnuje jak saprofyty, tak patogeny rostlin, hmyzu, korýšů, ryb, obratlovců a dalších mikroorganismů. V současnosti náleží do říše Chromista, podříše SAR, která byla ustanovena v roce 2007, kam spadá infraříše *Stramenopiles*, linie zahrnující hnědé řasy a rozsivky, které ztratily plastidy. Množství saprofytních oomycet obývá především vodní a vlhká půdní stanoviště. Tito zástupci mají pozitivní vliv na koloběh živin v přírodě prostřednictvím své klíčové role při rozkladu a recyklaci organické hmoty. Patogenní oomycety způsobují ničivá onemocnění řady hostitelů, u rostlin je rod *Phytophthora* považován za pravděpodobně vůbec nejničivějšího patogena dvouděložných rostlin¹. Na druhou stranu by jejich patogenita mohla být využita při vývoji biopreparátů potlačující infekce způsobené řadou nežádoucích organismů.

Charakteristika oomycet

Oomycety mají řadu pozoruhodných biologických vlastností, které je odlišují od dalších eukaryotních mikroorganismů, zejména hub. Buněčné stěny jsou složeny převážně z β -1,3-glukanových polymerů a celulosy, na rozdíl od buněčných stěn hub obsahují málo chitinu. Geny chitin syntasy jsou nicméně u oomycetních rodů široce rozšířené. Při aplikaci inhibitoru chitin syntasy, polyoxinu D, došlo k výraznému snížení růstu rodu *Saprolegnia*, což naznačuje, že chitin je minoritní, nicméně velmi důležitou složkou buněčné stěny oomycet. Oomycety jsou během vegetativní myceliální fáze diploidní, zatímco houby produkují převážně haploidní stélky. Buňky oomycet lze morfologicky odlišit od pravých hub podle jejich mitochondrií a hyf. Mitochondrie se vyznačují trubkovitými kristami na rozdíl od zploštělých krist hub a oomycetní hyfy jsou vždy bez sept. K dalším vlastnostem patří vakuoly obsahující fosforylované β -1,3-mykolaminarinové glukany či využití dráhy α - ϵ -diaminopimelové kyseliny při syntéze lysinu^{1,2}.

Analýzy sekvencí DNA, jako je mitochondriální COX-2, ribozomální DNA velké podjednotky (LSU rDNA) či malé podjednotky (SSU rDNA) potvrdily, že oomycety patří mimo říši hub. Oomycety jsou rozděleny do dvou podtříd. *Saprolegniomycetidae*, označovány jako „vodní formy“, zahrnují řády *Eurycascales*, *Leptomitales* a *Saprolegniales*. Druhá podtřída, *Peronosporomycetidae*, se skládá většinou z rostlinných patogenů a skládá se z řádů *Rhipidiales*, *Pythiales* a *Peronosporales*. Existence raných rodů mořských parazitů v převážně suchozemských řádech *Saprolegniales* a *Peronosporales* vedla evoluční biologie k domněnce o migraci oomycet na souš a do půdy. Tento pohyb byl zprostředkován prostřednictvím parazitismu na hlísticích nebo přechodem z kolonizovaných mořských řas v ústích řek na kořeny nebo výhonky rané pobřežní vegetace³.

Patogenní oomycety

Oomycetní druhy patří mezi nejproblematictější skupiny organismů působící onemocnění celé řady hostitelů. Mají jedinečný molekulární proces parazitismu, který se liší od pravých hub, ale morfologicky se podobá standardnímu vláknitému nárůstu. Klíč úspěchu patogenních oomycet spočívá v jejich schopnosti přizpůsobení pro překonání rezistence hostitele. Jednou z hlavních příčin úspěšného šíření je flexibilní systém rozmnožování. Mohou se rozmnožovat pohlavně, nepohlavně či prostřednictvím mezidruhové hybridizace, což jim umožňuje získat alelickou diverzitu a snadné množení. Tyto skutečnosti ústí v rychlý nárůst daných populací mikroorganismů. Velké populace kompenzují nedostatek sexuální rekombinace a zvyšují výskyt spontánních mutantů s lepšími vlastnostmi. Sekvenování genomu oomycet poskytlo další náhled na jejich schopnost přizpůsobení hostitelům. Oomycetní genomy obsahují velké množství genů kódující efektory virulence, které modulují procesy spojené s interakcí s hostitelem. Zmiňované geny jsou typicky spojeny s rychle se rozvíjejícími oblastmi genomu, zejména v oblastech obohacených o repete a transpozony, které podporují duplikaci genomu, jeho přeskupování, zvýšení rychlosti mutagenese a umlčování genů. Tato organizace genomu, diferencovaná rychle a pomalu se rozvíjejícími oblastmi, vedla k „dvourychlostnímu“ modelu genomu. Střídání kompartmentů s řídkým a hustým opakováním genů podporuje infekci tím, že umožňuje rychlé překonání odporu hostitele patogenem a vyvinutí nových virulentních faktorů. Dalším zajímavým aspektem genomu oomycet je jeho variace v ploidii, genom může existovat jako triploid nebo polyploid. Ukázalo se, že polyploidie tlumí mutační změny maskováním škodlivých alel. Díky tomu se předpokládá, že hraje zásadní roli v úspěchu patogenní infekce⁴.

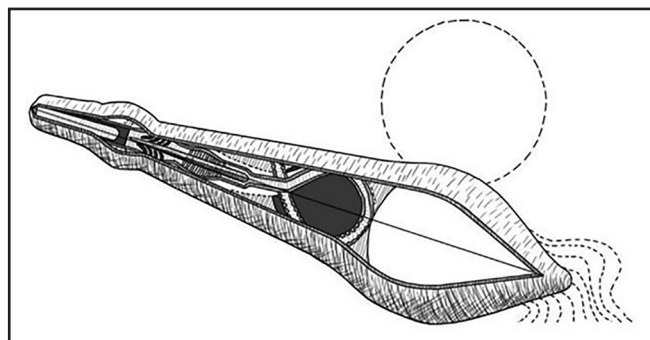
Oomycetní mikroorganismy jsou odpovědné za některé z nejničivějších chorob rostlin a tím vedou k velkým ekonomickým ztrátám a vážnému poškození ekosystémů. Nejvýraznějšími patogenními rody rostlin jsou *Phytophthora* a *Pythium*. *Phytophthora* zahrnuje více než šedesát druhů a většina z nich jsou patogeny jednoděložných i dvouděložných rostlin. Nejvýznamnějším druhem je *Phytophthora infestans*, která byla hlavním důvodem irského hladomoru s více než milionem obětí ve čtyřicátých letech 19. století. Tento mikroorganismus způsobuje destruktivní plíseň brambor vyznačující se černohnědými lézemi na listech a stoncích. Kromě poničení částí rostlin může *Phytophthora infestans* infikovat hlízy, což usnadňuje migraci patogenu prostřednictvím mezinárodního prodeje hlíz⁴. Půdní rody *Phytophthora* a *Pythium* dále působí hnědou hnilobu citrusů a kakaových bobů, kořenovou hnilobu luštěnin, plesnivění sazenic sóji, rajčat, okurek a dalších. *Phytophthora gallica*, *Pythium indigoferae* a *Pythium irregulare* napadají také stromy, zejména duby a jabloně⁵.

Oomycety působí také infekci řady zvířat – savců (*Lagenidium*, *Pythium*), členovců (*Lagenidium*), hlístic (*Myzocytiopsis*, *Myzocytiium*, *Haptoglossa*), ryb (*Achlya*, *Saprolegnia*, *Pythium*), krabů, humrů a krevet (*Haliphthorus*, *Halodaphnea*), ptáků (*Pythium insidiosum*) a dalších. Schopnost oomycet působit onemocnění různých obratlovců může spočívat v jejich společném soužití po miliony let. Ačkoliv se u oomycet vyvinulo hned několik virulentních faktorů majících vliv na savce, samotná destruktivní povaha onemocnění naznačuje, že jsou nedokonalými parazity a stále se vyvíjejí. Oomycetám chybí v cytoplazmatické membráně ergosterol, tudíž jsou rezistentní vůči většině antifungálních preparátů zaměřených touto cestou. To skýtá výzvu pro lékaře a veterináře, protože pythióza i lagenidióza jsou život ohrožující infekce u všech druhů. Pythióza je onemocnění způsobené mikroorganismem *Pythium insidiosum*. Vyskytla se u zjevně zdravých savců, včetně koček, psů, koní, ovcí, velbloudů, kočkovitých šelem, medvědů a lidí. Pythiózou byla postižena také řada ptáků. Dosud bylo *Pythium insidiosum* zaznamenáno jako jediný druh odpovědný za vznik této choroby. Nicméně se již objevily případy, kdy bylo také *Pythium aphanidermatum*, typický rostlinný patogen, izolováno z lidské tkáně. Kromě toho mikroorganismus izolovaný v Africe ze psa s kožní pythiózou vykazoval odlišný fylogenetický vzorec než *Pythium insidiosum*. Tato zjištění naznačují, že v případech pythiózy u savců může být zapojen více než jeden druh jako původce choroby⁶. Klinické projevy onemocnění závisí na postižené oblasti hostitelského organismu. U lidí se *Pythium insidiosum* vyskytuje u povrchových infekcí (keratitida) a dále může působit subkutánní, kutánní a arteriální pythiózu. Zvířata jsou postižena zejména subkutánní a střevní formou. V případě této choroby se potvrdila neúčinnost antifungálních léků na oomycetní onemocnění. Léčbou první volby byl po dlouhou dobu chirurgický zásah následovaný terapií jodidy. Vysoká míra recidivy u chirurgicky ošetřených pacientů a toxické vedlejší účinky jodidů jsou však výraznými omezeními této léčby⁷. V roce 1981 byl zaznamenán posun v technologii terapie. Bílkovinné imunogeny extrahované z *in vitro* kultur *Pythium insidiosum* byly schopné léčit některé případy kožní pythiózy vyznačující se kožní infekcí. Později byly tyto výsledky potvrzeny dalšími úspěšnými pokusy léčby touto cestou a terapie byla rozšířena na injekční podání imunogenů hostitelům s kožní a arteriální pythiózou. Zdá se, že imunoterapie na základě podání imunogenů *Pythium insidiosum* infikovanému hostiteli funguje jiným způsobem než během přirozené infekce. Vzhledem k léčebné míře imunoterapie u lidí a psů přibližně 55 % a u koní a skotu 70 – 80 %, je v současné době zavedena kombinace chirurgického zákroku, antimykotik (terbinafin) a imunoterapie⁸.

Biokontrola hlístic

Hlístice (Nematoda) napadají celou řadu zvířat a rostlin, u kterých působí závažná onemocnění. Mezi výrazné zástupce infikující člověka patří roup dětský (*Enterobius vermicularis*), škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*), svalovec stočený (*Trichinella spiralis*), vlasovec oční

(*Loa loa*) a další. Významné ztráty v zemědělství způsobuje hádátka řepné (*Heterodera schachtii*) a pšeničné (*Anguina tritici*)⁹. Zástupci rodu *Myzocytiopsis* patří mezi první popsané parazity hlístic. Obecně vykazují velké rozdíly v typech spor a metodách infekce. *Myzocytiopsis vermicola* je jedním ze tří druhů, které produkují dvoubíčíkaté zoospory, po jejichž encystaci se vyvíjí sled apikálních adhezivních pupenů. Tyto cystospory přilnou ke kutikule hlístice a zahájí novou infekci. Další druhy s adhezivními spory jsou *Myzocytiopsis humicola* a *Myzocytiopsis glutinospora*. *Myzocytiopsis glutinospora* je morfologicky srovnatelná s *Myzocytiopsis vermicola*, ale vyznačuje se pyriformními zoosporami, které jsou uvolňovány bez přítomnosti zadržovacího vaku. *Myzocytiopsis humicola*, má hladké oospory a pyriformní zoospory. *Myzocytiopsis subuliformis* také produkuje adhezivní infekční spory, ale není u něj popsáno žádné pohyblivé stádium, vytváří podlouhlé zúžené aplanospory¹⁰. Příbuzný rod *Haptoglossa* zahrnuje obligátně endoparazitické oomycety, které infikují hlístice a vířníky. Druhy tohoto rodu jsou pozoruhodné díky své infekční metodě takzvané „gun cell“. Tento útvar (Obr. 1), připomínající středověké dělo, obsahuje propracovaný tubulární systém, který funguje na bázi stříkačky. Komora s rozšířenou stěnou obsahuje jehlovitý útvar obklopený několika překrývajícími se kužely, které udržují jehlu na místě. Spora se udržuje pod tlakem velkou bazální vakuolou. Ve chvíli, kdy je komora stimulována ke střelbě dotykem hlístice, projektil zničí hostitelskou kutikulu, nebuněčnou vrstvu pokrývající povrch těla živočichů, a vystřelí prstovité trubice přímo na cílovou cytoplazmu. Buněčná protoplazma poté proudí na konec trubice, která se rozšiřuje a vytváří oválné sporidium uvnitř hostitele. Bližší prozkoumání vrcholů těchto „gun cells“ ukazuje obecnou přítomnost komplexního penetračního zařízení u celého rodu *Haptoglossa*, ale jednotlivé druhy se vyznačují charakteristickým uspořádáním kuželů obklopující jehlu. Celý proces je velmi rychlý a trvá méně než jednu sekundu. Tento mechanismus neslouží pro zničení kutikuly hlístic a následnou invazi a degradaci oomycetami, ale spíše slouží jako komplexní vstupní zařízení pro vstup rodu *Haptoglossa* do jejich hostitelů. „Gun cell“ je pasivním útvarem. Pokud je zralý, leží na substrátu a je připraven reagovat na konkrétní podnět ve formě dotyku plující hlístice. Ačkoli u některých druhů (*Haptoglossa mirabilis*) může být výstřel vyvolán tlakem, u jiných druhů (*Haptoglossa dickii*) výstřel vůbec nereaguje na umělé podněty^{10,11}.

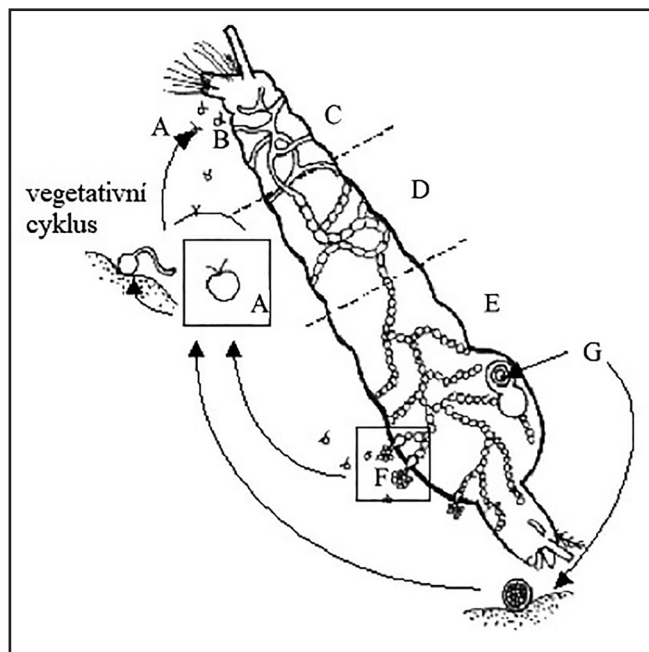


Obr. 1: Speciální útočné zařízení oomycetního rodu *Haptoglossa* (Soares a kol., 2018, upraveno)

Biokontrola komárů

Komáři patří mezi jedny z lékařsky nejvýznamnějších vektorů přenášejících parazity a patogeny, které mají ničivé dopady na zdraví člověka. Onemocnění jako horečka dengue, japonská encefalitida, žlutá zimnice, malárie a chikungunya jsou šířena prostřednictvím samotných komárů. Kromě osobní ochrany a edukace veřejnosti je nejúspěšnější metodou minimalizace výskytu nemocí přenášených tímto hmyzem vymýcení a kontrola komářích vektorů. Syntetické larvicidy jsou v této otázce bezpochyby účinné, ale byly vyřazeny kvůli škodlivým účinkům na ekosystém a necílené organismy. Metody biologické kontroly poskytují alternativy k chemickým přípravkům, avšak kromě problémů s rezistencí vyvstaly obavy ohledně bezpečnosti pro životní prostředí a dlouhodobých účinků běžně používaných biologických kontrolních činidel jako *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) na necílené organismy^{12,13}. Jedním z možných řešení je využití druhu *Lagenidium giganteum*, fakultativního parazita komárů. Tato oomyceta byla popsána již v roce 1935 v Severní Karolíně v USA. Zeměpisné rozšíření druhu je široké – Severní Amerika, Evropa, Afrika, Asie, dokonce i Antarktida. Způsobuje vysokou úmrtnost populací komárů rodů *Culex*, *Mansoria* a *Anopheles* jak při laboratorních experimentech, tak v malých i velkých terénních studiích. Suh a Axtell zjistili maximální virulenci *Lagenidium giganteum* vůči *Culex quinquefasciatus* při koncentracích vyšších než 150 zoospor/ml vody, která měla teplotu mezi 20 a 30 °C. Přežití zoospor, zjištěné jako larvální mortalita komárů, bylo nejvyšší při 25 °C. Při poklesu teploty na 19 °C se snížila úmrtnost larev na méně než 20 % a při 17 °C nedošlo již k žádné infekci¹⁴. Golkar a kol. studovali tuto variabilitu citlivosti mezi různými rody *Culex* a *Anopheles* ve vztahu k encystaci zoospor a obranným reakcím hostitele. U *Anopheles gambiae*, i přes připojení většího množství zoospor na kutikulu než je v přírodě běžné, rychlá a intenzivní obranná reakce úspěšně ochránila 56 % exponovaných vzorků před smrtí. Tato imunitní odpověď byla mnohem rychlejší než u *Aedes aegypti* a *Culex pipens*. Ačkoli ve srovnání s počtem zoospor přichycených na kutikulu *Anopheles gambiae* prochází kutikulou *Aedes aegypti* a *Culex pipens* zoospor velmi málo, přibližně 99 % obou druhů podlelehne infekci *Lagenidium giganteum*¹⁵. Další studie, zaměřující se na mortalitu larev v souvislosti s jejich stářím, ukázaly 100% úmrtnost velmi mladých larev. Vysoká mortalita se vyskytla u larev starých 1 – 2 dny, střední mortalita u larev starých 3 dny a u starších byla mortalita nízká. Klesající úmrtnost se stářím larvy může souviset s neschopností zoospor *Lagenidium giganteum* rozpoznat pozdní instary (jednotlivé fáze mezi svlékáním kutikuly) jinak vnímavých druhů komárů¹⁶.

Jako fakultativní parazit může *Lagenidium giganteum* vegetativně růst jak patogenním způsobem na larvách komárů, tak saprofytický ve vodním prostředí. Udržování této oomycety *in vivo* je velmi náročné, takže se využívá pouze zřídka. Běžná je kultivace *in vitro* s využitím definovaných i komplexních médií. Pro kultivaci v malém měřítku se používají pevná média, kultivace ve velkém měřítku (10 – 1000 l) probíhá v kapalných kulturách na bázi kvasničných extraktů¹⁷.



Obr. 2: Životní cyklus *Lagenidium giganteum*. Pohyblivé zoospory (A) adherují a prochází kutikulou (B) larvy komára. Hyfy rostou (C), tvoří septa (D) a následně sporangia (E). Jsou tvořeny vezikuly se zoosporami (F) (nepohlavní cyklus) nebo oosporami (G) (pohlavní cyklus) (Scholte a kol., 2004, upraveno)

Reprodukce *Lagenidium giganteum* je jak nepohlavní (zoospory), tak pohlavní (oospory) (Obr. 2). Pro infekci larev komárů jsou lepší vytvořené zoospory, i když jejich použití skýtá řadu úskalí. Dvoubíčíkaté zoospory nemají buněčnou stěnu, a tudíž jsou velmi křehké, aby mohly být přímo využitelné pro hubení komárů. Další nevýhodou je velmi krátká trvanlivost, zoospory přežívají pouze 48 hodin po vyjmutí z infikované larvy. Mezi další problémy patří potřeba udržovat mycelium zcela hydratované či jeho náchylnost k přemnožení kontaminujícími mikroorganismy a nedostatek stability za extrémních teplot. K překonání těchto problémů byla vyzkoušena řada metod, jednou z nich bylo zapouzdření oomycety do několika typů kapslí z alginátu vápenatého. Tento postup vedl ke snížení infekčnosti vůči larvám komárů a lepším podmínkám při skladování, manipulaci a aplikaci. Tvorba mycelia *Lagenidium giganteum* v granulích alginátu vápenatého zlepšila trvanlivost, ale účinnost proti larvám komárů klesla o 30 – 40 % po 57 dnech skladování. Využití granulátu skýtá výzvu spojenou se špatnou tolerancí *Lagenidium giganteum* k vysychání. Tento mikroorganismus je velmi citlivý na obsah vody ve svém růstovém prostředí. Citlivost na sušení a nestabilní skladování ve vodných suspenzích vedla k výzkumu dalších alternativ zpracování. Jednou z nich je invertní (voda-olej) emulzní formulace. Hlavní výhoda tohoto druhu emulze spočívá v zachycení vody olejem kolem organismu a zpomalení odpařování vody. To je zvláště výhodné pro organismy citlivé k vysušení. V případě *Lagenidium giganteum*, emulze voda-olej značně prodloužila trvanlivost skladování při pokojové teplotě. Olej od sebe odděluje kapčky vodné fáze, což navíc brání přenosu biologických kontaminantů mezi kapkami vody. Při testování emulze voda-olej zahuštěné nanočásticemi oxidu křemičitého

bylo zaznamenáno ještě vyšší prodloužení trvanlivosti skladování než při formulaci v podobě granulátu, vodné suspenze a nezahuštěné emulze voda-olej. Po 12 týdnech skladování byla u emulzních formulací obsahujících oxid křemičitý s počáteční hustotou buněk 3900 CFU/mg pozorována infekce vyšší než 95 %. Zvýšení počáteční hustoty buněk může dále prodloužit trvanlivost zahuštěných emulzí voda-olej^{13,16}.

Jako inokulum lze také využít oospory, pohlavní stadium *Lagenidium giganteum*. Oospory jsou dormantní propagule stabilní po dobu nejméně sedmi let, které jsou odolné vůči vysychání a mechanickému oděru. Bohužel výnosy masové produkce oospor zůstávají řádově nižší než u méně stabilního nepohlavního mycelia a také se vyskytují problémy s aktivací spor, které zabránily rozsáhlému polnímu testování. Dalším negativem využití oospor pro kontrolu komárů je jejich pomalé klíčení, které může trvat až 30 dní, což je ve většině případů mnohem déle než celý životní cyklus komárů^{16,17}.

První komerčně dostupný produkt na bázi mycelia *Lagenidium giganteum* byl prodáván pod značkou Lagenex do roku 1999, kdy byl stáhnut na žádost výrobce. Byl zvláště účinný vůči rodu *Culex*, druh použitých spor v přípravku nebyl zmíněn. Využití tohoto produktu bylo kompatibilní s bakteriálními látkami Bti a *Bacillus sphaericus* při užití vůči *Culex quinquefasciatus*. *Lagenidium giganteum* má oproti Bti výhodu v tom, že je schopen recyklace ve stojaté vodě a infekce dalších

generací komárů. V polních pokusech porovnávající Lagenex 25 s přípravkem Vectobac-12AS (Bti), snižoval Lagenex počet larev *Culex quinquefasciatus* o 100 % po dobu 22 dnů, zatímco Vectobac-12AS vyžadoval po 10. dni opakovanou aplikaci. Výsledky polního pokusu v malém měřítku v Severní Karolíně ukázaly, že *Lagenidium giganteum* se recykluje po celou sezónu navzdory periodickému nedostatku hostitelů a krátkodobému suchu. Polní pokus ve velké měřítku na kalifornských rýžových polích využívající mycelium pocházející z 20 nebo 30 litrů kultivačního média na hektar vyústil v 40 – 90 % infekci larev *Culex tarsalis* a *Anopheles freeborni*¹⁶.

Závěr

Oomycetní rody patří převážně mezi patogeny jak rostlin, tak celé řady živočichů. Některé druhy mohou být však prospěšné v biokontrolě infekcí způsobených mnoha organismy. Parazitismus oomycetních rodů *Myzocytiopsis*, *Myzocitium* a *Haptoglossa* na hlísticích by mohl mít v budoucnu využití v prostředcích napomáhajících léčbě infekcí vzniklých touto početnou skupinou organismů. Biokontrola komárů je primárně zprostředkována prostřednictvím *Lagenidium giganteum*. Tento zástupce má jakožto fakultativní parazit komárů slibný potenciál využití při vývoji nových biopreparátů, které by byly šetrnější k životnímu prostředí.

Literatura

1. Kamoun S: *Eukaryotic Cell* 2 (2), 191 (2003).
2. Beakes GW, Glockling SL, Sekimoto S: *Protoplasma* 249, 3 (2012).
3. Fawke S, Doumane M, Schormack S: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79 (3), 263 (2015).
4. Derevnina L, Petre B, Kellner R, et al.: *Philos. Trans. R. Soc.* 371, 1 (2016).
5. Shrestha A, Park SH, Shrestha B, et al.: *Nepal J. Sci. Technol.* 15 (1), 157 (2014).
6. Mendoza L, Vilela R: *Curr. Fungal Infect. Rep.* 7, 198 (2013).
7. Gastra W, Lipman LJA, Cock AWAM, et al.: *Vet. Microbiol.* 146 (1-2), 1 (2010).
8. Mendoza L, Newton J: *Med. Mycol.* 43, 477 (2005).
9. Lee DL: *The Biology of Nematodes*. CRC Press, Boca Raton 2002.
10. Glockling SL, Beakes GW: *Mycologia* 98 (1), 1 (2006).
11. Soares FE, Sufiate BL, Queiroz JH: *Agric. Nat. Resour.* 52, 1 (2018).
12. Vyas N, Dua KK, Prakash S: *Parasitol. Res.* 101, 385 (2007).
13. Vandergheynst J, Scher H, Guo HY, et al.: *BioControl* 52, 207 (2007).
14. Suh CP, Axtell RC: *Biol. Control* 15, 33 (1999).
15. Golkar L, LeBrun RA, Ohayon H, et al.: *J. Invertebr. Pathol.* 62, 1 (1993).
16. Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, et al.: *J. Insect Sci.* 4 (19), 1 (2004).
17. Kerwin JL, Petersen EE: *Fungi: Oomycetes and Chytridiomycetes*, In: *Manual of Techniques in Insect Pathology* (Lacey L.A. ed.), Academic Press, New York, 251-268.

Souhrn

Kulišová M.: Oomycety – patogeny či biokontrolní činidla?

Oomycety jsou eukaryotní mikroorganismy náležící mezi Chromista, z nichž mnohé patří mezi vysoce ničivé rostlinné a živočišné patogeny. Sdílejí řadu morfologických znaků s houbami, ale mají jedinečné odlišné vlastnosti, které tuto skupinu definují. Patogenita oomycet je zajištěna produkcí spor, jejich vývojem a následným šířením. Tohoto mechanismu oomycety využívají i v pozitivním slova smyslu při destrukci hlístic a komárů. Hlístice jsou původci řady onemocnění lidské populace a jejich výskyt se negativně podílí na ztrátách výnosů hospodářských plodin. Komáři figurují ve vzniku chorob jako významní přenašeči parazitů a patogenů. Výskyt obou těchto skupin živočichů je možné potlačit pomocí oomycetních druhů, které by mohly sloužit jako účinná látka biopreparátů.

Klíčová slova: oomycety, patogeny, biokontrola, hlístice, komáři, biopreparáty

Summary

Kulišová M.: Oomycetes - pathogens or biocontrol agents?

Oomycetes are eukaryotic microorganisms belonging to Chromista kingdom, many of them are highly destructive plant and animal pathogens. They share a number of morphological features with fungi but have unique distinct characteristics that define this group. The pathogenicity of oomycetes is provided by the production of spores, their development and subsequent dissemination. Oomycetes use this mechanism also in a beneficial way of destruction of nematodes and mosquitos. Nematodes are cause of many diseases in human population and their occurrence negatively participates in loss of crop yields. Mosquitos are one of the most medically important vectors transmitting parasites and pathogens. The presence of both of these groups can be suppressed by oomycete species, which could serve as the active ingredient of biologic products.

Keywords: oomycetes, pathogens, biocontrol, nematodes, mosquitos, biological products

ZELENÉ BIOTECHNOLOGIE PRO PŘÍPRAVU NANOČÁSTIC KOVŮ

Anna Miškovská

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, miskovsa@vscht.cz

Úvod

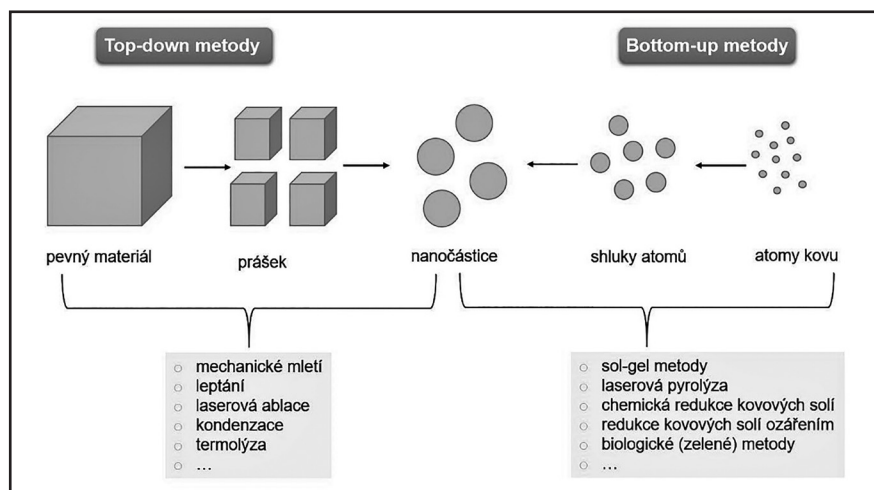
Nanočástice považujeme za základní stavební kameny nanotechnologie, jedinečné technologie schopné vyrábět a kontrolovat prvky na molekulární úrovni. Tyto zajímavé materiály s rozměrem v řádu nanometrů, jedné miliardtiny metru, si pro své neobvyklé vlastnosti získaly pozornost vědecké i komerční sféry. Je pro ně totiž charakteristické odlišné chování oproti větším celkům téhož materiálu, které je dáno právě jejich malým rozměrem. Výsledkem jsou unikátní chemické, biologické a fyzikální vlastnosti (např. magnetické, optické, antimikrobiální). Navíc jsme schopni tyto vlastnosti do jisté míry měnit manipulací s parametry jako jsou velikost, tvar nebo složení nanočástic¹. Jedinečné vlastnosti předurčují nanočástice kovů pro mnoho aplikací a v současné době se s nimi můžeme setkat například v textilním průmyslu, potravinářství, kosmetice nebo elektronice^{2, 3}.

Jelikož zájem o nanočástice kovů v posledních desetiletích markantně vzrostl, je důležitý racionální výběr metod pro jejich výrobu ve větším měřítku. Proto se v posledních letech stávají velmi populární metody biotechnologické, využívající princip tzv. zelené chemie, které pro syntézu nanočástic kovů využívají přírodní suroviny. Zelená syntéza či tzv. biosyntéza nanočástic patří mezi poměrně inovativní přístupy, které představují slibnou budoucí alternativu tradičních postupů přípravy nanočástic – fyzikálních a chemických, jejichž používání je v mnoha ohledech nevýhodné. Fyzikální metody jsou nechvalně známé tím, že pracují za vysoké teploty a tlaku, což vede k vysoké spotřebě energie a vysokým nákladům. Obvyklejším postupem přípravy nanočástic jsou v současné době metody chemické, které jsou ve srovnání s fyzikálními levnější. Avšak i ony mají velkou nevýhodu, kterou je používání toxických látek, které škodí životnímu prostředí a lidskému zdraví^{3, 4}. Naproti tomu zelené technologie jsou přátelské k životnímu prostředí, vyžadují ke svému uskutečnění nižší náklady, a navíc mívají vznikající nanočástice lepší některé klíčové vlastnosti jako jsou stabilita a biokompatibilita⁵. Mezi další výhody biologických metod syntézy nanočástic patří jednoduchost, jelikož se obvykle jedná o jednoduchou syntézu, která nevyžaduje změnu teploty ani tlaku oproti normálním hodnotám⁴. Biosyntetizované nanočástice mohou mít mnoho různých aplikací jako jsou například cílené doručování léčiv, čištění odpadních vod, biosenzory či antimikrobiální látky⁶.

Veškeré biologické metody syntézy nanočástic patří mezi tzv. bottom-up (česky zdola nahoru) přístupy, při kterých dochází ke vzniku nanočástic shromažďováním atomů, molekul či shluků kovů do větších celků (1 – 100 nm). Dále sem řadíme také většinu chemických

metod (např. sol-gel procesy, chemická depozice z plynné fáze a další). Výchozími látkami v případě bottom-up metod jsou sůl kovů (např. AgNO_3 nebo HAuCl_4 pro syntézu nanočástic stříbra, respektive zlata) a redukční činidlo (např. borohydrát, citrát). Použití chemických metod dále vyžaduje přidávání stabilizačních látek. Tento krok není v případě zelené syntézy nutný, neboť přírodní látky působí zároveň jako redukční i stabilizační agens². Opakem bottom-up metod jsou přístupy nazývané top-down (česky shora dolů), mezi které spadají fyzikální metody přípravy nanočástic (Obr. 1). Vstupním materiálem pro top-down metody je větší část pevného materiálu, u kterého postupně dochází k redukci velikosti až na požadovaný objem částice (například mletím, tepelnou dekompozicí, laserovou ablací nebo chemickým leptáním)⁷.

Využitím zelených biotechnologií pro průmyslovou výrobu nanočástic by byla zavedena šetrná a udržitelná alternativa dosavadních metod, a proto je tato oblast intenzivně zkoumána vědci z celého světa. To, jak zájem o zelené nanobiotechnologie v posledním desetiletí prudce vzrostl, je možné si prohlédnout na obrázku 2.

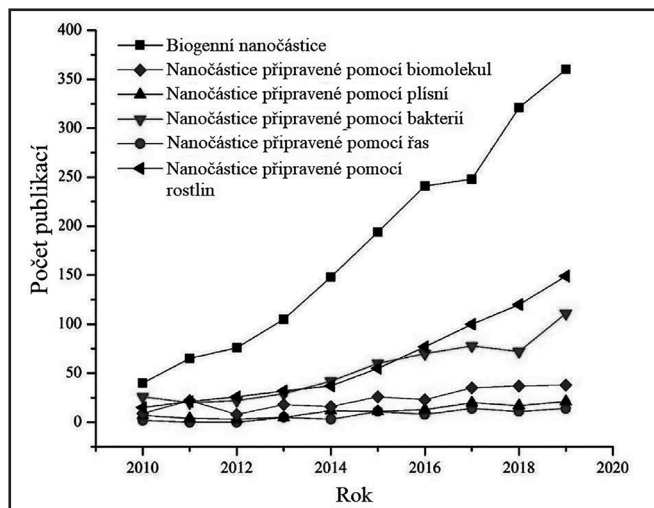


Obr. 1: Rozdělení metod syntézy nanočástic kovů na základě principu vzniku nanočástice.

Zelené nanobiotechnologie

Technologické provedení syntézy nanočástic kovů pomocí zelených metod je různé v závislosti na vybraném typu biologického činitele. Zelená syntéza nanočástic kovů může být uskutečňována pomocí rozmanité škály přírodních surovin. Mezi biomateriály používané k zelené syntéze nanočástic kovů patří rostliny, řasy, plísňe, kvasinky, bakterie a viry, které mohou být použity ve formě celých organismů nebo jejich metabolitů⁸. Mezi často volené materiály patří rostliny a rostlinné extrakty². Pro biosyntézu však byla použita celá řada dalších zdrojů jako jsou bezbuněčná růstová média, bezbuněčné vodné extrakty mikroorganismů či jednotlivé izolované biomolekuly jako jsou vitamíny, pigmenty nebo enzymy⁹.

V současné době existuje na téma zelených nanobiotechnologií mnoho odborných studií a snaha o naleze-



Obr. 2: Počet publikací v indexovaných časopisech obsahujících klíčová slova „biogenic nanoparticles, biomolecules, fungi, bacteria and algae-derived nanoparticles“ (český překlad: biogenní nanočástice, nanočástice připravené pomocí biomolekul, mikromycet, bakterií, řas) nalezená v názvu, abstraktu a klíčových slovech článků publikovaných v letech 2010 až 2019. (upravené podle Rana, et al. 2020)

ní „ideálního“ postupu přípravy roste. V následujících kapitolách budou popsáni hlavní biočinitelé užívaní pro přípravu nanočástic kovů a postup jakým je biosyntézy pomocí jednotlivých z nich dosaženo.

Biosyntéza nanočástic pomocí rostlin a rostlinných extraktů

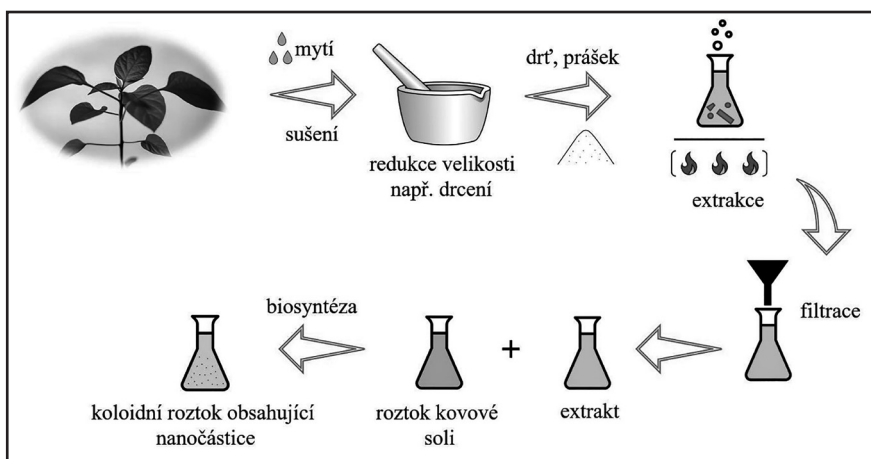
Použití rostlin pro syntézu nanočástic kovů patří mezi velmi nadějně směřující zelených nanobiotechnologií. Obecně může být biosyntéza nanočástic zprostředkována pomocí celé žijící rostliny (*in vivo*) nebo rostlinného extraktu (*ex vivo*).

Použití rostlinných extraktů je mimořádně praktické řešení, které bývá často upřednostňováno z důvodu jednoduchosti procesu, krátkého času reakce a vysoké účinnosti. Schopnost rostlinných extraktů redukovat ionty kovů a stabilizovat vznikající nanočástice je zapříčiněna přítomností velkého množství rozličných aktivních metabolitů (např. fenolů, karboxylových kyselin, aldehydů, amidů, proteinů a dalších). Pro jejich extrakci mohou být použity prakticky veškeré části rostlin včetně semen, kořenů, květů nebo plodů¹⁰. Velmi perspektivním směrem je příprava extraktu z agroodpadů jako jsou například slupky, skořápky nebo kokosová vlákna, které vznikají při masovém zpracovávání různých částí rostlin a mnohdy nemají žádná další uplatnění⁸. Technologie přípravy extraktu s obsahem aktivních molekul schopných katalyzovat syntézu nanočástic je jednoduchá a zahrnuje extrakci namletých, usušených (v některých případech předem omytých) částí rostlin do vhodného polárního nebo nepolárního rozpouštědla – nejčastěji horké vody nebo vodou ředěného roztoku ethanolu/methanolu (Obr. 3)¹¹.

Samotná reakce probíhá smícháním rostlinného extraktu s vodným roztokem kovové soli při pokojové tep-

lotě a odehrává se v řádech několika minut¹². Vznikající nanočástice lze snadno detekovat vizuálně výraznou změnou barvy reakční směsi. Množství a morfologie (tvar, distribuce velikostí) vznikajících nanočástic jsou značně ovlivněny reakčními podmínkami. Majoritní vliv má zdroj, ze kterého je připravován extrakt. Jednotlivé rostlinné extrakty se totiž mohou významně lišit v obsahu a kombinaci redukčních a stabilizačních biomolekul¹³. Dále také ovlivňují množství a charakteristiku nanočástic zvolený poměr koncentrací výchozích látek (rostlinný extrakt : roztok kovové soli), teplota, reakční doba a hodnota pH reakce¹². Experimentálně byla provedena úspěšná syntéza nanočástic pomocí extraktů z mnoha rostlin a jejich částí, patří mezi ně například známé rostliny jako jsou *Camellia sinensis* (čajovník čínský), *Aloe vera* (aloe pravá), *Vitis vinifera* (réva vinná) či *Allium sativum* (česnek setý)¹⁴.

Další z možností je zelená syntéza za použití celých žijících rostlin, někdy nazývaných jako „biotovárny“. Díky schopnosti biosorpce, akumulace a redukce iontů kovů jsou rostliny používány v mnoha aplikacích jako jsou například fytoremediace (především zbavování půdy kontaminantů jako jsou olovo, kadmium, nikl a další). Právě podrobné zkoumání rostlinné bioakumulace kovů vedlo k odhalení faktu, že kovy někdy bývají rostlinnou biomasou ukládány v podobě nanočástic¹⁵. V takových případech hovoříme o intracelulární biosyntéze nanočástic. Abychom dosáhli tohoto typu syntézy, je zapotřebí obohatit živnou půdu rostliny o rozpustnou



Obr. 3: Obvyklý postup přípravy rostlinného extraktu a následné biosyntézy nanočástic kovů.

formu daných kovových iontů¹⁶. Přestože se samotné provedení nezdá nijak obtížné je preferována syntéza pomocí rostlinných extraktů, kde odpadají obtížné dokončovací (tzv. down-stream) procesy nutné k izolaci nanočástic z rostlinných pletí^{2, 6}. Jinou z možností je extracelulární syntéza nanočástic pomocí žijících rostlin. Tento postup není zdaleka tolik prozkoumán, avšak bylo zjištěno, že kořenové exudáty (enzymy, fenoly, polysacharidy a další), jež jsou rostlinou produkovány do jejího okolí, jsou schopné redukce kovových iontů za vzniku nanočástic. Poprvé tento postup publikovali Raju s kolegy¹⁷, kteří vložili sazenice podzemnice olejné do roztoku obsahujícího ionty zlata (Au^+) a syntetizovali tak zlaté nanočástice o úzké distribuci velikostí 4 – 9 nm. Ve studii vznikaly rovněž intracelulární nanočástice zlata, které byly rostlinou akumulovány majoritně v kořenovém systému. Po dalším výzkumu by použití žijících rostlin pro extracelulární biosyntézu mohlo

představovat další z variant nenákladné, udržitelné, jednoduché a šetrné přípravy nanočástic, které by mohly být využívány například jako antibakteriální činidla pro boj s rostlinnými patogeny^{6, 17}.

Mezi žijící rostliny, které byly použity pro úspěšnou syntézu nanočástic kovů patří například *Medicago sativa* (tolice vojtěška), *Vigna radiata* (mungo fazole), *Arachis hypogaea* (podzemnice olejná), *Brassica juncea* (brukev olejná) nebo *Phaseolus vulgaris* (fazol obecný)^{6, 18}.

Biosyntéza nanočástic pomocí mikroorganismů

Schopnost mikroorganismů vylučovat obrovské množství reduktas z nich dělá ideální volbu pro produkci nanočástic specifické velikosti a tvaru. Navíc rozmanitost mikrobiální říše, co do počtu možných producentů, nám dává možnost syntetizovat nanočástice různorodých vlastností¹⁰. Mikroorganismy syntetizují nanočástice ze dvou námi poznávaných důvodů. Prvním a častějším z nich je ochrana před toxickým působením iontů těžkých kovů, které inhibují funkci metaloenzymů a iniciují vznik reaktivních kyslíkových částic. Existují různé mechanismy, jakými mikroorganismy detoxikují těžké kovy a patří mezi ně například vyloučení z buňky pomocí transportérů nebo enzymatická detoxikace pomocí redoxních enzymů. Dalším důvodem může být získávání energie, protože některé mikroorganismy (např. anaerobní bakterie rodu *Shewanella*) jsou schopny využívat ionty kovů jako akceptory elektronů¹⁹.

Podobně jako je tomu při používání rostlin, i pomocí mikroorganismů může syntéza nanočástic probíhat uvnitř i vně buněk. Z technologického hlediska je preferována syntéza extracelulární, protože postrádá nákladné a složité dokončovací operace nutné k rozrušení buněčných obalů (sonikace) a oddělení nanočástic od buněčných komponent (násobná centrifugace)²⁰. Intracelulární biosyntéza má však také velkou výhodu. Ve většině případů při ní totiž vznikají nanočástice kovů s velmi úzkou distribucí velikostí, což je pro některé aplikace nanočástic velmi důležité²¹.

Při extracelulární syntéze jsou obvykle mikroorganismy nejprve kultivovány za optimálních růstových podmínek (teplota, pH, růstové médium a další) po dobu 1 – 2 dnů. Poté je biomasa oddělena od média (odstředění/filtrace) a následují dvě různé možnosti. Jednou z nich je, že se takto získaný supernatant/filtrát smíchá s roztokem soli kovů, čímž se započne biosyntéza nanočástic – nelze však vyloučit vliv složek růstového média. Druhou často používanou možností je pak příprava nanočástic pomocí bezbuněčných vodných extraktů. V takovém případě jsou výše popsáním způsobem získané buňky inkubovány po určitou dobu ve sterilní vodě. Ze vzniklé suspenze je poté opět oddělena biomasa a teprve vzniklý bezbuněčný vodný extrakt je smíchán s roztokem kovových iontů^{19, 20}.

Intracelulární biosyntéza probíhá inkubací suspenze narostlých buněk s roztokem soli kovů po dobu několika minut až dní. Pro minimalizaci vlivu složek kultivačního média bývá nejprve kultivována biomasa za vhodných růstových podmínek, následně jsou buňky sklizeny a promyty sterilní vodou a až poté inkubovány s roztokem kovové soli¹⁹.

Velmi nadějným směrem je využívání vedlejších, odpadních produktů již zavedené mikrobiální produkce. Jako příklad lze uvést syntézu nanočástic stříbra pomocí odpadního supernatantu vznikajícího při výrobě

enzymu arginasy pomocí bakterie *Bacillus licheniformis* M09. Biosyntéza probíhala inkubací bezbuněčného supernatantu se sterilním roztokem dusičnanu stříbrného při pokojové teplotě po dobu 36 hodin. Následovala izolace nanočástic odstředěním a promytí destilovanou vodou. Bylo zjištěno, že takto lze získávat sférické nanočástice stříbra o velikosti 10 – 30 nm²².

Mezi mikroorganismy schopné biosyntézy nanočástic kovů řadíme bakterie, mikromycety, některé řasy a viry. Z prokaryot byly pro syntézu nanočástic použity například rody *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Rhodopseudomonas*, *Shewanella*, zástupci čeledi aktinobakterií, a také fotosyntetizující prokaryota (sinice) např. rod *Spirulina*^{19, 23}. Mezi často volené zástupce mikromycet patří rody *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Saccharomyces* a *Schizosaccharomyces*^{24, 25}. Ze skupiny mikroskopických řas byly pro experimentální syntézu nanočástic kovů použity řasy zelené, červené i hnědé. Biosyntéza nanočástic byla úspěšně zprostředkována také pomocí makroskopických řas např. rodů *Ulva*, *Chondrus* nebo *Sargassum* – ty však neřadíme mezi mikroorganismy²⁵. Poslední z mikroorganismů, které jsou zkoumány v souvislosti s možností biotechnologické produkce nanočástic kovů jsou viry, které se od předešlých organismů razantně liší svou stavbou – jedná se totiž o nebuněčné struktury. Tato oblast je poměrně nová a před zavedením tohoto postupu do praxe bude vyžadovat delší intenzivní výzkum. V zásadě se k experimentální syntéze nanočástic využívají fytopatogenní viry a bakteriofágy, které nejsou schopny infikovat živočišné buňky, jako je konkrétně např. virus tabákové mozaiky nebo bakteriofág M13^{26, 27}.

Výhody a nevýhody použití jednotlivých biočinitelů

Biosyntéza nanočástic kovů pomocí biologických materiálů má své výhody, ale také svá úskalí např. v podobě proveditelnosti v průmyslovém měřítku, nízké opakovatelnosti či možného bezpečnostního rizika. Následující text je věnován přehlednému výčtu základních výhod a nevýhod perspektivních biočinitelů používaných pro zelenou syntézu nanočástic kovů.

Rostlinné extrakty

Výhody:

- Používání vodných rozpouštědel.
- Biokompatibilita rostlinných extraktů (vhodné pro přípravu nanočástic pro biomedicínské účely).
- Jednoduchý, rychlý proces probíhající za atmosférického tlaku a pokojové teploty (nízkonákladově).
- Vhodný postup pro produkci ve velkém měřítku²⁸.
- Nepatogenita ve srovnání s některými mikroorganismy²⁹.
- Bez časově náročného procesu vedoucímu k přípravě mikrobiální kultury¹⁴.

Nevýhody:

- Náročná reprodukce přípravy monodisperzních nanočástic s definovanou morfologií povrchu. Dáno různým fytochemickým složením rostlin z jiné oblasti, pěstovaných v jiném období (pro některé aplikace nanočástic však nejsou tyto parametry zásadní)^{14, 28}.

Bakterie

Výhody:

- Snadné přizpůsobení extrémním podmínkám (možnost do jisté míry měnit podmínky růstu)²⁹.

- Levná kultivace.
- Vysoká růstová rychlost.
- Snadné genetické manipulace ve srovnání s eukaryoty³⁰.

Nevýhody:

- Ve srovnání s rostlinnou biosyntézou zdlouhavé přípravné operace (tzv. up-stream)¹⁴.
- Bezpečnostní riziko (patogenita některých zástupců)²⁹.

Plísně a kvasinky

Výhody:

- Jednodušší scale-up a down-stream procesy ve srovnání s jinými mikroorganismy.
- Vysoká sekrece extracelulárních enzymů a dalších proteinů³¹.
- Velká plocha povrchu přístupného reakci díky přítomnosti mycelií³⁰.

Nevýhody:

- Stejně jako v případě biosyntézy pomocí bakterií.
- Pomalejší růst ve srovnání s prokaryoty.

Řasy

Výhody:

- Netoxické organismy.
- Zvýšená schopnost bioakumulace a redukce kovů².

Nevýhody:

- Obtížný scale-up bioprosesu – nutnost použití fotobioreaktorů³².

Literatura

1. Asiya S, Pal K, et al.: *Mater. Today Chem.* 17, 100327 (2020).
2. Rana A, Yadav K, et al.: *J. Clean. Prod.* 122880 (2020).
3. Thakkar KN, Mhatre SS, et al.: *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 6(2), 257 (2010).
4. Parveen K, Banse V, et al.: *AIP conference proceedings* 1724(1), 020048 (2016).
5. Schröfel A, Kratošová G, et al.: *Acta Biomater.* 10(10), 4023 (2014).
6. Saim AK, Kumah FN, et al.: *Nanotechnol. Environ. Eng.* 6(1), 1 (2021).
7. Singh J, Dutta T, et al.: *J. Nanobiotechnology* 16(1), 84 (2018).
8. Adelere IA and Lateef A: *Nanotechnol. Rev.* 5(6), 567 (2016).
9. Gour A and Jain NK: *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 47(1), 844 (2019).
10. Moradi F, Sedaghat S, et al.: *Inorg. Nano-Met. Chem.* 51(1), 133 (2021).
11. Mohamad NaN, Arham NA, et al.: *Adv Mat Res* 832, 350 (2014).
12. Mittal AK, Chisti Y, et al.: *Biotechnol. Adv.* 31(2), 346 (2013).
13. Kumar V and Yadav SK: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84(2), 151 (2009).
14. Ahmed S, Ahmad M, et al.: *J. Adv. Res.* 7(1), 17 (2016).
15. Haverkamp R and Marshall A: *J. Nanopart. Res.* 11(6), 1453 (2009).
16. Iravani S: *Green Chem.* 13(10), 2638 (2011).
17. Raju D, Mehta UJ, et al.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 59(6), 471 (2012).
18. Marchiol L: *Ital. J. Agron.* e37, (2012).
19. Kato Y and Suzuki M: *Crystals* 10(7), 589 (2020).
20. Singh P, Kim Y-J, et al.: *Trends Biotechnol.* 34(7), 588 (2016).
21. Rahman A, Kumar S, et al.: *Microalgae cultivation for biofuels production*, Elsevier (2020).
22. Momin B, Rahman S, et al.: *Bioprocess Biosystems Eng.* 42(4), 541 (2019).
23. Chaudhary R, Nawaz K, et al.: *Biomolecules* 10(11), 1498 (2020).
24. Hulkoti NI and Taranath T: *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 121, 474 (2014).
25. Bakshi M, Mahanty S, et al.: *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation* 423, (2017).
26. Das RK, Pachapur VL, et al.: *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2(1), 1 (2017).
27. Velusamy P, Kumar GV, et al.: *Toxicol. Res.* 32(2), 95 (2016).
28. Dauthal P and Mukhopadhyay M: *Ind. Eng. Chem. Res.* 55(36), 9557 (2016).
29. Jamkhande PG, Ghule NW, et al.: *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 53, 101174 (2019).
30. Prasad R, Pandey R, et al.: *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 8(2), 316 (2016).
31. Salem SS and Fouda A: *Biol. Trace Elem. Res.* 1, (2020).
32. Da Silva TL and Reis A: *Algal biorefinery: An integrated approach*, Springer (2015).
33. Gahlawat G and Choudhury AR: *RSC Adv* 9(23), 12944 (2019).

Víry

Výhody:

- Použití pro syntézu nanokojugátů a nanokompozitů³³.
- Vznik monodisperzních nanočástic.
- Stabilní syntéza.
- Běžné provádění manipulací s virovým povrchem³⁰.

Nevýhody:

- Relativně neprobádaná oblast vyžadující intenzivní výzkum.
- Virová exprese vyžaduje přítomnost hostitelského mikroorganismu³⁰.

Závěr

Nanočástice kovů mají v dnešní době širokou škálu aplikací. Nalézají uplatnění téměř ve všech oblastech lidské činnosti včetně biomedicíny, textilního, potravinářského nebo chemického průmyslu. Z tohoto důvodu po nich za poslední desetiletí vzrostla poptávka, a tím pádem nabyly na důležitosti způsoby jejich výroby. Biotechnologické metody syntézy, využívající tzv. zelený přístup, by mohly být hospodárnou, udržitelnou a ekologickou alternativou tradičně používaných fyzikálních a chemických metod výroby nanočástic kovů, které jsou nákladné a škodí životnímu prostředí. Tento přehled poskytuje čtenáři základní popis biotechnologických metod přípravy nanočástic kovů pomocí rostlin, rostlinných extraktů a mikroorganismů. Navíc obsahuje přehledné shrnutí základních výhod a nevýhod použití jednotlivých biologických činitelů.

Souhrn

Miškovská A.: Zelené biotechnologie pro přípravu nanočástic kovů

S markantním rozvojem nanotechnologií nabývá na důležitosti racionální výběr metod pro výrobu nanočástic v průmyslovém měřítku. Pozornost se v současné době upírá na výzkum metod biotechnologických, využívajících princip tzv. zelené chemie, které pro syntézu nanočástic kovů využívají přírodní materiály jako např. mikroorganismy nebo rostliny. Tyto zelené metody by mohly v budoucnu nahradit konvenční postupy přípravy nanočástic (fyzikální a chemické), které jsou v mnoha ohledech nevýhodné. Tento přehled stručně shrnuje biotechnologické postupy přípravy nanočástic kovů pomocí přírodních surovin a obsahuje výčet hlavních výhod a nevýhod použití jednotlivých z nich.

Klíčová slova: nanočástice, nanobiotechnologie, biosyntéza

Summary

Miškovská A.: Green biotechnology for the preparation of metal nanoparticles

With the significant development of nanotechnology, a rational choice of methods for the production of nanoparticles on an industrial scale is gaining in importance. Currently, attention is focused on research into biotechnological methods, using the principle of so-called green chemistry, which use natural materials such as microorganisms or plants for the synthesis of metal nanoparticles. These green methods could be a future alternative to conventional approaches to the preparation of nanoparticles (physical and chemical), which are disadvantageous in many aspects. This review briefly summarizes the biotechnological methods for metal nanoparticle synthesis using biomaterials and lists the main advantages and disadvantages of using each of them.

Keywords: nanoparticles, nanobiotechnology, biosynthesis

ROZLIŠENÍ PERGAMENŮ PODLE JEJICH ZVÍŘECÍHO PŮVODU

Anna Zubová

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; zubovaa@vscht.cz

Úvod

Pergameny patří mezi cenné historické objekty, které se do nedávné doby používaly k zapisování rozličných informací. Do vynálezu papíru byl pergamen nejvyžívanějším médiem. Jsou vyráběny ze zvířecích kůží, nejčastěji se využívá kůže z ovce, kozy nebo telete. Rozlišení zvířecího původu je nutné pro jejich správnou konzervaci a má značnou výpovědní hodnotu o životě v minulosti pro kunsthistoriky.

Hlavní složkou pergamenů je kolagen, který může být spolu s DNA analytem, podle kterého by bylo možné odlišit jednotlivé zvířecí druhy. Nejčastější metodou, kterou je pergamen zkoumán, jsou různé mikroskopické metody, ale právě analýza DNA a proteomická analýza kolagenu by mohla přinést stejně uspokojivé, nebo spíše i lepší výsledky jako mikroskopické metody.

Výroba a druhy pergamenu

Pergamen je označení pro kůži, která je zbavena chlupů a je zpracována z obou stran. K jeho výrobě se používá nejčastěji ovčí, kozí a telecí kůže¹, ale není vzácné použití ani kůže dančí, jiné zvěřiny či kůže z exotických zvířat jako jsou antilopy, gazely nebo pštrosi².

První kožené psací materiály se objevovaly již zhruba v období 2500 př. n. l., ale pergamen v pravém slova smyslu se začal vyrábět v řeckém městě Pergamon v oblasti Malé Asie až ve 2. století př. n. l.³ Pergamen ovšem mohl začít konkurovat dříve používanému papyru až okolo 4. století nástupem římského císaře Konstantina I.⁴ Pergamen měl oproti papyru řadu výhod, byl mnohem pevnější, bylo možné na něj psát z obou stran a oproti papyru měl vysokou mechanickou odolnost při užívání a v evropských klimatických podmínkách byl trvanlivější⁵.

Nejprve bylo nutné získanou čerstvou kůží, pokud nebyla zpracována ihned, konzervovat, což bylo možné buď sušením nebo nasolováním⁶. Pokud byla kůže konzervována, první krok při výrobě pergamenu bylo vložení do studené vody, kdy kůže změkla a byly z ní odstraněny různé nečistoty (krev, rozpustné sole použité při konzervaci, nevláknité bílkoviny atd.)⁷. Následným krokem bylo loužení ve vápenné vodě po dobu několika týdnů, a poté se odstranily zbytky masa a podkožní blá-

ny z rubové strany kůže a kořínky, pokožka a pigmenty z lícové strany. V této fázi se holina, takto mechanicky zpracovaná kůže, zamokra brousila a vypírala ve vodě pro odstranění přebytku vápna⁸. V případě ovčí kůže byl použitý jiný proces z důvodu, aby se nepoškodila vlna. U ovčí kůže byla nanášena vrstva vápenné pasty na rubovou stranu. Alkálie se dostaly skrz kůži k chlupovým kořínkům, které se uvolnily z kůže a po dalším zpracování se chlupy prodávaly na vlnu. Kůže se následně ponořila do vápna a byla rozdělena na dvě vrstvy. Rubová strana se zpracovávala na pergamen a lícová strana se činila rostlinnými tříslovinami⁹. Pro odstranění dalších bílkovin se používaly enzymy z psího nebo holubího trusu. Holina dále byla za mokra vypínána na dřevěný rám, na kterém docházelo k sušení. Bylo důležité pergamen pravidelně dotahovat a dále se napnutý brousil a upravoval do finální podoby⁷.

Dva základní typy psacích pergamenů, které se rozoznávaly, byly pergamen středoevropského typu a pergamen italského typu. Středoevropský typ byl vyráběn hlavně z telecí kůže alkalickým způsobem a dalo se na něj psát z obou stran. Na rozdíl od italského typu, který byl zpracováván enzymaticky, pro psaní bylo používána jen rubová strana, protože nebyly odstraňovány kořeny chlupů v chlupových kanálcích kůže.² Další typy historických psacích pergamenů jsou byzantský pergamen, tzv. „vellum“, transparentní pergamen a barevné pergameny. Byzantský pergamen byl vysoce lesklý, tato vlastnost byla důsledkem použití vaječného bílku, pšeničného škrobu a lněného semínka a následného leštění. Tato úprava usnadňovala příjem inkoustů a barev². „Vellum“ byl pergamen získávaný z telecích kůží, používaly se i kůže ještě nenarozených telat (tzv. děložní pergamen). Byl to velice jemný materiál, přesto překvapivě pevný. Nevýhodou byl jeho malý rozměr¹⁰. Transparentní pergamen byl nerovnoměrně neprůhledný pergamenový list ošetřený vaječným bílkem, arabskou gumou a dalšími látkami, které vázaly vodu. Tento pergamen neusychal napínán na dřevěném rámu, ale byl sušen pod tlakem². Barevné pergameny se vyskytovaly především v byzantské říši a pro barvení byly použity nejrůznější barvy (purpury, malachit či indigo). Velice ceněnými pergameny jsou purprou obarvené pergameny popsané zlatým inkoustem (tzv. chrysografie)¹².

Analytické metody používané k určení zvířecího druhu pergamentu

Hlavní složkou pergamentu je kolagen, který je základní stavební složkou pojivových tkání. Existuje celá řada typů kolagenu, ale nejčastější je kolagen typu I. Tento typ je tvořen tzv. tropokolagenem, což je trimerní pravotočivá struktura, která se skládá ze tří levotočivých α -helixů. Dva z těchto řetězců jsou identické (značených $\alpha 1$) a jeden odlišný (značeného $\alpha 2$). Sekvence obou typů řetězců si jsou velmi podobné mezi jednotlivými živočišnými druhy. Mezi savci je tato podobnost víc než 90% a větší podobnost je u $\alpha 1$ řetězce než u $\alpha 2$ řetězce¹³. Srovnání podobností sekvencí v kolagenu typu I u savců je okolo 99 %¹³.

Jedny z analytických metod, které se používají k identifikaci zvířecího původu pergamentů, jsou optické metody. Na makroskopické úrovni jsou strany pergamentu odlišné, na lícové straně jsou viditelné vlasové folikuly, zatímco na rubové straně je pergamen více homogenní¹⁴. V mikroskopickém měřítku pergamen obsahuje hlavně kolagenová vlákna typu I, která jsou orientována rovnoběžně s povrchem a organizovaná v kolagenové síti. Pro zvířecí druhy jsou charakteristické vzory vlasových folikul a obsah tuku v kůži, které ovlivňují vzhled a strukturu povrchu¹⁵. Postupné ošetření zvířecí kůže během výroby pergamentu a degradace povrchu v průběhu času však ztěžují určení druhu, proto je potřebné vyvinout spolehlivé metody vedoucí ke správné identifikaci druhů¹⁶. Optické metody mají výhodu v tom, že jsou to neinvazivní metody a nevyžadují prakticky žádnou předchozí přípravu vzorku. V roce 2019 byla navržena nová metoda identifikace zvířecího druhu pergamentu kombinující spektrofotometrii a statistiku. Díky své struktuře je pergamen schopný rozptylovat a absorbovat světlo, takže lze sledovat difúzní odraz, propustnost a absorpci záření. Absorpční a rozptylové vlastnosti byly měřeny v širokém spektrálním rozsahu (UV-VIS-NIR) za použití standardního fotospektrometrického zařízení. Shromážděná optická data byla analyzována pomocí statistické metody analýza hlavních komponent (PCA). Tato metoda může vést k přesné identifikaci druhů, a to i u blízce příbuzných druhů (koza vs. ovce), jejichž kolagenové proteiny se odlišují jen v několika aminokyselinách¹⁶.

Pro analýzu pergamentů se dosud využívalo dvou způsobů přípravy vzorků. První způsob je použití malého kousku pergamentu (cca 0,3x0,3 cm), tedy jde o destruktivní vzorkování. Druhý způsob je nedestruktivní a jedná se o triboelektrickou extrakci. Při tomto vzorkování dochází k extrakci na PVC polymer v pevné fázi. Gumové polymery z PVC jsou obecně přijímány jako neinvazivní opatření pro odstraňování nečistot. Navíc tato technika má výhodu v konzervaci proteínového vzorku za pokojové teploty bez dalších požadavků na skladování. Při porovnání následné analýzy vzorků vytvořených destruktivně a nedestruktivně, tak optimalizace metodiky triboelektrické extrakce umožnila získat stejné, ne-li lepší výsledky, než při použití skutečného fragmentu pergamentu¹⁷.

Jedna z destruktivních metod, které mají za cíl určit zvířecí druh pergamentu, tak je analýza ancient DNA (aDNA). Extrakcí a sekvenováním DNA můžeme identifikovat jednak druh, ale i pohlaví použitého jedince a analýzou malých rozdílů v genetickém kódu můžeme určit možnou variantu plemene¹⁸. Výzkum aDNA založený na polymerázové řetězové reakci (PCR) má však své nedostatky, zejména pokud jde o kontaminující DNA. Největším problémem je, že PCR reakce upřednostňuje delší a méně poškozené řetězce, tedy

upřednostňuje kontaminaci před endogenní DNA, což znemožňuje identifikaci¹⁹. Lepší výsledky přináší sekvenování nové generace (NGS), které pracuje s kratšími fragmenty, generuje o mnoho více dat, vykazuje vyšší citlivost a je méně náchylné k chimérickým artefaktům, které mohou vzniknout v PCR²⁰. NGS oproti tradičnímu PCR umožňuje analýzu heterogenních vzorků, protože současně poskytuje informaci pro více než 10 milionů náhodně vybraných molekul nukleové kyseliny ve vzorku²¹.

Další možnosti určení zvířecího původu pergamentu nabízí proteomika. Rozdíly v kolagenu mezi jednotlivými živočišnými druhy byly studovány v rámci zooarcheologického projektu ZooMS, který byl zaměřen na analýzu kolagenu obsaženého v kostech²². Vzhledem k tomu, že kost je nejběžnějším archeologickým nálezem, hledala se jiná molekula k analýze než aDNA, jejíž analýza je drahá a nezaručuje úspěšnou identifikaci živočišného druhu. Oproti aDNA je kolagen hojněji zastoupený, je to stabilnější analyt a jeho analýza je podstatně levnější. Nejpodstatnější výhodou je, že princip ZooMS je minimálně destruktivní, protože pro analýzu je potřeba pouhých několik miligramů kosti. Vzorky byly nejdříve demineralizovány 0,6M HCl po dobu 18 hodin, a pak 18 hodin štěpeny trypsinem a analyzovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF s použitím kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové jako matrice. Bylo zjištěno, že ačkoli jsou sekvence kolagenových řetězců velmi konzervativní, tak prostřednictvím proteomické analýzy a použitím neuronové sítě, do které bylo začleněno 32 živočišných druhů, se v archeologických nálezech kostí podařilo úspěšně identifikovat zvířecí druhy. Na základě těchto výsledků bychom rádi aplikovali podobný postup i pro rozlišení zvířecích druhů u pergamentů. Na historických vzorcích pergamentu se již Kirby et al. (2013) pokoušeli určit zvířecí druh, ovšem používali metodu hmotnostní spektrometrie spojující ionizaci pomocí matrice a průletový analyzátor (MALDI-TOF) a porovnávali vzorek pergamentu s databází vytvořenou z kolagenu obsaženého v kostech²³. Vzorky obsahující kolagen se vyznačují ve spektru charakteristickými píky, jejichž poloha je unikátní pro jednotlivé zvířecí druhy. Porovnání vzorků s databází kolagenů známého původu tvoří základ pro identifikaci. Princip přiřazení vrcholů kolagenových peptidů a tím odvození druhu je přímočarý, ale je potřeba překonat řadu problémů. Posttranslační modifikace peptidů mohou posunout očekávanou polohu vrcholů ve spektrech. Je pravděpodobné, že i způsob přípravy vzorku má vliv na výsledné spektrum. Z těchto důvodů je přímé použití sekvenčních dat pro identifikaci druhů pomocí MS dosud neřešitelné, ale je možné použít statistický software, který toto porovnávání zjednoduší^{24,25}.

Závěr

Určení zvířecího původu pergamentu je klíčové pro správnou konzervaci a má značnou informativní hodnotu pro kunsthistoriky. Tento článek představuje rozdílné analytické metody, kterými je možné identifikovat živočišný původ pergamentu. Nejméně invazivními metodami jsou jednoznačně optické metody vzhledem k tomu, že je použit nijak neupravený pergamen. Dále jsou v článku uvedeny dva možné způsoby přípravy vzorků pro analýzu DNA a proteomickou analýzu. Díky modernější metodě sekvenování (NGS) není nutné, aby vzorek byl tak homogenní jako v případě PCR. Co se týká proteomického přístupu, tak v současné době se nejvíce používá hmotnostně spektrometrická metoda MALDI-TOF.

Literatura

1. Diehl E: Bookbinding: its background and technique, Courier Corporation, 1980.
2. Žabková K.: Diplomová práce. Masarykova univerzita 2010.
3. Zelinger J, Brabec M, et al.: Konzervace pergamentu a jeho uložení, 1992.
4. Tobolka ZV: Kniha, její vznik, vývoj a rozbor, Orbis, 1949.
5. Ďurovič M: Restaurování a konzervování archiválií a knih, Paseka, 2002.
6. Slovák R (2008): Historická výroba pergamentu, In: *Knihvazač: Knihařská ročenka*, 1, 60.
7. Blažej A: Technologie kůže a kožešin, Státní nakladatelství technické literatury, 1984.
8. <https://scribes.lochac.sca.org/articles/parchment.htm>, staženo 20. 11. 2020
9. https://is.muni.cz/el/1431/jaro2018/C5985/KUZE_USEN_PERGAMEN_-_SKRIPTA-2018.pdf, staženo 20. 11. 2020
10. Kubička R and Zelinger J: Výkladový slovník: malířství, grafika, restaurátorství, Grada Publishing, 2004.
11. Dřevíková J., Teoretická bakalářská práce – Průřez technikami iluminovaného rukopisu. IRKT Lito-myšl, 2002
12. Jarošová L.: Diplomová práce. Masarykova univerzita 2009.
13. <https://www.spectroscopyeurope.com/article/zooms-collagen-barcode-and-fingerprints>, (navštíveno 14. 1. 2020)
14. Bischoff FM: Pergamentdicke und Lagenordnung: Beobachtungen zur Herstellungstechnik Helmarshausener Evangeliare des 11. und 12. Jahrhunderts, Thorbecke (1991).
15. Moog G: *Eine Betrachtung histologischer Merkmale als Hilfe bei der Zuordnung von Pergamenten zum Ausgangsmaterial in Pergament-Geschichte, Struktur, Restaurierung, Herstellung*, ed. Rück, (1991).
16. Alvarez AMF, Bouhy J, et al.: *Sci. Rep.* 9(1), 1 (2019).
17. Fiddymment S, Holsinger B, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(49), 15066 (2015).
18. Bower MA, Campana MG, et al.: *J. Inst. Conserv.* 33(1), 1 (2010).
19. Hofreiter M, Serre D, et al.: *Nat. Rev. Genet.* 2(5), 353 (2001).
20. Krause J, Briggs AW, et al.: *Curr. Biol.* 20(3), 231 (2010).
21. Khodakov D, Wang C, et al.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 105(3), 1 (2016).
22. Buckley M (2018). *Zooarchaeology in Practice*, pp. 227: Springer.
23. Kirby DP, Buckley M, et al.: *Analyst* 138(17), 4849 (2013).
24. Hickinbotham S, Fiddymment S, et al.: *Bioinformatics* (2020).
25. Kuckova S, Rambouskova G, et al.: *J. Mass Spectrom.* 50(11), 1270 (2015).

Souhrn

Zubová A.: Rozlišení pergamenů podle jejich zvířecího původu

Pergameny jsou cennými historickými objekty, které byly po několik tisíciletí až do nedávné doby používány k zápisu nejrozličnějších informací. Jsou vyrobeny ze zvířecích kůží, což je stabilní materiál, ale pokud není vhodně skladován, dochází k jeho degradaci, a to vede k nenahraditelné ztrátě kulturního bohatství. Hlavní složkou je kolagen, který patří mezi velmi konzervativní bílkoviny. Určení zvířecího původu pergamentu je nutné pro jejich správnou konzervaci a má značnou informativní hodnotu pro kunsthistoriky. Určení zvířecího druhu pergamentu je možné různými analytickými metodami, které jsou popsány v tomto článku.

Klíčová slova: pergamen, zvířecí původ, kolagen, aDNA, optické metody, analýza DNA, hmotnostní spektrometrie

Summary

Zubová A.: Differentiation of parchments according to their animal origin

Parchments are valuable historical objects that have been used for several millennia until recently to record a variety of information. They are made of animal skins, which is a stable material, but if not stored properly, it degrades, leading to an irreplaceable loss of cultural wealth. The main ingredient is collagen, which is a very conservative protein. Determination of the animal origin of parchments is necessary for their proper conservation and has considerable informative value for art historians. The determination of the animal species origin of parchment is possible by various analytical methods, which are described in this article.

Keywords: parchment, animal origin, collagen, aDNA, optical methods, analysis of DNA, mass spectrometry

ROD *Pseudomonas* JAKO PRODUCENT SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ A CHITINOLYTICKÝCH ENZYMŮ POTENCIÁLNĚ VYUŽITELNÝCH JAKO ZÁKLAD BIOPESTICIDŮ

Jiří Mach¹, Martin Halecký², Tereza Hnátková³

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze, Česká zemědělská univerzita v Praze; ²Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze;

³Česká zemědělská univerzita v Praze, Dekonta, a. s. v Dřetovicích; jiri.mach@vscht.cz

Úvod

Stále nekončící nárůst lidské populace souvisí se zvyšujícími se nároky na množství vyprodukovaných plodin. Výnosy z obhospodařovaných polí jsou velmi závislé na schopnosti rostlin bránit se proti všudypřítomným škůdcům. Jedná se především o mikroorganismy (bakterie, plísňe), hmyz či živočichy (např. hádátka)¹. Rostliny mají obranné mechanismy, kterými se před zmíněnými škůdci brání. V některých případech dochází k překoná-

ní těchto přirozených bariér, což vede k narušení životaschopnosti hospodářsky významných plodin². Člověk záměrně zvyšuje rostlinnou obranyschopnost používáním chemických postřiků, které mají negativní vliv na životní prostředí. Kumulují se v tukové tkáni živočichů, a také narušují některé fyziologicky významné funkce zasaženého organismu. Jedná se především o organofosfáty (Roundup®), chlororganické sloučeniny (v minulosti používané DDT), karbamáty a mnoho dalších³.

V posledních letech dochází ke snižování aplikovaného množství těchto látek a do popředí zájmu se dostávají biopesticidy, jejichž součástí mohou být např. enzymy či sekundární metabolity⁴. Efektivita účinku těchto látek závisí na znalosti mechanismu interakce mezi patogenem a rostlinným hostitelem, který se snaží ochránit před vniknutím konkrétního škůdce. Pro pochopení této problematiky je nezbytné znát i proces inaktivace patogenního organismu použitou biologicky aktivní molekulou. Existuje celá řada způsobů, pomocí kterých je možné dosáhnout účinného zneškodnění původců onemocnění hospodářských plodin. Kromě biologicky aktivních látek může rostlinného parazita zahubit jiný parazit. Popsaný vztah se označuje pojmem „hyperparazitismus“, který je typický pro bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus* schopnou parazitovat např. bakterii *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*⁵.

Významnou roli zde hrají mikrobiální producenti, především půdní mikroorganismy. Jedná se především o rody *Bacillus*, *Pseudomonas* či *Trichoderma*. Jimi vyprodukované biologicky aktivní látky (např. chitinolytické enzymy nebo proteázy) se v polním hospodářství uplatňují jako tzv. „biokontrolní agents“, antagonisté rostlinných patogenů či ochrana sklizené (a uskladněné) úrody před případnou hnilobou či jinou chorobou⁶. Chitinolytické enzymy zajišťují rozklad buněčných stěn hub či exoskeletů (především) hmyzu, což negativně ovlivňuje životaschopnost těchto fytopatogenů. Mají tedy antifungální a insekticidní vlastnosti, které jsou velmi důležité pro vytvoření účinné ochranné bariéry odolné vůči těmto škůdcům⁷.

Jedním z moderních způsobů ochrany rostlin před rostlinnými patogeny je proces úpravy jejich genetického materiálu. Geny, kódující chitinolytické enzymy, jsou vloženy do vektoru. Po ligaci je vzniklý rekombinantní genetický materiál vnesen do cytoplasmy akceptorové, prokaryotické buňky procesem elektroporace. Nejčastěji je využita tumor-indukující, gramnegativní bakterie druhu *Agrobacterium tumefaciens* běžně napadající vyšší rostliny. Tento biologický činitel je posléze kultivován na pevném selektivním médiu (přítomnost antibiotika). K transgenním bakteriím je přidán rostlinný fragment. Vytvořené geneticky modifikovaného, nediferencovaného pletivo (tzv. kaulus) je přemístěno a dále kultivováno za vzniku vzrostlé GMO rostliny. Výše popsaným způsobem byla vytvořena např. Bt-kukuřice⁸.

Vyprodukovaný biopesticidní preparát, jehož součástí byly chitinolytické enzymy, byl aplikován na populaci komárů larev druhu *Aedes aegypti*. Přítomnost biologicky aktivních molekul měla negativní vliv na životaschopnost larev, což se projevilo snížením lokálního výskytu tohoto významného přenašeče mnohých onemocnění, zejména horečky Dengue či žluté zimnice⁹.

Rod *Pseudomonas* jako producent biologicky aktivních molekul

Studovaný bakteriální rod produkuje celou řadu sekundárních metabolitů, které jej mohou v některých případech zvýhodňovat před konkurenty. Většina těchto produktů má antibakteriální, fungicidní či insekticidní účinky. Mezi nejznámější antibiotika patří 2,4-diacetylfloroglucinol (DAPG), pyoluteorin, pyrrolnitrin či fenazin¹⁰. Aplikací suspenze DAPG-produkujících bakterií na hospodářsky významné plodiny je možné dosáhnout vyššího výnosu z dané zemědělské plochy, jelikož DAPG má antifytopatogenní účinky a chrání rost-

linu před napadením škůdcem. Mechanismus účinku tohoto metabolitu spočívá v narušení tří klíčových dějů, a to konkrétně buněčné homeostáze, integrity cytoplasmatické membrány a ochranného systému eliminujícího volné kyslíkové radikály¹¹. Fenazinová baktericidní barviva se uplatňují též i jako akceptory elektronů za anaerobních podmínek (známo u bakterie druhu *Pseudomonas aeruginosa*)¹². Tvorba těchto látek je ovšem možná pouze v případě dosažení prahové koncentrace autoinduktorů tvořených jedinci resistantního biofilmu¹³. Fluorescentní zástupci rodu *Pseudomonas* produkují fluoreskující žlutozelená či modrá barviva (pyoverdin, fluorescein, pyocyanin)¹⁴. Tyto pigmenty mají baktericidní účinky, což je důvod jejich potenciálního využití jako součást biopesticidů. Některé tyto pigmenty (např. pyoverdin) náleží též do heterogenní skupiny organických molekul o velikosti 500 – 1500 Da odbornou obcí nazývanou jako siderofory¹⁵. Jejich funkce spočívá v tvorbě komplexu s ionty železa, což má za následek snížení lokálního množství tohoto nutrientu v půdě. Tento deficit negativně ovlivňuje životaschopnost některých půdních, mnohdy fytopatogenních, bakterií¹⁶. Vzniklé komplexy jsou přijaty bakteriální buňkou, což má za následek zvýšení koncentrace iontů železa v intracelulárním prostředí (produkce sideroforů nastává v případě dosažení limitní koncentrace iontů železa uvnitř buňky). Pro transport této komplexní sloučeniny z mimobuněčného prostředí do buněčného interiéru jsou velice důležité povrchové, membránové TonB dependentní receptory¹⁷. Tato chelatační činidla jsou klasifikována do tří skupin. Jedná se konkrétně o hydroxamáty, katecholáty a α -hydroxykarboxyláty¹⁸. Podobnou komplexotvornou vlastností disponuje další biologicky aktivní metabolit známý jako krochelin A tvořící též komplexní sloučeniny se železitými ionty¹⁹.

Někteří zástupci rodu *Pseudomonas*, obývající rhizosféru vyšších rostlin, mají pozitivní vliv na jejich vitalitu, jelikož rostliny chrání před patogeny, a zároveň usnadňují rostlině přijmout železo v podobě již zmíněného chelátu. Též produkují významné biologicky aktivní látky patřící mezi fytohormony, které ovlivňují fyziologický vývoj rostliny²⁰. Za zmínku stojí jeden z nejdůležitějších auxinů, a to indol-3-octová kyselina ovlivňující průběh biosyntetických drah nebo fotosyntézy, růst postranních kořenů či samotnou cytokinezi²¹.

Enzymový aparát výše definovaného rodu *Pseudomonas* je experimentálně využíván v environmentálních technologiích jako základ potenciálního biopesticidního preparátu. Známým příkladem je nepatogenní druh *P. gessardii*, který není cytotoxický a nemá tedy negativní vliv na biocenózu, jež se nachází v okolí obhospodařovaného území. Navíc produkuje celou řadu sekundárních metabolitů, které chrání hospodářské plodiny před patogeny. Nejvýznamnější biologicky aktivní molekulou je 2,4-diacetylfloroglucinol mající antifytopatogenní účinky. Výnos ze zemědělské plochy, na kterou byl tento mikroorganismus aplikován, je podstatně vyšší než výnos z neošetřeného pole¹¹. Díky těmto prospěšným vlastnostem se začíná experimentovat s aplikací těchto mikroorganismů na obhospodařované zemědělské plochy, za účelem zvýšení kvality a výnosu z daného pole.

Chitinolytické enzymy jako základ biopesticidu

Do popředí zájmů se chitinolytické enzymy dostávají především pro svoji schopnost účinné degradace

chitinu. Tento strukturní homolog celulózy je druhým nejzastoupenějším biopolymerem na naší planetě, jehož odhadované roční vyprodukované množství činí $10^{10} - 10^{11}$ tun²². V podobě této organické sloučeniny se dusík nejčastěji dostává do půdy, jejíž součástí je tzv. edafon (půdní biotické společenství), který zajišťuje jeho degradaci. Je běžnou součástí exoskeletu členovců (např. koryši a hmyz), buněčných stěn hub či některých zástupců řas. Chitinolytické enzymy lze tedy použít proti významné části fytopatogenů⁶.

Základní stavební jednotkou tohoto homopolysacharidu je N-acetyl-D-glukosamin, jehož jednotlivé monomery jsou spojeny kovalentní β -1,4 glykosidickou vazbou. Vznik této vazby zajišťuje chitinsyntáza²³. Tento polymer existuje ve třech základních krystalických formách (α -, β -, γ -) lišících se strukturou polymerního řetězce, což se navenek projevuje odlišnými mechanickými vlastnostmi této látky. α -forma je tvořena dvěma antiparalelními mikrofibrily, které jsou spojeny velmi silnými intermolekulárními vodíkovými vazbami, kdežto struktura β -formy je tvořena paralelními řetězci. Třetí krystalická podoba toho polysacharidu disponuje strukturními prvky, které jsou součástí dvou předešlých typů²⁴.

Produkce chitinolytických enzymů

Oproti výše uvedeným sekundárním metabolitům jsou chitinolytické enzymy již produkovány ve větším měřítku. Produkci enzymů v průmyslovém měřítku předchází studium bioproduktu v laboratorních podmínkách, za účelem nastavení optimálních kultivačních podmínek. Následný scale-up neboli převedení produkce do většího, v tomto případě průmyslového, měřítka často doprovází nepředvídatelné komplikace v podobě odlišného chování biologického činitele, které je způsobeno provedenou změnou podoby biotechnologického procesu²⁵.

Mikrobiální produkce biologicky aktivních molekul představuje poměrně složitý proces, jehož fyzikální podmínky musí být v průběhu kultivace regulovány a udržovány na předem definované hodnotě. Důležitými parametry jsou zejména teplota, pH, složení média, doba kultivace a množství rozpuštěného kyslíku (klíčové pro aerobní mikroorganismy). Přítomnost specifického induktoru ve vsádce je též zásadní pro tvorbu indukovatelných biokatalyzátorů, na rozdíl od konstitutivních enzymů, které jsou syntetizovány neustále nezávisle na složení kultivačního média²⁶. Nízkonákladové odpadní produkty (sláma, peří, exoskelety krevet, mláto či lignocelulosevé zbytky) jsou často využívány v podobě levného substrátu tedy jako zdroje uhlíku, energie a někdy též i dusíku. Jejich biodegradace je zprostředkována biologickým činitelem. Takto komplexní nutrienty jsou ovšem obtížněji užitelné oproti jednodušším látkám např. jednoduchým sacharidům či močovině, což může negativně ovlivnit délku procesu²⁷. Prášková či koloidní forma chitinu je sice dražší, ale v laboratorních podmínkách běžně používána ke studiu produkce chitin degradujících enzymů. Pro průmyslovou produkci by byl ekonomicky přijatelnější odpadní produkt z mořských živočichů (především z exoskeletu koryšů)²⁸. Tato levná varianta je rovnocennou alternativou dražších forem chitinu. Nižší cena této suroviny by pozitivně ovlivnila celkovou ekonomickou bilanci daného biotechnologického procesu.

Submerzní kultivace chitin-produkujících mikroorganismů v mechanicky či pneumaticky míchaném bio-

reaktoru je nejčastěji provozována v průmyslu i přesto, že vznikající produkt má poměrně nízkou koncentraci ve vsádce po ukončení bioproduktu. Jedním z nejdůležitějších parametrů, který je nutné nekompromisně udržovat na předem definované hodnotě, je koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu. V případě jeho značného poklesu dochází ke snížení produktivity z důvodu započetí sporulačního procesu (sporulující druhy), během kterého dochází k tvorbě rigidních útvarů schopných přežít nepříznivé podmínky²⁹. Za účelem zvýšení výtěžnosti bioproduktu je možné použít kontinuálně pracující, mechanicky míchaný bioreaktor s externím recyklem biomasy. Do vsádky se vrací pouze biomasa membránovou filtrací oddělená od média. Součástí vznikajícího permeátu jsou extracelulární chitinázy. Nevýhodou tohoto uspořádání je mechanické namáhání buněk při průchodu armaturami a skrz čerpadlo, a také možnost vzniku kyslíkového deficitu v potrubí. Imobilizace biologického činitele na pevném nosiči je též vhodná ke kontinuální kultivaci. V takovémto uspořádání jsou mikroorganismy odolnější vůči katabolické represí. Složení média ovlivňuje výtěžnost procesu. Nejvhodnějším zdrojem dusíku je síran amonný. Přítomnost druhého zdroje uhlíku (galaktóza či škrob) má pozitivní vliv na produktivitu. Chitinasovou aktivitu dané vsádky je možné navýšit přidáním roztoku manganatých či měďnatých iontů. Tyto enzymy jsou relativně stabilní při pokojové teplotě a v rozsahu hodnot pH od mírně kyselých po mírně bazické. Podstatou downstream processingu je izolace vyprodukovaných enzymů, aniž by došlo k jejich deaktivaci. Chromatografické metody (gelová permeační a afinitní) jsou vhodnými nástroji pro purifikaci tohoto biokatalyzátoru³⁰. Při produkci chitinas vznikají odpadní produkty, např. N-acetyl- β -D-glukosamin, který může být dále využíván druhem *Mucor circinelloides* za vzniku bioetanolu často využívaného jako biopalivo³¹. Příkladem aplikace chitinas na konkrétní plodinu je ochrana bavlníku před nočním motýlem druhu *Helicoverpa armigera*³². Součástí domény *Archea* jsou extrémofilní zástupci, kteří produkují termostabilní chitinázy mající významný potenciál pro budoucí výzkum a následnou aplikaci.

Závěr

Studium půdních mikroorganismů či biologicky aktivních, v přírodě rozložitelných látek schopných ochránit hospodářsky významné plodiny před škůdci či jejich posklizňovém znehodnocení, je jedním z hlavních pilířů moderních environmentálně orientovaných přístupů v (intenzivním) zemědělství založených na prevenci znečištění životního prostředí. Nezbytnou vlastností studovaných antagonistů rostlinných patogenů (součást biopesticidního preparátu) musí být nulová toxicita vůči ostatním organismům obývajícím prostředí, v němž byl použit příslušný preparát. Tento ekologicky přívětivý produkt je vhodné konstruovat jako směs biologicky aktivních molekul, díky kterým má zmíněné, unikátní vlastnosti a komplexní účinek. Jedná se zejména o antibiotika (2,4-diacetylfloroglucinol), enzymy (chitinolytické enzymy či proteázy) nebo pigmenty (siderofory). Tyto molekuly negativně ovlivňují životaschopnost fytopatogenů, a proto je jejich přítomnost v preparátu vyžadována. Aplikace zdravotně a ekologicky nezávadných biopesticidů je z legislativního hlediska snazší než příprava a následné pěstování geneticky upravených rostlin, nemluvě o aplikaci standardních pesticidů s následným řešením nebezpečných externa-

lit takto pojaté ochrany rostlin. Některé státy nepovažují genetické manipulace rostlin za zcela bezpečné, a proto omezují či přímo zakazují pěstování takto modifikovaných organismů. Evropská unie v současnosti upírá směřem k rozšíření biopesticidů velké úsilí. Schvalování a aplikaci těchto přípravků je ovšem nezbytné zasadit do standardizovaného legislativního rámce, který se nyní tvoří. Úspěšnost nasazení biopesticidů bude vel-

mi důležitá pro uspokojení stále se zvětšující poptávky po obživě nezadržitelně rostoucí lidskou populací ne však za cenu rostoucí kontaminace životního prostředí.

Poděkování

Tento projekt (EnzymeCropProtect, program Eurostars 2) vznikl ve spolupráci s Dekontou, a. s., Dřetovice.

Literatura

1. Rodgers PB: *Pestic. Sci.* 39, 2 (1993).
2. Xin X-F, Kvitko B, et al.: *Microbiology* 16, 5 (2018).
3. Singh G, Bhalla A, et al.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 3, (2013).
4. Copping LG and Menn JJ: *Pest Manag. Sci.* 56, 8 (2000).
5. Köhl J, Kolnaar R, et al.: *Front. Plant Sci.* 10, 845 (2019).
6. Veliz EA, Martínez-Hidalgo P, et al.: *AIMS Microbiol.* 3, 3 (2017).
7. Höfte M and Altier N: *Res. Microbiol.* 161, 6 (2010).
8. Abbas MST: *Egypt. J. Biol. Pest. Control* 28, 1 (2018).
9. Dahiya N, Tewari R, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 6 (2006).
10. Özen AI and Ussery DW: *Microb. Ecol.* 63, 2 (2012).
11. Meyer SLF, Halbrecht JM, et al.: *J. Nematol.* 41, 4 (2009).
12. Blankenfeldt W and Parsons JF: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 29, (2014).
13. Wagner VE, Bushnell D, et al.: *J. Bacteriol.* 185, 7 (2003).
14. Cody YS and Gross DC: *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 5 (1987).
15. Vindeirinho JM, Soares HMVM, et al.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2020).
16. Wensing A, Braun SD, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 9 (2010); Emna A, Kałużna M, et al.: *Plant Pathol.* 66, (2016).
17. Llamas MA, Sparrius M, et al.: *J. Bacteriol.* 188, 5 (2006).
18. Ahmed E and Holmström SJM: *Microb. Biotechnol.* 7, 3 (2014).
19. Baars O, Zhang X, et al.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 57, 2 (2018).
20. Srivastava R, Aragno M, et al.: *Indian J. Microbiol.* 50, 3 (2010).
21. Zhao Y: *Annu. Rev. Plant. Biol.* 61, (2010).
22. Elieh-Ali-Komi D and Hamblin MR: *Int. J. Adv. Res.* 4, 3 (2016).
23. Banks IR, Specht CA, et al.: *Eucaryot. Cell* 4, 11 (2005).
24. Jang M-K, Kong B-G, et al.: *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 42, 14 (2004).
25. Crater JS and Lievens JC: *FEMS Microbiol. Lett.* 365, 13 (2018).
26. Singh R, Kumar M, et al.: *3 Biotech.* 6, 2 (2016).
27. Pant G, Prakash A, et al.: *J. Taibah Univ. Sci.* 9, 1 (2015).
28. Swiontek BM, Jankiewicz U, et al.: *Curr. Microbiol.* 68, 1 (2014).
29. Kao P-M, Chen C-I, et al.: *Biochem. Eng. J.* 34, 2 (2007).
30. Stoykov YM, Pavlov AI, et al.: *Eng. Life Sci.* 15, 1 (2015).
31. Inokuma K, Takano M, et al.: *Biochem. Eng. J.* 72, (2013).
32. Binod P, Sukumaran RK, et al.: *J. Appl. Microbiol.* 103, 5 (2007).

Souhrn

Mach J., Halecký M., Hnátková T.: Rod *Pseudomonas* jako producent chitinolytických enzymů a sekundárních metabolitů potenciálně využitelných jako základ biopesticidů

Studium aplikace ekologicky nezávadných biopesticidů obsahujících biologicky aktivní látky je zásadní pro omezení aplikace chemických postřiků. Biopesticidy mají antifytopatogenní účinky. Jejich hlavní složkou jsou intaktní buňky mikroorganismů nebo pouze biologicky aktivní látky. Významnou roli zde zastávají gramnegativní, nesporulující, pohyblivé a tyčinkovité bakterie patřící do rodu *Pseudomonas*. Jejich význam pro potenciální použití jako biopesticidu spočívá v jejich produkci rozmanité směsi biologicky aktivních látek (antibiotika, barviva a enzymy). Do popředí zájmů se dostávají chitinolytické enzymy katalyzující biodegradaci chitinu, jenž je součástí buněčných stěn či exoskeletů mnoha fytopatogenních organismů. Jejich schopnost účinně inaktivovat rostlinné škůdce, je jedním z důvodů jejich studia. Použitím těchto přípravků na obhospodařované pole je možné docílit vyšších výnosů. V příštích několika desetiletích bude úspěšnost zavedení tohoto procesu do praxe klíčová pro nasycení stále rostoucí lidské populace ne však za cenu rostoucí kontaminace životního prostředí.

Klíčová slova: biopesticid, *Pseudomonas gessardii*, chitinolytické enzymy, cytotoxicita, biodegradace, enzymová aktivita, ochrana rostlin

Summary

Mach J., Halecky M., Hnatkova T.: Genus *Pseudomonas* as a producer of chitinolytic enzymes and secondary metabolites potentially useful as a basis for biopesticides

The study of the application of environmentally friendly biopesticides containing biologically active substances is essential to limit the application of chemical sprays. Biopesticides have antiphytopathogenic effects. Their main component are intact cells of microorganisms or only biologically active substances. A gram-negative, non-sporulating, motile and rod-shaped bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* play an important role here. Their significance for potential use as a biopesticide consists in their production of a various mixture of biologically active substances (antibiotics, dyes and enzymes). Chitinolytic enzymes catalyzing the biodegradation of chitin, which is part of the cell walls or exoskeletons of many phytopathogenic organisms, are gaining prominence. Their ability to effectively inactivate plant pests is one of the reasons for their study. By using these products on the cultivated field, it is possible to achieve higher yields. In the next few decades, the success of putting this process into practice will be crucial to saturating the ever-growing human population, but not at the cost of growing environmental contamination.

Keywords: biopesticide, *Pseudomonas gessardii*, chitinolytic enzymes, cytotoxicity, biodegradation, enzyme activity, plant protection

OBSAH

Úvodem	1
Hošková M., Smirnova T: Proteomika jako hlavní nástroj při hledání biomarkerů rakoviny pankreatu	2
Kulišová M.: Oomycety – patogeny či biokontrolní činidla?	6
Miškovská A.: Zelené biotechnologie pro přípravu nanočástic kovů	10
Zubová A.: Rozlišení pergamenů podle jejich zvířecího původu	14
Mach J., Halecký M., Hnátková T.: Rod <i>Pseudomonas</i> jako producent sekundárních metabolitů a chitinolytických enzymů potenciálně využitelných jako základ biopesticidů	16

CONTENT

Editorial	1
Hošková M., Smirnova T: Proteomics as a major tool in the search for biomarkers of pancreatic cancer	2
Kulišová M.: Oomycetes - pathogens or biocontrol agents?	6
Miškovská A.: Green biotechnology for the preparation of metal nanoparticles	10
Zubová A.: Differentiation of parchments according to their animal origin	14
Mach J., Halecký M., Hnátková T.: Genus <i>Pseudomonas</i> as a producer of chitinolytic enzymes and secondary metabolites potentially useful as a basis for biopesticides	16

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

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

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

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

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

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

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

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

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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

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

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

BIOPROSPECT

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

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

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

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

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

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