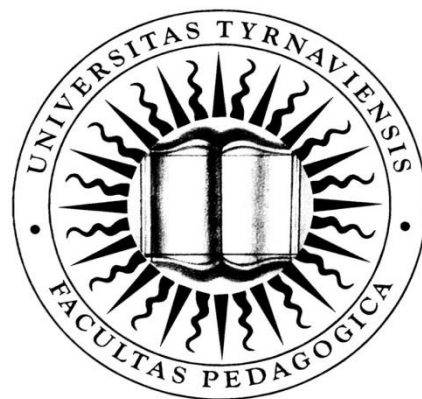


biológia ekológia chémia



mimoriadne číslo

časopis pre školy
ročník 17
2013

biológia ekológia chémia

mimoriadne číslo

<http://bech.truni.sk/>
ISSN 1338-1024
ročník 17
2013



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



Agentúra

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

editorial

Mimoriadne číslo časopisu *Biológia Chémia a Ekológia* sa vydáva z príležitosti ukončenia projektu „**Rozvoj Centra excelentnosti na využitie informačných biomakromolekúl na zlepšenie kvality života**“ (ITMS 26240120027) **spolufinancovaného Európskou úniou**. Predložený projekt vychádzal z analýzy priorít a potrieb vedeckého výskumu vo svete, Európskej únie a z potenciálu, ktorý UK predstavuje prostredníctvom excelentných jedincov a kolektívov v oblasti vied o živej prírode s cieľom zabezpečiť rozvoj a uplatnenie genomiky, proteomiky, bunkového inžinierstva a bioinformatiky v medicíne a biotechnológiách.

Pre rozvoj moderného biomedicínskeho výskumu v rámci Slovenskej republiky je nevyhnutné splnenie minimálne troch predpokladov: **(i) investovať finančné prostriedky do vybavenia slovenských laboratórií modernou prístrojovou technikou, (ii) získať príslušné know-how najmä úzkou spoluprácou s poprednými zahraničnými pracoviskami a (iii) pripraviť a stabilizovať kvalifikovaných výskumných pracovníkov najmä z novej generácie študentov a absolventov našich univerzít.** Jedným z možných riešení je **integrácia existujúcich špičkových výskumných tímov do spoločných vedecko-edukačných centier na báze komplementárnej expertízy.**

V súhlase s uvedenou predstavou, bolo ambíciou projektu „**Rozvoj Centra excelentnosti na využitie informačných biomakromolekúl na zlepšenie kvality života**“, (ITMS 26240120027) **rozvíjať položené základy špičkového centra zameraného na biomedicínsky výskum a vzdelávanie v tejto oblasti na pôde Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského a partnerských pracovísk z UK a Slovenskej akadémie vied.**

Poslaním „**Centra excelentnosti na využitie informačných biomakromolekúl na zlepšenie kvality života**“ bolo zabezpečiť výskum a vzdelávanie v oblasti biomedicíny a biotechnológie pre potreby Slovenskej republiky, a súčasne sa stať významnou súčasťou Európskeho výskumného priestoru. Pre naplnenie tohto zámeru bol potrebný synergický efekt koordinovaného prepojenia prírodovedného a biomedicínskeho výskumu. Ťažisko riešenia v rámci tohto projektu bolo založené na výskumných kapacitách a infraštruktúre **Prírodovedeckej fakulty UK, Lekárskej fakulty UK, Fakulty matematiky, fyziky a informatiky UK a Farmaceutickej fakulty UK.** Prepojenie špičkového experimentálneho výskumu s pracoviskami SAV – **Virologickým ústavom SAV a Ústavom molekulárnej biológie SAV** ako aj modernými manažérskymi prístupmi bolo nevyhnutným predpokladom pre úspešnú realizáciu biomedicínskeho výskumu v oblasti ochrany zdravia.

Snahou autorov článkov bolo priblížiť niektoré nové poznatky z oblasti biomedicínskeho výskumu čitateľom z radov študentov i pedagógov všetkých typov škôl.

Gabriela Gavurníková, Marta Kollárová

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. Zlatica Orsághová, CSc.
doc. Ing. Ján Reguli, CSc.
doc. RNDr. Ľudmila Slováková, CSc.
doc. RNDr. Katarína Ušáková, PhD.
doc. RNDr. Jarmila Kmeťová, PhD.
RNDr. Ivan Varga, PhD.
RNDr. Jozef Tatiersky, PhD.
PhDr. Jana Višňovská

recenzenti mimoriadneho čísla

prof. RNDr. Marta Kollárová, DrSc.
RNDr. Gabriela Gavurníková, CSc.
Mgr. Juraj Laco, PhD.

editori mimoriadneho čísla

doc. Ing. Ján Reguli, CSc.
PaedDr. Mária Orolínová, PhD.

návrh obálky

PaedDr. Mária Orolínová, PhD.



obsah mimoriadneho čísla

3

Rastliny môžu pomôcť antibiotikám v liečbe infekcií

Mária Mikulášová
Romana Chovanová

6

Úspechy a perspektívy vo vývoji antituberkulotík

Katarína Mikušová
Marta Kollárová

9

Bakteriofágy a ich využitie v terapii a potravinárstve

Michal Kajsík
Hana Drahovská

12

Nové aspekty v transformácii mikrorias

Eva Dobáková
Gabriela Gavurníková
Juraj Krajčovič

18

Riasy ako producenti biopalív

Aneta Šidíková
Lucia Hadariová
Juraj Krajčovič

23

Ukradnuté chloroplasty – plastidy mimo rastlinnej ríše a ich biotechnologický potenciál

Simona Trubačová
Mária Macejová
Juraj Krajčovič

29

Vplyv absencie anionických fosfolipidov na fyziológiu kvasinky *Kluyveromyces lactis*

Annamária Bardelčíková
Margita Obernauerová

32

Tioredoxínový systém aktinomycét – terapeutický terč

Michaela Koháryová
Marta Kollárová

35

Konfokálna mikroskopia alebo ako vidieť stromy cez les

Katarína Višacká
Katarína Gaplovská-Kyselá

38

Možnosti využitia prístroja Varioskan Flash v bunkovej a molekulárnej biológii

Andrej Dudáš
Zuzana Firdová
Marcela Bieliková

41

Autofluorescencia telových tekutín pre možný skríning nádorových ochorení

Milan Zvarík
Libuša Šikurová

44

Faktory ovplyvňujúce atraktivitu medzi pohlaviami

Nina Košťová
Roman Gardlík

- 46**
Kľúčový problém biologickej evolúcie:
Prechod od RNA sveta k DNA svetu
Marta Kollárová
Michaela Koháryová
- 49**
Nekódujúca DNA – zbytočnosť alebo nevyhnutnosť?
Zuzana Šándorová
Erik Birčák
Matej Vesteg
Juraj Krajčovič
- 53**
Klinické štúdie s využitím kmeňových buniek
Kristína Stahlová
Marek Máťuš
Jana Mlynárová
Peter Musil
Ján Kyselovič
Ondrej Sprušanský
- 56**
Terapeutické využitie kmeňových buniek
Lucia Menšíková
Peter Musil
Ondrej Sprušanský
Ján Kyselovič
Marek Máťuš
- 60**
***Trypanosoma brucei* – zlý patogén alebo dobrý model pre štúdium fascinujúcich rôznorodostí života?**
Anton Horváth
- 63**
Preeklampsia a fetálna DNA
Helena Fábryová
Peter Celec
- 65**
Phage display
Eva Lengyelová
Peter Celec
- 67**
Periodontitída
Katarína Janšáková
Peter Celec
- 69**
Poruchy ADP/ATP prenášača a ich patologické dôsledky
Juraj Laco
Eva Dobáková
Gabriela Gavurníková
- 75**
Karbonická anhydráza IX – hypoxiou kontrolovaný regulátor bunkovej migrácie
Eliška Švastová
Silvia Pastoreková
- 79**
Mitochondrie – multifunkčné organely
Igor Zeman
- 85**
Epikardiálne tukové tkanivo
Jana Mlynárová
Marek Máťuš
Peter Musil
Ondrej Sprušanský
Ján Kyselovič
- 88**
Triedenie proteínov v bunkách (alebo ako dostať proteíny tam kam patria)
Peter Polčic
- 91**
Malátdehydrogenázy – dôležité enzýmy metabolismu
Michaela Koháryová
Darina Mikulášová
Marta Kollárová
- 95**
Biologické membrány vo vzťahu k citlivosti eukaryotických buniek voči liečivám
Eduard Goffa
Yvetta Gbelská
- 97**
Biotechnologický potenciál mliečnych kvasiniek *Kluyveromyces lactis*
Zuzana Balážfyová
Yvetta Gbelská
- 100**
Kvasinky ako modelový organizmus pre štúdium starnutia
Eva Drozdíková
Margita Obernauerová
- 102**
Perspektívy v terapii fungálnych infekcií
Nora Tóth Hervay
Yvetta Gbelská
- 106**
***Escherichia coli* ako hostiteľský organizmus pre produkciu proteínov s využitím vo farmaceutickom priemysle**
Michaela Osadská
Hana Halászová
- 108**
Využitie systému na vysokoparalelné sekvenovanie DNA pri diagnostike vybraných dedičných ochorení
Martina Némethová
Silvia Bokorová
- 112**
Kvasinky a oxidačný stres
Hana Čuláková
Yvetta Gbelská

Rastliny môžu pomôcť antibiotikám v liečbe infekcií

Mária Mikulášová, Romana Chovanová

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká
fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava pracoviska
mikulasovam@fns.uniba.sk

Úvod

Po objave penicilínu a ďalších antibiotík, a ich zavedení do praxe, si ľudia mysleli, že vyhrali boj s infekčnými ochoreniami. Zvýšené používanie antibiotík však viedlo k nežiaducemu vývoju rezistencie, v dôsledku čoho ochorenia a ich pôvodcovia o ktorých sa predpokladalo, že sú vyhubené antibiotikami, sa vracajú v novej podobe, a odolné voči antibiotikám. Epidémie spôsobené takýmto, voči liekom rezistentnými baktériami, sú teraz obrovským problémom. Globálny výskyt multirezistentných kmeňov limituje účinnosť súčasných liečiv a signifikantne zvyšuje zlyhanie liečby. V súčasnosti väčšina baktérií, ktoré prispievajú ku vzniku infekčných chorôb sú rezistentné voči štandardnej antibiotickej terapii, napr. meticilín rezistentné stafylokoky a pneumokoky, ktoré sú rezistentné voči β -laktámovým a makrolidovým antibiotikám, vankomycín rezistentné enterokoky ako aj multirezistentné Gram-negatívne baktérie (Norrby a kol., 2005).

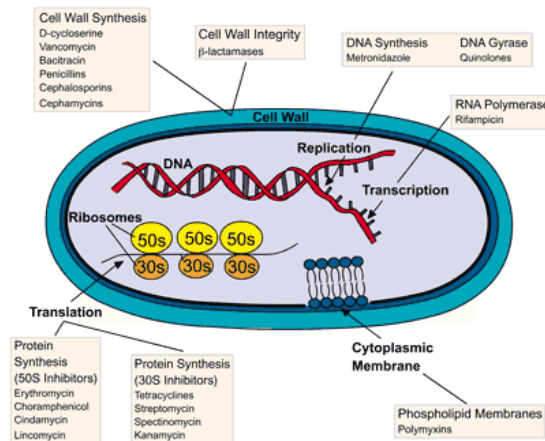
Nepomer medzi pomalým vývojom nových liekov a rýchlym šírením rezistentných kmeňov vyžaduje nové alternatívne metódy, ktoré by obnovili a zvýšili účinnosť používaných antibiotík. Z tohto hľadiska sú zaujímavé niektoré sekundárne metabolity rastlín, označované ako rezistenciu modifikujúce alebo modulujúce látky, ktoré zosilňujú aktivitu v súčasnosti používaných antibiotík voči rezistentným patogénom.

Mechanizmy pôsobenia antibiotík

Pre pochopenie procesu, akým sa baktérie stávajú rezistentnými voči antimikrobiálnym agensom, je najskôr potrebné poznať mechanizmus účinku týchto látok. Väčšina predávaných antimikrobiálnych látok pôsobí na tri dokázané cieľové procesy – biosyntézu bunkovej steny, syntézu bakteriálnych proteínov a replikáciu bakteriálnej DNA (obr. 1). Antibiotikum musí preniknúť v dostatočnej koncentrácii bakteriálnou bunkovou stenou a dostať sa k svojmu cieľovému miestu.

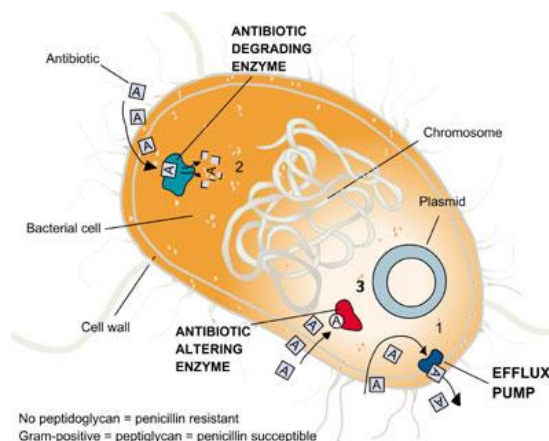
Mechanizmy rezistencie voči antibiotikám

Rezistencia voči antimikrobiálnym látkam je výsledok troch hlavných stratégií (obr. 2).



Obr. 1. Mechanizmy pôsobenia antibiotík

http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/activities/bacterial_drug_resistance/index.html



Obr. 2. Mechanizmy rezistencie baktérií voči antibiotikám

Prvý mechanizmus spočíva v chemickej modifikácii cieľového miesta antibiotika v bunke, ktorá vedie k zníženiu väzby antibiotika k jeho väzbovému miestu. β -laktámové antibiotiká sa viažu na penicilín viažuce proteíny (PBP), a tým blokujú syntézu bunkovej steny. V druhoch *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae* môže byť rezistencia proti β -laktámovým antibiotikám výsledkom produkcie alternatívneho proteínu PBP2a, ktorý má zníženú afinitu k β -laktamázam. Rezistencia proti makrolidom, linkozamidom a streptogramínu v patogénnych druhoch *Streptococcus* je spôsobená konformačnými zmenami v ribozónoch, čo vedie k zníženiu afinity týchto antibiotík k ich väzbovému miestu v 50S ribozomálnej podjednotke.

Produkcia hydrolytických enzýmov a skupiny transferáz je stratégia uplatňovaná množstvom patogénov pri obrane voči pôsobeniu antibiotík. Gény, ktoré kódujú enzýmy degradujúce antibiotiká sú často nesené v plazmidoch a ďalších genetických mobilných elementoch. Rezistencia proti β -laktámovým antibiotikám je umožnená produkciou β -laktamáz, ktoré hydrolyzujú amidovú väzbu v tetra- β -laktámovom kruhu týchto antibiotík. Rezistencia proti aminoglykozidom v Gram-negatívnych baktériách je najčastejšie sprostredkovaná rôznymi enzýmami, ktoré modifikujú molekulu antibiotika acetyláciou, adenyláciou alebo fosforyláciou.

Väčšina efluxných púmp v baktériách sú proteíny, ktoré môžu rozpoznať a vypumpovať širokú škálu chemicky a štrukturálne nepříbuzných zlúčenín z baktérií energicky závislým spôsobom, bez zmeny alebo degradácie antimikrobiálnej látky. To vedie k zníženiu vnútrobunkovej koncentrácie antibiotík, takže baktéria môže prežiť aj za podmienok zvýšenej koncentrácie antimikrobiálnych látok. Mnoholiekové efluxné pumpy sa nachádzajú v Gram-pozitívnych aj Gram-negatívnych baktériách, sú kódované chromozomálnymi alebo plazmidovými génmi. Aj keď sú takéto proteíny konštitutívne prítomné v baktériách, trvalá prítomnosť substrátu indukuje nadexpresiu (Teran a kol., 2003), čo zodpovedá za získanú rezistenciu.

Použitie rezistenciu modifikujúcich agensov v kombinácii s antibiotikami

S rozširovaním rezistencie voči starým antibiotikám súvisí potreba neustále vyvíjať nové účinné látky. Keď sa baktérie stávajú rezistentné voči antibiotikám prvej línie, liečba sa posúva k antibiotikám druhej a tretej línie, ktoré sú často drahé. V mnohých chudobnejších krajinách vysoká cena týchto nových antibiotík rezultuje v tom, že v oblastiach, kde je rozšírená rezistencia voči liekom prvej línie, niektoré choroby nie sú viac liečené. Za posledné desaťročia sa tempo vývoja nových antimikrobiálnych látok výrazne spomalilo, zatiaľ čo prevalencia ochorení sa naopak rozrástla veľkou rýchlosťou. Údaje o rýchlom šírení rezistencie aj voči novo zavedeným antibiotikám napovedajú, že aj tieto budú mať tiež krátku životnosť (Coates a kol., 2002). Antibiotiká, ktoré fungujú dnes, nemusia fungovať zajtra.

Alternatívnym riešením na prekonanie rezistencie voči antibiotikám je použitie rastlinných extraktov. Rastliny produkujú široké spektrum sekundárnych metabolitov, z ktorých mnohé majú terapeutický význam. Liečivá získané z prírodných zdrojov hrajú významnú úlohu v prevencii a v liečbe ľudských chorôb. Na rozdiel od syntetických liečiv nie sú antimikrobiálne látky rastlinného pôvodu spojené s nežiaducimi vedľajšími účinkami, sú lepšie tolerované pacientmi, sú akceptované vďaka

dlhej histórii používania, sú menej nákladné, sú obnoviteľné v prírode a majú veľký terapeutický potenciál na liečbu mnohých infekčných chorôb (Chanda a kol., 2010, Habbal a kol., 2011). Vyššie rastliny predstavujú tiež potenciálne zdroje nových prototypov antibiotík (Parekh a Chanda, 2007).

Niektoré sekundárne metabolity rastlín aj keď nemajú antimikrobiálnu aktivitu, sú účinné v senzibilizácii bakteriálnych buniek k iným antimikrobiálnym agensom (Tegos a kol., 2002). Predpokladá sa, že chránia rastliny pred infekciou tým, že účinkujú synergicky s inými antimikrobiálnymi látkami. Také látky môžu byť potenciálne použité na zvýšenie účinnosti antibiotík. Viacerí autori potvrdili, že rastlinné extrakty môžu potencovať aktivitu antibiotík voči rezistentným bakteriálnym patogénom (Shibata a kol., 2005; Marque a kol., 2005). Takéto látky sa označujú aj ako rezistenciu modifikujúce alebo modulujúce látky.

Synergizmus je definovaný ako pozitívna interakcia, ktorá vznikne kombináciou dvoch zložiek, ktoré spoločne preukazujú inhibičný účinok na cieľové organizmy. Výsledný účinok tejto interakcie je niekoľkonásobne väčší ako súčet ich jednotlivých efektov. Antagonistický účinok nastane, keď výsledný účinok je nižší ako je účinok aktívnejšej látky v kombinácii a indferentný v tom prípade, keď je výsledný účinok väčší ako je účinok aktívnejšej látky v kombinácii.

Niektoré súčasné terapeutické postupy sú založené na koncepte kombinovanej terapie, na základe poznatkov, že kombinácia antibiotík, alebo antibiotika s chemickou látkou môže mať synergický, potencujúci účinok. Napríklad kombinácia trimetoprímu a sulfametoxazolu (kotrimeazol) zahŕňa vzájomnú interferenciu dvoch nasledujúcich krokov v syntetickej dráhe bakteriálnych folátov. Sulfametoxazol kompetitívne inhibuje syntézu enzýmu začleneného v prvom kroku reakcie vedúcej k syntéze folovej kyseliny a trimetoprim inhibuje enzým dihydrofolát-reduktázu, zahrnutú v ďalšom kroku syntézy kyseliny folovej. Kombinácia antibiotika amoxycilínu s kyselinou klavulanovou, ktorá je inhibitor β -laktamáz, enzýmov vedúcich k rezistencii voči penicilínu a ďalším β -laktámovým antibiotikám, umožnila produkciu lieku Augmentín, ktorý sa používa v klinickej praxi od konca sedemdesiatych rokov.

Rastlinné extrakty alebo ich izolované zložky môžu zvyšovať *in vitro* aktivitu určitých antibiotík voči patogénym baktériám. Použitie agensov, ktoré nezabíjajú baktérie, ale modifikujú ich tak, aby produkovali fenotyp, ktorý je citlivý na antibiotiká, môže byť alternatívny prístup na liečbu infekčných ochorení. Pôsobenie takýchto látok vedie k citlivosti na predtým neúčinné antibiotikum, a pretože modifikujúci agent vyvoláva malý alebo nepriamy selekčný tlak, tento koncept môže spomaliť alebo zabrániť výskyt rezistentných genotypov (Taylor a kol., 2002).

Synergický antimikrobiálny účinok antibiotika kombinovaného s rastlinným extraktom vyžaduje interakciu extraktu s mechanizmom rezistencie. Začínajú sa objasňovať detaily o molekulárnej báze synergických interakcií medzi niektorými látkami odvodenými z rastlín a rôznymi triedami antibiotík. Schopnosť nových terapeutík inhibovať laktamázové alebo esterázové enzýmy môže rezultovať v synergizme s β -laktamázami. Epigallocatechín galát (EGCg) z čaju inhibuje aktivitu penicilinázy a tak obnovuje aktivitu penicilínu voči *S.aureus* (Zhao a kol., 2001) a potencuje účinok ampicilínu a sulbaktámu voči metilicilín rezistentným *S.aureus* (Hu a kol., 2001). Dve antimikrobiálne látky v kombinácii môžu ovplyvňovať rovnaký cieľ v bunke. EGCg podávaný s β -laktamovými antibiotikami môže inhibovať syntézu peptidoglykánu v bunkovej stene. Fujita a kol., (2005) demonštroval, že flavón baicalein prejavuje výrazný synergizmus s beta β -laktamovými antibiotikami voči metilicilín rezistentným *S.aureus* inhibíciou aktivity PBP2 alebo ovplyvnením štruktúry peptidoglykánu. Iným mechanizmom synergického účinku je zvýšenie vnútrobunkovej koncentrácie antibiotika, čo môže byť umožnené blokováním bakteriálnych efluxných púmp, ktoré vylučujú antibiotiká z bunky. Indolový alkaloid rezerpín, modulator efluxných púmp zvyšuje aktivitu tetracyklínu voči MRSA (Gibbons a Udo, 2000). Určité rastlinné zložky účinkujú ako bakteriálne inhibítory efluxných púmp a sú schopné obnoviť antibakteriálny účinok neúčinných antibiotík (Stavri a kol., 2007).

Záver

Popri vyhľadávaní a štúdiu rastlinných extraktov s antimikrobiálnym účinkom nadobúda dôležitosť štúdium rastlinných, rezistenciu modifikujúce látok, ktoré môžu zlepšiť účinnosť antibiotík a umožnia využitie starých a relatívne lacnejších antibiotík, ktoré boli označené ako neefektívne kvôli rezistencii.

Abstract

The problem of bacterial resistance to commonly used antibiotics has necessitated the search for newer and alternative compounds for the treatment of drug resistant infections. Crude extracts of medicinal plants stand out as veritable sources of potential resistance modifying agents. The promising results of basic research indicate that in future, combined therapy may be applied in human and veterinary medicine, agriculture and the food industry to combat bacterial pathogens.

Literatúra

COATES, A.; HU, Y. M.; BAX, R.; PAGE, C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. In: *Nature Reviews Drug Discovery*.1, 2002, pp. 895-910.

FUJITA, M.; SHIOTA, S.; KUROMA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline and baicalein and β -lactam against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Microbiol. Immunol.* 49, 2005, pp. 391-396.

GIBBONS, S.; UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug pumps, on the *in vitro* activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(k) determinant. In: *Phytother. Res.* 14, 2000, pp. 139-140.

HABBAL, O.; HASSON, S. S.; EL-HAG, A. H.; AL-MAHROOQI, Z.; AL-HASHMI, N.; AL-BIMANI, Z.; AL-BALUSHI, M. S.; AL-JABRI, A. A. Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* linn (Henna) against *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.1, 2011, pp.173-176.

HU, Z. Q.; ZHAO, W. H.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/ sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 2001, pp. 361-364.

CHANDA, S.; DUDHATRA, S.; KANERIA, M. Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruit of nutraceutical plants belonging to the family Fabaceae. In: *Food and Function*. 1, 2010, pp. 308-315.

MARQUE, Z. B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. J.; GENET, J. P.; SANTOS, A. F. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. In: *Phytochemistry*. 66, 2005, pp. 1804-1811.

NORRBY, R. S.; NORD, C. E.; FINCH, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. In: *Lancet Inf. Dis.* 5, 2, 2005, pp. 115-119.

PAREKH, J.; CHANDA, S. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. In: *African Journal of Biomedical Research*.10, 2007, pp.175-181.

SHIBATA, H.; KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUT, T. Alkyl gallates, intensifiers of β -lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2, 2005, pp. 549-555.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. In: *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 2007, pp.1247-1260.

TAYLOR, P. W.; STAPLETON, P. D.; LUZIO, J. P. New ways to treat bacterial infections. In: *Drug Discov. Today*. 7, 21, 2002, pp. 1086-1091.

TEGOS, G.; STERMITZ, F. R.; LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 10, 2002, pp. 3133-3141.

TERAN, W.; FELIPE, A.; SEGURA, A.; ROJAS, A.; RAMOS, J.L.; GALLEGOS, M. T. Antibiotic- dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the Drug Binding Repressor TtgR. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 10, 2003, pp. 3067-3072.

ZHAO, W. H.; HU, Z. Q.; OKUBO, S.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Mechanism of synergy between Epigallocatechin gallate and β -Lactams against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 6, 2001, pp. 1737-1742.

Úspechy a perspektívy vo vývoji antituberkulotík

Katarína Mikušová, Marta Kollárová

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave

mikusova@fns.uniba.sk
kollarm@fns.uniba.sk

Úvod

Posledný deň minulého roku priniesol nielen oslavy nadchádzajúceho nového roka, ale aj zverejnenie schválenia nového lieku proti tuberkulóze (TBC), známeho pod názvom *bedaquilín*. V našich končinách toto ochorenie nie je príliš rozšírené; podľa tlačovej informácie Svetovej zdravotníckej organizácie (*World Health Organization*, WHO) uverejnenej pri príležitosti Svetového dňa tuberkulózy (24. marec), s počtom 6,4 chorých na 100 000 obyvateľov Slovensko nastupuje do tzv. eliminačnej fázy. Z globálneho hľadiska však predstavuje TBC aj v súčasnosti závažný medicínsky problém. Podľa najnovšej štatistiky v roku 2012 pribudlo 8,7 milióna pacientov chorých na TBC, pričom každý deň tomuto ochoreniu podľahlo vyše 3 800 ľudí. Vážnou komplikáciou je výskyt mnohonásobne rezistentných foriem TBC, ktoré významne obmedzujú možnosti terapeutického zásahu. Americká agentúra *Food and Drug Administration* (FDA) uznala nové liečivo v zrýchlenom procese, práve ako súčasť liečby mnohonásobne rezistentnej pľúcnej TBC, v prípade, že zlyhávajú ostatné možnosti terapie. Význam tejto udalosti podčiarkuje aj fakt, že nové antituberkulotikum prichádza na trh po vyše štyridsiatich rokoch. Dlhý čas „čakania“ na nový liek proti TBC bol spôsobený jednak negatívnym prístupom k samotnej potrebe vývoja antibiotík vo väčšine farmaceutických firiem v posledných desaťročiach, ale aj náročnosťou tohto procesu, ktorý má svoje vlastné špecifiká a v neposlednom rade aj zvláštnymi vlastnosťami patogéna, ktorý ochorenie spôsobuje – baktérie *Mycobacterium tuberculosis*.

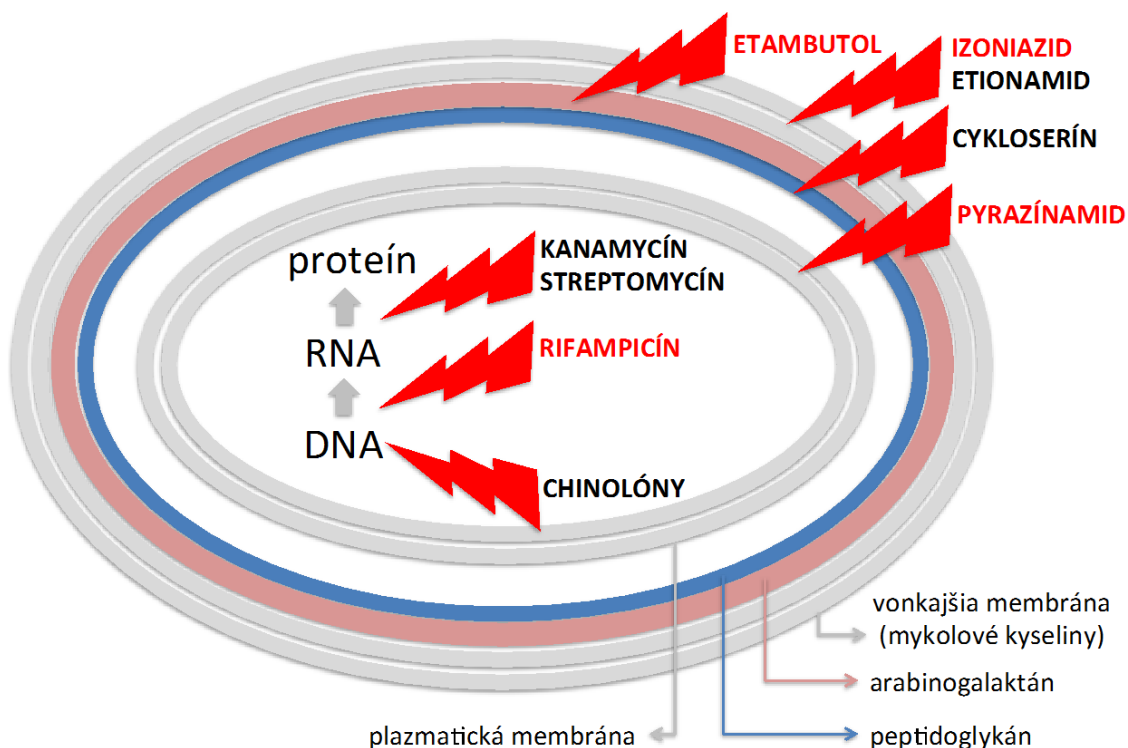
Mycobacterium tuberculosis – odolný patogén

Predpokladá sa, že až jedna tretina svetovej populácie je infikovaná baktériou *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Patogén je zvláštny tým, že sa po vdýchnutí dokáže na dlhé roky usídlieť v pľúcach hostiteľa. Ochorenie TBC prepukne len asi u 5 % nakazených ľudí, a to častokrát až v prípade zhoršenia zdravotného stavu v súvislosti s vekom alebo znížením imunity. AIDS predstavuje významný rizikový faktor pre rozvoj TBC; tieto dve ochorenia sa vzájomne podporujú a TBC je najčastejšou príčinou smrti pacientov infikovaných vírusom HIV. Šírenie choroby však podporujú aj zlé sociál-

ne pomery a chudoba, a preto TBC je veľkou záťažou najmä v najzaostalejších krajinách sveta.

Pre patogén *M. tuberculosis* je charakteristické, že naň nepôsobí väčšina bežných antibiotík, pričom liečba aj tými špecifickými liekmi je mimoriadne zdĺhavá. V počiatočnej intenzívnej fáze sa spravidla podávajú štyri antituberkulotiká tzv. prvej línie – izoniazid, rifampicín, pyrazinamid a etambutol počas dvoch mesiacov. Nasleduje udržiavacia fáza, ktorá zahŕňa užívanie izoniazidu a rifampicínu počas nasledujúcich štyroch mesiacov. Tento postup vylieči okolo 85 % pacientov. Pri ochorení spôsobenom mnohonásobne rezistentnými kmeňmi *M. tuberculosis* sa liečba predlžuje až na 2 roky, pričom sa podávajú (často injekčne) antituberkulotiká tzv. druhej línie, ktoré sú toxickéjšie a menej účinné. Úspešnosť liečby v tomto prípade dosahuje 50 – 70 %. V roku 2006 boli v provincii KwaZulu Natal v Južnej Afrike zaznamenané aj extrémne rezistentné formy TBC, ktoré nereagujú ani na lieky druhej línie. Počas vtedajšej epidémie ochoreniu podľahlo všetkých 54 nakazených pacientov v priemere do 16 dní od stanovenia diagnózy. Dodnes boli prípady extrémne rezistentných foriem TBC hlásené už v 84 krajinách sveta, vrátane susednej Českej republiky.

Mnohé vlastnosti tuberkulózneho bacila z hľadiska jeho patogenicity a mimoriadnej odolnosti sa pripisujú zvláštnej štruktúre bunkovej steny (obr. 1), ktorá sa líši od ostatných bakteriálnych patogénov. Jej kostru vytvára kovalentne viazaný komplex peptidoglykán, heteropolysacharidu arabinogalaktánu a mastných kyselín s veľmi dlhým reťazcom, nazývaných mykolové kyseliny. Mykolové kyseliny sa v hojnom počte viažu na koncové arabinózy arabinogalaktánu a vo vzájomne paralelnom usporiadaní, kolmom na plazmatickú membránu vytvárajú spolu s ďalšími (tzv. extrahovateľnými) lipidmi na povrchu baktérie relatívne nepriepustnú hydrofóbnu vrstvu – tzv. vonkajšiu membránu, ktorá patogén chráni pred účinkami bežných antibiotík. O kľúčovej úlohe bunkovej steny pre fyziológiu mykobaktérií svedčí aj fakt, že je cieľom pôsobenia najúčinnějších antituberkulotík. Isoniazid zasahuje výstavbu mykolových kyselín a etambutol inhibuje syntézu arabinánovej zložky bunkovej steny. Uvedené liečivá sú špecifické práve pre TBC, pretože ciele ich pôsobenia sa v ostatných patogénnych baktériách nenachádzajú.



Obr. 1. Schematický náčrt štruktúry mykobaktérie a miesta pôsobenia antituberkulotík prvej línie (označené červenou farbou) a druhej línie (označené čiernou farbou)

Odpovede na jednotlivé otázky sme zozbierali a vyhodnocovali graficky s využitím histogramov. Z výsledkov a porovnania odpovedí môžeme usudzovať aké budú reakcie žiakov na školách pri aplikácii DT do vyučovania. Výsledky nie sú aplikovateľné pre celú spoločnosť, pretože vzorka respondentov nie je veľká. Výskum skôr poukazuje všeobecne na postoje žiakov k problematike a prináša zaujímavé výsledky pri zisťovaní postavenia predmetu chémie v rade obľúbených predmetov u žiakov.

Vývoj liekov proti tuberkulóze – história a súčasnosť

Vývoj antibiotík zažíval svoju „zlatú éru“ v období 40-tych až 60-tych rokov 20. storočia. V tomto období boli objavené aj dodnes používané antituberkulotiká. Neskôr sa však záujem farmaceutických firiem obrátil na „civilizačné ochorenia“, ako sú rakovina, diabetes, kardiovaskulárne ochorenia a podobne. V tej dobe sa zdalo, že škála antibiotík je dostatočne pestrá a infekčné ochorenia prestávajú byť problémom vďaka očkovaniu, zlepšeniu hygienických pomerov a celkovej životnej úrovne, aj keď treba zdôrazniť, že táto situácia sa týkala jedine rozvinutých krajín. Nárast ochorení spôsobených rezistentnými a netradičnými patogénmi, úmrtia v nemocniciach po jednoduchých operačných zásahoch v dôsledku bakteriálnych infekcií počas nasledujúcich rokov

však poukázali na novú a neustálu potrebu vývoja nových liekov proti infekčným ochoreniam. Výskumnú aktivitu v prípade TBC podnietilo aj vyhlásenie ochorenia za globálnu hrozbu Svetovou zdravotníckou organizáciou v roku 1993.

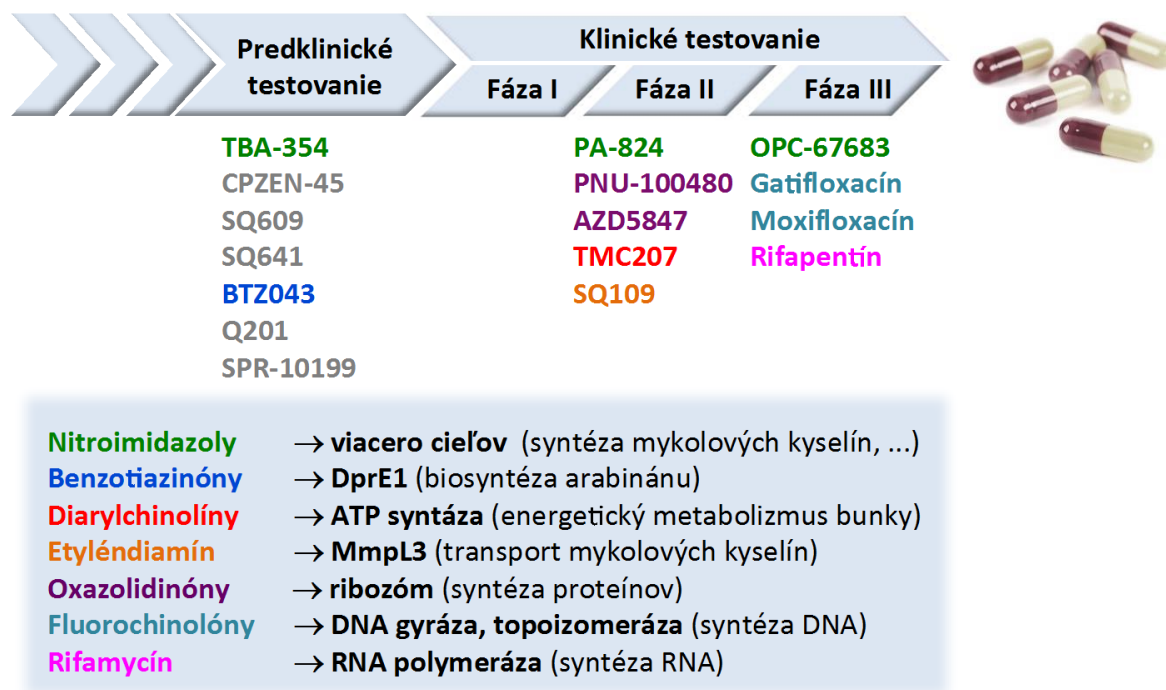
Bez výnimky všetky v súčasnosti využívané antibiotiká, vrátane antituberkulotík, boli objavené na základe empirického a náhodného procesu – pomocou testovania schopnosti prírodných alebo syntetických látok, pochádzajúcich z rôznych zdrojov, inhibovať rast vybraných patogénnych baktérií. Tento spôsob hľadania účinných látok bol koncom deväťdesiatych rokov 20. storočia nahradený takzvaným „genomickým prístupom“ vďaka množstvu informácií, ktoré sa dali získať z genómov sekvenovaných mikroorganizmov, vrátane pôvodcov závažných ochorení. Prvou baktériou s kompletne určenou sekvenciou DNA sa stala *Haemophilus influenzae* v roku 1995, no už rok 1998 prináša informácie aj o genóme *M. tuberculosis*. Do nového prístupu sa vkladali veľké nádeje; predpokladalo sa, že ak sa podarí identifikovať gény, ktoré sú pre patogén nepostrádateľné, bude stačiť nájsť inhibítory produktu (spravidla enzýmu), ktorý kódujú a nové liečivo bude na svete. Ukázalo sa však, že to také jednoduché nie je. Ilustráciou veľkého sklamaní, ktoré genomický prístup priniesol, je súhrn poznatkov firmy GlaxoSmithKline, ktorá počas rokov 1995 až 2001 vybrala na testovanie 350 génov z *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae*. U 127 z nich vedci zistili

esencialitu aspoň v jednom z týchto mikroorganizmov. Z nich sa podarilo vyprodukovať proteíny, ktoré sú potrebné na ďalšie testovanie v 67 prípadoch. Tieto sa podrobili vysokoúčinnému skríningu na hľadanie inhibítorov, pričom sa overovalo pôsobenie 260 000 – 530 000 rôznych molekúl. Len jediná molekula z týchto všetkých experimentov sa vybrala ako vhodná na ďalší vývoj.

Genomický prístup nepriniesol úspech ani v oblasti vývoja antituberkulotík. Ukázalo sa, že esencialita génu nezaručuje, že jeho produkt bude slúžiť ako vhodný cieľ pre antibiotikum. Pre mnohé cieľové enzýmy sa totiž nepodarilo identifikovať inhibítory, ktoré budú mať vlastnosti vhodné na vývoj liečiva. Ďalším problémom sa ukázala nemožnosť vyvinúť z dobrého inhibítora enzýmu látku, ktorá prenikne cez bunkovú stenu a plazmatickú membránu mykobaktérií a zastaví ich delenie. A tak sa postupne ukázalo, že oveľa účinnejší spôsob pre získanie nových antibiotík je predsa len „staromódny“, tzv. fenotypový skrínig na celých bunkách, podobný tomu, čo sa využíval v „zlatej ére antibiotík“, aj keď v modernejších podobách. Všetky nové látky, ktoré sú momentálne vo vývoji na liečbu TBC, boli identifikované práve takýmto spôsobom. Samozrejme i tento prístup má svoje riziká. Spektrum účinných látok závisí vo veľkej miere od kultivačných podmienok, a preto je ich nutné zvoliť tak, aby čo najviac napodobňovali situáciu počas infekcie in vivo. Často sa stáva, že sa odhalia molekuly s nešpecifickými účinkami (napr. detergenty) alebo cytotoxické látky. Pre ďalší vývoj antibiotika je teda potrebné zistiť aj presný mechanizmus jeho pôso-

benia. Jedným z najčastejších spôsobov v súčasnosti je izolácia rezistentných mutantov a identifikácia génov, ktoré sú za vznik rezistencie zodpovedné pomocou celogenómového sekvenovania.

Príkladmi úspešnej aplikácie tohto postupu je objavenie diarylchinolínu TMC 207 (to je už v úvode spomínaný bedaquilín), ktorý pôsobí na úrovni syntézy ATP a ovplyvňuje tak energetický metabolizmus mykobaktérie a benzotiazinónu BTZ043, ktorého cieľom je arabinánová zložka mykobakteriálnej bunkovej steny. Cesta od identifikácie účinnej látky k liečivu, ktoré pomôže pacientovi, však býva dlhá a neraz, žiaľ, končí slepou uličkou. Prvým krokom je úspešné absolvovanie predklinickej fázy vývoja, ktorá zahŕňa najmä testovanie látky na zvieracích modeloch z hľadiska jej účinkov, ale aj bezpečnosti, toxicity, dávkovania a podobne. V tejto fáze sa v súčasnosti nachádza aj látka BTZ 043, ktorej mechanizmus pôsobenia sa študoval aj na Katedre biochémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Samotné klinické testovanie v prvej fáze skúma bezpečnosť, tolerovateľnosť a farmakokinetické vlastnosti experimentálnej látky na relatívne malej skupine 20 – 100 zdravých dobrovoľníkov. V druhej fáze sa sleduje bezpečnosť, účinnosť a dávkovanie látky na skupine 20 – 300 pacientov. Tretia fáza prebieha na viacerých miestach a zameriava sa na porovnanie účinkov látky so štandardnou liečbou na veľkej skupine 300 – 3000 pacientov. Kritériá sú veľmi prísne, a aj z toho dôvodu sa do poslednej fázy klinických skúšok dostane len asi 10 % molekúl z druhej fázy.



Obr. 2. Prehľad molekúl vo vývoji na liečbu TBC
(Upravené podľa <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>, 8.4.2013)

Záver

Po dlhom období stagnácie sa v oblasti vývoja liečiv proti TBC konečne zaznamenáva zvýšené úsilie. Hoci je dnes v štádiu klinických skúšok aspoň desať zlúčenín a ďalšie molekuly sú vo fáze predklinického vývoja, je zrejmé, že tento počet ešte stále nie je dostatočný. Predpokladá sa, že moderné technológie, ktoré sú teraz k dispozícii, budú naďalej prinášať nové látky. Treba si však uvedomiť, že pre získanie nového antituberkulotika nestačí len pokračovať v testovaní látok na celých bunkách a ich optimalizácii pomocou zvieracích modelov. Je potrebné dôkladne porozumieť základným fyziologickým procesom *M. tuberculosis*, ako aj mechanizmom bunkovej smrti a prežívania tohto patogéna v prostredí, ktoré im hostiteľ poskytuje, aby bolo možné kvalifikovane posúdiť vhodnosť novo-objaveného cieľa pre vývoj liečiva. Takýto základný výskum prebieha spravidla na akademických inštitúciách, ktoré však nemajú možnosti na finančne aj technicky náročné vysokoúčinné skríniny. Tie sa realizujú spravidla v rámci farmaceutických firiem, ktoré majú prístup k tzv. „knižniciam“ so státisícami až miliónmi chemických zlúčenín, ale aj k výkonným najmodernejším robotom, ktoré zvládnu uskutočnenie a spracovanie obrovského množstva meraní. Vhodné sklbenie náročných požiadaviek na vývoj antituberkulotík je vytváranie konzorcií zložených z akademických a komerčných partnerov (napr. projekty podporené 7. Rámcovým programom Európskej únie – MM4TB, ORCHID). Ostáva dúfať, že vytrvalosť a úsilie vedcov zapojených do tohto výskumu budú odmenené ďalšími úspechmi, ktoré prinesú pomoc miliónom ľudí chorých na TBC.

Abstract

Tuberculosis still remains one of the leading causes of deaths from single infectious agent worldwide. There is a clear need

for the development of new drugs against this disease, which would shorten the therapy and serve to combat the most complicated, multidrug and extensively drug-resistant forms of tuberculosis. In the article recent successes, but also strategies and challenges of the development of the novel antitubercotics are discussed.

Literatúra

- BARRY, C. E. 3RD; BLANCHARD, J. S. The chemical biology of new drugs in the development for tuberculosis. In: *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010; 14: 456-66.
- BROTZ-OESTERHELT, H.; SASS, P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. In: *Future Microbiology*, 2010; 5: 1553-79.
- KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. In: *Nature*, 2011; 469: 483-90.
- MAKAROV, V.; MANINA, G.; MIKUŠOVÁ, K.; MOLLMANN, U. a kol. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. In: *Science*, 2009; 324: 801-4.
- PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; POMPLIANO, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. In: *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007; 6: 29-40.
- SALA, C.; HARTKOORN, R. C. Tuberculosis drugs: new candidates and how to find more. In: *Future Microbiology*, 2011; 6: 617-33.
- VILLEMAGNE, B.; CRAUSTE, C.; FLIPO, M.; BAULARD, A.R.; DEPREZ, B.; WILLAND, N. Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance. In: *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012; 51: 1-16.
- <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm333695.htm> 6.4.2013
- http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html 6.4.2013
- http://www.unric.org/en/images/stories/2013/PDF/TBM_newsletter_March_2013.pdf 7.4.2013
- <http://www.tbfacts.org/global-tb.html> 7.4.2013
- <http://ec.europa.eu/research/index.cfm?pg=newsalert&lg=en&year=2011&na=na-240311> (New EU-Funded Projects To Combat Tuberculosis – Press Release – Research And Innovation – European Commission) 7.4.2013

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Bakteriofágy a ich využitie v terapii a potravinárstve

Michal Kajsík, Hana Drahovská
Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave
kajsik@fns.uniba.sk
drahovska@fns.uniba.sk

Úvod

Bakteriálne patogény spôsobujú aj v súčasnosti mnohé ochorenia a veľké ekonomické škody v potravinárskom priemysle. Veľkým problémom sa v súčasnosti stáva rezistencia baktérií na antibiotiká, pretože narastá počet kmeňov, ktoré sú rezistentné na takmer všetky dostupné liečivá. Jedným z možných riešení problému je vyu-

žitie bakteriofágov, čiže vírusov infikujúcich baktérie. Bakteriofágy (skrátene fágy) sú všadeprítomné, ich výskyt je závislý na prítomnosti vhodného hostiteľa. Počet bakteriofágov v prostredí až desaťnásobne prevyšuje počet baktérií a celkové množstvo bakteriofágov v biosfére sa odhaduje na 10^{32} (Brüssow a Kutter, 2005). Až 96 % bakteriofágov patrí do skupiny chvostíkatých fágov (fágov s duálnou symetriou), ktoré majú typickú

štruktúru zloženú z ikozaedrálny hlavicej obsahujúcej DNA a z chvostíka. V súčasnej dobe nastala renesancia výskumu bakteriofágov; predovšetkým boli získané genómové sekvencie mnohých bakteriofágov, čo umožňuje lepšie pochopenie fágovej evolúcie, interakcie s hostiteľom, ekológie fágov a ich hostiteľov. So zvyšujúcim sa množstvom informácií o bakteriofágoch zároveň stúpajú nové možnosti ich využitia v diagnostike patogénnych baktérií, pri ochrane potravín pred kontamináciou a vo fágovej terapii. Zároveň je možné pre niektoré aplikácie pripraviť rekombinanté fágy s vylepšenými vlastnosťami.

Fágová terapia

Využitie bakteriofágov na liečbu bakteriálnych infekcií bolo zavedené krátko po ich objave, ktorý uskutočnili nezávisle Frederick Twort v roku 1915 a Félix D'Hérelle o dva roky neskôr (Carlton, 1999). V tej dobe boli k dispozícii iba obmedzené poznatky o fágovej biológii, a preto boli v terapii okrem pozitívnych výsledkov pozorované aj mnohé neúspechy. Po objave antibiotík bol v druhej polovici dvadsiateho storočia výskum fágovej terapie zastavený. V súčasnosti sú závažným klinickým problémom kmene rezistentné na antibiotiká. Napríklad kmene *Staphylococcus aureus* rezistentné na metilín/oxacilín (MRSA), enterokoky rezistentné na vankomycín a Gram negatívne patogény s ESBL β -laktamázami sú odolné voči takmer všetkým používaným skupinám antibiotík. Využitie bakteriofágov ako aj antibakteriálnych fágových produktov sa ukazuje ako jedna z možných náhrad antibiotikovej terapie (Maura a Debarbieux, 2011).

Bakteriofágy ako terapeutiká majú oproti antibiotikám viaceré výhody. Je to predovšetkým univerzálnosť a špecifita bakteriofágov. Každá baktéria môže byť infikovaná aspoň jedným fágom a zároveň fágy infikujú iba citlivé kmene patriace do jedného druhu, a preto na rozdiel od širokospektrálnych antibiotík nezabíjajú baktérie bežnej mikrobioty. Taktiež je výhodou, že fágy sa v procese terapie množia a po úspešnej liečbe sú vyradené z prostredia. Teoreticky tak na liečbu postačuje jedna aplikácia prípravku. Fágy nie sú toxické pre ľudí ani zvieratá a majú len málo vedľajších účinkov. Fágy je možné ľahko izolovať z rôznych typov prostredí, a preto príprava fágových liečiv je lacnejšia ako vývoj nových antibiotík. Na druhej strane vysoká špecifita bakteriofágov vyžaduje, aby pred začatím terapie bol známy pôvodca ochorenia a bola určená jeho citlivosť k terapeutickým fágom. K ďalším nevýhodám fágovej terapie patrí, že fágy môžu byť po podaní inaktivované kyslým prostredím v žalúdku alebo odstránené imunitným systémom hostiteľa (Maura a Debarbieux, 2011).

Bakteriofágy, ktoré majú byť využívané pri fágovej terapii alebo v potravinárstve, musia byť podrobne charakterizované a musia spĺňať niekoľko kritérií. Je potrebné, aby bola známa nukleotidová sekvencia fágovej DNA

a bolo vylúčené, že fág obsahuje gény toxické pre hostiteľa alebo virulénne gény. Fág musí byť striktné virulentný a neschopný transdukcie, t. j. prenosu škodlivých génov medzi rôznymi bakteriálnymi kmeňmi. Zároveň je potrebné poznať hostiteľskú špecifitu terapeutických fágov. Pri množení fágov je potrebné používať nepatogénne kmene baktérií. Fágy musia byť purifikované tak, aby neobsahovali živé bunky alebo ich pozostatky, a preparáty majú mať vysokú koncentráciu (Hagens a Loessner, 2010). V literatúre boli publikované viaceré štúdie účinnosti fágovej terapie na zvieratách, pričom bola potvrdená ich účinnosť a bezpečnosť proti patogénom ako *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Clostridium difficile* a *Klebsiella pneumoniae* (Lu a Koeris, 2011). Niektoré fágové preparáty sú už v štádiu klinických pokusov. Za najperspektívnejšie sa považuje použitie fágových liečiv pre lokálne použitie (napr. chronické rany, infekcie slizníc). Stafylokokové fágy boli napríklad aplikované na potlačenie MRSA u osôb pred plánovaným chirurgickým zákrokom. Výhodnou možnosťou pri terapii infekčných ochorení je synergický účinok bakteriofágov a antibiotík (Maura a Debarbieux, 2011).

Využitie fágov v potravinárstve

Bakteriofágy je možné využiť ako prostriedok na detekciu a kontrolu bakteriálnych patogénov vo všetkých fázach potravinárskej výroby (García a kol., 2008). Boli vypracované testy na rýchlu detekciu baktérií (napr. *Salmonella enterica* a *Listeria monocytogenes*), ktoré sú založené na infekcii patogénu so špecifickým bakteriofágom. Tradičnou metódou používanou pri štúdiu patogénnych baktérií je fagotypizácia. Je to metóda, ktorá porovnáva citlivosť kmeňov na infekciu vybranými bakteriofágmi. Získané výsledky majú význam pri epidemiologických štúdiách a pri hľadaní zdroja infekcie. V súčasnosti existujú fagotypizačné schémy pre všetky významné potravinové patogény ako je *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* a *Listeria monocytogenes* (Hagens a Loessner, 2007).

V potravinárstve je možné bakteriofágy použiť aj na prevenciu, prípadne liečbu infekcie hospodárskych zvierat. Zároveň sa fágy môžu aplikovať na dekontamináciu potravinárskych surovín živočíšneho (mäso) alebo rastlinného (ovocie a zelenina) pôvodu, prípadne na dezinfekciu zariadenia a kontaktných plôch. Bakteriofágy je možné použiť ako prirodzené konzervanty na predĺženie trvanlivosti potravín. Vo väčšine produktov sa používa zmes bakteriofágov, pričom jednotlivé bakteriofágy môžu byť prispôbené konkrétnym druhom baktérií. V súčasnosti sú dostupné na trhu prípravky vhodné na kontrolu potravín určených na priamu konzumáciu (syry, mäsové výrobky) pred kontamináciou *L. monocytogenes* (ListShield a LISTEX P100).

Rekombinantné bakteriofágy

V niektorých prípadoch bakteriofágy izolované z prostredia nemajú všetky vlastnosti potrebné pre ich využitie v technológii, a preto je výhodné vylepšiť ich genetickú informáciu. Na tento účel boli využité viaceré postupy, napríklad zavedenie priamych mutácií do DNA, rekombinácia fágového genómu, umelá selekcia fágov *in vivo* alebo príprava chimerických fágov.

Jedným z možných postupov je skombinovanie viacerých fágov. Napríklad bakteriofág T2 sa vyznačuje silnou lytickou aktivitou na úzkom okruhu citlivých bakteriálnych kmeňov a na druhej strane bakteriofág IP008 má širokú hostiteľskú špecifitu, ale lýza baktérií je pomalšia. V práci autorov Mahichi a kol. bol gén kódujúci proteín zodpovedný za väzbu na baktérie z fága IP008 vnesený do buniek *E. coli*, ktoré boli následne infikované fágom T2. Počas infekcie došlo v niektorých fágových genómoch k výmene pôvodného génu za jeho novú verziu. Rekombinantné fágy boli potom prenesené do kmeňa, ktorý pôvodný fág T2 nie je schopný lyzovať. Takto izolované bakteriofágy boli schopné infikovať viac hostiteľov ako fág T2 a lýza buniek bola efektívnejšia ako v prípade fága IP008 (Mahichi a kol., 2009).

Mutantné bakteriofágy boli použité aj proti baktériám rezistentným na antibiotiká alebo ako pomocný prostriedok pri liečbe antibiotikami. Baktericídne antibiotiká vyvolávajú v bunkách poškodenie DNA, ktoré bunka dokáže v určitej miere opraviť pomocou SOS odpovede. Na blokovanie tohto mechanizmu bol vytvorený modifikovaný fág M13 obsahujúci gén *lexA*. Pri testovaní tohto systému v laboratórnych kultúrach bolo zistené, že fág obsahujúci *lexA* zvýšil účinnosť antibiotika oproti nemodifikovanému fágu stokrát a oproti podaniu samotného antibiotika desaťtisíckrát. Účinnosť *lexA* fága bola potvrdená aj pokusmi na myšiach. Infekciu prežilo 80 % myší liečených modifikovaným fágom a antibiotikom, 50 % myší liečených nemodifikovaným fágom a antibiotikom a len 20 % myší liečených antibiotikom bez bakteriofágov (Lu a Collins, 2009).

Častým problémom pri bakteriálnych infekciách je tvorba biofilmu – čiže rast baktérií vo forme spoločenstva buniek pevne ukotvených na podložke. Biofilm bráni prieniku účinných látok k baktériám a bunky v biofilme sú v mnohých ohľadoch odolnejšie oproti bunkám rastúcim vo voľnom roztoku. Na degradáciu biofilmu bol skonštruovaný mutantný bakteriofág T7 nesúci gén pre disperzín B, enzým hydrolyzujúci polysacharidy, ktoré navzájom viažu bunky biofilmu. V porovnaní s kontrolami bol mutantný fág schopný zabíjať väčšie množstvo buniek, redukovať biofilm a intenzívnejšie sa množiť (Lu a Collins 2007).

Významnou komplikáciou pri použití lytických bakteriofágov na fágovú terapiu je uvoľnenie veľkého množstva bakteriálnych endotoxínov pri masívnej lýze patogénnych baktérií, čo môže spôsobiť pacientovi imunitný

šok. Preto je výhodné použiť na liečbu mutantné bakteriofágy, ktoré nelyzujú baktérie, a tým minimalizujú únik endotoxínov, sú dlhodobo stabilné v krvnom riečisku pacienta a nespôsobujú zápalové reakcie. Jedným prístupom je použitie filamentózných fágov M13, ktoré pri infekcii nelyzujú hostiteľa. Pre efektívne zabíjanie bakteriálnych buniek bol fág M13 modifikovaný pridaním toxického génu, napr. génu pre restriktívnu endonukleázu, ktorá po infekcii bakteriálnej bunky rozštiepi hostiteľskú DNA. Pri použití tohto fága sa hladina endotoxínov uvoľnených po hodine do média zvýšila deväťkrát menej ako pri použití lytických fágov (Hagens a Blasi 2003).

Záver

V súčasnej dobe boli vytvorené viaceré modifikované bakteriofágy, aby sa zvýšila efektivita a bezpečnosť fágovej terapie, a v mnohých prípadoch boli preukázané pozitívne výsledky. Pred zavedením do praxe je však stále potrebné ďalšie podrobné štúdium. Je nutné určiť optimálne dávkovanie a pomer antibiotika a fágov pri nereplikatívnych bakteriofágoch, pretože nesprávne určenie dávky zvyšuje riziko vzniku rezistencie. Pri riešení dávkovania bakteriofágov je potrebné uvedomiť si, ako a kde sa bakteriofágy v tele rozširujú. V prepracovanejších terapiách by sa mali vytvoriť bakteriofágy s naviazanými proteínovými ligandmi alebo protilátkami, ktoré spôsobujú akumuláciu fágov v určitých bunkách alebo orgánoch. Z dosiaľ dosiahnutých výsledkov je však zrejmá perspektíva využitia prírodných aj modifikovaných bakteriofágov v mnohých aplikáciách.

Abstract

Bacterial infections cause many serious problems in medicine and in society. Their treatment is complicated by increasing antibiotic resistance of pathogenic bacteria. Bacteriophages as natural predators of bacteria can be one solution of this problem. Bacteriophages are species specific and only kill prokaryotic cells. They can be used in phage therapy as well as in detection and control of pathogens during food production. Despite the many advantages of using bacteriophages, additional research is necessary before their application. In some cases genetic information of bacteriophages can be artificially improved generating recombinant bacteriophages with the aim to extend host specificity, prevent lysis of bacteria, increase antibiotic efficacy or introduce toxic gene into pathogenic bacteria.

Literatúra

- BRÜSSOW, H.; KUTTER, E. 2005. Phage ecology. In: KUTTER E., SULAKVELIDZE A., Eds. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Washington, DC: CRC Press. 129-163.
- CARLTON, M. R. 1999. Phage Therapy: Past History and Future Prospects In: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 47, 267-274, ISSN 0004-069X
- GARCIA, P., MARTÍNEZ, B., OBESO, J. M., RODRÍGUEZ, A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. In:

Letters in Applied Microbiology 47, 479-485, ISSN 0266-8254.
 HAGENS S.; BLASI U. 2003. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Letters in Applied Microbiology* 37, 318-23.
 HAGENS, S.; LOESSNER, M. J. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. IN: *Applied Microbiology and Biotechnology* DOI 10.1007/s00253-007-1031-8.
 HAGENS, S.; LOESSNER, M. J. 2010. Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11, 58-68.
 LU, K. T.; COLLINS, J. J. 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. In: *PNAS* 104, 11197-202.
 LU, K. T.; COLLINS J. J. 2009. Engineered bacteriophage

targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. In: *PNAS* 106, 4629-34.
 LU, K. T.; KOERIS, M. S. 2011. The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology* 14, 524-531.
 MAHICHI, F.; SYNNOTT, A. J.; YAMAMICHI, K.; OSADA, T.; TANJI, Y. 2009. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. IN: *FEMS Microbiology Letters* 295, 211-217.
 MAURA, D.; DEBARBIEUX, L. 2011. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 851-859.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Nové aspekty v transformácii mikrorias

Eva Dobáková, Gabriela Gavurníková,
Juraj Krajčovič

Katedra genetiky, Katedra biochémie,
Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave
dobakova@fns.uniba.sk
gavurnikova@fns.uniba.sk
krajcovic@fns.uniba.sk

Úvod

V súčasnej dobe narastajú exponenciálnym tempom požiadavky mnohých terapeutických, priemyselných aj diagnostických oblastí výskumu na prípravu rôznych typov rekombinantných proteínov. Do popredia sa preto dostávajú „bioreaktorové systémy“, ktoré sú dôležité v oblasti produkcie veľkého množstva rekombinantných proteínov, najmä v prípadoch, keď sú tradičné zdroje limitované. Napriek novým pokrokom v technológii rekombinantnej DNA založenej na využívaní rozmanitých druhov živých buniek a organizmov, neexistuje zatiaľ žiadny štandardný systém pre efektívnu produkciu proteínov na komerčne významnej úrovni. Voľba nadproduktívneho systému pre expresiu rekombinantných proteínov závisí od mnohých faktorov, ako sú ceny produkcie a vývoja systému, funkčnosti, čistoty a úrovne exprese proteínu v danom systéme. Stále rastúci dopyt spoločnosti a zvyšovanie požiadaviek na kvantitu priemyselne a diagnosticky významných proteínov, sú hlavnou hnacou silou pri vývoji nových, bezpečnejších a vysoko produktívnych systémov pre získavanie rekombinantných proteínov, uľahčujúcich život človeka (Walker a kol., 2005).

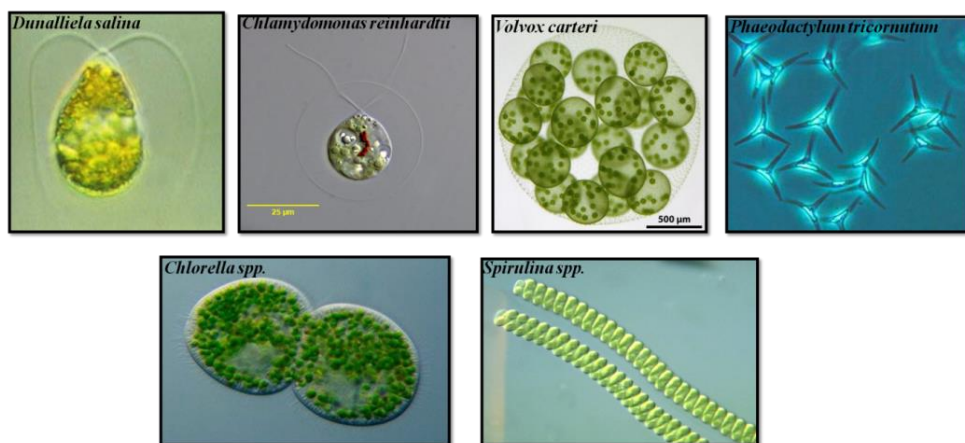
Mikroriasy

Mikroriasy predstavujú v súčasnosti nové expresné systémy, ktoré v sebe spájajú všetky výhody rastlín a mikrobiálnych organizmov, pre ktoré je typická vysoká a rýchla produkcia rekombinantných proteínov. Termín

„mikroriasy“ sa používa na opísanie rôznych fotosyntetických skupín prokaryotických (cyanobaktérie) a eukaryotických mikroorganizmov. Medzi najznámejších predstaviteľov patrí cyanobaktéria (sinica) *Spirulina*, ktorá slúži ako komerčný zdroj nutričných doplnkov, no patria sem aj zelené riasy ako *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina* a rozsievka *Phaeodactylum tricornutum*, ktorá bola po dlhé roky modelovým organizmom mnohých základných biologických a ekologických štúdií (Walker a kol., 2005) (obr. 1).

Tieto malé fotosyntetizujúce organizmy disponujú rovnakým fotosyntetickým mechanizmom ako vyššie rastliny. Vďaka svojej jednoduchšej štruktúre – jednobunkovej, vláknitej či vo forme kolónií, je celá energia upravená na proces fotosyntézy, rast a rozmnožovanie oveľa viac, než na udržiavanie iných diferencovaných štruktúr. V dôsledku toho je úroveň exprimovaných proteínov v mikroriasach v rozmedzí 30 – 50 % suchej hmoty biomasy (Benemann a Oswald 1996; Brown 2002). Vďaka mikroskopickej veľkosti a kultivácii v tekutých médiách, sa dajú živiny udržiavať blízko optimálnych podmienok. To umožňuje vysokú úroveň kontrolovanej, kontinuálnej produktivity proteínu, porovnateľnú s mikrobiálnou fermentáciou.

Kým využívanie rias ľudskou populáciou je staré niekoľko storočí, pokusy o masovú kultiváciu začali krátko po druhej svetovej vojne. V priebehu populačnej explózie sa v USA, Nemecku a Japonsku začali mikroriasy pestovať ako potenciálny zdroj potravy. Odvtedy sa masová kultivácia niektorých druhov mikrorias využívala pri očistení odpadových vôd, kontrole znečistenia vody, ako ob-



Obr. 1. Niektoré druhy biotechnologicky významných druhov mikrorias

noviteľné palivo pre transport (biodízel), ako zdroj vysoko hodnotných prírodných zdravých produktov (nutrifarmaká), na produkciu vodíka ako paliva a neskôr pri zmiernení skleníkového efektu (Benemann a Oswald 1996). Z komerčného hľadiska sa mikroriasy využívajú ako prirodzený zdroj vysoko hodnotných látok (najmä v medicínskej oblasti od šesťdesiatych rokov dvadsiateho storočia) (tab. 1).

Mikroriasy ako *Dunaliella*, *Haematococcus* a *Chlorella* neprodukujú toxíny a sú klasifikované ako zdroj potravy spadajúci do kategórie GRAS – „Všeobecne považované za bezpečné“ (Generally Regarded As Safe). Mikroriasy kvôli jednoduchosti svojej štruktúry minimalizujú aj obavy z izolácie potenciálnych bioproduktov z komplexných orgánov (Walker a kol., 2005).

Potenciál veľkokapacitných kultúr v podmienkach netypických pre konvenčné rastliny robí z mikrorias vytúženú biologickú „továreň“, schopnú vysokej produkcie prirodzených, ale aj nových cenných zlúčenín a látok. Zavedenie rutinných metód genetickej manipulácie rias je stále v zárodku. Posledný progres v oblasti spracovania efektívnych genetických transformačných procedúr nastal hlavne pri *Chlamydomonas reinhardtii*, *Haematococcus pluvialis* a niekoľkých ďalších druhoch (Stevens a Purton, 1997; Falcatore a Bowler, 2002). Čiastkové úspechy naznačujú, že molekulárne inžinierstvo komerčne dôležitých mikrorias má významnú perspektívu pre praktické uplatnenie.

Tab. 1. Mikroriasy, ich produkty a spoločnosti aktuálne predávajúce produkty z mikrorias alebo vyvíjajúce bioreaktory na báze mikrorias (upravené podľa Walker a kol., 2005)

Mikroriasa	Produkty
<i>Spirulina pacifica</i>	Nutričné doplnky, imunologická diagnostika, pigmenty (kozmetika) a farbenie potravín
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Nutričné mastné kyseliny
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Prírodný astaxantín ako nutrifarmakum
<i>Spirulina</i> sp.	Nutričný doplnok inhibujúci replikáciu a infekčnosť vírusov vrátane HIV, CMV, HSV a chrípky typu A
Rôzne	Protirakovinové liečivá
<i>Chlorella</i> sp. <i>Dunaliella</i> sp.	Doplnky diéty: polysaccharid N,β-1,3 glukán (<i>Chlorella</i>) a β-karotén (<i>Dunaliella</i>)
<i>Dunaliella bardowil</i>	β-karotén (práškový)
<i>Dunaliella salina</i>	Mix karotenoidov
Neznáme	Polynenasýtené mastné kyseliny
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Transgénne riasy pre zdravie živočíchov, bioremedácia, environmentálny monitoring a biopesticidy
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Vývoj technológie rekombinantných proteínov

Genetické transformačné metódy mikrorias

Vývoj metód pre transformáciu rias významne pokročil v období posledných desiatich rokov. Prvotný progres bol zaznamenaný v pionierskej práci, ktorá sa týkala transformácie zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Lumbreras a Purton, 1998; Fuhrmann, 2002). Vývoj molekulárnych nástrojov a metodológie pre introdukcii nových génov do jadrového alebo chloroplastového genómu *Chlamydomonas reinhardtii* slúžil ako katalyzátor pre vývoj podobných techník aj u iných druhov rias. Napriek rutínnej transformácii len niekoľkých druhov rias (*C. reinhardtii*, *Volvox carteri*, niektoré druhy rodu *Chlorella* a rozsievky *Phaeodactylum tricornutum*) existujú aj ďalšie výsledky o transformačných úspechoch iných druhov mikrorias.

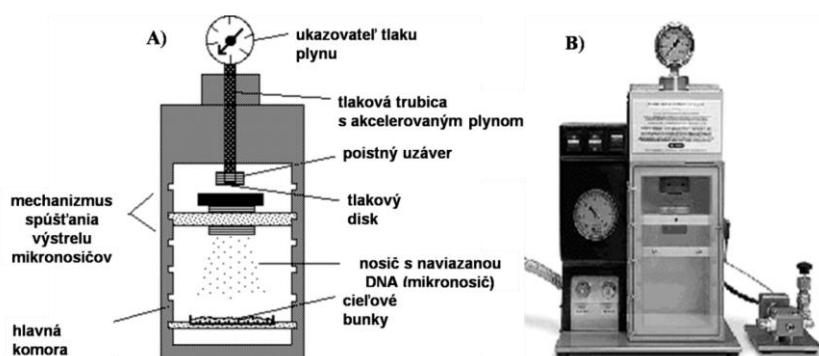
Pri transformácii štandardných kmeňov mikrorias (wild type) je prvou bariérou pevná bunková stena na ich povrchu, ktorá spôsobuje veľmi nízku účinnosť transformácie. Dá sa zvýšiť použitím kmeňov, ktoré nemajú bunkovú stenu, alebo dochádza k jej odstráneniu. Tento proces tak značne zvyšuje počet transformantov viabilných po transformácii. Protokolov na odstránenie bunkovej steny je niekoľko. Sú založené na princípe párovania gamét párovacieho typu plus (mt+) a párovacieho typu mínus (mt-) u riasy *Chlamydomonas reinhardtii*. V tomto procese dochádza k špecifickému rozpoznaní buniek, ktoré je závislé na interakcii bičiek. Interakcia spúšťa mechanizmus uvoľnenia lytických enzýmov,

autolýzinu alebo lyzínu, spôsobujúcich degradáciu bunkovej steny. Tieto enzýmy sú purifikovateľné a využívajú sa v predprípravnej fáze transformácie (Potvin a Zhang, 2010).

Biobalistika (génové delo)

„Ostreľovanie“ cieľových buniek kovovými časticami pokrytými DNA patrí medzi moderné a v súčasnosti často využívané, jednoduché, efektívne a vysoko reprodukovateľné transformačné metódy. Táto metóda bola úspešne zavedená pre väčšinu štandardných expresných systémov. Najväčšia nevýhoda tejto metódy spočíva v jej špeciálnom vybavení: wolfrámové alebo zlaté náboje – nosiče DNA, plyn (hélium) poháňajúci „výstrel“ a samotné nastreľovacie zariadenie (obr. 2).

Počet transformantov po nastreľovaní býva nižší ako pri iných metódach, no stále patrí medzi najefektívnejšie metódy z hľadiska transformácie chloroplastov. Umožňuje prenos mnohých kópií rekombinantnej DNA ako cez bunkovú membránu tak aj cez chloroplastové membrány, čím zvyšuje šancu pre úspešný integračný proces DNA do genómu mikroriasy (Boynton a Gillham, 1993). Táto metóda je efektívna pre stabilnú transformáciu jadra (Mayfield a Kindle, 1990) a chloroplastov (Boynton a kol., 1988; El Sheekh, 2000) jednobunkových rias *C. reinhardtii*, *Volvox carteri* (Schiedlmeier a kol., 1994), *Chlorella sorokiana* (Dawson a kol., 1997), ale aj pre komplexné druhy rias ako napr. koloniálna riasa *Gonium pectorale* (Lerche a Hallmann, 2009).



Obr. 2. Schéma génového delu

(A) Génové delo sa využíva ako jeden z mnohých spôsobov transportu génov do buniek. Prístroj je poháňaný plynom pod vysokým tlakom – héliom. Po prasknutí tlakového disku na konci trubice je uvoľnená silná tlaková vlna plynu, ktorá vymrští mikronosiče DNA (sú to malé wolfrámové alebo zlaté častice pokryté DNA s cieľovými génmi). Mikronosiče penetrujú bunky a gény sa uvoľnia do jej prostredia. Za optimálnych podmienok je poškodenie buniek minimálne a nové gény sa udržiavajú v bunkách počas dlhého obdobia. Génové delo sa používa

na celom svete na genetické manipulácie s rôznymi druhmi organizmov, zahŕňajúce, rastliny, zvieratá a mikroorganizmy. Aplikuje sa aj v medicíne (napr. génová terapia). (B) Génové delo BioPSD-1000/He Particle Delivery System značky Bio-Rad.

Metóda sklenených guľôčok

Táto metóda patrí medzi jednoduché a efektívne transformačné metódy. Pozostáva z inkubácie rias bez bunkovej steny s rekombinantnou DNA v prítomnosti sklenených guľôčok a polyetylén glykolu (PEG), ktorý značne zvyšuje transformačnú účinnosť. Napriek poklesu bunkovej viability o 25 % po trepaní s guľôčkami, je účinnosť bunkovej transformácie 10^3 transformantov/ μ g

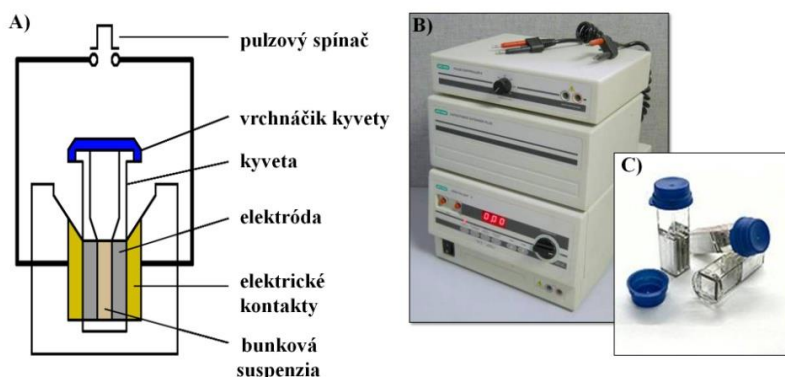
DNA (Kindle, 1990). Účinnosť 50 transformantov/ μ g DNA sa dosiahla pri transformácii plastidov *C. reinhardtii* (Kindle a kol., 1990). V porovnaní s génovým delom je táto metóda jednoduchšia a lacnejšia, pretože nevyžaduje špeciálne vybavenie a je efektívnejšia z hľadiska jadrovej transformácie.

S úspechom bola zavedená aj obmena tejto metódy, ktorá využíva namiesto sklenených guľôčok kremíkovo-uhlíkové elektródy (Dunahay, 1993). Je to efektívna

metóda na introdukciiu DNA do intaktných buniek, ktorá je osvedčená najmä u druhov mikrorias, ktoré nemajú dostupné mutančné kmene bez bunkovej steny alebo nie sú vyvinuté protokoly na odstránenie bunkovej steny. Viability buniek je niekoľkonásobne vyššia (až 80 %), no účinnosť transformácie, vysoké náklady na materiál a dopad na prostredie a zdravie súvisiaci s použitými elektródami spôsobujú, že metóda sklenených guľôčok patrí medzi uprednostňované.

Elektroporácia

Účinnosť elektroporácie mikrorias, alebo indukcia rekombinantného genetického materiálu do mikroorganizmu vystavením bunkových stien vysokej intenzite elektrických pulzov, bola po prvýkrát opísaná Brownom (obr. 3) (Brown a kol., 1991).



Obr. 3. Elektroporácia

A) Schematické znázornenie elektroporátora (cit 8). Elektrický výboj spôsobí vytvorenie hydrofilných pórov v bunkových membránach, ktoré zabezpečia efektívny vstup rekombinantnej DNA do buniek.

B) Elektroporátor využívaný na transformáciu mikroorganizmov na katedre biochémie PríF UK Bio-Rad Gene Pulser II System. Elektroporačné kvety. Môžu mať rôznu hrúbku stien v závislosti od transformovaných mikroorganizmov.

Elektroporácia špecificky rozrušuje fosfolipidové dvojvrstvy, čo vedie k efektívnemu molekulárnemu transportu cez plazmatickú membránu (Azencott a kol., 2007). Účinná transformácia sprostredkovaná elektrickým výbojom je rádovo dvakrát vyššia ako guľôčková a nemá vysoké požiadavky na vybavenie (Shimogawara a kol., 1998). Dôležitými parametrami ovplyvňujúcimi efektívnosť elektroporácie sú sila elektrického poľa, dĺžka elektrického pulzu, zloženie kultivačného média, teplota, zloženie membrány (Brown, 1991) a koncentrácia DNA (Wang a kol., 2007a).

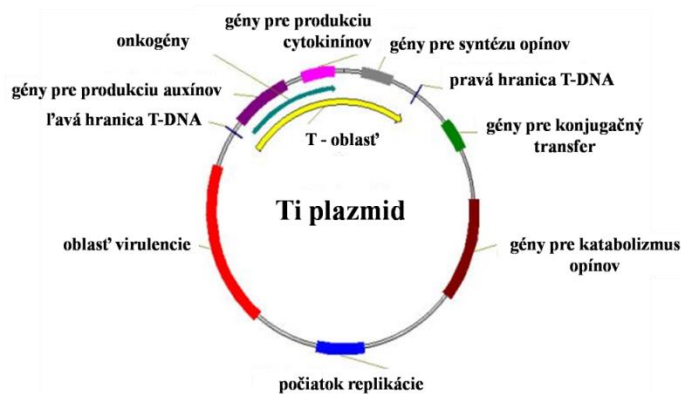
Úspešná elektroporácia bola uskutočnená u rias v *Dunaliella salina* (Geng a kol., 2004; Sun a kol., 2005; Wang a kol., 2007b; Sun a kol., 2005; Feng a kol., 2009), *Dunaliella viridis* (Sun a kol., 2006) a *Dunaliella tertiolecta* (Walker a kol., 2005a), *C. reinhardtii* (Tang a kol., 1995; Shimogawara a kol., 1998; Kovar a kol., 2002; Ladygin, 2003, Ladygin, 2004), v niektorých druhoch *Chlorella* (Chow a Tung, 1999; Wang a kol., 2007a), a *Nannochloropsis oculata* (Chen a kol., 2008; Li a Tsai, 2009).

Transformácia sprostredkovaná baktériou *Agrobacterium tumefaciens*

Transformácia prostredníctvom gram negatívnej pôdnej baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, indukujúcej tvorbu rastlinných nádorov, je ďalším zo spôsobov prenosu genetického materiálu. Doteraz bola vo väčšine prípadov využívaná len na transformáciu modifikovaných

rastlinných buniek. *Agrobacterium tumefaciens* je bežná pôdna baktéria, ktorá prirodzene vkladá svoje gény do rastlín a využíva ich molekulárnu mašinériu na exprimovanie tých génov, ktorých produkty využíva ako živiny (obr. 4). *Agrobacterium* spôsobuje v tomto procese nádory rastlín (crown gall disease), ktoré je možné pozorovať v blízkosti prepojenia medzi koreňom a stonkou. V období sedemdesiatych rokov dvadsiateho storočia sa niekoľko laboratórií podieľalo na výskume biológie, biochémie a molekulárnej biológie agrobaktérií. Tieto výskumy zistili, že nádory rastlinných buniek obsahovali vo svojom genóme DNA baktériového pôvodu. Prenášaná DNA, tzv. T-DNA bola pôvodne súčasťou malej molekuly DNA nachádzajúcej sa mimo baktériového chromozómu.

Táto molekula DNA sa nazýva Ti plazmid (tumor inducing – nádor vyvolávajúci) (obr. 4) (Chilton a kol., 1983.). Ti plazmid obsahuje väčšinu génov potrebných pre tvorbu nádoru. Ranené rastliny vylučujú fenolické látky, ktoré stimulujú expresiu virulentných génov (tzv. vir gény), ktoré sa tiež nachádzajú na Ti plazmide (Wullems a kol., 1981; Hoekema a kol., 1983). Vir gény kódujú sériu proteínov, zodpovedných za excíziu, prenos a integráciu T-DNA do rastlinného genómu. Gény nachádzajúce sa v oblasti T-DNA sú zodpovedné za proces tvorby nádoru. Niektoré z nich ovplyvňujú priamo tvorbu rastlinných rastových hormónov, spôsobujúcich proliferáciu transformovaných rastlinných buniek. Oblasť T-DNA je ohraničená na oboch koncoch 25 bp nukleotidov, nazývanými T-DNA hranice (Zupan a kol., 2000). Ľavá hranica T-DNA nie je esenciálna, ale pravá je nenahraditeľná pre prenos T-DNA.



Obr. 4. Základné elementy Ti plazmidu dizajnovaného pre transformáciu sprostredkovanú *A. tumefaciens*:

hraničné sekvencie T-DNA – sekvencie s veľkosťou 25 bp, nedokonalé opakovania, ktoré ohraničujú T-DNA a sú potrebné pre jej transfer. Gény vir – približne 35 génov, nachádzajúcich sa mimo oblasti T-DNA (transferovej DNA). Kódujú produkty potrebné pre excíziu, transfer a integráciu T-DNA do rastlinného genómu. Modifikovaná oblasť T-DNA – v natívnom prirodzenom stave sú to gény zodpovedné za tvorbu nádorov. Po ich odstránení je možné nahradiť ich génmi iného pôvodu (napr. z rastlín baktérií, vírusov, kvasiniek...). Gény pre produkciu opínov – zabezpečujú tvorbu opínov, látok slúžiacich ako zdroj dusíka pre *A. tumefaciens*. Gény pre produkciu auxínov – auxíny sú rastlinné hormóny, ktoré zohrávajú úlohu v raste a vo vývoji rastliny. Gény pre produkciu cytokinínov – zabezpečujú proliferáciu buniek a tvorbu nádorov.

Použitím tejto metódy boli úspešne transformované reportérové gény pre *uidA* (β -glukuronidáza), *gfp* (Green Fluorescent Protein) a *hpt* (hygromycínfosfotransferáza) do *C. reinhardtii* (Kumar a kol., 2004) a *Haematooccus pluvialis* (Kathiresan a Sarada, 2009).

Aj napriek malému množstvu výsledkov dáva táto metóda nádej v získavaní cenných výsledkov pri transformácii vyšších a nižších rastlín.

Faktory ovplyvňujúce expresiu proteínov a stratégie jej zvýšenia

Vývoj ekonomicky významných expresných systémov na princípe mikrorias je v súčasnosti limitovaný nízkym a nekonzistentným výťažkom rekombinantných proteínov. Posledné snahy smerujú k vylepšeniu nezávislých parametrov medzi ktoré patria: štúdium promótorov, neprekladných (UTR – untranslated region) sekvencií a štúdium fúzií medzi natívnym a rekombinantným peptidom v chloroplastoch mikrorias (Potvin a Zhang, 2010).

Regulácia exprese rekombinantného proteínu je komplexný a veľmi zložitý systém, ktorý pozostáva z mnohých interagujúcich zložiek. Aj keď nie je miera vzájomnej závislosti medzi jednotlivými faktormi úplne jasná, niektoré stratégie a mechanizmy dokázali zvýšiť výťažok rekombinantného proteínu v mikroriase. Systematické štúdium niektorých spomenutých faktorov bolo z hľadiska starších metód časovo náročné. Avšak pokračujúci posun od tradičnej izolácie a následnej modifikácie génov získavaných zo známych organizmov k *de novo* dizajnaniu a syntéze génov umožnili nové strategické cesty pre utváranie moderných, časovo – efektívnych a komplexných štúdií (Wu a kol., 2007).

Vzájomné komplexné pôsobenie viacerých faktorov zahŕňajúce enhancery (zosilňujúce elementy), regulačné mechanizmy, vplyv mnohých transkripčných a transláčnych faktorov, nejednotnosť genetického kódu, javy súvisiace s transformáciou, proteázová senzitivita, lokalizácia proteínu, utišovanie génov (gene silencing), spo-

sobuje nemalé ťažkosti v utváraní štandardných systémov pre produkciu rekombinantných proteínov v mikroriasach. Napriek tomu, že systematické štúdie a optimalizácia niektorých parametrov nie sú jednoduché a sú časovo náročné, stávajú sa niektoré experimenty účinnejšie, lacnejšie a ľahko dostupné, vďaka *de novo* dizajnaniu a syntéze génov (Potvin a Zhang, 2010). Všetky vyššie spomínané faktory patria k „upstream“ procesom dizajnovania a prípravy transgénnych proteínov. Po vytvorení transgénneho kmeňa, zohrávajú dôležitú úlohu pri ovplyvnení výťažku proteínu aj kultivačné parametre – „downstream“ podmienky: zloženie média, teplota, pH, koncentrácia oxidu uhličitého, podmienky trepania a osvetlenia. Ovplyvňujú ho buď priamo, prostredníctvom molekulárnych dráh pôsobiach na jednobunkový organizmus, alebo nepriamo cez účinkov na rast rias a maximálnu bunkovú hustotu (Potvin a Zhang, 2010).

Vzájomná spolupráca medzi výskumníkmi „upstream“ a „downstream“ dizajnovania bioprocessov uľahčí v budúcnosti vývoj ekonomicky významných transgénnych bioreaktorov založených na báze mikrorias.

Abstract

Microalgae already serve as a major natural source of valuable macromolecules including carotenoids, long-chain polyunsaturated fatty acids and phycocolloids. As photoautotrophs, their simple growth requirements make these primitive plants potentially attractive bioreactor systems for the production of high-value heterologous proteins. The difficulty of producing stable transformants has meant that the field of transgenic microalgae is still in its infancy. Nonetheless, several species can now be routinely transformed and algal biotechnology companies have begun to explore the possibilities of synthesizing recombinant therapeutic proteins in microalgae and the engineering of metabolic pathways to produce increased levels of desirable compounds. In this review, we outline recent progress in microalgal biotechnology and transformation and discuss the potential of microalgae as bioreactors for the production of heterologous proteins.

Literatúra

- AZENCOTT, H. R., PETER, G. F., PRAUSNITZ, M. R. (2007). Influence of the Cell Wall on Intracellular Delivery to Algal Cells by Electroporation and Sonication. *Ultrasound Med. Biol.* 33(11): 1805-1817.
- BENEMANN, J. R., OSWALD, W. J. (1996). Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. Final report to the US Department of Energy, Pittsburgh Energy Technology Center.
- BOYNTON, J. E., GILLHAM, N. W. (1993). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas*. *Methods Enzymol.* 217: 510–536.
- BOYNTON, J. E., GILLHAM, N. W., HARRIS, E. H., HOSLER, J. P., JOHNSON, A. M., JONES, A. R., RANDOLPH-ANDERSON, B. L., ROBERTSON D., KLEIN, T. M., SHARK, K. B., SANFORD, J. C. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
- BROWN, L. E., SPRECHER, S. L., KELLER, L. R. (1991). Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Mol. Cell Biol.* 11: 2328-2332.
- DAWSON, H. N., BURLINGAME, R., CANNONS, A. C. (1997). Stable transformation of *Chlorella*: Rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Curr. Microbiol.* 35: 356-362.
- DUNAHAY, T. G. (1993). Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques* 15: 452-460.
- EL SHEEKH, M. M. (2000). Stable chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii* using microprojectile bombardment. *Folia Microbiol.* 45: 496-504.
- FALCIATORE, A., BOWLER, C. (2002). Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 109-130.
- FENG, S., XUE, L., LIU, H., LU, P. (2009). Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Mol. Bio. Rep.* 36: 1433-9.
- FUHRMANN, M. (2002). Expanding the molecular toolkit for *Chlamydomonas reinhardtii* – from history to new frontiers. *Protist.* 153: 357-364.
- GENG, D., WANG, Y., WANG, P., LI, W., SUN, Y. (2003). Stable expression of hepatitis B surface antigen in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. App. Phycol.* 15: 451-456.
- HOEKEMA, A., HIRSH, P. R., HOOYKAAS, P. J. J., SCHILPEROORT, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- CHEN, H. L., LI, S. S., HUANG, R., TSAI, H. J. (2008). Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* 44: 768-776.
- CHILTON, M. D. (1983). A vector for introducing new genes into plants. *Scientific American* 248(6): 36-45.
- CHOW, K. C., TUNG, W. L. (1999). Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Rep.* 18: 778-780.
- KINDLE, K. L. (1990). High frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1228-1232.
- KOVAR, J. L., ZHANG, J., FUNKE, R. P., WEEKS, D. P. (2002). Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation. *Plant. J.* 29: 109-117.
- Ladygin, V. G. (2003). The transformation of the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Microbiol.* 72: 585-591.
- LADYGIN, V. G. (2004). Efficient transformation of mutant cells of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Process. Biochem.* 39: 1685-1691.
- LERCHE, K., HALLMANN, A. (2009). Stable nuclear transformation of *Gonium pectorale*. *BMC Biotechnol.* 9: 64.
- LI, S. S., TSAI, H. J. (2009). Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish Shellfish Immunol.* 26: 316-325.
- LUMBRERAS, V., PURTON, S. (1998). Recent advances in *Chlamydomonas* transgenics. *Protist.* 149 :23-27.
- MAYFIELD, S. P., KINDLE, K. L. (1990). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2087-2091.
- POTVIN, G., ZHANG, Z. (2010). Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnology Advances.* 28: 910-918.
- SHIMOGAWARA, K., FUJIWARA, S., GROSSMAN, A., USUDA, H. (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics.* 148: 1821-1828.
- SCHIEDLMEIER, B., SCHMITT, R., MULLER, W., KIRK, M. M., GRUBER, H., MAGES, W., KIRK, D. L. (1994) Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5080-5084.
- STEVENS, D. R., PURTON, S. (1997). Genetic engineering of eukaryotic algae: progress and prospects. *J. Phycol.* 33: 713–722.
- SUN, Y., GAO, X. S., LI, Q. Y., ZHANG, Q. Q., XU, Z. K. (2006). Functional complementation of a nitrate reductase defective mutant of a green alga *Dunaliella viridis* by introducing the nitrate reductase gene. *Gene* 377: 140-149.
- SUN, Y., YANG, Z., GAO, X., LI, Q., ZHANG, Q., XU, Z. (2005). Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Mol. Biotechnol.* 30: 185-192.
- TANG, D. K. H., QIAO, S. Y., WU, M. (1995). Insertion mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation and heterologous DNA. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* 36: 1025-1035.
- WALKER, T. L., PURTON, S., BECKER, D. K., COLLET, CH. (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep.* 24: 629-641.
- WANG, C., WANG, Y., SU, Q., GAO, X. (2007a). Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via electroporation. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 12: 180-183.
- WANG, T. Y., XUE, L. X., HOU, W. H., YANG, B. S., CHAI, Y. R., JI, X. A. (2007b). Increased expression of transgene in stably transformed cells of *Dunaliella salina* by matrix attachment regions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 651-657.
- WU, G., DRESS, L., FREELAND, S. J. (2007). Optimal encoding rules for synthetic genes: the need for a community effort. *Molec. Syst. Biol.* 3: 134.
- WULLEMS, G. J., MOLENDIJK, L., OOMS, G., SCHILPEROORT, R. A. (1981) Differential expression of crown gall tumor markers in transformants obtained after in vitro *Agrobacterium tumefaciens* induced transformation of cell regenerating protoplasts derived from *Nicotiana tabacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4344-4348.
- ZUPAN, J., MUTH, T. R., DRAPER, O., ZAMBRYSKI, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The plant Journal.* 23(1): 11-28.

Riasy ako producenti biopalív

Aneta Šidíková, Lucia Hadariová,
Juraj Krajčovič

Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave

aneta.sidikova@gmail.com;

luciahadariova@gmail.com;

krajcovic@fns.uniba.sk

Úvod

Energetický priemysel je v súčasnosti veľmi závislý na fosílnych palivách. Je zrejmé, že fosílna palivá sú ako zdroj energie z dlhodobého hľadiska neudržateľné, ich celosvetové zásoby sa znižujú a ceny narastajú. Spaľovaním takýchto palív sa zvyšuje množstvo emisií, čo vedie ku klimatickým zmenám, znečisteniu prostredia a zdravotným problémom. Z týchto dôvodov sa hľadajú nové možnosti ako pokryť zvyšujúci sa dopyt udržateľnejšími zdrojmi energie, šetrnejšími k životnému prostrediu. Biopalivá k takýmto zdrojom určite patria. Ich produkcia z obnoviteľných biologických zdrojov je perspektívnym riešením problému z dôvodu tvorby veľkého množstva biomasy za krátky čas.

Vývoj biopalív

Celosvetový výskum a vývoj biopalív napreduje miliónovými krokmi. Technológie sú čoraz efektívnejšie, vylepšuje sa kvalita biopalív a ekonomika ich výroby využívaním rôznych organizmov a východiskových surovín.

Prvú generáciu biopalív predstavujú palivá vyrábané fermentačnými technológiami z rôznych poľnohospodárskych plodín, ako napr. obilie, kukurica, slnečnica,

repka olejná, sója, palma olejová, cukrová repa a cukrová trstina. Pestovanie týchto plodín však vyžaduje veľké množstvo ornej pôdy i vody a má negatívny dopad na produkciu potravín.

Za druhú generáciu biopalív sa považuje získavanie energie z nekonzumovateľných rastlín (drevná a bylinná fytohmota) – lignocelulózy, ako sú drevo, listie, kôra, slama a pod. Táto technológia je náročná nielen z finančného ale aj environmentálneho hľadiska; opäť je tu potreba využívania poľnohospodárskej pôdy a dôsledkom je vytlačenie pestovania rastlín pre potravinárske účely a s tým súvisiaci nárast ich cien.

Biopalivá z mikroskopických rias (mikrorias) predstavujú tretiu a zároveň ekonomicky najpríťažlivejšiu generáciu biopalív. Súvisí to s nárokmi a nákladmi na ich kultiváciu a schopnosťou produkovať veľké množstvo lipidov (olejov) za krátky čas. Tabuľka 1 porovnáva viacero ukazovateľov, ktorými sa posudzuje efektívnosť produkcie biopalív mikroriasami s ostatnými plodinami, ktoré slúžia ako surovina na výrobu bionafty. V súčasnosti sa uskuťňuje intenzívny výskum, ktorého cieľom je ďalšie zvýšenie výťažku biopalív z mikrorias, a tým zlepšenie ekonomickej bilancie ich pestovania (prehľad Brennan a Owende, 2010).

Tab. 1. Porovnanie produkcie biopalív vybranými druhmi fotosyntetizujúcich organizmov (podľa Mata et al. 2010)

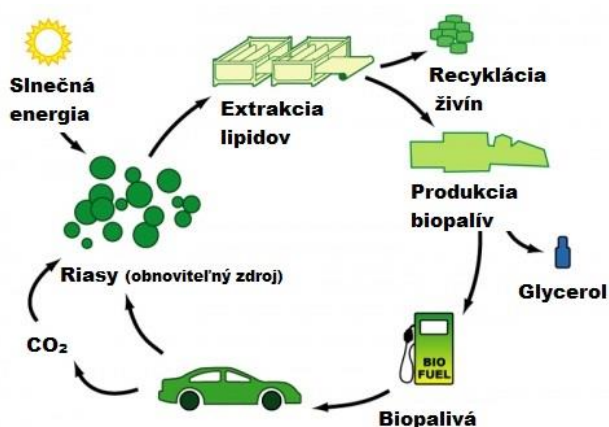
Druh organizmu	Obsah olejov v semenách (%)	Ročný výťažok oleja (l/ha)	Potrebná plocha (m ² /kg biopaliva)	Ročná produkcia biopaliva (kg/ha)
Kukurica siata (<i>Zea mays</i>)	44	172	66	152
Konopa siata (<i>Cannabis sativa</i>)	33	363	31	321
Sója fazuľová (<i>Glycine max</i>)	18	636	18	562
Dávivec čierny (<i>Jatropha curcas</i>)	28	741	15	656
Laničnik siaty (<i>Camelina sativa</i>)	42	915	12	809
Repka olejná (<i>Brassica napus</i>)	41	974	12	862
Slnečnica ročná (<i>Helianthus annuus</i>)	40	1070	11	946
Ricín obyčajný (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Palma olejná (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Mikroriasy (nízky obsah olejov)	30	58 700	0,2	51 927
Mikroriasy (stredný obsah olejov)	50	97 800	0,1	86 515
Mikroriasy (vysoký obsah olejov)	70	136 900	0,1	121 104

Riasy ako producenti biopalív

Pojmom riasy sa spravidla označujú fylogeneticky nepríbuzné fotosyntetizujúce organizmy, a to jednobunkové mikroskopické riasy (eukaryotické – s pravým jadrom, niekedy aj prokaryotické cyanobaktérie/sinice), ktoré, žijú jednotlivito alebo v kolóniách, ale i mnohobunkové makroskopické riasy – ich telo tvorí stielka, ktorá nikdy nie je rozlíšená na koreň, stonku, listy a kvet (nemajú diferencované vodivé pletivá).

Mikroskopické riasy – mikroriasy (2 – 200 µm) (termín mikroriasy sa používa hlavne v biotechnológiách), sú súčasťou takmer všetkých ekosystémov na Zemi. Zastúpené sú množstvom rozmanitých druhov, ktoré žijú v širokom rozpätí environmentálnych podmienok. Odhaduje sa, že existuje viac ako 50 tisíc druhov mikrorias, no len približne 30 tisíc sa doposiaľ ako tak študovalo. Skrytá diverzita mikroskopických rias je pravdepodobne ešte podstatne rozsiahlejšia.

Mikroskopické riasy pútajú pozornosť z viacerých aspektov. Nachádzajú uplatnenie pri očiste (bioremediácii) životného prostredia, hlavne odpadových vôd a dokážu veľmi efektívne fixovať CO₂. Biologické vychytávanie CO₂ predstavuje z dlhodobého hľadiska jedinou ekonomicky prijateľnú a environmentálne udržateľnú technológiu. Získaná biomasa z kultúr mikrorias nachádza mnohoraké uplatnenie (napr. ako krmivo pre živočíchy – suchozemské aj vodné, biofertilizéry, skvalitňovače pôd, látky využiteľné vo farmácii, v moderných biotechnológiách). Fotosyntetická fixácia CO₂ (a doplňujúcich živín) na biomasu mikrorias sa však veľmi intenzívne sleduje v spojitosti s následnou produkciou biopalív. Cyklus produkcie a využitia biopalív z mikrorias schematicky znázorňuje obr. 1. Produkcia biopalív z mikrorias je výrazne efektívnejšia v porovnaní s vyššími rastlinami (10-1000-krát pri prepočte produkcie biopalív v kg na hektár za rok) a na ďalšom zefektívnení ich produkcie sa intenzívne pracuje (Mata *et al.* 2010).



Obr. 1. Cyklus produkcie a využitia biopalív z mikrorias
Zdroj: <http://www.algae.wur.nl/UK/projects/Optimization+of+lipid+production+in+microalgae/> (upravené)

Účinnosť získavania biopalív z mikrorias je priamo úmerná obsahu lipidov v ich bunkách. Lipidy mikrorias sú chemicky podobné bežným rastlinným olejom; dominujú nepolárne triglyceridy (TGA), ktoré môžu byť relatívne jednoducho transformované na bionaftu. Množstvo kmeňov mikrorias prirodzene obsahuje pomerne veľa lipidov (cca 20 – 50 % sušiny, výnimočne až 85 %). Obsah lipidov je možné zvýšiť optimalizáciou faktorov, ktoré ovplyvňujú rast buniek, napr. intenzita osvetlenia, teplota, koncentrácia solí, dusíka, CO₂.

Poľnohospodárska verzus priemyselná produkcia

Riasy sa môžu kultivovať rôznymi spôsobmi, pričom technológie sa líšia výťažkami, nárokmi a nákladmi. Pri poľnohospodárskej produkcii (otvorený systém) sa mikroriasy kultivujú v otvorených nádržkách, ktoré môžu mať aj gigantické rozmery (viď obr. 2a – nádrže pripomínajú pretekárske dráhy). Riasy sú v nich fotosynteticky aktívne, plne závislé od slnečného svetla. Táto metóda je lacná, energeticky nenáročná a nádrže sa ľahko čistia. Vysoko cenená je aj z hľadiska environmentálneho, pretože fixuje veľké množstvo vzdušného CO₂ a nádrže možno umiestniť na poľnohospodársky nevyužitelnú pôdu. Kultivácia mikrorias v otvorených nádržkách je však technológiou pomerne extenzívnou, vyžaduje pomerne rozsiahle nádrže a kultúry sú vystavené riziku priamej kontaminácie nežiaducimi organizmami, čo znižuje produkciu biomasy.

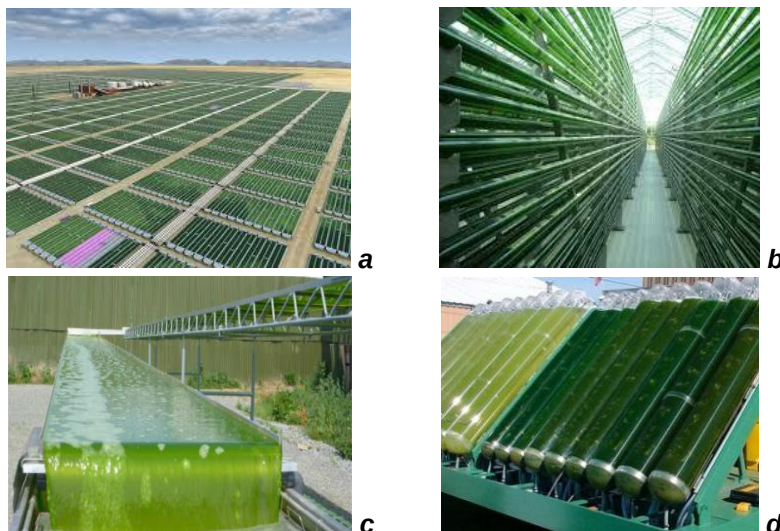
Priemyselná produkcia (uzavretý systém) mikrorias využíva podobný princíp ako priemyselné mikrobiálne fermentácie, v ktorých sa využívajú kvasinky alebo baktérie na produkciu potravín, nápojov alebo iných hodnotných biotechnologických produktov. Riasy sa kultivujú vo fotobioreaktoroch resp. fermentoroch, v ktorých sa ako zdroj uhlíka používajú aj cukry. Fermentácia sa potom môže uskutočňovať aj za tmy, kedy je produkcia biomasy síce vysoká, no nedochádza k fixácii CO₂, naopak emituje sa CO₂ obdobne ako pri spaľovaní fosílnych palív, preto je ich budúcnosť a ekonomická udržateľnosť otázná. Naopak veľmi perspektívnymi sú rôzne typy fotobioreaktorov (trubicové, ploché, stĺpcové – viď obr. 2b,c,d) využívajúce svetlo, a to či už slnečné alebo umelé.

Náklady a výnosy

Úspech určitého systému produkcie biopalív závisí od ekonomických a environmentálnych nákladov. LCA (Life-Cycle Analysis), známa ako metóda posudzovania životného cyklu, analyzuje súhrnné náklady v každom kroku produkcie porovnávaním množstva vstupnej energie a environmentálneho dopadu. Pomáha určiť, či daná stratégia produkcie biopalív využívajúca špecifické postupy je ekonomicky realizovateľná. Výsledky LCA

ukazujú, že pri použití LED (Light-Emitting Diode) fotobioreaktora je produkcia biomasy vyššia (244 668 kg/ha) ako pri použití solárneho fotobioreaktora (8 262 kg/ha) alebo otvorených nádrží (4 957 kg/ha). Na druhej strane, náklady na vypěstovanie jedného kilogramu

biomasy v otvorených nádržiach sú 8-krát nižšie ako v LED fotobioreaktoroch. Zníženie nákladov, napriek menšej produkcii biomasy, zvyšuje efektivitu celého procesu (prehľad Georgianna a Mayfield, 2012).



Obr. 2. Rôzne spôsoby kultivácie rias: a) v otvorených nádržiach, b) trubicové fotobioreaktory, c) ploché fotobioreaktory, d) stĺpcové fotobioreaktory (zdroj: <http://www.ecomena.org/tag/microalgae/>)

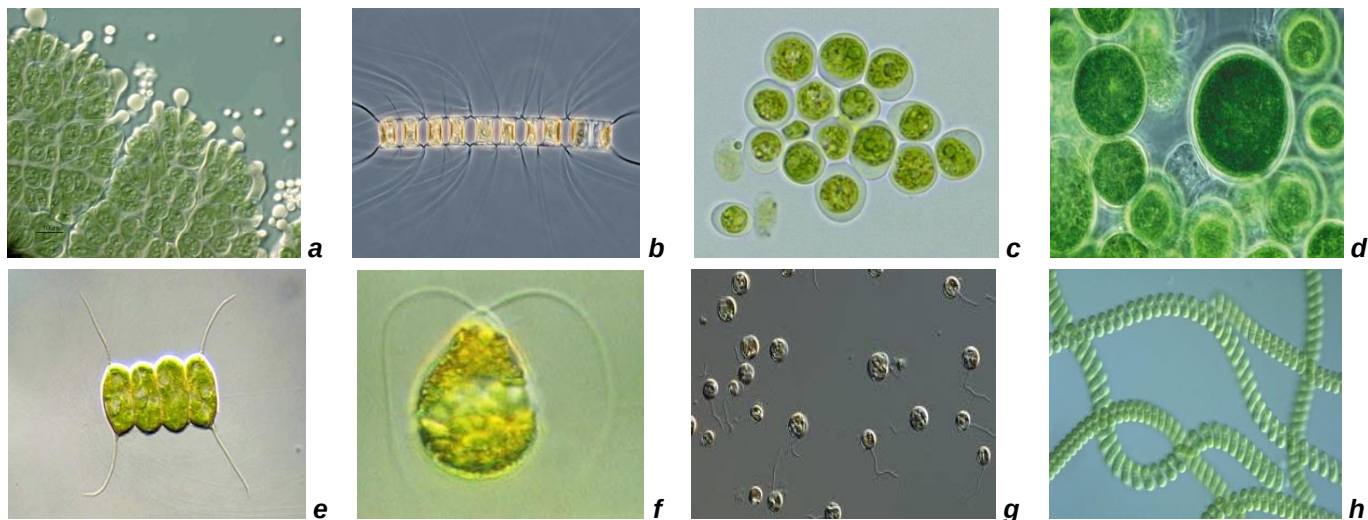
Výber vhodných druhov rias a kultivačných podmienok

Rôzne druhy mikrorias sú prispôsobené odlišným ekologickým podmienkam. Ich schopnosť tolerovať širokú škálu teplôt, svetla, salinity a patogénov determinuje spôsob a rozsah ich použitia. Pestovaním rias za špecifických podmienok sa zvyšuje obsah lipidov (aj iných látok) v bunkách, pričom každý druh, často kmeň, či izolát aj v rámci rovnakého druhu, môže mať odlišné optimálne rastové podmienky (Singh *et al.* 2011).

Z hľadiska produkcie biopalív a ďalších priemyselných organických látok medzi najvýznamnejšie patria sladkovodné riasy rodov *Botryococcus* (obr. 3a), *Chaetoceros* (obr. 3b), *Chlorococcum* (obr. 3c), *Chlorella* (obr. 3d), *Ellipsoidion*, *Haematococcus*, *Scenedesmus* (obr. 3e) a morské riasy rodov *Dunaliella* (obr. 3f), *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Pavlova* (obr. 3g), a *Phaeodactylum*. Z prokaryotických organizmov radených medzi mikroriasy púta pozornosť hlavne cyanobaktéria *Spirulina* (*Arthrospira* – obr. 3h), a to ani nie tak z hľadiska produkcie biopalív, ale skôr vďaka vysokému obsahu proteínov, vitamínov (E, B), karotenoidov, antioxidantov, a minerálov, je hojne dostupná na trhu ako významný doplnok stravy (niekedy označovaná ako „strava kozmonautov“).

Za účelom získania čo najvyššieho výťažku sa hľadajú riasy, ktoré za najkratší možný čas dosahujú vysokú hustotu a produkujú veľké množstvo lipidov s najnižším

možným prísunom energie. Ďalším dôležitým faktorom pri výbere vhodných druhov je náchylnosť ku kontaminácii. Je potrebné, aby sa mikroriasy dokázali efektívne brániť proti patogénom, resp. ich boli schopné do vysokej miery tolerovať. Vyvíjajú sa nové postupy ako znížiť riziko kontaminácie. Pestovaním rias v otvorených nádržiach sa zvyšuje riziko napadnutia patogénmi. S prihliadnutím na ich vysokú diverzitu je možné selekciou zvýšiť ochranu pred patogénmi. Pestovaním extrémofilných rias možno vylúčiť vplyv značného množstva mikroorganizmov, keďže v prostredí s vysokou salinitou, nízkym pH alebo vysokou teplotou prežije málo mikroorganizmov. Niektoré druhy rias sú schopné heteroinhibície. Táto schopnosť, nazývaná aj ako alelopatia, im umožňuje inhibovať rast iných mikroorganizmov. Tak tiež je možné využiť rezistenciu rias voči niektorým pesticídom, či antibiotikám používaných na odstránenie nežiaducich patogénov. Ukazuje sa, že riasy, podobne ako baktérie, sú schopné medzibunkovej komunikácie. Využívaním tohto fenoménu (nazývaného u baktérií *quorum sensing* – uvoľňovanie metabolitov do prostredia, na ktoré reagujú bunky rovnakého druhu v kultúre) si navzájom odovzdávajú informácie o stave prostredia, v ktorom sa nachádzajú, ako aj o hustote kultúry. Porozumenie medzibunkovej komunikácii môže pomôcť identifikovať chemicky regulované gény a rastové inhibítory, ktoré vplyvajú na hustotu buniek v kultúre. To by mohlo vyústiť k ovplyvňovaniu príslušných metabolických dráh do tej miery, že by hustota buniek v kultúre bola vyššia ako sú bežné limity (Stephens *et al.* 2010).



Obr. 3. Zástupcovia vybraných rodov mikrorias zaujímavých z hľadiska produkcie biopalív, či iných biotechnologicky významných látok:

a) *Botryococcus* sp. b) *Chaetoceros* sp. c) *Chlorococcum* sp. d) *Chlorella* sp. e) *Scenedesmus* sp. f) *Dunaliella* sp. g) *Pavlova* sp. h) *Spirulina* sp.

Recyklácia živín

Riasy sa využívajú nielen ako producenti biopalív ale aj v poľnohospodárstve, potravinárskom, či farmaceutickom priemysle. Ľudstvo už od nepamäti konzumuje riasy vďaka ich vysokej nutričnej hodnote. Vo farmaceutickom priemysle sa riasy využívajú ako doplnky stravy alebo ako prípravky na chudnutie.

Po extrakcii lipidov z biomasy zostáva zvyšná biomasa bohatá na rôzne prvky a živiny. Táto biomasa môže byť následne sekundárne využitá napr. aj ako potrava pre dobytok, hydinu, skvalitňovanie pôd, či získanie látok využiteľných vo farmácii, v moderných biotechnológiách. Recyklácia živín výrazne zvyšuje ekonomickú rentabilitu pestovania rias.

Zvyšovanie výťažku a znižovanie nákladov

Možno povedať, že v súčasnosti je každý organizmus (rastlina, živočích, či mikroorganizmus) využívaný v poľnohospodárskej alebo priemyselnej produkcii potravín domestikovaný, resp. vyselektovaný, či upravený krížením, výberom zo širokej palety hybridov (mutantov), no v poslednom čase aj využívaním metód molekulárnej biológie. Genetické inžinierstvo zohráva významnú úlohu aj pri úprave metabolizmu rias, čím sa zvyšuje rast a následne množstvo biomasy.

Zber úrody, ktorý spočíva v zakoncentrovaní kultúry a následnej dehydratácii biomasy, predstavuje technologicky a hlavne ekonomicky veľmi významný krok vedúci k produkcii biopalív, či získaniu iných produktov z rias. Odstránenie vody je energeticky náročné a spravidla

vyžaduje separáciu rias pomocou niektorej z klasických metód akou je napr. sedimentácia, filtrácia, resp. vyzrážanie (flokulácia). Samotná príroda však poskytuje príklady aj efektívnejších procesov získavania cenných produktov zo živých organizmov bez potreby ich usmrtenia. Sekrécia mlieka u cicavcov je rukolapným príkladom. Niektoré riasy, napr. sladkovodná zelená riasa *Botryococcus braunii* (obr. 3a), ktorá žije v kolóniách, uvoľňuje oleje v podobe kvapiek, ktoré je možné jednoduchým spôsobom izolovať (Amara *et al.* 2011). Využitie takéhoto princípu pri získavaní zaujímavých látok, ktoré sú riasy schopné produkovať, je veľmi atraktívne a púta pozornosť biotechnológov.

Biopalivá sa vyrábajú procesom transesterifikácie neutrálnych lipidov triglyceridov (TAG), pričom vedľajším produktom je glycerol. Lipidy sú však aj súčasťou bunkových membrán, a to vo forme glykolipidov, fosfolipidov, sulfolipidov a sterolov. Tieto lipidy majú polárny charakter. Vyvíjajú sa technológie s cieľom využiť a transformovať aj takéto lipidy, čo by do značnej miery zvýšilo výťažok biopalív.

Rýchlo sa rozvíjajúca syntetická biológia ponúka nové možnosti vnášania syntetického genómu do rias, čo umožňuje rýchle a komplexné manipulácie s génmi a optimalizáciu fotosyntetickej aktivity buniek (Georgianna a Mayfield, 2012)

Schopnosť rias využívať odpadové vody a možnosť ich pestovania na poľnohospodársky nevyužiteľnej pôde, umožňuje výrobu biopalív aj v rozvojových krajinách. Výhodou rias je aj ich schopnosť vychytávať z vody dusík a ťažko odstrániteľný fosfor, čo znižuje riziko eutrofizácie vôd a zvyšuje kvalitu získanej biomasy (Georgianna a Mayfield, 2012).

Záver

Znižujúce sa zdroje fosílnych palív a ich zvyšujúca sa spotreba a cena poháňa výskum a vývoj stále k efektívnejším technológiám. Veľká pozornosť sa venuje mikroriasam, ktoré v sebe ukrývajú významný biotechnologický a environmentálny potenciál. Prehľad výhod využívania mikrorias ako producentov biopalív uvádza tab. 2. Očakáva sa, že biopalivá produkované mikroriasami sa čoskoro stanú komerčne dostupnými, a to aj vďaka využitiu nových inovatívnych prístupov syntetickej bioló-

gie. Vypracovávajú sa fotobioreaktory na báze CO₂ fixujúcich fotosyntetizujúcich mikrorias, optimalizujú sa podmienky pre maximalizáciu výťažkov a pre tvorbu látok obsiahnutých v biomase, ktoré môžu nájsť mnohoročné praktické uplatnenie. Ukazuje sa, že práve komplexné spracovanie biomasy mikrorias, využitie čo najširšej palety rozmanitých produktov, ktoré riasy poskytujú, je reálnou cestou pre ekonomické pestovanie mikrorias v dohľadnej budúcnosti.

Tab. 2: Výhody mikrorias ako producentov biopalív

- ✓ Minimálne požiadavky pre rast (CO₂, slnečné žiarenie, voda)
- ✓ Obnoviteľný zdroj
- ✓ Využívanie nielen nepolárnych triglyceridov pre produkciu biopalív, ale aj polárnych lipidov, ktoré sú súčasťou membrán
- ✓ V porovnaní s olejnatými plodinami vyšší výťažok aj z menšej plochy
- ✓ Môžu sa pestovať na poľnohospodársky nevyužitelných pôdach
- ✓ Biomasa využiteľná nielen v energetike, ale aj vo farmácii, v potravinárstve, v poľnohospodárstve, pri očiste životného prostredia, v moderných biotechnológiách
- ✓ Využívanie odpadových vôd na získavanie živín
- ✓ Zachytávanie CO₂ z priemyselných spalín a tým znižovanie emisií
- ✓ Schopnosť rásť aj v extrémnych podmienkach (nízke pH, vysoká salinita, rôzna optimálna teplota)

Abstract

Microscopic algae are able to fix CO₂ very efficiently and an interest in algae as a source of biofuels has recently risen dramatically. The biological sequestration of CO₂ has been the only economically acceptable and environmentally sustainable technology producing renewable energy for a long time. The effectivity of biofuel production is directly proportional to the lipid content in the cells. Many microalgae strains naturally contain lots of lipids – about 20-50 % of dry biomass, exceptionally up to 85 %. The lipid content can be increased by optimizing factors that affect cell growth. Genetic engineering may be used to improve and modify algae strain as well. A broad diversity of the microalgae application is remarkable as well as potential applications in pharmacy, food and feed industry, agriculture, wastewater treatment and modern biotechnology. Algal biofuel production will be most economical when combined with other industrial processes.

Literatúra

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied energy*. 88, 2011, pp. 3402-3410.
BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae- A review of technologies for production, processing, and extractions biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 2010, pp. 557-577.
CHEN, CH.-Y.; YEH, K.-L.; AISYAH, R.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Cultivation, photobioreactors design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Biore-source Technology*. 102, 2011, pp. 71-81.
GEORGIANNA, D. R.; MAYFIELD, S. P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*. 488, 2012, pp. 329-335.
PITTMAN, J. K.; DEAN, A.P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algae biofuel production using waste water treatment. *Bioresource Technology*. 102, 2011, pp. 17-25.
SINGH, N. K.; DHAR, D. W. Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy Sust. Developm.* 31, 2011, pp. 605-629.
STEPHENS, E.; ROSS, I. L.; MUSSGUNG, J. H.; WAGNER, L. D.; BOROWITZKA, M. A.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Future prospects of microalgal biofuel production system. *Trends in Plant Science*. 15, 10, 2010 pp. 554-564.

Ukradnuté chloroplasty – plastidy mimo rastlinnej ríše a ich biotechnologický potenciál

Simona Trubačová, Mária Macejová,
Juraj Krajčovič

Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave
simona.trubacova@gmail.com,
macejova@gmail.com
krajcovic@fns.uniba.sk

Úvod

Keď 24. decembra 1968 astronaut misie Apollo 8, William Anderson, namieril objektív fotoaparátu z mesačného povrchu nad jeho horizont, vytvoril prvú farebnú fotografiu Zeme. Obrázok dnes známy pod názvom „Earthrise“ tak po prvýkrát umožnil ľuďstvu vidieť Zem ako modro-zelenú planétu. Od svojho vzniku pred približne 4,6 miliardami rokov prešla Zem obrovskými zmenami. Pomerne skoro po vytvorení vhodných podmienok (pred cca. 4 miliardami rokov) vznikli prvé, pravdepodobne anaeróbne organizmy, no takmer vzápätí sa objavili aj prvé organizmy schopné oxygennej fotosyntézy, sinice/cyanobaktérie (v staršej anglickej literatúre označované ako modro-zelené riasy). Fotosyntéza umožnila organizmom využívať energiu slnečného žiarenia a kyslík uvoľňovaný pri procese oxidácie vody sa akumuloval v atmosfére. Premena atmosféry Zeme sa pokladá za významný medzník v evolúcii a biodiverzite života. Chloroplasty nielen ako nástroje fotosyntézy, ale i ako organely, v ktorých sa odohrávajú aj iné metabolické procesy (vtedy je lepšie používať všeobecnejší termín plastidy), predstavujú nevyhnutnú podmienku života na Zemi vo formách, v akých ho poznáme.

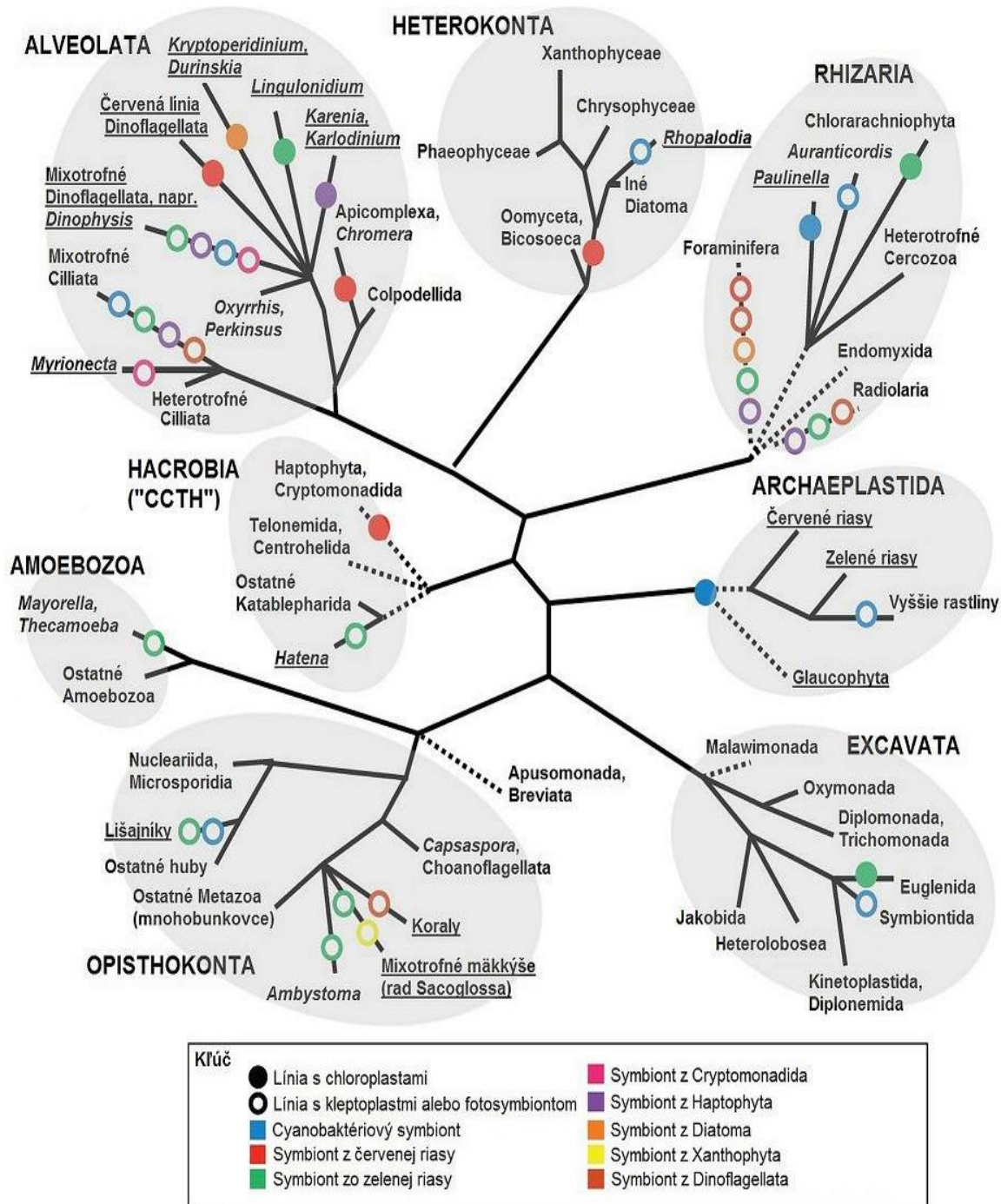
Plastidy

Proces fotosyntézy, vykonávaný fotoautotrofnými organizmami – cyanobaktériami, resp. fotosyntetizujúcimi riasami a rastlinami s chloroplastami (obsahujú fotosynteticky aktívny pigment chlorofyl), nielen že fixujú CO_2 a produkujú kyslík, no poskytujú energiu a stavebné látky potrebné pre život takmer všetkých živých organizmov. Pred viac ako 100 rokmi Konštantín Sergejevič Merežkovskij ako prvý prišiel s myšlienkou, podľa ktorej sú chloroplasty potomkami cyanobaktérií (siníc), ktoré boli pohltené živočíšnymi bunkami. Všetky plastidy sú teda pravdepodobne potomkami jedinej endosymbiózy a jej evolučný úspech spočíval v schopnosti hostujúceho endosymbionta poskytovať hostiteľskej bunke uhlík, vďaka čomu redukovala alebo úplne eliminovala potrebu hostiteľskej bunky prijímať potravu (Weber a kol., 2006). V chloroplastovej DNA (plastóm) je lokalizovaných približne 100 génov (50-200) kódujúcich rRNA a

tRNA, ako aj proteíny zapojené do fotosyntézy a transkripcie a translácie plastidových génov. Väčšina proteínov plastidu je v súčasnosti kódovaná jadrom. Funkcia plastidov však nespočíva len vo fotosyntéze. Sú zapojené aj do rôznych iných kľúčových metabolických procesov v bunke (biosyntéza aminokyselín, mastných kyselín, hému; depozit zásobných látok). Tieto funkcie zostávajú lokalizované v plastidoch aj u takých taxónov, ktoré stratili schopnosť fotosyntézy. Plastidy niektorých eukaryotov sú obalené dvomi membránami (primárne plastidy), iných tromi alebo štyrmi membránami (komplexné, resp. sekundárne plastidy). Podľa endosymbiotickej teórie primárne plastidy sú potomkami voľne žijúcich cyanobaktérií – primárna endosymbióza, t. j. prokaryot v eukaryotovi, v úlohe endosymbionta v ňom vystupovala cyanobaktéria a hostiteľom bol heterotrofný prvok. O komplexných (sekundárnych) plastidoch sa predpokladá, že vznikli udomácnením sa eukaryotickej riasy, ktorá už mala plastidy obalené dvomi membránami, v eukaryotickom hostiteľovi (sekundárna endosymbióza – eukaryot v eukaryotovi). Evolúcia endosymbionta v plastid je spätá so stratou viacerých funkcií hostiteľskej bunky – výsledkom je väčšinou jej úplná závislosť na funkčných plastidoch (prehľad Vesteg a kol., 2009).

Zlodeji chloroplastov

Všeobecnú predstavu, že iba rastliny, riasy a niektoré baktérie sú schopné zachytávať slnečné žiarenie a premieňať ho na energiu prostredníctvom fixácie oxidu uhličitého, v posledných rokoch spochybňujú objavy a štúdium symbiotických živočíchov zadržiavajúcich fotosyntetické symbionty, resp. chloroplasty (prehľad prítomnosti kleptoplastov a fotosyntetických symbiontov na obr. 1). Živočíchy kmeňov Porifera (hubky), Cnidaria (pŕhlivce), Acoelomorpha (bezčrevovce), Chordata (chordáty) a Mollusca (mäkkýše) si vyvinuli mechanizmy na získavanie produktov fotosyntézy prostredníctvom „vypožičania“ si schopnosti fotosyntézy vytvorením fotosyntetických asociácií s neporušenými jednobunkovými riasami alebo cyanobaktériami (Venn a kol., 2008). Hubky a pŕhlivce majú prirodzene prispôbenú stavbu tiel pre využívanie produktov fotosyntézy veľkým pomerom povrchovej plochy k objemu, čo podporuje čo najefektívnejšie zachytávanie slnečného žiarenia.



Obr. 1. Prehľad distribúcie fotosyntézy u rôznych skupín eukaryotov (upravené podľa Dorrell a Howe, 2012). Plnofarebné kruhy označujú prítomnosť trvalých chloroplastových línií, kružnice označujú prítomnosť kleptoplastov, alebo fotosymbiontov. Farba korešponduje s označením prokaryotických a eukaryotických línií, z ktorých sú chloroplasty odvodené. Prítomnosť viacerých kruhov na jednotlivých vetvách zodpovedá prítomnosti niekoľkých druhov symbiontov u rozličných zástupcov skupiny.

Pozoruhodným príkladom takejto fotosyntetickej asociácie je medúza zlatá, *Mastigias papau etpisoni*, unikátny poddruh, obývajúcí jediné izolované morské jazero na ostrove Palau, malej republiky v Mikronézii (obr. 2) (Dawson, 2005). Telá týchto medúz poskytujú domov zoskupeniam stoviek fotoautotrofných rias, ktoré získavajú energiu priamo zo slnečného žiarenia a zásobujú organizmus hostiteľa produktmi fotosyntézy. Medúzy

prijímajú riasy potravou v juvenilnom štádiu, tie pretrvávajú v bunkách medúzy a v dospelosti tvoria približne 10 % jej celkovej biomasy. Takýto spôsob života však neznamená iba anatomicke prispôsobenie. Každé ráno pri východe slnka medúzy putujú smerom na východ a zároveň s jeho pohybom po horizonte sa podvečer vracajú na západnú stranu jazera, kde pretrvávajú do rána.



Obr. 2. Medúza zlatá (*Mastigias papau etpisoni*)
Zdroj: <http://assets.natgeotv.com/Photos/12/31244.jpg>

Milióny jedincov sa každý deň vznášajú vo vodnom stĺpci jazera, v hĺbkach do ktorých preniká dostatočné množstvo slnečného svitu, zhromažďujú sa na hladine zaliatých lúčmi tropického slnka, kde sa pomaly otáčajú, aby tak poskytli riasam čo najväčšie množstvo svetla.

Existujú však i organizmy, ktoré pri získavaní schopnosti využívania energie slnečného žiarenia prostredníctvom fotosyntézy zašli „ešte ďalej“. Tieto organizmy nevytvárajú fotosyntetickú asociáciu s bunkami fotoautotrofných cyanobaktérií alebo rias, ale ponechávajú si chloroplasty zo svojej koristi, fotosyntetizujúcich rias. Takéto ukradnuté plastidy, nazývané kleptoplasty, možno pozorovať u viacerých prvkov, napríklad heterotrofných panciernatiek (Johnson, 2010).

Pravdepodobne najzaujímavejším a najznámejším „zlodejom“ plastidov sú však mäkkýše z radu *Sacoglossa*, najmä rod *Elysia* a jeho zástupca *Elysia chlorotica* (obr. 3).



Obr. 3. *Elysia chlorotica* (podľa Mackenzie a Le Page 2010)

Tieto morské slimáky, obývajúce brakické vody východného pobrežia USA, získavajú chloroplasty zo svojej potravy, rias *Vaucheria litorea*, po vylihanutí počas prvých dní života. Juvenilné jedince radulou narúšajú bunkovú stenu týchto žltozelených rias a sajú ich

bunkový obsah. Ten je následne strávený, s výnimkou chloroplastov, ktoré sa neporušené fagocytózou dostávajú do buniek tráviaceho epitelu. Metamorfóza larválnych jedincov je úplne závislá od prítomnosti riasy v prvom týždni života, po ktorom sú chloroplasty stabilne začlenené do buniek, v priamom kontakte s cytosolom hostiteľských buniek, obalené len dvomi chloroplastovými membránami. Hoci zadržiavanie ukradnutých plastidov nie je jedinečným fenoménom iba pre tieto živočíchy, ich unikátnosť spočíva v dlhodobej funkčnosti. Zatiaľ čo iní zástupcovia radu *Sacoglossa* dokážu využívať chloroplasty len niekoľko hodín, dospelé jedince *E. chlorotica*, študované v laboratórnych podmienkach, žijú bez akéhokoľvek prijímania potravy 9 až 12 mesiacov, pričom vyžadujú iba svetelné žiarenie a zdroj oxidu uhličitého (Rumpho a kol., 2011).

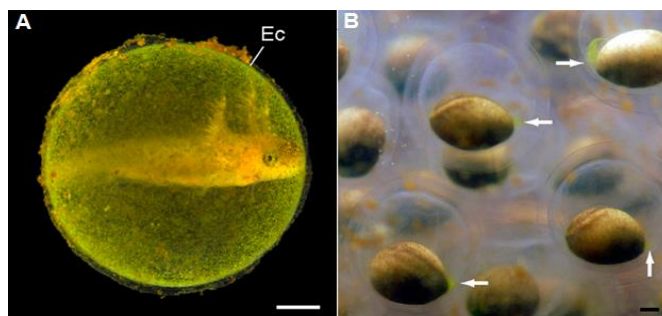
Symbiotická asociácia medzi fotosyntetizujúcimi riasami a stavovcami

I napriek tomu, že symbiotické asociácie medzi živočíchmi a fotosyntetizujúcimi mikroorganizmami nepredstavujú niečo absolútne nezvyčajné, ešte donedávna zoznam takýchto symbiotických vzťahov nezahrňal ani jedného stavovca. Tím doktora Kerneyho (2011) sa zameriaval na pomerne dobre známy mutualistický vzťah medzi jednobunkovými zelenými riasami *Oophila amblystomatis* a embryami obojživelníka, axolotla *Ambystoma maculatum*. Embryá tohto obojživelníka (sfarbením pripomínajúceho u nás žijúce salamandry) sa vyvíjajú vo vajčkách obalených želatínovou masou, s charakteristickým zeleným sfarbením, ktoré spôsobujú riasy obklopujúce vyvíjajúce sa embryá (obr. 4).

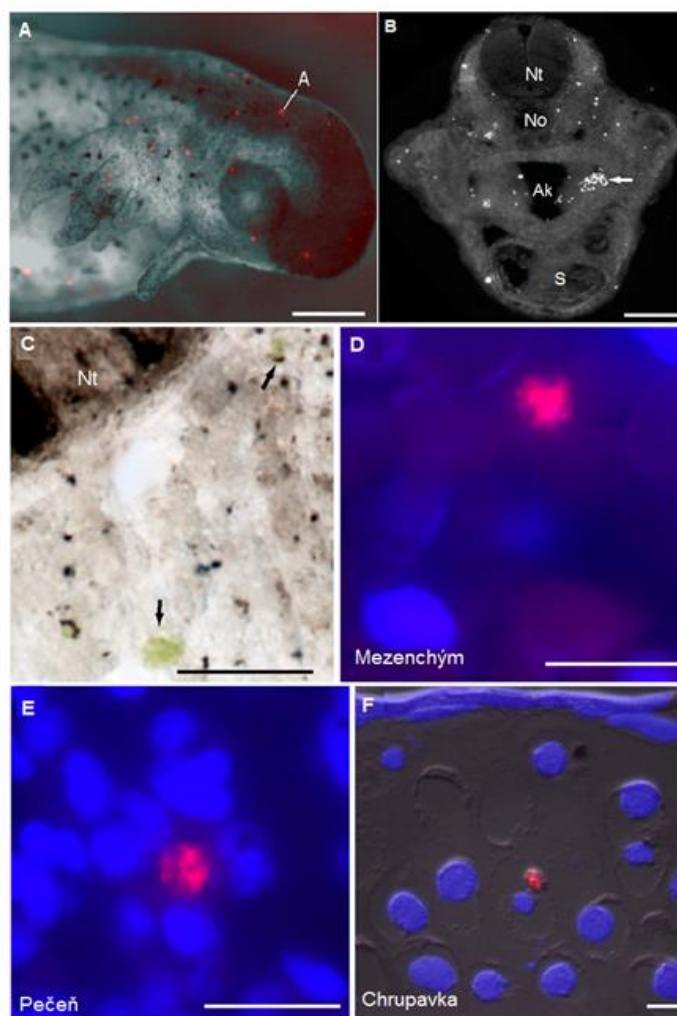
V tomto mutualistickom vzťahu využívajú riasy metabolity produkované vyvíjajúcim sa embryom a prostredníctvom fotosyntetických reakcií poskytujú embryám kyslík. Tento blízky vzťah dvoch rozličných organizmov však podľa posledných zistení môže byť oveľa bližší ako sa predpokladalo. Štúdie dokumentujú (Kerney a kol. 2011), že riasy nielenže obklopujú vyvíjajúce sa embryá axolotla, ale vstupujú i do ich tkanív a buniek. Fluorescenčná mikroskopia jasne ukazuje bunky rias v rôznych tkanivách (obr. 5), napr. v epiderme, neurálnej trubici, formujúcich sa očných šošovkách, kraniálnom mezenchýme, s najväčšou koncentráciou v alimentárnom kanále a žltkovom vaku. Chloroplasty endogénnych rias si zachovávajú štandardnú štruktúru s granami tylakoidov a škrobovými granulami. Prítomnosť takýchto štruktúr môže čiastočne pripomínať kleptoplasty mäkkýšov z rodu *Elysia*. Embryonálne bunky neprejavujú žiadne príznaky bunkovej nekrózy alebo apoptózy a štrukturálne sa javia ako susediace bunky bez vnútrobunkových „hostí“. Hoci sa väčšina vnútrotkanivových i vnútrobunkových rias vytráca v neskorších larválnych štádiách axolotlov, ich prítomnosť môže hostiteľským bunkám

udeľovať metabolické výhody. Otázne ale ostáva, čo umožňuje vytvorenie vnútrobunkovej symbiózy medzi bunkami stavovca a fotosyntetizujúcimi riasami. Kľúčovým faktorom je pravdepodobne ešte nevyvinutý imu-

nitný systém embrya, ktorý ak je u stavovcov funkčný, rozpoznáva a odstraňuje cudzie bunky. Ďalším nezanedbateľným faktorom u obojživelníkov je ich unikátna regeneračná schopnosť.



Obr. 4. Bunky rias *Oophila amblystomatis* vstupujúce do tkanív axolotla *Ambystoma maculatum* (upravené podľa Kerney a kol., 2011). **A)** Embryo vo vnútri vaječnej kapsuly (EC). **B)** Snímka z časozbernej nahrávky (mierka = 50 μ m).

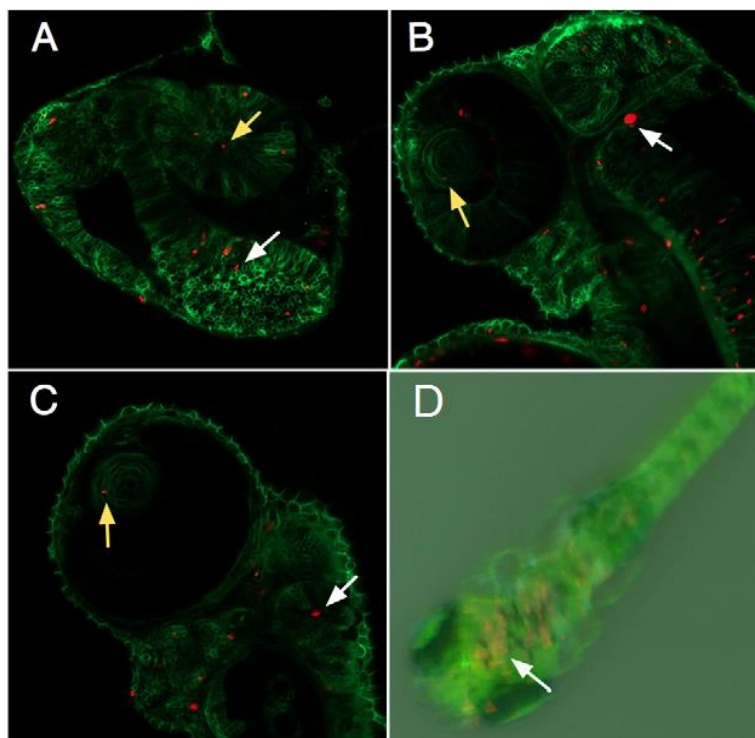


Obr. 5. Distribúcia buniek rias v telách embryí (upravené podľa Kerney a kol., 2011)

A) Embryo zbavené vaječnej kapsuly – červené body (A) autofluorescenčné bunky rias. **B)** Priečný vibratómový rez – šípka naznačuje nahromadenie autofluorescenčných buniek rias, (Nt) neurálna trubica, (No) notochord, (Ak) alimentárny kanál, (S) srdce. **C)** Rozptýlené bunky rias v kraniálnom mezenchýme zobrazené svetelnou mikroskopiou javiace zelené sfarbenie, (Nt) neurálna trubica. **D) – F)** Bunky rias zobrazené v tkanivách pomocou FISH: **D)** v kraniálnom mezenchýme, **E)** v pečeni, **F)** v chondrocyte (mierka: 1 mm v A – B; 50 μ m v C; 20 μ m v D – F).

Veľmi pozoruhodný príklad možnosti endosymbiôzy fotoautotrofných mikroorganizmov a živočíšnych buniek ponúkol kolektív doktorky Agapakis (2011). Podarilo sa im experimentálne preukázať, že cyanobaktérie *Synechococcus elongatus*, môžu vstupovať do buniek zebričky pruhovanej (*Danio rerio*), rybičky známej nielen medzi akvaristami, ale i ako modelový objekt genetiky a molekulárnej biológie. Do embryí *D. rerio* sa v jednobunkovom štádiu mikroinjekčne aplikovalo viac ako desať miliónov buniek cyanobaktérií *S. elongatus* za účelom sledovania vzťahu medzi bunkami embrya zebričky a bunkami cyanobaktérií počas embryogenézy. Červeno fluoreskujúce bunky cyanobaktérií sa našli v priebehu vývinu intracelulárne rozptýlené v hostiteľských bunkách bez detegovateľných morfológických zmien (obr. 6). Cyanobaktérie prežili v bunkách rybičky viac ako 12 dní, po ktorých bol experiment ukončený, vzhľadom na začínajúcu pigmentáciu, blokujúcu prenikanie svetelného žiarenia k cyanobaktériám. Autofluorescencia buniek cyanobaktérií časom klesala, hoci u cyanobaktérií v mozgu zebričky ostala pozorovateľná dlhšie ako 12 dní. Pre porovnanie sa do embryí v rovnakom vývoji injektovali bunky baktérií *Escherichia coli*. V tom prípade dochádzalo k smrti embryí do dvoch hodín, i napriek tomu, že bunky *E. coli* boli pred injekciou usmrtené UV žiarením, alebo sa eliminovala produkcia lipidu A, bakteriálneho endotoxínu. V ďalšom kroku sa experimentálne sledovala možnosť invázie cyanobaktérií do buniek cicavcov. Cyanobakté-

rie *S. elongatus* boli geneticky upravené tak, aby produkovali invazín, proteín z baktérie *Yersinia pestis*, ktorý interaguje s cicavčím proteínom pri pohlcovaní baktérii cicavčou bunkou a lysteriolyzín O z baktérie *Lysteria monocytogenes*, hemolytický proteín narúšajúci membrány endozómov a umožňujúci vstup baktérii do cytosolu cicavčej bunky. Takto pripravené cyanobaktérie kultivované s cicavčím bunkami efektívne vstupujú do buniek cicavčej línie ovariálnych buniek čínskeho škrečka. Agapakis a kol. (2011) preskúmali i vstup cyanobaktérií *S. elongatus* do cicavčích makrofágov prostredníctvom fagocytózy myšimi makrofágmi. Rovnako ako u embryí zebričiek, pohltené bunky *E. coli* pomerne rýchlo usmrcojú hostiteľské makrofágy, zatiaľ čo prítomnosť cyanobaktérií *S. elongatus* v cicavčích makrofágoch je možné pozorovať niekoľko dní. Makrofágy sú dôležitou súčasťou imunitného systému cicavcov, vyhľadávajúce a pohlcujúce cudzorodé látky a baktérie prenikajúce do organizmu. Z tohto dôvodu práve schopnosť cyanobaktérií uniknúť tráveniu vo fagozómoch je predpokladom pre ich vnútrobunkové udržanie sa a prípadnú endosymbiotickú reprodukciu. Na základe takéhoto unikátneho vzťahu fotoautotrofného mikroorganizmu s antibakteriálnym systémom eukaryotov autori experimentu predpokladajú, že cyanobaktérie *S. elongatus* s vnesenými génmi pre heterológnu produkciu proteínov invazín a lysteriolyzín O, môžu byť schopné sa deliť v cytosole cicavčích buniek (Agapakis a kol., 2011).



Obr. 6. Sledovanie intracelulárnych cyanobaktérií druhu *Synechococcus elongatus* počas vývoja zebričiek druhu *Danio rerio* (upravené podľa Agapakis a kol., 2011). Viditeľné červené autofluorescenčné bunky cyanobaktérií v bunkách; biele šípky naznačujú prítomnosť cyanobaktérií v mozgu, žlté šípky naznačujú prítomnosť cyanobaktérií v očiach. A) 1. deň po injektovaní. B) 2. deň po injektovaní. C) 3. deň po injektovaní. D) 12. deň po injektovaní.

Fotosyntetizujúce stavovce

Výsledky opísaných experimentov sa môžu zdať prekvapivé, významne však prispievajú k hľadaniu odpovede na otázku, či by bolo možné vytvoriť živočíchy, predovšetkým stavovce, ktoré by dokázali získavať energiu pre svoj život prostredníctvom slnečného žiarenia. Realizácia fantastického projektu tzv. „Zelenej kravy“ (možno aj „Zeleného človeka“) sa preto stáva uskutočniteľnejšou ako pri zrode tejto futuristickej myšlienky.

Väčšina dnes známych živočíchov schopných fotosyntézy prostredníctvom symbiotických asociácií s jednobunkovými riasami alebo cyanobaktériami, ako sú napríklad koralý, hubky, sasanky, ascídie, nezmary a lastúrniky, majú spôsob života veľmi podobný rastlinám, a táto ich vlastnosť by preto mohla byť nevyhnutná pre vytvorenie fotosyntetickej asociácie, no existuje i veľká skupina voľne žijúcich fotosyntetizujúcich živočíchov, ako napríklad medúzy a morské mäkkýše, ktoré nevyhnutnosť statického spôsobu života popierajú. Mnohé zo skupín fotosyntetizujúcich živočíchov, ako sasanky a koralý, majú rozkonárenú štruktúru tela, morské mäkkýše, napr. z rodu *Elysia*, majú listom podobný tvar, ktorý dodáva týmto živočíchom plochu využiteľnú pre čo najefektívnejšie zachytávanie slnečného žiarenia (Venn a kol., 2008). Hoci zatiaľ nie je jasné, či sú embryá axolotlov *A. maculatum* schopné získavať riasami fixovaný uhlík (Kerney a kol., 2011), ak by dospelé jedince žijúce väčšinu svojho života v úkryte potenciálne dokázali získavať aspoň časť energie prostredníctvom fotosyntézy, riziko vystavovaniu sa slnečnému žiareniu a opustenie úkrytu počas dňa by pravdepodobne prevyšovalo energetický benefit (MacKenzie a Le Page, 2010).

Vytvorenie fotosyntetizujúcich stavovcov by vyžadovalo zabudovanie fotosyntetického aparátu do ich tkanív. Takýmto aparátom by mohli byť bunky mikroskopických rias, alebo cyanobaktérie. Kandidátom na takúto asociáciu sú cyanobaktérie rodu *Synechococcus* (Agapakis a kol., 2011), panciernatky z rodu *Symbiodinium*, alebo zelené riasy z rodu *Chlorella*, ktoré zahŕňajú väčšinu symbiontov z dnes známych fotosyntetických vzťahov (Venn a kol., 2008). Prvou bariérou limitujúcou vytvorenie fotosyntetickej asociácie je degradácia alebo vylúčenie fotoautotrofného symbionta z hostiteľskej bunky. Po vniknutí potenciálneho symbionta je nevyhnutná i jeho možnosť deliť sa v hostiteľskej bunke, a tak v nej pretrvať počas niekoľkých bunkových cyklov. Nedávne štúdie naznačujú, že navodenie vnútrobunkovej symbiózy medzi koralmi a panciernatkami z rodu *Symbiodinium* signifikantne mení transkriptóm hostiteľského organizmu. Tieto zmeny zahŕňajú najmä modifikácie regulácie génov zapojených do procesov metabolizmu, remodelingu cytoskeletu a apoptózy (Dorrell a Howe, 2012).

Genetické inžinierstvo by raz potenciálne mohlo byť schopné vytvoriť stavovca, získavajúceho energiu fixá-

ciou oxidu uhličitého prostredníctvom fotosyntézy. Otáznym však ostáva, či by množstvo takto získanej energie postačovalo na úspešné prežitie takéhoto živočícha. Schopnosť vytvorenia symbiotického vzťahu záleží od mnohých faktorov. Jedným z nich je stabilita hostiteľskej fotoautotrofnej bunky alebo chloroplastu pretrvávajúcich v bunkách hostiteľa. Hostiteľské bunky s predpokladom pre zachovanie niektorých dôležitých faktorov z buniek svojej koristi, umožňujúcich dlhšie prežívanie symbiontov, môžu mať výhodu pri vytváraní takýchto asociácií. Ďalším z kritérií je i schopnosť hostiteľa využívať metabolity produkované symbiontom. Novonadobudnutý chloroplast alebo fotosyntetizujúci symbiont je potenciálne nebezpečný pre svojho hostiteľa. Reakcie fotosyntézy v podmienkach hostiteľskej bunky môžu produkovať reaktívne formy kyslíka, poškodzujúce nielen chloroplasty ale i hostiteľskú bunku (Dorrell a Howe, 2012). Nevyhnutnou by tak pravdepodobne okrem iného bola i ochrana týchto živočíchov pred intenzívnym ultrafialovým žiarením a prehrievaním organizmu, najmä u suchozemských fotosyntetizujúcich stavovcov. Výpočty využívajúce údaje o množstve fixovaného uhlíka prostredníctvom asociácie panciernatiek z rodu *Symbiodinium* a koralov (MacKenzie a La Page 2010) vedú k záverom, že energia získaná fotosyntézou v prípade fotosyntetizujúcej ryby s váhou 500 gramov by niekoľkokrát prevyšovala jej minimálne nároky na množstvo energie. To naznačuje možnosť pomerne efektívneho získavania energie fotosyntézou i u väčších stavovcov, ktoré majú menší pomer povrchu a objemu tela. Podľa Stuarta Sundina (Scripps Institute of Oceanography, La Jolla, California) dokážu fotosyntetizujúce koralý fixovať 3 až 80 gramov uhlíka na štvorcový meter za deň, čo predstavuje 126 až 3360 kilojoulov. Povrchová plocha ryby s typickým tvarom tela vrátane plochy plutiev a hmotnosťou 500 gramov predstavuje približne 0,045 m². Minimálny príjem energie takejto ryby podľa odborníčky na výživu rýb Ingrid Lupatsch (Swansea University, UK) tvorí 40 kilojoulov, z čoho vyplýva, že takáto ryba, využívajúca fotosyntetickú asociáciu s panciernatkami z rodu *Symbiodinium*, by pri najefektívnejšej fixácii uhlíka, mohla byť schopná získať energiu, ktorá by presahovala jej minimálne požiadavky na energetický príjem takmer štvornásobne (MacKenzie a Le Page, 2010).

Záver

Intratkanivové vstupovanie buniek fotoautotrofných mikroorganizmov, rias alebo cyanobaktérií do embryí alebo cicavčích bunkových línií predstavuje prekvapivú, no nádejnú endosymbiotickú asociáciu medzi fotosyntetizujúcimi organizmami a živočíchmi, dokonca stavovcami, či cicavcami. I napriek tomu, že vytvorenie fotosyntetizujúcich stavovcov, napríklad hovädzieho dobytká, by mohlo byť dosiahnuteľným cieľom, náklady na jeho realizáciu by s ohľadom na možnosť produkcie potravín

mohli presiahnuť jeho benefity. Nemenej zaujímavú aplikáciu poznatkov získaných prostredníctvom štúdia symbiotických asociíí fototrofných mikroorganizmov, či plastidov s inými organizmami, prináša možnosť vytvorenia syntetických plastidov a ich biotechnologickú aplikáciu, napr. pri produkcii biopalív a biomateriálov. Geneticky modifikovaný hostiteľský organizmus, nesúci takéto syntetické plastidy, by mohol byť schopný efektívne využívať produkty fotosyntézy, no i nefotosyntetizujúce plastidy, produkujúce zaujímavé metabolity, by mohli byť biotechnologicky veľmi prínosné. Skonštruovanie mikroorganizmov, napr. kvasiniek, nesúcich nefotosyntetizujúce plastidy by mohlo poskytovať nový reakčný priestor s unikátnymi vlastnosťami, ako napríklad kapacitu pre syntézu mastných kyselín alebo terpénov, biofarmák, biodegradabilných plastov, či iných biomedicínsky využiteľných látok.

Abstract

Chloroplasts are cell organelles of photosynthetic organisms (usually plants and algae), in which CO₂ fixation and synthesis of vital organic compounds take place. Chloroplasts originated from free-living cyanobacteria (blue-green algae), which became endosymbiont in eukaryotic host cell. However, the ability to use sunlight energy through photosynthesis is not limited to plants and algae. The improvement of the energy balance through the acquisition of chloroplasts (or photosynthetic microorganisms) attracts organisms outside the plant kingdom as well. The nature offers examples of symbiotic relationships between phototrophic organisms and primary nonphotosynthetic protozoans and animals. There are several cases of functional stolen chloroplasts (kleptoplasts) in invertebrates, what is stimulating for research and potential utiliza-

tion of photosynthetic organelles or symbionts by vertebrates. The outcome of these findings could be the project of „Green Cow“, or other potential biotechnological or synthetic-biological applications.

Literatúra

- AGAPAKIS, C. M., NIEDERHOLTMEYER, H., NOCHE, R. R., LIEBERMAN, T. D., MEGASON, S. G., WAY, J. C., SILVER, P. A. (2011). Towards a synthetic chloroplast. *PLoS One*. 6(4): 1-8.
- DAWSON, M.N. (2005). *Five new subspecies of Mastigias (Scyphozoa: Rhizostomeae: Mastigiidae) from marine lakes, Palau, Micronesia*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 85: 679-694.
- DORRELL, R.G., HOWE, C.J. (2012). What makes a chloroplast? Reconstructing the establishment of photosynthetic symbioses. *Journal of Cell Science*. 125: 1865-1875.
- JOHNSON, M.D. (2010). The acquisition of phototrophy: adaptive strategies of hosting endosymbionts and organelles. *Photosynth Res.* 107(1): 117-132.
- KERNEY, R., KIM, E., HANGARTER, R. P., HEISS, A. A., BISHOP, C. D., HALL, B. K. (2011). Intracellular invasion of green algae in a salamander host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 6497-6502.
- MACKENZIE, D., LE PAGE, M. (2010). Dawn of Plantimals. *New Scientist* 208: 32-35.
- RUMPHO, M. E., PELLETREAU, K. N., MOUSTAFA, A., BHATTACHARYA, D. (2011). The making of photosynthetic animal. *J Exp Biol*. 214: 303-311.
- VESTEG, M., VACULA, R., KRAJČOVIČ, J. (2009). On the origin of chloroplasts, import mechanisms of chloroplast-targeted proteins, and loss of photosynthetic ability. *Folia Microbiol.* 54: 303-321.
- WEBER, A. P., LINKA, M., BHATTACHARYA, D. (2006). Single, ancient origin of a plastid metabolite translocator family in Plantae from an endomembrane-derived ancestor. *Eukaryot Cell*. 5(3): 609-612.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Vplyv absencie anionických fosfolipidov na fyziológiu kvasinky *Kluyveromyces lactis*

Annamária Bardelčíková,
Margita Obernauerová
Katedra mikrobiológie a virológie,
Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave
obernauerova@fns.uniba.sk

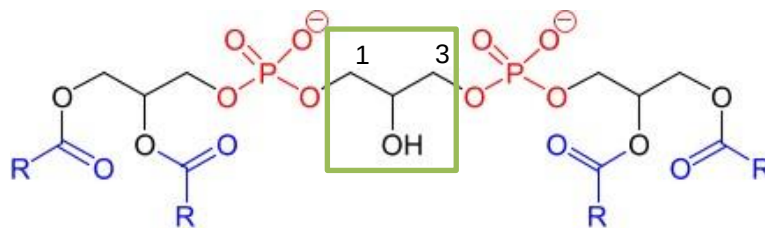
Membrány sú dynamické štruktúry s aktivitami prebiehajúcimi tak na ich povrchu ako aj vo vnútri ich fosfolipidovej dvojvrstvy. Fosfolipidy okrem toho, že sú základnými stavebnými zložkami biologických membrán participujú aj na ich funkčných aktivitách. Anionické fosfolipidy – kardiopín (CL) a jeho prekursor fosfatidylglycerol (PG) napriek svojmu minoritnému zastúpeniu (0,1 % – 30 %) sú nie len špecifickou, ale aj esenciálnou zložkou membrán. Ich obsah výrazne ovplyvňuje životaschopnosť ako aj základné funkcie buniek. V eukaryotických organizmoch sú lokalizované výlučne vo vnútornej

membráne mitochondrií, kým v prokaryotických organizmoch sa nachádzajú v cytoplazmatickej membráne, teda v membránach zapojených do energetického metabolizmu bunky.

CL je dimérny fosfolipid, ktorý vo svojej molekule obsahuje na centrálnom glycerole naviazané ďalšie dve molekuly fosfatidylglycerolu (v polohe 1 a 3) (obr. 1). Reťazce štyroch mastných kyselín naviazané na fosfatidylglyceroly majú 14-18 uhlíkov dlhé reťazce, pričom práve množstvom a zastúpením jednotlivých mastných kyselín sa kardiopín líši od ostatných fosfolipidov čo

súvisí s jeho špecifickou funkciou v bunke. Dimerická štruktúra tohto fosfolipidu mu umožňuje interagovať s jednotlivými podjednotkami oligomérnych proteínov a tým vytvárať stabilné, biologicky aktívne supramoleku-

lárne štruktúry charakteristické hlavne pre proteíny respiračného reťazca (Schlame a kol., 1990; Yamaoka-Koseki a kol., 1991; Nomura a kol., 2000; Petrosillo, a kol., 2003; Visahl a kol., 2004).



Obr. 1. Štruktúra kardiolípinu. V zelenom štvorci označený je centrálny glycerol, ktorý má v polohe 1 a 3 naviazané dve molekuly glycerolu. Reťazce mastných kyselín sú rozlíšené modrou farbou (<http://www.chemgapedia.de>). (upravené)

Z uvedeného vyplýva množstvo dôležitých funkcií, ktoré CL zastáva tak z hľadiska fyziologického, genetického ako aj patofyziologického. Má kľúčovú úlohu v biogenéze a funkcii mitochondrií, pri udržiavaní integrity buniek v stresových podmienkach prostredia (zvýšená teplota, osmotický šok), je potrebný pre transport fosfátov, je esenciálny z hľadiska biogenézy bunkovej steny, resp. vstupu buniek do apoptózy (Fry a Gree, 1981; Vishal a kol., 2004; Boekema a Braun, 2007). Štúdie ukazujú, že mitochondriálny CL je u kvasiniek *S. cerevisiae* asociovaný s hlavnými proteínmi respiračného reťazca a oxidačnej fosforylácie: komplexom III (ubichinónocytochróm c reduktáza, bc_1), komplexom IV (cytochróm c oxidáza), komplexom V (F_0F_1 -ATP syntetázy), ADP/ATP prenášačom a prenášačom fosfátu – P_i (Zhang a kol., 2002; Pfeiffer a kol., 2003; Vishal a kol., 2004). V bunkách bez CL dochádza k zníženiu účinnosti protón-transportnej kapacity respiračného reťazca a k zníženiu prepojenia respirácie so syntézou ATP. Následkom toho sú do prostredia uvoľňované elektróny ľahko reagujúce s molekulami kyslíka za vzniku reaktívnych kyslíkových radikálov – ROS, ktoré poškadzujú bunky (Chen, a kol., 2008). CL interaguje aj s proteínmi iných bunkových procesov ako napr. s β_2 -glykoproteínom (Kertesz a kol., 1995), dnaA proteínom (Sekimizu a Kornberg, 1988), histónami (Hirai a kol., 1992), DNA polymerázou (Yoshida a kol., 1989), RNA polymerázou (Schlame a kol., 2000), topoizomerázou I (Alving, 1986), adenosínmonofosfátdeaminázou (Purzycka-Preis a Zydowo, 1987), glycerolfosfátacyl-transferázou (Scheideler a Bell, 1989).

Syntéza CL prebieha v mitochondriách a zahŕňa tri po sebe nasledujúce reakcie. Esenciálnym enzýmom tejto biosyntetickej dráhy je fosfatidylglycerolfosfát syntáza kódovaná génom *PEL1/PGS1* (Chang a kol., 1998; Džugasová a kol., 1998). Prerušenie/mutácia génu pre fosfatidylglycerolfosfát syntázu ($\Delta pgs1$) katalyzujúcu syntézu fosfatidylglycerolu (PG) ako prekursora kardiolípinu (CL) u kvasinky *S. cerevisiae* spôsobuje deficienciu ako PG tak aj CL. Mutácia následne vyvoláva pleiotrópny fenotyp buniek nezlučiteľný s rastom na nefermentovateľnom zdroji uhlíka a s tým súvisiacou zníže-

nou respiráciou (Šubík 1974; Janitor a kol., 1996; Chang a kol., 1998). Dôsledkom *pgs1* mutácie u kvasinky *S. cerevisiae* je okrem neschopnosti rastu pri 37 °C (Džugasová a kol., 1998) aj znížená hladina β -1,3-glukánu, t. j. tieto mutantné kmene sú termosenzitívne a majú defekt v syntéze bunkovej steny (Zhong a kol., 2007). Neprítomnosť CL a PG však nie je pre túto *petite*-pozitívnu, fakultaívne anaeróbnu kvasinku letálna, avšak súčasnú stratu anionických fosfolipidov a mtDNA bunky neprežívajú (Šubík 1974; Janitor a Šubík, 1993; Džugasová a kol., 1998).

Pre *petite*-negatívnu, striktnu aeróbnu kvasinku *K. lactis* je delécia alebo úplná strata mtDNA letálna (Clark-Walker a Chen, 1996). *Petite*-negativita pri tomto druhu kvasiniek súvisí so súčasnou stratou jednotlivých komponentov respiračného reťazca a oxidačnej fosforylácie (Clark-Walker a Chen, 2001). Štúdie vysvetľujúce príčinu *petite*-negativity ukázali, že špecifické mutácie v jadrových génoch *ATP1 (MGI2)*, *ATP2 (MGI1)* a *ATP3 (MGI5)*, kódujúce α , β a γ podjednotky F_1 -ATP syntetázy, tzv. *mgi* (mitochondrial genome integrity) mutácie majú schopnosť suprimovať *petite*-letalitu zapríčinenú deléciou mtDNA u tohto druhu kvasiniek. Mechanizmus supresie spočíva v zmene štruktúry časti F_1 komplexu F_1F_0 -ATP-syntetázy, v dôsledku ktorej nedochádza ku kolapsu elektrického potenciálu na vnútornej membráne mitochondrií u buniek, ktoré stratili F_0 komplex kódovaný mtDNA (Chen a Clark-Walker a kol., 2000).

Letálny účinok na kvasinku *K. lactis* má aj prerušenie génu *PGS1* čo naznačuje ešte vyššiu mieru esenciality anionických fosfolipidov než v prípade kvasiniek *S. cerevisiae*. V našom laboratóriu sme ukázali, že letalita vyvolaná absenciou anionických fosfolipidov u kvasinky *K. lactis* je taktiež suprimovaná jednou z *mgi* mutácií a to mutáciou v géne *ATP2*, kódujúcom β podjednotku F_1 -ATP syntetázy. Dvojitý mutant *Klatp2.1pgs1Δ*, ktorému chýbajú oba anionické fosfolipidy má obmedzený rast na fermentovateľnom substráte a má znížený obsah cytochrómov a a c, cytochróm b mu chýba. Z uvedeného dôvodu nie je schopný využívať respiračný substrát a teda nie je schopný vytvoriť membránový potenciál mechanizmom oxidačnej fosforylácie. Vďaka prítomnos-

ti *atp2.1* mutácie, membránový potenciál nevyhnutný pre biogenézu mitochondrií a pre viabilitu svojich buniek vytvára opačnou funkciou F_1F_0 ATP-syntázy a to zvýšenou aktivitou ATPázy (Palovičová a kol., 2012).

Zhrnúc uvedené, deficiencia anionických fosfolipidov má významný pleiotrópny efekt hlavne na biogenézu a funkciu mitochondrií, vrátane stability a enzýmovej aktivity respiračných komplexov, prepojenosti respirácie a oxidačnej fosforylácie a s tým súvisiacej tvorby mitochondriálneho membránového potenciálu. PG môže kompenzovať nedostatok CL v niektorých, nie však vo všetkých jeho funkciách. Ďalšie štúdie však poukazujú aj iné významné úlohy anionických fosfolipidov v tzv. non-mitochondriálnych procesoch súvisiacich s udržiavaním integrity buniek (Zhong a kol., 2007).

Abstract

Biological membranes are a dynamic structure with a large number of cellular functions. Phospholipids are crucial structural and functional elements of membranes. Cardiolipin (CL) and its precursor phosphatidylglycerol (PG) are found almost exclusively in the inner mitochondrial membrane, where CL is major anionic phospholipid. CL play a important role in mitochondrial biogenesis by optimizing the activities of enzymes in the oxidative phosphorylation pathway, stabilizing the supercomplexes of respiratory chain complexes III and IV and transport proteins, such as the ATP/ATP translocator or phosphate translocator. CL is involved in maintaining the optimal mitochondrial internal structure, in protein import and in maintaining mtDNA. It is also important for some non-bioenergetic functions such as cell wall synthesis or the mitochondrion-vacuole signalling pathways. The absence of CL and PG originated by the mutation/disruption of the *PGS1* gene (coding phosphatidylglycerolphosphate synthase, an essential enzyme of the CL biosynthetic pathway) in the petite-positive yeast *Saccharomyces cerevisiae* is not lethal, contrary to the *petite*-negative yeast *Kluyveromyces lactis*, where the loss of anionic phospholipids has a fatal effect. Recently was shown, that the *atp2.1* suppressor mutation increased the viability of aerobic *K. lactis* lacking anionic phospholipids by increasing the hydrolysis of ATP to provide the potential required for the import of mitochondrial proteins indispensable for mitochondrial biogenesis.

Literatúra

ALVING, C. R. (1986) Antibodies to liposomes, phospholipids and phosphate esters. *Chem. Phys. Lipids*. 40: 303-314.
BOEKEMA, J. E., BRAUN, H. P. (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* 282(1): 1-4.
CLARK-WALKER, G. D., CHEN, X. J. (1996) A vital function for mitochondrial DNA in the petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 252: 929-938.
CLARK-WALKER, G. D., HANSBRO, P. M., GIBSON, F., CHEN, X. J. (2000) Mutant residues suppressing ρ^0 -lethality in *Kluyveromyces lactis* occurs at contact sites between subunits of F_1 -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1478:125-137.
CLARK-WALKER, G. D., CHEN, X. J. (2001) Dual mutation reveal interactions between components of oxidative phosphorylation in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics*. 159: 929-938.

DŽUGASOVÁ, V., OBERNAUEROVÁ, M., HORVÁTHOVÁ, K., VACHOVÁ, M., ŽÁKOVÁ, M., ŠUBÍK, J. (1998) Phosphatidylglycerolphosphate synthase encoded by the *PEL1/PGS1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* is localized in mitochondria and its expression is regulated by phospholipid precursors. *Curr. Genet.* 34:297-302.
FRY, M., GREEN, D. E. (1981) Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 256(4):1874-80.
GOHIL, V. M., HAYES, P., MATSUYAMA, S., SCHÄGGER, H., SCHLAME, M., GREENBERG, M. L. (2004) Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent. *J. Biol. Chem.* 279: 42612-42618.
CHANG, SC., HEACOCK, P. N., CLANCEY, C. J., DOWNHAN, W. (1998) The *PEL1* gene (renamed *PGS1*) encodes the phosphatidylglycerophosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 9829-36.
CHANG, S., HEACOCK, P. N., MILEYKOVSKAYA, E., VOELKER, D. R., DOWHAN, W. (1998) Isolation and characterization of the gene (*CLS1*) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 14933-14941.
CHEN, X. J., CLARK-WALKER, G. D. (1993) Mutations in *MGI* genes convert *Kluyveromyces lactis* into a petite-positive yeast. *Genetics*. 133: 517-525.
CHEN, S., HE, Q., GREENBERG, M. L. (2008) Loss of tafazzin in yeast leads to increased oxidative stress during respiratory growth. *Mol. Microbiol.* 68: 1061-1072.
HIRAI, H., NATORI, S., SEKIMIZU, K. (1992) Reversal by phosphatidylglycerol and cardiolipin of inhibition of transcription and replication by histones in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 458-63.
JANITOR, M., OBERNAUEROVÁ, M., KOHLWEIN, S. D., ŠUBÍK, J. (1996) The *pel1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is deficient in cardiolipin and does not survive the disruption of the *CHO1* gene encoding phosphatidylserine synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* 140: 43-7.
JANITOR, M., ŠUBÍK, J. (1993) Molecular cloning of the *PEL1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* that is essential for the viability of petite mutants. *Curr. Genet.* 24:307-312.
KERTESZ, Z. YU, B. B., STEINKASSERER, A., HAUPT, H., BENHAM, A., SIM, R. B. (1995) Characterization of binding of human beta 2-glycoprotein I to cardiolipin. *Biochem. J.* 310: 315-21.
NOMURA, M., NOGI, Y., OAKES, M. (2004). Transcription of rDNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In "The Nucleolus" (M. O. J. OLSON, Ed.): 128-153. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
PALOVIČOVÁ, V., BARDELČÍKOVÁ, A., OBERNAUEROVÁ, M. (2012) Absence of anionic phospholipids in *Kluyveromyces lactis* cells is fatal without F_1 -catalysed ATP hydrolysis. *Can. J. Microbiol.* 58: 694-702.
PETROSILLO, G., RUGGIERO, F. M., PARADIES, G. (2003) Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J.* 17(15): 2202-8.
PFEIFFER, K., GOHIL, V., STUART, A. R., HUNTE, C., BRANDT, U., GREENBERG, M. L., SCHÄGGER, H. (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278: 52873-52880.
PURZYCKA-PREIS, J., ZYDOWO, M. M. (1987) Regulatory effect of pig heart phospholipids on heart muscle AMP-deaminase. *Int. J. Biochem.* 19: 565-8.
SEKIMIZU, K., KORNBERG, A. (1988) Cardiolipin activation of dnaA protein, the initiation protein of replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263: 7131-5.
SCHEIDELER, M. A., BELL, R. M. (1989) Phospholipid dependence of homogeneous, reconstituted sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264: 12455-61.

SCHLAME, M., RUA, D., GREENBERG, M. L. (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid. Res.* 39(3): 257-88.

SCHLAME, M. (2007) Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J. Lipid. Res.* 49(8): 1607-20.

ŠUBÍK, J. (1974) A nuclear mutant of *S. cerevisiae* non-tolerating the cytoplasmic petite mutation. *FEBS Lett.* 42:309-313.

VISHAL, G. M., HAYES, P., MATSUYAMA, S., SCHÄGGER, H., SCHLAME, M., GREENBERG, M. L. (2004) Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent. *J. Biol. Chem.* 279(41): 42612-8.

YAMAOKA-KOSEKI, S., URADE, R., KITO M. (1991) Cardiolipins from rats fed different dietary lipids affect bovine heart cytochrome c oxidase activity. *J. Nutr.* 121(7): 956-8.

YOSHIDA, S., TAMIYA-KOIZUMI, K., KOJIMA, K. (1989) Interaction of DNA polymerases with phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1007: 61-66.

ZHANG, M., MILEYKOVSKAYA, E., DOWHAN, W. (2002) Gluing the respiratory chain together. *J. Biol. Chem.* 277 (46): 43553-43556.

ZHONG, Q., LI, G., GVOZDENOVIC-JEREMIC, J., GREENBERG, M. L. (2007) Upregulation of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae* suppresses temperature sensitivity of the *pgs1Δ* mutant. *J. Biol. Chem.* 282 (22): 15946-15953.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Tioredoxínový systém aktinomycét – terapeutický terč

Michaela Koháryová, Marta Kollárová

Katedra biochémie,
Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
koharyova@fns.uniba.sk
kollarm@fns.uniba.sk

Aktinomycéty – dobré aj zlé

Aktinomycéty sú mikroorganizmy tvoriace veľmi špecifickú skupinu grampozitívnych baktérií. Sú typickým príkladom konvergentnej evolúcie medzi prokaryotickými baktériami a eukaryotickými hubami. Od ostatných baktérií sa odlišujú svojím zložitým životným cyklom, ktorý pripomína skôr životný cyklus vyšších organizmov – húb (obr. 1). (Chater, 1986).

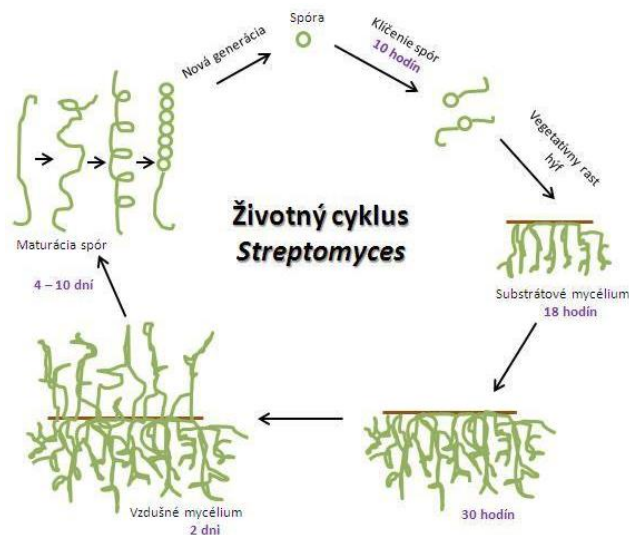
V prírode majú aktinomycéty nezastupiteľnú úlohu. Vyskytujú sa najmä v pôde, ktorej dodávajú typický zemitý pach, ale prítomné sú aj v sedimentoch, komposte, krmivách, vodných usadeninách a omietkach vlhkých budov. V zemi sa podieľajú na rozklade organických látok, vrátane nerozpustných zložiek organizmov ako napr. lignocelulóza a chitín, čím sa zároveň podieľajú na recyklácii uhlíka. Rad Actinomycetales je tvorený až ôsmimi čeľadami, do ktorých patria chemoorganické, saprofytické ale aj parazitické baktérie. Vyznačujú sa rozsiahlou produkciou sekundárnych metabolitov (tab. 1), ktoré sa dodnes využívajú v priemysle.

Až 55 % bioaktívnych sekundárnych metabolitov objavených v „zlatej ére antibiotík“ sú produkované rodom *Streptomyces*. Ich blízky príbuzní z rodu *Mycobacteriaceae* sú naopak pôvodcami vážnych ochorení, ako sú tuberkulóza a lepra (obr. 2).

Hoci sa tuberkulóza považuje za liečiteľnú, vo svetovom meradle ju Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) prirovnáva k časovanej bombe a to hlavne z dôvodu rezistencie patogénnych baktérií. V celosvetovom meradle tuberkulóza zabíja viac ľudí ako AIDS, malária a tropické choroby spolu. Denne na ňu zomiera viac ako 8 000 ľudí. Ak sa túto hrozbu nepodarí zneškodniť pomocou nových účinných liečiv, podstupujeme riziko, že v blízkej budúcnosti budeme musieť bojovať s infekčnou chorobou, rezistentnou na súčasné liečivá, ktorá sa šíri vzduchom a stane sa tak prakticky nevyliciteľnou.

Tab. 1. Stručný prehľad sekundárnych metabolitov produkovaných aktinomycétami

Sekundárny metabolit	Názov
Antibiotiká	Streptomycín, erytromycín, tetracyklín, neomycín, chloramfenikol, vankomycín, gentamycín
Antimykotiká	Nystatín, amfotericín
Protirakovinové liečivá	Doxorubicín, bleomycín, mitomycín
Imunosupresíva	Rapamycín
Herbicídy	Bialaphos



Obr. 1. Životný cyklus rodu *Streptomyces*



Obr. 2. Vybraní zástupcovia aktinomycét (zľava do prava):

Streptomyces coelicolor – pôdna baktéria. Na kolóniách sú viditeľné kvapky modrého antibiotika aktinorodínu, ktoré sa udržiavajú na povrchu vďaka hydrofóbnej povahe hýf a spór (Zdroj: Dr Paul A. Hoskisson, John Innes Centre, Norwich, UK.).

Mycobacterium tuberculosis – pôvodca tuberkulózy. (Zdroj: <http://www.flickr.com/photos/sanofi-pasteur/5280405700/in/photostream/lightbox/>).

Mycobacterium leprae – pôvodca lepry na obrázku z kožnej lézie (Zdroj: <http://www.niaid.nih.gov/topics/leprosy/Research/Pages/newBacterium.aspx>).

Tioredoxínový systém

Tioredoxínový systém bol objavený v organizmoch všetkých evolučných úrovní – od archaea a prokaryotov až po eukaryoty vrátane človeka. Je zložený z bielkovín tioredoxínu (Trx), enzýmu tioredoxínreduktázy (TrxR) a koenzýmu NADPH (Holmgren, 1985). Väčšina organizmov má v bunkách aj ďalší, funkčne podobný glutatión/glutaredoxínový systém (Gilbert, 1990). Oba systémy zodpovedajú za udržiavanie redukovaného stavu proteínov, chránia ich pred oxidáciou počas oxidačného stresu, ale aj pri iných fyziologických procesoch, pri ktorých vznikajú voľné radikály a slúžia teda ako „zhášače“ nežiaducich voľných radikálov. Redukciu – prísun elektrónov pre enzýmy a iné proteíny dokážu tieto systémy sprostredkovať tým, že podliehajú vlastnej tiol-disulfidovej výmene.

Tioredoxíny sú malé, termostabilné, disulfid-obsahujúce redoxné proteíny, lokalizované v cytoplazme, v bunkových membránach, v mitochondriách, v jadre ale aj v extracelulárnom priestore. Všetky tioredoxíny majú podobnú trojrozmernú štruktúru, s konzervovanou aminokyselinovou sekvenciou aktívneho miesta Cys-Gly-Pro-Cys, čo nasvedčuje tomu, že všetky Trx by mohli mať spoločného evolučného predka (Martin, 1995).

Tioredoxínreduktázy sú homodimerické flavoenzýmy, ktoré ako jediné dokážu redukovať oxidovaný Trx. Katalyzujú prenos dvoch elektrónov z NADPH, cez FAD a N-terminálne disulfidové aktívne miesto na substrát. TrxR je pre mnohé organizmy esenciálnym enzýmom a inaktivácia alebo delécia jej kódujúceho génu môže spôsobiť letalitu, ako napr. u gram-pozitívnej baktérie *Staphylococcus aureus* (Uziel a kol., 2004). Evolúciou sa vyvinuli dva typy TrxR: 1. **nízkomolekulové** s veľkosťou

podjednotky 35 kDa (izolované z prokaryotov, *E. coli*, kvasiniek, mykoplaziem, *Gardia duodenalis*, *Arabidopsis thaliana* a *Methanococcus janaschii*), 2. **vysokomolekulové** s veľkosťou podjednotky 55 kDa (izolované s vyšších eukaryotov, človeka a *Plasmodium falciparum*) (Luthman a Holmgren, 1982). Bakteriálne TrxR sa od ľudskej výrazne líšia nielen molekulovou hmotnosťou, ale aj rozdielnou trojrozmernou štruktúrou, mechanizmom katalýzy a substrátovou špecificitou. Predpokladá sa, že zrejme kvôli ľahko prístupnému a vysoko-reaktívnemu aktívnemu miestu TrxR vyšších organizmov má tento enzým funkcie, ktoré nie sú spojené len s funkciami Trx, ale má široké spektrum pre iné nedisulfidové substráty ako napr. pre selenid, hydroperoxydy lipidov a H_2O_2 a iné (Arnér a Holmgren, 2000). Naopak, TrxR s nízkou molekulovou hmotnosťou je veľmi špecifická a okrem Trx akceptuje len veľmi malé množstvo substrátov.

Tieto rozdiely otvárajú potenciál pri cieleňom dizajnovaní inhibítorov a iných liečiv, s možnosťou perspektívneho využitia v terapii vybraných infekčných ochorení, vrátane tuberkulózy.

Tioredoxínový systém patogénov – terč pre vývoj nových liečiv

Cytoplazma patogénov, tak ako iných organizmov, predstavuje vysoko redukované prostredie, v ktorom sa cysteíny proteínov môžu udržiavať v redukovanom stave. Patogény sú však tiež vystavované oxidačnému stresu, ktorý môže byť produkovaný metabolickými dráhami samotných patogénov (reaktívne kyslíkové metabolity), alebo ho ako obranu proti patogénom produkuje hosťujúci organizmus (reaktívne kyslíkové a dusíkové metabolity). Pri zvýšenom oxidačnom strese sa v patogénoch aktivujú rozličné oxidačno-redukčné mechanizmy na detoxikáciu reaktívnych kyslíkových metabolitov, na redukciu vzniknutých neželaných disulfidových väzieb a na opravu poškodení v bunke. Keďže organizmy vo väčšine prípadov obsahujú viaceré systémy a molekuly, ktoré chránia proteíny pred oxidačným poškodením, celkovo ide o zložitú sieť antioxidačných pochodov. V prípade patogénov (ako napr. *M. tuberculosis*), u ktorých však absentuje kooperujúci glutatión-glutaredoxínový systém, je hlavným oxidačno-redukčným systémom práve Trx systém.

Ako ublížiť mykobaktériám?

Správna funkcia Trx systému v boji proti oxidačnému stresu je mimoriadne dôležitá v mykobaktériách. V hosťateľskom organizme prebývajú v makrofágoch, čo predstavuje jednu formu virulencie bacilu. Makrofágy, neutrofily a iné fagocytujúce bunky sú kľúčovými zložkami antimikrobiálnej imunitnej odpovede, pretože dokážu generovať veľké množstvo vysoko toxických molekúl

ako reaktívne kyslíkové a dusíkové metabolity (Chan a kol., 1992, Rich a kol., 1997) a hydrolytické enzýmy ako napríklad kyslé hydrolázy (Clemens a Horwitz, 1995). Napriek takémuto toxickému prostrediu *M. tuberculosis* dokáže vďaka viacerým mechanizmom v hosťateľovi prežiť (Pieters, 2008). Mykobaktérie ako aj ostatné aktinomycéty (napr. *S. coelicolor*) nedokážu syntetizovať glutatión. V ich bunkách sa nachádza mykotiol (Newton a kol., 1996) a redoxná regulácia je pod kontrolou len Trx systému. Potvrdilo sa, že Trx systém zohráva u mykobaktérií úlohu v detoxikácii a zhášaní reaktívnych kyslíkových a dusíkových metabolitov tvorených vo fagocytoch počas infekcie a v poskytovaní redukčných ekvivalentov pre peroxiredoxíny (Shinnick a kol., 1995, Zhang a kol., 1999, Jaeger a kol., 2004). Trx systém týmto spôsobom pomáha prežívať patogénom v hosťateľských bunkách a je pre ne esenciálny.

V roku 2008 bola TrxR *M. tuberculosis* vybraná spomedzi takmer 4000 génových produktov, spolu s ďalšími 541 proteínmi ako perspektívny terapeutický cieľ pre vývoj nových antituberkulotík na základe bioinformatických predikcií (Raman a kol., 2008).

Záver

Pre vývoj nových účinných liečiv je aktuálnym trendom racionálny dizajn inhibítorov na základe vyriešených 3D štruktúr terapeutických cieľov. Najvhodnejšie terče pre inhibítory sú proteíny patogénov, ktoré sú esenciálne pre ich viabilitu. Za týmto účelom boli vykryštalizované proteíny a vyriešené 3D štruktúry TrxR napr. gastrického patogénu *Helicobacter pylori* (Gustafsson a kol., 2007) a *M. tuberculosis* (Akif a kol., 2005). Dizajnovanie a vývoj špecifických inhibítorov je náročná a komplexná záležitosť aj z časového hľadiska. Hoci bolo navrhnutých a testovaných množstvo účinných inhibítorov TrxR *in vitro* (najznámejší je Ebselén, Holmgren a kol., Patentová prihláška číslo 20110288130), zatiaľ sa žiadny nevyužíva v medicíne priamo na účinnú terapiu ochorení vyvolaných patogénmi.

Abstract

Study of structure, function and action of proteins proves the potential of modern biological sciences to seek for new therapeutic targets and opportunities for development of new drugs and antibiotics. The main role of thioredoxin system in all organisms is to protect proteins against the oxidative stress effects and maintain redox homeostasis in cells. All organisms also bear alternative rescue mechanisms, with the exception of actinomycetes, which protect their cells against stress by thioredoxin system only. If we restrict the function of thioredoxine system of specific pathogens, it may cause their weakening or even death.

Literatúra

AKIF, M.; SUHRE, K.; VERMA, C.; MANDE, S. C. Conformational flexibility of *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin

- reductase: crystal structure and normal-mode analysis. 2005. Acta Cryst. D61, 1603-1611.
- ARNÉR, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. 2000. Eur. J. Biochem. 267, 6102-6109.
- CHAN, J.; XING, Y.; MAGLIOZZO, R. S.; BLOOM, B. R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. 1992. J. Exp. Med. 175, 1111-1122.
- CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. 1995. J. Exp. Med. 181, 257-270.
- GILBERT, H. F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. 1990. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 63, 69-172.
- GUSTAFSSON, T. N.; SANDALOVA, T.; LU, J.; HOLMGREN, A.; SCHNEIDER, G. High-resolution structures of oxidized and reduced thioredoxin reductase from *Helicobacter pylori*. 2007. Acta Crystal., D63, 833-843.
- HOLMGREN, A. Thioredoxin. 1985. Annu. Rev. Biochem. 54, 237-271.
- CHATER, K. F. Antibiotic-producing *Streptomyces*. 1986. The bacteria 9, 119-158.
- JAEGER, T.; BUDDE, H.; FLOHE, L.; MENGE, U.; SINGH, M.; TRUJILLO, M.; RADI, R. Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. 2004. Arch. Biochem. Biophys. 423, 182-191.
- LUTHMAN, M.; HOLMGREN, A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. 1982. Biochemistry 21, 6628-6633.
- MARTIN, J. L. Thioredoxin-a fold for all reasons. 1995. Structure 3, 245-250.
- PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. 2008. Cell Host Microbe 3, 399-407.
- RAMAN, K.; YETURU, K.; CHANDRA, N. TargetTB: a target identification pipeline for *Mycobacterium tuberculosis* through an interactome, reactome and genome-scale structural analysis. 2008. BMC Syst. Biol. 2, 109.
- RICH, E. A.; TORRES, M.; SADA, E.; FINEGAN, C. K.; HAMILTON, B. D.; TOOSI, Z. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. 1997. Tuber Lung Dis 78, 247-255.
- SHINNICK, T. M.; KING, H.; QUINN, F. D. Molecular biology, virulence, and pathogenicity of mycobacteria. 1995. Am. J. Med. Sci. 309, 92-98.
- UZIEL, O.; BOROVOK, I.; SCHREIBER, R.; COHEN, G.; AHARONOWITZ, Y. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. 2004. J. Bacteriol. 186, 326-334.
- ZHANG, Z.; HILLAS, P. J.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Reduction of peroxides and dinitrobenzenes by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin and thioredoxin reductase. 1999. Arch Biochem Biophys 363: 19-26.

ZAÚJIMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Konfokálna mikroskopia alebo ako vidieť stromy cez les

Katarína Višacká,
Katarína Gaplovská-Kyselá
Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
gaplovska-kyselak@fns.uniba.sk

Úvod

Konfokálna mikroskopia predstavuje v súčasnosti významný nástroj pri skúmaní dynamických procesov v bunkách mikroorganizmov, rastlín, živočíchov a ľudí, zároveň má široké uplatnenie v súdnom lekárstve a materiálovom inžinierstve.

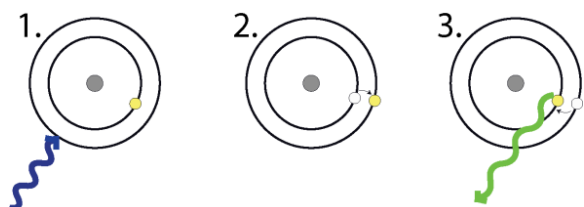
História konfokálnej mikroskopie siaha do 60-tych rokov 20. storočia, keď bol najväčším problémom fluorescenčnej mikroskopie výrazný signál pozadia, ktorý veľmi zhoršoval výsledný obraz. Intenzívny výskum v Československu (Mojmír Petráň) a v Amerike (David Egger a Robert Galambos) viedol k skonštruovaniu prvých konfokálnych mikroskopov (Schuldt, 2009), ktoré dokázali toto nežiaduce pozadie odstrániť.

Fluorescenčná mikroskopia

Vysvetlime si najprv, ako vzniká obraz v klasickom fluorescenčnom mikroskope, aby sme pochopili, čo nové priniesli konfokálne mikroskopy. Fluorescenčná mikro-

skopia využíva na značenie mikroskopických vzoriek fluorescenčné molekuly (nazývané aj fluorochrómy), ktorých jedinečnou vlastnosťou je, že sú schopné na veľmi krátku dobu, kratšiu ako miliónina sekundy, prijať fotóny s kratšou vlnovou dĺžkou a vysielať fotóny s dlhšou vlnovou dĺžkou (obrázok 1). Takto vyžiarené fotóny/svetlo následne pozorujeme. Prvé fluorescenčné mikroskopy boli vytvorené na začiatku 20. storočia, ale pár desaťročí si nik nevšimol ich potenciál. Najprv boli skúmané látky ako kryštály, chlorofyl, vitamíny a anorganické látky, ktoré autofluoreskovali samé, keď boli osvietené ultrafialovým svetlom. Veľký rozvoj fluorescenčnej mikroskopie nastal až v 30-tych rokoch, keď boli objavené prvé fluorescenčné farbičky, ktoré značili špecificky či už tkanivové komponenty alebo baktérie a iné patogény. Ďalším impulzom rozvoja fluorescenčnej mikroskopie bol objav konjugácie protilátok s fluorescenčnými farbičkami v 50-tych rokoch, ktoré boli a dodnes sú užitočnými nástrojmi v bunkovej biológii na špecifické značenie bunkových štruktúr.

Ako sme už spomínali, fluorescenčné mikroskopy, aj keď sú dodnes veľmi užitočnými pomocníkmi v laboratóriách, ponúkajú horšie rozlíšenie v porovnaní s konfokálnymi mikroskopmi. Prečo je to tak? Rozlíšenie, t. j. či sme schopní odlíšiť dva body od seba, je ovplyvnené vlnovou dĺžkou použitého svetla, numerickou apertúrou objektívu, ale taktiež svetlom z iných rovín ako ohniskovej. Pri klasickej fluorescenčnej mikroskopii dochádza k excitácii fluorochrómov v celom objeme vzorky a následne vidíme fluorescenčný signál aj z iných rovín ako z roviny, ktorá nás zaujíma. Tak sa v šume stratia detaily (obrázok 2) a my „cez les nemôžeme vidieť stromy“.



Obr. 1. Princíp fluorescence

1. Elektrón prijme fotón (svetlo s kratšou vlnovou dĺžkou) a excituje sa. 2. Elektrón preskočí do vyššej energetickej hladiny. 3. V milióntine sekundy sa elektrón vráti späť na nulovú hladinu, vysvieti fotón (svetlo s dlhšou vlnovou dĺžkou).

Fluorescenčná mikroskopia má však aj niekoľko unikátnych vlastností, ktoré ju robia nenahraditeľnou. Prvou z nich je rýchlosť snímania, ktorá je krátka a tým pádom užitočná pri pozorovaní živých buniek, ktoré sa menej

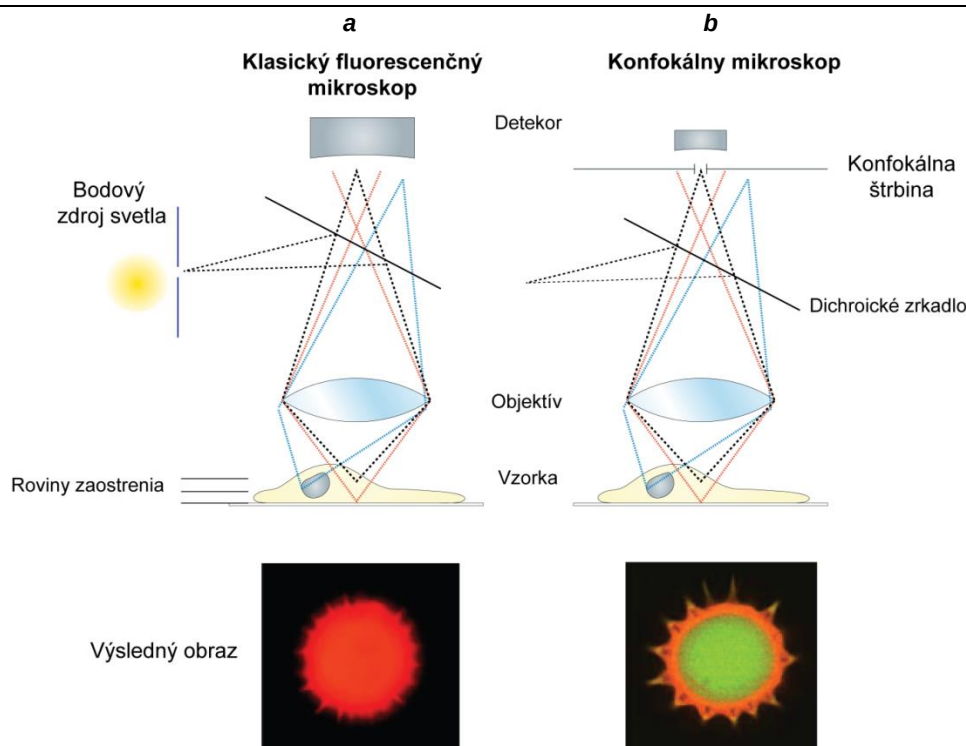
poškodzujú pri krátkom osvetlení fluorescenčným svetlom. Ďalšou výhodou je jednoduchosť obsluhy a tiež cena prístroja.

Konfokálna mikroskopia

Vylepšením konfokálnej mikroskopie v porovnaní s klasickou fluorescenčnou mikroskopiou je to, že môžeme získať obraz len z jednej roviny. Na pochopenie prečo je to tak, si musíme vysvetliť odlišnosti konfokálnej a klasickej fluorescenčnej mikroskopie (Juríková, 2011).

Pri najbežnejšie využívanom type konfokálnej mikroskopie sa ako zdroj svetla využíva laser, ktorý je šošovkou zaostrený len na určitú zónu (obrázok 2). Tým pádom má svetlo najvyššiu intenzitu práve v ohniskovej rovine, i keď je excitované aj isté množstvo fluorochrómov nad ňou a pod ňou. Rozdielom, v porovnaní s fluorescenčnou mikroskopiou je to, že z objektívu je svetlo prenesené do zobrazovacej roviny, kde je do dráhy svetla inštalovaná konfokálna štrbina, ktorá slúži nato, aby cez ňu mohlo prejsť iba svetlo z ohniskovej roviny. Svetlo z ostatných rovín dopadá mimo konfokálnej štrbiny, preto sa na detektor dostane iba signál z ohniskovej roviny (Schuldt, 2009).

Biologické vzorky môžu byť relatívne hrubé, takže vidieť len jednu rovinu, by nám veľa nepovedalo. Keď však zosnímame našu vzorku vo viacerých rovinách, ktoré sú od seba rovnako vzdialené, môžeme pomocou softvéru získať trojrozmerný model vzorky, napríklad bunkového jadra.



Obr. 2. Princíp klasickej fluorescenčnej a konfokálnej mikroskopie. A. Klasická fluorescenčná mikroskopia. B. Konfokálna mikroskopia (Modifikované z Schuldt, 2009; <http://www.olympusmicro.com>)

Zaujímavou metódou na štúdium dynamických procesov na úrovni proteínov v živých bunkách je metóda obnovenia fluorescence po vysvetení (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP). Princípom tejto metódy je intenzívne osvetlenie vybranej oblasti v bunke (napríklad bunkovej membrány, mitochondrie, jadra a i.), čo vedie k vysveteniu-poškodeniu všetkých fluochrómov (fluorescenčných proteínov) v tejto oblasti. Následne sledujeme v presných časových intervaloch obnovenie fluorescence v mieste vysvetenia, čo je spôsobené migráciou fluorescenčných proteínov z iných častí bunky, alebo membrány (Chenette, 2009).

Využitie

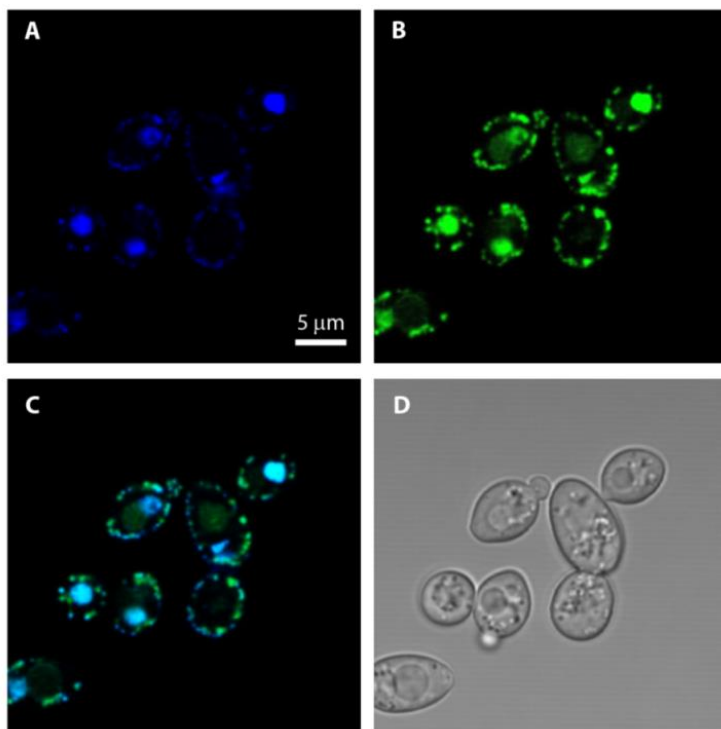
Na našom pracovisku (Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta UK) používame jeden typ konfokálneho mikroskopu. Ako objekty pozorovania nám slúžia rôzne modelové organizmy, predovšetkým však kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*). Kvasinkové bunky majú výhodu v tom, že sú nenáročné na kultiváciu a v pomerne krátkom čase vytvorí jedna bunka veľký počet potomstva, teda veľký počet buniek, ktoré sú identické s pôvodnou materskou bunkou. Taktiež sú veľmi dobre rozpracované molekulárne metódy pre prácu s kvasinkami (ako napr. transformácia kvasiniek plazmidovými DNA a pod.). Všetky tieto aspekty umožňujú pozorovať v samotných bunkách príslušné štruktúry, či organely (jadro, mitochondrie a i.) pomocou farbenia fluores-

cenčnými farbami, ako aj určiť lokalizáciu vybranej/skúmanej látky resp. molekuly.

Najčastejšie používanou fluorescenčnou farbičkou je DAPI, ktorá je excitovaná UV svetlom. Táto farbička sa v kvasinkových bunkách dostáva do jadra a mitochondrií, kde sa viaže na DNA. Výhodou je, že sa neviaže v bunke na žiadne iné štruktúry (obrázok 3A).

V bunkách existuje veľa génov kódujúcich proteíny, o ktorých funkcii a lokalizácii sa nič nevie. Práve lokalizácia môže byť odhalená využitím mikroskopie. Fúzia takéhoto neznámeho proteínu so zeleným fluorescenčným proteínom, ktorý bol prvýkrát izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*, umožní sledovať pohyb študovaného proteínu v bunke a jeho konečnú lokalizáciu (obrázok 3B).

V prípade, že kvasinkové bunky, ktoré obsahujú takýto fúzny proteín, sú farbené zároveň aj farbičkou DAPI, je možné pomocou konfokálneho mikroskopu zistiť, či sa študovaný proteín nachádza v jadre, mitochondriách, alebo v inom kompartmente bunky. Ak sa proteín nachádza v jadre a v mitochondriách, kde sa viaže na DNA (tak ako DAPI), počas kolokalizácie sa zmení farba príslušných bodov v bunke. Teda napríklad, ak fúzny proteín svieti na zeleno a DAPI farbička na modro a obidve sú lokalizované na rovnakom mieste (teda na DNA) výsledný obraz bude zmesou týchto dvoch farieb – teda tyrkysový (obrázok 3C).



Obr. 3. Fotografie z konfokálneho mikroskopu.

A. Kvasinkové bunky farbené fluorescenčnou farbičkou DAPI. **B.** Lokalizácia študovaného proteínu vo fúzii so zeleným fluorescenčným proteínom. **C.** Kolokalizácia DAPI a GFP proteínu. **D.** Kvasinkové bunky zobrazené viditeľným svetlom.

Mierka v obrázku: 5 µm.

Abstract

Fluorescence and confocal microscopy are useful tools in biological research. To choose the right method for observation of the sample, it is inevitable to understand the principles of both methods. Here we provide a short overview of principles and applications of fluorescence and confocal microscopy.

Literatúra

CHENETTE E. J. FCS and FRAP: illuminating cellular processes. In *Nature Cell Biology*. 2009, 11, pp. 13-14.
JURÍKOVÁ K. *Nové trendy v mikroskopických metódach*. Univerzita Komenského, Prírodovedecká Fakulta, 2011.
SCHULDT A. *Seeing the wood for trees*. In *Nature Cell Biology*, 2009, pp. 12-13.
<http://www.olympusmicro.com>
<http://www.nature.com/milestones/light-microscopy>

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Možnosti využitia prístroja Varioskan Flash v bunkovej a molekulárnej biológii

Andrej Dudáš,
Zuzana Firdová,
Marcela Bielíková

Katedra molekulárnej biológie,
Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
andrej.dudas@fns.uniba.sk

Úvod

V poslednej dobe majú vedci k dispozícii viacero prístrojov, ktoré sa vyznačujú multifunkčnosťou, čiže akumulujú v sebe viacero funkcií, ktoré donedávna vykonávali len samostatné prístroje. Okrem toho že predstavujú technologickú špičku, prinášajú so sebou úsporu priestoru a v neposlednom rade aj finančných prostriedkov.

Jedným z takýchto prístrojov je aj Varioskan Flash, ktorý je možné používať ako multifunkčný mikroplatničkový snímač, spektrofotometer, luminometer a fluorometer. Spomínané techniky naznačujú široké možnosti jeho využitia v bunkovej a molekulárnej biológii.

Základná charakteristika prístroja

Varioskan Flash je multifunkčný mikroplatničkový snímač so spektrálnym skenovaním. Umožňuje meranie intenzity fluorescence (FI), „time-resolved“ fluorescence (TRF), absorbancie, luminiscencie, kinetiky a spektrometrie v mikroplatničkách. Vďaka možnosti nastaviť vlnovú dĺžku v neobmedzenom rozsahu je využiteľný pre veľké množstvo rozličných typov experimentov.

Prístroj je vybavený modernou vysoko presnou optikou. Optimálne výsledky pre fluorometriu dosahuje pomocou štyroch monochromátorov. Pre fotometrické merania je určený dvojité monochromátor. Pre účely luminometrie obsahuje dve detekčné optiky, skenovaciu a LumiSens. Skenovacia optika sa využíva najmä pri optimalizácii jednotlivých parametrov luminometrických experimentov. LumiSens optika sa vyznačuje vysokou presnosťou a citlivosťou.

Pre experimenty zamerané na sledovanie kinetiky reakcií môže byť prístroj vybavený až troma nezávislými dávkovačmi. Tieto dávkujú jednotlivé reagenty v presne definovaných časoch a množstvách. Dávkovač uľahčuje prácu a umožňuje rýchlejšiu optimalizáciu experimentov. Prístroj podporuje súčasne dávkovanie a meranie, a tým umožňuje sledovanie kinetických reakcií priamo od začiatku samotnej reakcie. Táto schopnosť je nevyhnutná pre luminiscenčné reakcie tzv. zábleskového typu. Možnosť pridávať činidlá v ľubovoľnom poradí alebo v akejkoľvek fáze kinetickej reakcie umožňuje vykonávanie nadväzujúcich viackrokových analýz. Okrem toho, automatizácia zaručuje vysokú reprodukovateľnosť a minimalizuje odchýlky spôsobené ľudským faktorom. Detail dávkovača na obrázku č. 1.



Obr. 1. Varioskan Flash – multifunkčný mikroplatničkový snímač so spektrálnym skenovaním

Pre udržiavanie optimálnych a konštantných podmienok počas celého experimentu je prístroj vybavený integrovaným inkubátorom. Vďaka tomu je ideálny pre experimenty, v ktorých teplota zohráva kľúčovú úlohu ako napr. enzymatické reakcie, sledovanie procesov v živých bunkách. Dizajn prístroja a umiestnenie držiaka mikroplošiek umožňujú prepojenie s inými automatizovanými systémami.

O chod prístroja sa stará obslužný softvér SkanIt, ktorý je veľmi intuitívny a v logických krokoch umožňuje naplánovať priebeh celého experimentu. Softvér sa dodáva v dvoch verziách: „Research Edition“ je určená pre vedné odbory o živej prírode a „Drug Discovery Edition“ pre farmaceutický priemysel.

Meranie fluorescence

Fluorescencia je jav, pri ktorom pohltitím excitačného svetla danej vlnovej dĺžky fluorescenčnou molekulou dochádza následne k emisii svetla dlhšej vlnovej dĺžky. Intenzita fluorescence (FI) vyžarovaného svetla (RFU) pri daných excitačných a emisných vlnových dĺžkach proporčne zodpovedá koncentrácii skúmanej fluorescenčnej molekuly. Každá fluorescenčná molekula je charakterizovaná dvoma spektrami: excitačným a emisným. Fakt, že neexistujú dve zlúčeniny, ktoré by mali tieto dve spektrá identické, robí z fluorescence vysoko špecifickú analytickú metódu. Jednou z hlavných výhod fluorescence je jej vysoká citlivosť, ktorá umožňuje sledovať aj malé zmeny, ako je napr. zmena koncentrácie iónov v živých bunkách. Medzi techniky založené na fluorescencii patria aj FRET (z anglického *Fluorescence resonance energy transfer*) a TRF (z anglického *Time-resolved fluorescence*).

FRET je založená na rezonančnom prenose excitačnej energie medzi dvoma rôznymi fluorofórmi (donorom a akceptorom) s prekrývajúcim sa emisným a absorpčným spektrom. Fluorofór je molekula schopná po excitácii emitovať svetlo (žiarenie s danou vlnovou dĺžkou). Excitovaný donorový fluorofór emituje fluorescenčné žiarenie a po prekonaní kritickej vzdialenosti (ak sa fluorofóry k sebe dostatočne priblížia, cca 10 nm) dochádza k prenosu energie z excitovaného donora na akceptor, tzv. excitácia akceptora, v dôsledku čoho nastane detegovateľná fluorescencia alebo zmena fluorescence takto excitovanej molekuly. FRET má rozsiahle možnosti použitia pri štúdiu interakcií v živých systémoch. Najviac využívaná je pri štúdiu enzymatického štiepenia DNA alebo proteínových substrátov, proteín-proteínových interakcií a interakcií medzi DNA a proteínmi.

TRF je osobitná forma fluorescence, kde životnosť signálu je výrazne dlhšia v porovnaní s klasickou fluorescenciou. Pri TRF sa používajú lantanidové značky, ktoré majú podobné excitačné a emisné spektrá ako fluorescenčné značky. Každá takáto značka má unikátny parameter životnosti fluorescenčného signálu, ktorý sa označuje τ (tau) a udáva dĺžku fluorescenčnej emisie po

ukončení excitačného signálu. Pri meraní TRF sa na excitáciu lantanidovej značky využíva svetelný záblesk a výsledná emisia je detegovaná s oneskorením v čase špecifickom pre použitú značku. Hlavnou výhodou, ktorú TRF poskytuje, je odstránenie fluorescenčného pozadia, ktoré má zväčša len krátku životnosť po excitácii.

Meranie absorbancie

Princípom je, že keď svetelný lúč vojde do vzorky, tak časť svetla je pohltená vzorkou a zvyšok je transmittovaný, čiže prejde cez vzorku. Absorbancia udáva množstvo viditeľného spektra pohltenej vzorkou.

Meranie luminiscencie

Luminiscencia je emisia viditeľného svetla látkou. Je spôsobená pohybom elektrónov po excitácii z vysokoenergetického stavu do stavu nízkoenergetického. Látka schopná luminiscencie sa nazýva luminofor. Na rozdiel od fluorometrie nevyžaduje žiadne excitačné žiarenie. Podstatou je prebiehajúca chemická reakcia, kde excitácia vzniká na úkor energie uvoľňovanej reakciou. Jednotlivé typy luminiscencie sa líšia podľa zdroja energie, ktorý ju vyvolal. Keď je vyžarované svetlo výsledkom chemickej reakcie, predovšetkým oxidácie, napr. pri pomalej oxidácii fosforu, označuje sa ako chemiluminiscencia. Ak chemická reakcia prebieha v živom systéme, napr. svetielkovanie svätojánskej mušky, hovoríme o bioluminiscencii. Emitované svetlo vzniká v dôsledku chemických reakcií prebiehajúcich v tkanivách živých organizmov a je zväčša slabozelené alebo slabočervené. Takéto svetlo dokážu emitovať niektoré druhy hmyzu, hlbokomorské organizmy, červy, huby a mikroorganizmy, napr. hnilobné baktérie. Varioskan Flash umožňuje detegovať obidva spomínané typy luminiscencie.

BRET (z anglického *Bioluminescence resonance energy transfer*) je nedeštruktívna metóda, ktorá umožňuje sledovať komplexné proteín-proteínové interakcie priamo v živých bunkách. Jej podstatou je nerádioaktívny prenos energie medzi dvoma skúmanými proteínmi, pričom jeden z nich je fúzovaný s luciferázou (bioluminiscent darcu) a druhý s mutantnou formou zeleného fluorescenčného proteínu (GFP) (fluorescenčný akceptor). V prípade interakcie skúmaných proteínov sa luciferáza a GFP dostanú do tesnej blízkosti, prebehne rezonančný prenos energie a zmení sa farba bioluminiscenčnej emisie. Účinnosť prenosu závisí na stupni spektrálneho prekrytia, vzájomnej orientácii a vzdialenosti medzi darcom a akceptorom.

Stanovenie koncentrácie nukleových kyselín

Z veľkého množstva metód bunkovej a molekulárnej biológie, na ktoré je možné využiť prístroj Varioskan

Flash, sa zameriame na stanovenie koncentrácie nukleových kyselín, ktoré reprezentuje metódu používanú asi v každom molekulárno-biologickom laboratóriu.

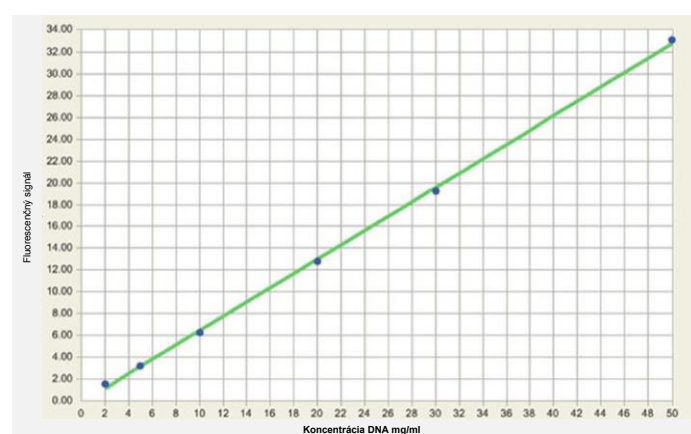
Na prístroji Varioskan je možné stanovovať koncentráciu a čistotu DNA dvoma spôsobmi s využitím dvoch už spomenutých techník, merania absorbancie a fluorescence. Pri klasickom postupe sa absorbancia vzorky stanovuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 260 nm (A260) a 280nm (A280). Molekuly DNA obsahujú purínové a pyrimidínové bázy, ktoré majú aromatický charakter a absorbujú charakteristickým spôsobom ultrafialové žiarenie. Pri vlnovej dĺžke 260 nm majú absorpčné maximum nukleové kyseliny, pri vlnovej dĺžke 280 nm bielkoviny. Ak je hodnota pomeru A260/A280 nižšia ako 1,8, tak je DNA znečistená bielkovinami. Koncentrácia dvojreťazcovej DNA sa stanoví podľa hodnoty nameranej pri A260, kde hodnota rovná 1 zodpovedá 50 µg/ml. Nevýhodou tohto postupu je, že vyžaduje špeciálne mikroplatničky prepúšťajúce ultrafialové svetlo, ktoré sú v porovnaní s bežnými niekoľkonásobne drahšie. Ďalšou nevýhodou je interferencia merania s bežnými kontaminantmi ako sú nukleotidy, jednoreťazcová DNA a RNA.

Alternatívu k spektrofotometrii predstavuje fluorescenčná metóda merania koncentrácie dvojreťazcovej DNA. Podstatou je farbenie DNA pomocou interkalačnej farbičky. Interkaláciou farbičky do molekúl dvojreťazcovej DNA sa v UV svetle emituje fluorescencia, ktorá je priamo úmerná koncentrácii nukleovej kyseliny. Množstvo DNA v skúmanej vzorke sa stanoví porovnaním jej fluorescence s intenzitou fluorescence riedenej sady štandardnej DNA so známou koncentráciou. Ako interkalačná farbička sa používa etídium bromid, ktorý je však pre svoje mutagénne vlastnosti v poslednej dobe stále častejšie nahradzovaný nemutagénnymi alternatívami, ako je napr. PicoGreen (Molecular Probes). Kombinácia Varioskan a PicoGreen je ideálna pre kvantifikáciu dvojreťazcovej DNA. V 96 jamkovej platničke je možné súčasne analyzovať až 88 vzoriek, 8 jamiek je potrebných pre štandard. Celý postup je navyše veľmi zjednodušený možnosťou pridávania PicoGreen činidla ku vzorkám pomocou automatického dávkovača. Pre účely merania sa pripraví PicoGreen činidlo nariadením koncentrovaného roztoku v pomere 1:200 v 1 x TE tlmivom roztoku. Na 1 vzorku je potrebných 100 µl takto pripraveného roztoku. Vzorka sa inkubuje s PicoGreen 20 sekúnd za neustáleho trepania v intenzite 600 otáčok za minútu a s priemerom 1 milimeter. Po následnej 5 minútovej inkubácii sa uskutočňuje samotné fluorescenčné meranie pri excitácii 485 nm a emisii 535 nm. Na grafe č. 1 je príklad vzorovej kalibračnej krivky.

Záver

Prístroj Varioskan Flash vďaka svojej multifunkčnosti poskytuje široké možnosti uplatnenia v molekulárnej a bunkovej biológii, ale aj v ďalších vedných odboroch

a farmaceutickom priemysle. Vďaka vstavaným dávkovačom a pripravenosti na prepojenie s inými automatizovanými systémami umožňuje vykonávať experimenty, ktoré sa vyznačujú vysokou reprodukovateľnosťou a elimináciou chýb meraní spôsobených ľudským faktorom. Vzhľadom na možnosť vykonávať fluorometrické, spektrofotometrické aj luminiscenčné merania je využiteľný v celej škále experimentov využívajúcich tieto techniky. Odporúča sa na experimenty študujúce apoptózu, prenos iónov Ca^{2+} , proliferáciu buniek a metabolické procesy v bunkách. Okrem toho poskytuje možnosť kvantifikácie nukleových kyselín (DNA, RNA), kvantifikácie proteínov, sledovať kinetiku enzymatických reakcií, vykonávať ELISA/FIA/TRF-ELISA testy, FRET/TR-FRET/BRET testy a GPCR testy. Uplatnenie nájde aj pri štúdiu: prenosu cez iónové kanály, fosforylácie prostredníctvom kináz, reportérových génov, mechanizmov prenosu signálov, fluorescence tryptofánu a tyrozínu.



Graf 1. Vzorová kalibračná krivka z fluorescenčného merania DNA na prístroji Varioskan Flash

Abstract

Varioskan Flash is a spectral scanning multimode reader that offers optimal performance for demanding research assays. It provides flexibility for a variety of different applications with unlimited wavelength selection, up to three onboard dispensers, unparalleled optical performance and the advanced Thermo Scientific SkanIt software. Varioskan Flash includes fluorescence intensity, time-resolved fluorescence (TRF), photometric, and luminometric detection technologies. It is designed for optimization and analysis of various assays, such as binding assays, molecular biology assays, enzyme kinetic studies, ion-channel and cell signalling assays. Its versatility makes it indispensable for modern biological laboratory. It is recommended for numerous molecular biology and cellular biology assays such as: Apoptosis assays; Ca^{2+} flux assays; Cell proliferation; Cellular assays; Direct DNA, RNA and protein quantitation; ELISA/FIA/TRF-ELISA assays; Enzyme kinetic studies; FRET assays; TR-FRET assays; BRET assays; GPCR assays; Ion channel assays; Kinase assays; Multilabel assays; Reporter gene assays; Signal transduction; Tryptophan and tyrosine UV fluorescence.

Literatúra

Thermo Scientific Varioskan® Flash User Manual, Rev. 1.2, 2008, dostupné na internete:
<https://static.thermoscientific.com/images/D01523-.pdf>
Thermo Electron Corporation Varioskan® Flash and SkanIt® Software for optimal performance to speed up your assay development. 2006,

dostupné na internete:
<https://static.thermoscientific.com/images/D10829-.pdf>
KERKVELD, M., BREEDING, R. Z. *DNA-quantification using Varioskan and PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit*, Fijnaart. dostupné na internete:
http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_24894.pdf

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Autofluorescencia telových tekutín pre možný skrínning nádorových ochorení

Milan Zvarik, Libuša Šikurová

Fakulta matematiky, fyziky a informatiky
Univerzita Komenského v Bratislave

zvarikmilan@gmail.com
sikuroval@gmail.com

Úvod

Rakovina je celospoločenským problémom, ktorý si každý rok vyžiada svoju daň. Patrí k hlavným príčinám úmrtia obyvateľstva priemyselne vyspelých krajín a je druhou hlavnou príčinou úmrtia v rozvojových krajinách. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) v roku 2008 zomrelo v dôsledku onkologických ochorení 8 miliónov ľudí, čo predstavuje asi 13 % všetkých úmrtí, čím sa rakovina zaraďuje do čela príčin mortality na svete (WHO, 2008). Predpokladá sa, že úmrtnosť bude stále rásť a v roku 2030 presiahne 13 miliónov. Práve rýchla diagnostika choroby je základom pre účinnú liečbu a prispela by k zníženiu tak obrovského čísla.

Autofluorescencia v diagnostike nádorových ochorení

Významné postavenie v oblasti diagnostiky metabolických a kancerogénnych procesov v súčasnej dobe nadobúdajú moderné techniky fluorescenčnej spektroskopie. V porovnaní s inými technikami sú výhodné najmä pre ich rýchlosť, vysokú senzitivitu a neinvazívny charakter. Na tento cieľ môžu využiť charakteristickú vlastnosť tumorového tkaniva, ktoré v porovnaní so zdravým tkanivom vo väčšej miere akumuluje určité chemické látky, ktoré sú schopné fluorescencie.

Fluorescencia ako optický jav je spôsobená prítomnosťou fluorescenčne aktívnych látok – fluoroforov, ktoré sú po excitácii schopné emitovať žiarenie. Fluorescencia biologického materiálu spôsobená prirodzeným výskytom vlastných (endogénnych) fluoroforov je často nazývaná ako autofluorescencia. Prítomnosť určitých fluoroforov v tkanive alebo v biologických tekutinách je typická pre isté fyziologické, respektíve patologické procesy. Keďže fluorescenčné techniky sú založené na detekcii

už molekulových zmien a zachytávajú aj veľmi nízke koncentrácie, sú vhodným prostriedkom na včasnú diagnostiku alebo skrínning.

Sľubnou metódou, ktorá by odhalila včasné štádiá nádorových ochorení aj nedostupných orgánov a tkanív je meranie autofluorescencie telesných tekutín. Krv a moč ako telesné tekutiny priamo odrážajú aktuálne zmeny v organizme, pretože ich zloženie odráža metabolický stav každého orgánu.

Fluorofory teda predstavujú jeden z potenciálnych markerov, ktorý by mohol slúžiť na rýchlu a nenáročnú detekciu a skrínning karcinómov bez potreby odberu nádorového tkaniva. Navyše, zmeny v zložení metabolitov prítomných v telesných tekutinách môžu slúžiť pre potreby pochopenia pozmeneného metabolizmu nádorových buniek.

Možnosti využitia autofluorescencie krvi

Wolfbeis et Leiner (1985) študovali fluorescenciu ľudského séra ako funkciu rôznej excitačnej vlnovej dĺžky. Fluorescenciu séra prezentovali vo forme topografických máp – excitačno-emisných matíc (EEM), aby identifikovali rôzne fluorofory, medzi ktoré patria hlavne tryptofán, NAD(P)H, kyselina 4-pyridoxínová, pyridoxal-5-fosfát a bilirubín viazaný na proteíny.

Leiner et al. (1986) našli signifikantný rozdiel vo fluorescencii séra v blízkej UV oblasti (325 a 365 nm) medzi kontrolami a pacientkami s gynekologickými nádormi.

Xu et al. (1988) pracovali na fakte, že abnormálne molekuly v rakovinových bunkách môžu vstupovať do krvi a nájsť tak rozdiel medzi fluorescenciou séra zdravých dobrovoľníkov a pacientov s rakovinou. Merali absorpčné, excitačné a emisné fluorescenčné spektrá. Keď excitovali sérum pri 290 nm, našli intenzívny emisný pás

pri 340 nm u zdravých aj chorých ľudí. Keď však excitovali vzorku pri 450 nm, pozorovali dva emisné pásy: hlavný pri 630 nm a druhý, slabší pri 690 nm pri pacientoch s rakovinou. U zdravých dobrovoľníkov bol v červenej oblasti spektra pozorovaný len slabý pás. Tieto dva pásy pri 630 a 690 nm predstavujú typické fluorescenčné spektrum séra pacienta s rakovinou. V skupine bolo 110 prípadov a použitím tejto metódy bola dosiahnutá 94,5 % správnosť. Aj keď detekcia rakoviny bola možná, táto metóda nedokázala určiť jej stupeň.

Hubmann et al. (1990) pozorovali rozdiely v sére zdravých dobrovoľníkov a pacientov s rakovinou. Podľa ich zistení je aminokyselina tryptofán zvýšená v krvi pacientov s rakovinou, pretože trpia hypoalbuminémiou a naopak hyperglobulinémiou.

Madhuri et al. (1997) pracovali s natívnou fluorescenčnou spektroskopiou biomolekúl v krvnej plazme, aby rozlíšili rakovinové a normálne vzorky pomocou ultrafialovej fluorescence. Pozorovali charakteristiky krvnej plazmy od normálnych a kancerózných subjektov. Vzorky excitovali v UV oblasti 250 – 340 nm. Emisné spektrum pri excitácii 300 nm vykazovalo značný rozdiel fluorescence medzi krvnou plazmou normálnych a kancerózných subjektov. Pomer intenzít fluorescence medzi 340 a 440 nm bol určený ako kvantifikátor diagnosticky potenciálnej hodnoty. Hodnota pomeru intenzít pri 340/440 nm normálnej krvnej plazmy bola nižšia ako 11 a pre tumory bola táto hodnota vyššia. Navyše tento pomer sa u kancerózneho plazmy menil v rozmedzí 11 – 28, v závislosti od stupňa malignity.

Ganesan et al. (1999) použili natívnu fluorescenčnú charakteristiku krvnej plazmy na rozlíšenie pacientov s poruchami pečene. Ukázalo sa, že priemerné hodnoty intenzít fluorescenčných spektier normálnych a chorých subjektov sa líšia. Pri excitácii pri 405 nm zaznamenali výrazný pík pri 464 nm v normálnych vzorkách, zatiaľ čo patologické vzorky vykazovali červený posun fluorescenčného maxima. Navyše v prípade poškodenia pečene nachádzali aj pík pri 615 nm, pravdepodobne spôsobený endogénnymi porfyrínmi. Pomer intenzít pri 465 nm ku 615 nm použili na odlíšenie patologických vzoriek od normálnych so štatisticky významnou úspešnosťou.

Karthikeyan et al. (1999) použili fluorescenčnú spektroskopiu na rozlíšenie fluorescence vzoriek krvi zdravých myší a myší s kožným karcinómom. Krv bola odobraná z očnej vény použitím heparínovej kapiláry a separácia plazmy, erytrocytov a membrán erytrocytov prebehla centrifugáciou v acetóne. Tieto frakcie boli fluorescenčne analyzované pri excitácii 400 nm pre normálne a kancerózne myši. Membrány erytrocytov oboch vzoriek dosahovali maximum fluorescence pri 440 nm a 630 nm, navyše rakovinové vzorky dosahovali aj pík pri 540 nm. Normálna plazma a erytrocyty ukázali významný pík pri 430 nm, zatiaľ čo vyšších vlnových dĺžkach fluorescence klesala. Plazma a erytrocyty

s rakovinou vykazovali aj druhý pík pri 630 nm, napriek tomu že normálna plazma ani erytrocyty tu fluorescenčný pík nedosahujú. Tri píky pri 470, 530 a 630 nm priradili NAD(P)H, flavínom a porfyrínom. V krvnej plazme a erytrocytoch rakovinových vzoriek bol nájdený signifikantný pokles v pomere intenzít pri 530 a 630 nm. Tento pomer bol u rakovinových vzoriek nižší ako 1, v zdravých vzorkách plazmy dosahoval hodnoty 2 resp. 2,5 u zdravých erytrocytov.

V práci pochádzajúcej od Masilamaniho et al. (2004) bola nájdená zvýšená koncentrácia porfyrínov vo formovaných elementoch krvi a krvnej plazmy u pacientov s rôznym druhom rakoviny v porovnaní so zdravými subjektmi. Bola meraná fluorescence pri excitácii 400 nm a ako indikátor prítomnosti rakoviny bol zvolený pomer intenzít pri 630 a 590 nm. U zdravých dobrovoľníkov bol tento pomer rovný 0,5. U pacientov s rakovinou žalúdka bol zvýšený na 1,2 u skorých štádií a 2,85 v neskorých štádiách. Pri rakovine prsníka bol tento pomer 0,83 resp. 1,56 (skoré resp. neskoré štádium). Skúmali viacero druhov rakoviny, pri všetkých však skoré štádiá vykazovali pomer v rozmedzí 0,8 – 1 a pri neskorých bolo toto číslo väčšie ako 1.

Dramićanin et al. (2006) aplikovali synchronnú fluorescenčnú spektroskopiu na preštudovanie prsníkového tkaniva. Merali fluorescenciu z oblasti excitácie 330 – 650 nm a konštantný interval vlnových dĺžok sa pohyboval od 30 do 120 nm pre 21 zdravých a 21 malígnych vzoriek tkaniva. Zo synchronných spektier s rôznym intervalom posunu medzi excitáciou a emisiou vytvorili 3D vzor synchronných spektier zdravých aj malígnych tkanív. Pomocou nich rozlíšili tri hlavné oblasti zmien medzi zdravým a patologickým tkanivom, ktoré prisúdili extracelulárnym proteínom a koenzýmom (kolagén, elastín, NADH a FAD).

Zhang et al. (2007) merali spektrá krvného séra myší so skorým štádiom sarkómu pri excitácii 400 nm, kde pozorovali emisiu protoporfyrínu IX. Na rozpoznanie skorých štádií rakoviny využil pík-pík hodnotu prvej derivácie emisných fluorescenčných spektier, teda rozdiel najvyššej a najnižšej amplitúdovej hodnoty. V sére myší so sarkómom bola táto hodnota vyššia ako v sére zdravých myší.

Možnosti využitia autofluorescencie moču

Zloženie moču je ovplyvnené telesným metabolizmom, stravou, vekom, hydratáciou a chorobami. Práve preto sa analýza moču využíva na detekciu prítomnosti mnohých chorôb. Štandardný test moču zahŕňa fyzikálne, biochemické a mikrobiologické testy. Biochemická analýza je založená hlavne na kvalitatívnej a kvantitatívnej determinácii jednotlivých komponentov, považovaných za markery poruchy. Takáto analýza využíva pomalé a nákladné techniky (izolácia, purifikácia, etc.), ktoré do

výsledkov prinášajú komplikácie a chyby. V súčasnej dobe rozvoj fluorescenčnej techniky umožňuje výskum analýzy moču pomocou moderných fluorescenčných metód, keďže moč obsahuje množstvo látok schopných fluoreskovať. V porovnaní s inými metódami sa táto metóda vyznačuje rýchlosťou a vysokou senzitivitou.

Meranie autofluorescencie moču má potenciál odlíšiť mnohé zdravotné ťažkosti, ako infekcie vylučovacieho traktu, poruchy obličiek, nefrotický syndróm a gastroenteritídu (Dubayová et al., 2003). Autori merali synchronne fluorescenčné spektrá pri posune excitačného a emisného monochromátora o 30 nm. Pri chronických poruchách obličiek zistili prítomnosť nového píku pri 310 nm, čo priradili fluorescencii proteínov. Rôzne poruchy ako diabetes mellitus, trombocytopénia alebo gastroenteritída vykazovali aj rôzne spektrálne zmeny synchronného spektra. Podľa charakteristického tvaru spektra bolo možné identifikovať rôzne druhy ochorenia. Navyše bolo možné pomocou spektier sledovať priebeh ochorenia. Pri prepustení z nemocnice spektrum vykazovalo charakteristiky zdravého moču, pri relapse ochorenia sa tvar spektra opäť zmenil do patologického stavu. Výsledkom tejto práce bola demonštrácia, že autofluorescencia organických zložiek moču súvisí s patologickým stavom, a môže byť preto využitá na diagnostické účely.

Kušnír et al. (2005) využívali na rozlíšenie patologických zmien v moči koncentračné matice synchronných spektier (KMSS). Merali synchronne spektrá pri posune 30 nm a pri 11 rôznych riedeniach moču. Pomocou týchto spektier vytvoril 3D obrazce, koncentračné matice synchronných spektier, ktoré vykazovali pre zdravý moč charakteristický tvar, odlišný od tvaru KMSS pacientov s hepatopatiou a trombocytopéniou. Práca tak poukazuje na inú možnosť hodnotenia autofluorescencie moču, ktorá pomocou KMSS ponúka kompletný pohľad na zloženie a koncentráciu fluoroforov v moči.

Anwer et al. (2009) použili na odhalenie bakteriúrie fluorescenčnú spektroskopiu moču. Neriedený zdravý a patologický moč excitovali pri 290 nm a sledovali emisiu v oblasti 350 – 500 nm. Zistili, že pre zdravý moč je charakteristická veľmi nízka fluorescencia v tejto oblasti, oproti vysokej a do značnej miery variabilnej fluorescencie moču s bakteriúriou. Vysokú fluorescenciu patologického moču vysvetlili nižšou koncentráciou tryptofánu a jeho metabolitov a tým zníženiu efektu vnútorného filtra, ktorý nastáva pri fluorescencii zdravého moču.

Masilamani et. al (2010) sú jediní autori, ktorí sa zamerali na detekciu rakoviny pomocou merania fluorescencie moču. Vzorky moču pochádzali od 100 zdravých dobrovoľníkov a 50 pacientov s rôznym typom rakoviny (8 pacientov s rakovinou prsníka, 10 krčka maternice, 5 hrubého čreva, 6 pažeráka, 10 pečene, 6 močového mechúra a 5 pacientov s leukémiou). V zdravom moči pri excitácii 400 nm namerali fluorescenciu pri 485 nm s ramenom pri 444 nm, ktorú priradili fluorescencii voľ-

ného, resp. viazaného NADH, a slabý pás v oblasti 615 nm spôsobený porfyrínmi. V emisných spektrách pacientov s rôznymi druhmi rakoviny maximá pri 444 a 485 nm miznú a do popredia sa dostáva maximum 530 nm, ktoré priradili fluorescencii flavínov (emisía pri 515 nm) a bilirubínu (emisía pri 555 nm). Taktiež bola zvýšená fluorescencia porfyrínov (emisía pri 615 nm). Na odlíšenie zdravých a patologických skupín použil intenzitu píku pri 444 nm, označeného ako viazané NADH a pomery píkov voľného NADH (485), flavínov (515 nm) a bilirubínu (555 nm) ku fluorescencii viazaného NADH (444 nm). Všetky tieto parametre vykazovali signifikantné zmeny a senzitivita a špecificita sa pohybovali na úrovni 80 – 90 %. Taktiež merali synchronne fluorescenčné spektrá pri posune 70 nm. Zdravé spektrá dosahovali maximá pri 365 nm, 430 nm a 470 nm a boli priradené fluorescencii NADH, flavínom a bilirubínu. Pri pacientoch bol pozorovaný posun emisie do dlhších vlnových dĺžok (červený posun) z 430 a 475 nm do 450 a 475 nm, podobne ako to bolo pri emisných spektrách. Ako parametre použili pomery flavínov (460 nm) a bilirubínu (475 nm) ku fluorescencii NADH (365 nm). Oba tieto parametre boli u onkologických pacientov signifikantne zvýšené.

Autori Zvarik et al (2012) sa zamerali na hľadanie rozdielov vo fluorescencii metabolitov v moči pacientov s rakovinou vaječníka oproti zdravým dobrovoľníkom použitím excitačno-emisných matíc. Zistili, že najväčší rozdiel vo fluorescencii moču je v oblasti emisie 400 – 460 nm a v oblasti excitácie 310 – 390 nm. Štatistická analýza ukázala 5-násobné zníženie intenzity píku 330/420 nm (excitačná/emisná vlnová dĺžka) v moči pacientov s rakovinou oproti zdravým jedincom. Navyše pomer intenzít píkov pri 370/440 nm a 330/420 nm je 18-krát nižší v prípade vzoriek od pacientov oproti kontrolným vzorkám. Pozorované zmeny boli vysvetlené zníženým množstvom kyseliny pyridoxínovej, zatiaľ čo modrofluoreskujúce pteríny dominujú v excitačno-emisných maticiach moču pacientov s rakovinou oproti zdravým jedincom. Autori ukázali, že sledovanie fluorescenčných metabolitov v moči ponúka možnosť skríningovej metódy nádorových ochorení vaječníka.

Záver

Monitorovanie autofluorescencie telových tekutín poukazuje na možnosti alternatívneho riešenia diagnostiky nádorových ochorení. Použitie telových tekutín, ktorých zloženie odráža aktuálny stav organizmu, dáva možnosť rýchleho skríningu nádorového ochorenia aj nedostupných orgánov. Navyše fluorescenčné metódy sú založené na detekcii molekulových zmien, a tak je možné zachytiť chorobu v jej ranom štádiu, kedy ešte nie sú rozvinuté morfológické zmeny, a choroba je klinicky asymptomatická. Nespornou výhodou fluorescenčných metód je aj ich finančná nenáročnosť, rýchlosť a minimálna záťaž pre pacienta.

Abstract

The early diagnostic is the most difficult but crucial condition for effective treatment of oncological diseases. The aim of the article was to investigate the possible cancer screening potential of body fluids autofluorescence. Body fluids contain many intrinsic fluorophores, therefore modern fluorescence techniques are perspective candidates for new routine screening tests. When compared to other methods, fluorescence analysis is fast, safe, highly sensitive, non-invasive, cheap and stressless for patients.

Literatúra

ANWER, A. G.; SANDEEP, P. M.; GOLDYS, E. M.; VEMULPAD, S. Distinctive autofluorescence of urine samples from individuals with bacteriuria compared with normals. *Clinica Chimica Acta*. 401, 1-2, 2009, pp. 73-75.
DRAMICANIN, T.; DRAMICANIN, M.; DIMITRIJEVIC, B.; JOKANOVIC, V.; LUKIS, S. Discrimination Between Normal and Malignant Breast Tissues by Synchronous Luminescence spectroscopy. *Acta Chimica Slovenica*. 53, 4, 2006, pp. 444-449.
DUBAYOVÁ, K.; KUŠNÍR, J.; PODRACKÁ, L. Diagnostic monitoring of urine by means of synchronous fluorescence spectrum. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 55, 2, 2003, pp. 111-119.
GANESAN, S.; MADHURI, S.; ARUNA, P.; SUCHITRA, S.; SRINIVASAN, T. G. Native fluorescence characterization of human liver abnormalities. *Proceedings of SPIE*. 3599, 1999, pp. 20-24.
HUBMANN, M. R.; LEINER, M. J.; SCHAUR, R. J. Ultraviolet fluorescence of human sera: I. Sources of characteristic differences in the ultraviolet fluorescence spectra of sera from normal and cancer-bearing humans. *Clinical Chemistry*. 36, 11, 1990, pp. 1880-1883.
KARTHIKEYAN, K.; MASILAMANI, V.; GOVINDASAMY, S. Spectrofluorimetric detection of DMBA-induced mouse skin carcinoma. *Pathology & Oncology Research*. 5, 1, 1999, pp. 46-48.

KUŠNÍR, J.; DUBAYOVÁ, K.; LEŠKOVÁ, L.; LAJTAR, M. Concentration matrices - Solutions for fluorescence definition of urine. *Analytical Letters*. 38, 10, 2005, pp. 1559-1567.
LEINER, M. J.; SCHAUR, R. J.; DESOYE, G.; WOLFBEIS, O. S. Fluorescence topography in biology. III: Characteristic deviations of tryptophan fluorescence in sera of patients with gynecological tumors. *Clinical Chemistry*. 32, 10, 1986, pp. 1974-1978.
MADHURI, S.; ARUNA, P.; BIBI, M.; GOWRI, V.; KOTESSWARAN, D.; GANESAN, S. Ultraviolet fluorescence spectroscopy of blood plasma in the discrimination of cancer from normal. *Proceedings of SPIE*. 2982, 1997, pp. 41-45.
MASILAMANI, V.; AL-ZHRANI, K.; AL-SALHI, M.; AL-DIAB, A.; AL-AGEILY, M. Cancer diagnosis by autofluorescence of blood components. *Journal of Luminescence*. 109, 3-4, 2004, pp. 143-154.
MASILAMANI, V.; VIJMASI, T.; AL SALHI, M.; GOVINDARAJ, K.; VIJAYA-RAGHAVAN, A. P.; Antonisamy, B. Cancer detection by native fluorescence of urine. *Journal of Biomedical Optics*. 15, 5, 2010, 057003.
WHO World health statistics. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2008.
WOLFBEIS, O.; LEINER, M. Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization. *Analytica Chimica Acta*. 167, 1985, pp. 305-315.
XU, Y.; SHEN, Z.; WIPER, D. W.; WU, M.; MORTON, R. E.; ELSON, P.; KENNEDY, A. W.; BELINSON, J.; MARKMAN, M.; CASEY, G. Lysophosphatidic Acid as a Potential Biomarker for Ovarian and Other Gynecologic Cancers. *Journal of the American Medical Association*. 280, 8, 1998, pp. 719-723.
ZHANG, R. B.; ZHOU, P. C.; LIN, G. C.; LI, Y. Q. Cancer Diagnosis at Early Stage Using Serum Derivative Fluorescence Emission Spectra. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 35, 12, 2007, pp. 1795-1797.
ZVARIK, M.; MARTINICKY, D.; HUNAKOVA, L.; SIKUROVA, L. Fluorescence characteristics of human urine from normal individuals and ovarian cancer patients. *Neoplasma*. 60, 2013, in press.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Faktory ovplyvňujúce atraktivitu medzi pohlaviami

Nina Košťová, Roman Gardlík

Ústav molekulárnej biomedicíny,
Lekárska fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
kostova.nina@gmail.com,
romangardlik@gmail.com

Úvod

Vzťah medzi ľudskou sexualitou, výberom partnera a hladinou androgénov stále nie je ešte presne známy. Faktorov, ktoré ovplyvňujú atraktivitu medzi pohlaviami je veľa a môžu byť u oboch pohlaví rôzne. U žien majú dôležitú úlohu tie faktory, ktoré súvisia s ich fertilitou, pričom u mužov je dôležitý ich prístup k zdrojom (1).

Zdá sa, že u oboch pohlaví ovplyvňujú hladiny testosterónu, súčasného aj prenatálneho, atraktivitu u opačného pohlavia. Na základe dostupných údajov je možné predpokladať, že muži s vyššími hladinami testosterónu sú pre ženy atraktívnejší. Medzi potenciálne determinanty ich atraktivity môžeme zaradiť aj vek, finančné

zabezpečenie, vzhľad, správanie a mnoho ďalších faktorov. U žien je podľa dostupnej literatúry dôležitým determinantom atraktivity fáza menštruačného cyklu.

Vplyv pohlavných hormónov na atraktivitu

Počas menštruačného cyklu dochádza k zmenám hladín estradiolu a progesterónu. U mnohých druhov sú samičky atraktívnejšie pre samčekov vo fáze ovulácie. Zistilo sa, že progesterón a jeho interakcie s estradiolom negatívne ovplyvňovali atraktivitu žien u mužov. Ženy sú teda pre mužov najatraktívnejšie počas najplodnejšej fázy menštruačného cyklu (2). U žien, ktoré žijú v trvalom vzťahu alebo u žien, ktoré dlhodobo užívajú hormonálnu antikoncepciu, čím je ich prirodzený cyklus potlačený, sa tieto výkyvy môžu prejavovať menej.

U samíc goríl nemala hladina androgénov vplyv na kopulačné správanie, ale zvýšené kopulačné správanie súviselo so zvýšenou hladinou estrogénov v periovulačnom období (3). Zebričky pestré, ktorým podávali v dospelosti testosterón, viac spievali a boli agresívnejšie, ale vyššia hladina testosterónu výber ich partnera neovplyvnila (4). Samičky potkanov, ktorým sa umelo podával testosterón propionát však preferovali sexuálne aktívnych samcov (5).

Za marker hladín prenatálneho množstva androgénov u ľudí sa považuje pomer dĺžky druhého (2D) a štvrtého (4D) prsta ruky jedinca, pričom nižší pomer 2D:4D svedčí o vyššej prenatálnej expozícii androgénom. Pomer 2D:4D je sexuálne dimorfný, u mužov býva druhý prst kratší, u žien je druhý prst rovnako dlhý alebo dlhší ako štvrtý prst (6). Nižší pomer 2D:4D u mužov pri hodnotení ženami zvyšoval ich atraktivitu (7).

Atraktivita a vek

U mužov je vek ženy jedným zo základných determinantov výberu partnerky, a to najmä preto, že fertilita žien je ohraničená iba na relatívne krátke obdobie. U žien vek muža nehrá dôležitú úlohu, plodnosť mužov sa vekom podstatne nemení, pričom vyšší vek muža môže znamenať vyššie postavenie v spoločnosti a tým aj lepší prístup k zdrojom (1).

Podľa výskumu, v ktorom vysokoškooláci posudzovali atraktivitu mužov a žien rôzneho veku, dospelí muži hodnotili pubertálne dievčatá rovnako atraktívne ako svoje vrstovníčky, zatiaľ čo ženy pubertálnych chlapcov vôbec nepovažovali za sexuálne atraktívnych (8).

Atraktivita a výzor

Ženy s priemernými tvárovými charakteristikami sú pre mužov atraktívnejšie, je to pravdepodobne preto, že tieto signalizujú neprítomnosť genetických anomálií (9). Muži preferujú ženy s priemernou hmotnosťou a s typic-

kým ženským pomerom medzi pásom a bokmi (waist-to-hip ratio – WHR), ktorý odzrkadľuje optimálnu fertilitu a zaisťuje, že žena nie je tehotná (10).

U predpubertálnych dievčat, ktorým sa boky ešte nezaoblili, je pomer vyšší (približne 0,85), u dievčat po puberte a mladých žien sa znižuje približne na 0,75 a potom sa zase zvyšuje u starších žien, u ktorých sa zväčšuje pás. Čím vyššie je WHR, tým je žena menej atraktívna a aj menej plodná.

Ak žena nehľadá dlhodobého partnera, vzhľad muža môže byť pre ňu najdôležitejším faktorom výberu. Dôležitá je predovšetkým telesná symetria, ktorá súvisí aj s dobrou fertilitou a neprítomnosťou genetických anomálií, svalová hmota a WHR okolo 0,9 (11). Medzi znaky závislé od testosterónu patria hustejšie a tmavšie fúzy, výška, „trojuholníkový“ tvar postavy, sociálna dominancia, telesný pach.

Atraktivita a socioekonomické postavenie

Pre ženu sú pre výber dlhodobého partnera, okrem genetických a zdravotných charakteristík, najdôležitejšie práve signály svedčiacie o jeho prístupe k zdrojom. Ženy považovali za najdôležitejšie budúce alebo aktuálne finančné zabezpečenie partnera a jeho spoločenské postavenie a moc (12).

Aj keď muži dosahujú vyššie postavenie a majetok až vo vyššom veku, dá sa predpokladať ich potenciál do budúcnosti. Potenciál prístupu k zdrojom (resource holding potential – RHP) môže mať rôzne determinanty, akými sú rodinné zázemie, vzdelanie, profesia, inteligencia. Ženy tieto atribúty často zohľadňujú pri výbere ideálneho partnera (13). Podobný výsledok, kedy to bolo skôr socioekonomické postavenie, ktoré hralo úlohu pri výbere sexuálneho partnera, zistili aj iní autori (14).

Záver

Vo viacerých výskumoch sa preukázalo, že pre mužov je dôležitý faktor atraktivity vek a výzor ženy, pričom ide o to, aby žena, ktorú si vyberú bola plodná a to čo najdlhší čas. Ženy sú pre mužov atraktívnejšie vo fáze ovulácie, alebo bezprostredne pred touto fázou, kedy sú najplodnejšie.

Pre výber partnera pre ženu je dôležité socioekonomické postavenie muža. Ženy to považujú za dôležité preto, aby sa ich partner dokázal postarať o ne a potomstvo.

Vo všeobecnosti existuje množstvo faktorov, hodnotiaceho aj hodnoteného, ktoré ovplyvňujú atraktivitu opačného pohlavia, preto ich treba brať do úvahy komplexne a nie iba ako izolované údaje.

Abstract

Progesterone and its interactions with estradiol have negative impact on the attractiveness of women perceived by men. Women are most attractive for men when they are most fertile. A lower ratio 2D:4D as a marker of higher prenatal androgen exposure, particularly testosterone, makes men more attractive to women. Age of a woman is very important factor in process of men's partner selection, on contrary, for women age of men is not so important factor in this process. Women with average face characteristic, average weight and typical waist-to-hip ratio are more attractive for men. In women, if they do not seek for a long-term partner then the appearance of the partner can be the most important criterion. Body symmetry plays an important role too. However, the most important factor in the process of selection of women's partner is his future or current financial resources and his social status and power.

Literatúra

1. WEISS, P. Sexuální atraktivita a její determinanty. In: *Psychiatr. Prax.* ročník 10, číslo 4, 2009, pp. 190–192.
2. PUTS, D.A.; BAILEY, D.H.; C'ARDENAS, R.A.; BURRISS, R.P.; WELLING, L.L.M.; WHEATLEY, J.R.; DAWOOD, K. Women's attractiveness changes with estradiol and progesterone across the ovulatory cycle. In: *Horm Behav.* ročník 63, číslo 1, 2012, pp. 13–19.
3. NADLER, R.D.; COLLINS, D.C.; MILLER, L.C.; GRAHAM, C.E. Menstrual cycle patterns of hormones and sexual behavior in gorillas. In: *Horm Behav.* ročník 17, číslo 1, 1983, pp. 1–17.
4. ADKINS-REGAN, E. Testosterone increases singing and aggression but not male-typical sexual partner preference in early estrogen treated female zebra finches. In: *Horm Behav.* ročník 35, číslo 1, 1999, pp. 63–70.

5. de JONGE, F. H.; EERLAND, E. M.; van de POLL, N. E. The influence of estrogen, testosterone and progesterone on partner preference, receptivity and proceptivity. In: *Physiol Behav.* ročník 37, číslo 6, 1986, pp. 885–891.
6. ZHENGUI, Z.; COHN, M. J. Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios. In: *PNAS*, ročník 108, číslo 39, 2011, pp. 16289–16294.
7. RONEY, J. R.; MAESTRIPIERI, D. Relative digit lengths predict men's behavior and attractiveness during social interactions with women. In: *Human Nature*, ročník 15, číslo 3, 2004, 271–282.
8. QUINSEY, V. L.; RICE, M. E.; HARRIS, G. T.; REID, K. S. The phylogenetic and ontogenetic development of sexual age preference in males. Conceptual and measurement issue. In: *The juvenile sex offender*, New York: Guildford, pp. 143–163, 1993.
9. LANGLOIS, J. H.; ROGGMAN, L. A. Attractive faces are only average. In: *Psychol Sciences*, 1990, pp. 115–121.
10. SINGH, D.; LUIS, S. Ethnic and gender consensus for the effects of waist-to-hip ratio on judgment of women's attractiveness. In: *Human Nature*, 1995, 51–65.
11. BARBER, N. The evolutionary psychology of physical attractiveness. *Sexual selection and human morphology. Ethology and Sociobiology*, ročník 16, 1995, 395–424.
12. BUSS, D. M. Sex differences in human mate preferences: Evolutionary hypotheses tested in 37 cultures (with commentary and rejoinder). In: *Behav Brain Sciences*, ročník 12, 1989, 1–49.
13. MEALEY, L. Sex Differences: Developmental and evolutionary strategies. London: Academic Press, 2000.
14. EDELSTEIN, R. S.; CHOPIK, W. J.; KEAN, E. L. Sociosexuality moderates the association between testosterone and relationship status in men and women. In: *Horm Behav*, ročník 60, číslo 3, 2011, pp. 248–255.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Kľúčový problém biologickej evolúcie: Prechod od RNA sveta k DNA svetú

Marta Kollárová, Michaela Kohárová

Katedra biochémie,
Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave
kollarm@fns.uniba.sk,
koharyova@fns.uniba.sk

Úvod

Molekula DNA nesúca genetickú informáciu všetkých žijúcich organizmov je pravdepodobne najštudovanejšia biologická makromolekula s množstvom tajomných aspektov. Jedným z nich je problém spojený s evolúciou DNA spočívajúci práve vo vzniku jej monomérov – **deoxyribonukleotidov**, za prebiotických podmienok.

Často sa považuje za samozrejmé, že DNA a RNA vznikli v evolúcii spolu, alebo prinajmenšom ribonukleotidy i deoxyribonukleotidy vznikli z jednoduchých molekúl porovnateľnými cestami. Tento spôsob vzniku deoxyribonukleotidov však nebol doteraz potvrdený reakciami syntézy deoxyribózy a deoxyribonukleotidov známymi v chémii a biochémií, ani simuláciou experimentov za prebiotických podmienok.

Základné stavebné bloky RNA a DNA sa líšia navzájom len **jediným atómom kyslíka**. Jeho odstránenie z molekuly však predstavuje veľmi zložitý chemický proces.

Počas evolúcie RNA bola pravdepodobne prvou existujúcou triedou makromolekúl. V prvej fáze evolúcie RNA mala jedinou funkciu autoreplikácie. Neskôr usporiadanie stavebných jednotiek nukleových kyselín umožnilo nielen autoreplikáciu vlastnej molekuly, ale aj vytváranie špecifických štruktúr iných molekúl – proteínov. Pre vznik DNA mali rozhodujúcu úlohu dva proteíny s katalytickou funkciou – ribonukleotidreduktáza (RNR), ktorá katalyzuje tvorbu deoxyribonukleotidov a reverzná transkriptáza katalyzujúca prepis informácie z RNA do DNA (Follmann, 1986; Stubbe, 1990).

Biosyntéza deoxyribonukleotidov

Zatiaľ čo ribóza a ribonukleotidy mohli existovať za primitívnych podmienok na Zemi, pretože ribóza vzniká medzi mnohými produktmi reakcií formaldehydu a ribonukleozidy sa tvoria zahriatím purínových báz s ribózou v prítomnosti anorganických solí, ani intenzívny výskum tvorby biomolekúl za abiotických podmienok neobjavil doteraz žiadnu chemickú cestu pre tvorbu deoxyribonukleotidov.

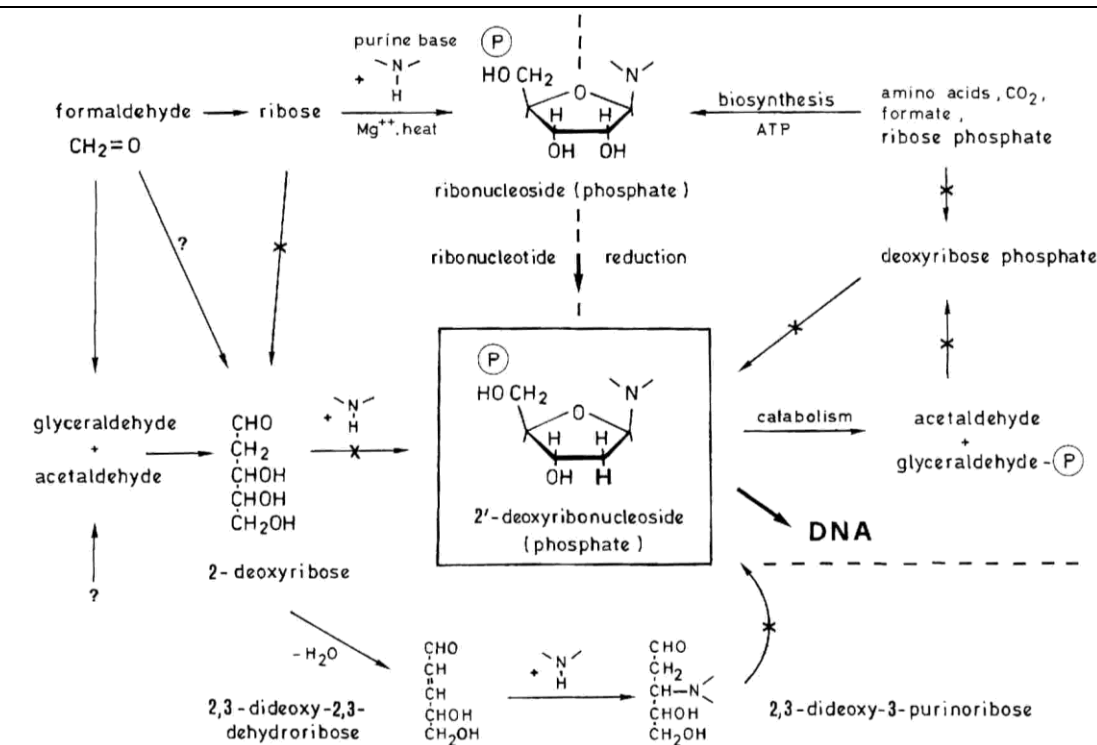
Deoxyribonukleotidy vznikajú redukciou zodpovedajúcich ribonukleotidov. Táto reakcia je katalyzovaná enzýmom ribonukleotidreduktázou. Produkty reakcie, 2'-deoxyribonukleotidy, nie sú tvorené žiadnou inou biosyntetickou cestou *de novo*. Z tohto dôvodu má proces redukcie ribonukleotidov rozhodujúcu úlohu pri syntéze DNA a delení buniek.

Redukcia ribonukleotidov na zodpovedajúce deoxyribonukleotidy nie je jednoduchý, ale postupný proces, pri ktorom dochádza k prenosu vodíka z NADPH najskôr na malú ditiolovú bielkovinu tioredoxín a z tioredoxínu na ribonukleotidy. Prvý proces katalyzuje enzým tioredoxínreduktáza a druhý ribonukleotidreduktáza. Jeho alternatívou je glutaredoxínový systém obsahujúci glutaredoxín, glutatión a glutatiónreduktázu, ktorý môže v prípade tioredoxínových mutantov substituovať tioredoxínový systém.

Redukcia ribonukleotidov sa uskutočňuje zložitým mechanizmom, ktorý sumárne možno chápať ako redukcii sekundárneho alkoholu ditiolom. Detailný mechanizmus redukcie nie je zatiaľ presne známy.

Ribonukleotidreduktázy a ich evolúcia

Aktivita RNR bola doteraz potvrdená u všetkých doteraz skúmaných organizmov. Tieto enzýmy odrážajú jednotu života práve tak, ako polymerázy nukleových kyselín alebo ribozomálny aparát. Najprv boli opísané dva typy RNR. Prvý typ je reprezentovaný enzýmom izolovaným z *Escherichia coli* kultivovanej za aeróbných podmienok a druhý z baktérie *Lactobacillus leichmannii*. V súčasnosti sú opísané štyri typy tohto enzýmu, ktoré sa prekvapujúco odlišujú požiadavkami na kofaktory napriek ich centrálnej úlohe v metabolizme (železo, koenzým B12, mangán, horčík, S-adenozylmetionin) a úrovňou fosforylácie ribonukleotidov, ktoré využívajú ako substráty. Štruktúru RNR, ktoré vyžadujú pre svoju aktivitu koenzým B12 a sú reprezentované enzýmom z *L. leichmannii* predstavuje jednoduchý polypeptidový reťazec. Fe-závislé RNR reprezentované enzýmom z *E. coli* majú podjednotkovú štruktúru vytvorenú z nerovnako veľkých polypeptidových reťazcov. Pravdepodobne veľké podjednotky RNR vytvárajú rodinu pôvodných proteínov s mnohonásobne nukleotid-viažucimi miestami.



Obr. 1. Chémia a biochémia ribózy, 2'-deoxyribózy a ich nukleozidov a nukleotidov

Prerušované čiary oddeľujú abiotické reakcie (vľavo) od reakcií katalyzovaných enzýmami (vpravo). Prečiarknuté šípky označujú reakcie, ktoré neprebiehali za abiotických podmienok na Zemi a ani v súčasnosti pôsobením známych enzýmov. Deoxyribonukleotidy môžu vzniknúť len z ribonukleotidov (Follmann, 1982).

Asociácia podjednotiek pripomína viac vzťah apoen-
zým-koenzým než podjednotkovú štruktúru enzýmu.

Predpokladá sa, že B12-závislé RNR vznikli prvé ako primitívne katalyzátory syntézy deoxyribonukleotidov. Tento názor sa však nedá celkom zosúladiť s fylogenetickým stromom bakteriálneho sveta. Toto by vyžadovalo poznať prebiotickú existenciu kobalt-obsahujúcich korinoidov. Tieto mohli vzniknúť súbežne s príbuzným porfyrínovým systémom, ale nevyskytovali sa pravdepodobne všade, pretože kobalt je zriedkavý prvok a navyše korinoidné koenzýmy sú rozkladané svetlom. Čo sa týka železa a horčíka, sú prinajmenšom stotisíckrát a tisíckrát frekventovanejšie na zemskom povrchu a väzba s proteínom je regenerovaná celou škálou biochemických katalyzovaných reakcií.

Napriek odlišnej proteínovej štruktúre majú RNR mnohé vlastnosti podobné. Na základe experimentálnych výsledkov sa predpokladá, že všetky doteraz známe RNR uskutočňujú túto reakciu rovnakým mechanizmom, ktorý má charakter zložitej radikálovej reakcie. Tiež všetky štyri ribonukleotidy sa viažu na rovnaké aktívne miesto enzýmu, pričom špecifita naviazania určitého ribonukleotidu je modulovaná naviazaním určitého modulátora na regulačné (alosterické) miesta enzýmu (Fontecave, 1998; Tomter, 2013).

Z hľadiska evolúcie by jedným z vysvetlení mohlo byť, že prirodzené vlastnosti chémie redukcie ribonukleotidov vnútili tieto podobnosti do oddelene sa vyvíjajúcich enzýmov konvergentnou evolúciou. Ďalšia alternatíva predpokladá, že tieto proteíny mali spoločného predka, z ktorého vznikli divergentnou evolúciou prispôbením sa na špecificky meniace sa požiadavky prostredia. Na základe štúdia vlastností jednotlivých typov ribonukleotidreduktáz viac autorov podporuje práve túto možnosť. Najsilnejším argumentom pre divergentnú evolúciu zo spoločného predka je unikátny mechanizmus alosterickej regulácie pre redukciu ribonukleotidov vo všetkých štyroch triedach enzýmu. V každom prípade ich substrátová špecifita je kontrolovaná naviazaním efektorových nukleotidov do alosterického miesta a všetky typy reduktáz odpovedajú rovnakým spôsobom na danú efektorovú molekulu, napriek rozdielnym proteínovým štruktúram. Prvý enzým pravdepodobne vznikol pred fotosyntézou a mohol byť podobný enzýmom, ktoré boli objavené v organizmoch schopných rásť za anaeróbnych podmienok. Tento enzým získal unikátny reakčný a kontrolný alosterický mechanizmus, ktorý dnes reguluje substrátovú špecifitu všetkých známych RNR. Po objavení kyslíka na Zemi sa začali vyžadovať nové mechanizmy pre tvorbu radikálov a začali sa vyvíjať ďalšie typy enzýmov. Pravdepodobne však vznik týchto enzýmov je zodpovedný za premenu „sveta RNA“ na „svet DNA“ (Reichard, 1998).

Záver

Často sa považuje za samozrejmé, že ribonukleotidy a deoxyribonukleotidy vznikli v evolúcii porovnateľnými cestami. Pretože doteraz nie je známa prijateľná abiotická cesta pre vznik deoxyribonukleotidov, problém spojený s evolúciou DNA spočíva práve pri vzniku jej monomérov. V evolúcii DNA nahradila RNA ako genetický materiál, pretože dvojvláknová DNA je stabilnejšia ako jednovláknová RNA a stala sa vhodnejšou pre uchovanie genetickej informácie.

Abstract

Ribonucleotide reductases (RNR) catalyzes the reduction of ribonucleotides to corresponding deoxyribonucleotides. They play important role in the regulation of DNA synthesis. Several types of the enzyme are known, differing in structure and catalytic mechanism. All RNRs require a protein radical for activity. They form an unique essential „bridge“ between RNA and DNA metabolism. Intensive research on abiotic formation of biomolecules has not revealed a chemical route to deoxyribonucleotides. In all present day organisms studied so far, deoxyribonucleotides are produced exclusively by reduction of the corresponding ribonucleotides, a reaction catalyzed by the enzyme ribonucleotide reductase. Ribonucleotide reductases are known as essential enzymes providing deoxyribonucleotides for DNA replication and DNA repair. They are also evolutionary key enzymes. The invention of ribonucleotide reductase made the transition from a RNA world to a DNA world possible.

Literatúra

- FOLLMANN, H. Deoxyribonucleotide synthesis and the emergence of DNA in molecular evolution. 1982. *Naturwissenschaften* 69: 75-81.
- FOLLMANN, H. Have deoxyribonucleotides and DNA been among the earliest biomolecules? 1986. *Adv. Space Res.* 6: 33-38.
- Fontecave, M. Ribonucleotide reductases and radical reactions. 1998. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 684-695.
- REICHARD, P. *The evolution of ribonucleotide reduction*. 1997. *TIBS* 22: 81-85.
- STUBBE, J. Ribonucleotide reductases. 1990. *Adv. Enzymol.* 63: 349-419.
- TOMTER, A. B., ZOPPELLARO, G., ANDERSEN, N. H., HERSLETH, H. P., HAMMERSTAD, M., ROHR, A. K., SANDVIK, G. K., STRAND, K. R., NILSSON, G. E., BELL, C. B., BARRA, A. L., BLASCO, E., LEPAPE, L., SOLOMON, E. I., ANDERSSON, K. K. Ribonucleotide reductase class I with different radical generating clusters. 2013. *Coordination Chemistry Reviews* 257: 3-26.

Nekódujúca DNA – zbytočnosť alebo nevyhnutnosť?

Zuzana Šándorová¹, Erik Birčák¹

Matej Vesteg^{1,2}, Juraj Krajčovič¹

¹Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave, SR;

²Katedra biológie a ekológie, Prírodovedecká
fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, ČR

z.sandorova@gmail.com;

bircak@fns.uniba.sk;

vesteg@fns.uniba.sk;

krajcovic@fns.uniba.sk

Úvod

Medzi základné charakteristiky živých organizmov patrí schopnosť rozmnožovať sa, a teda odovzdať svoju genetickú informáciu do ďalšej generácie. Čo to ale je genetická informácia? Ako vyzerá a ako sa realizuje? Ako sa prenáša na potomstvo? To sú otázky, ktoré trápili aj minulé generácie vedcov. Na niektoré sa podarilo odpovedať, na iné len z časti. Rýchle napredovanie biologického výskumu, hlavne molekulárnej biológie a bioinformatiky, prináša obrovské množstvo poznatkov o organizácii genetickej informácie u rozmanitých organizmov a spôsoboch jej realizácie. Mnohé zistenia sú pozoruhodné i prekvapivé a zásadným spôsobom menia naše predstavy o fungovaní živých systémov.

DNA

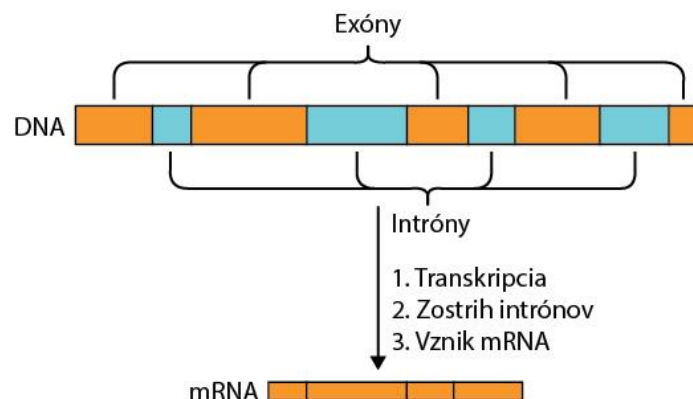
Už v 19. storočí sa vedelo o troch základných organických látkach (bielkoviny, sacharidy a lipidy), ktoré sa dlho považovali za biochemicky najdôležitejšie látky pre život. Až neskôr k nim pribudla štvrtá, veľmi podstatná organická substancia. Keďže sa prvýkrát pozorovala v jadrách eukaryotických buniek, dostala táto látka názvaná nukleín (lat. *nucleus* – jadro), z ktorého neskôr vznikol názov nukleová kyselina a až začiatkom 20. storočia sa začal používať termín, ktorý používame aj v súčasnosti – deoxyribonukleová kyselina (DNA). To, že práve DNA je nositeľom genetickej informácie sa zistilo až v tridsiatych rokoch 20. storočia. To v preklade znamená, že sa prenáša z jednej generácie na druhú a je zodpovedná za prenos tzv. faktorov dedičnosti, ako gény prvýkrát nazval zakladateľ genetiky Johan Gregor Mendel. Samotnú trojrozmernú štruktúru DNA opísali James Watson a Francis Crick v krátkom článku vydanom v časopise *Nature* až v roku 1953.

V tom období sa zdalo, že o DNA už vieme veľa. Vedelo sa, ako vyzerá a ako sa prenáša z generácie na generáciu. Nevedelo sa však, akým spôsobom je genetická informácia v DNA zapísaná a ako presne k realizácii genetickej informácie dochádza. V súčasnosti vieme, že DNA pozostáva z rôznych funkčných úsekov, ktoré nazývame gény. Sú to základné jednotky dedičnosti, ktoré

kódujú informáciu pre tvorbu produktu, čo sú najčastejšie bielkoviny. Proteín-kódujúce gény zvyčajne pozostávajú z kodónov (3 nukleotidy v sekvencii DNA, preto sa kodón nazýva aj triplet), ktoré predstavujú informáciu o zaradení jednej aminokyseliny do primárneho poradia aminokyselín v proteíne. V prvom kroku dochádza k transkripcii – prepisu informácie z DNA do mRNA molekuly, ktorá následne podlieha procesu translácie (prekladu). Tento krok sa tiež nazýva proteosyntéza, pretože dochádza k tvorbe proteínov. Poznáme však aj sekvencie, ktoré kódujú gény pre funkčné RNA. Tieto sa neprekladajú do proteínov a po ich transkripcii vykonávajú svoju funkciu v podobe RNA molekuly a zohrávajú dôležitú rolu práve pri expresii proteín-kódujúcich génov. Zaujímavé je, že proteín-kódujúce gény tvoria zvyčajne väčšinu genómu prokaryotov (organizmov bez membránou ohraničeného jadra), no predstavujú len zanedbateľnú časť DNA v jadrách eukaryotov. Tá totiž obsahuje aj rozsiahle nekódujúce sekvencie, ktoré sa nachádzajú medzi jednotlivými génmi, ale môžu sa nachádzať aj vo vnútri nich.

Nekódujúce časti DNA

Väčšina génov eukaryotov pozostáva z exónov a intrónov (obr. 1). Exóny predstavujú časti génov, ktoré sa prekladajú do proteínov, pričom intróny sa zvyčajne do proteínov neprekladajú. Intróny sú teda vnútro-génové nekódujúce časti DNA, ktoré sa musia v určitom štádiu expresie génov vystrihnúť. Proces vystrihnutia intrónov a spájania exónov sa odohráva na úrovni RNA po prepise informácie z DNA a nazýva sa zostrih (splicing). Intróny môžeme rozdeliť na rôzne skupiny: intróny prekurzorov tRNA molekúl, ktoré slúžia ako donor aminokyselín pri proteosyntéze. Ďalej poznáme intróny skupiny I a II, ktoré sú schopné samozostrihu, a spliceozómové intróny, ktoré sa vystrihujú procesom závislým na prítomnosti ribozýmo-enzymatického komplexu spliceozómu (viď. prehľad Will a Lührmann 2011, Vesteg a kol. 2012).

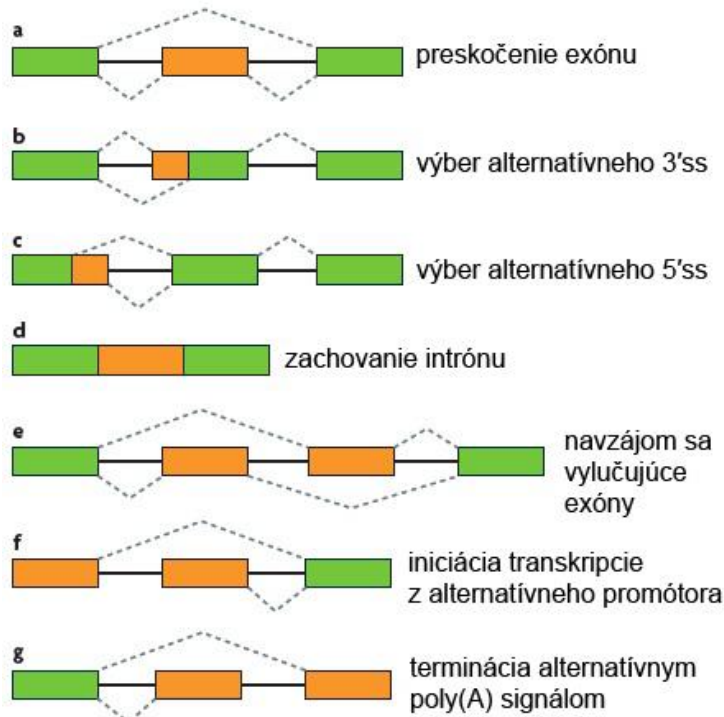


Obr. 1. Schéma proteín-kódujúceho génu a zostrihu intrónov

Znázornené sú jednotlivé časti génu, a to exóny (oranžové) a intróny (modré). Naznačená je transkripcia DNA do podoby prekurzora mRNA. V tejto fáze sú intróny vyštiepené procesom zostrihu intrónov, kedy vzniká konečná forma mRNA pozostávajúca už iba zo sekvencií exónov.

V roku 1941 bola navrhnutá hypotéza „jeden gén, jeden enzým“, podľa ktorej je v genóme toľko enzýmov/proteínov, koľko génov. Z toho vyplývalo, že genetická komplexnosť organizmu závisí od počtu jeho génov. Toto chápanie sa zmenilo vďaka objavu tzv. alternatívneho zostrihu intrónov (pozri prehľad Black 2003), čo je mechanizmus, pri ktorom vzniká z jedného génu viacero rôznych mRNA transkriptov (Chabot 1996) procesom výberu rôznych potenciálnych miest zostrihu (obr. 2). Výsledkom je odlišné začlenenie kódujúcich

(resp. nekódujúcich) regiónov do mRNA. Vzniká možnosť tvorby funkčne nových proteínov, čo sa zdá byť rozhodujúcim zdrojom diverzity proteómov eukaryotických organizmov, a teda aj u ľudí (Resch a kol. 2004). Objav alternatívneho zostrihu intrónov dramaticky zmenil chápanie genetickej komplexnosti fylogeneticky mladších línií eukaryotov, u ktorých môže limitovaný počet génov kódovať oveľa väčší počet proteínov (Parra a kol. 2006).



Obr. 2. Typy alternatívneho zostrihu

Exóny sú znázornené v zelených obdĺžnikoch, alternatívne zostrihnuté oblasti v oranžových obdĺžnikoch, intróny plnými čiarami a rôzne možnosti zostrihu prerušovanými čiarami (upravené podľa Keren a kol. 2010).

V roku 2003 sa podarilo dokončiť Projekt ľudského génu (HGP – the Human Genome Project), ktorého hlavným výsledkom bolo osekvenovanie celého ľudského genómu (určenie poradie nukleotidov, z ktorých DNA pozostáva). V tom istom roku sa začal ďalší medzinárodný projekt nazvaný ENCODE (the ENCyclopedia Of DNA Elements), ktorý mal za úlohu identifikovať všetky funkčné elementy v ľudskom genóme (ako napr. určiť transkripčné regióny, asociácie transkripčných faktorov, štruktúru chromatinu a histonové modifikácie). Cieľom bolo teda stanoviť, ktoré časti DNA sú biologicky aktívne a odhadnúť ich funkcie. V septembri minulého roka (2012) boli v časopise Nature uverejnené výsledky viacerých výskumných skupín pracujúcich na tomto projekte. Podarilo sa identifikovať biologicky aktívne úseky DNA a určiť ich biochemické funkcie vo viac ako 80 % ľudského genómu. Táto funkčná anotácia poskytuje predovšetkým nový pohľad na organizáciu a reguláciu ľudských génov a aj celého genómu. Zdá sa, že pojem „junk DNA“ (odpadová DNA), ktorý zaviedol Ohno ešte v sedemdesiatych rokoch minulého storočia, neplatí. Predpokladal, že DNA eukaryotov pozostáva z veľkej časti z nepotrebných úsekov DNA, informačne bezobsažných, ktoré nemajú zjavné biologické využitie.

Faktom je, že v genóme eukaryotov sa zvyčajne nachádza aj pomerne veľa nefunkčných kópií génov (pseudo-génov). Tie vznikli pravdepodobne génovou duplikáciou, po ktorej nasledovali mnohé mutácie, hlavne v regulačných oblastiach, až došlo k znefunkčneniu daného úseku DNA. V genóme sa tiež nachádza aj množstvo úsekov, ktoré kódujú tzv. malé RNA molekuly, ktoré sa podieľajú hlavne na regulácii a kontrole expresie génov kódujúcich proteíny. V 90-tych rokoch boli opísané miRNA (Micro RNA), ktoré sa zúčastňujú regulácie expresie proteín-kódujúcich génov tým, že sú schopné sa komplementárne viazať na úseky mRNA. Takéto molekuly potom nemôžu ďalej podstupovať proces translácie, čím sa zabezpečí efektívne zastavenie tvorby ďalších proteínov. Dnes je počet proteín-kódujúcich génov ľudského genómu odhadnutý na niečo vyše 20 000, pričom ešte pred niekoľkými desaťročiami sa toto číslo pohybovalo okolo 100 000. V minulosti sa totiž predpokladalo, že vysoká komplexnosť ľudského organizmu sa prejaví aj vo veľkom počte génov. Tento, zjavný nesúlad medzi počtom génov a zložitou organizmom sa nazýva paradox C hodnoty – hovorí, že neexistuje korelácia medzi komplexnosťou organizmu a veľkosťou jeho genómu. To znamená, že v počte génov nás predbehlo veľké množstvo organizmov, predstaviteľov rôznych fylogeneticky vzdialených skupín.

Pôvod intrónov

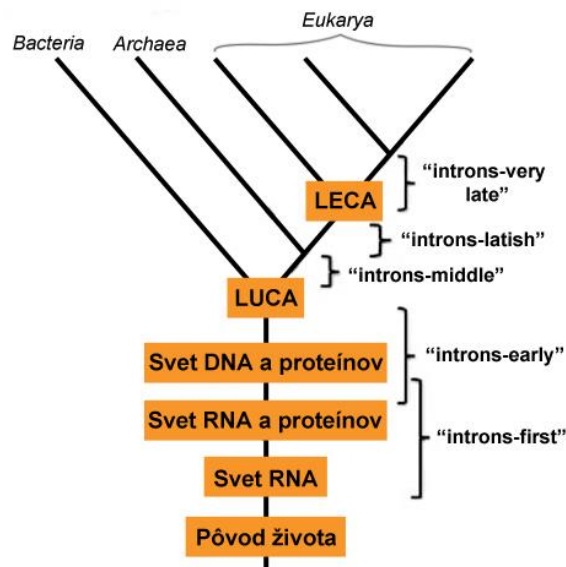
Odkiaľ sa ale v DNA „nadbytočné“ zdanlivo ničnekódujúce sekvencie vzali? Od objavenia spliceozómových intrónov v jadrových génoch eukaryotických buniek (ako sekvencií nukleotidov prerušujúcich kódujú-

ce časti génov) v roku 1977, sa objavilo viacero hypotéz pokúšajúcich sa vysvetliť pôvod intrónov, resp. mozaikovitej formy zápisu genetickej informácie v jadre eukaryotov. S touto problematikou úzko súvisia aj úvahy o pôvode života na Zemi a otázka, akú podobu mal zápis prvej genetickej informácie. Hypotéza RNA sveta (Gilbert 1986) predpokladá, že to bolo práve v podobe RNA, lebo tá sa môže správať aj ako katalyzátor, aj ako templát. Toto štádium života pravdepodobne predchádzalo dnešnému, v ktorom je hlavnou nositeľkou genetickej informácie DNA a úlohu katalyzátorov plnia proteíny v podobe enzýmov.

Otázka pôvodu intrónov úzko súvisí s hľadaním odpovedí na otázku, ako vyzerá posledný spoločný predok všetkých dnes žijúcich organizmov – LUCA (the Last Universal Common Ancestor). Uvažuje sa o jeho charakteristikách, či bol LUCA typickým učebnicovým prokaryotom alebo sa skôr ponášal niektorými svojimi charakteristikami na dnešné eukaryoty, či obsahoval alebo neobsahoval intrónové štruktúry. Práve podľa toho by sme mohli hypotézy o pôvode intrónov rozdeliť na tri skupiny, a to z hľadiska obdobia, v ktorom sa pravdepodobne objavili (obr. 3). Poznáme teda (i) „introns-first“ hypotézu (intróny vznikli v RNA svete), (ii) „introns-early“ hypotézu (intróny vznikli v RNP svete – obdobie histórie života, v ktorom ako hlavné katalyzátory slúžili ribonukleoproteíny, pričom genetická informácia bola ešte stále uložená v RNA) a (iii) „introns-late“ hypotézu (intróny vznikli v DNA svete) (pozri prehľad Rodríguez-Trelles a kol. 2006).

Úloha intrónov

Hlavnou črtou intrónov je, že sa pred transláciou mRNA musia z jej prekursora odstrániť. Tým sa zabezpečí, že sa preložia iba tie časti, ktoré obsahujú informáciu o jednotlivých aminokyselinách, ktoré tvoria samotné proteíny. Tie potom v konečnom dôsledku predstavujú funkčnú jednotku genetického materiálu. Z tohto dôvodu teda vzniká otázka, akú úlohu, či už v expresii génov, alebo všeobecne, intróny majú. Už od objavenia intrónov sa mnohí vedci pokúšajú zodpovedať túto otázku. Doteraz však nevznikol spoločný vedecký konsenzus, ktorý by jednoznačne určil úlohu intrónov. V súčasnosti sa všeobecne akceptuje, že hlavnou cestou vzniku nových proteínových domén, ako aj celých proteínov, je proces exon-shufflingu (obr. 4), ktorý bol charakterizovaný ako nehomologická prestavba génov na úrovni DNA (pozri prehľad Patthy 1996). Je známe, že exon-shuffling sa podieľa na prestavbe kódujúcich segmentov (exónov) vo väčšej miere ako postupná akumulácia náhodných zmien jednotlivých báz (na DNA úrovni) (Shapiro 2010). Vyššia miera náhodných prestavieb v rámci intrónov než pri kontinuálne prekladaných sekvenciách je zabezpečená väčšou dĺžkou intrónov, čím je zároveň umožnený vznik nových kombinácií exónov (Rogers 1990).

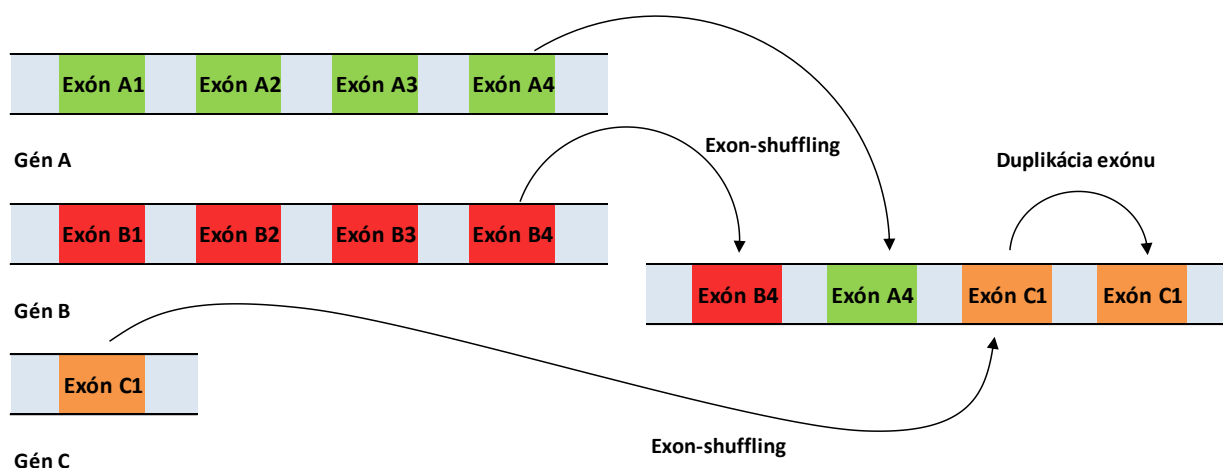


Obr. 3. Model „introns-first“, „introns-early“ a „introns-late“ hypotézy o pôvode intrónov počas evolúcie

„Introns-first“ hypotéza predpokladá, že intróny pochádzajú z RNA sveta. Podľa „introns-early“ hypotézy vznikli intróny v RNP svete, čiže po vzniku proteosyntézy a podľa „introns-late“ hypotézy sa intróny v evolúcii objavili až po vzniku syntézy DNA. „Introns-late“ hypotézy možno ešte rozdeliť na „introns-latish“, ktorá predpokladá, že intróny boli prítomné už u posledného spoločného predka eukaryotov (LECA - the Last Eukaryotic Common Ancestor) a „introns-very late“, podľa ktorej vznikli intróny až po diverzifikácii eukaryotov (upravené podľa Penny a kol. 2009).

Ďalším mechanizmom tvorby nových proteínov, tentokrát na úrovni RNA, je proces alternatívneho zostrihu. Ten predstavuje najčastejší mechanizmus tvorby ďalších variácií proteínov. Hoci tomuto procesu nepodliehajú všetky gény, tieto procesy pomerne frekventovane a významným spôsobom prispievajú k vzniku nových génových produktov. Tieto procesy majú tú výhodu, že generujú množstvo variant proteínov bez trvalej zmeny v DNA svojho nositeľa (Babushok a kol. 2007). Zahŕnutie intrónových sekvencií do génov v podobe alternatív-

ných exónov je dnes dobre zdokumentovaným spôsobom *de novo* vzniku exónov. Takáto rýchla evolúcia nových exónov môže viesť k vzniku množstva variant jedného proteínu. Niektoré takéto varianty môžu poskytovať selektívnu výhodu svojmu nositeľovi, čím sa alternatívne zostrihané transkripty môžu vyvinúť na dominujúce zostrihované varianty a môžu tak nahradiť dovtedy prevládajúce génové produkty, ktoré sa môžu postupom času stratiť.



Obr. 4. Schéma exon-shufingu

Výsledkom je vznik mozaikových génov zložených z exónov pochádzajúcich z rozdielnych génov. Na obrázku sú znázornené exóny rozdielnych génov v genóme. Rôznym skladaním exónov pomocou rekombinácie medzi intrónmi vznikajú odlišné gény, a teda aj proteíny, ktoré môžu mať nové funkcie. Ak sa funkcia ukáže ako selektčne výhodná, môže byť nový variant zafixovaný.

Záver

Aj keď je DNA eukaryotov (a z malej časti aj prokaryotov) tvorená na prvý pohľad nefunkčnými úsekmi, nedá sa s určitosťou povedať, že by boli úplne zbytočné. Ani zďaleka ešte nepoznáme funkcie všetkých úsekov DNA. Ako povedal známy filozof, lekár a humanista Albert Schweitzer: „Čím sme vzdelanejší, veci sa nestávajú zrozumiteľnejšími, ale záhadnejšími.“ Napokon novšie a novšie poznatky z tejto problematiky nás v tom len utvrdzujú.

Abstract

DNA is present in each cell and it is assumed to be the carrier of genetic information. Until recently, it was thought that parts of DNA assigned as genes encoding proteins represent the most important portion of the genome, because they contain the information of the exact order of aminoacids in proteins. Although some functions of non-coding DNA have been suggested earlier, only recent studies have confirmed very important roles of non-coding sequences in living cells.

Literatúra

BABUSHOK, D. V., OSTERTAG, E. M., KAZAZIAN, H. H. Jr. Current topics in genome evolution: molecular mechanisms of new gene formation. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 5, 2007, pp. 542-554.

BLACK, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. In: *Annu. Rev. Biochem.* 72, 2003, pp. 291-336.
CHABOT, B. Directing alternative splicing: cast and scenarios. In: *Trends Genet.* 12, 11, 1996, pp. 472-478.
GILBERT, W. The RNA world. In: *Nature.* 319, 1986, pp. 618.
KEREN, H., LEV-MAOR, G., AST, G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. In: *Nat. Rev. Genet.* 11, 5, 2010, pp. 345-355.
PARRA, G., REYMOND, A., DABBOUSEH, N., DERMITZAKIS, E. T., CASTELO, R., THOMSON, T. M., ANTONARAKIS, S. E., GUIGÓ, R. Tandem chimerism as a means to increase protein complexity in the human genome. In: *Genome Res.* 16, 1, 2006, pp. 37-44.
PATTHY, L. Exon shuffling and other ways of module exchange. In: *Matrix Biol.* 15, 5, 1996, pp. 301-310.
PENNY, D., HOEPPNER, M. P., POOLE, A. M. An Overview of the Introns-First Theory. In: *J. Mol. Evol.* 69, 5, 2009, pp. 527-540.
RESCH, A., XING, Y., MODREK, B., GORLICK, M., RILEY, R., LEE, C. Assessing the impact of alternative splicing on domain interactions in the human proteome. In: *J. Proteome Res.* 3, 1, 2004, pp. 76-83.
RODRÍGUEZ-TRELLES, F., TARRÍO, R., AYALA, F. J. Origins and evolution of spliceosomal introns. In: *Annu. Rev. Genet.* 40, 2006, pp. 47-76.
ROGERS, J. H. The role of introns in evolution. In: *FEBS Lett.* 268, 2, 1990, pp. 339-343.
SHAPHIRO, J. A. Mobile DNA and evolution in the 21st century. In: *Mob DNA.* 1, 1, 2010, pp. 4.
VESTEG, M., ŠÁNDOROVÁ, Z., KRAJČOVIČ, J. Selective forces for the origin of spliceosomes. In: *J. Mol. Evol.* 74, 2012, pp. 226-231.
WILL, C. L., LUHRMANN, R. Spliceosome Structure and Function. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3, 7, 2011.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Klinické štúdie s využitím kmeňových buniek

Kristína Stahlová, Marek Máťuš,
Jana Mlynárová, Peter Musil,
Ján Kyselovič, Ondrej Sprušanský
Katedra farmakológie a toxikológie,
Farmaceutická fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
sprusanskyl@fpharm.uniba.sk-mail

Úvod

UŽ mnoho rokov sú ľudské kmeňové bunky predmetom početných klinických štúdií (Trousou, 2009). Vďaka ich hlavným charakteristikám, sebaobnove a diferenciácii na špecializované bunkové línie in vivo aj in vitro, sú považované za nový prostriedok v liečbe rôznych ochorení, ktoré doposiaľ nie je možné úplne vyliečiť (Bongso a Lee, 2005). Zatiaľ, čo sa niektoré pracovné skupiny snažia spresniť a rozšíriť informácie o kmeňových bunkách kostnej drene a pupečníckovej krvi na základe ich predošlých aplikácií pri chorobách krvného a imunitného systému, iné sa zameriavajú na ďalšie možné využitie ostatných typov kmeňových buniek (Trousou et al., 2011). V súčasnosti sú v štádiu testovania napríklad:

- nervové kmeňové bunky a embryonálne kmeňové bunky na využitie v liečbe poškodení nervového systému (mozgu, miechy) a rôznych neurodegeneratívnych ochorení (Parkinsonova, Alzheimerova choroba),
- srdcové, embryonálne, hematopoetické, mezenchymálne kmeňové bunky ako možný prostriedok regenerácie poškodeného srdcového svalu, najmä po infarkte myokardu,
- kmeňové bunky oka (rohovky) na obnovu zraku,
- embryonálne kmeňové bunky špeciálne diferencované na pankreatické bunky pre regeneráciu pankreasu, obnovenie tvorby inzulínu a celkovú liečbu diabetu (Koledová et al., 2011).

Dizajn klinickej štúdie, respektíve terapie kmeňovými bunkami, závisí od mnohých faktorov. Aby sa dosiahli čo najpriateľnejšie podmienky, je dôležité dobre poznať klinický problém (ochorenie), typ tkaniva (orgánu), ktoré je potrebné „opraviť“, ďalej je dôležité vedieť, či bude toto riešenie dočasné alebo trvalé, či sa bude týkať celej štruktúry (orgánu) alebo fyziologickej funkcie. Napríklad, trvalé nahradenie určitej štruktúry, nevyhnutnej na fungovanie organizmu, by mohlo vyžadovať skôr autogénnu bunkovú terapiu, zatiaľ čo dočasné zabezpečenie fyziologickej funkcie je vhodné riešiť alogénnou formou transplantácie. Dôležitá je tiež otázka imunitnej odpovede, najmä pri alogénnej transplantácii, keďže transplantované bunky od donora sú príjemcovmu organizmu cudzie a mohli by vyvolať reakciu imunitného systému alebo úplné odmietnutie transplantovaných buniek organizmom príjemcu (Tubo, 2008). Niektoré štúdie tiež poukazujú na ďalší dôležitý faktor v bunkových terapiách, a to je množstvo buniek prenášaných do príjemcovho organizmu. Malé množstvo je samozrejme neefektívne a naopak, transplantácia príliš veľkého množstva buniek nemusí byť vždy v prospech pacienta, keďže môže viesť k nádorovej transformácii (Amariglio et al., 2009). Preto sú bezpečnosť a efektivita hlavnými kritériami skúmaní klinických aplikácií kmeňových buniek (Tubo, 2008).

V klinických štúdiách sa využívajú najmä dospelé kmeňové bunky (až v 75 % všetkých terapií), avšak ich využitie v klinickej praxi sprevádza jeden veľký problém – ich nízka početnosť v tkanivách. Dospelé kmeňové bunky sú v organizme prítomné len vo veľmi malom množstve. Ich izolácia a množenie v kultúre sú veľmi náročné a vyžadujú veľmi prísne podmienky, ktoré musia čo najvernejšie simulovať prirodzené prostredie buniek v organizme. Jedným z riešení by mohlo byť zdokonalenie doposiaľ známych kultivačných metód (Koledová et al., 2011), alebo cielená diferenciácia a využitie embryonálnych kmeňových buniek. Ich klinická aplikácia je však z praktického a etického hľadiska veľmi obmedzená (Liras, 2010). Zdrojom ESCs sú totiž embryá, nachádzajúce sa vo veľmi skorom štádiu blastocysty a pri ich izolácii dochádza k usmrteniu embrya (Chatterjee et al., 2010). Okrem toho, existujú aj otázky ohľadne bezpečného použitia embryonálnych kmeňových buniek, keďže majú potenciál vytvárať teratómy (nádory vznikajúce zo zárodočných buniek), i keď sú aj pozitívne nálezy, ktoré dokazujú, že sú menej náchylné k nekontrolovateľnému deleniu, ak sú transplantované medzi jedincami rovnakého druhu. Toto všetko vyvoláva rôzne negatívne a zmiešané postoje voči použitiu týchto buniek, i keď majú obrovský terapeutický potenciál a sú kľúčom k objasneniu mechanizmu mnohých chorôb i normálneho vývinu (Amariglio et al., 2009; Puri a Nagy, 2012). Ich náhradou by mohli byť indukované pluripotentné bunky, ktoré vzbudili veľkú pozornosť v posledných rokoch ako potenciálny nevyčerpatelný zdroj no-

vých buniek, využitelných v rôznych liečebných postupoch, keďže majú rovnaký potenciál ako embryonálne kmeňové bunky. Avšak pri indukovaných bunkách tak tiež nastáva bezpečnostné riziko. Doterajšie výskumy poukazujú nato, že iPSCs sú geneticky nestabilné a môžu byť zdrojom genetických mutácií a abnormalít (Puri a Nagy, 2012). Je to aj vďaka génom, vneseným do buniek na ich preprogramovanie. Napríklad c-Myc, jeden z génov využívaných na indukciu buniek, je silný onkogén. Transplantácia takýchto buniek môže mať teda negatívne, no najmä nepredvídateľné následky u jedinca, ktorý by ju podstúpil (Koledová et al., 2011).

Kmeňové bunky kostnej drene a klinické štúdie

Omnoho vhodnejšie pre klinické využitie sa zdajú byť kmeňové bunky kostnej drene – hematopoetické a mezenchymálne. V početných štúdiách bunky kostnej drene u myší, potkanov a dokonca ľudské dokázali, že sú omnoho plastickejšie, ako sa predpokladalo a sú schopné po transplantovaní do iného organizmu tvoriť rôzne typy buniek, nielen tie, ktoré sú odvodené od ich pôvodu. Vykazujú obrovskú aktivitu aj v tkanivách, ktoré nie sú hematopoetického, respektíve mezenchymálneho pôvodu. HSCs sú schopné diferenciácie na hepatocyty, svalové bunky, pankreatické bunky, epidermálne bunky, či dokonca neuróny a bunky myokardu (Xaymardan et al., 2008; Smith, 2003). Už desaťročia dokazujú svoje schopnosti aj v klinickej praxi ako hlavný prostriedok terapie chorôb krvného a imunitného systému. Sú schopné usídlieť sa v kostnej dreni poškodenej ožiaréním, produkovať bunky v pľúcach a pečeni u ožiaréných myší, a dokonca sa infiltrovať do poškodeného srdca po infarkte myokardu. MSCs sa taktiež začínajú využívať v klinickej praxi. Keďže sa za správnych podmienok ľahko množia v kultúre a taktiež dokážu tvoriť rôzne bunkové línie, čo bolo dokázané ako na animálnych modeloch, tak aj u ľudí, sú vhodnými kandidátmi na reparáciu tkanív a génovú terapiu (Xaymardan et al., 2008). Dokážu tvoriť nervové bunky v mozgu, svalové bunky v srdci, bunky kostrového svalstva, pečene atď. Niektorí práce naznačujú ich potenciál diferencovať na bunky s fenotypovými a funkčnými vlastnosťami endotelových buniek (Bryant a Schwartz, 2008; Oswald et al., 2004). V súčasnosti sa využívajú na liečbu ochorení pohybového aparátu (Jackson et al., 2007). MSCs majú obrovskú výhodu v tom, že sa ukázali ako neimunogénne, dokonca schopné potlačiť imunitnú odpoveď. Na svojom povrchu exprimujú veľmi nízke hladiny kostimulujúcich molekúl a HLA I (human leucocyte antigen) a vykazujú absenciu HLA II, čím potláčajú vznik imunitnej reakcie, prostredníctvom inhibície proliferácie T-lymfocytov (Tubo, 2008). Okrem toho, MSCs redukovávajú výskyt GVHD (graft-versus-host-disease), čo je veľmi ťažká forma imunitnej odpovede, ktorú spôsobujú alogénne

bunky po transplantácii v organizme recipienta. Z tohto pohľadu by mohli byť MSCs veľmi efektívne, nielen pre ich imunosupresívne účinky, ktoré sú samozrejme nesmierenne prínosné a dôležité, ale i pre ich schopnosť stimulovať hematopoézu, a tým potenciálne zlepšiť obnovu kostnej drene po chemoterapii a rádioterapii. Všetky tieto pozitívne výsledky naznačujú, že aplikácia MSCs spolu s HSCs by mohla byť bezpečná a efektívna procedúra, účinná nielen v terapii hematopoetického systému (Giordano et al., 2007).

Kmeňové bunky a kardiovaskulárne ochorenia

Infarkt myokardu sprevádza strata kardiomyocytov, ktoré sú následne nahradené fibroblastmi. Tie v mieste poškodenia začnú intenzívne proliferovať a zároveň produkovať kolagén, dôsledkom čoho vznikne jazva, ktorá vyplní infarktové ložisko (Joggerst a Hatzopoulos, 2009). Samotné srdce má však obmedzenú regeneračnú schopnosť, čo znamená, že tieto „reparačné opatrenia“ len zahoja poškodené miesto, no nezregenerujú ho do pôvodného stavu a už vôbec nezvrátia celý proces vedúci k negatívnej remodelácii srdca, ktorá môže nakoniec viesť až k srdcovému zlyhaniu. Hoci klasická farmakologická liečba dokáže spomaliť proces remodelácie, neexistuje žiadna dostupná terapia, ktorá by bola účinná v prevencii, či dokonca schopná navodiť úplnú regeneráciu poškodeného tkaniva (Strauer et al., 2005). Transplantácia kmeňových buniek preto momentálne predstavuje najväčšiu výzvu a zároveň nádej pre kardiologických pacientov. Jedny z prvých prístupov boli transplantácie fetálnych kardiomyocytov a myoblastov, avšak tieto nepriniesli sľubné výsledky. Izolácia donorových buniek je komplikovaná a priniesla veľa neúspešných prípadov. Na rozdiel od týchto buniek, sa kmeňové bunky kostnej drene ukázali ako úspešnejší a jednoduchší terapeutický prostriedok. Niekoľko štúdií využívajúcich najmä MSCs demonštrovalo ich regeneračné schopnosti a to prevažne v terapii regenerácie srdca po infarkte myokardu (IM) (Giordano et al., 2007).

Amado s kolektívom (2005) uskutočnili experiment na animálnom modeli (prasatá) s infarktovaným srdcom, ktorému boli injektované alogénne MSCs priamo do srdcového svalu (intramyokardiálne). Analýza poškodeného tkaniva, vykonaná osem týždňov po transplantácii buniek ukázala, že MSCs sú schopné regenerovať srdcový sval, výrazne zmenšiť ložisko infarktu a podporovať vytvorenie nového kontraktilného tkaniva v zóne IM, čo pozitívne ovplyvnilo obnovu energetického metabolizmu myokardu, sprevádzanú zlepšením systolickej a diastolickej funkcie, čím sa zlepšil aj celkový výkon srdcového svalu. V inom experimente na potkanoch s IM liečených taktiež transplantáciou MSCs, Miyahara a kolektív (2006) pozorovali podobné zlepšenie srdcovej funkcie, regeneráciu poškodeného tkaniva a dokonca tvorbu nových ciev v oblasti infarktu.

Animálne modely sú dôležitým nástrojom na pochopenie fungovania kmeňových buniek a ich možných využití v klinickej praxi. Napriek tomu predstavujú len zjednodušenie oveľa komplexnejšieho profilu ľudských ochorení, preto je dôležité dostať do praxe kmeňové bunky prostredníctvom klinických štúdií u ľudí. Tie sa pred niekoľkými rokmi naozaj začali uskutočňovať, pričom ich prvotným záujmom bola bezpečnosť samotnej transplantácie kmeňových buniek. Niekoľko klinických štúdií zaoberajúcich sa alogénnou transplantáciou buniek pacientom s IM, dokázalo bezpečnosť MSCs, ktoré sú všeobecne považované za neimunogénne a dokonca boli dokázané aj ich imunosupresívne účinky. Prvý klinický test dizajnovaný ako náhodná štúdia dokázala aj ich terapeutický potenciál, keď zlepšili funkciu srdcového svalu u pacientov s akútnym IM tri mesiace po tom, ako im boli tieto bunky intrakoronárne transplantované (Mazo et al., 2012). V inej štúdií, ktorá taktiež priniesla pozitívne výsledky, bolo sledovaných 11 pacientov s prekonaným IM, ktorým boli intrakoronárne transplantované kultivované MSCs. Po určitom čase sa u polovice pacientov významne zlepšili niektoré parametre, ako diastolická a systolická funkcia, následkom čoho sa zvýšila ejekčná frakcia a taktiež bolo pozorované zlepšenie kontraktility myokardu. Žiadne z týchto zlepšení nebolo zaznamenané u pacientov v kontrolnej skupine liečenej placebom (Katritsis et al., 2005).

Literatúra

- AMADO, L. C., SALIARIS, A. P., SCHULERI, K. H., ST JOHN, M., XIE, J. S., CATTANEO, S., DURAND, D. J., FITTON, T., KUANG, J. Q., STEWART, G., LEHRKE, S., BAUMGARTNER, W. W., MARTIN, B. J., HELDMAN, A. W., HARE, J. M. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 9;102(32):11474-9.
- AMARIGLIO, N., HIRSHBERG, A., SCHEITHAUER, BW, COHEN, Y, LOEWENTHAL, R, TRAKHTENBROT, L., PAZ, N., KOREN-MICHOWITZ, M., WALDMAN, D., LEIDER-TREJO, L., TOREN, A., CONSTANTINI, S., RECHAVI, G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med*. 2009 Feb 17; 6(2).
- BONGSO, A., LEE, E. H. Stem cells: their definition, classification and sources. In *Stem cells - from bench to bedside*. BONGSO, A., LEE, E. H. Singapore. World scientific publishing co., 1-13, 2005. ISBN 978-981-256-937-0.
- BRYANT, P. J., SCHWARTZ, P. H. Stem cells. In *Fundamentals of the stem cell debate*. MONROE, K. R., MILLER, R. B., TOBIS, J. S. Berkeley and Los Angeles, University of California, 10-36, 2008.
- CHATTERJEE, T., SARKAR, R. S., DHOT, P. S., KUMAR, S., KUMAR, V. K. Adult stem cells plasticity: dream or reality? *Armed Forces Med J India*, 66:56-60, 2010.
- GIORDANO, A., GALDERISI, U., MARINO, I. R. From the laboratory bench to patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.*, 211:27-35, 2007.
- Jackson, L., Jones, D. R., Scotting, P., Sottile, V. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic

- applications. *J Postgrad Med*, 53:121-127, 2007.
- JOGGERST, S. J., HATZOPOULOS, A. K. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol*, 11:20-39, 2009.
- KATRITSIS, D. G., SOTIROPOULOU, P. A., KARVOUNI, E., KARABINOS, I., KOROYESIS, S., PEREZ, S. A., VORIDIS, E. M., PAPAMICHAIL, M. Transcatheter transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005 Jul;65(3):321-9.
- KOLEDOVÁ, Z., DIVOKÝ, V., HORVÁTHOVÁ, M., FELLNEROVÁ, I. *Kmeňové bunky, využití ve výzkumu a klinické praxi*. Univerzita Palackého v Olomouci, 1. vyd., 54 pp., 2011. ISBN 978-80-244-2690-7.
- LIRAS, A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *Journal of Translational Medicine*, 8(131):1-15, 2010.
- MAZO, M., ARAÑA, M., PELACHO, B., PROSPER, F. Mesenchymal stem cells and cardiovascular disease: a bench to bedside roadmap. *Stem Cells Int*. 2012;2012:175979. doi: 0.1155/2012/175979.
- MIYAHARA, Y., NAGAYA, N., KATAOKA, M., YANAGAWA, B., TANAKA, K., HAO, H., ISHINO, K., ISHIDA, H., SHIMIZU, T., KANGAWA, K., SANO, S., OKANO, T., KITAMURA, S., MORI, H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006 Apr;12(4):459-65.
- OSWALD, J., BOXBERGER, S., JORGENSEN, B., FELDMANN, S., EHNINGER, G., BORNHÄUSER, M., WERNER, C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 22:377-384, 2004
- PURI, M. C., NAGY, A. Concise review: embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells*, 30:10-14, 2012.
- SMITH, C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*, 10(1):9-16, 2003.
- STRAUER, B. E., BREHM, M., ZEUS, T., BARTSCH, T., SCHANNWELL, C., ANTKE, C., SORG, R. V., KÖGLER, G., WERNET, P., MÜLLER, H. W., KÖSTERING, M. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 1;46(9):1651-8.
- TROUSON, A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Medicine*, 7:29, 2009
- TROUSON, A., THAKAR, R. G., LOMAX, G., GIBBONS, D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Medicine*, 9:52, 2011.
- TUBO, R. Fundamentals of cell-based therapies. In *Principles of Regenerative Medicine*. Atala A. et al. Canada. Elsevier Inc., 16-26, 2008. ISBN 978-0-12-369410-2.
- XAYMARDAN, M., CIMINI, M., WEISEL, R. D., LI, R. Bone marrow stem cells: properties and pluripotency. In *Principles of regenerative medicine*. Atala A. et al. Canada. Elsevier Inc., 268-283, 2008. ISBN 978-0-12-369410-2.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Terapeutické využitie kmeňových buniek

Lucia Menšíková, Peter Musil,
Ondrej Sprušanský, Ján Kyselovič,
Marek Máťuš
Farmaceutická fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
matus@fpharm.uniba.sk

Úvod

Kmeňové bunky sú nediferencované bunky, ktoré predstavujú esenciálne stavebné kamene viacbunkových organizmov. Sú zdrojom, z ktorého pochádzajú všetky bunky organizmu a ich základnou funkciou v organizme je produkcia nových buniek.

Medzi základné charakteristiky kmeňových buniek patrí schopnosť diferenciácie na iný typ buniek organizmu (nevratný proces, pri ktorom vzniká z menej špecializovanej bunky bunka viac špecializovaná na určitú funkciu) a schopnosť sebaobnovy (proces zaisťujúci zachovanie pôvodných vlastností kmeňových buniek i v dcérskych bunkách vznikajúcich z materských kmeňových buniek). Delenie, pri ktorom z kmeňovej bunky vznikajú dve nové kmeňové bunky s vlastnosťami rovnakými s materskou bunkou, sa nazýva symetrické delenie. Druhý typ delenia kmeňových buniek predstavuje asymet-

rické delenie, pri ktorom z kmeňovej bunky vzniká jedna diferencovaná bunka a jedna nová kmeňová bunka (Ulloa-Montoya a kol., 2005). Kmeňové bunky sú schopné veľkého počtu delenia (teoreticky až nekonečného). Schopnosť delenia kmeňových buniek je takmer neobmedzená, pretože v nich pôsobia špecializované mechanizmy (telomeráza) zabráňujúce meraniu reprodukčného času bunkovými molekulovými hodinami v podobe telomér (Koledová a kol., 2011). Treťou a poslednou črtou kmeňových buniek je ich schopnosť funkčnej rekonštitúcie tkaniva v podmienkach *in vivo* (Ulloa-Montoya a kol., 2005).

Rozdelenie kmeňových buniek

Kmeňové bunky môžeme na základe ich plasticity a zdrojov pôvodu klasifikovať podľa zdroja alebo podľa potencie (tab. 1, Gholamrezanezhad, 2011).

Tab. 1. Rozdelenie kmeňových buniek

	typ kmeňových buniek	charakteristika
Zdroj	embryonálne	pluripotentné bunky získané z vnút. bunkovej masy blastocysty predstavujú skoré embryonálne štádium
	dospelé	<i>endoderm. pôvod:</i> kmeňové bunky pľúc, prostaty, mliečnej žľazy, vaječníkov... <i>mezoderm. pôvod:</i> kmeňové bunky kostnej drene hematopoetické, mezenchýmové kmeňové bunky <i>ektoderm. pôvod:</i> kmeňové bunky pokožky
	nádorové	prítomné takmer vo všetkých typoch nádorov
	indukované pluripotentné	umelo vytvorené z nepluripotentných buniek
Potencia	totipotentné	zygota, morula, spóra schopné vytvoriť všetky bunky tela a organizmus
	pluripotentné	embryonálne kmeňové bunky, kalus schopné vytvoriť všetky bunky všetkých tkanív
	multipotentné	progenitorové b.: hematopoetické, mezenchymálne kmeňové bunky tvoria limitované množstvo buniek
	unipotentné	prekurzorové bunky

Embryonálne kmeňové bunky

Do skupiny kmeňových buniek embryonálneho pôvodu patria epiblastové, trofoblastové a embryonálne kmeňové bunky. Epiblastové kmeňové bunky predstavujú pluripotentné kmeňové bunky schopné diferenciácie na všetky typy buniek dospelého organizmu, ktorých pôvod tkvie v epiblaste. Trofoblastové kmeňové bunky pochádzajú z trofoblastu a sú multipotentnými bunkami schopnými diferenciácie iba na bunkové typy placenty (Koledová a kol., 2011).

Embryonálne kmeňové bunky vznikajú z oplodneného vajíčka (zygoty) po rozlíšení obalových buniek trofoblastu od buniek, z ktorých vznikne embryo v štádiu blastocysty. Embryonálne kmeňové bunky sú pluripotentnými bunkami schopnými diferenciácie na deriváty troch primárnych zárodočných vrstiev, ktoré sú zároveň schopné neobmedzeného počtu delení (Ying a kol., 2003). Pluripotencia embryonálnych kmeňových buniek je zabezpečená expresiou transkripčných faktorov Oct4, Nanog, Sox2, ktoré tvoria jadro regulačnej siete potláčajúcej expresiu génov vedúcich k diferenciácii týchto buniek na jednotlivé bunkové línie (Boyer a kol., 2005).

Embryonálne kmeňové bunky boli prvýkrát získané z

myší v roku 1981 (Evans a Kaufman, 1981; Martin, 1981). Ľudské embryonálne kmeňové bunky boli prvýkrát derivované v roku 1998 kolektívom okolo Jamesa Thomsona (Thomson a kol., 1998). Nakoľko sa línie ľudských embryonálnych kmeňových buniek získavajú oddelením vnútornej bunkovej masy blastocysty v skorom štádiu embryonálneho vývinu organizmu, dochádza pri tomto procese k deštrukcii embrya a jeho následnému usmrteniu, čo vyvoláva etické problémy v práci s týmito bunkami s vysokým terapeutickým potenciálom (Chatterjee a kol., 2010).

Dospelé kmeňové bunky

Dospelé/tkanivové kmeňové bunky sú špecializované kmeňové bunky nachádzajúce sa v zrelom, dospelom tkanive, ktoré sú prevažne multipotentné. Na rozdiel od embryonálnych kmeňových buniek majú tieto bunky iba limitovaný diferenciačný potenciál, nakoľko už dosiahli určitý stupeň vývoja. Najdôležitejšiu úlohu zohrávajú spomenuté bunky v procese reparácie a regenerácie tkanív, pretože zaisťujú tvorbu nových buniek potrebných pre rast a vývoj tkaniva. Tkanivové kmeňové bunky sú schopné nielen tvorby nových buniek identických s pôvodným tkanivom, ale za určitých okolností sú

schopné zmeniť sa na tkanivovú bunku iného typu – transdiferenciácia (Koledová a kol., 2011).

Väčšina dospelých kmeňových buniek neprodukuje nové bunky neustále, ani sa stále nedelí, ale zotrváva v stave pokoja – quiescencie. Nepravidelné delenie buniek je dôležité z hľadiska udržiavania homeostázy tkaniva a taktiež sa týmto spôsobom predchádza akumulácii onkogénne pôsobiacich dejov vyplývajúcich z chýb vznikajúcich počas dlhého obdobia bunkovej sebaobnovy (Bowie a kol., 2007).

Tkanivové kmeňové bunky sú v tkanive lokalizované v nikách – skupinách buniek tvoriacich mikroprostredie, ktoré umožňuje kmeňovým bunkám dosiahnuť ich identitu, teda schopnosť sebaobnovy a diferenciácie. Niku môžeme charakterizovať ako prostredie špecializované na podporu, udržiavanie a ochranu kmeňových buniek poskytujúce bunke optimálne podmienky pre jej existenciu (Scadden 2006).

Medzi tkanivové kmeňové bunky patria:

- Nervové kmeňové bunky, ktoré sú prítomné v mozgu a sú zdrojom neurónov, ako aj mikroglií, astrocytov, oligodendrocytov,
- Epidermálne kmeňové bunky (keratinocytové kmeňové bunky, kmeňové bunky rohovky...), ktoré sú prítomné v koži a vlasových folikuloch a produkujú bunky na obnovu pokožky, rohovky, rast vlasov, chlupov a nechto,
- Kmeňové bunky prsnej žľazy, ktoré tvoria všetky typy buniek prsnej žľazy
- Svalové kmeňové bunky (satelitné bunky), ktoré sa nachádzajú medzi svalovými vláknami, tvoria bunky priečne pruhovaného (kostrového svalstva),
- Srdcové kmeňové bunky, ktoré sa diferencujú na kardiomyocyty a bunky ciev,
- Kmeňové bunky čreva prítomné v kryptách sú zdrojom epitelových a sekrečných buniek (Koledová a kol., 2011),
- Hematopoetické kmeňové bunky (prítomné v kostnej dreni, slezine, fetálnej pečeni, pupočníkovej a periférnej krvi) tvorené v priebehu embryonálneho vývinu v niekoľkých orgánoch, v dospelosti však iba kostnou dreňou,
- Mezenchýmové kmeňové bunky – kmeňové bunky spojivového tkaniva (bunky strómy) prítomné v nehematopoetickej stróme kostnej drene, kde zabezpečujú mikroprostredie podporujúce diferenciáciu hematopoetických kmeňových buniek (Sacchetti a kol., 2007).

Nádorové kmeňové bunky

Nádorové kmeňové bunky (identifikované takmer vo všetkých typoch nádorových ochorení) vznikajú buď z nádorových buniek získaním vlastností kmeňových bu-

niek alebo z tkanivových kmeňových buniek patologickou zmenou genetickej informácie – nádorovou transformáciou (Koledová a kol., 2011). Tieto bunky majú schopnosť sebaobnovy a diferenciácie na mnohé typy buniek, avšak na rozdiel od iných typov kmeňových buniek sa delia nekontrolovateľne a možno ich od ostatných buniek v nádore odlíšiť na základe prítomnosti špecifických povrchových markerov (Gupta a kol., 2009). Nádorové kmeňové bunky sú vysoko rezistentné voči chemoterapii a rádioterapii (Gholamrezanezhad, 2011).

Indukované pluripotentné kmeňové bunky

Indukované pluripotentné kmeňové bunky sú bunkami vznikajúcimi ľudským zásahom premenou diferencovaných buniek na bunky kmeňové – reprogramovaním. Indukované pluripotentné kmeňové bunky vznikajú umelo z buniek nepluripotentných indukciou špecifických génov pluripotentných kmeňových buniek v diferencovaných bunkách, a to vnesením génov Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 na vektoroch alebo zmenou génovej expresie prostredníctvom microRNA (Koledová a kol., 2011). Tieto bunky sú podobné prirodzene sa vyskytujúcim pluripotentným bunkám (napr. embryonálnym bunkám) v mnohých aspektoch: expresia génov a proteínov, generačná doba, diferenciácia schopnosť, potencia či tvorba teratómov (Gholamrezanezhad, 2011). Prvýkrát boli indukované kmeňové bunky vytvorené v roku 2006 z myších fibroblastov vnesením génov Oct4, Sox2, Klf4 a c-Myc (Yamanaka a Takahashi, 2006). O rok neskôr boli vytvorené aj indukované pluripotentné kmeňové bunky z ľudských fibroblastov (Takahashi a kol., 2007; Yu a kol., 2007). Technika indukcie buniek umožňuje vedcom získavať pluripotentné kmeňové bunky bez zásahu do vyvíjajúceho sa embrya, čím odpadávajú etické zábrany práce s týmito bunkami (Gholamrezanezhad, 2011).

Terapeutické využitie kmeňových buniek

Kmeňové bunky ako zdroj nových, zdravých, funkčných buniek priniesli nové možnosti liečby, alebo aspoň príslub liečby rôznych poúrazových stavov (napr. poškodenie miechy), degeneratívnych chorôb (Huntingtonova, Parkinsonova choroba), diabetes, imunodeficitných stavov a rakoviny (Koledová a kol., 2011).

Momentálne je jedinou spoľahlivou metódou využívajúcou kmeňové bunky transplantácia hematopoetických kmeňových buniek (kostnej drene alebo pupočníkovej krvi), ktorá je vhodná pre pacientov s onkohematologickými ochoreniami (Kita a kol., 2011). Terapia kmeňovými bunkami však nie je obmedzená iba na využívanie hematopoetických kmeňových buniek, ale aj iných typov kmeňových buniek a to v oblasti regeneratívnej

medicíny. Niektoré diagnózy sú už takými bunkami liečené (napr. poškodené kĺbové spojenia).

Použite kmeňových buniek (ich účinnosť a rizikovosť) pri mnohých iných diagnózach/ochoreniach je momentálne v štádiu (nielen) klinického skúšania. Medzi iné patria aj tieto terapeutické indikácie (Gholamrezanezhad, 2011):

- Infarkt myokardu, ischemická choroba srdca, chronické srdcové zlyhanie.
- Neurodegeneratívne ochorenia (Parkinsonova, Alzheimerova choroba), poškodenie miechy.
- Diabetes mellitus.
- Poškodenie pečene (cirhóza, chronické ochorenia).

Záver

Nato, aby kmeňové bunky preukázali svoj liečebný potenciál, sa musia diferencovať, proliferovať a následne prežívať v tkanive, do ktorého boli transplantované. V diferenciácii kmeňových buniek zohráva kľúčovú úlohu mikroprostredie, do ktorého sú tieto bunky transplantované, rastové faktory a lokálne bunkové interakcie. Veľkou výzvou budúcnosti je teda zvýšiť diferenciačnú schopnosť dospelých kmeňových buniek na špecifické typy buniek a tým zvýšiť aj možnosť ich využitia v medicíne.

Abstract

Stem cells are emerging as therapeutic candidates in a variety of diseases because of their capacities to differentiate into various specific cell types. However, there are various types of cells associated with stemness – embryonic, adult, artificially reprogrammed, and cancer. Each type of stem cells has its characteristics and potential to be used in therapy of various diseases. In this short review, we will revisit the properties that define individual types of stem cells and review the data from the therapeutic use of stem cells.

Literatúra

BOWIE, M. B., KENT, D. G., DYKSTRA, B., MCKNIGHT, K. D., MCCAFFREY, L., HOODLESS, P. A., EAVES, C. J. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (14): 5878-5882, 2007.

BOYER, L. A., LEE, T. I., COLE, M. F., JOHNSTONE, S. E., LEVINE, S. S., ZUCKER, J. P., GUENTHER, M. G., KUMAR, R. M., MURRAY, H. L., JENNER, R. G., GIFFORD, D. K., MELTON, D. A., JAENISCH, R., YOUNG, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6):947-956, 2005.

CHATTERJEE, T., SARKAR, R. S., DHOT, P. S., KUMAR, S., KUMAR, V. K. Adult stem cells plasticity: dream or reality? *Armed Forces Med J India*, 66:56-60, 2010.

EVANS, M. J., KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154-156, 1981.

GHOLAMREZANEZHAD, A. *Stem cells in clinic and research*. In Tech, Rijeka, pp.804, 2011.

GUPTA, P. B., CHAFFER, C. L., WEINBERG, R. A. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med.*, 15 (9): 1010-1012, 2009.

KITA, K., LEE, J. O., FINNERTY, C. C., HERNDON, D. N. Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion. *Stem Cells Int.*, 2011:276193, 2011.

KOLEDOVÁ, Z. a kol. *Kmeňové buňky: využití ve výzkumu a klinické praxi*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, pp. 54, 2011.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(12):7634-7638, 1981.

SACCHETTI, B., FUNARI, A., MICHENZI, S., DI CESARE, S., PIERSANTI, S., SAGGIO, I., TAGLIAFICO, E., FERRARI, S., ROBEY, P. G., RIMINUCCI, M., BIANCO, P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131(2):324-336, 2007.

SCADDEN DT: The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097):1075-1079, 2006.

TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K., YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5):861-872, 2007.

THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S., JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282 (5391):1145-1147, 1998.

ULLOA-MONTOYA, F., VERFAILLIE, C. M., HU, W. S. Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 100:12-27, 2005.

YAMANAKA, S., TAKAHASHI, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663-676, 2006.

YING, Q. L., NICHOLS, J., CHAMBERS, I., SMITH, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3):281-292, 2003.

YU, J., VODYANIK, M. A., SMUGA-OTTO, K., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., FRANE, J. L., TIAN, S., NIE, J., JONSDOTTIR, G. A., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, I. I., THOMSON, J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858):1917-1920, 2007.

Trypanosoma brucei – zlý patogén alebo dobrý model pre štúdium fascinujúcich rôznorodostí života?

Anton Horváth

Adresa Katedra biochémie,
Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
horvath@fns.uniba.sk

Úvod

Trypanosoma brucei je jednobunkový organizmus z čeľade *Trypanozomatidae*, podľa ktorej nazývame aj všetky rody, ktoré do nej patria. Všeobecne je známy najmä ako pôvodca spavej nemoci – smrteľného ochorenia rozšíreného v subsaharskej časti Afriky. Menej známe sú ochorenia, ktoré vyvolávajú jeho príbuzní. V Strednej a Južnej Amerike je to Chagasova choroba spôsobovaná *Trypanosoma cruzi*. Najrozšírenejšími sú však leishmaniózy, ktorých pôvodcami je viacero druhov leishmanií. S chorobami, ktoré vyvolávajú sa možno stretnúť okrem Austrálie na všetkých obývaných kontinentoch. Nielen teda vo vzdialených tropických krajinách, ale aj v prímorských oblastiach južnej Európy.

Všetky trypanozomatidy sú obligátne parazity a veľa z nich vyvoláva vážne ochorenia ľudí aj hospodárskych zvierat a rastlín. Vedci začali študovať trypanozomatidy ešte pred tým, ako sa vedelo o ich patogenite. V polovici 19. storočia boli objavené v krvi rýb a žiab a nezdalo sa, že by spôsobovali svojim hostiteľom nejaké problémy. Svetelným mikroskopom boli popri jadre detegované bičíky a s jeho bázou asociované farbiteľné teliesko nazvané kinetoplast. Od kinetoplastu pochádza aj názov celého radu Kinetoplastidae, do ktorého trypanozomatidy patria. Dnes by sme povedali, že od svojho objavu boli trypanozomatidy niekoľko desaťročí výlučne predmetom základného výskumu. Až na prelome 19. a 20. storočia sa dali trypanozomatidy do súvislosti s chorobami, ktoré spôsobujú. Nasledujúce roky boli v znamení intenzívneho hľadania prostriedkov, ktorými by sa trypanozomiázy dali liečiť – v ich štúdiu teda začal dominovať aplikovaný medicínsky výskum. Postupne sa ukázalo, že v trypanozomatídach je veľké množstvo metabolických dráh a fenoménov, ktoré dovtedy neboli opísané v žiadnom inom organizme (Horváth, 2005). Opäť preto začali byť zaujímavé aj pre základný výskum. Bol v nich objavený nový spôsob ukotvenia proteínov do membrány pomocou glykozylfosfatidylinozitolovej (GPI) kotvy (Holder a Cross, 1981), prvý raz bol u nich opísaný aj fenomén varíovania teloméryných sekvencií na koncoch chromozómov (Bernards a kol., 1986). Oba tieto fenomény sú dnes považované za všeobecné atribúty eukaryotických buniek. Trypanozomatidy však majú aj mnoho fenoménov typických len

pre ne, či užku skupinu organizmov. Napríklad majú len jedinú mitochondriu a kinetoplast je miestom, kde je kumulovaná celá mitochondriálna DNA s unikátnou topológiou (Simpson, 1972); trypanozomatidy majú ako jediné známe organizmy glykolýzu oddelenú od cytoplazmy v špecializovanej organelle nazývanej glykozóm (Oppenheimer a Borst, 1977); nezvyčajnou organelou sú aj acidokalcizómy (Vercsei a kol., 1994) s vysokou koncentráciou pyro- a polyfosfátov (Urbina a kol., 1999). Unikátny je oxidoredukčný systém trypanotiónu, v ktorom sú dve molekuly glutatiónu kovalentne spojené molekulou spermidínu (Fairlamb a Cerami, 1985). RNA editing je fenomén, pri ktorom postranskripcnou modifikáciou primárnej RNA môže byť v extrémnych prípadoch zmenené aj viac ako 50 % jej pôvodnej informácie (Benne a kol., 1986; Stuart a kol., 2005). Trypanozomatidy sú tak modelovým organizmom pre štúdium všeobecných fenoménov eukaryotickej bunky aj unikátnych dráh ukazujúcich neočakávané rôznorodosti života.

Životný cyklus *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei počas svojho životného cyklu strieda dvoch hostiteľov: človeka alebo zviera a muchu tse-tse. Samce aj samičky muchy tse-tse sa živia krvou a pri každom bodnutí infikujú cicavčích hostiteľov. Trypanosoma sa niekoľko dní množí v mieste bodnutia, kde sa pravdepodobne v dôsledku imunitnej reakcie vytvára zápal. Odtiaľ sa parazity dostávajú do krvi, lymfatických uzlín a postupne do iných orgánov a aj do centrálneho nervového systému (CNS). Práve napadnutím CNS vyvolávajú symptómy typické pre spavú nemoc. V tomto štádiu je choroba už prakticky neliečiteľná. Keď sú trypanozómy spolu s krvou nasaté do tráviaceho traktu hmyzu, musia sa prispôbiť drastickej zmene podmienok. Zo života v krvnom riečisku pri 37 °C sa dostávajú do tráviaceho traktu muchy tse-tse a musia sa adaptovať na chladnejšiu teplotu a nové zdroje potravy. Týmto zmenám trypanozómy prispôbujú aj svoj metabolizmus a tvar. Krvné trypanozómy sú prakticky úplne závislé od glykolýzy ako zdroja energie. Funkcia mitochondrie je v nich obmedzená a úplne chýbajú enzýmové komplexy dýchacieho reťazca. Hmyzie

štádium sa v tráviacom trakte hmyzu prispôsobuje limitovaným zdrojom výživy a obnovuje plnú funkciu mitochondrie vrátane oxidačnej fosforylácie (Horváth, 2005).

Dýchací reťazec *Trypanosoma brucei*

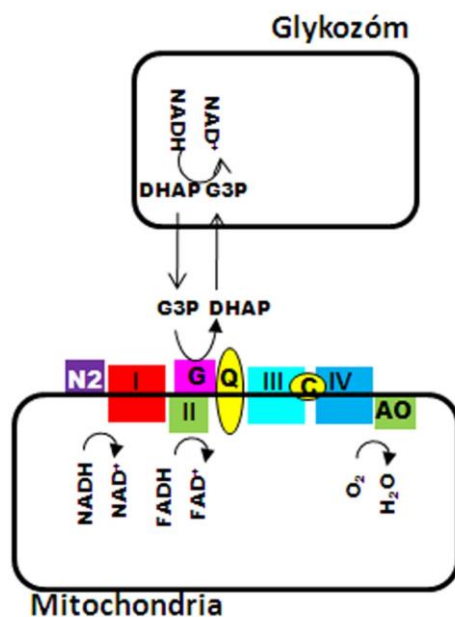
Oxidačná fosforylácia je hlavným zdrojom energie pre väčšinu aeróbnych organizmov. Jej zložkami sú dýchací reťazec (DR) a ATPsyntáza. DR využíva energiu elektrónov redukovaných koenzýmov NADH a FADH_2 , ktoré pochádzajú z katabolických procesov bunky, na vytvorenie elektrochemického potenciálu na vnútornej mitochondriálnej membráne. Elektrochemický potenciál je hnacou silou pre ATPsyntázu na biosyntézu ATP.

DR *T. brucei* tvoria 4 enzýmové komplexy: komplex I NADHdehydrogenáza a komplex II sukcinátdehydrogenáza, ktoré prenášajú elektróny na ubichinón; komplex III cytochróm c reductáza posúvajúca elektróny z ubichinónu na cytochróm c a komplex IV cytochróm c oxidáza, cez ktorú sa elektróny dostávajú až na ich finálny akceptor kyslík (Obr. 1). Popri tejto klasickej dráhe má však *T. brucei* aj niekoľko alternatívnych vetiev, ktoré tiež prenášajú elektróny, no nevyužívajú ich energiu na tvorbu membránového potenciálu. Sú to alternatívna NADHdehydrogenáza NDH2 pôsobiaca paralelne s komplexom I (Fang a Beattie, 2003), ktorá je zrejme hlavnou NADHdehydrogenázou v mitochondrii *T. brucei* (Verner a kol., 2013); Glycerol-3-fosfátdehydrogenáza (G3PDH) spájajúca metabolizmus glykozómov s dýchacím reťazcom a tiež prenášajúca elektróny na ubichinón

(Guerra a kol., 2006) a trypanozomálna alternatívna oxidáza (TAO) obchádzajúca komplexy III a IV a prenášajúca elektróny z ubichinónu priamo na kyslík (Chaudhuri a kol., 2006), (obr. 1).

Rozdiely v dýchacom reťazci trypanozomatíd a ich hostiteľov – ľudí je nielen v charaktere alternatívnych dráh, ale aj napríklad v štandardných enzýmových komplexoch. Hoci majú enzýmové vlastnosti porovnateľné so svojimi homológmi z iných organizmov, svojím podjednotkovým zložením sa dosť odlišujú. Napríklad komplex I *T. brucei* zrejme nedokáže prispievať k tvorbe membránového potenciálu (Verner a kol., 2011), komplex II je zložený z viac ako 10 podjednotiek, zatiaľ čo v iných organizmoch sú to len 4 podjednotky (Morales a kol., 2009), komplexy III a IV majú viaceré podjednotky, ktoré neboli dosiaľ opísané okrem trypanozomatíd v žiadnom inom organizme (Maslov a kol., 2002; Horváth a kol., 2005; Gnypová a kol., 2012).

Veľmi zaujímavou je aj funkcia ATPsyntázy nazývanej tiež komplex V oxidačnej fosforylácie. Vo vyvinutej mitochondrii v hmyzej časti životného cyklu využíva membránový potenciál na tvorbu ATP. Ako už bolo spomenuté, v krvi hostiteľa nie sú prítomné enzýmy dýchacieho reťazca tvoriace membránový potenciál. Tu komplex V svoju činnosť otáča. ATP netvorí, ale naopak štiepi a takto získanú energiu využíva na tvorbu membránového potenciálu (Schnauffer a kol., 2005). Ten je totiž nevyhnutný na ďalšie funkcie mitochondrie, ktoré priamo nesúvisia so získavaním energie, a ktoré zostávajú zachované aj v redukovaných mitochondriách krvného štádia.



Obr. 1. Dýchací reťazec *T. brucei* a jeho prepojenie s metabolizmom glykozómu

AO – trypanozomálna alternatívna oxidáza; C – cytochróm c; DHAP – dihydroxyacetónfosfát; G – glycerol-3-fosfátdehydrogenáza; G3P – glycerol-š-fosfát; N2* – alternatívna dehydrogenáza; Q – ubichinón; I, II, III a IV – komplexy I, II, III a IV;

Záver

Podľa oficiálnych odhadov Svetovej zdravotníckej organizácie je spavou nemocou nakazených 300 až 500 tisíc ľudí. Účinnosť dnes používaných liekov je nedostatočná a majú aj veľmi silné vedľajšie účinky. Za posledných niekoľko desaťročí sa nepodarilo vyvinúť žiadne liečivo s dostatočnou účinnosťou a cenovou dostupnosťou pre pacientov trpiacich touto chorobou. Dôvodom je niekoľko. Metabolizmus *T. brucei* je veľmi flexibilný a dokáže sa veľmi účinne brániť tak proti prirodzenej imunitě človeka ako aj proti rôznym chemoterapiám. Druhým dôležitým faktorom je, že vývoj nových liečiv je veľmi drahý. Vzhľadom na chudobu ľudí ohrozených touto chorobou nie je silná perspektíva, že by potenciálne nájdený liek mohol v blízkej budúcnosti finančne tieto náklady pokryť. Progres výskumu v tejto oblasti nie je preto viazaný na farmaceutické firmy, ale na pracoviská základného výskumu, ktorých prioritnou úlohou nie je komerčný výstup ako napríklad univerzity.

Na účinný boj proti chorobe vyvolanej *T. brucei* je nevyhnutné omnoho podrobnejšie poznanie jej metabolizmu vrátane oxidačnej fosforylácie. Každá odlišnosť medzi patogénom a hostiteľom je potenciálnym cieľom pre vývoj nového liečiva, ktoré by bez toxických účinkov na človeka efektívne eliminovalo parazita. Podrobné poznanie *T. brucei* pomôže nájsť aj lepší spôsob boja proti chorobám spôsobovaným aj inými trypanozomatidami, pretože ich metabolizmy sú pomerne blízke. Ako už bolo spomenuté napríklad leishmaniózy začínajú ohrozovať aj regióny na severnom pobreží Stredozemného mora a preto choroby spôsobované trypanozomatidami prestali byť vecou vzdialených exotických krajín a začínajú ohrozovať aj ľudí našich regiónov

Štúdium *T. brucei* prináša preto nielen údaje potrebné pre boj s chorobami, ktoré spôsobuje. Poznávaním tohto organizmu sme získali poznatky o dejoch, ktoré sme si dovtedy nevedeli ani predstaviť, ako napríklad RNA-editing či usporiadanie a replikácie kinetoplastovej DNA. Z tohto pohľadu vyplýva, že otázka v nadpise článku je zle položená. *T. brucei* je totiž súčasne krutý patogén aj modelový organizmus, ktorého skúmanie nám prináša obrovské množstvo nových poznatkov o svete, v ktorom žijeme.

Abstract

Trypanosoma brucei causes a fatal disease in Sub-Saharan Africa. In the same time it is a model for studying general properties of eukaryotic cells as well as fascinating diversity of life. *T. brucei* possess only single mitochondria with DNA concentrated to one place near to the basis of trypanosomal flagella. *Trypanosoma* changes two hosts during its life cycle - mammals and insects vector. Strong changes in environment between blood and insects gut are accompanied with changes cell shape and series of biochemical pathways including mitochondrial metabolism. One of them is oxidative phosphoryla-

tion that takes place in the inner mitochondrial membrane. This process in *T. brucei* differs from the one ongoing in the cells of vertebrate hosts. Each such difference is potential target for chemotherapy that could fight sleeping sickness that is caused by this pathogen. However today's drugs are not sufficient to combat it. More deep understanding of trypanosomal metabolism is necessary for more successful treatment of this disease.

Literatúra

- BENNE, R., van den BURG, J., BRAKENHOFF, J. P. J., SLOOF, P., van BOOM, J. H., TROMP, M. C. Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 1986, 46, 819-826.
- BERNARDS, A., MICHELS, P. A., LINCKE, C. R., BORST, P. Growth of chromosome ends in multiplying trypanosomes. *Nature* 1983, 303, 592-597.
- CHAUDHURI M, OTT RD, HILL GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 2006, 22, 484-491.
- FAIRLAMB, A.H., CERAMI, A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1985, 14, 187-198.
- FANG, J., BEATTIE, D. S. Identification of gene a 54 kDa alternative NADH dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 127, 73-77.
- GNUPOVÁ, A., PANICUCCI, B., PARIS, Z., VERNER, Z., HORVÁTH, A., LUKEŠ, J., ZÍKOVA, A. Disparate phenotypic effects from the knockdown of various *Trypanosoma brucei* cytochrome c oxidase subunits *Mol. Biochem. Parasitol.* 2012, 184, 90-98.
- GUERRA, D. G., DECOTTIGNIES, A., BAKKER, B. M. MICHELS, P. A. M. The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* spp. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006, 149, 155-169.
- HOLDER, A. A., CROSS, G. A. M. Glycopeptides from variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. C-terminal location of antigenically cross-reacting carbohydrate moieties. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 135-150.
- HORVÁTH, A. *Trypanozomatidy: Od štúdiá zákerých chorôb k objavom fascinujúcich rôznorodostí života*. 1. vyd. Bratislava : Univerzita Komenského, 2005. 80 s. ISBN 80-223-1990-2.
- HORVÁTH, A., HORÁKOVÁ, E., DUNAJČÍKOVÁ, P., VERNER, Z., PRAVDOVÁ, E., ŠLAPETOVÁ, I., CUNINKOVÁ, L., LUKEŠ, J. Downregulation of the nuclear-encoded subunits of the complexes III and IV disrupts their respective complexes but not complex I in procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molec. Microbiol.* 2005 58, 116-130.
- MASLOV, D. A., ZÍKOVA, A., KYSELOVA, I., LUKES, J. A putative novel nuclear-encoded subunit of the cytochrome c oxidase complex in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002, 125, 113-125.
- MORALES, J., MOGI, T., MINEKI, S., TAKASHIMA, E., MINEKI, R., HIRAWAKE, H., SAKAMOTO, K., OMURA, S., KITA, K. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric lp subunit. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 7255-7263.
- OPPERDOES, F. R. BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The Glycosome. *FEBS Lett.* 1977, 80, 360-364.
- SCHNAUFER, A., CLARK-WALKER, G. D., STEINBERG, A. G., STUART, K. The F1-ATP synthase complex in blood-

stream stage trypanosomes has an unusual and essential function *EMBO J.* 2005, 24, 4029-4040.
 SIMPSON, L. The kinetoplast of hemoflagellates. *Int. Rev. Cytol.* 1972, 32, 139-207.
 STUART, K. D., SCHNAUFER, A., ERNST, N. L., PANIGRAHI, A.K. Complex management: RNA editing in trypanosomes *Trends Biochem Sci.* 2005, 30, 97-105.
 URBINA, J. A., MORENO, B., VIERKOTTER, S., OLDFIELD, E., PAYARES, G., SANAHA, C., BAILEY, B.N., YAN, W., SCOTT, D. A., MORENO, S. N. J., AND DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 33609-33615.

VERCESI, A. E., MORENO, S. N., AND DOCAMPO, R. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 1994, 304, 227-233.
 VERNER, Z., ŠKODOVÁ, I., POLÁKOVÁ, S., ĎURIŠOVÁ-BENKOVIČOVÁ, V., HORVÁTH, A., LUKEŠ, J. Alternative NADH dehydrogenase (NDH2): intermembrane-space-facing counterpart of mitochondrial complex I in the procyclic *Trypanosoma brucei*. *Parasitol.*, 2013, 140, 328-337.
 VERNER, Z., ČERMÁKOVÁ, P., ŠKODOVÁ, I., KRIEHOVÁ, E., HORVÁTH, A., LUKEŠ, J. Complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) is active in but non-essential for procyclic *Trypanosoma brucei* *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011, 175, 196-200.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Preeklampsia a fetálna DNA

Helena Fábryová, Peter Celec

Ústav molekulárnej biomedicíny,
 Lekárska fakulta,
 Univerzita Komenského v Bratislave
 helenafabryova@gmail.com
 petercelece@gmail.com

Úvod

Ochorenie tehotných s vývojom podobným ako preeklampsia poznali už starí Gréci. Termín „preeklampsia“ bol podľa ontológie GoPubMed použitý prvý raz v roku 1914 (Bonney 1914). Samotný termín „preeklampsia“ sa skladá z latinskej predložky „pre-“, čo znamená „pred“, gréckeho „ék“ znamenajúceho von a gréckeho „lampein“ čo znamená „zabysnutie“. Je to gestačný syndróm s klinickou manifestáciou v treťom trimestri (Chesley 1985). Najdôležitejšími klinickými indikátormi sú hypertenzia a proteinúria. Preeklampsia sa vyskytuje v 3 až 5 % tehotenstiev, čo z nej robí najbežnejšiu komplikáciu počas tehotenstva. Je najčastejšou príčinou maternálnej a perinatálnej morbidity a mortality (Costante and Filetti 2011).

Progres v pochopení etiológie a patogenézy ochorenia je veľmi pomalý (George and Granger 2011). Častý výskyt ochorenia, nevhodná liečba (v súčasnej dobe indukcia predčasného pôrodu) a v mnohých prípadoch fatálne následky robia výskum v oblasti nielen zaujímavým, ale aj veľmi potrebným. Preeklampsia sa často označuje aj ako „choroba teórií“. Jednou z týchto teórií je, že zvýšená hladina fetálnej DNA u preeklamptických žien v porovnaní s normálnymi tehotenstvami nie je dôsledkom, ale príčinou preeklampsie (Vlkova, Szemes et al. 2010).

Preeklampsia

Preeklampsia je ochorenie spojené s gestačnou hypertenziou. Klinická manifestácia sa objavuje v treťom trimestri (Chesley 1985). Je najčastejšou príčinou potratov a poškodení plodu. Je to najčastejšia a zároveň

nebezpečná tehotenská komplikácia (Roberts, Taylor et al. 1989). Príčina preeklampsie stále nie je presne známa a mechanizmus rozvoja nevysvetlený. Väčšina prác zaoberajúca sa preeklampiou považuje za symptómy hypertenziu, proteinúriu, zníženú diurézu, problémy so zrakom, náhle zvýšenie hmotnosti, opuchy a kŕče. Všeobecne sa gestačná hypertenzia spája s preeklampiou (Chesley 1985).

Napriek tomu, že spúšťajúci faktor preeklampsie stále nie je identifikovaný, klinické štúdie naznačujú, ktoré faktory môžu ovplyvňovať prejavy preeklampsie. Srdcové príhody pred tehotenstvom môžu zvyšovať riziko preeklampsie (Liu, Huang et al. 2012). Medzi poznatkami, ktoré o preeklampsii máme, sa nájdu aj faktory ovplyvňujúce preeklampiou, ktoré sa môžu zdať kontroverzné. Podľa niektorých štúdií môže riziko preeklampsie znižovať fajčenie a tehotenstvo počas puberty. Riziko najbežnejšieho typu Downovho syndrómu (asociovaný s vekom matky vyšším ako 35 rokov) môže znižovať dlhodobé užívanie orálnej antikoncepcie (Nagy, Gyorffy et al. 2012). Na druhej strane užívanie kontraceptívnych prípravkov preukázateľne zvyšuje riziko preeklampsie, aj keď v niektorých štúdiách znižuje riziko gestačnej hypertenzie (Thadhani, Stampfer et al. 1999). Podľa iných štúdií však riziko preeklampsie znižuje (Magnussen, Vatten et al. 2007).

Fetálne nukleové kyseliny

Prítomnosť fetálnych nukleových kyselín bola preukázaná už koncom deväťdesiatych rokov (Lo, Corbetta et al. 1997). Fetálne nukleové kyseliny sú zvýšené v plaz-

me preeklamptických žien, čo môže nasvedčovať tomu, že fetálne nukleové kyseliny hrajú úlohu v etiológii preeklampsie. Zvýšené hladiny cirkulujúcej fetálnej DNA pred nástupom symptómov môžu byť následkom hypoxie a reoxygenácie v placentе, čo môže viesť k zvýšenému oxidačnému stresu v tkanivách a zvýšenej placentálnej apoptóze a nekróze (Hahn, Rusterholz et al. 2011). Molekulárnobiologickou hypotézou o spúšťajúcom mechanizme preeklampsie je zvýšená hladina mRNA placentálnej telomerázy (Geifman-Holtzman, Xiong et al. 2010) a transfekcia maternálnych buniek cirkulujúcou fetálnou RNA (Vlkova, Szemes et al. 2010). Hypotézu je potrebné ďalej overovať, aj keď výsledky

nedávnych štúdií (Scharfe-Nugent, Corr et al. 2012) ako aj výsledky experimentov nášho pracoviska postupne a čiastočne túto hypotézu potvrdzujú.

Imunológovia vedia, že DNA je pre organizmus akýmsi signálom nebezpečenstva, pokiaľ sa nenachádza tam, kde by sa za normálnych okolností mala (O'Neill 2009). Spomínané nedávne štúdie zaoberajúce sa preeklampsiou a aktiváciou TLR9 prispievajú k potvrdeniu hypotézy, že zvýšená hladina fetálnych nukleových kyselín v plazme preeklamptických žien je pravdepodobne skôr príčinou ako dôsledkom preeklampsie (Scharfe-Nugent, Corr et al. 2012).

Tab. 1. Rizikové faktory spojené s preeklampsiou

Faktor	Vplyv na riziko rozvoja preeklampsie	Citácia
Prvorodička	Zvýšené riziko	(George and Granger 2011)
Vek (prvorodičky)	Adolescencia – znížené riziko	(Martins Mda, Santos et al. 2011)
Dvojčatá	Bez efektu (retrospektívna štúdia)	(Liu, Huang et al. 2012)
Obezita (BMI)	Žiadna závislá asociácia	(Anderson, McCowan et al. 2012)
Fajčenie	Znižuje riziko	(Perni, Wikstrom et al. 2012)
Zvýšený oxidačný stres v plazme matky	Asociácia s ďalšími komplikáciami ako aj preeklampsiou	(Hsieh, Chen et al. 2012)
Hypotyreoidizmus v prvom trimestri	Zvýšené riziko	(van den Boogaard, Vissenberg et al. 2011)
Etnicita matky	Východoáziati znížené riziko, Mexičania najvyššie riziko (štúdia obyvateľov New Yorku)	(Gong, Savitz et al. 2012)

Záver

Zvýšené hladiny fetálnych nukleových kyselín v plazme matky v preeklamptických tehotenstvách v porovnaní s fyziologickými sú pravdepodobne príčinou a nie dôsledkom preeklampsie. Ďalší výskum v tejto oblasti sa pravdepodobne bude uberať smerom odhalenia úlohy nukleáz v regulácii hladiny fetálnych nukleových kyselín v plazme matky. Tiež bude potrebné ďalej charakterizovať vlastnosti cirkulujúcich fetálnych nukleových kyselín.

Abstract

Preeclampsia is the most common pregnancy-related disease associated with proteinuria and hypertension. It is also one of the leading causes of perinatal mortality and morbidity. Despite intense research, the aetiology is unknown. Fetal DNA present in maternal plasma was found to be higher in women suffering from preeclampsia. It has been suggested that this extracellular fetal DNA is the consequence of placental damage, but it might be also a cause of preeclampsia.

Literatúra

- BONNEY, V. (1914). "Pre-eclampsia" at the Twenty-fourth Week; Acute Toxaemia; Caesarean Section." *Proc R Soc Med* 7(Obstet Gynaecol Sect): 118-121.
- CHESLEY, L. C. (1985). "Diagnosis of preeclampsia." *Obstet Gynecol* 65(3): 423-425.
- COSTANTE, G., FILETTI, S. (2011). "Early diagnosis of medullary thyroid carcinoma: is systematic calcitonin screening appropriate in patients with nodular thyroid disease?" *Oncologist* 16(1): 49-52.
- GEIFMAN-HOLTZMAN, O., XIONG, Y. et al. (2010). "Increased placental telomerase mRNA in hypertensive disorders of pregnancy." *Hypertens Pregnancy* 29(4): 434-445.
- GEORGE, E. M., GRANGER, J. P. (2011). "Mechanisms and potential therapies for preeclampsia." *Curr Hypertens Rep* 13(4): 269-275.
- HAHN, S., RUSTERHOLZ, C. et al. (2011). "Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia." *Placenta* 32 Suppl: S17-20.
- LIU, H., HUANG, T. T. et al. (2012). "Risk factors and risk index of cardiac events in pregnant women with heart disease." *Chin Med J (Engl)* 125(19): 3410-3415.

LO, Y. M., CORBETTA, N. et al. (1997). "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum." *Lancet* 350(9076): 485-487.

MAGNUSSEN, E. B., VATTEN, L. J. et al. (2007). "Prepregnancy cardiovascular risk factors as predictors of preeclampsia: population based cohort study." *BMJ* 335(7627): 978.

NAGY, G. R., GYORFFY, B. et al. (2012). "Lower risk for Down syndrome associated with longer oral contraceptive use: a case-control study of women of advanced maternal age presenting for prenatal diagnosis." *Contraception*.

O'NEILL, L. A. (2009). "DNA makes RNA makes innate immunity." *Cell* 138(3): 428-430.

ROBERTS, J. M., TAYLOR, R. N. et al. (1989). "Preeclampsia: an endothelial cell disorder." *Am J Obstet Gynecol* 161(5): 1200-1204.

SCHARFE-NUGENT, A., CORR, S. C. et al. (2012). "TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia." *J Immunol* 188(11): 5706-5712.

THADHANI, R., STAMPFER, M. J. et al. (1999). "A prospective study of pregravid oral contraceptive use and risk of hypertensive disorders of pregnancy." *Contraception* 60(3): 145-150.

VLKOVA, B., SZEMES, T. et al. (2010). "Circulating free fetal nucleic acids in maternal plasma and preeclampsia." *Med Hypotheses* 74(6): 1030-1032.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Phage display

Eva Lengyelová, Peter Celec

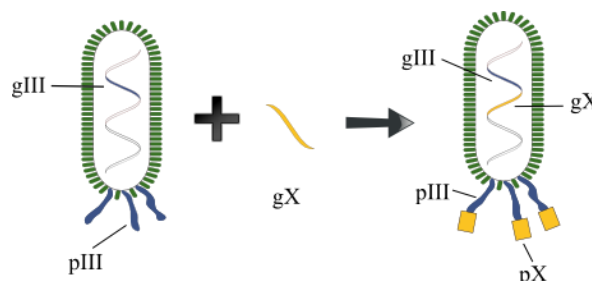
Ústav molekulárnej biomedicíny,
Lekárska fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
e.lengyelova89@gmail.com,
petercelec@gmail.com

Úvod

Bakteriofágy (fágy) sú vírusy napádajúce bakteriálne bunky. Genóm fága kóduje proteínový obal s rôznymi proteínovými vláknami, vďaka ktorým sa fágy dokážu naviazať na povrch bakteriálnych buniek. Phage display je molekulárna metóda, pri ktorej sa modifikuje genetický materiál kódujúci práve tento proteínový povrch a vlákna fágov. Do genómu sú vložené cudzorodé sekvencie DNA kódujúce proteíny. Tieto proteíny sú potom exprimované na povrchu fága ako fúzny proteín s pôvodným obalovým proteínom (Smith 1985). Princíp je znázornený na obrázku 1. Po tejto modifikácii sú fágy schopné naviazať sa na rôzne peptidy, proteíny aj bunky, ktorých povrchové proteínové receptory umožňujú väzbu s novými zobrazovanými proteínmi fága. Phage display sa využíva na objasnenie interakcií proteínov a peptidov, pre identifikáciu peptidových ligandov a na *in vivo* mapovanie receptorov na povrchu ciev rôznych tkanív (Azzazy et al. 2002).

Phage display

Phage display metóda bola prvýkrát opísaná v roku 1985. Génom fága bol modifikovaný za účelom študovať interakcie medzi zobrazovanými proteínmi fágov a proteínovými protilátkami (Smith 1985). Široká škála využitia metódy bola možná po zostavení tzv. phage display knižníc, v ktorej každá fágová častica obsahuje inú vloženú sekvenciu DNA a tak aj iný zobrazovaný proteín na obale. Knižnica má veľkú diverzitu, môže obsahovať až 10^9 rôznych fágov, resp. klonov (Clackson et al. 2004).

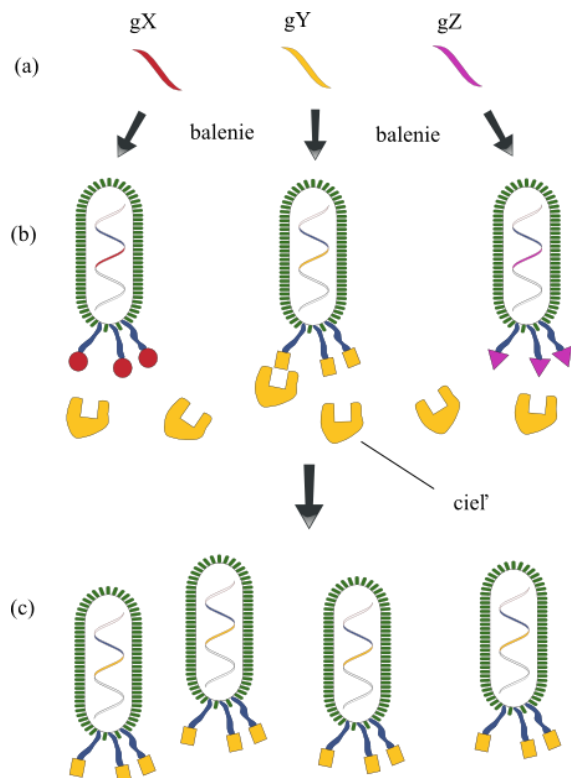


Obr. 1. Vloženie cudzorodej sekvencie (gX) do genómu fága (gIII) a zobrazenie príslušného proteínu (pX) ako fúzny proteín s pôvodným povrchovým proteínom (pIII)

Postup používaný pri phage display môžeme rozdeliť do niekoľkých základných krokov. V prvom kroku sa modifikuje DNA fága a vytvorí sa knižnica. Potom nasleduje selekcia špecifických klonov z knižnice, schopných naviazať sa na cieľ a nakoniec ich analýza. Knižnicu je možné ľahko selektovať, výhodou je, že protokoly na selekciu sa dajú ľahko optimalizovať a zmeniť podľa vlastností cieľa. Používa sa selekcia „paning“, ktorá je založená na afinite ligandu k cieľu. Pri tomto skríningu je knižnica zmiešaná s cieľom, nasleduje inkubácia, počas ktorej sa vytvoria špecifické väzby medzi cieľom a kompatibilným klonom. Po inkubácii sú nešpecifické klony, ktoré sa nenaviazali na cieľ, zmyté. Pri tomto kroku sa musí zväžiť viacero faktorov, napr. čas premývania. Pri intenzívnom premývaní sa môže stať, že sa odmyjú aj vysoko špecifické klony, ktoré sú v slabej väzbe s cieľom. Na druhej strane, keď je premytie ne-

dostatočné, môžu prevládať pevné, ale nešpecifické väzby. Po premývaní nasleduje eluovanie, pri ktorom nastáva signifikantné zníženie alebo zvýšenie pH. Týmto spôsobom sa rozruší väzba medzi cieľom a špecifickým klonom. Špecifické klony sú potom namnožené v hostiteľských baktériách (Hoogenboom 1997). Postup je schematicky znázornený na obrázku 2. Namnoženie a analýza klonov je časovo najnáročnejší proces. Celý

skrining sa cyklicky opakuje 3-6-krát. Po poslednom cykle sú špecificky naviazané klony sekvenované, aby sa určilo, ktoré zobrazované proteíny sú schopné naviazať sa na cieľ. Postup od vytvorenia knižnice až po analýzu klonov, sa nazýva „phage display cycle“ (Hoogenboom et al. 1998). Phage display skrining možno uskutočniť *in vivo* aj *in vitro* (Zou et al. 2004).



Obr. 2. Postup phage display metódy:

- vytvorenie knižnice – variácie náhodných nukleotidov (gX, gY, gZ) a ich „zabalenie“ do fága,
- selekcia fágov ktoré sa vedia naviazať na cieľ,
- amplifikácia špecifických fágov.

In vitro a in vivo phage display

Pri *in vitro* skriningu je možné skúmať interakcie fágov s rôznymi cieľmi, napr. so syntetickými proteínmi, syntetickými protilátkami, nukleovými kyselinami (Kay et al. 1996) a s anorganickými cieľmi (Whaley et al. 2000). *In vitro* pokusy však nedokážu dostatočne napodobniť komplexitu dejov, ktoré sa odohrávajú v organizmoch. Problémom tejto selekcie je, že špecificky sa viažu klony s vysokou afinitou k cieľu, získané v *in vitro* podmienkach, nie sú schopné efektívne sa viazať na cieľ v *in vivo* podmienkach. To môže byť dôsledkom toho, že cieľ v *in vivo* podmienkach je prítomný v oveľa nižšej koncentrácii ako v prípade *in vitro* a môže byť aj menej stabilný. *In vivo* phage display je modifikáciou *in vitro* metódy, ktorú zaviedli na prekonanie vyššie uvedených limitácií (Pasqualini et al. 1996).

Pri *in vivo* metóde je fágová knižnica aplikovaná priamo do živých organizmov. Existujú rôzne spôsoby aplikácie fágov. Najčastejšou je intravenózna aplikácia. Po aplikácii sú fágy ponechané cirkulovať v obehú určitý čas, potom sú zvieratá uspaté a ich telo je premyté fyziolo-

gickým roztokom na odstránenie nešpecifických klonov (Rajotte et al. 1998), cieľové orgány alebo tkanivá sú následne vybraté a homogenizované. Homogenizát sa rozdelí na dve časti. Jedna časť je použitá na určenie počtu a identifikáciu naviazaných fágov. Druhá časť je použitá na namnoženie špecifických klonov a je podávaná ďalším zvieratám (Rajotte et al. 1998).

Záver

Metóda phage display bola objavená pred 20 rokmi. Technológia *in vivo* phage display sa vyvíjala pomaly a proteínové knižnice sa používali relatívne málo. V posledných rokoch sa vďaka rôznym vylepšeniam stala postupne populárnou. Dnes úspešne slúži na skúmanie proteínových interakcií a identifikáciu peptidových ligandov (Szardenings 2003). Je to veľmi efektívna metóda, vďaka enormnej veľkosti knižníc je možné skúmať interakcie až biliónov proteínov naraz. Ako každá technika aj phage display ma isté obmedzenia. Nevýhodou tejto techniky je, že je časovo náročná a drahá. Nové generácie metódy phage display sa vyvíjajú práve

v tomto smere. Znížiť náklady a minimalizovať čas potrebný napr. na časovo náročnú amplifikáciu fágov v baktériách (Dias-Neto et al. 2009).

Abstract

Phage display is a high-throughput molecular method. The main advantage of phage display method is using the unique properties of bacteriophages. It is possible to modify their capsid proteins without losing his functionality by modifying their genome. This modification enables the capsid proteins to interact with various molecules. Phage display has currently a wide range of uses, particularly in defining protein-protein interactions, designing of new polypeptides or identifying peptide ligands.

Literatúra

AZZAZY, H. M., HIGSMITH, Jr., W. E. (2002). "Phage display technology: clinical applications and recent innovations." *Clin Biochem* 35(6): 425-445.
CLACKSON, T., LOWMAN, H. B. (2004). Phage display : a practical approach. Oxford, Oxford University Press.
DIAS-NETO, E., NUNES, D. N. et al. (2009). "Next-generation phage display: integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective high-throughput analysis." *PLoS One* 4(12): e8338.

HOOGENBOOM, H. R. (1997). "Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies." *Trends Biotechnol* 15(2): 62-70.
HOOGENBOOM, H. R., de BRUINE, A. P. et al. (1998). "Antibody phage display technology and its applications." *Immunotechnology* 4(1): 1-20.
KAY, B. K., HOESS, R. H. (1996). *Principles and Applications of Phage Display. Phage Display of Peptides and Proteins*. BRIAN, K., JILL, W., BURLINGTON, M. J. Academic Press: 21-34.
PASQUALINI, R., RUOSLAHTI, E. (1996). "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." *Nature* 380(6572): 364-366.
RAJOTTE, D., ARAP, W. et al. (1998). "Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display." *J Clin Invest* 102(2): 430-437.
SMITH, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228(4705): 1315-1317.
SZARDENINGS, M. (2003). "Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential." *J Recept Signal Transduct Res* 23(4): 307-349.
WHALEY, S. R., ENGLISH, D. S. et al. (2000). "Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly." *Nature* 405(6787): 665-668.
ZOU, J., DICKERSON, M. T. et al. (2004). "Biodistribution of filamentous phage peptide libraries in mice." *Mol Biol Rep* 31(2): 121-129.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Periodontitída

Katarína Janšáková, Peter Celec

Ústav molekulárnej biomedicíny,
Lekárska fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave
janskova.katarina@gmail.com,
petercelec@gmail.com

Úvod

Periodontitída predstavuje zápalové ochorenie ústnej dutiny. Deštruuje oblasť zubného lôžka a tkanivo v blízkosti zuba. V pokročilom štádiu ochorenia tkanivo už nie je schopné zub zachytávať a dochádza k jeho bolestivému vypadávaniu. Periodontitída postihuje všetky vekové kategórie a je globálne rozšírená s prevalenciou približne 10 %. (Rabello, Soedarsono et al. 2006).

Medzi základné prejavy periodontitídy patria napr. opuchnuté, krvácajúce ďasná, vytváranie hnisavých váčkov v oblasti zubných krčkov, či nápadné predlžovanie zubov vznikajúce v dôsledku úbytku podporného tkaniva (Hajishengallis 2010; Karasneh, Ababneh et al. 2011). Doposiaľ nie sú známe presné príčiny vzniku a progresie periodontitídy. Známých je viacero faktorov endogénneho a exogénneho pôvodu, ktorých vzájomné vplyvy stimulujú vznik a priebeh ochorenia (Laine, Crie-laard et al. 2012).

Rozdelenie periodontitídy

Ochorenie periodontitída má rôzne prejavy podľa ktorých sa rozdeľuje do viacerých skupín.

Chronická periodontitída predstavuje ochorenie dlhodobého charakteru s pomalou progresiou. Nie je sprevádzaná akútnou bolesťou a má charakter chronického zápalu. Chronická periodontitída postihuje predovšetkým dospelých jedincov vo veku 30 a viac rokov.

Agresívna periodontitída má akútny charakter. Vyskytuje sa už v pubertálnom období sprevádzaná veľkou bolesťou a kazivosťou zubov. Charakteristická je tvorba hnisavých váčkov pri zubných koreňoch už mŕtveho zuba.

Agresívna periodontitída má viacero kategórií (Armitage 1999):

- juvenilná periodontitída,
- predpubertálna periodontitída,
- rapídne progresívna periodontitída.

Periodontitída ako dôsledok vplyvu systémového ochorenia organizmu vzniká na základe už existujúceho ochorenia organizmu. Ide napr. o *diabetes mellitus* a kardiovaskulárne ochorenia. Tehotenstvo môže pôsobiť ako spúšťač mechanizmu periodontitídy (Karasneh, Ababneh et al. 2011).

Etiopatogenéza periodontitídy

Periodontitída vzniká ako dôsledok pôsobenia veľkého množstva rôznych faktorov. Príslušné faktory rozdeľujeme na faktory prostredia a genetické faktory. Do faktorov prostredia radíme predovšetkým činitele zahrňujúce socioekonomický stav jedinca, vek, životný štýl (fajčenie, výživa), ústna hygiena, stres a iné. Genetické faktory predstavujú najmä dedičné predispozície – polymorfizmy, ktoré človek môže ovplyvniť, ale nie zmeniť (Semenoff-Segundo, Porto et al. 2012).

Ďalší faktor ovplyvňujúci vznik periodontitídy predstavuje prítomnosť patogénnych, gram negatívnych baktérií. Medzi periodontitídu spôsobujúce baktérie patria predovšetkým *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (da Silva-Boghossian, do Souto et al. 2011). Dané baktérie sa v určitom množstve nachádzajú aj u zdravých jedincov, pri ochorení periodontitídou sa však ich počet niekoľkonásobne zvyšuje. Nachádzajú sa na povrchu jazyka, zubov a súhrnne vytvárajú orálny ekosystém (Bodineau, Coulomb et al. 2009). Prítomnosť spomínaných baktérií spôsobuje rozrušovanie tkanív tým, že do prostredia aktívne vylučujú endotoxíny (Valenza, Veihermann et al. 2009). Baktérie produkujú voľné radikály ako súčasť svojho metabolizmu a tým indukujú vznik oxidačného stresu a karbonylového stresu (Baltacioglu, Akalin et al. 2008).

Oxidačný stres predstavuje stav, pri ktorom dochádza k zvýšenej tvorbe voľných radikálov za zníženej tvorby antioxidantov. Voľné radikály a antioxidanty vytvárajú v bunkách nerovnovážny stav, ktorý vedie k patologickým procesom (Pepe, Balci et al. 2009). V bunkách rozrušujú bunkové štruktúry deštrukciou proteínov, DNA a peroxidáciou lipidov. Ak bunka rozsah svojho poškodenia už nedokáže reparačnými procesmi opraviť, nastáva apoptóza, t. j. programovaná bunková smrť (Gil Del Valle 2010). Voľné radikály však nespôsobujú iba patologický stav. V organizme sa podieľajú na procesoch, ktoré sú nevyhnutné pre jeho správne fungovanie. Zúčastňujú sa signálnych dráh, diferenciačných procesov, génovej expresie a fyziologických procesov, akým je napr. regulácia svalového tonusu (Dizdaroglu, Jaruga et al. 2002; Brimfield, Soni et al. 2012). Voľné radikály nevznikajú len ako prirodzená súčasť metabolizmu, ale aj ako dôsledok pôsobenia vonkajších činiteľov, t. j. mutagénnych látok, akými sú napr. UV, röntgenové žiarenie a rôzne chemikálie (Dizdaroglu, Jaruga et al. 2002).

Prečo organizmus nie je schopný odvrátiť zápal obrannými mechanizmami, nie je doteraz známe. Periodontitída aktivuje zápalovú reakciu, ktorej výsledkom je aktivácia rôznych druhov leukocytov (Ding, Zhao et al. 2012). Organizmus sa bráni odstraňovaním poškodených častí, čím ešte viac podporuje narušenie podporného zubného tkaniva (Xu and Wei 2006).

Záver

Periodontitída je ústne ochorenie napádajúce zubné lôžko, sprevádzané stratou zuba. Vyskytuje celosvetovo a jeho prevalencia naďalej stúpa. Je známe veľké množstvo faktorov, ktoré zodpovedajú za vznik a priebeh ochorenia. Doteraz však nemožno jasne tvrdiť, ktorý faktor je kľúčový. Podstatný ani nemusí byť vplyv jednotlivých činiteľov ako takých, ale ich spoločný efekt má deštruktívne následky (Arbes and Matsui 2011). Jedným z hlavných problémov periodontitídy je, že sa nedá úspešne liečiť. Jej príznaky a progresia sa však dajú značne ovplyvniť. Pravidelné zubné prehliadky, dôkladná hygiena a výživná strava môžu ochoreniu ak nie predísť, tak aspoň zmierniť príznaky.

Abstract

Periodontitis is an inflammatory disease of the oral cavity. The final phase of this disease is accompanied by the loss of teeth. The formation and progression of the disease affects a large number of factors. Periodontitis is divided into several entities. Each entity has its own characteristics. An essential element of periodontitis is involvement of bacteria, individual health status and oxidative stress.

Literatúra

- ARBES, S. J., Jr., MATSUI, E. C. (2011). "Can oral pathogens influence allergic disease?" *J Allergy Clin Immunol* 127(5): 1119-1127.
- ARMITAGE, G. C. (1999). "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." *Ann Periodontol* 4(1): 1-6.
- BALTACIOGLU, E., AKALIN, F. A. et al. (2008). "Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis." *Arch Oral Biol* 53(8): 716-722.
- BODINEAU, A., COULOMB, B. et al. (2009). "Increase of gingival matured dendritic cells number in elderly patients with chronic periodontitis." *Arch Oral Biol* 54(1): 12-16.
- BRIMFIELD, A. A., SONI, S. D. et al. (2012). "Metabolic activation of sulfur mustard leads to oxygen free radical formation." *Free Radic Biol Med* 52(4): 811-817.
- da SILVA-BOGHOSSIAN, C. M., do SOUTO, R. M. et al. (2011). "Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases." *Arch Oral Biol* 56(9): 899-906.
- DING, C., ZHAO, L. et al. (2012). "Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism (rs2234663) and periodontitis susceptibility: a meta-analysis." *Arch Oral Biol* 57(6): 585-593.
- DIZDAROGLU, M., JARUGA, P. et al. (2002). "Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement." *Free Radic Biol Med* 32(11): 1102-1115.
- GIL DEL VALLE, L. (2010). "WITHDRAWN: Oxidative stress in

aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans." *Biomed Pharmacother*.

HAJISHENGALLIS, G. (2010). "Complement and periodontitis." *Biochem Pharmacol* 80(12): 1992-2001.

KARASNEH, J. A., ABABNEH, K. T. et al. (2011). "Investigation of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms in Jordanian patients with chronic and aggressive periodontitis." *Arch Oral Biol* 56(3): 269-276.

LAINE, M. L., CRIELAARD, W. et al. (2012). "Genetic susceptibility to periodontitis." *Periodontol* 2000 58(1): 37-68.

PEPE, H., BALCI, S. S. et al. (2009). "Comparison of oxidative stress and antioxidant capacity before and after running exercises in both sexes." *Gend Med* 6(4): 587-595.

RABELLO, D., SOEDARSONO, N. et al. (2006). "CSF1 gene associated with aggressive periodontitis in the Japanese population." *Biochem Biophys Res Commun* 347(3): 791-796.

SEMENOFF-SEGUNDO, A., PORTO, A. N. et al. (2012). "Effects of two chronic stress models on ligature-induced periodontitis in Wistar rats." *Arch Oral Biol* 57(1): 66-72.

VALENZA, G., VEIHELMANN, S. et al. (2009). "Microbial changes in periodontitis successfully treated by mechanical plaque removal and systemic amoxicillin and metronidazole." *Int J Med Microbiol* 299(6): 427-438.

XU, Y., WEI, W. (2006). "A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats." *Arch Oral Biol* 51(9): 794-803.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Poruchy ADP/ATP prenášača a ich patologické dôsledky

Juraj Laco, Eva Dobáková,
Gabriela Gavurníková

Katedra biochémie,
Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave

laco@fns.uniba.sk
dobakova@fns.uniba.sk
gavurnikova@fns.uniba.sk

Úvod

Mitochondrie poskytujú väčšinu energie pre eukaryotickú bunku vo forme ATP, molekuly s vysokým energetickým potenciálom (obr. 1). Energetika bunky vyžaduje kontinuálnu syntézu ATP a jeho recykláciu. ATP je regenerované v mitochondrii v procese oxidačnej fosforylácie (OxPhos). Recyklácia ATP si vyžaduje výmenu mnohých metabolitov tvorených a spotrebúvaných proteínmi OxPhos. Prekážkou prechodu substrátov býva vnútorná mitochondriálna membrána, ktorá je len čiastočne permeabilná. Hydrofilné metabolity môžu preniknúť touto bariérou pomocou proteínov patriacich do rodiny mitochondriálnych prenášačov (MCF). Najviac zastúpený a najštudovanejší proteín je ADP/ATP prenášač (Adenine Nucleotide Carrier, Ancp alebo ANC). Je to jadrom kódovaný proteín, katalyzujúci výmenu ATP^{4-} tvoreného v mitochondriách pomocou ATP syntázy a ADP^{3-} tvoreného v cytosole mnohými energiu-spotrebujúcimi reakciami. Preto je Ancp priamo využívaný v produkcii mitochondriálnej energie v spolupráci s mitochondriálnym fosfátovým prenášačom (Pfcp). Výmena ADP/ATP nie je elektroneutrálna a je poháňaná mitochondriálnym membránovým potenciálom ($\Delta\Psi$). Okolo 30 % energie produkovanej v mitochondriálnej respirácii je spotrebovanej na tento výmenný proces. Syntéza ATP v OxPhos je závislá na koordinovanej expresii a interakcii proteínov kódovaných jadrom i mitochondriami. Mutácie jadrových génov využívaných v udržiavaní mtDNA boli opísané a asociované s mnohými klinickými fenotypmi (Hudson a kol., 2008). Navy-

še bolo opísaných množstvo ochorení asociovaných s dysfunkciou Ancp a mitochondriálnou innstabilitou. Cieľom tohto krátkeho prehľadného článku je opísať ochorenia súvisiace s poruchami ADP/ATP prenášača.

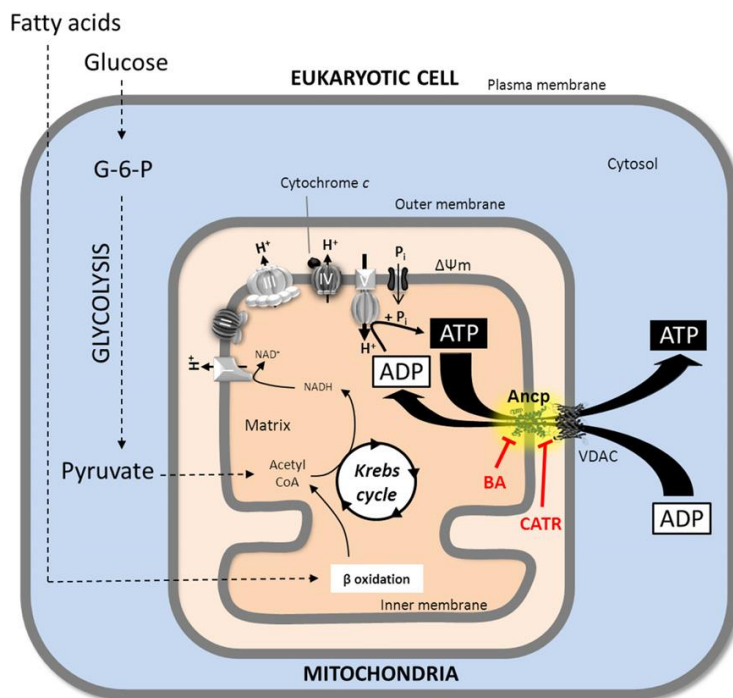
ADP/ATP prenášač

Ancp je jeden z najviac zastúpených mitochondriálnych proteínov a tvorí až 10 % proteínového zloženia vnútornej mitochondriálnej membrány v mitochondriách srdca hovädzieho dobytky. Ancp je kódovaný 4 rozdielnymi génmi *SLC25A4* (ANC1 alebo ANT1), *SLC25A5* (ANC3 alebo ANT2), *SLC25A6* (ANC2 alebo ANT3) a *SLC25A31* (ANC4 alebo ANT4). Ich expresia je tkanivovo špecifická a prísne regulovaná. U ľudí je expresia závislá na vývinovom stupni a bunkovej proliferácii. Expresia týchto génov je regulovaná rôznymi transkripčnými elementami v promotórových oblastiach. Preto je Ancp logickým kandidátom regulácie bunkovej závislosti na energetickom metabolizme. ANC1, ANC2 a ANC3 majú podobnú organizáciu v genóme. Obsahujú 4 exóny a 3 intróny v podobných pozíciách. Aminokyselinové sekvencie proteínov sú na takmer 90% identické, kým štvrtá izoforma len na 70 %. Gén ANC4 má 6 exónov (Dolce a kol., 2005). Okrem vysokej homológie majú ľudské ANC izoformy špecifické kinetické a funkčné parametre. ANC3/ANT2 isoforma vykazuje vyššie hodnoty K_M ako ANC1 a ANC2 (De Marcos Lousa a kol., 2002).

ANC1/ANT1 (obr. 2) je exprimovaný na vysokej úrovni v srdci, svaloch, mozgu, ale v nízkej hladine v proliferujúcich bunkách ako myoblasty počas vývinu svalov. Je lokalizovaný na subtelomericknej oblasti chromozómu 4. *ANC2/ANT3* je lokalizovaný v pseudo-autozomálnej oblasti chromozómov X a Y (Slim a kol., 1993). *ANC2* je izoforma exprimovaná vo všetkých tkanivách a fibroblastoch v závislosti na oxidačnom metabolizme (Stepien a kol., 1992). Expresia *ANC2* a *ANC3* sa znižuje počas diferenciácie.

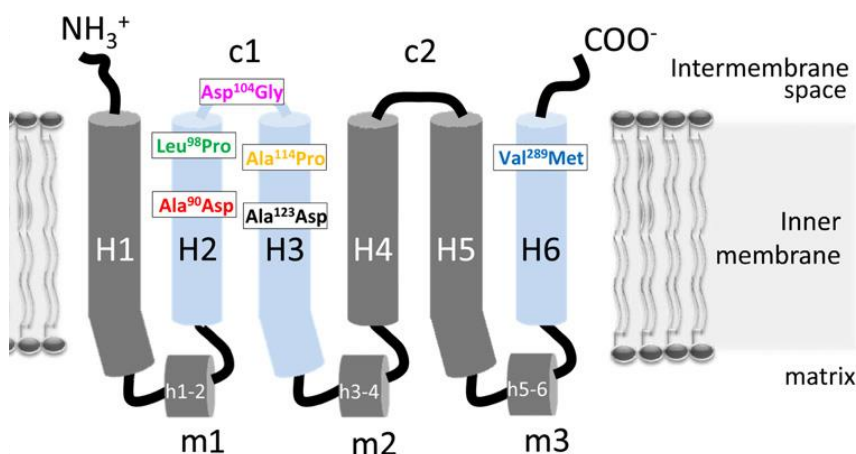
ANC3/ANT2 je lokalizovaný na chromozóme X. Jeho expresia je rastovo regulovaná a indukovaná v proliferujúcich bunkách s vysokou potrebou energie (obličky, pečeň, slezina), ale tiež v rakovinových bunkách (Stepien a kol., 1992). Čiastočne sa využíva v udržiavaní $\Delta\Psi$ a inhibícii apoptózy.

ANC4/ANT4 bol nedávno identifikovaný u ľudí a myší. Je evolučne konzervovaný u cicavcov a je exprimovaný najmä v semenníkoch, spermiiach, mozgu a pečeni (Dolce a kol., 2005). Doteraz neboli nájdené génové mutácie tohto génu súvisiace s ľudskými ochoreniami.



Obr. 1. Schematické znázornenie metabolických pochodov a prepojenie jednotlivých komponentov počas produkcie ATP v aeróbne rastúcej eukaryotickej bunke.

Syntéza ATP nasledovaná katabolizmom glukózy a lipidov prebieha hlavne v mitochondriách. Úlohou respiračného reťazca (komplexy I-IV) je translokácia protónov H^+ cez vnútornú mitochondriálnu membránu, pričom vzniká elektrický potenciál a pH gradient ($\Delta\Psi$), ktorý poháňa syntézu ATP pomocou enzýmu ATP syntáza (komplex V). Proces OxPhos umožní generovať tvorbu ATP z ADP a P_i a ADP/ATP prenášač hrá kľúčovú úlohu transportu adenínových nukleotidov cez membrány mitochondrií. CATR (carboxyatractylide) a BA (bongkreik acid) sú špecifické inhibitory Ancp (Cléméncon a kol., 2013).



Obr. 2. 3D štruktúrny model ľudského ADP/ATP prenášača. Schematická topológia ľudského ANC1

H1-H6 predstavujú 6 hydrofóbných transmembránových helixov, m1-m3 reprezentujú matrixové hydrofilné slučky, každá obsahuje malý hydrofilný helix (h1-2, h3-4 a h5-6) a 2 cytosolické slučky (c1 a c2). Oblasti asociované s patologickými mutáciami sú znázornené svetlo modrou farbou (H2, c1, H3 and H6) Mutácie poskytujúce klinický fenotyp sú znázornené rôznymi farbami – Ala90Asp (červená), Leu98Pro (zelená) Asp104Gly (ružová), Ala114Pro (oranžová), Ala123Asp (čierna) a Val298Met (modrá) (Cléméncon a kol., 2013).

Patofyziologické aspekty poruchy ADP/ATP prenášača

Genetické defekty ovplyvňujúce syntézu ATP môžu navodiť neurodegeneratívne ochorenia ako maternálne dedičný Leigh syndróm (MILS), neuropatie, ataxie a retinálnu pigmentózu (NARP). Poškodenia OxPhos indukujú mnohé klinické fenotypy. Poruchy ANC ovplyvňujú rôzne tkanivá na rôznych úrovniach a vykazujú rozmanité symptómy.

Ľudské ANC defekty môžu vzniknúť dereguláciou na transkripčnej alebo translačnej úrovni alebo kvôli proteínovej inaktivácii. Zmenená expresia ANC bola opísaná u myoklonálnej epilepsie, ktorá bola asociovaná s potrhávanými myofibrilami, myopatiou, encefalopatiou, laktátovou acidózou, stavmi podobnými s mŕtvicou a Kearn-Sayreovým syndrómom. Podobne defekty fosfátového prenášača vedú k niekoľkým neonatálnym laktátovým acidózam, kardiomyopatiám a svalovým hypotóniám (Mayr a kol., 2011).

Zmenená syntéza ANC bola popísaná pri Rettovom syndróme (Forlani a kol., 2010) a pri chorobe Marie-Tooth typ 2A (Guillet a kol., 2010), kde je jasne ukázaná spojitosť medzi expresiou ANC a syntézou ATP a mitochondriálnou morfogenézou.

V roku 2002 ukázali imunochemické analýzy kostrových a srdcových svalov u pacientov so Sengerovým syndrómom deficienciu proteínu ANC1 (Jordens a kol., 2002). Získaný klinický obraz poukazoval na hypertropickú kardiomyopatiu, kongenitálny katarakt a laktátovú acidózu. Zrejme sa jedná o transkripčnú, translačnú alebo posttranslačnú modifikáciu, zodpovednú za daný syndróm. Boli nájdené autoprotiátky proti ANC1 u pacientov trpiacich dilatovanú kardiomyopatiu (DCM). Srdcový defekt ovplyvnil srdcové komory aj predsieň a bol špecifický pre DCM, avšak tento defekt nebol pozorovaný u ischemických, valvulárnych a hypertropických kardiomyopatiách (Dörner a Schultheiss, 2000). Napriek zvýšenému obsahu ANC bol transport nukleotidov znížený. Ostatné komponenty dýchacieho reťazca neboli ovplyvnené (Dörner a kol., 2006).

Zmenená expresia ANC izoforiem a znížená syntéza ATP v mitochondriách kostrových svalov asociovaná so zlyhaním srdca bola tiež popísaná na psom modeli (Rosca a kol., 2009). Nitroalkénová modifikácia Cys56 v proteíne ANC1 navodila akútnu ochranu srdca počas ischemickej reperfúzie (IR) tým, že vplývala na mitochondriálny permeabilizačný tranzitný pór (mPTP) alebo na ADP/ATP transport (Nadtochiy a kol., 2012).

Priamy účinok mutácie ľudského ANC bol opísaný zatiaľ iba v jednom prípade mitochondriálnej myopatie asociovananej s kardiomyopatiou (Palmieri a kol., 2005). Mutácie v géne ANC1 boli opísané v 5 prípadoch autozomálne dominantnej progresívnej externálnej oftalmoplégie (adPEO). Je to mitochondriálne ochorenie u mladých

ľudí a klinicky je charakteristické poklesom orgánov (ptosis), progresívnou muskulárnou slabosťou ovplyvňujúcou najmä očný sval, dysfágiou, dysfóniou a rôznymi neurologickými ochoreniami. Je asociované so 6 jadrovými génmi, ktoré kódujú ANC1, Twinkle, POLG, POLG2, OPA1 a p53R2 (Tynjismaa a kol., 2009). Pacienti s adPEO nesú štandardné aj mutované alely génu ANC1 (Kaukonen a kol., 2000).

Dôležitá otázka ostáva nezodpovedaná: ako defekty v ANC1 indukujú depléciu mtDNA? Bolo navrhnutých niekoľko hypotéz, ktoré hovoria o zapojení Ancp v udržiavaní dNTP pool-u (Kaukonen a kol., 2000) a jeho možnej úlohy v mitochondriálnej permeabilite (Chen, 2002). Zvýšenie oxidačného stresu (tvorba ROS) ako dôsledok zníženej syntézy ATP by mohlo vyústiť k defektom mitochondriálnej membrány a poruchám DNA (Fontanesi a kol., 2004).

mPTP, apoptóza a ADP/ATP prenášač

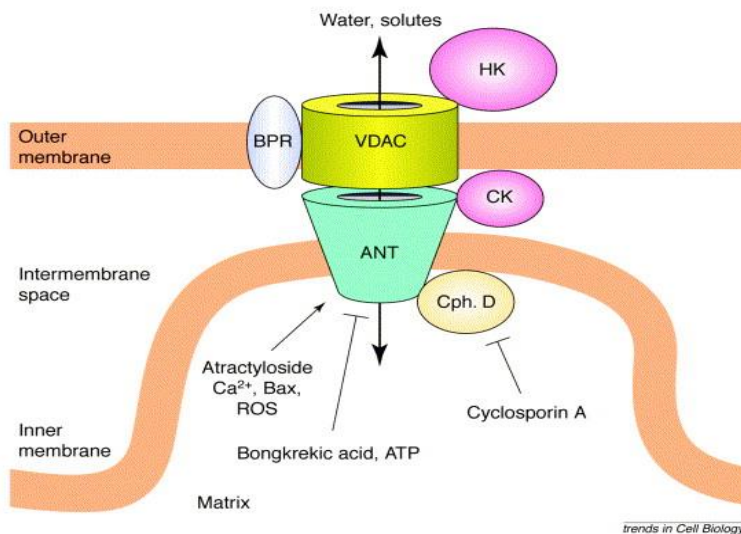
Ancp je kľúčovým metabolickým prepojením medzi mitochondriálnym matrix a cytosolom (ADP/ATP výmena). Participuje na mnohých modeloch mitochondriou navodenej apoptózy formovaním mitochondriálneho permeabilného tranzitného póru (mPTP). Masívne napučanie mitochondrií indukované vysokou koncentráciou vápnika bolo prvýkrát pozorované v mitochondriách izolovaných z pečene (Chappell a Crofts, 1965). Bolo to spôsobené otvorením nešpecifického kanála vo vnútornej mitochondriálnej membráne (Hunter a kol., 1976), ktorý bol pomenovaný mitochondriálny permeabilný tranzitný pór (mPTP). Jeho otvorenie indukuje rýchlu stratu nepermeability vnútornej membrány, ktorá sa stáva permeabilnou pre molekuly do 1500 Da. Výsledkom nie je len charakteristické napučanie matrixu, ale tiež kolaps mitochondriálneho potenciálu. Napučanie vedie k dizrupcii vonkajšej membrány a úniku molekúl ako cytochróm c, kaspázy a apoptózu iniciujúcich faktorov (AIF). Nič nie je známe o mitochondriálnej permeabilite za normálnych fyziologických podmienok. Za stresových podmienok, tvorba a otváranie mPTP vedie k smrti bunky nekrozou alebo apoptózou. Patofyziologická úloha mPTP bola študovaná u rôznych ochorení – IR (Crompton a kol., 1987), kardiomyopatiách (Nazareth a kol., 1991) a srdcových disfunkciách u potkanov (Griffiths a Halestrap, 1993).

Kanál mPTP póru je tvorený komplexom proteínov vonkajšej a vnútornej membrány a medzimembránového priestoru pozostávajúceho z napätovo a Ca^{2+} -závislého póru senzitívneho k cyklosporínu A (obr. 3) (CsA-sensitive high-conductance channel).

ANC3 izoforma má anti-apoptotickú funkciu, kde sa ukázala zvýšená frekvencia bunkovej smrti *in vitro* a *in vivo* pomocou RNA interferencie (Le Bras a kol., 2006). Ancp bol jedným z prvých potvrdených proteínov tvoria-

cich integrálnu časť mPTP (Hunter a Haworth, 1979), spolu s cyklofilínom D a mitochondriálnym porínom (VDAC). Bolo to potvrdené pozorovaním, že CATR je schopný indukovať otvorenie póru (Hunter a Haworth, 1979; Le Quoc a Le Quoc, 1988). Potvrďuje to, že tranzícia súvisí s konformáciou Ancp. ADP/ATP prenášač

šač funguje ako intermediát v interakcii medzi cyklofilínom D a mPTP (Halestrap a Davidson, 1990; Woodfield a kol., 1998). Zdá sa, že Ancp je skôr regulačný element mPTP ako jeho stabilná súčasť (Juhászova a kol., 2008).



Obr. 3. Schematické znázornenie úlohy ADP/ATP prenášača v mPTP
Opis v texte (Desagher a Martinou, 2000).

Rakovina

V zdravých bunkách je hlavným zdrojom energie OxPhos. Rakovinové bunky katabolizujú živiny odlišne, pretože využívajú aeróbnú glykolyzu. Vo väčšine rakovinových buniek až 80 % produkcie ATP vzniknutého v OxPhos je zabezpečených hypoxickou adaptáciou (Moreno-Sanchez a kol., 2007; Stubbs a Griffiths, 2010). Hypotéza hovorí, že poruchy v OxPhos môžu prerušiť dodávanie energie a tým zastaviť progresiu rakovinových buniek.

Za normálnych fyziologických podmienok ADP/ATP prenášač vymieňa cytosolické ADP^{3-} za matrixové ATP^{4-} cez vnútornú mitochondriálnu membránu a transport je poháňaný záporným membránovým potenciálom generovaným v OxPhos. Ak je OxPhos porušená, bunky rastú slabo, produkuje sa nízky potenciál len transportom ATP vs ADP (Giraud a Velours, 1997). V neprítomnosti potenciálu, ADP/ATP translokátor môže vymieňať buď ADP alebo ATP za ktorýkoľvek nukleotid.

ANC3/ANT2 je špecificky exprimovaný v nediferencovaných bunkách alebo v tkanivách schopných proliferácie a regenerácie (Stepien a kol., 1992; Dolce a kol., 2005). Je silno nadexprimovaný v rôznych ľudských rakovinových bunkách (Heddi a kol., 1994; Chevrollier a kol., 2005; Le Bras a kol., 2006). Tento gén teda môže predstavovať potenciálny terapeutický cieľ proti rakovi-

ne (Chevrollier a kol., 2010). ANC3 zabezpečuje reverzný transport – návrat glykolytického ATP do mitochondrie (Stepien a kol., 1992).

Mitochondriálny $ATP-Mg^{2+}/P_i$ prenášač (SCaMC) vymieňa $ATP-Mg^{2+}$ za HPO_4^{2-} alebo $HADP^{2-}$ medzi cytosolom a matrix (Laco a kol., 2010; Traba a kol., 2011) a transport je závislý na prítomnosti Ca^{2+} . Ostáva stále nejasné, ako sa tento proteín prípadne môže zapájať do procesov transportu adenínových nukleotidov v rakovinových bunkách.

Modelové systémy študujúce patologické stavy asociované s Ancp

Existujú systémy študujúce patologické stavy. Graham a kol. (1997) inaktivovali Anc1p v myšiach – model pre fenotyp myopatií a kardiomyopatií. Bol použitý na štúdium implikácií ANC v mPTP. Bunky z pacientov ad-PEO nevykazujú žiadny fenotyp a ANC1 nie je štandardne exprimovaný v žiadnych kultivovaných bunkách. Ľudské HeLa bunky z rakoviny krčka maternice exprimujú len ANC2 a ANC3 gény. Nadexpresia ANC1 indukuje apoptózu v ranných štádiách.

Dôležitým modelom sú kvasinky, ktoré sa široko využívajú na molekulárne štúdie a pre porovnanie dôsledkov

mutácií v ľudskom *ANC1* géne. *S. cerevisiae* má 3 homology ADP/ATP prenášačov: *AAC1*, *AAC2* a *AAC3*. Prítomnosť viacerých izoform v rôznych druhoch sa dá vysvetliť potrebou odpovede na rôzne stimuly a požiadavky, medzi ktorými je na prvom mieste koncentrácia kyslíka (Santamaria a kol., 2004). Expresia z promotora *AAC2* je indukovaná, keď sú bunky prenosené zo kvasiteľného (glukóza) na nesekvasiteľný uhlíkový substrát (glycerol) (Betina a kol., 1995) a je to jediná izoforma nevyhnutná pre rast na nefermentovateľnom zdroji uhlíka alebo pri absencii kyslíka. Trojitý mutant v génoch *AAC1-3* nie je schopný rásť na nefermentovateľnom substráte (Drgoň a kol., 1991).

Kvasinkový systém má výhody bezpečnej manipulácie, rýchleho rastu buniek, jednoduchých kultivačných podmienok a ľahko dostupných genetických nástrojov. Navyše mnohé bunkové a metabolické procesy nájdené u vyšších eukaryot sú konzervované v mnohých kvasinkových druhoch, vrátane post-translačnej modifikácie a sekrečných dráhach. Avšak existujú mnohé limitácie kvasiniek.

Iné organizmy evolučne bližšie k človeku ako kvasinky by mohli byť vhodnejšie pre jednotlivé štúdie. Avšak model *S. cerevisiae* nie je úplne nevhodný pre skríning liečiv namierených proti ľudským mitochondriálnym ochoreniam (Couplan a kol., 2011). Bolo identifikovaných 10 z celkového počtu 12000 látok z rôznych chemických knižníc molekúl, potenciálne aktívnych v liečbe dedičných mitochondriálnych ochorení zapríčinených deficienciou ATP syntázy.

Abstract

In aerobic eukaryotic cells, the high energy metabolite ATP is generated mainly within the mitochondria following the process of oxidative phosphorylation. The mitochondrial ATP is exported to the cytoplasm using a specialized transport protein, the ADP/ATP carrier, to provide energy to the cell. Any deficiency or dysfunction of this membrane protein leads to serious consequences on cell metabolism and can cause various diseases such as muscular dystrophy. Described as a decisive player in the programmed cell death, it was recently shown to play a role in cancer. The objective of this review is to summarize the current knowledge of the involvement of the ADP/ATP carrier, encoded by the *SLC25A4*, *SLC25A5*, *SLC25A6* and *SLC25A31* genes, in human diseases and of the efforts made at designing different model systems to study this carrier and the associated pathologies through biochemical, genetic, and structural approaches.

Literatúra

BETINA, S., GAVURNÍKOVÁ, G., HAVIERNIK, P., ŠABOVÁ, L. and KOLAROV, J. (1995) Expression of the *AAC2* gene encoding the major mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled at the transcriptional level by oxygen, heme and HAP2 factor. *Eur. J. Biochem.* 229: 651-657.

CLEMENCON, B., BABOT, M. and TRÉZÉGUET, V. (2013)

The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): Pathological implications of its dysfunction. *Molecular Aspects of Medicine* 34: 485-493.

COUPLAN, E., AIYAR, R. S., KUCHARCZYK, R., KABALA, A., EZKURDIA, N., GAGNEUR, J., ST ONGE, R. P., SALIN, B., SOUBIGOU, F., Le CANN, M., STEINMETZ, L. M., di RAGO, J. P. and BLONDEL M. (2011) A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108: 11989-11994.

CROMPTON, M., COSTI, A. and HAYAT, L. (1987) Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* 245: 915-918.

CHAPPELL, J. B. and CROFTS, A. R. (1965) Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria calcium ion-induced swelling. *Biochem. J.* 95: 378-386.

Chen, X. J. (2002) Introduction of an unregulated channel by mutations in adenine nucleotide translocase suggests an explanation for human ophthalmoplegia. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1835-1843.

CHEVROLLIER, A., LOISEAU, D., CHABI, B., RENIER, G., DOUAY, O., MALTHIERY, Y. and STEPIEN, G. (2005) ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37: 307-316.

CHEVROLLIER, A., LOISEAU, D., REYNIER, P. and STEPIEN, G. (2010) Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 562-567.

De MARCOS, LOUSA C., TRÉZÉGUET, V., DIANOUX, A. C., BRANDOLIN, G. and LAUQUIN, G. J. M. (2002) The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry* 41: 14412-14420.

DESAGHER, S. and MARTINOU, J. C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology.* 10 (9): 369-377.

DOLCE, V., SCARCIA, P., IACOPETTA, D. and PALMIER, F. (2005) A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett.* 579: 633-637.

DÖRNER, R. and SCHULTHEISS, H. P. (2000) The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. *Herz* 25: 176-180.

DÖRNER, A., GIESSEN, S., GAUB, R., GROSSE SIESTRUP, H., SCHWIMMBECK, P. L., HETZER, R., POLLER, W. and SCHULTHEISS, H. P. (2006) An isoform shift in the cardiac adenine nucleotide translocase expression alters the kinetic properties of the carrier in dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* 8: 81-89.

DRGOŇ, T., ŠABOVÁ, L., NELSON, N. and KOLAROV, J. (1991) ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 289: 159-162.

FONTANESI, F., PALMIERI, L., SCARCIA, P., LODI, T., DONNINI, C., LIMONGELLI, A., TIRANTI, V., ZEVIANI, M., FERRERO, I. and VIOLA, A. M. (2004) Mutations in *AAC2*, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability *Hum. Mol. Genet.* 13: 923-934.

FORLANI, G., GIARDA, E., ALA, U., Di CUNTO, F., SALANI, M., TUPLER, R., KILSTRUP-NIELSEN, C. and LANDSBERGER, N. (2010) The MeCP2/YY1 interaction regulates ANT1 expression at 4q35: novel hints for Rett syndrome pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 19: 3114-3123.

- GIRAUD, M. F. and VELOURS, J. (1997) The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho- yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1. *Eur. J. Biochem.* 245: 813-818.
- GRAHAM, B. H., WAYMIRE, K. G., COTTRELL, B., TROUNCE, I. A., MacGREGOR, G. R. and WALLACE, D. C. (1997) A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat. Genet.* 16: 226-234.
- GRIFFITHS, E. J. and HALESTRAP, A. P. (1993) Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25: 1461-1469.
- GUILLET, V., GUEGUEN, N., VERNY, C., FERRE, M., HOMEDAN, C., LOISEAU, D., PROCACCIO, V., AMATI-BONNEAU, P., BONNEAU, D., REYNIER, P. and CHEVROLLIER, A. (2010) Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Neurogenetics* 11: 127-133.
- HALESTRAP, A. P. and DAVIDSON, A. M. (1990) Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* 268: 153-160.
- Heddi A., Lestienne P., Wallace D.C. and Stepien G. (1994) Steady state levels of mitochondrial and nuclear oxidative phosphorylation transcripts in Kearns-Sayre syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1226: 206-212.
- HUDSON, G., AMATI-BONNEAU, P., BLAKELY, E. L., STEWART, J. D., HE, L., SCHAEFER, A. M., GRIFFITHS P. G., AHLQVIST, K., SUOMALAINEN, A. and REYNIER, P. (2008) Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: A novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131: 329-337.
- HUNTER, D. R., HAWORTH, R. A. and SOUTHARD, J. H. (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251: 5069-5077.
- HUNTER, D. R. and HAWORTH, R. A. (1979) The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 195: 453-459.
- JORDENS, E. Z., PALMIERI, L., HUIZING, M., van den HEUVEL, L. P., SENGERS, R. C., DÖRNER, A., RUITENBEEK, W., TRIJBELS, F. J., VALSSON, J., SIGFUSSON, G., PALMIERI, F. and SMEITINK, J. A. (2002) Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome. *Ann. Neurol.* 52: 95-99.
- JUHASZOVA, M., WANG, S., ZOROV, D., NUSS, H. B., GLEICHMANN, M., MATTSON, M. P. and SOLLITI, S. (2008) The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore. Where the known meets the unknown. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1123: 197-212.
- KAUKONEN, J., JUSELIUS, J. K., TIRANTI, V., KYTTALA, A., ZEVIANI, M., COMI, G. P., KERANEN, S., PELTONEN, L. and SUOMALAINEN, A. (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289: 782-785.
- LACO, J., ZEMAN, I., PEVALA, V., POLČIC, P. and KOLAROV, J. (2010) Adenine nucleotide transport via Sal1 carrier compensates for the essential function of mitochondrial ATP/ADP carrier. *FEMS Yeast.* 10: 290-296.
- Le BRAS, M., BORGNE-SANCHEZ, A., TOUAT, Z., EL DEIN, O. S., DENIAUD, A., MAILLIER, E., LECCELLIER, G., REBOUILLAT, D., LEMAIRE, C., KROEMER, G., JACOTOT, E. and BRENNER, C. (2006) Chemosensitization by knock-down of adenine nucleotide translocase-2. *Cancer Res.* 66: 9143-9152.
- Le QUOC, K. and Le QUOC, D. (1988) Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* 265: 249-257.
- MAYR, J. A., ZIMMERMANN, F. A., HORVATH, R., SCHNEIDER, H. C., SCHOSER, B., HOLINSKI-FEDER, E., CZERMIN, B., FREISINGER, P. and SPERL, W. (2011) Deficiency of the mitochondrial phosphate carrier presenting as myopathy and cardiomyopathy in a family with three affected children. *Neuromuscul. Disord.* 21: 803-808.
- MORENO-SANCHEZ, R., RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S., MARIN-HERNANDEZ, A. and SAAVEDRA, E. (2007) Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274: 1393-1418.
- NADTOCHIY, S. M., ZHU, Q., URCIOLI, W., RAFIKOV, R., BLACK, S. M. and BROOKES, P. S. (2012) Nitroalkenes confer acute cardioprotection via adenine nucleotide translocase 1. *J. Biol. Chem.* 287: 3573-3580.
- PALMIERI, L., ALBERIO, S., PISANO, I., LODI, T., MEZNARIC-PETRUSA, M., ZIDAR, J., SANTORO, A., SCARCIA, P., FONTANESI, F., LAMANTEA, E., FERRERO, I. and ZEVIANI, M. (2005) Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* 14: 3079-3088.
- ROSCA, M. G., OKERE, I. A., SHARMA, N., STANLEY, W. C., RECCHIA, F. A. and HOPPEL, C. L. (2009) Altered expression of the adenine nucleotide translocase isoforms and decreased ATP synthase activity in skeletal muscle mitochondria in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46: 927-935.
- SANTAMARIA, M., LANAVE, C. and SACCONI, C. (2004) The evolution of the adenine nucleotide translocase family. *Gene* 333: 51-59.
- SLIM, R., LEVILLIERS, J., LUDECKE, H.J., CLAUSSEN, U., NGUYEN, V. C., GOUGH, N. M., HORSTHEMKE, B. and PETIT, C. (1993) A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes X-inactivation. *Genomics* 16: 26-33.
- STAPIEN, G., TORRONI, A., CHUNG, A. B., HODGE, J. A. and WALLACE, D. C. (1992) Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 267: 14592-14597.
- STUBBS, M. and GRIFFITHS, J. R. (2010) The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. *Adv. Enzyme Regul.* 50: 44-55.
- TRABA, J., SATRUSTEGUI, J. and del ARCO, A. (2011) Adenine nucleotide transporters in organelles: novel genes and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 1183-1206.
- TYNISMÄÄ, H., YLIKALLIO, E., PATEL, M., MOLNAR, M. J., HALLER, R. G. and SUOMALAINEN, A. (2009) A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 85: 290-295.
- WOODFIELD, K., RÜCK, A., BRDICZKA, D. and HALESTRAP, A. P. (1998) Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem. J.* 336: 287-290.

Karbonická anhydráza IX – hypoxiou kontrolovaný regulátor bunkovej migrácie

Eliška Švastová, Silvia Pastoreková

Oddelenie molekulárnej medicíny,
Virologický ústav SAV, Bratislava
viruelis@savba.sk

Bunková migrácia

Bunková migrácia je biologický fenomén, ktorý je základom nádorovej invazivnosti a metastázovania. Nádorové bunky sa môžu pohybovať buď individuálne alebo kolektívne, pričom využívajú podobné princípy pohyblivosti. V oboch prípadoch migračný cyklus pozostáva z polarizácie buniek a tvorby vodiaceho výčnelku (tzv. lamelipódia), prichytenia výčnelku k podkladu, proteolytickej degradácie extracelulárnej hmoty, presunu bunkového tela smerom dopredu, uvoľnenia prichytenia a pritiahnutia zadnej časti bunky (Webb a kol, 2002). Všetky kroky sú sprevádzané obrovskými zmenami v aktínovom cytoskelete, spojenými s dynamickou moduláciou a/alebo redistribúciou funkčne relevantných molekúl a vytvorením polarizovaných intracelulárnych a extracelulárnych gradientov iónov (Stock a Schwab, 2009, Martin a kol, 2011).

Migrácia je zvyčajne iniciovaná signálmi prichádzajúcimi z extracelulárneho prostredia vo forme pro-migračných rastových faktorov (napr. HGF, PDGF, VEGF, TGF- β), ktoré sú prenášané do bunky prostredníctvom receptorov (c-Met, PDGFR etc.) a v bunke aktivujú dráhy riadené kinázami PI3K, MAPK, PKA a i. To vedie k zmenám v transkripčnom profile a k aktivácii efektorových funkcií potrebných pre vykonanie migračného programu (Yilmaz a Christofori, 2010).

Nádorové bunky sa však môžu začať pohybovať aj v dôsledku fyziologických stresov prítomných v nádorovom mikroprostredí, hlavne hypoxie a acidózy (Pouyssegur a kol, 2006, Gillies a Gatenby, 2007). Príčinou hypoxie v rastúcom nádorovom tkanive je nepravidelná a nefunkčná cievna sieť, ktorá obmedzuje prísun kyslíka pod úroveň jeho potreby nádorovými bunkami. Nedostatočne okysličené bunky na túto situáciu reagujú stabilizáciou alfa podjednotky transkripčného faktora HIF, ktorá je citlivá na kyslík a vytvára heterodimér s konštitutívnou podjednotkou beta. Spolu aktivujú množstvo génov kódujúcich proteíny zapojené v bunkovej adaptácii na hypoxický stres. Okrem komponentov metabolickej prestavby na glykolýzu, faktorov stimulujúcich angiogenézu a iných molekúl, HIF indukuje mnoho proteínov zúčastňujúcich sa na bunkovej migrácii a invazivnosti, ktoré podporujú epitelovo-mezenchýmovú tranzíciu.

Medzi tieto molekuly patria represory medzi-bunkových kontaktov (Snail a Slug), regulátory adhézie a cytokeletálnej prestavby (FAK), pro-migračné rastové faktory a ich receptory (VEGF/VEGFR, HGF/c-Met), povrchové proteínázy (TACE/ADAM17), vnútrobunkové prenášače signálov (PKA), iónové transportéry a s nimi asociované enzýmy (MCT4, C IX, AQP) atď.

V dôsledku metabolického posunu ku glykolýze hypoxické bunky generujú pericelulárnu acidózu, ktorá podporuje migráciu aktiváciou proteolytických enzýmov, ktoré degradujú extracelulárnu hmotu a uvoľňujú membránovo-viazané rastové faktory. Acidóza tiež prispieva k aktivácii intracelulárnych signálnych dráh a k stimulácii mnohých zložiek pH-regulačnej mašinerie, najmä tých, ktoré pôsobia na vedúcom výčnelku migrujúcej bunky (6). Takže hypoxia a acidóza posilňujú pro-migračnú signalizáciu vyvolanú rastovými faktormi. Aká je však úloha CA IX v tomto zložitom fenoméne?

Karbonická anhydráza IX – viac než jednoduchý enzým

CA IX je členom rodiny alfa karbonických anhydráz, teda zinkových metaloenzýmov, ktoré katalyzujú reverzibilnú hydratáciu oxidu uhličitého na bikarbonátové ióny a protóny. Táto jednoduchá reakcia je esenciálna pre mnohé biologické procesy, ktoré závisia na acidobázickej rovnováhe a tiež na časovo a priestorovo regulovaný iónový transport v rôznych subcelulárnych kompartmentoch a cez plazmatickú membránu. V ľudskom organizme existuje 15 CA izoforiem, z ktorých 3 sú inaktívne a 12 má slabú až veľmi silnú aktivitu. Väčšina izoforiem sa nachádza v diferencovaných bunkách a plní špecializované úlohy v rôznych metabolicky aktívnych tkanivách a orgánoch (Supuran, 2008). CA IX, identifikovaná v našom laboratóriu (Pastorek a kol, 1994), je jediný izoenzým, ktorý je prednostne asociovaný s nádormi a prítomný ojedinele iba v niektorých zdravých tkanivách (v epiteli žalúdka a čreva), (9). CA IX sa nachádza v mnohých typoch pevných nádorov a jej prítomnosť je často spojená s agresívnym fenotypom. To je spôsobené najmä hypoxickou reguláciou CA IX na viacerých úrovniach (Pastorekova a kol, 2008).

Hypoxia – hlavný regulátor CA IX

Transkripčná aktivácia CA IX je závislá hlavne na transkripčnom faktore HIF-1, ktorý sa viaže na promótor v blízkosti transkripčného počiatku CA9 génu (Wykoff a kol, 2000). To sa odráža v typickom regionálnom expresnom profile CA IX v nádorových tkanivách, kde je prítomná v širšej perinekrotickej zóne hypoxických nádorov alebo je difúzna v nádoroch s onkogénnou aktiváciou (najmä v obličkových karcinómoch s inaktivovaným tumorovým supresorom von Hippel Lindau). V promótoze HIF-1 kooperuje s transkripčným faktorom SP1, najmä v hustých bunkách (Kaluz a kol, 2002). Transkripcia génu CA9 je tiež modulovaná acidózou a onkogénnymi dráhami (Ihnatko a kol, 2006, Kopacek a kol, 2005).

Hypoxia reguluje správny zostih CA9 mRNA (Barathova a kol, 2008) a aktivuje proteín CA IX na funkčnej úrovni tým, že zvyšuje hladinu cAMP, aktivuje proteín kinázu A (PKA), ktorá fosforyluje Thr443 v intracelulárnej časti CA IX, čím indukuje zmeny v extracelulárnej časti CA IX a zvyšuje jej katalytickú výkonnosť (Ditte a kol, 2011). Hypoxia tiež indukuje odštiepenie ektodomény CA IX pomocou proteázy TACE/ADAM17 (Zatovicova a kol, 2005).

Úloha CA IX v hypoxických nádorových bunkách

Načo vlastne nádory potrebujú takto regulovanú CA IX? Hypoxia predstavuje pre nádorové bunky fyziologický stres, ktorý vytvára selekčný tlak smerom k adaptácii, úniku alebo bunkovej smrti. Súčasťou adaptačných mechanizmov je schopnosť odolávať acidóze, ktorá je výsledkom posunu od oxidačnej fosforylácie ku glykolýze, ktorá často pretrváva aj v reoxygenovaných bunkách (čo je známe ako Warburgov efekt (Fang a kol, 2008). Hoci glykolýza generuje menej energie vo forme ATP než oxidačná fosforylácia, je veľmi dôležitá pre nádorové bunky, pretože jej medziprodukty sa využívajú na produkciu biomasy, ktorá je potrebná pre proliferáciu (Heiden a kol, 2009). Hlavným produktom glykolytického metabolizmu je kyselina mliečna, ale onkogénny metabolizmus tiež produkuje nadmerne veľa protónov a CO₂ (Helmlinger a kol, 2002). Aby sa zachovalo neutrálne/slabo zásadité intracelulárne pH (pHi), ktoré je nevyhnutné pre biosyntetické reakcie a život, bunky vyvinuli dva základné transportné mechanizmy – export laktátu a protónov na jednej strane a import bikarbonátu na strane druhej. Export zabezpečuje niekoľko typov transmembránových iónových transportérov, ako napríklad monokarboxylátový transportér (MCT4) a Na⁺/H⁺ výmenník 1 (NHE1), ktoré sú samotné ovplyvnené hypoxiou a acidózou (Parks a kol, 2011). NHE1 je dôležitý pre reguláciu pHe a pHi v nádoroch a prispieva k vytvoreniu reverzného protónového gradientu (Cardone a kol,

2005). Podľa najnovších štúdií je extrúzia protónov dynamickou odpoveďou na acidózu, ktorá varíruje v závislosti od typu bunky (Hulikova a kol, 2012). V určitých situáciách (napr. pri chronickej hypoxii) však temno mechanizmus nestačí na stabilizáciu pHi, ktoré je priaznivé pre proliferáciu a prežívanie buniek. Preto bunky využívajú import bikarbonátu pomocou bikarbonátových transportérov (BT) ako napríklad sodíkovo-bikarbonátový kotransportér (napr. NBCe1) a aniónový výmenník (AE2). BT sú rozšírené v rôznych tkanivách, exprimované v rôznych izoformách a zostihových variantoch a hrajú dôležitú úlohu v udržiavaní pHi ako aj v kontrole objemu bunky (Romero a kol, 2004). Medzi NHE1 a AE2 existuje funkčná kooperácia, pričom experimentálne údaje ukazujú, že bikarbonátový transport má principiálny význam pri regulácii intracelulárnej acidózy v 3D a in vivo modeloch (Hulikova a kol, 2011, Robey a kol, 2009).

Pericelulárne protóny, laktát a CO₂, ktoré sa akumulujú v nádorovom tkanive, vytvárajú kyslé mikroprostredie, ktoré neumožňuje spontánnu tvorbu bikarbonátových iónov. Nedostatok substrátu pre import bikarbonátu si vyžaduje enzymatickú funkciu CA IX, ktorá na extracelulárnej časti membrány katalyzuje hydratáciu CO₂, čím produkuje bikarbonátové ióny, a prostredníctvom priestorovej a funkčnej kooperácie s bikarbonátovými transportérmi ich priamo poskytuje na import do cytoplazmy, kde spotrebujú protóny a generujú CO₂, ktorý opúšťa bunky difúziou a prispieva k extracelulárnej acidóze (Morgan a kol, 2007, Svastova a kol, 2004). Acidózu tiež podporujú protóny, ktoré tiež pochádzajú z hydratácie CO₂. Tento model bikarbonátového metabolizmu podporuje experimentálny dôkaz interakcie CA IX a BT (Orlowski a kol, 2012, Svastova a kol, 2012).

Z hľadiska udržiavania merne alkalického intracelulárneho pH, CA IX môžeme vnímať ako súčasť mašinerie, ktorá ochraňuje nádorové bunky pred acidózou a tým im poskytuje výhodu v prežívaní (Swietach a kol, 2009, Chiche a kol, 2009). Z hľadiska príspevku k extracelulárnej acidóze, CA IX môžeme vnímať ako aktívny komponent pro-metastatickej kaskády, pretože kyslé pHe indukuje migráciu, aktivuje proteázy degradujúce ECM a podporuje invazivnosť. Tieto úvodné udalosti potom uľahčujú nádorovým bunkám vstup do cirkulácie a prípadne tvorbu metastáz (Gatenby a kol, 2006, DeClerck a Elble, 2010).

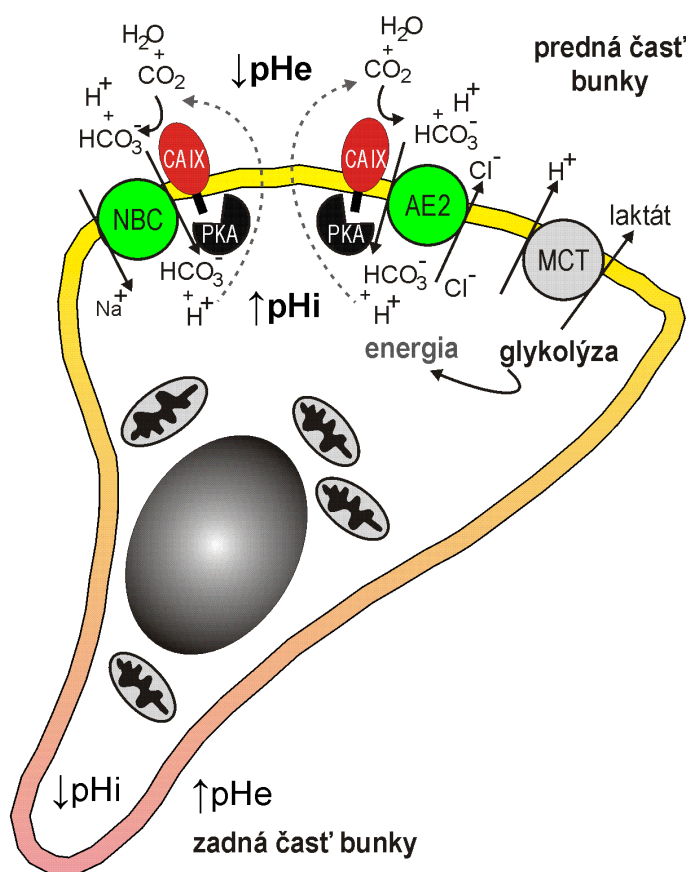
CA IX ako zložka migračného aparátu bunky

Ako už bolo uvedené, bunková migrácia je komplexný fenomén, ktorý závisí, okrem iného, na vytvorení správnych pH gradientov pozdĺž bunky – s kyslým pHe a alkalickým pHi v prednej časti bunky, a alkalickým pHe a kyslým pHi v zadnej časti bunky (Martin a kol, 2011, Stock a kol, 2007). Vytvorenie gradientov je spojené

s relokizáciou iónových transportérov (vrátane NHE1, NBCe1 a AE2) do lamelipódií, kde môžu kooperatívne uskutočňovať intenzívny transport iónov potrebný pre bunkovú pohyblivosť (Stuwe a kol, 2007, Svastova a kol, 2012). Molekulárne a farmakologické štúdie ukazujú, že strata alebo inhibícia týchto transportérov má značný vplyv na bunkovú migráciu.

CA IX podstupuje rovnakú cestu relokizácie do predných výčnelkov bunky, kde zaujíma polohu v blízkosti bikarbonátových transportérov (obr. 1). Ako prví sme experimentálne dokázali, že CA IX priamo komunikuje s AE2 a NBCe1 v lamelipódiách hypoxických buniek stimulovaných k migrácii pomocou HGF (Svastova a kol, 2012). Lamelipódiá migrujúcich buniek sú veľmi zaujímavé organely charakterizované absenciou mitochondrií a intenzívnou glykolýzou, ktorá generuje energiu pre prestavbu cytoskeletu a recyklovanie proteínov (Jia a kol, 2005, Nguyen a kol, 2000). Takáto metabolická

konštelácia pripomína hypoxické bunky, takže je možné predpokladať, že lamelipódiá sú vlastne „pseudohypoxické“ migračné organely. Táto predstava je kompatibilná s aktiváciou funkcie CA IX v bikarbonátovom transportnom metabolóne, ktorá vyústi do zvýšenej schopnosti regulovať pH v predných častiach bunky a tým stimulovať migráciu (Klein a kol, 2000). Okrem toho, lamelipódiá obsahujú zvýšené hladiny cAMP, ktoré prispievajú k aktivácii PKA zhromaždenej počas migrácie v bunkových výčnelkoch (Lim a kol, 2008). Takže, PKA je v správnej pozícii a fyziologickom kontexte, aby fosforylovala CA IX a stimulovala jej katalytickú aktivitu spriahnutú s transportom bikarbonátových iónov dokonca aj v podmienkach normoxie/reoxygenácie. V súlade s touto koncepciou je fakt, že fosforylácia Thr443 je potrebná pre pro-migračný efekt CA IX a jej inaktivačná mutácia vedie k zníženej migrácii buniek (Ditte a kol, 2011).



Obr. 1. Schéma migrujúcej bunky s lamelipódiom v prednej časti

Lamelipódium obsahuje bikarbonátový metabolon zložený z bikarbonátových transportérov (napr. sodíkovo-bikarbonátový kotransportér NBC alebo aniónový výmenník AE2), ktoré kooperujú s karbonikou anhydrázou IX (CA IX). CA IX je aktivovaná fosforyláciou treonínu 443 v C-terminálnej časti molekuly proteín kinázou A (PKA), ktorá je tiež lokalizovaná a aktivovaná v lamelipódiu. Konverziu pericelulárneho oxidu uhličitého katalyzovanou CA IX sú produkované bikarbonátové ióny, ktoré sú importované pomocou NBC alebo AE2 do vnútra bunky, kde zvyšujú intracelulárne pH (pHi) a zároveň sa uvoľňujú protóny, ktoré znižujú extracelulárne pH (pHe). Lamelipódium je tiež charakterizované neprítomnosťou mitochondrií a glykolytickým metabolizmom, ktorý generuje energiu pre prestavbu bunky potrebnú na migráciu. Glykolýzou je súčasne produkovaná kyselina mliečna, ktorá je vo forme laktátu a protónov vylučovaná z bunky pomocou monokarboxylátového transportéra (MCT). To vedie ku vzniku reverzného gradientu v prednej časti bunky, acidózou na vonkajšej strane a mierne alkalickým pH na vnútornej strane plazmatickej membrány lamelipódiu.

Pro-migračná úloha CA IX môže byť podmienená aj schopnosťou tohto proteínu interferovať s E-kadherínom sprostredkovanou medzibunkovou adhéziou a to pomocou kompetitívnej interakcie s beta katenínom, podobne ako je to známe pre EGFR a MUC-1 (Svastova a kol, 2003). Tým sa môže urýchliť disociácia buniek z tkaniva a získanie mobilného fenotypu. Navyše, supresia CA IX pomocou RNA interferencie vedie k potlačeniu viacerých molekúl zapojených do interakcií s medzibunkovou

hmotou a do tvorby fokálnych adhézných kontaktov a tým znižuje schopnosť buniek migrovať a invadovať (Radvak a kol, 2013).

Takže, CA IX má niekoľko vlastností relevantných pre bunkovú adhéziu-migráciu-invazívnosť a tiež podporuje mezenchymálny fenotyp (Svastova a kol, 2012). To je v súhlase s expresiou CA IX v pokročilých nádoroch, ktoré často prechádzajú epitelovo-mezenchymálnou tranziáciou (Potter a Harris, 2004).

Záver

Hoci poznáme základné kontúry úlohy CA IX v nádorovej biológii, stále zostáva veľa otázok, ktorých zodpovedanie je potrebné na lepšie objasnenie pozície tohto proteínu v bunkovej signalizácii a adaptácii na stresy v mikroprostredí, ako aj na využitie CA IX ako markera a terapeutického terča v klinických situáciách. V tomto kontexte je veľmi dôležité zamerať sa na hypoxiu, ktorá je doposiaľ nedostatočne prebádaná v súvislosti s bunkovou migráciou napriek tomu, že hypoxická frakcia buniek v nádorových tkanivách sa vyznačuje zvýšeným migračným, invazívnym a metastatickým potenciálom. Pritom väčšina štúdií zameraných na mechanizmy iónového transportu a pH regulácie v migrujúcich bunkách bola uskutočnená v normoxických podmienkach, v ktorých sa proteínové interakcie a iónové toky podstatne líšia od hypoxie (Sullivan a Graham, 2007). Preto veríme, že dekódovanie biologickej funkcie hypoxiou-regulovanej CA IX a jej spolupráce s pH regulátormi, iónovými transportérmi a inými relevantnými molekulami v pohybujúcich sa hypoxických bunkách nám pomôže lepšie porozumieť komplexný fenomén bunkovej migrácie ako počiatočného stupňa metastatickej kaskády.

Abstract

Cell migration is a sequence of morphological changes that result in the dynamic remodeling of cell. These changes are determined by intricate, inter-related molecular and physiological processes that regulate cell motility. These include ion transport and pH balance and involve the carbonic anhydrase IX (CA IX) as an important player. CA IX is a highly active enzyme localized on the cell surface and present in a number of various solid tumors. It is upregulated by the low level of oxygen (hypoxia) and often used as a biomarker of tumor hypoxia and target for anticancer therapy. CA IX role is to protect tumor cells from hypoxia and acidosis in tumor microenvironment and directly contribute to cell migration and invasion. Thereby, it facilitates cancer progression.

Literatúra

BARATHOVA, M., TAKACOVA, M., HOLOTNAKOVA, T., GIBADULINOVA, A., OHRADANOVA, A., ZATOVICOVA, M. et al. Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumor phenotype. *BJC* 2008; 98:129-36.
CARDONE, R. A., CASAVOLA, V., RESHKIN, S. J. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:786-95.
CHICHE, J., ILC, K., LAFERRIERE, J., TROTTIER, E., DAYAN, F., MAZURE, N. M., BRAHIMI-HORN, M. C., POUYSSÉGUR, J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 2009; 69:358-68.
DeCLERCK, K., ELBLE, R. C. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front Biosci* 2010; 15:213-25.
DITTE, P., DEQUIEDT, F., SVASTOVA, E., HULIKOVA, A., OHRADANOVA-REPIC, A., ZATOVICOVA, M. et al. Phos-

phorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors. *Cancer Res* 2011; 71:7558-67.
FANG, J. S., GILLIES, R. D., GATENBY, R. A. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 2008 Oct; 18(5):330-7. Epub 2008 Mar 26.
GATENBY, R. A., GAWLINSKI, E. T., GMITRO, A. F., KAYLOR, B., GILLIES, R. J. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res* 2006; 66:5216-23.
GILLIES, R. J., GATENBY, R. A. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26:311-317.
HEIDEN, M. G. V., CANTLEY, L. C., THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324:1029-33.
HEMLINGER, G., SCKELL, A., DELLIAN, M., FORBES, N. S., JAIN, R. K. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res.* 2002 Apr; 8(4):1284-91.
HULIKOVA, A., VAUGHAN-JONES, R. D., SWIETACH, P. Dual role of CO₂/HCO₃⁻ buffer in the regulation of intracellular pH of three-dimensional tumor growths. *J Biol Chem* 2011; 286:13815-26.
HULIKOVA, A., HARRIS, A. L., VAUGHAN-JONES, R. D., SWIETACH, P. Regulation of intracellular pH in cancer cell lines under normoxia and hypoxia. *J Cell Physiol* 2012 Sep 4. doi: 10.1002/jcp. 24221.
IHNAKO, R., KUBES, M., TAKACOVA, M., SEDLAKOVA, O., SEDLAK, J., PASTOREK, J., KOPACEK, J., PASTOREKOVA, S. Extracellular acidosis elevates carbonic anhydrase IX in human glioblastoma cells via transcriptional modulation that does not depend on hypoxia. *Int J Oncol* 2006; 29:1025-33.
JIA, Z., BARBIER, L., STUART, H., AMRAEI, M., PELECH, S., DENNIS, J. W. et al. Tumor cell pseudopodial protrusions. *J Biol Chem* 2005; 280:30564-30573.
KALUZ, S., KALUZOVA, M., CHRASTINA, A., OLIVE, P. L., PASTOREKOVA, S., PASTOREK, J. et al. Lowered Oxygen Tension Induces Expression of the Hypoxia Marker MN/Carbonic Anhydrase IX in the Absence of Hypoxia-inducible Factor 1 α Stabilization: A Role for Phosphatidylinositol 3-Kinase1. *Can Res* 2002; 62:4469-4477.
KLEIN, M., SEEGER, P., SCHURICHT, B., ALPER, S. L., SCHWAB, A. Polarization of Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers in migrating renal epithelial cells. *J Gen Physiol* 2000; 115:599-608.
KOPACEK, J., BARATHOVA, M., DEQUIEDT, F., SEPELAKOVA, J., KETTMANN, R., PASTOREK, J. et al. MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1729:41-49.
LIM, C. J., KAIN, K. H., TKACHENKO, E., GOLDFINGER, L. E., GUTIERREZ, E., ALLEN, M. D., et al. Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge migrating cells. *MBC* 2008; 19:4930-4941.
MARTIN, C., PEDERSEN, S. F., SCHWAB, A., STOCK, C. Intracellular pH gradients in migrating cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300:C490-5.
MORGAN, P. E., PASTOREKOVA, S., STUART-TILLEY, A. K., ALPER, S. L., CASEY, J. R. Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CA IX, with bicarbonate transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293:738-748.
NGUYEN, T. N., WANG, H. J., ZALZAL, S., NANJI, A., NABI, I. R. Purification and characterization of beta-actin-rich tumor cell pseudopodia: role of glycolysis. *Exp Cell Res.* 2000 Jul 10; 258(1):171-83.
ORLOWSKI, A., De GIUSTI, V. C., MORGAN, P. E., AIELLO, E. A., ALVAREZ, B. V. Binding of carbonic anhydrase IX to extracellular loop 4 of the NBCe1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter

- enhances NBCe1-mediated HCO_3^- influx in the rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;303:C69-80.
- PARKS, S. K., CHICHE, J., POUYSSEGUR, J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol* 2011;226:299-308.
- PASTOREK, J., PASTOREKOVA, S., CALLEBAUT, I., MORNON, J. P., ZELNIK, V., OPAVSKY, R., ZATOVICOVA, M., LIAO, S., PORTETELLE, D., STANBRIDGE, E. J. et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*. 1994;9:2877-88.
- PASTOREKOVA, S., RATCLIFFE, P. J., PASTOREK, J. Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. *BJU Int* 2008; 101:8-15.
- POTTER, C., HARRIS, A. L. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle* 2004;3:164-7.
- POUYSSEGUR, J., DAYAN, F., MAZURE, N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumor regression. *Nature* 2006; 441:437-443.
- RADVAK, P., REPIC, M., SVASTOVA, E., TAKACOVA, M., CSADEROVA, L., STRNAD, H., PASTOREK, J., PASTOREKOVA, S., KOPACEK, J. Suppression of carbonic anhydrase IX leads to aberrant focal adhesion and decreased invasion of tumor cells. *Oncol Reports* 29(3):1147-53.
- ROBEY, I. F., BAGGETT, B. K., KIRKPATRICK, N. D., ROE, D. J., DOSESCU, J., SLOANE, B. F., HASHIM, A. I., MORSE, D. L., RAGHUNAND, N., GATENBY, R. A., GILLIES, R. J. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res* 2009;69:2260-8.
- ROMERO, M. F., FULTON, C. M., BORON, W. F. The SLC4 family of HCO_3^- transporters. *Pflügers Arch* 2004;447:495-509.
- SCHWAB, A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F739-47.
- STOCK, C., SCHWAB, A. Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflügers Arch* 2009; 458:981-92.
- STOCK, C., MUELLER, M., KRAEHLING, H., MALLY, S., NOËL, J., EDER, C., SCHWAB, A. pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:679-86.
- STÜWE, L., MÜLLER, M., FABIAN, A., WANING, J., MALLY, S., NOËL, J., SCHWAB, A., STOCK, C. pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. *J Physiol*. 2007;585(Pt 2):351-60.
- SULLIVAN, R., GRAHAM, C. H. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:319-31.
- SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature* 2008; 7:168-181.
- SVASTOVA, E., ZILKA, N., ZATOVICOVA, M., GIBADULINOVA, A., CIAMPOR, F., PASTOREK, J. et al. *Exp Cell Res* 2003; 290:332-345.
- SVASTOVA, E., HULIKOVA, A., RAFAJOVA, M., ZATOVICOVA, M., GIBADULINOVA, A., CASINI, A., CECCHI, A., SCOZZAFAVA, A., SUPURAN, C. T., PASTOREK, J., PASTOREKOVA, S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 2004; 577:439-45.
- SVASTOVA, E., WITARSKI, W., CSADEROVA, L., KOSIK, I., SKVARKOVA, L., HULIKOVA, A., et al. Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *JBC* 2012; 287:3392-402.
- SWIETACH, P., PATIAR, S., SUPURAN, C. T., HARRIS, A. L., VAUGHAN-JONES, R. D. The Role of Carbonic Anhydrase 9 in Regulating Extracellular and Intracellular pH in Three-dimensional Tumor Cell Growth. *J Biol Chem* 2009; 284:20299-20310.
- WEBB, D. J., PARSONS, J. T., HORWITZ, A. F. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells—over and over and over again. *Nat Cell Biol* 2002; 4:97-100.
- WYKOFF, C. C., BEASLEY, N. J., WATSON, P. H., TURNER, K. J., PASTOREK, J., SIBTAIN, A. et al. Hypoxia-inducible expression of tumor associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60: 7075-83.
- YILMAZ, M., CHRISTOFORI, G. Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Mol Cancer Res* 2010; 8:629-642.
- ZATOVICOVA, M., SEDLAKOVA, O., SVASTOVA, E., OHRADANOVA, A., CIAMPOR, F., ARRIBAS, J. et al. Ecto-domain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *BJC* 2005; 93:1267-1276.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Mitochondrie – multifunkčné organely

Igor Zeman

Katedra biochémie,
Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
igor.zeman@fns.uniba.sk

Úvod

Mitochondrie sú bunkové organely obalené dvojitou membránou, ktoré sa vyskytujú v jednobunkových ako aj mnohobunkových eukaryotických bunkách. Slovo mitochondria pochádza z gréckych slov *mitos* (vlákno) a *chondrion* (granula), pretože takéto útvary pripomínali mitochondrie vedcom, ktorí ich prvý krát pozorovali v mikroskope už v polovici 19. storočia. Majú veľkosť baktérie, sú približne 2 μm dlhé s priemerom 0,5 – 1 μm . V prvej polovici 20. storočia sa zistilo, že v týchto orga-

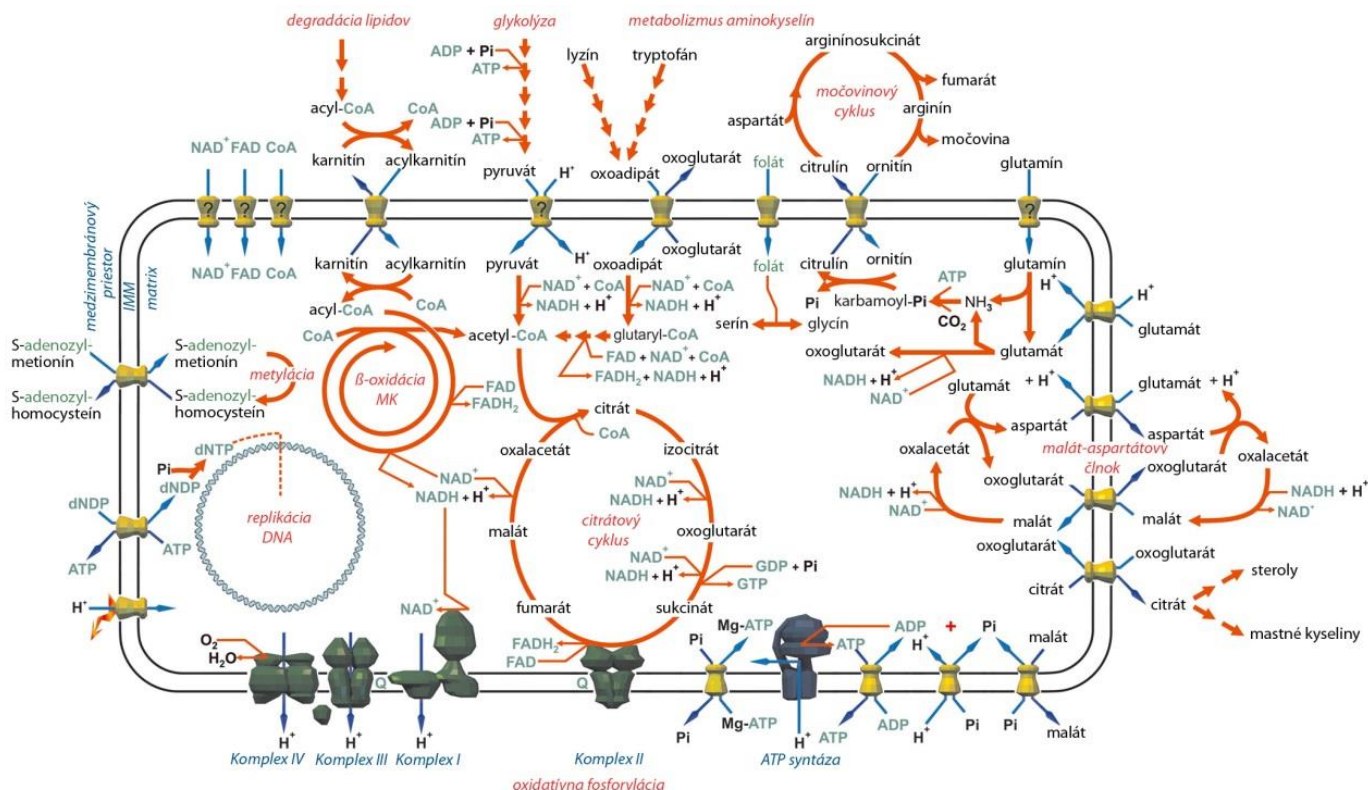
nelách prebiehajú významné bunkové metabolické dráhy – citrátový (Krebsov) cyklus a močovinový cyklus. V druhej polovici 20. storočia sa podarilo objaviť a neskôr osekvenovať mitochondriálnu DNA (mtDNA), ktorá kóduje proteíny, ribozomálne RNA (rRNA) a transferové RNA (tRNA). Pekárske kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sú jednobunkové eukaryotické bunky, ktoré sa používajú v biochémii a molekulárnej biológii ako modelový organizmus pre štúdium mnohých biologických

fenoménoch, vrátane štúdia mitochondrií. Ich mtDNA obsahuje 85 779 bázových párov a kóduje 8 proteínov, 24 tRNA, 21S rRNA a 15S rRNA. V ľudských mitochondriách má mtDNA 16 000 bázových párov a kóduje 13 proteínov, 22 tRNA, 16S rRNA a 12S rRNA.

Morfológia mitochondrií

Elektrónová mikroskopia umožnila určiť ich ultraštruktúru a bližšie charakterizovať štyri základné časti mito-

chondrií – vonkajšiu membránu (OMM, „outer mitochondrial membrane“), medzimembránový priestor, vnútornú membránu (IMM, „inner mitochondrial membrane“), ktorá vytvára početné záhyby (kristy) a ohraničuje vnútorný priestor organely – matrix. OMM je permeabilná pre malé molekuly do veľkosti 5000 Daltonov vďaka prítomnosti porínov. IMM je nepriepustná pre ióny a väčšinu molekúl a transport cez ňu zabezpečuje špeciálna skupina transportných proteínov (obr. 1).



Obr. 1. Mitochondriálne metabolické dráhy a ich prepojenie s bunkovým metabolizmom pomocou mitochondriálnych prenášačov

Schematické zobrazenie cicavčích mitochondrií neobsahuje vonkajšiu membránu, ktorá je priepustná pre malé molekuly. Červené šípky označujú zjednodušené metabolické dráhy, v ktorých sú zvýraznené kľúčové metabolity. Kofaktory a intermediáty s veľkým obsahom energie sú zelené. S otáznikom sú označené prenášače v mitochondriách človeka, ktoré nepatria do MCF rodiny (pyruvátový prenášač), alebo ktorých príslušnosť do rodiny MCF proteínov nie je známa (prenášače pre koenzým A (CoA), glutamín, FAD, NAD⁺). Upravené podľa (Kunji, 2004).

Evolučný pôvod mitochondrií

Odkiaľ pochádzajú mitochondrie? Hypotézy o vzťahu medzi baktériami a mitochondriami začali vznikať už od objavu týchto organel. K odhaleniu pôvodu mitochondrií významne pomohli analýzy sekvencií mtDNA z rôznych organizmov. Dnes je všeobecne akceptovaná teória endosymbiotického pôvodu mitochondrií. Pradáva eukaryotická bunka pohltila endocytózou baktériu, ktorá mala funkčnú oxidatívnu fosforyláciu, čo jej prinieslo evolučnú výhodu. OMM tak pochádza z plazmatickej membrány pôvodnej eukaryotickej bunky a IMM pochádza z plazmatickej membrány baktérie. Pravdepodobný

je monofyletický pôvod mitochondrií. Vznik mitochondrií je skôr dôsledkom jedinečnej udalosti v evolúcii ako dôsledkom vzniku viacerých nezávislých symbiotických partnerstiev. Existuje však prekvapivá rozmanitosť medzi stavovcami, rastlinami, hubami a prvokmi, ak porovnáme počet zachovaných mitochondriálnych génov, ich organizáciu a expresiu.

Mitochondriálny dýchací reťazec a oxidatívna fosforylácia

Mitochondrie sú veľmi dôležité pre každý organizmus, pretože sa v nich syntetizujú molekuly adenozíntrifosfá-

tu (ATP), ktoré môžeme označiť ako univerzálny zdroj chemickej energie v bunkách. Výživné látky z potravy sú v bunkách premieňané sériami chemických reakcií na rôzne potrebné metabolity pričom časť uvoľnenej energie sa využije na syntézu ATP v mitochondriách v procese, ktorý sa označuje ako oxidatívna fosforylácia a prebieha vo vnútornej mitochondriálnej membráne. Napríklad, ak by sa v bunke spracovala jediná molekula glukózy na pyruvát iba pomocou glykolýzy, ktorá prebieha v cytoplazme, tak by sa vytvorili iba dve molekuly ATP. Ak sa však do spracovania glukózy zapoja aj mitochondrie, môže bunka získať až 30 molekúl ATP. Z jednej molekuly glukózy vznikne nakoniec šesť molekúl CO_2 . Pri takejto kompletnej aeróbnej oxidácii glukózy dochádza k premene pyruvátu na acetylkoenzým A, ktorý sa ďalej zapája do citrátového cyklu, v ktorom vznikajú dve molekuly ATP konverziou z GTP. Redukované koenzýmy NADH a FADH_2 , pochádzajúce z glykolýzy, premeny pyruvátu na acetylkoenzým A a z reakcií citrátového cyklu odovzdávajú elektróny komponentom dýchacieho reťazca. Prenos elektrónov cez jednotlivé multiproteínové komplexy dýchacieho reťazca (komplexy I, II, III a IV) až na kyslík (O_2), ktorý s 2 H^+ tvorí H_2O , je spojený s pumpovaním protónov z matrixu do medzimembránového priestoru (Obr. 1). Takto vzniká elektrochemický H^+ gradient, ktorý sa pomocou ATP syntázy premieňa na chemickú energiu uloženú v ATP v dôsledku vzniku kovalentnej väzby medzi ADP a anorganickým fosfátom (P_i). Človek bez prítomnosti kyslíka nedokáže prežiť viac ako niekoľko minút, pretože dôjde ku kolapsu životne dôležitých orgánov v dôsledku nedostatku ATP.

Peter Mitchell bol autorom teórie chemiosmotického mechanizmu tvorby ATP, ktorá predpokladala spojenie prenosu elektrónov, pumpovania protónov a syntézy ATP. Predtým sa predpokladalo, že ATP vzniká v mitochondriách podobne ako v glykolýze, substrátovou fosforyláciou. Experimenty však potvrdili Mitchellovu teóriu a jej autor za svoje objavy získal Nobelovu cenu za chémiu v roku 1978. Mechanizmus „väzbových zmien“, ktorým ATP syntáza vytvára ATP z ADP a P_i navrhol Paul Boyer. Predpokladal, že energia uvoľnená pohybom H^+ cez F_0 časť ATP syntázy umožňuje rotáciu γ a ϵ podjednotiek, čím každá z troch β podjednotiek cyklicky nadobúda tri rôzne konformácie, ktoré sa líšia afinitou k ATP, ADP a P_i . V takzvanom T („tight“) stave sa ADP a P_i viažu tak silne, že vytvoria kovalentnú väzbu, čím vznikne molekula ATP. Boyer získal Nobelovu cenu za chémiu v roku 1997.

Transport látok cez vnútornú mitochondriálnu membránu

Aby ATP mohlo vznikať v mitochondriách, je potrebné dopraviť substráty pre túto reakciu do mitochondrií. To zabezpečujú transmembránové proteíny lokalizované v

IMM – fosfátový prenášač (Pic, „phosphate carrier“) a ADP/ATP prenášač (Aac, „ADP/ATP carrier“), ktorý importuje ADP do mitochondrií a exportuje ATP von z mitochondrií, aby sa mohlo využiť v ďalších častiach bunky (obr. 1). Časť intramitochondriálneho ATP sa využije priamo v organele pre jej biogénu. Napríklad import prekursorových proteínov si vyžaduje nielen transmembránový potenciál ($\Delta\psi$), ale aj hydrolýzu matrixového ATP. Takisto nadobudnutie správnej štruktúry proteínov v mitochondriách je ATP závislý proces. ATP sa využíva aj pri replikácii mtDNA, transkripcii a translácii. Aacp a Picp proteíny patria do rodiny mitochondriálnych prenášačov. Počet jednotlivých prenášačov sa v rôznych organizmoch líši. V eukaryotických parazitoch je 1 až 9 proteínov, v kvasinkách 35, v rastlinách takmer 60 a v *Homo sapiens* 53 proteínov z tejto rodiny MCF („mitochondrial carrier family“).

Mitochondriálne prenášače zohrávajú významnú úlohu v metabolizme eukaryotickej bunky, pretože prepájajú biochemické reakcie, prebiehajúce v cytosole a v mitochondriách (obr. 1). Zúčastňujú sa aj na metabolizme sterolov, glukoneogenéze a močovinovom cykle. Transportujú nukleotidy, aminokyseliny, kofaktory, karboxylové kyseliny a anorganické ióny, ktoré sú potrebné pre oxidatívnu fosforyláciu, glukoneogenézu, syntézu a degradáciu mastných kyselín (MK), aminokyselín, proteínov a nukleových kyselín. Pri fyziologickom pH je väčšina transportovaných látok vo forme aniónov, (napr. ADP^{3-} , ATP^{4-} , H_2PO_4^-) a iba niektoré z nich, karnitín, ornitín a glutamín sú kationy. Užitočnou funkciou pre hibernujúce zvieratá, ktorá im umožní prežiť v chladnom prostredí je produkcia tepla prostredníctvom rozpojovacieho proteínu Ucp („uncoupling protein“). Napriek rôznorodosti transportovaných metabolitov vykazujú prenášače mnohé spoločné charakteristiky. Všetky sú kódované jadrovým genómom a maturované proteíny majú veľkosť približne 30 kDa. Každá z troch sekvenčne podobných domén má veľkosť približne sto aminokyselín a obsahuje dva transmembránové α -helikálne úseky. Proteín obsahuje celkovo šesť transmembránových domén, tri matrixové a dve cytosolické slučky. Na základe fylogenetickéj analýzy sa predpokladá, že mitochondriálne prenášače vznikli zo spoločného predchodcu.

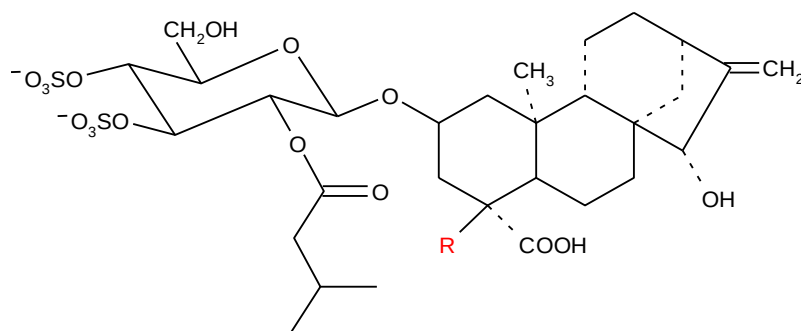
ADP/ATP prenášač

V tele dospelého človeka sa prostredníctvom Aacp prenesie cez IMM približne 55 kilogramov ADP a ATP za deň. Toto množstvo sa ešte výrazne zvýši pri telesnej námahe. Aacp je aj prvý mitochondriálny transportný systém, ktorý bol objavený a stal sa modelovým príkladom štúdia mitochondriálnych prenášačov. Aacp sa podarilo purifikovať a následne rekonštituovať do lipozómov po prvý krát v sedemdesiatych rokoch minulého storočia. ADP/ATP transport je špecificky inhibovaný dvomi triedami prírodných vysoko-afinitných inhibítorov

(obr. 2). Prvú skupinu tvoria potenciálne letálne inhibítory atraktylozid (ATR), čo je diterpénový heteroglukozid s dvomi sulfátovými skupinami, a karboxyatraktylozid (CATR). Tieto zlúčeniny obsahuje napríklad bodliak *Atractylis gummifera*, ktorý rastie v krajinách pri Stredozemnom mori.

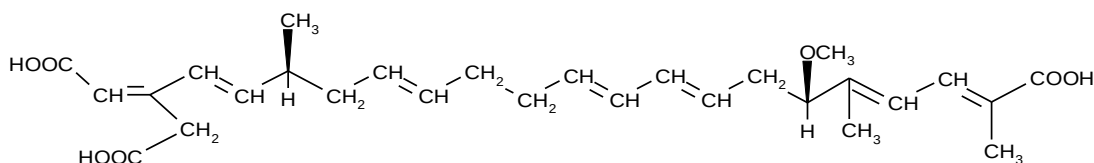
ATR a CATR majú záporný náboj pri fyziologickom pH a preto neprechádzajú cez IMM a viažu sa na Aacp z cytosolickej strany. Sú známe prípady, kedy neúmyselné požitie tejto rastliny malo za následok závažnú otravu, vyvolávajúcu nekrózu obličiek, poruchy tráviaceho systému spojené s krvácaním a neurologické ťažkosti.

Atractylis gummifera bol opísaný už pred dvetisíc rokmi gréckym lekárom a botanikom Pedaniusom Dioscoridom ako rastlina používaná v medicíne. Druhú skupinu inhibítorov predstavujú lipofilné kyseliny bongkreková a izobongkreková (BA, isoBA), ktoré sú produkované baktériou *Burkholderia gladioli pathovar cocovenenans* (*Pseudomonas cocovenenans*). Viažu sa na matrixovú stranu Aacp. Ak dôjde k bakteriálnej kontaminácii ázijského jedla pripravovaného z kokosových orechov a sóje („tempe bongkrek“), môže to mať za následok smrteľnú otravu.



Karboxyatraktylozid (CATR) : R = COOH

Atraktylozid (ATR) : R = H



Kyselina bongkreková (BA)

Obr. 2. Špecifické inhibítory mitochondriálneho ADP/ATP translokátora

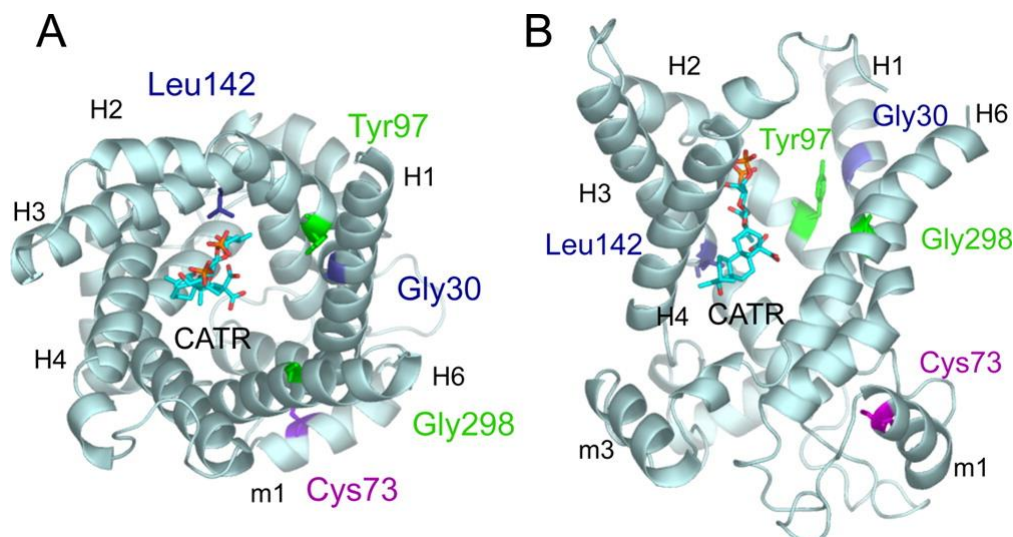
Inhibítory zohrali významnú úlohu pri charakterizácii transportného mechanizmu, pretože sa viažu na dve konformácie Aacp potrebné pre transport, označované ako BA a CATR konformácie, pričom vytvárajú stabilný komplex s Aacp (obr. 3). V neprítomnosti inhibítorov je rýchla reverzibilná zmena medzi dvomi konformáciami iniciovaná väzbou ADP alebo ATP. Pre pochopenie presného mechanizmu ADP/ATP transportu je nevyhnutné identifikovať aminokyseliny potrebné pre interakciu s inhibítormi a konformačné zmeny indukované po väzbe inhibítora. Podarilo sa pripraviť mutanty Aacp rezistentné voči BA pomocou mutagenézy hlavnej kvasinkovej izoformy Aacp, ktorou je Aac2 proteín. Na vznik rezistencie stačí špecifická mutácia v jedinej aminokyseline. Identifikovali sa štyri nezávislé mutácie, pričom každá z nich je lokalizovaná v inom transmem-

bránovom segmente. Gly30Ser v prvom, Tyr97Cys v druhom, Leu142Ser v treťom a Gly298Ser v šiestom (obr. 3). Meraním ADP/ATP transportu s izolovanými mitochondriami v prítomnosti BA sa ukázalo, že transport mutantných Aac2p bol účinnejší v porovnaní s divým typom Aac2p.

Zásadným krokom vpred pri charakterizácii funkcie každého proteínu je určenie jeho trojrozmernej štruktúry pomocou Röntgenovej štruktúrnej analýzy vykryštalizovaného čistého proteínu. Kryštalizácia membránových proteínov je omnoho ťažšia ako príprava kryštálov z rozpustných proteínov. Podarilo sa pripraviť kryštál Aacp vo väzbe s jeho inhibítormi CATR. Aacp sa stal prvým a zatiaľ jediným proteínom z rodiny mitochondriálnych proteínov, u ktorého sa podarilo určiť jeho

atómovú štruktúru a to s rozlíšením 2,2 Å. Nezodpovedanou otázkou naďalej zostáva presný mechanizmus transportu nukleotidov, ktorý zahŕňa vzájomnú konverziu medzi BA a CATR konformáciami. Preto je potrebné určiť štruktúru proteínu aj bez naviazaného inhibítora CATR. Kombináciou dvoch mutácií Tyr97 a Ser298 zabezpečujúcich rezistenciu k BA vznikol proteín, ktorý je stabilizovaný v CATR konformácii. V súčasnosti prebiehajú experimenty s jeho kryštalizáciou. Štruktúra BA

konformácie nie je doteraz známa, pretože napriek početným pokusom sa purifikácia ADP/ATP translokátora v komplexe s BA zatiaľ nepodarila. Pravdepodobne preto, lebo BA môže disociovať z proteínu počas izolácie v prítomnosti detergentov. Pre purifikáciu by bol preto vhodný taký Acp mutant, ktorý by bol vďaka mutáciám stabilizovaný v BA konformácii. Takýto mutant sa podarilo pripraviť zámenou Cys73Trp (obr. 3).



Obr. 3. 3D štruktúra ADP/ATP translokátora z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (ScAac2p) v komplexe s inhibítorom CATR

Štruktúra je vypočítaná bioinformatickými metódami podľa templátovej štruktúry Acp z *Bos taurus*. Proteín je vykreslený ako stuha, označené aminokyseliny (AK) a karboxyatraktylozid (CATR) ako paličky. (A) Pohľad z medzimembránového priestoru. H1 – H6 označujú transmembránové helixy 1 až 6. Helix číslo 5 bol vynechaný kvôli prehľadnosti. Matrixové slučky číslo 1 a 3 sú označené ako m1 a m3. Štyri mutované AK spôsobujúce rezistenciu voči inhibítoru BA sú tmavomodré (Gly30 a Leu142) alebo svetlozelené (Tyr97 and Gly298). AK Cys73 je ružová. (B) Pohľad z bočnej strany. Upravené podľa (Babot a kol., 2012).

Čo sa stane s bunkou, v ktorej by ADP/ATP transport chýbal v dôsledku mutácie AAC génov, alebo inhibície Acp? Takej bunke hrozí zánik v dôsledku nedostatku intramitochondriálneho ATP, pretože bunka stratu esenciálnych mitochondriálnych funkcií nedokáže prežiť. V kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* sú až tri AAC izogény, ktoré sú odlišne exprimované, čím sa bunka dokáže vyrovnáť s meniacimi sa rastovými podmienkami. Napríklad pri nedostatku kyslíka, keď sa znižuje expresia Aac2 izoformy, tak sa indukuje expresia Aac3 izoformy, ktorá sa vôbec netvorí v prítomnosti kyslíka. Mutant, v ktorom boli všetky tri AAC gény (AAC1, AAC2 a AAC3) vyradené za určitých podmienok dokázal prežiť. Je to možné len vďaka tomu, že v mitochondriách sa nachádzal ešte funkčný „záložný“ transportný systém adenínových nukleotidov. Je to ATP-Mg/P_i antiportér (Sal1p, „supressor of *aac2* lethality“), ktorý zabezpečí prísun cytosolického ATP do mitochondrií (obr. 1). Súčasné vyradenie génov SAL1 a AAC bunka neprežije.

Metabolické dráhy v mitochondriách

Biochemické reakcie prebiehajúce v mitochondriách sú dôležité pre celú bunku (obr. 1). Medzi kľúčové objavy v histórii biochémie patrí objav citrátového cyklu (cyklu trikarboxylových kyselín), za ktorý bola v roku 1953 udeľená Nobelova cena Hansovi Krebsovi za fyziológiu alebo medicínu. V rámci jedného úplného prebehnutia citrátového cyklu vznikajú 2 molekuly CO₂, 3 NADH, 1 FADH₂ a 1 GTP. Medziprodukty citrátového cyklu môžu zároveň slúžiť ako prekursor pre biosyntézu mnohých dôležitých molekúl, ako sú aminokyseliny, glukóza, puríny, pyrimidíny, mastné kyseliny a steroidy. Medzi kľúčové mitochondriálne dráhy patrí aj oxidácia mastných kyselín, močovinový cyklus, biosyntéza hemu, časť reakcií vedúcich k syntéze steroidov, biosyntéza dolicholu a ubiquinónu, syntéza Fe-S klastrov a syntéza kardiolípinu, ktorý sa nachádza takmer výlučne v mitochondriálnych membránach. Aeróbna oxidácia mastných kyselín je hlavným zdrojom pre tvorbu ATP v cicavčích pečenejových bunkách. Oxidáciou MK sa vytvára acetyl koenzým A, ktorý vstupuje do citrátového cyklu, kým

NADH, FADH₂ sa zapájajú do dýchacieho reťazca. V súčasnosti sa kladie dôraz na pochopenie regulácie týchto dráh, ich integráciu do celkového metabolizmu, na štruktúrnu analýzu zúčastnených enzýmov a na klonovanie génov, ktoré sa môžu použiť na diagnostiku vrodených porúch metabolizmu.

Choroby spôsobené poškodením mitochondriálnych funkcií

Mitochondriálne ochorenia môžu byť dôsledkom mutácií v mtDNA, čím sa môže poškodiť mitochondriálna proteosyntéza, niektorý z komplexov dýchacieho reťazca a syntéza ATP. Väčšina mitochondriálnych proteínov je kódovaná jadrovou DNA a príslušné mutácie môžu poškodiť asembláciu a funkciu dýchacieho reťazca, oxidatívnu fosforyláciu, medzigenómovú signalizáciu, import proteínov do mitochondrií, syntézu fosfolipidov IMM, mitochondriálnu pohyblivosť, delenie a fúziu mitochondrií. Tieto defekty sa môžu prejaviť v širokej palete ochorení, zahŕňajúc neurodegeneratívne ochorenia spojené so starnutím (Alzheimerova alebo Parkinsonova choroba, Friedreichova ataxia) a metabolické poruchy. Symptómy môžu byť mierne až závažné. Typické sú neuropatie a myopatie, alebo ich kombinácia a laktátová acidóza. Závažné mutácie sú letálne. Mitochondrie sú zároveň hlavným bunkovým producentom reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS, „reactive oxygen species“), ktoré môžu poškodzovať mtDNA, mitochondriálne proteíny a lipidy. Akumulácia poškodení narastá s časom, znižuje funkčnosť mitochondrií a prispieva k starnutiu organizmov.

Poškodenie mitochondriálnych prenášačov môže zapríčiniť niektoré mitochondriálne ochorenia. Mutácia v ľudskom géne pre ADP/ATP translokátor *ANT1* spôsobuje chronickú externú progresívnu oftalmoplégiu a viacnásobné delécie mtDNA. Aacp sa taktiež selektívne modifikuje oxidačným poškodením v dôsledku starnutia. Znížené množstvo Aacp spôsobuje myopatie, laktátovú acidózu, problémy s dýchaním a rýchlu únavu. Tieto problémy sa môžu objaviť u pacientov v predškolskom veku. Úbytok Aacp bol v tomto prípade zistený pomocou imunodetekcie v priečne-pruhovaných svaloch, ale nie v srdci, pečeni, fibroblastoch a lymfocytoch.

Pre štúdium ľudských ochorení sa používajú modelové organizmy ako sú napríklad myši alebo kvasinky. Podarilo sa pripraviť geneticky modifikovanú myš, ktorej chýba jeden z dvoch génov, kódujúci ADP/ATP translokátor (*ANT1* gén). Takáto myš stratu izoformy prežila, ale objavili sa typické prejavy myopatie a kardiopatie, laktátová acidóza, poškodené priečne-pruhované svaly. Mitochondrie zo svalových buniek tvorili zvýšené množstvo ROS a objavili sa poškodenia mtDNA. Ak sa pripravila myš s prerušeným génom *ANT2*, viedlo to k smrti počas embryogenézy v dôsledku poškodeného vývoja srdca a krvného systému. Detailné štúdium ľudských

Aacp, či už proteínov pôvodne zo zdravých buniek alebo mutantných Aacp, ktoré spôsobujú oftalmoplégiu sa podarilo uskutočniť pomocou ich expresie v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, alebo v baktériách *Escherichia coli*. Výhodou experimentov v jednobunkových organizmoch je jednoduchá kultivácia, rýchla generačná doba a dostupnosť širokej palety biochemických a molekulárno-biologických metód. Meraním aktivity a využitím poznatkov o štruktúre proteínu sa podarilo demonštrovať, ako konkrétne patologické mutácie menia väzbovú afinitu k substrátom a translokačnú kinetiku. Mutácie modulujú asociáciu nukleotidov s Aacp v dôsledku zmenených elektrostatických vlastností, alebo redukujú možnosť konformačných zmien potrebných pre transport.

Homozygotná mutácia vo fosfátovom prenášači zapríčiniť laktátovú acidózu, hypertrofickú kardiomyopatiu a muskulárnu hypotóniu, čo viedlo k úmrtiu pacientov v prvom roku ich života. Mutácie v aspartát/glutamátovom prenášači *Agc2* (citrín) spôsobujú dve autozomálne recesívne ochorenia – neonatálnu intrahepatickú cholestázu a citrulinémiu typu II, ktorá môže bez liečby spôsobiť smrť pacienta v dôsledku hyperamonemickej encefalopatie a komplikácií mozgového opuchu. Špecifické mutácie citrátového prenášača spôsobujú poruchy v činnosti Krebsovho cyklu, čo sa prejaví poruchami vo vývoji nervového tkaniva.

Mitochondrie sa podieľajú aktívne v programovanej bunkovej smrti (apoptóze) v cicavčích bunkách. Apoptóza je potrebná pre odstránenie nepotrebných buniek bez toho, aby vznikol na danom mieste zápal. Uplatňuje sa už počas embryogenézy a prebieha v organizme počas celého života. Po interakcii proapoptotických proteínov z Bcl-2 rodiny (napr. Bax, Bak) s OMM dochádza k uvoľneniu viacerých proteínov do cytosolu (napr. cytochróm c, AIF), kde sa podieľajú na aktivácii apoptotických dráh. Protiapoptotické proteíny (napr. Bcl-x_L, Bcl-2) po interakcii s proapoptotickými proteínmi v OMM môžu apoptózu inhibovať. K permeabilizácii mitochondrií môže dôjsť aj pomocou permeabilizujúceho tranzitného póru (PTP), ktorý vytvára za určitých podmienok ATP syntáza. Vznikne nešpecifický pór pre malé molekuly v IMM, čo umožní kolaps $\Delta\psi$, napučanie matrixu, prasknutie OMM, uvoľnenie cytochrómu c do cytoplazmy a aktiváciu apoptózy. Na regulácii PTP sa podieľa aj porín (proteín z OMM), Aacp (proteín z IMM) a matrixový proteín cyklofilín. Proapoptotické alebo protiapoptotické proteíny z rodiny Bcl-2 modulujú aktivitu PTP pomocou priamych interakcií s porínom alebo s ADP/ATP prenášačom.

Záver

Štúdium mitochondrií je aj naďalej v centre základného i aplikovaného výskumu, pretože zostáva ešte mnoho nezodpovedaných otázok o rôznych funkciách mito-

chondrií v zdravých alebo poškodených bunkách. Nee-
xistuje univerzálna mitochondria, ktorá by mala rovnaké
vlastnosti vo všetkých typoch buniek a organizmov. Je
potrebné preskúmať špecifické funkcie mitochondrií
v rôznych tkanivách a špecializovaných typoch buniek.
To nám pomôže pochopiť príčiny širokého spektra mito-
chondriálnych ochorení a zabezpečiť pre každého pa-
cianta účinnú terapiu.

Abstract

Mitochondria are essential organelles present in the eukaryot-
ic cells. They have two membranes with different composition
and functions. Their main role is to provide the cell with ATP
synthesized during the process called oxidative phosphoryla-
tion. Substrates for ATP synthesis are transported to mito-
chondrial matrix via mitochondrial ADP/ATP carrier and phos-
phate carrier located in the inner mitochondrial membrane.
Major success in understanding the function of the ADP/ATP
carrier was achieved when specific inhibitors atractylosides
and bongkrekates were used to study this protein. ATP is
synthesized from ADP and phosphate by the enzyme ATP
synthase and this process is driven by transmembrane proton
gradient created across inner membrane by action of the res-
piratory chain. Mitochondria produce metabolic intermediates
for a variety of cellular biosynthetic pathways. They play also
important role in aging and apoptosis. Impaired mitochondrial
functions may cause a wide variety of diseases.

Literatúra

- BABOT, M., BLANCARD, C., ZEMAN, I., LAUQUIN, G. J. M.,
TRÉZÉGUET, V. (2012). Mitochondrial ADP/ATP carrier: Pre-
venting conformational changes by point mutations inactivates
nucleotide transport activity. *Biochemistry* 51:7348-7356.
KUNJI, E. R. (2004). The role and structure of mitochondrial
carriers. *FEBS Lett.* 564:239-244.
LACO, J., ZEMAN, I., PEVALA, V., POLČIC, P., KOLAROV, J.
(2010). Adenine nucleotide transport via Sal1 carrier compen-
sates for the essential function of the mitochondrial ADP/ATP
carrier. *FEMS Yeast Res.* 10:290-296.
SCHEFFLER, I. E. (2000). A century of mitochondrial re-
search: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1:3-
31.
SCHEFFLER, I. E. (2008). Mitochondria. Second Ed. John
Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
ŠABOVÁ, L., ZEMAN, I., SUPEK, F., KOLAROV, J. (1993).
Transcriptional control of AAC3 gene encoding mitochondrial
ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxy-
gen, heme and ROX1 factor. *Eur. J. Biochem.* 213:547-553.
ZEMAN, I., SCHWIMMER, C., POSTIS, V., BRANDOLIN, G.,
DAVID, C., TRÉZÉGUET, V., LAUQUIN, G. J. M. (2003). Four
mutations in transmembrane domains of the mitochondrial
ADP/ATP carrier increase resistance to bongkrekic acid. *J.
Bioenerg. Biomembr.* 35:243-256.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Epikardiálne tukové tkanivo

Úvod

Tukové tkanivo sa distribuuje do celého tela. Jeho roz-
loženie závisí od pohlavia, veku, genotypu, stravy, fy-
zickej aktivity, hormónov a liekov (Iacobellis G., 2005).
Tuk, ktorý obklopuje orgány v telových dutinách, sa
nazýva viscerálny tuk (Iacobellis G., Singh N., Sharma
A. M., 2007). Viscerálne tukové tkanivo sa považuje za
dôležitý ukazovateľ vysokého rizika vzniku kardiovasku-
lárných a metabolických ochorení (Iacobellis G. et al.,
2003b). V súvislosti s kardiovaskulárnym rizikom je dôle-
žitá lokálna distribúcia viscerálneho tuku (McLean. S.,
Stillman A. E., 2009). Tento možno rozdeliť do skupín
podľa umiestnenia v troch hlavných dutinách (intratorá-
kálna, intraabdominálna a vnútropanvová) (Iacobellis,
G., 2005). Tuk okolo srdca sa ukladá do troch rozdiel-
nych ložísk: epikardiálne, perikardiálne a intracelulárne
(Iacobellis G., Pond C. M., Sharma A. M., 2006).

Jana Mlynárová, Marek Máťuš, Peter Musil,
Ondrej Sprušanský, Ján Kyselovič

Farmaceutická fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
mlynarova@fpharm.uniba.sk

Charakteristika epikardiálneho tukového tkaniva

Epikardiálne tukové tkanivo (ET) bolo objavené v polo-
vici dvadsiateho storočia (Iacobellis G., Pond C. M.,
Sharma A. M., 2006). Odlišuje sa od perikardiálneho
tuku. Epikardiálny tuk je lokalizovaný medzi myokardom
a viscerálnym perikardom. Perikardiálny tuk sa definuje
ako epikardiálny s parakardiálnym a je lokalizovaný
medzi viscerálnym a parietálnym perikardom. Odlišujú
sa takisto embryologickým základom a cievny zaso-
bením (Sacks H. S., Fain J. N., 2007; Iacobellis G.,
Bianco A. C., 2011; Iacobellis G. et al., 2008). Epikar-
diálny tuk možno rozlišovať myokardiálny (na povrchu
myokardu) a perikoronárny, nachádzajúci sa v tesnej
blízkosti koronárnych artérií. Nie je však známe, či sa
tieto dve ložiská odlišujú (Iacobellis G., Bianco A. C.,

2011). Epikardiálne tukové tkanivo sa odlišuje od ostatných viscerálnych tukových tkanív viacerými vlastnosťami: veľkosť adipocytov, počet adipocytov na gram tkaniva, zložením a syntézou, vychytávaním a odbúraním mastných kyselín, obsahom proteínov, expresiou enzýmov zahrnutých do metabolizmu tukov, využívaním glukózy, rýchlosťou ubúdania tukového ložiska (Rabkin S. W., 2007; Iacobellis G., Bianco A. C., 2011).

Štúdie epikardiálneho tukového tkaniva v normálnych, hypertenzných a ischemických srdciach ukázali, že tukové tkanivo tvorí významnú zložku srdca (Iacobellis G., Leonetti F., 2005). Za fyziologických podmienok, ET pokrýva myokard v oblasti bázy, atrioventrikulárnej ryhy, intraventrikulárnej ryhy, hlavných vetiev koronárnych artérií, voľnej steny pravej komory a apexu ľavej komory. Najväčšie množstvo tuku sa nachádza na voľnej stene pravej komory. V malej miere sa nachádza aj v oblasti predsiení (Iacobellis G., Pond C. M., Sharma A. M., 2006; Sacks H. S., John N. F., 2007; Rabkin S. W., 2007; Singh N. et al., 2007). Z celkového množstva tuku v tele tvorí iba 0,02 % (Iacobellis G., Pond C. M., Sharma A. M., 2006), avšak pokrýva priemerne 80 % povrchu srdca a predstavuje asi 20 % hmotnosti srdca (Rabkin S. W., 2007). Neexistuje vrstva oddeľujúca ET od myokardu. Epikardiálne tukové tkanivo má spoločné cievné zásobenie s myokardom (Iacobellis G., Pond C. M., Sharma A. M., 2006; Iacobellis G., Bianco A. C., 2011; Singh N. et al., 2007).

Úloha epikardiálneho tukového tkaniva

Fyziologická úloha ET nie je úplne objasnená (Iacobellis, G. et al., 2008). Zrejme slúži na vychytávanie intravaskulárnych voľných mastných kyselín, čím ochraňuje kardiomyocyty pred nadmernou koncentráciou vyšších mastných kyselín z koronárnych artérií. Inokedy je potrebné na uvoľňovanie vyšších mastných kyselín ako okamžitý zdroj ATP pri zvýšenej potrebe myokardu, napríklad pri ischemickom stave (Sacks H. S., John N. F., 2007; Iacobellis G., Corradi D., Sharma A. M., 2005). Môže sa teda správať ako tlmivý systém, ktorý reguluje hladinu mastných kyselín, čím zabraňuje jej zvýšeniu na toxickú úroveň (Iacobellis G., Singh N., Sharma A. M., 2007).

Okrem regulácie homeostázy mastných kyselín v koronárnej mikrocirkulácii a poskytovania energie myokardu sa predpokladá, že ET tlmí torzný efekt vln arteriálneho pulzu a srdcovej kontrakcie na koronárne artérie a uľahčuje remodeláciu koronárnych artérií (Rabkin S.W., 2007).

Epikardiálne tukové tkanivo sa ako sekrečný orgán zrejme podieľa aj na fyziológii kardiovaskulárneho systému cez faktory vylučované adipocytmi, ktoré účinkujú cez receptory práve na koronárnych cievach. Môže vylučovať niektoré bioaktívne molekuly, teda antiinflamač-

né a proinflamačné mediátory (Iacobellis G., Singh N., Sharma A. M., 2007). Prostredníctvom sekrécie adiponektínu a adrenomedulínu, stimulovanej lokálnym alebo systémovým metabolickým či mechanickým poškodením, môže pôsobiť protektívne na srdce a cievy (Iacobellis G., Barbaro G., 2008). Epikardiálne tukové tkanivo je tiež schopné produkovať vazoaktívne látky, ktoré regulujú pružnosť koronárnych artérií, ako je napríklad od adipocytov odvodený relaxačný faktor („*adipocyte-derived relaxing factor*“), ktorý pôsobí vazodilatačne, nezávisle od oxidu dusnatého (Sacks H. S., Fain J. N., 2007). Z biochemického hľadiska uvoľňuje ET veľa mastných kyselín, obsahuje veľa proteínov, má slabú oxidačnú kapacitu a slabé využitie glukózy. U morských prasiat sa, na rozdiel od iných tukových ložísk, zistila zvýšená syntéza vyšších mastných kyselín, ich uvoľňovanie a rozklad po stimulácii katecholamínmi. Predpokladá sa znížený antilipolitický efekt inzulínu a zvýšená aktivita hlavne β_3 -adrenergických receptorov (Iacobellis G., Leonetti F., 2005).

Tukové tkanivo je multifunkčný orgán vylučujúci množstvo hormónov, rastových faktorov, enzýmov, cytokínov, komplementových faktorov, proteínov matrixu, teda adipokínov resp. adipocytokínov (Fruhbeck G., 2004). V epikardiálnom tukovom tkanive bolo sledovaných mnoho cytokínov a iných génov u zdravých pacientov ako aj u pacientov s koronárnou chorobou (KCH), či metabolickým syndrómom (MS). Mazurek et al. ukázal u pacientov podstupujúcich aortokoronárny bypass rozdielnú expresiu v 1003 génoch v porovnaní s podkožným tukovým tkanivom. 805 z nich bolo upregulovaných, 198 downregulovaných v ET, pričom upregulované boli gény súvisiace so zápalom a imunitnou reakciou. Medzi downregulovanými génmi boli gény súvisiace s adipocytmi (Mazurek T. et al., 2003).

Adipokín alebo adipocytokín je hormón, cytokín alebo chemokín, vylučovaný z neporušeného tukového tkaniva, kde sa nachádzajú adipocyty, preadipocyty, makrofágy, lymfocyty, endoteliálne bunky, mastocyty, bazofily a fibroblasty (Sacks H. S., Fain J. N., 2007). Adipokíny sa podieľajú na viacerých procesoch priamym alebo nepriamym pôsobením. Regulujú rozvoj zápalu, aterosklerózy, hypertenzie, inzulínovej rezistencie a remodelácie ciev (Fruhbeck G., 2004). Takýmito látkami sú proinflamačné a antiinflamačné faktory. Z proinflamačných faktorov ET produkuje TNF α , IL-1 β , IL-6, nervový rastový faktor, rezistín, leptín. Z antiinflamačných faktorov je to adiponektín a adrenomedullin. Bola zistená aj expresia PAI-1, CD-45, AGT, t-PA, MCP-1 a IL-6 solubilný receptor v ET (Iacobellis G., Singh N., Sharma A. M., 2007; Iacobellis G., Corradi D., Sharma A. M., 2005; Baker A.R. et al., 2006; Iacobellis G., Barbaro G., 2008).

Množstvo epikardiálneho tuku je spojené s obezitou (Rabkin S. W., 2007). Pri extrémnej obezite môže ET pokryť celý povrch srdca v hrúbke 2 cm a viac. Voľné

masné kyseliny z hypertrofovaných adipocytov môžu difundovať priamo do myokardu, kde spolu s voľnými masnými kyselinami z plazmy môžu zhoršiť myokardiálnu steatózu a lipotoxicitu. Následkom týchto dejov dochádza k zvýšeniu hmotnosti srdca a mechanickej námahy, hypertrofii ľavej komory, diastolickej dysfunkcii ľavej komory, k zvýšenej arytmogénite až zlyhávaniu srdca (Sacks H. S., Fain J. N., 2007). Hmotnosť ET sa zvyšuje s hypertrofiou. Nadmerné množstvo tuku tak pridá na hmotnosti komôr a takisto sa zvýši námaha a práca myokardu pri pumpovaní krvi (Iacobellis G., Singh N., Sharma A. M., 2007; Iacobellis G., Pond C. M., Sharma A. M., 2006). Vzhľadom na blízkosť ET k myokardu a absenciu prepážky medzi nimi sa predpokladá lokálne pôsobenie medzi týmito tkanivami. Zdá sa, že ET by mohlo vplývať na myokard a koronárne artérie parakrinne alebo endokrinne prostredníctvom cytokínov (Iacobellis G., Barbaro G., 2008).

Hrúbka ET signifikantne pozitívne koreluje s plazmatickou hladinou glukózy nalačno a inzulínu nalačno ako aj s inými parametrami súvisiacimi s metabolickým syndrómom (Wang CH-P. et al., 2009; Iacobellis G. et al., 2003; Iacobellis G., Leonetti F., 2005; Iacobellis G., Barbaro G., Gerstein H. C., 2008). Epikardiálne tukové tkanivo tak súvisí s metabolickým syndrómom (Iacobellis G. et al., 2003; Iacobellis G. et al., 2008).

Epikardiálne tukové tkanivo sa dáva do súvislosti s atriálnou fibriláciou. Zdá sa, že zvýšený celkový a atriálny objem ET je väčší u pacientov s atriálnou fibriláciou (AF) a má zväčšujúcu sa tendenciu od pacientov bez AF cez tých s paroxysmálnou až perzistentnou AF (Nagashima K. et al., 2011; Shin S. Y. et al., 2011). Zistila sa korelácia ET aj s rekurenciou AF po katéetrovej ablácii (Tsao H-M. et al., 2011). Adiponektin v ET sa zdá byť dôležitý pre zachovanie sínusového rytmu po operácii srdca (Kourliouros A. et al., 2011).

Záver

Epikardiálne tukové tkanivo je aktívne viscerálne tukové tkanivo obklopujúce srdce. Jeho funkcia doteraz nie je úplne známa. Predpokladá sa však fyziologická ako aj patofyziologická úloha ET na kardiovaskulárne ochorenia. Viaceré štúdie preukázali jeho úlohu pri koronárnej chorobe, metabolickom syndróme a atriálnej fibrilácii.

Abstract

Epicardial adipose tissue (EAT) is a visceral adipose tissue around the heart. EAT differs from other adipose tissue deposits. In patients undergoing aortocoronary bypass, 1003 genes were found to be differentially expressed. 805 of them were upregulated, 198 downregulated in EAT compared to subcutaneous adipose tissue. The physiologic role of EAT is not yet clear. It probably uptakes free fatty acids from coronary arteries and thus protects cardiomyocytes from a fatty acid overload. EAT is also important as an immediate source of energy,

especially during higher myocardial energetic requirements. Epicardial adipose tissue as a secretory organ also contributes to cardiovascular physiology. This activity can be due to factors secreted by adipocytes, with effect on coronary arteries. Thus EAT can contribute to coronary artery disease. A protective effect on the heart and vessels is proposed by secretion of adiponectin and adrenomedullin. EAT is also proposed to contribute to metabolic syndrome and atrial fibrillation.

Literatúra

- BAKER, A. R., SILVA, N. F., QUINN, D. W., HARTE, A. L., PAGANO, D., BONSER, R. S., KUMAR, S., McTERNAN, P. G. 2006. Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*. 2006, Vol. 5(1).
- IACOBELLIS, G., SINGH, N., SHARMA, A. M. 2007. Cardiac adiposity and cardiovascular risk: potential role of epicardial adipose tissue. *Current Cardiology Reviews*. 2007, Vol. 3, pp. 11-14.
- IACOBELLIS, G., CORRADI, D., SHARMA, A. M. 2005. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005d, Vol. 2, pp. 536-543.
- IACOBELLIS, G., ASSAEL, F., RIBAUDO, M. C., ZAPPATERRENO, A., ALESSI, G., DI MARIO, U., LEONETTI, F. 2003. Epicardial fat from echocardiography: a new method for visceral adipose tissue prediction. *Obes Res*. 2003, Vol. 11, pp. 304-310.
- IACOBELLIS, G., RIBAUDO, M. C., ASSAEL, F., VECCI, E., TIBERTI, C., ZAPPATERRENO, A., DI MARIO, U., LEONETTI, F. 2003. Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: A new indicator of cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, Vol. 88(11), pp. 5163-5168.
- IACOBELLIS, G., WILLENS, H. J., BARBARO, G., SHARMA, A. M. 2008. Threshold Values of High-risk Echocardiographic Epicardial Fat Thickness. *Obesity*. 2008b, Vol. 16(4), pp. 887-892.
- IACOBELLIS, G., BARBARO, G., GERSTEIN, H. C. 2008. Relationship of epicardial fat thickness and fasting glucose. *Int J Cardiol*. 2008a, Vol. 128, pp. 424-426.
- IACOBELLIS, G., BARBARO, G. 2008. The double role of epicardial adipose tissue as pro- and anti-inflammatory organ. *Horm Metab Res*. 2008c, Vol. 40, pp. 442-445.
- IACOBELLIS, G., BIANCO, A. C. 2011. Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends in endocrinology and metabolism*. 2011, Vol. 22(11), pp. 450-457.
- IACOBELLIS, G.; LEONETTI, F. 2005. Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005d, Vol. 90(11), pp. 6300-6302.
- IACOBELLIS, G., POND, C. M., SHARMA, A. M. 2006. Different "weight" of cardiac and general adiposity in predicting left ventricle morphology. *Obesity*. 2006, Vol. 14(10), pp. 1679-1684.
- IACOBELLIS, G. 2005. Imaging of visceral adipose tissue: an emerging diagnostic tool and therapeutic target. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005b, Vol. 5, pp. 345-353.
- KOURLIOUROS, A., KARASTERGIOU, K., NOWELL, J., GUKOP, P., TAVAKKOLI, HOSSEINI, M., VALENCIA, O., MOHAMED, ALI V., JAHANGIRI, M. 2011. Protective effect of epicardial adiponectin on atrial fibrillation following cardiac surgery. *European Journal of cardio-thoracic surgery*. 2011, Vol. 39, pp. 228-232.
- MAZUREK, T., ZHANG, L., ZALEWSKI, A., MANNION, J. D., DIEHL, J. T., ARAFAT, H., SAROV-BLAT, L., O'BRIEN, S., KEIPER, E. A., JOHNSON, A. G., MARTIN, J., GOLDSTEIN, B. J., SHI, Y. 2003. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003, Vol. 108, pp. 2460-2466.

MCLEAN, D. S., STILLMAN, A. E. 2009. Epicardial adipose tissue as a cardiovascular risk marker. *Clinical lipidology*. 2009, Vol. 4(1), pp. 55-62.

NAGASHIMA, K., OKUMURA, Y., WATANABE, I., NAKAI, T., OHKUBO, K., KOFUNE, T., KOFUNE, M., MANO, H., SONODA, K., HIRAYAMA, A. 2011. Association between epicardial adipose tissue volumes on 3-dimensional reconstructed CT images and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *Circ J*. 2011, Vol. 75(11), pp. 2559-65.

RABKIN, S. W. 2007. Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. *Obes Rev*. 2007, Vol. 8(3), pp. 253-261.

SACKS, H. S., FAIN, J. N. 2007. Human epicardial adipose tissue: A review. *Am Heart J*. 2007, Vol. 153(6), pp. 907-17.

SHIN, S. Y., YONG, H. S., LIM, H. E., NA, J. O., CHOI, C. U., CHOI, J. I., KIM, S. H., KIM, J. W., KIM, E. J., PARK, S. W., RHA, S. W., PARK, C. G., SEO, H. S., OH, D. J., KIM, Y. H. 2011. Total and interatrial epicardial adipose tissues are independently associated with left atrial remodeling in patients with atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2011, Vol. 22(6), pp. 647-55.

SINGH, N., SINGH, H., KHANIJOUN, H. K., IACOBELLIS, G.

2007. Echocardiographic assessment of epicardial adipose tissue- A marker of visceral adiposity. *MJM*. 2007, Vol. 10(1), pp. 26-30.

FRUHBECK, G. 2004. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004, Vol. 2, pp. 197-208.

TSAO, H. M., HU, W. C., WU, M. H., TAI, C. T., LIN, Y. J., CHANG, S. L., LO, L. W., HU, Y. F., TUAN, T. C., WU, T. J., SHEU, M. H., CHANG, C. Y., CHEN, S. A. 2011. Quantitative analysis of quantity and distribution of epicardial adipose tissue surrounding the left atrium in patients with atrial fibrillation and effect of recurrence after ablation. *Am J Cardiol*. 2011, Vol. 107, pp. 1498-1503.

WANG, C. P., HSU, H. L., HUNG, W. C., YU, T. H., CHEN, Y. H., CHIU, C. A., LU, L. F., CHUNG, F. M., SHIN, S. J., LEE, Y. J. 2009. Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis. *Clinical Endocrinology*. 2009, Vol. 70, pp. 876-882.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Triedenie proteínov v bunkách (alebo ako dostať proteíny tam kam patria)

Peter Polčic

Katedra biochémie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave
polcic@fns.uniba.sk

Úvod

Biochemické procesy v eukaryotických bunkách prebiehajú v špecializovaných membránami ohraničených kompartmentoch zvaných organely. Enzymatická výbava jednotlivých organel preto musí zodpovedať ich špecializovanej funkcii. Napríklad mitochondrie, ktoré sú predovšetkým zodpovedné za odbúranie pyruvátu v Krebsovom cykle a produkciu energie vo forme ATP v procese oxidatívnej fosforylácie, potrebujú enzýmy ktoré katalyzujú jednotlivé kroky týchto procesov. V Golgiho aparáte zasa dochádza ku glykozylácii proteínov, potrebuje preto enzýmy schopné prenášať glykozylové zvyšky. Transkripcia DNA do RNA prebieha v jadre, k tomu je potrebné aby boli všetky komponenty transkripčnej mašínérie prítomné v jadre.

Akým spôsobom je teda zabezpečené že každá organela obsahuje špecifickú proteínovú výbavu? Väčšina bunkových proteínov je kódovaná jadrovou DNA a syntetizuje sa na voľných ribozómoch v cytoplazme alebo na ribozómoch, ktoré sú viazané na membránu drsného endoplazmatického retikula. Proteíny nasyntetizované na voľných ribozómoch sú po syntéze uvoľnené do cytoplazmy, kde buď zostávajú, alebo sú transportované do jadra, mitochondrií, peroxizómov, prípadne chloroplastov (v rastlinných bunkách). Ribozómy viazané na endoplazmatické retikulum syntetizujú proteíny určené pre endoplazmatické retikulum samotné, Golgiho apa-

rát, vakuoly alebo lyzozómy, proteíny bunkovej (cytoplazmatickej) membrány ale aj proteíny určené na sekreciu z bunky. Okrem jadrom kódovaných proteínov dve z organel, mitochondrie a chloroplasty, obsahujú aj vlastnú DNA a vlastný proteosyntetický aparát schopný syntetizovať proteíny priamo v organele. Takýmto spôsobom je však tvorená len malá hŕstka proteínov.

Pre správne roztriedenie proteínov kódovaných jadrovou DNA do jednotlivých organel je potrebné, aby každý proteín vo svojej primárnej štruktúre niesol informáciu – značku – o tom, do ktorej organely patrí. Takýmto značkám hovoríme signálne peptidy a do dnešného dňa bolo popísaných mnoho druhov takýchto sekvencií smerujúcich proteíny do rôznych organel. Viaceré z nich sa nachádzajú na koncoch proteínov a sú z nich po dopravení proteínu na miesto určenia odstránené. Iné odstránené nie sú a na proteínoch zostávajú. Signálne peptidy bývajú rozpoznávané transportnými systémami v membránach organel a takto rozpoznané proteíny sú potom týmito systémami do organel importované, takže všetky mitochondriálne proteíny sa dostanú do mitochondrií, jadrové do jadra a podobne. Napriek tomu, že triedenie proteínov do jednotlivých častí bunky vo všeobecnosti sleduje jednoduchú schému, importné dráhy do jednotlivých organel majú mnoho odlišností.

Z cytoplazmy do organel

Prekursor proteínov určených pre import do mitochondrií môžu obsahovať niekoľko typov signálov. Odštiepiateľnou sekvenciou na N-konci bývajú označené proteíny transportované do mitochondriálnej matrix. Túto sekvenciu netvorí presne určené poradie aminokyselín ale spoločnou črtou mitochondriálnych presekvencií je, že tvoria amfipatický alfa-helix, ktorý je z jednej strany hydrofóbny a z druhej kladne nabitý. Proteíny s takouto presekvenciou sú rozpoznané receptormi na povrchu mitochondrií. Tieto receptory sú súčasťou proteín-importných komplexov vonkajšej mitochondriálnej membrány TOM (*translocase of the outer membrane*). Po naviazaní na receptor je proteín vložený do importného póru, ktorý je súčasťou rovnakého komplexu. Reťazec proteínu je rozvinutý a pretiahnutý pórom do mitochondriálneho medzimembránového priestoru signálnou sekvenciou napred, kde je rozonaný podobným komplexom vnútornej mitochondriálnej membrány TIM23 (*translocase of the inner membrane*), cez ktorú je ďalej transportovaný do mitochondriálnej matrix. Transport preproteínu do mitochondriálnej matrix je poháňaný elektrochemickým gradientom ($\Delta\psi$) na vnútornej mitochondriálnej membráne, ktorý zabezpečí elektroforetické vloženie kladne nabitého N-konca proteínu do kanálu v komplexe TIM23, ako aj hydrolýzou ATP ktorá je potrebná pre vťahnutie proteínu do mitochondriálnej matrix pomocou šaperónových proteínov HSP60 (*heat shock protein*). V mitochondriálnej matrix je pomocou mitochondriálnej procesujúcej peptidázy N-koncová presekvencia odštiepená a proteín je zvinutý do natívnej konformácie.

Iné mitochondriálne proteíny, predovšetkým proteíny vnútornej mitochondriálnej membrány neobsahujú typické N-koncové presekvencie, ale informácia o ich nasmerovaní do mitochondriálnej membrány je rozložená pozdĺž aminokyselinovej sekvencie celého proteínu. Tieto proteíny sú tiež rozonávané receptorom, ktorý je súčasťou importného komplexu TOM, ktorý sa podieľa aj na importe vyššie spomenutých proteínov s N-koncovou presekvenciou, i keď rozpoznávanie takýchto proteínov sa môžu zúčastňovať odlišné podjednotky komplexu. Komplexom TOM sú potom transportované cez vonkajšiu membránu mitochondrií a pretože sa jedná o veľmi hydrofóbne proteíny, ich transport cez vodné prostredie medzimembránového priestoru mitochondrií vyžaduje asistenciu ďalších šaperónových proteínov (napr. Tim9 a Tim10). Následne sú s pomocou špecializovaného importného komplexu vo vnútornej membráne TIM22 do tejto membrány zabudované. Veľmi podobne ako import do mitochondrií prebieha aj import proteínov do chloroplastov.

Pre proteíny určené do peroxizómov, organel podieľajúcich sa predovšetkým na odbúravaní mastných kyselín, je charakteristická C-koncová sekvencia serín-lyzín-leucín alebo N-koncová sekvencia (pochopteľne iná

ako mitochondriálna a chloroplastová, obvykle tvorená deviatimi aminokyselinovými zvyškami). Každá z týchto dvoch typov sekvencií, označovaných ako PTS1 a PTS2 (*peroxizomal targeting signal*) je v cytosole rozoznaná pomocou receptorového proteínu (Pex5 pre PTS1 a Pex7 pre PTS2), ktorý sa na ňu naviaže a privedie proteíny ku transportnému komplexu v membráne peroxizómu a proteíny sú transportované do peroxizómov mechanizmom, ktorý, na rozdiel od importu do mitochondrií a chloroplastov, nevyžaduje rozvinutie proteínu. Takýmto spôsobom je možné do peroxizómov importovať komplexy proteínov, z ktorých iba niektoré obsahujú signálnu sekvenciu.

Jadrové proteíny sú do jadra importované cez póry v jadrovej membráne. Rozmery jadrových pórov, ktoré sú tvorené veľkými proteínovými komplexmi v miestach spojenia vnútornej a vonkajšej jadrovej membrány, umožňujú prepustiť voľnou difúziou proteíny až do veľkosti 60 kDa, preto sa dlho predpokladalo, že proteíny sa do jadra dostávajú difúziou cez jadrové póry. Dnes vieme, že mnohé z jadrových proteínov sú cez pór aktívne transportované. Tieto proteíny majú vo svojej sekvencii jadrový lokalizačný signál NLS (*nuclear localization signal*), ktorý je obvyčajne bohatý na kladne nabitú aminokyselinu a môže sa nachádzať v niektorom mieste pozdĺž celej sekvencie proteínu, zvyčajne však v strede alebo blízko pri C-konci. Je tiež potrebné aby sa kladne nabitú aminokyselinu tvoriace tento signál v zbalenom proteíne nachádzali na povrchu, aby ho mohol jadrový importný receptor rozoznať a zabezpečiť nasmerovanie proteínu do póru a jeho následný import. Receptorom rozpoznávajúcim NLS je proteín importín, nachádzajúci sa v cytoplazme. Po naviazaní transportovaného proteínu importín interaguje s proteínmi (nukleoporínmi) jadrového póru a importuje proteín do jadra. Uvoľnenie transportovaného proteínu z komplexu z importínom v jadre zabezpečuje proteín Ran-GTP, ktorý sa v jadre viaže na importín a po uvoľnení transportovaného proteínu je spolu s importínom cez jadrový pór prenesený do cytoplazmy. Podobne ako pri importe do peroxizómov jadrové proteíny pri prechode cez pór rozvinuté nie sú.

Prestupná stanica – endoplazmatické retikulum

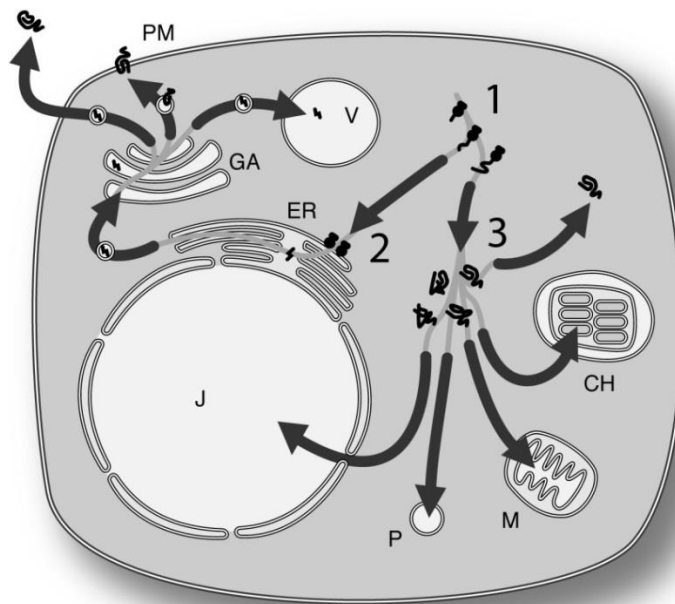
Spoločnou črtou importu proteínov do mitochondrií, chloroplastov, peroxizómov a jadra bolo, že proteíny sú kompletne nasyntetizované v cytoplazme a až následne sú do organel importované transportnými komplexmi v membránach týchto organel. Pretože import prebieha až po ich syntéze (translácii), hovoríme, že ide o import posttranslačný. Celkom iným spôsobom sú transportované proteíny do ostatných bunkových kompartmentov. Tieto sú syntetizované na povrchu endoplazmatického retikula. Proteíny určené na syntézu na ribozómoch

viazaných na endoplazmatickom retikule obsahujú špecifickú signálnu sekvenciu na svojom N-konci. Táto je opäť iná ako vyššie spomínané N-koncové signálne peptidy. Tvorí ju obvykle jedna alebo niekoľko kladne nabitých aminokyselín nasledovaných viacerými hydrofóbnymi aminokyselinami. Podobne ako u ostatných proteínov aj ich syntéza sa začína na voľných ribozónoch v cytoplazme. Pretože syntéza proteínov prebieha v smere od N-konca k C-koncu, je signálna sekvencia nasyntetizovaná ako prvá a v momente keď je z proteínu nasyntetizovaná toľko, že celá signálna sekvencia vyčnieva von z ribozómu, sa na ňu naviaže ribonukleoproteín označovaný ako signál rozoznávajúca častica SRP (*signal recognition particle*). Úlohou SRP je rozoznávať signálnu sekvenciu. Komplex signálnej sekvencie a SRP je následne rozpoznaný receptorom na povrchu endoplazmatického retikula a signálna sekvencia je vložená do kanála v membráne. Od tejto chvíle syntéza proteínu pokračuje s tým, že proteín z ribozómu priamo prechádza membránovým kanálom (Sec61) dovnútra do lumenu endoplazmatického retikula. Takémuto spôsobu transportu proteínov, keď ku transportu dochádza súčasne so syntézou hovoríme kotranslačný. V lumene endoplazmatického retikula je signálna sekvencia odštiepená signálnou peptidázou a v zrelom proteíne sa nenachádza. Ak proteín obsahuje vo svojej sekvencii signál pre zastavie transferu cez membránu, neprechádza do lumenu celý, ale zostáva zakotvený

v membráne endoplazmatického retikula. Poloha takéhoto signálu, alebo viacerých signálov, potom určuje topológiu membránového proteínu.

Ako rozpustné proteíny v lumene, tak aj proteíny ukotvené v membráne sú odtiaľto následne transportované do Golgiho aparátu prostredníctvom membránových váčkov. Tieto po splynutí s cisternami Golgiho aparátu proteíny odovzdávajú a vracajú sa naspäť prázdne iba s proteínmi, potrebnými v endoplazmatickom retikule, ktoré sú recyklované (tiež na základe prítomnosti špecifickej sekvencie lyzín-kyselina asparágová-kyselina glutamová-leucín na C-konci, ktorá je rozpoznaná receptormi v membráne váčku). Z Golgiho aparátu sú proteíny opäť prostredníctvom membránových váčkov transportované ďalej buď do vakuol, plazmatickej membrány alebo sú sekretované z bunky von. Váčky obsahujúce prenášané proteíny sa oddeľujú z cisterien Golgiho aparátu a spájajú s membránou vakuoly, pričom je ich obsah uvoľnený do vakuoly, alebo s plazmatickou membránou. V druhom prípade sú proteíny z váčkov uvoľnené z bunky von a proteíny ukotvené v membráne váčkov zostávajú na povrchu bunky integrované do plazmatickej membrány.

Poslednou skupinou proteínov, sú proteíny určené pre cytoplazmu. Tieto vo svojej sekvencii neobsahujú žiadne signálne sekvencie a preto po syntéze na voľných ribozónoch zostávajú v cytoplazme.



Obr. 1. Triedenie proteínov

Proteosyntéza jadrom kódovaných proteínov začína na voľných cytoplazmatických ribozónoch (1). Proteíny určené pre endoplazmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA), vakuoly (V), plazmatickú membránu (PM), a proteíny sekretované z bunky, sú po nasyntetizovaní signálnej sekvencie rozoznané a po väzbe ribozómu na endoplazmatické retikulum sú dosyntetizované na viazaných ribozónoch (2). Ostatné proteíny sú kompletne syntetizované v cytoplazme (3), kde buď zostávajú, alebo sú posttranslačne transportované do mitochondrií (M), chloroplastov (CH), jadra (J) alebo peroxizómov (P).

Záver

Ako vidno, triedenie novonasyntetizovaných proteínov do správnych organel je komplexný proces, ktorý vyžaduje správnu funkciu mnohých importných systémov. Za objavenie signálnych sekvencií, ktoré proteíny smerujú do správnych bunkových kompartmentov bolo natoľko zásadným objavom molekulárnej biológie, že za neho Günter Blobel dostal v roku 1999 Nobelovu cenu za fyziológiu a medicínu.

Poruchy v procesoch triedenia proteínov sú vo väčšine prípadov nezlúčiteľné s životom, alebo sú príčinami niekoľkých vážnych chorôb. Napríklad defekty importu proteínov do peroxizómov sú príčinou Zellwegerovho syndrómu a adrenoleukodystrofie, dvoch dedičných ľudských ochorení vedúcich k poruchám funkcie mnohých orgánov a predčasnej smrti. Pochopenie detailov procesov triedenia proteínov je teda dôležité nie len preto, že rozširuje naše poznanie o tom ako živé systémy fungujú, ale aj preto že nás môže naučiť ako ľuďom s týmito poruchami pomôcť.

Abstract

Each compartment of eukaryotic cell contains a specific set of proteins required for its proper function. Most of the cellular proteins are synthesized in cytoplasm on either free ribosomes or ribosomes bound to the membrane of rough endoplasmic reticulum (ER). Proteins synthesized on free ribosomes may be posttranslationally transported to target organelle, while proteins synthesized on bound ribosomes are cotranslationally transported into the ER and to their destination are transported in vesicles derived from ER membrane. Which path will newly synthesized protein follow and to which compartment it will be delivered is governed by targeting signals present in the primary structure of the protein.

Literatúra

BOLENDER, N., SICKMANN, A., WAGNER, R., MEISINGER, C., PFANNER, N. (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep.* 9(1):42-49.
HEILAND, I., ERDMANN, R. (2005) Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* 272(10):2362-2372.
LODISH, H., BERK, A., KAISER, C.A., KRIEGER, M., SCOTT, M.P., BRETSCHER, A., PLOEGH, H., MATSUDAIRA, P. *Molecular Cell Biology*. New York, W.H. Freeman and Company, 2008, ISBN 978-071676017

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

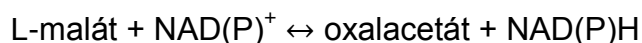
BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Malátdehydrogenázy – dôležité enzýmy metabolizmu

Michaela Koháryová, Darina Mikulášová
Marta Kollárová

Katedra biochémie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave
koharyova@fns.uniba.sk
kollarm@fns.uniba.sk

Malátdehydrogenáza (MDH, EC 1.1.1.37) katalyzuje vratnú reakciu premeny malátu na oxalacetát spojenú s redukciou koenzýmov NAD^+ (nikotínamidadenín-dinukleotid), alebo NADP^+ (nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát):



Či sa vytvára malát alebo oxalacetát závisí od fyziologických parametrov ako je napríklad redox potenciál a funkcia v tkanive. Oxalacetát má kľúčovú úlohu nielen v niektorých metabolických dráhach ako je napríklad Krebsov a glyoxylátový cyklus, glukoneogenéza, ale tiež v syntéze niektorých aminokyselín, udržiavaní oxidačno-redukčnej rovnováhy a výmeny metabolitov medzi cytoplazmou a organelami v bunke.

Distribúcia malátdehydrogenáz

Malátdehydrogenáza je všeobecne rozšírený enzým nachádzajúci sa v živej prírode. Nachádza sa v každej baktérii, kvasinke, živočíchovi a rastline. U eukaryotických organizmov je malátdehydrogenáza prítomná vo viacerých izoformách lokalizovaných v cytoplazme, mitochondriách, peroxizómoch a glyoxyzómoch. V rastlinách sa nachádza ďalšia forma MDH lokalizovaná v chloroplastoch. Fyziologický význam viacerých izoenzymových foriem MDH súvisí s ich metabolickou funkciou a ich vnútrobunkovou lokalizáciou. Rôzne izoenzy lokalizované v odlišných bunkových organelách sú kódované chromozómalnou DNA a sú syntetizované na cytoplazmatických ribozómoch. Obyčajne sú v cytoplazme syntetizované ako väčšie prekurzorové molekuly obsahujúce na N-konci polypeptidového reťazca tzv.

tranzitný peptid obsahujúci niekoľko aminokyselín. Úlohou tranzitného peptidu je sprostredkovať transport polypeptidového reťazca do príslušnej organely, pričom po vstupe je odstránený tzv. posttranslačnou modifikáciou a tak premenený na funkčný proteín (enzým).

Na základe porovnania sekvencie aminokyselín polypeptidového reťazca eukaryotických NAD⁺-malátdehydrogenáz ich možno rozdeliť veľmi zjednodušene do dvoch skupín ako „mitochondriálne“ a „cytoplazmatické“ s identitou v poradí aminokyselín v polypeptidovom reťazci približne 50 % v každej skupine, pričom homológia aminokyselinovej sekvencie medzi skupinami je okolo 20-25 %. Napriek malej podobnosti v primárnej štruktúre polypeptidového reťazca (určenej poradím aminokyselín), MDH z rôznych organel eukaryotickej bunky majú takmer identickú terciárnu (priestorovú) štruktúru a katalytické vlastnosti (Gietl, 1992).

Malátdehydrogenázy baktérií sú menej študované a vykazujú určité odlišnosti v dôležitých charakteristikách ako je napríklad molekulová hmotnosť, podjednotková štruktúra a katalytické vlastnosti, čo súvisí s ich existenciou v rôznych životných podmienkach.

Izoenzýmy malátdehydrogenáz

Štúdiom viacerých rastlinných malátdehydrogenáz bolo dokázané, že tento enzým je vysoko polymorfný. Znamená to, že v rôznych organizmoch existuje viacero molekulových foriem. Presne identifikovaný fenotyp, vysoká aktivita v rôznych orgánoch a tkanivách robí malátdehydrogenázy spoľahlivým a vhodným genetickým markerom, ktorý môže byť efektívne využitý v špeciálnej ekologickej a populačnej genetike (Yudina, 2012).

Mitochondriálna MDH: Je syntetizovaná v cytoplazme ako väčšia prekursorová molekula, ktorá je potom importovaná do matrix mitochondrií. Import do mitochondrií je sprostredkovaný proteínmi v cytoplazme, receptormi v membráne a chaperónmi v matrixe mitochondrií. Aminokyselinová sekvencia mitochondriálnych MDH z rôznych zdrojov má vysokú homológiu s bakteriálnou MDH izolovanou z *Escherichia coli* (55-60 %). Tento enzým sa v mitochondriách zúčastňuje na viacerých metabolických premenách – katalyzuje poslednú reakciu v Krebsovom cykle, zúčastňuje sa premeny aminokyseliny glycinu na serín, pôsobí v malát-aspartátovom člnku zabezpečujúcom reoxidáciu koenzýmu NADH vzniknutého v cytoplazme a v rastlinných bunkách sa zároveň zúčastňuje aj vo fotorespirácii.

Mikroteliesková MDH: Do tejto skupiny patrí **peroximálna** a **glyoxyzomálna MDH**. Peroxizómy sú organely prítomné vo všetkých eukaryotických bunkách. Sú považované za prvotnú organelu uskutočňujúcu metabolizmus kyslíka primitívnych preeukaryotických buniek, ktoré vznikli so vstupom kyslíka do atmosféry počas evolúcie. V peroxizómoch prebieha oxidácia mastných

kyselín na acetylkoenzým A, ktorý prechodom cez cytoplazmu vstupuje do mitochondrií a zúčastňuje sa na reakciách Krebsovho cyklu.

V rastlinách sú prítomné dva odlišné typy peroxizómov. Peroxizómy v listoch sa zúčastňujú fotorespirácie. Na rozdiel od nich peroxizómy nachádzajúce sa v klíčiach semenách sa zúčastňujú premeny mastných kyselín zásobných lipidov na cukry potrebné pre vývoj mladej rastliny. Táto premena je spojená so sériou reakcií glyoxylátového cyklu, a preto sa tieto peroxizómy nazývajú glyoxyzómy. Aj napriek tomu, že sú tieto MDH identické a serologicky nerozlišiteľné, mikrotelieskové MDH nachádzajúce sa v rastlinách sa rozdeľujú na **peroxizomálna** a **glyoxyzomálna MDH**. Zistilo sa, že v kukurici jeden gén kóduje mikrotelieskovú MDH, ktorá pôsobí tak v glyoxyzómoch ako aj peroxizómoch v zodpovedajúcich metabolických dráhach.

Chloroplastová MDH: Je jediná izoforma závislá na prítomnosti koenzýmu NADPH, pričom špecifitu k tomuto koenzýmu spôsobuje zámena jedinej aminokyseliny (kyseliny asparágovej za glycin v polohe 40) v polypeptidovom reťazci. V C3 rastlinách je NADP⁺-MDH esenciálnou zložkou malát-aspartátového člnku, ktorý vyrovnáva redukčné ekvivalenty medzi chloroplastom a cytoplazmou. V C4 rastlinách NADP⁺-MDH katalyzuje premenu oxalacetátu na malát v chloroplastoch mezofilných buniek, odkiaľ je transportovaný do chloroplastov cievnych zväzkov (kľúčový enzým pri fixácii oxidu uhličitého u C4 rastlín).

Výnimkou sú chloroplastové MDH závislé na prítomnosti koenzýmu NAD⁺. NAD⁺-MDH aktivita nie je typickou všeobecnou vlastnosťou chloroplastových MDH. Bola stanovená doteraz len v chloroplastoch *Mesembryanthemum crystallinum* (Winter a kol., 1982), špenáte (Ocheretina a Scheibe, 1997) a jednobunkovej zelenej riase *Chlamydomonas reinhardtii* (Willeford a Gibbs, 1989).

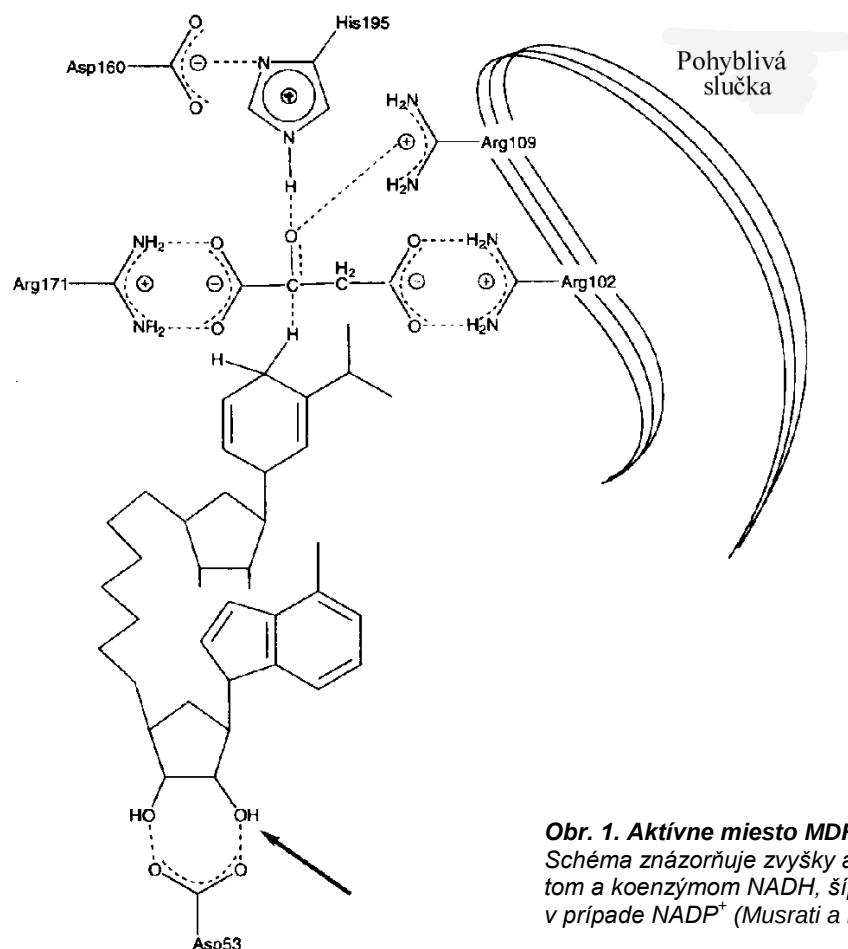
Cytoplazmatická MDH: Na rozdiel od MDH nachádzajúcich sa v organelách nie je syntetizovaná ako väčšia prekursorová molekula, čo bolo dokázané transláciou v podmienkach *in vitro*. V cytoplazme zostáva po acetylácii N-konca polypeptidového reťazca. Primárnou úlohou cytoplazmatickej MDH je účasť v rôznych systémoch potrebných pre transport substrátov a redukčných ekvivalentov medzi cytoplazmou a bunkovými organelami.

Štruktúra a katalytický mechanizmus pôsobenia malátdehydrogenázy

Malátdehydrogenázy sú multimérne enzýmy zložené z identických proteínových podjednotiek, ktoré sú obvyčajne organizované ako dimérne alebo tetramérne molekuly. Každá podjednotka je zložená približne z 330

až 350 aminokyselín. Obsahuje konzervatívnu doménu viažucu nukleotidový koenzým (NAD^+ , alebo NADP^+), ktorá sa poradím aminokyselín a štruktúrou podobá iným NAD^+ -závislým enzýmom (obr.1). Predpokladá sa,

že každá podjednotka enzýmu funguje počas katalýzy nezávisle, pretože doteraz nebola dokázaná vzájomná kooperácia medzi katalytickými miestami jednotlivých podjednotiek.



Obr. 1. Aktívne miesto MDH

Schéma znázorňuje zvyšky aktívneho miesta spolu so substrátom a koenzýmom NADH, šípka znázorňuje miesto fosfátu v prípade NADP^+ (Musrati a kol., 1998).

Predpokladaný mechanizmus spoločný pre všetky MDH spočíva vo vysokej konzervatívnosti aminokyselinovej sekvencie aktívneho miesta obsahujúceho tri arginíny (Arg), histidín (His) a aspartát (Asp), pričom každá z uvedených aminokyselín plní svoju špecifickú funkciu. Arg102 vytvára iónový pár s karboxylovou skupinou na C_4 malátu, Arg171 vytvára iónový pár s karboxylovou skupinou na C_1 malátu, Arg109 polarizuje karbonylovú skupinu, His195 umožňuje prechod protónu z OH skupiny na C_2 malátu potrebného pre redukciu NAD^+ , Asp160 stabilizuje protonizovaný histidín vytvorením iónového páru (Goward a Nicholls, 1994).

Aktívne miesto malátdehydrogenázy obsahuje dôležitý pár medzi aminokyselinami histidínu a aspartátu (tzv. His-Asp pár), v ktorom sú tieto aminokyseliny spojené vodíkovou väzbou a vytvárajú protón-prietokový systém pri ktorom histidín pôsobí ako kyselina pri redukcii oxalacetátu a ako zásada pri oxidácii malátu. V reakcii, keď histidín pôsobí ako kyselina, musí byť protonizovaný a jeho kladný náboj je stabilizovaný záporným nábojom

aspartátu. Deléciou aspartátu alebo jeho nahradením alanínom alebo asparagínom dochádza k destabilizácii komplexu MDH-NADH-malát, pričom sa zvyšuje afinita pre oxalacetát. Naopak, reverzná reakcia vyžaduje ne-protonizovaný histidín pôsobiaci ako zásada, v dôsledku čoho afinita pre malát nie je ovplyvnená nahradením aspartátu alanínom alebo asparagínom (Lemaire a kol., 1996). Histidín a aspartát sú v aktívnom mieste enzýmu blízko vedľa seba vzájomne spojené vodíkovými väzbami, ktoré pomáhajú fixovať imidazolový kruh histidínu v správnej orientácii pre naviazanie substrátu. Naviazanie substrátu do aktívneho miesta spôsobí umiestnenie His-Asp páru do prostredia zníženej polarity.

Evolúcia malátdehydrogenáz

Pre štúdium pôvodu malátdehydrogenázy sa využíva porovnanie aminokyselinových sekvencií a podobnosti štruktúr malátdehydrogenáz izolovaných z rôznych organizmov.

Goward a Nicholls (1994) zostavili fylogenetický strom malátdehydrogenáz, v ktorom podľa identity aminokyselínových sekvencií malátdehydrogenázy divergujú do dvoch hlavných fylogenetických skupín: „mitochondriálne“ a „cytoplazmatické“. Prvá skupina obsahuje mitochondriálne a peroxizomálne enzýmy spolu s eubakteriálnymi homológmi (napríklad *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*). Patrí sem tiež NADH špecifický chloroplastový enzým (Berkemeyer a kol., 1998). Do druhej skupiny patria eukaryotické cytoplazmatické NADH špecifické enzýmy a NADPH špecifické chloroplastové malátdehydrogenázy (Roger kol., 1999; Ocheretina a Scheibe, 1997).

Z evolučného hľadiska je zaujímavé, že najsilnejšie sekvenčné homológy (59% identita) sú medzi eukaryotickou mitochondriálnou (mMDH) a prokaryotickou MDH z *E. coli* (eMDH) a tiež medzi eukaryotickou cytoplazmatickou (cMDH) a prokaryotickou MDH z *Thermus flavus* (TfMDH) (50 až 55 %), zatiaľčo medzi mMDH a cMDH je len 20 % sekvenčná identita (Gleason a kol., 1994; Honka a kol., 1990). Vo všeobecnosti sa dá povedať, že v rámci jednotlivých skupín sú tieto enzýmy v úzkom vzťahu a majú až 50 % aminokyselinovú podobnosť. No medzi skupinami je táto podobnosť nižšia, okolo 20-25%. Vysvetlenie rozdielov medzi malátdehydrogenázami z organel a cytoplazmy ponúka teória, podľa ktorej gén kódujúci malátdehydrogenázu – *mdh*, mohol byť duplikovaný ešte pred inváziou prvotných eukaryotov baktériami, čo viedlo ku vzniku mitochondrie a chloroplastu eukaryotov podľa endosymbiotického pôvodu týchto organel (McAlister-Henn, 1998).

Evolučná analýza podskupiny cytoplazmatických malátdehydrogenáz z rastlín, cicavcov a baktérií ilustruje, že cytoplazmatická MDH predstavuje pôvodnú formu MDH, ktorá je konzervovaná v rastlinách, cicavcoch a baktériách (Ding a Ma, 2004).

Malátdehydrogenázy sa často uvádzajú ako dôkaz na podporu endosymbiotickej hypotézy vzniku mitochondrií a chloroplastov u eukaryotov. Pri endosymbióze každý z organizmov poskytol niečo, čo jeho partnerovi chýbalo: prokaryoty detoxikovali kyslíkovú hrozbu hostiteľovi a poskytovali užitočné bioprodukty, proto-eukaryoty poskytovali fyzickú bezpečnosť a voľný zdroj potravy pre prokaryoty. Toto symbiotické spolunažívanie mohlo byť kedykoľvek prerušené. Evolučný tlak tak mohol byť silou, ktorá vyžadovala stmelenie spolužitia a premenila baktériu na pro-mitochondriu, pro-chloroplast a neskôr na mitochondriu a chloroplast, ako ich poznáme dnes.

Abstract

The enzyme malate dehydrogenase is a good candidate for study of structure, evolution and catalysis. The enzyme has been isolated from many different sources, including *Archaea*, eubacteria, fungi, plants and mammals. In eukaryotes is loca-

lized in subcellular organelles such as mitochondria, chloroplasts, glyoxysomes and peroxisomes.

MDH is an enzyme of primary metabolism, that catalyses the interconversion of oxaloacetate and malate linked to the oxidation/reduction of dinucleotide coenzymes (NADH/NAD⁺ or NADPH/NADP⁺).

Literatúra

- BERKEMEYER, M., SCHEIBE, R., OCHERETINA, O. (1998). A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 273, 43, 27927-27933.
- DING, Y., MA, Q. H. (2004). Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat. Biochimie 86, 509-518.
- GIETL, C. (1992). Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles, Biochem. Biophys. Acta 1100, 217-234.
- GLEASON, W. B., FU, Z., BIRKTOFT, J., BANASZAK, L. (1994). Refined crystal structure of mitochondrial malate dehydrogenase from porcine heart and the consensus structure for dicarboxylic acid oxidoreductases. Biochemistry 33, 2078-2088.
- GOWARD, CH. R., NICHOLLS, D. J. (1994). Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution and catalysis, Protein Science 3, 1883-1888.
- LEAUMAIRE, M., MIGINIAC-MASLOW, M., DECOTTIGNIES, P. (1996). The catalytic site of chloroplastic NADP-dependent malate dehydrogenase contains His/Asp pair, Eur. J. Biochem. 236, 947-952.
- MCALISTER-HENN, L., BLABER, M., BRADSHAW, R. A., NISCO, S. J. (1988). Evolutionary relationships among the malate dehydrogenases. Trends Biochem. Sci 13, 178-181.
- MUSRATI, R. A., KOLLÁROVÁ, M., MERNIK, N., MIKULÁŠOVÁ, D. (1998). Malate Dehydrogenase: Function and Properties, Gen. Physiol. Biophys. 17, 193-210.
- OCHERETINA, O., SCHEIBE, R. (1997). Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding plant cytosolic malate dehydrogenase, Gene 199, 145-148.
- ROGER, A. J., MORRISON, H. G., SOGIN, M. L. (1999). Primary structure and phylogenetic relationship of malate dehydrogenase gene from *Giardia lamblia*. J. Mol. Evol. 48, 750-755.
- YUDINA, R. S. (2012). Malate dehydrogenase in plants: Its genetics, structure, localization and use as a marker. Advances in Bioscience and Biotechnology 3, 370-377.
- WILLEFORD, K. O., GIBBS, M. (1989). Localisation of the enzymes involved in the photoevolution of H₂ from acetate in *Chlamydomonas reinhardtii*, Plant Physiol. 90, 788-791.
- WINTER, K., FOSTER, J. G., EDWARDS, G. E., HOLTUM, J. A. M. (1982). Intracellular localisation of enzymes of carbon metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* exhibiting C₃ photosynthetic characteristics or performing Crassulacean acid metabolism, Plant Physiol. 69, 300-307.

Biologické membrány vo vzťahu k citlivosti eukaryotických buniek voči liečivám

Eduard Goffa, Yveta Gbelská

Katedra mikrobiológie a virológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

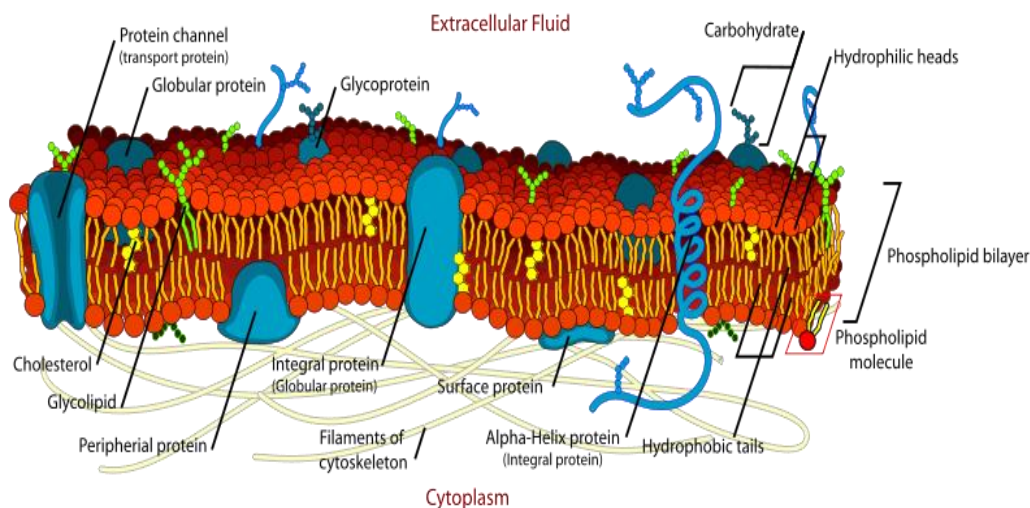
Biologické membrány (biomembrány) sú pre život esenciálne, plošne organizované štruktúry o hrúbke 4 až 13 nm. Napriek tomu, že v prírode existujú rôzne typy membrán, líšiace sa v štruktúre a funkciách, biologické membrány majú mnoho spoločných vlastností. Najdôkladnejšie preštudovanou biologickou membránou je cytoplazmatická membrána, ktorá tvorí fázové rozhranie medzi bunkou a vonkajším prostredím. Funguje ako ochranná bariéra, ktorá selektívne prepúšťa z prostredia do bunky niektoré látky a súčasne dovoľuje vylučovať z buniek do prostredia rôzne produkty metabolizmu a iné zlúčeniny. Cytoplazmatická membrána má teda rozhodujúcu funkciu pri výmene látok medzi bunkou a vonkajším prostredím a zároveň zabezpečuje konštantné vnútorné prostredie bunky. Eukaryotické bunky obsahujú okrem cytoplazmatickej membrány tiež rôzne typy vnútorných membrán, ktoré obaľujú a členia subcelulárne organelly na oddelené kompartmenty, ktoré tvoria samostatné funkčné jednotky.

Z hľadiska transportu možno biomembrány charakterizovať ako bariéry obmedzujúce voľnú difúziu látok medzi bunkou a prostredím. Nejde však o nepriepustné štruktúry, ale o vysoko selektívne permeabilné bariéry, regulujúce molekulové a iónové zloženie vnútorného

prostredia bunky. Membrány zohrávajú kľúčovú úlohu aj v komunikačných procesoch. Obsahujú špecifické receptory zachytávajúce vonkajšie stimuly a regulujú informačný tok medzi bunkou a vonkajším prostredím. Niektoré biomembrány majú ďalšie špecifické funkcie, prenášajú napr. elektrochemické impulzy pozdĺž nervových a svalových vlákien, uskutočňujú procesy konverzie energie pri fotosyntéze a bunkovom dýchaní.

Zloženie biologických membrán

Z chemického hľadiska sú biomembrány tvorené z molekúl lipidov, bielkovín a sacharidov, ktoré vo vzájomnom organizovanom usporiadaní udržiavajú nekovalentné interakcie. Už v r. 1925 E. Gorter a F. Grendl považovali za základný stavebný prvok membrány lipidovú dvojvrstvu, tvorenú molekulami polárnych lipidov usporiadaných tak, že v oboch monomolekulových vrstvách sú dlhé osi molekúl usporiadané kolmo na rovinu dvojvrstvy. Polárne časti molekúl každej monovrstvy sú orientované na vonkajšiu stranu membrány a sú v kontakte s vodným prostredím. Nepolárne časti lipidových molekúl smerujú do vnútra dvojvrstvy a vytvárajú hydrofóbnú zónu membrány (obr. 1).



Obr. 1. Štruktúrna organizácia biologických membrán
(prevzaté z cellbiology.med.unsw.edu.au/units/images/Cell/)

Lipidová dvojvrstva ideálne spĺňa požiadavky rozhodujúce pre funkciu membrány: je nepriepustná pre ióny a väčšinu polárnych molekúl, je schopná udržať si odpovedajúcu viskozitu, umožňuje zabudovanie membránových bielkovín, samovoľne opravuje prípadné poškodenie a umožňuje splynutie membrán, pri vzájomnom kontakte dvoch buniek (Vodrážka, 2007).

Hlavnou stavebnou zložkou biologických membrán sú teda lipidy, a to predovšetkým fosfolipidy, sfingolipidy, glykolipidy a steroly. Sformovaním uvedených lipidov do dvojvrstvy sa vytvára rozhranie medzi vnútorným prostredím bunky a vonkajším prostredím. Lipidové zloženie bunkových membrán priamo ovplyvňuje ich fluiditu a teda aj intenzitu difúzie rôznych látok do bunky. S lipidovou dvojvrstvou sú asociované proteíny, ktoré podľa lokalizácie v membráne označujeme ako periférne, vnorené do membrány alebo transmembránové. Jednou z funkcií transmembránových proteínov, je zabezpečiť výmenu lipidov medzi vonkajšou a vnútornou vrstvou membrány, čím tieto proteíny regulujú vlastnosti membrány podľa aktuálnych potrieb bunky. Ďalšou dôležitou funkciou membránových transportných proteínov je aktívne vylučovanie (eflux) cudzorodých a toxických látok von z bunky. Optimálny pomer rôznych druhov lipidov v membráne má vplyv aj na nevyhnutnú stabilitu

a funkčnosť proteínov membrány. Hoci sa membránové lipidy pôvodne považovali iba za štruktúrne jednotky membrán, dnes je jasné, že sa aktívne podieľajú na mnohých fyziologických procesoch v bunke.

Vplyv lipidového zloženia bunkových membrán na citlivosť eukaryotických buniek voči liečivám

Správny pomer rôznych druhov lipidov v membráne je rozhodujúci aj pre stabilitu a funkciu efluxných púmp – transportných proteínov, ktoré zohrávajú významnú úlohu v ochrane bunky pred pôsobením rôznych cytotoxicky pôsobiacich látok.

Narastajúci výskyt rezistencie proti antimikrobiálnym látkam u patogénnych mikroorganizmov je vážnym problémom v liečbe rôznych infekcií. V laboratórnych podmienkach, ale aj v klinickej praxi sa čoraz častejšie izolujú mutantné kmene mikroskopických patogénnych húb (kvasiniek), ktoré vykazujú rezistenciu voči rozsiahlemu spektru dostupných antimykotík, ktoré sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1. Antifungálne liečivá interferujúce s funkciou cytoplazmatickej membrány

skupina	názov	mechanizmus účinku
polyény	amfotericín B, nystatín, pimarcín	tvorba pórov v bunkových membránach
azoly	flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, bifonazol, vorikonazol	inhibícia biosyntézy ergosterolu
allylamíny	terbinafín	inhibícia biosyntézy ergosterolu
morfolíny	amorolfín, fenpropimorf	inhibícia biosyntézy ergosterolu

Pozorované široké spektrum rezistencie patogénnych mikroorganizmov voči liečivám, označované termínom mnohonásobná rezistencia voči liečivám (MDR- *multi-drug resistance*) sa vyskytuje u všetkých živých organizmov od baktérií po človeka (Ling, 1997). K pochopeniu molekulárnej podstaty fenoménu mnohonásobnej rezistencie prispeli intenzívne štúdie s využitím nepatogénnej kvasinky *S. cerevisiae*, u ktorej bol MDR fenotyp pôvodne označený ako pleiotropná rezistencia voči liečivám (PDR- *pleiotropic drug resistance*). Gény, podieľajúce sa na rozvoji tohto fenotypu sa nachádzajú v takzvaných PDR lokusoch (Balzi a Goffeau, 1995). Súbor PDR génov predstavuje jeden z mnohých mechanizmov, ktoré využíva bunka kvasiniek pre zabezpečenie svojej rezistencie voči xenobiotikám. PDR gény kódujú proteíny membránových efluxných púmp, ktoré sa

priamo podieľajú na vylučovaní toxických látok von z bunky. Medzi PDR génmi sa nachádzajú aj gény zodpovedné za biosyntézu niektorých membránových lipidov, čo naznačuje, že ako odpoveď na chemický stres vyvolaný prítomnosťou liečiv bunka reaguje nielen expresiou génov pre membránové pumpy, ale aj génov, ktoré sa podieľajú na zabezpečení správneho lipidového zloženia bunkovej membrány ovplyvňujúceho stabilitu a správnu funkciu membránových efluxných púmp.

Záver

Molekulárne mechanizmy, ktoré vedú k rozvoju rezistencie patogénnych mikroorganizmov voči dostupným liečivám sú rôzne, avšak jeden z najvýznamnejších faktorov zabezpečujúci odolnosť mikroorganizmov voči

širokému spektru liečiv je zloženie lipidov a proteínov bunkovej membrány. Výskum funkcie bunkových membrán je v súčasnosti oprávnené v centre pozornosti mnohých výskumných laboratórií.

Abstract

Biological membranes are specific structures consisting of lipid bilayer acting as selective barrier in a living cell. Its major role is connected with the intake of nutrients as well as releasing waste compounds using specific vesicles or the activity of membrane proteins. The same mechanisms employ microorganisms in the fight against some antimicrobial agents and

also cancer cells escaping chemotherapy. The elucidation of molecular function of biological membranes is still one of the main focus of today's scientific research.

Literatúra

- BALZI, E., GOFFEAU, A. (1995) Multidrug resistance: the PDR network. *J Bioenerg Biomembr.* 27(1):71-76.
LING, V. (1997) Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol.* 40:3-8.
VODRÁŽKA, Z. (2007) Biochemie. *Academia*. ISBN: 8020006001.
cellbiology.med.unsw.edu.au/units/images/Cell

ZAÚJIMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Biotechnologický potenciál mliečnych kvasiniek *Kluyveromyces lactis*

Zuzana Balážfyová, Yvetta Gbelská

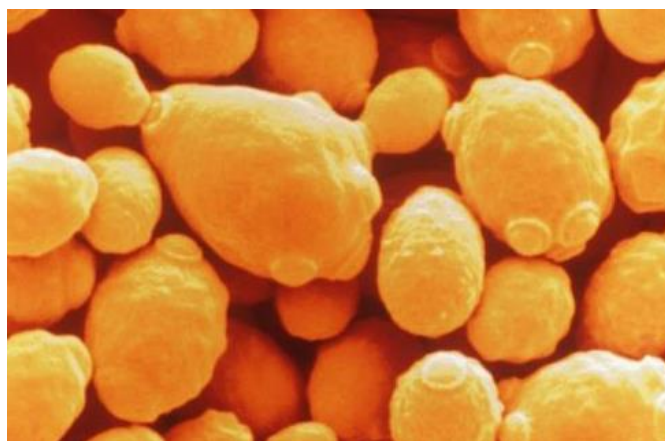
Katedra mikrobiológie a virológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave

Napriek tomu, že patríme medzi cicavce a mlieko resp. mliečne výrobky, sú základom našej prvej výživy, neustále narastá počet jedincov, ktorí trpia laktózovou intoleranciou, teda neschopnosťou rozkladať hlavný mliečny sacharid, laktózu. Pre mikroorganizmy je neschopnosť využiť laktózu prirodzený stav, pretože väčšina druhov mikroorganizmov nemá enzým, nevyhnutný pre rozštiepenie disacharidu laktózy na monosacharidové zložky glukózu a galaktózu. Výnimkou sú, okrem baktérií mliečneho kvasenia a enterobaktérií, aj mliečne kvasinky *Kluyveromyces lactis*, ktoré disponujú schopnosťou metabolizovať laktózu. Kvasinky *K. lactis* sú najčastejšie izolované z mlieka a tvoria podstatnú zložku eukaryotickej mikroflóry pri výrobe syrov, ktorá znižuje pH srvátky a tým napomáhajú činnosti baktérií mliečného kvasenia (Rodicio a Heinisch, 2013).

Kvasinky *K. lactis*, pomenované podľa holandského mikrobiológa Alberta Jana Kluyvera (1888 – 1956), sú jednobunkové eukaryotické organizmy guľovitého až oválneho tvaru (obr. 1). Veľmi často sa označujú ako menšia verzia pekárskych kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Patria medzi pučiace kvasinky a sú schopné vytvárať rudimentárne mycélium. Asky obsahujúce 1 až 4 spóry guľovitého tvaru, vznikajú z vegetatívnych diploidných buniek, veľmi ľahko pukajú, čím dochádza k uvoľňovaniu spór, ktoré aglutinujú do zhlukov (Kocková-Kratochvílová, 1990).

Ako zdroj uhlíka využívajú laktózu a ich životný cyklus je podobný kvasinkám *S. cerevisiae*. Bunky sa väčšinou nachádzajú v haploidnej fáze, diploidná fáza je len pre-

chodná. Kultúry diploidných buniek majú tendenciu spontánne sporulovať a počas hladovania sú schopné produkovať tetrády (štvorice buniek v spoločnom vrecu) (Herman a Roman, 1966).



Obr. 1. *Kluyveromyces lactis*

(<http://galloimages.co.za/image/kluyveromyces-lactis-budding-yeast-cells-produce/81782199/2>)

Kvasinky *K. lactis* patria k aeróbnym druhom a hoci sú evolučne blízko príbuzné kvasinkám *S. cerevisiae*, niektoré vlastnosti majú odlišné. Kým u *S. cerevisiae* prevláda fermentačný typ metabolizmu, u *K. lactis* sa usku- točujú obidve metabolické dráhy – fermentácia a respi- rácia súčasne (Breunig et al., 2000). Špecifickým zna- kom kvasiniek *K. lactis* je schopnosť využívať laktózu

ako jediný zdroj uhlíka. Keďže táto schopnosť je u kvasiniek zriedkavá, štúdiu metabolizmu laktózy *K. lactis* sa venovala veľká pozornosť. Laktóza do buniek kvasiniek vstupuje prostredníctvom laktózo-permeázy - transportného proteínu lokalizovaného v cytoplazmatickej membráne, a následne je vo vnútri bunky hydrolyzovaná prostredníctvom enzýmu β -galaktozidázy na glukózu agalaktózu (Riley *et al.*, 1987a). Degradácia laktózy kvasinkami *K. lactis* alebo purifikovanými enzýmami našla uplatnenie v rôznych odvetviach priemyslu.

Genetický systém kvasiniek *K. lactis* pozostáva z chromozomálnej, mitochondriálnej a plazmidovej DNA. Haploidný genóm *K. lactis* je tvorený lineárnou dvojvláknovou molekulou DNA s celkovou veľkosťou 12,2 Mbp a tvorí ho šesť chromozómov, ktoré sú označené A až F (Steensma *et al.*, 1988; Sor a Fukuhara, 1989). Kvasinky *K. lactis* na rozdiel od kvasiniek *S. cerevisiae* neprešli celogenómovou duplikáciou (WGD, whole genome duplication), čo naznačuje, že väčšina génov, ktorých produkty sú zapojené do rôznych metabolických a signálnych dráh, je prítomná iba v jednej kópii (Rodicio a Heinisch, 2013).

Mitochondriálna DNA kvasinky *K. lactis* je tvorená cirkulárnou molekulou dvojvláknovej DNA o veľkosti 40,2 kbp a predstavuje asi 10 % celkového bunkového obsahu DNA (Zivanovic *et al.*, 2005). mtDNA *K. lactis* obsahuje gény, ktoré kódujú 3 podjednotky cytochróm-c-oxidázy (COX1, COX2, COX3), 3 podjednotky mitochondriálnej ATP syntetázy (ATP6, ATP8, ATP9), apocytochróm b (CYTB), ribozomálny proteín (VAR1), gény pre 15S a 21S rRNA, ako aj pre 22 tRNA (Skelly *et al.*, 1991; Breunig a Steensma, 2003).

Plazmidy predstavujú extrachromozomálne genetické elementy, ktoré sú schopné samostatnej reprodukcie a kódujú také vlastnosti bunky, ktoré nie sú pre bunku esenciálne, ale udeľujú jej určité výhody. Plazmidy kvasiniek *K. lactis* sú tvorené dvojreťazcovou kruhovou DNA (v jadre) a lineárnou molekulou DNA (v cytoplazme). Lineárne DNA plazmidy pGKI1 a pGKI2 sú v bunke vždy prítomné spoločne a udeľujú jej smrťaci, tzv. „killer fenotyp“. Kmene nesúce killer plazmidy sú schopné usmrťovať citlivé kmene iných druhov kvasiniek, pro-

stredníctvom vylučovaného toxínu zymocínu (Gunge *et al.*, 1981).

Kvasinky *K. lactis* sú prítomné v rôznych mliečnych produktoch, všeobecne sú považované za nepatogénne, „zdravotne nezávadné“ so statusom GRAS (generally regarded as safe) a vyznačujú sa vlastnosťami, ktoré ich predurčujú na priemyselné využitie – majú krátku generačnú dobu, v pomerne krátkom čase produkujú veľké množstvo biomasy, využívajú lacné substráty, ktoré sú najčastejšie priemyselnými odpadmi, majú nízky obsah proteáz a vhodné sekrečné vlastnosti (Wésolowski – Luovel *et al.*, 1996; Breunig a Steensma, 2003).

Kvasinky *K. lactis* sa využívajú v mliekárenskom priemysle, pri výrobe syrov, tvoria súčasť kefírových zŕn, teda konglomerátov baktérií a kvasiniek využívaných pri výrobe kefírov. Využívajú sa na produkciu mnohých enzýmov ako napr. chymozínu, β -galaktozidázy, ktorá im umožňuje využívať laktózu so srvátky ako odpadu z mliekárenského priemyslu (Bonekamp a Oosterom, 1994). Ako nepatogénny a netoxický organizmus sa kvasinky *K. lactis* používajú ako hostiteľské organizmy na prípravu rôznych heterologických proteínov, ktoré sú využívané ako farmaceutické prípravky alebo potravinárske aditíva (ľudský sérový albumín, interleukín 1- β , bakteriálne a fungálne β -laktamázy a xylanázy, myšia α -amyláza, obalový glykoproteín E2 vírusu hepatitídy C) (Fleer *et al.*, 1991; Saliola *et al.*, 1999; Durand *et al.*, 1999; Breunig a Steensma, 2003).

Kvasinky *K. lactis* teda predstavujú vhodný mikroorganizmus nielen v základnom výskume, ale majú aj komerčné využitie. Za účelom dosiahnutia vysokého stupňa produkcie heterologických proteínov vysokej molekulovej hmotnosti, uprednostňujú priemyselné firmy eukaryotické mikroorganizmy – kvasinky namiesto baktérií. Hoci sa pôvodne predpokladalo využiť kvasinku *S. cerevisiae*, evolučne príbuzné kvasinky *K. lactis* sa stali jednou z vhodných alternatív pre dosiahnutie vysokej koncentrácie sekretovaných proteínov. A práve lineárna plazmidová DNA, ktorá sa nachádza v cytoplazme *K. lactis*, je jedinečným systémom pre expresiu rôznych heterologických proteínov (tab. 1.).

Tab. 1. Príklady heterologických proteínov produkovaných využitím *S. cerevisiae* a *K. lactis*
(prevzaté z K. Wolf (ed), 1996)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ľudský rastový hormón – uvoľňujúci faktor (GRF)
	Ľudský apolipoproteín (apoE)
	Ľudský interleukín 6
	Ľudský interleukín 1- β
	Ľudský parathormón
	Ľudský sérový albumín
	Myšia amyláza
	Tetanus toxín C
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ľudský interleukín 1- β
	Ľudský sérový albumín
	Povrchový antigén vírusu hepatitídy B (HBsAg)
	Hovädzí prochymozín

Najznámejší enzým produkovaný kvasinkami *K. lactis* je β -galaktozidáza (β -D-galaktozid-galaktohydroláza), proteín s vysokou molekulovou hmotnosťou komerčného významu, často označovaná ako laktáza. Tento enzým, zodpovedný za hydrolýzu laktózy na glukózu a galaktózu, má významné využitie pri odbúravaní laktózy z mlieka, vzhľadom na rastúci počet konzumentov s intoleranciou na laktózu. β -galaktozidáza ma význam aj v potravinárskom priemysle, pri výrobe syrov, jogurtov, zmrzlín, zabraňuje kryštalizácii laktózy a zvyšuje silu sladidla v mliečnych výrobkoch. Transglykozylačnú aktivitu β -galaktozidázy možno využiť pri produkcii galaktooligosacharidov (GOS) ako prebiotických zložiek, ktoré znižujú hladinu cholesterolu v krvi a slúžia ako prevencia pred rakovinou hrubého čreva (Rodicio a Heinisch, 2013)

Ďalšie významné využitie kvasiniek *K. lactis* predstavuje bioremediácia. Nepretržite stúpajúca celosvetová výroba mliečnych produktov vedie k produkcii obrovského množstva tekutého produktu, srvátky, ako vedľajšieho produktu pri výrobe syrov, tvarohu a kazeínu. Nedostatok primeraných metód pre elimináciu srvátky, núti priemysel k jej vypúšťaniu do odpadových vôd, čo predstavuje trvalé nebezpečenstvo v oblasti environmentálneho znečistenia. Ekonomický spôsob, ktorý by srvátku eliminoval, je jej premena na komerčne cenné produkty. Vysoko hodnotné produkty sa môžu zo srvátky získať jej fermentáciou za pomoci mikroorganizmov asimilujúcich laktózu. A práve laktózu – metabolizujúce kvasinky rodu *Kluyveromyces* sú intenzívne využívané na premenu srvátky na hodnotné produkty využiteľné vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle. Oxidatívny metabolizmus týchto kvasiniek umožňuje rýchlu produkciu biomasy a sprievodných produktov. Bunková masa je výborným doplnkom výživy pre ľudí a živočíchy, pretože predstavuje významný zdroj ribonukleotidov, oligosacharidov a bunkového proteínu (SCP). Uvedené produkty majú význam ako imunostimulátory, zahusťovače, stabilizátory, prebiotiká a majú význam aj pri zlepšovaní senzorických vlastností rôznych potravinárskych produktov (Ghaly a Kamal, 2004).

Utilizácia srvátky bola účinne spojená so syntézou aktívneho ľudského lyzozýmu. Rovnako úspešná bola tiež produkcia rekombinantnej glukoamylázy, ľudského interferónu, ľudského interleukínu 1- β , ľudského sérového albumínu a povrchového antigénu hepatitídy B (Cai et al., 2005).

Abstract

Yeast belong to intensively studied microorganism and attract increasing attention both in basic research and biotechnological applications. The effective use of yeast in biotechnology depends on our knowledge of the physiology as well as the existence of techniques for their genetic manipulation. The presented work describes the basic metabolic properties of the yeast species *Kluyveromyces lactis* as well as the proper-

ties needed for its biotechnological use. The yeast belonging to the genus *Kluyveromyces* are non-pathogenic, their GRAS status and eukaryotic organisation of cells are the main reasons for their industrial applications as a host strains for high-level production of heterologous proteins of commercial importance.

Literatúra

- BONEKAMP, F. J., OOSTEROM, J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* – a review. 1994. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 1-3.
- BREUNIG, K. D., BOLOTIN-FUKUHARA, M., BIANCHI, M., BOURGAREL, D., FALCONA, C., FERRERO, I., FRONTALI, L., GOFFRINI, P., KRIJGER, J. J., MAZZONI, C., MILKOWSKI, I., STEENSMA, H. Y., WESOŁOWSKI-LOUVEL, M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. 2000. Enzyme Microbiol. Technol. 26, 771-778.
- BREUNIG, K. D., STEENSMA, H. Y. *Kluyveromyces lactis*: genetics, physiology, and application. 2003. In: Functional Genetics of Industrial Yeasts (ed. de Winder JH). Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 171-205.
- CAI, X. P., ZHANG, J., YUAN, H. Y., FANG, Z. A., LI, Y. Y. Secretory expression of heterologous protein in *Kluyveromyces cicerisporus*. 2005. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67, 364-369.
- DURAND, R., RASCALE, C., FEVRE, M. Expression of a catalytic domain of a *Neocalimastix frontalis* endoxylanase gene (*XYN3*) in *Kluyveromyces lactis* and *Penicillium roqueforti*. 1999. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 208-214.
- FLEER, R., CHEN, X. J., AMELLAL, N., YEH, P., FOURNIER, A., GUINET, F., GAULT, N., FAUCHER, D., FOLLARD, F., FUKUHARA, H., MAYAUX, J. F. High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin 1- β in *Kluyveromyces lactis*. 1991. Gene 107, 285-295.
- GHALLY, A. E., KAMAL, M. A. Submerged fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. 2004. Water Res. 38: 631-644.
- GUNGE, N., TAMARU, A., OZAWA, F., SAKAGUCHI, K. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. 1981. J. Bacteriol. 151: 462-464.
- HERMAN, H., ROMAN, A. Allele specific determinants of homothalium in *Saccharomyces lactis*. 1966. Genetics. 53: 727-740.
- KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. 1990. ALFA, Bratislava.
- RILEY, M. I., HOPPER, J. E., JOHNSTON, S. A., DICKSON, R. C. *GAL4* of *Saccharomyces cerevisiae* activates the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis* and creates a new phenotype: glucose repression of the regulon. 1987. Mol. Cell. Biol. 7: 780-786.
- RODICIO, R., HEINISCH, J. J. Yeast in the milky way: Genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. 2013. Yeast (Epub. ahead of print).
- SALIOLA, M., MAZZONI, C., SOLIMANDO, N., CRISAM, A., FALCONE, C., JUNGM, G., FLEER, R. Use of the *KIADH4* promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65: 53-60.
- SKELLY, J. P., HARDY, C. M., CLARK-WALKER, G. D. A mobile group II intron of a naturally occurring rearranged mitochondrial genome in *Kluyveromyces lactis*. 1991. Curr. Genet. 20: 115-120.
- SOR, F., FUKUHARA, H. (1989) Analysis of chromosome patterns of the genus *Kluyveromyces*. Yeast. 5: 1-10.
- STEENSMA, H. Y., de JONGH, F. C. M., LINNEKAMP, M. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of

yeasts *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. 1988. Curr. Genet. 14: 311-317.

WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M., BREUNIG, K. D., FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis*, in K. Wolf (ed.): 1996. Nonconventional Yeast in Biotechnology. 139-188.

Wolf, K. (ed) Nonconventional Yeasts in Biotechnology. 1996. Springer-Verlag, Berlin, 141-201.

ZIVANOVIC, Y., WINCKER, P., VACHERIE, B., BOLOTIN-FUKUHARA, M., FUKUHARA, H. Complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA from *Kluyveromyces lactis*. 2005. FEMS Yeast Res. 5: 315-322.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Kvasinky ako modelový organizmus pre štúdium starnutia

Eva Drozdíková, Margita Obernauerová

Katedra mikrobiológie a virológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave

Akým spôsobom a prečo vlastne starneme fascinovalo ľudí už od nepamäti. Okrem vlastného filozofického a biologického záujmu, určenie molekulárnych a bunkových mechanizmov základných procesov starnutia je dôležité z hľadiska pochopenia vzniku a priebehu ochorení súvisiacich s vekom, ktoré v konečnom dôsledku obmedzujú dĺžku ľudského života.

Myšlienka, že práve kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* by mohli slúžiť ako model pre štúdium ľudského starnutia sa spočiatku stretla so značnými pochybnosťami. Hoci kvasinky boli využívané ako model pre štúdium mnohých základných bunkových procesov v ľudskom organizme, nepredpokladalo sa, že by mohli pomôcť objasniť taký komplexný a zložitý dej ako je starnutie u ľudí. Štúdie, ktoré začali na rôznych modelových organizmoch, od najjednoduchších ako sú už spomínané kvasinky, cez hlístovce až po mušky octomilky a myši, pomohli odhaliť mnohé mechanizmy a dráhy spôsobujúce starnutie, ktoré sú prekvapivo veľmi podobné pre veľké množstvo aj pomerne fylogeneticky (vývojovo) vzdialených druhov organizmov. Tieto mechanizmy boli nájdené aj u vyšších eukaryotov, vrátane človeka. Na základe týchto zistení existuje predpoklad, že môžu mať vplyv aj na niektoré neurodegeneratívne ochorenia (spôsobujúce rozpad nervového systému) súvisiace s vekom.

Starnutie je proces úpadku organizmu, charakterizovaný postupným úpadkom bunkových komponentov a organel. Ide o nahromadenie poškodení bunkových súčastí, ktoré bunka už nie je schopná opraviť. Pre štúdium dlhovekosti, či už u kvasiniek alebo u ľudí, je veľmi dôležité stanoviť jasný rozdiel medzi javmi, ktoré sú zapríčinené starnutím a tými, ktoré sú spôsobené chorobnými zmenami. Schopnosť rozlišovať medzi týmito fenoménmi, pričom každý z nich skracuje dĺžku života, je mimoriadne dôležitá. Starnutie je teda úpadok, ktorý nastáva u väčšiny populácie, pričom zmeny zapríčinené ochorením nastávajú u menšiny. Vekom pribúdajúce zmeny v štruktúre najmä jadrového chromatinu, môžu

spôsobiť starnutie bunky, prípadne celého organizmu. Jedným z dôsledkov akumulácie (hromadenia) poškodení DNA sú poruchy v génovej expresii súvisiace s vekom, čo vedie k strate bunkovej rovnováhy.

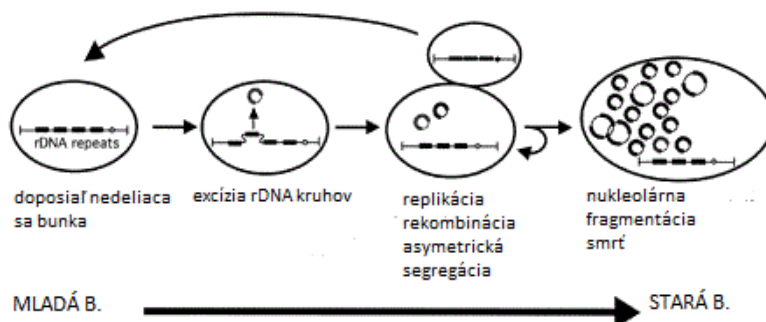
Kvasinka *S. cerevisiae* je jedným z najvýznamnejších modelových organizmov spojených so štúdiom starnutia. Relatívna rýchlosť a nenáročnosť, s ktorou môže byť ich dlhovekosť vyhodnocovaná, dovoľuje rýchle napredovanie vo vymedzovaní molekulárnych mechanizmov spôsobujúcich starnutie a tiež faktorov, ktoré proces starnutia ovplyvňujú. Kvasinky sa ukázali byť cenným modelom pre pochopenie základných bunkových procesov i u ľudí. Napriek tomu, že ide o veľmi jednoduchý jednobunkový organizmus, môže poskytnúť informácie o ľudskom starnutí, ktoré je jedným z najzložitejších a najkomplexnejších biologických javov. Aj keď príčiny starnutia sú pravdepodobne rozmanité, získané informácie naznačujú, že deje vplyvajúce na dlhovekosť sú prekvapivo podobné.

Starnutie v kvasinkách je sledované z dvoch rozličných pohľadov. V prvom prípade sa jedná o tzv. chronologické starnutie, kedy sa sleduje čas od vzniku bunky, ktorá sa ďalej nedelí až po jej smrť. V takomto prípade dochádza k hromadeniu poškodení spôsobených prebiehajúcimi bunkovými procesmi alebo vplyvom vonkajšieho prostredia. Keď poškodenia dosiahnu určitú kritickú hranicu, ktorá je už pre bunku neúnosná, bunka odumiera. V druhom prípade hovoríme o tzv. replikatívnom starnutí, pri ktorom sa sleduje počet dcérskych buniek, ktoré vzniknú delením pôvodnej (materskej) bunky.

Počas chronologického starnutia dochádza v bunke predovšetkým k zvýšeniu nestability DNA v jadre. Príčinou môžu byť tzv. reaktívne formy kyslíka (peroxydy, superoxydy, kyslíkové radikály), ktoré vznikajú počas bunkového dýchania v mitochondriách. Za normálnych podmienok sú odbúravane za pomoci špeciálnych enzýmov, ktorých produkcia a účinnosť však v dôsledku narastajúceho poškodenia DNA klesá.

Pri replikatívnom starnutí sa na starnúcej bunke objavujú charakteristické znaky. Keď sa dcérska bunka oddeľuje od materskej, spojenie medzi oboma bunkami sa zúži a zanecháva na povrchu materskej bunky okrúhly chitinózny útvar nazývaný zárodočná jazva. Takéto jazvy zostávajú natrvalo prítomné na povrchu materskej bunky. Ako bunka podstupuje jednotlivé bunkové cykly, jazvy na jej povrchu sa hromadia a tak môžu slúžiť ako vhodný marker (znak) pre stanovenie počtu uskutočnených bunkových. Ďalším znakom je strata asymetrie. Počas starnutia bunka zväčšuje svoj objem aj napriek tomu, že po väčšinu svojho života produkuje malé dcérske bunky. Avšak, veľmi staré bunky majú sklon produkovať veľké a krátko žijúce dcérske bunky. Novovznikajúca bunka sa od pôvodnej často oddelí, až keď dosiah-

ne približne rovnakú veľkosť. Po niekoľkých pučaniach sa dá materská bunka ľahko rozlíšiť od mladých buniek vďaka svojmu zväčšenému objemu. Napokon sa stáva sterilnou – nie je schopná sa ďalej deliť. Starnutie u *S. cerevisiae* je zapríčinené mnohými faktormi a jedným z najvýznamnejších a najpravdepodobnejších je produkcia a akumulácia tzv. extrachromozomálnych rDNA kruhov (obr. 1). Tie vznikajú pri delení bunky samovoľne rDNA (úsek DNA, ktorý kóduje ribozomálnu DNA). Po každom bunkovom cykle sa ich v jadierku nahromadí väčšie množstvo, až napokon bunka nie je schopná energeticky zvládnuť proces delenia a viac už neprodukuje dcérske bunky. Zaujímavé je, že tieto rDNA kruhy zostávajú v materskej bunke a neprenášajú sa na novovzniknutú dcérsku bunku.



Obr. 1. Nestabilita rDNA ako príčina replikatívneho starnutia u *S. cerevisiae*

Hlavným mechanizmom, pomocou ktorého kvasinková bunka potláča tvorbu rDNA kruhov je zbalenie DNA a histónov do „silent“ heterochromatínu. Heterochromatín je definovaný ako úsek DNA, ktorý zostáva počas bunkového cyklu vysoko kondenzovaný a nie je prepisovaný počas replikácie DNA. Históny sú malé bázičné proteíny, prítomné v jadre všetkých eukaryotických buniek. Rozlišujeme päť základných typov histónov avšak ich štruktúra je takmer rovnaká. Históny H3 a H4 sú bohaté na kladne nabitú bázičnú aminokyselinu a tieto interagujú so záporne nabitými fosfátovými skupinami DNA. Slúžia na zbalenie DNA do kompaktnejšej formy. Niekoľko odlišných histónov vytvára akýsi „súdok“, okolo ktorého sa DNA dokáže obtočiť približne 2x. Takáto štruktúra sa nazýva nukleozóm a je základnou štruktúrnou jednotou eukaryotického chromatinu. Po celej dĺžke molekuly DNA sa nachádza veľké množstvo nukleozómov v tesných vzdialenostiach medzi sebou. Úspora dĺžky DNA je približne 6-násobná. Acetylácia a deacetylácia histónov patria medzi hlavné modifikácie (úpravy) histónov, pomocou ktorých je regulovaná transkripcia a „silencing“ (utišovanie) určitých úsekov molekuly DNA. Zistilo sa, že určité enzýmy dokážu ovplyvňovať štruktúru DNA. V kontexte starnutia sú najvýznamnejšie tzv. sirtuíny. Sú to enzýmy, ktoré dokážu deacetylovať históny, menia štruktúru chromatinu a tým dokážu zabrániť transkripcii niektorých úsekov DNA. Prítomnosť sirtuínov bola dokázaná vo všetkých živých organizmoch.

Aktivitou sirtuínov môže dôjsť k zastaveniu tvorby rDNA kruhov, čo v konečnom dôsledku vedie k predĺženiu replikatívnej dĺžky života. Rovnako môžu sirtuíny pôsobiť aj v mieste telomér. Teloméry sú koncové časti lineárnych chromozómov a predstavujú akúsi ochranu, ktorá nedovoľuje spájať chromozómy navzájom koncovými časťami. Pri každom delení bunky sa teloméry o niečo skrátiť. Napokon sa skrátiť do takej miery, že už nedokážu plniť svoju ochrannú funkciu. To má za následok nestabilitu koncových častí chromozómov a prípadne aj smrť bunky. Sirtuíny svojou aktivitou dokážu „utišovať“ niektoré miesta na telomérach, čo spomaľuje ich skracovanie a predlžuje dĺžku života bunky.

Zaujímavý je aj fenomén tzv. kalorickej reštrikcie (znížený príjem živín). U mnohých organizmov sa ako odpoveď na nepriaznivé environmentálne podmienky, ako sú stres alebo nedostatok živín, vyvinuli špecifické obranné mechanizmy. Tie zahŕňajú napríklad zmeny na chromatinu, ktoré umožňujú alebo predchádzajú expresii fundamentálnych génov a chránia celistvosť genómu. Kalorická reštrikcia (KR) predlžuje život u mnohých organizmov. Jej prospešný účinok je rovnako možné aplikovať na kvasinky *S. cerevisiae*. Zníženie koncentrácie glukózy v kultivačnom médiu predlžuje životnosť buniek o 20-30 %. Paradoxne, hladujúce bunky nevykazujú vyššiu odolnosť voči oxidatívnym poškodeniam než bunky s dostatkom živín. Naopak, znížený prísun živín je sprevádzaný zvýšením respirácie a práve to je zod-

povedné za predĺženie ich života. Predpokladá sa, že znížený prísun živín vyvoláva v bunkách stresové podmienky, vďaka ktorým dochádza k aktivácii sirtuínov.

Na základe týchto poznatkov sa ďalšie štúdie zamerali na hľadanie zlúčenín, ktoré by boli schopné aktivovať sirtuíny. Aktivátory predstavujú napríklad rastlinné polyfenoly- resveratrol, buteín, piceannol a kvercetín. Hoci všetky tieto zlúčeniny umožňujú ovplyvniť dĺžku života, najúčinnějšíu zlúčeninou sa zdá byť resveratrol, ktorý umožňuje predĺžiť dĺžku života kvasiniek *S. cerevisiae* až o 70 %. Resveratrol preukázal terapeutické účinky aj pri kardiovaskulárnych, metabolických, zápalových a neurodegeneratívnych ochoreniach a ukázalo sa, že vykazuje aj preventívne účinky.

Aj napriek získaným výsledkom však k dnešnému dňu stále nie je celkom jasné, či má resveratrol významné biologické účinky aj u ľudí. I keď dnes už bežne dostupné výživové doplnky obsahujúce resveratrol sa ukázali byť úspešným marketingovým ťahom, priame a dostatočné dôkazy, ktoré by potvrdzovali jeho vplyv na ľudský organizmus, stále chýbajú.

Abstract

Aging in yeast can be influenced and regulated by several factors. These include for example the family histone deacetylases, known as sirtuins. Their presence has been detected not only in yeasts but also in higher eukaryotes. Other mechanism that affects life span of cells is the effect of caloric restriction. Activation or inactivation

of sirtuins may also affect the occurrence and process of various age-related diseases. Substances which activate mentioned regulative pathways could harbour wide therapeutical potential.

Literatúra

- ARIS, J. P., FALCÓN, A. A. (2003) Plasmid accumulation reduces life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 41607-41617.
- BITTERMAN, K. J., MEDVEDIK, O., SINCLAIR, D. A. (2003). Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. In *Microbiology and molecular biology reviews*. ISSN: 1098-5557, 2003, vol. 67, no. 3, p. 376-399.
- DEFOSSEZ, P. A. (2002) Restriction calorique et longévité: résultats inattendus chez la levure. *Med Sci* 18: 1191-1193
- GAN, L., MUCKE, L. (2008) Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron* 58: 10-14.
- CHEN, X. F., MENG, F. L., ZHOU, J. Q. (2009) Telomere recombination accelerates cellular aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 5: e1000535.
- KAEBERLEIN, M. (2010) Resveratrol and rapamycin: are they anti-aging drugs? *Bioessays* 32: 96-99.
- KENYON, C. J. (2010) The genetics of ageing. *Nature* 464: 504-512.
- LEWIN, B. (1997) *Genes VI*, Oxford University Press, USA, pp.1280.
- LODISH, H. et al., (2008) *Molecular Cell Biology*. 6th ed. W. H. Freeman & Co., 973 p. ISBN: 0-7167-7601-4.
- STEFFEN, K. K., KENNEDY, Y. B. K., KAEBERLEIN, M. (2009) Measuring replicative life span in the budding yeast. *J Vis Exp* 28: doi: 10.3791/1209.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Perspektívy v terapii fungálnych infekcií

Nora Tóth Hervay, Yvetta Gbelská

Katedra mikrobiológie a virológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave
tothhervay@nic.fns.uniba.sk

Úvod

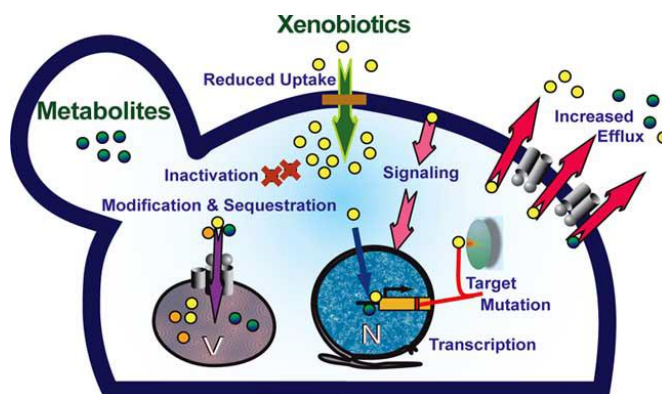
Adaptácia mikroorganizmov na špecifické ekologické niky, v ktorých sa nachádzajú, je asociovaná s evolúciou a vzájomným prepojením regulačných sietí v bunkách. So zmenami regulačných vzťahov medzi génami na úrovni transkripcie je často asociovaná aj odolnosť (rezistencia) patogénnych mikroorganizmov voči terapeutikám. Rovnaký mechanizmus, označovaný ako MDR (MultiDrug Resistance) sa pripisuje pozorovanej odolnosti rakovinových buniek voči cytostatikám. Terapiu patologických stavov komplikuje rozvoj tzv. mnohonásobnej rezistencie voči liečivám v cieľových bunkách, ktorá sa prejavuje zvýšenou odolnosťou buniek voči rôznym, štruktúrne a funkčne odlišným cytotoxickým zlúčeninám.

Mechanizmy rezistencie buniek voči terapeutikám

Živá bunka disponuje viacerými mechanizmami obrany voči prítomným toxickým látkam v prostredí. Jedna z najdôležitejších stratégií používaných mnohými mikroorganizmami a rakovinovými bunkami na obranu proti účinku cytotoxických látok je zvýšená aktivita membránových transportných proteínov, ktorá vedie k vzniku fenoménu mnohonásobnej rezistencie (obr. 1) (Sipos a Kuchler 2006). Molekulárna podstata vzniku, možnej modulácie a vzťahu fenoménu MDR so štruktúrou a funkciou biologických membrán sa dlhšiu dobu študuje

s využitím fakultatívne anaeróbných kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Pochopenie molekulárnych mechanizmov mnohonásobnej rezistencie u tohto eukaryo-

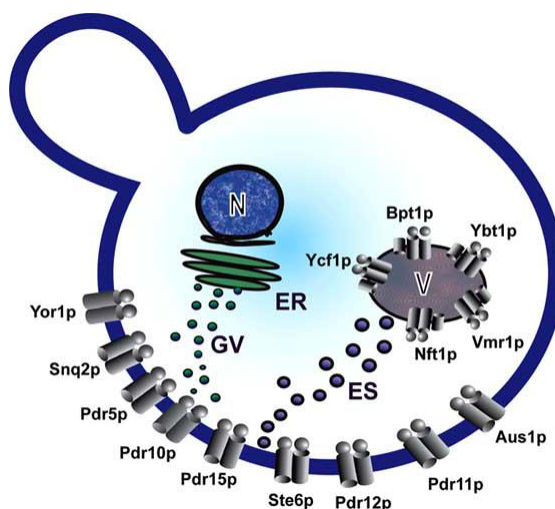
tického mikroorganizmu vytvára predpoklad pre hľadanie nových spôsobov boja proti multirezistentným patogénom človeka, zvierat a rastlín.



Obr. 1. Zvýšená aktivita efluxných púmp vedie k rezistencii buniek kvasiniek voči liečivám (Sipos a Kuchler. 2006)

Prežívanie patogénnych mikroorganizmov v prítomnosti cytotoxickéj látky umožňujú transportné proteíny, nazývané tiež efluxné pumpy, vylučujúce liečivo von z buniek. Transportné proteíny lokalizované v cytoplazmatickej membráne vylučujú intracelulárne lokalizované zlúčeniny do vonkajšieho prostredia, zatiaľ čo transport-

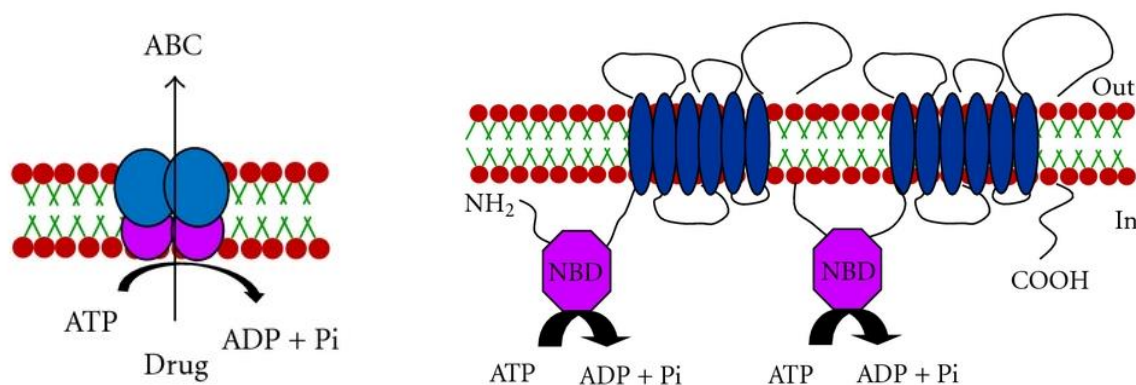
né proteíny lokalizované vo vnútrobunkových membránach zabezpečujú transport zlúčenín z/do príslušných organel (obr. 2) (Nourani *et al.* 1997). Podľa spôsobu, akým transportné proteíny získavajú energiu pre transport látok, sa rozdeľujú na primárne a sekundárne transportéry.



Obr. 2. Lokalizácia ABC transportných proteínov v kvasinkách (Sipos a Kuchler 2006)

Primárne transportéry (ABC transportné proteíny) získavajú energiu potrebnú pre transport látok z buniek hydrolyzou ATP (obr. 3). Štruktúru ABC transportných proteínov tvorí nukleotid-viažuca doména (NBD), ktorá viaže a hydrolyzuje ATP a hydrofóbne transmembránové domény (TMD), ktoré sa skladajú zo šiestich segmentov (TMS) navzájom spojených extra- a intracytoplazmatickými slučkami a sú zodpovedné za substrátovú špecificitu ABC transportných proteínov. Podľa počtu transmembránových domén (TMD) rozoznávame tri typy ABC transportérov: proteíny s dvoma sadami TMD

tzv. „full-size“, proteíny s jednou sadou transmembránových domén tzv. „half-size“ a proteíny bez TMD (Klein *et al.* 2011). Efluxné pumpy ABC rodiny sú proteíny so širokou substrátovou diverzitou, ktorá zahŕňa ióny ťažkých kovov, aminokyseliny, cukry, lipidy, liečivá a peptidy. V eukaryotických bunkách zabezpečujú rôzne fyziologické funkcie: podieľajú sa na transmembránovej distribúcii a transporte lipidov, peptidov, feromónov a cholesterolu, podieľajú sa na procese apoptózy, sú zahrnuté v biogenéze peroxizómov, v odpovedi buniek na stres atď (Schmitt *et al.* 2002).



Obr. 3. Topológia ABC transportných proteínov

NBD domény ABC proteínov sú zodpovedné za hydrolyzu ATP, ktorá je zdrojom energie pre xenobiotiká (Prasad et al. 2011).

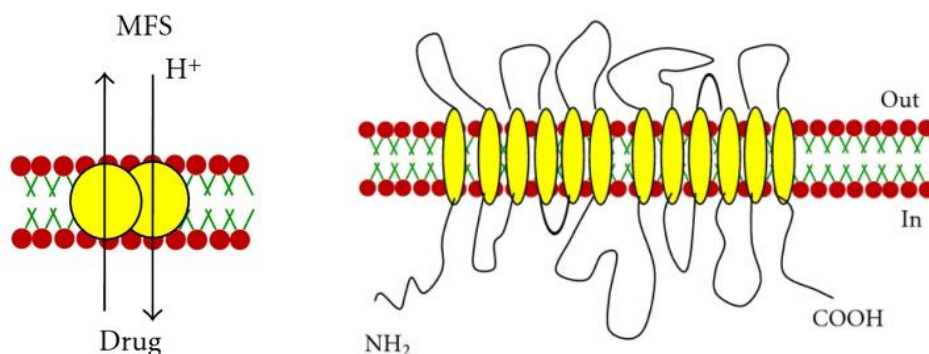
Pre podobnosť s P-glykoproteínom cicavčích buniek, ktorý je asociovaný s rezistenciou rakovinových buniek voči používaným cytostatikám, sa z hľadiska štruktúry, funkcie a fylogenie intenzívne študovala hlavná vylučovacia ABC transportná pumpa Pdr5p kvasinky *S. cerevisiae*.

Sekundárne transportéry z rodiny MFS (Major Facilitator Superfamily) využívajú na transport látok koncentračný gradient protónov vodíka alebo kationov sodíka (obr. 4). MFS transportéry majú v porovnaní s ABC transportérmi užšiu substrátovú špecifickosť, spravidla zabezpečujú uniport, symport alebo antiport jednoduchých cukrov, oligosacharidov, aminokyselín, peptidov, nukleotidov, metabolitov Krebsoho cyklu, organických a anorganických látok, antibiotík, fungicídov ako aj ďalších toxických zlúčenín z buniek (Pao et al., 1998; Del Sorbo et al., 2000). Transportéry typu MFS spravidla obsahujú 12 alebo 14 transmembránových hydrofóbných segmentov a sú klasifikované na základe štruktúry a substrátovej špecifity do 17 skupín (Goffeau et al., 1997). Podobné ABC transportné proteíny s analogickou funk-

ciou boli identifikované aj v bunkách patogénnych mikroorganizmov, a ich zvýšená expresia bola zaznamenaná v mnohých klinických izolátoch patogénnych kvasiniek (tab. 1).

Záver

V príspevku sme stručne popísali štruktúru a vlastnosti transportných proteínov patogénnych a nepatogénnych kvasiniek. Napriek tomu, že tieto proteíny sa študujú predovšetkým z hľadiska mechanizmu vylučovania rôznych zlúčenín z buniek, posledné experimentálne zistenia naznačujú účasť ABC transportných proteínov aj v zabezpečovaní homeostázy membránových lipidov. V nasledujúcom období je preto nevyhnutné zamerať sa na detailnú štruktúru transportných proteínov, ktorá by mohla pomôcť odhaliť spôsob rozpoznávania substrátu. Rovnako dôležité je štúdium vzťahu medzi molekulárnou štruktúrou a funkciou transportných proteínov pre hľadanie nových terapeutík špecificky potláčajúcich aktivitu transportných proteínov.



Obr. 4. Topológia MFS transportných proteínov

MFS proteíny využívajú protónový gradient ako zdroj energie pre transport látok (Prasad et al. 2011)

Tab. 1. ABC proteíny patogénnych kvasiniek (Klein et al. 2011)

proteín	funkcia	dĺžka proteínu (aa)	topológia
<i>Candida albicans</i>			
CaCdr1p	eflux terapeutík, translokácia fosfolipidov	1501	(NBD-TMD ₆) ₂
CaCdr2p	eflux terapeutík, translokácia fosfolipidov	1499	(NBD-TMD ₆) ₂
CaCdr3p	translokácia fosfolipidov	1501	(NBD-TMD ₆) ₂
CaCdr4p	neznáma	1490	(NBD-TMD ₆) ₂
CaHst6p	neznáma	1323	(TMD ₆ -NBD) ₂
CaYor1p	eflux terapeutík	1488	(TMD ₆ -NBD) ₂
CaYcf1p	eflux terapeutík	1580	(TMD ₆ -NBD) ₂
CaMlt1p	neznáma	1606	(TMD ₆ -NBD) ₂
<i>Candida dubliniensis</i>			
CdCdr1p	eflux terapeutík	1500	(NBD-TMD ₆) ₂
CdCdr2p	eflux terapeutík	1501	(NBD-TMD ₆) ₂
<i>Candida glabrata</i>			
CgCdr1p	eflux terapeutík	1499	(NBD-TMD ₆) ₂
Pdh1p/CgCdr2p	eflux terapeutík	1542	(NBD-TMD ₆) ₂
CgSnq2p	eflux terapeutík	1507	(NBD-TMD ₆) ₂
CgAus1p	neznáma	1398	(NBD-TMD ₆) ₂
<i>Aspergillus fumigatus</i>			
AfuMdr1p	eflux terapeutík	1349	(TMD ₆ -NBD) ₂
AfuMdr2p	eflux terapeutík	791	TMD ₆ -NBD
AfuMdr4p	eflux terapeutík	1344	(TMD ₆ -NBD) ₂
atrF	eflux terapeutík	1547	(TMD ₆ -NBD) ₂
<i>Cryptococcus neoformans</i>			
CnMdr1p	eflux terapeutík	1408	(TMD ₆ -NBD) ₂
CnAfr1p	eflux terapeutík	1543	(NBD-TMD ₆) ₂

aa – aminokyselina

Abstract

Clinical resistance to antifungal drugs develops through several distinct and to some extent non-overlapping molecular mechanisms. These include reduced drug uptake, alterations of target genes, transcriptional reprogramming, stress response and signaling leading to cell surface remodeling, membrane permeability changes, as well as increased drug efflux by membrane transporters. Drug target alterations and overexpression of ABC membrane transporters, however, represent most prevalent causes of clinical antifungal resistance. One of the possibilities to overcome the increasing resistance of microbial pathogens is the modulation of the membrane transporters activity.

Literatúra

Del SORBO, G., SHOONBEEK, H. J., DE WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. 2000. Fungal Genet. Biol. 30, 1-15.
 GOFFEAU, A., PARK, J., PAULSEN, I. T., JONNIAUX, J. L., DINH, T., MORDANT, P., SAIER, M. H. J. Multidrug-resistant transport proteins in yeast complete inventory and

phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. 1997. Yeast. 13, 43-54.
 KLEIN, C., KUHLER, K., VALACHOVIC, M. ABC proteins in yeast and fungal pathogens. 2011. Essays Biochem. 50, 101-119.
 NOURANI, A., WESOLOWSKI-LOUVEL, M., DELAVEAU, T., JACQ, C., DELAHODDE, A. Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. 1997. Mol. Cell. Biol. 17, 5453-5460.
 PAO, S. S., PAULSEN, I. T., SAIER, M. H. Jr. Major facilitator superfamily. 1998. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1 – 34.
 PRASAD, R., SHAMA, M., RAWAL, M. K. Functionally Relevant Residues Of Cdr1p: A Multidrug Abc Transporter Of Human Pathogenic *Candida Albicans*. 2011. J. Amino Acids. 531412.
 SCHMITT, L., TAMPÉ, R. Structure And Mechanism Of Atp Transporter. 2002. Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 754-760.
 SIPOS, G., KUHLER, K. Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. 2006. Curr Drug Targets. 7, 471-81.

Escherichia coli ako hostiteľský organizmus pre produkciu proteínov s využitím vo farmaceutickom priemysle

Michaela Osadská, Hana Halászová

Katedra molekulárnej biológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave
osadskam@gmail.com
hana.halaszova@gmail.com

Úvod

Pomocou techník rekombinantných DNA možno vnášať cudzie gény do živých organizmov, hostiteľských buniek, a tým modifikovať ich vlastnosti. Rekombinantné proteíny produkované v hostiteľských bunkách nachádzajú čoraz viac svoje široké využitie v rôznych odvetviach priemyslu, farmaceutický priemysel nevynímajúc (Rai a Padh, 2001; Terpe, 2006). Pri výbere expresných systémov, ktoré sa využívajú na produkciu biofarmaceutík, teda liekov založených na báze rekombinantných proteínov, sa prihliada na rôzne faktory, ako sú rýchlosť rastu kultúry a kultivačné nároky, stupeň expresie, lokalizácia cieľového proteínu v bunke alebo v médiu, posttranslačná modifikácia, biologická aktivita a spôsob regulácie expresie a dôležitý je aj pomer kvality produktu k finančným nákladom celkovej produkcie. K najstarším a najrozšírenejším hostiteľským organizmom pre produkciu rôznych proteínov stále patrí baktéria *Escherichia coli*, ktorá často predstavuje prvú voľbu pri produkcii priemyselných a terapeutických proteínov (Terpe, 2006). Taktiež zohráva dominantnú úlohu spomedzi všetkých bakteriálnych expresných systémov (Chen, 2012). Výhody tohto Gram-negatívneho bakteriálneho kmeňa zahŕňajú rýchly rast, rýchlu expresiu, ľahkosť kultivácie a vysoké produkčné výnosy, čo je výhodné pre masívnu produkciu mnohých komerčných proteínov (Swartz, 1996). Genetika *E. coli* je pochopená oveľa lepšie, ako genetika iných mikroorganizmov. Jej genóm môže byť rýchlo, jednoducho a precízne zmenený, promótorova kontrola nie je ťažká a počet kópií plazmidu sa dá jednoducho upravovať. Zaujímavý je aj fakt, že *E. coli* dokáže akumulovať rekombinantné proteíny tvoriace do 80 % jej suchej hmotnosti. Už v roku 1993 boli rekombinantné procesy v *E. coli* zodpovedné za výnos najmenej 5 miliárd dolárov (Swartz, 1996).

Časť 1. Heterologická expresia a jej využitie vo farmaceutickom priemysle

V posledných rokoch enormne stúpol počet tých rekombinantných proteínov, ktoré sa využívajú na terapeutické

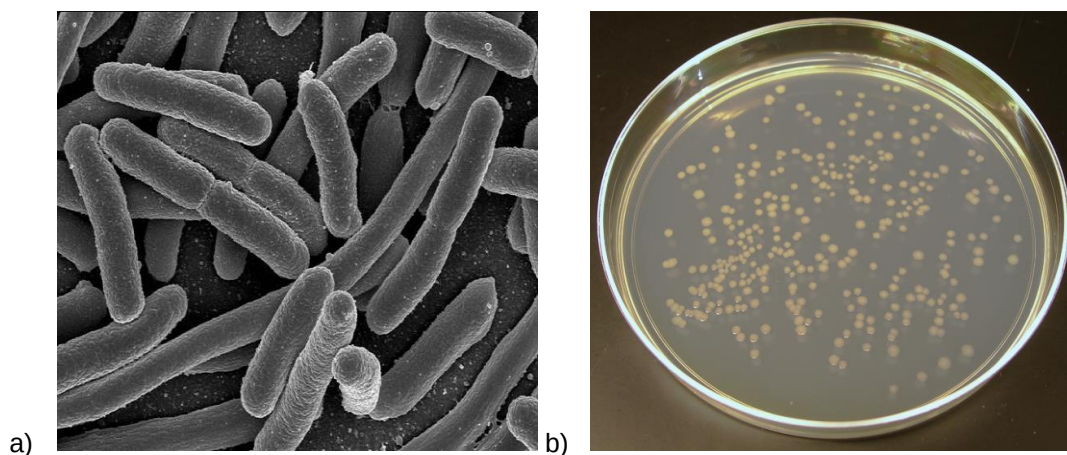
aplikácie. Vstupom génového inžinierstva do farmaceutickej výroby sa začala vyčleňovať skupina liečiv, ktoré označujeme ako bioliečivá alebo biofarmaceutiká. Význam a pozícia rekombinantných peptidových a proteínových liečiv vo farmaceutickom priemysle neustále narastá a stávajú sa jeho nezastupiteľnou súčasťou, pričom sa dá predpokladať, že v najbližších rokoch budú biofarmaceutiká na farmaceutickom trhu dominovať. Biofarmaceutiká sa využívajú na liečbu ochorení, ktoré sa predtým nedali liečiť, resp. ich liečba bola veľmi obtiažna, napr. rakovina, autoimunitné ochorenia, diabetes, anémia a pod. Niekedy dokonca predstavujú jedinú účinnú terapiu (Schmidt, 2004). Biofarmaceutiká môžeme rozdeliť do základných skupín, ku ktorým patria krvné faktory, trombolýtiká a antikoagulanty, hormóny, enzýmy, rastové faktory, interferóny a interleukíny, očkovacie látky a monoklonálne protilátky (Walsh, 2010). V minulosti sa peptidy a proteíny s farmakologickým účinkom získavali extrakciou z prírodných zdrojov, čo však so sebou nieslo určité riziká, napr. prenos priónov, kontaminácia vírusmi. Ich extrakcia z pôvodných zdrojov je tiež značne limitovaná (napr. ľudské proteíny). Dnes sa ich výroba presúva k modernejším prístupom, a to hlavne k technológiám využívajúcim techniky rekombinantných DNA, pričom terapeutické proteíny môžu byť vhodne upravené tak, aby mali optimálne farmakologické vlastnosti. Z celkovo 211 biofarmaceutík licencovaných FDA a EMEA (US Food and Drug Administration, European Medicines Agency) do decembra 2011, 66 je produkovaných v baktérii *E. coli*, čo predstavuje 31 % z celkového množstva produkovaných biofarmaceutík. Na porovnanie, v cicavčích bunkách bolo produkovaných 91 biofarmaceutík, a teda 43 %. Z toho vyplýva, že baktéria *E. coli* stále patrí medzi najvyužívanejšie hostiteľské kmene pre produkciu proteínov s farmaceutickým využitím (Walsh, 2012).

Časť 2. *Escherichia coli* ako hostiteľský organizmus

Escherichia coli je gram-negatívna bičíkatá tyčinkovitá baktéria o veľkosti okolo 1,1–1,5 μm x 2,0 – 6,0 μm (obr. 1) Bola objavená v roku 1885 nemeckým pediatrom

rom Theodorom Escherichom (Escherich, 1885). Dokáže rásť v aeróbných ale aj v anaeróbných podmienkach, teda je fakultatívne anaeróbná. Rozsiahle vedomosti ohľadom fyziológie, genetiky a kompletnej genomickú sekvencii (Baneyx, 1999), jednoduchá manipulácia pri experimentoch a rýchly rast v pomerne lacnom médiu, ktorý vedie k vysokému výťažku, predurčuje bakteriálny systém *E. coli* za prvú voľbu na produkciu priemysel-

ných a terapeutických proteínov (Baneyx, 1999; Ferrer-Mirallés a kol., 2009), pretože umožňuje rýchlu a ekonomickú produkciu rekombinantných proteínov (Jana a Deb, 2005). Možnosti jej využitia sa neustále zvyšujú s rozširujúcou sa plejádou dostupných klonovacích vektorov a nových mutantných hostiteľských kmeňov (Sørensen a Mortensen, 2005; Terpe, 2006).



Obr. 1. Baktéria *E. coli* a) pozorovaná elektrónovým mikroskopom, b) kolónie *E. coli* na tuhom médiu

Baktéria *E. coli* bola ako hostiteľský organizmus využitá na produkciu prvého schváleného rekombinantného farmaceutika na trhu, ktorým bol ľudský inzulín v roku 1982 na liečbu cukrovky (FDA App., 1982). Odvtedy už bolo v *E. coli* produkovaných a schválených jednak v USA aj v Európe mnoho rekombinantných proteínov na

terapeutické aplikácie, ktorých stručný prehľad uvádzame v tabuľke 1. Najviac rekombinantných biofarmaceutík produkovaných v *E. coli* slúži na liečbu infekčných chorôb, endokrinných a metabolických porúch (Ferrer-Mirallés a kol., 2009).

Tab. 1. Prehľad vybraných rekombinantných biofarmaceutík schválených v USA a v Európe

Proteín	Oblasť terapie	Rok schválenia	Firma uvádzajúca produkt na trh
Ľudský inzulín	<i>Diabetes melitus</i>	1982; 2007	Eli Lilly; Aventis
Analógy ľudského inzulínu	<i>Diabetes mellitus</i>	1996; 2000; 2006	Eli Lilly; Aventis; Pfizer
Ľudský rastový hormón (somatotropín)	Nedostatok rastového hormónu	1985; 1987; 1993; 1995; 2006	Genentech; Eli Lilly; Novo Nordisk; Pfizer; Pharmacia; Sandoz
Mutantný somatotropín	Agromegália u pacientov po chirurgických zákrokoch, po rádioterapii	2002	Pfizer; Pharmacia
Interferón β -1b	Skleróza multiplex	1993	Berlex; Chiron
Interferón α -2b	Niektoré typy leukémie, Kaposiho sarkóm, hepatitída C	1986	Schering-Plough
Pegylovaný interferón α -2b	Hepatitída C	2001; 2002	Schering-Plough; Enzon Hoffmann-La Roche
Paratyroidný hormón	Osteoporóza	2002; 2006	Eli Lilly; Nycomed

Nie vždy sa ale dá zaručiť, že cieľový proteín sa bude v bunke *E. coli* nadexprimovať v biologicky aktívnej forme do požadovanej hladiny (Baneyx, 1999). Môže to byť spôsobené jedinečnosťou a štruktúrou génovej sekvencie, stabilitou mRNA a efektívnosťou translácie, ďa-

lej od jednoduchosti, resp. zložitosti skladania produkovaného proteínu, degradáciou proteínu hostiteľskými proteázami, značnými rozdielmi vo využívaní preferenčných kodónov a od potenciálnej toxicity rekombinantného proteínu voči hostiteľskej bunke (Jana a Deb, 2005).

Jednou z najväčších nevýhod baktérie *E. coli* ako hostiteľského organizmu, je neschopnosť uskutočniť posttranslačné modifikácie, ku ktorým dochádza v eukaryotických organizmoch (napr. glykozylácia, fosforylácia; Terpe, 2006), ďalej chýbajúce mechanizmy pre produkciu proteínov, ktoré obsahujú disulfidické mostíky (Choi a Lee, 2004).

Záver

Escherichia coli expresný systém patrí medzi najpoužívanejšie systémy pre expresiu rekombinantných proteínov vďaka množstvu výhod, ktoré poskytuje. Napriek skutočnosti, že tento systém je už dostatočne preštudovaný, nie je vždy možné zabezpečiť to, že cieľový proteín bude exprimovaný v bunke *E. coli* v biologicky aktívnej forme. Aj napriek uvedeným nedostatkom môžeme očakávať, že v budúcnosti, keď sa budú študovať rôzne nové a nekonvenčné bakteriálne expresné systémy, nájde svoje stále využitie aj expresný systém založený na výnimočnej baktérii *Escherichia coli*.

Abstract

Recombinant proteins produced in the various host cells can be used in the different sectors of the industry, including pharmaceutical industry. During the selection of proper expression system for the production of biopharmaceuticals the ratio of product quality to the financial cost of the total production is very important. *Escherichia coli* expression system remains to be one of the most preferred bacterial expression systems and often is the first choice for the production of industrial and therapeutic recombinant proteins.

Literatúra

- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. In *Curr Opin Biotechnol.*, Vol. 10, 1999, pp. 411-421.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. In *Biotech. Advances*. Vol 30, Is. 5, 2012, pp. 1102-1107.
- CHOI, J. H., LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. In *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 64, 2004, pp. 625-35.
- ESCHERICH, T. Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. In *Fortshr. Med.* Vol. 3:5-15-522, 1885, pp. 547-554.
- FERRER-MIRALLES, N. a kol. Microbial Factories for Recombinant pharmaceuticals. In *Microbial Cell factories*. Vol. 8, 2009, pp. 17.
- HUMAN INSULIN RECEIVES FDA APPROVAL. In *FDA Drug Bull.* 1982, Vol.12, p. 18-19.
- JANA, S., DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. In *App. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 67, 2005, pp. 289-298.
- RAI, M., PADH, H. Expression Systems for production of Heterologous Proteins. In *Current Science.*, Vol. 80, 209, 2001, pp. 1121-1128.
- SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. In *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 65, 2004, pp. 363-372.
- SØRENSEN, H. P., MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. In *Journal of Biotechnology*. Vol. 115, Is. 2, 26, 2005, pp. 113-128.
- SWARTZ, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. In *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 12, 2001, pp.195-201.
- TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol.72, No. 2, 2006, pp. 211-222.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks. In *Nat. Biotechnol* Vol. 28, Iss. 9, 2010, pp. 917-924.
- WALSH, G. New Biopharmaceuticals. In *Biopharm Int* Vol. 25, Iss. 6, 2012, pp. 34-36.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

BIOMEDICÍNA, BIOTECHNOLÓGIE

Využitie systému na vysokoparalelné sekvenovanie DNA pri diagnostike vybraných dedičných ochorení

Martina Némethová, Silvia Bokorová

Katedra molekulárnej biológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave
m.nemethova@gmail.com
bokorovasisa@gmail.com

Úvod

Diagnostika dedičných ochorení je stále aktuálnou témou. Niektoré ochorenia majú veľmi slabý klinický prejav a ich prítomnosť nám nemusí ubrať na kvalite života, ale stretávame sa i dedičnými ochoreniami, ktoré sú závažnejšie a môžu prejsť až do malígneho stavu. V týchto prípadoch je nevyhnutné poznať včas správnu diagnózu potvrdenú aj na genetickej úrovni. Sekvenátory novej generácie ponúkajú nové možnosti na kvalitnejšie a rýchlejšie získanie potrebných informácií na určenie

správnej diagnózy na základe genetických výsledkov. Významnú úlohu zohráva genetická diagnostika pri diferenciálnej diagnostike, kedy lekár potrebuje poznať správnu diagnózu pre navrhnutie vhodnej liečby. Ak bude liečba v čas a správne zvolená, pacient má vyššie šance na kvalitnejší život.

Vybrané dedičné ochorenia

Jedným z častých autozómovo dominantných ochorení je neurofibromatóza typu 1 (NF1; MIM 162200), nazý-

vaná aj Recklinghausen ochorenie. Je to multisystémové ochorenie s incidenciou 1:3500. (Boyd a kol., 2009). Penetrancia ochorenia je takmer úplná už do 8 roku života (Radtke a kol., 2007). Pre stanovenie diagnózy musí pacient splniť minimálne 2 zo 7 základných diagnostických kritérií (tab.1) (National Institutes of Health Consensus Development Conference, 1988). Ochorenie so závažným priebehom a komplikáciami skracaie dĺžku života v priemere o 10-15 rokov (Rasmussen, Friedman, 2000).

Pre pacientov s NF1 je typickým znakom vznik neurofibrómov, ktoré pozostávajú zo zmesi Schwanových buniek, fibroblastov, žírnych buniek, perineurálnych buniek, kolagénu a extracelulárnej matrix (Maertens a kol., 2006). Najzávažnejším problémom u týchto pacientov je benígny plexiformný neurofibrómov, ktorý sa tvorí hlboko pod kožou v nerovných puzdrách (Korf, 1999). V 8-12% vo veku 20-30 rokov sa z neho vyvinie ťažko identifikovateľný malígny nádor periférnych nervových puzdier (MPNST) (Evans a kol., 2002). Výskumy ukázali, že NF1 pacienti s mikrodéliciou v NF1 géne majú vyššie riziko vzniku MPNST (De Raedt a kol., 2003).

Identifikácia mutácií v NF1 géne (17q11.2), ktorý pokrýva približne 350kb genomického DNA a pozostáva zo 60 exónov (3 podliehajú alternatívnemu zostrihu) (Viskochil a kol., 1990; Cawthon a kol., 1990; Li a kol., 1995) je náročná, pretože v tomto géne neboli identifikované žiadne hot spoty. To znamená, že mutácie sú roztrúsené po celom géne a preto je potrebné analyzovať celý gén. Takmer 50% mutácií vzniká *de novo* (Radtke a kol., 2007).

Tab. 1. Základné diagnostické kritériá

6 café au lait škvŕn – >0.5 cm do puberty, >1,5 cm po puberte
Freckling v oblasti podpažšia, slabín
2 a viac Lischových nodulov
Glióm zrkového nervu
2 a viac neurofibrómov alebo 1 plexiformný neurofibrómov
Charakteristická dysplázia tibie alebo rednutie dlhých kostí s následnou pseudoartrózou alebo bez nej
Prvostupňový príbuzný s NF1

Sú známe i ochorenia, ktorých niektoré klinické príznaky majú podobnosť s NF1: NF2, schwanomatóza, Noonan syndróm, Watsonov, Leopard, McCune-Albright syndróm, NF-like syndróm (SPRED1) (Viskochil, Carey), piebaldizmus (Giebel, Spritz, 1991), srdcovo-tvárovo-kožný syndróm (CFC), Costello syndróm a Noonov

syndróm. Spoločným menovateľom týchto ochorení je, že sú spôsobené poruchami génov zapojených do regulácie Ras-MAPK signálnej dráhy (Rodriguez-Viciano a kol., 2006; Stevenson a kol., 2008). Doposiaľ bolo identifikovaných 17 génov nachádzajúcich sa na viacerých chromozómoch.

Spoločným diagnostickým znakom niektorých z vyššie uvedených ochorení (NF1, NF2, SPRED1, Watsonov, Leopard, McCune-Albright syndróm, piebaldizmus) sú aj hyperpigmentované škvrny nazývané café au lait škvrny (CALM). U jednotlivých ochorení sa môžu líšiť veľkosťou, tvarom, výskytom a počtom. Mnohé z týchto ochorení predisponujú ku vzniku multiorgánového postihnutia alebo vzniku malignity (Ilenčíková a kol., 2009).

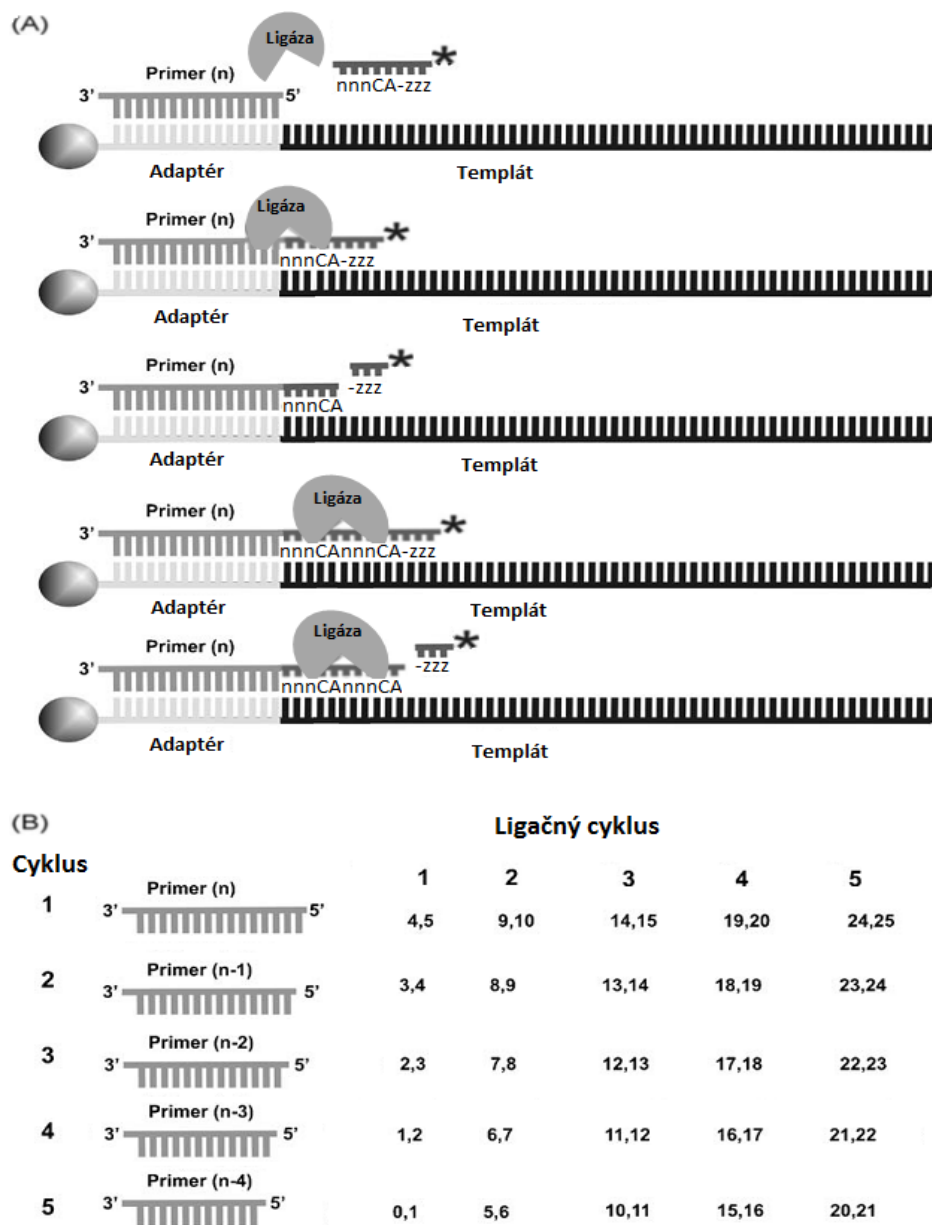
Na rýchlejšiu identifikáciu kauzatívnej mutácie a presné stanovenie diagnózy u pacientov s uvedenými ochoreniami, ktoré majú veľmi podobné klinické príznaky by bolo vhodné využitie sekvenovania transkriptómu a celogenómového sekvenovania.

Využitie systému na vysokoparalelné sekvenovanie DNA (SOLiD 5500xl)

Princíp systému sekvenovania na SOLiD 5500xl je založený na ligácii, ktorá prebieha v smere 3'-5'. Celý proces prípravy pozostáva z troch základných krokov: príprava templátu (knižnice), emulzná PCR a samotné sekvenovanie. Na povrchu magnetických guľôčok sa nachádzajú oligá, ktoré sú komplementárne ku adaptérovej sekvencii na templáte. Na každej guľôčke sa prichytí iba jeden fragment a prostredníctvom emulznej PCR si ich namnožíme. Výsledkom je zmes monoklonálnych guľôčok, ktoré sa ďalšími krokmi opracujú a tak pripraví na samotné sekvenovanie v čípe. Pri sekvenovaní sa využívajú špeciálne oktaméry (próby), ktorých sekvencia pozostáva z troch degenerovaných báz, dvoch špecifických báz a troch univerzálnych báz nesúcich na 5'konci fluorescenčnú farbičku (obr. 1). Priebeh sekvenovania je nasledovný. Univerzály primer sa naviaže na adaptérovú sekvenciu a oktamér na templát. Ligáza spojí oktamér s univerzálnym priemerom. Potom, čo sa zaznamená fluorescencia, odštiepi sa univerzálna báza nesúca farbičku a celý proces sa opakuje až po koniec templátu. V každom ďalšom cykle na adaptér nasadá univerzálny primer vždy o jednu bázu kratší (od n po n-4), čím sa zabezpečí prečítanie celej nukleotidovej sekvencie. Takéto dvojbazové kódovanie eliminuje chybovosť. Sekvenovanie môže byť paralelné až pre 50 miliónov guľôčiek. Výsledkom je obrovské množstvo novonasyntetizovaných 35bp dlhých DNA fragmentov, ktoré sa vzájomne prekrývajú. (Ansorge, 2009). Sekvenovanie na prístroji SOLiD 5500xl je možné tromi rôznymi prístupmi. Celogenómové, exómové sekvenovanie a sekvenovanie transkriptómu. Celogenómové sekvenovanie poskytuje osekvenovanie kom-

pletnej genomickej DNA. Exómové sekvenovanie zahŕňa všetky exóny spolu s veľmi krátkymi intrónickými úsekmi. Pri sekvenovaní transkriptómu je sekvenovaná totálna RNA (bez rRNA) prepísaná do cDNA. Ďalšou

možnosťou využitia je cielečné sekvenovanie, a to amplicónové s použitím špecificky navrhnutých primerov na vybrané oblasti genómu alebo selektívny výber fragmentov (www 1).



Obr. 1. Sekvenovanie ligáciou na prístroji SOLiD 5500xl

(A) Sekvenačné primery hybridizujú na adaptér. Súbor 4 fluorescenčne značených dvojbázových prôb (označené hviezdíčkou) súťaží o ligáciu s univerzálnym sekvenačným primerom. Tieto próby majú čiastočne degenerovanú DNA (označené ako *n* a *z*). Špecifita dvojbázových prôb je zabezpečená 4. a 5. bázou, ktorá je komplementárna k templátu. Pred každou nasledujúcou ligáciou sú tri koncové fluorescenčne značené nukleotidy oktameru odstránené z reťazca. (B) Sekvencia templátu sa stanovuje v každom ligačnom cykle, pričom veľkosť univerzálného primeru sa líši o jednu bázu (od *n* po *n-4*). Poradie nukleotidov, ktoré bolo pri každom ligačnom cykle zaznamenané v podobe dvojnukleotidových pozícií je zapísané pod jednotlivými ligačnými cyklami (Upravené podľa Ansorge, 2009).

Na diagnostiku vyššie uvedených dedičných ochorení by bolo ideálne sekvenovanie mRNA. Sekvenovaním transkriptov sme schopní zachytiť aj zosťrihové mutácie, ktoré sa vyskytujú mimo klasických konsenzus miest. Na odhalenie príčiny nesprávneho zosťrihu na mRNA, je

nevyhnutné osekvenovať aj genomickú DNA pomocou celogenómového sekvenovania, ktoré môžeme využiť v prípade negatívnych genetických výsledkov, ale jasných klinických prejavov, na analýzu iných kandidátnych génov.

Kedže veľkosť génov je príliš veľká a použitie Sangerovho sekvenovania je v súčasnej dobe časovo náročné, masívne paralelné sekvenovanie nám umožňuje urýchliť a upresniť kompletnú analýzu pre viacerých pacientov naraz. Jednou z jeho najväčších výhod je, že z prístrojov novej generácie sekvenovania patrí SOLiD 5500xl k prístrojom s najpresnejším čítaním až na 99,99 % (www 1).

Hoci pri sekvenovaní získame obrovské množstvo dát, ktoré sú časovo náročné na spracovanie, v našom prípade by bolo postačujúce zamerať sa len na analýzu konkrétnych génov, čím sa celý proces urýchli.

Záver

Sekvenovanie novej generácie by malo výrazne zlepšiť kvalitu genetického vyšetrenia pri polygénnych ochoreniach alebo ochoreniach s nejasným klinickým prejavom. V týchto prípadoch je potrebné sekvenovať viacero génov naraz a preto by masívne paralelné sekvenovanie malo priniesť úsporu času a financií. Zavedenie do praxe by mohlo mať pozitívny dopad na skvalitnenie a urýchlenie diferenciálnej diagnostiky dedičných ochorení. Pri takých dedičných ochoreniach, pre ktoré sú typické len mutácie v konkrétnych oblastiach zodpovedného génu, môžeme využiť amplikónové sekvenovanie a to u viacerých pacientov naraz.

Abstract

Next-generation sequencing techniques offer new opportunities for better and more quickly obtain genetic information. Some of hereditary diseases with very similar clinical manifestation can go up to a malignant state. Because of the genetic diagnosis played important role by the different diagnosis when a doctor needs to know the diagnosis in time for designing appropriate treatment. In this cases is sequencing using SOLiD 5500xl the best solution.

Literatúra

ANSORGE, W. J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol*, 25(4), p. 195-203.
National Institutes of Health Consensus Development Conference. 1988. Neurofibromatosis: conference statement. *In Arch Neurol*. 45, p. 575-8.
BOYD, K. P., KORF, B. R., THEOS, A. 2009. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*. 61, p. 1-14.
CAWTHON, R. M., O'CONNELL, P., BUCHBERG, A. M., VISKOCHIL, D., WEISS, R. B., CULVER, M., STEVENS, J., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G., WHITE, R. 1990. Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics*. 7, p. 555-565.
De RAEDT, T., BREMS, H., WOLKENSTEIN, P., VIDAUD, D., PILOTTI, S., PERRONE, F., MAUTNER, V., FRAHM, S.,

SCIOT, R., LEGIUS, E. 2003. Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. *Am J Hum Genet*. 72, p. 1288-92.
EVANS, D. G., BASER, M. E., MCGAUGHRAN, J., SHARIF, S., HOWARD, E., MORAN, A. 2002. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 39, p. 311-14.
GIEBEL, L. B., SPRITZ, R. A. 1991. Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, p. 8696-8699.
ILENČÍKOVÁ, D., ŽUROVČÍKOVÁ, D., COPÁKOVÁ, L., ŠTRBOVÁ, D., ŠUVADA, J., RYBÁROVÁ, A., HLAVATÁ, A., WIMMER, K. 2009. „Café-au-lait“ makuly v diagnostike detských nádorových ochorení. *Čes.-slov. Pediat*. 64(9), p. 406-414.
KORF, B. R. 1999. Plexiform neurofibromas. *Am J Med Genet*. 89, p. 31-7.
LI, Y., O'CONNELL, P., BREIDENBACH, H.H., CAWTHON, R., STEVENS, J., XU, G., NEIL, S., ROBERTSON, M., WHITE, R., VISKOCHIL, D. 1995. Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics*. 25, p. 9-18.
MAERTENS, O., BREMS, H., VANDESOMPELE, J., DE RAEDT, T., HEYNS, I., ROSENBAUM, T., DE SCHEPPER, S., DE PAEPE, A., MORTIER, G., JANSSENS, S., SPELEMAN, F., LEGIUS, E., MESSIAEN, L. 2006. Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Hum Mutat*. 27, p. 1030-40.
RADTKE, H. B., SEBOLD, C. D., ALLISON, C., HAIDLE, J. L., SCHNEIDER, G. 2007. Neurofibromatosis Type 1 in Genetic Counseling Practice: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 16, p. 387-407.
RASMUSSEN, S. A., FRIEDMAN, J. M., 2000. NF1 gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol*. 151, p. 33-40.
RODRIGUEZ-VICIANA, P., TETSU, O., TIDYMAN, W. E., ESTEP, A. L., CONGER, B. A., CRUZ, M. S., MCCORMICK, F., RAUEN, K. A. 2006. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science*. 311, p. 1287-1290.
STEVENSON, D. A., SWENSEN, J. J., VISKOCHIL, D. H. 2008. Neurofibromatosis type 1 and other syndromes of the Ras Pathway. Neurofibromatoses, Kaufman D. Monogr Hum Genet., Basel, Karger. 16, p. 32-45, ISSN 0077-0876.
VISKOCHIL, D., BUCHBERG, A. M., XU, G., CAWTHON, R. M., STEVENS, J., WOLFF, R. K., CULVER, M., CAREY, J. C., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., WHITE, R., O'CONNELL, P. 1990. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*. 62, p. 187-192.
VISKOCHIL, D., CAREY, J. C. Alternate and related forms of the neurofibromatoses; in HUSON, S. M., HUGHES, R. A. CH. (eds): The Neurofibromatoses. London: Chapman & Hall, p. 445-474.
www1:<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Sequencing/Next-Generation-Sequencing.html> 25.4.2013
www2:<http://www.appliedbiosystems.com> 24.4.2013

Kvasinky a oxidačný stres

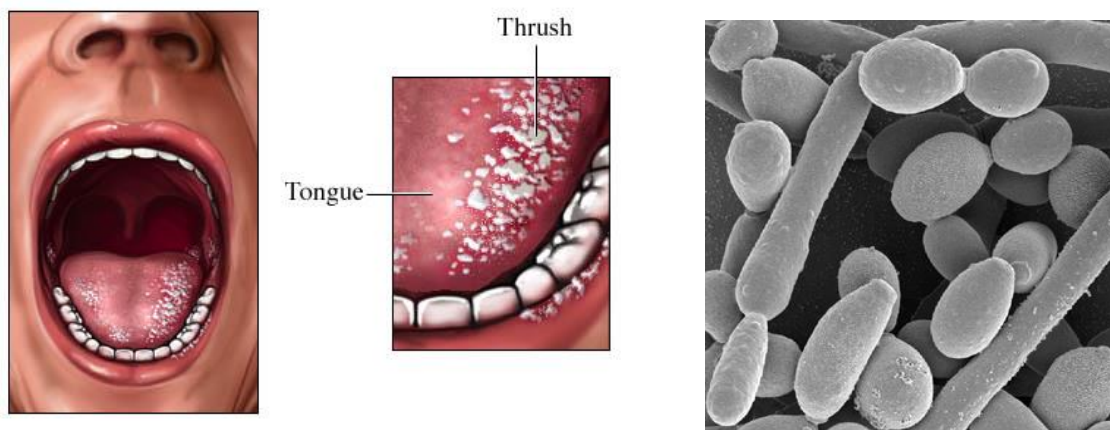
Hana Čuláková, Yvetta Gbelská

Katedra mikrobiológie a virológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Kvasinky sú jednobunkové eukaryotické organizmy, ktoré patria do ríše Huby. Niektoré sa nachádzajú v pôde, iné spolunažívajú s rastlinami a živočíchmi. Významná časť z druhov kvasiniek má potenciál spôsobovať ochorenia. Takéto druhy kvasiniek nazývame oportúnne patogény, pretože k vyvolaniu ochorenia dochádza pri ich premnožení v organizme hostiteľa. Dôvodom premnoženia kvasiniek môže byť napríklad oslabenie imunitného systému alebo narušenie prirodzenej mikróflóry jedinca (tráviaceho traktu alebo pošvy). Patogénne kvasinky môžu spôsobiť infekcie kože, slizníc, vnútorných orgánov a krvného obehu. Ochore-

nia spôsobené kvasinkami (mykózy) môžu mať rôzny stupeň závažnosti, ktorý závisí od veľkého množstva faktorov vrátane imunitného stavu hostiteľa. Obzvlášť nebezpečné sú tieto fungálne patogény pre imunokompromitovaných jedincov (pacienti užívajúci imunosupresívu po transplantáciách, HIV pozitívni pacienti, pacienti po chemo- alebo rádioterapii), u ktorých môže takéto ochorenie viesť až k smrti. Patogény spomedzi kvasiniek patria do rodov *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* a *Malassezia*, pričom najčastejším pôvodcom kvasinkových infekcií je druh *Candida albicans*.



Obr. 1. Kvasinková infekcia ústnej dutiny; bunky *C. albicans* pod rastrovacím elektrónovým mikroskopom
(<http://www.webmd.com/oral-health/thrush-in-the-mouth>; <http://altered-states.net/barry/newsletter493/>).

Fagocytóza, reaktívne formy kyslíka a ich toxické efekty

V prípade premnoženia kvasiniek v hostiteľovi sa ako prvá spúšťa nešpecifická imunitná odpoveď. Do obrany proti patogénnym kvasinkám sa zapájajú fagocytujúce leukocyty (makrofágy, neutrofily). Pri fagocytóze dochádza k pohlteniu mikroorganizmu a jeho usmrteniu vo fagolyzozóme fagocytu pomocou enzymatických a chemických mechanizmov. Medzi enzymatické mechanizmy patria najmä proteolytické enzýmy a na chemickú deštrukciu patogénov sú využívané reaktívne formy kyslíka (reactive oxygen species – ROS), ktoré sú pro-

dukované fagocytmi pri tzv. respiračnom vzplanutí (Kontseková a Kontsek, 2004).

Reaktívne formy kyslíka predstavujú špecifické oxidačné stavy dvojatómovej molekuly kyslíka (Halliwell a Gutteridge, 1989; Gutteridge, 1994). Patria sem voľné radikály ako superoxidový anión O_2^- a hydroxylový radikál $OH^\cdot$ a neradikálové reaktívne formy ako peroxid vodíka H_2O_2 a singletový kyslík 1O_2 . Tieto formy kyslíka sú veľmi toxické, pretože sa správajú ako oxidačné činidlá (odoberajú elektróny), čím spôsobujú širokú škálu oxidačných poškodení bunkových zložiek fagocytovaného mikroorganizmu. ROS môžu vyvolať peroxidáciu lipidov, zhlukovanie alebo rozpad proteínov, karbonyláciu nie-

ktorých enzýmov a hydroxyláciu aminokyselín. V prípade zasiahnutia nukleových kyselín sa môžu tvoriť jednovláknové a dvojvláknové zlomy, modifikovať alebo až odštiepiť dusíkaté bázy, či vzniknúť priečne väzby medzi reťazcami DNA (Toledano a kol., 2003). Následkom týchto poškodení dochádza k odumretiu bunky patogénneho mikroorganizmu a odstráneniu infekcie.

Niektoré druhy kvasiniek dokážu uniknúť nešpecifickej obrane hostiteľa práve tým, že dokážu prežiť respiračné vzplanutie vo fagocytoch a ďalej sa v organizme hostiteľa šíriť.

Oxidačný stres

Reaktívne formy kyslíka nevznikajú iba pri fagocytóze. ROS sa prirodzene tvoria vo všetkých bunkách s aeróbnym metabolizmom pri neúplnej redukcii kyslíka pri respirácii a tiež počas metabolizmu mastných kyselín (Halliwell a Gutteridge, 1989; Gutteridge, 1994). ROS sú teda neustále produkované ako vedľajšie produkty normálneho metabolizmu bunky. Aby sa zabránilo vzniku oxidačných poškodení v bunke, existujú rozličné mechanizmy, ktoré ROS degradujú a poškodené molekuly v bunkách opravujú (Lushchak, 2011). Produkcia a odstraňovanie ROS sú pod prísnou kontrolou tak, aby sa v bunke nachádzali iba vo veľmi nízkej koncentrácii (menej ako 10^{-8} M) (Halliwell a Gutteridge, 1989). Ak sa rovnováha ich tvorby a eliminácie naruší, dochádza k zvýšeniu hladiny ROS natoľko, že ich obranné mechanizmy nestíhajú odstraňovať. Pre bunku nastáva oxidačný stres (Cabiscol a kol., 2000; Lushchak, 2011).

Obranné mechanizmy kvasiniek proti oxidačnému stresu

Oportúnne patogénne kvasinky disponujú intenzívnou obranou voči ROS a odolávajú nielen ROS, ktoré sa vytvoria pri ich prirodzenom metabolizme, ale aj ROS vytvoreným vo fagocytoch. Na odstraňovaní ROS v bunkách kvasiniek sa podieľajú dve hlavné skupiny obranných (antioxidačných) systémov: antioxidanty obsahujúce kov a tiolové redoxné systémy (Toledano a kol., 2003).

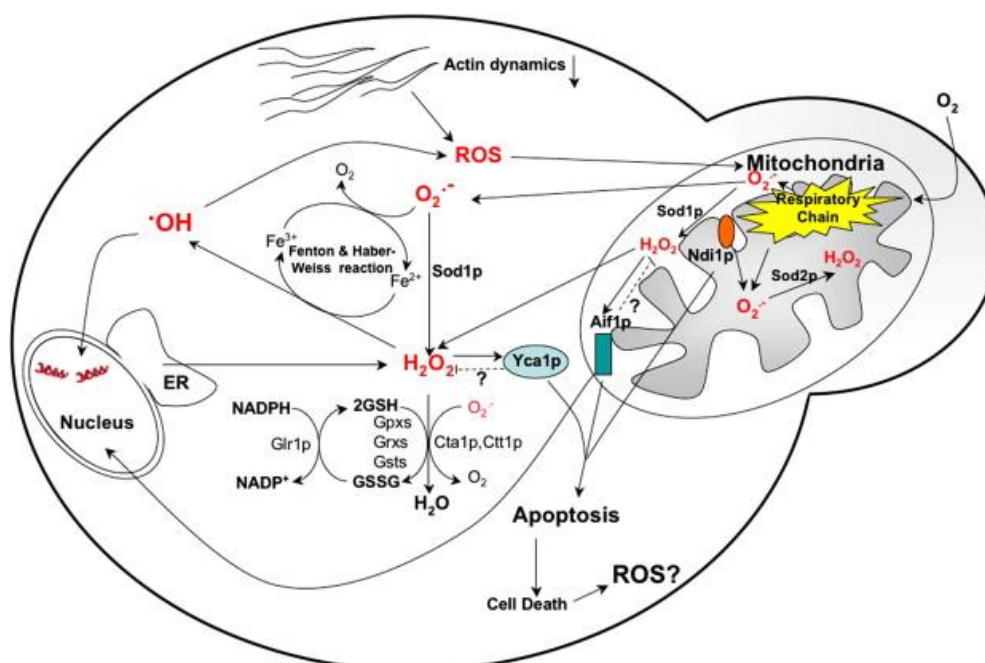
Medzi antioxidačné enzýmy, ktoré obsahujú kov patria superoxiddismutázy a katalázy. Superoxiddismutázy majú vo svojej štruktúre meď + zinok alebo mangán a superoxidový anión premieňajú na peroxid vodíka akyslík (Gralla a Kosman, 1992). Katalázy obsahujú železo a redukujú H_2O_2 na vodu a kyslík (Ruis a Hamilton, 1992). Kvasinky *C. albicans* majú napr. až šesť rôznych superoxiddismutáz (Frohner a kol., 2009).

Tiolový redoxný systém bunky hrá dôležitú úlohu pri odstraňovaní peroxidov a pri spätnej redukcii oxidačne poškodených proteínov. Tento systém je tvorený dvoma tiolovými redoxnými dráhami, tioredoxínovou a glutatio-

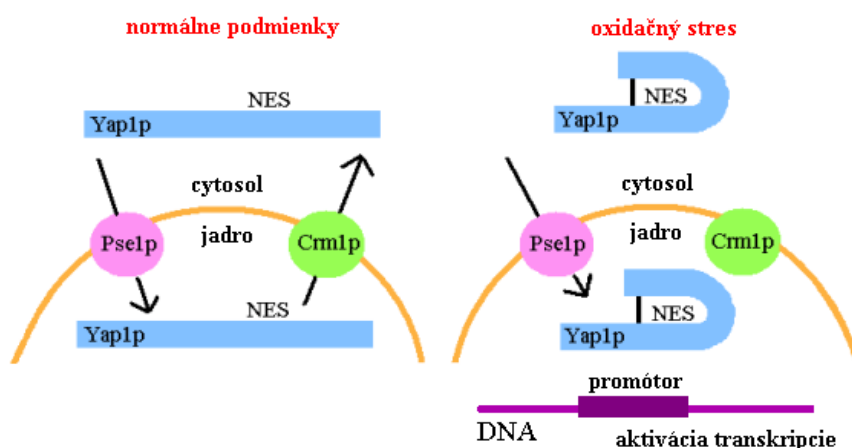
novou. Oxidované proteíny sú redukované pomocou tioredoxínu (v tioredoxínovej dráhe) alebo glutationu (v glutationovej dráhe). Keďže pri týchto reakciách dochádza k oxidácii tioredoxínu resp. glutationu, musia byť tieto zlúčeniny spätne redukované, aby mohli naďalej plniť svoje funkcie. Ich redukcia je zabezpečená reduktázami (tioredoxínreduktázou a glutationreduktázou), ktoré na redukcii využívajú elektróny z NADPH. Následne sa elektróny môžu ďalej prenášať na peroxidázy (tioredoxínperoxidázy alebo glutationperoxidázy), ktoré uskutočňujú redukcii peroxidu vodíka a rôznych organických peroxidov (Toledano a kol., 2003). Takýmto spôsobom sa zabezpečí napríklad redukcia disulfidických mostíkov proteínov, čím sa obnoví pôvodná štruktúra a funkcia proteínov.

Spustenie obranných mechanizmov proti oxidačnému stresu

V prípade zvýšenej hladiny ROS v bunke kvasinky musí kvasinková bunka viesť „naštartovať“ vyššie uvedené obranné mechanizmy. Antioxidačnú obranu spúšťa bunka tak, že začne prepisovať gény, ktorých produkty – proteíny odstraňujú ROS (spomínané superoxiddismutázy, katalázy, peroxidázy, tioredoxíny atď.). Aby k prepisovaniu génov pre antioxidanty došlo iba v prítomnosti oxidačného stresu, v bunkách kvasiniek sa nachádzajú špecifické regulačné proteíny, ktoré sa aktivujú iba pri oxidačnom strese. Najdôležitejším regulátorom odpovede na oxidačný stres je kvasinkový aktivačný proteín (yeast activator protein – Yap1; v prípade, že hovoríme o kvasinke *C. albicans*, sa tento proteín označuje Cap1p) (Schnell, 1992; Alarco a Raymond, 1999; Rodrigues-Pousada a kol., 2004). Tento proteín je prenášaný do jadra bunky, kde spúšťa prepis príslušných génov. Zároveň je však z jadra bunky transportovaný von, aby sa gény neprepisovali v prípade, že bunka nie je vystavená oxidačnému stresu. Keď nie je bunka kvasinky pod stresom, transport proteínu Yap1 do jadra a z jadra je v rovnováhe, teda gény kódujúce antioxidanty prepisované nie sú. V prítomnosti veľkého množstva ROS v bunke sa proteín Yap1 oxiduje, čím sa mení jeho konformácia (v mieste jadrového exportného signálu – NES). Takto pozmenený proteín Yap1 nie je rozpoznávaný exportným proteínom v jadrovej membráne, ktorý teda nedokáže Yap1p vylúčiť. Keďže iný transportný proteín, ktorý prenáša Yap1p do jadra rozpozná aj oxidovaný Yap1p bez problémov, Yap1p sa v jadre hromadí (Kuge a kol., 1998; Azevedo a kol., 2007). Čím viac ROS je prítomných v bunke kvasinky, tým viac molekúl proteínu Yap1 sa oxiduje a teda aj hromadí v jadre bunky. Následne tým viac génov pre antioxidanty sa prepisuje, čím sa vytvorí veľké množstvo antioxidantov, ktoré efektívne detoxifikujú ROS.



Obr. 2. Reaktívne formy kyslíka v bunke kvasinky, ich vzájomné premeny a mechanizmy detoxifikácie (Perrone a kol., 2008).



Obr. 3. Transport regulačného proteínu Yap1 medzi jadrom a cytoplazmou pri normálnych a stresových podmienkach (u modelovej pekárenskej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*).

Záver

Kedže antioxidačné obranné mechanizmy kvasiniek sú zodpovedné za ich odolnosť voči reaktívnym formám kyslíka, vynára sa otázka, či by nebolo možné využiť tieto poznatky na boj proti patogénnym kvasinkám. Ak by sme dokázali navrhnúť inhibitory proteínov zapojených do mechanizmov obrany kvasinkových buniek voči ROS, teoreticky by sa mohla zvýšiť účinnosť usmrcovania patogénnych kvasiniek pri fagocytoze. Podporením nešpecifickej imunitnej odpovede by sa mohlo zabrániť šíreniu infekcie v organizme pacienta a urýchliť liečba mykotického ochorenia.

Abstract

Some yeast species are oportune pathogens, because they can cause diseases. Phagocytosis is among the first defence mechanisms, which are activated in the infected host. Reactive oxygen species (ROS) produced by immune cells during phagocytosis are toxic for yeast cells, but some yeast can overcome their toxic effects. Yeast cell has effective defence mechanisms consisting of antioxidant enzymes and tiol redox systems, which detoxificate ROS. The main regulator of adaptive oxidative stress response in yeast is Yap1 protein, which activates transcription of antioxidant genes in stress conditions. Collecting information about antioxidant defence systems in fungal pathogens is an important part of the basic

research, because inhibitors of these systems could be used to combat yeast pathogens in the future.

Literatúra

- ALARCO, A. M., RAYMOND, M. (1999). The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181: 700–708.
- AZEVEDO, D., NASCIMENTO, L., LABARRE, J., TOLEDANO, M. B., RODRIGUES-POUSADA, C. (2007). The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium sensing domain. *FEBS Lett* 581: 187–195.
- CABISCOL, E., TAMARIT, J., ROS, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3: 3–8.
- FROHNER, I. E., BOURGEOIS, C., YATSYK, K., MAJER, O., KUCHLER, K. (2009). *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* 71: 240–252.
- GRALLA, E. B., KOSMAN, D. J. (1992). Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv Genet* 30: 251–319.
- GUTTERIDGE, J. M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91: 133–140.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, England, p. 5.
- KONTSEKOVÁ, E., KONTSEK, P. (2004). *Základy imunológie*. Vydavateľstvo UK, Bratislava, ISBN 80-223-1828-0.
- KUGE, S., TODA, T., IIZUKA, N., NOMOTO, A. (1998). Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* 3: 521–532.
- LUSHCHAK, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153: 175–190.
- PERRONE, G. G., TAN, S. X., DAWES, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1354–1368.
- RODRIGUES-POUSADA, C. A., NEVITT, T., MENEZES, R., AZEVEDO, D., PEREIRA, J., AMARAL, C. (2004). Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett* 567: 80–85.
- RUIS, H., HAMILTON, B. (1992). Regulation of yeast catalase genes. *Molecular Biology of Free Radical Scavenging System*: 153.
- SCHNELL, N., KREMS, B., ENTIAN, K. D. (1992). The *PAR1* (*YAP1/SNQ3*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* 21: 269–273.
- TOLEDANO, M. B., DELAUNAY, A., BITEAU, B., SPECTOR, D., AZEVEDO, D. (2003) Oxidative stress responses in yeast. V *Yeast stress responses* (Hohmann, S., Mager, W. H., eds), Springer – Verlag Berlin Heidelberg, Berlín, 2003, ISBN 3-540-43926-9, s. 241–287.
- <http://altered-states.net/barry/newsletter493/>
- <http://www.webmd.com/oral-health/thrush-in-the-mouth>



rubriky

DIDAKTIKA PREDMETU

návrhy na spôsob výkladu učiva,
interpretovanie skúseností z vyučovania,
organizovanie exkurzií, praktických cvičení
a pod.

ZAÚJÍMAVOSTI VEDY

odborné vedecké články, najnovšie vedecké
objavy, nové odborné publikácie a pod.

NOVÉ UČEBNICE

nové učebnice z biológie, ekológie, chémie

INFORMUJEME A PREDSTAVUJEME

rozličné aktuálne informácie z rôznych
podujatí v oblasti školstva, informácie
z MŠ SR, z vedeckých inštitúcií, študijné
smery, odbory univerzít v SR, vedecké
pracoviská, uplatňovanie absolventov

NAPÍSAI STE NÁM

námety, otázky čitateľov

OLYMPIÁDY A MIMOŠKOLSKÉ AKTIVITY

informácie o biologických a chemických
olympiádach, podnety na samostatnú
a záujmovú prácu žiakov mimo
vyučovacieho procesu

RECENZIE

posúdenie nových publikácií z odborov

OSOBNOSTI A VÝROČIA

profil osobností z chemických
a biologických vied, jubileá

NÁZORY A POLEMIKY

diskusie z korešpondencie čitateľov

NÁPADY A POSTREHY

rozličné námety použiteľné vo vyučovaní,
pripomienky k učebniciam, možnosti
používania alternatívnych učebníc, iných
pomôcok, demonštrovanie pokusov a pod.

PREČÍTALI SME ZA VÁS

upozornenie na zaujímavé články, knihy,
weby

pokyny pre prispievateľov

Príspevky musia byť dodané v elektronickej verzii
na CD alebo mailom na adresu bech@truni.sk
a jedna kópia v tlačenej podobe.
Príspevky píšete v textovom editore s výstupom
vo formáte .rtf, .doc alebo .odt.

Autori na konci príspevku uvedú celé meno, priezvisko
a titul, adresu pracoviska, pracovné zaradenie
a na konci príspevku sa podpíšu.

Vedecké štúdie a odborné príspevky by mali mať
rozsah 5 až 8 normostrán (jedna normostrana
zodpovedá 30 riadkom po 60 znakov vrátane medzier).
Príspevky informačného charakteru by nemali
byť dlhšie ako 3 normostrany.

Zoznam literatúry je potrebné obmedziť len na najnutnejší
rozsah a pramene citovať podľa normy STN ISO 690.
Prívitame dodanie obrazového materiálu v dobrej kvalite.
Príspevky sú recenzované.
Nevyžiadané rukopisy nevraciam.

poďakovanie

Tento časopis vyšiel v súvislosti s realizáciou projektu „Rozvoj Centra excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl na zlepšenie kvality života“, ITMS kód: 26240120027, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



Agentúra

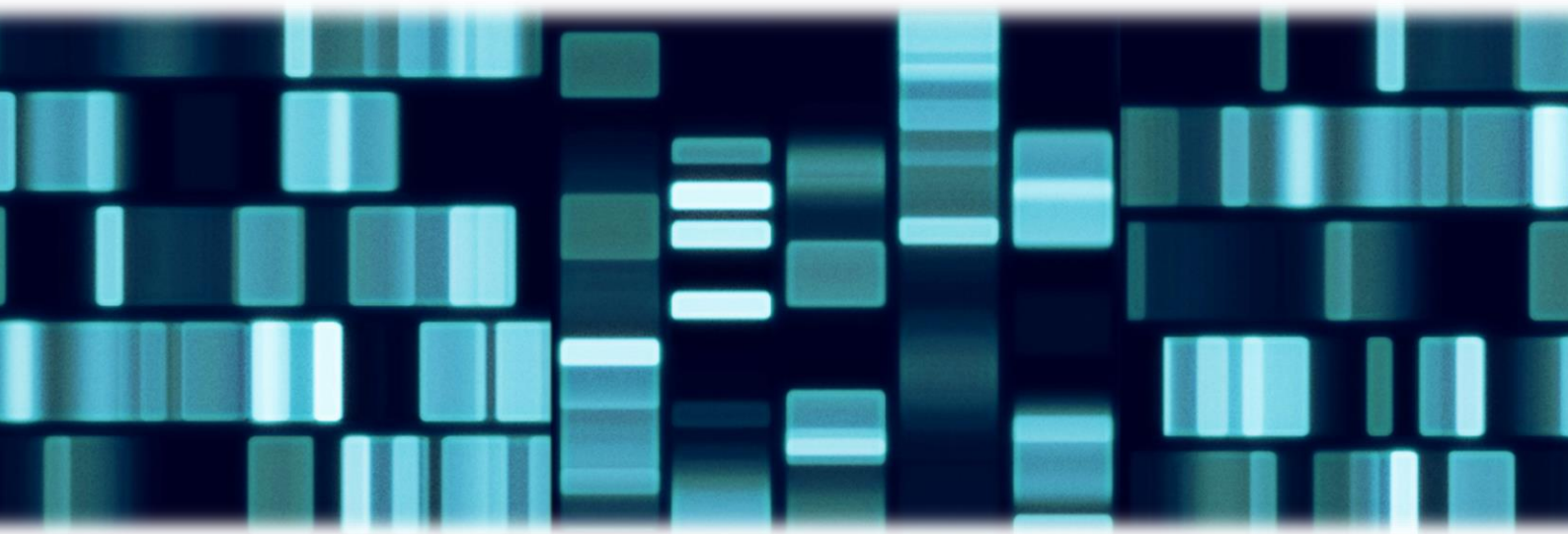
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ



Európska únia

Európsky fond regionálneho rozvoja





ISSN 1338-1024