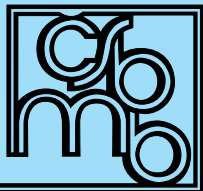


ČESKÁ SPOLEČNOST PRO BIOCHEMII A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

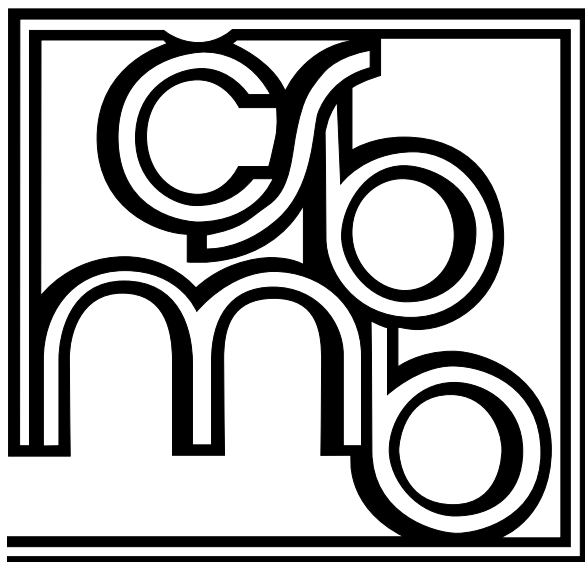


BULLETIN

ČÍSLO 1

ROČNÍK 28 (2000)

ISSN 1211-2526



Určeno pro vnitřní potřebu ČSBMB
Výkonný redaktor: Tomislav Barth ÚOCHB, AV ČR
tel.: (02) 20 183 268
Sponzorem ČSBMB je **BIOTECH** a. s.
Sazba a tisk: grafické studio Venice Cal.
Vychází třikrát ročně v nákladu 550 výtisků
Podávání novinových zásilek povoleno
Ředitelstvím pošt Praha
pod č. 304/1994 ze dne 10. 2. 1994
ISSN 1211-2526

EMBL: [w.w.w.:http://embl-heidelberg.de/](http://embl-heidelberg.de/)
EMBO: <http://www.embo.org>
FEBS: <http://www.febs.unibe.ch/>

BULLETIN

ČESKÉ SPOLEČNOSTI PRO BIOCHEMII A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

<http://CSBMB.img.cas.cz>

Tomislav BARTH - výkonný redaktor

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 00 Praha 6
<barth@uochb.cas.cz>

Jana BARTHOVÁ

Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Karel BEZOUŠKA

Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Marta KOLLÁROVÁ

Přírodovědecká fakulta KU, Mlýnská dolina CH-1, Bratislava, SR

Irena KRUMLOVÁ

Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, Kladenská 48,
160 00 Praha 6 nebo katedra biochemie a mikrobiologie VŠCHT, 160 00 Praha 6,
tel.: (02) 24 35 51 66, fax: (02) 311 37 26, e-mail <irena.krumlova@vscht.cz>

Příspěvky na disketě 3,5", zpracované v textovém procesoru Word či WordPerfect, zasílejte, spolu s vytištěným textem kterémukoli z redaktorů nebo do sekretariátu společnosti. Prosíme, abyste do textu nemontovali ani obrázky, ani tabulky. Připojte je v originále, případně na disketě ve zvláštních souborech, v textu označte, prosím, jen jejich umístění.

Adresa ČSBMB: Kladenská 48, 160 00 Praha 6
tel.: 02/316 74 71

ISSN 1211-2526

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

NOVÁ WEBOVÁ
STRÁNKA NAŠÍ
SPOLEČNOSTI

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

CENA ČSBMB 2000

přihláška do soutěže

Termín odevzdání do 15. 4. 2000

Příjmení:	Jméno:		Titul:	
Ústav/VŠ:				
Adresa:				
Fax:				
Tel.:				
E-mail				
Titul souboru				

Na další straně prosím pokračujte s vyplněním anotace souboru Vaší práce.
Délka anotace nesmí přesahovat jednu stránku A4 psanou fontem Times new roman,
velikost 12, řádkování jednoduché.

Sdělení společnosti

Zpráva o činnosti České společnosti pro biochemii a molekulární biologii za rok 1999	6
Stanovisko Evropské molekulárně biologické organizace (EMBO) ke geneticky modifikovaným organismům	8

Odborné články

P. Hodek: Slepíčí protilátky - perspektiva po nové tisíciletí	10
V. Pliška: Neurohypofysární hormony - pražský příspěvek k jejich chemii a farmakologii	18
J. Patočka: Smrtící cyanobakterie a jejich toxiny	21

Informace ze sekcí

Peptidové zprávy - sekce Biologicky aktivní peptidy	25
Jazyková sekce	29
Sekce separačních metod	30

Oznámení o vědeckých akcích

M. Stiborová XX. Xenobiochemické sympozium	33
L. Kohout, A. Kasal, B. Kohoutek... 18. konference o isoprenoidech . . .	34
European Congress of Clinical Chemistry, Praha, květen 2001	37

Různé

38

Zpráva o činnosti České společnosti pro biochemii a molekulární biologii za rok 1999

V uplynulém roce Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii uspořádala nebo byla spoluorganizátorem řady akcí.

Jednoznačně nejvýznamnější mezinárodní akcí byl „The 4th New EMBO Members' Workshop“ s názvem „Frontiers of Molecular Biology“, který se uskutečnil ve dnech 16.-19. 10. 1999 na Novotného lávce v Praze. Této akci evropského významu se zúčastnilo 39 nových členů EMBO (Evropské molekulárně biologické organizace) a téměř devadesát členů stálých členů EMBO. Součástí konference byla diskuse za přítomnosti politiků a tisku o dopadu molekulární biologie na životní prostředí.

V jarních měsících (8.-11. 3. 1999) spoluorganizovala ČSBMB (spolu s firmou Ekomonitor - vodní zdroje) sympozium „Od laboratorních experimentů k bioremediačním technologiím“. Akce se konala v Seči u Chrudimi a zástupci společnosti zde udělili cenu společnosti za nejlepší plakátové sdělení (cenu obdrželi postgraduální studenti ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT).

V dubnu jsme přivítali významnou návštěvu, a to generálního sekretáře FEBS (Federace evropských biochemických společností) prof. Vito Turka z Josef Stefan Institute v Ljubljani, který zde v rámci své návštěvy (tzv. FEBS Lecture Tour) přednesl přednášku na téma „Cystein Proteinases: Structure, Activation, Antigen Presentation“. Přednáška se konala v Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

V Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR se tak jako každý druhý rok konalo setkání členů sekce biologicky aktivních peptidů ČSBMB (21.-23. 4. 1999).

V rámci spolupráce s firmami pořádala Společnost v areálu Přírodovědecké fakulty UK na Albertově seminář na téma „Analýza proteomu“. Tato akce byla pořádána ve spolupráci s firmou BioTech a.s. a katedrou biochemie PřF UK dne 25. 5. 1999.

Vědecký sekretář ČSBMB zastupoval společnost na zasedání exekutivy FEBS na 26. kongresu FEBS, který se uskutečnil 19.-24. 6. 1999 v Nice. Na tomto zasedání se zástupce naší společnosti stal členem pracovní skupiny FEBS pro podporu výzkumu ve státech východní Evropy.

K další mezinárodní akci pořádané v kooperaci s Ústavem biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha patří organizace 1. česko-švýcarského sympozia o moderních biotechnologiích (4.-7. 9. 1999).

V termínu 14.-16. 9. 1999 ve spolupráci s laboratoří biochemie a mikrobiologie Ústavu ekologie krajiny AV ČR pořádala Společnost v Českých Budějovicích konferenci na téma „Magnetické separace v biověděch a biotechnologiích“. Dále pak ve dnech 7.-9. 10. 1999 ve spolupráci s 1. LF UK a Českou nefrologickou společností 17. sjezd International Society of Blood Purification, který se konal v Praze.

19. 10. proběhlo pracovní odpoledne „Acamprosat - nová dimenze léčby závislosti na alkoholu“, ve spolupráci se Společností pro návykové nemoci ČLS a ústavem klinické biochemie 1. LF UK a VFN. Společnost rovněž spolupracovala na akci „Fotodynamická diagnostika a terapie v České republice“ organizované společně s JEP. Tato akce se konala 3. 11. 1999 v přednáškovém sále Lékařského domu v Praze.

Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii

CENA České společnosti pro biochemii a molekulární biologii 2000



sponzoruje v rámci svých aktivit na podporu vědecké komunity a výzkumu v oblasti biomedicíny a biotechnologií cenu ČSBMB udělovanou od roku 1995 za významný vědecký přínos v oblastech biochemie a buněčné a molekulární biologie. Cena ve výši 1 500 USD bude udělena za význačný přínos v oboru v období 1998/99. Cena kromě finančního ohodnocení zahrnuje plenární přednášku při zahájení sjezdu ČSBMB.

Cena není omezena žádnými speciálními kvalifikačními požadavky s jedinou výjimkou - oceněný musí být občanem České republiky. Formulář pro podání přihlášky do soutěže můžete obdržet na adrese (e-mail: irena.krumlova@vscht.cz). S vyplněným formulářem se předkládá po jednom výtisku publikací vydaných v roce 1998 nebo/a 1999, z nichž je zřejmý zásadní přínos předkladatele k publikovaným výsledkům (zpravidla první autor).

Podrobnosti soutěže budou uvedeny na internetové stránce společnosti.

Anotace vítězného souboru prací bude otištěna jako příspěvek ve sborníku příspěvků sjezdu společnosti.

Za Milošem Čihařem



Dne 26. října 1999 zemřel Ing. Miloš Čihař, dlouholetý hospodář naší biochemické společnosti. Dvě generace českých a slovenských biochemiků si ho zajisté pamatují jako všudypřítomného a nepostradatelného organizátora biochemických sjezdů, dnů, konferencí, seminářů, kurzů a řady dalších akcí.

Miloš Čihař se narodil 7. srpna 1922 v Praze. V roce 1943 absolvoval klasické gymnázium a v roce 1949 Vysokou školu chemicko-technologickou v Praze.

Jeho profesní zájem směřoval od samého počátku do zdravotnictví, ať již jako pracovníka Výzkumného ústavu endokrinologického, Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, externího učitele na Státní zdravotnické škole či pracovníka odboru vědeckého plánu ČSAV v oblasti biologických a zdravotnických věd. S velkým entusiasmem se přitom věnoval organizačnímu a ekonomickému zajišťování činnosti Československé společnosti biochemické při ČSAV a jejím zahraničním kontaktům.

Miloš Čihař procházel životem plný optimismu, se smyslem pro humor a pohodu. Miloval hory, turistiku, lyžování a byl nadšeným kajakářem. Jeho velkou láskou byla klasická hudba. Žel, posledních osm let svého života byl nucen statečně bojovat s vážným tělesným postižením.

Záslužná činnost Miloše Čihaře není zapomenuta nejen jeho přímými spolupracovníky, ale zajisté ani bezpočtem řadových členů naší biochemické společnosti, jimž vždy věrně a ochotně pomáhal.

Jan Škoda

Zemřel velký přítel ÚOCHB, profesor dr. L. M. Sirakov, DrSc

Profesor L. M. Sirakov byl aspirantem Dr. I. Rychlíka na ÚOCHB v polovině šedesátých let. Vypracoval a obhájil svoji kandidátskou práci na našem ústavě. pracoval pak několik let v USA (Birmingham, Alabama) a po svém návratu do Bulharska zastával významné funkce na pracovištích Lékařské akademie věd v Sofii. Podobně jako on i jeho žena a později i dcera obhájily své kandidátské práce na pracovištích v Praze. Profesor Sirakov zemřel po dlouhé těžké nemoci 7. prosince v Sofii. Česká biochemická pospolitosť ztrácí jeho odchodem věrného přítele a spolupracovníka.

T. Barth

11. 11. 1999 navštívil Společnost a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR Dr. Miklós Szekeres z Biological Research Center maďarské Akademie věd v Szege-du, který zde měl přednášku o nové skupině rostlinných hormonů. Další akcí v rámci spolupráce s firmami byl seminář „PCR v medicíně“ (18. 11. 1999 společně s firmou Sigma-Aldrich).

Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii byla v uplynulém roce nositelem dvou grantů. A to grantu MŠMT ČR programu INGO na reprezentaci české biochemie a molekulární biologie ve FEBS, IUBMB a EMBC. Předseda společnosti je rovněž zástupce ČR v EMBC a členem EMBO. Další grant byl společností udělen MZd ČR na uspořádání série přednášek zaměřených především na lékařskou veřejnost (viz přednášky).

Společnost již tradičně vydává Bulletin ČSBMB (třikrát do roka), jehož součástí je i informační FEBS Bulletin, který je vydáván v Praze a distribuován všem společnostem začleněným do FEBS.

K dalším službám Společnosti patří odborná garance mladým biochemikům při žádosti o FEBS stipendia, stipendia IUBMB nebo EMBC. Podmínkou k získání těchto stipendií je alespoň roční členství ve Společnosti.

V České společnosti pro biochemii a molekulární biologii je zájmové sdruženo 530 biochemiků a molekulárních biologů ze všech pracovišť v České Republice. Veškeré informace o ČSBMB najdete na webovské stránce společnosti pod adresu: <http://csbmb.img.cas.cz>.

V Praze dne 15. 1. 2000

Prof. RNDr. Václav Pačes, DrSc.
předseda ČSBMB

NOVÁ WEBOVÁ STRÁNKA

NAŠÍ SPOLEČNOSTI

<http://CSBMB.img.cas.cz>

Stanovisko Evropské molekulárně biologické organizace (EMBO) ke geneticky modifikovaným organismům

Geneticky modifikované organismy (GMO) byly poprvé vytvořeny před 30 lety. U široké veřejnosti však po dlouhou dobu nevyvolaly významnější odezvu. Tento nedostatek zájmu jako by odrážel snadnost, se kterou byly pomocí GMO řešeny problémy v medicíně a zemědělství. Například snadný zdroj lidského inzulinu produkovaného geneticky modifikovanými bakteriemi v tichosti nahradil nedostatek vepřového inzulinu využívaného k léčbě stále rostoucího počtu diabetiků. Toto využití GMO nebylo nikde oslavováno, ačkoli zabránilo velmi nepříjemné krizi.

Nezájem veřejnosti však vystřídal strach, když vyšlo najevo, že některé krevní deriváty používané v lékařství byly nakaženy HIV a virem žloutenky typu B, a způsobily tak mnoho případů úmrtí. V nedávné době vyvolala hrozba šíření tzv. „nemoci šilenců krav“ skutečné obavy veřejnosti, zejména ve Velké Británii. V těchto případech sice nešlo o využití GMO, ale v očích veřejnosti GMO, viry, bakterie a DNA představují infekční materiál, a jsou proto považovány za nebezpečné. Toto chápání GMO představuje jeden ze specifických důvodů, proč se Evropané obávají konzumace potravin připravených s využitím GMO a odmítají šíření těchto technik v potravinářství. V širším rámci to pak představuje odmítání globalizace zemědělské výroby. Navození stavu tzv. „zvýšené pozornosti ke GMO“ také přispívá k přežívání ekologických organizačních typů Greenpeace. A konečně, veřejnost ví, jak hrozným způsobem byla v tomto století zneužita genetika.

Z toho všeho vyplývá, že vědci si musejí uvědomit, že obavy veřejnosti z využívání GMO jsou podloženy zdravým skepticismem k obecnějšímu jevu, totiž k možnému zanedbání bezpečnosti při přípravě potravin a při zdravotní péči. Tento skepticismus je bohužel silně přizíván ideologickými předsudky a nedostatečným porozuměním. Proti ideologickým představám toho vědci mnoho nezmůžou, ale mají dost možností, jak posílit veřejnou informovanost.

Je konzumace „cizí“ DNA nebo bílkovin zdraví škodlivá? Pokud ano, žijeme nebezpečně už od počátků evoluce. Všechno, co požíváme, obsahuje cizorodou DNA nebo bílkoviny. Dá se tedy říci, že úplně všechny GMO jsou bezpečné? Ovšemže ne! Jsou přece známy toxiny a jiné jedovaté bílkoviny (mnoho běžných rostlin je přirozeně obsahuje). Proto se geneticky modifikované plodiny či potravinářské suroviny přísně testují, zda jsou „v podstatě ekvivalentní“ s běžnými druhy (tj. jsou-li výsledky laboratorních analýz ve všech jejich podstatných charakteristikách stejné, v rámci normální variace). Využívání GMO tedy nelze paušálně povolit, ale zároveň nemá smysl tuto technologii zcela zamítnout. Jako vědci musíme trvat na tom, aby se ke každému produktu GMO přistupovalo se stejnou pozorností jako k jakémukoli tradičnímu produktu. Stejně důrazně musíme trvat na tom, že útokům na vědu a výzkum při řešení využití GMO je nutno čelit rozumem a fakty. V žádném případě nesmí racionální diskusi nahradit terorismus.

Riziko, že využívání některých GMO by mohlo mít škodlivé důsledky pro životní prostředí (mnoho z nich je přitom určeno ke zmírňování škod na životním prostředí), musí být objektivně zhodnoceno a postaveno proti možnosti vážnějších škod, které by jinak dále působily konvenční zemědělské prostředky. Navíc je třeba vzít v úvahu, že rizika spojená s GMO jsou velmi omezená při existenci záplavy přirozených mutantních variant; populace všech organismů obsahují soubory mutantních variant a genetická výměna mezi různými druhy organismů je běžný, i když ne příliš častý jev. Gen-

Vážené dámy, vážení pánové,

dovolte, abychom Vás informovali o přípravných **14. Kongresu klinické chemie a laboratorní medicíny EUROMEDLAB**, který se bude konat v Praze v Kongresovém centru, ve dnech 26. května až 1. června 2001. Organizátorem kongresu je spolu s IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP. K účasti jsou pozváni přední světoví odborníci v oboru klinické chemie a laboratorní medicíny.

program kongresu bude rozdělen na plenární přednášky, postery, workshopy

a diskuse u kulatého stolu. Účastníkům bude dána možnost jak aktivně, tak i pasivně se zúčastnit vědeckého programu. Ten se bude týkat klinické chemie, imunochemie, toxikologie, endokrinologie, molekulární biologie a laboratorní hematologie. Speciální workshopy se budou zabývat informatikou, pregraduálním i postgraduálním vzděláváním, managementem v laboratořích a kvalitou kontroly.

Nedílnou součástí kongresu bude také výstava chemických a farmaceutických firem, výrobců a distributorů technického zařízení a vybavení laboratoří, nakladatelství apod. Plánujeme také rozsáhlý kulturní program, jako např. uvítací recepci, koncert ap. a připravujeme bohatou nabídku vycházek, výletů a turistických akcí.

Rádi Vás přivítáme na našem propagačním stánku v Kongresové centru ALDIS v Hradci Králové během IV. Celostátního sjezdu České společnosti klinické biochemie a s potěšením Vám poskytneme bližší informace o kongresu EUROMEDLAB 2001, předáme předběžné přihlášky a drobné propagační dárky.

Na vaši návštěvu se těší

Monika Šenderová
sekretariát kongresu

doc. MUDr. Petr Schneiderka, CSc.
předseda organizačního výboru



přenos informace v ditrofickém systému hmyz – rostlina, zejména v souvislosti s obrannými mechanismy rostlin. Uvědomíme-li si, že hmyz představuje přes 90 % všech živých organismů a asi 80 % veškerého hmyzu jsou býložravci, pak se vnučuje otázka, jak je možné, že tu ještě nějaké „bezbranné“ rostliny vůbec rostou. Odpověď na tuto otázku je zdánlivě jednoduchá - rostliny se dokážou účinně bránit hmyzím škůdcům chemickými obrannými látkami různých typů.

Mechanismus vzniku a účinku těchto látek je v současné době předmětem intenzivního výzkumu a nejnovější poznatky v této oblasti byly na konferenci shrnuty v přednáškách vědců, kteří patří v tomto směru k absolutní světové špičce. W. Boland (MPI for Chemical Ecology, Jena) a J. Tumlinson (U.S. Department of Agriculture, Gainesville) věnovali své přednášky biosyntéze těkavých látek, jejichž vznik je v rostlině indukován hmyzím atakem a které jsou schopné atrahovat predátory škůdce. Mechanismus biosyntézy těkavých isoprenoidů mevalonátovou cestou a alternativními pochody byl diskutován rovněž v přednáškách M. Rohmera (Université Luis Pasteur, Strasbourg) a G. Blomquista (University of Nevada, Reno). Stereochemií a mechanismem produkce netěkavých isoprenoidních pryskyřic, dalšího obranného prostředku rostlin, se zabývala přednáška R. Coatese (University of Illinois, Urbana), zatímco přednáška D. Morgana (Keele University, Keele) byla zaměřena na biosyntézu oxidovaných triterpenoidů, zejména azadirachtinu, který se vyznačuje vysokou protipožerovou a insekticidní aktivitou. Chemické rozmanitosti v přírodě s ohledem na obecnou funkci atraktantů a deterentů se věnovala ve své přednášce U. Jacobsson (Royal Institute of Technology, Stockholm).

Druhou skupinu představovaly metodiky izolace, identifikace a syntézy sémiokemikálií. W. Francke (University Hamburg, Hamburg) prezentoval struktury nových těkavých isoprenoidů produkovaných vybranými druhy hmyzu (tesaříci, mravenci, parazitující včely). Využití stereoselektivních syntetických postupů (včetně biokatalytických) při syntéze isoprenoidních feromonů a juvenoidů byla věnována přehledná přednáška E. Serebryakova (Institute of Organic Chemistry, Moskva). Specifickému problému izolace, identifikace a syntézy isomerních 3-methyl-himachalenů, feromonu dvoukřídlého přenašeče (*Lutzomyia longipalpis*) tropické nemoci způsobené parazity *Leishmania* se věnoval A. Hooper (IACR-Rothamsted, Harpenden).

Účastníci ocenili, že konference byla uspořádána v Prachaticích. Líbilo se jim město, jeho okolí a celé Jižní Čechy, svým dílem přispělo i krásné letní počasí bez jediného mráčku po celou dobu trvání konference.

Na závěr byli všichni přítomní pozváni polskou stranou na 19. konferenci o isoprenoidech, která se bude konat v roce 2001 v Gdaňsku.

L. Kohout, A. Kasal, B. Koutek

ové inženýrství prováděné člověkem je ve srovnání s tím poměrně zanedbatelný zásah.

Přesto je třeba předcházet i velmi nepravděpodobným případům, které by mohly mít nežádoucí důsledky. Proto se provádí mnoho testů bezpečnosti jak tradičních plodin, tak i plodin geneticky modifikovaných. Pokud nebudou GMO spolehlivě otestovány v praxi, nebude možné využít hmatatelných ekologických výhod, které přinášejí. Jako příklad lze uvést výrobu biodegradovatelných plastů z geneticky modifikovaných rostlin místo z ropy. Také plodiny, které potřebují méně vody nebo chemických hnojiv, jsou zjevně důležité pro zemědělskou výrobu. Modifikované plodiny poskytující levné požitelné vakcíny nebo vysoký obsah prekursoru vitamínu A, který předchází nejběžnější formě slepoty ohrožující milióny obyvatel třetího světa, by se brzy mohly stát realitou.

Některé směry tohoto výzkumu jsou pokládány za „nepřirozené“. To je ovšem zase otázka pohledu na věc. Za stejně „nepřirozené“ by mohlo být označeno po tisíceletí trvajícím šlechtění, které využilo přirozených, mutantních variant, aby „stvořilo“ rostliny a zvířata s lépe využitelnými vlastnostmi, jako např. s vyšším výnosem či velikostí a přírůstkem, nebo s vyšší odolností proti škůdcům.

Lidská rasa (čítající 6 miliard jedinců a stále rostoucí) vstoupila do epochy, v níž konvenční přístupy k biologickým problémům narážejí na své meze. Zemědělství musí řešit problémy spojené se závislostí výnosů na chemii, se suchem, s vysokou zasořeností půdy a se škůdci; tyto problémy nelze řešit pomocí konvenčních metod. Také požadavky na vysoce účinná a dostupná léčiva pro naši stárnoucí populaci bude pomocí samotných konvenčních metod těžké uspokojovat. Využití některých GMO by s sebou sice mohlo nést určitá rizika, ale rizikem bylo i zavádění jiných nových technologií, které se později ukázaly jako bezpečné a nedocenitelné, jako například elektřina. Tato rizika by však měla být vyvářena potenciálními výhodami. Mnoho GMO bezpochyby poskytne reálnou možnost, jak vyřešit klíčové problémy, které zasahují celou lidskou populaci.

Ze všech těchto důvodů, a zejména s ohledem na obrovské problémy, kterým je lidstvo vystaveno, musejí molekulární biologové pokračovat ve výzkumu, a zároveň seznamovat veřejnost jak s riziky a výhodami GMO, tak i s přínosy jejich průběžného testování. EMBO doporučuje, aby současnou polarizovanou debatu nahradila rozumná diskuse. Musíme vytvořit platformu, která bude podporovat všechny, kdo se podílejí na zlepšování životní úrovně, a uvádět přitom v soulad vědecký potenciál, společenské potřeby a požadavky dlouhodobých bezpečných řešení globálních problémů.

NOVÁ WEBOVÁ STRÁNKA
NAŠÍ SPOLEČNOSTI
<http://CSBMB.img.cas.cz>

Slepičí protilátky - perspektiva pro nové tisíceletí

Petr Hodek

Univerzita Karlova v Praze, přírodovědecká fakulta, katedra biochemie, Hlavova 2030, Praha 2, hodek@prfdec.natur.cuni.cz

Úvod

Protilátky jsou považovány za klíčové proteiny specifické imunitní reakce organismu. Tyto imunokompetentní bílkovinné makromolekuly jsou produkovány B-lymfocyty jako odpověď organismu na průnik cizorodé látky (antigeny) do vnitřního prostředí. Ve většině případů vykazují antigenní vlastnosti cizorodé látky o vysoké relativní molekulové hmotnosti. Schopnosti vyšších organismů produkovat specifické protilátky lze cíleně využívat jak pro navození či zvýšení imunity v humánní i veterinární medicíně (vakcinace), tak k získání protilátek proti podaným antigenům. Protilátky jsou pak nejčastěji izolovány z krve experimentálního zvířete (např. potkana, králíka, ovce, prasete, koně apod.), která je získávána buď několika odběry během života, nebo srdeční punkcí vedoucí ke smrti zvířete. Dalším zdrojem protilátek, ovšem podstatně méně využívaným, je kolostrum savců např. krav. Jak z krve tak z kolostra jsou získávány protilátky, které jsou označovány jako polyklonální, protože je produkují různé klonny B-lymfocytů. Vzhledem k tomu, že je jejich specifita zaměřena zpravidla na více antigenních determinant cizorodé látky, jsou označovány jako polyspecifické protilátky. Na rozdíl od tohoto typu protilátek, lze hybridomovou technologií, např. v těle potkanů, kterým byly implantovány fúzní buňky sleziny, připravit monoklonální protilátky, které jsou vytvářeny pouze jedním klonem B-lymfocytů. Proto tyto protilátky interagují výlučně s jediným místem na antigeny - jsou tedy monospecifické.

Jak monoklonální, tak polyklonální protilátky jsou široce používány v klinické praxi pro stanovení např. úrovní vlastních protilátek (HIV test, IgE), proteinů spojených s patologickými stavy (nádorové markery, myoglobin) nebo nízkomolekulárních látek (progesteron). Značné množství diagnostických technik používaných v klinicko-biochemických laboratořích je převedeno na ELISA stanovení v provedení kompetitivního nebo záchytového protokolu. Velmi běžné jsou i diagnostické proužky (stripky) s vázanou specifickou protilátkou užívané k orientačním stanovením vyšetřovaného antigeny. Vedle diagnostického použití jsou protilátky aplikovány jako antidota neutralizující např. toxiny (tetanotoxin, hadí jed) nebo pro tzv. pasivní imunizaci organismu proti např. průjmovým onemocněním mikrobiálního i virového původu (E. coli, rotavirus).

Neméně významné místo zaujímají protilátky ve vědeckovýzkumné práci, kde slouží k detekci či stanovení rozličných nízko- i vysokomolekulárních biomolekul. Běžně jsou k těmto účelům používány imunochemické techniky jako např. imunodifuze, ELISA a Western blotting. Protilátky nacházejí použití i při studiu interakcí receptorových makromolekul s ligandy nebo aktivity enzymů, protože mohou svou vazbou na studovanou molekulu inhibovat její vazebnou nebo enzymovou aktivitu.

jednotlivými organismy a pak se jedná o tzv. sémiochemi-kálie, kam patří jednak f e r o m o n y (v případě komunikace v rámci jednoho druhu), jednak allelochemikálie (v případě mezidruhové komunikace).

Konference byla zahájena „Šormovou“ přednáškou Dr. Jaroslava Kalvody (Ciba-Geigy, Švýcarsko), který se v úvodu zmínil o historii steroidní chemie, v níž svého času působily velké osobnosti chemie a kde byly rozpracovávány mnohé nové metody organické syntézy i analýzy. Dále referoval o dvou svých netypických steroidních tematech: zatímco v tradiční steroidní chemii býval tetracyklický skelet více méně neměnný a proměňovány byly sub-stituenty, byl v jeho první doméně rigidní steroidní skelet rozvolněn tím, že byly postupně rušeny ty či ony skeletální C-C vazby - příčky rigidní stavby. Tak byly vypracovány postupy k přípravě 5,10-seko, 8,9-seko, 13, 14-sekoderivátů.

Jeho druhou netypickou (ne)steroidní doménou bylo využití steroidní molekuly jako konstrukčního bloku, na němž byly tu testovány vazby s určitým receptorem (např. angiotensinu II), tu konstruovány specifické peptidické řetězce (např. mezi aminoskupinami umístěnými v prostorově definovaných axiálních polohách 18 a 19).

Po přednášce byla Dr. Kalvodovi předána medaile a dip-lom připomínající skutečnost, že laureát byl poctěn proslovením historicky první Šormovy přednášky.

Hlavními tematy steroidní chemie byly chemie neuro-steroidů a brassinosteroidů. První tema bylo uvedeno profesorem Robelem z pařížského INSERMu, který je spoluautorem samotného pojmu „neurosteroid“. Už proto byl v přednášce vedle nových faktů uveden i celkový přehled biochemie a fyziologie těchto látek. Prof. Covey (Washington University School of Medicine) prezentoval rozsáhlou práci o syntéze a vlastnostech enantiomerů přírodních neurosteroidů a prokázal enan-tio-selektivitu GABAA receptorů v případě 5 α -pregnanových derivátů. Práce české skupiny (ÚOCHB, Praha) v této oblasti byly věnovány syntéze analogů epalonu modifikovaných v kruhu B a jejich in vivo aktivitě.

Druhé kompaktní téma - brassinosteroidy - pokrývalo oblast jejich biosyntézy (B. Schneider, M.P.I. for Chemical Ecology, Jena), molekulárního modelování aktivních látek (C. Brosa, Institut Químic de Sarriá, Barcelona) i studií zaměřených k jejich výrobě (V. Khripach, Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk). Přednášky byly doplněny řadou posterů autorů převážně běloruských, českých a španělských.

V dalších plakátových sděleních se vyskytovala témata odvozená od potřeby přístupu k biologicky aktivním steroidům, jako byly vitamin D (skupina prof. J. Wichy, ICHO PAN, Varšava), ekdyson a kardiosteroidy. Výrazně cytostatický cefalostatin, tj. dimerní steroidní pyrazin, vyprovokoval vznik dvou nezávislých studií v různých národních laboratořích (J.W. Morzycki, Institute of Chemistry, Bialystok; I. Černý, ÚOCHB, Praha). Naproti tomu čistě mezinárodní spolupráce se uplatnila při přípravě tetramerního steroidního derivátu, v němž čtyři molekuly kyseliny cholové jsou součástí supramolekulárního porfyriu (M. Dukh). Priorita Evropské unie, kladoucí důraz na využití odpadů - zvláště zemědělských - jako suroviny nepotravinářských výrob, se projevila v pracích holandské skupiny (A. DeGroot, Wageningen University, Wageningen) o využitelnosti solanidinu pro steroidní výrobu.

Poněkud stranou tentokrát zůstaly přednášky z oboru biosyntézy (M. Okamoto, Osaka University Medical School) a biotechnologie (S. Mahato, Indian Institute of Chemical Biology, Calcutta) a plakátová sdělení o enzymologii steroidů.

Hlavní přednášky v oblasti sémiochemikálií byly orientovány na dvě problematiky. První z nich byla biosyntéza isoprenoidních signálních látek, které zprostředkují

zhodnoceny byly totiž i objevy, které byly pro xenobiochemii klíčové a ovlivnily směr jejího celkového vývoje. Zajímavý přehled to byl jistě pro všechny účastníky. Neocenitelný však byl pro xenobiochemické badatele mladších ročníků (včetně studentů), jež jsou v xenobiochemii spíše nováčky, a kterých byl na sympoziu potěšitelně hojný počet.

Odborná i neformální diskuse probíhala nejen při prezentacích přednášek a posterových sdělení, ale i při „kulatém diskusním stole“ organisovaném první den jednání. Je navýsost cenné, že se diskuse i celý průběh XX. Xenobiochemického symposia nesly nejen na vysoké odborné úrovni, ale i v ryze přátelském duchu výměny názorů a experimentálních zkušeností, které budou zcela jistě využity na domácích pracovištích účastníků tohoto vědeckého setkání. O účastníky symposia bylo vzorně pečováno jak při technické organizaci vědeckých sdělení, tak po stránce ubytování a z hlediska gastronomického. Dík za perfektní průběh symposia, přípravu a vydání abstraktů prezentovaných příspěvků i vytvoření nádherné atmosféry patří především organisátorům akce v čele s prof. Ing. M. Mikem, DrSc.

V Praze, 28.6.1999

M. Stiborová, L. Kameníková

18. konference o isoprenoidech

se konala ve dnech 10. až 16. září 1999 v Prachaticích. Původně bylo plánováno, že účastníci konference budou ubytováni ve dvou spolu sousedících hotelích (Park a Garnet), vzhledem k velkému zájmu však byla část účastníků ubytována také v hotelu Koruna. Vlastní konference probíhala v konferenčním sálu hotelu Park. Konference se zúčastnilo 114 účastníků a 8 doprovázejících osob. Zahraničních účastníků (z Anglie, Austrálie, Belgie, Dánska, Francie, Holandska, Indie, Itálie, Japonska, Maďarska, Mexika, Německa, Polska, Rakouska, Ruska, Slovinska, Španělska, Švédska, Švýcarska, Ukrajiny a USA) bylo 87, spolu s doprovázejícími osobami celkem 95.

Konference o isoprenoidech se konají pravidelně každý druhý rok střídavě v Československu, později v České republice, a Polsku od roku 1967, původně každý rok jako konference o steroidech, později ve dvouletých obdobích jako konference o isoprenoidech. Na pořádání v té které zemi se vždy zúčastňuje i druhá strana.

Během konference bylo předneseno celkem 11 hodinových a 11 půlhodinových přednášek, prezentováno bylo 70 posterů. Z posterů vybral organizační výbor 6 sdělení pro přednesení ve formě 15 minutových přednášek. Abstrakta všech přednášek a posterů byla vydána jako zvláštní číslo Chemických listů 1999, 93, S1 až S69 (ISSN 0009-2770), které obdrželi všichni účastníci konference.

Isoprenoidy tvoří velkou skupinu přírodních látek téměř univerzálně zastoupených v rostlinné i živočišné říši. Proč si příroda vybrala právě tento typ organických sloučenin pro zajišťování různých funkcí, a jakými způsoby se tyto sloučeniny uplatňují v nejrozmanitějších životních pochodech, to byla témata této konference.

Konference se věnovala v podstatě jen jednomu typu iso-prenoidů, jejichž společným jmenovatelem je signální funkce v živých organismech. Hovořilo se o látkách, které buď přenášejí vzkaz mezi buňkami či tkáněmi živočichů resp. rostlin, tedy hormonech a neurotransmitérech, nebo zprostředkují komunikaci mezi

Po imobilizaci na vhodný nosič jsou protilátky velmi cenným nástrojem pro afinitní izolaci antigenů z komplexní směsi popř. slouží k jeho zakoncentrování z extrémně zředěných roztoků.

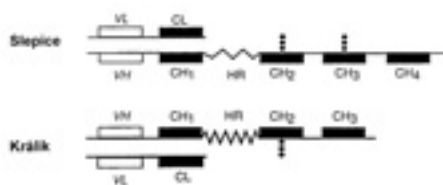
V posledním desetiletí se stále častěji v literatuře objevují práce, v nichž autoři použili místo běžných savčích protilátek imunoglobuliny získané z ptačích vajec. Tyto protilátky, které jsou v naprosté většině aplikací použitelné stejně dobře jako protilátky savcí, byly až do nedávna neprávem opomíjeny. Ovšem v některých parametrech tyto protilátky dokonce předčí savčí ekvivalent. Dá se tedy předpokládat, že je jen otázkou času, kdy se ptačí protilátky, především slepic kura domácího (*Gallus domesticus*), rozšíří v povědomí vědců a aplikačních pracovníků jako velmi perspektivní náhrada savčích imunoglobulinů.

Ptačí imunoglobuliny

Savci chrání své potomstvo v časně postnatálním období pasivní imunizací, kterou zajišťují protilátky obsažené v kolostru. I v pozdějších etapách vývoje mláďat je mateřské mléko zdrojem protilátek neutralizujících patogeny v jejich trávicím traktu. Naproti tomu ptáci využívají jinou strategii ochrany potomstva. Při zrání vajíčka jsou krevní imunoglobuliny, odpovídající IgG savců, koncentrovány ve žloutku, zatímco IgA a IgM spolu s dalšími proteiny jsou ve vejcovodu sekretovány do bílku. Koncentrace IgG ve žloutku je cca 1,3-1,9x vyšší než v krvi slepice (Rose a spol., 1974, Sunwoo a spol., 1996). Po vylíhnutí, kuře zatahuje do svého těla žloutkový vak, který pak slouží jako významný nutriční zdroj a díky přítomným imunoglobulinům k pasivní imunizaci mláďete. Původně žloutkové IgG potom cirkulují v krvi kuřete, zatímco úlohu pasivní imunizace v zažívacím traktu zajišťují IgA a IgM.

U savců je popsáno pět základních tříd imunoglobulinů (IgA, IgD, IgE, IgG a IgM), naproti tomu u ptáků byly nalezeny jen výše zmíněné tři třídy (IgA, IgG a IgM). Navíc se struktury odpovídajících si imunoglobulinů ptáků a savců v mnoha ukazatelích závažně liší. Ptačí a savčí IgG mají rozdílný počet konstantních domén v těžkém řetězci. Zatímco je ptačí IgG, podobně jako savčí IgE a IgM, tvořen čtyřmi konstantními doménami, IgG savců obsahuje jen tři (viz obr. 1). U savců pravděpodobně došlo ke ztrátě druhé domény těžkého řetězce, z níž zbyl jen krátký úsek, který plní funkci „pantu“ (hinge region), typickou pro savčí IgG (Warr a spol., 1995). Tento úsek poskytuje značnou flexibilitu oběma ramenům savčí molekuly IgG, což zvýrazňuje její bifunkčnost. Vzhledem k odlišnostem IgG z obou zdrojů a faktu, že slepičí IgG jsou obsaženy kromě krve též ve žloutku, doporučili již roku 1969 Leslie a Clem pro ptačí IgG vhodnější označení IgY (z angl. yolk). Zajímavé je zjištění, že stejný rozdíl v počtu konstantních domén zjištěný v případě třídy IgG je i mezi ptačími a savčími IgA. Před-

Obr. 1. Srovnání ptačích IgY a savčích IgG na příkladu slepice a králíka. Jednotlivé domény struktur imunoglobulinu jsou prezentovány obdélníky, kde V je variabilní a C konstantní oblast lehkého (L) a těžkého (H) řetězce. HR (hinge region) označuje pantovou oblast. Tečkované jsou vyznačeny sacharidové struktury. (Převzato z práce Shade a Hlinak, 1996).



pokládá se, že v průběhu evoluce se dnešní ptačí IgY i oba savčí IgG a IgE vytvořily ze společného základu, kterým byl imunoglobulin podobný současnému IgY. Stejně závěry implikuje i detailní analýza sacharidové složky savčích a ptačích imunoglobulinů (Ohta a spol., 1991).

Charakteristika a vlastnosti IgY

IgY je majoritní ptačí imunoglobulin, který se z pohledu své funkce v organismu i imunochemického použití nejvíce podobá savčímu IgG. Již v roce 1962 byl IgY identifikován Williamsem jako gama globulin ve frakci označované gama livetin. Jeho koncentrace v krvi dosahuje 5-6mg/ml, zatímco ve žloutku se pohybuje v rozmezí 10-25mg/ml (Leslie a Martin, 1973; Rose a spol., 1974). V obou případech jsou koncentrace IgY nižší než IgG v krvi savců, např. u králíka dosahuje koncentrace 35mg/ml (Hatta a spol., 1993).

Vzhledem k tomu, že je těžký řetězec IgY o jednu konstantní doménu delší než v případě IgG je i relativní molekulové hmotnosti (RMH) 1,8x10⁵ celé IgY molekuly vyšší než IgG. Pro disociované řetězce IgY byla SDS elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí stanovena RMH 6,4x10⁴ pro těžký řetězec (HC) a 2,8x10⁴ pro lehký řetězec (LC) (Hatta a spol., 1993). Přítomnost čtvrté konstantní domény CH2 se dále projevuje i v ovlivnění schopnosti IgY vytvářet s antigeny imunoprecipitát. Důvodem je pravděpodobně rozdílnost konformace obou typů imunoglobulinu. Absence „pantové oblasti“ u IgY snižuje vzájemnou pohyblivost ramen nesoucích varibilní domény, což do určité míry stericky brání prosítování binárních komplexů antigen-protilátka, které je zásadní pro vznik precipitátu (Gallagher a Voss, 1974). V některých případech, zejména pokud se jedná o antigeny s nižší RMH (<3x10⁴), nedochází k precipitaci komplexu i přes velmi silnou vazbu mezi IgY a antigenem (McLaren et al., 1994). Naproti tomu byla popsána řada slepičích protilátek, které fungují v precipitačních testech stejně dobře jako králíčí IgG i bez nutnosti přídavku sloučenin podporujících precipitaci (napo. PEG 8000) (Polson a spol., 1980). S přítomností další konstantní domény CH2 u IgY souvisí i podstatně (až 2x) zvýšený obsah cukru. Právě na této doméně HC je totiž další místo pro vazbu cukerné struktury. Díky vysokému obsahu mannosy (110nmol/mg IgY) v antenálních částech oligosacharidu jsou IgY velmi silně vázány konkanavalinem A (Hodek, nepublikované výsledky). Sacharidové struktury IgY jsou naprosto vyjímečné, protože obsahují neobvykle glykosylované oligosacharidy oligo-mannosového typu (Ohta a spol., 1991).

Další odlišnost IgY a IgG spočívá v hodnotě pI. IgY vykazují hodnotu pI posunutou přibližně o jednotku pH do kyselé oblasti. Možná právě tato odlišnost je zodpovědná za rozdíly ve stabilitě IgG a IgY pozorované v silně kyselém prostředí. Zatímco po 2-hodinové inkubaci IgY při pH 2 ztrácí až 90% aktivity, IgG zůstávají za těchto podmínek z více než 45% aktivní (Hatta a spol., 1993). I v případě termální stability jsou slepičí IgY poněkud labilnější než králíčí IgG. Hodnota T_{max} 74°C, určená diferenciální skenující kalorimetrií pro IgY, je přibližně o 3°C nižší než pro IgG. Z aplikačního pohledu je významným rozdílem slepičích a savčích protilátek to, že IgY nereagují s reumatoidním faktorem a Fc receptory savců a dále to, že IgY neaktivují systém savčího komplementu. Tyto vlastnosti jsou zvláště příznivé při použití IgY pro imunostanovení prováděná se savčími séry na pevné fázi (Larsson a Sjöquist, 1988; Benson a spol., 1961). Zvláštností IgY je i jejich velmi nízká až nulová afinita pro protein

XX. Xenobiochemické symposium

Ve dnech 20.-21. května 1999 se v půvabném prostředí zámku Smolenice konalo již jubilejní XX. Xenobiochemické symposium.

Symposium bylo organisováno xenobiochemickými sekcemi jak Slovenské tak i České společnosti pro biochemii a molekulární biologii s tíhou organizačních povinností na slovenské straně. Jubilejní symposium, které bylo věnováno nestorovi československé xenobiochemie prof. A. Jindrovi bylo otevřeno předsedou organizačního výboru prof. Milanem Mikem. Přihlášené příspěvky byly rozříděny do čtyř tématicky poněkud volně sestavených přednáškových bloků a přednášky byly doplněny plejádou plakátových sdělení.

Již tradičně je přínosem Xenobiochemických symposií, které se konají buď samostatně (každé dva roky) nebo jako součást sjezdů České a Slovenské farmaceutické společnosti a České a Slovenské společnosti pro biochemii a molekulární biologii, kvalitní odborná úroveň prezentovaných příspěvků. Nebylo tomu jinak ani při letošním setkání. Za neocenitelný přínos je rovněž považována příležitost k výměně odborných zkušeností pracovníků řešících problematiku xenobiochemie, metabolismu léčiv a environmentálních polutantů, jejich účinků na organismy a problematiku metodických přístupů užívaných v těchto vědeckých disciplínách v České republice i na Slovensku.

Studium cytochromů P450 je v celé řadě laboratoří zabývajících se xenobiochemickými problematikami buď ústřední nebo alespoň částečným tématem výzkumu. Letos se účastníci XX. Xenobiochemického symposia ve Smolenicích mohli seznámit s aspekty výzkumu cytochromů P450 z praktické stránky (jejich využití ke zefektivnění chemoterapie a potlačení negativních vlivů léčiv a toxikantů včetně karcinogenů), dále pak z hlediska základního vědeckého výzkumu (studium aktivního centra enzymů v experimentálním i modelovém uspořádání), rovněž jako z pohledu srovnávací xenobiochemie (výskyt a funkce těchto enzymů v různých organismech).

S velkým zájmem se setkaly příspěvky seznamující vědeckou veřejnost s modelovými systémy užívanými při studiu metabolismu xenobiotik (úloha extrahepatálních orgánů v metabolismu xenobiotik, erytrocyty jako modely pro studium účinků xenobiotik a

další biologické modely jako např. jednoduchý organismus *Tetrahymena*). Diskutován byl již tradičně metabolismus a další problematiky léčiv s důrazem na jejich optimální dávkování, mechanismus jejich terapeutického působení, jejich vedlejších účinků, mechanismus resistance k léčivům). Parametry oxidativního stresu vyvolaného xenobiotiky a identifikace aduktů proteinů s xenobiotiky byly také prezentovány v přednáškách a dále diskutovány jako potenciální indikátory kontaminovaného životního a pracovního prostředí.

Vzhledem ke „kulatému“, dvacátému výročí organisování Xenobiochemického symposia byli jeho účastníci díky příspěvku prof. Kameníkové seznámeni i s historií všech dosavadních československých xenobiochemických symposií i xenobiochemie jako oboru samotného. Nežůstalo však pouze u faktografického výčtu akcí. Časově

Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2000, konference Odborné skupiny chromatografie a elektroforézy ČSCH, 5-6. 9. 2000, Pardubice, Info: P. Jandera, Univ. Pardubice, Čs. Legii 565, 532 10 Pardubice, tel. 040-6037023, fax 040-6037068, Pavel.Jandera@upce.cz; <http://www.upce.cz/~kalch/chrel2K>

Desorption 2000, Sept. 7, 2000, Saint-Malo, France; Info: Frederique Dykstra, Inst. de Physique Nucleaire, F-91406 Orsay Cedex, France; fax 33-01-6915-4475; des2000@ipno.in2p3.fr

Sjezd České a Slovenské společnosti pro biochemii a molekulární biologii, 7-9. 9. 2000, Praha, Info: I. Krumlová, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6, irena.krumlova@vscht.cz

12th Int. Symp. on Capillary Electroseparation Techniques, ITP 2000, 10-13. 9. 2000, Bratislava, SR; Info: ITP-2000 Secretariat, Dept. Anal. Chem., Fac. Sci., Comenius Univ., Mlynska Dolina CH-2, 842 15 Bratislava, fax 421-7-65425360; ITP2000@fns.uniba.sk; www.analytika.sk/ITP2000

Sjezd Asociace českých chemických společností a Slovenské chemické společnosti, 17-20. 9. 2000, České Budějovice, Info: J. Tríska, ÚKE AVČR, Branišovská 31, Č. Budějovice, triska@entu.cas.cz

12th Int.Symp. on Chirality, ISCD 2000, 24-28. 9. 2000, Chamonix-Mont Blanc, France; Info: Chiral. 2000 Secret., fax +33-4-72728159, Chirality2000@ens-lyon.fr, <http://ens-lyon.fr/STIM/iscd.html>

Int. Symp. on Chromatography, ISC 2000, 1-5. 10. 2000, Olympia, London, UK; Info: ISC 2000, fax 44-115 950 0614; ISC2000@chromsoc.demon.co.uk; www.chromsoc.demon.co.uk/ISC2000.htm

Int. Symp. on Electrokinetic Phenomena, 3-6. 10. 2000, Dresden, FRG; Info: Inst. für Polymer-forschung, fax 49-351-4658214, e-mail: wustrack@ipfdd.de; <http://www.ipfdd.de/elkin.htm>

6th Int. Symp. New Achievements in Chromatography, 11-13. 10. 2000, Plitvice Lakes, Croatia; Info: Croat.Soc.Chem.Eng., POB 123, HR-10000 Zagreb, Croatia, fax +385-1-4872490; hdkic@zg.tel.hr

20th Int. Symp. on the Separation and Analysis of Proteins, Peptides and Polynucleotides, ISPPP 2000, 5-8. 11. 2000, Ljubljana, Slovenia; Info: fax +386-61-217431; teja.alic@cd-cc.si; <http://www.biaseparations.com/isppp2000>

14th Int. Symp. on High-Performance Capillary Electrophoresis and Related Microscale Techniques, HPCE 2001, 13-18. 1. 2001, Boston, Massachusetts, USA; Info: J. Oefner, fax +1-650-876-0793, hpce@casss.org; www.casss.org

Připravil: V. Kašička, ÚOCHB AV ČR, kasicka@uochb.cas.cz

A a G (Kronvall a spol., 1970; Larsson a Lindahl, 1993). Proto není možno k jejich afinitní purifikaci použít sorbenty s imobilizovanými proteiny A nebo G tak, jak je to běžné např. v případě savčích IgG.

Produkce a purifikace IgY

Již více než století je známo, že každé slepičí vajíčko (bez ohledu na to, zda je oplozené či nikoliv) obsahuje ve svém žloutku značná množství IgY (Kleperer, 1893). Přestože jejich koncentrace nedosahuje zcela hodnot IgG v krvi savců, jedná se o téměř každodenní zdroj nejméně 100mg IgY/žloutek. Pokud provedeme srovnání např. králíka se slepicí z pohledu produkce protilátek, docházíme k velmi pozoruhodnému závěru, že jedna slepice za rok vyprodukuje přibližně 30x více IgY, než kolik IgG lze získat z krve králíka za stejné období (Hatta a spol., 1993). Imunizací slepice lze navodit produkci specifických IgY, které v závislosti na typu antigenu tvoří 0,1-10% z celkového množství IgY. Imunitní odpověď slepice na podaný antigen většinou však nevede k významnějšímu nárůstu celkového obsahu IgY ve žloutku.

Pro hypersenzibilizaci pokusných zvířat s cílem stimulace biosyntézy protilátek specifických pro podaný antigen je používána celá řada adjuvantních prostředků. Při použití těchto prostředků je využívána kombinace dvou efektů vedoucích ke stimulaci imunitní odpovědi produkčního organismu. Jednak je antigen připraven do takové formy (napo.emulze), která umožní jeho vhodnou prezentaci imunitnímu systému, jednak jsou přidávány různé prostředky, které nespecificky stimulují imunitní systém k produkci protilátek (např. adamantyldipeptid, deaktivované mikroorganismy nebo jejich složky). Z testovaných prostředků pro aplikaci antigenu do těla slepice (intramuskulárně i subkutánně) vyšla jako nejúčinnější technika využívající emulzifikace vodných roztoků antigenů v minerálních oleji. Nejlepším imunostimulačním prostředkem je Freundovo adjuvant v kompletní formě pro prvou dávku antigenu a pro další dávky (boosters), Freundovo adjuvant v kompletní nebo nekompletní podobě (NFA) či jen roztok antigenu v PBS (Svensden-Bollen et al, 1996; Schwarzkopf a Thiele, 1996).

Porovnávání slepice a králíka vzhledem k dosaženým titrům specifických protilátek (v ELISA) nevede k jednoznačným závěrům hovořícím ve prospěch jednoho nebo druhého experimentálního systému. I při dodržení srovnatelného postupu imunizace obou druhů zvířat, titry protilátek závisí především na imunogenicitě daného antigenu pro příslušný druh. Například pro jeden serotyp lidského rotaviru jsou slepice schopny vytvořit protilátky, které mají neutralizační titer téměř 4x vyšší než srovnatelné protilátky králíčí, naopak v případě dalšího serotypu jsou cca 2x horší (Hatta a spol., 1993). Díky fylogenetické vzdálenosti savců a ptáků jsou slepice vynikající pro přípravu protilátek proti savcům, zejména konzervovaným, antigenům. Slepičí IgY jsou schopné na savčích antigenech rozpoznat více epitopů než IgG savců, což vede k amplifikaci při stanovení využívajícím tyto protilátky. Další výhodou slepičímho systému spočívá v tom, že i při velmi nízkých dávkách savčích antigenů (0,001-0,01 mg/dávku), slepice produkují protilátky s vysokými titry (Larsson a spol., 1998). Pokud je třeba připravit protilátky proti konzervovaným antigenům savčího proteomu, je savčí produkční systém jen málo efektivní. Právě v takových případech je použití slepičímho produkčního systému velmi vhodné, protože pro slepice jsou tyto antigeny většinou značně imunogenní (Knecht a spol., 1996).

Jednou ze zásadních překážek širšího použití slepic k produkci protilátek je pravděpodobně izolace IgY ze žloutku. Srovnatelně nenáročný postup jako je přípra-

va frakce séra z krve v případě slepičích vajec skutečně není k dispozici. IgY, které tvoří přibližně 5% z celkového obsahu proteinů žloutku, jsou spolu s ostatními glykoproteiny a převážně lipoproteiny součástí komplexní emulze žloutkových lipidů (Juneja a Kim, 1997). V současné době však existuje celá škála postupů izolace IgY. Prvým krokem izolace (po separaci žloutku) je vždy oddělení lipidní frakce od frakce rozpustných proteinů. Využívá se srážení lipidní frakce precipitačními činidly, extrakce organickými rozpouštědly, vymrazení nebo hydrofobní chromatografie. Frakce ve vodě rozpustných proteinů je v dalších krocích izolace dělena frakčním srážením nebo chromatografií na ionexech či gelových sítích (Polson a spol., 1980; Bade a Stegemann, 1984; Hassl a Aspöck, 1988; Hatta a spol., 1990; Akita a Nakai, 1993; Schwarzkopf a Thiele, 1996). Většina postupů využívá kombinaci 2-3 purifikačních kroků k získání finálního preparátu IgY. Běžně lze připravit IgY frakci ve vysoké čistotě (až 98%) při výtěžku 70-100mg IgY/žloutek. K získání monospecifických IgY se lze pak použít techniku afinitní chromatografie na imobilizovaném antigenu. Specificky sorbovaný IgY je eluován silně kyselým nebo bazickým pufrům (Ntakirutimana a spol., 1992; Kuronen a spol., 1997). Purifikované IgY jsou velmi stabilní, při skladování při 4°C po dobu 10 let nezměnily své aktivity (Larsson a spol., 1999).

Použití IgY

Jak již bylo zmíněno, jsou slepičí vajíčka velmi bohatým zdrojem kvalitních protilátek (cca 25g/rok), které v řadě ohledů pořadí běžně používané savčí protilátky. Právě možnost značné a relativně levné produkce implikuje použití IgY v oblasti profylaxní nebo akutní pasivní imunizace, kdy je k získání požadovaného efektu třeba aplikovat vysoké dávky protilátek. Především cena protilátek získávaných z konvenčních zdrojů způsobovala, že tento způsob prevence infekčních onemocnění byl využíván jen v omezené míře. V oblasti profylaxe se mohou uplatnit slepičí protilátky např. proti hovězímu rotaviru, ovlivňujícímu významně úmrtnost telat (Kuroki et al, 1994), proti *E. coli*, působící patogenně u selat (Jin a spol., 1998) nebo u lidí např. k deaktivaci *Streptococca mutans*, který je považován za jednoho z původců zubního kazu (Hamada a spol., 1991). Často ani není třeba pro tyto účely IgY izolovat, stačí použít sušené žloutky vajec imunizovaných slepic. Pro akutní aplikace lze pomocí slepičích protilátek neutralizovat mikrobiální nebo hadí toxiny (Thalley a Carroll, 1990). Slepičí antiséra jsou naprosto nezbytná v takových případech, kdy je nutno aplikovat antitoxinová séra u osob, kterým bylo podáno nedávno savčí antisérum nebo jsou na některé jeho složky alergické. Tak lze předejít případnému anafylaktickému šoku a sérové nemoci.

Neméně významné místo zauímají slepičí protilátky v imunodiagnostice konzerovaných savčích proteinů, kde vykazují vyšší titry a specifitu než imunoglobuliny savců. Zejména v imunodiagnostice lze plně využít výhody IgY, protože nereagují s reumatoidním faktorem, systémem komplementu nebo Fc receptory, což často způsobuje falešně pozitivní výsledky stanovení ve vzorcích savčích sér (Larsson a Sjöquist, 1988). Slepičí protilátky se rovněž dobře hodí k detekci pathogenu ve stolici, protože IgY neváží protein A (produkovaný *Staphylococem aureus*), který působí silnou interferenci při použití IgG. Nejširší použití zatím IgY zaznamenaly v ELISA, Western blotting nebo imunohistochemickým aplikacím jako primární protilátky pro detekci či stanovení rozličných biologicky významných látek (Hatta a spol., 1997). Vzhledem k tomu, že byly vypracovány spolehlivé metodiky konjugace IgY s křenuvou peroxidázou,

4th Int. Symp. on Interface between Anal. Chem. & Microbiol., 4-7. 6. 2000, Le Castel Sainte-Anne, Tregastel - Bretagne, F, Info: J.Mehur, fax 33-2-98224653; isiam@ifremer.fr; www.ifremer.fr/isiam/

23rd Int. Symp. on Capillary Chromatography, 5-10. 6. 2000, Riva del Garda, Italy; Info: P. Sandra, fax 32-5620-4859; ric.sandra@ven.be; http://www.richrom.com

8th Int.Conf. on ElectroAnalysis, ESEAC 2000, 11-15. 6. 2000, Bonn, FRG; Info: H. Emons, Inst. Applied Phys. Chem., 52425 Jülich, FRG; fax 49-2461-612493; eseac2000@fz-juelich.de

30th Annual Int. Symp. on Environ. Anal. Chem. (ISEAC), 13-16. 6. 2000, Espoo, Helsinki, Finland; Info: M.Frei-Häusler, POB 46, 4123 Allschwil 2, CH; fax 41-61-482-0805; iaecmfrei@access.ch

APCE 2000, 3rd Asia-Pacific Int.Symp. on Capillary Electrophor., 14-17. 6. 2000, Hong Kong, China; Info: Dr. Y.S.Fung, Univ. Hong Kong, China, fax +852-2548-2132; ysfung@hkucc.hku.hk

Kurz Theory of Mass Transport in Chromatography, 19-23. 6. 2000, kurz prof. E. Kenndlera (Univ. of Vienna) pro studenty doktorského studia i pro další zájemce na Přírodovědecké fakultě UK, přednášky v angličtině, pro studenty bude kurz zakončen zápočtem. Info: doc. B. Gaš, PŘF UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, tel. 02-21952437, fax 02-291958, gas@natur.cuni.cz

24th Int. Symp. on HPLC and Related Techniques (HPLC 2000), 24-30. 6. 2000, Seattle, WA, USA; Info: J. Cunningham, fax 301-898-5596; janetbarr@aol.com; http://www.stlcdg.org/hplc 2000

8th Int. Conf. On Flow Analysis, 25-29. 6. 2000, Warsaw, Poland; Info: M.Trojanowicz, Univ. of Warsaw, fax 48-22-822-3532; trojan@chem.uw.edu.pl; http://www.congress.pbp.com.pl/flow

8th Int. Meeting on Chemical Sensors, 3-5. 7. 2000, Basel, Switzerland; Info: P. Orme, fax 44-1235-868-811; p.orme@dial.pipex.com; http://www.elsevier.nl/locate/imcs2000

Kurz HPLC a HPCE, 21. 8.-1. 9. 2000, kurz Dr. H. Claessense (Tech. Univ. Eindhoven, NL) pro studenty doktorského studia i pro další zájemce na Universitě Pardubice, přednášky v angličtině, pro studenty zkouška 4.9.2000, kurzovné cca 400.- Kč. Info: prof. P. Jandera, Univ. Pardubice, CHTF, Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice, tel. 040-6037023, fax 040-6037068, Pavel.Jandera@upce.cz

15th Int. Mass Spectrometry Conf., 15th IMSC, 27. 8.-1. 9. 2000, Barcelona, Spain; Info: Ana Costeja, fax 34-934-262-845; 15imsc@website.es; http://www.website.es/15imsc/

4th Siena Meeting: from Genome to Proteome, Siena, Italy, 4-7. 9. 2000; Info: D.F. Hochstrasser, Univ. of Geneva, L. Bini and V. Pallini, Univ. of Siena, fax: +39-0577-234-903; pallini@unisi.it

SEKCE SEPARAČNÍCH METOD

Seznam mezinárodních symposií, konferencí a kurzů o chromatografii, elektroforéze a příbuzných metodách v r. 2000 a na počátku r. 2001

13th Annual Tech. Conf. & Expo on Filtration and Separ. Technol., 14-17. 3. 2000, Myrtle Beach, SC, USA; Info: fax 205-333-6446; afs@dbtech.net; <http://www.afssociety.org>

Analytica 2000, 11-14.4.2000, Munich, Germany; Info: R. Huber, MesseReise Service, fax 49-89-949-2-0679; huberr@messe-muenchen.de; <http://www.analytica.de/2000/englisch/index.html>

4th European & 9th Int. Symp. on Supercrit. Fluid Chromatography & Extraction, 13-14. 4. 2000, Munich, FRG; Info: H. Engelhardt, Univ. des Saarlandes, sfc2000@mx.uni-saarland.de

ExTech 2000 Symp. Advances in Extraction Technologies, 3-7. 5. 2000, Waterloo, Canada; Info: hlord@scimail.uwaterloo.ca; <http://www.science.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn>

EuroResidue IV, Int. Conf. on Residues of Veterinary Drugs in Food, 8-10. 5. 2000, Koningshof, Veldhoven, NL; fax 31-30-274-4403; euroresidue@rivm.nl; <http://www.rikilt.dlo.nl/euroresidue>

3rd Biennial Int. Conf. on Chem. Measurement & Monitoring of Environment, EnviroAnalysis 2000, 8-11. 5. 2000, Ottawa, Canada; Info: fax 613-520-3679; <http://www.carleton.ca/~rburk/ea2000>

VIIth Symp. of EU Biochromatogr. Soc., Separ. & Character. of Biol. and Synth. Macromol., 9-11. 5. 2000, Nantes, F; Info: B. Sebille, BP28, F-94320 Thiais; fax 33-1-49781208; sebille@glvt-cnrs.fr

13th Int. Symp. on Prepar./Process Chromatogr. (PREP 2000), 14-17. 5. 2000, Washington DC; Info: J. Cunningham, fax 301-898-5596; janetbarr@aol.com; <http://www.stlcdg.org/prep>

11th Int. Symp. on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2000), 14-18. 5. 2000, Basel, Switzerland; Info: fax 41-61-686-2185; congress@messbasel.ch.; <http://www.congress.ch/pba>

4th Int. Symp on Micro Total Analysis System, 14-18.5.2000 The Netherlands; Info: Congress Assoc. Twente, fax 31-53-489-4442; <http://www.el.utwente.nl/esa/mutas2000>

6th World Congress on Biosensors, 24-26.5.2000, San Diego, USA; Info: L. Reed, Biosensors 2000 Secret., fax +44-1865-843958; e.reed@elsevier.co.uk; <http://www.elsevier.nl/locate/biosconf>

FITC a biotinem, nacházejí jejich konjugáty místo i jako sekundární protilátky v běžných imunochemických technikách (Larsson a spol., 1998; Kim a spol., 1999). Díky poněkud nižší hodnotě pI vzhledem k IgG se ptáci IgY velmi dobře hodí při raketkové elektroforéze ke kvantifikaci imunoglobulinu v savčích sérech (Altschuh a spol., 1984). Proto není třeba IgY karbamylovat, aby došlo k odlišení jejich izoelektrického bodu od stanovovaných lidských protilátek, jak je to běžné např. u králíčích IgG. Jedinou limitací aplikace IgY je v některých případech jejich snížená schopnost vytvářet s antigeny imunoprecipitát. Obvykle je však možné změnou reakčních podmínek (např. zvýšením iontové síly prostředím) proces imunoprecipitace podpořit.

V řadě prací bylo popsáno použití IgY (po zakotvení na gelovou matici) jako imunisorbentu k izolaci nebo zakoncentrování řady nízk- i vysokomolekulárních sloučenin (Shelver a spol., 1998; Hatta a spol., 1997). Z afinitních kolon na bázi IgY se daří s velkými výtěžky (97%) uvolnit sorbovaný antigen i za podstatně mírnějších podmínek (pH 4) než z kolon s imobilizovanými IgG. Tento postup je tedy vhodný tehdy, pokud je třeba minimalizovat poškození eluovaného antigenu.

Výhody slepičích protilátek

Z etického pohledu je produkce protilátek ve slepičím organismu a jejich izolace z vajec rozhodně přijatelnější varianta než stávající způsob založený na použití krve savců. Navíc imunizace nezpůsobuje slepici významnější zdravotní potíže jednak proto, že v místě aplikace antigenu většinou nedochází ke vzniku abscesu, jednak díky tomu, že nezbytné množství antigenu k navození dostatečné produkce protilátek je obvykle nižší než je tomu např. u králíků. Tím, že jsou protilátky izolovány z vajec nikoli z krve, je zásadním způsobem omezen stres zvířete jen na nezbytnou míru při injekční aplikaci antigenu. Není ani třeba utrácet pokusná zvířata k získání větších objemů krve pro izolaci potřebného množství antiséra. Skutečně ohromná produkce protilátek ukládaných do vaječného žloutku je dalším argumentem svádícím pro preferenci slepičího systému. Za období snášky je jedna slepice schopna vyprodukovat tolik protilátek jako několik desítek králíků. Je třeba zohlednit i to, že slepice jsou z pohledu imunitní reakce na podaný antigen mnohem spolehlivější než např. králíci. Proto je možno omezit počet zvířat potřebných pro každý experiment na 1-2. Použitím slepic lze tedy jak minimalizovat jejich strádání a stres v průběhu experimentu, tak snížit počet experimentálních zvířat potřebných pro produkci protilátek.

Další zásadní výhoda slepic vychází z fylogenetické vzdálenosti ptáků a savců. Zřejmým důsledkem je to, že slepice jsou schopny produkovat protilátky s vysokými titry proti silně konzervovaným savčím proteinům. Na takové antigeny např. králíci nedokáží vytvořit protilátky vyhovujících titerů. Slepičí IgY připravené proti proteinům pocházejícím z organismů dostatečně evolučně vzdálených slepici rozpoznávají více epitopů na antigenů a potencují tak konečný signál v imunologických stanoveních. Jak již bylo uvedeno, vzhledem k rozdílnosti ptáčích a savčích imunoglobulinů se slepičí protilátky při testech se savčími séry neváží na rheumatoidní faktor, neaktivují komplement ani nejsou rozpoznávány Fc receptory. Právě opačné vlastnosti savčích IgG mohou být zdrojem vážných interferencí při stanoveních, kdy se používají IgG vázané na pevné fázi.

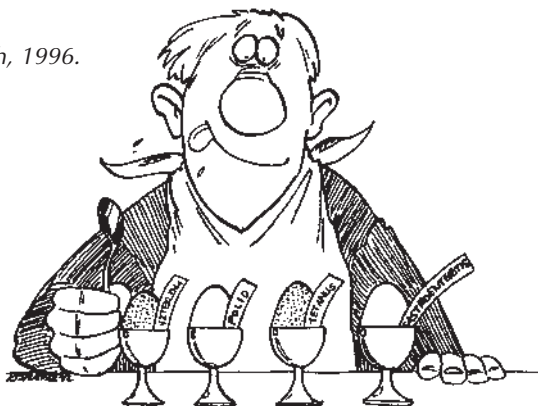
Slepičí protilátky jsou v naší laboratoři úspěšně používány po řadu let k imunodetekci různých cytochromů P450 a jejich stanovení metodou ELISA v mikrosomálních preparátech jater experimentálních zvířat po premedikaci modelovými induktory

cytochromu P450. V současné době je v procesu testování metoda afinitní purifikace cytochromu P450 na afinitních kolonách s imobilizovanými slepičími protilátkami.

Závěr

Závěrem je možno vyjádřit přesvědčení, doložené výše zmíněnými fakty, že ptačí protilátky budou v neďaleké budoucnosti plně doceněny jako více než plnohodnotná alternativa savčích protilátek a jejich použití se stane běžnou rutinou. Laboratoře připravené na tuto alternativu budou schopny velmi rychle akceptovat regulace EU týkající se experimentů s pokusnými zvířaty a přejít na použití ptačího produkčního systému.

Obr. 2. Převzato z práce Losch, 1996.



Poděkování

Autor děkuje za podporu výzkumné práce na tomto tématu MŠMT ER (grant VS 96141), GAUK (246/1999) a GAER (203/99/1628, 203/99/1003).

Literatura:

1. Akita, E. M., Nakai, S., 1993, J. Immunol. Methods, 160, 207-214.
2. Altschuh, D., Hennache, G., Van Regenmortel, M. H. V., 1984, J. Immunol. Methods, 69, 1-7.
3. Bade, H., Stegemann, H., 1984, J. Immunol. Methods, 72, 421-426.
4. Benson, H. N., Brumfield, H. P., Pomeroy, B. S., 1961, J. Immunol., 87, 616-622.
5. Gallagher, J. S., Voss, E. W., 1973, Immunochemistry, 11, 461-465.
6. Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Kawabata, S., Hiraoka, J., Fujiwara, T., Ooshima, T., 1991, Infect. Immunol., 59, 4161-4167.
7. Hassl, A., Aspöck, H., 1988, J. Immunol. Methods, 110, 225-228.
8. Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., 1990, Agric. Biol. Chem., 54, 2531-2535.
9. Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T., 1993, Biosci. Biotech. Biochem., 57, 450-454.
10. Hatta, H., Ozeki, M., Tsuda, K. v Hen Eggs: Their Basic and Applied Science (Yamamoto, T., Juneja, L. R., Hatta, H., Kim, M., eds.), str. 151-178, CRC Press, USA, 1997.

Zápis ze schůze Českého národního komitétu pro biochemii a molekulární biologii dne 8. prosince 1999

Přítomni: prof. MUDr. R. Černý, prof. MUDr. Jiří Duchoň, prof. ing. Jan Káš, prof. RNDr. Arnošt Kotyk, prof. MUDr. Jiří Kraml, prof. RNDr. Eva Kvasničková, prof. ing. Pavel Rauch, Doc. RNDr. Vladimír Mikeš.
Nepřítomni: RNDr. T. Barth (omluven), prof. RNDr. Václav Pačes (omluven), RNDr. Jan Konvalinka

1. Podána zpráva o činnosti v roce 1999, které dominovala práce názvoslovné komise (Barth, Černý, Duchoň, Kahovec, Kotyk, Kraus, Zadražil). Konstatováno, že bylo rozesláno 215 exemplářů doporučení na redakce časopisů, nakladatelství a všech-ny biologická a lékařská katedry na Vysokých školách, dále na Úřad prezidia AV ČR a příslušný odbor ministerstva školství. Podle rešerše prof. Duchoně bylo Doporučení otištěno v plném rozsahu v šesti periodikách, vesměs s kladnými komentáři redakce. Pouze časopis Vesmír Doporučení neotiskl a objevila se v něm pouze kontraverzní debata redaktorky Lounské s prof. Krausem.

2. Bylo doporučeno napsat na toto interview jakousi repliku pro Akademický bulletin (Duchoň a Kotyk). Tam je třeba zdůraznit zvláštnosti češtiny jednak v běžné terminologii, jednak v odborné nomenklatuře chemických názvů.

3. Konstatováno, že Kotyk, Pačes a Kraml přispěli k formulaci standardů pro PhD in molecular biosciences pod redakcí prof. Franka Velly. Termín „molecular biosciences“ navrhl Kraml jako vhodnější než „PhD in biomedicine“, který užívá koordinační odborová rada pro postgraduální studium v biomedicině na Karlově univerzitě pod vedením prof. B. Ošťádala, a do něhož jsou začleněni i rostlinní fyziologové. Námitka ze strany prof. Ošťádala zazněla v tom smyslu, že termín biomedicína dosáhl obecného přijetí jak na UK, tak u akreditační komise MŠMK.

4. Kotyk dále referoval o práci Mezinárodní názvoslovné komise pro biochemii, zejména o svém úsilí vydat během příštího roku souhrnné názvosloví všech transportních proteinů.

5. Po diskusi o pokračování činnosti NK bylo doporučeno neusilovat o fúzi s Českou společností pro biochemii a molekulární biologii, především se zřetelem k možným administrativním komplikacím.

6. Bylo doporučeno nahradit prof. V. Pačese (na jeho vlastní žádost) a Dr. Konvalinku jako tajemníka, pokud možno členy některých akademických ústavů, protože bylo konstatováno, že zastoupení vysokých škol v NK je podstatně vyšší než dalších výzkumných pracovišť. Kotyk se obrátí na ředitele příslušných ústavů o návrhy. Kotyk dále požádal o ukončení své funkce předsedy NK, ale bylo dohodnuto záležitost odložit na příští jednání.

13. 12. 1999

Prof. RNDr. Arnošt Kotyk, DrSc.

laboratorní medicíně. 3. Klinická farmakologie a klinická toxikologie, monitorování léků a jejich klinická interpretace. 4. Využití klinicko-biochemických dat v racionální zdravotnické péči. 5. Point-Of-Care-Testing- klinická biochemie akutních stavů, Spolu se sekci posterů proběhly i dvě pracovní setkání (Workshops). Příjemným vstupem byly soutěže o Cenu České společnosti klinické biochemie za rok 1998, cena firmy Roche zaměřená na výsledky molekulární biologie aplikované na klinickou biochemii a cena České společnosti klinické biochemie ve spolupráci s firmou BioTech as. Určitým názorovým průlomem byla výstava fotografií -Florence '99, které zachytily atmosféru světového kongresu ve Florencii.

Zde jsou vítězové:

Cena ČSKB za rok 1999

J. Masopust:

„Klinická biochemie - požadování a hodnocení biochemických vyšetření (1. a 2. část)“
Karolinum - nakladatelství Univerzity Karlovy, Praha 1998, 2 svazky, 832 stran, ISBN 80-7184-648-3

Cena ROCHE

Doc. MUDr. Richard Průša, CSc.

Multimediální učebnice DNA diagnostiky na CD-ROM.

Cena ČSKB sponzorovaná firmou BioTech, a.s.

MUDr. Tomáš Adam a kol. za soubor prací:

T. Adam, J. Ševčík, L. D. Fairbanks, P. Barták

Determination of purine enzyme activities in human erythrocytes by capillary electrophoresis Purine and Pyrimidine Metabolism in Man IX, edited by A. Griesmacher et al. Plenum Press, New York, 1998

T. Adam, J. Ševčík, Z. Švagera, L. D. Fairbanks, P. Barták

Determination of adenosine deaminase activity in human erythrocytes by on-column capillary isotachopheresis - capillary zone electrophoresis in the presence of electroosmotic flow Electrophoresis 1999, 20, 564-568

T. Adam, J. Ševčík, L. D. Fairbanks, P. Barták

Determination of purine nucleoside phosphorylase activity in human erythrocytes by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. B 698 (1998) 308-311

Nejlepší poster - divácká anketa

Kcna P. a kol. (Praha)

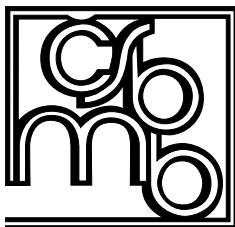
Tkáňová transglutamináza - nový marker pro serologickou diagnózu celiakie

Fotografická soutěž - Florence '99, vítězná fotografie: Collezione Firenze I

autor: Ing. Robert Bulawa

Letošní setkání klinických biochemiků bude v Pardubicích v půli září.

11. Jin, L. Z., Baidoo, S. K., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., 1998, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 21, 313-321.
12. Juneja, L. R., Kim, M. v *Hen Eggs: Their Basic and Applied Science* (Yamamoto, T., Juneja, L. R., Hatta, H., Kim, M., eds.), str. 57-72, CRC Press, USA, 1997.
13. Kim, H.-O., Durance, T. D., Li-Chan, E. C. Y., 1999, *Anal. Biochem.*, 268, 383-397.
14. Klemperer, F., 1893, *Ark. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 31, 356-382.
15. Knecht, W., Köhler, R., Minét, M., Löffler, M., 1996, *Eur. J. Biochem.*, 236, 609-613.
16. Kronvall, G., Seal, U. S., Finstad, J., 1970, *J. Immunol.*, 104, 140-147.
17. Kuronen, I., Kokko, H., Mononen, I., Parviainen, M., 1997, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 35, 435-440.
18. Kuroki, M., Ohta, M., Ikemori, Y., Peralta, R. C., Yokoyama, H., Kodama, Y., 1994, *Arch. Virol.*, 138, 143-148.
19. Larsson, A., Sjöquist, J., 1988, *J. Immunol. Methods*, 108, 205-208.
20. Larsson, A., Lindahl, T., 1993, *Hybridoma*, 12, 143-147.
21. Larsson, A., Carlander, D., Wilhelmsson, M., 1998, *Food Agric. Immunol.*, 10, 29-36.
22. Larsson, A., Wejaker, P.-E., Forsberg, P.-O., 1999, *Food Agric. Immunol.*, 11, 43-49.
23. Leslie, G. A., Clem, L. W., 1969, *J. Exp. Med.*, 130, 1337-1352.
24. Leslie, G. A., Martin, L. N., 1973, *J. Immunol.*, 110, 1-9.
25. Losch, U., 1996, *ALTEX*, 13 (Suppl. 96), 15-17.
26. McLaren, R. D., Prosser, C. G., Grieve, R. C. J., Borissenko, M., 1994, *J. Immunol. Methods*, 177, 175-184.
27. Ntakirutimana, V., Demedts, P., Van Sande, M., Scharpé, S., 1992, *J. Immunol. Methods*, 153, 133-140.
28. Ohta, M., Hamako, J., Yamamoto, S., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., Oka, S., Mizuochi, T., Matsuura, F., 1991, *Glycoconjugate J.*, 8, 400-413.
29. Polson, A., Wechmar, M. B. V., Regenmortel, M. H. V. V., 1980, *Immunol. Commun.*, 9, 475-493.
30. Polson, A., Von Wechmar, M. B., Fazakerley, G., 1980, *Immunol. Commun.*, 9, 495-514.
31. Rose, M. E., Orlans, E., Buttress, N., 1974, *Eur. J. Immunol*, 4, 521-523.
32. Schwarzkopf, C., Thiele, B., 1996, *ALTEX*, 13 (Suppl. 96), 22-25.
33. Schwarzkopf, C., Thiele, B., 1996, *ALTEX*, 13 (Suppl. 96), 35-39.
34. Shelver, W. L., Larsen, G. L., Huwe, J. K., 1998, *J. Chromatogr. B*, 705, 261-268.
35. Sunwoo, H. H., Nakano, T., Dixon, W. T., Sim, J. S., 1996, *Poultry Sci.*, 75, 342-345.
36. Svendsen-Bollen, L., Crowley, A., Stodulski, G., Hau, J., 1996, *J. Immunol. Methods*, 191, 113-120.
37. Thalley, B. S., Carroll, S. B., 1990, *Biotechnology*, 8, 934-938.
38. Warr, G. W., Magor, K. E., Higgins, D. A., 1995, *Immunol. Today*, 16, 392-398.
39. Williams, J., 1962, *Biochem. J.*, 83, 346-355.



Neurohypofysiální hormony: pražský příspěvek k jejich chemii a farmakologii

Vladimir Pliška

Department of Animal Science, ETH Zürich, CH-8092 Zürich, Switzerland

Článek mého milého kolegy a přítele V. Schreiber, otištěný nedávno v Čs. Fyziologii (47 [1998] 13-18), líčí více než padesátiletou historii peptidových hormonů z pohledu klinického endokrinologa. Jeho záběr je široký, a tím i sympatická snaha, formulovaná v jeho závěru – „... být oslavou 40. výročí prvých velkých úspěchů české chemické a farmaceutické školy ... „ – je na úrovni spíše obecné. K tomu několik poznámek, týkajících se nejoriginálnějšího příspěvku pražské peptidové školy: neurohypofysálních hormonů vasopresinu a oxytocinu. Není třeba dlouze opakovat známá historická fakta, že jejich novodobá historie začíná publikací jejich struktury a synthesy, jako vůbec prvých biologicky aktivních peptidů, v letech 1953-54 Vincentem du Vigneaudem a jeho spolupracovníky a že tato skupina vypracovala první metody vedoucí k jejich chemické modifikaci a tím k synthese prvých analogů vůbec, že tento významný pokrok byl neobyčejně rychle, již v roce 1955, oceněn Nobelovou cenou za chemii, a konečně že du Vigneaudova skupina na Rockefellerově universitě dala impulsy k výzkumu peptidů v několika dalších vědeckých týmech. Dva z nich daly vznik tomu, co V. Schreiber právem označuje jako „škola“: skupina basilejská a skupina pražská. Právem, protože obě vyvinuly svůj jedinečný koncept a měly po kratší či delší čas své následovníky. Koncept se týkal především toho, co dnes označujeme jako „drug design“; strategie, zahrnující spolupráci chemiků, farmakologů a kliniků, byla zhruba stejná. Rozdíly v konceptech jsou však hodné pozornosti. V laboratoři du Vigneauda se zájem soustředil především na vliv jednotlivých aminokyselinových řetězců a funkčních skupin (ale i peptidické „kostry“ – D-substituce!) na biologické vlastnosti. Basilejská skupina vznikla v tehdejší firmě SANDOZ AG (dnes NOVARTIS) a její zájmy byly tudíž převážně klinicko-farmakologické, soustředěné na pozměněný poměr jednotlivých biologických aktivit (např.. na poměr vasopresorická/antiuretická aktivita). Význačnými representanty zde byli B. Berde, R.A.. Boissonas a St. Guttman. Ve strategii pražské skupiny, soustředěné kolem Ústavu organické chemie a biochemie čs. akademie věd, přibyl ještě další profesionální typ – biochemici, a to do značné míry určilo její zaměření. Zde vznikla představa „enzymových sond“, t.j. peptidových analogů umožňujících formulovat hypotézy o inaktivačních mechanismech rozhodujících o farmakokinetických vlastnostech nativních hormonů a jejich analogů, odtud vzešel návrh t.zv. syntetických hormonogenů, molekul resistantních vůči enzymatické inaktivaci, a řada dalších. Doba účinku je významný farmakologický faktor, persistence medikamentu často žádaný klinický cíl. Je ale nutno hned podotknout, že pražská skupina na této cestě, jaksi mimo původní plán, narazila na peptidové analogy neočekávaných vlastností; DDAVP – deamino-D-arginin-vasopresin – je jejich přesvědčivým příkladem. Jsou zároveň příkladem fenoménu, v současnosti označovaného jako „serendipita“: jejich objevitelé šli stejnou cestou jako tři bájeslovní princové ze Serendipu (původní název Ceylonu, dnes Sri Lanka), kteří, míříce za

2nd Bulgarian Peptide Symposium

The 2nd Bulgarian Peptide Symposium was held, with EPS support, on October 8-10, 1999, in Panitchishte, a resort in the Rila mountain. It was attended by more than 75 scientists, including a large number of young people. Raniero Rocchi, Chairman of the EPS, and Ljubomir Vezenkov, Chairman of the Bulgarian Peptide Society, opened the proceedings on Friday evening. The Symposium started with a jubilee lecture „Investigations on the neurotoxic complex from the venom of the *Vipera amodytes*“, delivered by the outstanding Bulgarian chemist Boris Aleksiev (Chemical-Technological and Metallurgic University). On Saturday, the EPS plenary lecture „Some examples of glycopeptide synthesis“ was given by Raniero Rocchi. There were 11 oral presentations during the Symposium. Boris Atanasov (Institute of Organic Chemistry, Bulg. Acad. Sci.) delivered a lecture on electrostatic interactions in intermediates of penicillin hydrolysis by β -lactamase and their use for design of potential antibiotic's accelerators. Enzyme systems and drug design were also the theme of the lectures by Ivanka Stoyneva and Bojidar Chorbanov, both coming from the Institute of Organic Chemistry, Bulg. Acad. Sci. Interesting synthetic work was presented by Valentin Lozanov (Medical University) in his lecture „Formation of disulphide bonds of synthetic peptides - Amaranth A - an amylase inhibitor and Endothelin-1“ and by Ljubomir Vezenkov (Chemical-Technological and Metallurgic University) in „Design and synthesis of new analogues of Y-fragment (400-411) of human fibrinogen by incorporation of the active sequence Arg-Gly-Asp“. The lecture by Tamara Pajpanova (Institute of Molecular Biology, Bulg. Acad. Sci) concerned the action of some canavanine hydrazide derivatives as metabolic inhibitors. The rest of the contributions coming from the Institute of Physiology, Bulg. Acad. Sci. were focused on some new findings in pharmacology of endogenous enkephalins and their delta-selective analogues (Nevena Pencheva), physiology and pharmacology of melanocyte-inhibiting factor (Adriana Bocheva) and effects of angiotensin on learning and memory (Alexander Ternianov). The final day was devoted to the posters and their discussion at a round table session. There were 18 poster presentations, covering different topics: structure-activity studies, peptidomimetics, structural analysis of peptides, mechanism of catalytic and enzymatic synthesis of peptides and glycopeptides, physiological study of modified aminoacids and bioactive peptides. The proceedings of the symposium will be published in English in the journal of Bulgarian Chemical Communications. The pharmaceutical company BalkanPharma AD Dupnitsa as well as the Valerus firm, which sponsored the meeting, took the opportunity to advertise and exhibit their products.

Contributed by Nevena Pencheva

IV. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie s mezinárodní účastí. Hradec Králové 26. - 28. září 1999

Organisátorům sjezdu a ostatních všech aktivit se sjezdem souvisejících patří mé poděkování. Nebyly to jen přednášky či soutěž ve vývěskách (posterech) ale i organizaci výstavy. Zasedání proběhlo v několika sekcích .1. Edukace v klinické biochemii-postgraduální výchova jednotlivých kategorií pracovníků v oboru 2 Molekulárně biologické techniky a možnosti jejich využití v klinické biochemii a

Kongresy minulé a budoucí

Od otištění první části informace o budapeštkém setkání evropských a jiných peptidářů uplynul rok. Objevily se také symposiální materiály vydané nakladatelstvím Akadémiai Kiadó v Budapešti a to v režii dvou pracovníků. Těmi jsou Sándor Bajusz z Ústavu pro výzkum léčiv a Ferenc Hudecz, pracovník Maďarské akademie věd



a Eötvös Lóránd University . Tištěné materiály jsou nyní plně k dispozici. Co ještě říci ke kongresu a to především k jeho organizaci. Kongres byl mimořádně dobře připraven a byl plně funkční ve všech výstupech vědeckých, společenských a informačních. Byla tu i řada detailů, které plně svědčí o mimořádných zkušenostech organizátorů načerpaných na zahraničních akcích, za všechny jen jedna zmínka technického rázu a to že na každém vývěskovém (posterovém) tablu byla přichycena papírová schránka na žádanky o budoucí separáty a případné zprávy. I zde se uplatnilo logo kongresu (viz výše). Organizátorům 26. EPS v Montpellier a nejen jim, ale i všem budoucím, byla nasazena vysoká laťka, improvisace zde neměla místo.

T. Barth

2. Bulharské peptidové symposium

8-10. října 1999-Panitchiště.



Rád bych na začátku uvedl, že z tohoto symposia existuje nejen kniha abstrakt, ale že materiály vyjdou jako Proceedings. Konference má svoje logo **...hory slézajícího potkana s batohem plným skleněného chemického nádobíčka...** Až na pozvaného předsedu EPS, profesora **Raniera Rocchiho**, který se právě v roce 1999 ujal funkce předsedy EPS, bylo symposium bulharskou záležitostí. Blíže o něm Doc.Dr.Nevena Pencheva, PhD z Fysiologického ústavu Bulharské akademie věd v Sofii. (Psáno pro Bulletin ČSBMB).

určítým cílem, „ ... were making discoveries, by accidents and sagacity, of things which they were not in quest of ... „ (Horace Walpole, 1754). Kromě cílů zcela praktických však práce pražské skupiny přinesla i poznatky základní důležitosti, např. pro studium interakcí peptidových ligandů s jejich receptory. Opět jeden z četných příkladů: t.zv. carba-analogy (J. Rudinger a K. Jošt), v nichž nereaktivní intramolekulární můstek -CH₂-CH₂- nahrazuje disulfidickou skupinu, pokládanou do té doby za nezbytnou pro biologickou aktivitu. Výrazná biologická aktivita těchto látek naznačuje, že disulfidická skupina především zajišťuje aktivní konformační stav peptidického řetězce; její čistě chemický vliv na biologickou aktivitu není podstatný. To bylo ovšem oceněno až mnohem později. Zbývá ještě uvést některá jména této průkopnické skupiny: ze „starší“ generace je to bezesporu František Šorm, Josef Rudinger, Ivan Rychlík a Zdenka Beránková-Ksandrová, z „mladší“ pak Milan Zaoral, Karel Jošt, Karel Poduška, Evžen Kasářík, Ivan Krejčí, Ivo Poláček, Ivan Vávra, Alena Machová, Tomislav Barth, autor této osobní vzpomínky, a mnoho dalších.

Tradice výzkumu neurohypofysárních peptidů dodnes pokračuje v U.S.A. v laboratořích dvou žáků Vincenta du Vigneauda: Maurice Manninga, profesora biochemie na Medical College of Ohio, Toledo OH, a částečně též Victora Hrubyho, profesora chemie na University of Arizona, Tucson AR. Ačkoliv du Vigneaud měl řadu vynikajících žáků a spolupracovníků z evropského kontinentu, jejich práce v tomto vědeckém oboru z různých důvodů do dnešních dnů nepokračovala. Ještě v 70. a časných 80. letech existovala aktivní peptidová skupina ve firmě HOFMANN-LaROCHE v Basileji, vedená Rolfem Studerem a Dieterem Gillessenem. Oba titi vynikající du Vigneaudovi spolupracovníci se však od poloviny 80. let peptidům nevěnují a po jejich odchodu do pense v 90. letech byl peptidový výzkum ve jmenované firmě zcela zastaven. Podobně ani ve firmě NOVARTIS, spojující dvě dřívější firmy s významným peptidovým výzkumem (SANDOZ AG a CIBA-GEIGY), nepatří peptidy k preferovaným firemním programům.

Tato tendence však není ojedinělá ani ve světovém měřítku a zájem o vývoj nových peptidových terapeutik – nikoliv však diagnostik, syntetických antigenů pro přípravu protilátek, atd. - ve farmaceutických firmách v posledních dvou desetiletích zřetelně upadá. Uvedme jako další příklad klinicko-farmakologický výzkum neurohypofysárních hormonů ve firmě SMITH-KLINE & BEACHAM, ještě v 80. a ranných 90. letech velmi intenzivní. Publikace četných výsledků, patrně ne zcela chráněných patenty, nesevědí o výrazném komerčním zájmu. Výzkum se zde obrací spíše jiným směrem – k synthese t.zv. peptidomimetik, nepeptidických sloučenin s molekulární konformací a biologickou aktivitou analogickou příslušným peptidům (carba-analogy byly prvním neuvědomělým krokem k tomuto konceptu). Obecně tedy pozorujeme spíše odklon zájmu o klinicky použitelná peptidová farmaka. Enthusiasmus, částečně ještě zřetelný v citovaném článku V. Schreiberova, je vystřídán jistou - a pochopitelnou – skepsí.

Důvody jsou tu několikolité. Předně nejsou jejich farmakologické vlastnosti označované dnes jako „bioavailibility“ nijak výhodné. V tkáních a tělních tekutinách jsou zpravidla rychle inaktivovány a jejich kontrolovaná aplikace je možná jen parenterální cestou, nejlépe intravenosně. Existují zde zajisté i spolehlivé alternativy jako je intranasální aplikace, ale ty jsou spíše výjimkou a ujaly se jen zřídka (u peptidů např. v případě DDAVP). Produkce kratších peptidů metodami genové technologie není zpravidla možná, nebo se jeví jako zcela neekonomická: jde o krátké peptidy kodované ve formě dlouhých prekursorů, z nichž jsou aktivní sekvence odštěpovány postribosomálními enzymatickými procesy – mechanismus, jehož technologická

rekonstrukce by byla velmi náročná. Analoga nadto obvykle obsahují nekodované aminokyseliny, takže jejich produkce by musela jít cestou parciální syntesy. To vše by vedlo k značným nákladům ve výzkumu, produkci a i v distribuci, které by se nutně odrazily ve vysoké ceně výsledného produktu. Stále rostoucí náklady na zdravotní péči a jimi iniciovaná politická diskuse v různých zemích ukazují, že tato cesta bude zřejmě v budoucnu zcela neschůdná.

K tomu přistupuje další aspekt, který lze stručně shrnout do these, že jak soukromý tak veřejně podporovaný výzkum se nemůže za situace, kdy finanční prostředky jsou nutně omezené, soustředit na málo frekventní aplikace a odčerpávat investice globálnějšími zdravotnickými problémům. V oblasti proteinových farmaceutik to názorně demonstrovuje nedávná švýcarská diskuse kolem preparátu „Novo Seven“, gentecnologicky produkovaného koagulačního faktoru VIIa (firma NOVO NORDISK), pokládaného za spolehlivou alternativu k preoperativní prevenci rozsáhlejších ztrát krve v případech hemofiliků typu A či B s přecitlivělostí na příslušné chybějící faktory VIII či IX, tedy v případech spíše řídkých. Náklady na každý takový zásah činí zhruba 500 000 švýcarských franků (t.j. asi 10 milionů českých korun). Zde máme co činit s novými problémy vědecké etiky, podmíněnými neobyčejně rychlým rozvojem terapeutických a diagnostických možností na konci tohoto tisíciletí. Dříve či později nás zásadní diskuse na toto thema nemine.

To vše relativuje klinickou důležitost syntetických peptidů, naprosto však neznamená všeobecný odklon od nich. Je tu především jejich epistemologický význam: při studiu základních regulačních pochodů v organismu.. A přes to, co bylo výše řečeno, mohou být v určitých situacích medikamenty „volby“. V tomto směru je nutno ještě mnohé přenechat budoucímu výzkumu.

A konečně, mezinárodní reputace pražské peptidové školy v padesátých a šedesátých letech byla významným vkladem pro českou moderní přírodovědu v době, kdy totalitní režim intelektuální vývoj katastrofálním způsobem brzdil a distance k západní kultuře začala nabývat kritických rozměrů (připomeňme jen vývoj v genetice, a nejen ten). Solidní základy této školy založily dvě výrazné osobnosti: František Šorm a Josef Rudinger. Jím je také věnována tato vzpomínka, kterou snad je možno uzavřít historkou kolující v peptidářských kruzích: Jistý seriosní profesor ze Západu prostudoval dvě publikace týkající se určitého problému v peptidové synthese, jednu ze skupiny ve vlastní zemi, druhou z pražské laboratoře Josefa Rudingera. Prvou předal svému spolupracovníkovi se slovy „Vyzkoušejte to, prý to funguje“; druhou jinému spolupracovníkovi s poznámkou „Použijte to, výtěžek je sedmatřicet a půl procenta!“

Poznámka redaktora

Tento příspěvek byl napsán počátkem roku 1999, jako jedna ze dvou odpovědí na výše citovaný článek prof. V. Schreiber, který jsme přetiskli v čísle 3. našeho Bulletinu. (V. Schreiber: Hormonálně aktivní peptidy, Bull. ČSBMB, Vol 26, 111-118, 1998) se svolením Československé Fyziologie, kde byl původně otištěn. Prvou část odpovědi prof. V. Plišky (DDAVP: osudy peptidového farmaka z pražských laboratoří) jsme otiskli v 2 čísle loňského bulletinu (Bulletin ČSBMB: 27, 114- 117, 1999).

T. Barth

PEPTIDOVÉ ZPRÁVY

Biologicky aktivní peptidy

Obsah peptidových zpráv

Časopisy s peptidovou tematikou
Amino acids

Kongresy minulé a budoucí

25th EPS Budapešť - pokračování

2. Bulharské peptidové symposium

4. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie

Časopisy s peptidovou tematikou

Amino Acids - vydává Springer Verlag, Wien, New York

Tento časopis přináší sdílení ze všech oblastí výzkumu aminokyselin jako jsou analýza aminokyselin, biosynthesa, racemisace, modifikace aminokyselin (fosforylace, methylace, acetylace a glykosylace) a příprava radioaktivních a stabilních izotopů aminokyselin. Najdeme zde i oblasti zaměřené na poznání nových funkcí aminokyselin ve fyziologii, pathofysiologii a biologii. Nepřekvapí, že je zastoupena i sekce peptidů a polyaminů v lékařství, výživě, potravinářské chemii, neurochemii, farmakologii a jiných. Vlastní časopis má čtyři sekce - chemicko-fyzikální, aplikované a zemědělské vědy, biologické a nakonec i lékařské vědy. Každá sekce má ještě řadu podsekcí. Vítány budou i interdisciplinárně zaměřené příspěvky. Časopis je možno objednat na adrese: Springer-Verlag, Wien, Sachsenplatz 4-6, P.O.Box 89,

A-1201, Wien, Rakousko. Roční předplatné (dva ročníky) - 1168 DEM.

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

NOVÁ WEBOVÁ
STRÁNKA NAŠÍ
SPOLEČNOSTI

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

Smrtící cyanobakterie a jejich toxiny

Jiří Patočka

Katedra toxikologie, Vojenská lékařská akademie, 500 01 Hradec Králové.
E-mail: patocka@pmfhk.cz

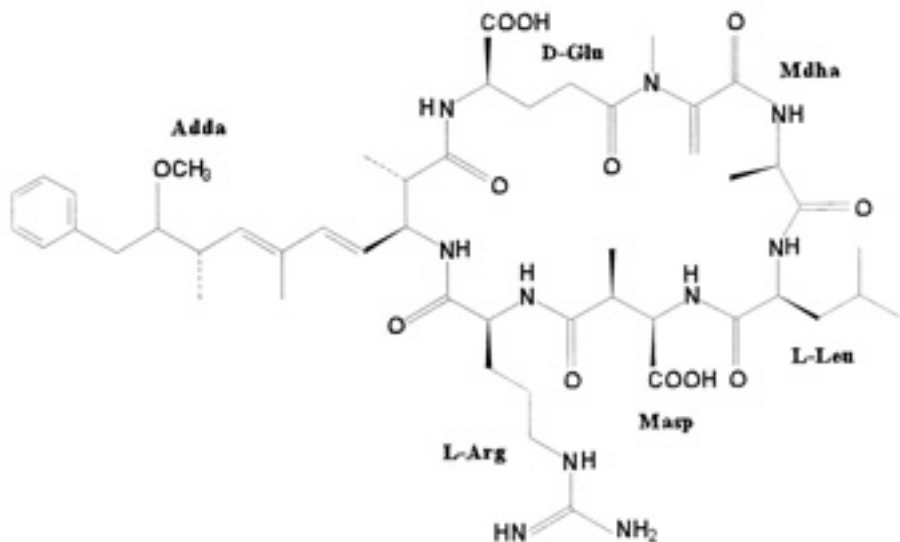
Cyanobakterie, známější pod označením modrozelené řasy, jsou pravidelnou součástí všech povrchových vod. Nejsou to však řasy, nýbrž fotosyntetické bakterie a patří mezi nejstarší formy života na Zemi. Cyanobakterie jsou producentem mnoha velmi toxických látek a častou příčinou otrav divoce žijících i domácích zvířat¹ pijících vodu zamořenou jedy uvolňovanými cyanobakteriemi. Prvá seriózní zpráva o jejich toxicitě pochází z Austrálie z roku 1878. Tehdy způsobily přemnožené cyanobakterie v jednom jezeře smrt tisíců kusů dobytka a vyvolaly zděšení mezi farmáři². Takto zamořená voda je nebezpečná i pro člověka a způsobuje nemoc, známou v Austrálii jako horečka „borcoo“. Typickými příznaky choroby jsou vedle vysoké teploty i těžké průjmy adochází při ní k toxickému poškození jater³. Jiné hromadné otravy zvířat cyanobakteriemi byly hlášeny z USA či Japonska⁴. Cyanobakterie se mohou rozmnožovat i v jiných než povrchových vodách a pak představují vážný zdravotní problém i pro obyvatele měst. V roce 1966 zemřelo na dialyzační jednotce nemocnice v Caruaru v Brazílii⁵⁰ pacientů na toxické selhání jater, protože cyanobakterie se rozmnožili ve vodě používané pro dialýzu^{5,6}. Nedávno byly toxické cyanobakterie nalezeny i v mořské vodě⁷ a bylo prokázáno, že jsou příčinou některých nemocí decimujících umělé chovy lososů v Britské Kolumbii ve státě Washington^{8,9}.

Důvodem vysoké toxicity cyanobakterií jsou některé jimi syntetizované látky, jako např. microcystiny, produkované cyanobakteriemi spp. *Microcystis*, zejména *M. aeruginosa*. Microcystinů bylo až dosud identifikováno více než padesát¹⁰ a jejich skutečný počet bude daleko vyšší. Microcystiny jsou malé cyklické peptidy složené ze sedmi aminokyselin. Je mezi nimi několik aminokyselin, které jinde nebyly nalezeny. Takovou unikátní a pro microcystiny typickou aminokyselinou je kyselina [2S,3S,8S,9S]-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-fenyl-deka-4,6-dienová (Adda). Typická je pro ně také přítomnost D-aminokyselin (D-Arg, D-Ala) či přítomnost N-methyldehydroalaninu (Mdha) nebo kyseliny D-erythro-beta-methylasparagové (Masp). Chemickou strukturu jednoho z nejrozšířenějších microcystinů, microcystinu-LR, vidíme na Obr. 1. Jednotlivé druhy microcystinů se od sebe liší zejména záměny dvou L-aminokyselin (u microcystinu-LR je to L-Arg a L-Leu) resp. absencí methylskupiny v aminokyselině Masp.

Mechanismus toxického účinku microcystinů spočívá v inhibici enzymů ze skupiny protein-fosfatáz. Protein-fosfatázy tvoří skupinu důležitých regulačních enzymů, ovládajících aktivitu tisíce nejrůznějších protein-kináz v buňce, proto jejich inhibice látkami jako jsou microcystiny má pro buňku katastrofické následky. V posledních zhruba deseti letech bylo objeveno větší množství přírodních toxinů, jejichž mechanismus toxického účinku spočívá v inhibici protein-fosfatáz, např. kyselina okadaová¹¹, tautomycin¹² fumonisiny¹³ apod. Tyto látky jsou velmi toxické a jejich zásah do biochemismu buňky je pro buňku fatální. Všechny vykazují mutagenní a karcinogenní účinky.

Microcystiny inhibují zejména protein-fosfatázu 1 (PP-1) a protein-fosfatázu

Obr. 1. Chemická struktura microcystinu-LR, cyklického heptapeptidu složeného z kyseliny [2*S*,3*S*,8*S*,9*S*]-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-fenyl-deka-4,6-dienové (Adda), D-glutamanové (D-Glu), N-methyldehydroalaninu (Mdha), L-leucinu (L-Leu), kyseliny D-erythro-beta-methyl-asparagové (Masp) a L-argininu (L-Arg).



2A (PP-2A), klíčové enzymy podílející se na defosforylaci fosfoserinových a fosfotreoninových skupin buněčných proteinů. Regulace množství fosforylovaných proteinů v buňce je kritická pro udržení homeostázy^{14,15} a proto každý zásah do aktivity protein-fosfatáz má za následek její narušení, což vede k závažným buněčným poruchám^{16,17}. Protože afinita microcystinů k oběma druhům protein-fosfatáz je vysoká, např. IC₅₀ microcystinu-LR pro PP-1 i PP-2A je 0,2 nM¹⁸, stačí na jejich inhibici již nepatrné množství toxinu. Výsledkem je potom vysoká toxicita těchto látek. Tak např. střední smrtná dávka microcystinu-LR (LD₅₀) pro myš při intra peritoneálním podání je jen 50 ug/kg¹⁹. To řadí tyto substance mezi velmi toxické látky.

Pro vazbu microcystinů na protein-fosfatázy je důležitá přítomnost aminokyseliny Adda v jejich molekule. Demethylace na C9 této aminokyseliny ovlivňuje vazbu sice jen nepatrně, ale zato změna konfigurace dienu na C6 z trans formy na formu cis, redukuje vazbu na enzym a toxicitu látky drastickým způsobem²⁰. Také volná karboxylová skupina zbytku kyseliny D-glutamanové je pro toxicitu microcystinů velmi důležitá. Jakákoliv modifikace této skupiny vede k úplné ztrátě toxicity. Naproti tomu zbytek L-argininu je možno nahradit alaninem, fenylalaninem, leucinem, methioninem či homoserinem, aniž by se podstatným způsobem změnila toxicita látky²¹. Micro-

cystin-LR se váže kovalentní vazbou na Cys-273²², který je součástí katalytického centra PP-1^{18,23} a inhibice enzymu je proto ireverzibilní.

Microcystiny představují významný nástroj pro studium regulačních mechanismů v buňce, což umožní lépe pochopit molekulární buněčné procesy. Jejich studium je významné i z hlediska ochrany živočichů před toxickými účinky cyanobakterií, které mohou být přítomny v nejrůznějších vodních zdrojích a mohou tak při její konzumaci ohrožovat životy zvířat i lidí.

Tato práce byla zpracována v rámci projektu MO 66021299116

Literatura

1. Galey F.D., Beasley V.R., Carmichael W.W., Kleppe G., Hooser S.B., Haschek W.M.: *Am. J. Vet. Res.* 48, 1415 (1987).
2. Francis G.: *Nature* 18, 11 (1978).
3. Lambert T.W., Holmes C.F.B., Hrudý S.E.: *Environ. Rev.* 2, 167 (1994).
4. Matsunaga H., Harada K.I., Senma M., Ito Y., Yasuda N., Ushida S., Kimura Y.: *Nat. Toxins* 7, 81 (1999).
5. Jochimsen E.M., Carmichael W.W., An J.S., Cardo D.M., Cookson S.T., Holmes C.E., Antunes M.B., de Melo Filho D.A., Lyra T.M., Bartelo V.S., Azevedo S.M., Jarvis W.R.: *New Engl. J. Med.* 338, 873 (1998).
6. Pouria S., de Andrade A., Barbosa J., Cavalcanti R.L., Barreto V.T.S., Ward C.J., Preiser W., Poon G.K., Neild G.H., Codd G.A.: *Lancet* 352, 21 (1998).
7. Chen D.Z.X., Boland M.P., Smillie M.A., Klix H., Ptak C., Andersen R.J., Holmes C.F.B.: *Toxicicon* 31, 1407 (1993).
8. Andersen R.J., Luu H.A., Chen D.Z.X., Holmes C.F.B., Kent M.L., Le Blanc M., Taylor F.J.R., Williams D.E.: *Toxicicon* 31, 1315 (1993).
9. Williams D.E., McCready T.L., Craig M., Dawe S.C., Kent M.L., Holmes C.F.B., Andersen R.J.: *Chem. Res. Toxicol.* 10, 463 (1997).
10. Craig M., McCready T.L., Luu H.A., Smillie M.A., Dubord P., Holmes C.F.B.: *Toxicicon* 31, 1541 (1993).
11. Murakami Y., Oshima Y., Yasumoto T.: *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 48, 69 (1982).
12. Piwien-Pilipuk G., Galigniana M.D.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 144, 119 (1998).
13. Gelderblom W.C., Jaskiewicz K., Marasas F.W., Thiel P.G., Horak R.M., Vleggaar R., Kriek N.P.: *Appl. Env. Microbiol.* 54, 1806 (1988).
14. Cohen P.: *Annu. Rev. Biochem.* 59, 453 (1989).
15. Hubbard M.J., Cohen P.: *Methods Enzymol.* 201, 414 (1991).
16. Oliver C.J., Shenolikar S.: *Front. Biosci.* 3, 961 (1998).
17. Holmes C.F.B., Boland M.P.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 934 (1993).
18. Dawson J.F., Holmes C.F.B.: *Front. Biosci.* 4, 646 (1999).
19. Stotts R.R., Namikoshi M., Haschek W.M., Rinehart K.L., Carmichael W.W., Dahlem A.M., Beasley V.R.: *Toxicicon* 31, 783 (1993).
20. Nishiwaki-Matsushima R., Nishiwaka S., Ohta T., Yoshizawa S., Suganuma M., Harada K., Watanabe M.F., Fujiki H.: *Jpn. J. Cancer. Res.* 82, 993 (1992).
21. Rinehart K.L., Namikoshi M., Choi B.W.: *J. Appl. Phycol.* 6, 159 (1994).
22. Goldberg J., Huang H., Kwon Y., Greengard P., Naim A.C., Kuriyan J.: *Nature* 376, 745 (1995).
23. MacKintosh C., Beattie K.A., Klumpp S., Cohen P., Codd G.A.: *FEBS Lett.* 264, 187 (1990).

20 žhavých novinek pro rok 2000

KLONOVÁNÍ

Echo™ Cloning System **NEW!**

- Cre rekombináza pro přímé klonování
- jeden donorový vektor, řada expresních vektorů

TOPO® Cloning Kits for Sequencing **NEW!**

ONE SHOT® TRANSFORMACE

MultiShot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* **NEW!**

- 96-jamkový formát

New One Shot® Strains **NEW!**

- INV110 *E. coli* (genotyp *dam/dcm*)
- BL21(DE3)pLysE *E. coli*

GENE EXPRESSION

TOPO TA Cloning Kits for T7-based Expression **NEW!**

Pichia methanolica Expression System **NEW!**

YES™ Vector Collection **NEW!**

- Yeast Expression System, 8 vektorů, *Saccharomyces cerevisiae*

InsectSelect™ System **NEW!**

T-REx™ System **NEW!**

- Tetracycline-Regulated Expression

GeneSwitch™ System **NEW!**

pBudCE4 **NEW!**

- simultánní, nezávislá exprese dvou proteinů z jednoho vektoru

pBC1 Milk Expression Vector Kit **NEW!**

Flip-In™ System **NEW!**

- Flp rekombináza – homogenní stabilní savčí buněčné linie

BsdCassette™ Vectors **NEW!**

- inkorporace genu blastocidinové resistance do kteréhokoli vektoru

ANALÝZA GENOMU

GeneStorm® Expression-Ready Clones **NEW!**

- pro expresi v *E. coli* nebo savčích buňkách

Dual Bait Hybrid Hunter™ Yeast Two-Hybrid System **NEW!**

- simultánní detekce a analýza dvou protein-protein interakcí

Hybrid Hunter™ Libraries and Support Products **NEW!**

PURIFIKACE A DETEKCE PROTEINŮ

Linx™ Rapid Protein Conjugation Kits **NEW!**

- rychlá a snadná konjugace HRP nebo AP s protilátkou pro western blotting a ELISA

Positope™ Control Protein **NEW!**

BUNĚČNÉ KULTURY

im Media **NEW!**

- pre-mixed, pre-sterilized *E. coli* growth media



BIO - BULLETIN

Představujeme:

PanVera Corporation

Americká společnost, která vyvíjí, vyrábí a dodává biologické reagentie, kity a systémy pro molekulární biologii, buněčnou biologii a

proteinovou analýzu. Patří k nejvýznamnějším producentům purifikovaných rekombinantních humánních proteinů a fluorescenčních polarizačních kitů. Je partnerem předních farmaceutických a biotechnologických společností.



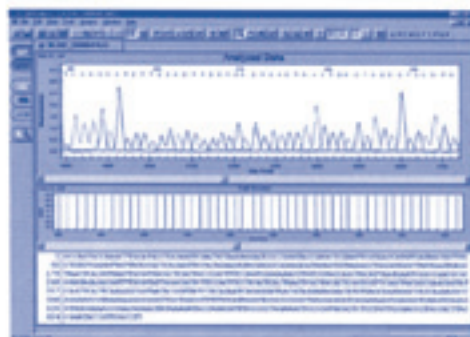
- Beacon 2000 fluorescence polarization systém
- Produkty pro molekulární biologii
 - *transfer a exprese genů*
 - *DNA značení, hybridizace a detekce*
 - *extrakce DNA*
 - *klonování, mapování, systémy pro mutagenesi*
- Produkty pro fluorescenci a fluorescenční polarizaci
- Rekombinantní proteiny
 - *proteinkinázy*
 - *proteiny buněčné signalizace*
 - *receptory steroidních hormonů*
 - *apolipoproteiny*
- Enzymy pro cytochrom P450

CEQ2000 DNA analysis systém

DNA sekvenování

cena – méně než 310

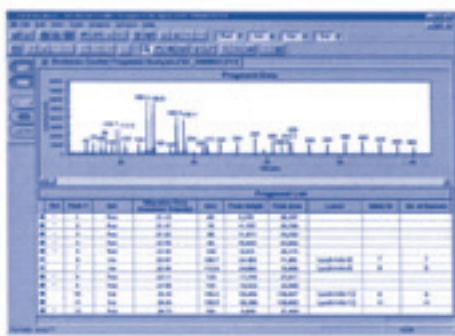
Kč/templát



Analýza fragmentů/genotypizace

kapacita – více než 377

fragmentů/den



Denature

Load
Sample

Separate/Detect
Analyze



Database
Interaction

Automatizace procesu sekvenování



20% sleva po celý rok 2000

...co dodat?

cobo, for od)
 ybídnout 3.
 . obtěžovat,
 díky; —ation
 alchává 24-
 er [so'lisito]
 právní zá-
 so'lisitos) a
 nepokojený
 soui, for o)
 ný † to b)
 —udo [se
 rost(livost,
 i
 ný, celistý,
 lný, solida
 rditý 3. d
 k, kubický
 tuhá látka,
 g ['beorin]
 —fuel ['fju-
 —ly [so-
 lit, upevnit;
 Revraty —ku

sol
 solo
 solace [sol'is] a
 —tia [sol'tial] a stano-
 vratný
 solubility [solju'biliti] a 1. roz-
 solubility 2. (roz-
 řešitelnost; — [solju'bil] a
 1. rozpustitelný 2. (roz-
 řešitelný
 solution [so'lu:šon] a 1. rozto-
 rozpustění 2. (roztočení) 3.
 med. vyproštění, osvobození
 4. med. oddělení dvou částí od
 sebe
 solvability [solvo'biliti] a
 1. rozpustitelnost
 k plnění; —able [solvabl] a
 1. rozpustitelný 2. (roz)řeši-
 telný 3. solventní 4. zast.
 splatný; —o [solv] et 1.
 rozpuštění; —o [solv] et 1.

Solution 2000



Biologické a analytické systémy Předpříprava vody Ultra-Low TOC Vysokokapacitní systémy Reverzní osmóza



The Water Wizard Knows!

Systémy pro přípravu čisté vody Solution 2000™

- Jednoduchá obsluha, tichý provoz
- Kompletní systém
- Kompaktní, snadno umístitelný na zeď, polici či stůl
- Včetně mobilního dispensoru
- Snadno instalovatelné a udržovatelné uživatelem
- Vestavěný uhlíkový předfiltr
- Vysoká kapacita a průtoková rychlost
- Výměnné kartridže a příslušenství použitelné pro ostatní systémy (Millipore a Barnstead)
- Recyklovatelné DI moduly
- Stálá recirkulace
- Výhodná cena