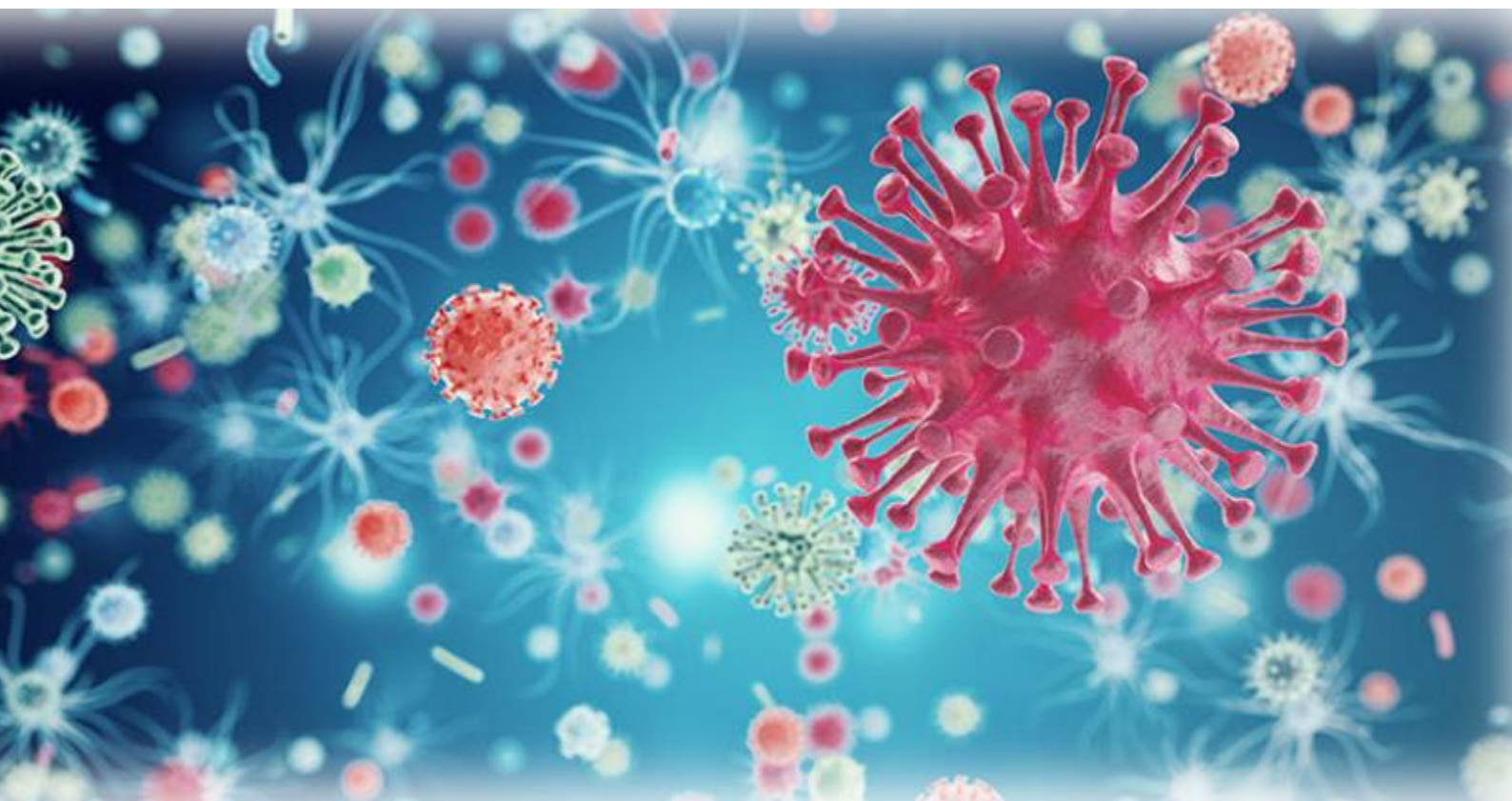


# biológia ekológia chémia



časopis pre školy  
ročník 21  
číslo 2  
2017

Predkladané dve jesenné čísla časopisu Biológia, Ekológia a Chémia sa vydávajú z príležitosti ukončenia monitorovacieho obdobia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“ (ITMS 26240120003), ktorý bol riešený v rámci Operačného programu Výskum a vývoj (OP VaV) a podporovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Vďaka tomuto operačnému programu (OP VaV) bola v rokoch 2007-2013 poskytovaná finančná podpora na aktivity výskumu a vývoja a na infraštruktúru vysokých škôl. Z geografického hľadiska pokrýva celé územie Slovenskej republiky.

Predložený a v priebehu piatich rokov monitorovaný projekt vychádzal z analýzy priorít a potrieb vedeckého výskumu vo svete, Európskej únie a z potenciálu, ktorý Univerzita Komenského ako aj SAV v Bratislave predstavuje prostredníctvom excelentných vedecko-výskumných pracovníkov, zameraných vysokoškolských pedagógov, ako aj talentovaných študentov z rôznych stupňov vysokoškolského vzdelávania.

V súčasnom období je v rezorte školstva priam esenciálne, aby vysokoškolská veda a technika zahŕňala podporované výskumné aktivity verejných vysokých škôl v troch oblastiach: (a) prevádzku a rozvoj infraštruktúry vysokoškolskej vedy a techniky (vrátane rezervy na podporu neplánovaných vedeckých aktivít verejných vysokých škôl v oblasti vedy a techniky) a umožňovala uchádzať sa o projekty z Európskych štrukturálnych fondov, (b) základný výskum prostredníctvom vnútorného grantového systému VEGA a APVV, (c) aplikovaný výskum v oblasti školstva, pedagogiky a tvorivého a interpretačného umenia prostredníctvom vnútorného grantového systému KEGA. Takisto je nevyhnutné, aby vzdelávacie a vedecké inštitúcie na Slovensku v spolupráci s poprednými vedecko-výskumnými a univerzitnými pracoviskami v Európe, ale aj v zámorí získali príslušné „know-how“ v rôznych oblastiach vied o živej prírode s cieľom aplikovať ich rozvoj a uplatnenie pomocou moderných informačných prístupov genómiky, proteómiky, bunkového inžinierstva a bioinformatiky hlavne v medicíne a biotechnológiách, ako aj v priemyselnom inžinierstve.

V súhlase s uvedenou predstavou, bolo ambíciou projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“ (ITMS 26240120003) položiť základy špičkového centra zameraného na biomedicínsky výskum a vzdelávanie v tejto oblasti na pôde Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského, Lekárskej fakulty UK, Fakulty matematiky, fyziky a informatiky UK a Farmaceutickej fakulty UK a partnerských pracovísk zo Slovenskej akadémie vied (Virologický ústav SAV a Ústav molekulárnej biológie SAV) v Bratislave.

Poslaním „Centra excelentnosti na využitie informačných biomakromolekúl na zlepšenie kvality života“ bolo zabezpečiť, aby vzdelávanie a výskum v prírodovedných oblastiach na Slovensku sa mohol stať významnou súčasťou Európskeho výskumného a vzdelávacieho priestoru.

Snahou autorov článkov bolo priblížiť niektoré nové a zaujímavé poznatky, z rôznych oblastí vied o živote a ich aplikáciách v oblasti biomedicínskeho a biotechnologického výskumu, čitateľom z radov študentov i pedagógov všetkých typov škôl.

Gabriela Gavurníková, Marta Kollárová



**Európska únia**  
Európsky fond regionálneho rozvoja



**Agentúra**

**Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR**

**pre štrukturálne fondy EÚ**

## vydavateľ

Trnavská univerzita v Trnave  
Pedagogická fakulta  
Priemyselná 4  
P. O. BOX 9  
918 43 Trnava



## redakcia

Trnavská univerzita v Trnave  
Pedagogická fakulta  
Katedra chémie

## redakčná rada

prof. RNDr. Jozef Halgoš, DrSc.  
prof. RNDr. Marta Kollárová, DrSc.  
prof. RNDr. Eva Miadoková, DrSc.  
prof. RNDr. Pavol Záhradník, DrSc.  
prof. RNDr. Pavol Eliáš, CSc.  
prof. PhDr. Ľubomír Held, CSc.  
prof. RNDr. Miroslav Prokša, CSc.  
doc. RNDr. Jarmila Kmeťová, PhD.  
doc. RNDr. Zlatica Orsághová, CSc.  
doc. Ing. Ján Reguli, CSc.  
doc. RNDr. Ľudmila Slováková, CSc.  
doc. RNDr. Katarína Ušáková, PhD.  
doc. RNDr. Jozef Tatiersky, PhD.  
doc. RNDr. Ivan Varga, PhD.  
PhDr. Jana Višňovská

## recenzenti

prof. RNDr. Marta Kollárová, DrSc.  
RNDr. Gabriela Gavurníková, CSc.

## editor

PaedDr. Mária Orolínová, PhD.

## návrh obálky

RNDr. Gabriela Gavurníková, CSc.

ISSN 1338-1024



## obsah

### ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

2

**Modelové mikroorganizmy ako nástroj pre odhaľovanie univerzálnych biologických princípov**

*Ľubomír Tomáška*

6

**Genetika v medicíne**

*Filip Brázdovič*

10

**Cytoplazmatická membrána a jej fluidita**

*Marcela Morvová Jr., Libuša Šikurová*

14

**Význam a špecifita adsorbčných receptorov pri fágovej infekcii bakteriálneho hostiteľa**

*Adela Tkáčová, Lucia Bocánová, Gabriela Bukovská*

18

**Mikrobióm človeka a jeho vplyv na zdravotný stav organizmu**

*Yveta Gbelská, Nora Tóth Hervay*

23

**Úloha extracelulárnej DNA v patogenéze zápalových črevných chorôb**

*Barbora Čechová, Roman Gardlík*

26

**Genetická transformácia baktérií s využitím studenej plazmy**

*Pavol Mišenko, Roman Gardlík, Zdenko Machala*

30

**Úloha extracelulárnej DNA v patogenéze sepsy**

*Marianna Hladová, Ľubomíra Tóthová*

34

**Pteríny ako markery nádorových ochorení**

*Katarína Kolníková, Milan Zvarík, Libuša Šikurová*

39

**Kyselina hyaluronová – molekula tisícich tvárí**

*Gabriela Gavurníková, Barbora Bučková*

46

**Kyselina hyaluronová a jej biomedicínske aplikácie**

*Gabriela Gavurníková, Barbora Bučková*

52

**Vírus lymfocytovej choriomeningitídy ako ľudský patogén**

*Ľubomíra Lukáčiková, Katarína Lapošová, Silvia Pastoreková*

59

**Povrchové odštepovanie extracelulárnych domén proteínov ako významný regulačný fenomén**

*Ivana Vidličková, Miriam Zaťovičová, Silvia Pastoreková*

66

**Endolyziny bakteriofágov, ich funkcia a využitie**

*Gabriela Bukovská, Nora Halgašová*



# Modelové mikroorganizmy ako nástroj pre odhaľovanie univerzálnych biologických princípov

Lubomír Tomáška

Katedra genetiky  
Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, Mlynská dolina B-1  
842 15 Bratislava  
Slovensko  
tomaska1@uniba.sk

## Model microorganisms as tools for studying universal biological principles

### Abstract

Many fundamental principles governing basic cellular functions were revealed using simple model microorganisms. A choice of a "correct" microbe for curiosity-driven research of a given phenomenon combined with a hard work, collaboration, intuition, and serendipity resulted in major discoveries with direct biomedical and technological implications.

### Key words

Microorganisms, yeasts, telomeres, mitochondria

**Anything found to be true of *E. coli* must also be true of elephants<sup>1</sup>.**

Jacques Monod

## Úvod

*Phycomyces* je jednobunková mnohoadrová huba, ktorá má niekoľko výnimočných senzorických schopností. Jej sporangiofórum je schopné detegovať modré svetlo s intenzitou  $10^{-8}$  –  $10^1$  W/m<sup>2</sup> a odpovedať naň pozitívnym fototropizmom. Vykazuje tiež negatívny geotropizmus, jeho rast je stimulovaný fyzickým naťahovaním a má schopnosť vyhybať sa pevným objektom, ktoré sú umiestnené v jeho blízkosti. Fakt, že *Phycomyces* má tak široký repertoár reakcií na vonkajšie prostredie ilustruje relatívne bohatý senzorický svet tejto huby (Bergman a kol., 1969). Zároveň to, že ide o jednobunkový organizmus navádza na jeho využitie ako modelu pre štúdium detekcie, spracovania a interpretácie signálov, ktorým sú vystavené aj zložitejšie organizmy. S touto myšlienkou prišiel pred viac ako 50 rokmi Max Delbrück, geniálny fyzik, zakladateľ tzv. fágovej školy, ktorá zásadne prispela k odhaleniu základných princípov molekulárnej genetiky platných aj pre ľudské bunky. Využil

<sup>1</sup>Friedmann (2004). Monodov výrok je parafrázou staršieho citátu (z roku 1926) holandského mikrobiológa Alberta Jana Kluyvera: „From the elephant to butyric acid bacterium – it is all the same!“, metafora, ktorá ilustrovala hlavný odkaz knihy *Die Einheit in der Biochemie*, ktorú Kluyver v publikoval spolu s Hendrickom Jeanom Louisom Donkerom; Kluyver & Donker (1926).

prítom princíp (nazvaný tiež Delbrückov princíp), že príslušný fenomén je potrebné študovať u najjednoduchšieho organizmu, u ktorého sa vyskytuje (Kováč, 2000). Na rozdiel od bakteriofágov sa však *Phycomyces* do učebníc nedostala. Po Delbrückovej smrti záujem o využitie *Phycomyces* ako modelu pre štúdium senzorických funkcií na molekulárnej úrovni postupne upadol. Dôvodov mohlo byť niekoľko. Mnohoadrový charakter sporangiofór komplikoval izoláciu mutantov; pomerne zložitý životný cyklus spôsoboval problémy pri genetickej analýze; hrubá bunková stena odolávala väčšine činidiel, ktoré boli využívané pre cytologické experimenty. Okrem toho, ani samotné Delbrückovo laboratórium neprinieslo počas 30 rokov štúdia žiadny zásadný objav, ktorý by vyplýval z analýzy tejto fascinujúcej huby a ktorý by na jej štúdium motivoval ďalších ľudí. Napriek Delbrückovej genialite tak *Phycomyces* v snahe porozumieť fungovaniu eukaryotickej bunky zohrala iba vedľajšiu rolu a hlavnú úlohu prebrali iné organizmy.

## Saccharomyces cerevisiae ako model eukaryotickej bunky

Ak bola (aspoň zatiaľ) *Phycomyces* súčasťou komparzu, tak jednoznačnou hviezdou eukaryotickej biológie je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Takmer každý súčasný poznatok o eukaryotickej bunke priamo, alebo nepriamo vyplynul zo štúdia tejto jednobunkovej askomycéty. Krátka generačná doba (~90 min), schopnosť vegetatívneho rozmnožovania v haplo- i diploidnej fáze, ľahká indukcia meiózy, dobre definované pohlavia (párovacie typy), jednoduché kultivačné metódy umožňujúce získať v krátkom čase veľké množstvo buniek, schopnosť rásť v prítomnosti i neprítomnosti kyslíka (Hall a Linder, 1993; Feldman, 2010). Tieto (i ďalšie) vlastnosti spolu s jej biotechnologickým významom urobili zo *S. cerevisiae* (pučiaca, pivárenská kvasinka angl. *budding yeast*, *baker's yeast*) jeden z najčastejšie využívaných modelov eukaryotickej bunky (Botstein a Fink, 1988; 2011). Výsledkom desiatok tisícok štúdií rôznych aspektov života *S. cerevisiae* boli prelomové objavy týkajúce sa intermediárneho metabolizmu, bioenergeti-

ky, replikácie, rekombinácie a reparácie DNA, transkripcie, translácie, sekrecie proteínov, mitochondriálnej dedičnosti, membránového transportu, biogenézy membránových organel, regulácie bunkového cyklu, či cytokinézy (Linder a kol., 2006). Okrem toho, takmer všetky technológie, ktoré sú dnes využívané pre analýzu eukaryotov (včítane človeka), boli prvýkrát odskúšané a optimalizované u *S. cerevisiae*. Prvý plazmid, ktorý umožnil klonovanie a expresiu génov v eukaryotickej bunke bol skonštruovaný pre *S. cerevisiae* (Hinnen a kol., 1978). Prvým kompletne osekvenovaným eukaryotickým genómom bol genóm *S. cerevisiae* (Goffeau a kol., 1996). Mikročipová analýza transkriptómu, dnes už rutinne používaná technika, bola prvýkrát úspešne testovaná u *S. cerevisiae* (Chu a kol., 1998). Prvá celogenómová zbierka delečných mutantov, ktorá umožňuje systematickú analýzu funkcie všetkých predikovaných neesenciálnych génov, bola pripravená pre *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces Genome Database* (SGD; [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) je jednou z najlepšie spravovaných databáz venovaných jednému organizmu aj vďaka unikátnej komunitě „kvasinkárov“, ktorí veľmi ochotne zdieľajú materiál i nápady a aktívne komunikujú na formálnych i neformálnych fórach o rôznych aspektoch biológie. S istou (nie však prehnanou) nadsázkou sa dá povedať, že to, čo *Escherichia coli* a bakteriofágy znamenali pre odhalenie základných princípov molekulárnej genetiky, znamenala *S. cerevisiae* pre náš súčasný pohľad na eukaryotickú bunku.

## Nekonvenčné modelové mikroorganizmy a ich význam pre pochopenie všeobecných biologických princípov

So zovšeobecňovaním však treba byť opatrný. Keby platil Monodov výrok univerzálne, mali by nám *E. coli* a *S. cerevisiae* stačiť pre kompletný popis pro-, resp. eukaryotickej bunky a komparzistov typu *Phycomyces* by nám stačilo katalogizovať do taxonomických skupín. Keď „všetko, čo platí pre *E. coli* platí aj pre slona“, potom by všetko čo platí pre *E. coli* malo platiť aj pre ostatné baktérie. Keby to však tak bolo, Frederick Griffith by neobjavil „transformačný princíp“ (Griffith, 1928) a Avery, MacLeod a McCarthy by ho následne nemohli identifikovať ako DNA (Avery a kol., 1944). *E. coli* totiž nie je prirodzene kompetentná prijímať DNA z mimobunkového prostredia. Ak by *Streptococcus pneumoniae* zdieľal túto vlastnosť s *E. coli*, nebolo by možné tieto klasické experimenty uskutočniť. Podobne, ak by všetko, čo platí pre *S. cerevisiae* platilo pre všetky eukaryoty, potom by vlastnosťami *S. cerevisiae* mali disponovať minimálne ostatné askomycéty. Keď však boli v dnes už

klasickej práci porovnané základné bioenergetické vlastnosti len u malej skupiny kvasiniek, zistilo sa, že sa dramaticky odlišujú (Šubík a kol., 1974a,b). Napríklad, anaeróbného rastu, typickej vlastnosti *S. cerevisiae*, je schopná iba malá frakcia druhov kvasiniek, ktoré sa okrem toho dramaticky odlišujú v citlivosti na rôzne inhibítory či v rýchlosti respirácie a fermentácie. Pritom taxonómia kvasiniek pozná takmer 1000 rôznych druhov, odlišujúcich sa nielen v bioenergetických, ale i cytologických, morfológických, či fyziologických charakteristikách, v ktorých *S. cerevisiae* vôbec nepripomínajú.

Naše súčasné vedomosti o fungovaní buniek sú síce založené na zlatých štandardoch *E. coli* a *S. cerevisiae*, neznamená to však, že ostatné organizmy sú automaticky odsúdené na nezáujem biológov. V skutočnosti sa práve tieto organizmy môžu kvalifikovať do pozície modelov pre konkrétny biologický fenomén (Obr. 1). Či tú šancu majú sa dá zistiť odpoveďou na otázku: Je tento jav rovnaký ako u *E. coli* alebo *S. cerevisiae*? Ak je odpoveď „Áno“, potom jeho analýza u iného organizmu zrejme neprinesie zásadný výsledok. Ak je odpoveď „Nie“, potom bol odhalený nový fenomén a organizmus, u ktorého bol odhalený, má šance dostať sa do svetla reflektorov (Fink, 1988).

Pekným príkladom, ako modelových mikroorganizmov pomohli odhaliť zásadné princípy fenoménu dôležitého aj pre ľudské zdravie, je príbeh objavovania mechanizmov udržiavania integrity telomér, koncových štruktúr lineárnych molekúl DNA. Význam týchto objavov ilustruje aj fakt, že traja z hlavných protagonistov tohto príbehu sa venovali štúdiu telomér práve u eukaryotických mikroorganizmov, prvokov a kvasiniek. Vo svojej spoločnej reminiscencii publikovanej pri príležitosti udelenia Nobelovej ceny, Elizabeth Blackburnová, Carol Greiderová a Jack Szostak uvádzajú okrem iného štyri podstatné odkazy pre mladú generáciu biológov (Blackburn a kol., 2006). Po prvé, je absolútne esenciálne aktívne komunikovať s kolegami s rôznych oblastí vedy a snažiť sa štúdiom získať aspoň čiastočný prehľad o všetkých oblastiach biológie. Ako rastie špecializácia vo vede, je stále pravdepodobnejšie, že jednotliví výskumníci ostanú zakuklení vo svojich veľmi úzko zameraných oblastiach. Veľké problémy biológie však nemôžu byť vyriešené štúdiom limitovaného aspektu daného biologického systému, ale vyžadujú integráciu všetkých prírodných vied.

Ich druhým odkazom je hodnota veľmi riskantných experimentov. Nebáli testovať hypotézy, ktoré sa v danom období ukazovali ako úplne bláznivé. Pravdaže, väčšina takýchto riskantných experimentov nefunguje, čo môže byť zdrojom značných frustrácií. Ak sa však niektorý z takýchto divokých nápadov ukáže ako relevantný, môže to viesť k zásadným objavom búrajúcim aktuálne paradigmy. Stratégia konformného výskumu síce poskytuje

komfort istých výsledkov, pravdepodobnosť zaujímavého objavu je však pri nej blízka nule.

Tretie poučenie spočíva vo význame výskumu, ktorého hlavnou motiváciou je zvedavosť a nie bezprostredná aplikácia výsledkov. Naše poznanie sveta je veľmi rozdrobené a neúplné a pokrok vo výskume neprebieha

lineárnym spôsobom. Väčšina zásadných objavov je výsledkom náhodného pozorovania, ktoré zmení nielen pôvodnú predstavu o danom fenoméne, ale často aj hlavný smer výskumu a možné aplikácie sú skôr emergentným produktom, ako plánovanou aktivitou.

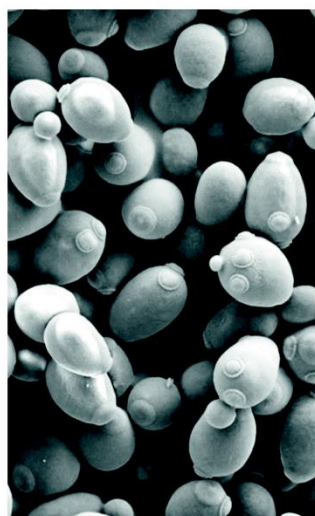
**Obr. 1: Ilustrácie niektorých z mikroorganizmov, ktorých štúdium prinieslo zásadné poznatky o fungovaní buniek a ich spoločenstiev. Obrázky nie sú v rovnakej mierke. Zdroj: <https://en.wikipedia.org>**



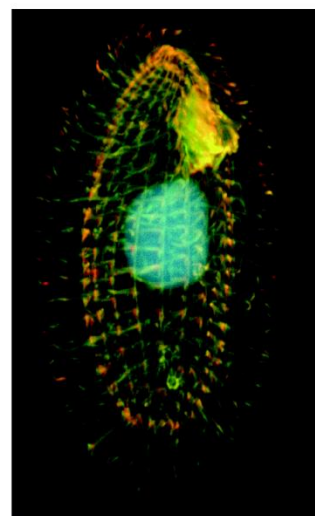
*Escherichia coli*



*Phycomyces*



*Saccharomyces cerevisiae*



*Tetrahymena thermophila*

## Záver

Posledným odkazom, ktorý nás vedie na začiatok tohto textu, je fakt, že naše znalosti o fungovaní biologických systémov často pochádzajú z analýzy zdanlivo exotických, neštandardných, či nekonvenčných druhov organizmov. Dôvod je jednoduchý: „exotickosť“ daného biologického druhu je len výsledkom špeciálnych adaptácií na konkrétne životné prostredie. Okrem týchto adaptácií však všetky živé organizmy na Zemi fungujú na rovnakom chemickom základe. Výsledkom biologickej evolúcie je obrovská diverzita organizmov, ktorá však zároveň ilustruje opakované využívanie analogických nástrojov na riešenie problémov, do ktorých sa naši biologickí predchodcovia dostali (Kováč, 2000). Nielen o telomérach, ale o mnohých fenoménoch súvisiacich s ľudskými bunkami sme sa najviac dozvedeli na základe štúdií rôznych, na prvý pohľad „nezaujímavých“ druhov kvasiniek a prvokov. Napríklad *Tetrahymena* bol ešte v polovici 1970-tych rokov rod, ktorý poznala iba úzka skupina protistológov. O niekoľko rokov štúdium jediného typu 20 kbp dlhej molekuly DNA tohto bičíkovca viedol k dvom Nobelovým cenám (Blackburn a kol., 2006; Cech, 1990). S rozvojom nových technológií sa zvyšujú šance, že biológovia budú stále viac ťažiť z unikátnych vlastností organizmov, ktoré ešte pred pár rokmi z technických dôvodov neboli prístupné informatívnym analýzám. Niektoré z týchto nových technológií, napríklad

CRISPR-Cas, je práve výsledkom štúdia problematiky, ktorá sa pred niekoľkými rokmi zdala byť pre mnohých obskúrna (Lander, 2016). Je možné, že *Phycomyces*, alebo iné druhy mikroorganizmov, ktoré zatiaľ študuje iba nepočítaná skupina výskumníkov (alebo nie sú študované vôbec), na svoj veľký nástup na scénu ešte len čaká.

## Literatúra

- EVERETT, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. In: *J. Exp. Med.* ročník 79, číslo 2, 1944, pp. 137-158.
- BERGMAN, K.; BURKE, P. V.; CERDÁ-OLMEDO, E.; DAVID, C. N.; DELBRÜCK, M.; FOSTER, K. W.; GOODSELL, E. W.; HEISENBERG, M.; MEISSNER, G.; ZALOKAR, M.; DENNISON, D. S.; SHROPSHIRE, W. JR. *Phycomyces*. In: *Bacteriol. Rev.* ročník 33, číslo 1, 1969, pp. 99-157.
- BLACKBURN, E. H.; GREIDER, C. W.; SZOSTAK, J. W. Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. In: *Nat. Med.* ročník 12, číslo 10, 2006, pp. 1133-1138.
- BOTSTEIN, D.; FINK, G. R. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*. ročník 240, číslo 4858, 1988, pp. 1439-1443.
- BOTSTEIN, D.; FINK, G. R. Yeast: an experimental organism for 21st century biology. *Genetics*. ročník 189, číslo 3, 2011, pp. 695-704.



- CECH, T. R. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena*. *Biosci. Rep.* ročník 10, číslo 3, 1990, pp. 239-261.
- FELDMANN, H. *Yeast. Molecular and cell biology*. Wiley-Blackwell, 2010, ISBN-10: 352732609X
- FINK, G. R. Notes of a bigamous biologist. *Genetics*. ročník 118, číslo 4, 1988, pp. 549-550.
- FRIEDMANN, H. C. From "butyribacterium" to "*E. coli*": an essay on unity in biochemistry. *Perspect Biol Med.* ročník 47, číslo 1, 2004, pp. 47-66.
- GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. *Science*. ročník 274, číslo 5287, 1996, pp. 563-567.
- GRIFFITH, F. The significance of Pneumococcal Types. *J. Hygiene*, ročník 27, číslo 2, 1928, pp. 113-159.
- HALL, M. N.; LINDER, P. (eds.) *The early days of yeast genetics*. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008. ISBN-10: 0879698748
- HINNEN, A.; HICKS, J. B.; FINK, G. R. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. ročník 75, číslo 4, 1978, pp. 1929-1933.
- CHU, S.; DERISI, J.; EISEN, M.; MULHOLLAND, J.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; HERSKOWITZ, I. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*. ročník 282, číslo 5389, 1998, pp. 699-705.
- KLUYVER, A. J.; DONKER, H. J. L. Die Einheit in der Biochemie. *Chem. Zelle Gewebe*. ročník 13, 1926, pp. 134-190.
- KOVÁČ, L. Fundamental principles of cognitive biology. *Evol. Cogn.* ročník 6, číslo 1, 2000, pp. 51-69.
- LANDER, E. S. The heroes of CRISPR. *Cell*. ročník 164, číslo 1-2, 2016, pp. 18-28.
- LINDER, P.; SHORE, D.; HALL, M. N. *Landmark papers in yeast biology*. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. ISBN-10: 0879696435
- ŠUBÍK, J.; KOLAROV J.; KOVÁČ, L. Anaerobic growth and formation of respiration-deficient mutants of various species of yeasts. *FEBS Lett.* ročník 45, číslo 1, 1974a, pp. 263-266;
- ŠUBÍK, J.; KOLAROV J.; KOVÁČ, L. Bongkreic acid sensitivity of respiration-deficient mutants of *petite*-negative species of yeasts. *Biochim. Biophys. Acta* ročník 357, číslo 3, 1974b, pp. 453-456.

## Podakovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



# Genetika v medicíne

Filip Brázdovič

Katedra genetiky  
Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4  
Slovensko  
brazdovic1@uniba.sk

## Genetics in medicine

### Abstract

Genetics was founded by G. Mendel in the 19th century. After rediscovering his findings, it was noticed that some human disorders followed the same pattern as Mendel described in his work. That was the beginning of the medical genetics or the use of genetic in medicine. After a humble start, the field of medical genetics skyrocketed. This short review aims to describe the beginning, the most common use, current state, and future prospect of genetics in medicine.

### Key words

Genetics, medicine, cytogenetics, pharmacogenomics, gene therapy

## Úvod

Za zakladateľa genetiky je považovaný Gregor Mendel, augustínsky mních žijúci v 19. storočí v Brne. Venoval sa kríženiu rastlín hrachu siateho. Pri svojich experimentoch si všimol rôzne znaky, napr. farbu kvetov, veľkosť a tvar semien. Pozoroval, že znaky sa prenášajú do ďalšej generácie v určitých pravidelných pomeroch (Mendel 1866). Podľa toho, ako často sa znaky v populácii potomkov objavovali, boli označené ako dominantné resp. recesívne. V tej dobe Mendel nevedel, čo podmieňuje prejav pozorovaných znakov. Používal termín *dedičné faktory*. V súčasnosti vieme, že týmito faktormi sú gény, ktoré sú zapísané v sekvencii DNA. Súbor pravidiel, ktoré Mendel vo svojej práci opísal, je označovaný ako Mendelove zákony. Pojmy recesívny a dominantný znak sa v genetike používajú dodnes. Ako však súvisia Mendelove experimenty na hrachu s ľuďmi?

## Využitie poznatkov v medicíne

Počiatky využívania genetiky v medicíne siahajú na začiatok 20. storočia. Archibald Garrod, anglický lekár, pozoroval, že metabolické ochorenie alkaptonúria<sup>1</sup> podlieha Mendelovým zákonom (Garrod 1902). Bola to jedna z prvých opísaných dedičných chorôb. Za krátko boli objavené ďalšie ochorenia, čo tiež zodpovedali Mendelovým zákonom (albinizmus, brachydaktylia, hemofília).

<sup>1</sup>Alkaptonúria je dedičné ochorenie pri ktorom telo pacienta nie je schopné metabolizovať aminokyseliny fenylalanín a tyrozín. Ide o autozomálne recesívne ochorenie spôsobené mutáciou v géne *HGD*.

Až s nástupom populačnej genetiky<sup>2</sup>, bolo možné tieto poznatky použiť v praxi. Na základe výskytu ochorenia je možné predpovedať jeho incidenciu v ľudskej populácii, prípadne v rodine, kde sa ochorenie už vyskytlo.

Závrtný rozkvet genetiky zažila v polovici 20. storočia. Bolo dokázané, že DNA je nositeľkou genetickej informácie (Hershey a Chase 1952), vytvára štruktúru dvojzávitnice (Watson a Crick 1953) a je u ľudí organizovaná do 23 párov chromozómov (Tjio a Levan 1956). Prvým geneticky podmieneným ochorením, ktorého príčina bola objasnená, bol Downov syndróm (Lejeune a kol. 1953). Ľudia trpiaci Downovým syndrómom vykazujú abnormálny karyotyp<sup>3</sup>. Ide o čiastočnú alebo úplnú trizómiu<sup>4</sup> 21. chromozómu. Trizómia sa u ľudí prejavuje fyzickým a mentálnym postihnutím. Zmeny v DNA na úrovni chromozómov sa označujú ako chromozómové aberácie. Chromozómovými aberáciami sa zaoberá cytogenetika. Najčastejšie je možné sa s cytogenetickým vyšetrením stretnúť pri prenatálnej diagnostike. Cieľom vyšetrenia je zistiť, či je plod zdravý. Najpoužívanejšou metódou je amniocentéza, pri ktorej sa odoberie vzorka z amniovej tekutiny. V tej sa nachádzajú voľné bunky plodu, ktoré sú následne použité na diagnostiku. Priekopníckym bodom v prenatálnej diagnostike bol objav buniek a voľnej DNA plodu v krvnom riečisku matky. Množstvo biologického materiálu plodu v krvi matky je veľmi malé. So súčasnou technológiou je však dostatočné pre účely diagnostiky (prehľadne spracované v Vermeesch a kol. 2016).

Chromozómové aberácie sú veľmi závažnými zmenami. Iba zopár ich je zlučiteľných so životom. Väčšina geneticky podmienených ochorení je zapríčinená zmenami na úrovni génu. Tie bolo možné analyzovať až s objavením techník sekvenovania DNA (Sanger a Coulson 1975, Maxam a Gilbert 1977). Dedičné zmeny DNA sa nazývajú mutácie. Môžu byť rôzneho rozsahu. Od jednonukleotidových zámen, delécii a adícii, až po chromozómové prestavby. Odhaduje sa, že v bunke za je-

<sup>2</sup>Populačná genetika sa zaoberá genetickým zložením populácií a vplyvmi, ktoré na toto zloženie pôsobia. Priekopníkmi v populačnej genetike boli Ronald A. Fisher, John B. S. Haldane a Sewall Wright.

<sup>3</sup>Karyotyp je označenie súboru chromozómov jedinca.

<sup>4</sup>Trizómia je stav, pri ktorom sa v bunke nachádzajú tri kópie toho istého chromozómu.



den deň dôjde k poškodeniu až 10 000 báz DNA (prehľadne spracované v Lindahl 1993). Zdroje poškodenia sa rozdeľujú podľa pôvodu na interné a externé. Medzi interné zdroje patria najmä metabolizmus bunky, replikácia a oprava DNA a transkripcia. Medzi externé patria toxické látky, ionizujúce a UV žiarenie a vírusy. Genotoxikológia je oblasť genetiky, ktorá sa zaoberá skúmaním potenciálnej toxicity látok na DNA.

Najväčším míľnikom v medicínskej genetike je stanovenie kompletnej sekvencie DNA ľudského genómu<sup>1</sup>. Projekt začal v roku 1990 a bol dokončený v roku 2003 (International human genome sequencing consortium 2004). Odhalil, že ľudský genóm sa skladá z 3,2 gigabáz a obsahuje približne 20 000 génov kódujúcich proteíny. Toto číslo tvorí asi iba 3 % ľudskej DNA. Na čo je však dobré poznať sekvenciu celého genómu? Porovnávaním genómov ľudí trpiacich ochorením so štandardným ľudským genómom je možné odhaliť zmeny v DNA, ktoré môžu spôsobovať, prípadne zvyšovať riziko výskytu ochorenia. Porovnávací genetika sa stala veľmi silným nástrojom pri analýze DNA. Jedným z príkladov sú veľké genómové asociačné štúdie. V týchto štúdiách sa porovnáva DNA veľkého počtu ľudí s cieľom identifikovať varianty DNA asociované s ochorením (Stranger a kol. 2011). Pred začatím projektu sekvenovania ľudského genómu bolo známych menej ako 100 génov asociovaných s ľudskými ochoreniami. V súčasnosti je ich identifikovaných viac než 2850. Prítomnosť génu, alebo iného DNA markera asociovaného s ochorením, nemusí ultimátne viesť k prejavu ochorenia. Prítomnosť týchto markerov by sa však nemala brať na ľahkú váhu. Odporúčané sú častejšie návštevy lekárov kvôli zvýšenému riziku výskytu ochorenia. Odhadom rizika výskytu geneticky podmienených ochorení sa zaoberá prediktívna genetika. Najznámejšie je jej využitie pri ochoreniach zasahujúcich metabolizmus, srdcovo-cievny systém a pri rakovine. U rakoviny sú konkrétnym príkladom gény BRCA1 a BRCA2 (Breast Cancer). Bolo dokázané, že niektoré ich varianty výrazne zvyšujú riziko rakoviny prsníka a rakoviny vaječníkov (King a kol. 2003).

Medzi ľuďmi je značná variabilita. Platí to aj pre ich génové zloženie, ktoré vplyva na odpoveď organizmu na podávanú liečbu. Vďaka znalosti ľudského genómu bolo možné odhaliť faktory, ktoré ovplyvňujú reakciu tela na lieky. Jedným z príkladov je gén *TPMT*, ktorého produkt metabolizuje liečivá merkaptopurín a azatioprin. Tieto liečivá sa používajú ako imunosupresíva pri liečení neoplázií<sup>2</sup>. U pacientov s nefunkčnými alelami génu *TPMT* sa po podaní spomínaných liečiv hromadia cytotoxické

tioguanínové nukleotidy (TGN). Tie by boli u ľudí so štandardným genómom *TPMT* konvergované na ich inaktívnu formu. Vysoká koncentrácia TGN vedie k závažnej potenciálne život ohrozujúcej toxicite (Evans a kol. 2001). Tým, ako gény vplyvajú na odpoveď organizmu na liečbu, sa zaoberá farmakogenomika. Je to relatívne nová oblasť štúdia, ktorej cieľom je vývin efektívnych, bezpečných liečiv, ktorých dávky sú ušité na mieru pacienta. Gény, na ktoré sa farmakogenomika zameriava, spadajú zväčša do kategórie kódujúcich enzýmy metabolizujúce liečivá a bunkové transportéry (prehľadne spracované v Evans a Relling 2004).

Kontroverznejšie využitie genetiky je v oblasti asistovanej reprodukcie. Je to oblasť, ktorá sa ešte len vyvíja, ale už bol zaznamenaný konkrétny prípad. Išlo o tzv. dieťa troch rodičov (Hamzelou 2016). Pár chcel počať dieťa, ale matka bola nositeľkou génu pre závažné neurologické ochorenie Leighov syndróm. Tento gén bol lokalizovaný na mitochondriálnej DNA matky. Pri oplodnení sa mitochondrie zo spermie nedostávajú do vajíčka. To znamená, že embryo zdedí mitochondrie výhradne od matky. V uvedenom prípade mitochondrie s mutovanou DNA. Takéto dieťa zomiera zväčša krátko po narodení. Po dvoch neúspešných pokusoch sa pár rozhodol požiadať lekárov o pomoc. Cieľom bolo nahradiť nefunkčné mitochondrie novými od darcu. Lekári najprv odobrali jadro z vajíčka darcu, ktoré obsahovalo funkčné mitochondrie (Zhang a kol. 2016). Takéto vajíčko bolo pripravené prijať nové jadro. Po implantácii jadra matky do vajíčka s funkčnými mitochondriami, bolo toto vajíčko oplodnené otcovskou spermiou a prenosené do matky, kde sa oplodnené vajíčko vyvíjalo na embryo. 6. apríla 2016 sa páru narodil chlapec, ktorý nevykazoval žiadnu stopu po ochorení. Tento chlapec má 23 chromozómov od matky, 23 chromozómov od otca a mitochondriálnu DNA od darcu, teda tretej osoby. Chlapec bude musieť byť ešte dlho pod odborným dohľadom, kvôli nepredvídateľným následkom takéhoto zásahu. Každopádne, je to veľký úspech pre oblasť asistovanej reprodukcie a šanca pre ľudí, ktorí nemôžu mať deti. Na druhej strane, ozvala sa silná vlna kritiky proti podobným zásahom. Je nutné vytýčiť si hranicu, čo je ešte prípustné a čo už je za hranicou etiky.

Dosiaľ uvedené príklady využitia genetiky v medicíne predstavovali diagnostiku a prevenciu geneticky podmienených ochorení, správne dávkovanie liečiv a príklad využitia v asistovanej reprodukcii. Je však možné odstrániť príčinu? Inak povedané, robiť presné zásahy do genómu vyvíjajúceho sa alebo dokonca dospelého organizmu?

Už dlhšie je známe, že niektoré skupiny vírusov sú schopné včleňovať svoju DNA do genómu hostiteľa. Ide o retrovírusy, adenovírusy, herpes simplex vírus a ďalšie. Vírusová častica sa skladá z nukleovej kyseliny a

<sup>1</sup>Genóm predstavuje kompletnú genetickú výbavu bunky alebo organizmu.

<sup>2</sup>Pojem neoplázia sa používa na označenie nového abnormálneho rastu tkaniva.

proteínového obalu, kapsidu. Nukleové kyseliny vírusov, DNA alebo RNA, môžu byť v jednovláknovej ale aj dvojitovláknovej forme. Túto nukleovú kyselinu je možné v laboratórnych podmienkach zameniť inou, a tak docieľiť to, že vírus bude vkladať do genómu cudziu DNA. Týmto spôsobom je možné vložiť náhradný gén, alebo opraviť gén s mutáciou.

Za prvú klinickú skúšku génovej terapie je považovaná štúdia vplyvu geneticky modifikovaných tumor infiltrujúcich lymfocytov (TIL) (Rosenberg a kol. 1990). TIL sú schopné invadovať do pevných tumorov, kde majú lytickú aktivitu. Týmto spôsobom môžu výrazne pomôcť pacientom s pokročilým melanómom. Do genómu TIL bol pridaný gén podmieňujúci rezistenciu voči antibiotiku neomycín. Tento gén slúžil ako marker pre sledovanie priebehu terapie. Modifikované TIL boli následne transplantované do tela pacienta. Štúdia sa ukázala ako úspešná. Modifikované TIL boli nájdené v tumorových ložiskách aj dva mesiace po podaní. V tomto prípade boli bunky modifikované mimo ľudského tela, a potom boli transplantované späť. Tento prístup sa označuje ako *ex vivo*. Ten je využívaný pri modifikácii hematopoetických kmeňových buniek<sup>1</sup> a lymfocytov.

Príkladom génovej terapie ochorenia podmieneného jedným génom je  $\beta$ -talasémia.  $\beta$ -talasémie sú skupinou ochorení, ktoré sú charakterizované zníženou, alebo absentujúcou produkciou  $\beta$ -reťazcov hemoglobínu. Sú známe dve formy  $\beta$ -talasémie, minor a major. Ľudia trpiaci  $\beta$ -talasémiou major nevytvárajú žiadne  $\beta$ -reťazce hemoglobínu, čo vedie k defektnej tvorbe červených krviniek a k závažným anémiám. Preto, pacienti s  $\beta$ -talasémiou potrebujú časté transfúzie krvi a kontroly množstva železa. Vo svete v súčasnosti prebiehajú klinické skúšky, v ktorých boli pacientom s  $\beta$ -talasémiou major odobrané hematopoetické bunky. Tieto bunky boli infikované vírusovým vektorom nesúcim správnu verziu postihnutého génu. Následne boli modifikované kmeňové bunky transplantované do pacientov, ktorým pomocou chemoterapie boli odstránené chybné hematopoetické zárodočné bunky. Pacient, ktorému bola podaná génová terapia, sa po 33 mesiacoch stal nezávislým na krvných transfúziách (Cavazzana-Calvo a kol. 2010). To znamená, že jeho geneticky modifikované hematopoetické zárodočné bunky sa v jeho tele uchytili a začali produkovať krvné bunky.

V génovej terapii sa využíva aj prístup *in vivo*. V tomto prípade sa bunky, ktoré majú byť modifikované, nachádzajú v tele pacienta. Najčastejšími cieľmi sú bunky pečene a sietnice oka. Vírus AAV špecificky zasahuje pečene bunky. V pilotnej štúdii bol pacientom s hemofíliou B podaný vírus AAV, ktorý vo svojej DNA obsahoval gén pre koagulačný faktor IX. Práve ten je po-

škodený u pacientov s hemofíliou B. Po zacielení vírusu do pečene bola pozorovaná expresia koagulačného faktora IX (Nathwani a kol. 2014). Expresia bola dostatočná na to, aby pacientom zmiernila priebeh ochorenia. Génová terapia je ešte len v plienkach. No už teraz je jasné, že má obrovský potenciál do budúcnosti. Ilustruje to aj fakt, že do roku 2012 bolo uskutočnených 1 800 klinických skúšok génovej terapie (prehľadne spracované v Ginn a kol. 2013). Cieľom génovej terapie sú hlavne gény asociované s rakovinou, so srdcovo cievnyimi ochoreniami a s ochoreniami podmienenými jedným génom. Génová terapia má však aj svoju negatívnu stránku. Rizikom je zlé zacielenie DNA, pri ktorom môže dôjsť k poškodeniu funkčne dôležitého úseku. S tým je spojené riziko vzniku rakoviny. Ďalším významným rizikom je zlá imunitná odpoveď organizmu na génovú terapiu. V súčasnosti sa vyvíjajú nové bezpečnejšie vírusové vektory a alternatívne spôsoby dopravy DNA, ktoré nevyžadujú použitie vírusov.

## Záver

Od prvého využitia genetiky v medicíne uplynulo približne sto rokov. Za ten čas genetika pokročila o nesmierny kus dopredu. Je nedocenená pri diagnostike a odhade rizika geneticky podmienených ochorení. V krátkej budúcnosti sa vďaka znalosti génového zloženia pacienta stane realitou podávanie liekov na mieru. Pomocou asistovanej reprodukcie genetika dáva šancu párom, ktoré nemôžu mať deti. Najväčší potenciál sa však skrýva v génovej terapii. Jej pomocou je možné permanentne zmeniť genetickú informáciu jedinca, a tak odstrániť príčinu ochorenia. Mnohé z uvedených príkladov sú ešte len na začiatku a je iba otázkou času, kedy sa stanú súčasťou nášho každodenného života.

## Literatúra

- CAVAZZANA-CALVO, M.; PAYEN, E.; NEGRE, O.; WANG, G.; HEHIR, K.; FUSIL, F.; DOWN, J.; DENARO, M.; BRADY, T.; WESTERMAN, K.; CAVALLESCO, R.; GILLET-LEGRAND, B.; CACCAVELLI, L.; SGARRA, R.; MAOUCHE-CHRÉTIEN, L.; BERNAUDIN, F.; GIROT, R.; DORAZIO, R.; MULDER, G.; POLACK, A.; BANK, A.; SOULIER, J.; LARGHERO, J.; KABBARA, N.; DALLE, B.; GOURMEL, B.; SOCIE, G.; CHRÉTIEN, S.; CARTIER, N.; AUBOURG, P.; FISCHER, A.; CORNETTA, K.; GALACTEROS, F.; BEUZARD, Y.; GLUCKMAN, E.; BUSHMAN, F.; HACEIN-BEY-ABINA, S.; LÉBOULCH, P. Transfusion independence and HMG2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. In: *Nature*. 467, 7313, 2010, pp. 318 - 323.
- EVANS, W. E.; HON, Y. Y.; BOMGAARS, L.; COUTRE, S.; HOLDSWORTH, M.; JANCO, R.; KALWINSKY, D.; KELLER, F.; KHATIB, Z.; MARGOLIN, J.; MURRAY, J. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. In: *Journal of Clinical Oncology*. 19, 8, 2001, pp. 2293 - 2301.

<sup>1</sup>Hematopoetické kmeňové bunky sú bunky, z ktorých sa diferencujú ostatné krvné bunky procesom hematopoézie.

- EVANS, W. E.; RELLING, M. V. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. In: *Nature*. 429, 6990, 2004, pp. 464 - 468.
- GARROD, A. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. In: *The Lancet*. vol II, 1902, pp. 1616 - 1620.
- GINN, S. L.; ALEXANDER, I. E.; EDELSTEIN, M. L.; ABEDI, M. R.; WIXON, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. In: *The journal of gene medicine*. 15, 2, 2013, pp. 65 - 77.
- HAMZELOU, J. Exclusive: World's first baby born with new "3 parent" technique. In: *New Scientist*. 27, 2016.
- HESHEY, A. D.; CHASE, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. In: *The Journal of general physiology*. 36, 1, 1952, pp. 39 - 56.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. In: *Nature*. 431, 7011, 2004, pp. 931 - 945.
- KING, M. C.; MARKS, J. H.; MANDELL, J. B. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. In: *Science*. 302, 5645, 2003, pp. 643 - 646.
- LEJEUNE, J.; GAUTIER, M.; TURPIN, R. Les chromosomes humains en culture de tissus. In: *CR Acad. Sci.(Paris)*. 249, 1959, pp.602 - 603.
- LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. In: *Nature*. 362, 6422, 1993, pp. 709 - 715.
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74, 2, 1977, pp. 560 - 564.
- MENDEL, J. G. Versuche über Pflanzenhybriden. In: *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn*, Bd. IV für das Jahr, 1865, pp. 3 - 47.
- NATHWANI, A. C.; REISS, U. M.; TUDDENHAM, E. G.; ROSALES, C.; CHOWDARY, P.; MCINTOSH, J.; DELLA PERUTA, M.; LHERITEAU, E.; PATEL, N.; RAJ, D.; RIDDELL, A.; PIE, J.; RANGARAJAN, S.; BEVAN, D.; RECHT, M.; SHEN, Y.-M.; HALKA, K. G.; BASNER-TSCHAKARJAN, E.; MINGOZZI, F.; HIGH, K. A.; ALLAY, J.; KAY, M. A.; NG, C. Y. C.; ZHOU, J.; CANCIO, M.; MORTON, C. L.; GRAY, J. T.; SRIVASTAVA, D.; NIENHUIS, A. W.; DAVIDOFF, A. M. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. In: *The New England Journal of Medicine*. 371, 2014, pp. 1994 - 2004.
- ROSENBERG, S. A.; AEBERSOLD, P.; CORNETTA, K.; KASID, A.; MORGAN, R. A.; MOEN, R.; KARSON, E. M., LOTZE, M. T.; YANG, J. C.; TOPALIAN, S. L.; MERINO, M. J. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. In: *New England Journal of Medicine*. 323, 9, 1990, pp. 570 - 578.
- SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. In: *Journal of molecular biology*. 94, 3, 1975, pp. 441 - 448.
- STRANGLER, B. E.; STAHL, E. A.; RAJ, T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. In: *Genetics*. 187, 2, 2011, pp. 367 - 383.
- TJIO J. H.; LEVAN, A. The chromosome number of man. In: *Hereditas*. vol. 42, 1956, pp. 1-6.
- VERMEESH, J. R.; VOET, T.; DEVRIENDT, K. Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis. In: *Nature Reviews Genetics*. 17, 10, 2016, pp. 643 - 656.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid. In: *Nature*. 171, 1953, pp. 737 - 738.
- ZHANG, J.; LIU, H.; LUO, S.; CHAVEZ-BADIOLA, A.; LIU, Z.; MUNNE, S.; KONSTANTIDINIS, M.; WELLS, D.; HUANG, T. First live birth using human oocytes reconstituted by spindle nuclear transfer for mitochondrial DNA mutation causing Leigh syndrome. In: *Fertility and Sterility*. 106, 3, 2016. pp. e375 - e376.

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



Agentúra

Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR

pre štrukturálne fondy EÚ



Európska únia  
Európsky fond regionálneho rozvoja



Operačný program  
VÝSKUM a VÝVOJ



# Cytoplazmatická membrána a jej fluidita

Marcela Morvová Jr.<sup>1</sup>

Libuša Šikurová<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Katedra jadrovej fyziky a biofyziky  
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava  
Slovensko

<sup>1</sup>Marcela.Morvova2@fmph.uniba.sk

<sup>2</sup>sikuroval@gmail.com

## Cytoplasmatic membrane and its fluidity

### Abstract

The article shows the effect of cytoplasmic cell membrane composition on membrane fluidity. It also highlights the role of membrane fluidity and discusses the possibilities of its evaluation.

### Key words

Membrane, fluidity

## Úvod

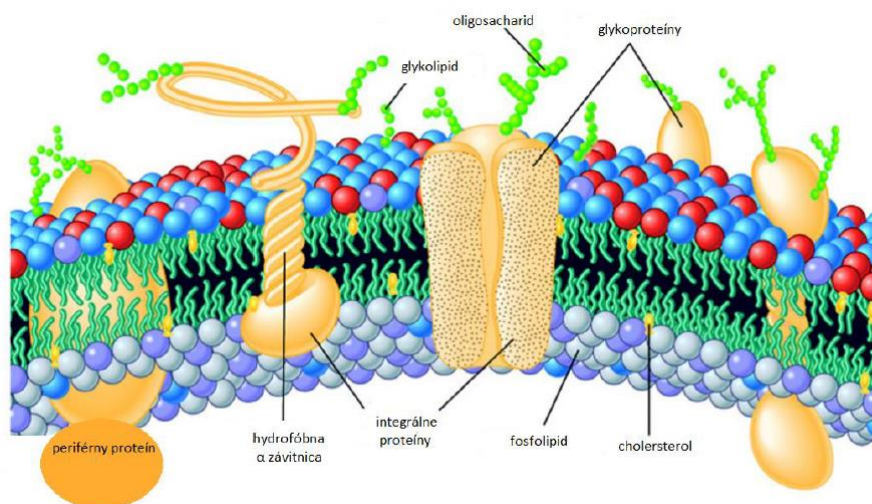
Biologická membrána umožňuje existenciu života ako ho poznáme. Tvorí semipermeabilnú bariéru medzi bunkou (resp. organelou) a vonkajším prostredím, čím umožňuje komunikáciu bunky s okolitým prostredím a tým kontroluje zloženie bunky. Pojem biologická membrána zahŕňa jednak cytoplazmatickú (bunkovú membránu), ako aj membrány jednotlivých organel (ako napríklad endoplazmatického retikula, obalu jadra, Golgiho aparátu či mitochondrií). Cytoplazmatická (bunková) membrána slúži ako bariéra oddeľujúca vnútorné prostredie bunky od okolia, a preto jej funkčný stav je rozhodujúcim faktorom pre prežitie bunky. Je dôležitou bunkovou štruktúrou, na ktorej sa odohrávajú mnohé signalizačné, biochemické a metabolické procesy vyža-

dajúce kontrolované prostredie. Vlastnosti membrány závisia najmä od jej zloženia a je preto prirodzené, že si bunky zloženie svojej membrány prísne regulujú. Zároveň je však aj cieľovou štruktúrou pre mnohé liečivá využívané v terapii patologických stavov a aj mnohé mechanizmy ich účinku súvisia práve s cytoplazmatickou membránou a jej fyzikálnymi vlastnosťami. Medzi významné fyzikálne vlastnosti patrí membránová fluidita.

## Bunková membrána

Cytoplazmatická membrána je dvojvrstva lipidových molekúl, približne 5 nm široká, ktorá oddeľuje vnútorné prostredie bunky od vonkajšieho. Dôležitá je preto regulácia jej zloženia, ktorá slúži ako odpoveď na zmeny teploty, pH a ďalších faktorov. Je dlho známe, že okrem funkcie selektívnej bariéry, biologické membrány zohrávajú fundamentálnu rolu pri plnení fyziologických úloh. Väčšina biochemických a biofyzikálnych procesov v bunke sa odohráva na membráne. Typická membrána sa skladá z lipidov, ktoré tvoria jej základnú štruktúru, bielkovín, ktoré tvoria transportné mechanizmy, a sacharidov, ktoré tvoria rozpoznávacíe molekuly (Obr. 1).

Obr. 1: Štruktúra bunkovej membrány (upravené podľa Karp 2010)



Lipidové zložky membrány sú najmä fosfolipidy, sfingolipidy a steroly. Prevalu majú fosfolipidy, skladajúce sa z hydrofilnej časti napojenej prostredníctvom fosfátovej skupiny na hydrofóbne reťazce mastných kyselín. Molekuly s takýmto usporiadaním, hydrofilnou aj hydrofóbnou časťou, sa nazývajú amfipatické (Alberts et al. 1998). Podobne aj steroly a glykolipidy, ktoré sa tiež nachádzajú v membránach, majú túto vlastnosť. Vytváranie lipidových dvojvrstiev vo vodnom prostredí je následok práve amfipatického charakteru lipidových molekúl. Hydrofilné časti sa natáčajú smerom do vodného prostredia, zatiaľ čo hydrofóbne reťazce sú orientované k sebe vo vnútri membrány. Takéto usporiadanie je pre obidve časti z energetického hľadiska najvýhodnejšie. Toto správanie zároveň zabezpečuje dvojvrstve samozacelovacu schopnosť v prípade vytvorenia trhliny – každá trhlina tvorí voľné rozhranie s vodou, čo je energeticky nevýhodné, a preto sa molekuly dvojvrstvy samovoľne preusporadúvajú, aby voľné rozhranie odstránili. Nemožnosť vytvárať voľné rozhrania má u dvojvrstvy konečných rozmerov za následok vytváranie hraničných plôch okolo uzavretého priestoru, čo je podmieňujúci faktor pri tvorení bunky (Alberts et al. 1998).

Okrem lipidov, významnú úlohu v cytoplazmatickej membráne zohrávajú aj proteíny, ktoré sa podieľajú na selektívnom transporte, enzymatickej aktivite a imunitných procesoch. Všeobecne prijímaný model membránovej štruktúry je tzv. model tekutej mozaiky, ktorý opisuje membránu ako „more lipidov, v ktorom plávajú pro-

teíny“. Tieto môžu byť buď viazané na povrch membrány (periférne proteíny), alebo sú viazané súčasne na hydrofóbne vnútro aj na polárny povrch (integrálne proteíny) (Bittman 1997). V porovnaní s lipidovou dvojvrstvou sú, vo všeobecnosti, proteíny málo stlačiteľné, zaberajú objem asi 50 – 100 fosfolipidov. Predpokladá sa, že tepelný pohyb lipidov v blízkosti proteínov je značne brzdený a je spojený s lokálnym nárastom v mikroviskozite. Rozsah tohto efektu klesá s narastajúcou vzdialenosťou od proteínu, a preto by celkový efekt na lipidovú mikroviskozitu mal narastať s pribúdajúcim počtom proteínov v membráne (Shinitzki 1984).

## Lipidové zloženie membrány

Lipidy tvoria základ štruktúry membrány, preto je ich zloženie prísne regulované. V membráne sa nachádzajú rôzne typy lipidov, pričom všetky musia mať amfipatickú štruktúru. Existujú tri hlavné druhy lipidov v membránach: fosfolipidy, sfingolipidy a steroly. Fosfolipidy obsahujú naviazané dve karboxylové kyseliny. Za fosfátovou skupinou majú naviazaný buď cholín, etanolamín, serín alebo inozitol. Sfingolipidy sa skladajú zo sfingozínu a naviazanej karboxylovej kyseliny. Steroly sú orientované malou hydroxylovou skupinou k povrchu membrány a zvyšok molekuly smeruje do vnútra dvojvrstvy (Karp 2010). V Tabuľke 1 uvádzame príklady lipidového zloženia vybraných membrán.

Tab. 1: **Lipidové zloženie vybraných membrán** (upravené podľa Karp 2010)

Lipid	Ľudský erytrocyt	Ľudský myelín	Mitochondria zo srdca kravy	<i>E. coli</i>
Kyselina fosfatidová	1,5	0,5	0	0
Fosfatidylcholín	19	10	39	0
Fosfatidyletanolamín	18	20	27	65
Fosfatidylglycerol	0	0	0	18
Fosfatidylserín	8,5	8,5	0,5	0
Kardiolipín	0	0	22,5	12
Sfingomyelín	175	8,5	0	0
Glykolipidy	10	26	0	0
Cholesterol	25	26	3	0

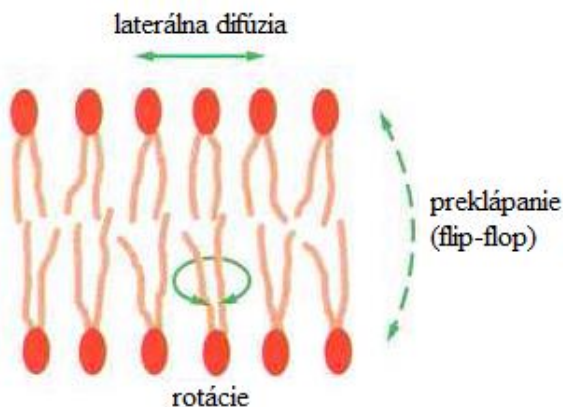
V tabuľke sú uvedené percentá z celkovej hmotnosti lipidov.

## Membránová fluidita

Membránová fluidita predstavuje vlastnosť membrány správať sa ako dvojrozmerná tekutina, čo znamená, že v rámci dvojvrstvy sa môžu lipidy pohybovať a vymieňať si svoje miesta. Tzv. model tekutej mozaiky zdôrazňuje fluiditu daného usporiadania – molekuly lipidov majú značnú voľnosť pohybovať sa laterálne, rotovať a preklápať sa (Obr. 2). Tieto výmeny vedú k rýchlej difúzii v rámci roviny membrány. Laterálna difúzia je pohyb mo-

lekúl, kedy si fosfolipidy vymieňajú miesta so susednými molekulami v rámci roviny monovrstvy. Pri rotácií dochádza k rýchlemu otáčaniu molekuly okolo svojej pozdĺžnej osi. Pri preklápaní (angl. flip-flop) dochádza ku prechodu molekuly z jedenej monovrstvy do druhej. Zatiaľ čo laterálna difúzia a rotácia sú bežné tepelné pohyby, ktoré umožňujú rýchlu výmenu lipidov na povrchu bunky, preklápanie je pomerne zriedkavé a vyžaduje si prítomnosť určitých proteínov (Alberts et al. 1998).

Obr. 2: Pohyblivosť fosfolipidov



Skutočnosť, že sa molekuly môžu voľne pohybovať v rovine membrány, z nej vytvára dvojrozmernú tekutinu. Stupeň tekutosti, teda ľahkosť s akou sa môžu molekuly v membráne pohybovať, je určujúci pre funkčnosť membrány a musí byť udržiavaný v náležitých hraniciach (Alberts et al. 1998). Fluiditu membrány ovplyvňujú rôzne faktory. Jednak je to lipidové zloženie membrány, ale napríklad aj teplota.

Vo všeobecnosti platí, že krátke a rozvetvené reťazce, prítomnosť dvojitych väzieb a vysoká polarita hydrofilnej časti molekúl, tekutosť membrány zvyšujú (Lakowicz 2006). Každá dvojitá väzba v nenasýtenom reťazci vytvára nepravidelnosť, ktorá sťažuje prikladanie jedného reťazca k druhému. Preto membrány s vysokým obsahom nenasýtených uhľovodíkových reťazcov majú vyššiu tekutosť ako tie s menším počtom (Alberts et al. 1998). Uvedenie cis-dvojitej väzby do acylového reťazca fosfolipidu zvyšuje vo významnej miere jeho špecifický objem, čo sa prejaví v znížení viskozity prostredia. Dvojitá väzba má najvýraznejší efekt, keď je situovaná v plne saturovanom reťazci. Uvedenie druhej dvojitej väzby do reťazca má už omnoho menší vplyv na znižovanie viskozity. Pri vyšších stupňoch saturácie sa tento efekt stáva postupne menej výrazný (Shinitzki 1984). Stupeň nenasýtenia acylového reťazca fosfolipidov je do značnej miery určený na úrovni membránovej biogenézy, keď v procese biosyntézy fosfolipidov dochádza k selekcii vhodných mastných kyselín. Špeciálne intracelulárne enzýmy (desaturázy) sú schopné upravovať počet nenasýtených väzieb a dĺžku reťazcov v mastných kyselinách, ktoré má bunka k dispozícii (Shinitzki 1984). Bunky, ktoré sa musia prispôsobovať meniacim sa teplotným podmienkam, majú schopnosť regulovať tekutosť svojej membrány takýmto nastavením dĺžky a nasýtenia uhľovodíkových reťazcov. Napríklad pri vysokých teplotách bunka produkuje dlhšie reťazce s menším počtom dvojitych väzieb (Alberts et al. 1998).

Vplyv cholesterolu, ale aj iných sterolov, je zložitejší. Za fyziologických podmienok vystupuje cholesterol ako hlavný „stužovač“ v prirodzených membránach. Jeho

vplyv sa prejavuje v celkovom náraste mikroviskozity a usporiadosti lipidov v dvojvrstve. Je však nutné poznamenať, že závisí od aktuálnej teploty a tzv. teploty fázového prechodu  $T_{fp}$ . Táto teplota vyjadruje hranicu, pod ktorou sa lipid nachádza v kryštalickom stave a nad ktorou sa nachádza v tekutokryštalickom, resp. tekutom stave. Ak je aktuálna teplota nižšia ako  $T_{fp}$ , bude cholesterol tekutosť membrány zvyšovať, pretože jeho aromatická štruktúra narušuje pravidelné usporiadanie reťazcov karboxylových kyselín fosfolipidov. Naopak, ak je teplota vyššia ako  $T_{fp}$ , cholesterol zapadne do medzier medzi molekulami a stabilizuje tak vrstvu, v ktorej sa nachádza. Cholesterol nad teplotou fázového prechodu znižuje tekutosť membrány.

Vplyv proteínov na lipidovú dynamiku je podobný ako v prípade cholesterolu. Bielkoviny taktiež zvyšujú rigiditu a usporiadanosť tekutých lipidových domén, ale pod lipidovým fázovým prechodom sa správajú opačne (Shinitzki 1984). Významným faktorom je tiež teplota. Pri znížení teploty spôsobí pokles tepelnej energie zníženie rýchlosti pohybu lipidov, v dôsledku čoho sa dvojvrstva stáva menej tekutou.

Tekutosť membrány je pre bunku dôležitá z viacerých dôvodov. Umožňuje membránovým proteínom rýchlo difundovať v rovine membrány a interagovať navzájom, čo má význam pri bunkovej signalizácii. Poskytuje jednoduchý spôsob distribúcie membránových lipidov a proteínov z miest, kde boli po svojej syntéze začlenené do membrány, do iných miest v bunke. A taktiež umožňuje membránam vzájomnú fúziu a zmiešanie ich molekúl a zaisťuje rovnomerné rozdelenie membránových molekúl medzi dcérske bunky pri bunkovom delení (Alberts et al. 1998).

## Ohodnotenie membránovej fluidity

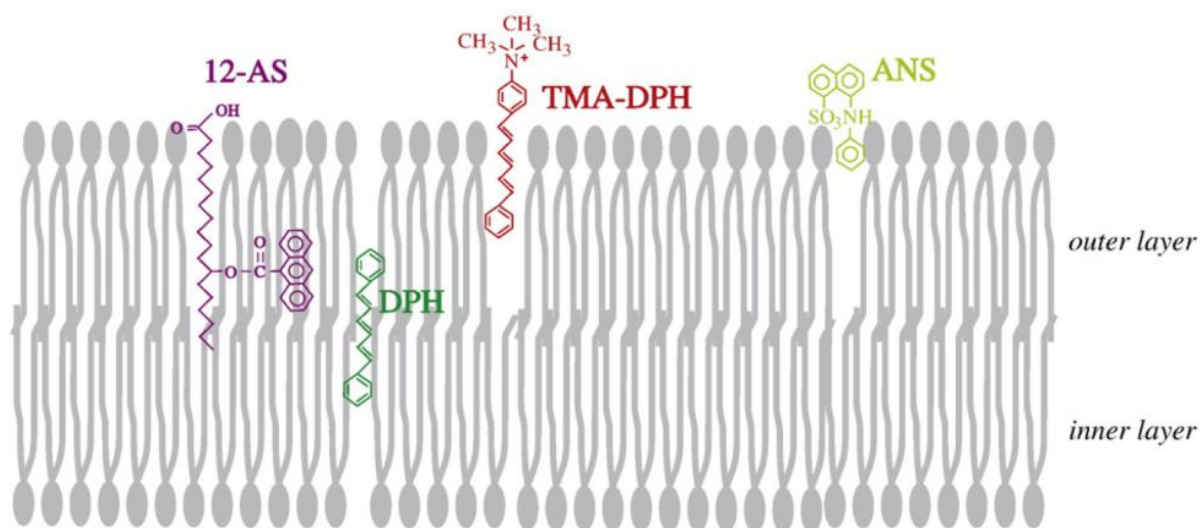
Membránovú fluiditu je možné ohodnotiť využitím fluorescenčných sond. Medzi najčastejšie používané patrí DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién), TMA-DPH (1-(4-trimetylamóniumfenyl)-6-fenyl-1,3,5-hexatrién), 12-AS (12-(9-antroyloxy) kyselina stearová) a ANS (1-anilino-8-naftalén sulfonát). Práve preto, že sú tieto sondy lokalizované v rôznych úrovniach lipidovej dvojvrstvy, umožňujú sledovať zmeny membránovej fluidity v rôznych oblastiach dvojvrstvy, sú teda špecificky vhodné na charakterizáciu odlišných oblastí membrány (Obr. 3). TMA-DPH sa používa na monitorovanie fluidity v blízkosti povrchu bunkovej membrány. Polárna časť tejto sondy je ukotvená na rozhraní lipid-voda, zatiaľ čo uhľovodíková časť vstupuje do hydrofóbnej oblasti dvojvrstvy. Dĺžka hydrofóbnej časti molekuly TMA-DPH je približne ekvivalentná 10 uhlíkovému reťazcu. ANS sa zabudováva takým spôsobom, že aniónová sulfonátová skupina je orientovaná smerom ku hydrofóbnym častiam



lipidov a podáva teda informáciu o interakcii medzi proteínmi a lipidmi a o fluidite povrchu membrány. 12-AS a DPH sa zabudovávajú do hydrofóbných oblastí lipidovej dvojvrstvy. Najznámejší spôsob hodnotenia membránovej fluidity využíva polarizovanú fluorescenciu sond, ktorá poskytuje informácie o rotačných pohyboch fluorescenčných sond zabudovaných do membrány, pričom medzi najčastejšie používanú patrí sonda DPH. Molekula DPH má hydrofóbný charakter, absorbuje žiarenie v tej oblasti vlnových dĺžok (absorpčné maximum 360 nm), v ktorej neabsorbujú žiadne iné zložky membrán, zároveň sa neviaže na proteíny a je chemicky stabilná.

Po pridaní sondy DPH k izolovaným membránam sa sonda zabuduje do membrány, čo je sprevádzané silným zvýšením jej fluorescencie (fluorescenčné maximum 430 nm) (Mason 1999). Využíva sa pri tom fyzikálny jav anizotropia, spočívajúci v tom, že fyzikálne vlastnosti látky sa menia podľa smeru, v ktorom tieto vlastnosti meriame. Preto sa anizotropia fluorescencie sondy DPH (meraná polarizovaným svetlom) správa ako indikátor štruktúrneho usporiadania hydrofóbného vnútra membrány, čo je inverzne proporcionálne membránovej fluidite.

Obr. 3: **Väzba najpoužívanejších fluorescenčných sond na špecifické oblasti lipidovej dvojvrstvy** (upravené podľa Marczak 2009).



## Záver

Článok poukazuje na vplyv zloženia cytopazmatickej membrány bunky na tekutosť (fluiditu) membrány. Upozorňuje tiež na úlohu fluidity membrány a diskutuje možnosti jej ohodnotenia.

## Literatúra

- ALBERTS, B., D. BRAY, A. JOHNSON a J. LEWIS, 1998. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing. ISBN 80-902906-2-0.
- BITTMAN, Robert., 1997. *Cholesterol: its functions and metabolism in biology and medicine*. ISBN 0306454785.
- KARP, Gerald., 2010. *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. B.m.: John Wiley. ISBN 0470483377.
- LAKOWICZ, Joseph R., 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. ISBN 0387312781.
- MARCZAK, Agnieszka, 2009. Fluorescence anisotropy of membrane fluidity probes in human erythrocytes incubated with anthracyclines and glutaraldehyde. *Bioelectrochemistry* [online]. 2009, roč. 74, č. 2, s. 236–239. ISSN 15675394.
- MASON, W.T., 1999. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for*

- Quantitative Real-Time Analysis*. 2nd vyd. London: Academic Press. ISBN 978-0-12-447836-7.
- SHINITZKI, Mein, 1984. Membrane Fluidity and Cellular Functions. V: *Physiology of Membrane Fluidity*. Springer, Boston, s. 1–52.

## Podakovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



# Význam a špecificita adsorbčných receptorov pri fágovej infekcii bakteriálneho hostiteľa

Adela Tkáčová<sup>1</sup>Lucia Bocánová<sup>2</sup>Gabriela Bukovská<sup>3</sup><sup>1,2,3</sup>Oddelenie genomiky a biotechnológií

Ústav molekulárnej biológie SAV

Dúbravská cesta 21

845 51 Bratislava

Slovensko

<sup>1</sup>Adela.Tkacova@savba.sk<sup>2</sup>Lucia.Bocanova@savba.sk<sup>3</sup>Gabriela.Bukovska@savba.sk

Significance and specificity of adsorption receptors in bacterial host phage infection.

## Abstract

The rise of antibiotic-resistant bacterial strains, causing intractable infections, has resulted in a serious global problem that requires effective solutions. The problem is also the existence of biofilms produced by pathogenic bacteria. The biofilm functions as a barrier against antibacterial drugs. Using of phage therapy preceded antibiotic treatment against bacterial infections and involves the use of bacteriophages, bacterial viruses, to fight bacteria. Renew of phage therapy could be an alternative how to control the pathogenic bacteria occurrence. Also the use of bacteriophage treatment to lyse bacteria in biofilms has attracted growing interest. In particular, many natural or engineered phages produce depolymerases to degrade polysaccharides in the biofilm matrix and allow access to host bacteria. The adsorption of bacteriophages onto host cells is condition for the onset of the infection process. Understanding the mechanisms involved and the factors affecting it is, thus, crucial for the investigation of host-phage interactions.

## Key words

Bacteriophage, biofilm, antibiotic resistance, phage therapy, adsorption receptors

## Úvod

Bakteriofágy sú vírusy infikujúce prokaryotické organizmy. Boli objavené približne pred sto rokmi. Patria medzi najpočetnejšie nebunkové organizmy, pričom ich charakterizujeme ako formu živej hmoty. Nachádzajú sa vo všetkých ekosystémoch. V posledných rokoch sa o zvýšenú pozornosť o štúdium fágov zaslúžilo ich potenciálne využitie vo forme fágovej terapie pri infekciách spôsobených multirezistentnými baktériami ako alternatívna liečba k antibiotikám. Životný cyklus bakteriofágov je závislý od hostiteľa. Pri lytickom cykle nastáva po replikácii fágovej DNA v bunke hostiteľa a vytvorení nových fágových častíc lýza bunky, pri ktorej sa do prostredia uvoľnia nové fágové častice. Pri infekcii fágom, ktorá prechádza do lyzogénnej formy, dochádza k integrácii fágovej DNA do genómu hostiteľa vo forme profága.

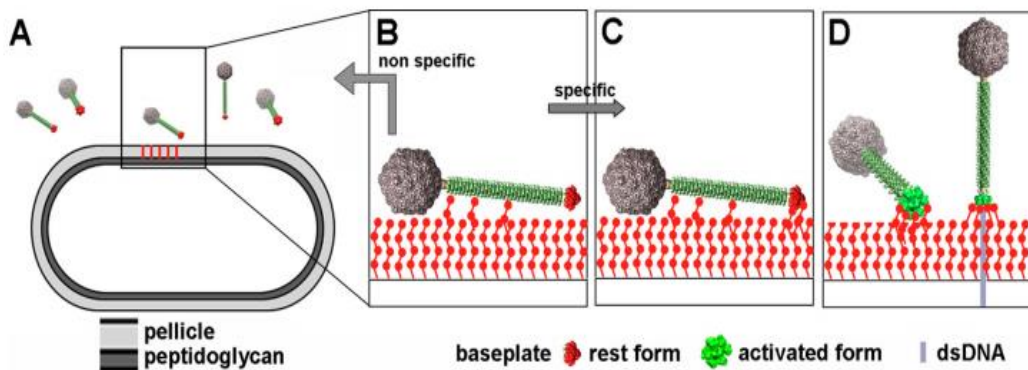
Infekcia hostiteľa fágom pozostáva z viacerých krokov, prvým z nich je adsorpcia fága. Na povrchu bakteriálnej bunky sa nachádzajú receptory, ktoré sú kľúčové pri

adsorbčii fágovej častice na bunku. Tieto receptory sú vysoko špecifické pre každého fága. Po naviazaní sa fága na receptor, dochádza ku konformačným a štruktúrnym zmenám vo fágových proteínoch a bakteriálnom receptore, čím sa umožní vniknutie fágovej DNA do baktérie (Spinelli a kol., 2014). Hostiteľské receptory predstavujú širokú škálu rôznych molekúl od peptidov po polysacharidy. Komplexita a zloženie bunkovej steny je zrejme príčinou náročnejšej identifikácie receptorov špecifických pre adsorpciu fágov (Silva a kol., 2016).

## Adsorbčné receptory grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií

Na povrchu bunkovej steny baktérií sa nachádzajú biomakromolekuly, najčastejšie proteíny alebo polysacharidy, ktoré majú úlohu receptorov. Receptory interagujú s proteínmi fágového viriónu, chvostíka alebo bazálnej platničky. Adsorpcia fágovej častice na receptory bakteriálnej bunkovej steny má kľúčovú úlohu v procese infekcie bakteriálnej bunky (Spinelli a kol., 2014). Štruktúra a následná konformácia biomakromolekúl pri vzájomnej interakcii predstavuje esenciálny krok rozhodujúci o úspešnej infekcii danej baktérie konkrétnym fágom. Na Obr. 1 je zobrazený typ lokalizácie vhodného receptora na povrchu bakteriálnej bunky, špecifického pre adsorpciu daného fága. Stavba bunkovej steny priamo súvisí s typom receptorov na povrchu bakteriálnej bunky, preto sú adsorbčné fágové receptory rozmanité a odlišné pre gram-pozitívne a gram-negatívne baktérie. Hlavnou súčasťou bunkovej steny všetkých baktérií je peptidoglykan. Peptidoglykanová vrstva gram-negatívnych baktérií je relatívne tenká, u gram-pozitívnych baktérií je vrstva peptidoglykanu hrubšia. Peptidoglykan predstavuje komplex heteropolysacharidov, tvoriacich lineárny reťazec striedajúcich sa jednotiek N-acetylglukózamínu (GlcNAc) a kyseliny N-acetylmurámovej (MurNAc) spojených  $\beta$ -1,4 väzbou.

Obr. 1: Proces vyhľadávania špecifického receptora a adsorbcia fága



Upravené podľa 17.8.2017:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00003/full>

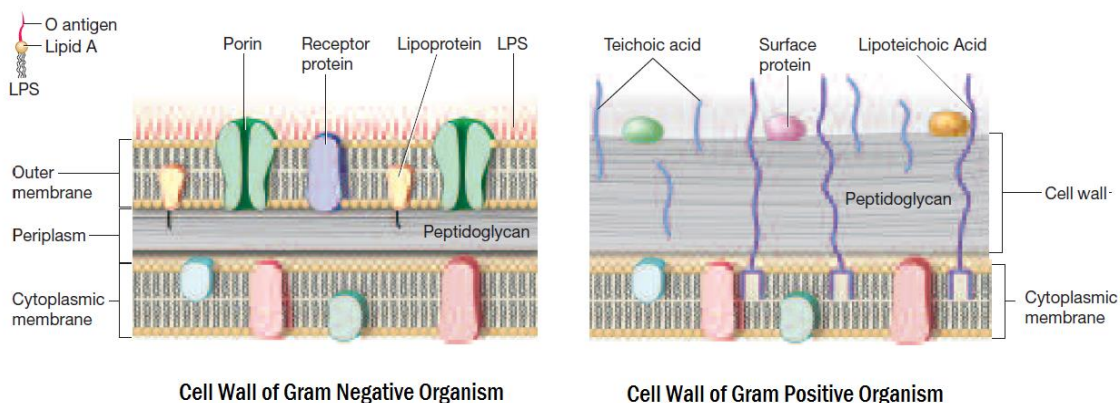
Ku karboxylovej skupine každej kyseliny MurNAc je pripojený amidovou väzbou krátky tetrapeptid. Zloženie a štruktúra peptidoglykanu je takmer identická u všetkých gram-negatívnych baktérií v porovnaní s veľkou diverzitou peptidoglykanu u gram-pozitívnych baktérií. U gram-negatívnych baktérií obsahuje bunková stena okrem peptidoglykanu aj vonkajšiu membránu. Dvojvrstva vonkajšej membrány je tvorená vrstvou fosfolipidov a vrstvou lipopolysacharidov, ktoré často zodpovedajú za toxicitu gram-negatívnych baktérií. Súčasťou membrány sú aj integrálne proteíny, ktoré predstavujú transportné kanály. Medzi cytoplazmatickou membránou a peptidoglykanom je periplazmatický priestor (Nikaido, 2003).

Gram-pozitívne baktérie nemajú vonkajšiu membránu. Cez vrstvu peptidoglykanu prechádzajú reťazce kyseliny teichoovej, teichurónovej, a lipoteichoovej a proteíny. V peptidoglykane všetkých gram-pozitívnych baktérií sú prítomné opakujúce sa disacharidy, ale zloženie tetrapeptidu sa mení v závislosti od bakteriálneho rodu. Napríklad *Listeria monocytogenes* má L-lyzín nahradený kyselinou m-diaminopimelovou, *Staphylococcus aureus*

má k L-lyzínu bočného reťazca pripojených päť glycinov, *Streptomyces pyogenes* dva alaníny (Madigan a kol., 2012). Porovnanie zloženia bunkových stien gram-negatívnych a gram-pozitívnych baktérií je zobrazené na Obr. 2.

Fágy sa viažu na rozmanité súčasti bunkovej steny gram-pozitívnych a gram-negatívnych baktérií, od proteínov cez sacharidy, na zložky bakteriálnych puzdier, biofilmov a proteíny bakteriálnych pilusov. Táto rôznorodosť receptorov a štruktúr je dôkazom rozmanitosti stratégií, ktoré si vyvinuli fágy na prekonanie obranných mechanizmov hostiteľa v priebehu evolúcie. Autori Silva a kol. (2016) publikovali zoznam doteraz identifikovaných receptorov špecifických pre adsorbciu fágov infikujúcich gram-pozitívne a gram-negatívne baktérie. Vytvorili voľne dostupnú databázu týchto receptorov, ktorá sa stále dopĺňa o nové poznatky. Napr. pre adsorbciu fága boli u gram-pozitívnych baktérií identifikované ako receptory často zložky peptidoglykanu, napr. kyselina N-acetyl muramová je receptorom hostiteľa *Bacillus thuringiensis* pre fága Bam35 z čeľade *Siphoviridae* (Gaidelyte a kol., 2006).

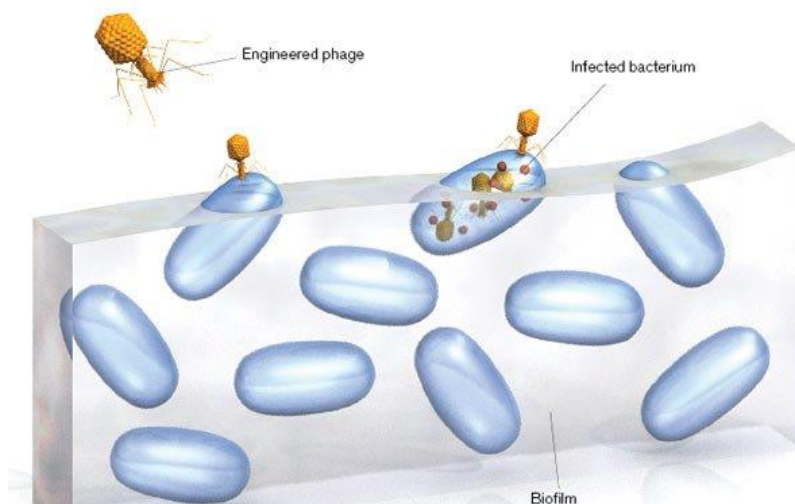
Obr. 2: Porovnanie zloženia bunkovej steny gramnegatívnych a gram-pozitívnych baktérií



Upravené podľa 17.8.2017:  
[https://www.reddit.com/r/science/comments/5smdeu/dragonfly\\_wings\\_naturally\\_kill\\_bacteria\\_at\\_the/](https://www.reddit.com/r/science/comments/5smdeu/dragonfly_wings_naturally_kill_bacteria_at_the/)



Obr. 3: **Degradácia bakteriálneho biofilmu fágom**



Upravené podľa 17.8.2017:

<http://www2.technologyreview.com/tr35/profile.aspx?TRID=967>

Na galaktózu v polysacharide bunkovej steny hostiteľa *Lactobacillus plantarum* sa adsorbuje fág B1 z čeľade *Siphoviridae* (Douglas a Wolin, 1971). Pre fága z čeľade *Myoviridae* a hostiteľa *Staphylococcus aureus* sú receptorom aniónové zložky kyseliny teichoovej (Xia a kol., 2011). Ďalšie poznatky sú známe zo štúdia interakcií medzi modelovými fágmi a grampozitívnymi baktériami – ako napr. mykobakteriofágom L5, fágom SPP1 z *Bacillus subtilis* a fágmi infikujúcimi rod *Lactococcus* (Mahony a van Sinderen, 2015).

Fágy sa opätovne začínajú využívať na liečbu infekcií spôsobených multirezistentnými baktériami pomocou fágovej terapie. Aplikácia fágov sa ukázala ako vhodná aj na potlačenie infekcií baktériami, ktoré vytvárajú biofilmy. Baktérie v biofilme sú veľmi odolné voči antibiotikám. Bakteriofágy, prirodzené alebo pripravené, často produkujú depolymerázy, ktoré degradujú polysacharidy v matrici biofilmu. Tým sa uvoľní cesta pre fágy, fág získa prístup k adsorbčným receptorom na bunke, nastáva infekcia a lýza bunky (Harper a kol., 2014).

## Úloha adsorbčných receptorov v rezistencii baktérií voči fágom

Baktérie majú rôzne obranné mechanizmy, ktorými sa bránia voči fágovej infekcii. Jeden z prirodzených mechanizmov rezistencie vzniká v bakteriálnych kmeňoch spontánnou nešpecifickou mutáciou najčastejšie v génoch kódujúcich bunkové receptory. Adsorbcia fágovej častice na baktériu je iniciačný krok fágovej infekcie, a teda aj kľúčový bod pri vzniku rezistencii baktérie voči fágu (Pires a kol., 2017). Zmenou konformácie trojrozmernej štruktúry receptorov, špecifických pre nasadnu-

tie fága na bunku, sa baktérie brániavoči fágovým infekciám (Labrie a kol., 2010). Tieto kmene odolné voči fágovej infekcii (BIM's – Bacteriophage insensitive mutant's) sú schopné prežívať aj v prostredí s vysokou koncentráciou lytických fágov. Tvorba BIM je jednoduchá a rýchla. Nevýhodou je možnosť spätnej mutácie, ktorá spôsobí stratu rezistencie alebo zmenu bunkového rastu. Väčšina z doteraz identifikovaných receptorov bola odvodená buď od štruktúr peptidoglykánu, alebo kyseliny teichoovej. Špecifita adsorbčných receptorov sa mení v závislosti od mikroorganizmu a fága. Napr. u *Pseudomonas aeruginosa* slúžia ako adsorbčné receptory pre fága LUZ19 pilusy štvrtého typu, ktoré zabezpečujú pohyb bunky (Lavigne a kol., 2013) a lipopolysacharidy (LPS) v bunkovej stene sú receptormi pre fágov phiBB-PAA2 a vB-PaeM\_CEB\_DP1 (Garbe a kol., 2010; Pires a kol., 2013). Je zrejme, že v baktériách rezistentných voči infekcii fágom nastala zmena v štruktúre LPS alebo v pilusoch IV typu dôsledkom mutácie, alebo delécie génov kódujúcich adsorbčné receptory. Niektorí autori vo svojich štúdiách uvádzajú výskyt fágovo-rezistentných kmeňov *P. aeruginosa* aj v biofilmoch. Biofilmy poskytujú baktériám vo svojom matrici zvýšenú ochranu a genetickú variabilitu. Pravdepodobne práve preto dochádza v biofilmoch k rýchlejšiemu vzniku rezistentných bakteriálnych kmeňov voči fágom. Keďže bakteriofágy sú schopné adsorbovať sa na odlišné bakteriálne receptory, jedným z riešení zníženia vzniku takejto rezistencie je aplikácia fágových koktejlů obsahujúcich zmes vybraných/modifikovaných bakteriofágov (Pires a kol., 2017).

## Záver

Nárast výskytu multirezistentných patogénnych baktérií je veľmi vážnym celosvetovým problémom a vyžaduje si efektívne riešenia. Bakteriofágy svojou univerzálnosťou, špecificitou a spôsobom rozmnožovania predstavujú vhodnú alternatívnu metódu prevencie a liečby v prípade zlyhania účinku antibiotickej liečby. Bakteriofágy dokážu prenikať do matrixu biofilmu patogénnych baktérií a degradovať bakteriálny biofilm. Prvým krokom v procese infekcie bakteriálnej bunky fágom je jeho väzba na adsorbčné receptory na povrchu bakteriálnej bunky. Receptory sú zložky bunkovej steny, ktoré interagujú s proteínmi fága a umožňujú prienik fágovej DNA do bunky. Nasadením fága na adsorbčné receptory dochádza k infekcii baktérie a následnému usmrteniu bakteriálnej bunky. Rôznorodosť identifikovaných receptorov pre jednotlivé fágy poukazuje na rozmanitosť stratégií, ktoré si vyvinuli fágy na prekonanie obranných mechanizmov hostiteľa v priebehu evolúcie.

## Literatúra

DOUGLAS, J. L.; WOLIN, M. J. Cell wall polymers and phage lysis of *Lactobacillus plantarum*. In: *Biochemistry*. 10, 1971, pp: 1551-155.

GAIDELYTE, A.; CVIRKAITE-KRUPOVIC, V.; DAUGELAVICIUS, R. The entry mechanism of membrane-containing phage Bam35 infecting *Bacillus thuringiensis*. In: *Journal of Bacteriology*. 188, 2006, pp: 5925–5934.

GARBE, J.; WESCHE, A.; BUNK, B.; KAZMIERCZAK, M.; SELEZSKA, K.; ROHDE, C. Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. In: *BMC Microbiology*. 10, 2010. doi:301 10.1186/1471-2180-10-301.

HARPER, D. R.; PARRACHO, H. M. R. T.; WALKER, J.; SHARP, R.; HUGHES G.; WERTHÉN, M.; LEHMAN, S.; MORALES, S. Bacteriophages and Biofilms. In: *Antibiotics*. 3, (3), 2014, pp: 270-284.

LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. In: *Nature Reviews Microbiology*. 8, 2010, pp: 317–327.

LAVIGNE, R.; LECOUTERE, E.; WAGEMANS, J.; CENENS, W.; AERTSEN, A.; SCHOOF, L. A multifaceted study of *Pseudomonas aeruginosa* shutdown by virulent podovirus LUZ19. In: *mBio Journal*. 4, 2013, doi: 10.1128/mBio.00061-13.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A. Brock biology of microorganisms (13th edition), 2012, pp: 1152. Benjamin Cummings, San Francisco. ISBN 978-0-321-64963-8.

MAHONY, J.; VAN SINDEREN; D. Gram-positive phage-host interactions. In: *Frontiers in Microbiology*. 6, 2015, pp:1–2.

NIKAIIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. In: *Microbiology and Molecular Biology Review*. 67, 2003, pp: 593-656.

PIRES, D. P.; DÖTSCH, A.; ANDERSON, E. M.; HAO, Y.; KHURSIGARA, C. M.; LAM, J. S.; SILLANKORVA, S.; AZEREDO, J. A genotypic analysis of five *P. aeruginosa* strains after biofilm infection by phages targeting different cell surface receptors. In: *Frontiers in Microbiology*. 8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01229.

SILVA, J. B.; STORMS, Z.; SAUVAGEAU, D. Host receptors for bacteriophage adsorption. In: *FEMS Microbiology Letters*. 363, 2016, pp:1-11.

SPINELLI, S.; VEESLER, D.; BEBEACUA, C.; CAMBILLAU C. Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal siphophages. In: *Frontiers in Microbiology*. 5, (3), 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00003.

XIA, G.; CORRIGAN, R. M.; WINSTEL, V. et al. Wall teichoic acid-dependent adsorption of *Staphylococcal siphovirus* and *myovirus*. In: *Journal of Bacteriology*. 193, 2011, pp:4006–4009.

## Podakovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



# Mikrobióm človeka a jeho vplyv na zdravotný stav organizmu

Yveta Gbelská<sup>1</sup>

Nora Tóth Hervay<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava  
Slovensko

<sup>1</sup>yveta.gbelska@uniba.sk

## The human microbiota in health and disease

### Abstract

The human microbiome plays an important role in the well-being of the human host, and participates actively in the development of a wide variety of diseases. Current research on host-microbiota interactions should go beyond a characterization of the community composition and an investigation of the community member's associations. With new techniques in hand, future advances will help to clarify the interactions between the microbiota and human development, and the potential roles of microbiota involved in the mechanisms of various diseases (liver diseases, bacterial infection, cancer, psychiatric diseases and metabolic diseases).

### Key words

Microbiome, health, infectiousdisease

## Úvod

Zavedenie nových technológií do vedeckého výskumu biológie v posledných desaťročiach (celogenómové, bioinformatické analýzy), poskytlo nový pohľad na spoločenstvá mikroorganizmov, ktoré žijú v symbióze s makroorganizmom (človekom). Ukazuje sa, že asociované mikroorganizmy významnou mierou ovplyvňujú zdravotný stav človeka. Osídľujú povrch tela, v najvyššej koncentrácii sa však nachádzajú v gastrointestinálnom trakte – odhaduje sa, že až 500 rôznych druhov mikroorganizmov je súčasťou celkového počtu  $10^{14}$  baktérií, ktoré kolonizujú črevný trakt. Zloženie mikrobiómu zdravého jedinca je počas celého života pomerne stabilné. Diverzita mikrobiómu závisí od životného štýlu hostiteľa, diéty a klinických intervencií napr. od užívania antibiotík. Narušenie homeostázy mikrobiómu vedie k tzv. dysmikrobii, ktorá zvyšuje riziko rôznych ochorení hostiteľa.

## Úloha mikrobiómu človeka

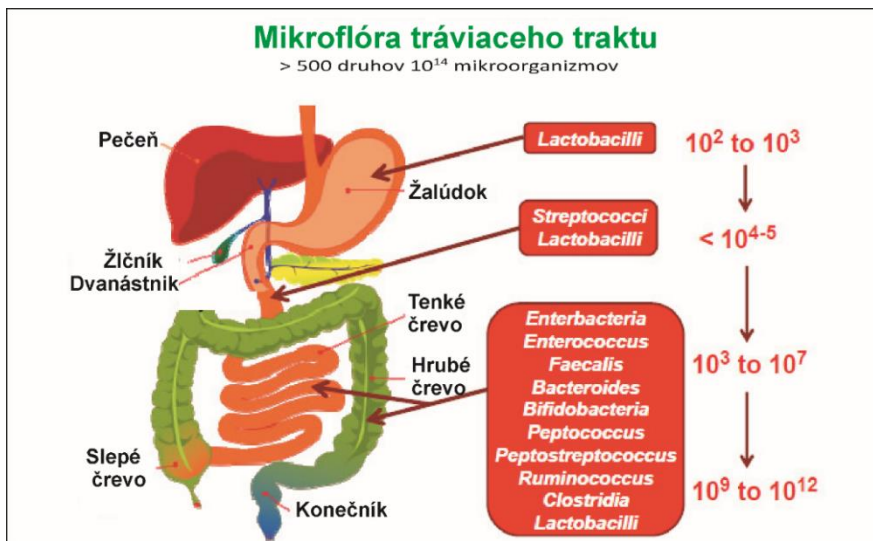
Črevná mikroflóra človeka sa považuje za „esenciálny orgán“, reprezentovaný predovšetkým anaeróbnymi baktériami zo 4 taxonomických oddelení: *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* a *Proteobacteria* (Obr. 1). Väčšina druhov bola detegovaná tzv. kultivačne nezávislými metódami, najčastejšie sekvenovaním 16S rRNA. Črevný mikrobióm zohráva významnú úlohu pri formovaní imunitného systému makroorganizmu (Bous-

kra a kol., 2008). Pomáha pri modulácii metabolizmu, reguluje vývin črevného epitelu (Savage 1977, Whitman a kol. 1998, Ley a kol. 2006, Wang a Li 2015). Ukazuje sa, že viaceré chronické choroby ako je obezita, zápalové ochorenie čriev, cukrovka, metabolický syndróm, ateroskleróza, cirhóza pečene, hepatocelulárny karcinóm sú úzko asociované s mikrobiómom človeka (Obr. 2). Mikroorganizmy poskytujú hostiteľovi špecifické enzýmy, disponujú biochemickými dráhami, ktoré uľahčujú trávenie potravy, pomáhajú pri likvidácii xenobiótík, syntetizujú esenciálne vitamíny. Mikroorganizmy produkujú antimikrobiálne zlúčeniny, ktoré slúžia ako fyzikálna bariéra chrániaca hostiteľa pred infekciou patogénnymi druhmi mikroorganizmov (Hooper a kol. 2003, Schaubert a kol. 2003, Cash a kol. 2006).

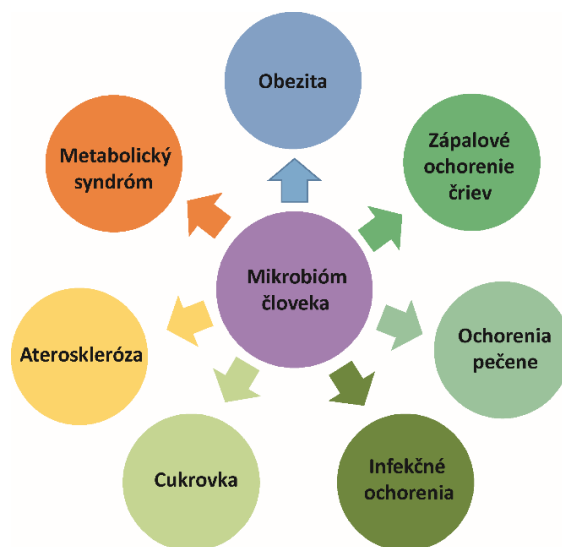
Mikrobióm človeka (baktérie, archaeóny, vírusy, eukaryotické mikroorganizmy) teda významnou mierou ovplyvňuje fyziologické funkcie makroorganizmu. Zloženie a funkcia mikrobiómu sa mení podľa miesta lokalizácie v organizme, závisí od veku, pohlavia a diéty hostiteľa. Komenzálna baktérie kolonizujú telo hostiteľa krátko po narodení. Z pomerne jednoduchej komunity mikroorganizmov vzniká postupne komplexný ekosystém zúčastňujúci sa na trávení potravy, brániaci vstupu patogénnych mikroorganizmov, prispievajúci k formovaniu normálnej architektúry čreva. Trávenie vlákniny – xyloglukánov, bežne sa vyskytujúcich v zelenine, zabezpečujú špecifické druhy baktérií z rodu *Bacteroides* (Lasbrink a kol. 2014). Ak je vláknina tvorená fruktooligosacharidmi a oligosacharidmi, na jej odbúrání sa zúčastňujú baktérie z rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Goh a kol. 2015). Črevný mikrobióm je tiež rozhodujúci pre zabezpečenie homeostázy lipidov, proteínov a esenciálnych vitamínov (foláty, vitamín K, biotín, riboflavín (B<sub>2</sub>), kobalamín (B<sub>12</sub>) (Morowitz a kol. 2011). Normálny črevný mikrobióm produkuje denne 50 – 100 mmol.L<sup>-1</sup> organických kyselín s krátkym reťazcom (kyselina octová, propionová, maslová), ktoré slúžia ako zdroj energie pre črevný epitel hostiteľa (Duncan a kol. 2009). Tieto kyseliny sú ľahko absorbované črevným epitelom, regulujú pohyb čreva, zápalové procesy a homeostázu glukózy (Cebra 1999).



Obr. 1: Zastúpenie mikroorganizmov v gastrointestinálnom trakte človeka (upravené podľa Konturek a kol. 2015)



Obr. 2: Symbióza človeka s mikroorganizmami je v úzkom vzťahu s rôznymi ochoreniami (upravené podľa Wang a kol. 2017)



## Mikrobióm človeka a infekčné choroby

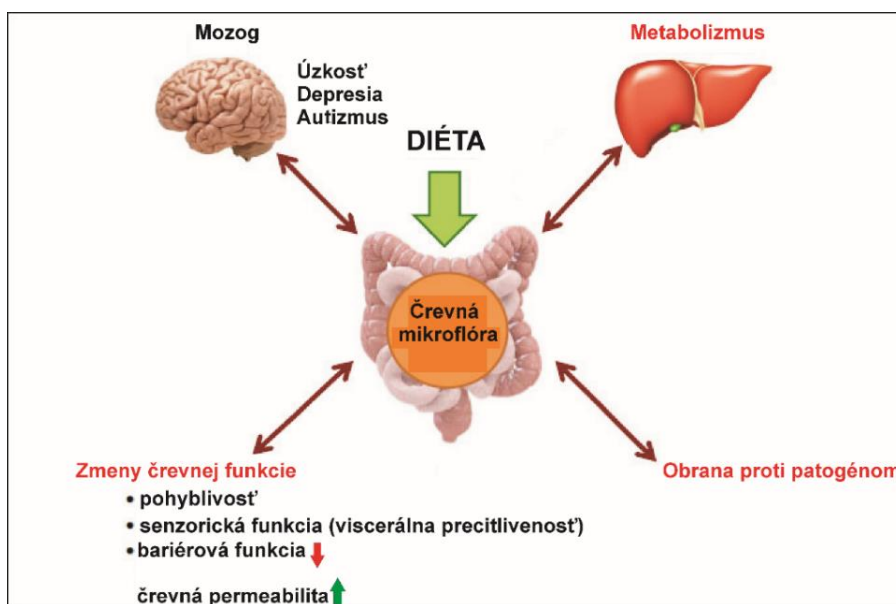
Na základe doterajších štúdií možno jednoznačne konštatovať, že narušenie normálnej rovnováhy mikrobiómu hostiteľa (tzv. dysmikróbia) významne ovplyvňuje priebeh a výsledok infekčnej choroby. K modifikácii zloženia črevného mikrobiómu dochádza nielen v dôsledku bakteriálnej infekcie, ako je napr. premnoženie *C. difficile* po podávaní antibiotík, ale aj v dôsledku vírusovej infekcie napr. vírusu HIV, hepatitídy B. Anaeróbná, gram-pozitívna, spórotvorná baktéria *C. difficile* je bežnou súčasťou črevnej mikroflóry. Narušením črevnej sliznice po podávaní antibiotík sa zníži odolnosť organizmu voči baktérii produkujúcej toxín a dochádza k progresii infekcie (Gu a kol. 2016). Stav vaginálneho mikrobiómu má

vplyv na riziko infekcie vírusom HIV. Baktérie rodu *Gardnerella* napr. efektívne znižujú koncentráciu tenofoviru, terapeutika používaného na likvidáciu infekcie. *Helicobacter pylori* vyvoláva peptické ochorenie tráviaceho traktu. Posledné štúdie uvádzajú, že *H. pylori* je tiež spojený s progresom periodontitídy (Hu a kol. 2016). Chronický zápal žalúdka asociovaný s *H. pylori* sa považuje za primárny rizikový faktor pri vzniku rakoviny žalúdka. Iba u 1 % – 2 % ľudí infikovaných *H. pylori* sa vyvinie ochorenie. Riziko vzniku ochorenia súvisí s genetickou diverzitou kmeňov *H. pylori*, rozdielmi v reakcii rôznych hostiteľov na prítomnosť infekčného agens, ako aj špecifitou interakcií medzi hostiteľom a mikroorganizmom (El-Omar a kol. 2000). V poslednom období pribúdajú poznatky o úzkom vzťahu medzi mikrobiómom GI traktu a pečeňou (Obr. 3). Metabolity produkované

vané črevnou mikrobiómou – etanol, amoniak a acetaldehyd, ovplyvňujú funkciu resp. metabolizmus pečene tým, že podporujú uvoľňovanie bakteriálnych endotoxínov. U pacientov s cirhózou pečene sa 16S rRNA sekvencovaním dokázalo znížené zastúpenie druhov *Bacteroidetes*, zatiaľ čo množstvo *Proteobacteria* a *Fusobacteria* sa zvýšilo (Chen a kol. 2011). Zaznamenalo sa tiež zvýšené množstvo baktérií z rodov *Veillonella*, *Streptococcus* a *Clostridium* (Quin a kol. 2014). Črevnú dysbiózu indikuje aj zvýšené množstvo baktérií z čeľade *Pasteurellaceae*, ktoré sa považuje za indikátor finálneho štádia ochorenia. Hoci presná príčina pozorovaných zmien zatiaľ nie je jasná, predpokladá sa, že bakteriálne antigény prechádzajú cez narušenú a zapálenú črevnú stenu do žlčového systému čím indukujú abnormálnu imunitnú odpoveď a iniciujú autoimunitné ochorenie pečene (Bjornsson a kol. 2005).

Patologická nerovnováha mikrobiómu sa pozorovala tiež u pacientov s kolorektálnym karcinómom. Charakteristická je vysoká koncentrácia potenciálnych patogénov ako sú baktérie z rodov *Pseudomonas*, *Helicobacter* a *Acinetobacter* nižšie zastúpenie prospešných baktérií napr. baktérií produkujúcich kyselinu maslovú. Nie je však jasné, či zmeny v mikrobiálnom spoločenstve sú príčinou alebo následkom ochorenia. Na druhej strane, mnohé metabolity baktérií potláčajú vznik rakoviny čreva, napr. spomenuté organické kyseliny s krátkym reťazcom vznikajúce pri mikrobiálnej fermentácii komplexných polysacharidov (octová, propiónová, maslová). (Clausen a kol. 1991, Howe a kol. 1992). Tumor potláčajúci efekt kys. maslovej súvisí s indukciou apoptózy, inhibíciou proliferácie buniek, epigenetickými zmenami v génovej expresii, modulácii zápalového procesu a hladiny cytokínov.

Obr. 3: Fyziologickú úlohu črevnej mikrobiómy ovplyvňuje diéta. Črevná mikrobióma má vplyv na funkciu rôznych orgánov a obranu proti patogénom.

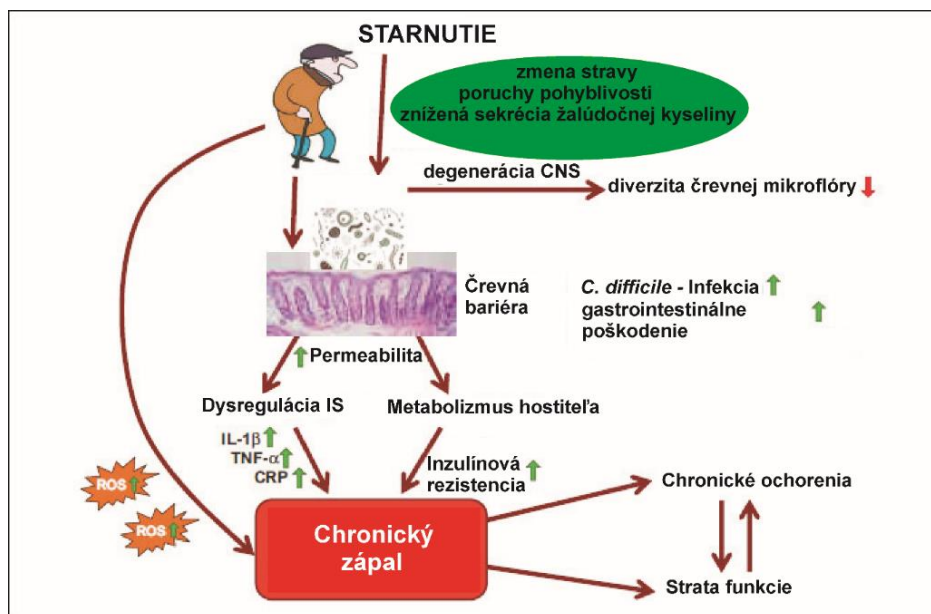


## Mikrobióm človeka a metabolické poruchy

Zloženie črevnej mikrobiómy ovplyvňuje používanie antibiotík a životný štýl hostiteľa – návyky, diéta, hygienické preferencie. Dysbióza črevnej mikrobiómy má vplyv na produkciu mediátorov imunity a indukuje buď chronický zápalový proces alebo metabolickú poruchu (Sommer a Backhed 2013). Obezita, diabetes typu 2 a kardiovaskulárne ochorenia sú považované za dôsledok komplexných interakcií medzi genetickou dispozíciou hostiteľa, diétou, prostredím a črevnou mikrobiómou makroorganizmu (Franks a kol. 2016).

Mechanizmus vzniku ochorení môže súvisieť s translokáciou mikroorganizmov z čreva do tkanív, čo vedie k zápalu. Zmeny v zastúpení mikroorganizmov súvisia s mnohými ďalšími chorobami – astma, potravinové alergie, autizmus, depresie. Interakcie medzi hostiteľom a jeho mikrobiómom sú komplexné a dynamické, zahŕňajú rôzne mechanizmy imunitné, hormonálne a nervové dráhy. Autizmus je napr. sprevádzaný relatívne nízkym zastúpením mukolytických baktérií *Akkermansia muciniphila* a *Bifidobacterium spp.*, ako sa zistilo analýzou výkalov autistických detí. Zmeny v zastúpení mikroorganizmov v črevnom mikrobióme, ku ktorým dochádza v procese starnutia, vedú k rôznym degeneratívnym zmenám (Obr. 4).

Obr. 4: Vplyv starnutia na črevnú mikroflóru a patológiu gastrointestinálneho traktu



## Záver

Pôvodné mikrobiologické štúdie v prezentovanej oblasti boli zamerané na zodpovedanie otázky, ktorý druh mikroorganizmu sa vyskytuje v ktorej lokalite, resp. aká je jeho funkcia. Moderné, dostupné technológie celogenómovej a bioinformatickej analýzy umožnili študovať spoločenstvá mikroorganizmov prítomné v rôznych ekosystémoch. Fylogenetickú štruktúru mikrobiálneho spoločenstva pomáha odhaliť napr. analýza 16S rRNA transkriptov. Dobré známou a primárnou funkciou črevnej mikroflóry je metabolizmus sacharidov, produkcia energie a syntéza bunkových komponentov pre makroorganizmus. Využitie hromadiacich sa poznatkov o mikrobióme človeka v humánnej medicíne v budúcnosti, závisí od našej schopnosti porozumieť, ktoré mikroorganizmy sú esenciálne pre vitálne interakcie s hosťiteľom v podmienkach jeho zdravia resp. choroby. Pre pochopenie interakcií medzi mikrobiómom a hosťiteľom v komplexnom spoločenstve mikroorganizmov je tiež rozhodujúca identifikácia tých druhov, ktoré produkujú zaujímavé metabolity. Prevencia a terapia ochorení zásahom do mikrobiómu človeka je aktuálnou úlohou súčasného vedeckého bádania. Niektoré terapeutické postupy sa už overovali v praxi, napr. podávanie probiotík urýchlilo rekonvalescenciu pacientov infikovaných vírusom H7N9, transplantácia fekálneho mikrobiómu izolovaného zo zdravého jedinca zlepšila stav pacientov infikovaných *C. difficile* výraznejšie ako podávanie antibiotík. Mikrobióm človeka je teda nevyhnutné študovať ďalej, aby sa získané poznatky dali využiť v diagnostike a terapii v personalizovanej medicíne v budúcnosti.

## Literatúra

- BJORNSSON, E., CEDERBORG, A., AKVIST, A. a kol. Intestinal permeability and bacterial growth of the small bowel in patients with primary sclerosing cholangitis. *Scand. J Gastroenterol*, roč. 40, č. 9, 2005, pp. 1090-94.
- BOUSKRA, D., BRÉZILLON, C., BÉRARD, M. a kol. Lymphoid tissue genes is induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, roč. 456, č. 7221 (2008) pp.507-510.
- CASH, H. L., WHITHAM, C. V., BEHREND, C. I., HOOPER, L.V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, roč. 313, č. 5790 pp.1126-1130.
- CEBRA, J.J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr*, roč. č. 69, 5, 1999, pp.1046S-51S.
- CHEN, Y., YANG, F., LU, H., WANG, B., a kol. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, roč. 54, č. 2, 2011, pp. 562-572.
- CLAUSEN, M. R., BONNÉN, H., MORTENSEN, P. B. Colonic fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. *Gut*, roč. 32, č. 8, 1991, pp.923-928.
- DUNCAN, S. H., LOUIS, P., THOMSON, J. M., FLINT, H. J. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* roč. 11, č. 8, 2009, pp.2112-22.
- EL-OMAR, E. M., CARRINGTON, M., CHOW, W. H., a kol. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, roč. 404, č. 6776, 2000, pp.398-402.
- FRANKS, P. W., McCARTHY, M. I. Exposing the exposures responsible for type 2 diabetes and obesity. *Science*, roč. 354, č. 6308, 2016, pp.69-73.
- GOH, Y. J., KLAENHAMMER, T. R. Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annu Rev FoodSciTechnol*. roč. 6, 2015 pp.137-156.
- GU, S., CHEN, Y., ZHANG, X. a kol. Identification of key taxa that favor intestinal colonization of *Clostridium difficile* in and adult Chinese population. *MicrobesInfect*. Roč. 18, č. 1, 2016, pp. 30-38.



- HOOPER, L. V., STAPPENBECK, T. S., HONG, C. V., GORDON, J. I. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* roč.4, č. 3, 2003, pp.269-273.
- HOWE, G. R., BENITO, E., CASTELLETO, R. a kol. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J. Natl. CancerInst.* roč. 84, č.24, 1992, pp.1887-96.
- HU, Z., ZHANG, Y., LI, Z. a kol. Effect of Helicobacter pylori infection on chronic periodontitis by the change of microecology and inflammation. *Oncotarget* roč. 7, č. 41, 2016, pp. 66700-12.
- KONTUREK, P. C., HAZIRI, D., BRZOZOWSKI, T. a kol. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *J. Physiol. Pharmacol.* roč. 66, č. 4, 2015, pp. 483-91.
- LARSBRINK, J., ROGERS, T. E., HEMSWORTH, G. R., a kol. A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. *Nature*, roč. 506, č. 7489, 2014, pp. 498-502.
- LEY, R. E., PETERSON, D. A., GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, roč. 124, č. 4, 2006, pp. 837-48.
- MOROWITZ, M. J., CARLISLE, E. M., ALVERDY, J. C. Contributions of intestinal bacteria to nutrition and metabolism in the critical illness. *SurgClin North Am* roč. 91, č. 4, 2011, pp. 771-85.
- QIN, N., YANG, F., LI, A. a kol. Alterations of the human gut-microbiome in liver cirrhosis. *Nature*, roč. 513, č. 7516, 2014, pp. 59-64.
- SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* roč. 31, č. 1, 1977, pp.107-133.
- SCHAUBER, J., SVANHOLM, C., TEERMÉN, S. a kol. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by shortchain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut*, roč. 52, č. 5, pp.734-41.
- SOMMER, F., BACKHED, F. The gutmicrobiota – masters of host development and physiology. *Nat. Rev.Microbiol.* roč. 11, č. 4, 2013, pp. 227-38.
- WANG, B., LI, L. Who determines the outcomes of HBV exposure? *TrendsMicrobiol.* roč. 23, č. 6, 2015, pp. 328-29.
- WANG, B., YAO, M., LV, L. a kol. The human microbiota in health and disease. *Engineering* roč. 3, 2017 pp. 71-82.
- WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C., WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* roč. 95, č. 12, 1998, pp. 6578-83.

## Podakovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



# Úloha extracelulárnej DNA v patogenéze zápalových črevných chorôb

Barbora Čechová<sup>1</sup>

Roman Gardlík<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra molekulárnej biológie  
Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 3278/6, 841 04, Karlova Ves  
Slovensko  
renaissance265215@gmail.com

<sup>2</sup>Ústav molekulárnej biomedicíny  
Lekárska fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Sasinkova 4, 811 08, Bratislava  
Slovensko  
roman.gardlik@gmail.com

## Role of extracellular DNA in pathogenesis of inflammatory bowel disease

### Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract with a complex etiology caused by various genetic, immunological and environmental factors. IBD refers to ulcerative colitis and Crohn's disease, which are diseases of the digestive tract with similar clinical, pathological and epidemiological features. They are characterized by recurrent episodes of disease exacerbations with associated abdominal pain, diarrhea, weight loss and rectal bleeding. Neutrophils, eosinophils, and macrophages release DNA to extracellular space as a result of apoptosis or other forms of cellular death. Levels of plasma circulating DNA are increased in inflammation. Previous studies have shown that increased levels of extracellular DNA are extremely sensitive and specific for poor outcomes in many different conditions. In this article we describe the association between severity of inflammation and levels of extracellular DNA in plasma.

### Key words

Extracellular DNA, Cell-free DNA, NETs, inflammatory bowel disease

## Úvod

Extracelulárna DNA (ec DNA) sa stáva v modernej biomedicíne stále väčším fenoménom pre jej potenciálne klinické využitie. Potenciál využitia ec DNA ako markeru akútneho a chronického zápalu spočíva v schopnosti takejto DNA stimulovať signálne dráhy tzv. toll like receptorov, ktoré sú súčasťou vrodeneho imunitného systému a regulujú imunitnú odpoveď. Náš záujem o túto problematiku vzbudil možný súvis ec DNA s patogenézou zápalových črevných chorôb. Zápalové črevné choroby predstavujú stále zvyšujúce sa riziko u čoraz viac ľudí. Problém pri výskume vzniku týchto chorôb spočíva v ich komplexnej a zložitej patogenéze. Príznaky týchto chorôb a ich intenzita sú značne individuálne, čo predstavuje problém aj pri diagnostike a včasnom nastavení terapie. Niekoľko tímov vedcov sa začalo pohrávať s myšlienkou využitia ec DNA ako markeru chronického

zápalu. Dnes bežne používané markery, ako napríklad hladina C reaktívneho proteínu, sa zdajú byť v tomto prípade nedostatočné. Úloha ec DNA pri patogenéze zápalových črevných chorôb nie je dostatočne preskúmaná a opísaná. To však poukazuje na potrebu zaoberať sa touto témou do hĺbky.

## Zápalové črevné choroby

Zápalové črevné choroby (IBD) môžeme charakterizovať ako poruchy tráviaceho traktu so zložitou patogenézou [1]. Pre tieto choroby sú typické opakujúce sa stavy remisie a relapsu. Vo všeobecnosti sa delia na Crohnovu chorobu (CD) a ulceróznou kolitídu (UC), ktoré majú určité spoločné, ale aj odlišné vlastnosti. Pre CD je typické, že v prevažnej miere postihuje aj hrubé črevo a časti tenkého čreva. Pre UC je typický zápal mukózy a postihuje výlučne len hrubé črevo [2]. Patogenéza IBD je veľmi komplexná a na vzniku choroby sa podieľajú genetické, imunologické, mikrobiologické a environmentálne faktory [3]. Genetické a imunologické faktory spolu úzko súvisia, pretože predstavujú súbor génov a ich mutácie, ktoré výrazne ovplyvňujú reguláciu imunitnej odpovede a vznik autofágie, potrebnej na správnu homeostázu organizmu [4]. Z environmentálnych faktorov je najlepšie preskúmaný význam vitamínu D a fajčenia, ktoré pôsobi protichodne pri CD a UC [5,6].

Diagnostika zápalových črevných chorôb je pomerne zložitá, vzhľadom na to, že príznaky môžu byť veľmi individuálne. Medzi základné príznaky patrí hnačka, krvácanie z konečníka, bolesti brucha, strata hmotnosti a pod. Včasná diagnostika a následná terapia umožňuje jedincovi žiť plnohodnotným životom, no naopak neskorá diagnostika môže viesť k vážnym komplikáciám a následným operáciám [2,3].

## Extracelulárna DNA

DNA sa nachádza v jadre každej bunky organizmu. Milióny buniek sa v dospelom tele denne eliminuje prostredníctvom viacerých procesov bunkovej smrti, ktorými sú apoptóza a nekróza [7,10,11]. Bunkový materiál sa pri oboch typoch buniek dostáva do extracelulárneho priestoru. Pri apoptóze je tento materiál takmer bezprostredne zachytávaný fagocytujúcimi bunkami, ktoré tak eliminujú hlavne nukleové kyseliny. Najviac pravdepodobnou formou uvoľňovania takejto DNA, ktorá pretrváva v extracelulárnom priestore sa zdá byť nekróza, ktorá nie je prirodzenou bunkovou smrťou a nastáva výlučne pri patologických stavoch v organizme. Pri tejto forme bunkovej smrti zvyčajne nedochádza k zachytávaniu bunkového materiálu, a preto je veľmi pravdepodobné, že sa nukleové kyseliny pochádzajúce z jadra nevylúčia hneď po ich uvoľnení do extracelulárneho priestoru [8,9,10,11]. DNA, ktorá sa nachádza mimo bunky, nazývame preto extracelulárna DNA (ec DNA). Predmetom diskusie o pôvode ec DNA sa v súčasnosti stávajú hlavne tzv. „neutrophil extracellular traps“ (NETs). Sú to nukleoproteínové siete, ktoré zachytávajú patogény. Súčasťou týchto vlákien sú dlhé sekvencie DNA, ktoré sa pravdepodobne pri tomto procese môžu uvoľniť a byť prítomné mimo buniek. Ich prítomnosť sa potvrdila pri rôznych zápalových chorobách vrátane UC [12].

Objav extracelulárnych nukleových kyselín v cirkulujúcich telových tekutinách bol zaznamenaný Mandelom a Metaisom v roku 1948 [9]. Nanešťastie v tom období nebol o tému ec DNA veľký záujem. Neskôr bolo preukázané, že koncentrácia ec DNA bola zvýšená u pacientov s metastatickým ochorením a v niektorých prípadoch sa jej koncentrácia značne znížila po úspešnej proti nádorovej terapii [8,9,10,13].

## Úloha ec DNA v patogenéze zápalových črevných chorôb

Predchádzajúce štúdie ukázali, že zvýšené hladiny ec DNA sú veľmi citlivými indikátormi zlej prognózy aj pri iných stavoch, než je rakovina [13,14]. V roku 2014 japonskí vedci predstavili štúdiu, v ktorej vizualizovali a charakterizovali výskyt ec DNA a NETs pomocou metódy MPH (multifotónová mikroskopia) na myšacom modeli kolitídy. Kolitídu vyvolávali pomocou roztoku dextrán sulfátu sodného (DSS). Skúmali nielen koncentráciu ec DNA v krvi pri DSS indukovanej kolitíde u myší, ale aj u ľudských pacientov trpiacich UC. Vo svojej štúdií dokázali, že existuje pozitívna korelácia medzi koncentráciou extra celulárnej DNA a NETs pri DSS indukovanej kolitíde v porovnaní s kontrolnými skupinami. Zvýšená koncentrácia ec DNA bola spojená so závažnosťou choroby a mierou zápalu [14].

## Extracelulárna DNA a receptor TLR 9

V tráviacom trakte, ako aj v celom ľudskom tele, sú jednými z kľúčových regulátorov vrodeneho imunitného systému receptory, ktoré sa nazývajú toll like receptory (TLRs). V tráviacom trakte sú tieto receptory exprimované v rôznych bunkách črevného epitelu. Pre súvis ec DNA s IBD je dôležitý najmä TLR 9 receptor. TLR 9 je stimulovaný DNA sekvenciami pochádzajúcimi z patogénnych baktérií. Rovnako však aj samotná DNA z rôznych zdrojov, ako napríklad ec DNA, dokáže viazať tento receptor a stimulovať ho. Modifikácia štruktúry sekvencií DNA môže ovplyvniť ich imunomodulačnú kapacitu a preto ec DNA môže prispieť k patogenéze zápalových a reparačných stavov. Pri experimentálnych modeloch kolitídy sa ukázalo, že aktivácia určitých receptorov vrátane TLR 9, má protizápalové účinky. Systémové podanie ec DNA izolovanej od jedincov z kolitídou, môže znížiť jej klinickú závažnosť zmenou expresie prozápalových cytokínov a TLR 9 signalizácie [15].

## Záver

Význam ec DNA v molekulárnej diagnostike je dnes veľmi rozšíreným predmetom diskusie a výskumov v rôznych oblastiach. Jej význam sa v súčasnosti sleduje v oblasti prenatálnej diagnostiky a pri sledovaní priebehu vývoja rakoviny. Najnovšie štúdie sa však zaoberajú významom tejto DNA v patogenéze rôznych ďalších chorôb. Jednými z nich sú zápalové črevné choroby. Štúdiám k tejto téme sa dnes venuje niekoľko vedeckých tímov, ktorých výskumy potvrdili súvislosť koncentrácie ec DNA s vážnosťou zápalu. Výskumov k tejto téme je stále veľmi málo, preto by sa v budúcnosti malo pracovať na ďalších výskumoch v danej oblasti.

## Literatúra

1. COSNES, J., et al., Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2011. 140(6): p. 1785-94.
2. MOLODECKY, N. A. et al., Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 2012. 142(1): p. 46-54 e42; quiz e30.
3. ZHANG, Y.Z. and Y.Y. LI. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(1): p. 91-9.
4. OGURA, Y., et al., A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001. 411(6837): p. 603-6.
5. LESLIE, W. D. et al., Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Am J Gastroenterol*, 2008. 103(6): p. 1451-9.



6. COSNES, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2004. 18(3): p. 481-96.
7. FRANK, M. O. Circulating Cell-Free DNA Differentiates Severity of Inflammation. *Biol Res Nurs*, 2016. 18(5): p. 477-88.
8. GRAVINA, S., SEDIVY, J. M., VIJQ, J. The dark side of circulating nucleic acids. *Aging cell*, 2016.
9. LO, Y. M. D. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum : An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945: 1-7.
10. HIRSCH, T. et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 1997. 15(13): p. 1573-81.
11. MOCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*, 2013. 210(7): p. 1283-99.
12. BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004. 303(5663): p. 1532-5.
13. KOIKE, Y. et al. Dynamic pathology for circulating free DNA in a dextran sodium sulfate colitis mouse model. *Pediatr Surg Int*, 2014. 30(12): p. 1199-206.
14. JIANG, P. and Y. M. LO, The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet*, 2016. 32(6): p. 360-71.
15. MÚZES, G, KISS, A. L., TULASSA, Z., SIPOS, F. Cell-free DNA-induced alteration of autophagy response and TLR9-signaling: Their relation to amelioration of DSS-colitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Volume 52, June 2017, Pages 48-57

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



# Genetická transformácia baktérií s využitím studenej plazmy

Pavol Mišenko<sup>1</sup>

Roman Gardlík<sup>2</sup>

Zdenko Machala<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra jadrovej fyziky a biofyziky  
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava 4  
Slovensko  
pavolmisenko.95@gmail.com

<sup>2</sup>Ústav molekulárnej biomedicíny  
Lekárska fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava  
Slovensko  
romangardlik@gmail.com

<sup>3</sup>Katedra astronómie, fyziky Zeme a meteorológie  
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava 4  
Slovensko  
machala@fmph.uniba.sk

## Genetic transformation of bacteria using cold plasma

### Abstract

Bacterial transformation by incorporation of specific DNA plasmid is a commonly used technique. It found applications in many research fields, such as molecular biology, microbiology, and genetic engineering. One of the new potential methods for bacterial transformation is using non-equilibrium (cold) plasma. Exposure to non-equilibrium plasma produces electric field, charged particles and radicals, capable of creating reversible pores in cell membrane and by that allowing DNA transfer into the cell.

### Key words

Non-equilibrium plasma, electroporation, genetic transformation

## Úvod

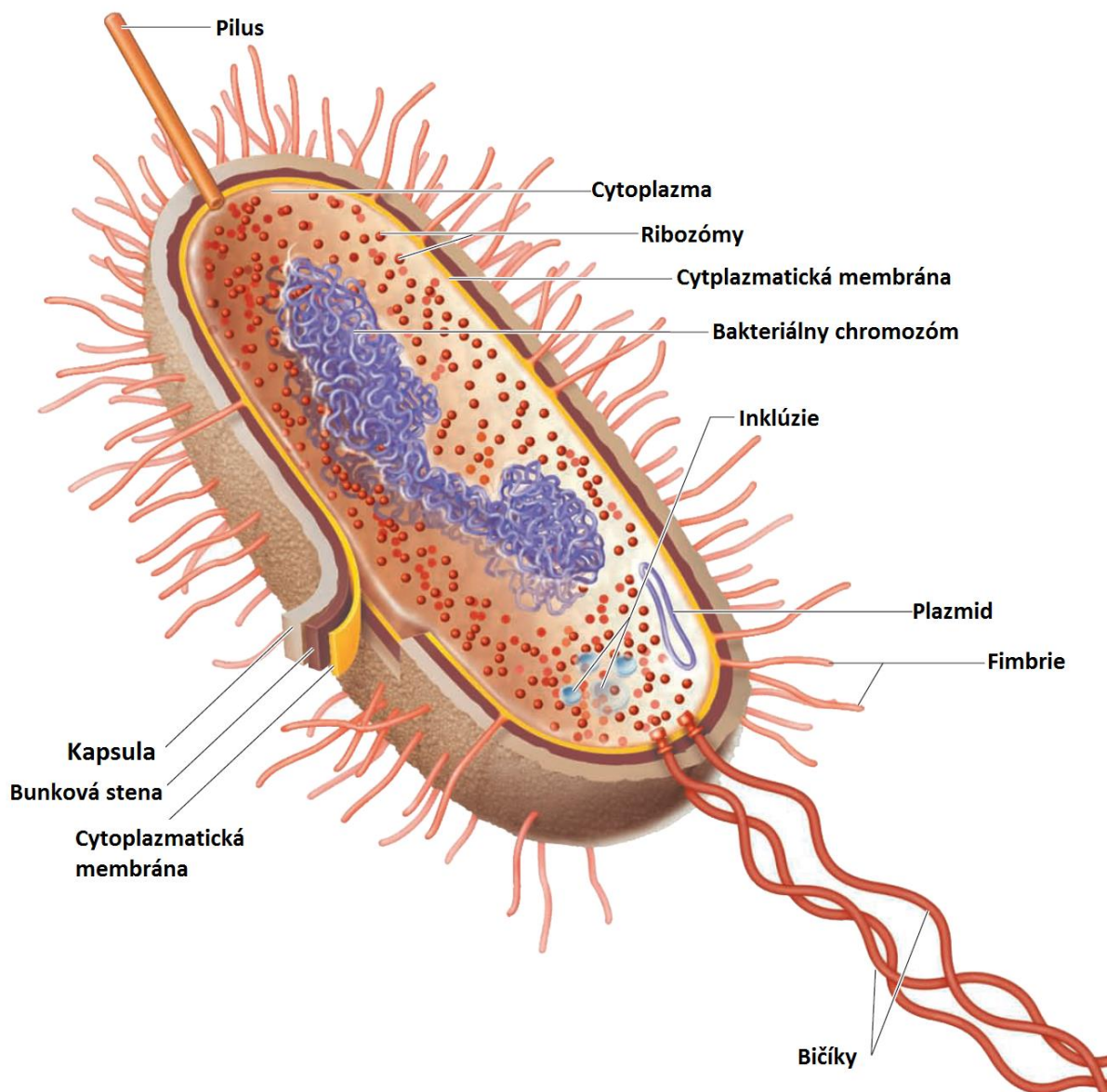
Genetická transformácia pomocou vpravovania krátkeho, špecifického úseku DNA (deoxyribonukleová kyselina), označovaného aj ako plazmid, do bunky je bežne používaná metóda v biologických laboratóriách, aplikovaná najmä na baktérie. Baktérie sú veľmi prispôsobivé organizmy so schopnosťou pohlcovať molekuly DNA, replikovať ich, a využiť ich na syntézu špecifických proteínov. Vďaka schopnosti baktérií rýchlo sa rozmnožovať a rásť, majú potenciál na produkciu veľkého množstva biologicky účinných látok, ako napríklad pri výrobe inzulínu, používaného na liečbu pacientov s diabetom I. typu. V súčasnosti sa na transformáciu používajú viaceré metódy, no medzi najpoužívanejšie patria elektroporácia a chemická transformácia pomocou tepelného šoku. Vzhľadom na vysokú technickú náročnosť alebo malú efektivitu má zmysel hľadať nové metódy trans-

formácie. Jednu z inovatívnych metód transformácie predstavuje použitie nerovnovážnej (nízkoteplotnej, studenej) plazmy. (Connolly et al., 2015; Sangwijit et al., 2015) Pri pôsobení nízkoteplotnej plazmy sa vytvára silné elektrické pole spolu s nabitými i neutrálnymi reaktívnymi časticami, ktoré môžu spôsobiť depolarizáciu membrán a následne vytvorenie pórov umožní vstup DNA do bakteriálnej bunky.

## Bakteriálna bunka

Baktérie, spoločne s vírusmi, hubami a protozoa sa zaraďujú k mikroorganizmom. Pokroky v medicíne a v metódach skúmania mikroorganizmov, najmä rýchlym rozvojom mikroskopie, ukázali, že bakteriálne bunky sa výrazne odlišujú od ostatných živých organizmov. Od eukaryotických buniek sa odlišujú hlavne veľkosťou, stavbou bunkových štruktúr, spôsobom delenia a usporiadaním DNA (Singleton, 2004). Všeobecnú schému stavby bakteriálnej bunky zobrazuje Obr. 1. Významný faktor ovplyvňujúci úspešnosť genetickej transformácie baktérií a zohľadňujúci sa pri výbere transformačnej metódy je štruktúra bakteriálnej steny. Vo väčšine baktérií slúži bunková stena na ochranu pred mechanickým a chemickým poškodením a osmotickou lýzou bunky, pričom kompenzuje vysoký pretlak vo vnútri bunky (Bednář et al., 1999; Singleton, 2004). Plní tiež funkciu „molekulového sita“ – to znamená, že určuje priepustnosť pre jednotlivé látky. Z tohto hľadiska hrá bunková stena kľúčovú úlohu pri prechode DNA do baktérie. (Votava, 2003).

Obr. 1: Všeobecná stavba bakteriálnej bunky (Tortora & Funke, 2013)



Veľkou výhodou niektorých baktérií v ich prežívaní je aj pomerne rýchle rozmnožovanie sa. Bakteriálny druh *Escherichia coli* má, za vhodných podmienok, generačný čas (čas za ktorý sa počet buniek dvojnásobne zvýši) približne 20 minút, čo umožňuje veľmi rýchlu kultiváciu. To robí z týchto baktérií vhodných kandidátov na syntézu biologicky aktívnych látok vo veľkých množstvách. Všetky informácie dôležité pre život a chod každého organizmu sú uložené v DNA. Bakteriálna DNA je tvorená obvykle jednou dlhou molekulou DNA, poskladanou vo vnútri bunky (Obr. 1.). Takto poskladaná zaberá v bunke asi 10 % jej celkového objemu (Bednář et al., 1999; Singleton, 2004; Tortora & Funke, 2013). V rámci DNA sa vyčleňujú rôzne dlhé informačné miesta nazývajúce sa gény. Každý gén kóduje jeden špecifický proteín, pričom baktérie sú schopné čítať tieto miesta a následne syntetizovať príslušné proteíny.

## Genetická transformácia pomocou plazmidu

Plazmid je samostatne sa deliaca, krátka, do kruhu uzavretá molekula DNA, ktorá neobsahuje žiadne gény ovplyvňujúce rast alebo prežitie bunky a preto slúži ako dobrý vektor na prenos genetickej informácie. Použitím špecifických enzýmov, štiepiacich molekulu DNA na konkrétnom mieste, je možné do plazmidu vložiť fragmenty DNA, kódujúce širokú paletu proteínov a iných biologicky aktívnych látok. Pripravený plazmid je potom transportovaný do bakteriálnej bunky pomocou rôznych metód.

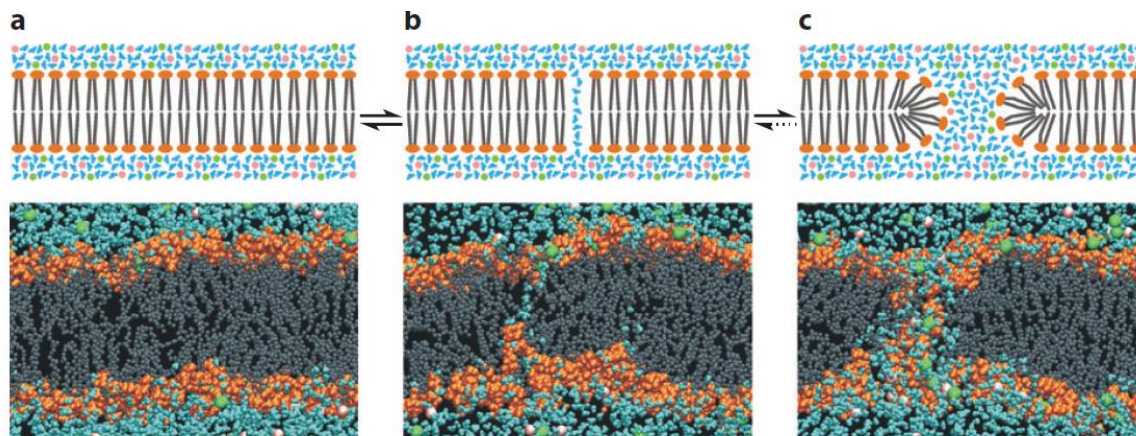
Elektroporácia indukuje zväčšenie membránovej permeability vplyvom aplikovania vonkajšieho elektrického poľa. Medicínske aplikácie elektroporácie ako prvý študoval vo svojej práci Neumann (Neumann et al., 1982).



Súčasný model elektroporácie predpokladá formáciu vodných pórov, ktorá je iniciovaná prerážaním bunkovej membrány molekulami vody. To má za následok reorganizáciu membránových molekúl a vznik vodného póru (Obr. 2) (Yarmush et al., 2014). Cez vniknuté póry do-

chádza k prestupu zápornej DNA do bunky v smere od zápornej elektródy (Golzio et al., 2002). Intenzita elektrického poľa musí byť dostatočná na to aby došlo k vzniku pórov a zároveň nenastali nevratné zmeny v bunkovej štruktúre.

Obr. 2: **Tvorba pórov v bunkovej membráne. Schematické znázornenie v porovnaní so simuláciou** (Yarmush et al., 2014). a) neporušená membrána; b) molekuly vody prerážajú do membrány; c) v membráne vzniká vodný pór



Transformácia tepelným šokom našla využitie v mnohých odvetviach výskumu hlavne pre svoje jednoduché experimentálne prevedenie. Táto metóda zahŕňa 2 dôležité kroky, ktorými sú naviazanie sa plazmidovej DNA na bunkový povrch  $\text{Ca}^{2+}$  a následný prestup DNA do vnútra bunky (Sarkar et al., 2002). Jednou z možností ako zabezpečiť čiastočné naviazanie molekuly DNA na bakteriálny povrch, je pomocou chloridu vápenatého. DNA sa pripojí na kladne nabitý ión chloridu vápenatého, ktorý sa naviaže na záporne nabité molekuly v membráne bunky (Micklos & Freyer, 1990; Sarkar et al., 2002). Takto naviazaný plazmid je schopný prestúpiť do vnútra bunky napríklad pôsobením krátkého tepelného šoku.

## Studená plazma

Štvrté skupenstvo hmoty, plazma, je ionizovaný plyn tvorený z neutrálnych a nabitých (kladných a záporných) častíc, ktoré na seba pôsobia vzájomnými elektrostatickými silami. S plazmou sa môžeme stretnúť v rôznych formách, ako napríklad vo forme blesku, polárnej žiary, plazmových výbojok ako žiariviek, no plazma tvorí aj hviezdy, a slnečný vietor. Rôzne formy plazmy sú odrazom odlišností vo vlastnostiach, ktorými sú teplota, stupeň ionizácie a vodivosť plazmy (Martišovič, 2004). Nízkoteplotná (studená) plazma sa využíva v mnohých aplikáciách vďaka tomu, že v nej teplota plynu môže byť veľmi nízka, dokonca na úrovni izbovej teploty, pričom teplota elektrónov je vysoká, a tak je zabezpečené silne reaktívne prostredie

Nízkoteplotná plazma generovaná za atmosférického tlaku generuje zmes reaktívnych molekúl, radikálov,

nabitých častíc, elektrické pole a často aj UV žiarenie. Výskum interakcií studenej plazmy s bunkami i živými organizmami sa prudko rozvíja najmä v posledných cca 15 rokoch a zahŕňa oblasti dezinfekcie a sterilizácie v medicíne, ako aj nových plazmových terapií v zubnom lekárstve, dermatológii, onkológii, alebo v bioinžinierstve (Laroussi et al., 2013; Fridman & Friedman, 2013; Machala et al., 2012). Hlavnú úlohu pri interakcii s bunkou v týchto aplikáciách zohrávajú najmä reaktívne molekuly, radikály a nabité častice (Dobrynin et al., 2008; Fridman & Friedman, 2013; Sysolyatina et al., 2014; Machala et al., 2010).

## Genetická transformácia pomocou studenej plazmy

Vplyv nabitých častíc na rôzne štruktúry bunky sa môže výrazne líšiť v závislosti od ich senzitivity voči týmto agentom. Pôsobením nabitých častíc a elektrického poľa na bunkové membrány môže dochádzať k vzniku pórov v membránach buniek, rovnako ako pri elektroporácii (Obr. 2). Veľkosť a počet týchto pórov závisí od intenzity a trvania pôsobenia elektrického poľa ale aj od vlastností a stavby bunkovej membrány a bunkových štruktúr. Na tvorbe pórov sa nabité častice podieľajú tým, že nasadajú na povrch membrány a vytvárajú lokálne silné elektrické pole. Vytvorené póry s malým polomerom sa uzatvárajú veľmi rýchlo, približne po 250 ns. Väčšie póry pretrvávajú v membránach niekoľko sekúnd až minút. Predpokladá sa, že práve vznikom týchto pórov je umožnený vstup molekúl DNA do bunky (Ji et al., 2006; Sysolyatina et al., 2014). Alternatívnym vysvetlením efektu plazmovej transformácie je pôsobe-

nie nabitých častíc na špecifické molekuly v membráne a umožnenie prechodu DNA do bunky (mechanizmus podobný ako pri transformácii tepelným šokom). Dôležitú podpornú úlohu v procese transformácie môžu hrať aj neutrálne radikály. Presný mechanizmus plazmovej transformácie však zatiaľ nie je úplne objasnený a je predmetom ďalšieho skúmania, pretože transformácia studenou plazmou je perspektívne účinnejšia alebo ľahšie aplikovateľná ako doterajšie metódy.

## Záver

Nízкотеплотná plazma naberá v posledných rokoch výrazne na popularite pre svoje široké spektrum aplikácií v medicíne. Transformácia baktérií vpravovaním špecifického plazmidu DNA do bakteriálnych buniek sa štandardne robí pomocou tepelného šoku alebo reverzibilnej elektroporácie, čiže využitím silných elektrických pulzov. Nízкотеплотná plazma pôsobí na baktérie oxidačným stresom, zo vznikajúcich reaktívnych častíc s posilným efektom elektrického poľa a generovaného žiarenia. Studená plazma sa efektívne používa na inaktiváciu baktérií, čo sa využíva napr. pri sterilizácii medicínskych nástrojov alebo priam pri liečení rán, kožných chorôb a v zubnom lekárstve. Studená plazma však môže v budúcnosti nájsť uplatnenie aj v genetickej transformácii, ako alternatíva k doteraz používaným metódam.

## Literatúra

BEDNÁŘ, M.; FRAŇKOVÁ, V.; SCHINDLER, J.; VÁRA, J.; & SOUČEK, A.; *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha. Marvil, s.r.o. 1999

CONNOLLY, R. J.; HOFF, A. M.; GILBERT, R.; & JAROSZESKI, M. J.; Optimization of a plasma facilitated DNA delivery method. In: *Bioelectrochemistry*, 103, 2015, pp.15-21.

DOBRYNIN, D.; FRIEDMAN, G.; FRIDMAN, A.; & STARIKOVSKIY, A.; Inactivation of bacteria using dc corona discharge: role of ions and humidity.; In: *New Journal of Physics*, 5, 144 , 2008, pp.724-732.

FRIDMAN, A.; & FRIEDMAN, G. *Plasma Medicine*. Philadelphia. John Wiley & Sons Ltd., 2013. ISBN: 978-0-470-68969-1

GOLZIO, M.; TEISSIE, J.; & ROLS, M. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 3, 2002, pp. 1292-1297.

JI, Z.; KENNEDY, S. M.; BOOSKE, J. H.; & HAGNESS, S. C. Experimental Studies of Persistent Poration Dynamics of Cell Membranes Induced by Electric Pulses. In: *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*, 34, 4, 2006, pp. 1416-1424.

LAROUSSE, M.; et al. (eds.). *Plasma medicine: applications of low-temperature gas plasmas in medicine and biology / edited by Cambridge* : Cambridge, Cambridge University Press. 2012. ISBN: 978-1107006430

MACHALA, Z.; HENSEL, K.; AKISHEV, Y. (eds.). *Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security*. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology, Springer, 2012, ISBN: 978-94-007-2852-3

MACHALA, Z.; CHLÁDEKOVÁ, L.; PELACH, M. *Plasma agents in bio-decontamination by dc discharges in atmospheric air*, In: *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 43 ,2010, 222001(7pp)

MARTIŠOVITŠ, V. *Základy fyziky plazmy*. Bratislava: Univerzita Komenského. 2004

MICKLOS, D. A., & FREYER, G. A. *DNA science: a first course in recombinant DNA technology*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1990

NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y.; & HOFSCHEIDER, P. H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. In: *The EMBO Journal*, 1, 7, 1982, pp. 841-845.

SANGWIJIT, K.; YU, L. D.; SARAPIROM, S.; PITAKRATTANANUKOOL, S.; & ANUNTALABHOCHAI, S. Low-energy plasma immersion ion implantation to induce DNA transfer into bacterial *E. coli*. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 365, 2015, pp. 389-393.

SARKAR, S.; CHAUDHURI, S.; & BASU, T. Mechanism of artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA - Clues from the influence of ethanol. In: *Current Science*, 83, 11, 2002 pp. 1376-1380.

SINGLETON, P. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine (6th ed.)*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd., 2004, ISBN: 978-0-470-09027-5

SYSOLYATINA, E.; MUKHACHEV, A.; YUROVA, M.; GRUSHIN, M.; KARALNIK, V.; Petryakov, A.; AKISHEV, Y. Role of the charged particles in bacteria inactivation by plasma of a positive and negative corona in ambient air. In: *Plasma Processes and Polymers*, 11, 4, 2014, pp. 315-334.

TORTORA, G., & FUNKE, B. *Microbiology : an Introduction*, Pearson, 2013, ISBN: 978-0-321-73360-3

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Praha. NEPTUN. 2003

YATMUSH, M. L.; GOLBERG, A.; SERŠA, G.; KOTNIK, T.; & MIKLAVČIČ, D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. In: *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16, 2014, pp. 295-320.

## Podakovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



# Úloha extracelulárnej DNA v patogenéze sepsy

Marianna Hladová<sup>1</sup>

Lubomíra Tóthová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra molekulárnej biológie  
Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6  
84215 Bratislava  
Slovensko  
mariana.hladova@gmail.com

<sup>2</sup>Ústav molekulárnej biomedicíny  
Lekárska fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava  
Slovensko  
tothova.lubomira@gmail.com

## The role of extracellular DNA in the pathogenesis of sepsis

### Abstract

The definition of sepsis has been changing for decades, because new knowledge about the pathogenesis of sepsis was gathered. Nowadays the sepsis is defined as a dysregulated immune response to system infection. The main cause of sepsis are microorganisms, so the antibiotics are the essential treatment for this disease. The mortality on sepsis is still very high because in many cases the treatment did not start soon enough and the microbial resistance on available antibiotics is widespread. Sepsis is a very complex disease accompanied by system inflammatory response syndrome, immunosuppression, changes in coagulation and organ damage. Because of its complexity, the effective treatment and also biomarkers for prognosis are still missing.

Extracellular DNA has been discovered in 1940s, got more attention in 1990s and these days the extracellular DNA is connected to a lot of diseases and also the pathogenesis of sepsis. Increased concentration of extracellular DNA have been discovered during sepsis and its connection to immune responses. Extracellular DNA is also released from the neutrophil extracellular traps – the defence mechanism of neutrophils. It also stimulates a production of inflammatory mediators, mostly cytokines. Extracellular DNA represents a link between immunity and coagulation during the sepsis. However, the complete mechanism of its activity is still not clear. Whether increased concentration of extracellular DNA is the cause or the consequence of sepsis is still not known. The role of extracellular DNA as a potential biomarker is studied widely, as well as its potential role as a new therapeutic target in sepsis.

The aim of this bachelor thesis is to summarize the available literature regarding the role of extracellular DNA in the pathogenesis of sepsis. Moreover, to reveal the potential role of extracellular DNA in animal model of sepsis.

### Key words

NETosis, cell-free DNA, lipopolysaccharide, nucleosomes, immunity

## Úvod

Sepsa patrí k vážnym medicínskym problémom, na čo poukazuje aj fakt, že na ňu zomiera celosvetovo ročne približne 5,3 miliónov ľudí populácii (Fleischmann et al. 2016). V Slovenskej republike sa vyskytuje ročne priemerne 1770 prípadov ťažkej sepsy u pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti. Mortalita zapríčinená sepsou je u nás veľmi vysoká a to

51,2 % (Zahorec, Firment et al. 2005). Prvá definícia sepsy sa objavila už 1000 rokov pred Kristom. Definoval ju Avicenna ako hnilobné procesy v krvi a tkanivách sprevádzané horúčkou (Majno 1991). Z historického hľadiska sa sepsa definovala veľmi ťažko na základe klinických príznakov. S pokrokom v medicíne a diagnostike sa definície sepsy postupne menili. V súčasnosti je sepsa definovaná ako „život ohrozujúca orgánová dysfunkcia spôsobená dysreguláciou hostiteľskej odpovede na infekciu“ (Singer, Deutschman et al. 2016). Ťažká sepsa je definovaná ako sepsa sprevádzaná zlyhaním orgánov a hypoperfúziou tkanív. Septický šok je štádiom sepsy, pri ktorom dochádza k obzvlášť závažným abnormalitám na cirkulačnej, bunkovej a metabolickej úrovni a je spojený s vyšším rizikom mortality ako iba samotná sepsa (Singer, Deutschman et al. 2016).

Keďže je sepsa veľmi závažné ochorenie, je potrebné poznať jej klinické príznaky, vedieť ju diagnostikovať v skorom štádiu a snažiť sa predísť jej rozvoju v septický šok. Veľmi zaujímavým fenoménom je tiež extracelulárna DNA (ecDNA), ktorá môže mať veľmi široké uplatnenie v medicíne. Objav extracelulárnej DNA bol kľúčovým míľnikom na ceste k liečbe mnohých ochorení a pochopeniu ich patofyziológie. V súčasnosti sa študuje aj význam extracelulárnej DNA v patogenéze sepsy a jej možné uplatnenie ako biomarkera prognózy sepsy a tiež terapeutického cieľa.

## Extracelulárne DNA ako potenciálny nový biomarker sepsy

*K novoobjaveným biomarkerom pri sepse môže patriť aj stanovenie koncentrácie ecDNA (Dwivedi, Tottl et al. 2012). Veľkosť ecDNA u pacientov so septickým šokom je 150 – 300 básových párov. U zdravých jedincov sa pohybuje množstvo ecDNA v rozmedzí 0,93 ± 0,76 ng/μl, čo je podobná hodnota ako u pacientov po preko-*



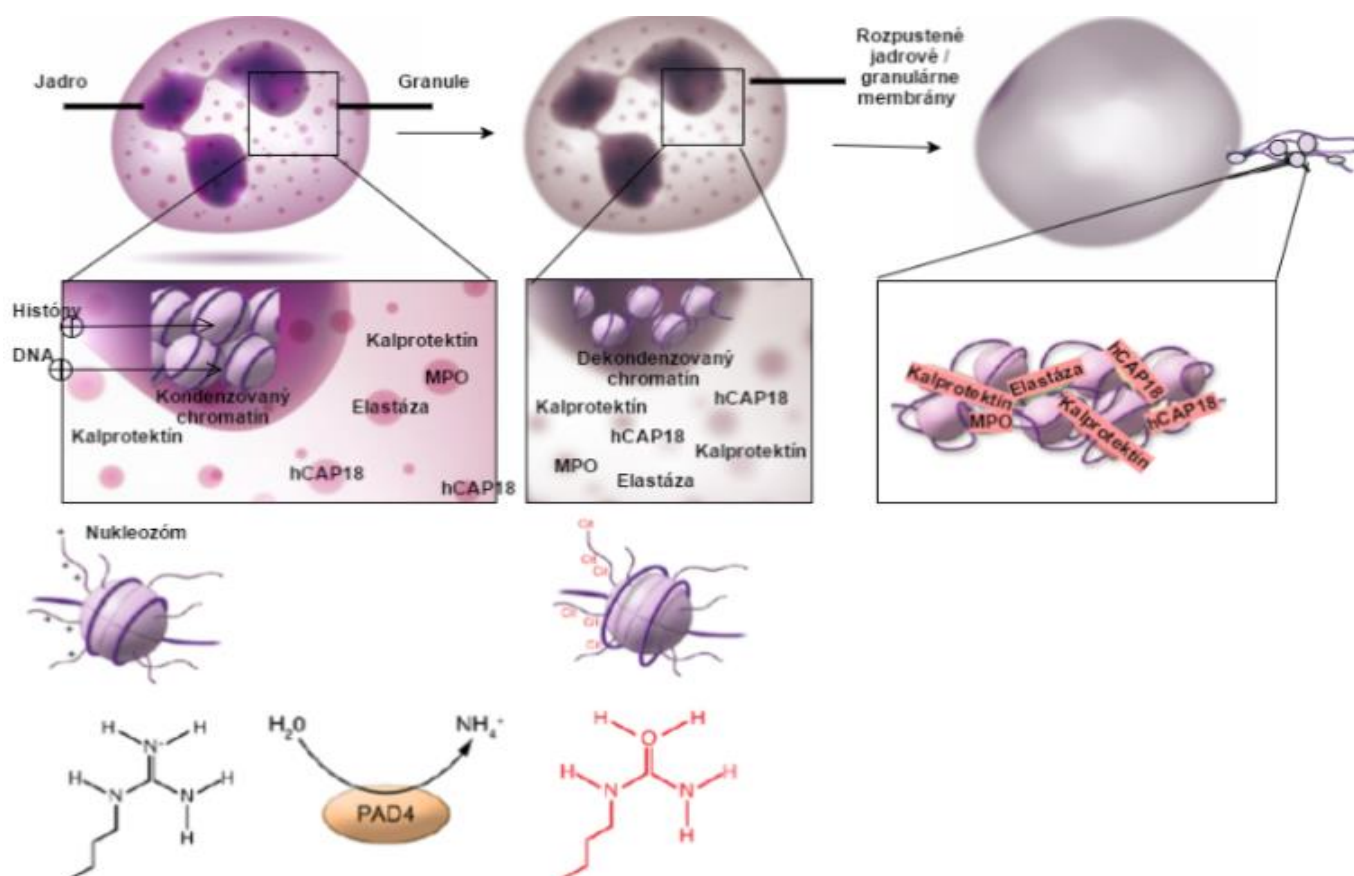
naní sepsy  $1,16 \pm 0,13$  ng/ $\mu$ l. Na druhej strane u pacientov, ktorí neprežili boli hodnoty ecDNA  $4,65 \pm 0,48$  ng/ $\mu$ l, teda preukázateľne vyššie (Dwivedi, Tolft et al. 2012). U pacientov so septickým šokom je množstvo ecDNA v plazme signifikantne vyššie v priebehu 24 a 48 hod po prijatí na jednotku intenzívnej starostlivosti oproti zdravým kontrolám. Tento fakt poukazuje na využitie ecDNA v plazme ako spoľahlivého biomarkera s vysokou citlivosťou a špecifitou. Vysoké koncentrácie ecDNA sú zároveň aj prediktory rozvoja septického šoku a mortality a pomáhajú pri včasnej diagnostike, ktorá zvyšuje šance na prežitie. Sekvenčné analýzy tiež ukázali, že ecDNA u pacientov so sepsou pochádza od hostiteľa a nie je mikrobiálneho pôvodu (Huttunen, Kuparinen et al. 2011).

## Extracelulárna DNA a jej úloha v sepe

Nukleové kyseliny sa považujú za kód života, vďaka ich schopnosti uchovávať genetickú informáciu v bunkovom jadre. V bunke sa okrem jadra nachádzajú aj v mitochondriách. Nie všetky nukleové kyseliny sa však nachádzajú len v bunke. V posledných rokoch sú nukleové kyseliny nachádzajúce sa mimo bunky predmetom skúmania mnohých vedcov. Tieto nukleové kyseliny

označujeme ako cirkulujúce, mimobunkové alebo extracelulárne nukleové kyseliny (Fleischhacker and Schmidt 2007). Prvý dôkaz o ich existencii vo vzorkách ľudskej plazmy poskytli Mandel a Metais v roku 1948 (Mandel and Metais 1948). EcDNA nachádzajúca sa mimo bunky môže cirkulovať v plazme, sére alebo lymfatickej tekutine. Môžeme ju však nájsť aj v mozgovo-miechovom moku, tekutine z brušnej dutiny, materskom mlieku, tekutine z bronchiálneho výplachu, moči, stolici, slinách, žlči, spinálnej a amniovej tekutine (Fleischhacker and Schmidt 2007). Začiatkom dvadsiateho storočia vedci začali dávať do súvislosti prítomnosť ecDNA v telových tekutinách s rôznymi ochoreniami. Jedným z prvých takto skúmaných ochorení bol systémový lupus erythematosus (SLE). Pri skúmaní rozpustných tkanivových antigénov v krvnom obehú pacientov so SLE boli objavené v sére pacientov aj protilátky voči DNA. Predpokladalo sa, že pôvod tejto DNA bol endogénny, keďže bola objavená aj pri ďalších ochoreniach spojených s deštrukciou tkanív ako hepatitída a metastatické karcinómy (Tan, Schur et al. 1966). Dnes už je známe, že ecDNA je uvoľňovaná z apoptických a nekrotických buniek a v komplexoch s protilátkami voči DNA sa podieľa na vzniku/patogenéze SLE (Su and Pisetsky 2009).

Obr. 1: **Formovanie NETov**





Apoptóza, programovaná bunková smrť je bežným javom aj pri sepe. K apoptóze dochádza v rôznych tkanivách a orgánoch v dôsledku prítomnosti veľkého množstva zápalových mediátorov (Dwivedi, Toltl et al. 2012); (Zeerleder, Zwart et al. 2003). Okrem apoptózy ecDNA vzniká aj v ďalšom type bunkovej smrti, ktorým je nekroza, potom v procese fagocytózy, aktívnej sekrécie a v špeciálnom type bunkovej smrti neutrofilov, netóze (Thierry, El Messaoudi et al. 2016). Neutrofilý sú súčasťou prvej obrannej línie proti baktériám, hubám a protozoám. Vykonávajú adhéziu na vaskulárny endotel a migrujú na miesta zápalových ložísk. Eliminujú tiež cudzorodé mikroorganizmy prostredníctvom fagocytózy, uvoľňujú reaktívne metabolity kyslíka a mikrobicídne substancie. Ich granuly obsahujú antimikrobiálne proteíny, proteázy, komponenty respiračného vzplanutia a tiež veľa membránových receptorov (Faurichou and Borregaard 2003). Okrem pohlcovania mikroorganizmov a sekrécie antimikrobiálnych látok uvoľňujú aj extracelulárne pasce neutrofilov (NETy). Tieto pasce vznikajú v procese netózy, uvoľnením jadrového materiálu neutrofilov do extracelulárneho priestoru. DNA je základnou zložkou týchto krehkých štruktúr, pretože po aplikácii DNázy dochádza k ich degradácii, na druhej strane po aplikácii proteináz sa javia stále ako stabilné. Avšak ecDNA môže mať škodlivý efekt na hostiteľský organizmus, tým, že podnecuje tvorbu cytokínov a spúšťa nadmerné zrážanie krvi (Swystun, Mukherjee, and Liaw 2011).

## Chlorochín a DNáza – nová možnosť liečby sepsy?

Chlorochín patrí medzi 4-aminochinolínové liečivá, dlho používané v liečbe a prevencii malárie. Je tiež veľmi rozšírený ako inhibítor autofágie a užitočný doplnok pri terapii rakoviny. Autofágia je proces, pri ktorom cytoplazmatický materiál (organely a proteíny) sú transportované do lyzozómov a degradované. Autofágia je dôležitá pri zápalových procesoch a imunitnej odpovedi. Nie je dostatočne preskúmané a známe, či pri sepe je tento proces zrýchlený alebo blokovaný. Tak isto, či je prínosný alebo škodlivý pre imunitné mechanizmy v priebehu sepsy. Chlorochín zvyšuje lyzozomálne a autofagozomálne pH a inhibuje lyzozóm-autofagozomálnu fúziu. Keďže chlorochín inhibuje autofágiu, bol použitý v animálnom modeli sepsy (Takahashi, Watanabe et al. 2013). V tomto modeli inhibíciou autofágie urýchlil proces poškodenia pečene a zvýšil mortalitu zvierat. Je pravdepodobné, že indukcia autofágie má preventívnu úlohu pri komplikáciách spojených so sepsou. Vynára sa však ešte množstvo otázok. Chlorochín nie je špecifický inhibítor autofágie, blokuje vznik autofagozómu a nepôsobí špecificky v pečeni. Napriek tomu blokovanie

autofágie v hepatocytoch pôsobilo preventívne proti poškodeniu pečene v priebehu sepsy (Takahashi, Watanabe et al. 2013).

V posledných desaťročiach sa objavilo množstvo liečiv so sľubným terapeutickým účinkom pri sepe. Tieto liečivá však neprešli fázou II a fázou III klinických testov (Marshall 2014). Účinok týchto liečiv bol založený na utlmení zápalového procesu a koagulačných mechanizmov. V klinických testoch však nepreukázali zníženie mortality. V posledných rokoch bola objavená ecDNA, ktorá spája imunitné reakcie s koagulačnými. Potvrdilo sa, že NETy sú hlavným zdrojom tejto DNA pri sepe (Gould, Vu et al. 2014). NETy sú negatívne regulované pomocou deoxyribonukleázy I (DNáza I) (Meng, Paunel-Gorgulu et al. 2012). Táto endonukleáza závislá od vápnika a horčíka hydrolyzuje dvojzávitnicu DNA a tiež degraduje chromatin uvoľňovaný pri nekroze na prevenciu anti-DNA autoimunitných reakcií (Brinkmann, Reichard et al. 2004). Rekombinantná ľudská DNáza I (rhDNáza) sa používa na liečbu rôznych ochorení asociovaných so zvýšeným množstvom ecDNA ako cystická fibróza a pleurálne infekcie (Jones and Wallis 2010).

## Záver

Sepsa patrí k život ohrozujúcim ochoreniam s vysokou mierou mortality. Je to veľmi komplexné ochorenie, do ktorého patofyziológie je zapojené veľké množstvo mediátorov. Toto ochorenie má veľmi rýchly priebeh od objavenia sa prvých príznakov až po vznik septického šoku, preto sú potrebné spoľahlivé biomarkery na včasnú diagnostiku. V súčasnosti neexistuje žiadny diagnostický test na presné potvrdenie diagnózy sepsy alebo septického šoku. Ako jeden z biomarkerov by mohla v budúcnosti slúžiť aj ecDNA. EcDNA, ktorá je súčasťou extracelulárnych pascí neutrofilov je priamo zapojená do patogenézy sepsy. V súčasnosti medzi skúmané liečivá, ktoré by mohli prispieť k lepšej prognóze tohto ochorenia patrí chlorochín a DNáza. Chlorochín funguje na princípe blokovania autofágie, zatiaľ čo DNáza priamo hydrolyzuje dvojzávitnicu DNA. Úloha ecDNA v patogenéze sepsy však ešte nie je úplne objasnená, a preto sú potrebné ďalšie štúdie v oblasti využitia ecDNA ako biomarkera alebo terapeutického cieľa pri sepe.

## Literatúra

BRINKMANN, V., U. REICHARD, C. GOOSMANN, B. FAULER, Y. UHLEMANN, D. S. WEISS, Y. WEINRAUCH and A. ZYCHLINSKY (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663): 1532-1535.  
DWIVEDI, D. J., L. J. TOLTL, L. L. SWYSTUN, J. POGUE, K. L. LIAW, J. I. WEITZ, D. J. COOK, A. E. FOX-ROBICHAUD and P. C. LIAW (2012). Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care* 16(4): R151.

- FAURSCHOU, M. and N. BORREGAARD (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5(14): 1317-1327.
- FLEISCHHACKER, M. and B. SCHMIDT (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775(1): 181-232.
- GOULD, T. J., T. T. VU, L. L. SWYSTUN, D. J. DWIVEDI, S. H. MAI, J. I. WEITZ and P. C. LIAW (2014). Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(9): 1977-1984.
- HUTTUNEN, R., T. KUPARINEN, J. JYLHAVA, J. AITTONIEMI, R. VUENTO, H. HUHTALA, J. LAINE, J. SYRJANEN and M. HURME (2011). Fatal outcome in bacteremia is characterized by high plasma cell free DNA concentration and apoptotic DNA fragmentation: a prospective cohort study. *PLoS One* 6(7): e21700.
- JONES, A. P. and C. WALLIS (2010). Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*(3): Cd001127.
- MAJNO, G. (1991). The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis* 163(5): 937-945.
- MANDEL, P. and P. METAIS (1948). *C R Seances Soc Biol Fil* 142(3-4): 241-243.
- MARSHALL, J. C. (2014). Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends in Molecular Medicine* 20(4): 195-203.
- MENG, W., A. PAUNEL-GORGULU, S. FLOHE, I. WITTE, M. SCHADEL-HOPFNER, J. WINDOLF and T. T. LOGTERS (2012). Deoxyribonuclease is a potential counter regulator of aberrant neutrophil extracellular traps formation after major trauma. *Mediators Inflamm* 2012: 149560.
- SINGER, M., C. S. DEUTSCHMAN, C. SEYMOUR et al. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 315(8): 801-810.
- SU, K. Y. and D. S. PISETSKY (2009). The role of extracellular DNA in autoimmunity in SLE. *Scand J Immunol* 70(3): 175-183.
- TAKAHASHI, W., E. WATANABE, L. FUJIMURA, H. WATANABE-TAKANO, H. YOSHIDOME, P. E. SWANSON, T. TOKUHISA, S. ODA and M. HATANO (2013). Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care* 17(4): R160.
- TAN, E. M., P. H. SCHUR, R. I. CARR and H. G. KUNKEL (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation* 45(11): 1732-1740.
- THIERRY, A. R., S. EL MESSAOUDI, P. B. GAHAN, P. ANKER and M. STROUN (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 35(3): 347-376.
- ZAHOREC, R., J. FIRMENT, J. STRAKOVA, J. MIKULA, P. MALIK, I. NOVAK, J. ZEMAN and P. CHLEBO (2005). Epidemiology of severe sepsis in intensive care units in the Slovak Republic. *Infection* 33(3): 122-128.
- ZEERLEDER, S., B. ZWART, W. A. WUILLEMIN, L. A. AARDEN, A. B. GROENEVELD, C. CALIEZI, A. E. VAN NIEUWENHUIJZE, G. J. VAN MIERLO, A. J. EERENBERG, B. LAMMLE and C. E. HACK (2003). Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med* 31(7): 1947-1951.

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



# Pteríny ako markery nádorových ochorení

Katarína Kolníková<sup>1</sup>Milan Zvarik<sup>2</sup>Libuša Šikurová<sup>3</sup><sup>1,2,3</sup>Fakulta matematiky, fyziky a informatiky

Univerzita Komenského v Bratislave

Mlynská dolina, 842 48 Bratislava

Slovensko

<sup>1</sup>kolnikova.katarina@gmail.com,<sup>2</sup>zvarikmilan@gmail.com,<sup>3</sup>sikuroval@gmail.com

## Pterins as markers of tumor diseases

### Abstract

Early diagnostics of oncology disease is an important aspect for initiating accurate therapy and, of course, for increasing chance for recovery. Biomarkers obtained from body fluids seem to be an effective diagnostic instruments which may provide useful information on the cancer type and the disease's stage of progression. Finding the new potential cancer biomarkers such as pterines is currently the biggest challenge for clinical and cancer research. This contribution describes the functional employment of pterins as biomarkers in cancer diagnosis.

### Key words

Pterins, tumor, biomarkers, cancer

## Úvod

Onkologické ochorenia sú celosvetovým problémom, na ktoré v posledných rokoch trpí čoraz viac ľudí. Prognóza býva väčšinou nepriaznivá a majorita pacientov sa z tejto choroby nevylieči. Stanovenie správnej diagnózy so sebou prináša viaceré komplikované vyšetrenia. Okrem toho je rakovina často odhalená až v pokročilom štádiu, kedy sú dostupné liečebné postupy žiaľ nedostačujúce na vyliečenie. Preto je snaha lekárov a vedeckých pracovníkov nájsť takú diagnostickú metódu, ktorá stanoví onkologické ochorenie ešte v jeho ranom štádiu, kedy sú šance na vyliečenie relatívne vysoké.

V súčasnosti sa diagnostika opiera hlavne o zobrazovacie techniky ako je výpočtová tomografia röntgenového žiarenia (CT), magnetická rezonancia (MRI), či pozitronová emisná tomografia (PET), ale aj o inštrumentálne a mikroskopické metódy akými sú endoskopia či biopsia. Práve biopsia – odobratie podozrivého tkaniva a jeho následné pozorovanie mikroskopom – sa považuje za jednu z najpresnejších diagnostických metód. Táto metóda je však finančne a časovo náročná, pre pacienta invazívna a poskytuje informácie iba o danom výreze tkaniva.

Potenciálnou diagnostickou metódou sa ukazuje byť stanovovanie biomarkerov z telesných tekutín ako je krv alebo moč. Pteríny, ako potenciálne biomarkery, sa v

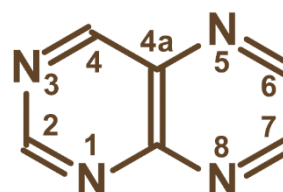
súčasnosti intenzívne skúmajú, pretože doterajšie výskumy ukázali ich dôležitosť pri diagnostike onkologického ochorenia.

## Pteridíny a pteríny

Pteridíny sú heterocyklické zlúčeniny, ktoré slúžia ako kofaktory rôznych enzymatických reakcií (Obr. 1). Podľa základnej stavby benzénového kruhu sa pteridíny delia na dve skupiny – pteríny a lumazíny. Pteríny majú amínovú skupinu na druhom mieste a kyslíkovú skupinu na štvrtom mieste benzénového kruhu. Druhá skupina, lumazíny, sa vyznačuje 2,4-dioxo štruktúrou (Blau et al., 2008).

Pteríny sú vysokopolárne, fotosenzitívne zlúčeniny, ktoré sa svetlom rozkladajú na rôzne deriváty. Medzi pteríny patrí napríklad: xanthopterín, pterín, biopterín, onkopterín, neopterín, molybdopterín a mnohé ďalšie (Tomandl, 1998). Pteríny sa slabo rozpúšťajú vo vode a vo väčšine organických rozpúšťadiel. Vyskytujú sa v oxidačných formách, ale iba redukované formy vykazujú plnú biologickú aktivitu (Blau et al., 2008). Redukované formy pterínov podliehajú oxidačnému procesu na vzdušnom kyslíku alebo svetle. Počas oxidácie nevznikajú iba plne oxidované formy materskej zlúčeniny, ale aj deriváty pteridínov v dôsledku rôznych prešmykov. Redukované formy pterínov majú silné antioxidačné účinky a môžu *in vivo* pôsobiť ako vychytávače reaktívnych foriem kyslíka (Tomandl, 1998).

Obr. 1: Chemická štruktúra pteridínu (Blau et al., 2008)

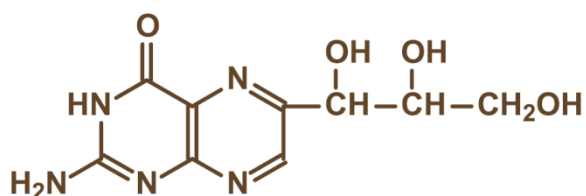


Biosyntéza všetkých pterínov prebieha hydrolytickým štiepením guanozín trifosfátu (GTP) pomocou GTP cyklohydroláz v troch po sebe idúcich enzýmových krokoch. V ľudskom organizme prebieha biosyntéza hlavne v hepatocytoch, lymfocytoch, dopaminergných a serotonergných synaptózomoch (Tomandl, 1998).

## Neopterín

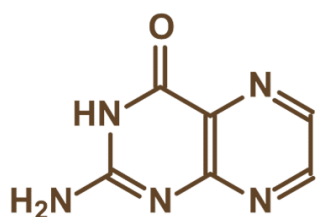
Neopterín (NEO) je nízkomolekulová substancia syntetizovaná z GTP v monocytoch resp. makrofágoch vďaka stimulácii interferénom gama (IFN –  $\gamma$ ). Neopterín sa vyskytuje v telesných tekutinách ako je krv, moč, ascites alebo cerebrospinálny mok. Klinické štúdie ukázali, že jeho zvýšená hladina sa preukazuje pri kardiovaskulárnych ochoreniach, infekčných a autoimunitných chorobách, nádoroch a transplantáciách. Sledovanie hladiny neopterínu u ľudí je tak nápomocné pri monitorovaní bunkovej imunity a zápalových odpovediach organizmu (Yanchun et Zhidong, 2011). Chemická štruktúra neopterínu je na Obr. 2.

Obr. 2: Chemická štruktúra neopterínu (Blau et al., 2008).



Keďže koncentrácia neopterínu odráža aktivitu IFN –  $\gamma$ , neopterín môže byť považovaný za biochemický indikátor systémovej imunitnej aktivácie (Sucher et al., 2010). Meranie koncentrácie neopterínu umožňuje monitorovanie stupňa imunitnej aktivity. Neopterín je biochemicky statický, a tak jeho polčas rozpadu v organizme je ovplyvnený iba jeho renálnou exkréciou. Naopak, IFN –  $\gamma$  má problémový polčas rozpadu, pretože po jeho vzniku v organizme dochádza k jeho rýchlej neutralizácii rozpustnými receptormi alebo sa rýchlo naviaže na cieľovú štruktúru. Práve pre tento fakt sa lokálne tvorené cytokíny nedostanú do krvnej cirkulácie, a nie sú tak vhodnými štruktúrami na biochemickú diagnostiku. Napríklad u HIV – 1 pacientov a pacientov s hepatitídou

Obr. 3: Chemická štruktúra pterínu a biopterínu (Blau et al., 2008)



typu C sa paralelne sledovala hladina IFN –  $\gamma$  a neopterínu, pričom síce hodnoty vzájomne asociovali, ale senzitivita stanovenia neopterínu bola vyššia (Sucher et al., 2010).

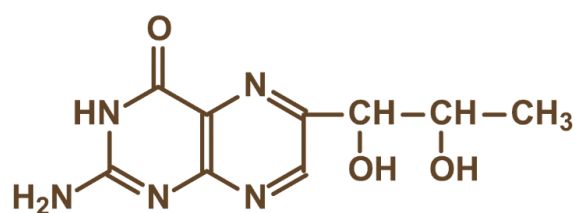
Biologická funkcia neopterínu nie je ešte úplne preskúmaná, ale ukázalo sa, že neopterín súvisí s tvorbou *in vitro* reaktívnej formy kyslíka, ozn. ROS (z ang. reactive oxygen species) po stimulácii IFN –  $\gamma$ . Súvis spočíva v neopteríne ako indikátore oxidačného stresu a ROS. Existuje predpoklad, na základe ktorého je funkčné prepojenie medzi koncentráciou neopterínu a zvýšenou produkciou ROS, čo následne môže modulovať proliferáciu a prežívanie nádorových buniek. ROS je kľúčovým produktom pri iniciácii a progresse nádorového ochorenia, pretože spôsobuje bodové mutácie, ktoré potom aktivujú onkogény (Sucher et al., 2010).

V súčasnosti má neopterín nízku diagnostickú citlivosť, a tak ho zatiaľ nemôžeme považovať za klasický tumorový marker. Avšak, stanovením koncentrácie neopterínu sa dá podporiť diagnostika nádorového ochorenia. Na druhej strane, vysoká koncentrácia neopterínu v moči alebo v sére kvôli chronickej stimulácii imunitného systému indukujú nepriaznivú prognózu, pretože imunitný systém nie je schopný kontrolovať rast nádoru (Sucher et al., 2010).

## Biopterín a pterín

Biopterín (BIO) je oxidovaná forma tetrahydrobiopterínu (BH4). BH4 je najdôležitejší nekonjugovaný pteridín v biologických tekutinách (Cañada – Cañada et al., 2009). Materské mlieko obsahuje vysoké množstvo biopterínu, asi 90-krát viac ako sérum. Preto je pravdepodobné, že mliečne žľazy sú zodpovedné za produkciu BH4 (Espinosa – Mansilla, 2008).

Pterín (PT) je takisto derivát BH4, pričom obsahuje iba základné dva benzénové kruhy, pričom neobsahuje bočné reťazce. Jeden z nich má vyššie spomínanú 2-amino-4-oxoštruktúru (Blau et al., 2008). Štrukturálny vzorec pterínu a biopterínu je na Obr. 3. V moči poskytujú biopterín aj pterín modrú fluorescenciu. Ich koncentrácia v moči je zvýšená pri vírusových, chronických, nádorových či autoimunitných ochoreniach (Zvarík et al., 2015).





## Využitie pteridínov ako biomarkerov

Hoci existuje obrovské množstvo druhov rakoviny, predsa len majú všetky niečo spoločné. Ich vývoj je veľmi rýchly, a tak skorá diagnostika a následná liečba zlepšujú šance pacienta na prežitie a možnosti viesť relatívne normálny život. Doteraz používané metódy sú síce adekvátne na diagnostiku, ale sú pomerne nevhodné. Vyšetovanie zobrazovacími technikami je finančne náročné a je podmienené už morfológickými zmenami tkaniva – veľkosť nádoru, štádium ochorenia. Biopsia je invazívna metóda, počas ktorej môže dôjsť ku rôznym komplikáciám. Preto by bolo dobré nájsť takú metódu, ktorá stanoví nádorové ochorenie s istotou, v skorom štádiu a nebude pre pacienta stresujúca alebo inak škodlivá. Takou metódou sa javí byť určovanie biomarkerov z telesných tekutín ako krv alebo moč. Biomarkery z moču pacienta sa v súčasnosti intenzívne skúmajú, pretože odber moču je jednoduchší, možno ho často opakovať a na rozdiel od odberu krvi je nebolestivý (Gamagedara et al., 2011).

Rakovinové biomarkery (označované ako aj onkomarkery) sú zmeny na molekulovej, bunkovej alebo tkanivovej úrovni, ktoré predurčujú indikáciu súčasného a vyvíjajúceho sa stavu rakoviny. Takýmito indikátormi môžu byť cukry, tuky, nukleové kyseliny, ale aj rôzne iné látky, napríklad pteríny, resp. pteridíny. Pteridíny sa v poslednom období stali predmetom výskumu na skrining rakoviny, pretože hladiny určitých pteridínov poukazovali na prítomnosť nádorového ochorenia (Gamagedara et al., 2011, Košliński et al., 2011, Girón et al., 2012). Neopterín je považovaný za najdôležitejší rako-

vinový biomarker zo všetkých pteridínov, avšak aj hodnoty iných pteridínov sa používajú v klinickej praxi na kancerózne a prekancerózne skrining (Girón et al., 2012).

Gamagedara et al. (2011) stanovovali koncentrácie ôsmich pteridínov pomocou vysokoúčinnnej kapilárovej elektroforézy s laserom indukovanou fluorescenciou. Pozorovali moč 38 onkologických pacientov s rôznym typom rakoviny (rakovina prsníkov, pľúc, čreva, konečníka, podžalúdkovej žľazy, vaječníkov, pažeráka, močového mechúra, obličiek a non-Hodgkinov lymfóm) a 17 zdravých dobrovoľníkov. Po štatistickej analýze došli k záveru, že koncentrácia piatich pteridínov u onkologických pacientov bola výrazne vyššia ako u zdravých dobrovoľníkov (6-biopterín, xantopterín, pterín, izoxantopterín, 6-hydroxymetylpterín). Jeden pteridín u onkologických pacientov mal signifikantne nižšiu koncentráciu (6,7-dimetylpterín) a dva pteridíny nevykazovali signifikantnú zmenu (D-(+)-neopterín a kyselina pterín-6-karboxylová) (Gamagedara et al., 2011).

V práci Suchera et al. (2010) je ponúkaný prehľad koncentrácie neopterínu v závislosti od rôznych typov rakoviny. V práci je uvedené, že u onkologických pacientov liečených z rôznych typov rakoviny bola zaznamenaná výrazne vyššia koncentrácia neopterínu v moči alebo sére ako u zdravých jedincov. Zároveň, koncentrácia neopterínu rástla súbežne s progresom rakoviny (Sucher et al., 2010). V tabuľke 1 je uvedený percentuálny prehľad pacientov, u ktorých bola zaznamenaná vyššia koncentrácia neopterínu v moči alebo v sére pri rôznych typoch rakoviny.

Tab. 1: **Frekvencia zvýšenej koncentrácie neopterínu v moči alebo sére u onkologických pacientov** (Sucher et al., 2010)

Pacienti so zvýšenou koncentráciou neopterínu (%)	Typ rakoviny
80 – 100	chronická myeloidná leukémia, rakovina vaječníkov
60 – 80	sarkóm maternice, rakovina pankreasu
40 – 60	rakovina hrubého čreva, krčka maternice
20 – 40	rakovina prostaty, prsníkov

Košliński et al. (2014) publikovali štúdiu, v ktorej sa venovali detekcii pterínov v moči onkologických pacientov s rakovinou močového mechúra a zdravých dobrovoľníkov. Zistili, že koncentrácia neopterínu v moči u onkologických pacientov bola vyššia ako u zdravých jedincov. Koncentráciu porovnávali voči koncentrácii kreatinínu. Rozdiely v hladinách biopterínu a pterínu neboli štatisticky signifikantné. Preto sa treba zamerať na ďalšie štúdiá týchto látok, aby sa ukázalo, či sledovanie koncentrácie pterínov v moči je alebo nie je relevantné.

Košliński et al. sa vo svojej predošlej práci (Košliński et al., 2011) zamerali na prehľad dovtedy zisteného meta-

bolického profilu pteridínov ako potenciálnych biomarkerov v onkologickom ochorení. Je známe, že metabolismus pteridínov zdravých buniek je odlišný od nádorových. Každý typ nádoru má iný vplyv na zmenu v koncentrácii pteridínov. Koncentrácia xantopterínu, izoxantopterínu, biopterínu a neopterínu v moči pritom navzájom nesúvisí. Autori uvádzajú rôzne štúdie, v ktorých je koncentrácia neopterínu v moči onkologických pacientov štatisticky významne vyššia v porovnaní so zdravými dobrovoľníkmi. Skúmané boli rôzne onkologické ochorenia, ako napríklad rakovina prsníkov, pľúc, pečene či hrubého čreva.

Zvýšené hladiny neopterínu u pacientov s malígnym tumorom pečene sledovali Melichar et al. (2008). Neopterín v moči stanovili pre 154 pacientov, pričom až v 120 prípadoch našli vyššie hodnoty oproti 33 kontrolám.

K podobným výsledkom dospeli aj v inej štúdií venovanej meraniu hladín neopterínu v moči pacientov s rôznym poškodením pečene (Kawasaki et al., 1988). Autori zistili zvýšené hladiny neopterínu u pacientov s rakovinou pečene oproti pacientom s cirhózou a zdravým dobrovoľníkom, avšak nenašli rozdiel v hladinách neopterínu medzi zdravými jedincami a pacientami s cirhózou pečene.

Aj Yuksel et al. (2007), pozorovali hladinu neopterínu v moči u onkologických pacientok s malígnym nádorom prsníka v rôznych štádiách a benígnym nádorom prsníka. Výsledky porovnávali so vzorkami od zdravých dobrovoľníkov. Zistili, že koncentrácia neopterínu v moči u pacientok s malígnym nádorom je signifikantne vyššia ako u pacientok s nádorom benígnym. Zároveň nenašli signifikantný rozdiel medzi koncentráciou neopterínu u zdravých jedincov a pacientok s benígnym nádorom.

Štúdia Zvaríka et al. (2015) porovnávala hladiny pteridínov u onkologických pacientok s malígnym a benígnym nádorom vaječníkov a zdravých jedincov. Pracovali so vzorkami moču od 36 pacientiek s malígnym a 39 pacientiek s benígnym nádorom vaječníkov. Počet zdravých jedincov bol 32. V moči detegovali fluorescenciu neopterínu, biopterínu a pterínu. Zistili, že hladina všetkých troch pteridínov bola oproti zdravým jedincom signifikantne vyššia u pacientiek s malígnym ako aj benígnym nádorom. Pri porovnaní hladín pteridínov medzi oboma skupinami pacientiek (malígne / benígne) zistili, že v prípade neopterínu a pterínu sú hladiny pri malígnych tumoroch signifikantne vyššie oproti pacientkám s benígnym tumorom. Biopterín bol v oboch skupinách oproti kontrolám zvýšený v rovnakej miere. Zistenie, že koncentrácia neopterínu v moči je vyššia u onkologických pacientok ako u zdravých jedincov korešponduje s doterajšími výsledkami v iných výskumoch.

Vo vyššie spomínaných štúdiách sa výskum sústreďoval na stanovenie koncentrácie pteridínov v moči. Okrem koncentrácie týchto látok sa dá určovať aj ich hustota v moči. Takej štúdií sa venovali Burton et al. (2014). Zamerali sa na diferenciu medzi agresívnou formou rakoviny prsníka a benígnym nádorom. Skúmali špecifickú hustotu pteridínov v moči pacientok s benígnym a malígnym nádorom prsníka s normovaním na kreatinín. Premerali moč 27 pacientok s benígnym nádorom prsníka a 21 pacientok s agresívnou formou rakoviny prsníka. Signifikantný rozdiel hustoty jednotlivých pteridínov v moči vykazovali xantopterín a izoxantopterín. Pomer týchto pterínov (každého zvlášť) voči kreatinínu bol vyšší u pacientok s agresívnou formou rakoviny ako u pacientok s benígnym nádorom prsníka (Burton et al., 2014).

## Záver

Z uvedených prác vyplýva, že pri onkologických ochoreniach je hladina pteridínov v moči zvýšená. Pozorovania boli zamerané na stanovenie hladiny pteridínov v moči u onkologických pacientov a jej následnému porovnaniu so zdravými dobrovoľníkmi. V štúdiách nie je preukázané, že pri zvýšenej hladine pteridínov v moči má pacient nádorové ochorenie, ale že pri nádorových ochoreniach je hladina pteridínov zvýšená. Domnievame sa, že v budúcnosti by stanovenie pterínov v moči mohlo slúžiť ako jedna z dôležitých diagnostických metód. Na takéto zavedenie novej metódy však musia byť vykonané ešte mnohé klinické štúdie.

## Literatúra

- BLAU, N., DURAN, M. et GIBSON, K. M. (eds.) *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008, 860 p. ISBN: 978-3-540-76697-1.
- BURTON, C. et al. Normalization of urinary pteridines by urine specific gravity for early cancer detection. *Clinica Chimica Acta*. Volume 435, 2014, pp. 42-47.
- CAÑADA – CAÑADA, F. et al. Determination of marker pteridins and biopterin reduced forms, tetrahydrobiopterin and dihydrobiopterin, in human urine, using a post-column photoinduced fluorescence liquid chromatographic derivatization method. *Analytica Chimica Acta*. Volume 648, 2009, pp. 113-122.
- ESPINOSA – MANSILLA, A. et al. LC determination of biopterin reduced forms by UV-photogeneration of biopterin and fluorimetric detection. *Talanta*. Volume 77, 2009, pp. 844-851.
- GAMAGEDARA, S. et al. Investigation of urinary pteridine levels as potential biomarkers for noninvasive diagnosis of cancer. *Clinica Chimica Acta*. Volume 412, 2011, pp. 120-128.
- GIRÓN, A. J. et al. A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers in human urine. *Talanta*. Volume 101, 2012, pp. 465-472.
- KAWASAKI, H. et al. Prognostic Significance of Urinary Neopterín Levels in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. Volume 155, Issue 4, 1988, pp. 311-318.
- KOŠLIŇSKI, P. et al. Determination of pterins in urine by HPLC with UV and fluorescent detection using different types of chromatographic stationary phases (HILIC, RP C<sub>8</sub>, RP C<sub>18</sub>). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Volume 91, 2014, pp. 37-45.
- KOŠLIŇSKI, P. et al. Metabolic profiling of pteridines for determination of potential biomarkers in cancer diseases. *Electrophoresis*. Volume 32, 2011, pp. 2044-2054.
- MELICHAR, B. et al. Urinary neopterín in patients with liver tumors, *Tumori*. Volume 92, 2006, pp. 318–322.
- SUCHER, R. et al. Neopterín, a prognostic marker in human malignancies. *Cancer Letters*. Volume 287, 2010, pp. 13-22.
- TOMANDL, J. Pteriny. *Chemické Listy*. Volume 92, 1998, pp. 689-697.

YANCHUN, L. et ZHIDONG, H. Significance of humoral neopterin in clinical diagnostics and prognosis. *Journal of Medical Colleges of PLA*. Volume 26, 2011, pp. 45-51.

YUKSEL, O. et al. Neopterin, Catalase and Superoxide Dismutase in Females with Benign and Malignant Breast Tumors. *Pteridines*. Volume 18, 2007, pp. 132-138.

ZVARÍK, M. et al. Differences in pteridine urinary levels in patients with malignant and benign ovarian tumors in comparison with healthy individuals. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. Volume 153, 2015, pp. 191-197.

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



**Európska únia**  
Európsky fond regionálneho rozvoja



# Kyselina hyalurónová – molekula tisícich tvárí

Gabriela Gavurníková<sup>1,2</sup>

Barbora Bučková<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centrum vedecko-technických informácií SR  
Lamačská cesta 7315/8A 811 04 Bratislava –  
Staré mesto  
Slovensko  
gabriela.gavurnikova@cvtisr.sk

<sup>2</sup>Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava  
Slovensko  
gavurnikova1@uniba.sk

<sup>3</sup>Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava  
Slovensko  
buckova66@uniba.sk

## Hyaluronic acid – the molecule of thousand faces

### Abstract

Hyaluronic Acid (HA), also known as hyaluronan or hyaluronate, is a carbohydrate, more specifically a mucopolysaccharide occurring naturally throughout the human body. Hyaluronic acid is high molecular weight polymer composed of repeating disaccharide units derived from glucose. It naturally occurs in different parts of body and it is one of main components of extracellular matrix. Due to its structure, hyaluronic acid exhibits unique hydrophilic and rheological properties. Hyaluronic acid affects and regulate multiple processes in cells and extracellular matrix by interacting with hyaluronan receptors – hyaladherin. HA can be several thousands of sugars (carbohydrates) long. When not bound to other molecules, it binds to water giving it a stiff viscous quality similar to "Jello". This viscous Gel is one of the most heavily researched substances in medicine today with thousands of trials mostly in the fields of orthopedics and eye surgery. Its function in the body is, amongst other things, to bind water and to lubricate movable parts of the body, such as joint and muscles. Its consistency and tissue-friendliness allows it to be beneficial in skin-care products as an excellent moisturizer. Because HA is one of the most hydrophilic (water-loving) molecules in nature with numerous benefits for the human body it can be described as "nature's moisturizer".

### Key words

Hyaluronic acid, viscosity, elasticity, biopolymer,  
D-N-acetylglukosamine, D-glucuronic acid

## Úvod

Kyselina hyalurónová je najjednoduchší zastupiteľ glykozaminoglykánov v živých organizmoch. Vytvára rôzne dlhé reťazce tvorené z dvoch spojených jednotiek – D-N-acetylglukozamínu a kyseliny D-glukurónovej. Asi najväčší význam tejto molekuly spočíva v jej nezvyčajných reologických vlastnostiach a v jej schopnosti zadržiavať veľké množstvo vody, vďaka čomu má v organizme často úlohu spojenú s udržiavaním a reguláciou vody v bunke a tkanivách. Syntetizuje sa na vnútornej strane plazmatickej membrány enzýmami hyaluronan syntázami, pričom však novovzniknuté vlákno najčas-

tejšie priamo prechádza von z bunky do extracelulárnej matrix, kde sa táto látka vyskytuje v najväčšom množstve. V závislosti od molekulovej hmotnosti má kyselina hyalurónová rôzne funkcie pri stavbe chrupky, pri hojení rán, pri prozápalových a protizápalových reakciách, pri mitóze a migrácii buniek. Väčšina z týchto úloh je sprostredkovaná proteínovými receptormi – hyaladherínami, ktoré špecificky viažu vlákna kyseliny hyalurónovej. Vďaka spomínaným vlastnostiam našla kyselina hyalurónová významné uplatnenie v rôznych biomedicínskych oblastiach.

## História objavu kyseliny hyalurónovej

Kyselina hyalurónová bola objavená v roku 1934 Karлом Meyerom a jeho kolegom Johnom Palmerom, izoláciou zo sklovca kravieho oka. Svoj názov dostala vďaka spojeniu dvoch slov – **hyaloid**, čo v preklade znamená sklovec, a **urónová kyselina**. Vedci zistili, že ide o polysacharid zložený práve z urónovej kyseliny a z ďalšieho aminosacharidu (Meyer a Palmer, 1934). Presná štruktúra však bola opísaná až o niekoľko rokov neskôr začiatkom päťdesiatych rokov 20. storočia Bernardom Weissmannom a opäť Karлом Meyerom (Weissmann a Meyer, 1954). Počas nasledujúcich rokov boli skúmané jej fyzikálno-chemické vlastnosti ako viskozita, schopnosť vytvárania reťazcov a regulácia vody (Garg a Hales, 2004). V roku 1986 bol zavedený pojem „**hyalurónan**“, ktorý presnejšie zodpovedal medzinárodnej nomenklatúre polysacharidov (Balazs a kol., 1986).

Vďaka jej ideálnym vlastnostiam ako lubrikant našla kyselina hyalurónová svoje uplatnenie v klinickej medi-



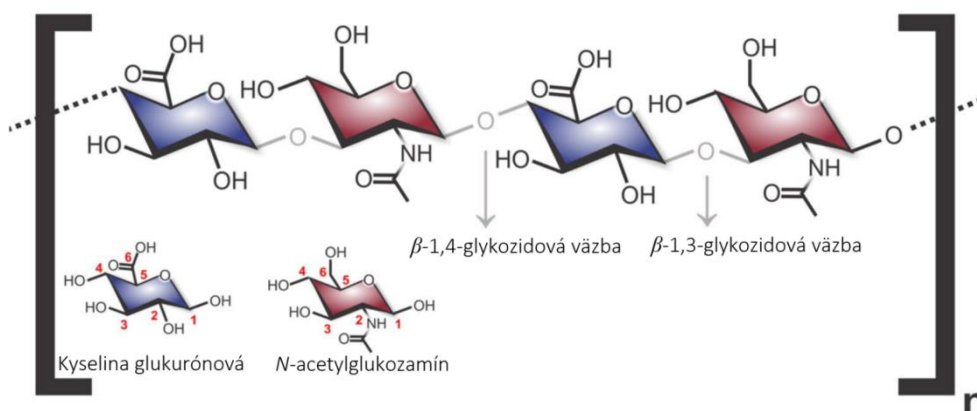
cíne. Na jej využívaní má zásluhu Endre Balazs, ktorý ako prvý vyvinul vysoko purifikovanú kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktorá nepôsobila zápalovo, z pupočnej šnúry a kohútich hrebeňov (Balazs a Sweeney, 1968). Začiatkom osemdesiatych rokov bola kyselina hyalurónová značne využívaná pri operáciách v očnom lekárstve. Bola používaná na výrobu šošoviek, ktoré boli implantované do vnútra oka (Liu a kol., 2011). Avšak kvôli znepokojeniu nad využívaním extrakcie z kohútich hrebeňov, keďže ide o použitie živočíšnych komponentov v biomedicínskych a farmaceutických aplikáciách, boli postupne vyvíjané nové spôsoby získavania kyseliny hyalurónovej a to metódou mikrobiálnej fermentácie. Prvý producent, ktorý bol použitý bol *Streptococcus zooepidemicus*, ktorý je doteraz používaný pri výrobe kyseliny hyalurónovej na technické účely, avšak je nevhodný pokiaľ ide o jej využitie práve v biomedicínskej oblasti (Liu a kol., 2011). Kyselina hyalurónová, ktorá vzniká ako časť extracelularnej kapsuly je síce identická s cicavčou, no môže obsahovať endotoxíny pochádzajúce z tejto baktérie. Preto bola ako

alternatíva objavená produkcia rekombinantnej kyseliny hyalurónovej, ktorá využíva ako hostiteľov gram-pozitívne a gram-negatívne baktérie, napríklad *Bacillus subtilis* (Widner a kol., 2005), *Escherichia coli* (Yu a Stephanopoulos, 2008), *Lactococcus lactis* (Chien a Lee, 2007) a *Agrobacterium* sp. (Marcellin a kol., 2014).

## Chemická štruktúra, fyzikálne a chemické vlastnosti

Kyselina hyalurónová (HA z anglického jazyka *Hyaluronic acid*) patrí do skupiny glykozaminoglykánov, prirodzene sa vyskytujúcich v živých organizmoch. Je to lineárna polymérna molekula zložená z disacharidových jednotiek D-N-acetylglukozamínu a kyseliny D-glukurónovej spojenými  $\beta$ -1,4-glykozidovou a  $\beta$ -1,3-glykozidovou väzbou (Obr. 1). Molekuly môžu byť dlhé 2000 – 25000 jednotiek, čo zodpovedá molekulovej hmotnosti  $10^6$  –  $10^7$  daltonov (jeden disacharid približne 400 Da) (Choi a kol., 2012).

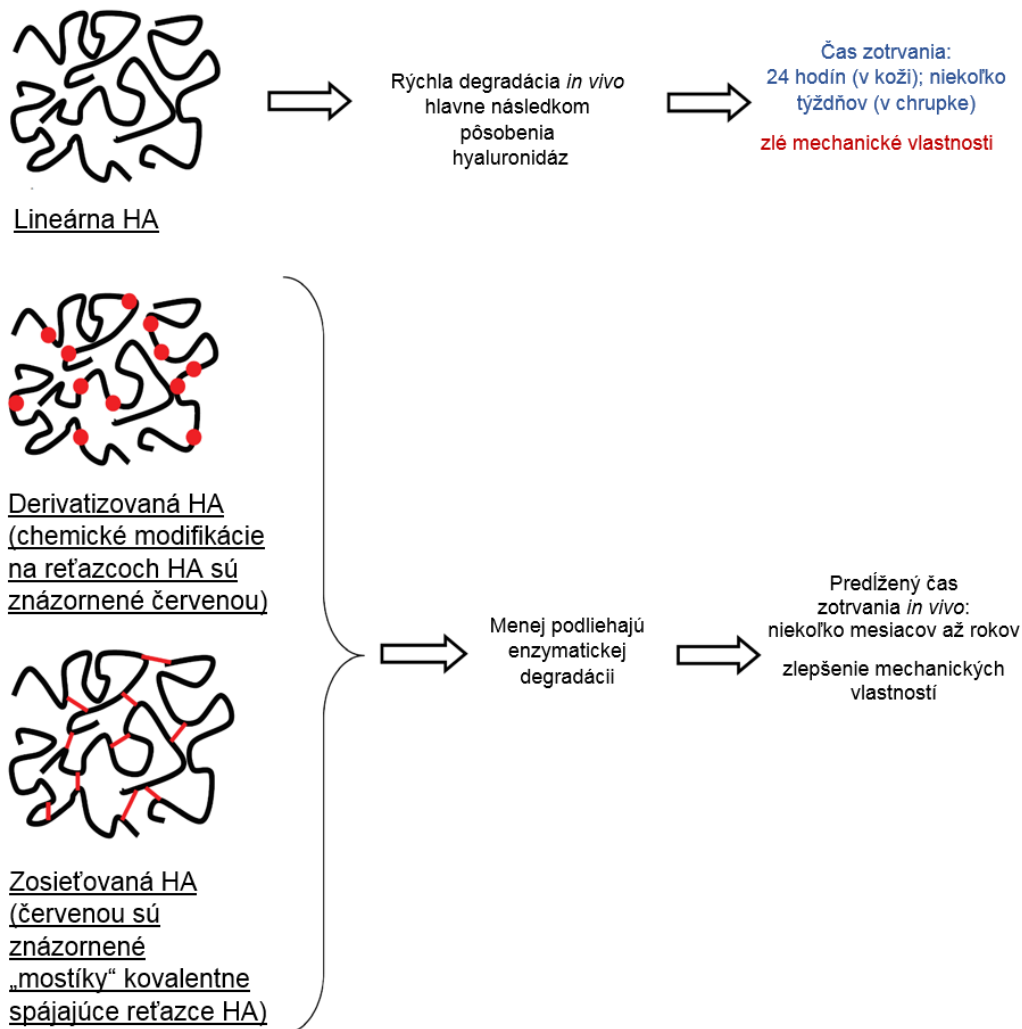
Obr. 1: Chemická štruktúra disacharidovej jednotky kyseliny hyalurónovej zloženej z D-glukurónovej kyseliny a D-N-acetylglukozamínu (Prevzaté z de Oliveira a kol., 2016)



V tele sa HA nachádza vo forme soli hyalurónanu s ionizovanými karboxylovými skupinami. Vo fyziologickom roztoku vlákna vytvárajú štruktúru náhodných cievok, alebo miestami až dvojzväznic. Štruktúra je tvorená pomocou vodíkových väzieb medzi hydroxylovými skupinami sacharidových jednotiek a elektrostatickým odporom medzi ich karboxylovými skupinami. Kyselina hyalurónová sa vyznačuje silnými hydrofilnými vlastnosťami a vďaka svojej štruktúre je schopná zadržať molekuly vody a tak zväčšiť až 1000 násobok svojej hmotnosti (Stern a kol., 2006). Je významná hlavne pre svoje nezvyčajné reologické vlastnosti ako je viskozita a elasticita. Pri vysokej koncentrácii má roztok vyznačuje nemesierne vysokou viskozitou, ktorá je závislá od šmykového napätia. 1 % roztok má gélovú štruktúru (Necas a kol., 2008). Viskozita gélu je závislá od viacerých parametrov ako je zosieťovanie, pH alebo rôzne modifikácie reťazca (Price a kol., 2007).

Keďže vlastnosti kyseliny hyalurónovej sú priamo závislé od jej štruktúry, jednotlivé odvetvia medicíny môžu vyžadovať rôzne druhy kyseliny hyalurónovej vzhľadom na jej dĺžku (molekulovú hmotnosť) a na modifikáciu reťazca. V niektorých oblastiach je využívaná prirodzene sa vyskytujúca lineárna forma, avšak vo väčšine prípadov je potrebná jej chemická modifikácia. Najčastejšie modifikácie spočívajú vo vytváraní derivátov alebo vzniku trojrozmernej sieťovej – „cross-linked“ – štruktúry, kedy dochádza ku tvorbe kovalentných väzieb medzi reťazcami. Úprava vlákien znižuje ich rozpustnosť vo vode a zvyšuje odolnosť voči ich enzymatickej degradácii, čím je predĺžená životnosť látky v tkanive alebo bunke a umožňuje tak jej lepší účinok. Modifikácia a to predovšetkým zosieťovanie reťazcov taktiež zlepšujú špecifické mechanické vlastnosti materiálu (Brown a Jones, 2005).

Obr. 2: **Schematické znázornenie komerčne využívaných foriem – lineárnej, derivatizovanej a zosieťovanej HA**  
(Prevzaté zo Schiraldi a kol., 2010)



Existuje niekoľko rôznych spôsobov ako vytvoriť „cross-linked“ kyselinu hyalurónovú prostredníctvom molekúl alebo enzýmov, ktoré väzbu sprostredkujú. Na zosieťovanie môže byť použitý napríklad bis-karbomiid (Sadozai a kol., 2005), multivalentné hydrazidové zosieťovanie prostredníctvom karbodiimidom (EDC: 1-etyl-(3,3-dimetylaminopropyl) karbodiimidom) a koaktivátory (N-hydroxysulfosucinimid-sulfo-NHS alebo 1-hydroxy-benzotriazole-HOBT) (Bulpitt a Aeschlimann, 1999). Taktiež je na prípravu používané disulfidové zosieťovanie (Shu a kol., 2003), fotosieťovanie (Leach a kol., 2003) a autozosieťovanie sprostredkované karbodiimidom a koaktivátorom alebo 2-chlór-1-metylpyridíniumjodidom (Yong a kol., 2004). Metódy spájania zahrňujúce hydroxylové skupiny kyseliny hyalurónovej sú napríklad s použitím divinylsulfónu (Ibrahim a kol., 2010) a diepoxidu (Segura a kol., 2005).

Spôsoby derivatizácie využívajú esterifikáciu a sulfatáciu hydroxylových skupín vlákien. Esterifikácia prebieha na karboxylových skupinách, čo znižuje celkový náboj hyalurónanu a zvyšuje jeho hydrofóbnosť čím zlepšuje

stabilitu (Vindigni a kol., 2009). Rozpustnosť vo vode sa znižuje v závislosti od stupňa modifikácie (Schiraldi a kol., 2010). Krátka životnosť kyseliny hyalurónovej v tkanive predstavuje jeden z hlavných nedostatkov pri jej využití v biomedicíne.

## Úloha kyseliny hyalurónovej v organizme

Kyselina hyalurónová sa prirodzene vyskytuje v rôznych zvieracích tkanivách – v kohútích hrebeňoch, koži žralokov, hovädzích očiach, hovädzej nosovej priehradke, ale aj u ľudí, napríklad v pupočnej šnúre, v synoviálnej tekutine, pokožke, sklovci oka, hrudníkovej lymfe. V určitom množstve sa môže taktiež nachádzať aj v pľúcach, obličkách, mozgu, svaloch, plazme, v moči a malé množstvo v pečeni (Kogan a kol., 2007) (Fraser a kol., 1997). Najviac kyseliny hyalurónovej je možné v ľudskom tele nájsť v extracelulárnej matrix, kde má dôležitú úlohu pri jej organizácii (Laurent, 1998).

Tab. 1: **Koncentrácia kyseliny hyalurónovej [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ] v jednotlivých orgánoch pri rôznych organizmoch**  
(Prevzaté z Frasera kol., 1997)

Orgán alebo tekutina	Človek	Ovca	Králik	Potkan
Pupočná šnúra	4100			
Synoviálna tekutina	1400 – 3600	540	3890	
Koža	200			
Sklovec	140 – 338	260	29	
Pľúca		98 – 243		34
Obličky			93 – 113	30
Obličková papila			250	
Obličková kôra			4	
Mozog	35 – 115		54 – 76	74
Svaly			27	
Črevo				44
Hrudníková lymfa	8,5 – 18	1 – 34		5,4
Pečeň			1,5	4
Komorový mok	0,3 – 2,2	1,6 – 5,4	0,6 – 2,5	0,2
Moč	0,1 – 0,3			
Mozgovo-miechový mok	0,02 – 0,32			
Plazma	0,01 – 0,1	0,12 – 0,31	0,019 – 0,086	0,048 – 0,026

Vďaka svojim hygroskopickým vlastnostiam sa kyselina hyalurónová podieľa na regulácii obsahu vody, hydratácii tkaniva a pri transporte vody. Taktiež pomáha pri udržiavaní osmotickej rovnováhy. V extracelulárnej matrici interaguje s ostatnými komponentami a s bunkami pomocou špecifických a nešpecifických interakcií (Necas a kol., 2008). Môže sa viazať s väzbovými proteínmi a receptormi – hyaladherínami. Dôležitú úlohu zohráva v matrici chrupky, kde tvorí agregáčny centrum pre agrekan, ktorý si vďaka interakciám s kyselinou hyalurónovou zachováva svoje makromolekulové zloženie (Iannitti a kol., 2011). Jednou z najvýznamnejších rodín väzbových proteínov sú glykoproteínové hyaladheríny a to vďaka receptoru CD44. Ide o multifunkčný transmembránový proteín vyskytujúci sa u väčšiny typov buniek v tele. Môže regulovať génovú expresiu a má dôležitú úlohu pri aktivácii kináz vo vnútri bunky. Má vplyv na množenie, diferenciáciu a migráciu buniek a taktiež na vznik nádorov v tele (Choi a kol., 2012). Do tejto skupiny proteínov patrí taktiež receptor LYVE1 (Lymphatic vessel endothelial HA receptor), nachádzajúci sa na endoteli lymfatických ciev, sleziny a pečene, alebo TSG-6 (Tumor necrosis factor-stimulated gene-6) (Fakhari a Berkland, 2013). Najznámejším predstaviteľom receptorov, neobsahujúcich glykoproteínovú časť je RHAMM (Receptor for HA-Mediated Mobility). Nachádza sa nie len na povrchu, ale taktiež v cytosole a v jadre bunky (Leach a Schmidt, 2004). Pomáha pri raste a migrácii buniek, hlavne fibroblastov hladkého svalstva.

## Syntéza HA

Kyselina hyalurónová nie je syntetizovaná v Golgiho aparáte, ako ostatné glykozaminoglykány, ale na vnútornej strane plazmatickej membrány integrovanými proteínmi – hyalurónan syntázami (HAS) (Necas a kol., 2008) odkiaľ je následne vytlačená cez pórovitú štruktúru do extracelulárneho priestoru. Hyalurónan syntázy delíme do dvoch tried. Do prvej triedy zaradíme HAS cicavcov, streptokokov skupiny A a C, žaby *Xenopus* a vírusu *Chlorella* PCBV-1. Z druhej triedy je zatiaľ známa iba syntáza baktérie *Pasteurella multocida* (Marcellin a kol., 2014), proteín označovaný ako pmHAS. Hyalurónan syntázy prvej triedy obsahujú viaceré transmembránové domény asociované s molekulami lipidov, vďaka čomu sa HA syntetizuje a prechádza von z bunky kde buď vytvára kapsulu, alebo je jednoducho uvoľnená do medzibunkového priestoru. pmHAS druhej triedy je zložený z dvoch nezávislých katalytických domén s transferázovou aktivitou zodpovednou za napájanie UDP-glukurónovej kyseliny (UDP-GlcUA z anglického jazyka UDP-glucuronic acid) a UDP-N-acetylglukozamínu (UDP-GlcNAc z anglického jazyka UDP-N-acetylglucosamine) (Sze a kol., 2016). Ide o periférny membránový proteín pričom spomínané katalytické jednotky sú spojené s plazmatickou membránou jednou doménou pri karboxylovom konci enzýmu (DeAngelis, 1999). Spojenie s membránou a prechod HA z bunky však nie sú v prípade tohoto enzýmu

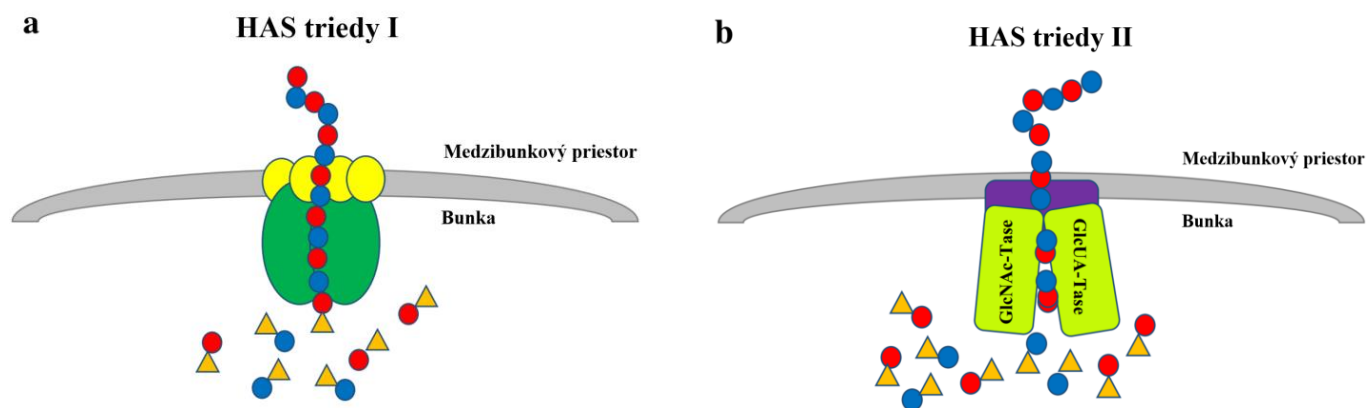
k syntéze nevyhnutné (Sze a kol., 2016). Ďalším hlavným rozdielom je samotný spôsob syntézy kyseliny hyaluronovej. HAS patriace do prvej triedy pridávajú cukorné prekuzory na redukujúci koniec syntetizovaného

reťazca zatiaľ čo hyaluronan syntázy z druhej skupiny predlžujú vlákno na neredukujúcom konci (de Oliveira a kol., 2016).

Obr. 3: **Schematické znázornenie biosyntézy hyaluronan syntázami triedy I a triedy II (HAS).**

(a) HAS triedy I sú integrálne membránové proteíny, ktoré katalyzujú adíciu UDP-cukru rastúcemu HA reťazcu a môžu transportovať hydrofilný HA polymér cez bunkovú membránu eukaryotov alebo gram-pozitívnych baktérií. Lipidové molekuly (žlté kruhy) uľahčujú aktivitu HAS, ktorá im umožňuje riadiť premiestnenie HA.

(b) HAS triedy II je periférny proteín, ktorý tiež katalyzuje predĺženie HA. Tento enzým je hybridom dvoch glykozyltransferáz, ktoré prenášajú UDP-N-acetylglukozamín a UDP-glukurónovú kyselinu na neredukujúci koniec HA reťazca. Predpokladá, že by tento proteín mohol interagovať s inými bunkovými membránovými proteínmi (capsular polysaccharid transport protein-purple block) s cieľom premiestniť HA cez bunkovú membránu Gram-negatívnych baktérií (*P. multocida*). Modré a červené body predstavujú GlcUA a GlcNAc. Oranžový trojuholník predstavuje UDP zložku. (Prevzaté zo Sze a kol., 2016).



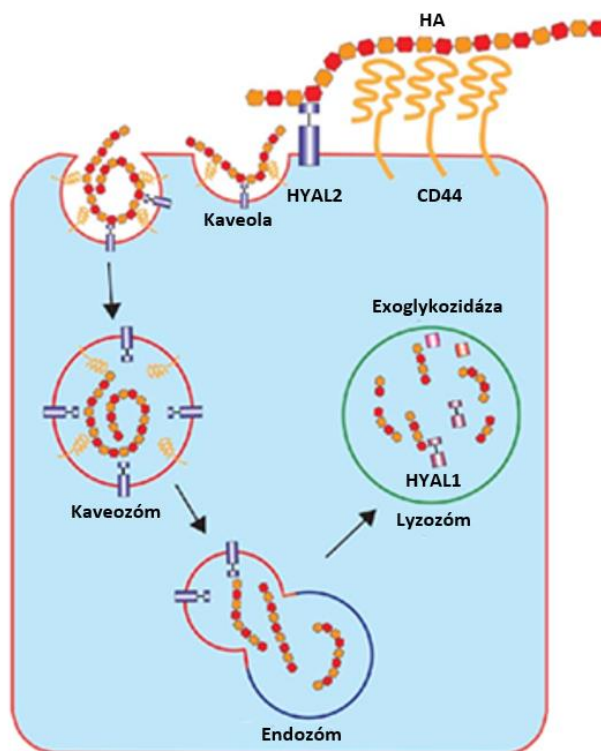
## Degradácia HA

Proces degradácie kyseliny hyaluronovej môže prebiehať enzymaticky, alebo neenzymaticky (Fakhari a Berklund, 2013). Pri enzymatickom odbúravaní sú používané tri druhy enzýmov – **hyaluronidázy 1 a 2,  $\beta$ -D-glukuronidázy** a  **$\beta$ -N-acetyl-hexosaminidázy**. Hyaluronidáza 2 je pripevnená na vonkajšej strane plazmatickej membrány a hydrolyticky štiepi reťazce kyseliny hyaluronovej na kratšie 20kDa fragmenty, ktoré ďalej endocytózou prejdú do vnútra bunky. Tam sa dostanú do skorých endozómov a lyzozómov, kde sú opäť skracované hyaluronidázou 1. Zvyšné dva enzýmy môžu následne odbúrať vzniknuté fragmenty odoberaním koncového sacharidu z neredukujúceho konca. Jednotlivé monosacharidy z pôvodných vlákien môžu potom opustiť lyzozóm a podieľať sa na ďalších metabolických reakciách. (Leach a Schmidt, 2004) (Aya a Stern, 2014).

Neenzymatická degradácia môže byť spôsobená teplom, ultrazvukom, hydrolýzou alebo oxidáciou. Bolo zistené, že vystavením látky ultrazvuku sa dlhšie reťazce odbúravajú pomalšie ako vlákna s nižšou molekulovou hmotnosťou. Pri použití tepla sa so zvyšujúcou teplotou molekuly začínajú degradovať a ich viskozita sa exponenciálne znižuje v závislosti od teploty (Stern a kol., 2007). Hydrolýza kyseliny hyaluronovej môže byť buď kyslá alebo zásaditá. Pri kyslej hydrolýze sa degraduje zvyšok kyseliny D-glukurónovej a pri zásaditej N-

acetylglukozamín. Oxidácia hyaluronového reťazca môže prebiehať vďaka reaktívnym formám kyslíka (Fakhari a Berklund, 2013).

Obr. 4: **Schéma enzymatickej degradácie kyseliny hyaluronovej** (Prevzaté z Chanmee a kol., 2016)





## Záver

Kyselina hyalurónová je unikátna molekula, ktorá vďaka svojim špecifickým reologickým vlastnostiam a štruktúre stále púta pozornosť vedcov na celom svete. Aj napriek tomu, že molekula ako taká bola objavená už pred niekoľkými desaťročiami, jej potenciál a úloha v organizme doteraz nie sú plne preskúmané. Pri mnohých procesoch stále nie sú známe presné mechanizmy jej pôsobenia. Poznanie súčasných, stále sa rozvíjajúcich poznatkov o kyseline hyalurónovej, o jej charakteristike z chemického hľadiska a jej funkcie v živom organizme, sú nesmierne dôležité hlavne pre jej biomedicínske aplikácie. V posledných rokoch vznikajú neustále nové formy úpravy a kombinácie kyseliny hyalurónovej s inými zlúčeninami, vďaka čomu sa zlepšujú vlastnosti a pozitívny vplyv vznikajúcich hydrogélův a nanočastíc. Kyselina hyalurónová si upevňuje svoje postavenie aj v oblastiach výskumu rakoviny a prenosu liekov, čo predstavuje významnú perspektívu jej možného využitia.

## Literatúra

- AYA, K. L., STERN, R. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. *Wound repair and regeneration* 22, 5 (2014): 579-593.
- BALAZS, E. A., LAURENT T. C., JEANOS R. W. Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochemical Journal* 235, 3 (1986): 903
- BALAZS, E. A., SWEENEY, D. B. *New and controversial aspects of retinal detachment*. (A. McPherson, Ed.) Harper and Row, (1968) ISBN 9780061416453
- BROWN, M. B., JONES, S. A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 19, 3 (2005): 308-318.
- BULPITT, P., AESCHLIMANN, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 47, 2 (1999): 152-169.
- DE OLIVEIRA, J. D., CARVALHO, L. S., GOMES, A. M., QUEIROZ, L. R. Beatriz Simas MAGALHAES, B. S., PARACHIN, N. S., Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial cell factories* 15, 1 (2016): 119.
- DEANGELIS, P. L. Molecular Directionality of Polysaccharide Polymerization by the *Pasteurella multocida* Hyaluronan Synthase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 37 (1999): 26557-26562.
- FAKHARI, A., BERKLAND, C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta biomaterialia* 9, 7 (2013): 7081-7092.
- FRASER, J. R., LAURENT, T. C., LAURENT, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine* 242, 1 (1997): 27-33.
- GARG, H. G., HALES, C. A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. Elsevier, (2004).
- CHANMEE, T., ONTONG, P., ITANO, N. Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment. *Cancer letters* 375, 1 (2016): 20-30.
- CHIEN, L.-J., LEE, C.-K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied microbiology and biotechnology* 77, 2 (2007): 339-346.
- CHOI, K. Y., SARAVANAKUMAR, G., PARK, J. H., PARK, K. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 99 (2012): 82-94
- IANNITTI, T., LODI, D., PALMIERI, B. Intra-articular injections for the treatment of osteoarthritis. *Drugs in R & D* 11, 1 (2011): 13-27.
- IBRAHIM, S., KANG, Q. K., RAMAMURTHI, A. The impact of hyaluronic acid oligomer content on physical, mechanical, and biologic properties of divinyl sulfone-crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94, 2 (2010): 355-370.
- KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology letters* 29, 1 (2007): 17-25.
- LAURENT, T. C. *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*. Portland Press, (1998) ISBN 1855781190
- LEACH, J. B., SCHMIDT, C. E. Hyaluronan. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, (2004), 779-789
- LEACH, J., BIVENS, K. A., PATRICK JR, C. W., SCHMIDT, C. E. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and bioengineering* 82, 5 (2003): 578-589.
- LIU, L., LIU, Y., LI, J., DU, G., CHEN, J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial cell factories* 10, 1 (2011): 99
- MARCELLIN, E., STEEN, J. A., NIELSEN, L. K. Insight into hyaluronic acid molecular weight control. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 16 (2014): 6947-6956.
- MEYER, K., PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry* 107, 3 (1934): 629-634.
- NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P., KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina* 53, 8 (2008): 397-411.
- PRESTWICH, G. D., MARECAK, D. M., MARECEK, J. F., VERCRUYSSSE, K. P., ZIEBELL, M. R. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release* 53, 1 (1998): 93-103.
- PRICE, R. D., BERRY, M. G., NAYSARIA, H. A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 60, 10 (2007): 1110-1119.
- SADOZAI, K. K., GOODING, T. B., BUI, K., SHERWOOD, C. H. Crosslinked hyaluronic acid compositions for tissue augmentation. U.S. Patent 8,124,120, (2012).
- SEGURA, T., ANDERSON, B. C., CHUNG, P. H., WEBBER, R. E., SHULL, K. R., SHEA, L. D. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* 26, 4 (2005): 359-371.
- SHU, X. Z., LIU, Y., PALUMBO, F., PRESTWICH, G. D. Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent

mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials* 24, 21 (2003): 3825-3834.

SCHIRALDI, C., LA GATTA, A., DE ROSA, M. Biotechnological production and application of hyaluronan. *Biopolymers*. InTech, (2010).

STERN, R., ASARI, A. A., SUGAHARA, K. N. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European journal of cell biology* 85, 8 (2006): 699-715.

STERN, R., KOGAN, G., JEDRZEJAS, M. J., ŠOLTÉS, L. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology advances* 25, 6 (2007): 537-557.

SZE, J. H., BROWNLIE, J. C., LOVE, C. A. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech* 6, 1 (2016): 67.

VINDIGNI, V., CORTIVO, R., IACOBELLIS, L., ABATANGELO, G., ZAVAN, B. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. *International journal of molecular sciences* 10, 7 (2009): 2972-2985.

WEISSMANN, B., MEYER, K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical Cord1, 2. *Journal of the american chemical society* 76, 7 (1954): 1753-1757.

WIDNER, B., BEHR, R., VON DOLLEN, S., TANG, M., HEU, T., SLOMA, A., STERNBERG, D., DEANGELIS, P. L., WEIGEL, P. H., BROWN, S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology* 71, 7 (2005): 3747-3752.

YOUNG, J.-J., CHENG, K.-M., TSOU, T.-L., LIU, H.-W., WANG, H.-J. Preparation of cross-linked hyaluronic acid film using 2-chloro-1-methylpyridinium iodide or water-soluble 1-ethyl-(3, 3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 15, 6 (2004): 767-780.

YU, H., STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic engineering* 10, 1 (2008): 24-32.

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



**Európska únia**  
Európsky fond regionálneho rozvoja



# Kyselina hyalurónová a jej biomedicínske aplikácie

Gabriela Gavurníková<sup>1,2</sup>

Barbora Bučková<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centrum vedecko-technických informácií SR  
Lamačská cesta 7315/8A 811 04 Bratislava –  
Staré mesto  
Slovensko  
gabriela.gavurnikova@cvtisr.sk

<sup>2</sup>Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava  
Slovensko  
gavurnikova1@uniba.sk

<sup>3</sup>Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava  
Slovensko  
buckova66@uniba.sk

## Hyaluronic acid and its biomedical applications

### Abstract

For more than 30 years hyaluronic acid (HA) has been used for various applications in medicine for example in dermatology to support dermal regeneration, in urology, tissue engineering or as a treatment for cardiovascular diseases and it still finds new applications. Thanks to properties of the biopolymer, hyaluronic acid has become an important component of pharmaceutical and cosmetic products worldwide. HA was first used commercially in 1942 when Endre Balazs applied for a patent to use it as a substitute for egg white in bakery products. Its discovery was very unique. No other molecule had ever been discovered that has such unique properties to the human body. Balazs went on to become the leading expert on HA, and made the majority of discoveries concerning hyaluronic acid benefits. Hyaluronic Acid is found naturally in most every cell in the body and occurs in high concentrations in specific body locations. In each body location, it serves a different function. Unfortunately, HA also has a half-life (the time it takes for the molecule to get broken down and excreted from the body) of less than 3 days and possibly even as little as one day in the skin. For this reason, it is imperative that the body continually replenish itself with HA. Below are some of the areas in the human body where it is present and critical to anatomical function. This paper summarizes knowledge of usage of hyaluronic acid in medicine and it specially focuses on application and effects on osteoarthritis, in dermatology and otolaryngology.

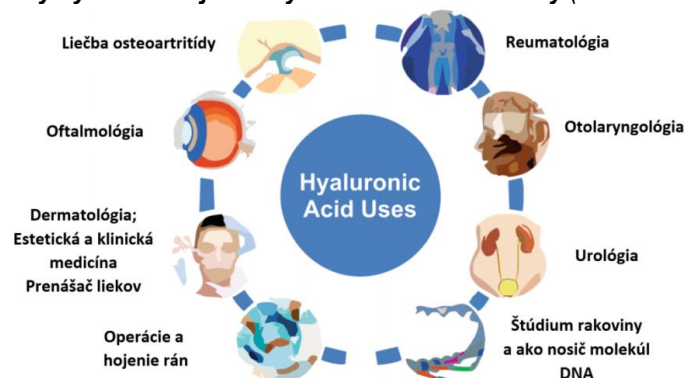
### Key words

Hyaluronic acid, viscosity, biopolymer, biomedicine, aesthetic surgery, osteoarthritis, dermatology

## Úvod

Kyselina hyalurónová (HA) predstavuje vďaka svojim unikátnym fyzikálno-chemickým vlastnostiam, ako je viskoelasticita a vysoká hygroskopicitá, biokompatibilita a jej netoxickosť, nesmierne významnú molekulu aplikovanú v rôznych oblastiach medicíny. HA s vysokou molekulovou hmotnosťou zaznamenala úspechy predovšetkým pri viacerých zákrokoch v očnom lekárstve, pri aplikáciách v reumatologických ochoreniach, pri dermatológii. Naopak kratšie reťazce tohto biopolyméru našli svoje uplatnenie pri produkcii látok inhibujúcich rast nádorov, podporujúcich angiogézu – vznik nových ciev, alebo expresiu prozápalových mediátorov. HA sa v súčasnosti taktiež využíva napríklad v otolaryngológii, urológii, tkanivovom inžinierstve a ako súčasť liekov. (de Oliveira a kol., 2016, Sze a kol., 2016). Pri testovaní kyseliny hyalurónovej neboli zaznamenané žiadne známky cytotoxicity, neurotoxicity ani negatívneho vplyvu na plodnosť testovaných subjektov.

Obr. 1: Schéma aplikácie kyseliny hyalurónovej v rôznych oblastiach medicíny (Prevzaté z de Oliveira a kol., 2016)



Vďaka štruktúrnej homológii medzi rôznymi druhmi živočíchov a slabej interakcii s krvnými zložkami predstavuje kyselina hyalurónová vysoko neantigénnu a neimunogénnu látku, keďže nevyvoláva imunitnú odpoveď u ľudí ani iných stavovcov. V dôsledku jej aplikácie v biomedicíne musia byť kladené vysoké nároky nielen na efektívnosť produkcie ale aj na spôsob získavania čistého a bezpečného produktu. V súčasnosti je asi najrozšírenejšia metóda prípravy pomocou biotechnologických bakteriálnych fermentácií, ktoré postupne nahrádzajú pôvodné extrahovanie kyseliny hyalurónovej zo živočíšnych tkanív, predovšetkým kohútích hrebeňov alebo sklovca oka.

## Aplikácie kyseliny hyalurónovej v medicíne

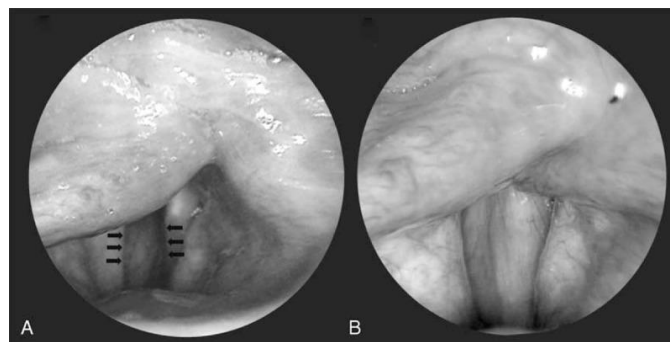
### Otolaryngológia

Zlúčeniny kyseliny hyalurónovej sú v dnešnej dobe najčastejšie používané látky pri injekčnej laryngoplastike. Ide predovšetkým o Restylane (Medicis Aesthetics Inc) a Hyaform (INAMED Aesthetics Inc) (Sataloff a Benninger, 2015). Kyselina hyalurónová je prítomná v extracelulárnej matrix sliznicového väziva hlasiviek, kde ovplyvňuje biologické a mechanické vlastnosti tkaniva a zohráva dôležitú úlohu pri správnom vibrovaní hlasiviek. Tlmí nárazy, chráni okraje hlasiviek a priamo ovplyvňuje ich hrúbku a viskozitu. Injekčné podávanie kyseliny hyalurónovej je využívané pri liečbe nedostatčnosti hlasivkovej štrbiny, liečbe poranených alebo zjazvených hlasiviek (Sataloff a Benninger, 2015) a pri jednostrannej paralýze hlasiviek (Fang a kol., 2015). Injekcie exogénnej kyseliny hyalurónovej pomáhajú dosiahnuť viskoelastické vlastnosti podobné zdravému tkanivu. Štúdie ukázali okamžité zlepšenie kvality hlasu po podaní látky a ďalšie zlepšovanie počas nasledujúcich troch až šiestich mesiacov. Pomocou stroboskopického vyšetrenia bola počas tohto obdobia potvrdená prítomnosť podanej kyseliny hyalurónovej bez jej výraznej absorpcie. Injekcie kyseliny hyalurónovej boli modifikované aby bola kyselina odolnejšia voči enzymatickej degradácii čím by zotrvala v tkanive dlhšie a tým sa predĺžila doba jej účinku v hlasivkách. Jedinou nevýhodou tejto, inak užitočnej, modifikácie je zvýšenie viskozity roztoku, čo môže mať za následok zhoršenie jeho použitia pri podaní jemnou ihlou (Sataloff a Benninger, 2015).

Kyselina hyalurónová je taktiež používaná pri liečbe perforácie ušného bubienka (TMP z anglického jazyka *typanic membrane perforation*). TMP je obyčajne výsledkom infekcie, úrazu alebo zavedenia tympanosomického trubice (Saliba a kol., 2012). Približne v 12 % prípadov TMP spôsobených úrazom sa môže stať toto

ochorenie chronickým a vyžadovať liečbu. TMP môže zvyšovať riziko akútneho zápalu stredného ucha alebo chronického ochorenia stredného ucha, ktoré je často spojené s výtokom z ucha. Poškodený bubienok sa stáva akusticky neúčinný, čo môže viesť k prevodovej nedoslýchavosti u postihnutých pacientov. V súčasnosti je jednou z metód liečby TMP myringoplastika tukovými štepami s kyselinou hyalurónovou. V tomto prípade je štep a zvyšok membrány bubienka pokrytý esterom kyseliny hyalurónovej EpiDisc (Medtronic Xomed Inc) (Saliba a kol., 2012). Ester stimuluje migráciu epiteliálnych buniek membrány nad tukovým tkanivom a taktiež zabraňuje dehydratácii perforovaných okrajov. Štúdie liečby veľkých perforácií preukázali lepšie výsledky myringoplastiky s tukovými štepami pri použití kyseliny hyalurónovej oproti výsledkom kde ester pridaný nebol. Pri malých perforáciách neboli z hľadiska úspešnosti zistené žiadne štatistické rozdiely medzi výsledkami oboch metód (Gün a kol., 2016).

Obr. 2: Hlasivková štrbina u pacienta s jednostrannou paralýzou hlasiviek (A) pred a (B) jeden mesiac po injekčnom podaní kyseliny hyalurónovej (Prevzaté z Fang a kol., 2015)



Obr. 3: Otoskopia. (A) Perforovaný ušný bubienok pred myringoplastikou tukovými štepami s kyselinou hyalurónovou (HAFGM). (B) Ušný bubienok dva mesiace po HAFGM, s vyliečeným TMP a novou vaskularizovanou membránou (Prevzaté zo Saliba a kol., 2012)



### Dermatológia, plastická chirurgia a hojenie rán

Hojenie rán predstavuje komplexný biologický proces, pozostávajúci zo série reakcií zameraných na opravu poškodeného tkaniva. Po poškodení tkaniva a krvných ciev sa v mieste poranenia začnú ukladať krvné doštičky a prídu zápalové bunky. Následne je buď regenero-



vané pôvodné tkanivo, alebo vzniká vláknitá jazva. Kyselina hyalurónová je jednou z kľúčových zložiek pri celom procese hojenia. Po poranení tkaniva sa jej hladina výrazne zvýši vďaka syntéze poškodenými endotelovými bunkami a z megakaryocytov a krvných doštičiek, ktoré obsahujú veľké množstvo jej dlhých reťazcov (Aya a Stern, 2014). Po vytvorení trombocytovej zátky sa začnú jej zhromaždené reťazce podieľať na vzniku edému v poranenej oblasti a spolu s fibrínom vytvára dočasnú štruktúru, čím rozširuje tkanivo a tak pomáha odstraňovať odumreté bunky, odpad a baktérie z rany a urýchliť šírenie výživných látok (Voigt a Driver, 2012). Kyselina hyalurónová má taktiež signalizačnú úlohu. Trombocyty obsahujú degradačný enzým hyaluronidázu 2, avšak na rozdiel od ostatných buniek, nie hyaluronidázu 1. Predpokladá sa, že v počiatkovej fáze hojenia je enzým na krvných doštičkách inhibovaný, no neskôr sa stáva opäť aktívnym a štiepi reťazce kyseliny hyalurónovej na kratšie fragmenty (tie však nie sú ďalej degradované, kvôli chýbajúcej hyaluronidáze 1), ktoré pomocou väzby s kyselinou hyalurónovou viažucimi receptormi ako napríklad CD44 alebo TLR2 a TLR4 vyvolajú zápalové reakcie. V ďalšej časti hojenia rán napomáhajú fragmenty vývoju ciev – angiogenéze. Na rozdiel od kyseliny hyalurónovej s veľkou molekulovou hmotnosťou, ktorá angiogenézu potláča, jej kratšie polyméry prostredníctvom mnohých signalizačných dráh napomáhajú proliferácii a migrácii endotelových buniek pri vývoji. Okrem toho sa čiastočne podieľajú aj na kontrole expresie vaskulárneho endotelového faktora. V poslednej fáze procesu hojenia majú najväčšiu úlohu fibroblasty, ktoré sú základnými bunkami štruktúry a syntetizujú a ukládajú kolagénové vlákna. Kolagén typu III tvorí dočasné krytie rany, avšak ide o mäkkú a tvárnu látku,

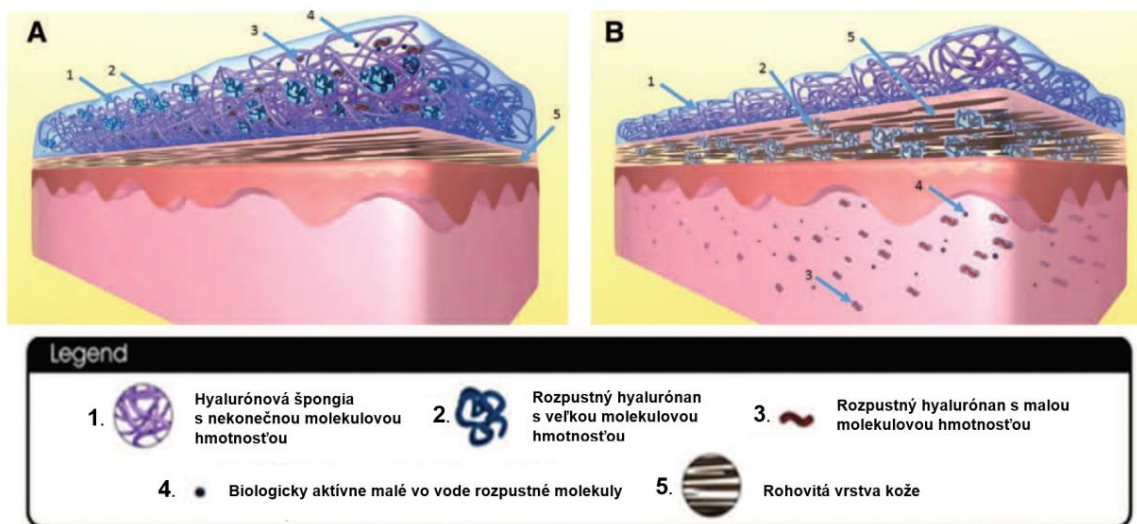
takže rana nie je dostatočne odolná voči ťahu. Kolagén typu III je postupne nahradený kolagénom typu I, ktorý je už na ťah odolnejší a začne sa vytvárať jazva. Kyselina hyalurónová nie len že opäť ovplyvňuje migráciu a rozmnožovanie, tentokrát fibroblastov, ale taktiež špecificky stimuluje produkciu kolagénu typu III. (Aya a Stern, 2014).

Okrem využitia na stimuláciu hojenia problémových rán je exogénna kyselina hyalurónová využívaná aj na následnú redukciu jaziev. Či už ide o jazvy po poranení alebo po chirurgickom zákroku, niektoré z nich môžu byť znetvorené a esteticky nepríjemné a spôsobovať svrbenie, citlivosť, bolesť a psychické poruchy pacienta. V prípade plastickej operácie prsníka ide o hlavný dôvod pre následnú reoperáciu, pričom na zlepšenie výzoru a štruktúry jazvy sa dosahuje použitím skrytých rezov, silikónu, injekcií kortikosteroidov a masážnej terapie po operácii (Manahan a kol., 2015).

Na redukciu zjazvenia boli vytvorené rôzne modifikácie a formy kyseliny hyalurónovej (Weindl a kol., 2004). Príkladom využitia jednej z nich, s dobrými výsledkami, testovanej v posledných rokoch, je kyselina hyalurónová vo forme špongie (HylaSponge System, Matrix Biological Institute). Ide o polymerizáciu dlhých vlákien hyalurónanu, ktoré vyvárajú veľké cievky vytvárajúce globulárne častice s prakticky nekonečnou molekulovou hmotnosťou, ktoré môžu zadržiavať veľké objemy vody a vo vode rozpustných látok podobne ako špongia. V zadržanej vode v špongii sú rozpustené dlhé aj krátke reťazce a voliteľne vo vode rozpustné biologicky aktívne malé molekuly ako napríklad vitamíny, aminokyseliny alebo peptidy. Látky sa následne po priložení špongie dostanú difúziou *priamo do pokožky*. (Mahedia a kol., 2016)

#### Obr. 4: Hyalurónová špongia.

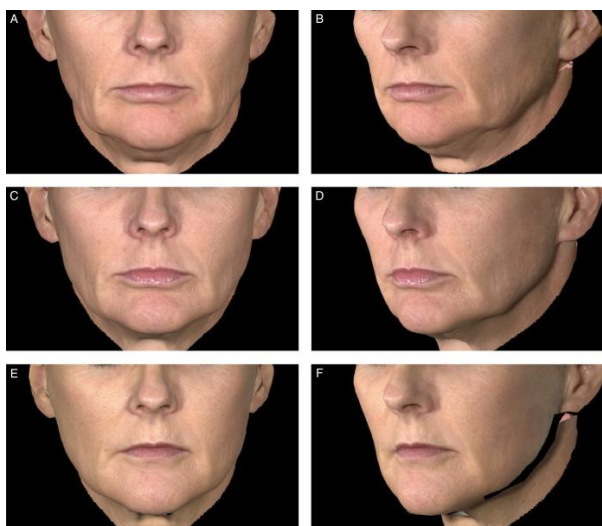
(A) Hyalurónová špongia s rozpustnou kyselinou hyalurónovou s malou a veľkou molekulovou hmotnosťou a s biologicky aktívnymi molekulami stále v špongii. Rohovitá vrstva kože nie je hydratovaná a je tenšia. (B) Hyalurónová špongia s rozpustnou kyselinou hyalurónovou s malou a veľkou molekulovou hmotnosťou a s biologicky aktívnymi molekulami transportovanými do pokožky. Rohovitá vrstva je hrubšia a spolu s ostatnými vrstvami kože je hydratovaná (Prevzaté z Mahedia a kol., 2016)



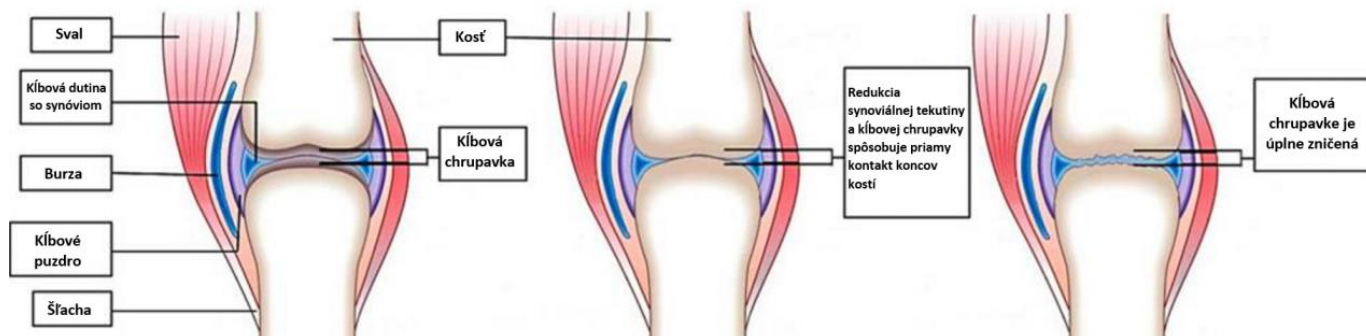
## Kožné výplne na báze kyseliny hyalurónovej

V posledných rokoch začali injekčne podávané kožné výplne predstavovať silnú konkurenciu pre používané invazívnejšie chirurgické zákroky v oblasti estetickej medicíny. Na základe výskumu International Society of Aesthetic Plastic Surgery, bolo v roku 2013 vykonaných viac ako 11 miliónov nechirurgických procedúr na celom svete a z toho vo viac ako troch miliónoch išlo o použitie vstrebateľných výplní tkaniva. Najčastejšie používanou výplňou je v súčasnosti kyselina hyalurónová. Podľa štatistiky American Society for Aesthetic Plastic Surgery bolo v roku 2014 v Spojených štátoch vykonaných viac ako 1,6 miliónov zákrokov podaním výplne kyseliny hyalurónovej, čo z nej robí druhý najčastejšie používaný nechirurgický zásah po použití botulotoxínu (Prasetyo a kol., 2016). Injekčné výplne kyseliny hyalurónovej sú rôzne v závislosti od pomeru krátkych a dlhých vlákien, miery zosieťovania alebo pridaných iných látok. Výplne sa používajú na zníženie vzniku jaziev, vyplnenie pleti alebo pier a odstránenie vrások na tvári pacienta, vďaka zvýšeniu schopnosti pokožky viazať vodu (Few a kol., 2015) (Gousse a kol., 2016).

**Obr. 5: Výsledky liečby 48 ročnej ženy s injekčne podávaným výplňou Juvéderm Voluma XC (Allergan, Inc.), (A, B) pred liečbou, (C, D) po 6 mesiacoch, (E, F) po 24 mesiacoch. V štúdií išlo o podávanie 6,3ml Juvéderm Voluma XC (gél kyseliny hyalurónovej a lidokainu) do strednej časti tváre (Prevzaté z Few a kol., 2015).**



**Obr. 6: Schématické znázornenie poškodenia kĺbu pri osteoartrítide (Prevzaté z Musumeci a kol., 2015)**



## Kyselina hyalurónová pri liečbe osteoartrítidy a reumatických ochorení

Osteoartrída (OA z anglického jazyka osteoarthritis) je najčastejšie chronické ochorenie postihujúce rôzne kĺby v tele, aj keď najčastejšie je spájaná hlavne s poškodením kolenného kĺbu. Môže byť spôsobená degeneráciou a poškodením chrupavky a okolitej extracelulárnej matrix alebo abnormálnou remodeláciou subchondriálnej kosti a zápalom kĺbu. V normálnej chrupavke existuje jemná rovnováha medzi jej syntézou a degradáciou. V prípade osteoartrítidy však degradácia chrupavky prevyšuje syntézu. Rovnováha je ovplyvnená vekom a je regulovaná niekoľkými faktormi produkovanými synoviom a chondrocytmi. Ochorenie je sprevádzané bolesťou postihnutého kĺbu a znížením jeho správneho fungovania, čo má negatívny vplyv na schopnosť pacienta vykonávať každodenné činnosti.

V súčasnosti poznáme niekoľko možností liečby OA, pričom najčastejšie ide o podávanie nesteroidných protizápalových liekov a intraartikulárne injekcie kortikosteroidov. V prvom prípade môžu však tieto lieky vyvolávať nežiaduce vedľajšie účinky a v prípade kortikosteroidov je nedostatkom ich krátka doba účinku a zvyšovanie hladiny glukózy v krvi, čo je problém hlavne pri diabetických pacientoch. Intraartikulárne injekcie kyseliny hyalurónovej sú ďalšou možnosťou liečby OA. Ako bolo už v predchádzajúcej časti spomenuté, kyselina hyalurónová je okrem iného prítomná v synoviálnej tekutine, kde má v závislosti od koncentrácie a molekulovej hmotnosti vplyv na jej viskoelastické vlastnosti. Synoviálna HA má významnú úlohu pri lubrikácii a tlmení nárazov. Pri nízkom šmykovom napätí, napríklad počas pomalého pohybu, sa lineárne reťazce usporiadajú v smere toku a správajú sa ako viskózna kvapalina. Keď je naopak kĺb vystavený rýchlemu nárazu, pri behu alebo skoku, nemajú molekuly HA dostatok času na usporiadanie, čo umožňuje absorpciu nárazu. V dôsledku osteoartrítidy je koncentrácia a taktiež molekulová hmotnosť HA znížená, čo výrazne zníži aj viskoelasticitu synoviálnej tekutiny a jej schopnosť chrániť chrupavku (Balazs a Denlinger, 1993). Intraartikulárne podaná kyselina hyalurónová má niekoľko mechanizmov terapeutického účinku pri tomto ochorení.

Obr. 7: Ukážka (vľavo) zdravého a (vpravo) poškodeného kolenného kĺbu trpiaceho osteoartrítidou (Prevzaté z Driban a kol., 2016)



Podaná HA má taktiež významný chondroprotektívny efekt – potláča apoptózu chondrocytov a podporuje ich proliferáciu. Efekt je sprostredkovaný väzbou molekuly na prítomné receptory CD44. Naviazanie indukciou mitogén-aktivovanej proteínkinázy fosfatázy-1 – (negatívneho regulátora IL-1 $\beta$ ) inhibuje expresiu interleukínu-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), čo má za následok pokles produkcie matrixovej metaloproteinázy – 1, 2, 3, 9 a 13 (MMP) (Mihara a Hashizume, 2012). Vo výsledku je tak zníženie katabolického účinku enzýmu v chrupavke. Väzba HA – CD44 redukuje aj expresiu ďalšej skupiny metaloproteináz – ADAMTS – dizintegrín metaloproteináza trombospordín, podieľajúcich sa na štiepení agrekátu, versikánu a brevikánu, ktoré predstavujú dôležité synoviálne zložky (Li a kol., 2012). Agrekán je primárny proteoglykán kĺbovej chrupavky, ktorý pomáha zabezpečovať jej stlačiteľnosť a elasticitu. Štiepenie agrekátu vedie k erózii chrupavky. Ako choroba postupuje celková koncentrácia proteoglykánov a glykozaminoglykánov sa znižuje. Strata agrekátu z chrupavky je jednou z prvých patofyziologických zmien pozorovaných počas osteoartritídy. Výsledky liečby kyselinou hyalurónovou preukázali nie len potlačenie jeho degradácie, ale zároveň stimuláciu syntézy (Altman a kol., 2015). Pri *in vitro* meraní s osteoartritickými chondrocytmi bol zaznamenaný nárast mRNA expresie génu *ACAN*, zodpovedného za produkciu proteínu agrekátu, pri kultivácii s HA, na rozdiel od kultivácie kde HA prítomná nebola a úroveň mRNA ostala konštantná (Bauer a kol., 2016). Pri sledovaní markeru syntézy proteoglykánov síran ( $^{35}\text{SO}_4$ ) po pridaní HA je zaznamenaná jeho zvýšená inkorporácia do chondrocytov. Ukázalo sa tiež, že liečba intraartikulárnou kyselinou hyalurónovou zvyšuje endogénnu produkciu GAG. Injekcie nielen doplnia HA v synoviálnej tekutine, ale podporia aj samotnú produkciu endogénnej HA (Greenberg a kol., 2006) (Altman a kol., 2015).

## Záver

Spočiatku po objavení kyseliny hyalurónovej sa predpokladalo, že ide o inertnú zlúčeninu, ktorá nijak špecificky neinteraguje s inými makromolekulami. Avšak od objavenia interakcie HA s proteoglykánmi v chrupavke vedcami Hardinghamom a Muirom v roku 1972 bol publikovaný veľký počet dát o úlohe kyseliny hyalurónovej v bunke, pri migrácii, mitóze, zápale, tvorbe nádorov, angiogenéze, embryogenéze a jej ďalších funkciách (Boeriu a kol., 2013). Vďaka zadržiavaniu vody, biokompatibilite a viskoelasticite tohto polyméru sa HA stala dôležitou súčasťou hlavných farmaceutických, biomedicínskych a kozmetických výrobkov s vysokou komerčnou hodnotou po celom svete (Sze a kol., 2016). V súčasnom období sme svedkami jej nesmierne významných biomedicínskych aplikácií. Tak ako rastie počet aplikácií kyseliny hyalurónovej, rastie v priebehu rokov aj jej podiel na trhu. V súčasnosti je tento polymér v závislosti od jeho čistoty a veľkosti v hodnote 1000 – 5000 USD/kg. Podľa výskumu uskutočneného v roku 2014 spravodajskou spoločnosťou Transparency Market Research bola trhová hodnota HA v roku 2012 5,32 miliardy USD a do roku 2019 by mala dosiahnuť 9,85 miliárd USD (de Oliveira a kol., 2016).

## Literatúra

- AYA, K. L., STERN, R. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. *Wound repair and regeneration* 22, 5 (2014): 579-593.
- ALTMAN, R. D., MANJOO, A., FIERLINGER, A., NIAZI, F., & NICHOLLS, M. (2015). The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *BMC Musculoskeletal Disorders*(16), 321.
- BALAZS, E. A., DENLINGER J. L. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *The Journal of rheumatology. Supplement* 39 (1993): 3-9.
- BAUER, C., BERGER, M., BAUMGARTNER, R. R., HOLLER, S., ZWICKL, H., NICULESCU-MORZSA, E., NEHRER, S. (2016). A Novel Cross-Linked Hyaluronic Acid Porous Scaffold for Cartilage Repair. *Cartilage*(7), 265-273.
- BOERIU, C. G., SPRINGER, J., KOOY, F. K., VAN DEN BROEK, L. A., EGGINK, G. Production methods for hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2013 (2013): 1-14.
- DE OLIVEIRA, J. D., CARVALHO, L. S., GOMES, A. M., QUEIROZ, L. R., MAGALHAES, B. S., PARACHIN, N. S. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial cell factories* 15, 1 (2016): 119.
- DRIBAN, J. B., STOUT, A. C., LO, G. H., EATON, C. B., PRICE, L. L., LU, B., BARBE, M. F., MCALINDON, T. E. Best performing definition of accelerated knee osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 8, 5 (2016): 165-171.



- FANG, T.-J., HSIN, L.-J., CHUNG, H.-F., CHIANG, H.-C., LI, H.-Y., WONG, A. M., PEI, Y.-C. Office-based intracordal hyaluronate injections improve quality of life in thoracic-surgery-related unilateral vocal fold paralysis. *Medicine* 94, 40 (2015).
- FEW, J., COX, S. E., PARADKAR-MITRAGOTRI, D., MURPHY, D. K. A multicenter, single-blind randomized, controlled study of a volumizing hyaluronic acid filler for midface volume deficit: patient-reported outcomes at 2 years. *Aesthetic surgery journal* 35, 5 (2015): 589-599.
- GOUSSE, C., LEBRETON, P. F., PROST, N. Heat stable hyaluronic acid compositions for dermatological use. U.S. Patent 9,333,160, (2016).
- GREENBERG, D. D., STOKER, A., KANE, S., COCKRELL, M., & COOK, J. L. (2006). Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*(14), 814-822.
- GÜN, T., BOZTEPE, O. F., ATAN, D., İKINCIOĞULLARI, A., DERE, H. Comparison of Hyaluronic Acid Fat Graft Myringoplasty, Fat Graft Myringoplasty and Temporal Fascia Techniques for the Closure of Different Sizes and Sites of Tympanic Membrane Perforations. *Journal of International Advanced Otolaryngology* 12, 2 (2016).
- LI, J., GORSKI, D. J., ANEMAET, W., VELASCO, J., TAKEUCHI, J., SANDY, J. D., & PLAAS, A. (2012). Hyaluronan injection in murine osteoarthritis prevents TGFbeta 1-induced synovial neovascularization and fibrosis and maintains articular cartilage integrity by a CD44-dependent mechanism. *Arthritis research & therapy*(14), R151.
- MAHEDIA, M., SHAH, N., AMIRLAK, B. Clinical Evaluation of Hyaluronic Acid Sponge with Zinc versus Placebo for Scar Reduction after Breast Surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* 4, 7 (2016).
- MANAHAN, M. A., BURETTA, K. J., CHANG, D., MITHANI, S. K., MALLALIEU, J., SHERMAK, M. A. An outcomes analysis of 2142 breast reduction procedures. *Annals of plastic surgery* 74, 3 (2015): 289-292.
- MIHARA, M., & HASHIZUME, M. (2012). The effect of high molecular hyaluronic acid on the induction of matrix degradation enzymes By IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Osteoarthritis and Cartilage*(20), 134-135.
- MUSUMECI, G., AIELLO, F. C., SZYCHLINSKA, M. A., DI ROSA, M., CASTROGIOVANNI, P., MOBASHERI, A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International journal of molecular sciences* 16, 3 (2015): 6093-6112.
- PRASETYO, A. D., PRAGER, W., RUBIN, M. G., MORETTI, E. A., NIKOLIS, A. Hyaluronic acid fillers with cohesive poly-densified matrix for soft-tissue augmentation and rejuvenation: a literature review. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* 9 (2016): 257.
- SALIBA, I., KNAPIK, M., FROEHLICH, P., ABELA, A. Advantages of hyaluronic acid fat graft myringoplasty over fat graft myringoplasty. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 138, 10 (2012): 950-955.
- SATALOFF, R. T., BENNINGER, M. S. *Sataloff's Comprehensive Textbook of Otolaryngology: Head & Neck Surgery: Laryngology*. (R. T. Sataloff, & M. S. Benninger, Ed.) JP Medical Ltd. (2015) ISBN 9789351527459.
- SZE, J. H., BROWNIE, J. C., LOVE, C. A. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech* 6, 1 (2016): 67.
- WEINDL, G., SCHALLER, M., SCHÄFER-KORTING, M., KORTING, H. C. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacology and Physiology* 17, 5 (2004): 207-213.

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.





# Vírus lymfocytovej choriomeningitídy ako ľudský patogén

Lubomíra Lukáčiková<sup>1</sup>

Katarína Lapošová<sup>2</sup>

Silvia Pastoreková<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Virologický ústav  
Biomedicínske centrum SAV,  
Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava  
Slovensko

<sup>3</sup>silvia.pastorekova@savba.sk

Lymphocytic choriomeningitis virus as a human pathogen

## Abstract

Lymphocytic choriomeningitis virus belonging to Arenavirus family readily causes infections in mice. However, its connection to human infections is largely underestimated. It is because in humans, LCMV induces mainly asymptomatic infections, or infections with flu-like symptoms (fever, myalgia, headache), and only rarely can have serious consequences such as meningitis or meningoencephalitis. Infections in immunocompromised or immunosuppressed individuals can be even fatal. It is therefore very important to pay increased attention to early diagnostics of LCMV and to development of preventive and/or therapeutic anti-LCMV strategies.

## Key words

Lymphocytic choriomeningitis virus, persistent infection, immunity, cytotoxic T lymphocytes, antibodies

## Úvod

Vírus lymfocytovej choriomeningitídy (LCMV) je prototypovým zástupcom čeľade Arenavírusov, ktorej členovia sú všeobecne spájaní s chorobami prenášanými z hľadavcov na ľudí. Arenavírusy sú klinicky dôležité ľudské patogény, medzi ktoré patria aj pôvodcovia niektorých závažných hemoragických horúčok (t.j. horúčok s vnútorným krvácaním). Väčšina arenavírusov vyvoláva perzistentnú, zvyčajne asymptomatickú infekciu v ich rezervoárových hostiteľoch, u ktorých sa vyskytuje chronická virémia a virúria (t.j. prítomnosť vírusu v krvi a v moči). Predpokladá sa, že niektoré infekcie sú spôsobené pomalou a/alebo nedostatočnou hostiteľskou imunitnou odpoveďou.

Čeľaď *Arenaviridae* obsahuje rody *Mammarenavirus* (mammalian arenaviruses) a *Reptarenavirus* (reptilian arenaviruses) (Radoshitzky *et al.*, 2015) Rod *Mammarenavirus* je rozdelený do dvoch sérologických skupín podľa antigénnych vlastností a geografického rozšírenia. Do prvej sérologickej skupiny LCMV–Lassa (tzv. vírusy „starého sveta“), patrí LCMV a štyri arenavírusy z Afriky (Lassa, Mobala, Mopeia, Ippy). Arenavírusy pochádzajúce zo Severnej alebo Južnej Ameriky tvoria druhú sérologickú skupinu: Tacaribe (tzv. vírusy „nového sveta“), ktorá obsahuje tri fylogenetické skupiny A, B,

C. Patria sem napríklad vírusy *Junin*, *Tacaribe*, *Pichinde*, *Tamiari*, *Parana*, *Oliveros* (Bowen *et al.*, 1997).

Mammarenavírusy z jednej geografickej oblasti sú antigénne príbuzné iným vírusom z tej istej oblasti. Tieto vírusy sú zoonotické, čo znamená, že v prírode sa vyskytujú len v zvieratách. Každý vírus je asociovaný s jedným druhom alebo s viacerými príbuznými druhmi hľadavcov, ktoré tvoria prírodný rezervoár pre vírusy. Výnimkou je vírus *Tacaribe* objavený na Trinidade, ktorý bol izolovaný z fruktivorných netopierov (*Artibeus* spp.), ale neskoršie pokusy získať vírus z netopierov alebo iných potenciálnych hostiteľov boli neúspešné. Prirodzeným hostiteľom nedávno objavených reptarenavírusov sú hady.

U prirodzených hostiteľov sa dokázal vertikálny aj horizontálny prenos, vrátane pohlavného, transuterinného, post pôrodného prenosu, ako aj prenosu mliekom, slinami alebo močom. Do prenosu nie sú zapojené žiadne článkonožce, či iné vektory (Bishop, 1990).

Prirodzeným hostiteľom a rezervoárom LCMV je myš domová (*Mus musculus*). Človek sa môže nakaziť vdýchnutím vírusu z aerosólu, či priamym kontaktom s kontaminovanými exkrementami infikovaných myší. Prenos z človeka na človeka doposiaľ nebol dokázaný, s výnimkou prenosu z matky na plod a len nedávno zisteného prenosu transplantovanými orgánmi od LCMV infikovaných donorov imunosuprimovaným recipientom. Tento spôsob prenosu viedol k extrémne vysokej mortalite, keď viac ako 70 % pacientov podľahlo infekcii. Prejavy kongenitálnej infekcie bývajú spájané s hydrocefalom, mikro a makrocefalom, či chorioretinitídou. Infekcia vírusom v prvom trimestri môže mať za následok spontánny potrat. Sérologické štúdie v rôznych oblastiach sveta dokázali, že prevalencia protilátok voči LCMV v ľudskej populácii sa pohybuje v rozmedzí 1 % až 37,5 %.

Aj napriek týmto poznatkom sa v odbornej literatúre čoraz častejšie objavuje názor, že význam vírusu lymfocytovej choriomeningitídy v patogenéze ľudských ochorení sa do značnej miery podceňuje. To je spojené najmä s pozorovaním, že veľká väčšina infekcií človeka

spôsobených LCMV má subklinický priebeh a len malá časť sa prejaví vážnym ochorením u imunokompetentných jedincov. U jedincov s poruchami imunity však môže mať vážne zdravotné následky, niekedy až s fatálnym koncom.

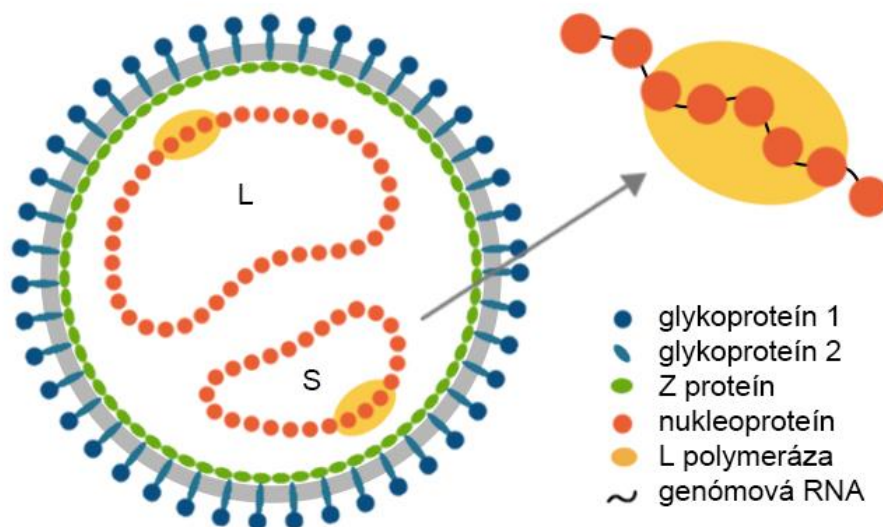
Zatiaľ neexistuje žiadna špeciálna liečba LCMV chorôb, hoci Ribavirín proti nemu vykazuje *in vitro* účinok a úspešne bol využitý vo viacerých prípadoch transplantáciou nakazeného pacienta. Nové antivírusové stratégie proti LCMV sú v súčasnosti vo fáze výskumu (Pasquato a Kunz, 2016).

## Štruktúra a replikácia arenavírusov

Štruktúra vírusových častíc všetkých arenavírusov je veľmi podobná. Vo vnútri obsahujú bunkové ribozómy, ktoré sa sem dostávajú pri vbalovaní vírusu a spôsobu-

Obr. 1: Štruktúra viriónu LCMV.

Na povrchu viriónu je lipidická dvojvrstva, v ktorej sú dva glykozylované proteíny 1 a 2. Pod povrchom je matrixový proteín Z. L a S predstavujú dva segmenty genomovej RNA spojené s nukleoproteínom. Nukleokapsid spojený s vírusovou L polymerázou tvorí vírusový ribonukleoproteín.



Virióny sú v *in vitro* podmienkach relatívne nestabilné. Rýchlo sa inaktivujú pôsobením UV alebo gama žiarenia, pri teplote nad 56 °C, alebo pri vystavení pH mimo rozhrania 5,5 – 8,5. K odstráneniu infekčnosti viriónov môže prísť pri porušení integrity viriónového obalu rozpúšťadlami alebo detergentami.

Genóm pozostáva z dvoch jednovláknových RNA molekúl, L a S, v dĺžke asi 7,5 kb a 3,5 kb, ktoré sú prepisované ambisense stratégiou a sú nekovalentnými väzbami spojené do cirkulárnej formy. MrL je  $2,2 - 2,8 \times 10^6$  a MrS je  $1,1 \times 10^6$  (Southern, 1996). Jediná výrazná homológia medzi dvoma genomickými RNA je na 3'konci, kde je vysoko konzervatívna sekvencia pozostávajúca z 19 nukleotidov (Perez a de la Torre, 2003). K nej komplementárne sekvencie sú na 5'konci. 3'konce neobsahujú polyA sekvencie (Bishop, 1990). Preparáty

jú jeho pieskovitý vzhľad. Virióny sú sférické, obalené častice, veľké 50 – 300 nm. Na povrchu je lipidický obal, ktorý virióny získavajú prechodom cez membránu infikovanej bunky. Na obale sa nachádzajú výbežky v tvare písmena T, ktoré sú tvorené oboma vírusovými glykoproteínmi (GP-1 a GP-2). Ich dĺžka je 8 – 10 nm. Výbežky sú zväčša nepravidelného tvaru, riedko rozostavené, v pozdĺžnom reze sa javia ako duté (Bishop, 1990). Izolované nukleokapsidy očistené od hostiteľských ribozómov sú organizované v uzavretých kruhoch rôznej dĺžky 450 nm – 1300 nm (Obr. 1). Ukazuje sa, že sú v superšpiralizovanej forme a predstavujú lineárny súbor nukleozomálnych podjednotiek (Clegg *et al.*, 2000). S viriónom je asociovaná RNA-závislá RNA polymeráza (Buchmeier *et al.*, 2001).

čistých vírusov môžu tiež obsahovať 28S, 18S a 4-6S RNA bunkového pôvodu. L a S sú asociované s nukleoproteínom N (63 – 72) v nukleokapsidoch, ktoré majú helikálnu symetriu (Buchmeier a Parekh, 1987). Krátky segment S RNA kóduje hlavné štrukturálne komponenty viriónu – vnútorný nukleoproteín (NP) a dva vonkajšie glykoproteíny (GP-1 a GP-2), ktoré vznikajú posttranslačnou úpravou, štiepením glykoproteínového prekursora GP-C (Wright *et al.*, 1990). NP a GP-C sú kódované neprekrývajúcimi sa, opačne orientovanými čítacími rámcami. Dlhý segment L kóduje vírusovú RNA-závislú RNA polymerázu L a štruktúrny a regulačný proteín Z, ktorý je menší a obsahuje doménu zinkového prstu. Medzi génmi na každom vlákne sa nachádza nekódujúca intragenomická časť, ktorá je vo forme palindrómu a tvorí vlásenku.

NP je asociovaný s vírusovou RNA v infikovaných bunkách, čím tvorí nukleokapsid (NC), ktorý je templátom pre vírusovú RNA polymerázu. NC asociovaný s vírusovou polymerázou tvorí ribonukleoproteín (RNP), ktorý sa zúčastňuje transkripcie a replikácie a je minimálnou jednotkou vírusu LCM potrebnou na infekciu (Cornu a de la Torre, 2001). Tetraméry GP-1 a GP-2 tvoria výbežky viriónového obalu a zabezpečujú interakciu vírusu s bunkovým receptorom. GP-2 tvorí komplex s nukleoproteínom a je dôležitý pri maturácii a pučaní viriónov. Vírus neutralizujúce protilátky sú namierené proti konformačným epitopom glykoproteínu GP-1 (Burns a Buchmeier, 1991). L proteín je minoritný proteín, ktorý predstavuje RNA-závislú RNA polymerázu. Z proteín je štruktúrnym aj regulačným proteínom. Obsahuje jednu doménu zinkového prstu so 60 aminokyselinami. Jej funkciou je pravdepodobne sprostredkovanie interakcií medzi proteínmi.

Replikačný cyklus arenavírusov je v porovnaní s inými RNA pomerne pomalý. Maximálny počet častíc je dosiahnutý až za 2 – 3 dni od začiatku infekcie. Infekcia zvyčajne prebieha bez výrazného poškodenia hostiteľského replikačného aparátu a bez cytopatického efektu. Na začiatku infekcie dochádza k adsorpcii vírusu prostredníctvom GP-1 na bunkový receptor  $\alpha$ -dystroglykán, ktorý je prítomný na mnohých typoch buniek živočíšnej ríše (Cao *et al.*, 1998). Vstup vírusu do bunky sa uskutočňuje vbalením do veľkých vezikúl a následnou fúziou membrány do vnútra bunky, ktorá je závislá od pH. Pri menšom pH ako 6 dochádza k disociácii GP-1 z viriónu a konformačným zmenám GP-2 a tým k strate infekčnosti vírusu. Po uvoľnení nukleokapsidu do cytoplazmy aktivuje vírusovo-špecifická RNA polymeráza syntézu mRNA z genomických RNA templátov a následne dochádza k translácii vírusových proteínov a replikácii RNA, ktorá prebieha v cytoplazme, tak ako u všetkých RNA vírusov. Tento proces je vzhľadom na obojakú polaritu genomovej RNA relatívne komplikovaný.

Arenavírusy využívajú pomerne ojedinelý mechanizmus replikácie s tzv. ambisense stratégiou. Oba segmenty RNA obsahujú dva gény, pričom majú vzájomne obrátenú polaritu. Na segmente S je gén pre GP-C prekursor pozitívnej polarity, kým gén pre nukleoproteín je negatívnej polarity. Na segmente L je gén pre Z proteín pozitívnej polarity a gén pre L proteín negatívnej polarity. Na replikáciu využívajú RNA-závislú RNA polymerázu, ktorá je asociovaná s nukleoproteínom a je prítomná vo virióne. Ako prvá sa transkribuje negatívna časť vlákna (NP a L proteín), a to priamou transkripciou genomovej RNA, následne sa nepriamou transkripciou, prostredníctvom antigenómovej RNA, transkribujú gény ležiace na pozitívnej časti genomovej RNA (GP-C a Z

proteín). Takto vzniká viac druhov mRNA so subgenomickou dĺžkou. Vznik antigenomickej RNA je súčasťou replikácie genomovej RNA, ktorá beží v slede: genomová RNA – antigenómová RNA – genomová RNA. Tento mechanizmus platí pre oba segmenty L a S nezávisle (Kunz a de la Torre, 2005). Prekursorový glykoproteín GP-C sa posttranslačne štiepi na produkty GP-1 a GP-2 (Wright *et al.*, 1990) a tieto sú následne transportované na bunkovú membránu. Na membráne sa cytoplazmatický koniec GP-2 asociuje s NP a ten s proteínom Z. Vírusy dozrievajú pučaním na povrchu infikovanej bunky (Clegg *et al.*, 2000), často spôsobujú stenčenie membrány a vznik agregátov ribozómov na strane pučania.

Výnimočnou vlastnosťou arenavírusov je schopnosť produkovať vysoké hladiny vírusu s minimálnym poškodením hostiteľských buniek a minimálnymi zásahmi do bunkového metabolizmu.

## Patogenéza a prenos LCMV

LCMV je necytopatický RNA vírus, ktorého prirodzeným hostiteľom a rezervoárom je myš domová (*Mus musculus*), ale úspešne môže byť prenesený aj na morčatá, škrečky, potkany, psy, opice, kuracie embryá, ale i na človeka. Ľudia sa infikujú pri kontakte s infikovanými hlodavcami alebo intranazálne, inhaláciou vírusu z aerosólu a tiež perorálne, priamym kontaktom s exkrementami kontaminovanými infekčným vírusom. Aerosóly z infikovaného moču hlodavca sú pravdepodobne najdôležitejším spôsobom prenosu choroby (Obr. 2). Infekcie LCMV u ľudí prebiehajú v celej škále od asymptomatických nákaz, cez systémové infekcie, až po postihnutie centrálnej nervovej sústavy, ktoré sa môže vyvinúť až do fatálnej encefalitídy, aseptickkej meningitídy alebo meningoencefalitídy. Infekcia týmto vírusom počas tehotenstva je spojená so spontánnymi potratmi a kongenitálnymi malformáciami (Barton, 1993). K nákaze môže prísť aj prostredníctvom infikovaných orgánových transplantátov (Fischer *et al.*, 2006, Waggoner *et al.*, 2013).

Formovanie dlhotrvajúceho vzťahu medzi hostiteľom a vírusom znamená pre hostiteľa ťažké rozhodovanie. Silná imunitná odpoveď môže síce viesť k lepšej kontrole patogénu, ale niekedy môže taká odpoveď spôsobiť značné poškodenie tkaniva, takže je lepšie využiť slabú toleranciu.

Necytopatické vírusy, ku ktorým patrí aj LCMV, majú rozvinuté viaceré stratégie, ktorými sa vyhnú imunitnému systému hostiteľa a navodia perzistentnú infekciu v hostiteľovi. Akútna infekcia LCMV u dospelých myší obyčajne navodí odpoveď T-cytotoxických buniek, ktorá môže pôsobiť imunopatologicky. Avšak niektoré LCMV kmene [DOCILE (LCMV-D) alebo CI-13 Armstrong (CI-



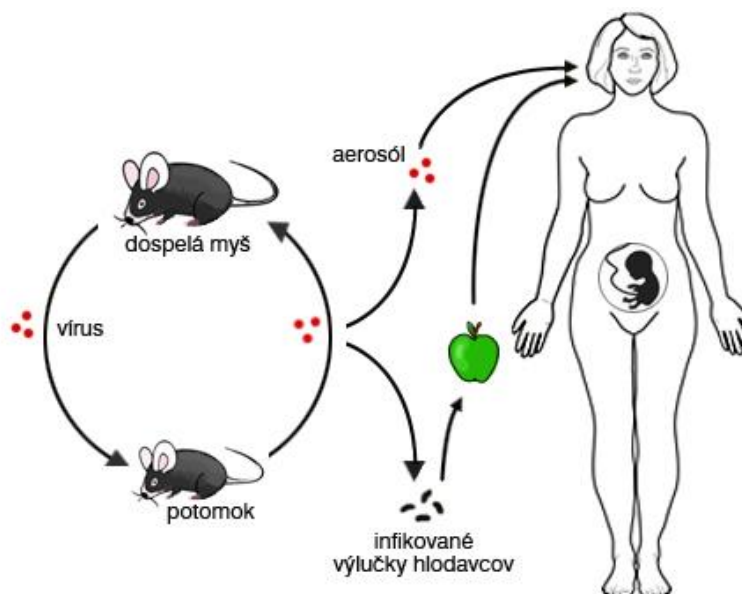
13 Arm)] získané z infikovaných myší môžu smerovať od akútnej infekcii k perzistentnej bez toho, aby spôsobovali rôzne imunopatologické ochorenia.

Sklon k perzistencii sa dáva do vzťahu s tropizmom, rýchlosťou šírenia vírusu a mutáciami vírusu. Rôzne

kmene LCMV u infikovaných myší sa podstatne líšia pokiaľ ide o koncentráciu detegovateľných infekčných vírusov v tkanivách, množstva a času objavenia sa anti-LCMV protilátok a rozvojom chorôb asociovaných s týmto vírusom (Oldstone, 1996).

**Obr. 2: Schéma infekcie vírusom lymfocytárnej choriomeningitídy.**

Vírus koluje v populácii prirodzeného hostiteľa (*Mus musculus*). Človek sa infikuje intranazálne aerosólom alebo perorálne po kontakte s vodou a potravinami, ktoré sú kontaminované infikovanými výlučkami myší. V prípade infekcie tehotnej ženy môže dôjsť k prenosu vírusu z matky na plod.



Jedným z hlavných prejavov perzistencie vírusu je porucha normálnej homeostázy hostiteľa, v dôsledku čoho vznikne ochorenie, ktoré nespôsobuje deštrukciu (zabitie) infikovanej bunky. Perzistentne infikované bunky majú rovnakú morfológiu ako neinfikované bunky. Perzistentná infekcia *in vitro* má podobný charakter ako perzistentná infekcia *in vivo*. Je charakteristická zníženým titrom vírusu, obmedzeným hromadením vírusového glykoproteínu na povrchu infikovaných buniek a tvorbou LCMV – špecifických, defektných, interferujúcich partikul, ktoré sa objavujú veľmi rýchlo po začatí infekcie (Buchmeier et al., 1980). Ak sú myši infikované *in utero* alebo pri narodení vírusom LCM, vírus navodí dlhoživotnú perzistenciu takmer v každom tkanive (slezina, týmus, lymfatické uzliny, pečeň, srdce, obličky, CNS) (Fazakerley, 1991).

V perzistentnej vírusovej infekcii, ktorá začala *in utero*, pri pôrode, alebo počas dospelosti, bol v prirodzených myších modeloch pozorovaný nedostatok voľne cirkulujúcich protilátok, čo bolo spôsobené tým, že protilátky boli miesto putovania voľne v krvi viazané v komplexe na vírus a vírusové antigény formujú imunokomplexy vírusu s protilátkami. A keďže perzistentné infekcie sú charakterizované nadbytkom vírusových antigénov, nie je prekvapujúce, že voľné protilátky sú ťažko detekovateľné. Zaujímavé je, že také cirkulujúce vírus-antivírusové imunokomplexy sú infekčné, prispievajú k udržia-

vaniu perzistencie a často presmerovávajú infekciu na bunky, ktoré normálne nie sú na vírus náchylné, pretože preňho nemajú dostatok receptorov. Detekcia vírus-antivírusových imunokomplexov môže byť použitá ako znak perzistentnej infekcie vo väčšine, ak nie vo všetkých takýchto infekciách u zvierat a ľudí (Whitton a Oldstone, 2001).

## LCMV a imunitná odpoveď

Humorálna (protilátková) a bunková (T-lymfocytová) odpoveď sú dva hlavné antigén-špecifické efektorové systémy, ktorými imunitný systém rozlišuje vírusovú infekciu. Protilátky rozpoznávajú voľný vírus alebo vírusom infikované bunky. Cytotoxické T lymfocyty (CTL) interagujú s vírusovými antigénmi, ktoré sú vo forme krátkych peptidov viazané na hostiteľské bunky a prezentované HLA I molekulami (Bjorkman et al., 1987). Takéto rozpoznávanie je sprostredkované transmembránovými proteínmi – T-bunkovými receptormi, zloženými z  $\alpha$  a  $\beta$  reťazca (DeLisi et al., 1985). Interakcia TCR s komplexom peptid-HLA I iniciuje sériu procesov vedúcich k deštrukcii vírusom-infikovaných buniek (Moseman a McGavern, 2013).

Prirodzene prezentované peptidy majú väčšinou dĺžku 8 až 9 aminokyselín. Objavili sa však aj dlhšie a to 10 až 11 aminokyselinové peptidy (Gairin et al., 1994). Pepti-



dy môžu zaujať rôznu konformáciu potrebnú na začle-  
nenie sa do HLA viažuceho žliabku. Rôzne štúdie odha-  
lili, že aminokyselinové sekvencie peptidov z rôznych  
vírusových proteínov sú odlišné pre každú HLA alelu  
(Michael *et al.*, 1991). Hoci tento polymorfizmus prav-  
depodobne dáva druhom selektívnu výhodu pre prežitie  
v boji s infekčnými mikroorganizmami, má aj nevýhodu  
v tom, že sťažuje vývoj CTL vakcín. Pravdepodobne by  
takéto vakcíny potrebovali inkorporáciu prinajmenšom  
jedného CTL epitopu pre každý z odlišných HLA haplo-  
typov až by vytvorili konštrukciu akýchsi „náhrdelníko-  
vých“ epitopov (Oldstone *et al.*, 1992).

Napriek týmto ťažkostiam, možnosť použiť CTL epitopy  
na imunitnú ochranu má aj niekoľko lákavých výhod.  
Prvá, kým protilátky vo všeobecnosti pôsobia, len keď  
sú nasmerované priamo na štruktúrny vírusový kompo-  
nent, CTL môžu pôsobiť bez ohľadu na charakter terčo-  
vého proteínu. Boli detegované takmer voči všetkým  
testovaným vírusovým proteínom. Druhá, CTL odpoveď  
môže poskytnúť lepšie šance pri boji s chorobami, než  
protilátková, hoci rovnováha medzi imunopatológiou  
spôsobenou CTL a vyčistením vírusu je veľakrát veľmi  
krehká a imunitná odpoveď môže byť v konečnom dô-  
sledku pre hostiteľa škodlivá. Tretia, kým je protilátková  
odpoveď na vírusovú infekciu druhovo špecifická, CTL  
odpoveď je bežne krížovo reaktívna a preto jedna vak-  
cína môže indukovať ochranu voči rozdielnym sérolo-  
gickým druhom vírusu (Whitton *et al.*, 1989).

LCMV je jeden z klasických modelov vírusovej imunity.  
Jedna z jeho mnohých vlastností je, že indukuje obrov-  
skú a tiež ľahko merateľnú imunitnú odpoveď. Vrchol  
imunitnej odpovede je na 6. až 8. deň po infekcii, keď  
môže byť reaktivovaných 80 – 90 % myších CD8+ T  
buniek (Masopust *et al.*, 2007). Vďaka tomu je relatívne  
jednoduché detegovať jednotlivé komponenty imunitnej  
odpovede. Inými slovami, počas CTL odpovede na  
LCMV môžeme ľahko definovať individuálne peptidové  
epitopy. Väčšina CTL má spoločnú špecificitu pre jeden  
epitop na vírusovom NP. Rôzne analýzy ukazujú, že  
kým sa CTL klony delia o spoločný epitop, odlišujú sa  
v ich schopnosti rozpoznávať bunky infikované príbuz-  
ným, ale rôznym druhom LCMV. Toto poznanie pouka-  
zuje na to, že CTL vakcíny by na dosiahnutie optimálnej  
efektivity nemali obsahovať len vírusovú sekvenciu,  
ktorá nesie CTL odpoveď na infikovanú bunku. Mali by  
obsahovať aj takú sekvenciu, ktorá je vyberaná na zá-  
klade špecifičnosti indukovaných CTL. Tá má byť taká,  
že maximalizuje šance pre rozpoznanie rôznych séroty-  
pových druhov (Whitton *et al.*, 1989).

Identifikácia CTL epitopov z nukleoproteínu LCMV mô-  
že slúžiť ako základ na vytvorenie vakcíny. Tiež je dôle-  
žitá pre vývoj diagnostického testu a môže slúžiť aj na

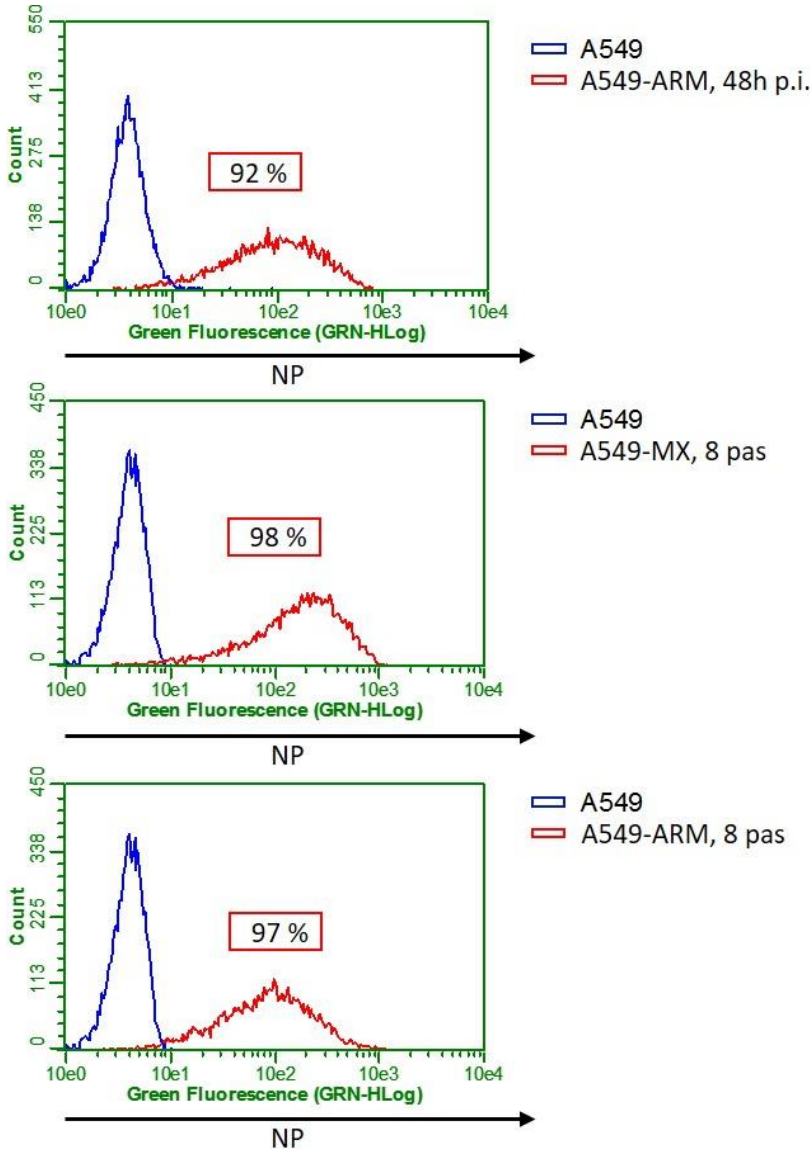
stanovenie kvality imunitnej odpovede (Sette a Fikes.,  
2003).

V rámci projektu „Centrum excelentnosti pre využitie  
informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a  
pre zlepšenie kvality života“ sa časť nášho výskumu  
venovala detekcii nukleoproteínu LCMV v perzistentne  
alebo akútne infikovaných bunkách pomocou prietoko-  
vej cytometrie s využitím zariadenia Guava EasyCyte,  
ktoré umožňuje študovať rôzne bunkové parametre a  
sledovať prítomnosť bunkových proteínov a vírusových  
antigénov v bunkách. Detekciu NP LCMV sme uskutoč-  
nili pomocou monoklonových protilátok pripravených  
v našom laboratóriu. Tieto protilátky špecificky reagujú  
s NP LCMV, pričom rozpoznávajú konformačné epitopy  
závislé od správneho skladania proteínu (Reiserová et  
al, 1999). Keďže prietoková cytometria sa môže využiť  
na analýzu buniek fixovaných etanolom, pri ktorej sa  
štruktúra proteínov do značnej miery zachová, je to  
vhodná metóda na detekciu NP pomocou našich kon-  
formačne-závislých protilátok. Za účelom analýzy per-  
zistentnej infekcie vírusom LCMV sme bunky A549 (deri-  
vované z ľudského alveolárneho karcinómu) infikovali  
pomocou bezbunkového extraktu kmeňom MX, ktorý  
bol identifikovaný v našom laboratóriu, a tiež kmeňom  
Armstrong (ARM). Takto infikované bunky sme kultivo-  
vali počas 4 týždňov (8 pasáží), aby v nich vírus nasto-  
lil perzistenciu. V prípade sledovania priebehu akútnej  
infekcie sme A549 bunky infikovali kmeňom ARM a kul-  
tivovali len 48 hodín. Následne sme ich trypsinizovali,  
fixovali etanolom a inkubovali s myšou monoklonovou  
protilátkou špecifickou pre vírusový nukleoproteín. Po  
premytí sme k bunkám pridali fluoresceínom značenú  
anti-myšiu sekundárnu protilátku a pomocou prietokovej  
cytometrie sme detegovali percento buniek, v ktorých sa  
nachádzal vírus. Cytometrická analýza dokázala, že  
hoci je v ôsmej pasáži počet infikovaných buniek veľmi  
podobný (98 % vs 97 %) (Graf 1), intenzita signálu v  
prípade kmeňa MX je takmer dvojnásobná v porovnaní  
s kmeňom ARM (164 AU vs 89 AU). Na základe týchto  
výsledkov môžeme konštatovať, že priebeh perzistent-  
nej infekcie kmeňa MX a ARM sa líši. Kým nepriama  
imunofluorescencia vizuálne zobrazuje lokalizáciu nuk-  
leoproteínu LCMV v cytoplazme infikovaných buniek,  
ale neposkytuje žiadny kvantitatívny údaj (Obr. 3), pri-  
etoková cytometria dokáže odhaliť nielen proporciu bu-  
niek, ktoré obsahujú vírusový antigén, ale aj jeho rela-  
tívne množstvo.

Tento prístup nám umožnil získať výsledky, ktoré sú  
podkladom pre ďalšie experimenty odhaľujúce vplyv  
vírusu na hostiteľskú bunku a tiež pre štúdium protivíru-  
sových látok a poukázal na význam získaného zariade-  
nia pre výskum v oblasti virológie.

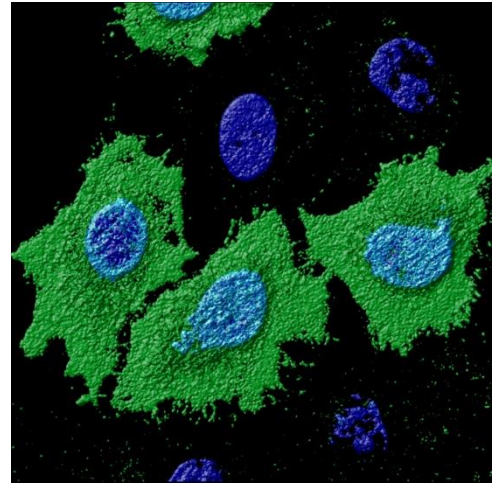
**Graf 1: Analýza infekcie nádorových buniek vírusom LCMV pomocou detekcie nukleoproteínu prietokovou cytometriou.**

Bunky A549 derivované z pľúcneho karcinómu boli akútne infikované kmeňom Armstrong (ARM) LCMV a perzistentne infikované (8 pasáží) s kmeňom ARM a MX. Následne boli bunky fixované etanolom a inkubované s protilátkou špecifickou pre vírusový nukleoproteín (NP). Detekcia bola robená pomocou sekundárnych anti-myších protilátok konjugovaných s fluoresceínom. Histogram ukazuje percento infikovaných buniek v porovnaní s kontrolnými neinfikovanými bunkami. (p.i. – po infekcii; pas – pasáž)



**Obr. 3: Zobrazenie nukleoproteínu LCMV pomocou nepriamej imunofluorescencie a konfokálnej mikroskopie.**

Bunky perzistentne infikované kmeňom MX LCMV narastené v hustej jednovrstve boli fixované metanolom a opracované primárnou a sekundárnou protilátkou ako je uvedené pri Grafe 1. Obrázok ukazuje silný zelený fluorescenčný signál v cytoplazme infikovaných buniek. Jadrá buniek sú zafarbené na modro.



**Záver**

Je všeobecne známe, že vírus lymfocytovej choriomeningitídy často spôsobuje infekcie u myší. Jeho spojitosť s ochoreniami u ľudí sa do značnej miery podceňuje. Je to spôsobené tým, že LCMV u ľudí vyvoláva hlavne asymptomatické infekcie, prípadne infekcie so symptómami pripomínajúcimi chrípku (horúčka, myalgia, bolesti hlavy, nevoľnosť, vracanie) a len v nepatrných prípadoch sa môže prejavíť ako vážne ochorenie (meningitída, meningoencefalitída).

Infekcie u imunosuprimovaných pacientov po transplantácii, nám však pripomínajú, že vírus môže byť veľmi nebezpečný (Lapošová et al, 2013). Okrem toho infekcia LCMV v prenatálnom období má negatívny vplyv na prežívanie a zdravie plodu. Ukazuje sa, že kongenitálna infekcia LCMV je oveľa bežnejšia ako sa uvádza. Identifikácia ľudských CTL epitopov je preto veľmi dôležitá hlavne pre vývoj diagnostických prostriedkov a v neposlednom rade môže slúžiť na určenie kvality imunitnej odpovede, na definovanie korelácií medzi ochranou a imunopatológiou a výber nových vakcín.

## Literatúra

- BARTON, L. L., BUDD, S. C., MORFITT, W. S., PETERS, C. J., KSIAZEK, T. G., SCHINDLER, R. F., YOSHINO, M. T. (1993) *Sequencing studies of pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA*. *J. Virol.* 52:897-904.
- BISHOP, D. H. L. (1990) Arenaviridae and Their Replication. In: FIELDS B. N., KNIPE D. M., HOWLEY P. M. *Fields Virology*, 2nd edition, Raven Press, New York, pp. 1231-1239.
- BJORKMAN, P. J., M. A. SAPER, B. SAMRAOUI, W. S. BENNETT, J. L. STROMINGER, and D. C. WILEY. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-511.
- BOWEN, M. D., PETERS, C. J., NICHOL, S. T. (1997) Phylogenetic Analysis of the Arenaviridae: Patterns of Virus Evolution and Evidence for Cospeciation between Arenaviruses and Their Rodent Hosts. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8(3):301-316.
- BUCHMEIER, M. J., WELSH, R. M., DUTKO, F. J., OLDSTONE, M. B. A. (1980) The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Adv. Immunol.* 30:275-331.
- BUCHMEIER, M. J., PAREKH, B. S. (1987) Protein structure and expression among arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 133:41-57.
- BUCHMEIER, M. J., BOWEN, M. D., PETERS, C. J. (2001) Arenaviridae: the virus and their replication. In: KNIPE D. M., HOWLEY P. M. *Fields Virology*, 4th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1635-1668.
- CAO, W., HENRY, M. D., BORROW, P., YAMADA, H., ELDER, J. H., RAVKOV, E. V., NICHOL, S. T., COMPANS, R. W., CAMPBELL, K. P., OLDSTONE, M. B. (1998) Identification of Alpha Distroglycan as a Receptor for Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Lassa Fever Virus. *Science* 282(5396):2079-2081.
- CLEGG, J. C. S., BOWEN, M. D., BUCHMEIER, M. J., GONZALEZ J.-P., LUKASHEVICH, I. S., PETERS, C. J., RICO-HESE, R., ROMANOWSKI, V. (2000) Family Arenaviridae. In: van REGENMORTEL, M. H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., CARSTENS, E. B., ESTES, M. K., LEMON, S. M., MANILOFF, J., MAYO, M. A., MCGEOCH, D. J., PRINGLE, C. R., WICKNER, R. B. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*, Academic Press, San Diego, California, pp. 633-640.
- CORNU T. I., DE LA TORRE J. C. (2001) RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. *J. Virol.* 75(19):9415-9426.
- DELISI, C., BERZOFKY, J. A. (1985). T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7048-7052.
- FISCHER, S. A., GRAHAM, M. B., KUEHNERT, M. J., KOTTON, C. N., SRINIVASAN, A., MARTY, F. M., COMER, J. A., GUARNER, J., PADDOCK, C. D., DEMEO, D. L., SHIEH, W.-J., ERICKSON, B. R., BANDY, U., DEMARIA, A. JR., DAVIS, J. P., DELMONICO, F. L., PAVLIN, B., LIKOS, A., VINCENT, M. J., SEALY, T. K., GOLDSMITH, C. S., JERNIGAN, D. B., ROLLIN, P. E., PACKARD, M. M., PATEL, M., ROWLAND, C., HELFAND, R. F., NICHOL, S. T., FISHMAN, J. A., KSIAZEK, T., ZAKI, S. R. The LCMV in Transplant Recipients Investigation Team (2006) Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354(21):2235-2249.
- GAIRIN, J. E., MAZARGUIL, H., HUDRISIER, D. and MICHAEL B. A. OLDSTONE. (1994). Optimal Lymphocytic Choriomeningitis Virus Sequences Restricted by H-2Db Major Histocompatibility Complex Class I Molecules and Presented to Cytotoxic T Lymphocytes. *Journal of Virology*, p.2297-2305.
- KUNZ, S., DE LA TORRE, J. C. (2005) Novel Antiviral Strategies to Combat Human Arenavirus Infections. *Curr. Mol. Med.* 5:735-751.
- LAPOŠOVÁ, K., PASTOREKOVÁ, S., TOMÁŠKOVÁ, J. Lymphocytic choriomeningitis virus: invisible but not innocent. *Acta Virol.* 2013;57(2):160-70.
- OLDSTONE, M. B. A., TISHON, A., GECKELER, R., LEWICKI, H., WHITTON, J. L. (1991). A common antiviral cytotoxic T-lymphocyte epitope for diverse major histocompatibility complex haplotypes: Implications for vaccination. *Immunology* 89: 2752-2755.
- MOSEMAN, E. A., MCGAVERN, D. B. The great balancing act: regulation and fate of antiviral T-cell interactions. *Immunol. Rev.* 2013 Sep;255(1):110-24.
- OLDSTONE, M. B. A., TISHON, A., GECKELER, R., LEWICKI, H. and WHITTON, J. L. (1992). A common antiviral cytotoxic T-lymphocyte epitope for diverse major histocompatibility haplotypes: implications for vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2752-2755.
- PASQUATO, A., KUNZ, S. Novel drug discovery approaches for treating arenavirus infections. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(4):383-93.
- PEREZ, M., DE LA TORRE, J. C. (2003) Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 77:1184-1194.
- RADOSHITZKY, S. R., BÀO, Y., BUCHMEIER, M. J., CHARREL, R. N., CLAWSON, A. N., CLEGG, C. S., DERISI, J. L., EMONET, S., GONZALEZ, J. P., KUHN, J. H., LUKASHEVICH, I. S., PETERS, C. J., ROMANOWSKI, V., SALVATO, M. S., STENGLIN, M. D., DE LA TORRE, J. C. (2015): Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* 2015 Jul;160(7):1851-74.
- REISEROVÁ, L., KALUZOVÁ, M., KALUZ, S., WILLIS, A. C., ZÁVADA, J., ZÁVODSKÁ, E., ZÁVADOVÁ, Z., ČIAMPOR, F., PASTOREK, J., PASTOREKOVÁ, S. (1999) Identification of MaTu-MX agent as a new strain of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and serological indication of horizontal spread of LCMV in human population. *Virology* 257:73-83.
- SETTE, A., and J. FIKES. (2003). Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr. Opin. Immunol.* 15:461-470.
- SOUTHERN, P. J. (1996) Arenaviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1505-1519.
- WAGGONER, J. J., SODA, E. A., DERESINSKI, S. Rare and emerging viral infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2013 Oct;57(8):1182-8.
- WHITTON, J. L., TISHON, A., LEWICKIE, H., GEBHARD, J., COOK, T., SALVATO, M., JOLY, E., and OLDSTONE, M. B. A. (1989). Molecular Analyses of a Five-Amino-Acid Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Epitope: an Immunodominant Region Which Induces Nonreciprocal CTL Cross-Reactivity. *Journal of Virology*, p. 4303-4310.
- WHITTON, J. L., OLDSTONE, M. B. A. (2001) The immune response to virus. In: KNIPE, D., HOWLEY, P. M. *Fields Virology*, 4th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp.285-320.
- WRIGHT, K. E., SPIRO, R. C., BURNS, J. W., BUCHMEIER, M. J. (1990) Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 177(1):175-183.

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekul v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.





# Povrchové odštiepovanie extracelulárnych domén proteínov ako významný regulačný fenomén

Ivana Vidličková<sup>1</sup>Miriam Zaťovičová<sup>2</sup>Silvia Pastoreková<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Virologický ústav  
Biomedicínske centrum SAV  
Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava  
Slovensko

<sup>1</sup>ivana.vidlickova@savba.sk

## Surface proteolysis of protein ectodomains as an important regulatory phenomenon

### Abstract

Posttranslational shedding is an important regulatory mechanism that affects many receptor and adhesive transmembrane proteins. It causes rapid decrease of the abundance of cell surface proteins, resulting in direct inhibition of function linked with protein localization. On the other hand, shedding liberates soluble ectodomain of the protein with own effector potential and can be also a prerequisite for operation of cytoplasmic part in signal transduction. It is metalloproteinase-mediated, highly regulated process, responding to multiple physiological stimuli. Shedding typically modulates cellular processes, such as migration, adhesion and proliferation and participates in development, inflammation and cancer. Carbonic anhydrase IX (CA IX) is a transmembrane protein, functionally involved in two phenomena important in development of tumor phenotype – pH regulation and control of cell adhesion. CA IX extracellular domain is shed in metalloproteinase – dependent manner and is detectable in body fluids of cancer patients. Potential biological function, interaction partners, receptor structure and cleavage site of CA IX ectodomain have not been discovered so far. We evaluated shedding of CA IX using flow cytometry and found that activation of ectodomain cleavage leads to depletion of CA IX from cell surface. We propose that this may affect the ability of cells to adapt to changes in tumor microenvironment.

### Key words

Shedding, carbonic anhydrase IX, ectodomain, ADAM, ectodomain biological function, cleavage site

## Úvod

Jedným z významných mechanizmov bunkovej odpovede na exogénne stimuly je znižovanie hustoty transmembránových proteínov na bunkovom povrchu. Týmto procesom bývajú zasiahnuté najmä receptory, regulačné proteíny a adhezívne molekuly. K poklesu hustoty proteínov na cytoplazmatickej membráne môže dochádzať dvoma základnými spôsobmi.

Prvým z nich je zníženie množstva povrchového proteínu, ktoré je závislé od ligandu a založené na zvýšenej endocytóze. Komplexy pozostávajúce z ligandu a receptora sú internalizované v periférnych endozómoch a následne môžu byť degradované lyzozomálnymi proteázami. Ďalším bunkovým mechanizmom zníženia množstva proteínu na membráne je jeho redukcia nezávislá je od ligandu a zvyčajne býva sprostredkovaná

proteázami. Výsledkom pôsobenia týchto enzýmov je uvoľnenie (odštiepenie, z ang. „shedding“) veľkej časti, zvyčajne celej extracelulárnej oblasti (ektodoména), daného proteínu (Dello Sbarba and Rovida, 2002). Odstránením ektodomény stráca proteín svoju pôvodnú funkciu, či už receptorovú, enzymatickú alebo funkciu v medzibunkovej adhezii. Zároveň však sheddingom vzniká solubilná forma daného proteínu, ktorej biologická funkcia sa môže líšiť od funkcie membránovo-viazanej formy daného proteínu. Okrem vplyvu v extracelulárnej oblasti môže mať shedding dopad aj na cytoplazmatickú časť transmembránových proteínov. Pre niektoré z nich je totiž predpokladom spustenia procesu tzv. regulovanej intramembránovej proteolýzy (Brown et al., 2000), vďaka ktorej môže dôjsť k uvoľneniu cytoplazmatickej domény proteínu a tým k spusteniu jej signálnych funkcií vnútri bunky.

Odštiepovanie membránovo viazaných cytokínov a rastových faktorov môže byť podstatné pre rôzne typy bunkovej signalizácie. V prvom rade môže byť predpokladom pre uvoľnenie ligandu, ktorý sa viaže na receptor na tej istej bunke – autokrinná signalizácia, alebo na inej bunke – parakrinná signalizácia. Proteolytická úprava jedného proteínu môže aktivovať iný, na neho naviazaný, proteín, ktorý zostáva membránovo viazaný a spustiť tak signalizáciu. Na druhej strane môže byť štiepením ligand odstránený, čo zastaví jeho funkciu v signalizácii. Podobne môžu byť odštiepené aj receptory, čím dochádza k zníženiu signálnej kapacity na bunkovom povrchu. Solubilné receptory zároveň môžu vyvážať z prostredia ligand a brániť tak jeho naviazaniu na aktívne receptory na membráne (Edwards et al., 2008). Odhady o množstve odštiepaných molekúl sa líšia, rôzne zdroje uvádzajú, že shedding podliehajú 2 – 4 % proteínov (Arribas and Massagu, 1995; Hayashida et al., 2010) na bunkovom povrchu, faktom však zostáva, že je takto upravovaná široká paleta proteínov zahŕňajúca cytokíny, rastové faktory, adhezívne bunkové molekuly, enzýmy a viaceré iné proteíny.



## Enzymy uskutočňujúce odštiepovanie proteínových ektodomén

Odštiepovanie extracelulárnych domén je proces katalyzovaný proteázami (Arribas et al., 1996). Z proteáz sa ho zúčastňujú hlavne matrixové metaloproteinázy (MMP) a ADAM proteíny (a disintegrin and metalloproteinase). Špecifické proteázy sprostredkujúce shedding bývajú označované ako „konvertázy“, „sekretázy“ a v poslednom období najmä pojmom „sheddázy“.

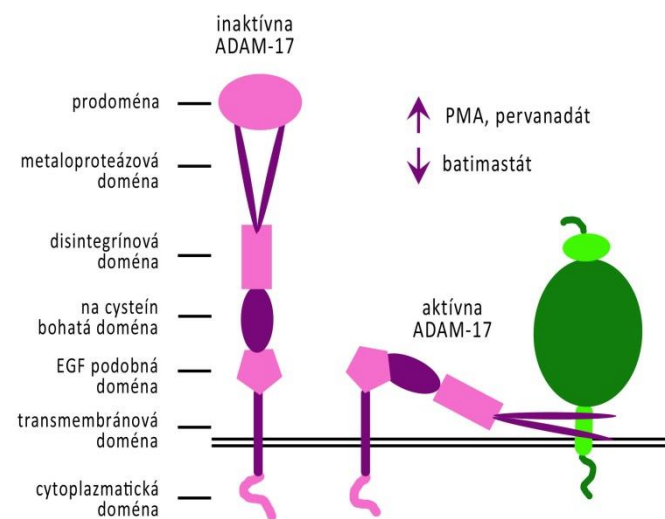
MMP sú na zinku závislé endoproteinázy, ktoré sa zúčastňujú remodelácie a degradácie extracelulárneho matrixu. Ich enzymatická aktivita je prísne regulovaná. Vznikajú ako inaktívne zymogény, na aktiváciu ktorých je potrebné odštiepenie prodomény. Druhý stupeň regulácie zabezpečujú ich endogénne inhibítory – TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases). Vyznačujú sa doménovou štruktúrou, ktorá je závislá od konkrétnej podskupiny MMP, ale základ tvorí metaloproteinázová doména a prodoména u inaktívnych foriem. Viaceré z týchto proteináz boli identifikované ako sheddázy konkrétnych transmembránových proteínov. Napríklad, MMP-9 sa môže podieľať na sheddingu E-kadherínu, ICAM-1 a syndekánov -1 a -4 (Brule et al., 2006; Fiore et al., 2002; Symowicz et al., 2007), MMP-7 je schopná odštiepovať TNF $\alpha$ , FasL, či HB-EGF (Haro et al., 2000; Powell et al., 1999; Yu et al., 2002). Mnohé metaloproteinázy sú teda schopné plniť funkciu sheddáz, ale v podmienkach *in vivo* je shedding pravdepodobne špecifický proces, čo je zabezpečené vzájomným pôsobením substrátu, sheddáz, extracelulárnych a intracelulárnych regulačných faktorov.

Rodina ADAM proteínov obsahuje transmembránové a sekretované proteíny s úlohou v bunkovej adhezii. Zároveň do tejto rodiny patrí prevažná väčšina proteáz zapojených v proteolytickom štiepení ektodomén, čo z nich robí dôležité regulačné proteíny. Správna funkcia ADAM proteínov je nevyhnutná pre mnohé biologické procesy vrátane bunkovej migrácie, vývinu svalov a nervového systému, či imunitnej odpovede organizmu, ale aj nádorovej progresie (Edwards et al., 2008). Na N-konci ADAM proteáz sa nachádza signálna sekvencia, ktorá ich nasmeruje do sekrečnej dráhy, nasleduje prodoména s funkciou v maturácii proteínu, metaloproteinázová doména, disintegrínová doména, na cysteín bohatá doména, EGF podobná doména, transmembránová doména a cytoplazmatický chvost na C-konci (Obr. 1). Pro-doména zabezpečuje správne skladanie proteínu (Roghani et al., 1999). Udržiava enzým v inaktívnom stave, kým nie je odstránená pro-proteín konvertázami (PC) (Lum et al., 1998). Z hľadiska enzymovej aktivity je kľúčová zinok-viažuca metaloproteinázová doména, ktorá zabezpečuje hydrolytické štiepenie proteínových

substrátov. Disintegrínová doména môže spĺňať úlohu v medzibunkovej adhezii (White, 2003). Nasledujúca doména bohatá na cysteín sa podieľa nielen na regulácii katalytickej aktivity, ale zúčastňuje sa aj rozpoznania substrátu a odstránenia prodomény počas maturácie (Milla et al., 1999; Reddy et al., 2000; Smith et al., 2002). Cytoplazmatický chvost ADAM proteínov obsahuje potenciálne miesta pre väzbu proteínov s SH3 doménou, ako aj predpokladané fosforylačné miesta. To naznačuje jeho možnú úlohu v regulácii katalytickej aktivity a funkcie týchto proteináz (Seals and Courtneidge, 2003).

Ľudský genóm obsahuje 25 génov pre ADAM proteíny, 4 z nich sú pseudogény. Zo zvyšných 21 vznikajúcich ľudských ADAM proteínov len 13 obsahuje v metaloproteinázovej doméne charakteristické aktívne miesto repolyzínového typu, ktoré je predpokladom katalytickej aktivity enzýmu (Bode et al., 1993). Proteázovú funkciu majú nasledovné ADAM proteíny: ADAM-8, -9, -10, -12, -15, -17, -19, -20, -21, -28, -30, -33 a ADAMDEC-1. Ostatní zástupcovia tejto proteínovej rodiny plnia pravdepodobne úlohy v proteín-proteínových interakciách a pri skladaní proteínov (Edwards et al., 2008).

Obr. 1: Štruktúra ADAM17



Aktivita ADAM proteínáz je regulovaná rozličnými stimulmi, napr. aktivátormi PKC, aktivátormi G-proteínových receptorov a Ca ionofórmami. Mechanizmus tejto regulácie zatiaľ nie je celkom objasnený, ale je pravdepodobne spojený s modifikáciami v cytoplazmatickom chvoste samotných enzýmov (Seals and Courtneidge, 2003). ADAM proteíny sú vo všeobecnosti citlivé aj na TIMP inhibítory, katalytická aktivita ADAM-10 je napríklad inhibovaná TIMP-1 a TIMP-3 (Amour et al., 2000). ADAM-17 bola v roku 1997 opísaná súčasne dvoma výskumnými tímami (Black et al., 1997; Moss et al., 1997) ako enzým odštiepujúci membránovo viazaný

prekurzor nádorového nekrotizujúceho faktora (pro-TNF $\alpha$ ) – TACE. Išlo o veľmi významný objav, pretože enzým zodpovedný za solubilizáciu tohto cytokínu bol hľadaný už dlho. Zároveň bola takto prvýkrát potvrdená úloha ADAM proteínázy v shedding, dovtedy boli tieto proteíny považované iba za adhezívne molekuly. Do súčasnosti bolo identifikovaných viac ako 76 rôznych substrátov ADAM-17 (Scheller et al., 2011), nielen zo skupiny cytokínov, ale aj ligandov, receptorov a adhezívnych molekúl, ktoré sú aktivované alebo inaktivované štiepením ADAM-17. Je to teda sheddáža s najväčším množstvom substrátov a najväčším známym regulačným vplyvom. Preto nie je prekvapujúce, že jej deregulácia je spájaná s mnohými patológiami ako reumatoidná artritída, zápalové ochorenia čriev a pľúc, psoriáza, Alzheimerova choroba, skleróza multiplex, vývinové choroby srdca, diabetes a viaceré typy nádorových ochorení (Gooz, 2010).

Funkčne ADAM-17 sheddáža zapojená najmä v regulácii imunitnej odpovede, regenerácie tkanív a EGFR signalizácie. Rodina receptorov epidermálneho rastového faktora (EGFR) môže viazať jedenásť rôznych ligandov. Všetky tieto ligandy sú pôvodne syntetizované ako membránovo viazané prekursor, ktoré sa stávajú funkčnými až po proteolytickom odštiepení. ADAM-17 je sheddážou väčšiny ligandov EGFR, konkrétne TGF $\alpha$ , amfiredulínu, HB-EGF, epiregulínu, neuregulínu a epigénu, a preto sa veľkou mierou podieľa na regulácii jednej z najdôležitejších signálnych dráh stavovcov (Reiss and Saftig, 2009). Ďalšou oblasťou, v ktorej je podstatná funkcia ADAM-17, je regulácia bunkových adhezívnych molekúl v imunitnej odpovedi. Odštiepuje proteíny, ktoré sa podieľajú na adhezii/deadhézii a migrácii leukocytov, ako napríklad VCAM-1 a ICAM-1 molekuly (Garton et al., 2003; Tsakadze et al., 2006). Už z týchto niekoľkých príkladov je zjavné, že shedding zabezpečený ADAM-17 je pre cieľové molekuly mechanizmom, ktorý má značný vplyv na ich funkciu.

Keďže shedding predstavuje významný regulačný nástroj, je prirodzené, že samotný podlieha prísnej kontrole. Indukciu shedding môžu navodiť mnohé stimuly: cytokíny, rastové faktory, PMA, pervanadát, ceramid, bakteriálne toxíny aj bunkový stres (Hayashida et al., 2010). Niektoré z nich pritom vyvolávajú globálnu aktiváciu shedding, iné sú zodpovedné len za aktiváciu shedding konkrétnych proteínov. Ako prvý kľúčový regulátor bola objavená proteín kináza C (PKC). U väčšiny odštiepaných proteínov bola dokázaná zvýšená aktivácia shedding pôsobením PMA (forbol 12-myristát-13-acetát) a práve PKC je aktivovaná forbol esterami, čo odhalilo jej úlohu v regulácii shedding (Arribas and Massagu, 1995). Medzi ďalšie kinázy, ktoré sú zapojené v regulácii shedding patria proteín tyrozín kinázy (PTK). Všeobecný inhibitor proteín tyrozín fosfatáz – pervanadát zvyšuje shedding niekoľkých pro-

teínov, napr. L1, syndekánov, angiotenzín konvertujúceho enzýmu (ACE). PTK inhibítory zároveň inhibujú shedding týchto molekúl (Gutwein et al., 2000; Subramanian et al., 1997). Aj keď je vplyv spomenutých kináz na aktiváciu shedding zjavný, zdá sa, že ho neindukujú priamo fosforyláciou štiepeného substrátu (Santhamma et al., 2004). Skôr sa zdá, že regulácia kinázami je sprostredkovaná fosforyláciou cytoplazmatickej oblasti sheddáz.

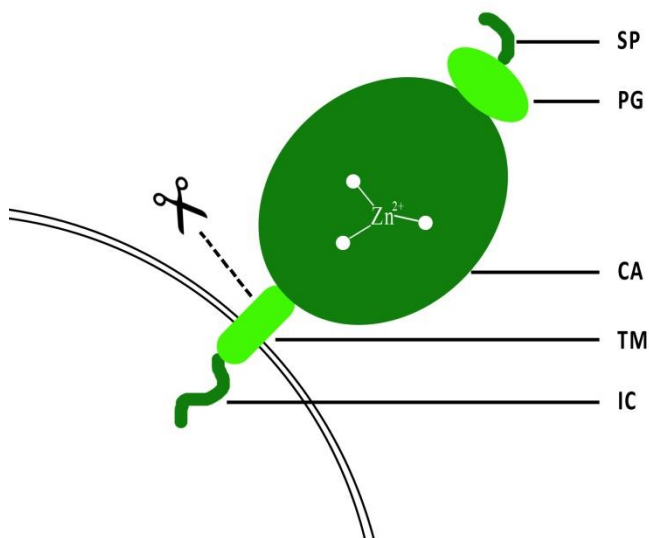
Už viac ako 15 rokov je známy fakt, že shedding je katalyzovaný špecifickými proteázami (Arribas et al., 1996), ale spôsob, akým si vyberajú ich substráty zostáva nejasný. Vo všeobecnosti k štiepeniu dochádza v tesnej blízkosti bunkového povrchu. Sekvenčná podobnosť v tejto oblasti sa však u sheddovaných proteínov nenašla a nebolo teda identifikované spoločné štiepne miesto. Súhrnne sa dá povedať, že transmembránové proteíny bývajú štiepené v tzv. „stopkovej“ oblasti medzi ich transmembránovým regiónom a zloženou extracelulárnou doménou (Ehlers et al., 1996).

## Karbonická anhydráza IX

Jedným zo substrátov proteázy ADAM-17 je transmembránový enzým karbonická anhydráza IX (angl. carbonic anhydrase IX, CA IX), ktorého expresia je asociovaná s nádormi. Je indukovaný hypoxiou (t.j. zníženou hladinou kyslíka v nádorových tkanivách) a zohráva kľúčovú úlohu v regulácii pH a v kontrole migrácie a invazívnosti, čo sú procesy podporujúce nádorovú progresiu.

Proteín CA IX má molekulovú hmotnosť 58/54 kDa a transmembránovú lokalizáciu, pričom prevažná časť molekuly sa nachádza v extracelulárnom priestore (Pastoreková et al., 1992). Táto časť pozostáva z CA domény, ktorá zabezpečuje katalytickú funkciu a N-koncovú PG domény (proteoglykánom podobná oblasť), ktorá je unikátnou črtou CA IX, keďže sa nevyskytuje u žiadnej z ostatných karbonických anhydráz (Obr. 2). Transmembránový región TM vytvára prepojenie medzi katalytickou doménou a krátkym intracelulárnym chvostom IC v C-koncovú oblasti proteínu (Opavský et al., 1996; Pastorek et al., 1994). V oblasti CA domény sa nachádza evolučne konzervované katalytické centrum tvorené tromi zinok viažucimi histidínovými rezíduami, ako aj tri cysteínové rezíduá, ktoré sa podieľajú na tvorbe disulfidových mostíkov, tak v rámci molekuly CA IX, ako aj medzi molekulami tvoriacimi oligoméne formy proteínu (Alterio et al., 2009). Cytoplazmatický chvost obsahuje tri fosforylačné miesta zapojené do regulácie katalytickej aktivity extracelulárnej oblasti proteínu. Pre schopnosť CA IX podieľať sa na acidifikácii extracelulárneho prostredia je nevyhnutná fosforylácia Thr<sup>443</sup> proteín kinázou A a súčasná defosforylácia Ser<sup>448</sup> (Ditte et al., 2011). Fosforylácia Tyr<sup>449</sup> je významná v signálnej dráhe Akt kinázy (Dorai et al., 2005).

Obr. 2: Štruktúra CA IX s naznačením pozície štiepneho miesta



V podmienkach nádorového mikroprostredia, v ktorých by v dôsledku zníženej dostupnosti kyslíka dochádzalo k hromadeniu laktátu a protónov vo vnútri buniek, enzým CA IX katalyzou reverzibilnej hydratácie oxidu uhličitého napomáha udržiavať neutrálne intracelulárne pH. Regulácia pH spočíva v tvorbe a aktívnom transporte bikarbonátového iónu do vnútra buniek. Tieto funkcie zabezpečuje metabolón – komplex proteínov, ktorý CA IX vytvára spolu s viacerými bikarbonátovými transportérmi (AE, NBC) (Morgan et al., 2007). Pri premene oxidu uhličitého okrem bikarbonátu vzniká aj protón vodíka, následkom čoho CA IX svojou katalytickou funkciou prispieva aj k acidifikácii extracelulárneho nádorového mikroprostredia (Švastová et al., 2004). Acidóza prispieva k zníženiu bunkovej adhézie a k zvýšeniu motility a migrácie, čím podporuje epiteliálno-mezenchymálnu tranzíciu a podieľa sa tak na náraste metastatickej aktivity nádorových buniek (Brahimi-Horn et al., 2011).

Okrem regulácie pH je CA IX proteín funkčne zapojený aj v adhézii a migrácii nádorových buniek. Vďaka PG doméne ho môžeme zaradiť medzi adhezívne molekuly (Závada et al., 2000; Zavadová and Závada, 2005). Nemenej významný v tomto smere je aj vplyv CA IX na E-kadherín – adhezívnu molekulu, ktorej destabilizácia je spájaná s nárastom invazívnosti nádorových buniek. Prítomnosť CA IX znižuje mieru E-kadherínom sprostredkovanej adhézie, pravdepodobne v dôsledku interakcie CA IX s  $\beta$ -katenínom, ktorá destabilizuje väzbu E-kadherínu na aktínové filamenty (Švastová et al., 2003). Najnovšie zistenia potvrdzujú aj vplyv CA IX na bunkovú migráciu. CA IX je relokalizovaná do lamelipódií migrujúcich buniek, kde svojou katalytickou aktivitou, v interakcii s bikarbonátovými transportérmi, prispieva k zvýšenej migrácii (Švastová et al., 2012).

Distribúcia CA IX v zdravých tkanivách je veľmi nízka, prevažne viazaná na gastrointestinálny trakt (Pastore-

ková et al., 1997), zatiaľ čo u väčšiny solídnych tumorov (karcinómy krčka maternice, obličiek, pľúc, prsníka, hrubého čreva, pažeráka, hlavy a krku, mozgu) bola dokázaná ektopická expresia CA IX proteínu na vysokej úrovni (Pastoreková et al., 2007).

Nádorovo asociovaný proteín CA IX je kódovaný génom CA9. Primárne je miera expresie CA IX ovplyvňovaná najmä hypoxiou cez hypoxiou indukovateľný faktor-1 (HIF-1), ktorý rozpoznáva hypoxia-responzívny element (HRE) nachádzajúci sa v promótoře CA9 génu (Wykoff et al., 2000). Aktívny transkripčný faktor HIF-1 je heterodimér, pozostávajúci z HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$  podjednotky. Podjednotka HIF-1 $\beta$  je exprimovaná konštitutívne, zatiaľ čo expresia a transkripčná aktivita HIF-1 $\alpha$  podjednotky je regulovaná dostupnosťou kyslíka. V prítomnosti kyslíka je podjednotka HIF-1 $\alpha$  pozmenená prolylhydroxylázami (PHD) a faktorom inhibujúcim HIF, čo vedie k jej rozpoznaní von Hippel-Lindau tumor supresorovým proteínom (pVHL). To má za následok rýchlu degradáciu HIF-1 $\alpha$  v proteazóme. V hypoxických podmienkach, ktoré sú v dôsledku neadekvátnej vaskulatúry častou charakteristikou nádorov, nemôže dochádzať k modifikácii HIF-1 $\alpha$  podjednotky, a teda ani k jej degradácii. To vedie k vstupu HIF-1 $\alpha$  do jadra a spojeniu s HIF-1 $\beta$  podjednotkou. Vzniká tak aktívny transkripčný komplex, ktorý po rozoznaní HRE elementu stimuluje transkripciu cieľových génov vrátane CA9 (Coleman and Ratcliffe, 2007; Huang et al., 1996).

Karbonická anhydráza IX patrí medzi proteíny, ktorých expresia na bunkovom povrchu je vo významnej miere regulovaná aj posttranslačne. Pokles hustoty CA IX molekuly na membráne môže byť spôsobený endocytózou alebo odštiepením ektodomény proteínu.

V roku 2003 Závada a kol. dokázali prítomnosť solubilnej formy CA IX vo veľkosti 54/50 kDa v kultivačných médiách CA IX-pozitívnych nádorových bunkových línii, ako aj v telesných tekutinách onkologických pacientov. Veľkosť fragmentu zodpovedá veľkosti extracelulárnej časti molekuly CA IX. Vo všeobecnosti hladina ECD v médiu korešponduje s množstvom bunkovo viazaného CA IX proteínu, podiel uvoľnenej formy CA IX je asi 10 % z celkového množstva proteínu viazaného na membránu. V podmienkach hypoxie shedding CA IX kopíruje stúpajúcu hladinu proteínov a pomer množstva ECD a CA IX na bunkovom povrchu zostáva zachovaný. Inhibitor metaloproteáz batimastat (BB-94) inhibuje odštiepovanie CA IX. Aj keď všetky sheddázy zúčastňujúce sa sheddingu CA IX zatiaľ neboli identifikované, potvrdená bola úloha proteázy TACE/ADAM-17 (Zaťovičová et al., 2005). Aj keď je náročné predvídať biologickú funkciu uvoľňovanej ECD, je možné, že by mohla interferovať s CA IX molekulou na bunkovom povrchu alebo zabezpečovať medzibunkovú signalizáciu.

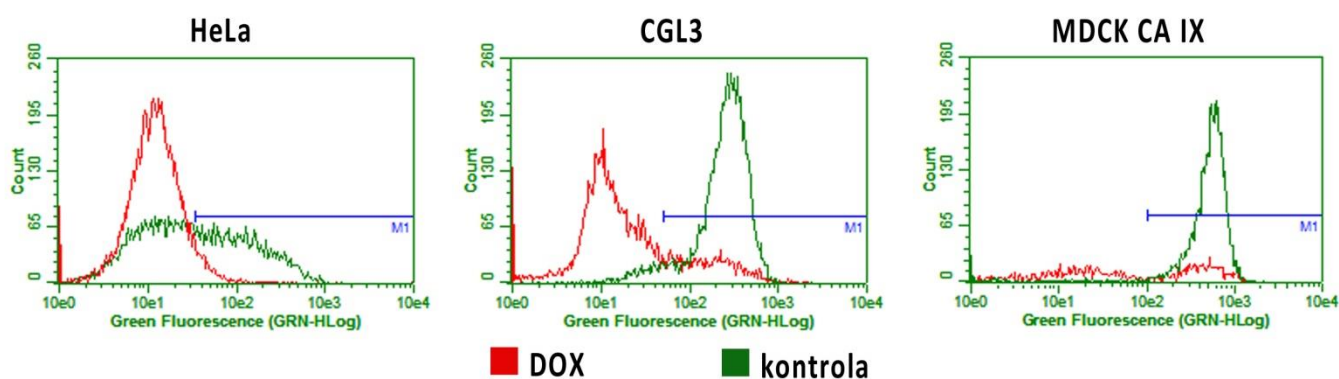


Shedding ECD CA IX môže byť indukovaný aj bunkovou smrťou navodenou rôznymi cytostatickými látkami (Vidličková et al., 2016). Keďže hladina ECD CA IX v krvi je mnohými autormi považovaná za významný prognostický marker vývoja ochorenia, bolo by pravdepodobne potrebné brať do úvahy aj možnú spojitosť množstva ECD CA IX s použitou liečbou.

V rámci projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“ sa časť výskumu venovala analýze odštiepovania extracelulárnej domény CA IX pomocou prietokovej cytometrie s využitím zariadenia Guava EasyCyte, ktoré umožňuje študovať rôzne bunkové parametre a sledovať prítomnosť rôznych proteínových markerov na plazmatickej membráne ako aj vo vnútri buniek. Povrchovú detekciu CA IX sme uskutočnili pomocou protilátky M75, ktorá špecificky rozpoznáva CA IX. Táto protilátka bola vyrobená v našom laboratóriu a v celom svete sa používa na detekciu CA IX v nádorových tkanivách pacientov s diagnostickým zámerom ako aj na experimentálne účely v nádorových bunkách kultivovaných *in vitro*. Prietoková cytometria má

oproti iným metódam detekcie výhodu v tom, že je rýchla, poskytuje komplexné údaje o počte buniek exprimujúcich skúmaný proteín a tiež o hladine jeho expresie. Na účel skúmania povrchovej hustoty molekúl CA IX v dôsledku indukcie odštiepovania extracelulárnej domény sme živé nádorové bunky opracovali protilátkou M75, ktorá sa viazala na molekuly CA IX. Táto protilátka za bazálnych podmienok neindukuje endocytózu, a tak detekujeme iba povrchovú frakciu CA IX molekúl. Na viacerých bunkových modeloch sme zistili, že aktivácia odštiepovania pomocou chemoterapeutických látok skutočne vedie k redukcii CA IX-špecifického signálu na bunkovom povrchu. Tento jav bol sprevádzaný zvýšenou hladinou ektodomény CA IX v kultivačnom médiu, čo sme zistili pomocou nami vyvinutej detekčnej metódy s využitím dvoch CA IX protilátok viažucich sa na rôzne oblasti proteínu. Tento prístup nám umožnil získať výsledky, ktoré sú podkladom pre ďalšie experimenty a poukázal na význam získaného zariadenia pre výskum v oblasti nádorovej biológie a zvlášť pre štúdium odštiepovania povrchových bunkových proteínov.

**Graf 1: Histogramy z analýzy povrchovej hustoty CAIX pomocou prietokovej cytometrie.** Nádorové bunky boli opracované chemoterapeutickou látkou doxorubicín (DOX) a analyzované pomocou prietokovej cytometrie na prítomnosť CA IX na povrchu buniek. Grafy zobrazujú povrchovú hladinu CA IX (zelená) a jej pokles, t.j. posun signálu smerom k nižším hodnotám vľavo po opracovaní doxorubicínom (červená). Experiment ukazuje, že chemoterapeutikum indukuje masívne odštiepovanie extracelulárnej domény CA IX, čo vedie k redukcii povrchovej hustoty CA IX a strate signálu, ktorý zniká väzbou CA IX-špecifickej protilátky.



## Záver

V posledných rokoch boli publikované stovky prác zameraných na problematiku sheddingu ektodomén (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), čo svedčí o intenzívnom bádani v tejto oblasti. Stále sú objavované nové sheddované proteíny (Suzuki et al., 2012; Utsunomiya et al., 2012) a výskum sa zameriava aj na štúdium mechanizmov odštiepovania a dopad tohto fenoménu, najmä v oblasti patologických procesov. Karbo-nická anhydráza IX je známa hlavne kvôli jej biologickým funkciám v rámci nádorového mikroprostredia. Dôležité je však aj jej zaradenie do skupiny sheddovaných proteínov. Ide o enzymaticky aktívny proteín, podieľajúci sa aj na regulácii medzibunkovej adhézie, do odštiepo-

vania ktorého je zapojená proteináza ADAM-17. Každý z týchto faktov je predpokladom pre veľký dopad, ktorý by mohol mať shedding tejto molekuly, takže jej štúdium intenzívne pokračuje.

## Literatúra

ALTERIO, V., HILVO, M., DI FIORE, A., SUPURAN, C. T., PAN, P., PARKKILA, S., SCALONI, A., PASTOREK, J., PASTOREKOVA, S., PEDONE, C. et al. (2009). Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16233-16238.  
AMOUR, A., KNIGHT, C. G., WEBSTER, A., SLOCOMBE, P. M., STEPHENS, P. E., KNÄUPER, V., DOCHERTY, A. J. and MURPHY, G. (2000). The *in vitro* activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett.* 473, 275-279.



- ARRIBAS, J. and MASSAGU, J. (1995). Transforming Growth Factor- $\alpha$  and 13-Amyloid Precursor Protein Share a Secretory Mechanism. *J. Cell Biol.* 128, 433-441.
- ARRIBAS, J., COODLY, L., VOLLMER, P., KISHIMOTO, T. K., ROSE-JOHN, S., AND MASSAGUÉ, J. (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271, 11376-11382.
- BLACK, R. A., RAUCH, C. T., KOZLOSZY, C. J., PESCHON, J. J., SLACK, J. L., WOLFSON, M. F., CASTNER, B. J., STOCKING, K. L., REDDY, P., SRINIVASAN, S. et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385, 729-733.
- BODE, W., GOMIS-RÜTH, F. X., AND STÖCKLER, W. (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". *FEBS Lett.* 331, 134-140.
- BRAHIMI-HORN, M.C., BELLOT, G., and POUYSSÉGUR, J. (2011). Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 67-72.
- BROWN, M. S., YE, J., RAWSON, R. B., and GOLDSTEIN, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398.
- BRULE, S., CHARNAUX, N., SUTTON, A., LEDOUX, D., CHAIGNEAU, T., SAFFAR, L., and GATTEGNO, L. (2006). The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology* 16, 488-501.
- COLEMAN, M. L. and RATCLIFFE, P. J. (2007). Oxygen sensing and hypoxia-induced responses. *Essays Biochem.* 43, 1-15.
- DITTE, P., DEQUIEDT, F., ŠVASTOVÁ, E., HULÍKOVÁ, A., OHRADANOVÁ-REPIČ, A., ZAŤOVIČOVÁ, M., CSADEROVÁ, L., KOPÁČEK, J., SUPURAN, C. T., PASTOREKOVÁ, S. et al. (2011). Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors. *Cancer Res.* 71, 7558-7567.
- DORAI, T., SAWCZUK, I. S., PASTOREK, J., WIERNIK, P. H. and DUTCHER, J. P. (2005). The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *Eur. J. Cancer* 41, 2935-2947.
- EDWARDS, D. R., HANDSLEY, M. M. and PENNINGTON, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29, 258-289.
- EHLERS, M. R., SCHWAGER, S. L., SCHOLLE, R. R., MANJI, G. A., BRANDT, W. F. and RIORDAN, J. F. (1996). Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence. *Biochemistry* 35, 9549-9559.
- FIORE, E., FUSCO, C., ROMERO, P. and STAMENKOVIC, I. (2002). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 21, 5213-5223.
- GARTON, K. J., GOUGH, P. J., PHILALAY, J., WILLE, P. T., BLOBEL, C. P., WHITEHEAD, R. H., DEMPSEY, P. J. and RAINES, E. W. (2003). Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (ADAM 17). *J. Biol. Chem.* 278, 37459-37464.
- GOOZ, M. (2010). ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45, 146-169.
- GUTWEIN, P., OLESZEWSKI, M., MECHTERSHEIMER, S., AGMON-LEVIN, N., KRAUSS, K. and ALTEVOGT, P. (2000). Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275, 15490-15497.
- HARO, H., CRAWFORD, H. C., FINGLETON, B., SHINOMIYA, K., SPENGLER, D. M. and MATRISIAN, L. M. (2000). Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor- $\alpha$  in a model of herniated disc resorption. *J. Clin. Invest.* 105, 143-150.
- HAYASHIDA, K., BARTLETT, A. H., CHEN, Y. and PARK, P. W. (2010). Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 293, 925-937.
- HUANG, L. E., ARANY, Z., LIVINGSTON, D. M. and BUNN, H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 32253-32259.
- LUM, L., REID, M. S. and BLOBEL, C. P. (1998). Intracellular maturation of the mouse metalloproteinase disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* 273, 26236-26247.
- MILLA, M. E., LEESNITZER, M. A., MOSS, M. L., CLAY, W. C., CARTER, H. L., MILLER, A. B., SU, J. L., LAMBERT, M. H., WILLARD, D. H., SHEELEY, D. M. et al. (1999). Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.* 274, 30563-30570.
- MORGAN, P. E., PASTOREKOVÁ, S., STUART-TILLEY, A. K., ALPER, S. L. and CASEY, J. R. (2007). Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C738-48.
- MOSS, M. L., JIN, S. L., MILLA, M. E., BICKETT, D. M., BURKHART, W., CARTER, H. L., CHEN, W. J., CLAY, W. C., DIDSBURY, J.R., HASSLER, D. et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 385, 733-736.
- OPAVSKÝ, R., PASTOREKOVÁ, S., ZELNÍK, V., GIBADULINOVÁ, A., STANBRIDGE, E.J., ZÁVADA, J., KETTMANN, R. and PASTOREK, J. (1996). Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 33, 480-487.
- PASTOREK, J., PASTOREKOVÁ, S., CALLEBAUT, I., MORNON, J.P., ZELNÍK, V., OPAVSKÝ, R., ZAŤOVIČOVÁ, M., LIAO, S., PORTETELLE, D. and STANBRIDGE, E. J. (1994). Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* 9, 2877-2888.
- PASTOREKOVÁ, S., ZÁVADOVÁ, Z., KOŠŤÁL, M., BABUSÍKOVÁ, O. and ZÁVADA, J. (1992). A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology* 187, 620-626.
- PASTOREKOVÁ, S., PARKKILA, S., PARKKILA, A K., OPAVSKÝ, R., ZELNÍK, V., SAARNIO, J. and PASTOREK, J. (1997). Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* 112, 398-408.
- PASTOREKOVÁ, S., KOPÁČEK, J. and PASTOREK, J. (2007). Carbonic anhydrase inhibitors and the management of cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 865-878.
- POWELL, W. C., FINGLETON, B., WILSON, C. L., BOOTHBY, M. and MATRISIAN, L. M. (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.* 9, 1441-1447.
- REDDY, P., SLACK, J. L., DAVIS, R., CERRETTI, D. P., KOZLOSZY, C. J., BLANTON, R., SHOWS, D., PESCHON, J. J. and BLACK, R. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 14608-14614.
- REISS, K. and SAFTIG, P. (2009). The "a disintegrin and

- metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 126-137.
- ROGHANI, M., BECHERER, J. D., MOSS, M. L., ATHERTON, R. E., ERDJUMENT-BROMAGE, H., ARRIBAS, J., BLACKBURN, R. K., WESKAMP, G., TEMPST, P. and BLOBEL, C. P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274, 3531-3540.
- SANTHAMMA, K. R., SADHUKHAN, R., KINTER, M., CHATTOPADHYAY, S., MCCUE, B. and SEN, I. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of cleavage secretion of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 279, 40227-40236.
- DELLO SBARBA, P. and ROVIDA, E. (2002). Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding. *Biol. Chem.* 383, 69-83.
- SEALS, D. F. and COURTNEIDGE, S. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17, 7-30.
- SCHELLER, J., CHALARIS, A., GARBERS, C. and ROSE-JOHN, S. (2011). ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* 32, 380-387.
- SMITH, K. M., GAULTIER, A., COUSIN, H., ALFANDARI, D., WHITE, J. M. and DESIMONE, D. W. (2002). The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J. Cell Biol.* 159, 893-902.
- SUBRAMANIAN, S. V., FITZGERALD, M. L. and BERNFIELD, M. (1997). Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* 272, 14713-14720.
- SYMOWICZ, J., ADLEY, B. P., GLEASON, K. J., JOHNSON, J. J., GHOSH, S., FISHMAN, D. A., HUDSON, L. G. and STACK, M. S. (2007). Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 67, 2030-2039.
- ŠVASTOVÁ, E., ŽILKA, N., ZAŤOVIČOVÁ, M., GIBADULINOVÁ, A., ČIAMPOR, F., PASTOREK, J. and PASTOREKOVÁ, S. (2003). Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with  $\beta$ -catenin. *Exp. Cell Res.* 290, 332-345.
- ŠVASTOVÁ, E., HULÍKOVÁ, A., RAFAJOVÁ, M., ZAŤOVIČOVÁ, M., GIBADULINOVÁ, A., CASINI, A., CECCHI, A., SCOZZAFAVA, A., SUPURAN, C. T., PASTOREK, J. et al. (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.* 577, 439-445.
- ŠVASTOVÁ, E., WITARSKI, W., CSADEROVÁ, L., KOŠÍK, I., ŠKVARKOVÁ, L., HULÍKOVÁ, A., ZAŤOVIČOVÁ, M., BARÁTHOVÁ, M., KOPÁČEK, J., PASTOREK, J. et al. (2012). Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 287, 3392-3402.
- TSAKADZE, N. L., SITHU, S. D., SEN, U., ENGLISH, W. R., MURPHY, G. and D'SOUZA, S. E. (2006). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J. Biol. Chem.* 281, 3157-3164.
- VIDLICKOVA, I., DEQUIEDT, F., JELENSKA, L., SEDLAKOVA, O., PASTOREK, M., STUHLIK, S., PASTOREK, J., ZATOVICOVA, M., PASTOREKOVA, S. (2016) Apoptosis-induced ectodomain shedding of hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX from tumor cells: a double-edged response to chemotherapy. *BMC Cancer.* 16:239.
- WHITE, J. M. (2003). ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 598-606.
- WYKOFF, C. C., BEASLEY, N. J., WATSON, P. H., TURNER, K. J., PASTOREK, J., SIBTAIN, A., WILSON, G. D., TURLEY, H., TALKS, K. L., MAXWELL, P. H., et al. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60, 7075-7083.
- YU, W., WO ESSNER, J. F., MCNEISH, J. D. and STAMENKOVIC, I. (2002). CD44 anchors the assembly of matrilysin / MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev.* 16, 307-323.
- ZAŤOVIČOVÁ, M., SEDLÁKOVÁ, O., ŠVASTOVÁ, E., OHRAĎANOVÁ, A., ČIAMPOR, F., ARRIBAS, J., PASTOREK, J. and PASTOREKOVÁ, S. (2005). Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br. J. Cancer* 93, 1267-1276.
- ZÁVADA, J., ZÁVADOVÁ, Z., PASTOREK, J., BIESOVÁ, Z., JEŽEK, J. and VELEK, J. (2000). Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br. J. Cancer* 82, 1808-1813.
- ZÁVADOVÁ, Z. and ZÁVADA, J. (2005). Carbonic anhydrase IX (CA IX) mediates tumor cell interactions with microenvironment. *Oncol. Rep.* 13, 977-982.

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



**Agentúra**

Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR

pre štrukturálne fondy EÚ



**Európska únia**  
Európsky fond regionálneho rozvoja



Operačný program  
VÝSKUM a VÝVOJ

# Endolyzíny bakteriofágov, ich funkcia a využitie

Gabriela Bukovská<sup>1</sup>

Nora Halgašová<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Oddelenie genómiky a biotechnológie,  
Ústav molekulárnej biológie SAV  
Dúbravská cesta 21  
845 51 Bratislava  
Slovensko

<sup>1</sup>Gabriela.Bukovska@savba.sk

<sup>2</sup>Nora.Halgasova@savba.sk

## Endolysins of bacteriophages, their function and application

### Abstract

Endolysins (lysins) are bacteriophage-encoded enzymes that have evolved to degrade specific bonds within the bacterial cell wall. These enzymes represent a novel class of antibacterial agents against infectious pathogens, especially in the light of the worldwide increasing frequency of drug-resistant pathogens, which have made antibiotic therapy increasingly redundant. Lysins have been used successfully to eliminate/control bacterial pathogens in animal models. They have not only an immediate antibacterial effect but are also highly specific, meaning that they selectively kill only one bacterial host type. Endolysins are currently a tool with great potential not only in medicine, but also in food and biotechnology.

### Key words

Bacteriophage, cell lysis, endolysin, phage therapy, pathogens

## Úvod

Bakteriofágy sú vírusy, ktoré s vysokou špecifitou a účinnosťou infikujú a usmrcujú baktérie. Už v čase ich objavu na začiatku minulého storočia sa uvažovalo o využití fágov pri liečbe bakteriálnych infekcií. V 40-tych rokoch, po objave antibiotík, sa však upustilo od fágovej terapie. V súčasnosti narastajúci výskyt baktérií rezistentných na väčšinu alebo všetky dostupné antibiotiká sa stáva celosvetovým problémom. Antibiotická rezistencia je hrozbou pre kontrolu infekčných chorôb. Infekcie spôsobené rezistentnými kmeňmi nie je možné liečiť štandardnými postupmi, často dochádza k predĺženiu choroby a zvýšeniu rizika smrti pacienta. Fágová terapia, známa už pred érou antibiotík sa tak vracia do povedomia odbornej verejnosti ako jedna z alternatív liečby infekčných chorôb.

Endolyzín, lytický proteín bakteriofágov, je aktívny aj samostatne ako izolovaný proteín a pôsobí aj z vonkajšej strany bakteriálnej bunky. V porovnaní s antibiotikami má aplikácia endolyzínov viacero výhod. Majú nielen okamžitý antibakteriálny účinok, ale sú aj vysoko špecifické, čo znamená, že selektívne usmrcujú spravidla len jeden bakteriálny druh hostiteľa. Endolyzíny v súčasnosti predstavujú nástroj s veľkým potenciálom nielen v medicíne, ale aj v potravinárstve a v biotechnológiách.

## Lytické proteíny bakteriofágov

Bakteriofágy sú vnútrobunkové parazity, ktoré nie sú schopné sa samostatne rozmnožovať bez hostiteľskej bunky. Podľa životného cyklu bakteriofágy rozdeľujeme na lytické (virulentné) a lyzogénne (temperované). Životný cyklus bakteriofágov vo všeobecnosti pozostáva z viacerých krokov, pričom posledné štádium je proces lýzy bunky a uvoľnenie zrelých fágových častíc (Obr. 1; Ajuebor a kol., 2016, upravené). Hlavnou prekážkou resp. bariérou, ktorú musia fágy prekonať pri uvoľnení z bunky smerom von je bunková stena hostiteľa. Hlavnou súčasťou bunkovej steny všetkých baktérií je peptidoglykán. Vytvára pevnú – tvar determinujúcu štruktúru, plní tak funkciu vonkajšieho „skeletu“ a podmieňuje pevnosť bunkovej steny. Kým peptidoglykánová vrstva gram-negatívnych baktérií je relatívne tenká (1 – 7 nm), u gram-pozitívnych baktérií je vrstva peptidoglykánu hrubšia (20 – 80 nm) (Cabeen a Jacobs-Wagner, 2005). Gram-negatívne baktérie obsahujú okrem bunkovej steny peptidoglykánu aj vonkajšiu membránu. Dvojvrstva vonkajšej membrány je tvorená vrstvou fosfolipidov a vrstvou lipopolysacharidov, ktoré často zodpovedajú za toxicitu gram-negatívnych baktérií. Gram-pozitívne baktérie nemajú vonkajšiu membránu. Cez vrstvu peptidoglykánu prechádzajú reťazce kyseliny teichoovej, teichurónovej, lipoteichoovej a proteíny (Navarre a Schneewind, 1999). Väčšina bakteriofágov s ds DNA genómom lyzuje bunkovú stenu pomocou dvoch lytických proteínov – holínu a endolyzínu. Endolyzíny predstavujú skupinu peptidoglykánových hydroláz s muralytickou aktivitou voči všetkým trom väzbám (glykozidickej, amidovej a peptidovej), ktoré sa nachádzajú v peptidoglykáne bunkovej steny.

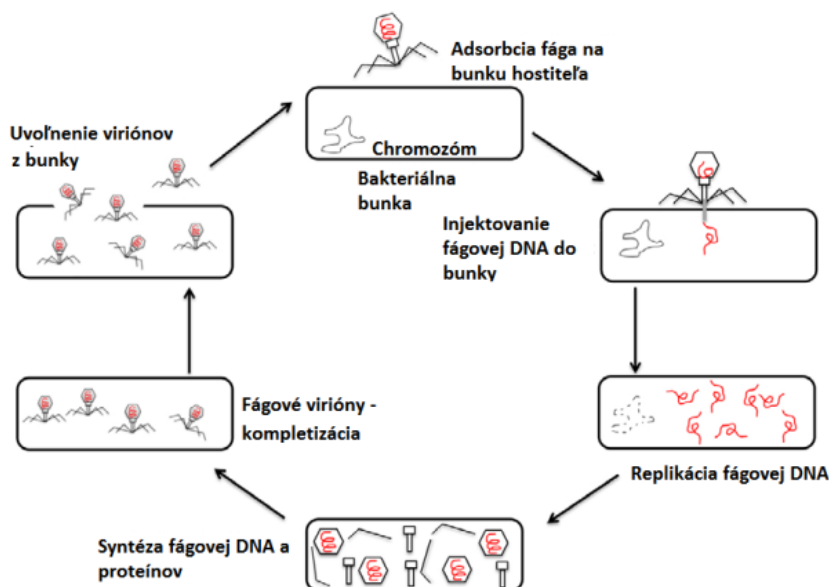
Väčšina endolyzínov neobsahuje sekrečnú signálnu sekvenciu. Prienik cez cytoplazmatickú membránu k substrátu im umožňujú holíny – malé hydrofóbne proteíny, ktoré spriechodnia bunkovú membránu vytvorením otvorov. Po integrácii do cytoplazmatickej membrány holíny pri určitej kritickej koncentrácii oligomerizujú v presne naprogramovanom čase na konci lytického cyk-



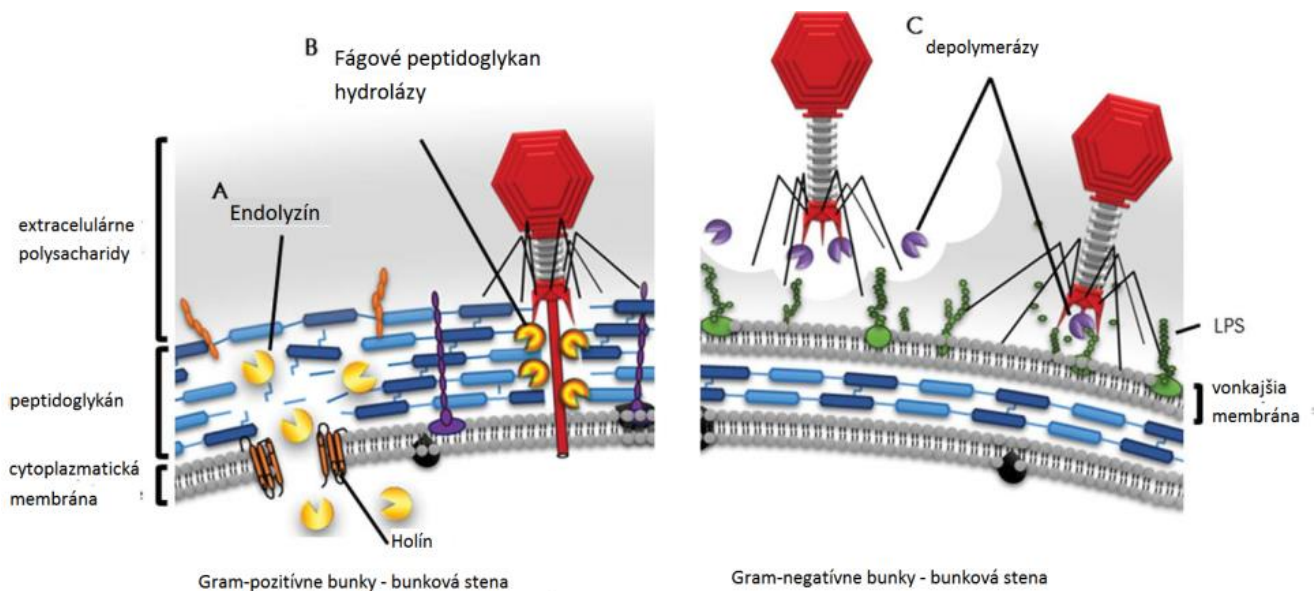
lu. Holín tým kontroluje dĺžku lytického cyklu fága. Výsledkom enzymatického pôsobenia endolyzínov je degradácia peptidoglykánu, končiaca lýzou bunky a uvoľnením zrelých viriónov. Holín predstavuje regulačnú a endolyzín výkonnú zložku lytického systému navzá-

jom funkčne prepojených proteínov (Obr. 2; Roach a Donovan, 2015, upravené). V Gram-negatívnych baktériách sú potrebné na uvoľnenie zrelých fágov ďalšie enzýmy – nedávno objavené spaníny, ktoré zabezpečia degradáciu vonkajšej membrány (Young, 2014).

Obr. 1: **Replikačný cyklus lytických bakteriofágov.** (Ajuebor a kol., 2016, upravené)



Obr. 2: **Schéma pôsobenia fágových lytických proteínov pri lytickom cykle bakteriofágov.** (Roach a Donovan, 2015, upravené)



## Štruktúra a funkcia fágových endolyzínov

Endolyzíny fágov infikujúcich Gram-negatívne baktérie sú malé globulárne proteíny a obsahujú len katalytickú doménu. Endolyzíny bakteriofágov infikujúcich Gram-pozitívne baktérie majú molekulovú veľkosť približne od 25 do 40 kDa. Výnimkou je PlyC endolyzín fága infikujúceho bakteriálny kmeň streptokokov, ktorého veľkosť je 114 kDa. Väčšina endolyzínov z tejto skupiny má

dvojdoménovú štruktúru s prevažnou organizáciou proteínu: N-terminálna katalytická a C-terminálna väzbová doména, ktoré sú prepojené krátkym lineárnym úsekom (tzv. linker). Ich enzymová aktivita je substrátovo špecifická: muramidázová, transglykozylázová, glukozaminidázová, endopeptidázová alebo amidázová. Najpočetnejšími sú hydrolázy – muramidázy, amidázy, endopeptidázy a glukozaminidázy. Menšou skupinou sú transglykozylázy (Obr. 3; Yang a kol., 2014, upravené). Jeden endolyzín vykazuje len jeden typ muralytickej aktivi-



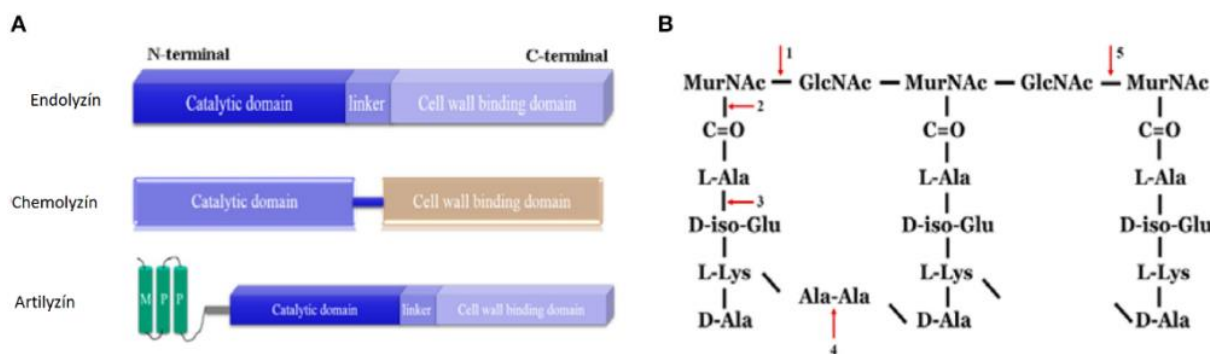
ty. Sekvencie endolyzínov tej istej enzýmovej triedy majú vysokú sekvenčnú homológiu v katalytickej oblasti a veľmi nízku homológiu vo väzobnej oblasti. Väčšinou sa oblasť CBD endolyzínov identifikuje experimentálne (Ajuebor a kol., 2016).

C-terminálna oblasť endolyzínov obsahuje substrát viažúcu doménu (CBD – cell binding domain), cez ktorú sa enzým viaže na špecifický ligand (napr. N-acetylglukozamín, cholí, polyramnóza) v bunkovej stene hostiteľskej baktérie. Väzbové miesto je pre každý endolyzín špecifické a CBD tak určuje hostiteľské spektrum daného endolyzínu. CBD po naviazaní sa na ligand pritiahne cez linker katalytickú doménu do blízkosti substrátu a umožní tak enzýmu štiepenie peptidoglykán.

Väčšina endolyzínov má úzke hostiteľské spektrum a pôsobí len na kmene, ktoré sú hostiteľmi daného bakteriofága. Len niektoré endolyzíny majú širšiu hostiteľskú špecifickosť. Špecifickosť je určená najmenej tromi rôznymi faktormi: typom štiepenej väzby, prítomnosťou kompo-

nentov v bunkovej stene potrebných pre špecifickú aktiváciu enzýmu a špecifitou rozpoznania substrátu. Hostiteľské spektrum endolyzínu môže byť obmedzené na bakteriálny rod napr. streptomycéty, bacily, listérie alebo bakteriálny druh napr. *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Brevibacterium flavum*. Výnimkou je amidáza PlyV12 z fága  $\phi$ 1 *Enterococcus faecalis* účinná nielen voči *E. faecalis* a *E. faecium*, ale aj voči *Streptococcus pyogenes*, streptokokom skupiny B a C a *Staphylococcus aureus*. Doménová štruktúra endolyzínov umožňuje vzájomnú kombináciu domén pochádzajúcich z odlišných enzýmov, pričom si obe zachovávajú svoju aktivitu a špecifickosť. Vzniknú tak lyzíny s rôznymi katalytickými a hostiteľskými špecifickosťami. Štúdie poukazujú na to, že tvorba enzýmov s presne definovanou špecifickosťou a vysokou lytickou aktivitou má veľký terapeutický potenciál (Ajuebor a kol., 2016).

Obr. 3: **Lyzíny.** A. schéma štruktúry lyzínov B. Štiepne miesta endolyzínov 1. muramidázy 2. amidázy 3., 4. endopeptidázy 5. glukozaminidázy (Yang a kol., 2014, upravené)



## Aplikácia endolyzínov

Endolyzíny hoci pôvodne pôsobia na hostiteľa z vnútra, svoju funkčnosť si zachovávajú aj pri exogénnej aplikácii voči Gram-pozitívnym aj Gram-negatívnym baktériám. Často postačuje malé množstvo prečisteného enzýmu na rýchlu lýzu hustej suspenzie buniek. Endolyzíny vďaka neobvyklej substrátovej špecifickosti a vysokej aktivite našli svoje uplatnenie nielen v potravinárstve, ale aj v biotechnológii a medicíne. Izolované endolyzíny sa môžu využiť v terapii samostatne alebo v kombinácii s klasickými antibiotikami. Endolyzíny boli už úspešne použité na modelových zvieratách pri liečbe sepsy, pneumónie, endokarditídy a meningitídy. Niekoľko štúdií opisuje úspešnú liečbu streptokokových infekcií myši pomocou endolyzínov. Zároveň veľmi perspektívne je ich použitie pre elimináciu patogénov kolonizujúcich mukózne membrány (sliznice horného dýchacieho traktu, očí, uší, ako aj gastrointestinálneho a urogenitálneho traktu) a pri prevencii sekundárnych bakteriálnych infekcií pri vírusových ochoreniach (Ajuebor a kol., 2016).

Častou aplikáciou endolyzínov v potravinárstve je bioochrana producentov pred bakteriálnymi kontamináciami (napr. endolyzín ktorý sa extracelulárne produkuje v *Lactococcus lactis*). Zaujímavou aplikáciou z oblasti biotechnológií je príprava transgénnych rastlín, ktoré produkujú fágový endolyzín. Takéto rastliny sú potom rezistentné voči fytopatogénnym baktériám. Endolyzín spolu s holínom možno využiť napr. na regulovanú lýzu štartovacej kultúry laktokokov v potravinárskej fermentácii, čím sa urýchľuje zrenie syra. Endolyzín a holín sa využívajú aj na regulovanú autolýzu kmeňov ako *Listeria vibrio* alebo *Salmonella* spp. Vlastnosť väzbovej domény endolyzínu viazať sa na povrch bunkovej steny baktérií s vysokou afinitou a špecifickosťou sa zase využila na špecifické odlíšenie patogénnej baktérie *Listeria monocytogenes* v kontaminovaných potravinách od ostatnej bakteriálnej populácie. Po naviazaní fluorescenčnej značky na proteín s väzbovou doménou endolyzínu z fága infikujúceho listérie bolo možné identifikovať pomocou fluorescenčného mikroskopu prítomné patogénne listérie v testovaných potravinách.

## Záver

Využitie endolyzínov na elimináciu nežiaducich baktérií má pred sebou veľkú perspektívu. Oblasť výskumu bakteriofágov a ich produktov sa v posledných rokoch zno-va orientuje na ich využitie ako terapeutík, vzhľadom na nárast bakteriálnych patogénov rezistentných na antibiotiká. Ich uplatnenie je však oveľa širšie. Praktické aplikácie priameho použitia endolyzínov v potravinárstve, biotechnológiách, medicíne ako účinného antibakteriálneho prostriedku voči patogénnym baktériám má stúpajúcu tendenciu. Hlavnou výhodou fágov a ich produktov endolyzínov je ich špecifickosť na cieľové baktérie. Vysoká špecifickosť a väzbová afinita väzbových domén endolyzínov z nich robí ideálnych kandidátov pre rozvoj nových detekčných nástrojov a pri prevencii mnohých infekčných chorôb.

## Literatúra

AJUEBOR, J.; McAULIFFE, O.; O'MAHONY, J.; ROSS, R. P.; HILL, C.; COFFEY, A. Bacteriophage endolysins and their applications. In: *Science Progress*. 99, (2), 2016, pp. 183-199.  
CABEEN, M. T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. In: *Nature Review Microbiology* 3, 2005, pp. 601-610.  
NAVARRE, W. W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 63, (1), 1999, pp. 174-229.  
ROACH, D. R.; DONOVAN, D. M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. In: *Bacteriophage*. 5, (3), 2015, pp. e1062590.  
YANG, H.; YU, J.; WEI, H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. In: *Frontiers in Microbiology*. 5, 2014, Article 542.  
YOUNG, R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. In: *J Microbiol*. 52, (3), 2014, pp. 243-258.

## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



## Pod'akovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu „*Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života*“, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



**Európska únia**  
Európsky fond regionálneho rozvoja





