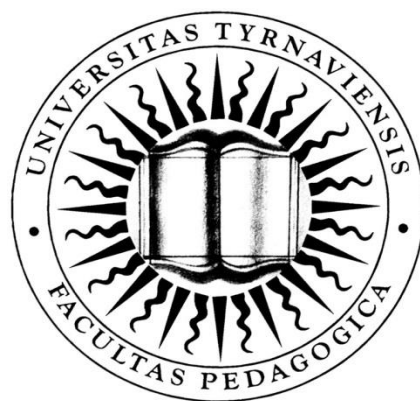


biológia  
ekológia  
chémia



časopis pre školy  
ročník 21  
číslo 3  
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 genomiky, proteomiky, 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.

## editori

PaedDr. Mária Orolínová, PhD.

## návrh obálky

RNDr. Gabriela Gavurníková, CSc.

ISSN 1338-1024



## obsah

### ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

2

**Nanočastice ako platforma vo vývoji HIV vakcíny**  
*Zuzana Garaiová, Iveta Waczulíková, Maxim Ionov, Sylvia Michlewska, Elzbieta Pedziwiatr-Werbicka, Mari Bryszewska, Tibor Hianík*

8

**Helikázy a ich potenciál v terapii**  
*Nora Halgašová, Gabriela Bukovská*

12

**Fágové depolymerázy a ich využitie**  
*Michal Kajsík, Hana Drahovská*

16

**Priemyselný význam biokatalyzátorov a možnosti regenerácie kofaktorov**  
*Stanislava Bírová, Zdenko Levarski, Stanislav Stuchlík*

21

**N-glykozylácia proteínov v expresných kmeňoch *Escherichia coli***  
*Zdenko Levarski, Stanislava Bírová, Eva Struhárňanská, Silvia Rybecká, Stanislav Stuchlík*

25

**Ergosterol – kľúčový sterol v bunkách kvasiniek**  
*Alexandra Konečná, Nora Tóth Hervay, Yvetta Gbelská*

29

***Streptococcus agalactiae* – závažný patogén novorodencov aj dospelých**  
*Aneta Lichvaríková, Hana Drahovská*

34

**Nekonvenčné kvasinky – výlet za hranice pekárenskej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae***  
*Hana Dibalová-Čuláková, Yvetta Gbelská*

38

**Polymérne nanočastice ako potenciálna platforma v rakovinovej terapii**  
*Veronika Šubjaková, Tibor Hianík*

43

**RNA interagujúce s PIWI proteínmi majú potenciál pre onkologickú liečbu**  
*Silvia Rybecká, Stanislav Stuchlík*

46

**Esenciálne oleje vo vzťahu k mikroorganizmom**  
*Andrea Puškárová, Mária Bučková, Lucia Kraková, Domenico Pangallo*

50

**RNA interferencia – „náhodný“ objav premysleného mechanizmu**  
*Ingrid Sveráková, Anton Horváth*

53

**Kontrola kvality proteínov v endoplazmatickom retikule**  
*Peter Polčic*

57

**Benzotiazinón PBTZ169 – nová nádej pre liečbu tuberkulózy**  
*Katarína Mikušová*

## Nanočastice ako platforma vo vývoji HIV vakcíny

Zuzana Garaiová<sup>1</sup>Iveta Waczulikova<sup>1</sup>Maksim Ionov<sup>2</sup>Sylwia Michlewska<sup>2</sup>Elzbieta Pedziwiatr-Werbicka<sup>2</sup>Maria Bryszewska<sup>2</sup>Tibor Hianik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra jadrovej fyziky a biofyziky,  
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky,  
Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko  
zuzana.garaiova@fmph.uniba.sk  
iveta.waczulikova@fmph.uniba.sk  
tibor.hianik@fmph.uniba.sk

<sup>2</sup>Katedra všeobecnej biofyziky,  
Univerzita Lodž, Lodž, Poľsko  
maksion@biol.uni.lodz.pl  
sylwia.michlewska@gmail.com  
elzbieta.pedziwiatr@biol.uni.lodz.pl  
maria.bryszewska@biol.uni.lodz.pl

### Nanoparticles as a platform for development of HIV vaccine

#### Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV) is a virus that is responsible for a serious disease known as an acquired immunodeficiency syndrome – AIDS. HIV/AIDS condition is possible to treat, but not to completely cure. According to the latest statistics, 1.8 million people were newly infected and approximately one million people died from AIDS-related illnesses in the year 2016. Antiretroviral therapy, which is currently available, can improve quality and prolong lives of HIV-infected patients. However, despite of application of antiretroviral drugs, the virus cannot be completely eliminated from the body. For these reasons, the issue of prevention and development of an effective vaccine is reopened and a number of new strategies are currently being considered. Here, we summarize the basic structural characteristics of the HIV virus and present a brief summary of the HIV vaccine development activities that have been performed so far. In the end, we draw attention to the new trends that underline the implementation of nanotechnology in the area of vaccination. In this context, we will give examples that point to the potential of nanoparticles, whether as carriers of active vaccine substances, or when they directly act as antiviral agents.

#### Key words

HIV/AIDS, vaccine, antigen, adjuvant, nanoparticles

### Úvod

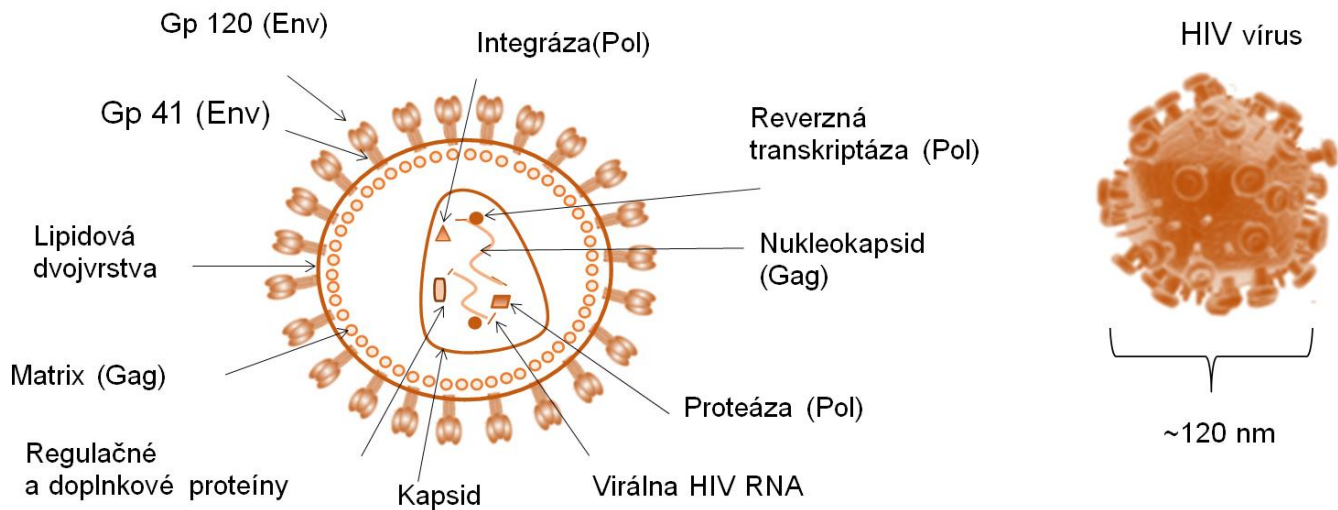
Vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV) zodpovedá za vznik závažného ochorenia – syndrómu získanej imunitnej nedostatočnosti, známeho tiež pod skratkou AIDS. HIV/AIDS je v súčasnosti možné liečiť, nie však vyliečiť. Podľa posledných dostupných štatistík bolo v roku 2016 zaznamenaných 1,8 milióna nových infekcií spôsobených vírusom HIV a na ochorenia spojené s AIDS zomrelo v tomto roku 1 milión ľudí (www.unaids.org). Antiret-

rovirálna liečba, ktorá sa pri liečbe uplatňuje, síce dokáže skvalitniť a predĺžiť život HIV infikovaných pacientov, avšak úplne eliminovať vírus nedokáže. Aj z týchto dôvodov sa opätovne otvára otázka prevencie a vývoja efektívnej očkovacej látky s využitím nových stratégií a prístupov. V tomto článku zhrnieme základnú štruktúrnú charakteristiku HIV vírusu, uvedieme krátky súhrn doposiaľ vyvíjaných aktivít zameraných na vývoj HIV vakcíny a v závere upriamime pozornosť na nové trendy, ktoré spočívajú v implementácii nanotechnológií do oblasti vakcinológie. V tomto kontexte uvedieme príklady, ktoré poukazujú na potenciál nanočastíc či už ako nosičov aktívnych vakcinačných látok, alebo ich priameho antivirálného účinku.

### HIV vírus – základná charakteristika

HIV je retrovírus (trieda Retroviridae), ktorý má sférický tvar a priemer približne 120 nm. Hlavné štruktúrne časti HIV sú: virálny obal, matrix a virálne jadro (Seitz, 2016). Virálne jadro obsahuje virálnu kapsulu, tzv. kapsid, ktorý obklopuje dve jednovláknové molekuly RNA obalené v nukleokapside, ďalej enzýmy potrebné pre životný cyklus HIV (napr. reverznú transkriptázu, proteázu, integrázu) a ďalšie regulačné a dôležité doplnkové proteíny. Matrix zahŕňa oblasť obsiahnutú medzi jadrom a obálkou. Celý útvar je obalený lipidovou dvojvrstvou, ktorej súčasťou sú „výbežky“ tvorené glykoproteínmi gp120 a gp41. Informácia potrebná na tvorbu nových komponentov, či už štruktúrnych proteínov alebo esenciálnych enzýmov – a teda nových HIV vírusov, je zakódovaná v 3 hlavných génoch: *gag*, *pol* a *env* (Obr. 1).

Obr. 1: Štruktúra HIV vírusu



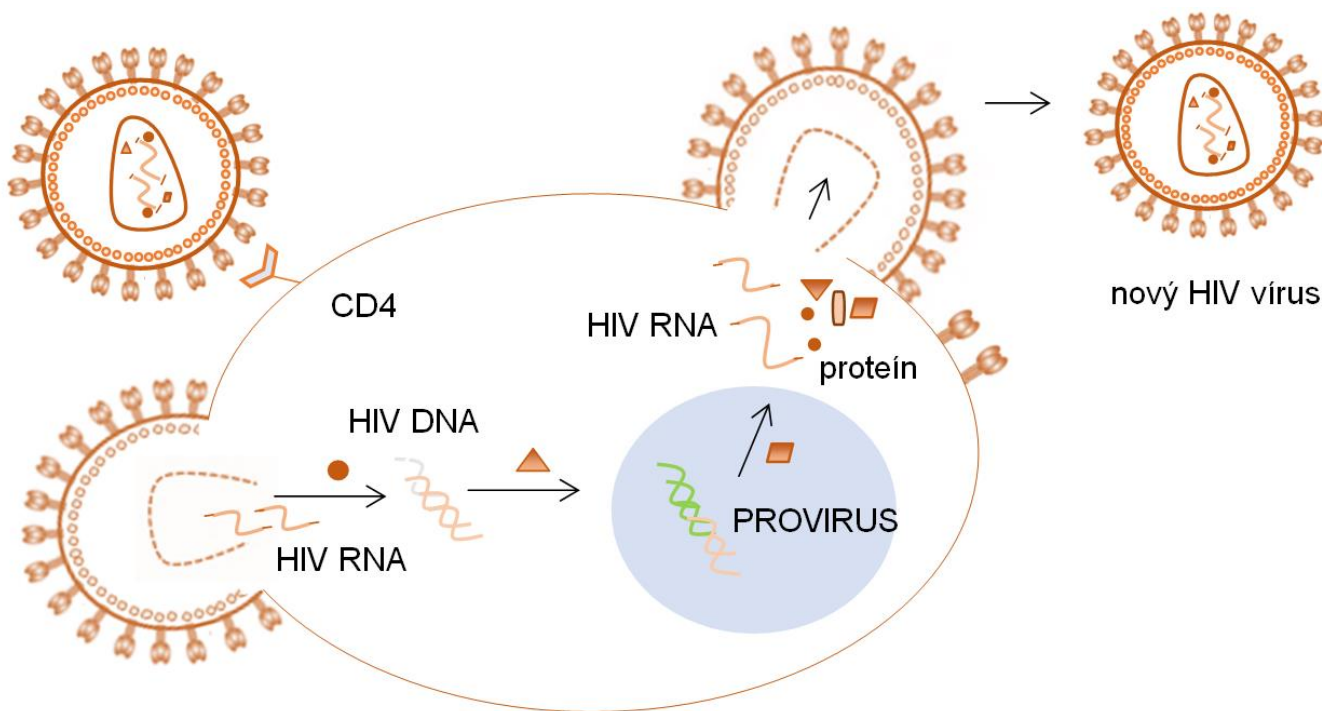
Hlavnou cieľovou štruktúrou HIV vírusu sú imunitné bunky, ktoré majú na svojom povrchu CD4 receptory, t. j. CD4<sup>+</sup> biele krvinky T lymfocyty, mononukleárne makrofágy a dendritické bunky.

Životný cyklus HIV zahŕňa viacero etáp, ktoré na seba plynulo nadväzujú. V prvom kroku dochádza k interakcii medzi glykoproteínom gp120 a CD4 receptorom, t. j. k pripojeniu HIV k hostiteľskej bunke a fúzii s membránou (Wilén a kol., 2012).

Po preniknutí HIV do bunky dochádza k odstráneniu obalu vírusu a k uvoľneniu vnútorného obsahu. Ribonukleová kyselina (RNA) sa pomocou enzýmu reverznej transkriptázy prepíše do deoxyribonukleovej kyseliny

(DNA) a vzniknutá vírusová DNA migruje smerom do jadra hostiteľskej bunky. Tu sa HIV-DNA integruje za asistencie enzýmu integrázy do DNA hostiteľskej bunky, kde zostáva uložená ako provírus. V tomto kroku sa z hostiteľskej bunky stáva „továreň“ na produkciu nových HIV vírusov. Provírus sa po nejakej dobe aktivuje, vzniká virálna RNA a proteíny, ktoré sa postupne zhromažďujú na vnútornom povrchu bunky. Budúce častice sa postupne kompletizujú a nové virióny sa z bunky uvoľňujú procesom označovaným ako pučanie. Prestupom cez cytoplazmatickú membránu sa finalizuje obal vírusu (Obr. 2).

Obr. 2: Virálny cyklus HIV vírusu



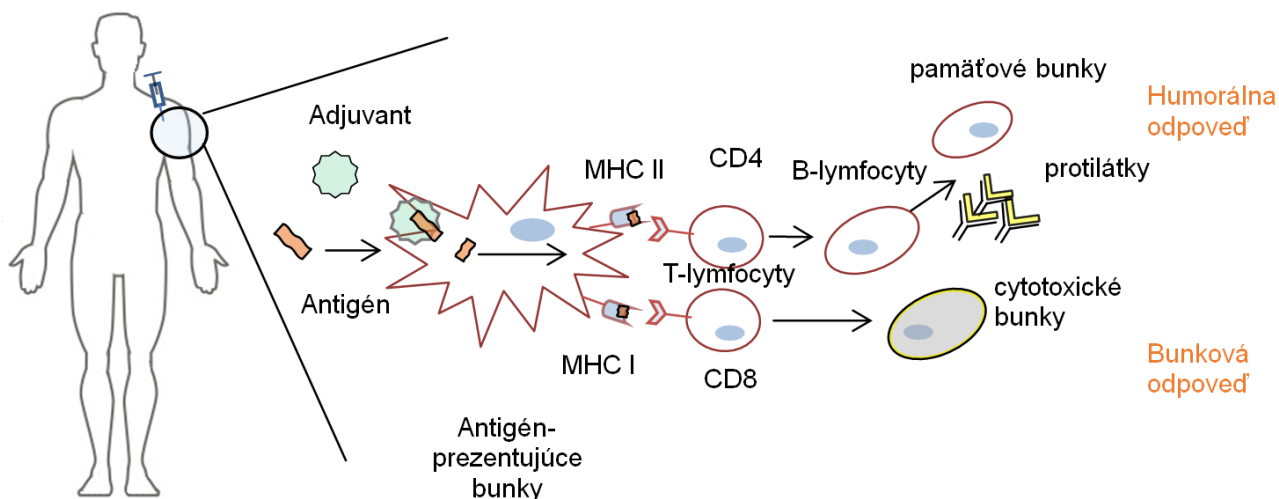
Rozoznávame dva hlavné typy HIV vírusu – typ 1 (HIV-1) a typ 2 (HIV-2). Oba typy zdieľajú podobnosť v základnom genetickom usporiadaní, v móde transmisie, vo vnútrobunkovom replikačnom cykle, ako aj v klinickom dôsledku – oba typy ústia do ochorenia AIDS (Nyamweya a kol., 2013). AIDS predstavuje pokročilé resp. posledné štádium infekcie; imunitný systém je poškodený v tak rozsiahlej miere (počet CD4 buniek obyčajne klesne pod hodnotu 300 buniek/mm<sup>3</sup> krvi), že ľudské telo sa nedokáže efektívne brániť a bojovať s rôznymi (oportunistickými) ochoreniami a v konečnom dôsledku im podľahne. V prípade HIV-2 je však pravdepodobnosť progresu nákazy smerom k AIDS nižšia. HIV-2 sa vyskytuje v oblasti západnej Afriky, zatiaľ čo HIV-1 sa šíri po celom svete.

HIV-1 sa ďalej delí do skupín, v rámci ktorých je dominantná skupina M (major), ktorá zodpovedá za pandemický priebeh infekcie. V rámci skupiny M je rozpoznávaných niekoľko fylogenetických subtypov (A – K). Priemerná genetická variabilita medzi subtypmi skupiny M je približne 15 % pre *gag* gén a 25 % pre *env* gén. Celosvetovo najviac prevalentné HIV-1 genetické formy sú subtypy A, B a C, pričom práve posledná menovaná C forma predstavuje takmer 50 % všetkých HIV-infekcií na celom svete (Bounaguro a kol., 2007). Vysoká genetická variabilita HIV-1 vírusu je jedným z dôvodov, ktoré stoja za doposiaľ neúspešnou snahou vývoja efektívnej a bezpečnej očkovacej látky.

Vo všeobecnosti je aktívnou zložkou akejkoľvek vakcíny látka odvodená od mikroorganizmu, ktorý ochorenie spôsobuje. Používajú sa celé mŕtve, živé avšak oslabené, resp. inaktivované organizmy, prípadne len niektoré ich štruktúrne jednotky (proteíny, polysacharidy); sumárne sa označujú pojmom antigény. Antigény majú schopnosť stimulovať imunitný systém za účelom tvorby špecifických protilátok a obranných mechanizmov, pomocou ktorých sa patogén identifikuje, neutralizuje/zneškodní a zapíše do imunitnej pamäte.

Po zaočkovaní a prípadnom opätovnom stretnutí s reálnym patogénom je potom ľudský organizmus pripravený rýchlo a náležite (cielené) reagovať. Okrem primárnej antigénnej zložky, môže vakcína obsahovať ešte zložku pomocnú v podobe tzv. adjuvantu (často sa používajú napr. soli hliníka) (Clapp a kol., 2011). Úlohou adjuvantu je zosilniť imunitnú reakciu na podaný antigén. Adjuvant môže imunogenitu antigénu zosilniť rôznymi spôsobmi, napr. môže predĺžiť jeho prítomnosť v krvi, či napomôcť jeho pohlteniu – napr. dendritickými bunkami (DC). DC sú špecifické antigén-prezentujúce bunky, ktoré antigén spracujú a prezentujú na tzv. MHC glykoproteínoch. Tieto sú rozpoznávané CD4+T-lymfocytmi, čo vedie k B-lymfocytmi indukovanej tvorbe vysoko-špecifických protilátok (humorálna imunitná odpoveď), prípadne k CD8+T-lymfocytmi sprostredkovanej produkcii cytotoxických buniek (bunková imunitná odpoveď) (Gutjahr a kol., 2016) (Obr. 3).

Obr. 3: Schematické znázornenie procesu vakcinácie s inicializáciou imunitnej odpovede



## HIV vakcína – prehľad doterajších klinických štúdií

Čo sa týka vakcíny proti HIV, jej dizajn zostáva z dôvodu zložitosti vírusu, ako aj z hľadiska zabezpečenia želaného a bezpečného účinku stále veľkou výzvou; skúšajú sa rôzne stratégie, rôzne typy antigénov i adjuvantov. V rokoch 1998/1999 sa uskutočnila jedna z pr-

vých veľkých klinických štúdií (fáza III) zameraná na otestovanie vakcíny **AIDSVAX**, ktorá bola pripravená na báze gp120 proteínu, pričom sa študovali dva rozličné izoláty subtypu B (USA, Kanada, Puerto Rico, Holandsko) a subtypov B/E (Thajsko). Vakcína bola dizajnovaná s cieľom indukcie neutralizačných protilátok v nádeji, že sa predíde alebo zabráni infekcii HIV. Výsledky však nepreukázali významný protektívny účinok vakcíny proti

vírusu. Aj napriek nepozorovanému želanému efektu bola táto vakcína zaradená do ďalšej klinickej štúdie **RV144** (fáza III), ktorá sa uskutočnila v roku 2003 (Thajsko). Táto vakcína pozostávala celkovo z dvoch vakcinačných substancií: spomínaná AIDS-VAX gp120 bola použitá ako doplnková (re-vakcinačná tzv. *boost*) a ALVAC-HIV ako hlavná zložka (*prime*). ALVAC-HIV je vektorová vakcína na báze inertnej formy canarypoxu – vtáčieho vírusu, ktorá obsahuje geneticky modifikované verzie troch génov (env, gag, pro). Cieľom tejto *prime-boost* kompozície RV144 vakcíny bolo stimulovať bunčkovú imunitnú odpoveď spolu s produkciou protilátkovej odpovede na povrchový proteín gp120. Ako adjuvant bol použitý síran draselno hlinitý. Výsledkom tejto štúdie bola redukcia rizika voči HIV infekcii približne o 30 %. Výsledok bol prekvapujúci aj v spojení s faktom, že jednotlivé zložky vakcíny samy o sebe v predošlých štúdiách nepreukázali pozitívny efekt. Klinická štúdia **STEP** s vektorovou vakcínou Adenovírusu 5 kódujúcou gag/pol/nef/ proteíny indikovala dokonca náchylnosť voči infekcii namiesto prevencie u skupiny testovaných mužov (www.aidsmap.com, Asif a kol., 2017).

Aktuálne, aj s nadväznosťou na pozitívnu odozvu RV144 vakcíny, sa v novembri 2016 začala nová vakcinačná štúdia (fáza II/III), ktorej základom je modifikovaná verzia RV144 a má označenie **HVTN702**. HVTN702 bola dizajnovaná s vyššou špecifitou k HIV subtypu C (predominantný v južnej Afrike) so squalenovým adjuvantom – MF59 s cieľom generovať robustnejšiu imunitnú odpoveď. Výsledky z tejto štúdie budú zverejnené v roku 2021 (www.clinicaltrials.gov).

Výskum v oblasti HIV vakcíny však neustále pokračuje. Pozornosť sa v tomto smere stále viac upriamuje na nanotechnológie a použitie rôznych nanočastíc s vhod-

nými vlastnosťami (Zhao a kol., 2014; Aikins a kol., 2017; Glass a kol., 2016, Vacas-Cordoba a kol., 2014). Už samotný, vyššie spomínaný MF59 adjuvant je emulzná nanočastica typu olej/voda (El Sahly a kol., 2010).

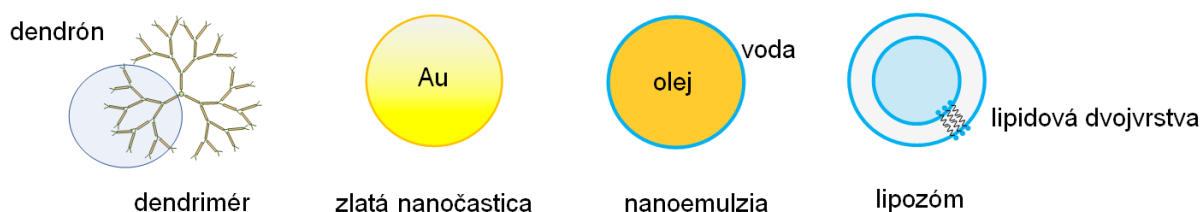
## Nanočastice – platforma vo vývoji HIV vakcíny

Nanotechnológia ponúka možnosť prípravy nanočastíc s unikátnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré vychádzajú práve z ich nanorozmerov. Unikátnou je aj flexibilitnosť procesu prípravy a modifikácie nanočastíc, vďaka ktorej môžeme cielene syntetizovať častice s rôznou veľkosťou, tvarom, zložením a povrchovými vlastnosťami (Obr. 4).

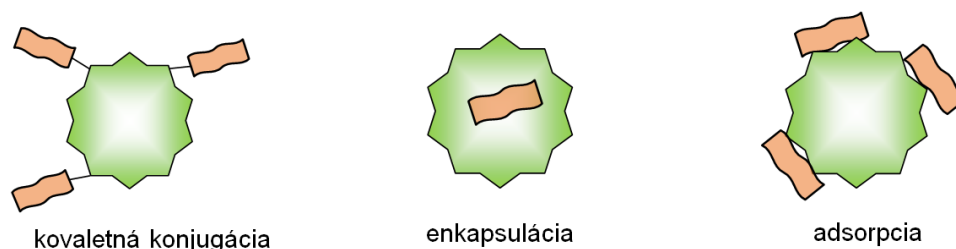
Svojimi rozmermi sa nanočastice pohybujú na veľkostnej škále bunkových komponentov, majú schopnosť prestupu cez plazmatickú membránu a v prípade ich vhodnej povrchovej modifikácie sa môžu naviazať a špecificky dopraviť terapeutický náklad do vnútra buniek. Aj z týchto dôvodov sa nanočastice študujú v rôznych biomedicínskych aplikáciách zahŕňajúcich aj oblasť vakcinológie (Zhao a kol., 2014).

V rámci formulácie vakcíny môže nanočastica zohrávať úlohu transportného nosiča (pre antigén alebo adjuvant), prípadne sama pôsobiť ako adjuvančný imunostimulátor (Zhao a kol., 2014; Glass a kol. 2016). Pre transportnú funkciu je zvyčajne potrebné zaistiť asociáciu nanočastice s antigénom. Táto asociácia sa môže uskutočniť prostredníctvom jednoduchej fyzikálnej adsorpcie, prípadne viac komplexnými metódami, ako napr. chemickou konjugáciou alebo enkapsuláciou (Obr. 5).

Obr. 4: Schematické znázornenie rôznych druhov nanočastíc



Obr. 5: Schematické znázornenie rôznych možností asociácie antigénu s nanočasticou



Antigén môže byť na povrch nanočastice adsorbovaný na základe elektrostatických alebo hydrofóbných interakcií. Pri enkapsulácii je potrebné antigén pridať k nanočastici v procese jej syntézy a v prípade chemickej konjugácie použiť chemické zosieťovanie (tzv. cross-linked chémiu). Z uvedených informácií vyplýva, že adsorpcia je metóda jednoduchšia na prípravu, avšak vzájomne väzobné interakcie s antigénom sú slabšie; tento postup je ideálny v prípade potreby rýchleho uvoľnenia antigénu. Uvoľnenie z komplexnejšej a stabilnejšej kovalentnej väzby si vyžaduje odbúranie nanočasticového nosiča. Jednotlivé prístupy sa intenzívne študujú (Doane a Burda, 2013). Výber procesu kovalentnej alebo nekovalentnej konjugácie nepochybne závisí od rôznych faktorov biologického prostredia. Avšak dôležitú úlohu v dosiahnutí želaného účinku zohrávajú fundamentálne vlastnosti nanočastíc, ktoré musia byť dôkladne preštudované.

Štúdium nanovakcín aj v nadväznosti na klinické neúspechy štandardných vakcín je zatiaľ prevažne orientované na základný, predklinický výskum. Pripravujú sa rôzne druhy nanočastíc, ktoré sa modifikujú rôznymi antigénnymi štruktúrami, konjugáty sa charakterizujú z hľadiska fyzikálno-chemických vlastností, transportná schopnosť spolu s účinkom vyvolania imunitnej odpovede sa študuje na membránových modeloch, bunkových kultúrach ako i zvieracích modeloch.

Ingale a kol. (2016) pripravili lipidové nanočastice na báze niklu, ktoré modifikovali elektrostaticky s HIV-1 obálkovým glykoproteínom, ktorý, ako už bolo spomenuté v úvodnej časti, zodpovedá za fúziu vírusu s hosťiteľskou bunkou. V porovnaní so samotným glykoproteínom takto pripravený komplex aktivoval B bunky efektívnejšie. V imunizačných experimentoch na animálnych modeloch bol dvojestupňovým testovaním (tzv. two-tier test citlivosti) zistený trend zlepšenia protilátkami sprostredkovej neutralizácie. Väčšiu stabilitu v komplexácii dosiahli autori neskôr modifikáciou lipozómov – nahradením niklu za kobalt, ako aj kovalentným cysteínovým naviazaním antigénneho nákladu (Bale a kol., 2016). Výsledkom bola stabilnejšia platforma s potenciálom generácie zlepšenej a uniformnej protilátkovej odpovede.

Lipidové nanočastice (lipozómy) je možné okrem platformy nosiča využiť aj ako model plazmatickej membrány buniek. Túto možnosť využili Ionov a kol. (2015) na detailnejšie štúdium mechanizmov interakcie polymérnych nanočastíc – samotných, aj v komplexe so syntetickými peptidmi odvodenými od HIV. Ako polymérne nanočastice boli použité dendriméry na báze kremíka a uhlíka tzv. karbosilanové dendriméry (CBD). Dendriméry vo všeobecnosti patria k molekulám s unikátnou architektúrou, ich štruktúra sa smerom od jadra vetví do vrstiev (tzv. generácií), čím celá štruktúra pripomína korunu stromov. Modifikované dendriméry nachádzajú

potenciál pre uplatnenie v rôznych biomedicínskych aplikáciách. V rámci tejto konkrétnej štúdie bola preukázaná interakcia komplexov s modelovými membránami, pričom táto interakcia mala elektrostatický charakter a bola silnejšia v prípade inkubácie komplexov s negatívne nabitými lipozómami. V ďalšej štúdii (Melikishvili a kol., 2016) sa autori snažili použiť model lipozómov priblížiť k reálnejším podmienkam, a to prítomnosťou pegylovaného (PEG, polyetylénglykol) lipidu za účelom modelovania glykokalixu, ktorý sa nachádza na vonkajšej strane plazmatickej membrány. V tomto prípade bola interakcia HIV syntetických peptidov v komplexe s CBD dendriméromi silnejšia smerom k zwitterionickým než ku pegylovaným membránovým modelom. Rastúca koncentrácia PEG-lipidu viedla k oslabeniu interakcie. Z hľadiska využitia nanočastíc ako nosičov predstavuje prekonanie extracelulárnych prekážok, ako i následná interakcia s plazmatickou membránou, jeden z kľúčových faktorov. Možnosť optimalizácie a modulácie fyzikálno-chemických vlastností nanočastíc, či už v procese ich syntézy alebo post-syntézy, je pre dosiahnutie želaného adjuvančného účinku v tomto smere veľkým pozitívom. Okrem adjuvančného pôsobenia môžu nanočastice tiež disponovať aj účinkom antivirálnym. Polyanionické karbosilanové dendriméry preukázali veľký potenciál ako antivirotiká vo vývoji nových mikrobicídnych látok zameraných na prevenciu HIV-1. Vacas-Cordoba a kol. (2016) študovali mechanizmus dvoch typov – sulfátových a naftylsulfátových CBD dendrimérov. Tieto dendriméry inhibovali virálnu infekciu v procese fúzie, konkurovali naviazaniu vírusu k cieľovej bunke a membránovej fúzii tým, že zablokovali interakciu medzi virálnym gp120 proteínom a CD4 hosťiteľským receptorom. Dendriméry boli schopné inhibovať i medzibunkovú transmisiu HIV. Okrem polymérnych nanočastíc sa v oblasti vakcinológie intenzívne študujú aj kovové, napr. zlaté nanočastice, ktoré taktiež disponujú viacerými unikátnymi vlastnosťami (stabilita, biokompatibilita, ľahkosť modifikácie a iné). Navyiac, multivalentná prezentácia malých molekúl na povrchu zlatých nanočastíc môže konvertovať neaktívne liečivo na účinnú látku (Bowman a kol., 2008). Peňa Gonzales a kol. (2017) skombinovali vlastnosti dendrimérov a zlatých nanočastíc; pripravili zlaté nanočastice modifikované s kationickými karbosilanovými dendrónmi, ktoré vlastne predstavujú stavebné bloky vyššie spomenutých dendrimérov. Autori tieto nanočastice charakterizovali viacerými biofyzikálnymi metódami a preštudovali ich aj z hľadiska indukcie potenciálnej toxicity a nešpecifického antigénneho stimulu. Zistili, že žiadna z nanočastíc neindukovala proliferáciu lymfocytov – navyiac nanočastice boli tolerované aj smerom k červeným krvinkám. Štúdium potenciálu týchto dendronizovaných zlatých nanočastíc ako nosičov rôznych terapeuticky aktívnych látok v súčasnosti intenzívne prebieha na viacerých renomovaných pracoviskách.



Na Fakulte matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského (FMFI UK) v Bratislave a v spolupráci s poľskými kolegami na Univerzite v Lodži, tieto nanočastice aktuálne študujeme v spojení s tromi typmi HIV odvodenými peptidmi a pripravené komplexy charakterizujeme napr. z hľadiska veľkosti, morfológie, zeta potenciálu, a iných, pre ďalšie využitie dôležitých vlastností.

## Záver

Vývoj efektívnej a bezpečnej očkovacej látky je proces zložitý a v prípade vírusu HIV to platí dvojnásobne. Výskum sa zameriava na štúdium nových antigénov, ako aj ich nosičov, ktoré musia spĺňať vlastnosti bezpečného použitia, ľahkej výroby, a po podaní vakcíny vyvolať stabilnú a intenzívnu imunitnú odpoveď. Veľkou výzvou v tomto smere zostáva dizajn takej očkovacej látky, ktorej základom by boli čo najmenej variabilné štruktúrne zložky vírusu, čím by bola takáto vakcína efektívna aj v prípade rôznych mutácií HIV. Aj z týchto dôvodov sa výskum aktuálne upriamuje na nanotechnológie. Nanočastice disponujú mnohými unikátnymi vlastnosťami, ktoré by sa dali využiť za účelom podporenia biologickej aktivity HIV vakcíny, prípadne dosiahnutia priameho antivirálného účinku.

## Literatúra

ASIF, D. F.; IRSHAD, M. Efficacy Trials and Progress of HIV Vaccines. In: *J. Cell. Sci. Ther.* 8, 2017, doi:10.4172/2157-7013.1000265.  
AIKINS, M. E.; BAZZILL, J.; MOON, J. J. Vaccine nanoparticles for protection against HIV infection. In: *Nanomedicine* 12(6), 2017, pp. 672-682.  
BALE, S.; GOEBRECHT, G.; STANO, A.; WILSON, R.; OTA, T.; TRAN, K.; INGALE, J.; ZWICK, M. B.; WYATT, R. T. Covalent linkage of HIV-1 trimers to synthetic liposomes elicits improved B cell and antibody responses. In: *J. Virol.* 91 (16), 2017, doi: 10.1128/JVI.00443-17.  
BOUNAGURO, L.; TONESELLO, M. L.; BOUNAGURO, F. M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenic and therapeutic implications. In: *J. Virol.* 81(19), 2007, pp. 10209-10219.  
BOWMAN, M. C.; BALLARD, T. E.; ACKERSON, J. CH.; FELDHEIM, D.; MARGOLIS, D. M.; MELANDER, CH. Inhibition of HIV fusion with multivalent gold nanoparticles. In: *J. Am. Chem. Soc.* 130(22), 2008, pp. 6896-6897.  
CLAPP, T.; SIEBERT, P.; CHAN, D.; BRAUN L., J. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability. In: *J. Pharm. Sci.* 100(2), 2011, pp. 388-401.  
DOANE, T.; BURDA, C. Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery. In: *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 65(5), 2013, pp. 607-621.  
EL SAHLY, H. MF59 as a vaccine adjuvant: a review of safety and immunogenicity. In: *Expert Rev. Vaccines.* 9(10), 2010, pp. 1135-1141.  
GLASS, J.; KENT, S.; DE ROSE, R. Enhancing dendritic cell activation and HIV vaccine effectiveness through nanoparticle vaccination. In: *Expert review of vaccines.* 15(6), 2016, pp. 719-729.  
GUTJAHR, A.; PHELIP, C.; COOLEN, A.L.; MONGE, C.; BOISGARD, A.S.; PAUL, S.; VERRIER, B. Biodegradable polymeric nanoparticles-based vaccine adjuvants for lymph nodes targeting. In: *Vaccines.* 4(34), 2016, doi: 10.3390/vaccines4040034.  
IONOV, M.; CIEPLUCH, K.; GARAIOVA, Z.; MELIKISHVILI, S.; MICHLEWSKA, S.; BALCERZAK, L.; GLIŃSKA, S.; MIŁOWSKA, K.; GOMEZ-RAMIREZ, R.; DE LA MATA, F.J.; SHCHARBIN, D.;

WACZULIKOVA, I.; BRYSEWSKA, M.; HIANIK, T. Dendrimers complexed with HIV-1 peptides interact with liposomes and lipid monolayers. In: *Biochim. Biophys. Acta.* 1848(4), 2015, pp. 907-915.  
INGALE, J.; STANO, A.; GUENAGA, J.; SHARMA, S. K.; NEMAZEE, D.; ZWICK, M. B.; WYATT, R. T. High-Density Array of Well-Ordered HIV-1 Spikes on Synthetic 556 Liposomal Nanoparticles Efficiently Activate B Cells. In: *Cell Rep* 15, 2016, pp. 1986-1999.  
MELIKISHVILI, S.; POTURNAYOVA, A.; IONOV, M.; BRYSEWSKA, M.; VARY, T.; CIRAK, J.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; GOMEZ-RAMIREZ, R.; DE LA MATA, F. J.; HIANIK, T. The effect of polyethylene glycol-modified lipids on the interaction of HIV-1 derived peptide-dendrimer complexes with lipid membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta.* 1858(12), 2016, pp. 3005-3016.  
NYAMWEYA, S.; HEGEDUS, A.; JAYE, A.; ROWLAND-JONES, S.; FLABAGAN, K. L.; MACALLAN, D. C. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: lessons for viral immunopathogenesis. In: *Rev. Med. Virol.* 23(4), 2013, pp. 221-240.  
PEÑA-GONZÁLES, C. E.; PEDZIWIATR-WERBICKA, E.; SHCHARBIN, D.; GUERRERO-BELTRÁN, C.; ABASHKIN, V.; LOZNIKOVA, S.; JIMENÉZ, J. L.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.; BRYSEWSKA, M.; GÓMEZ, R.; SANCHÉZ-NIEVES, J.; DE LA MATA, F. J. Gold nanoparticles stabilized by cationic carboxilic dendrons: Synthesis, characterization and biological properties. In: *Dalton transaction* 46, 2017, pp. 8736-8745.  
SEITZ, R. (German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'). Human immunodeficiency virus (HIV). In: *Transfus Med. Hemother.* 43(3), 2016, pp. 203-222.  
VACAS-CORDOBA, E.; MALY, M.; DE LA MATA, F. J.; GÓMEZ, R.; PION, M.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. Antiviral mechanism of polyanionic carboxilic dendrimers against HIV-1. In: *Int. Journal of Nano-medicine.* 11, 2016, pp. 1281-1294.  
VACAS-CORDOBA, E.; CLIMENT, N.; DE LA MATA, J. F.; PLANA, M.; GÓMEZ, R.; PION, M.; GARCIA, F.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. Á. Dendrimers as nonviral vectors in dendritic cell-based immunotherapies against human immunodeficiency virus: step forward their clinical evaluation. In: *Future Medicine.* 9(17), 2014, pp. 2683-2702.  
WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell binding and entry. In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(8), 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a006866.  
WWW.AIDSMAP.COM; <http://www.aidsmap.com/The-STEP-study/page/1065651/>  
WWW.CLINICALTRIALS.GOV; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02968849>  
WWW.UNAIDS.ORG; <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>  
ZHAO, L.; SETH, A.; WIBOWO, N.; ZHAO, CH.; MITTER, N.; YU, CH.; MIDDELBERG, A. P. J. Nanoparticle vaccines. In: *Vaccine.* 32, 2014, pp. 327-337.

## 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.



# Helikázy a ich potenciál v terapii

Nora Halgašová<sup>1</sup>

Gabriela Bukovská<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oddelenie genomiky a biotechnológií  
Ústav molekulárnej biológie SAV  
Dúbravská cesta 21  
845 51 Bratislava  
Slovensko  
Nora.Halgasova@savba.sk

<sup>2</sup>Oddelenie genomiky a biotechnológií  
Ústav molekulárnej biológie SAV  
Dúbravská cesta 21  
845 51 Bratislava  
Slovensko  
Gabriela.Bukovska@savba.sk

## Helicases and their therapeutic potential

### Abstract

Helicases separate the complementary strands of double-stranded nucleic acids using the energy from nucleoside triphosphate hydrolysis. They have roles in all aspects of DNA and RNA metabolism. The nucleic acid metabolic processes may be largely affected by DNA damage. An important aspect of helicase function is to recognize and handle damaged DNA molecules. Mutations in helicase genes result in synthesis of defective proteins with altered function. Incorrect action of the dysfunctional helicase in the organism may result in serious pathological states. Further studies on various helicases will contribute for development and design of specific therapeutics to prevent and treat diseases related to helicase deficiencies.

### Key words

DNA replication, replication protein, helicase, mutation, therapeutics

## Úvod

Biomakromolekuly proteínov a nukleových kyselín patria k základným zložkám živej bunky. Proteíny sú hlavným aktérom všetkých chemických procesov, ktoré v živých organizmoch prebiehajú, nukleové kyseliny zabezpečujú uchovanie a prenos genetickej informácie. Proteíny slúžia ako stavebné zložky, zdroj energie, substancia pre tvorbu hormónov a protilátok, fungujú ako enzýmy, zúčastňujú sa transportných a zásobovacích procesov, nukleové kyseliny nesú informáciu pre ich syntézu. Všetky svoje úlohy vykonávajú proteíny prostredníctvom interakcií s ďalšími zložkami bunky, pričom k najdôležitejším partnerom proteínov z pohľadu medzimolekulových interakcií patria nukleové kyseliny.

## Helikázy ako súčasť metabolických procesov nukleových kyselín

Nukleové kyseliny sú základné informačné molekuly bunky, ktorých úlohou je uchovávanie a prenos genetickej informácie. Deoxyribonukleová kyselina (DNA) slúži v živých organizmoch ako nositeľ informácie pre vyko-

návanie všetkých životných funkcií. Obvykle existuje vo forme dvojzávitnicových molekúl. Ribonukleová kyselina (RNA) zabezpečuje prenos genetickej informácie obsiahnutej v DNA. Existujú rôzne typy ribonukleových RNA (mediátorová, transferová, ribozomálna), ktoré majú v tomto procese svoju špecifickú funkciu. Ribonukleová kyselina býva prevažne jednovláknová, ale môže obsahovať dlhšie alebo kratšie dvojláknové úseky. Všetky tri etapy prenosu genetickej informácie – replikácia DNA, prepis genetickej informácie z DNA do RNA (transkripcia) a proces syntézy bielkovín (translácia) sú spojené s konformačnými zmenami nukleových kyselín. Dôležitú úlohu pri uskutočňovaní konformačných zmien nukleových kyselín majú helikázy.

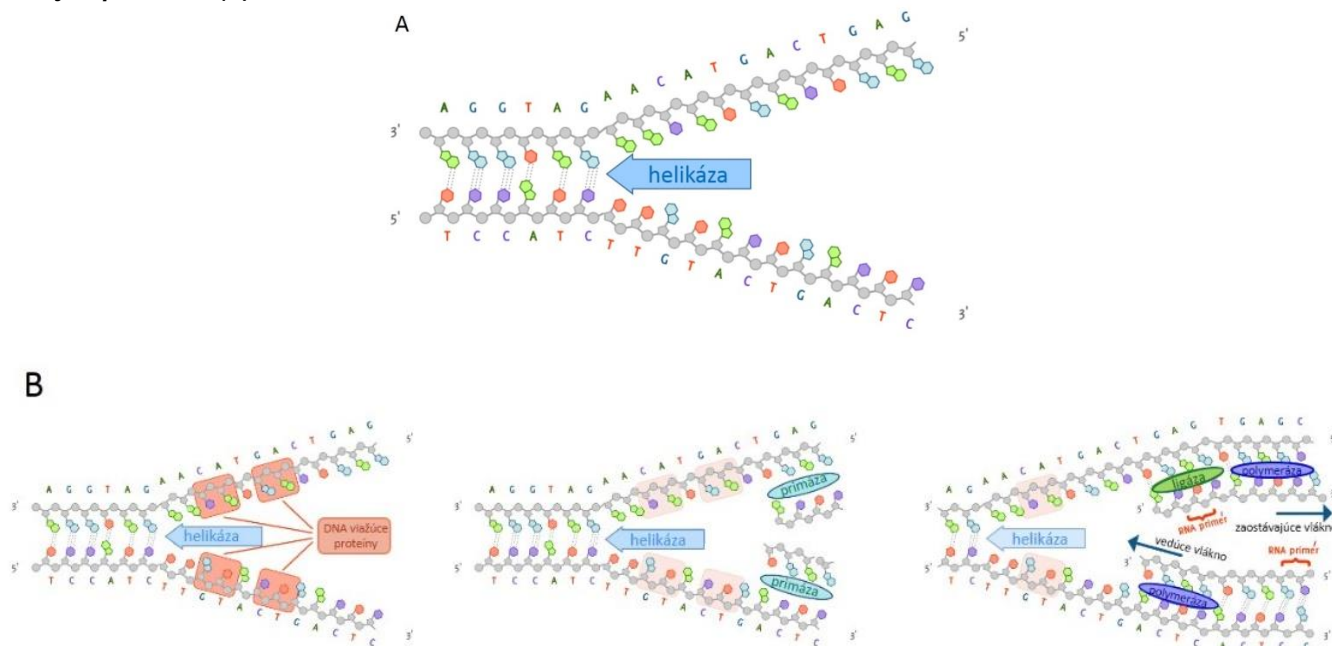
Helikázy sú proteíny, ktoré rozvíjajú dvojláknové úseky nukleových kyselín (Obr. 1A, B), pričom ako zdroj energie využívajú energiu získanú hydrolýzou adenozíntrifosfátu (ATP). Predstavujú veľmi početnú skupinu enzýmov, napríklad na génóme kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bolo identifikovaných 134 otvorených čítacích rámcov (ORF), kódujúcich proteíny podobné helikázam (Shiratori a kol., 1999), čo predstavuje približne 2,1 % všetkých ORF na kvasinkovom génóme.

Vysoká početnosť helikáz súvisí s množstvom špecifických funkcií, za ktoré sú jednotlivé proteíny zodpovedné. Zúčastňujú sa takmer všetkých procesov metabolizmu DNA a RNA-replikácie, rekombinácie a opravy DNA, transkripcie, translácie, syntézy ribozómov, maturation RNA, splicingu a procesov jadrového exportu. Sú nevyhnutné pre život bunky a v procese evolúcie dosiahli vysoký stupeň konzervovanosti na štruktúrnej aj funkčnej úrovni. Vysoká konzervovanosť helikáz prekračuje hranice medzi jednotlivými druhmi živých organizmov a poskytuje predpoklady pre to, aby poznatky získané zo štúdiá jednotlivých helikáz prispeli k objasneniu štruktúry a funkcie týchto enzýmov vo všeobecnosti. Konzervované oblasti helikáz, označované tiež ako konzervované motívy, zodpovedajú za väzbu nukleových kyselín, nukleotidov a kofaktorov. Medzi jednot-

livými skupinami helikáz sa odlišujú v súvislosti s konkrétnou funkciou, ktorú tieto helikázy vykonávajú. Na základe konzervovaných motívov boli helikázy rozdelené do šiestich superrodín, SF1-SF6 (Singleton a kol.

2007). Helikázy sa odlišujú tiež oligomérnym stavom – niektoré fungujú ako monoméry alebo diméry, iné sú funkčné len vo forme vyšších oligomérnych komplexov – hexamérov.

Obr. 1: Replikatívna DNA helikáza rozvíjajúca dvojzávitnicu DNA (A) a tá istá DNA helikáza v kontexte s ostatnými replikačnými proteínmi (B)

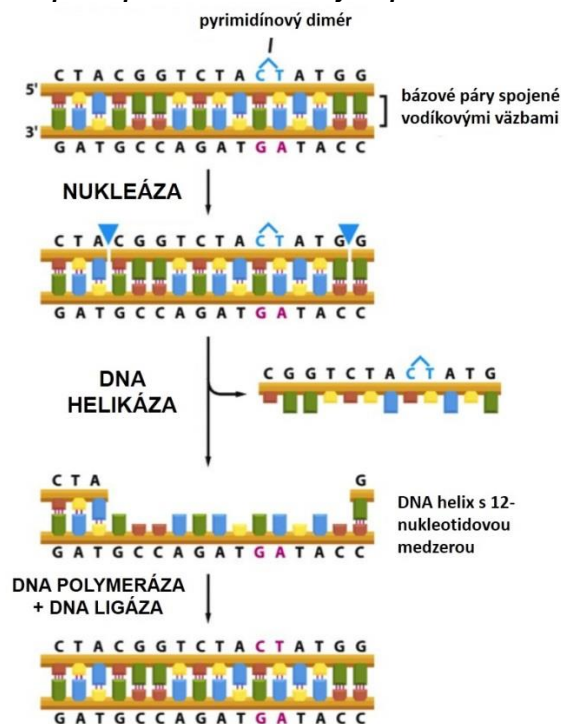


Upravené 10.7.2017 podľa:  
<http://www.profilegenomics.com/merritt/static/en/dna/helicase.png>,  
<http://www.profilegenomics.com/merritt/static/en/dna/binding%20proteins.png>,  
<http://www.profilegenomics.com/merritt/static/en/dna/primase.png>,  
<http://www.profilegenomics.com/merritt/static/en/dna/polymerase.png>

## Helikázy a ich úloha pri opravných mechanizmoch DNA

Dôležitým aspektom funkcie helikáz v biologickom kontexte je ich interakcia s poškodenými molekulami DNA. Všetky metabolické procesy, na ktorých sa DNA zúčastňuje, môžu byť ohrozené jej poškodením (Suhasini, Brosh, 2010). Poškodenie DNA môže viesť k úplnému zablokovaniu jej replikácie alebo transkripcie, alebo môže prinajmenšom podstatne znížiť ich presnosť. Pravdepodobnosť poškodenia DNA v bunkách je veľmi vysoká. Lindahl (1993) uvádza približne 10 000 poškodzujúcich udalostí v každej bunke ľudského tela za deň a iba dobre fungujúce opravné mechanizmy sú schopné zabezpečiť genomickú stabilitu. Živé organizmy si na opravu poškodenej DNA vyvinuli sofistikované mechanizmy, ktorých neoddeliteľnou súčasťou sú helikázy. Ich schopnosť katalyticky separovať vlákna DNA poskytuje priestor pre tolerovanie alebo opravu poškodenia. Helikázy pôsobia napríklad pri jadrových opravných mechanizmoch ako je vyštiepenie chybných nukleotidov (NER, Obr. 2), transkripčne závislá oprava (TCR) alebo udržiavanie telomér. Od jednoduchých baktérií až po cicavčie bunky, vo všetkých sa helikázy zúčastňujú na odpovedi, resp. oprave poškodenia DNA.

Obr. 2: Oprava poškodenia DNA vyštiepením nukleotidov



Upravené 10.7.2017 podľa:  
[https://classconnection.s3.amazonaws.com/853/flashcards/247853/png/nucleotide\\_excision\\_repair1349114267928.png](https://classconnection.s3.amazonaws.com/853/flashcards/247853/png/nucleotide_excision_repair1349114267928.png).

Vzhľadom na to, akú dôležitú úlohu majú helikázy v regulácii a udržiavaní genomickej integrity, je zrejmé, že defekty v týchto enzýmoch môžu viesť k patologickým stavom. V súčasnosti boli identifikované mnohé gény kódujúce helikázy. Genetické štúdie ukázali, že mutácie v niektorých týchto génoch sa spájajú s viacerými ľudskými ochoreniami. Mutácie v génoch kódujúcich helikázy môžu viesť k ochoreniam ako je predčasné starnutie, rôzne druhy rakoviny, neurologické alebo autoimunitné ochorenia a iné. Zatiaľ však nie je jasné, akým spôsobom defekty v týchto proteínoch vedú k ochoreniu. V súčasnosti sa vynakladá veľké úsilie na objasnenie vlastností helikáz na molekulárnej a bunkovej úrovni, avšak vzdialenosť od molekúl k pacientovi je zatiaľ veľmi veľká.

## Helikázy ako potenciálne terapeutiká

V posledných rokoch bolo opísaných niekoľko metodických prístupov, ktoré by mohli byť použité či už na presnejšiu diagnostiku ochorení alebo priame ovplyvnenie mechanizmu pôsobenia dotknutých helikáz so zvýšenou alebo zníženou funkciou. Jednou z možností sú genetické a expresné analýzy vzoriek od pacientov, čo umožní posúdiť kvalitu DNA a kvantitu RNA. Diagnózu a prognózu rakoviny alebo vekom podmienených chorôb by mala umožniť analýza génovej expresie helikázy RECQ1 (Sharma, 2014). Úroveň expresie tohoto najpočetnejšieho zástupcu zo skupiny opravných helikáz RecQ býva v rakovinových bunkách vysoko nadpriemerná. Objasnenie úlohy RECQ1 pre udržanie proliferatívneho a invazívneho fenotypu rakovinových buniek by mohlo pomôcť pri vývoji terapeutických stratégií na zabránenie progresie a metastázovania primárnych tumorov. Helikázy zo skupiny RecQ by mohli byť využité na prípravu nových terapeutík na báze malej interferujúcej RNA (siRNA) odvodených od génov týchto helikáz (Futami a Furuichi, 2015). Na spomalenie rastu rakovinových buniek boli v rôznych modelových systémoch použité na inhibíciu RecQ helikáz aj špecifické inhibítory s nízkou molekulovou hmotnosťou. Obidve tieto stratégie by mali viesť k zväčšeniu replikačných lézií a ponechaniu poškodených úsekov DNA bez opravy, čo by mohlo selektívne zabiť rakovinové bunky alebo aspoň zabrániť ich rastu.

Na druhej strane, mnohé helikázy majú v organizme aj tumor supresívne účinky. V takýchto prípadoch môže dôjsť k ochoreniu v dôsledku ich poškodenia alebo zníženej expresie. Na ovplyvnenie ochorení vyplývajúcich z narušenej funkcie defektných helikáz bol navrhnutý ďalší terapeutický postup. Jeho princípom je myšlienka farmakologického pôsobenia na defektné helikázy prostredníctvom malých chemických molekúl (Suhasini a Brosh, 2013). Tento prístup využíva predpoklad, že

bunkový fenotyp súvisiaci s poškodenou helikázou by mohol byť zvrátený pôsobením chemickej molekuly, ktorá navráti pôvodnú helikázovú katalytickú aktivitu v opravnej dráhe DNA. Väzbou na helikázu by mohla chemická molekula napríklad indukovať konformačné zmeny umožňujúce prepojenie hydrolýzy ATP a DNA rozvíjajúcej aktivity alebo obnoviť schopnosť proteínu vytvárať oligoméry komplex.

RNA helikázy majú svoju úlohu pri transkripcii, translácii, syntéze ribozómov, maturácii RNA, splicingu a procesoch jadrového exportu. Zistilo sa, že účinkujú aj ako zložky signálnych dráh v procese vrodenej imunitnej odpovede. Štúdium RNA helikáz, ktoré sa podieľajú na imunitnej odpovedi, bude prispievať k rozvoju stratégií boja proti vírusovým infekciám ako je HIV, HCV (vírus hepatitídy C) alebo IAV (Vírus chrípky typu A) (Ariumi 2014). Ďalším ochorením, pri ktorom by mohla byť molekulárnym cieľom pre diagnostiku a liečbu RNA helikáza, je autoimunitné ochorenie, systémový lupus erythematosus (Oliveira a kol., 2014). Pri tomto ochorení je antivirálna odpoveď organizmu v dôsledku poškodenia génov kódujúcich helikázy aktivovaná nadmerne. Terapeutické stratégie zamerané na defektné RNA helikázy by v prípade tohto ochorenia mohli byť zaujímavé, ale bolo by potrebné najprv identifikovať optimálne miesta zásahu do biochemickej dráhy.

Všetky uvedené stratégie poukazujú na vysoký terapeutický potenciál proteínov s helikázovou aktivitou, poskytujú nové pohľady na molekulárnu patológiu chorôb súvisiacich s vlastnosťami a funkciou helikáz a svedčia o tom, že táto problematika je vysoko aktuálna. Ďalšie štúdie rôznych proteínov s helikázovou aktivitou prispievajú nielen k diagnóze a liečbe určitých chorôb, ale aj k prevencii a vytvoreniu budúcej generácie terapeutík.

## Záver

Napriek veľkému úsiliu, ktoré sa vynakladá na objasnenie fungovania helikáz na molekulárnej a bunkovej úrovni, mnohé otázky zostávajú stále nezodpovedané. Zatiaľ nie je jasné, akým spôsobom defekty v týchto proteínoch vedú k ochoreniam. Bude potrebné pochopiť vzťah medzi jednotlivými mutáciami a ich fenotypickým prejavom. Toto vyžaduje systematické sledovanie molekulárných defektov spôsobených mutáciami a charakterizáciu biologických dráh, ktoré nebudú správne fungovať, keď sa defektná helikáza bude exprimovať. Budú potrebné biochemické, štruktúrne a genetické analýzy, ktoré poukážu presnejšie na funkciu helikáz v procese replikácie a opravy DNA. Bude nutné navrhnúť presné modely molekulovej štruktúry helikáz. Všetky tieto poznatky prispievajú k vývoju špecifických liečiv proti rakovine a chorobám súvisiacim so starnutím, ale aj vírusovým ochoreniam alebo autoimunitným ochoreniam.

## Literatúra

- ARIUMI, Y. Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection. *Frontiers in Genetics* 2014, 5, 423.
- FUTAMI, K., FURUICHI, Y. RECQL1 and WRN DNA repair helicases: potential therapeutic targets and proliferative markers against cancers. *Frontiers in Genetics* 2015, 5, 441.
- LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993, 362, 709-15.
- OLIVEIRA, L., SINICATO, N. A., POSTAL, M., APPENZELLER, S., NIEWOLD, T. B. Dysregulation of antiviral helicase pathways in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Genetics* 2014, 5, 418.
- SHARMA, S. An appraisal of RECQ1 expression in cancer progression. *Frontiers in Genetics* 2014, 5, 426.
- SHIRATORI, A., SHIBATA, T., ARISAWA, M., HANAOKA, F., MURAKAMI, Y., EKI, T. Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast* 1999, 15, 219-253.
- SINGLETON, M. R., DILLINGHAM, M. S., WIGLEY, D. B. Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases. *Annual Review of Biochemistry* 2007, 76, 23-50.
- SUHASINI, A. N., Brosh, R. M. Jr. Disease-causing missense mutations in human DNA helicase disorders. *Mutation Research* 2013, 752, 138-152.
- SUHASINI, A. N., Brosh, R. M. Jr. Mechanistic and biological aspects of helicase action on damaged DNA. *Cell Cycle* 2010, 9, 2317-2329.

## 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.



Agentúra

Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR  
pre štrukturálne fondy EÚ



**Európska únia**  
Európsky fond regionálneho rozvoja



## Fágové depolymerázy a ich využitie

Michal Kajsík<sup>1</sup>

Hana Drahovská<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vedecský park  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova č.8, 84104 Bratislava  
Slovensko  
michal.kajsik@uniba.sk

<sup>2</sup>Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova č.6, 842 15 Bratislava  
Slovensko  
drahovska@fns.uniba.sk

### Phage depolymerases and their utilization

#### Abstract

Bacterial resistance is critical factor for treating infections with antibiotics. Since there is lack of other treatments, the number of multidrug-resistant nosocomial pathogens is increasing alarmingly. Phage therapy, as an alternative to antibiotic treatment, exists many years, although it is not accepted the same way in all countries. Recently, research in this area is focused mainly on antibacterial action of lytic proteins, which provide the mechanism of cell lysis. Phage lytic proteins include holins, endolysins and depolymerases. The use of purified proteins provides several advantages over whole phage particles. Significant antimicrobial activity of lysins represents a potential for their use as an alternative to antibiotics. The aim of this article is to summarize the information about depolymerases and their antimicrobial effects.

#### Key words

Bacteriophage, biofilm, depolymerases

### Úvod

Bakteriálna rezistencia je kritickým faktorom pri liečení infekcií antibiotikami. Nedostatok iných spôsobov liečby zvyšuje počet multirezistentných nozokomiálnych patogénov. Fágová terapia, ako alternatíva k antibiotickej liečbe, je známa už mnoho rokov, no nie je rovnako uznávaná vo všetkých krajinách. Napriek sľubným výsledkom sa v západnej medicíne zatiaľ nepoužíva. V poslednej dobe sa výskum v tejto oblasti venuje aj účinku fágových lytických proteínov, ktoré sa počas životného cyklu fága podieľajú na degradácii hostiteľských membrán a ochranných obalov. Lytické proteíny s najvýraznejšími terapeutickými účinkami sú peptidoglykán hydrolázy, medzi ktoré patria virión asociované peptidoglykán hydrolázy a endolysíny. Ich funkciou je degradácia peptidoglykánu. S viriónom asociované peptidoglykán hydrolázy sú súčasťou štruktúry vírusových častíc v okolí chvostíka. Spôsobujú lokálne štiepenie bunkovej steny potrebné pre transfer fágovej DNA do bunky. Endolysíny, tvorené v neskorej fáze lytického cyklu, sú zasa potrebné na deštrukciu peptidoglykánu, nevyhnutnú pre uvoľnenie nových fágových častíc z bunky. K lytickým proteínom patria aj holíny a depolymerázy.

Depolymerázy sú reakciou bakteriofágov na ochrannú vrstvu polysacharidov, ktoré sú kovalentne naviazané na povrch alebo voľne asociované s bunkou. Depolymerázy štiepia extracelulárne polysacharidy a lipopolysacharidy, zanechávajúc povrch bunky prístupný pre adsorbciu vírusových častíc. Poslednými z opisovaných proteínov su holíny. Ich funkciou je tvorba pórov vo vnútornej vrstve cytoplazmatickej membrány, a tým sprístupnenie peptidoglykánu pre endolysíny. V tomto prehľade sa budeme podrobnejšie venovať depolymerázam, ktoré je možné použiť spolu s intaktnými fágmi, inými fágovými proteínmi alebo antibiotikami proti bakteriálnym kmeňom tvoriacim biofilm, čím je možné zvýšiť ich antimikrobiálny potenciál alebo rozšíriť spektrum účinku na viaceré bakteriálne patogény.

### Depolymerázy

Do životného cyklu bakteriofága sa zapája niekoľko proteínov s antimikrobiálnym potenciálom. Ako prvé sa zapájajú proteíny asociované s viriónom vírusu, ako sú depolymerázy a virión asociované peptidoglykán hydrolázy. Peptidoglykán hydrolázy sú lokalizované na bazálnej platničke alebo na chvostíku fága. Ich úlohou je vytvoriť pór v peptidoglykáne, ktorým sa fágová nukleová kyselina dostane do bunky.

Ďalšie virión asociované enzýmy sú depolymerázy. Hydrolyzujú exopolysacharidy nachádzajúce sa v kapsule, respektíve v exopolysacharidovej vrstve niektorých baktérií (tab. 1). Zatiaľ bola zistená ich prítomnosť len u bičíkatých dsDNA bakteriofágov (Casjens a Thuman-Commike, 2011). Samotné depolymerázy nemajú bakteriocídny účinok, ale deštrukcia púzdra baktérií má vážne následky. Odstránenie obalu baktérie ju vystavuje vplyvom okolia, čím výrazne znižuje schopnosť prežitia. Kapsula zároveň predstavuje fyzickú bariéru pre adsorbciu fága na povrch baktérie (Scholl a kol., 2005). Prekrýva antigény na povrchu bunky, a tým slúži ako ochrana pred reakciami imunitného systému. Polysacharidy sú prítomné na povrchu baktérií ako štrukturál-

ne alebo kapsulárne polysacharidy (CPS), alebo sú súčasťou sekretovaného exopolysacharidu (EPS) bakteriálnych biofilmov (Yan a kol., 2014). Odstránením

exopolysacharidov sú baktérie vystavené vysychaniu a sú citlivejšie na účinok antimikrobiálnych prostriedkov (Bjarnsholt, 2013).

Tab. 1: **Prehľad vybraných substrátov fágových depolymeráz.** Spracované podľa (Born a kol., 2014)

Bakteriálny druh	Bakteriofág	Substrát
<i>E.coli</i>	K1F	Sialová kyselina
<i>E.coli</i>	K1E	Sialová kyselina
<i>Erwinia amylovora</i>	L1	Amylovoran galaktóza
<i>Pseudomonas putida</i>	phi15	Pektín
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DEP phage	nešpecifikovaný
<i>Enterobacter agglomerans</i>	SF153b	nešpecifikovaný
<i>Klebsiella aerogenes</i>	nešpecifikované	galaktóza
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	vB_SepiS-phiPLA5	Pektín
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	vB_SepiS-phiPLA7	Pektín
<i>Acinetobacter baumannii</i>	phiAB6	Pektát

Depolymerázy sa často uvoľňujú z lytických fágov v aktívnych formách, ktoré ovplyvňujú matrix biofilmu. Depolymerázová aktivita môže byť identifikovaná ako neustále sa rozširujúca turbídna zóna v okolí fágových plakov. Zónu predstavujú citlivé baktérie, ktorých polysacharidové kapsuly boli degradované depolymerázou. Doteraz používané spôsoby merania aktivity depolymeráz môžeme rozdeliť na biologické, biochemické a fyzikálne. Niektoré metódy sú univerzálne pre všetky druhy polysacharidov, ale existujú aj metódy na substrátovo špecifickú detekciu. Primárny biologický spôsob detekcie prítomnosti depolymeráz je aplikácia fágov a enzýmov na bakteriálne kultúry a analýza typickej turbídnej zóny (Cornelissen a kol., 2011). Spektrofotometrické metódy umožňujú kvantitatívne stanovenie depolymerizačnej aktivity. Na kolorimetrické vyhodnotenie degradácie biofilmu sa využíva kryštálová violet alebo dimetyl-metylénová modrá (Toté a kol., 2008). Využíva sa aj množstvo iných metód, ako napríklad elektroforetické metódy, TLC chromatografia, spektroskopia. Jedna zo sofistikovanejších metód umožňujúca presné meranie degradácie matrixu biofilmu je laserová interferometria, ktorá deteguje rýchlosť difúzie malých molekúl cez vrstvu biofilmu (Danis-Wlodarczyk a kol., 2016). Fágové depolymerázy sú veľmi špecifické a zriedka pôsobia na viacero príbuzných polysacharidových štruktúr. Bolo identifikovaných celkovo 160 depolymeráz zo 143 bakteriofágov (43 Myoviridae, 47 Siphoviridae, 37 Podoviridae a 16 nezaradených), ktoré infikujú 24 bakteriálnych rodov. Veľkosť týchto proteínov je tiež rôznorodá, pohybuje sa od 197 do 2417 aminokyselín (Pires a kol., 2016). Fágové depolymerázy môžu mať dve formy:

- integrálna súčasť fágových častíc,
- rozpusťné proteíny vznikajúce pri lýze hostiteľskej bunky (Drulis-Kawa a kol., 2015).

Väčšina fágových depolymeráz (126 proteínov) je kódovaná v rovnakom otvorenom čítacom rámci ako gén pre vlánko chvostíka. Depolymerázy môžu byť umiestnené aj na iných štruktúrach bakteriofága, okrem chvostíkových vlákien aj na bazálnej platničke alebo na krku spájajúcom chvostík a hlavičku (Pires a kol., 2016).

## Rozdelenie depolymeráz

Podľa spôsobu pôsobenia boli depolymerázy rozdelené do dvoch hlavných skupín: hydrolázy a lyázy. Obe skupiny sa vyznačujú vysokou špecifitou reakcií s bakteriálnymi polysacharidmi, čo prispieva k úzkemu hostiteľskému spektru.

### Hydrolázy:

O-glykozylové hydrolázy sú enzýmy, ktoré katalyzujú hydrolýzu glykozydických väzieb (Davies a Henrissat, 1995). Vo väčšine prípadov je enzymatická aktivita katalyzovaná dvoma aminokyselinovými zvyškami: všeobecná kyselina (donor protónu) a nukleofil/báza (Koshland, 1953). Podľa priestorovej polohy katalytických zvyškov hydrolýza prebieha pomocou dvoch hlavných mechanizmov, ktoré vedú k celkovej retencii alebo inverzii anomerickej konfigurácie. V tejto triede enzýmov bolo zistených šesť rôznych skupín depolymeráz: sialidázy, levanázy, xylozidázy, dextranázy, rhamnozidázy a peptidázy.

### Lyázy:

Polysacharidové lyázy sú enzýmy, ktoré štiepia (1,4)-glykozidické väzby pomocou  $\beta$ -eliminácie so súčasným zavedením novej dvojitej väzby bez použitia vody (Michaud a kol., 2003). Táto skupina fágových depolymeráz zahŕňa tri skupiny: hyaluronát, alginát a pektín/pektát lyázy.

Väčšina fágov kóduje iba jeden alebo dva depolymerázové motívy prítomné na jednom gène. Avšak niektoré fágy môžu obsahovať viacero génov kódujúcich depo-

lymerázy. Napríklad fág  $\phi$  K1-5 je schopný replikovať sa v K1 a K5 kmeňoch *E. coli*, pretože kóduje dve chvostíkové vlákna s odlišnou enzymatickou aktivitou. Jedno vlákno obsahuje endosialidázu, zatiaľ čo druhé K5 lyázu, ktoré degradujú kapsulárny polysacharid K1 alebo K5 kmeňov (Scholl a kol., 2001).

## Využitie depolymeráz

Biofilmy vďaka impermeabilite matrixu poskytujú baktériám ochranu proti bakteriofágom alebo antibiotikám. Matrix zabezpečuje fyzickú bariéru pre viaceré agensy. Fágy prostredníctvom lytických enzýmov degradujú exopolysacharidy a dostávajú sa do hlbších vrstiev biofilmu a následne lyzujú bakteriálne bunky (Harper a kol., 2014). Mechanizmus pôsobenia bakteriofágov sa líši od pôsobenia antibiotík alebo biocídov. Bakteriálne bunky v prvých štádiách rastu sú náchylnejšie na infekciu ako zrelé bunky. Prostredníctvom kanálov fágy vstupujú do biofilmu. Takýto spôsob prieniku môžeme sledovať pri biofilmoch tvorených baktériami rodu *Lactococcus*, *Stenotrophomonas maltophilia* a iné.

Pires a kol. uskutočnil niekoľko pokusov, ktorými dokázal enzymatickú aktivitu natívnych bakteriofágov. Použili bakteriálne kmene *Acinetobacter* a jeho bakteriofága vB\_AbaP\_CEB1. Bakteriofágy boli aplikované na vyrastené kolónie a účinkovali 24 až 120 hodín. Aktivita fágovej depolymerázy je vizuálne identifikovaná prítomnou turbídnou zónou, ktorá obklopuje plaky (Pires a kol., 2016). Podobný pokus urobil aj Harper s kolektívom. Použili kmeň *Pseudomonas aeruginosa*, ktoré boli infikované fágom. Po infekcii došlo k produkcii alginát lyázy a následne teda k degradácii exopolysacharidu alginátu (Harper a kol., 2014). Štúdie ukazujú, že bakte-

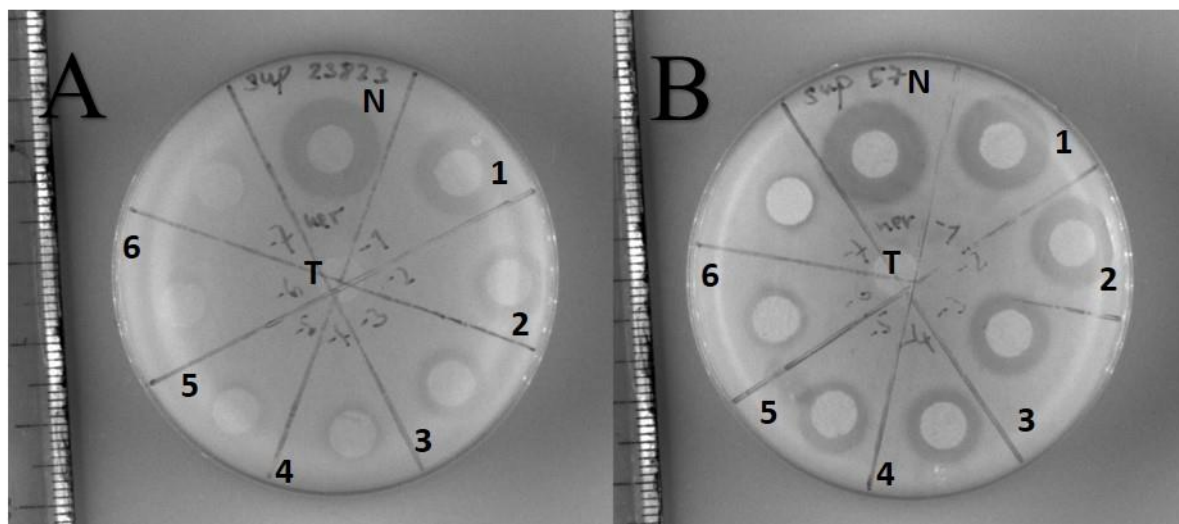
rio fágy obsahujúce polysacharidové depolymerázy špecifické pre konkrétne kmene sú relatívne časté (Hughes a kol., 1998). Izolované polysacharidové depolymerázy sú na rozdiel od samotného fága aktívne v širokom rozsahu podmienok prostredia. Pri použití fágovej častice je nevyhnutné, aby fág získal prístup k receptorom na bunke a infikoval ju vo všetkých možných podmienkach. Pri použití enzýmu je rozsah hostiteľov oveľa širší.

Tzu-Lung Lin a kol. testovali aktivitu purifikovanej depolymerázy z bakteriofága NTUH-K2044-K1-1 infikujúci patogénny kmeň *Klebsiella pneumoniae*. Analýza DNA sekvencie fágu ukázala, že vírus kóduje gén 34, ktorý má vysokú sekvenčnú podobnosť s pektát lyázou, a preto môže zodpovedať kapsulárnej depolymeráze. Pri nanášaní na médium s *K. pneumoniae*, rekombinantný proteín spôsobil zónu inhibovaného rastu. Špecifickosť tohto enzýmu bola skúmaná na viacerých kmeňoch a bolo zistené, že purifikovaná depolymeráza bola schopná inhibovať rast širšieho spektra kmeňov ako samotný bakteriofág (Lin a kol., 2014).

V našom laboratóriu sme sa venovali purifikácii depolymeráz z bakteriofágov Dev-CT-57 a Dev-CD-23823. Oba fágy infikujú baktérie rodu *Cronobacter* a tvoria plaky s čírym stredom a so širokou turbídnou zónou, ktorá je charakteristická pre fágy obsahujúce depolymerázy. Na základe porovnania ich DNA sekvencií s databázou sme vybrali gény gp41 z fága Dev-CD-23823 a gp40 z fága Dev-CT-57. Proteíny sme nadexprimovali v expresnom kmeni *E. coli* a následne aplikovali na bakteriálne kultúry pomocou diskov. Oba proteíny boli aktívne, čo sme pozorovali širokou turbídnou zónou v okolí disku (Obr. 1).

Obr. 1: Vplyv koncentrácie proteínov na veľkosť zóny lýzy bakteriálnej kultúry *C. malonaticus* 161007/29.

A: Proteín CD23-gp41; B: Proteín CT57-gp40; N: neriedený proteín; 1: 2x riedený proteín; 2: 4x riedený proteín; 3: 8x riedený proteín; 4: 16x riedený proteín; 5: 32x riedený proteín; 6: 64x riedený proteín; T: tlmivý roztok





## Záver

Vzhľadom na pretrvávajúci výskyt, či dokonca šírenie multirezistentných patogénov, je nevyhnutné venovať množstvo úsilia do hľadania nových spôsobov boja proti bakteriálnym patogénom. K sľubným alternatívam patrí aj využitie bakteriofágov a ich lytických proteínov. Fágové lytické proteíny sú obvykle monomérmé, je možné ich exprimovať v bakteriálnych hostiteľoch. Samozrejme sú špecifické a účinné voči konkrétnym hostiteľom a substrátom. Špecifita enzýmov je výhodná pre terapiu, pretože sa dá liečba cieľiť na patogény, pričom baktérie prospešné pre človeka ostávajú neporušené. Depolymerázy zapadajú do fágovej terapie ako doplnkový prípravok, ktorý odstráni kapsulu alebo naruší biofilm a umožní tak fágom a endolyzínom atakovať patogénne baktérie. Schopnosť baktérií, maskovať povrchové štruktúry exopolysacharidmi, prichytávať sa na povrchy a vytvárať biofilm spôsobuje v praxi obrovské problémy. Bakteriofágy predstavujú najpočetnejší organizmus na našej planéte, pričom každý z nich obsahuje a inovuje spôsob ako efektívne atakovať a lyzovať hostiteľa. Naším úsilím by malo byť opísať čo najviac takýchto proteínov a študovať ich schopnosti, ktoré by mohlo ľudstvo využiť vo svoj prospech.

## Literatúra

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Supplementum*, (136), 2013, 1-51.

BORN, Y., FIESELER, L., KLUMPP, J., EUGSTER, M. R., ZURFLUH, K., DUFFY, B., AND LOESSNER, M. J. The tail-associated depolymerase of *Erwinia amylovora* phage L1 mediates host cell adsorption and enzymatic capsule removal, which can enhance infection by other phage. *Environmental microbiology*, 16(7), 2014, 2168-80.

CASJENS, S. R. AND THUMAN-COMMIKE, P. A. Evolution of mosaic related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly. *Virology*, 411(2), 2011, 393-415

CORNELISSEN, A., CEYSSENS, P. J., T'SYEN, J., VAN PRAET, H., NOBEN, J. P., SHABUROVA, O. V., KRYLOV, V. N., VOLCKAERT, G., LAVIGNE, R. The T7-related *Pseudomonas putida* phage  $\phi$ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PLOS ONE* 6, 2011

DANIS-WŁODARCZYK, K., VANDENHEUVEL, D., JANG, H.B., BRIERS, Y., OLSZAK, T., ARABSKI, M., WASIK, S., DRABIK, M., HIGGINS, G., TYRRELL, J., HARVEY, B.J., NOBEN, J.-P., LAVIGNE, R., DRULIS-KAWA, Z. A proposed integrated approach for the preclinical evaluation of phage therapy in *Pseudomonas* infections. *Scientific Reports* 6, 2016, 28115.

DAVIES, G., HENRISSAT, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859.

DRULIS-KAWA, Z., MAJKOWSKA-SKROBEK, G., MACIEJEWSKA, B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Current Medicinal Chemistry* 22, 2015, 1757-1773

HARPER, D., PARRACHO, H., WALKER, J., SHARP, R., HUGHES, G., WERTHÉN, M., LEHMAN, S., MORALES, S. Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics* 3, 2014, 270-284.

HUGHES, K. A., SUTHERLAND, I. W., JONES, M. V. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* 144, 1998, 3039-3047

KOSHLAND, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews* 28, 1953, 416-436.

LIN, T.-L., HSIEH, P.-F., HUANG, Y.-T., LEE, W.-C., TSAI, Y.-T., SU, P.-A., PAN, Y.-J., HSU, C.-R., WU, M.-C., WANG, J.-T. Isolation of a Bacteriophage and Its Depolymerase Specific for K1 Capsule of *Klebsiella pneumoniae*: Implication in Typing and Treatment. *The Journal of infectious diseases* 210, 2014, 1734-1744.

MICHAUD, P., DA COSTA, A., COURTOIS, B., COURTOIS, J. Polysaccharide Lyases: Recent Developments as Biotechnological Tools. *Critical Reviews in Biotechnology* 23, 2003, 233-266.

PIRES, D. P., OLIVEIRA, H., MELO, L. D. R., SILLANKORVA, S., AZEREDO, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology* 100, 2016, 2141-2151.

SCHOLL, D., ADHYA, S. and MERRIL, C. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 2005, 4872-4.

SCHOLL, D., ROGERS, S., ADHYA, S., MERRIL, C.R. Bacteriophage K1-5 Encodes Two Different Tail Fiber Proteins, Allowing It To Infect and Replicate on both K1 and K5 Strains of *Escherichia coli*. *Journal of Virology* 75, 2001, 2509-2515.

TOTÉ, K., BERGHE, D. V., MAES, L., COS, P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Letters in Applied Microbiology* 46, 2008, 249-254.

YAN, J., MAO, J., XIE, J. Bacteriophage Polysaccharide Depolymerases and Biomedical Applications. *BioDrugs* 28, 2014, 265-274.

## 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.



# Priemyselny význam biokatalyzátorov a možnosti regenerácie kofaktorov

Stanislava Bírová<sup>1</sup>

Zdenko Levarski<sup>1,2</sup>

Stanislav Stuchlík<sup>1,2</sup>

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

<sup>1</sup>birova12@uniba.sk

<sup>2</sup>Univerzitný vedecký park  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava  
Slovensko

## Industrial importance of biocatalysts and cofactor regeneration possibilities

### Abstract

Biotransformation is a modern way of using biological sources for chemical reaction catalysis and thus has a great potential to substitute so far preferred synthetic chemistry to produce valuable compounds e.g. drugs or food additives. Production of recombinant enzymes is thanks to current possibilities of recombinant biologics engineering, much more preferred than isolation of a native enzyme from its original natural sources. One of such perspective enzymes is alcohol dehydrogenase, used in processes mainly in combination with enzymes providing cofactors regeneration. This work offers a short review of such multi-enzyme systems with a wide practical applicability.

### Key words

*E. coli*, biotransformation, alcohol dehydrogenase, cofactor

## Úvod

Biotransformácia, často označovaná aj ako biokatalýza, predstavuje spôsob využitia biologických systémov na katalýzu konverzie substrátu na produkt, pričom katalyzujúcim komponentom takejto reakcie môžu byť jednobunkové organizmy alebo izolovaný enzým. Na základe toho rozlišujeme biotransformáciu celobunkovú alebo enzýmovú (Ghisalba et al., 2010). Spomedzi benefitov, ktoré biokatalyzátory ponúkajú, je ich výnimočnou vlastnosťou vysoká selektivita, a to chirálna (stereoselektivita) voči konkrétnemu stereoizoméru [diastereoizomérom L/D, (+)/(-), (E)/(Z); enantiomérom (R)/(S)]; miestne špecifická (regioselektivita) a selektivita voči konkrétnym funkčným skupinám prítomným v molekule substrátu (chemoselektivita). Tieto vlastnosti umožňujú minimalizovať prítomnosť vedľajších produktov, vrátane neželaných izomérov, a tým jednoduchšiu separáciu cieľového produktu z reakčnej zmesi. V neposlednom rade je ich pridanou hodnotou aj ich environmentálna bezpečnosť (Ghisalba et al., 2010, Lee et al., 2013). Použitie jednobunkových organizmov (baktérií, kvasiniek) resp. izolovaných enzýmov ako biokatalyzátorov zahŕňa svoje výhody aj nevýhody. Zásadný rozdiel pri-

náša metabolický aparát prítomný v použítom organizme pri celobunkovej biotransformácii, ktorý je spravidla schopný *in vivo* regenerácie kofaktorov esenciálnych pre správnu funkčnosť enzýmu, a teda aj priebeh danej reakcie. Nie je teda kofaktory nutné dodávať exogénne, ako je to pri enzýmovej biotransformácii. Na druhej strane, táto intracelulárna metabolická aktivita býva zdrojom množstva neželaných vedľajších produktov, z čoho vyplýva celková menšia efektivita celobunkového systému (Lee et al., 2013; Prather, 2004).

Natívne enzýmy prítomné v bunkách alebo v izolovanej forme sa málokedy správajú ako ideálne biokatalyzátory. Využitím moderných techník génového inžinierstva je však možné charakteristiky týchto jednoduchých organizmov, ako aj enzýmov, cielene zmeniť či vylepšiť (Rajagolapan & Kroutil, 2011). Naviac, v súčasnosti vďaka rekombinantným metodikám je možné produkovať relatívne vysoké množstvá enzýmu v nenáročných hostiteľských organizmoch s dobre preštudovanou genetikou, jednoduchou a rýchlou transformabilitou a s dobrou rastovou kinetikou, akým je napríklad *Escherichia coli* (Johannes et al., 2006; Rosano & Ceccarelli, 2013; Sørensen & Mortensen, 2005). Nevyhnutným krokom je však efektívna expresia a purifikácia rekombinantného enzýmu so zámerom získať enzým v čo najvyššej čistote, množstve a aktivite. Často sa však dosiahnutie týchto cieľov stáva problematickým z rozličných metodologických príčin či komplikácií daných použitým expresným systémom alebo charakterom exprimovaného proteínu (Baneyx & Mujacic, 2004).

## Význam alkohol dehydrogenázy a možnosti regenerácie kofaktorov

Výrazný progres vo výskume biokatalyzátorov nastal primárne kvôli potenciálu selektivity enzýmov použitých v organickej syntéze zlúčenín, ktorých jednotlivé stereoizoméry vykazujú navzájom odlišné vlastnosti. Chirálna

zlúčeniny sú tak jednou z najdôležitejších skupín priemyselne využívaných látok v rámci rôznych odvetví, vrátane farmaceutického či potravinárskeho. Konkrétne chirálne alkoholy vystupujú často ako kľúčové intermediáty v multikrokovej syntéze organických zlúčenín. Vzhľadom na rozvíjajúci sa záujem o zavedenie biotransformačných reakcií do tohto doposiaľ čisto syntetického procesu, bolo vyvinutých viacero prístupov biokatalytickej prípravy chirálnych alkoholov (Honda et al., 2006) s využitím oxidoreduktáz (Daußmann et al., 2006), hydroláz (Kong et al., 2014) alebo lyáz (Stillger et al., 2006). Vo veľkej miere je pozornosť venovaná

predovšetkým používaniu alkohol dehydrogenáz (ADHs) v industriálnych procesoch v podobe izolovaného enzýmu aj v rámci celobunkovej biokatalýzy (de Wildeman et al., 2007). Z experimentálnych dát (Tab. 1) možno usúdiť, že alkohol dehydrogenáza (ADH) získaná zo širokej škály organizmov s rôznymi špecifickými vlastnosťami, adjustovanými na konkrétne využitie vďaka technikám proteínového inžinierstva, ponúka silný biokatalytický nástroj s početnými možnosťami komerčného využitia, vrátane produkcie chirálnych alkoholov z prochirálnych karbonylových zlúčenín.

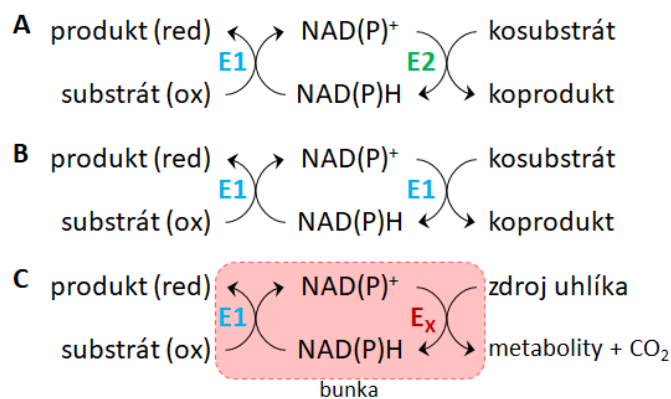
Tab. 1: **Prehľad experimentálnych štúdií zaoberajúcich sa biokatalytickou produkciou chirálnych alkoholov pomocou ADH z rôznych zdrojov**

PÔVOD ADH	PRODUCENT	REAKCIA	POUŽITIE	REF.
<i>Lactobacillus kefir</i>	natívna ADH z <i>L. kefir</i>	redukcia 2-acetylchromen-4-ónu	intermediát syntézy <b>antiastmatík</b>	Bisel et al., 2007
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>E. coli</i> /LBADH	produkcia terc-butyl (S)-6-chloro-5-hydroxy-3-ketohexanoátu	intermediát syntézy <b>hypolipidemík</b>	Wolberg et al., 2008
<i>Candida magnoliae</i>	<i>E. coli</i> /CMADH a GDH z <i>Bacillus megaterium</i>	produkcia etyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoátu	intermediát syntézy <b>hypolipidemík</b>	Kizaki et al., 2001
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>E. coli</i> /CaADH	produkcia etyl (2S,3R)-2-chloro-3-hydroxy-3-fenylpropanoátu	intermediát syntézy <b>chemoterapeutík</b>	Applegate et al., 2011
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>E. coli</i> /SsADH	produkcia (S)-profénov	intermediát syntézy <b>nesteroidných antiflogistík</b>	Friest et al., 2010

Väčšina oxidoreduktáz, vrátane ADHs patrí medzi enzýmy závislé od kofaktorov, konkrétne  $\beta$ -1,4-nikotínamid adenín dinukleotidu (NADH) alebo  $\beta$ -1,4-nikotínamid adenín dinukleotid fosfátu (NADPH). Tento fakt môže predstavovať, kvôli vysokej cene kofaktorov, komplikáciu ich praktickej aplikácie. Z toho dôvodu sú vyvíjané stále efektívnejšie spôsoby regenerácie kofaktorov s cieľom dosiahnuť ekonomickú životaschopnosť biotransformačných procesov (Liu & Wang, 2007; Kara et al., 2013). Z doposiaľ vyvinutých ciest regenerácie kofaktorov sa zdajú byť relevantnými pre priemyselné využitie najmä tzv. substrátovo-spojený, enzýmovo-spojený a *in vivo* prístup (Obr. 1; de Wildeman et al., 2007).

Prvý spôsob regenerácie kofaktorov zahŕňa použitie enzýmu, ktorý je schopný utilizovať zároveň oxidovanú [NAD(P)<sup>+</sup>] aj redukovanú [NAD(P)H] formu kofaktora, teda katalyzovať aj syntézu želaného produktu konverziou substrátu, aj spätnú kofaktor-regeneračnú reakciu s kosubstrátom. Avšak situácia, keď ten istý enzým katalyzuje súčasne dve rôzne reakcie, dva rôzne substráty sú tak v kompetícii o jeho aktívne miesto a pôsobia na seba ako vzájomné inhibítory. Z toho vyplýva, že je pomerne náročné dosiahnuť termodynamicky výhodné podmienky pre súčasný priebeh oboch reakcií v tom istom reakčnom médiu (Liu & Wang, 2007).

Obr. 1: **Schémy rozličných ciest regenerácie kofaktorov** (adaptované z publ. de Wildeman et al., 2007); A – enzýmovo-spojená; B – substrátovo-spojená; C – *in vivo*



Termodynamickú rovnováhu medzi priamou a spätnou reakciou je možné posunúť *in situ* odstraňovaním koproduktu z reakčnej zmesi odparovaním, odčerpávaním plynov, redukciou tlaku, destiláciou alebo kryštalizáciou (Goldberg et al., 2007). Existuje niekoľko významných štúdií venovaných ADH-katalyzovaným syntézam chirálnych alkoholov, ktoré dokázali využiť potenciál tohto spôsobu kofaktorovej regenerácie použitím lacného zdroja H<sup>+</sup>, oxidácie izopropanolu na acetón (Musa et al., 2009; Lavandera et al., 2008; Findrik et al., 2005; Inoue

et al., 2005; Hildebrandt et al., 2001). Popritom autori opisujú zaujímavé vlastnosti ADH z daných organizmov (najmä termofilných mikroorganizmov), okrem enantio-selektivity aj napríklad termostabilitu (Musa et al., 2009) či odolnosť voči organickým rozpúšťadlám prítomným v reakčnej zmesi (Lavandera et al., 2008).

Na rozdiel od substrátovo-spojenej reakcie je v enzýmovom spojení spôsobe prítomný, okrem enzýmu priamej reakcie, navyše ďalší enzým, ktorý katalyzuje spätnú kofaktor-regeneračnú konverziu kosubstrátu na koprodukt. Tento model ponúka možnosti použitia širšieho spektra kosubstrátov na kofaktorovú regeneráciu. Zároveň, ak majú enzýmy dostatočne odlišnú substrátovú špecificitu, nadobúda systém aj jednoduchšiu cestu dosiahnutia termodynamickú „hnacej sily“ pre obe reakcie. (Liu & Wang, 2007). Experimentálne štúdie venované tejto metóde regenerácie nikotínových kofaktorov opisujú použitie viacerých vhodných reakcií katalyzovaných príslušnými enzýmami z hľadiska potreby oxidačného alebo redukčného mechanizmu. Medzi najvýznamnejšie oxidačné partnerské enzýmy pre ADH patria najmä formiát dehydrogenáza (FDH – oxidácia formiátu na  $\text{CO}_2$ ), glukóza dehydrogenáza (GDH – oxidácia glukózy) či malát dehydrogenáza (MDH – oxidácia malátu na oxáloacetát). Výhodou použitia FDH a MDH je okamžité a priebežné odparovanie produktu ( $\text{CO}_2$  resp. oxáloacetátu) z reakčnej zmesi a znamená minimalizáciu možnosti inhibície produktom, a preto aj výhodný termodynamický stav reakcie. O industriálnej viabilite kofaktorovej regenerácie použitím druhého enzýmu svedčia viaceré patenty, napríklad použitie ADH z *Rhodococcus erythropolis* na produkciu chirálnych organických zlúčenín spolu s FDH na spätnú reoxidáciu NADH (Hummel et al., 2003); MDH na regeneráciu kofaktora v podobnom procese (Náamnieh et al., 2004); ADH a MDH na produkciu primárnych alkoholov z aldehydov (Gröger et al., 2007); alebo FDH na regeneráciu kofaktora pri produkcii chirálneho intermediátu syntézy niektorých hypolipidémik určených na terapiu hyperlipidémii (Chen & Wu, 2011).

Jadhav et al. (2014) v štúdií venovanej ADH-katalyzovanej konverzii butanal na butanol porovnávali efektívnosť reakcie bez kofaktorovej regenerácie a s použitím ako enzýmovo-, tak aj substrátovo-spojenej regenerácie NADH. Prekvapivo, pri použití ADH na katalýzu priamej (butyraldehyd  $\rightarrow$  butanol) aj spätnej reakcie (acetaldehyd  $\rightarrow$  etanol), bola dosiahnutá najvyššia miera konverzie (75 %). Naopak, pri enzýmovo-spojenej regenerácii NADH pridaním glutamát dehydrogenázy (GLDH) a L-glutamátu ako kosubstrátu bola miera konverzie najnižšia (24 %). Konvenčná reakcia bez použitia akéhokoľvek prístupu kofaktorovej regenerácie dosiahla konverziu 35 %. Napriek tomu, že enzýmovo-spojený prístup vykazuje vo väčšine prípadov výhodnejšie vlastnosti a v

priemere lepšie výsledky, aj na základe uvedenej štúdie môžeme povedať, že pravdepodobne nie je možné so 100 % určitou vopred predpokladať, ktorá metóda je najvhodnejšia pre danú reakciu.

Popri spomínaných prístupoch použitia ADH v rámci dvoj-enzýmovej sústavy so sekundárnym kofaktor-regeneračným enzýmom (FDH, GDH a i.), bolo vyvinutých množstvo prác, kde autori volia originálne a často kreatívne prístupy dizajnu viac-enzýmových systémov *in vitro* aj *in vivo*. Yun et al. (2003) vytvorili systém *in vitro* produkcie dvoch enantiomérnych zlúčenín ((R)-1-fenyletanolu a (R)- $\alpha$ -metylbenzylamínu) z jedného racemického substrátu ( $\alpha$ -metylbenzylamínu) využitím troch rekombinantných enzýmov nadexprimovaných a purifikovaných z *E. coli*:  $\omega$ -transaminázy ( $\omega$ -TA, z *Vibrio fluvialis*) a páru ADH (z *Lactobacillus kefir*) s GDH (z *Bacillus subtilis*) v sústave enzýmovo-spojenej regenerácie NADPH. Touto prácou demonštrovali vyššiu efektívnosť použitého trojenzýmového systému, v ktorom sa vyhli inhibícii produktom spojenej s  $\omega$ -TA, pričom zároveň boli schopní vyprodukovať enantiočistý (R)-amín aj (R)-alkohol z racemickej zmesi.

Weckbecker a Hummel (2004) sa zaoberali taktiež trojenzýmovým systémom v celobunkovej biotransformácii zameranej na zefektívnenie konverzie acetofenónu na (R)-fenyletanol, štandardu pre stanovenie enantiočistoty. Použili overenú kombináciu ADH (z *Lactobacillus kefir*) a FDH (z *Candida boidinii*) obohatenú o rekombinantnú pyridín nukleotid transhydrogenázu (PNT, z *E. coli*). Aktivita použitého typu FDH závisí striktne od  $\text{NAD}^+$  a naopak, (R)-špecifická ADH viaže prednostne fosfátom obohatený NADPH. Preto bola ako prostriedok medzi týmito enzýmami do reakcie zaradená PNT katalyzujúca transport  $\text{H}^+$  z molekuly NADH (produkt FDH-oxidácie formiátu na  $\text{CO}_2$ ) na  $\text{NADP}^+$  (produkt ADH-redukcie ketónu na sekundárny alkohol). Tento prístup zaručil obnovu vnútrobunkovej koncentrácie oboch typov kofaktorov, ktoré boli opäť k dispozícii pre kľúčovú ADH resp. FDH a správny priebeh transformácie.

Priebeh multikrokovej biokatalýzy, obzvlášť celobunkovej, môže prinášať aj komplikácie v podobe nefunkčnej alebo nekompatibilnej expresie jednotlivých enzýmov alebo ich nízkej stability z dôvodu prílišnej akumulácie reakčných intermediátov. Za účelom minimalizácie takýchto javov, Li et al. (2014) vytvorili originálny celobunkový biokatalytický systém s použitím enzýmovej fúzie ADH (z *Lactobacillus brevis*) a FDH (z *Candida boidinii*) spojených rôznymi typmi linkerov za účelom redukcie prochirálnych ketónov na chirálne (R)-alkoholy. Fúzne proteíny ADH-lin1-FDH resp. ADH-lin2-FDH dosiahli vyššiu mieru enantiočistoty produktu v porovnaní s celobunkovou biotransformáciou využívajúcou tieto enzýmy ako dva izolovane exprimované proteíny. Podobný prístup fúzie enzýmov vyvinuli Jeon et al. (2015) využi-

tím ADH (z *Micrococcus luteus*) a Baeyer-Villiger monoxygenázy (BVMO, z *Pseudomonas putida*). Takáto sústava bola určená na transformáciu sekundárnych alkoholov s dlhým reťazcom (rôznych substituovaných hydrofóbných mastných kyselín) na príslušné estery. Oba enzýmy boli exprimované v *E. coli* vo forme fúzneho proteínu, pričom ich sekvencie boli spojené linkerom bohatým na flexibilný glycín. Fúzny ADH-Gly-BVMO enzým vykazoval signifikantne vyššiu aktivitu u väčšiny vybraných substrátov v porovnaní s enzýmami exprimovanými v *E. coli* izolovane. Týmto počnmi autori naznačili perspektívu technológie fúzných enzýmov ako účinného nástroja na vylepšenie možností multikrokovvej biokatalýzy.

## Záver

Enzýmovo spojená metóda obnovy kofaktorov, na základe paralelného použitia dvoch rôznych enzýmov, patrí medzi najjednoduchší z tzv. multienzýmových systémov. Tie boli vytvorené ako nový prístup k viackrokovvej syntéznej reakcii v snahe napodobniť intracelulárne kaskádové biochemické procesy, pri ktorých produkt jednej reakcie je zároveň reaktantom reakcie ďalšej. Zaužívaný spôsob takejto syntézy obnáša viackrokový postup, pričom reakcie prebiehajú v izolovaných sústavách s potrebou purifikovať každý meziproduct. Taký postup dosahuje nielen nízke výťažky, ale je náročný na čas a na množstvo chemikálií použitých pri separačných krokoch a automaticky aj na množstvo odpadu. Keďže je environmentálna ochrana v ére 21. storočia jednou z najdiskutovanejších záležitostí chemického a farmaceutického priemyslu, dôležité sú práce venované vývoju inovatívnych menej škodlivých „green“ prístupov. Z týchto dôvodov sa vytvárajú multi-enzýmové systémy ponúkajúce vyššie výťažky produktu a nižšiu finančnú náročnosť s využitím neškodných biologických produkčných systémov.

## Literatúra

APPLEGATE, G. A.; CHELOHA, R. W.; NELSON, D. L.; BERKOWITZ, D.B. A new dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* for asymmetric synthesis: dynamic reductive kinetic resolution entry into the Taxotère side chain. In: *Chem Commun (Camb)*. 47, 8, 2011, pp. 2420-2.  
BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. In: *Nat Biotechnol*. 22, 11, 2004, pp. 1399-408.  
CHEN, Y.; WU, X. Synthesis of ethyl (3R, 5S)-dihydroxy-6-benzyloxy hexanote. WO Patent. 2011. 2,011,066,775.  
DAUßMANN, T.; ROSEN, T. C.; DÜNKELMANN, P. Oxidoreductases and Hydroxynitrilase Lyases: Complementary Enzymatic Technologies for Chiral Alcohols. In: *Eng Life Sci*. 6, 2, 2006, pp. 125-9.  
DE WILDEMAN, S. M.; SONKE, T.; SCHOEMAKER, H. E.; MAY, O. Biocatalytic reductions: from lab curiosity to "first choice". In: *Acc Chem Res*. 40, 12, 2007, pp. 1260-6.

FINDRIK, Z.; VASIĆ-RAČKI, D.; LÜTZ, S.; DAUßMANN, T.; WANDREY, C. Kinetic modeling of acetophenone reduction catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter* sp. In: *Biotechnol Lett*, 27, 15, 2005, pp. 1087-95.  
FRIEST, J. A.; MAEZATO, Y.; BROUSSY, S.; BLUM, P.; BERKOWITZ, D. B. Use of a robust dehydrogenase from an archaeal hyperthermophile in asymmetric catalysis-dynamic reductive kinetic resolution entry into (S)-profens. In: *J Am Chem Soc*. 132, 17, 2010, pp. 5930-1.  
GHISALBA, O.; MEYER, H. P.; WOHLGEMUTH, R. Industrial biotransformation. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. New York: John Wiley & Sons, 2010. ISBN 9780470054581.  
GOLDBERG, K.; SCHROER, K.; LÜTZ, S.; LIESE, A. Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. In: *Appl Microbiol Biotechnol*. 76, 2, 2007, pp. 237-48.  
GRÖGER, H.; CHAMOULEAU, F.; HAGEDORN, C. Method for producing primary alcohols by reducing aldehydes using an alcohol dehydrogenase for a coupled cofactor regeneration. EP Patent. 2007. 1,784,495.  
HILDEBRANDT, P.; RIERMEIER, T.; ALTENBUCHER, J.; BORNSCHEUER, U. T. Efficient resolution of prostereogenic arylaliphatic ketones using a recombinant alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. In: *Tetrahedron: Asymmetry*. 12, 8, 2001, pp. 1207-10.  
HONDA, K.; ISHIGE, T.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S. Microbial and Enzymatic Processes for the Production of Chiral Compounds. *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. Boca Raton: CRC Press. 2006. ISBN 9781420019377.  
HUMMEL, W.; ABOKITSE, K.; GRÖGER, H. ADH from *Rhodococcus erythropolis*. WO Patent. 2003. 2,003,091,423.  
INOUE, K.; MAKINO, Y.; ITOH, N. Production of (R)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH). In: *Tetrahedron: Asymmetry*. 16, 15, 2005, pp. 2539-49.  
JADHAV, S. B.; HARDE, S.; BANKAR, S. B.; GRANSTRÖM, T.; OJAMO, H.; SINGHAL, R. S.; SURVASE, S. A. A green process for the production of butanol from butyraldehyde using alcohol dehydrogenase: process details. In: *RSC Adv*. 4, 28, 2014, pp. 14597-602.  
JEON, E.Y.; BAEK, A.H.; BORNSCHEUER, U.T.; PARK, J.B. Enzyme fusion for whole-cell biotransformation of long-chain sec-alcohols into esters. In: *Appl Microbiol Biotechnol*. 99, 15, 2015, pp. 6267-75.  
JOHANNES, T.; SIMURDIK, M. R.; ZHAO, H. Biocatalysis. *Encyclopedia of Chemical Processing*. Boca Raton: CRC Press. 2006. ISBN 9780824755638.  
KARA, S.; SCHRITTWIESER, J. H.; HOLLMANN, F.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. In: *Appl Microbiol Biotechnol*. 98, 4, 2014, pp. 1517-29.  
KIZAKI, N.; YASOHARA, Y.; HASEGAWA, J.; WADA, M.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S. Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. In: *Appl Microbiol Biotechnol*. 55, 5, 2001, pp. 590-5.  
KONG, X.D.; YUAN, S.; LI, L.; CHEN, S.; XU, J. H.; ZHOU, J. Engineering of an epoxide hydrolase for efficient bioresolution of bulky pharmaco substrates. In: *Proc Natl Acad Sci USA*. 111, 44, 2014, pp. 15717-22.  
LAVANDERA, I.; KERN, A.; SCHAFFENBERGER, M.; GROSS, J.; GLIEDER, A.; DE WILDEMAN, S.; KROUTIL, W. An exceptionally DMSO-tolerant alcohol dehydrogenase for the stereoselective reduction of ketones. In: *ChemSusChem*. 1, 5, 2008, pp. 431-6.

- LEE, W. H.; KIM, M. D.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Engineering of NADPH regenerators in *Escherichia coli* for enhanced biotransformation. In: *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 7, 2013, pp. 2761-72.
- LI, B.; LI, Y.; BAI, D.; ZHANG, X.; YANG, H.; WANG, J.; LIU, G.; YUE, J.; LING, Y.; ZHOU, D.; CHEN, H. Whole-cell biotransformation systems for reduction of prochiral carbonyl compounds to chiral alcohol in *Escherichia coli*. In: *Sci Rep-UK.* 4, 6750, 2014, pp. 1-5.
- LIU, W.; WANG, P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. In: *Biotechnol Adv.* 25, 4, 2007, pp. 369-84.
- MUSA, M. M.; LOTT, N.; LAIVENIEKS, M.; WATANABE, L.; VIELLE, C.; PHILLIPS, R. S. A single point mutation reverses the enantiopreference of *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase. In: *ChemCatChem.* 1, 2009, pp. 89-93.
- NÁAMNIEH, S.; HUMMEL, W.; GRÖGER, H. Use of malate dehydrogenase for NADH regeneration. WO Patent. 2004. 2,004,022,764.
- PRATHER, K. Using whole cells as biocatalysts: why/when, growth vs conversion (screening). MIT Chemical Engineering Department. 2004. Dostupné na: <http://ocw.mit.edu/courses/chemical-engineering/10-492-2-integrated-chemical-engineering-topics-i-introduction-to-biocatalysis-fall-2004/lecture-notes/lecture5.pdf>
- RAJAGOLAPAN, A.; KROUTIL, W. Biocatalytic reactions: selected highlights. In: *Mater Today.* 14, 4, 2011, pp. 144-52.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. In: *Front Microbiol.* 5, 2013, pp. 172.
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. In: *J Biotechnol.* 115, 2, 2005, pp. 113-28.
- STILLGER, T.; POHL, M.; WANDREY, C.; LIESE, A. Reaction engineering of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* catalyzing enantioselective C–C bond formation. In: *Org Process Res Dev.* 10, 6, 2006, pp. 1172-7.
- WECKBECKER, A.; HUMMEL, W. Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. In: *Biotechnol Lett.* 26, 22, 2004, pp. 1739-44.
- WOLBERG, M.; FILHO, M.V.; BODE, S.; GEILENKIRCHEN, P.; FELDMANN, R.; LIESE, A.; HUMMEL, W.; MÜLLER, M. Chemoenzymatic synthesis of the chiral side-chain of statins: application of an alcohol dehydrogenase catalysed ketone reduction on a large scale. In: *Bioprocess Biosyst Eng.* 31, 3, 2008, pp. 183-91.
- YUN, H.; YANG, Y. H.; CHO, B. K.; HWANG, B. Y.; KIM, B. G. Simultaneous synthesis of enantiomerically pure (R)-1-phenylethanol and (R)-alpha-methylbenzylamine from racemic alpha-methylbenzylamine using ω-transaminase/alcohol dehydrogenase/glucose dehydrogenase coupling reaction. In: *Biotechnol Lett.* 25, 10, 2003, pp. 809-14.

## 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.



# N-glykozylácia proteínov v expresných kmeňoch *Escherichia coli*

Zdenko Levarski<sup>1,2</sup>Stanislava Bírová<sup>2</sup>Eva Struhárňanská<sup>2</sup>Silvia Rybecká<sup>2</sup>Stanislav Stuchík<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Vedecký park  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičová č. 8, 841 04 Bratislava  
Slovensko  
zdenko.levarski@uniba.sk

<sup>2</sup>Katedra molekulárnej biológie  
Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičová č. 6, 842 15 Bratislava  
Slovensko

## N-glycosylation of proteins in *Escherichia coli* expression strains

### Abstract

The discovery of bacterial protein glycosylation system in *Campylobacter jejuni* opened new possibilities in the field of synthetic biology and glycoengineering. This 16 kbp locus encompasses genes needed for the synthesis and attachment of bacterial type glycan to asparagine residues on the target proteins. The ability of this system to be fully functional in *Escherichia coli*, one of the most commonly used host organisms in biotechnology production pushed the possibilities even further. Although there are still many obstacles, such as relatively low efficiency, presence of non-eukaryotic sugar moieties and requirement for broader recognition sequence, a lot of success has been made in the engineering of eukaryotic core glycan, glycosylation efficiency increase and recognition sequence optimization. This system has so far been successfully utilized to generate glycoconjugate vaccines and allow oriented antibody immobilization through attached glycans.

### Key words

N-glycosylation, recombinant proteins, post-translational modification, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*

## Úvod

Proces enzymaticky katalyzovaného pripájania molekúl oligo- a polysacharidov (glykánov) z donorových molekúl na cieľové proteíny je známy pod názvom glykozylácia a patrí medzi najdôležitejšie potranslačné úpravy prebiehajúce v eukaryotických bunkách (Aebi, 2013). Jej najčastejšia forma, N-glykozylácia, čiže naväzovanie glykánov na asparagínové zvyšky cieľových proteínov, okrem fyziologického predstavuje aj veľmi dôležitý proces z hľadiska farmaceutického a biotechnologického priemyslu. Táto modifikácia proteínov určuje najmä množstvo charakteristík daného proteínu a pokiaľ ide o terapeuticky využiteľnú molekulu, jej stabilita, počas rozpadu, farmakokinetika a farmakodynamika predstavujú tie najdôležitejšie faktory (Veronese and Pasut, 2005; Werner et al., 2007). Aby biologikum splnilo prís-

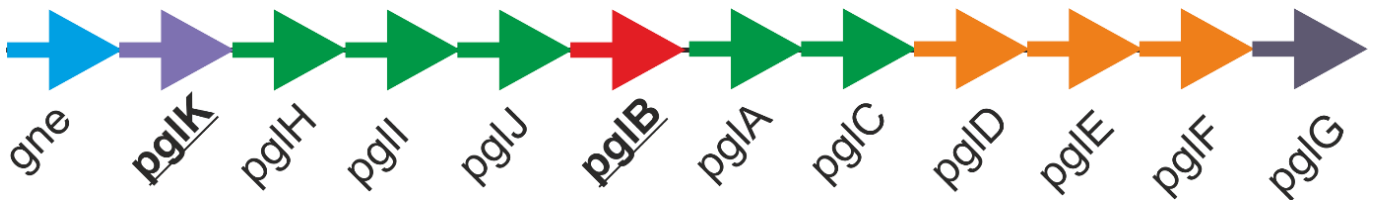
ne normy a dostalo sa na trh, musí v prvom rade spĺňať základnú požiadavku – mať funkčnú a natívnu štruktúru, identickú alebo porovnateľnú s tou, ktorú má jeho prirodzene sa vyskytujúca forma. Tak napr. jedno z prvých rekombinantných liečiv schválených na ľudské použitie, ľudský rastový hormón, na svoju správnu aktivitu nevyžaduje žiadne po-translačné úpravy, ale ani nesmie obsahovať žiadne prídavné aminokyseliny, najmä na svojom N-konci (Kamionka, 2011). To z hľadiska jeho produkcie v kultúrach *E. coli* predstavuje problém, keďže prítomnosť iniciačného metionínu, ktorý sa v maturovanej molekule rastového hormónu nenachádza, môže až u 5 % pacientov vyvolávať imunitnú odpoveď (Schellekens and Casadevall, 2004). Tento problém sa relatívne jednoducho rieši fúziou exprimovanej molekuly k proteínovým partnerom a následným odštiepením, prípadne opracovaním N-konca purifikovanej molekuly rastového hormónu (Levarski et al., 2014). Problém ale nastáva, keď cieľovú molekulu nepredstavuje jednoduchý proteín, ale zložitejšia molekula vyžadujúca si na svoju správnu funkciu aj glykány. Vtedy sa najčastejšie ako produkčný organizmus uprednostňujú eukaryotické bunky, začínuc od kvasiniek s humanizovaným systémom glykozylácie cez hmyzie bunkové kultúry až po najčastejšie využívané, ale zároveň aj najnáročnejšie, cicavčie bunkové kultúry s líniou ovariálnych buniek čínskeho škrečka – CHO. Tieto bunky zabezpečujú vysokú mieru produkcie zložitých proteínov a zároveň aj správnu po-translačnú modifikáciu. Ich hlavnou nevýhodou sú vysoké nároky na sterilitu, drahé kultivačné médiá a zložitosť manipulácie. Dlhodobú prax však má ambíciu zatiaľ aspoň čiastočne uľahčiť objav bakteriálneho N-glykozylačného systému, ktorý bol prvýkrát opísaný u patogéna *Campylobacter jejuni* (Jaffé et al., 2014).

## Pgl operón

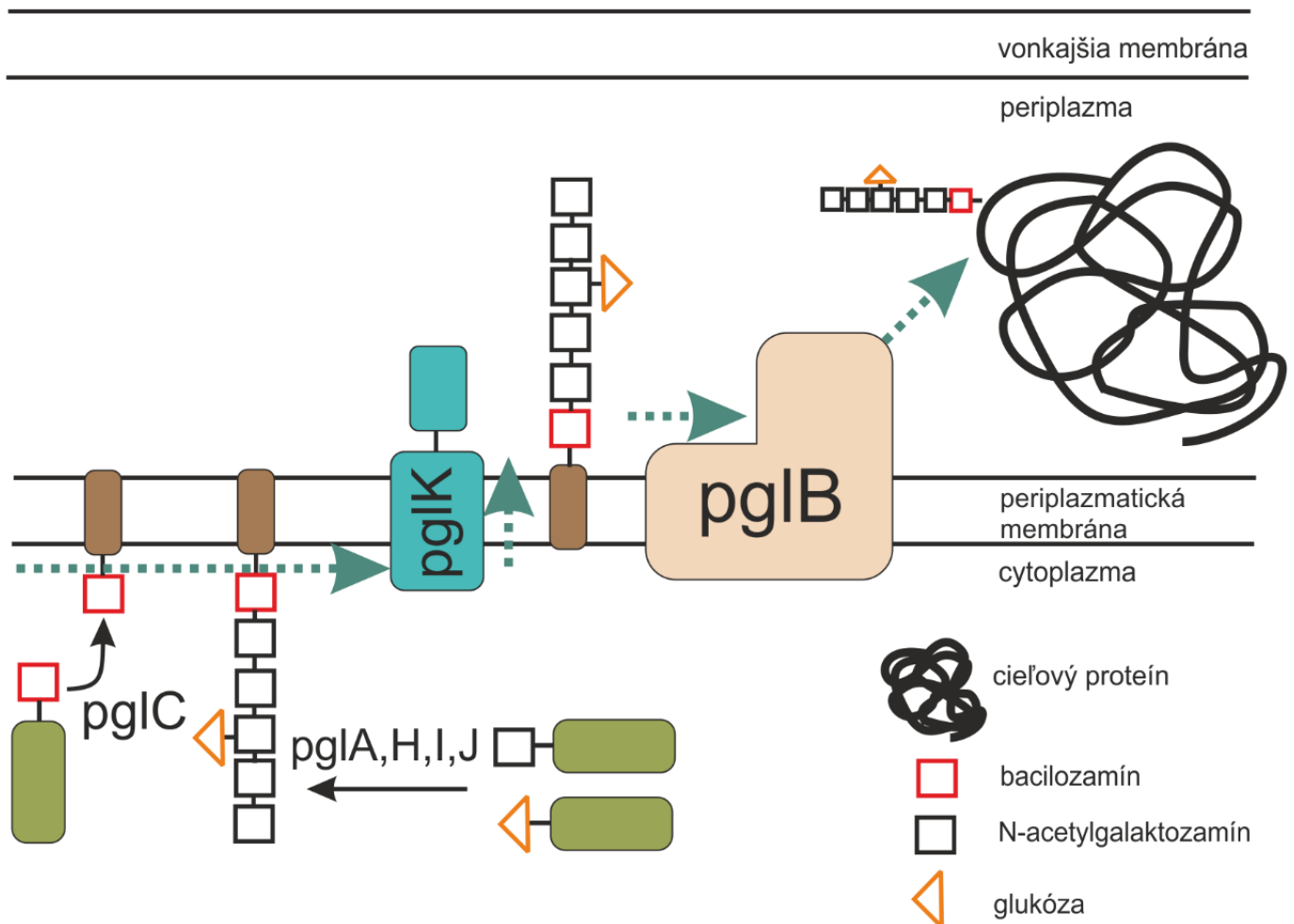
Enzýmy, potrebné na N-glykozyláciu proteínov v *C. jejuni*, sú kódované génmi v pgl operóne. Pgl lokus bol opísaný pred dvadsiatimi rokmi (Fry et al., 1998; Szymanski et al., 1999) ale významnejší záujem vyvolalo až jeho prenesenie do *E. coli* (Wacker et al., 2002). Ide o zhruba 16 kbp klaster (Obr. 1) zahrňujúci okrem jednotlivých glykozyltransferáz aj dva kľúčové enzýmy glykozylačného aparátu – flipázu pglK a oligosacharyltransferázu pglB (Linton et al., 2005; Young et al., 2002). Flipáza katalyzuje prenos glykanu (Obr.2), syntetizovaného v cytoplazme a ukotveného na lipidovom

nosiči, cez periplazmatickú membránu. Oligosacharyltransferáza následne rozpoznáva sekvenciu piatich aminokyselín na cieľovom proteíne a katalyzuje väzbu glykanu na asparagínový zvyšok. Sekvencia, ktorú pglB rozpoznáva je podobná s tou eukaryotickou (N-X-S/T, pričom X je ľubovoľná aminokyselina okrem prolínu), avšak vyžaduje si aj prídavné dve aminokyseliny, inak je efektivita prenosu nízka (D/E-X1-N-X2-S/T). Výsledkom tohto faktu je, že rekombinantné proteíny, nesúce eukaryotickú rozpoznávaciu sekvenciu sú síce glykozylované, ale s nižšou účinnosťou a na správne fungovanie systému je potrebné mutovať okolie glykozylovaného asparagínu (Nita-Lazar et al., 2005).

Obr. 1: Pgl operón z *C. jejuni*



Obr. 2: Priebeh N-glykozylácie v bakteriálnych bunkách





## Glykoinžinierstvo

Keď sa zameriame na dizajn glykanov s využitím pgl systému narazíme na dva rozdielne prístupy s rovnakým cieľom – priblíženie štruktúry bakteriálneho glykanu k štruktúre toho eukaryotického a napokon aj ľudského. Prvý prístup využíva *in vitro* remodelovanie glykánu s pomocou rekombinatných enzýmov, kde z pôvodného glykánu zostáva len prvý cukorný zvyšok – buď pôvodný bacilozamín alebo substituovaný N-acetylglukozamín (Lizak et al., 2011). Druhý prístup využíva podobné enzýmy ale *in vivo*, kde sa štruktúra vznikajúceho glykánu ovplyvňuje už v cytoplazme *E. coli* pomocou substitúcie pôvodných glykozyltransferáz za rekombinatné, najčastejšie kvasinkového pôvodu (Han et al., 2013). Oba prístupy umožňujú vytvorenie tzv. trimanóзовého jadra, ktoré je charakteristické pre glykány ľudského pôvodu tvoria základ humanizácie bakteriálneho glykánu. Problémom zostáva pridanie ďalšej charakteristickej eukaryotickej zložky glykánu – kyseliny sialovej, ktorá sa prirodzene v baktériách nenachádza.

## Využitie bakteriálneho glykozylačného systému

Bakteriálny glykozylačný systém bol v praxi využitý na produkciu konjugovaných vakcín, čím sa technológia ich výroby značne zjednodušila (Ihssen et al., 2010). Namiesto separátnej syntézy a izolácie glykánu a proteínového nosiča a následnej fúzie, tvorba konjugovaných vakcín za prítomnosti pgl systému prebieha v rovnakej bunke. Ako glykozyltransferázy a syntázy sa používajú enzýmy z cieľových organizmov (v súčasnosti z *Francisella tularensis*, *Shigella flexneri* serotyp 2a a *Burkholderia pseudomallei*). PglK (flipáza) a pglB (oligosacharyltransferáza) z pgl operónu následne syntetizovaný glykán prenášajú na cieľový proteínový nosič (Garcia-Quintanilla et al., 2014; Kampf et al., 2015; Ravenscroft et al., 2016).

Ďalším z príkladov použitia pgl systému je orientovaná imobilizácia protilátok na chromatografické matrice. Klasické imobilizačné techniky, využívajúce neselektívnu aktiváciu aminoskupín a následnú kovalentnú väzbu na vhodnú maticu znižujú flexibilitu cieľového proteínu a pokiaľ ide o enzým, často ovplyvňujú aj jeho aktivitu. Imobilizácia cez glykán umožňuje naopak flexibilnú väzbu a zároveň nezasahuje do aminokyselinovej štruktúry proteínu, čím sa teoreticky umožňuje lepšia prístupnosť substrátu resp. lepšie podmienky na správne fungovanie celého systému (Hu et al., 2013).

## Záver

Objav a opísanie bakteriálneho glykozylačného systému poskytuje zaujímavé možnosti pre súčasný biotechno-

logický výskum a v kombinácii s prístupmi syntetickej biológie má potenciál ovplyvniť spôsob akým získavame terapeuticky, diagnosticky, potravinársky alebo priemyselne zaujímavé látky. V súčasnosti však jeho širšie použitie limituje zatiaľ relatívne nízka účinnosť glykozylácie cieľových proteínov a neschopnosť produkčných kmeňov *E. coli* exportovať množstvo naprodukovaných proteínov do periplazmatického priestoru. Značné úsilie sa vyvíja v tomto smere a publikované pokroky z posledných rokov naznačujú, že optimalizačná cesta existuje a predurčuje tento systém na potenciálne široké využitie.

## Literatúra

- AEBI, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 2430-2437.
- FRY, B. N., KOROLIK, V., TEN BRINKE, J. A., PENNING, M.T. T., ZALM, R., TEUNIS, B. J. J., COLOE, P. J. and VAN DER ZEIJST, B.A.M. (1998). The lipopolysaccharide biosynthesis locus of *Campylobacter jejuni* 81116. *Microbiology* 144, 2049-2061.
- GARCIA-QUINTANILLA, F., IWASHIKI, J. A., PRICE, N. L., STRATILO, C. and FELDMAN, M. F. (2014). Production of a recombinant vaccine candidate against *Burkholderia pseudomallei* exploiting the bacterial N-glycosylation machinery. *Frontiers in microbiology* 5, 381.
- HAN, R., LI, J., SHIN, H. D., CHEN, R. R., DU, G., LIU, L. and CHEN, J. (2013). Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnology advances*.
- HU, X., HORTIGUELA, M. J., ROBIN, S., LIN, H., LI, Y., MORAN, A. P., WANG, W. and WALL, J. G. (2013). Covalent and oriented immobilization of scFv antibody fragments via an engineered glycan moiety. *Biomacromolecules* 14, 153-159.
- IHSSEN, J., KOWARIK, M., DILETTOSO, S., TANNER, C., WACKER, M. and THONY-MEYER, L. (2010). Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* 9, 61.
- JAFFÉ, S. R. P., STRUTTON, B., LEVARSKI, Z., PANDHAL, J. and WRIGHT, P. C. (2014). *Escherichia coli* as a glycoprotein production host: recent developments and challenges. *Current opinion in biotechnology* 30, 205-210.
- KAMIONKA, M. (2011). Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12, 268-274.
- KAMPF, M. M., BRAUN, M., SIRENA, D., IHSSEN, J., THONY-MEYER, L. and REN, Q. (2015). In vivo production of a novel glycoconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a in recombinant *Escherichia coli*: identification of stimulating factors for in vivo glycosylation. *Microbial cell factories* 14, 12.
- LEVARSKI, Z., SOLTYSOVA, A., KRAHULEC, J., STUCHLIK, S., and TURNA, J. (2014). High-level expression and purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 100, 40-47.
- LINTON, D., DORRELL, N., HITCHEN, P. G., AMBER, S., KARLYSHEV, A. V., MORRIS, H. R., DELL, A., VALVANO, M. A., AEBI, M. and WREN, B. W. (2005). Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* N-linked protein glycosylation pathway. *Molecular microbiology* 55, 1695-1703.
- LIZAK, C., GERBER, S., NUMAO, S., AEBI, M. and LOCHER, K.P. (2011). X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature* 474, 350-355.

NITA-LAZAR, M., WACKER, M., SCHEGG, B., AMBER, S. and AEBI, M. (2005). The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. *Glycobiology* 15, 361-367.

RAVENSCROFT, N., HAEUPTLE, M.A., KOWARIK, M., FERNANDEZ, F. S., CARRANZA, P., BRUNNER, A., STEFFEN, M., WETTER, M., KELLER, S., RUCH, C. *et al.* (2016). Purification and characterization of a Shigella conjugate vaccine, produced by glycoengineering Escherichia coli. *Glycobiology* 26, 51-62.

SCHELLEKENS, H. and CASADEVALL, N. (2004). Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences. *Journal of neurology* 251 Suppl 2, II4-9.

SZYMANSKI, C. M., YAO, R., EWING, C. P., TRUST, T. J. and GUERRY, P. (1999). Evidence for a system of general protein glycosylation in Campylobacter jejuni. *Molecular microbiology* 32, 1022-1030.

VERONESE, F. M. and PASUT, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug discovery today* 10, 1451-1458.

WACKER, M., LINTON, D., HITCHEN, P. G., NITA-LAZAR, M., HASLAM, S. M., NORTH, S. J., PANICO, M., MORRIS, H. R., DELL, A., WREN, B. W. *et al.* (2002). N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. *Science* 298, 1790-1793.

WERNER, R. G., KOPP, K. and SCHLUETER, M. (2007). Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992) 96, 17-22.

YOUNG, N. M., BRISSON, J. R., KELLY, J., WATSON, D. C., TESSIER, L., LANTHIER, P. H., JARRELL, H. C., CADOTTE, N., ST MICHAEL, F., ABERG, E. *et al.* (2002). Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, Campylobacter jejuni. *The Journal of biological chemistry* 277, 42530-42539.

## 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



# Ergosterol – kľúčový sterol v bunkách kvasiniek

Alexandra Konečná<sup>1</sup>Nora Tóth Hervay<sup>2</sup>Yveta Gbelská<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Prirodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava  
Slovensko

<sup>1</sup>alexandra.konecna@uniba.sk

## Ergosterol – major sterol of yeast

### Abstract

Various molecular studies have shown that plasma membrane lipids play an important role in drug resistance. Lipids also affect the mechanical properties of the plasma membrane. Sterols belong to the basal lipid components of yeast membranes, e.g. of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as well as the fungal pathogen *Candida albicans*. The plasma membrane composition determines the cell's susceptibility to variety of stresses, such as ionic, osmotic and oxidative pressures, and the presence of antifungal drugs. Insight into the role of lipids in fungal virulence can lead to an improved understanding of the process of fungal pathogenesis and the development of new lipid-mediated therapeutic strategies.

### Key words

Yeast, plasma membrane, ergosterol, antifungal compounds

## Úvod

Steroly sú esenciálne štruktúrne a regulačné komponenty membrán eukaryotických buniek. Sú nevyhnutné pre zabezpečenie integrity membrány, ako aj pre životaschopnosť buniek. Steroly, ako základné komponenty biologických membrán, determinujú citlivosť kvasinkovej bunky voči rôznym stresovým faktorom (osmotický stres, oxidačný stres, antifungálne látky). Esenciálnu úlohu v zabezpečovaní fluidity a permeability plazmatickej membrány húb a kvasiniek zohráva ergosterol, homológ ľudského cholesterolu (Lv a kol., 2016).

Inhibícia biosyntézy ergosterolu je základnou funkciou celého radu antimykotík a antibiotík, ktoré sú účinné nielen proti mykózam, ale aj proti pôvodcom ďalších ochorení, ako sú leishmanióza a malária. V poľnohospodárstve sa inhibítory biosyntetickej dráhy ergosterolu používajú ako fungicídy. Ergosterol má tiež pozitívny

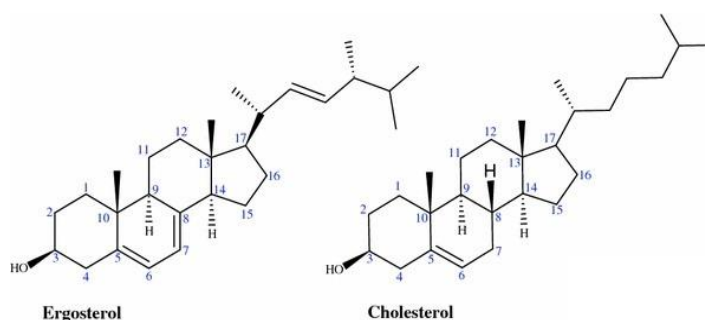
účinnok na ľudské zdravie, je prekursorom vitamínu D2 (ergokalciferolu). Pôsobenie UV svetla vedie k fotochemickej reakcii, ktorá konvertuje ergosterol na ergokalciferol (Dohnal a kol., 2008).

## Syntéza ergosterolu u kvasiniek

Eukaryotické bunky rôzneho pôvodu sa líšia štruktúrou sterolov; živočíchy syntetizujú cholesterol, rastliny sitosterol, kampesterol a stigmasterol, hlavným sterolom kvasiniek a húb je ergosterol. Spoločnou charakteristikou všetkých sterolov je prítomnosť dvojitej väzby medzi uhlíkmi C-5 a C-6 a prítomnosť hydroxylovej skupiny na uhlíku C-3. Štruktúru ergosterolu tvorí tetracyklická štruktúra s hydrofilnou hydroxylovou skupinou a acylovým postranným reťazcom, ktorý zodpovedá za ukotvenie ergosterolu v membráne. Na rozdiel od cicavčieho cholesterolu, ergosterol disponuje prítomnosťou nenasýtených väzieb medzi uhlíkmi C-7 a C-8 v kruhovej štruktúre molekuly a na C-22 v bočnom reťazci, ako aj prítomnosťou metylovej skupiny v polohe C-24 v bočnom reťazci (Obr. 1). V čistej forme je ergosterol biela kryštalická látka, takmer nerozpustná vo vode, veľmi dobre rozpustná v tukoch (Dohnal a kol., 2008).

Ergosterol ako základný sterol v membránach húb, zohráva v bunkových membránach štruktúrnu úlohu, podobne ako cholesterol v cicavčích systémoch. Steroly ovplyvňujú fyzikálne vlastnosti membrány – rigiditu, fluiditu a permeabilitu. Interakciu s fosfolipidmi a sfingolipidmi udržiavajú laterálnu heterogenitu v distribúcii proteínov a lipidov v plazmatickej membráne tým, že vytvárajú špecifické mikrodomény, tzv rafty (Mollinedo 2012).

Obr. 1: Chemická štruktúra ergosterolu a cholesterolu (upravené podľa – Kamiński, 2014)



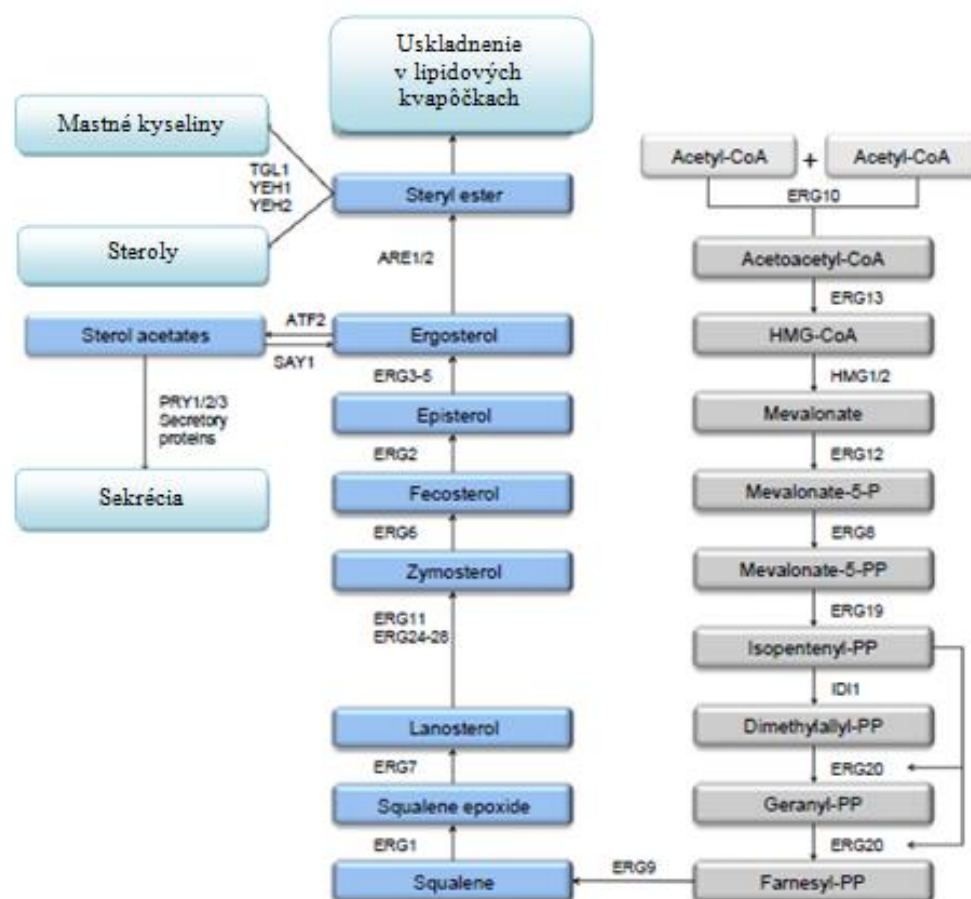
Ergosterol sa syntetizuje v membráne endoplazmatického retikula, a následne sa transportuje z miesta syntézy na miesto finálnej lokalizácie do plazmatickej membrány. Biosyntéza ergosterolu v bunkách kvasiniek zahŕňa viac ako 20 enzymatických reakcií (Obr. 2). Počiatočná fáza biosyntetickej dráhy ergosterolu poskytuje významné medziprodukty pre syntézu esenciálnych bunkových komponent ako sú hem, chinóny alebo dolichol (Grunler a kol., 1994). Biosyntetická dráha je iniciovaná kondenzáciou dvoch molekúl acetyl-CoA, postupne dochádza k tvorbe dôležitého intermediátu, farnesylypyrofosfátu. Kondenzáciou dvoch molekúl farnesylypyrofosfátu vzniká skvalén. Deléciu génov, produkty ktorých katalyzujú prvé kroky v biosyntéze ergosterolu bunky kvasiniek neprežívajú, čo poukazuje na esenciálnu úlohu sterolov v ich bunkách (Klug a Daum, 2014). Vychádzajúc zo skvalénu, nasledujúce kroky vedú vzniku prvého sterolu – lanosterolu. Sú katalyzované nasledujúcimi enzýmami: skvalénsyntáza, kódovaná génom *ERG9*, skvalénepoxidáza, kódovaná génom *ERG1* a lanosterolsyntáza kódovaná génom *ERG7* (Lees a kol., 1995; Klug a Daum, 2014). Ku konverzii lanosterolu na zymosterol dochádza demetyláciou, redukciou a desaturáciou substrátu. Uvedené reakcie katalyzujú produkty génov *ERG11* a *ERG24-ERG28*. Sterol C-24 metyltran-

sferáza – *Erg6p* je zodpovedná za vznik fekosterolu zo zymosterolu, izomeráza *Erg2p* konvertuje fekosterol na episterol, ktorý je následne desaturovaný a redukovaný na finálny produkt dráhy – ergosterol (Kristan a Riřner, 2012). Delécia génov kódujúcich enzýmy katalyzujúce neskoršie fázy biosyntézy ergosterolu (od lanosterolu po ergosterol) vedie k akumulácii sterolov líšiacich sa od ergosterolu počtom a pozíciou dvojítych väzieb v B kruhu a v postrannom reťazci molekuly sterolu, pričom bunka kvasiniek je schopná tieto delécie prežiť (Lees a kol., 1995). Biosyntéza ergosterolu je energeticky náročný, aeróbnny proces vyžadujúci prítomnosť hemu a molekulového kyslíka.

V anaeróbných podmienkach sú bunky kvasiniek schopné prijať z okolitého prostredia steroly, zabudovať ich do plazmatickej membrány a následne ich transportovať späť do membrány endoplazmatického retikula, kde sú voľné steroly esterifikované a vzniknuté sterylestery sú uložené v lipidových kvapôčkach (Jacquier a Schneider, 2012; Klug a Daum, 2014).

Syntéza sterolov je prísne regulovaná, aby sa predišlo akumulácii voľných sterolov, ktoré sú pre bunku toxické. K regulácii hladiny sterolov dochádza na transkripčnej, translačnej a posttranslačnej úrovni, ako aj feedback mechanizmami (Espenshade a Hughes, 2007).

Obr. 2: **Biosyntéza ergosterolu a metabolizmus sterylestero**v u *S. cerevisiae* (upravené podľa Klug a Daum, 2014)



\*CoA – koenzým A; HMG-CoA – 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA; P – fosfát.

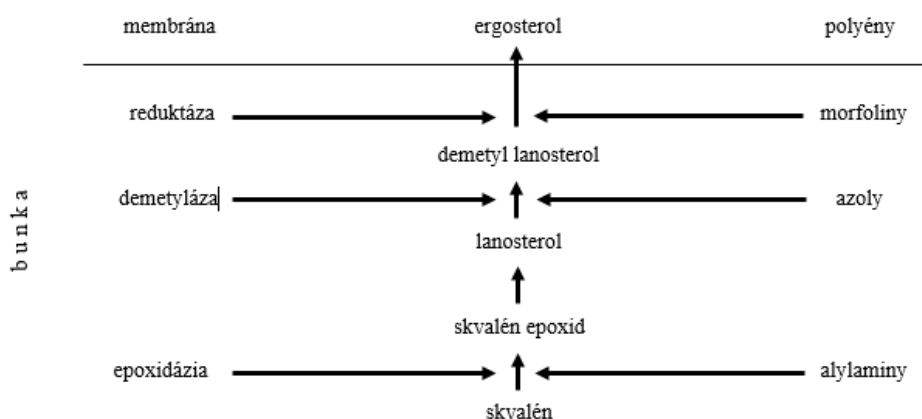
## Ergosterol ako cieľ antifungálnych látok

Infekčné ochorenia sú dlhodobou hlavnou príčinou morbidity a mortality pacientov, u ktorých sa čoraz častejšie identifikujú patogénne kmene kvasiniek a húb rezistentné voči dostupným antimikrobiálnym zlúčeninám. Neustále narastajúci počet klinických izolátov patogénnych druhov kvasiniek rezistentných voči dostupným terapeutikám poukazuje na akútnu potrebu vyvíjať nové, selektívne pôsobiace antifungálne látky. Dostupnú terapiu limituje štruktúrna a funkčná podobnosť ľudských a fungálnych buniek. Miesta zásahu existujúcich a nových antifungálnych terapeutík by mali byť špecifické pre patogénny mikroorganizmus. Niektoré z existujúcich antifungálnych látok interferujú s biosyntézou, resp. funkciou ergosterolu, ktorý je hlavným sterolom v membránach húb a kvasiniek (Obr.3). Ďalšie inhibujú biosyntézu (1,3)-D glukánu, ktorý tvorí jednu zo zložiek fungálnej bunkovej steny (Vandeputte a kol., 2012). Antifungálne látky interferujú s biosyntetickou dráhou ergosterolu na rôznych úrovniach. Za základ antifungálnej liečby a profylaxie sa už dlhú dobu považujú azoly vrátane ketokonazolu, itrakonazolu a flukonazolu. Kľúčové azolové liečivo, flukonazol sa v klinickej praxi používa od roku 1990. Jeho nízka toxicita, vysoká účinnosť

a možnosť orálnej aplikácie sú základné vlastnosti, prečo je najčastejšie používanou triazolovou zlúčeninou (Grant a Clissold, 1990; Kolaczowska a Kolaczowski, 2016). Antifungálne azoly inhibujú v biosyntetickej dráhe ergosterolu funkciu enzýmu sterol-14- $\alpha$  demetylázy, ktorá je kódovaná génom *ERG11*. V dôsledku inhibície dochádza k nahromadeniu toxických medziproduktov sterolov a následne k bunkovej smrti. Ďalšou skupinou antifungálnych látok sú alylamíny, ktoré interagujú so skvalénepoxidázou kódovanou génom *ERG1*. Pôsobením alylamínov dochádza k akumulácii skvalénu (Ryder, 1991). Na druhej strane, polyénové antifungálne látky sa viažu priamo na ergosterol v plazmatickej membráne, výsledkom čoho je tvorba pórov/kanálov v membráne, narušenie jej protónového gradientu, únik esenciálnych zložiek z cytozolu a smrť bunky. Nevýhodou používania polyénových antimykotík je ich interakcia s inými sterolmi cicavčích buniek podobných ergosterolu. Morfolíny inhibujú dva enzýmy biosyntetickej dráhy ergosterolu, sterol C8-C7 izomerázu (Erg2p) a sterolreduktázu (Erg24) (Dohnal a kol., 2008).

U kmeňov kvasiniek s deléciou *ERG* génov bola preukázaná zvýšená citlivosť buniek voči rôznym antifungálnym látkam. Podobný fenotyp sa pozoroval aj pri delícii niektorých génov zahrnutých v biosyntéze sfingolipidov (Prasad a Singh, 2013).

Obr. 3: **Miesta pôsobenia jednotlivých antibiotík** (upravené podľa Dohnal a kol., 2008)



## Záver

Experimentálne štúdie na modelových kvasinkách druhu *S. cerevisiae* a rodu *Candida* poukázali na významnú úlohu ergosterolu v zabezpečovaní normálnej permeability plazmatickej membrány, v rezistencii buniek voči chemoterapeutikám, v intracelulárnom transporte proteínov lokalizovaných v plazmatickej membráne (Geber a kol., 1995; Sanglard a kol., 2003; Pasrija a kol., 2005). Viaceré nezávislé experimentálne štúdie v poslednej dobe ukázali, že akákoľvek odchýlka v zložení ergosterolu a sfingolipidov v bunkovej membráne má za následok zmenenú citlivosť buniek kvasiniek voči

antimykotikám. Analýza kmeňov nesúcich mutácie v génoch pre enzýmy biosyntetickej dráhy ergosterolu alebo sfingolipidov odhalila súvislosť medzi hladinou ergosterolu, resp. sfingolipidov a fenoménom mnohonásobnej rezistencie kvasiniek *C. albicans*, ako aj *S. cerevisiae* voči xenobiotikám (Mukhopadhyay a kol., 2004; Pasrija a kol., 2005).

Vzhľadom na zvyšujúci sa počet rezistentných kmeňov patogénnych kvasiniek a toxicitu antifungálnych látok pre ľudské bunky, je nevyhnutné neustále hľadať a identifikovať nové zlúčeniny s potenciálnym antifungálnym účinkom a zároveň nízkou toxicitou pre človeka.

## Literatúra

DOHNAL, V., JEŽKOVÁ, A., SKLÁDANKA, J. Ergosterol: kľúčový steroid hub. 2008. ISSN 1212-4117

ESPEHSHADE, P. J., HUGHES A. L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. In: *Annu Rev Genet.*,41, 2007pp.401-427.

GEBER A., HITCHCOCK, C. A., SWARTZ, J. E., PULLEN, F. S., MARSDEN, K. E., KWON-CHUNG, K. J., BENNET J. E. Deletion of the *Candida glabrata* *ERG3* and *ERG11* genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. In: *Antimicrob Agents Chemother.* 39, 2005, pp. 2708-2717.

GRANT, S. M., CLISSOLD, S. P. Fluconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. In: *Drugs.* 39, 6, 1990, pp. 877-916.

GRUNLER, J., ERICSSON, J., DALLNER, G. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. In: *Biochim Biophys Acta.* 1212, 1994, pp. 259-277.

JACQUIER, N., SCHNEITER, R. Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast. In: *J Steroid Biochem Mol Biol.* 129, 2012, pp.70-78.

KAMIŃSKI, D. M. Recent progress in the study of interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. In: *Eur. Biophys. J.* 43, 2014, pp. 453-467.

KLUG, L., DAUM, G. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res.* 2014, 14, pp. 369-388.

KOLACZKOWSKA, A., KOLACZKOWSKI, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans candida species. In: *J. Antimicrob. Chemother.*, 71, 6, 2016, pp. 1438-1450.

LEES, N. D., SKAGGS, B., KIRSCH, D. R., BARD, M. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* – a review. In: *Lipids.* 30, 1995, pp. 221-226.

MOLLINEDO, F. Lipid raft involvement in yeast cell growth and death. In: *Front Oncol.* 10, 2, 2012, pp.140

PARKS, L. W., CASEY, W. M. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. In: *Annu Rev Microbiol.* 49, 1995, pp. 95-116.

PASRIJA, R., PRASAD, T., PRASAD, R. Membrane raft lipid constituents affect drug susceptibilities of *Candida albicans*. In: *Biochem Soc Trans.* 33, 2005, pp. 1219-1223.

PRASAD, R., SINGH, A. Lipids of *Candida albicans* and their role in multidrug resistance. In: *Curr. Genet.* 59, 4, 2013, pp. 243-50.

RYDER, N. S. Squalene epoxidase as a target for the allylamines. In: *Biochem. Soc. Trans.* 19,3, 1991, pp. 774-7.

SANGLARD, D., ISCHER, F., PARKINSON, T., FALCONER, D., BILLE, J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. In: *Antimicrob Agents Chemother.* 47,2003, pp. 2404-2412.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. In: *International Journal of Microbiology.* 2012, 713687.

## PodĎakovanie

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.



# *Streptococcus agalactiae* – závažný patogén novorodencov aj dospelých

Aneta Lichvariková<sup>1</sup>Hana Drahovská<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, 84215 Bratislava  
Slovensko

<sup>1</sup>lichvarikova.aneta@gmail.com<sup>2</sup>drahovska@fns.uniba.sk

## *Streptococcus agalactiae* – the important pathogen of newborns and adults

### Abstract

*Streptococcus agalactiae* is an important pathogen, which infects people, fish and also bovine. It is a gram-positive bacteria colonizing human urogenital and gastrointestinal tract where it can be either in commensal or pathogenic state. *S. agalactiae* causes serious infections mainly to newborns. Transmission of the bacteria from mother to child occurs during delivery. It can also cause diseases among pregnant and elderly or immunodeficient people. Treatment of the infections is based on antibiotic prophylaxis and penicillin plays the major role. However, some women may be allergic to penicillin and there is a problem with rising antibiotic resistance. Therefore scientists are seeking for new treatment solutions. Phage therapy which uses bacteriophages infecting pathogenic bacteria, may be a good replacement for antibiotic. Another approach may be using endolysins, phage enzymes that are able to lyse bacteria.

### Key words

*Streptococcus agalactiae*, gram-positive bacteria, infections, urogenital tract, gastrointestinal tract

## Úvod

Invazívne bakteriálne infekcie a následné ťažké zápalové reakcie zostávajú významnou príčinou morbidita a mortality u ľudských novorodencov ako aj dospelých jedincov. *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus, GBS) je oportunistický patogén, ktorý kolonizuje nižší gastrointestinálny a urogenitálny trakt až u 35 % zdravých jedincov (Melin a Efstratiou, 2013). Táto gram pozitívna,  $\beta$ -hemolytická baktéria predstavuje najčastejšiu príčinu život ohrozujúcich bakteriálnych infekcií u ľudských novorodencov. Hlavným rizikovým faktorom pre vznik novorodeneckej infekcie je materská kolonizácia streptokokom skupiny B. Postihnutí novorodenci sa vyznačujú predčasným narodením ako aj nízkou pôrodnou hmotnosťou a medzi klinické prejavy infekcie patrí pneumónia, sepsa a meningitída. Závažné infekcie môžu zapríčiniť trvalé postihnutie dieťaťa, prípadne až smrť. *S. agalactiae* infikuje tiež dospelých, najmä starších a imunodeficientných jedincov. Súčasná liečba infekcií spôsobených týmto patogénom je založená na užívaní antibiotík. Komplikáciou pri liečbe je zvýšená rezistencia týchto patogénov voči podávaným antibioti-

kám. Naviac, klinické štúdie ukázali, že podávanie antibiotík tehotným ženám môže byť spojené s negatívnymi účinkami na novorodenca, ako je vznik nekrotizujúcej enterokolitídy (Ting a kol., 2016). V dôsledku týchto nevýhod sa v súčasnosti hľadajú nové možnosti liečby. Vhodnou alternatívou sa javí fágová terapia, ktorá využíva bakteriofágy a ich produkty ako bioagenty pri liečbe infekčných ochorení spôsobených baktériami.

## Charakterizácia *Streptococcus agalactiae*

*S. agalactiae* predstavuje gram-pozitívne baktérie kokovitého tvaru, ktoré vytvárajú retiazky. Zaraduje sa do rodu *Streptococcus*, čeľade *Streptococcaceae*, radu *Lactobacillales*, triedy *Bacilli*, oddelenia *Firmicutes* a domény *Bacteria*. Lancefieldovej klasifikácia rozdeľuje baktérie rodu *Streptococcus* podľa sacharidového zloženia bakteriálnych povrchových antigénov pomocou aglutinačných testov so špecifickými protilátkami a *S. agalactiae* zaraduje medzi streptokoky skupiny B (group B streptococci, GBS). To znamená, že GBS sa od ostatných patogénnych baktérií rodu *Streptococcus* odlišuje tým, že v bunkovej stene má zabudované sacharidy skupiny B.

*S. agalactiae* je fakultatívne anaeróbna nepohyblivá baktéria, ktorá nevytvára spóry. Patrí medzi  $\beta$ -hemolytické baktérie, čo znamená, že je schopná kompletnej lýzy červených krviniek. Pri raste na krvnom agare sa okolo jednotlivých narastených kolónii vytvára číra zóna zodpovedajúca rozloženým erytrocytom.

Streptokoky skupiny B sa rozdeľujú podľa typovo špecifických kapsulárnych polysacharidov na desať antigénne unikátnych sérotypov (Ia, Ib, II-IX). Polysacharidová kapsula *S. agalactiae* predstavuje jeden z hlavných virulénnych faktorov.

*S. agalactiae* je oportunistický patogén, ktorý je súčasťou mikrobiómu v urogenitálnom a dolnom gastrointestinálnom trakte ľudí. Prvé zmienky o patogenite tejto baktérie pochádzajú z roku 1964, a to v súvislosti s novorodeneckými infekciami vznikajúcimi počas prvého

týždňa života (Eickhoff a kol., 1964). Neskôr boli GBS rozpoznané ako príčina infekcií u pacientov s poruchami imunitného systému a u starších ľudí. Okrem toho je *S. agalactiae* tiež príčinou mastitídy u hovädzieho dobytku. Niektoré evolučné línie tohto druhu sa prispôbili výlučne človeku alebo dobytku, zatiaľ čo iné sú geneticky rozmanitejšie, a môžu kolonizovať oboch hostiteľov (Sørensen a kol., 2010). Zároveň bol tento oportunistický patogén izolovaný aj z ďalších druhov, vrátane cicavcov, obojživelníkov a rýb (Evans a kol., 2008).

## Ochorenia spôsobené *S. agalactiae*

*S. agalactiae* je najčastejšou príčinou vážnej invázivnej bakteriálnej infekcie u ľudských novorodencov. Novorodenecká infekcia týmto oportunistickým patogénom môže byť prítomná vo forme so skorým nástupom (Early-Onset Disease, EOD) alebo vo forme s neskorým nástupom (Late-Onset Disease, LOD). Infekcie so skorým nástupom sa prejavujú v rámci prvého týždňa života novorodenca a predstavujú najčastejší typ ochorení spôsobených *S. agalactiae*. Infekcie s neskorým nástupom sa vyskytujú u dojčiat vo veku od 1 týždňa až 3 mesiacov (Johri a kol., 2006).

V prípade ochorení so skorým nástupom je novorodeneček infikovaný vystavením sa *S. agalactiae* pred alebo počas pôrodu (Remington a kol., 2001). EOD môže nastať aj v prípade vystavenia novorodenca *S. agalactiae* počas prechodu cez pôrodné cesty, avšak väčšina EOD infekcií nastáva v dôsledku šírenia baktérii z materského genitálneho traktu cez rozrušené membrány do plodovej vody, v ktorej sa baktérie množia. Prechod baktérií do plodovej vody umožňuje kolonizovať dýchacie cesty plodu a spôsobiť pneumóniu. Z pľúc získa GBS prístup do krvného obehu novorodenca, čo vedie k vzniku sepsy. Navyše, krvným obehom sa baktérie šíria do viacerých častí tela, kde následne penetrujú do tkanív a spôsobujú meningitídu alebo osteomyelitídu (Lindahl a kol., 2005). Približne 30 – 70 % novorodencov narodených matkám s potvrdeným *S. agalactiae* sa stáva nositeľmi GBS. Väčšina z nich ostane asymptomatickými prenášačmi, avšak u 1 – 3 % detí sa vyvinie vážne ochorenie (Verani a kol., 2010).

Infekcie s neskorým nástupom sú v porovnaní s EOD menej časté, avšak dôležitejšie, pretože ich výskyt v dôsledku antibiotických opatrení, na rozdiel od EOD, neklesá. Aj v tomto prípade je za väčšinu ochorení zodpovedný vertikálny prenos GBS z matky na novorodenca. LOD sa však môže rozvinúť aj ako následok nozokomialnej infekcie, kedy novorodenci získajú *S. agalactiae* horizontálnym prenosom od nemocničného personálu. Medzi najčastejšie klinické prejavy infekcie patrí bakteriémia, ktorá až v jednej štvrtine prípadov prechádza do meningitídy. Pomerne zriedkavejšími prejavmi

infekcie sú celulitída a osteomyelitída (Poyart a kol., 2008).

Podstatná časť novorodencov, ktorí prežijú infekcie spôsobené streptokokmi zo skupiny B, trpia trvalými následkami. Neurologické problémy sa vyskytujú až u 50 % preživších trpiacich novorodeneckou meningitídou. Neurologické následky zahŕňajú mentálnu retardáciu, kortikálnu slepotu, hluchotu, nekontrolovateľné zachvaty, stratu sluchu a reči, ako aj oneskorený vývoj reči (Verani a kol., 2010).

Klinické prejavy GBS infekcií u dospelých sú početné a veľmi rozmanité, nakoľko GBS môže kolonizovať povrch kože ako aj slizníc. *S. agalactiae* môže byť izolovaný z infikovaného miesta spolu s inými patogénmi, čo veľmi dlho spochybňovalo jeho úlohu v patogenéze ochorení. Až štúdie invazívnych GBS infekcií, pri ktorých boli organizmy izolované z prirodzene sterilných miest ako krv alebo cerebrospinálna tekutina, poskytli priamy dôkaz, že GBS je pôvodca mnohých klinických syndrémov (Farley, 2001).

Infekcie kože a mäkkých tkanív patria medzi najčastejšie prejavy infekcií spôsobených invazívnymi streptokokmi skupiny B. Medzi tieto prejavy patrí najmä celulitída, preležaniny či vrede na nohách. Po vstupe GBS do krvného riečiska dochádza k vzniku osteomyelitídy, pričom najčastejšie sú postihnuté kosti dolných končatín, čo má obvykle súvis s nedostatočnou funkciou ciev, či šírením infekcie z priľahlých častí kože a mäkkých tkanív. Pneumónia spôsobená GBS sa vo všeobecnosti vyskytuje len u starších ľudí trpiacich cerebrovaskulárnym ochorením alebo demenciou. Na druhej strane meningitída, ktorá predstavuje závažné riziko pre novorodencov, nie je u dospelých častá (Farley, 2001).

## Liečba GBS infekcií

Počas posledných dvoch desaťročí hlavným cieľom v boji proti *S. agalactiae* bola prevencia voči GBS infekciám. Mnohé štúdie dokázali, že prenatálny skrining zameraný na identifikáciu *S. agalactiae* a následná liečba matky pomocou antibiotík môže znížiť riziko prenosu baktérie na novorodenca. Skrining žien prebieha medzi 35 a 37 týždňom tehotenstva a pozostáva z odberu vzorky a následnej kultivácie na selektívnych médiách, ktorá odhalí prítomnosť GBS. Napriek vysokej senzitivite a špecificite má odber a kultivácia odobratej vzorky niekoľko nevýhod. Do testovania nie sú zahrnuté predčasné pôrody, ktoré síce predstavujú len 7 – 11 % všetkých pôrodov, no riziko vzniku infekcie je v týchto prípadoch vyššie. Ochorenia so skorým nástupom sa prejavujú až u 32 – 38 % zo všetkých predčasne narodených detí (Marió a kol., 2013).

Navyše, až 61 % novorodencov s GBS infekciou sa narodilo matkám s negatívnym výsledkom na prítomnosť



*S. agalactiae*. Tieto negatívne výsledky je možné vysvetliť rekolonizáciou matky až po odobratí vzorky, nesprávnym výberom vzorky či nesprávnou technikou odberu vzorky (Van Dyke a kol., 2009).

V prípade, že matka nebola testovaná na prítomnosť GBS, pri pôrode sa nasadí antibiotická liečba v závislosti od rizikových faktorov, ako je napr. predčasný pôrod. Tento prístup však znižuje účinok antibiotickej profylaxie, to znamená preventívnych krokov voči GBS infekciám, a zvyšuje počet pacientov, ktorých liečba nie je potrebná. Táto bezúčelová liečba pomocou antibiotík nie je prospešná pre matku ani novorodenca, a vedie k zvýšenému riziku anafylaxie, použitiu liečiv pri narodení dieťaťa a v období tesne po narodení ako aj produkcii kmeňov rezistentných na podávané antibiotiká (Honest a kol., 2006).

Najčastejšie používaným antibiotikom pri liečbe je penicilín alebo ampicilín. V prípade alergie matky na penicilín je vhodnou voľbou erytromycín alebo clindamycín. Tieto antibiotiká sa pri silnej kolonizácii GBS podávajú intravenózne, nakoľko orálne či intramuskulárne podanie nie je účinné (Verani, McGee a Schrag, 2010). Klinické štúdie však ukázali, že podávanie antibiotík tehotným ženám môže byť spojené s negatívnymi účinkami na novorodenca, ako je vznik nekrotizujúcej enterokolitídy (Ting a kol., 2016).

Pomocou intrapartálnej antibiotickej profylaxie sa podarilo znížiť počet novorodencov trpiacich GBS infekciami. Problémom súčasnej antibiotickej liečby je však zvýšená rezistencia týchto patogénov voči podávaným antibiotikám. Veľkou nevýhodou pri použití antibiotík je tiež prípadná alergická reakcia matky a jej plodu na podané antibiotiká. Odhadovaný výskyt alergických reakcií pri liečbe penicilínom je 0,7 až 4 % zo všetkých liečených. Odhadované riziko anafylaxie je 4/10 000 až 4/100 000 recipientov (Verani, McGee a Schrag, 2010).

## Fágová terapia

Bakteriofágy, alebo jednoducho fágy, sú vírusy schopné infikovať, v mnohých prípadoch zabíjať, bakteriálne bunky. Nachádzajú sa vo všetkých biotopoch sveta, kde sa darí baktériám, pričom sa odhaduje, že na každú bakteriálnu bunku pripadá desať fágových častíc. Bakteriofágy nie sú schopné infikovať cicavčie bunky, infikujú len cieľové špecifické baktérie. Hostiteľská špecificita fágov je vysoká, každý fág infikuje len jeden druh baktérie, v niektorých prípadoch dokonca len jeden bakteriálny kmeň.

Bakteriofágy boli nezávisle objavené na začiatku 20. storočia Fredericom Twortom a Félixom D'Hérelom. Odvtedy tieto baktérie infikujúce vírusy významne prispeli k rozvoju mnohých vedeckých disciplín, najmä molekulárnej biológie a genetiky baktérii. Už vtedy sa

o fágoch uvažovalo ako o potenciálnych antimikrobiálnych agensoch, schopných zabíjať hostiteľské baktérie. Avšak, neznalosť podrobnej biológie fágov a objav antibiotík odsunuli záujem o bakteriofágy v západnej medicíne. V súčasnosti však využitie bakteriofágov na liečbu bakteriálnych infekcií získava pozornosť najmä v dôsledku stále rastúceho množstva baktérii rezistentných na antibiotiká. Ďalším dôvodom obnoveného záujmu o terapeutické bakteriofágy sú hlbšie vedomosti o biológii bakteriofágov ako aj interakcii bakteriofágov s baktériami (Elbreki a kol., 2014).

Fágová terapia používa bakteriofágy a ich produkty ako bioagenty na liečbu alebo profylaxiu infekčných ochorení spôsobených baktériami. Využitie fágov ako antimikrobiálne agenty má niekoľko výhod v porovnaní s antibiotikami. Hlavnou charakteristikou fágov je ich vysoká špecificita infekcie, čo znamená, že rozpoznávajú len obmedzený rozsah bakteriálnych kmeňov. Týmto je možné zabrániť škodám normálnej mikroflóry hostiteľa, avšak je potrebná identifikácia cieľového patogénu, ako aj výber účinného fága (Drulis-Kawa a kol., 2012).

Ďalšou výhodou bakteriofágov je, že na prekonanie infekcie postačuje len jedna dávka fágov, nakoľko ich propagácia je závislá od hostiteľa. To znamená, že sú schopné replikovať sa len v mieste infekcie a navyše, bakteriofágy podliehajú samovyrieďovaniu z prostredia, čo umožňuje odstránenie bakteriofágov v prípade neprítomnosti hostiteľských baktérii (Denes a Wiedmann, 2014).

Výhodou použitia fágov je tiež ich všeobecne nízky sklon k indukcií rezistencie ako aj absencia krížovej rezistencie na antibiotiká. Toto robí z fágov efektívne riešenie proti multirezistentným baktériám a biofilmom (Ormälä a Jalasvuori, 2013).

Úspešný vývoj fágovej terapie musí zároveň spĺňať niekoľko podmienok. Bakteriofágy využívané na fágovú terapiu musia byť striktne lytické, to znamená schopné zabíjať bakteriálne bunky ihneď po infekcii, a špecifické len pre cieľové patogény, pričom nemôžu mať žiaden vplyv na symbiotické baktérie ľudských hostiteľov. Navyše, tieto bakteriofágy nesmú byť schopné transdukcie, aby sa zabránilo horizontálnemu génovému prenosu (Chan a kol., 2013).

Rovnako ako pri iných antimikrobiálnych činiteľoch, je dôležité, aby sa fágy dostali k cieľovým patogénnym baktériám v dostatočnom množstve. To je možné dosiahnuť buď priamou aplikáciou fága na miesto infekcie alebo systémovým podaním. V oboch prípadoch môže úspešnej penetrácii bakteriofága do cieľových baktérii pomôcť kombinácia fágového potenciálu lyzovať baktérie spolu so schopnosťou zvýšiť počet fágových častíc po infekcii cieľovej baktérie (Chan a kol., 2013).

Fágová terapia má však aj niektoré obmedzenia. Nevýhodou môžu byť gény antibiotikovej rezistencie alebo

iné faktory virulencie, ktoré môžu byť prítomné v genóme lyzogénnych bakteriofágov alebo sa môžu preniesť do baktérií z iných hostiteľov prostredníctvom generalizovanej transdukcie. Z tohto dôvodu sa ako terapeutiká používajú len lytické a netransdukčné fágy a na ich rast sa využívajú nepatogénni hostitelia (Kutter a kol., 2010). Obmedzenia pri využití bakteriofágov ako terapeutických činidiel je možné prekonať pomocou viacerých stratégií. Prvou je využitie fágových kokteíl. Použitím zmesi fágov s rozdielnymi, ale komplementárnymi vlastnosťami je možné obísť obmedzený rozsah hostiteľov jedného fága. Ďalšou výhodou fágových kokteíl je, že rôzne typy fágov infikujúce rovnaké bakteriálne druhy a kmene redukujú pravdepodobnosť vzniku rezistentných baktérií (Gu a kol., 2012).

Ďalším prístupom môže byť využívanie fágových produktov namiesto celých bakteriofágov. Príkladom sú endolyzíny, enzýmy, ktoré na konci replikačného cyklu lyzujú bakteriálnu bunku a uvoľňujú novovzniknuté fágové častice do prostredia. Použitie endolyzínov sa považuje za sľubnú alternatívu liečby bakteriálnych infekcií, pretože eliminuje riziko prenesenia toxických fágových vlastností na baktérie, a tiež redukuje riziko vzniku rezistencie voči terapeutickým fágom (Borysowski a kol., 2006).

## Liečba GBS infekcií fágovou terapiou

V súčasnosti nie je identifikovaný žiaden bakteriofág infikujúci ľudské izoláty *S. agalactiae*. Podarilo sa však izolovať fága JX01, ktorý lyzoval hovädzie kmene *S. agalactiae* (Bai a kol., 2013). Bakteriofág JX01 bol izolovaný z infikovaného mlieka kráv, ktoré boli postihnuté mastitídou. Zistilo sa, že bakteriofág JX01 špecificky infikuje hovädzie izoláty *S. agalactiae*, zatiaľ čo ľudské ani rybie izoláty nelyzuje. Preto v boji s GBS infekciami boli zatiaľ využité len fágové produkty, konkrétne lyzíny B30 (Pritchard a kol., 2004), PlyGBS (Cheng a kol., 2005), LambdaSa1 a LambdaSa2 (Pritchard a kol., 2007) a lyzín PlySK1249 (Oechslin a kol., 2013).

Kmene *S. agalactiae* často obsahujú vo svojom genóme profágy, ktoré môžu byť indukované rôznymi spôsobmi. Jedným je využitie mitomycínu C, pomocou ktorého sa podarilo indukovať bakteriofága B30. Pomocou fágového lyzínu B30 bolo možné zabrániť rastu niekoľkých GBS kmeňov (Pritchard a kol., 2004).

Celogenómovým sekvenovaním *S. agalactiae* kmeňa 2603 V/R sa zistilo, že obsahuje niekoľko génov pre fágové lyzíny, a to LambdaSA1 a LambdaSa2. Ukázalo sa, že aj keď tieto lyzíny poskytujú na agarovej platničke trochu menšie zóny vyčistenia ako lyzín B30, zóny vykazovali úplné vyčistenie bez zvyškového zákalu na rozdiel od lyzínu B30 (Pritchard a kol., 2007).

Ďalším lyzínom je PlyGBS, ktorý je vhodný na lýzu GBS buniek *in vivo* (Cheng a kol., 2005). PlyGBS patrí do skupiny fágových lyzínov, ktoré zabíjajú baktérie pomocou natrávenia bunkovej steny, čím sa bunky stávajú citlivé na osmotickú lýzu. Použitím jednej dávky PlyGBS v myšacom modeli sa podarilo významne zredukovať kolonizáciu GBS vo vagíne ako aj v orofarynxu (Cheng a kol., 2005). Preto by PlyGBS mohol byť alternatívou antibiotickej liečby na redukciiu vaginálnej kolonizácie GBS u tehotných žien pred pôrodom. Tiež by mohol byť využitý na liečbu novorodencov infikovaných patogénymi *S. agalactiae* (Cheng a Fischetti, 2007).

V roku 2013 bola publikovaná štúdia opisujúca nový fágový lyzín účinkujúci proti  $\beta$ -hemolytickým streptokokom. Endolyzín PlySK1249 bol izolovaný z kmeňa *Streptococcus dysagalactiae* SK1249 a vykazoval krížovú lytickú aktivitu proti niekoľkým  $\beta$ -hemolytickým streptokokom. Tento enzým bol úspešný pri liečbe myšacieho modelu GBS bakterémie, a preto je vhodným kandidátom na predklinické testovanie (Oechslin a kol., 2013).

## Záver

*S. agalactiae* je oportunistický patogén, ktorý kolonizuje gastrointestinálny a urogenitálny trakt ľudí. Keďže táto baktéria je súčasťou urogenitálneho traktu žien, môže sa pri pôrode preniesť na dieťa a spôsobiť mu závažné ochorenia ako je meningitída či sepsa. GBS je schopný infikovať aj dospelých, najmä starších a imunodeficientných pacientov. Aby sa zabránilo ochoreniam spôsobeným GBS, používa sa v súčasnosti liečba pomocou intrapartálnej antibiotikovej profylaxie. Tá má však mnoho nevýhod a kvôli rozsiahlemu šíreniu baktérii rezistentných na antibiotiká sa hlavnou terapeutickou výzvou stáva hľadanie alternatívnych terapeutických stratégií. Bakteriofágy môžu byť vhodným nástrojom na liečbu bakteriálnych infekcií. Fágová terapia sa vyznačuje mnohými výhodami nad antibiotikami, avšak na zavedenie fágovej terapie do klinickej praxe sú nevyhnutné ďalšie štúdie. Inou stratégiou je využitie proteínov kódovaných bakteriofágmi, ako sú endolyzíny, holíny alebo proteíny fágových chvostíkov. Doteraz nebol identifikovaný žiaden bakteriofág infikujúci ľudské izoláty GBS. Avšak, ako protiinfekčné činidlá boli úspešne testované viaceré fágové endolyzíny.

## Literatúra

BAI, Q., ZHANG, W., YANG, Y., TANG, F., NGUYEN, X., LIU, G., LU, C. Characterization and genome sequencing of a novel bacteriophage infecting *Streptococcus agalactiae* with high similarity to a phage from *Streptococcus pyogenes*. In: *Archives of Virology*, 158, 2013, pp. 1733-1741.  
BORYSOWSKI, J., WEBER-DABROWSKA, B., GÓRSKI, A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial

- agents. In: *Experimental Biology and Medicine*, 231, 2006, p. 366–377.
- DENES T., WIEDMANN M. Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: implications for improving applications in food safety. In: *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 2014, pp. 45-49.
- DRULIS-KAWA, Z., MAJKOWSKA-SKROBEK, G., MACIEJEWSKA, B., DELATTRE, A. S., LAVIGNE, R. Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. In: *Current Protein and Peptide Science*, 13, 2012, pp. 699-722.
- EICKHOFF, T. C., KLEIN, J. O., DALY, A. K., INGALL, D., FINLAND, M. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. In: *New England Journal of Medicine*, 271, 1964, pp. 1221-1228.
- ELBREKI M., ROSS R. P., HILL C., O'MAHONY J., MCAULIFFE O., COFFEY A. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. In: *Journal of Viruses*, 2014.
- EVANS, J. J., BOHNSACK, J. F., KLESZIUS, P. H., WHITING, A. A., GARCIA, J. C., SHOEMAKER, C.A., TAKAHASHI, S. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from pischine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and pischine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. In: *Journal of medical microbiology*, 57, 2008, pp. 1369-1376.
- FARLEY, M. M. Group B Streptococcal disease in nonpregnant adults. In: *Clinical Infectious Diseases*, 33, 2001, pp. 556-561.
- GU, J., LIU, X., LI, Y., HAN, W., LEI, L., YANG, Y., ZHAO, H., GAO, Y., SONG, J., LU, R., SUN, C., FENG, X. A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential. In: *PLoS ONE*, 7, 2012, e31698
- HONEST, H., SHARMA, S., KHAN, K. S. Rapid tests for group B Streptococcus colonization in laboring women: a systematic review. In: *Pediatrics*, 117, 2006, pp. 1055-1066.
- CHAN, B. K., ABEDON, S. T., LOC-CARRILLO C. Phage cocktails and the future of phage therapy. In: *Future Microbiology*, 8, 2013, pp. 769-783.
- CHENG, Q., FISCHETTI, V. A. Mutagenesis of a bacteriophage lytic enzyme PlyGBS significantly increases its antibacterial activity against group B streptococci. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 2007, pp. 1284-1291.
- CHENG, Q., NELSON, D., ZHU, S. W., FISCHETTI, V. A. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2005, pp. 111-117.
- JOHRI, A. K., PAOLETTI, L. C., GLASER, P., DUA, M., SHARMA, P. K., GRANDI, G., RAPPUOLI, R. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. In: *Nature Reviews Microbiology*, 4, 2006, pp. 932-942.
- KUTTER, E., DE VOS, D., GVASALIA, G., ALAVIDZE, Z., GOGOKHIA, L., KUHL, S., ABEDON, S. T. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 2010, pp. 69-86.
- LINDAHL, G., STÅLHAMMAR-CARLEMALM, M., ARESCHOUH, T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. In: *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 2005, pp. 102-127.
- MARIÓ, M. J. S., VALENZUELA, I., VÁSQUEZ, A. E., ILLANES, S. E. Prevention of early-onset neonatal Group B Streptococcal disease. In: *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 6, 2013, pp. 63-68.
- MELIN P., EFSTRATIOU A. Group B Streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. In: *Vaccine*, 31, 2013, pp. D31-D42.
- MULLANEY D. M. Group B Streptococcal infections in newborns. In: *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 30, 2001, pp. 649-658.
- ORMÁLÁ, A. and JALASVUORI, M. Phage therapy: should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run?. In: *Bacteriophage*, 3, 2013, e24219-e24221.
- POYART, C., RÉGLIER-POUPET, H., TAZI, A., BILLOËT, A., DMYTRUK, N., BIDET, P., BINGEN, E., RAYMOND, J., TRIEU-CUOT, P. Invasive group B streptococcal infections in infants, France. In: *Emerging infectious diseases*, 14, 2008, pp. 1647.
- PRITCHARD, D. G., DONG, S., BAKER, J. R., ENGLER, J. A. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. In: *Microbiology*, 150, 2004, pp. 2079-2087.
- PRITCHARD, D. G., DONG, S., KIRK, M. C., CARTEE, R. T., BAKER, J. LambdaSa1 and LambdaSa2 Prophage Lysins of *Streptococcus agalactiae*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2007, pp. 7150-7154.
- REMLINGTON, J. S., KLEIN, J. O., SHENAI, J. P. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. In: *Journal of Perinatology*, 21, 2001, pp. 571-571.
- TING, J. Y., SYNNESE, A., ROBERTS, A., DESHPANDEY, A., DOW, K., YOON, E. W., SHAH, P. S. Association between antibiotic use and neonatal mortality and morbidities in very low-birth-weight infants without culture-proven sepsis or necrotizing enterocolitis. In: *JAMA pediatrics*, 170, 2016, pp. 1181-1187.
- SØRENSEN, U. B. S., POULSEN, K., GHEZZO, C., MARGARIT, I., KILIAN, M. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. In: *MBio*, 1, 2010, e00178-10.
- VAN DYKE, M. K., PHARES, C. R., LYNFIELD, R., THOMAS, A. R., ARNOLD, K. E., CRAIG, A. S., ET AL. Evaluation of universal antenatal screening for group B streptococcus. In: *New England Journal of Medicine*, 360, 2009, pp. 2626-2636.
- VERANI, J. R., MCGEE, L., SCHRAG, S. J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC In: *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59, 2010, pp. 1-36.
- VERANI, J. R., SCHRAG, S. J. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. In: *Clinics in perinatology*, 37, 2010, pp. 375-392.

## 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.



# Nekonvenčné kvasinky – výlet za hranice pekárenskej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Hana Dibalová – Čuláková<sup>1</sup>

Yveta Gbelská<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>hana.dibalova@uniba.sk

<sup>2</sup>yveta.gbelska@uniba.sk

Non-conventional yeasts – trip beyond bakers`  
yeast *Saccharomyces cerevisiae*

## Abstract

Yeasts are involved in food and beverage fermentations for millennia. Two species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, are the best-known species used in industry and research. Other yeast species are considered as nonconventional yeasts. Among them are for example the genera *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* and also species belonging to genus *Saccharomyces* referred to as non-*cerevisiae* species. Although the non-conventional yeasts were considered as spoilage yeasts formerly, in last decades their unique properties have been discovered. Their tolerance to various stress conditions or the ability to produce specific compounds are used in new biotechnologies leading to more effective processes as well as new products.

## Key words

Non-conventional yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, stress tolerance, bioethanol, biotechnology

## Úvod

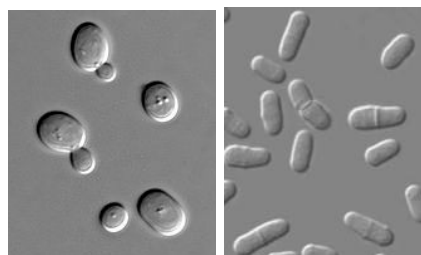
Kvasinky sa využívajú na výrobu piva, vína, saké a chleba už tisícky rokov, pričom najčastejšie používanou je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Ďalšou dobre preskúmanou kvasinkou je druh *Schizosaccharomyces pombe*, ktorá slúžila ako model pri odhalení regulácie bunkového cyklu u eukaryotov (práca bola ocenená Nobelovou cenou za fyziológiu a medicínu v roku 2001) (Steensels a kol., 2014). V posledných desaťročiach sa pekárenská, niekedy označovaná aj pivná, kvasinka *S. cerevisiae* začala používať na výrobu bioetanolu, inzulínu a vakcín proti hepatitíde. *S. cerevisiae* má však, ako každý živý organizmus, svoje limitácie. Nové biotechnologické aplikácie vyžadujú úplne iné podmienky ako tradičné fermentácie (nižšie pH, teploty nad 45 °C, vysoká koncentrácia etanolu, či nové substráty) a predstavujú novú výzvu pre doteraz používané kmene kvasiniek. Kvasinky sú počas technologického procesu často vystavené rozličným environmentálnym stresom a toxickým zlúčeninám, ktoré spomaľujú, či dokonca zastavujú ich metabolizmus a množenie. Doteraz bolo

opísaných viac ako 2000 druhov kvasiniek a veľa z nich má pozoruhodné vlastnosti, napr. neobvyklú toleranciu voči stresovým podmienkam prostredia alebo produkujú jedinečnú kombináciu aromatických zlúčenín, čím môžu poskytnúť jedlám a nápojom nové sensorické vlastnosti (chuť, vôňa) (Steensels a kol., 2014; Radecka a kol., 2015; Stribny a kol., 2015). Na výrobu nových produktov alebo zefektívnenie výroby už známych produktov môžeme teda využiť iné druhy kvasiniek s ich špecifickými vlastnosťami.

## Nekonvenčné kvasinky

Do skupiny nekonvenčných kvasiniek zaraďujeme všetky ostatné kvasinky okrem druhov *S. cerevisiae* a *Sch. pombe* (Spencer a kol., 2002). Pôvodne boli nekonvenčné kvasinky považované za škodlivé, nakoľko boli často izolované z kontaminovaných potravín a nápojov, no ich podrobnejšie štúdium odhalilo ich skrytý potenciál. Najvýznamnejšími druhmi nekonvenčných kvasiniek sú rody *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* a druhy patriace do rodu *Saccharomyces* označované ako non-*cerevisiae*. Tieto kvasinky disponujú inými metabolickými dráhami, ktoré im umožňujú využívať iné substráty (často environmentálny odpad) a vedia upraviť svoj metabolizmus tak, aby sa vyhli škodlivým faktorom priemyselného prostredia (Gamero a kol., 2015; Radecka a kol., 2015).

Obr. 1: **Bunky kvasiniek *S. cerevisiae* (vľavo) a *Sch. pombe* (vpravo) pod svetelným mikroskopom** (<http://slideplayer.com/slide/7968752/>)



## Debaryomyces hansenii

*Debaryomyces hansenii* je extrémofilná kvasinka, pôvodne izolovaná z morskej vody, ktorá sa bežne vyskytuje v prostredí s nízkou dostupnosťou vody pre metabolické procesy (kontaminuje syry, mäso, výrobky s vysokým obsahom cukru a nakladané uhorky). Jej extrémofilný charakter sa prejavuje značnou odolnosťou voči vysokým koncentráciám osmoticky aktívnych látok ako sú cukry a soli (množí sa aj v prítomnosti 4 M NaCl, zatiaľ čo *S. cerevisiae* toleruje maximálne koncentráciu 1,7 M NaCl) a odolnosťou voči vysušeniu. Ďalšou významnou vlastnosťou *D. hansenii* je jej schopnosť akumulovať lipidy až do 70 % svojej hmotnosti. Kvôli produkcii aromatických látok a podpore množenia niektorých baktérií sa *D. hansenii* podieľa na výrobe syrov a fermentovaných údenín. Významná je aj jej schopnosť metabolizovať xylózu a produkovať xylitol, ktorý sa používa ako umelé sladidlo pre diabetikov (Breuer a Harms, 2006).

## Dekkera bruxellensis

*Dekkera bruxellensis* bola na jednej strane považovaná za najneprijemnejšiu kontamináciu vína, pretože mu vďaka produkcii prchavých fenolov dodávala príchut' „spoteného koňa“. Na druhej strane hrá táto kvasinka nezastupiteľnú úlohu pri výrobe špeciálneho Belgického piva a kvaseného čaju Kombucha. Významnými vlastnosťami *D. bruxellensis* sú jej vysoká odolnosť voči etanolu (10 – 16 %), nízkemu pH (najmä kyseline octovej, ktorú sama produkuje) a schopnosť využívať nitráty, čím sa stáva zaujímavou ako „výkonnejšia“ alternatíva k *S. cerevisiae* pri výrobe bioetanolu (Schifferdecker a kol., 2014; Radecka a kol., 2015).

## Rod Kluyveromyces

Najznámejšie druhy z rodu *Kluyveromyces* sú druhy *K. lactis* a *K. marxianus*. *K. lactis* má schopnosť produkovať kyselinu mliečnu a rozkladať laktózu, čo sa využíva pri výrobe nízkolaktózových potravín. Táto kvasinka je veľmi vhodná ako hostiteľský systém pre produkciu cudzorodých proteínov a iných zlúčenín. Týmto spôsobom je možné vyrábať v bunkách *K. lactis* napríklad enzým chymozín (používaný ako syridlo) alebo vitamín C (van Ooyen a kol., 2006; Steensels et al., 2014). *K. marxianus* bola pôvodne izolovaná zo syrov a je známa svojou extrémnou odolnosťou voči vysokým teplotám. Na rozdiel od *S. cerevisiae*, ktorá nedokáže fermentovať pri teplote vyššej ako 37 °C, dokáže *K. marxianus* produkovať etanol aj pri teplote 45 °C. Navyše je schopná pre svoj rast využiť aj cukrovú trstinu, štavu z kukuričnej siláže a melasu (Radecka a kol., 2015).

## Rod Pichia

Rod *Pichia* zahŕňa druhy kvasiniek, ktoré sú schopné využívať pre svoj rast rôzne atypické substráty a sú veľmi vhodné na produkciu cudzorodých proteínov.

*Pichia angusta* (syn. *Hansenula polymorpha*, *Ogataea polymorpha*) rastie pri teplotách nad 50 °C, je schopná využívať metanol a nitráty a fermentovať súčasne xylózu a celobiozózu (Radecka a kol., 2015). *Pichia pastoris* (syn. *Komagataella pastoris*) hrá dôležitú úlohu ako hostiteľ pre výrobu proteínov a iných vzácnych molekúl, ako sú napríklad ľudský erytropoetín (dôležitý pre tvorbu červených krviniek), enzým lakáza (degraduje lignín) a β-karotén (Steensels a kol., 2014). Oba spomínané druhy dokážu využívať metanol a používajú sa ako modelové organizmy na štúdium biogenézy bunkových organel – peroxizómov (Steensels a kol., 2014; Radecka a kol., 2015).

*Pichia kudriavzevii* (syn. *Issatchenkia orientalis*) bola izolovaná z fermentovaných zvyškov kakaových bôbov, mangovej dužiny, ananásového džúsu, stebiel ryže a kukurice, čo vypovedá o jej schopnosti rásť na jednoduchých aj zložených sacharidoch. Pri výrobe bioetanolu z necukorných materiálov (druhá generácia biopalív) sú kvasinky často vystavené vysokej teplote, nízkemu pH a derivátom furánu, ktorý poškodzuje ich bunky. Schopnosť fermentovať pri teplote 45 °C, odolávať kyseline octovej a mravčej až pod pH 2, efektívna produkcia etanolu za týchto extrémnych podmienok a schopnosť tolerovať vysoké koncentrácie hydroxymetylfurfuralu robia *P. kudriavzevii* zaujímavou pre výrobu bioetanolu druhej generácie (Radecka a kol., 2015).

*Pichia guilliermondii* (syn. *Meyerozyma guilliermondii*) bola izolovaná z pôdy obsahujúcej oleje, z rastlín, jazier a žalúdka prežúvavcov. Táto kvasinka je schopná využívať pre svoj rast, uhľovodíky, vytvárať vitamín B2 a premieňať xylózu na xylitol (Sibirny a Boretsky, 2009).

## Yarrowia lipolytica

Kvasinka *Yarrowia lipolytica* bola izolovaná zo syrov, jogurtov, údenín, ale aj z kanalizácie. Významnou črtou tejto kvasinky je jej schopnosť efektívne využívať hydrofóbne substráty ako sú n-alkány, mastné kyseliny a oleje a akumulovať tuky až do 50 % svojej hmotnosti. Uvažuje sa, že tieto vlastnosti by mohli predstavovať alternatívnu cestu výroby olejov. V súčasnosti sa *Y. lipolytica* využíva pre produkciu bielkovín (kedy sa celá kvasinková bunka využíva ako zdroj bielkovín), ale aj kyseliny citrónovej, rôznych aróm a steroidov. Služí tiež ako modelový organizmus na výskum sekrécie proteínov (vyučovanie proteínov von z bunky), štúdium mitochondrií, peroxizómov a metabolizmu tukov (Nicaud, 2012; Steensels a kol., 2014).

## Rod *Zygosaccharomyces*

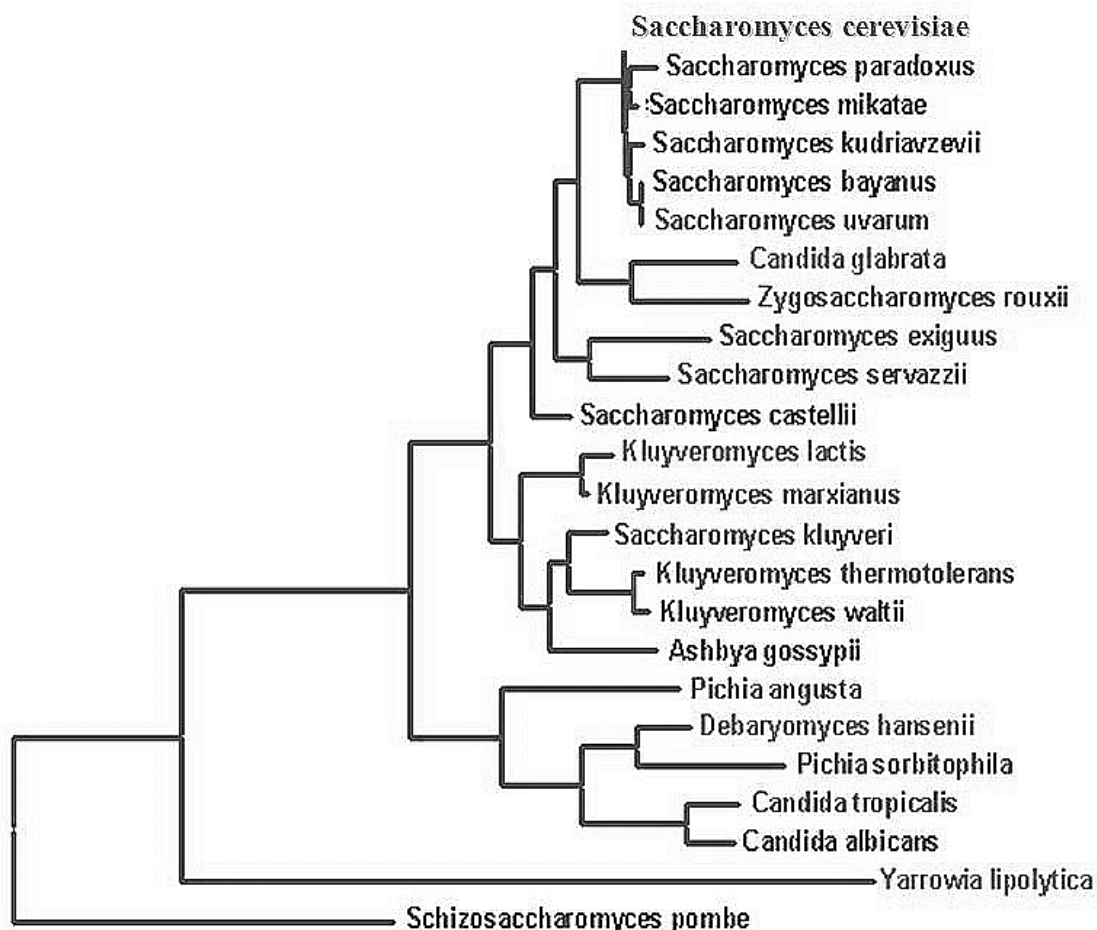
Z rodu *Zygosaccharomyces* sú najznámejšie druhy *Zygosaccharomyces rouxii* a *Zygosaccharomyces bailii*. *Z. rouxii* sa často izoluje ako kontaminant sladených nápojov, džúsov a kečupov. V porovnaní so *S. cerevisiae* má pozoruhodnú odolnosť voči osmoticky aktívnym látkam – rastie v prostredí s obsahom 90 % cukru, kým *S. cerevisiae* toleruje iba 50 % a odoláva koncentrácii 3 M NaCl. Disponuje tiež vysokou odolnosťou voči kyselinám (je schopná prežiť nízke pH prostredia spôsobené prítomnosťou kyseliny citrónovej – pH 3 a HCl až do pH 1.5). Vďaka týmto vlastnostiam sa *Z. rouxii* môže využívať na výrobu sójových omáčok, balzamikového octu a pasty Miso (Duskova a kol., 2015; Radecka a kol., 2015). Nedávno bola opísaná schopnosť *Z. rouxii* rozkladať aflatoxíny (jedy vyvolávajúce rakovinu) v arašidoch, ktoré produkujú niektoré druhy mikroskopických húb pri ich nevhodnom skladovaní (Zhou a kol., 2017). Druh *Z. bailii* má schopnosť rásť pri pH 2, čo mu umožňuje odolávať konzervantom v potravinách a spôsobiť ich znehodnotenie. Na druhej strane, vysoká odolnosť

*Z. bailii* voči kyseline octovej, jej schopnosť prispôbiť sa teplote 40 °C a produkcia enzýmov, ktoré rozkladajú inulín, sa môže využiť pri výrobe bioetanolu z lignocelulóзовého materiálu (Radecka a kol., 2015).

## Non-*cerevisiae* druhy *Saccharomyces*

Druhovú bohatosť kvasiniek možno demonštrovať už u samotného rodu *Saccharomyces*, kam okrem *S. cerevisiae* patria aj nekonvenčné druhy *S. bayanus*, *S. uvarum*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* zúčastňujúce sa na kvasení piva, vína a cideru alebo *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, ktoré boli izolované z prírodných materiálov (Gonzales a kol., 2006). Každý druh má jedinečné vlastnosti, ktoré môžu byť využité napríklad pri výrobe nových vín. Odlišnosti v ich metabolizme od *S. cerevisiae* im umožňujú produkovať viac aromatických látok (vyššie alkoholy, estery kyseliny octovej), ovplyvňovať ich senzorické vlastnosti (pomer etanolu a glycerolu) a efektívne fermentovať pri nižšej teplote, čo tiež prispieva k aróme vína (Gamero a kol., 2015; Stribny a kol., 2015).

Obr. 2: **Fylogenetický strom zobrazujúci stupeň príbuznosti rôznych nekonvenčných kvasiniek k pekárskemu kvasinke *S. cerevisiae* a kvasinke *Sch. pombe*** (<http://slideplayer.com/slide/5232427/>)



## Záver

Vlastnosti kvasiniek, ktoré umožňujú týmto mikroorganizmom prežívať extrémne podmienky, a tým napríklad kontaminovať konzervované potraviny, sú často tými istými vlastnosťami, ktoré sú vítané a požadované pri moderných biotechnologických aplikáciách v súčasnosti. Odolnosť voči vysokým teplotám, značným koncentráciám cukrov a solí, nízkemu pH alebo produkcia neobvyklých zlúčenín predstavuje len vrchol ľadovca. Kvasinky, donedávna označované ako „škodlivé“ alebo dosiaľ bližšie necharakterizované druhy môžu ukrývať úžasné vlastnosti, ktorých poznanie nám môže otvoriť dvere k novým technologickým procesom a výrobkom.

## Literatúra

BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. In: *Yeast*. 23, 6, 2006, pp. 415-437.

DUSKOVA, M.; FERREIRA, C.; LUCAS, C.; SYCHROVA, H. Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*. In: *Mol Microbiol*. 97, 3, 2015, pp. 541-559.

GAMERO, A.; BELLOCH, C.; QUEROL, A. Genomic and transcriptomic analysis of aroma synthesis in two hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in wine-making conditions. In: *Microb Cell Fact*. 14, 2015, pp. 128.

GONZALEZ, S. S.; BARRIO, E.; GAFNER, J.; QUEROL, A. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. In: *FEMS Yeast Res*. 6, 8, 2006, pp. 1221-1234. <http://slideplayer.com/slide/5232427/>  
<http://slideplayer.com/slide/7968752/>

NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica*. In: *Yeast*. 29, 10, 2012, pp. 409-418.

RADECKA, D.; MUKHERJEE, V.; MATEO, R. Q.; STOJILJKOVIC, M.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. In: *FEMS Yeast Res*. 15, 6, 2015, pp. fov053.

SCHIFFERDECKER, A. J.; DASHKO, S.; ISHCHUK, O. P.; PIŠKUR, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. In: *Yeast*. 31, 9, 2014, pp. 323-332.

SIBIRNY A. A.; BORETSKY Y. R. Chapter 6: *Pichia guilliermondii*. In book: *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (Satyanarayana, T.; Kunze, G. eds.). Berlín : Springer Science + Business Media B. V., 2009, ISBN 978-1-4020-8291-7.

SPENCER, J. F.; RAGOUT DE SPENCER, A. L.; LALUCE, C. Non-conventional yeasts. In: *Appl Microbiol Biotechnol*. 58, 2, 2002, pp. 147-156.

STEENSELS, J.; SNOEK, T.; MEERSMAN, E.; PICCA NICOLINO, M.; VOORDECKERS, K.; VERSTREPEN, K. J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. In: *FEMS Microbiol Rev*. 38, 5, 2014, pp. 947-995.

STRIBNY, J.; GAMERO, A.; PÉREZ-TORRADO, R.; QUEROL, A. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma – active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. In: *Int J Food Microbiol*. 205, 2015, pp. 41-46.

VAN OOYEN, A. J.; DEKKER, P.; HUANG, M.; OLSTHOORN, M. M.; JACOBS, D. I.; COLUSSI, P. A.; TARON, C. H. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. In: *FEMS Yeast Res*. 6, 3, 2006, pp. 381-392.

ZHOU, G.; CHEN, Y.; KONG, Q.; MA, Y.; LIU, Y. Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Zygosaccharomyces rouxii* with solid state fermentation in peanut meal. In: *Toxins*. 9, 1, 2017, pp. E42.

## 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.



# Polymérne nanočastice ako potenciálna platforma v rakovinovej terapii

Veronika Šubjaková<sup>1</sup>

Tibor Hianik<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Katedra jadrovej fyziky a biofyziky  
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Slovensko

<sup>1</sup>subjakov@gmail.com

<sup>2</sup>tibor.hianik@fmph.uniba.sk

Polymeric nanoparticles as a potential platform in cancer therapy

## Abstract

Polymeric, polyalkylcyanoacrylate, nanoparticles can be potential nanocarriers for targeted drug delivery system. Properties of these nanoparticles such as small size, biocompatibility and biodegradation of monomers, low toxicity and easy preparation, surface modification and drug encapsulation are necessary for therapeutic application. In vitro cytotoxic effect of polybutylcyanoacrylate (PBCA) and polyoctylcyanoacrylate (POCA) nanoparticles with encapsulated and free drug cabazitaxel were studied on human mammary adenocarcinoma cell lines (MDA-MB-231) and glioblastoma cells (P3) by Alamar Blue assay. Cabazitaxel is chemotherapeutic agent, which acts in cells as inhibitor of mitotic division. Viability of cancer cell was examined after different time exposure and concentration of cabazitaxel encapsulated in PBCA and POCA nanoparticles, as well as free cabazitaxel.

## Key words

Polymeric nanoparticles, drug delivery, EPR, cancer therapy, chemotherapeutics, cabazitaxel

## Úvod

Počet rakovinových a nádorových ochorení u ľudí každoročne stúpa, s čím je spojená aj rastúca úmrtnosť. Jedným zo spôsobov ako predísť vzrastajúcej úmrtnosti je jednak včasná diagnostika, ale taktiež aj voľba vhodnej a účinnej terapie. Najčastejšie sa pri liečbe rakoviny a nádorov využíva chemoterapia. Táto terapia spočíva v aplikovaní cytostatických liečiv, ktoré však so sebou prinášajú aj množstvo vedľajších nežiaducich účinkov. Okrem toho, že ničia rakovinové bunky, zároveň poškodzujú zdravé tkanivá, a tým sa znižuje ich efektivita v oblasti rakovinového tkaniva a taktiež životná úroveň pacienta. Vytvorenie transportného systému pre priame doručenie chemoterapeutického liečiva do poškodeného tkaniva, tak aby nezasiahlo zdravé tkanivá, by mohlo byť jedným z riešení pre účinnú chemoterapiu. Polymérne nanočastice majú veľký potenciál splniť tieto požiadavky. Pre ich unikátne vlastnosti, ako sú napríklad malé rozmery a ľahká povrchová modifikácia, si získavajú polymérne nanočastice zvýšený záujem vo vedeckých štúdiách v oblasti pasívneho aj aktívneho cielenia liečiv v rakovinovej diagnostike a terapii.

## Polymérne nanočastice ako nosiče liečiv

Polymérne nanočastice (PNPs) zohrávajú dôležitú úlohu vo vývoji efektívnej liečby rakovinových a nádorových ochorení. PNPs sú submikrónové koloidné systémy, syntetizované z biokompatibilných a biodegradovateľných polymérov, v ktorých je terapeutická látka rozpustená, zapuzdrená alebo zachytená na polymérnej matrici. Polyméry môžu byť zložené z prírodných zložiek ako napríklad chitosan, gelatín, albumín alebo syntetických, medzi ktoré patria napríklad polyglykolydy (PLG), polylaktid ko-glykolydy (PLGA), polyalkylcyanoakryláty (PACA), a iné (Nagavarma a kol., 2012). PNPs sú definované morfológiou a kompozíciou ich jadra a obalu. Ich tvary a formy sú charakterizované fyzikálno-chemickými štruktúrami a môžu sa vyskytovať ako tuhé polymérne častice, polymérne micely, polymérne konjugáty, dendriméry, prípadne hybridné kombinácie. PNPs môžu byť funkcionalizované rôznymi molekulami ako sú napríklad peptidy, aptaméry (syntetické úseky DNA alebo RNA, ktoré majú vysokú afinitu a špecificitu voči cieľovej molekule), protilátky alebo iné malé molekuly, ktoré prispievajú k zvýšeniu doby cirkulácie v krvi a ich špecifickej distribúcie, aktívnemu cieleniu (Prabhu a kol., 2015). V závislosti od metódy prípravy, štruktúry PNPs môžu byť získané vo forme nanokapsúl alebo nanosfér. Nanokapsuly sú systémy, v ktorých je liečivo rozpustené vo vodnom alebo v olejovom jadre a obklopené polymérnou membránou, pričom nanosféry sú systémy tvorené matricou, kĺbkom polyméru, v ktorom je liečivo rovnomerne rozptýlené. Okrem prenášania liečiv je PNPs možné využiť aj ako nosiče proteínov a DNA do buniek a tkanív (Prabhu a kol., 2015; Nagavarma a kol., 2012).

Polybutylkyanoakrylátové (PBCA) a polyoktylkyanoakrylátové (POCA) nanočastice môžu byť použité pre transport liečiv alebo iných látok. Alkylkyanoakrylátové monoméry boli dlho známe a uvádzané na trhu ako Super lepidlá, pre svoje adhézne vlastnosti, ktorých výsledkom sú spoje s vysokou pevnosťou (Graf a kol., 2009).



Okrem toho mali uplatnenie aj v medicíne, kde boli využívané pre lepenie tkanív v chirurgii (Vauthier a kol., 2003). V 1970-tich rokoch Couvreur a spol. (Couvreur a kol., 1979) predstavili možnosť využitia týchto monomérov pre syntézu PNPs ako nosičov liečiv. Odvtedy si získali zvýšený záujem vo vývoji protinádorovej a rakovinovej terapie. Polyméry sú biologicky kompatibilné a degradovateľné. Pri syntéze polymérov sa ako iniciátory používajú hydroxylové ióny disociované vo vode, ale taktiež je možné použiť aj iné molekuly ako alkoholy a aminokyseliny. Podstatou je, aby daná molekula bola nukleofilná (Nicolas a Couvreur, 2009).

Ich cytotoxický efekt, bunková absorpcia a degradácia závisia od dĺžky alkylového reťazca monoméru, typu liečiva a bunkových línií. Bolo vykonaných niekoľko desiatok štúdií *in vitro* aj *in vivo* experimentoch s rôznymi typmi liečiv enkapsulovanými alebo adsorbovanými na týchto NPs (Graf a kol., 2009). PBCA NPs pokryté polysorbátom 80 boli úspešne použité pri prekonaní hematocelulárnej bariéry napríklad s enkapsulovaným dalgínom (Olivier a kol., 1999) a temozolomidom (Tian a kol., 2011).

Gemcitabín hydrochlorid, ktorý sa používa pri liečbe nádorov a bol študovaný v POCA nanočasticiach (Arias a kol., 2009). V práci porovnávali dva spôsoby uchytenia liečiva v nanočasticiach. V prvom bol gemcitabín adsorbovaný na povrchu nanočastíc, kým v druhom prípade bol pridaný pred polymerizačným procesom. Pri druhom spôsobe bolo zachytené vyššie množstvo liečiva ako aj jeho pomalšie uvoľňovanie. Cytotoxicita bola študovaná na L1210 nádorových bunkách myší. Ako voľné tak aj enkapsulované liečivo vykazovalo v tomto prípade podobnú protinádorovú aktivitu. Pri *in vivo* experimentoch však enkapsulované liečivo v POCA nanočasticiach vykazovalo signifikantne vyššiu protinádorovú aktivitu, čo potvrdili aj histologické testy. POCA nanočastice ako možné nosiče pre chemoterapeutického agenta cathin-6-one študovali v práci Arias a spol. (Arias a kol., 2011), aby zvýšili farmakologický účinok liečiva. Syntetizované nanočastice sa vyznačovali výraznou hydrofóbnosťou a povrchovým nábojom za fyziologických podmienok, čo zvyšovalo intracelulárnu absorpciu infikovaných fagocytov.

Snipstad a spol. (Snipstad a kol., 2014) vo svojej práci študovali fluorescenčné farbivo Nile Red ako model hydrofóbného liečiva enkapsulovaného v PBCA nanočasticiach na bunkách PC3 (bunky rakoviny prostaty). Koncentrácia nanočastíc, 20 µg/ml, bola použitá na základe Alamar blue testu viability buniek, vyššie koncentrácie nanočastíc už prejavovali toxické účinky. Nile Red enkapsulovaný v PBCA nanočasticiach vykazoval vyššiu bunkovú absorpciu v porovnaní s voľne rozpustným liečivom.

Mørch a kol. (Mørch a kol., 2015) predstavili platformu pre súbežné diagnostické a terapeutické účely pomocou vzduchových mikrobublín stabilizovaných PBCA nanočasticami, ktoré zároveň slúžili ako kontrastné činidlá pre ultrazvukové zobrazovanie. Zistili, že pegylované PBCA nanočastice mali nižšiu povrchovú hustotu náboja. Taktiež úspešne zapuzdрили Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočastice do PBCA PNPs. Tieto kombinované nanočastice môžu byť použité pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou.

Bunková absorpcia a intracelulárna degradácia PBCA, POCA a P(BCA/OCA) nanočastíc bola študovaná na PC3 a RBE4 (endotelová línia u potkanov) bunkách. Použili model hydrofóbného liečiva Nile Red 688 pre štúdium zmeny fluorescencie pri degradácii a bunkovej absorpcii. PBCA nanočastice degradovali rýchlejšie ako POCA nanočastice, kombinované P(BCA/OCA) stredne rýchlo. Bunková absorpcia PBCA a POCA nanočastíc bola vyššia pre RBE4 bunky ako pre PC3 (Sulheim a kol., 2016). Cisplatina bola enkapsulovaná v PBCA nanočasticiach a cytotoxický účinok samotného liečiva, aj PBCA nanočastíc s liečivom bol študovaný na MCF-7 (bunky adenokarcinómu prsníka) pomocou MTT testu. Enkapsulované liečivo vykazovalo vyšší cytotoxický efekt na MCF-7 bunkách (Haghnazari a kol., 2016). MTT test bol použitý aj pre štúdium cytotoxického účinku imatinib mesylátu enkapsulovaného v PBCA nanočasticiach na leukemických bunkách K562. Toxický účinok enkapsulovaného liečiva bol opäť mierne vyšší v porovnaní s použitím samotného liečiva (Hasandoost a kol., 2017). Stabilita častíc bola rovnaká ako v prvý deň ich syntézy.

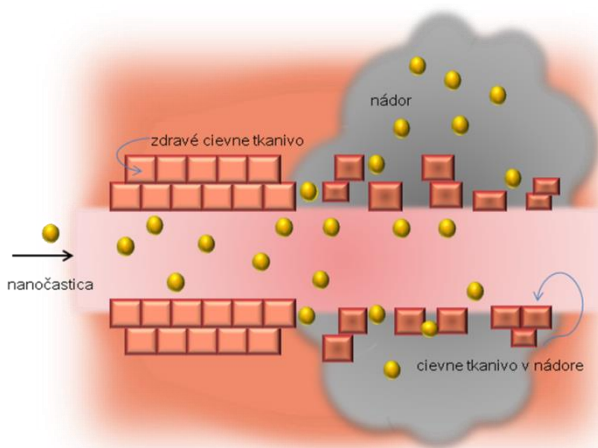
Hoci PBCA a POCA nanočastice ako prenášače liečiv sú častým objektom v predklinických štúdiách, ďalej do 2. fázy klinických štúdií sa zatiaľ posunuli PBCA nanočastice s enkapsulovaným mitoxantrónom na liečbu pre pacientov s diagnostikovaným hepatocelulárnym karcinómom (Zhou a kol., 2009).

## Cielený prenos liečiv

Doručovanie liečiv do poškodených tkanív môže byť vykonané pasívnym ako i aktívnym cílením nanočastíc. Pri pasívnom transporte liečiv sa využíva efekt zvýšenej permeability a retencie v nádorových tkanivách, známy tiež pod skratkou EPR (Obr. 1). Nádorové tkanivá sa vyznačujú špeciálnymi charakteristikami, ktoré ich anatomicky a patologicky odlišujú od zdravých tkanív.

V dôsledku zvýšenej angiogenézy sú nádorové tkanivá výrazne prekrvené a kvôli nadmernému a rýchlemu rastu rakovinových buniek dochádza k poškodeniu endotelových buniek ciev a vznikajú na nich defekty a diery rôznej veľkosti. Okrem toho je narušená a nefunkčná lymfatická drenáž, ktorá prispieva k akumulácii makromolekúl v nádorových tkanivách (Fang a kol., 2011).

**Obr. 1: Schematické znázornenie lokalizácie nanočastíc v nádorových tkanivách v dôsledku EPR efektu, ktorý sa využíva pre pasívne cielenie liečiv.**



Práve preto je pri pasívnom cielení liečiv rozhodujúca veľkosť nanočastíc. Pre *in vivo* aplikácie je vhodná veľkosť v rozmedzí od 10 do 200 nm. Rozmery nanočastíc možno precízne kontrolovať pomocou dynamického rozptylu svetla s využitím prístroja Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK). Nanočastice s priemerom pod 10 nm sú odstránené renálne alebo extravazáciou, kým NPs s priemerom väčším ako 200 nm sú odstránené slezinou a nad 1  $\mu\text{m}$  sú opsonizované a akumulované v pečeni, slezine alebo kostnej dreni. Morfológia nanočastíc má taktiež vplyv na ich transport a distribúciu v tele, práve preto sú sférické nanočastice najčastejšie študované (Elsabagy a Wooley, 2012; Petros a DeSimone, 2010; Banik a kol., 2016). Ďalším faktorom ovplyvňujúcim životnosť a cirkuláciu nanočastíc v obehú sú ich povrchové vlastnosti. Nanočastice sú hneď po vstupe do krvného obehu rozpoznávané ako cudzie telesá a napadnuté systémom mononukleárných fagocytov. Toto rozpoznávanie úzko súvisí s procesom opsonizácie, pri ktorom sú cudzie objekty obalované špeciálnymi proteínmi – opsonínmi, nachádzajúcimi sa v krvnej plazme. Takto označený objekt je viditeľný pre fagocyty a následne je nimi odstránený, najčastejšie ich akumuláciou v pečeni a v slezine (Owens a Peppas, 2006). Preto je potrebná povrchová modifikácia nanočastíc rôznymi chemickými skupinami, ktoré môžu upravovať povrchový náboj, hydrofilnosť, imunogenitu *in vivo*, biodistribúciu a intracelulárnu dostupnosť a tak vytvoriť účinný prenos liečiv (Owens a Peppas, 2006; Prabhu a kol., 2015)

Jedným zo spôsobov ako limitovať opsonizáciu PNPs je kovalentné alebo nekovalentné naviazanie polymérnych reťazcov polyetylénglykolu (PEG), ide o tzv. pegyláciu. PEG je špirálovitý polymér, v ktorom sa opakujú etylén-éterové jednotky s dynamickou konformáciou (Jokerst a kol., 2005). PEG vrstva by mala mať minimálnu hrúbku

pre efektívne blokovanie opsonínov. Táto hrúbka zvyčajne koreluje s povrchovou hustotou reťazcov, konformáciou a molekulovou hmotnosťou. Molekulová hmotnosť PEG môže byť zo širšieho intervalu (2000-20 000 Da). Ukázalo sa, že pokrytie nanočastíc s PEG, ktorá má molekulovú hmotnosť 2000 Da alebo vyššiu, sa považuje za dostatočné pre obídenie systému mononukleárných fagocytov. Keďže PEG nie je biodegradovateľný, uprednostňujú sa molekuly PEG s nižšou molekulovou hmotnosťou (Garaiová, 2013).

PEG znižuje pôsobenie systému mononukleárných fagocytov a zvyšuje cirkulačný čas v závislosti od dĺžky, typu (lineárne alebo rozvetvené) reťazcov a hustoty pokrytia nanočastíc. Vhodný cirkulačný polčas  $t_{1/2}$  závisí od aplikácie nanočastíc. Pre biozobrazovanie je optimálny polčas 2 – 6 hodín, pre terapeutické účely je potrebný dlhší polčas (aj dni), ktorý už však môže mať za následok poškodenie aj zdravých tkanív. PEG svojou hydrofilnou podstatou zvyšuje rozpustnosť a má vplyv aj na výslednú veľkosť PNPs. PEG je netoxický a využívaný ako stabilizátor v procese prípravy nanočastíc, zároveň môže byť jeho funkcia nahradená aj inými molekulami ako sú sacharidy, kopolyméry a lipidy (Jokerst a kol., 2005)

Aktívne cielenie liečiv je vykonávané pomocou špeciálne upraveného povrchu nanočastíc (povrch je pokrytý aktívnymi molekulami ako sú aptaméry, protilátky, antigény alebo receptory), ktorý sa viaže na špecifické receptory nachádzajúce sa na nádorových bunkách (Cho a kol., 2008). Často používaná molekula pre aktívne cielenie nanočastíc je napríklad kyselina listová. Receptory kyseliny listovej sa vyskytujú na nádorových bunkách vo zvýšenej miere, kým v zdravých bunkách nedochádza k ich expresii, alebo sa v nich vôbec nenachádzajú (Sudimack a Lee, 2000).

Ďalšou z fyziologických bariér, ktorú treba prekonať pri cielenom prenose liečiv je hematoencefalická bariéra. Táto bariéra je ochranou mozgového tkaniva pred vonkajšími vplyvmi a vzniká vďaka tenkým spojeniam medzi mozgovými kapilármi tvorenými jednou vrstvou epitelových buniek. Na jednej strane bráni prenikaniu rôznych nebezpečných látok z krvi do mozgu, ale na druhej strane je prekážkou pri prestupe liečiv (antibiotiká, neuropeptidy a ďalšie) do centrálnej nervovej sústavy. Jednou z možností ako dosiahnuť cielený prestup do mozgového tkaniva sú nanočastice povrchovo upravené pomocou polysorbátu 80 (Tween 80), ktorý zachytáva apolipoproteín E z krvnej plazmy. Tieto nanočastice potom napodobňujú lipoproteíny s nízkou hustotou a tie môžu interagovať s receptormi, kde najpravdepodobnejším mechanizmom je endocytóza endotelových buniek (Kreuter, 2012).

## In vitro cytotoxický účinok enkapsulovaného a neenkapsulovaného kabazitaxelu

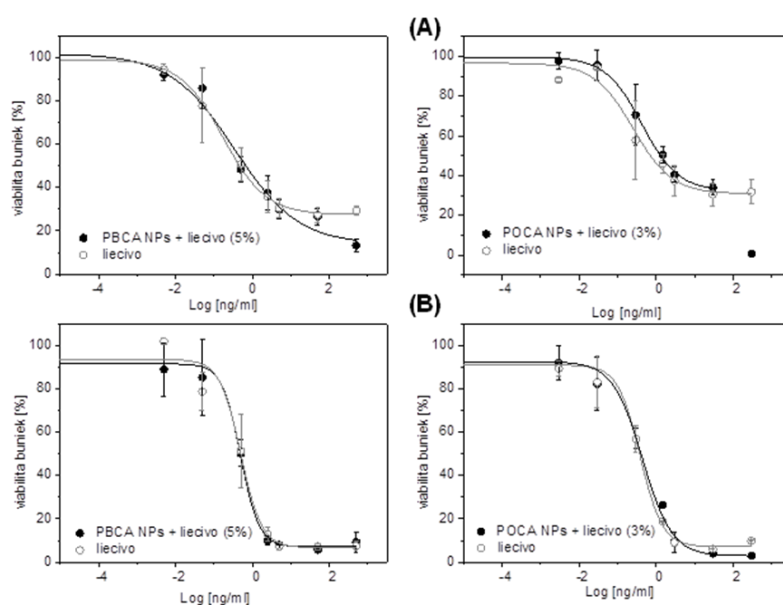
Každá bunka sa charakterizuje svojim životným cyklom, ktorý určujú jednotlivé fázy, počas ktorých rastie a reprodukuje sa. Počet a dĺžka týchto fáz sa líši od typu buniek (Alberts a kol., 1998). Chemoterapeutiká zasahujú do jednotlivých fáz a narúšajú ich normálny priebeh, čo vedie k zastaveniu rastu a k bunkovej smrti – apoptóze. Existuje viacero skupín chemoterapeutík podľa spôsobu ich účinku a chemickej štruktúry.

Taxány zahrňujú skupinu chemoterapeutík interagujúcich s mikrotubulami nádorových buniek počas mitotického delenia. Medzi najznámejšie patria paklitaxel a docetaxel (Yared a Tkaczuk, 2012). V roku 2010 bol kabazitaxel schválený Úradom pre kontrolu liečiv a potravín v USA, ako nové terapeutické liečivo pre pacientov kastrofózne-rezistentného karcinómu prostaty ako náhrada jeho prekursoru docetaxelu, voči ktorému si karcinóm vytvoril rezistenciu (De Bono a kol., 2010). Kabazitaxel, známy pod menom Jevtana, je na Slovensku dostupný od roku 2011. Toto liečivo je hydrofóbné

a viaže sa na tubulín, na ktorom vďaka 2 metyloxylovým reťazcom mení afinitu k P-glykoproteínu, čím zvyšuje šancu predísť rezistencii. Taktiež má využitie aj pri liečbe rakoviny prsníka (Yared a Tkaczuk, 2012). Kabazitaxel polymerizuje mikrotubuly a tým stabilizuje mitotické vretienko, čím dochádza k inhibícii bunkového delenia (Cheetham a Petrylak, 2013).

*In vitro* cytotoxický účinok kabazitaxelu enkapsulovaného v PBCA a POCA nanočasticiach, ako i samotného kabazitaxelu sme študovali na bunkových líniiach ľudského adenokarcinómu prsníka (MDA-MB-231) a glioblastómu (P3) pomocou Alamar Blue testu. Na Obr. 2. vidíme krivku závislosti viability buniek od logaritmu koncentrácie kabazitaxelu, enkapsulovaného i neenkapsulovaného pre MDA-MB-231 bunkovú líniu po 72 hodinovej inkubácii (Obr. 2A.) a pre bunky P3 glioblastómu (Obr. 2B.). Vidíme, že kabazitaxel, ktorý slúži ako inhibítor v procese bunkového delenia, bol účinnejší pri bunkovej línii glioblastómu P3, pri ktorej už po 48 hodinách vykazoval takmer 100 % cytotoxický účinok, pravdepodobne kvôli rapidnejšiemu rozmnožovaniu týchto buniek. Kým viabilita MDA-MB-231 buniek po 72 hodinách expozície kabazitaxelom klesla len na úroveň ~30 %.

Obr. 2: Závislosť viability buniek (%) od logaritmu koncentrácie liečiva po ošetrení rôznymi koncentraciami enkapsulovaného v PBCA a POCA nanočasticiach a neenkapsulovaného liečiva (kabazitaxelu) pre MDA-MB-231 bunky a inkubácií 72 hodín (A), P3 bunky a inkubácií 48 hodín (B). Krivky zodpovedajú fitu 4-parametrickej rovnice. Dáta sú prezentované ako priemer  $\pm$ SD (n=2-3).



## Záver

Polyalkylkyanoakrylátové nanočastice môžu slúžiť ako nosiče liečiv. Sú vhodné napríklad aj pre enkapsuláciu hydrofóbného liečiva, kabazitaxelu, ktorý bol vyvinutý pre pacientov s kastrofózne-rezistentným karcinómom prostaty. Toto liečivo však môže byť použité aj pri liečbe rakoviny prsníka a mozgových nádoroch, nakoľko pô-

sobí ako inhibítor mitotického bunkového delenia. Enkapsulovaný kabazitaxel v PBCA a POCA nanočasticiach, aj neenkapsulovaný, vykazoval podobnú cytotoxicitu pre jednotlivé skúmané koncentrácie na bunkových líniiach rakoviny prsníka (MDA-MB-231) a glioblastómu (P3), čo potvrdzuje, že samotné nanočastice nebránia uvoľňovaniu a prenikaniu liečiva do buniek.

## Literatúra

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS K., WALTER, P. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Praha, Espero Publishing, 1968. ISBN 80-902906-2-0.
- ARIAS, J. L., CEBRIÁN-TORREJÓN, G., POUPON, E., FOURNET, A., COUVREUR P. Biodegradable polymeric nanoformulation based on the antiprotozoal canthin-6-one. In: *Journal of Nanoparticle Research* 13, 2011, pp. 6737-6746.
- ARIAS, J. L., REDDY, L. H., COUVREUR, P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. In: *Journal of Drug Targeting* 17, 2009, pp. 586-598.
- BANIK, B. L., FATTAHI, P., BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 8, 2016, pp. 271-299.
- COUVREUR, P., KANTE, B., ROLAND, M., GUIOT, P., BAUDUIN, P., SPEISER, P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 31, 1979, pp. 331-332.
- DE BONO, J. S., OUDARD, S., OZGUROGLU, M., HANSEN, S., MACHIELS, J. P., KOCÁK, I., GRAVIS, G., BODROGI, I., MACKENZIE, M. J., SHEN, L., ROESSNER, M., GUPTA S., SARTOR, A. O. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial. In: *The Lancet* 376, 2010, pp. 1147-1154.
- ELSABAHY, M., WOOLEY, K.L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. In: *Chemical Society Reviews* 41, 2012, pp. 2545-2561.
- FANG, J., NAKAMURA, H., MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 2011, pp. 136-151.
- GARAIÓVÁ, Z. *Study of the mechanisms of nanoparticle-mediated drug delivery across the lipid membrane*. Univerzita Komenského v Bratislave, Dizertačná práca, 2013.
- GRAF, A., McDOWELL, A., RADES, T. Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for enhanced delivery of therapeutics – is there real potential? In: *Expert Opinion on Drug Delivery* 6, 2009, pp. 371-387.
- HAGHNAZARI, N., MOHAMMADI, H., MOKHTARI, M. J., KARAMI, C., GHASEM, S. Synthesis and in vitro cytotoxicity of a novel efficient cisplatin-loaded poly N-butyl cyanoacrylate. In: *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 50, 2016, pp. 190-197.
- HASANDOOST, L., AKBARZADEH, A., ATTAR, H., HEYDARINASAB, A. In vitro effect of imatinib mesylate loaded on polybutylcyanoacrylate nanoparticles on leukemia cell line K562. In: *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 45, 2017, pp. 665-669.
- CHEETHAM, P., PETRYLAK, D. P. Tubulin-targeted agents including docetaxel and cabazitaxel. In: *Cancer Journal* 19, 2013, pp. 59-65.
- CHO, K., WANG, X., NIE, S., CHEN, Z., SHIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. In: *Clinical Cancer Research* 14, 2008, pp. 1310-1316.
- JOKERST, J. V., LOBOVKINA, T., ZARE, R. N. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. In: *Biophysical Chemistry* 257, 2005, pp. 2432-2437.
- KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 2012, pp. 213-222.
- MØRCH, Y., HANSEN, R., BERG, S., ÅSLUND, A. K. O., GLOMM, W. R., EGGEN, S., SCHMID, R., JOHNSEN, H., KUBOWICZ, S., SNIPSTAD, S., SULHEIM, E., HAK, S., SINGH, G., McDONAGH, B. H., BLOM, H., DE LANGE DAVIES, C., STENSTAD, P. M. Nanoparticle-stabilized microbubbles for multimodal imaging and drug delivery. In: *Contrast Media & Molecular Imaging* 10, 2015, pp. 356-366.
- NAGAVARMA, B. V. N., YADAV, H. K. S., AYAZ, A., VASUDHA, L. S., SHIVAKUMAR, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles – A review. In: *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5, 2012, pp. 16-23.
- NICOLAS, J., COUVREUR, P. Synthesis of poly (alkyl cyanoacrylate) -based colloidal nanomedicines. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1, 2009, pp. 111-127.
- OLIVIER, J. C., FENART, L., CHAUVET, R., PARIAT, C., CECHELLI, R., COUET, W. Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. In: *Pharmaceutical Research* 16, 1999, pp.1836-1842.
- OWENS, D. E., PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics* 307, 2006, pp. 93-102.
- PETROS, R. A., DESIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 2010, pp. 615-627.
- PRABHU, R. H., PATRAVALE, V. B., JOSHI, M. D. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights. In: *International Journal of Nanomedicine* 10, 2015, pp. 1001-1018.
- SNIPSTAD, S., WESTRØM, S., MØRCH, Y., AFADZI, M., ÅSLUND, A. K., DE LANGE DAVIES, C. Contact-mediated intracellular delivery of hydrophobic drugs from polymeric nanoparticles. In: *Cancer nanotechnology* 5, 2014, p. 8.
- SUDIMACK, J. LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 2000, pp.147-162.
- SULHEIM, E., BAGHIROV, H., VON HAARTMAN, E., BØE, A., ÅSLUND, A. K. O., MØRCH, Y., DE LANGE DAVIES, C. Cellular uptake and intracellular degradation of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. In: *Journal of Nanobiotechnology* 14, 2016, pp. 1-14.
- TIAN, X. H., LIN, X. N., WEI, F., FENG, W., HUANG, Z. C., WANG, P., REN, L. DIAO, Y. Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. In: *International Journal of Nanomedicine* 6, 2011, pp. 445-452.
- VAUTHIER, C., DUBERNET, C., FATTAL, E., PINTO-ALPHANDARY, H., COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 55, 2003, pp. 519-548.
- YARED, J. A., TKACZUK, K. H. R. Update on taxane development: New analogs and new formulations. In: *Drug Design, Development and Therapy* 6, 2012, pp. 371-384.
- ZHOU, Q., SUN, X., ZENG, L., LIU, J., ZHANG, Z. A randomized multicenter phase II clinical trial of mitoxantrone-loaded nanoparticles in the treatment of 108 patients with unresected hepatocellular carcinoma. In: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5, 2009, pp. 419-423.

## Podakovanie

Polymérne nanočastice boli syntetizované v SINTEF, Trondheim, Nórsko. Autori ďakujú Dr. Y. Mørch a prof. C. de Lange Davies za ich poskytnutie a za cenné diskusie.

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

# RNA interagujúce s PIWI proteínmi majú potenciál pre onkologickú liečbu

Silvia Rybecká<sup>1</sup>

Stanislav Stuchlík<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Katedra molekulárnej biológie  
Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, 84215 Bratislava 4  
Slovensko

<sup>1</sup>rybecka2@uniba.sk

<sup>2</sup>stuchlik@uniba.sk

PIWI-interacting RNAs have potential  
to treat oncologic diseases

## Abstract

PiRNAs are the most abundant group of small non-coding RNAs represented across the whole spectre of organisms. They play crucial role in genome stability maintenance during early development. Recent studies showed their presence in adult organism uncovering their role in epigenetic regulation of gene expression. This article reviews recent findings about piRNAs and their potential in oncologic diseases treatment.

## Key words

Pirna, small non-coding rnas, cancer, RNA interference, PIWI proteins, genes expression regulation, transposones, genome stability

## Úvod

Neustálou snahou v liečbe onkologických ochorení je nachádzať také prostriedky, ktoré nielen umožnia úplné vyliečenie, ale tiež také s minimom vedľajších účinkov. Nesporne významnú úlohu v šanci na vyliečenie zohráva i včasnosť záchytu malignity, jej charakterizácia a nastavenie terapie k najvyššej efektívnosti pre daný typ ochorenia. K tomu je potrebné hľadať vhodné prognostické a prediktívne markery a terapeutické ciele, ktoré zacielia výhradne nádorovo transformovanú bunku.

Výskum posledného desaťročia odkryl „nových hráčov“ v regulácii gébovej expresie. Sú nimi molekuly zo skupiny krátkych nekódujúcich RNA – piRNA (RNA interagujúce s PIWI proteínmi), ktorých hlavnou úlohou je udržiavanie gébovej stability prostredníctvom umlčovania transponovateľných elementov. O týchto molekulách sa pôvodne predpokladalo, že sa vyskytujú iba v zárodočných bunkách, avšak recentné štúdie ukazujú, že sa nachádzajú aj u dospelých jedincov, a navyše ich expresné hladiny sa významne líšia medzi zdravým a nádorovým tkanivom. Tieto vlastnosti piRNA ich predurčujú k uplatneniu v liečbe onkologických ochorení.

## Komplexy piRNA a proteínov skupiny PIWI

RNA interagujúce s PIWI proteínmi, skrátene piRNA, sú endogénne krátke nekódujúce RNA s dĺžkou asi 26 – 31 nukleotidov. Prvá štúdia o ich regulačnom potenciáli u cicavcov pochádza z roku 2006. Tým Aravin a kol. (2006) opisujú skupinu krátkych nekódujúcich RNA v samčích zárodočných bunkách myši s dĺžkou asi 26 – 31 nukleotidov. Táto dĺžka ich jednoznačne zaraďuje do inej skupiny ako sú už dobre známe miRNA a siRNA, ktoré majú zvyčajne dĺžku 20 – 23 nukleotidov.

Piwi proteíny, ktoré vytvárajú komplexy s molekulami piRNA, sú evolučne vysoko konzervované a vyskytujú sa u rastlín i živočíchov (Cox a kol., 1998). Piwi proteíny patria do rodiny takzvaných argonautových proteínov. Komplex piRNA a asociovaného PIWI proteínu, môže posttranskripčne regulovať expresiu tak, že piRNA funguje ako rozpoznávacie miesto oblasti transkriptu na princípe komplementarity a s ňou asociovaný PIWI proteín má nukleázovú aktivitu, ktorá tento transkript degraduje.

## Umiestnenie a úloha v genóme

Ukázalo sa, že piRNA sú derivované z diskretných genomických lokusov, pričom tieto lokusy obsahujú najmä defektné transpozóny (Brennecke a kol., 2007), čo ich predurčuje k ich regulácii na komplementárnom princípe. Preto môžeme usudzovať, že primárnou úlohou piRNA je kontrola mobility transpozónov, a tým udržiavanie stability genómu.

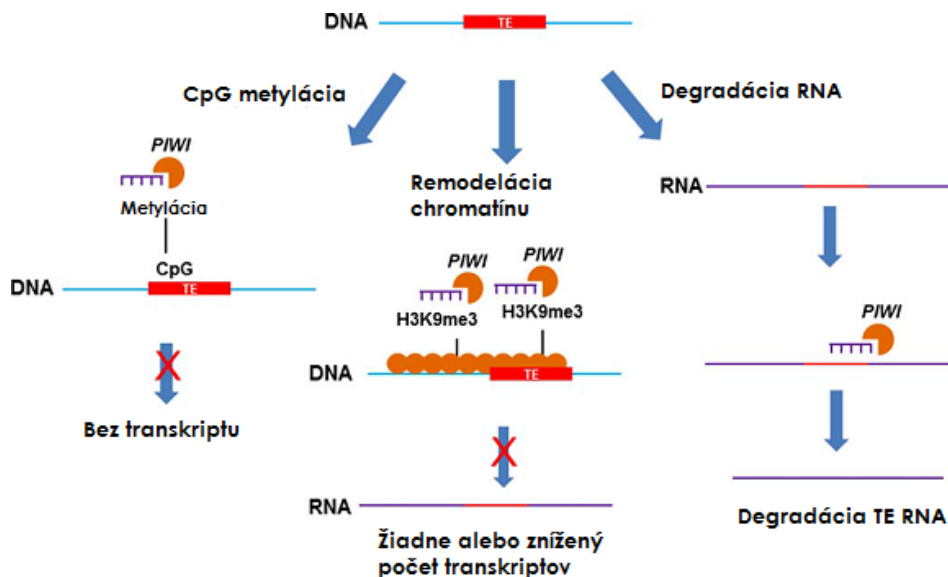
Repetitívne elementy pritom tvoria až polovicu genómu človeka a asi 40 % genómu myši a hrajú dôležitú úlohu v štruktúre chromatinu, čím ovplyvňujú i expresiu príslušných génov (Waterston a kol., 2002; Slotkin a Martienssen, 2007; Goodier a Kazazian, 2008). PiRNA sú dôležitými ochrancami genómu práve v zárodočných bunkách, pretože ide o kritickú fázu vývinu, keď každá mutácia spôsobená TE (transponovateľné elementy) má potenciál prenosu do ďalšej generácie.

PiRNA má úlohu aj v udržiavaní hladín modifikácie H3K9me3, ktorá má v zárodočných bunkách taktiež efekt represora na repetitívnych sekvenciách typu LINEs (Pezic a kol., 2014). Zaujímavé je, že táto pomocou piRNA sprostredkovaná represia chromatinu cieľi výhradne na TE s plnou dĺžkou, teda iba na tie, ktoré sú

aktívne. Toto zistenie odкрýva pozoruhodnú schopnosť piRNA rozpoznávať aktívne elementy spomedzi množstva fragmentov genomických transpozónov, ktoré bunka obsahuje. Ďalší prehľad spôsobov ovplyvňovania génovej expresie prostredníctvom piRNA je na Obrázku 1.

Obr. 1: Tri cesty ovplyvňovania aktivity transpozónov komplexmi Piwi-piRNA (Guo a Wu, 2013)

Schéma vľavo ukazuje represiu expresie transpozónov zvýšením metylácie CpG oblastí DNA. Metylácia nastáva buď v oblasti upstream, alebo priamo v kódujúcej oblasti transpozónu. Schéma uprostred ukazuje zníženie expresie transpozónov pomocou remodelácie chromatinu v blízkosti transpozónovej DNA. Vpravo je docielené degradácie transpozónového transkriptu komplementárnym párovaním s piRNA v komplexe Piwi-piRNA a nukleázovou aktivitou PIWI.



## Typy regulácie expresie prostredníctvom piRNA

Za najpodstatnejšiu funkciu komplexov PIWI-piRNA je považovaná schopnosť represie mobilných elementov. Tento predpoklad je podporený najmä faktom, že väčšina piRNA majú protizmyselnú sekvenciu k transpozónom v gonádach drozofily. Preto sú transpozóny považované za ich primárne ciele. Najsilnejším dôkazom toho sú nezávislé štúdie naprieč viacerými druhmi, ktoré preukázali kontrolu transpozónov prostredníctvom Piwi-piRNA u drozofily (Brennecke a kol., 2007), myši (Aravin a kol., 2006) a ryby *Danio rerio* (Houwing a kol., 2007).

V súvislosti s nádormi boli prvotne skúmané samotné Piwi proteíny a postupne sa v tumorigenéze preukazoval i význam Piwi v komplexe s molekulou piRNA (Suzuki a kol., 2012). Ďalej nadmerná alebo nedostatočná expresia piRNA cieľiacich mRNA (vrátane takých, ktoré obsahujú transpozónovú sekvenciu v 3'UTR oblasti) môže teoreticky zohrávať úlohu v jej degradácii alebo inhibícii expresie tumor-supresorových génov alebo onkogénov. Potom hladina expresie konkrétnej piRNA priamo koreluje s expresiou nádorového supresoru alebo onkogénu.

Okrem toho narušenie fyziologických hladín piRNA, ktoré za normálnych okolností suprimujú aktivitu TE, môže uľahčiť retrotranspozíciu, zvýšiť tým genómovú nestabilitu a prispieť tak k tumorigenéze. Aj keď je preukázaná výrazná disregulácia expresných hladín piRNA v nádore v porovnaní so zdravým tkanivom, nie je jasná úloha a postavenie týchto molekúl v rámci tejto patogenezy. Zo štúdií vyplýva dilema, či je zvýšená alebo znížená expresná hladina konkrétnej piRNA sprievodným znakom nádoru, teda dôsledkom iných zmien v genóme, alebo je faktorom, ktorý tento stav vyvoláva a riadi. Dôkazom toho, že má význam sa týmito molekulami zaoberať v súvislosti s liečbou onkologických ochorení je aj fakt, že v súčasnosti prebieha približne 20 klinických štúdií založených na technológii miRNA alebo siRNA. Príkladom je liečivo od firmy Calando Pharmaceuticals pod názvom CALAA-01 zo skupiny siRNA vo fáze klinického hodnotenia 1b. Táto molekula cieľi podjednotku ribonukleotidovej reduktázy, dôsledkom čoho je inhibícia tumoru. Nosičom liečiva je nanočastica v priemere menšia ako 100 nm.

Zo skupiny miRNA je najznámejším liečivom modifikovaná microRNA, ktorá sa komplementárne viaže na endogénnu miR-122 pod komerčným názvom Miravirsen. Táto molekula, v súčasnosti vo fáze klinického

hodnotenia 2b, sa používa na terapiu hepatitídy C. Vírus hepatitídy C potrebuje miR-122, aby sa mohol replikovať, ale nemôže túto molekulu utilizovať v prípade, že je viazaná na miravirsén.

Liečivá fungujúce na báze interferencie s cieľovou molekulou teda majú svoje miesto v terapii rôznych ochorení. Vzhľadom na to, že ide o pomerne nedávne objavy a klinické štúdie trvajú aj desaťročia, ešte potrvá nejaký čas, kým sa stanú stabilnou súčasťou farmaceutickej výroby. Potenciál však majú nielen vďaka efektívnemu a selektívnemu účinku, ale aj vďaka minimu vedľajších účinkov. Liečivá na báze krátkych nekódujúcich RNA totiž možno zaradiť do takzvaných direct target drugs.

## Záver

PiRNA predstavujú najväčšiu skupinu molekúl zo skupiny krátkych nekódujúcich RNA vôbec. Medzi ich funkcie patrí udržiavanie stability zárodočných buniek, umlčovanie transpozónov, ale aj riadenie expresie génov, ktoré obsahujú transpozóny, najčastejšie vo svojej 3'UTR oblasti. Pôvodná domnienka ich výhradného výskytu v zárodočných bunkách je dnes minulosťou a vieme, že piRNA sú abundantly exprimované vo všetkých tkanivách človeka a navyše ich hladiny sú tkanivovo špecifické. V nádorovom tkanive sa expresné hladiny piRNA líšia od expresných hladín v zdravom tkanive. Nejde pritom o univerzálne pravidlo – hladina niektorých konkrétnych piRNA je zvýšená a niektorých, naopak, znížená. Špecifická expresia a výskyt v krvnom obehú ich predurčujú aj k použitiu ako neinvazívnych prognostických biomarkerov nádorových ochorení. Regulačné schopnosti piRNA v rámci bunky im zasa dávajú potenciál stať sa významnými terapeutickými cieľmi liečiv najnovšej generácie. V budúcom výskume treba objasniť ich podrobnejšiu úlohu v patogenéze onkologických ochorení, a to najmä nakoľko sú ich deregulované hladiny príčinou, či dôsledkom nádorovej transformácie.

## Literatúra

ARAVIN, A.; GAIDATZIS, D.; PFEFFER, S.; LAGOS-QUINTANA, M.; LANDGRAF, P.; IOVINO, N.; MORRIS, P. A Novel Class of Small RNAs Bind to MILI Protein in Mouse Testes. In: *Nature*. ročník 37, číslo 442, 2006, pp. 203-207  
BRENNECKE, J.; ARAVIN, A. A.; STARK, A.; DUS, M.; KELLIS, M.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J. Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transpo-

son Activity in Drosophila. In: *Cell*. ročník 33, číslo 128, 2007, pp. 1089-1103  
COX, D. N.; CHAO, A.; BAKER, J.; CHANG, D.; QIAO, D.; LIN, H. A novel class of Evolutionarily Conserved Genes Defined by Piwi Are Essential for Stem Cell Self-Renewal. In: *Genes & Development*. ročník 12, číslo 23, 1998, pp. 3715-27  
GOODIER, J. L.; KAZAZIAN, H. H. Retrotransposons Revisited: The Restraint and Rehabilitation of Parasites. In: *Cell*. ročník 34, číslo 135, 2008, pp. 23-35  
GUO, J.; WU, Y. Fighting an Old War with a New Weapon – Silencing Transposons by Piwi-Interacting RNA. In: *IUBMB Life*. ročník 17, číslo 65, 2013, pp. 739-47  
HOUWING, S.; KAMMINGA, L. M.; BEREZIKOV, E.; CRONEMBOLO, D.; GIRARD, A.; VAN DEN ELST, H.; FILIPPOV, D. V. A Role for Piwi and piRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish. In: *Cell*. ročník 33, číslo 129, 2007, pp. 69-82  
PEZIC, D.; MANAKOV, S. A.; SACHIDANANDAM, R.; ARAVIN, A. A. PiRNA pathway targets active LINE<sup>o</sup> elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells. In: *Genes & Development*. ročník 28, číslo 13, 2014, pp. 1410-28  
SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSEN, R. Transposable Elements and the Epigenetic Regulation of the Genome. In: *Nature Reviews. Genetics*. ročník 8, číslo 4, 2007, pp. 272-85  
SUZUKI, R.; HONDA, S.; KIRINO, Y. PIWI Expression and Function in Cancer. In: *Frontiers of Genetics*. ročník 2, číslo 3, 2012, pp. 204  
WATERSTON, R. H.; LINDBLAT-TOH, K.; BIRNEY, E.; ROGERS, J.; ABRIL, J. F.; AGARWAL, P. Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome. In: *Nature*. ročník 41, číslo 420, 2002, pp. 520-62

## 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.



## Esenciálne oleje vo vzťahu k mikroorganizmom

Andrea Puškárová<sup>1</sup>

Mária Bučková<sup>2</sup>

Lucia Kraková<sup>3</sup>

Domenico Pangallo<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>Ústav molekulárnej biológie SAV  
Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava  
Slovensko

<sup>1</sup>andrea.puskarova@savba.sk

<sup>2</sup>maria.buckova@savba.sk

<sup>3</sup>lucia.krakova@savba.sk

<sup>4</sup>domenico.pangallo@savba.sk

### Essential oils in relation to microorganisms

#### Abstract

Essential oils are the volatile liquids that are distilled from aromatic plants. Each essential oil is composed of dozens (sometimes hundreds) of individual components at quite different concentrations that work together synergistically. Their most common constituents are terpenes, aromatic and aliphatic compounds. Essential oils have many scientifically-proven health benefits, one of which is their potent antimicrobial qualities. With some strains of microorganisms becoming increasingly resistant to the current array of manufactured antibiotics. Scientists and medical professionals are beginning to recognize the potential of essential oils as a sources for broad-spectrum antimicrobial drugs and agents for decontaminating an indoor environment. Essential oils could be used as models for further studies in vivo and clinical trials.

#### Key words

Essential oils, antimicrobial activity, antimicrobial resistance, indoor environment

### Úvod

Esenciálne oleje sú sekundárne metabolity rastlín. Definujeme ich ako prchavé, intenzívne voňajúce zmesi prírodných látok olejovej konzistencie, sú lipofilné, vo vode ťažko rozpustné, môžu obsahovať asi 20 až 60 rozmanitých zlúčenín v rôznych koncentráciách. Po chemickej stránke sú tvorené uhľovodíkmi (monoterpény a seskviterpény) a oxidovanými zlúčeninami (alkoholy, estery, étery, ketóny, laktóny, aldehydy, ketóny fenoly a fenol étery). Chemické zloženie esenciálnych olejov varíruje od oleja k oleju. Toto zloženie je ovplyvnené množstvom faktorov, ako napríklad časťou rastliny, z ktorej bol olej získaný, regiónom, podnebím, nadmorskou výškou, destilačným procesom. Bola preukázaná synergia (spolupôsobenie) jednotlivých chemických látok v esenciálnych olejoch. Takto všetky zložky esenciálneho oleja prispievajú k jeho výslednej charakteristike a účinku.

### Antimikrobiálny účinok esenciálnych olejov

Veľké množstvo esenciálnych olejov má antimikrobiálny účinok, t. j. účinkujú na potlačenie rastu a rozmnožovania alebo usmrcujú rôznych pôvodcov infekčných ochorení.

Antimikrobiálne látky môžu byť označované podľa typu mikroorganizmov, proti ktorým predovšetkým pôsobia. Napríklad antibakteriálne látky sa používajú proti baktériám, antifungálne látky sa používajú proti hubám. Látky, ktoré usmrcujú mikroorganizmy, sa nazývajú mikrobiocídne. Tie, ktoré len potláčajú ich rast, sa nazývajú biostatiké.

Schopnosť mikroorganizmu odolať antimikrobiálnej liečbe, ktorá bola predtým účinná sa vo všeobecnosti označuje ako antimikrobiálna rezistencia. Je príčinou častého zlyhávania štandardnej terapie. Vzhľadom na veľmi krátky životný cyklus sú mikroorganizmy veľmi adaptabilné voči okolitým podmienkam a nové generácie, ktoré vznikajú si nesú genetickú informáciu s rezistenciou a s inými výhodami oproti starším generáciám. Preto je dôležité hľadať nové účinné antimikrobiálne látky (Pidot et al., 2014). V tomto zmysle sú obzvlášť zaujímavé práve zmesi prchavých sekundárnych metabolitov rastlín – esenciálne oleje. Na rozdiel od chemických látok vyrábaných v laboratóriách sa chemické látky v esenciálnom oleji rastliny môžu meniť a prispôbovať sa vonkajším podmienkam prostredia a evolúcii. Práve prispôbovosť zaujala vedcov a zdravotníkov pri hľadaní nových látok s antimikrobiálnym účinkom. Esenciálne oleje sa pre svoje liečivé účinky používali už v dobách, kedy ľudstvo nemalo žiadne vedomosti o tom, čo sú baktérie alebo účinné látky.

Esenciálne oleje v porovnaní s dostupnými antibiotikami vykazujú často účinok aj k rezistentným bakteriálnym kmeňom (Warnke a kol., 2009). Medzi najčastejšie tes-



tované baktérie patrí hlavne methicilin rezistentný *Staphylococcus aureus* (MRSA). Mnohé práce poukazujú na synergický (spolupôsobiaci) účinok esenciálneho oleja s bežne užívanými antibiotikami, čo by mohlo viesť k zníženiu ich spotreby a zmenšení rýchlosti nárastu bakteriálnej rezistencie. Citlivosť patogénov *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* sa napríklad zvýšila použitím kombinácie bežne používaných liečiv, ako sú beta-laktámové antibiotiká, chloramfenikol a chinolóny s geraniolom (Warnke a kol., 2009). Iná štúdia (Fadli a kol., 2012) poukázala na synergický účinok esenciálneho oleja z *Thymus maroccanus* (*Lamiaceae*) s jeho hlavnou zložkou karvakrol (76,35 %) s niekoľkými bežne používanými antibiotikami (ciprofloxacín, gentamicín, pristinamycín, cefixim) na rôzne patogény (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*).

Esenciálne oleje s biocídnou aktivitou boli použité aj na vývoj alternatívnych dezinfekčných stratégií pre vnútorné prostredie alebo v potravinárskom priemysle, na kontaminovaných povrchoch a zariadeniach v prostredí na spracovanie potravín (Jun a kol., 2010; Nowak a kol., 2012). Bola potvrdená aj účinnosť niektorých esenciálnych olejov na zabránenie tvorby biofilmu *Listeria monocytogenes* (De Oliveira a kol., 2010) a *Salmonella enterica* (Valeriano a kol., 2012) na nehrdzavejúcich ocelových povrchoch.

Počas odparovania majú niektoré esenciálne oleje silnejšie antimikrobiálne účinky, ako keby sa použili v tekutom stave (Tyagi a kol., 2010; Puškárová a kol., 2017). K zvýšenému antimikrobiálnemu pôsobeniu dochádza v dôsledku kombinácie odparených olejov so zápornými iónmi v ovzduší, čím sa zároveň dosahuje prečistenie ovzdušia a dezinfekcia (Tyagi a kol., 2010).

## Testovanie antimikrobiálneho účinku esenciálnych olejov

Antimikrobiálny účinok esenciálnych olejov závisí od chemického profilu esenciálneho oleja (Bakkali a kol., 2008), preto je pre testovanie nevyhnutné vybrať esenciálne oleje, ktoré majú chemické zloženie potvrdené plynovou chromatografiou a hmotnostnou spektrometriou (GC/MS), čo je najbežnejšia a nevyhnutná technika používaná na analýzu chemického zloženia. Podľa literatúry (Kalemba a Kunicka 2003) účinnosť antimikrobiálnych látok klesá v poradí: fenoly > aldehydy > ketóny > alkoholy > estery > uhľovodíky. Jeden esenciálny olej obsahuje niekoľko hlavných aktívnych zložiek, ako sú napríklad tymol, pinén, eugenol, limonén, linalol, karvakrol a celý rad zlúčenín s nižším percentuálnym zastúpe-

ním. Oleje bohaté na fenoly sú napríklad klinček (viac ako 85 %), oregáno (viac ako 80 %) alebo tymián (viac ako 60 %). Hlavnou zložkou levandule sú alkoholy (viac ako 58 %), v prípade šalvie sú to estery (viac ako 75 %). Medzi esenciálne oleje, v ktorých dominantnou chemickou látkou sú aldehydy patria napríklad citrónová tráva (viac ako 85 %) a škorica-cassia (viac ako 85 %). Hlavnou zložkou čajovníkového esenciálneho oleja sú uhľovodíky monoterpény (viac ako 70 %).

Pre testovanie antimikrobiálneho účinku esenciálnych olejov sa najčastejšie využívajú metódy vyvinuté špeciálne pre testovanie antibiotík, hoci ich prevedenie musí byť rozlične modifikované vzhľadom na nedostatočnú rozpustnosť esenciálnych olejov vo vode a ich prchavosť.

Priamy kontakt mikroorganizmu s testovanou látkou sa využíva pri diskovej difúznej a dilučnej metóde.

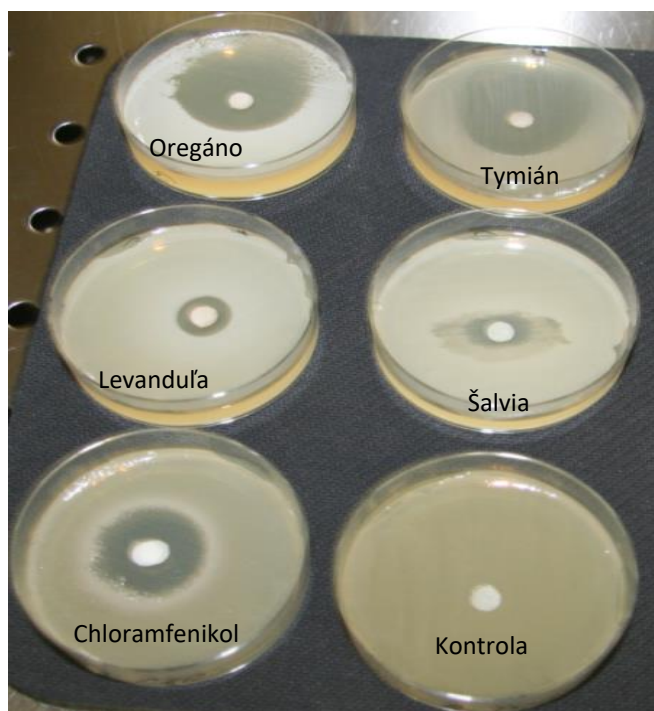
Disková difúzna metóda používa jednu koncentráciu testovanej látky, ktorá sa aplikuje na kruhový filtračný papier (Obr. 1). Inhibičná zóna (nameraná veľkosť plochy odumretých mikroorganizmov) indikuje, či je kmeň citlivý, rezistentný, alebo stredne citlivý. Pre jednotlivé antibakteriálne chemoterapeutiká a testované baktérie sú stanovené hraničné veľkosti inhibičných zón v mm. Ako citlivý sa označuje kmeň so zónou rovnakou alebo väčšou ako je hraničná veľkosť, za rezistentný kmeň so zónou menšou ako má štandardný kmeň pre rovnaký druh baktérií (<http://www.eucast.org>).

Dilučná metóda umožňuje zistiť najmenšiu koncentráciu esenciálneho oleja, ktorá vyjadruje mieru citlivosti mikroorganizmu v tekutých alebo agarových živných pôdach. Stanovuje sa minimálna inhibičná koncentrácia, čo je najnižšia koncentrácia, ktorá zastaví rast baktérií a minimálna baktericídna (usmrcujúca) koncentrácia, čo je najnižšia koncentrácia, ktorá usmrť 99,9 % príslušníkov populácie vyšetovaných mikroorganizmov (NCCLS, 1999).

Nepriamy kontakt mikroorganizmu s testovanou látkou predstavuje možnosť testovať antimikrobiálne účinky výparov esenciálnych olejov (Obr. 2). V tomto prípade je esenciálny olej umiestnený mimo živnú pôdu a do kontaktu s testovaným mikroorganizmom sa dostávajú iba jeho výpary (Inouye a kol., 2003). Pri tomto spôsobe testovania bol experimentálne zaznamenaný výraznejší účinok esenciálnych olejov najmä u mikroskopických vláknitých húb (Tulio a kol., 2007; Tyagi a kol., 2011; Puškárová a kol., 2017). Jedným vysvetlením môže byť kombinovaný účinok pôsobení plynov a nepriameho pôsobenia živnej pôdy s absorbovanou silicou. Huby rastú viac na povrchu a sú teda viac vystavené vplyvu pár, zatiaľ čo u baktérií prevláda vplyv silíc akumulovaných v substráte. Iným vysvetlením môže byť všeobecne väčšia citlivosť húb voči siliciam.

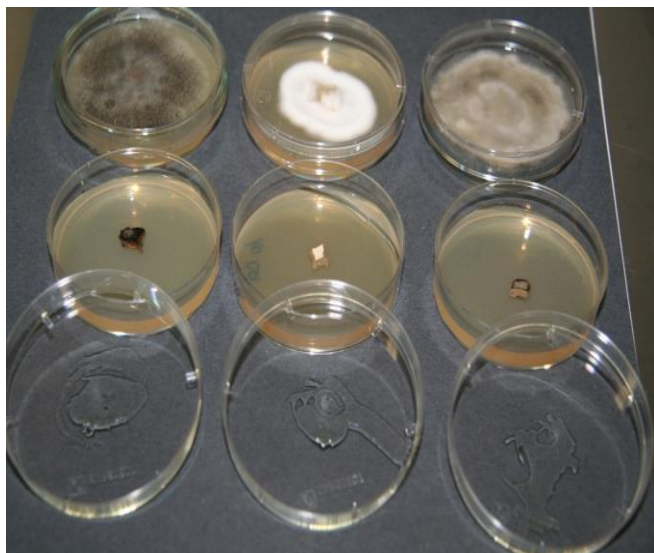
**Obr. 1: Disková difúzna metóda.**

Citlivosť bakteriálneho kmeňa *Staphylococcus aureus* na esenciálne oleje (5 µl/disk) oproti citlivosti na chloramfenikol (30 µg/disk), kontrola (disk bez oleja).



**Obr. 2: Príklad testovania antimikrobiálnych účinkov výparov esenciálnych olejov.**

Metóda mikroatmosféry. Antifungálny účinok výparov neriedeného esenciálneho oleja tymián na kmene: zľava *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium globosum*, *Alternaria alternata*. Použitá koncentrácia oleja 1 µl / ml vzduchového priestoru.



## Záver

Antimikrobiálna rezistencia sa v dnešnej dobe stala vážnym celosvetovým problémom. Do popredia sa preto dostáva hľadanie nových účinných látok s potenciálnou antimikrobiálnou aktivitou, ktoré by mohli pomôcť prekonať tento problém a zlepšiť liečbu infekčných ochorení. Počet štúdií, ktoré sa zaoberajú antimikrobiál-

nymi vlastnosťami esenciálnych olejov alebo ich jednotlivých zložiek neustále stúpa a získané výsledky sú veľmi povzbudivé. Avšak zaoberajú sa hlavne aktivitami *in vitro*. Je nedostatok informácií o toxicite, systémovej farmakokinetike a farmakodynamike u ľudí a tak tieto prírodné zlúčeniny, kým dostanú svoje miesto vo farmakoterapii, čaká ešte dlhý proces testovania. Aj napriek tomu, že výsledky *in vitro* štúdií nemôžu byť prenesené na komplexný žijúci systém, indikujú silný antibiotický potenciál esenciálnych olejov a poukazujú aj na ich možné využitie pri dezinfekcii rôznych materiálov, povrchov a vnútorného prostredia.

## Literatúra

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. In: *Food and chemical toxicology*. 46(2), 2008, pp. 446-475.
- DE OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. In: *Food Control*. 21(4), 2010, pp. 549-553.
- FADLI, M.; SAAD, A.; SAYADI, S.; CHEVALIER, J.; MEZRIOUI, N. E.; PAGÈS, J. M.; HASSANI, L. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection—bacteria and their synergistic potential with antibiotics. In: *Phytomedicine*. 19(5), 2012, pp. 464-471.
- INOUE, S., ABE, S., YAMAGUCHI, H.; ASAKURA, M. Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. In: *International Journal of Aromatherapy*. 13(1), 2003, pp. 33-41.
- JUN, W.; KIM, M. S.; CHO, B. K.; MILLNER, P. D.; CHAO, K.; CHAN, D. E. Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. In: *Journal of food engineering*. 99(3), 2010, pp. 314-322.
- KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. In: *Current medicinal chemistry*. 10(10), 2003, pp. 813-829.
- NOWAK, A.; KALEMBA, D.; KRALA, L.; PIOTROWSKA, M.; CZYZOWSKA, A. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. In: *Food microbiology*. 32(1), 2012, pp. 212-216.
- PIDOT, S. J.; COYNE, S.; KLOSS, F.; HERTWECK, C. Antibiotics from neglected bacterial sources. In: *International Journal of Medical Microbiology*. 304(1), 2014, pp. 14-22.
- PUŠKÁROVÁ, A.; BUČKOVÁ, M.; KRAKOVÁ, L.; PANGALLO, D.; KOZICS, K. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. In: *Scientific Reports*. 7, 2017.
- TULLIO, V.; NOSTRO, A.; MANDRAS, N.; DUGO, P.; BANCHE, G.; CANNATELLI, M. A.; CARLONE, N. A. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. In: *Journal of applied microbiology*. 102(6), 2007, pp. 1544-1550.
- TYAGI, A. K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical character-

rization of *Cymbopogon citratus*. In: *BMC Complementary Alternative Medicine*. 10, 2010, pp.1-11.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. In: *Food Chemistry*. 126, 2011, pp. 228-235.

VALERIANO, C.; DE OLIVEIRA, T. L. C.; DE CARVALHO, S. M.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. In: *Food Control*. 25(2), 2012, pp. 673-677.

WARNKE, P. H.; BECKER, S. T.; PODSCHUN, R.; SIVANANTHAN, S.; SPRINGER, I. N.; RUSSO, P. A.; SHERRY, E. The battle against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. In: *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 37(7), 2009, pp. 392-397.

## 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



# RNA interferencia – „náhodný“ objav premysleného mechanizmu

Ingrid Sveráková<sup>1</sup>

Anton Horváth<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>[ingrid.sverakova@uniba.sk](mailto:ingrid.sverakova@uniba.sk)

<sup>2</sup>[anton.horvath@uniba.sk](mailto:anton.horvath@uniba.sk)

RNA interference – „random“ discovery of sophisticated mechanism

## Abstract

The discovery of RNA interference by Fire and Melo has opened up a new arena for research in molecular biology and this technique of gene silencing is looking for its application also in medicine where it possibly may treat various important diseases RNA interference is process of posttranscriptional regulation of genes cause by interfering RNAs. Interfering RNAs are 21-23 nucleotide RNA duplexes which derived from longer double stranded RNA. Dicer and RISC play important role in process of RNA interference.

## Key words

RNA interference, *Caenorhabditis elegans*, mRNA, gene expression

## Úvod

Termín „RNA interferencia“ (RNAi) označuje proces inhibície génovej expresie vyvolaný prítomnosťou dvojitú vláknovej RNA (dsRNA). V odbornej literatúre sa pojem RNA interferencia začal používať v roku 1998, keď skupina C. Mela publikovala v časopise Nature vplyv dvojitú vláknovej RNA na expresiu viacerých génov u hlístovca *Caenorhabditis elegans* a pozorovaný jav nazvali „gene silencing“, teda stíšovanie génov. Po vyjdení tejto publikácie sa spustila lavína s dôkazmi o prítomnosti RNAi aj v ostatných živých organizmoch od húb cez rastliny až po živočíšnu ríšu (Basyuk a kol., 2004).

## Obdobie pred objavom RNA interferencie

Indície o existencii regulácie génov na úrovni mRNA prichádzali už niekoľko rokov pred tým. Zdá sa, že prvými boli Romano a Macino v roku 1992. Títo vniesli do huby *Neurospora crassa* exogénnu sekvenciu, ktorá potlačila pôsobenie karotenogénnych génov a z huby sa dočasne stal albín bez pigmentov. V prípade *N. crassa* ešte nemôžeme hovoriť o objave RNAi, keďže vedci nevedeli opísať mechanizmus akým vyvolávajú požadovaný fenotyp. Tomuto momentu sa však pripisuje dôležitosť, pretože Romano a Macino napriek neznalosti vnútrobunkovej mašínérie RNAi, na základe získaných výsledkov prišli k správne mu záveru, že v ich modelo-

vom organizme dochádza k regulácii génovej expresie. A navyše, túto reguláciu vedeli sami indukovať pomocou exogénnej RNA (Romano a Macino; 1992). Autori nazvali tento fenomén „quelling“, teda zhášanie.

Začiatkom deväťdesiatych rokov bol aj v rastlinách opísaný fenomén posttranskripčného stíšenia expresie génu (tzv. PTGS – post transcriptional gene silencing). Cieľom bolo získať hlbší odtieň modrých kvetov petúnií. Zosilnená expresia génu pre enzým chalcón syntázu, ktorý sa zúčastňuje na produkcii modrého pigmentu, nevedla k zvýšeniu intenzity sfarbenia, ale kvety vyrastali biele alebo bielo sektorované. Aj jeho podstata, že ide o proces totožný s RNAi, bola vysvetlená až po objave RNAi v *C. elegans*.

V roku 1995 mali vedci Guo a Kemphues šťastnú ruku pri výbere modelového organizmu a pri dizajnovaní experimentu. Pomocou injektovania sense a antisense RNA do háďatka *C. elegans* sa im podarilo vyradiť gén par-1 zodpovedajúci za asymetrické delenie zárodočných buniek. Vedcom nebolo jasné, čo prítomnosť sense a antisense RNA v tele *C. elegans* spôsobuje, ale boli schopní dizajnovať experiment, pri ktorom cielene oslabili expresiu kinázy zodpovednej za tvorbu asymetrických dcérskych buniek. Že dosiahnutý efekt bol šťastná náhoda, ukázali o tri roky neskôr Fire a Melo, ktorí ukázali, že experiment postavený na injektovaní sense RNA do háďatka dosiahol požadovaný efekt symetrického delenia len v dôsledku kontaminácia sense vláknami s antisense, ktoré spolu hybridizovali za vzniku dsRNA.

## Mechanizmy pôsobenia RNA interferencie

Prítomnosť dsRNA v bunkách sa ukázala ako kľúčová. Až Fire a Melo so spolupracovníkmi dokázali, že špecifická exogénna dsRNA vnesená do organizmu interferuje s vybraným génom a oslabuje jeho prejav. Zároveň ukázali, že jednovoľknová RNA, či už sense alebo antisense, tento efekt vyvolá minimálne, prípadne vôbec. Fire s Melom pokračovali v štúdiu objaveného mechanizmu, prišli na to ako efektívne stíšiť génovú expresiu a

navrhli niekoľko možných mechanizmov ako sa to deje. Ako sa neskôr ukázalo, ani jeden z nich nebol správny, ale téza ktorú vyslovili správna bola: „RNA interferencia pravdepodobne existuje pre biologické potreby organizmu a umožňuje im fyziologický gene silencing“. V roku 2006 bola obom vedcom za tento objav udelená Nobelova cena za fyziológiu alebo medicínu.

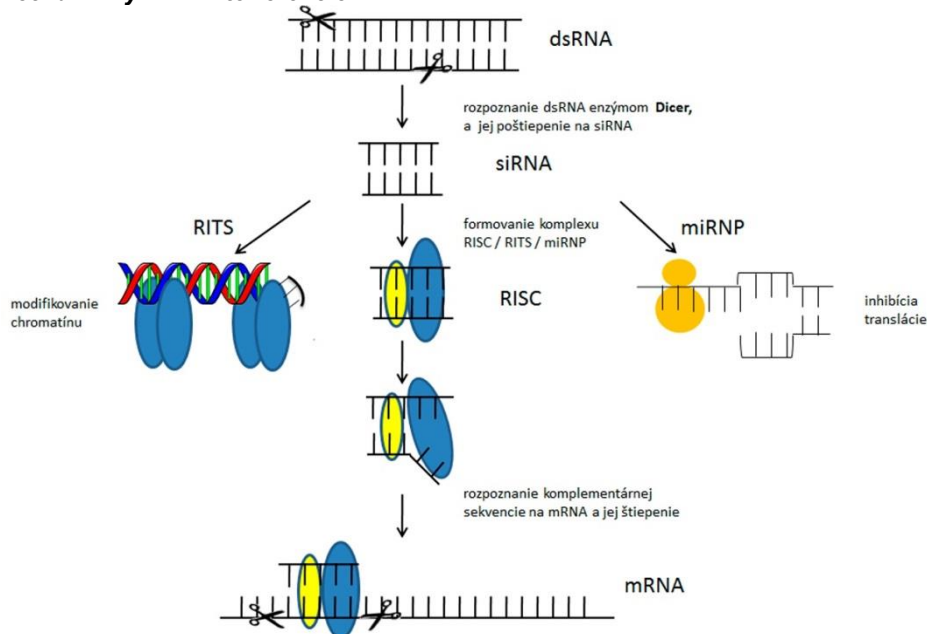
RNAi využíva široké spektrum organizmov na rôzne účely. Rastlinám aj živočíchom umožňuje RNAi supresiu mobilných transpozómov a bráni akumulácii repetitívnych DNA sekvencií, čím si udržiavajú integritu genómu. Zároveň im pomáha bojovať proti RNA vírusom. A v neposlednom rade, funguje ako mechanizmus regulácie expresie vlastného genómu. Regulácia sa odohráva v dvoch stupňoch: 1) na úrovni transkripcie, pomocou transkripčných faktorov a rôznych mechanizmov ako sú acetylácia histónov a metylácia DNA, 2) na úrovni translácie cez procesovanie mRNA, jej transláciu a interferenciu.

RNAi je stupňovitý proces, ktorý je aktivovaný prítomnosťou dsRNA v bunke. Pôvod dsRNA môže byť rôzny. Endogénne dsRNA syntetizujú bunky sami. Môžu byť buď kódované v genóme vo forme „fold-back“ RNA (Bartel, 2004) alebo pochádzajú z RNA vírusov, ktoré infikovali bunku a tá ich replikuje (Waterhouse a kol., 2001). Exogénne dsRNA sú syntetizované umelo v laboratóriu a do buniek sú vnesené injekciou alebo cez rastové médium. U jednobunkových organizmov vedci vyvinuli techniku, ktorá kombinuje oba predošlé spôsoby: pomocou molekulárno-biologických techník boli do buniek vnesené DNA plazmidy, ktoré po stimulácii externou nízkomolekulovou látkou dokážu v bunke syntetizovať dsRNA s požadovanou sekvenciou, a tak znížiť alebo vyradiť efekt vybraného génu (Ngo a kol., 1998). Znalosť „čítania“ genómu vedcom umožňuje syn-

tetizovať dsRNA komplementárne k ľubovoľnej proteínovej sekvencii, vyradovať tým aktivitu proteínu a podľa fenotypu odvodiť jeho možnú funkciu.

dsRNA môže vyvolať až tri rôzne druhy interferenčných RNA a každý typ RNA ďalej spúšťa iný mechanizmus RNAi (Meister a Tuschl, 2004). Genómom kódované dsRNA sú ešte v jadre procesované endonukleázou Drosha za vzniku interferenčných micro RNA (miRNA) a tie sú posúvané ďalej do cytoplazmy. V cytoplazme sa môžu nachádzať ďalšie dva druhy interferenčných RNA: „short-interfering“ RNA (siRNA) a „repeat-associated short interfering“ RNA (rasiRNA). Všetky tri druhy sú dvojvláknové a majú veľkosť okolo 20 bázových párov. V cytoplazme sú všetky rozpoznané ďalšou endonukleázou Dicer (Lee a kol., 2002). Rôzne organizmy kódujú rôzny počet génov pre Dicer. Predpokladá sa, že organizmy s viacerými mechanizmami RNAi kódujú aj viacero enzýmov Dicer, aby špecifický Dicer mohol rozpoznať správny typ interferenčnej RNA a aktivovať konkrétnu dráhu pre RNAi (Bernstein a kol., 2001). V ďalšom kroku interferenčnej kaskády sa začínajú jednotlivé mechanizmy diferencovať na tri rôzne mechanizmy. 1. na miRNA a siRNA sa viaže niekoľko proteínov s ktorými vytvárajú ribonukleoproteínový komplex RISC. Po sfomovaní RISC dôjde k rozpleteniu dvojvláknovej interferenčnej RNA, ktorá je jeho súčasťou. Takto pripravený RISC rozpozná v cytoplazme sekvenciu na mRNA komplementárnu k interferenčnej RNA a poštiepi ju (Hammond a kol., 2000). 2. miRNA vytvorí namiesto komplexu RISC komplex miRNP, ktorý sa naviaže na mRNA čím zablokuje proces translácie bez degradácie cieľovej mRNA (Bartel, 2004). 3. rasiRNA väzbou so špecifickými proteínmi vytvára komplex RITS, tento sa viaže na chromatín, moduluje jeho stav a tak ovplyvňuje expresiu génov (Meister a Tuschl, 2004) (Obr. 1).

Obr. 1: Rôzne mechanizmy RNA interferencie



## Využitie RNA interferencie

RNA interferencia sa pomerne rýchlo od jej objavenia prepracovala medzi základné metódy reverznej genetiky, ale má potenciál stať sa aj terapeutickým nástrojom pri liečbe rôznych ochorení. Veľkou výhodou molekúl siRNA je ich stabilita a schopnosť aspoň čiastočne prechádzať cez membrány. Telovými tekutinami sú ďalej transportované do rôznych tkanív. siRNA by mohli potenciálne zabrániť expresii génov nesúcich ochorenie, prípadne by vedeli zneškodniť RNA vírusy, ktoré spôsobujú vírusové ochorenia ako sú niektoré druhy rakoviny, HIV, vírusová hepatitída, hnačkové ochorenia spôsobené rota vírusmi (Arias a kol.; 2004). Vedci sa venujú príprave syntetických siRNA molekúl, ktoré by spĺňali atribúty pre liečivo. siRNA musí byť pri liečbe ochorenia vysoko efektívne, musí mať nízku cytotoxicitu a minimum vedľajších účinkov. Doterajšie experimenty ukázali, že siRNA dokážu u zvierat potlačiť rozmnožovanie určitých druhov vírusov a tým zefektívniť liečbu. Farmaceutické firmy už dokonca zašli tak ďaleko, že vyvinuli liečbu pre ľudí, ktorá sa ukázala ako úspešná, ale bohužiaľ finančne veľmi náročná, a preto sa v jej výskume ďalej nepokračuje. Ukazuje však perspektívnosť takejto terapie. Ďalšou prekážkou pre využitie RNAi na terapeutické účely môžu byť samotné RNA vírusy, proti ktorým by bola liečba cieleňá. Niektoré vírusy si vyvinuli mechanizmy ako sa proti RNAi brániť. U rastlinných vírusov bola pozorovaná produkcia proteínov, ktoré dokážu zoslabiť, niekedy až zastaviť, proces RNAi v hostiteľskej bunke. Nie je jasné, či aj v živočíšnych bunkách plní RNAi funkciu ochrany pred virálnymi infekciami ako u rastlín, ale minimálne v prípade rotavírusu sa špekuluje, že dokáže pomocou špecifického proteínu inhibovať RNAi (Ding a kol., 2004).

Nezanedbateľnou výhodou terapie cez siRNA je variabilita sekvencie, ktorá sa by sa dala syntetizovať. V súčasnosti sťažuje liečbu nespočetného množstva ochorení rezistencia na liečivo, ktorú patogén počas terapie získava. Dĺžka sekvencia siRNA (cca 20 nukleotidov), je oproti dĺžke zacieleného génu (dĺžka génu pre peptid je rôzna, ale v zásade ide o stovky až tisícky nukleotidov) natoľko krátka, že pre daný gén existuje viacero variant siRNA.

## Záver

RNA interferencia je už dnes veľmi účinným nástrojom molekulárnej biológie v základnom výskume mnohých organizmov. Intenzívne sa pracuje aj na jej využití v aplikovanom medicínskom výskume, kde má určité potenciál stať sa efektívnym nástrojom pri liečbe mnohých ochorení.

## Literatúra

- BASYUK, E., SUAVET, F., DOGLIO, A., BORDONNE, R., BERTRAND, E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res.* 31, (2003) pp. 6593-6597.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, (2004) pp. 281-297.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M., HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, (2001) pp. 363-366.
- DING, S. W., LI, H., LU, R., LI, F., LI, W. X. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res* 102(1), 2004 pp. 109-15.
- ARIAS, C. F., DECTOR, M. A., SEGOVIA, L., LÓPEZ, T., CAMACHO, M., ISA, P., ESPINOSA, R., LÓPEZ, S. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Research* 102, (2004) pp. 43-51.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E., MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669), (1996) pp. 806-11.
- GUO, S., KEMPHUES, K. J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 81(4), (1995) pp. 611-20.
- HAMMOND, S. M., BERNSTEIN, E., BEACH, D., HANNON, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, (2000) pp. 293-296.
- LEE, Y., JEON, K., LEE, J. T., KIM, S., KIM, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, (2002) pp.4663-4670.
- MEISTER, G., TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, (2004) pp. 343-349.
- NGO, H., TSCHUDI, C., GULL, K., ULLU, E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, (1998) pp. 14687-92.
- ROMANO, N., MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.* 22, (1992) pp. 3343-53.
- WATERHOUSE, P. M., WANG, M. B., LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, (2001) pp. 834-842.

## 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.



# Kontrola kvality proteínov v endoplazmatickom retikule

Peter Polčic

Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova č. 6, 842 15 Bratislava  
Slovensko  
peter.polcic@uniba.sk

## Protein quality control in the endoplasmic reticulum

### Abstract

The proper folding of proteins is a key prerequisite for their function. In eukaryotic cells, endoplasmic reticulum (ER) is an organelle, in which proteins that enter the secretion pathway are synthesized, posttranslationally modified and folded. As not all proteins fold to a proper conformation spontaneously and effectively, mechanisms of protein quality control that ensure that proteins fold correctly are required. In ER, these involve calnexin/calreticulin cycle and unfolded protein response (UPR) pathways.

### Key words

Endoplasmic reticulum, proteosynthesis, quality control, calnexin/calreticulin cycle, unfolded protein response

## Úvod

Endoplazmatické retikulum (ER) eukaryotických buniek je organela ktorá, hrá kľúčovú úlohu v syntéze bunkových proteínov. Tu sa začína sekrečná dráha, ktorá je zodpovedná za biosyntézu nielen proteínov určených na sekréciu, ale aj proteínov cytoplazmatickej membrány a proteínov mnohých bunkových organel, vrátane vakuol, lyzozómov, peroxizómov, Golgiho aparátu a ER samotného (pozri Polčic, 2013). Samotná proteosyntéza prebieha na ribozómoch naviazaných na cytoplazmatickom povrchu membrány drsného ER a syntetizované proteíny buď prechádzajú z ribozómu membránovým kanálom do lumenu ER alebo sú zabudované do membrány ER. Novonasyntetizované proteíny však spravidla ešte treba posttranslačne modifikovať, čo v ER zahŕňa predovšetkým odštiepenie signálnej sekvencie, tvorbu disulfidových väzieb a glykozyláciu (naviazanie sacharidov), a nakoniec zbalíť do výslednej natívnej konformácie (pozri napr. Alberts a kol. 2014).

## Výstupná kontrola

Zbaľovanie proteínov a proteínových komplexov je nevyhnutné pre ich správnu funkciu. Nesprávne zbalené proteíny opúšťajúce ER by mohli pre bunku predstavovať vážnu hrozbu, nakoľko by tieto nielen neboli funkčné, ale mohli by navyše interferovať so správnu funkciou iných bunkových proteínov. Preto v ER existuje mechanizmus, ktorý zabezpečí, že ER opúšťajú iba proteíny správne zbalené.

Zbaľovaniu proteínov v ER asistuje niekoľko proteínov. Medzi najdôležitejšie z nich patria šaperóny BiP, kalnexín a kalretikulín. Šaperóny sú proteíny, ktoré sa viažu na nezbalené alebo nekompletne zbalené proteíny a asistujú im pri zbaľovaní väčšinou tým, že zabráňujú nesprávnej agregácii hydrofóbných častí proteínov, ktoré sú v správne zbalených proteínoch obvykle ukryté vnútri a sú zvonka neprístupné. Interakcia šaperónu so zbaľovaným proteínom umožňuje proteínu postupne prechádzať konformačnými zmenami vedúcimi ku správne zbaleniu. Okrem proteínov asistujúcich pri zbaľovaní však ER obsahuje dômyselný systém výstupnej kontroly. Tento systém na monitorovanie priebehu zbaľovania proteínov využíva oligosacharidové zložky čerstvo nasyntetizovaných proteínov. Pri glykozylácii v ER je na dusík v postranných reťazcoch niektorých zvyškov asparagínu v syntetizovanom proteíne naviazaný oligosacharid, ktorý obsahuje dve jednotky N-acetylglukozamínu, deväť manóz a tri glukózy. Dve z glukóz sú vzápätí odstránené enzýmami glukozidázou I a II. Posledná glukóza oligosacharidu slúži pri výstupnej kontrole ako ukazovateľ toho, koľko času strávil proteín zbaľovaním v ER. Odštiepenie poslednej glukózy katalyzuje glukozidáza II. Absencia glukózy na oligosacharide teda koreluje s dlhším časom, ktorý mal proteín k dispozícii na zbaľovanie, a teda s pokročilejším zbalením. Nezbalené proteíny, obsahujúce v oligosacharide glukózu, sú viazané proteínmi kalnexínom a kalretikulínom, ktoré špecificky rozpoznávajú oligosacharidy obsahujúce jednu glukózu, čím sú zadržované v ER a postupne sa zbaľujú. Proteíny, ktoré v oligosacharide glukózu nemajú, nie sú kalnexínom a kalretikulínom zadržované a sú považované za zbalené. Takéto proteíny pokračujú sekrečnou dráhou na svoje miesto určenia.

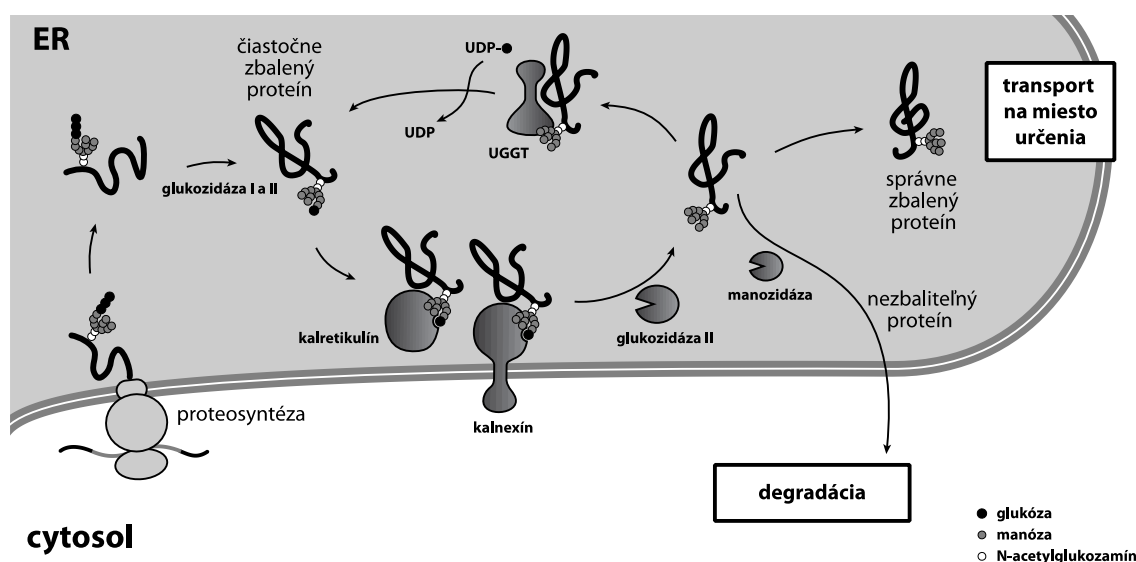
Mnohé proteíny sa však skôr ako je glukóza z ich oligosacharidu odštiepená správne zbalíť nestihnú. Takéto proteíny sú, spravidla na základe prítomnosti hydrofóbných častí na povrchu, rozpoznané enzýmom UDP-glukóza:glykoproteín glukozyltransferázou, ktorá glukózu na oligosacharid opäť pripojí prenosom z molekuly UDP-glukózy (tzv. aktivovanej glukózy). Takto označený proteín sa opäť stáva substrátom pre kalnexín a kalretikulín a je zadržaný v ER. Proteíny, ktoré sa zbaľujú

pomaly, môžu takýto cyklus, nazývaný kalnexínový/kalretikulínový cyklus, absolvovať niekoľkokrát (obr. 1). Väčšinu proteínov sa takýmto spôsobom podarí zbaliť a môžu byť z ER uvoľnené a pokračovať sekrečnou dráhou do svojho miesta určenia. Stane sa však, že niektorý proteín opakovane výstupnou kontrolou neprechádza a javí sa ako nezbaliteľný. Takýto proteín je opäť rozpoznávaný na základe toho, že trávi v ER svojim zbalovaním priveľa času. Kľúčovým enzýmom pri rozpoznávaní takýchto proteínov je pomalá manozidáza, ktorá špecificky odštiepi z oligosacharidu jednu manózu. Proteíny, s takto modifikovanými oligosacharidmi sú z ER

exportované do cytoplazmy membránovými transportnými systémami (retrotranslokónmi), ktoré zároveň obsahujú ubikvitín ligázu. Počas transportu sú teda ubikvitinované a v cytoplazme sú degradované proteazómom. U väčšiny proteínov sa toto deje zriedka, existujú však prípady ťažko zbaliteľných proteínov, pri ktorých je takýmto spôsobom degradovaných v extrémnych prípadoch až 90 % nasyntetizovaného proteínu (napríklad acetylcholinový receptor neurónov alebo T-bunkový receptor). Kvôli takýmto proteínom je systém výstupnej kontoly ER nielen ďalším z kontrolných mechanizmov ale nevyhnutnou súčasťou proteosyntetického aparátu.

Obr. 1: **Kalnexínový/kalretikulínový cyklus v endoplazmatickom retikule (ER).**

Kalnexín a kalretikulín viažu nekompletne zbalené proteíny, ktoré vo svojich oligosacharidových zložkách obsahujú jednu glukózu. Táto je z nich odštiepená glukozidázou II. Ak proteín stále nie je kompletne zbalený, enzým UDP-glukóza:glykoproteín glukozyltransferáza (UGGT) na oligosacharid prenese glukózu z UDP-glukózy, čím z proteínu opäť vytvorí substrát pre kalnexín a kalretikulín. V prípade, že proteín správne zbalený je, opúšťa ER a dostáva sa na svoje miesto určenia. Nezbaliteľné proteíny sú rozpoznané manozidázou a sú exportované do cytoplazmy na degradáciu.



## Krízový scenár

Čas od času sa prihodí, že vplyvom nepriaznivých okolností, napríklad prítomnosťou určitých chemických látok v prostredí, vzniká v ER stresová situácia, kedy sa proteíny vo zvýšenej miere zbalujú nesprávne a dochádza ku hromadeniu nezbalených proteínov. Toto sa deje napríklad pri zvýšenej teplote alebo v prítomnosti redukčného činidla, ktoré bráni tvorbe disulfidových väzieb v proteínoch. V takejto situácii je potrebné aby bunka zareagovala zvýšenou produkciou proteínov, ktoré správne zbalovaniu proteínov pomáhajú, predovšetkým vyššie zmienených šaperónov. Musí preto existovať spôsob, ako takúto situáciu v ER hlásiť do jadra a expresiu takýchto proteínov indukovať. Spôsobov je hneď niekoľko a spolu ich nazývame dráhami odpovede na nezbalené proteíny – UPR (angl. *unfolded protein response*). V živočíšnych bunkách boli opísané tri hlavné dráhy UPR (pozri napr. Brodsky a Skach, 2011).

Prvou z nich je dráha označovaná IRE1, podľa ústredného komponentu, ktorý sa jej zúčastňuje (skratka IRE nijakým spôsobom nerefereuje na jeho funkciu, pretože tento proteín bol pomenovaný skôr ako sa prišlo na to aká je jeho funkcia). Je to transmembránová proteínkináza-endoribonukleáza, ktorá sa nachádza v membráne ER. Časť proteínu, ktorá sa nachádza v lumene ER, slúži ako receptor, ktorý odpovedá na prítomnosť nezbalených proteínov. Časť, ktorá sa nachádza v cytoplazme obsahuje proteínkinázovú doménu a endoribonukleázovú doménu. Endoribonukleáza je za normálnych okolností neaktívna a pre svoju aktiváciu vyžaduje fosforyláciu špecifického aninokyselinového zvyšku. Na túto fosforyláciu slúži jej proteínkinázová doména. Táto je však na proteíne lokalizovaná tak, že sa ku zvyšku, ktorý má byť fosforylovaný, nedostane. Jediný spôsob ako tento príslušný zvyšok fosforylovať, je ak sa dva proteíny IRE1 priblížia k sebe a vzájomne sa svojimi proteínkinázovými doménami fosforylujú. Aktivovaná endoribonukleáza potom v cytosole poštiepi jednu kon-



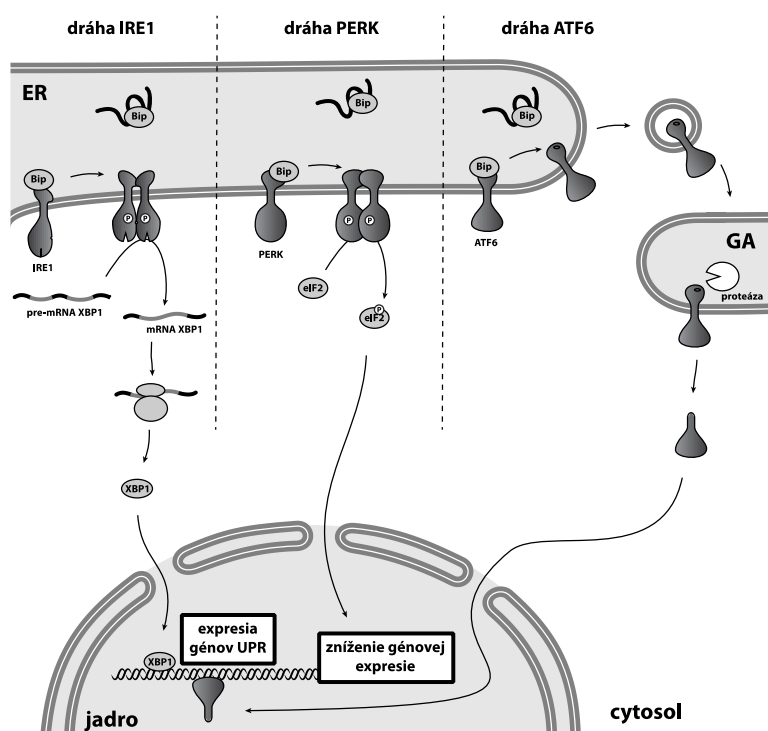
krétnu pre-mRNA tak, že z nej vyštiepi intrón, čím umožní jej transláciu. Transláciou tejto mRNA vznikne proteín, v živočíšnych bunkách označovaný XBP1 (X box viažuci proteín – *X box-binding protein*), ktorý cez jadrový pór vstupuje do jadra a slúži ako transkripčný faktor, ktorý aktivuje expresiu génov potrebných pre zbaľovanie proteínov v ER (šaperónov a iných). V neprítomnosti množstva nezbalených proteínov v lumene ER dimerizácii IRE1 bráni šaperón Bip, ktorý sa viaže na jeho receptorovú doménu v lumene ER a tým jej znemožňuje interagovať s druhou molekulou IRE1. Pretože Bip má vysokú afinitu k nezbaleným proteínom, v prípade ich nahromadenia, je z IRE1 vyviazaný nezbalenými proteínmi, tým umožní IRE1 dimerizovať a aktivovať signalizáciu.

Druhou dráhou je dráha, ktorej základným komponentom je transmembránová proteín kináza PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*). Opäť ide o proteín lokalizovaný v membráne ER, ktorého doména nachádzajúca sa v lumene ER slúži ako senzor a cytoplazmatická doména má proteínkinázovú aktivitu. V štandardnej situácii senzorová doména v lumene ER viaže šaperón BiP. V prípade stresu v ER je BiP vyviazaný nezbalenými proteínmi. Uvoľnené domény PERK spôsobia jeho dimerizáciu. V dimére dochádza, podobne ako pri IRE1, ku vzájomnej fosforylácii cytoplazmatických podjednotiek, ktoré potom fosforylujú podjednotky transkripčného faktora eIF2 (eIF2 $\alpha$  a eIF2 $\beta$ ). Aktivita transkripčného faktora eIF2 sa fosforyláciou jeho podjednotiek zníži, čo vedie v bunke k celkovému zníženiu transkripcie. Za takýchto podmienok sa syntetizuje menej proteínov a mašinéria ER zodpo-

vedná za správne zbaľovanie proteínov sa dostáva spod vysokého náporu, čo vo väčšine prípadov vedie k návratu k rovnováhe medzi proteosyntézou a kapacitou ER správne zbaľovať proteíny.

Trojicu dráh UPR uzatvára signalizácia pomocou proteínu ATF6 (*activating transcription factor 6*). Tento proteín je lokalizovaný v membráne ER a podobne ako IRE1 a PERK obsahuje doménu, orientovanú do lumenu ER, ktorá slúži ako senzor prítomnosti nezbalených proteínov. V tejto doméne je lokalizovaný aj signál pre transport tohto proteínu do Golgiho aparátu. Cytoplazmatickú doménu ATF6 tvorí transkripčný faktor (typu leucínového zipsu). Za normálnych podmienok je ATF6 zadržaný v endoplazmatickom retikule šaperónmi Bip a kalretikulínom, ktoré sa na ATF6 v lumene ER viažu, čím pokrývajú signál pre transport do Golgiho aparátu. V prípade hromadenia nezbalených proteínov sú však tieto šaperóny vyviazané nezbalenými proteínmi a ATF6 sa uvoľní. Transportný signál ho nasmeruje do transportných vezikúl smerujúcich do Golgiho aparátu. V ňom sa nachádzajú proteázy, ktoré ATF6 štiepia v oblasti transmembránovej domény, čím sa jeho cytoplazmatická doména oddelí od membrány Golgiho aparátu. Tým sa z nej stáva aktívny transkripčný faktor, ktorý prechádza do jadra a viaže sa do regulačných oblastí promótorov génov kódujúcich šaperóny a iné proteíny potrebné pre vysporiadanie sa s krízou v ER, a stimuluje ich expresiu. Ich zvýšená produkcia potom, podobne ako pri bunkovej odpovedi vyvolanej IRE1, zabezpečí zvýšenie kapacity ER pre správne zbaľovanie proteínov a návrat k homeostáze.

Obr. 2: **Tri dráhy odpovede na nezbalené proteíny**



IRE1, PERK a ATF predstavujú senzory v membráne ER. Za normálnych okolností sú na ich domény v lumene ER naviazané šaperóny Bip. V prípade hromadenia nezbalených proteínov je Bip vyviazaný nezbalenými proteínmi a dochádza k aktivácii príslušných troch dráh. Ich výsledkom je aktivácia expresie šaperónov a iných proteínov asistujúcich pri zbaľovaní proteínov v ER, a celkové zníženie expresie, vedúce ku zníženiu proteosyntézy. ER – endoplazmatické retikulum, GA – Golgiho aparát.

## Záver

Zbaľovanie proteínov do natívnej konformácie je základným predpokladom pre funkciu všetkých enzýmov a štruktúrnych proteínov. Pretože nie všetky proteíny sa správne zbaľujú spontánne a efektívne, bunky si v evolúcii vytvorili mechanizmy kontrolujúce zbaľovanie proteínov. Poruchy týchto mechanizmov spôsobujú alebo sprevádzajú viaceré závažné ochorenia (Marciniak a Ron, 2006). Napríklad mutácie v géne kódujúcom proteín kinázu PERK spôsobujú zriedkavé závažné dedičné ochorenie Wolcottov-Rallisonov syndróm (Søvik a kol., 2008), ktorý sa prejavuje mnohými vážnymi príznakmi (poruchy vývoja, mentálna retardácia, diabetes a iné) a pacienti sa spravidla nedožijú dospelosti. Hromadenie nezbalených proteínov v ER sprevádza aj mnohé neurodegeneratívne a autoimunitné ochorenia. Pochopenie detailov mechanizmov zúčastňujúcich sa na regulácii priebehu zbaľovania proteínov a dráh odpovede na nezbalené proteíny preto bude mať zásadný vplyv aj na ľudské zdravie.

## Literatúra

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., MORGAN, D., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., (2014). *Molecular Biology of the Cell*. Sixth Edition. Garland Science: New York and Abingdon, UK. 2014. ISBN: 9780815344322

BRODSKY, J. L., SKACH, W. R. (2011). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. In: *Current Opinion in Cell Biology* 23: 464-475.

MARCINIAK, S. J., RON, D. (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. In: *Physiological Reviews* 86: 1133-1149.

POLČIC, P. Triedenie proteínov v bunkách (*alebo ako dostať proteíny tam kam patria*). In: *Biológia, ekológia, chémia*. ročník 17, mimoriadne číslo, 2013, pp. 88-91.

SØVIK, O., NJØLSTAD, P.R., JELLUM, E., MOLVEN, A. (2008). Wolcott-Rallison syndrome with 3-hydroxydicarboxylic aciduria and lethal outcome. In: *J. Inherit. Metab. Dis.* 31: 293-297.

## 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.



# Benzotiazínón PBTZ169 – nová nádej pre liečbu tuberkulózy

Katarína Mikušová

Katedra biochémie  
Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava  
Slovensko  
katarina.mikusova@uniba.sk

## Benzothiazinone PBTZ169 – new hope for treatment of tuberculosis

### Abstract

Tuberculosis, a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is among the top 10 causes of death worldwide. While the infection is curable, the high number of incident cases and a spread of resistant tuberculosis are making the situation very serious. It is clear, that there is an urgent need to improve the therapy by introducing new medicines. The article presents the story of discovery and development of a novel drug – benzothiazinone PBTZ169, which has recently entered clinical phase and represents a hope for patients suffering of tuberculosis.

### Key words

Tuberculosis, drug development, benzothiazinones, DprE1, mechanism of action

## Úvod

Hoci väčšina ľudí spája slovo „tuberkulóza“ (TBC) skôr s minulosťou, aj v dnešnej dobe na toto ochorenie každých 18 sekúnd umiera jeden človek. V súčasnosti však táto choroba najviac útočí v najchudobnejších oblastiach sveta, a práve ľudia zo sociálne slabších vrstiev a s oslabeným imunitným systémom, ako napr. pacienti infikovaní vírusom HIV, sú najčastejšou obeťou TBC aj vo vyspelých krajinách ([http://www.who.int/tb/publications/factsheet\\_global.pdf?ua=1](http://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf?ua=1)). Ochorenie je spôsobené baktériou *Mycobacterium tuberculosis*, ktorá sa prenáša kvapôčkovou infekciou. Patogénne baktérie sa dostanú do ovzdušia, keď chorý človek rozpráva, kašle alebo kýcha, pričom niekedy stačí na spustenie infekcie vdýchnutie jediného bacila. Liečba odporúčaná Svetovou zdravotníckou organizáciou zahŕňa minimálne šesťmesačnú kúru s 2 – 4 druhmi liekov. Táto kombinovaná terapia je pre pacientov mimoriadne náročná a okrem problémov s každodenným prijímaním veľkého množstva tabliet, má často za následok nevoľnosť a ďalšie nepríjemné nežiaduce účinky. Situáciu komplikuje aj stúpajúci počet prípadov mnohonásobne rezistentnej TBC, kedy sa liečba predlžuje minimálne na dva roky, pričom sa nasadzujú lieky s ešte horšou znášanlivosťou. Napriek takejto náročnej liečbe ochorenie úspešne zvládne len asi 50 % pacientov s mnohonásobne rezistentnou TBC. Cieľom početných akademick-

kých pracovísk a niekoľkých (málo) farmaceutických firiem je zaviesť do liečebného režimu TBC nové účinné antituberkulotiká, ktoré by liečbu zefektívnili. Perspektívnym novým kandidátom je látka zo skupiny benzotiazínónov – PBTZ169, ktorá sa v súčasnosti nachádza v druhej fáze klinických skúšok (<https://www.newtdrugs.org/pipeline/clinical>). Prvé výsledky testov uskutočnených na zdravých, ako aj chorých dobrovoľníkoch naznačujú, že sa táto látka môže stať novou nádejou pre milióny ľudí chorých na TBC. Aká však bola cesta PBTZ169 z laboratória k pacientovi?

## Ako boli benzotiazínóny objavené?

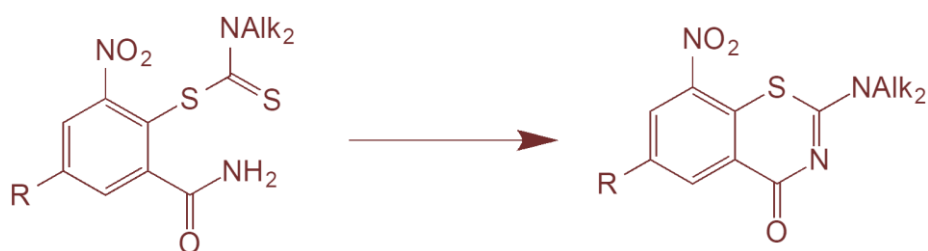
Príbeh benzotiazínónov sa spája s menom ruského chemika Vadima Makarova. Ten počas svojho doktorského štúdia na Moskovskej medicínskej akadémii koncom 80-tych rokov minulého storočia skúmal rôzne možnosti reakcií pyrimidínov – báz, ktoré sú súčasťou nukleových kyselín. Ako jedno z činidiel používal dimeylditiokarbamát a následne sa začal zaujímať o vlastnosti zlúčenín, ktoré nasyntetizoval pomocou tejto látky. Vadim obhájil doktorát v roku 1992. Ekonomická situácia v Rusku v tej dobe bola veľmi zlá. Vedecké inštitúcie šetrili tým, že sa počas letných mesiacov jednoducho zatvárali. Vadim však našiel možnosť ako využiť toto obdobie na prácu v zahraničí – nastúpil ako chemik v Inštitúte Hansa Knolla v Jene v Nemecku. Po stretnutí s mikrobiologičkou Ute Möllmannovou na tomto pracovisku prišlo k dohode o testovaní Vadimových látok na celom spektre patogénov, ktoré boli na inštitúte k dispozícii. Zlúčeniny odvodené od ditiokarbamátov vykazovali účinky proti rôznym baktériám a hubám. To však ani nebolo prekvapujúce – takéto látky sa používali aj ako pesticídy, kvôli svojim antifungálnym a insekticídnym vlastnostiam. K významnému posunu však došlo vtedy, keď sa medzi mnohými nosyntetizovanými derivátmi objavili látky, na ktoré boli extrémne citlivé práve mykobaktérie – pôvodcovia nielen TBC, ale aj ďalšieho vážneho ochorenia – lepry. Vďaka finančnému príspevku nemeckej firmy Medac GmbH počas rokov 2000 – 2003 mohol Vadim nasyntetizovať obrovské množstvo zlúčenín, ktoré sa hneď v Jene testovali. Podarilo sa nielen

zvýšiť účinnosť týchto látok, ale tiež dosiahnuť selektívitu voči mykobaktériám a pochopiť, ktoré skupiny v rámci štruktúry týchto látok sú za uvedené vlastnosti zodpovedné. Získali sa aj prvé úspešné výsledky na myšacom modeli, čo naznačovalo, že látky sú naozaj perspektívne.

Po skvelom začiatku však nastala kríza – napriek existencii vysoko účinných látok, Vadim nebol schopný nájsť partnera pre ich ďalší vývoj. Jedným z dôvodov odmietania spolupráce bola predpokladaná toxicita ditiokarbamátov pre ľudský organizmus, hoci predbežné toxikologické experimenty na myšiach skôr svedčili o opaku. Vadim si to vysvetľoval tým, že ditiokarbamáty sa zrejme v mykobaktériách alebo v myšiach premieňajú na aktívnu a selektívnu látku. Poháňaný touto myš-

lienkou sa v roku 2005 (opäť ako tradične, počas letných mesiacov v Jene) rozhodol možné metabolity dôkladne preštudovať. Spolu so svojou kolegyňou Olgou Ryabovou navrhli celý rad predpokladaných transformácií pôvodnej molekuly a tieto látky hľadali v extraktach pripravených z kultivačného média s nepatogénnymi mykobaktériami, na ktoré sa pôsobilo vybranými ditiokarbamátmi. Medzi izolovanými molekulami však dominovala nová látka, ktorá v zozname predpokladaných metabolitov chýbala! Onedlho sa podarilo túto molekulu charakterizovať. Vyšlo najavo, že ditiokarbamáty sa premenili na benzotiazinóny (Obr. 1), čím sa určila základná aktívna štruktúra, ktorá sa dala ďalej optimalizovať.

Obr. 1: Navrhnutá transformácia aryldialkylditiokarbamátov na benzotiazinóny (podľa Mikušová a kol., 2014)



Na jar v roku 2006 ďalší sled udalostí urýchlila Ute Möllmannová, ktorá už dlhšiu dobu spolupracovala s profesorom Stewartom Coleom z Pasteurovho inštitútu v Paríži. Tento rešpektovaný a svetovo uznávaný mykobakteriológ čoskoro zistil, že 3 deriváty benzotiazinónov, ktoré mu Ute poslala, sú skutočne výnimočné, takmer zázračné látky. Osobné stretnutie Vadima so Stewartom v júli 2006 na netradičnom mieste – stanici Montparnasse v Paríži vyústilo do výnimočnej spolupráce, ktorá trvá až dodnes. Jej základy sa však vytvárali v rámci práve sformovaného konzorcia 6. rámcového programu EÚ zameraného na vývoj liečiv proti tuberkulóze NM4TB (*New Medicines for Tuberculosis*, Nové lieky proti tuberkulóze) vedeného Stewartom Coleom. Súčasťou tohto konzorcia sa stalo aj naše Laboratórium biochémie mykobaktérií na Katedre biochémie PriF UK, a tak sme mali možnosť prispieť k skladaniu mozaiky, ktorá viedla k pochopeniu fungovania benzotiazinónov.

## Akým spôsobom bol identifikovaný cieľ benzotiazinónov?

Členovia konzorcia NM4TB sa po prvýkrát dopočuli o benzotiazinónoch na prvom stretnutí, ktoré sa uskutočnilo v máji 2006 v Bratislave a neskôr osobne od Vadima na nasledujúcom stretnutí v Budapešti, v novembri 2006. Napriek tomu, že výsledky, ktoré prezentoval, boli obdivuhodné, jeho prejav sa stretol aj s istou dávkou nedôvery od niektorých partnerov projektu. Nevedeli si predstaviť, že látka, ktorej štruktúru práve vidia,

môže byť viac ako 70-krát účinnejšia než najaktívnejšie antituberkulotikum izoniazid. Vadim na všetky, aj nepríjemné poznámky odpovedal so šarmom sebe vlastným. Na otázku o špecifickom substituent, ktorý mal za následok významné zvýšenie aktivity odzbrojujúco odvetil – že zrejme tu už nejde o vedu, ale o umenie...

Odhaliť molekulárny cieľ benzotiazinónov dostala za úlohu prof. Giovanna Riccardi so svojím tímom z univerzity v Pavii. Štandardný postup zahŕňa izoláciu kmeňov mykobaktérií, ktoré sú voči študovanej látke rezistentné. Nasleduje sekvenácia genómu rezistentného kmeňa a jeho porovnanie s pôvodným, kontrolným kmeňom. Takýmto spôsobom sa dá objaviť zámena aj jediného nukleotidu v špecifickom géne v rezistentnom kmeni, pričom môže ísť práve o gén kódujúci proteín, na ktorý pôsobí študovaná látka. Zámena nukleotidu spôsobí zmenu aminokyseliny v proteíne – to má za následok zmenu jeho vlastností, ktorá sa prejaví v rezistencii. V prípade, že funkcia tohto génu je známa – môže sa pristúpiť k ďalšiemu vývoju. Pilotné experimenty uskutočnené týmto spôsobom však nepriniesli jednoznačnú odpoveď, pretože sa zistilo, že je ovplyvnených hneď niekoľko rôznych génov. Medzi nimi sa však nachádzal gén *dprE1*, ktorého produkt je dôležitý pre výstavbu kľúčovej zložky mykobakteriálnej bunkovej steny. Jej zvláštna štruktúra prispieva k nezvyklej odolnosti tohto patogéna – poskytuje ochranu voči pôsobeniu bežných antibiotík, ale aj proti útokom imnitného systému hostiteľa. Mohol by teda práve proteín, kódovaný génom *dprE1*, byť cieľom benzotiazinónov?

V lete v roku 2007 sme odpoveď na túto otázku začali hľadať v našom laboratóriu... Ako sme však vedeli, ktorým smerom sa vydať? Relatívne jednoducho – v tej dobe totiž jediná informácia vo vedeckej literatúre, ktorá sa týkala enzýmu DprE1 pochádzala z publikácie vydannej v roku 2005, na ktorej sa významne podieľalo práve naše laboratórium. Mali sme teda „v rukách“ celé spektrum metodík, hoci rozhodne nie triviálnych, ktorými sme dokázali overiť fungovanie tohto enzýmu v mykobaktériách a teda aj jeho prípadnú inhibíciu. A skutočne sa našimi biochemickým metódami relatívne rýchlo podarilo potvrdiť DprE1 ako cieľ benzotiazinónov (Makarov a kol., 2009).

## Aký je mechanizmus pôsobenia benzotiazinónov?

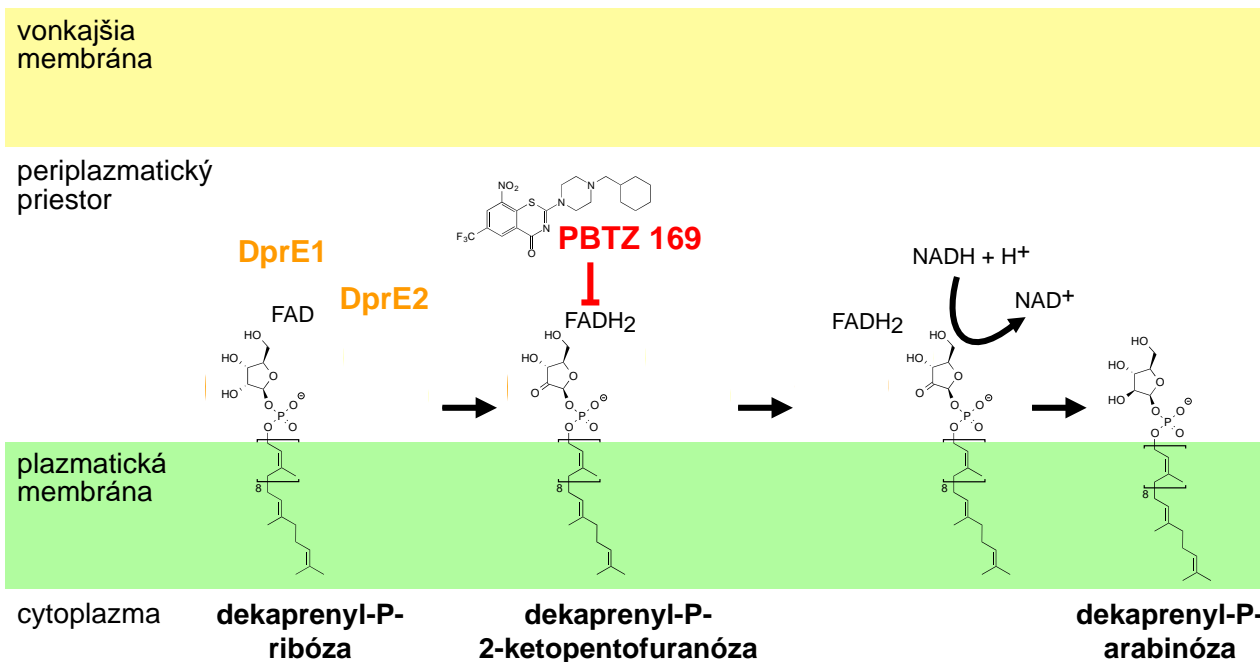
Pri identifikácii molekulárneho cieľa benzotiazinónov sme využili výsledky výskumu, na ktorom sa naše laboratórium podieľalo v rámci spolupráce so skupinou profesora Patricka Brennana z Kolorádskej štátnej univerzity vo Fort Collins, v USA. Článok, ktorý sme uverejnili v roku 2005, odhaľoval metabolickú cestu, ktorou vzniká špecifický cukor mykobakteriálneho bunkového obalu – arabinóza. Tento výskum bol poháňaný najmä našou zvedavosťou. Arabinóza je totiž v prírode veľmi zriedkavý cukor a nás zaujímalo, ako sa vlastne v mykobaktériách vytvára. Po dlhých rokoch snaženia sa nám podarilo ukázať, že arabinóza vzniká z iného cukru – ribózy, dovtedy nepoznanou, jedinečnou metabolickou dráhou,

na ktorej sa podieľa práve DprE1 (Obr. 2) (Mikušová a kol., 2005).

Benzotiazinóny zabíjajú mykobaktérie tak, že „nájdu“ komplementárne miesto na enzýme DprE1, jeho pôsobením sa modifikujú a následne sa naň pevne naviažu (Trefzer a kol., 2012). Takéto inhibitory sú veľmi účinné a nazývajú sa „samovražedné“, pretože ich aktivuje ich samotný cieľový enzým. Nefunkčný enzým má za následok závažné poškodenie mykobakteriálneho bunkového obalu, ktorý nedokáže plniť svoju ochrannú funkciu – bunky sa prestávajú deliť, deformujú sa, praskajú. Postupom času pribúdali ďalšie molekuly, ktoré zasahujú DprE1 (Mikušová a kol., 2014). Tieto látky boli identifikované spomedzi státisícov zlúčenín, u ktorých sa testovala schopnosť zastaviť rast patogénnych mykobaktérií. Ukázalo sa teda, že tento enzým je mimoriadne zraniteľným miestom tuberkulózneho bacila. Vysvetlenie tohto fenoménu priniesli výsledky nášho ďalšieho pátrania, ktoré poukázali na nečakanú lokalizáciu DprE1 na vonkajšom povrchu plazmatickej membrány mykobaktérie (Brecik a kol., 2015). Ľahká dostupnosť tohto enzýmu, jeho citlivosť, esencialita pre fyziológiu mykobaktérií, spolu s jeho neprítomnosťou u človeka viedli k označeniu DprE1 prívlastkom „zázračný cieľ“ (Manina a kol., 2010). Ten by však nebol ničím bez „zázračného“ inhibítora. Originálne benzotiazinóny boli ďalej modifikované tak, aby sa ešte zlepšili ich vlastnosti či zjednodušila ich syntéza. Pre ďalší vývoj bol zvolený derivát PBTZ169 (Obr. 2) (Makarov a kol., 2014).

Obr. 2: **Syntéza arabinózy v mykobaktériách a jej inhibícia benzotiazinónom PBTZ169**

Arabinóza vzniká premenou ribózy viazanej na lipidový nosič – dekaprenylfosfát pôsobením enzýmov DprE1 a DprE2. Prvý enzým katalyzuje oxidáciu ribózy v polohe 2, pričom akceptorom elektrónov je koenzým FAD. Následne sa produkt tejto reakcie redukuje elektrónmi z kofaktora NADH pôsobením enzýmu DprE2. Benzotiazinóny sa aktivujú redukciou prostredníctvom elektrónov z FADH<sub>2</sub> a kovalentne sa viažu do aktívneho miesta enzýmu DprE1.



## Záver

Spôsoby, akými sa hľadajú nové antituberkulotiká, sú rôzne. Donedávna sa verilo takzvanému racionálnemu prístupu, ktorý zahŕňal celý rad metodík – od skríningu miliónov zlúčenín v počítači, až po testovanie inhibície špecifických enzýmov v skúmavke. V súčasnosti sa uprednostňuje skôr „klasický“ spôsob – a to hľadanie inhibitorov bakteriálneho rastu medzi státisícmi látkami testovaných v bunkových kultúrach patogéna, alebo vhodného modelového organizmu.

Príbeh benzotiazinónov je však iný. Nepochybne v ňom hrá dôležitú úlohu náhoda a šťastie. Je to však predovšetkým príbeh zanieteného vedca – Vadima Makarova, ktorý sa nevzdával, neustále zdokonaľoval svoje látky, veril im a v snahe pochopiť ich extrémnu účinnosť objavil nové výnimočné molekuly s doposiaľ nevídanou aktivitou. Je tiež príbehom skvelej medzinárodnej spolupráce v konzorciách NM4TB a MM4TB (More Medicines for Tuberculosis) vedených Stewartom Coleom, ktorá umožnila rýchlo identifikovať cieľ týchto látok, pochopiť ich fungovanie a zabezpečiť ich ďalší vývoj.

Koncom apríla tohto roku potešila všetkých vedcov zainteresovaných na príbehu benzotiazinónov správa o tom, že Nadácia Billa a Melindy Gatesovcov podporila sumou 2,45 milióna dolárov spustenie klinickej fázy testovania PBTZ169 (<http://im4tb.org/news/>). Hoci pôjde ešte o dlhý a náročný proces, výsledky doterajších experimentov vlievajú nádej, že benzotiazinóny budú jedného dňa zachraňovať životy ľudí chorých na TBC.

## Literatúra

BRECIK, M.; CENTÁROVÁ, I.; MUKHERJEE, R.; KOLLY, G. S. a kol. DprE1 is a vulnerable tuberculosis drug target due to its cell wall localization. In: *ACS Chemical Biology*, 2015; 10: 1631-6.

MAKAROV, V.; LECHARTIER, B.; ZHANG, M.; NERES, J. a kol. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. In: *EMBO Molecular Medicine*, 2014; 6: 372-83.

MAKAROV, V.; MANINA, G.; MIKUŠOVÁ, K.; MOLLMANN, U. a kol. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. In: *Science*, 2009; 324: 801-4.

MANINA, G.; PASCA, M. R.; BURONI, S.; DE ROSSI, E.; RICCARDI, G. Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose 2'-epimerase from *Mycobacterium tuberculosis* is a magic drug target. In: *Current Medicinal Chemistry*, 2010; 17: 3099-108.

MIKUŠOVÁ, K.; HUANG, H.; YAGI, T.; HOLSTERS, M. a kol. Decaprenylphosphoryl arabinofuranose, the donor of the D-arabinofuranosyl residues of mycobacterial arabinan, is formed via a two-step epimerization of decaprenylphosphoryl ribose. In: *Journal of Bacteriology*, 2005; 187: 8020-5.

MIKUŠOVÁ, K.; MAKAROV, V.; NERES, J. DprE1 – from the discovery to the promising tuberculosis drug target. In: *Current Pharmaceutical Design*, 2014; 20: 4379-403.

TREFZER, C.; ŠKOVIEROVÁ, H.; BURONI, S.; BOBOVSKÁ, A. a kol. Benzothiazinones are suicide inhibitors of mycobacterial decaprenylphosphoryl-beta-D-ribofuranose 2'-oxidase DprE1. In: *Journal of the American Chemical Society*, 2012; 134: 912-5.

## PodĎakovanie

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





ISSN 1338-1024