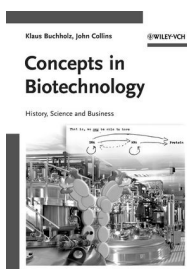


RECENZE



Klaus Buchholz
a John Collins:
**Concepts in Biotechnology.
History, Science and Business**

Vydal Wiley-VCH 2010, měkká vazba,
471 stran, cena 60 Euro.
ISBN: 978-3-527-31766-0

Velmi hezky napsaná předmluva dobře charakterizuje cíl publikace, t.j. dát čtenáři relativně stručný přehled vývoje biotechnologií od konce 19. století po naše dny. Ukazuje na významné úspěchy vědy a využití nových poznatků v praktických aplikacích, jež přispívají ke zvýšení kvality života. Obhajuje důvod rozdělení obsahu publikace do tří částí a stručně glosuje jejich obsah.

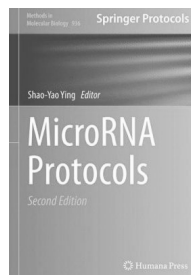
První část se podrobně zabývá historií biotechnologií, která je rozdělena do 4 časových úseků (do r. 1850, 1850–1890 Pasteur a rozpustné enzymy, 1890–1950 organická rozpouštědla, organické kyseliny, enzymové technologie a začátek výroby antibiotik a po r. 1950).

Era „nových biotechnologií“, která je spojena s rozvojem genetiky a jejím uplatněním v biotechnologických aplikacích a byla zahájena zejména rekombinantními DNA technologiemi v sedmdesátých letech již plynule přechází do druhé části nazvané „The New Paradigm Based on Molecular Biology and Genetics“. V této druhé části jsou v zásadě popsány nejdůležitější základy moderních biotechnologií a přehledně jsou vymezeny jejich aplikační oblasti. Nezapomíná se zde ani na etické aspekty biotechnologií a problematiku intelektuálního vlastnictví.

Třetí část nazvaná prostě „Application“ je věnována problematice biochemického inženýrství, industriálním biotechnologiím (biopaliva, bioplyn, velkokapacitní produkce jako aminokyseliny, organické kyseliny, vitaminy, biopolymery a j., aplikace enzymů, biotechnologie v potravinářství a environmentálních aplikacích, aerobní a anaerobní čištění odpadních vod). Následující podkapitola je věnována farmaceutickým biotechnologiím, kde jsou zařazeny mikrobiální fermentace, biotransformace, buněčné kultury, antibiotika, monoklonální protilátky, vakcíny, hormony, cytokiny, krevní deriváty, diagnostické enzymy a protilátky a další biofarmaceutika). Poslední stručnou podkapitolu tvoří rostlinné biotechnologie. Autoři se zde zabývají typy používaných genových modifikací i současnými problémy, které jsou s uplatněním transgenních plodin spojeny (politické, bezpečnostní a etické aspekty, regulační mechanismy, názory veřejnosti). Celá tato třetí část je sice dobře napsána, ale rozhodně není vyčerpávající. To však vzhledem k současnému rozsahu biotechnologií a rozsahu knihy ani nebylo možné.

V každém případě je to kniha zajímavá, která stojí za přečtení a doporučil bych ji zejména jako výukový materiál a velice vhodný informační prostředek pro ty, kteří chtějí získat globální pohled na vývoj i současný stav biotechnologií.

Jan Káš



Shao-Yao Ying (ed.):
MicroRNA Protocols

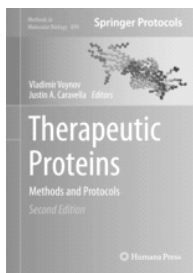
Vydal Humana Press 2013, 2. vydání,
375 stran, 65 obrázků.
Cena 119,99 Euro.
ISBN 978-1-62703-083-0

MicroRNA neboli miRNA jsou nekódující, jednovláknové RNA molekuly, které se skládají z 21–23 nukleotidů, specificky regulujících genovou expresi. Řetězce miRNA vznikají nejprve jako prekursorů, tzv. pri-miRNA, které díky vzájemně komplementárním sekvencím vytvářejí vlásenky a které jsou v jádře procesovány na funkční miRNA. Jejich specifická regulace je dána částečnou komplementaritou k transkriptům genů (mRNA), jejichž expresi regulují (snižují produkci odpovídajících proteinů). Vzhledem ke své funkci našly miRNA podobně jako siRNA rozsáhlé uplatnění v molekulární biologii. Kniha „MicroRNA Protocols“ se po úvodu prezentujícím poněkud nevyvážený přehled nekódujících RNA věnuje konkrétním metodám izolace, detekce a analýzy miRNA, včetně optimalizované metody northern blotu s vysokým rozlišením pro určení délky řetězců miRNA, identifikace genově specifických miRNA, nebo výpočetního schématu pro analýzu sekvencí dat miRNA. Následují metody identifikace miRNA v intronech a konstrukce databází intronových miRNA. Další kapitoly se zabývají např. sledováním a validací interakce miRNA s cílovou mRNA nebo studiem expresních profilů miRNA v *Caenorhabditis elegans*, pluripotentních a embryonálních buňkách, či neuronech v různých stádiích diferenciaci. Dále jsou prezentovány metody přípravy vektorů pro vnášení miRNA a metody studia funkce miRNA *in vitro* i *in vivo*. Je zde demonstrována i možnost použití miRNA pro vytvoření stabilního transgenního myšího modelu, v němž byl konstrukt kódující miRNA cílen do intronu tkáňově specifického genu. Dále jsou popsány např. možnosti umlčení onkogenů v kmenových buňkách, nebo stanovení miRNA ve slinách, jakožto biomarkeru OSCC (oral squamous cell carcinoma). Je zde i nástin možné aplikace miRNA v kosmetice pro bělení pokožky snížením exprese tyrosinasy, nutné pro vytváření melaninu. V závěru knihy jsou příklady klinických aplikací, jako jsou podpoření hojení ran modulací imunitní odpovědi nebo snížení exprese genů nadproduko-

vaných při rakovině prostaty.

Přestože kniha obsahuje řadu dobře zpracovaných kapitol s aktuální problematikou, nelze říci, že je optimálním materiálem pro získání všeobecné orientace v problematice miRNA. Jedná se o nahodilý soubor individuálně zpracovaných témat, z nichž některá mohou být zajímavá pro odborníky v této oblasti.

Tomáš Ruml



Voynov, Vladimir; Caravella, Justin A. (ed.):

Therapeutic Proteins: Methods and Protocols

Vydal Humana Press 2012, 2. vydání,
502 stran, 107 obrázků,
cena 117,65 Euro.
ISBN 978-1-61779-920-4

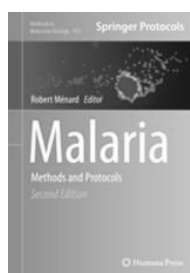
Donedávna byl farmaceutický průmysl orientován zejména na izolaci nebo produkci organických molekul. V současné době rozvoje rekombinantních technologií, kdy disponujeme velkou škálou produkčních kmenů a je znám genom řady organismů, zaznamenáváme posun k hledání a výrobě proteinů pro léčbu i prevenci různých typů onemocnění. Uvedení nového proteinu do klinické praxe je obvykle spojeno s dlouhou cestou charakterizace a testování produktu, včetně řady klinických testů. Důležitou rolí kromě účinnosti léku hraje také vyloučení jeho toxicity a nežádoucí imunitní odpovědi. V případě úspěšných prvotních testů následuje další zdlouhavý proces; optimalizace produkce ve velkém měřítku a charakterizace vlastností finálního produktu.

Toto druhé vydání knihy: „Therapeutic Proteins: Methods and Protocols“ podává v úvodu aktuální přehled o nejprodávanějších terapeutických proteinech a dalších, které byly nedávno schváleny, nebo jsou ve fázi schvalování. Z nich největší podíl na světových trzích představují protilátky a jejich deriváty. Kromě toho jsou vyráběny a testovány proteiny ovlivňující srážení krve, imunitní systém, dále sem patří např. enzymy, hormony a podpůrné proteiny pro regeneraci tkání. Tématem dalších kapitol je přehled různých typů knihoven protilátek a phylomero-vých knihoven peptidů, které přes svoji malou velikost (cca 15 až 50 aminokyselin) jsou dostatečně dlouhé, aby zaujaly sekundární strukturu. V kapitolách věnovaných těmto problematikám jsou popsány protokoly přípravy knihoven a metod jejich testování, jako jsou ribosomální či kvasinkový displej. Další část je zaměřena na návrh a produkci domén protilátek, „affibodies“, tj. malých ligandů neimunoglobulinové povahy, dále tzv. duálních variabilních domén imunoglobulinů, jež specificky váží zároveň dva cíle, nebo tzv. di- a tribodies, což jsou terapeutické deriváty protilátek. Ty využívají schopnost heterodimerizace těžkého a lehkého řetězce Fab fragmentů pro vytvoření lešení pro připojení funkčních vazebných skupin, pří-

čemž tribodies vykazují delší retenci v organismu. Z oblasti exprese proteinů v *E. coli* jsou představeny protokoly pro produkci membránových proteinů nebo pro produkci jediného proteinu po eliminaci veškerých intracelulárních mRNA. Pasáž exprese buněčnými liniemi diskutuje jak transientní expresi, tak přípravu a využití stabilních transfektantů. Nechybí ani produkce terapeutických proteinů v *Arabidopsis thaliana*. Pozornost je věnována i purifikaci produktu např. odstranění endotoxinů a virů. Jsou popsány metody charakterizace produktu jako analýza N-glykanů včetně využití databází pro glykobiologii. Jsou popsány také způsoby charakterizace farmaceutických výrobků změněné jak na cíleně vytvořené modifikace např. PEGylace, nebo negativní jevy jako je např. výskyt okem neviditelných částic a proteinových agregátů, či analýza isomerace aspartátu, která je indikátorem degradace proteinů. Jsou nastíněny i počítačové metody predikce a simulace agregace proteinů. Závěr knihy pojednává o dvou způsobech formulace léků, a to chitosanových nanočásticích a konjugátech protilátek s léky.

Dle mého názoru může tato kniha být užitečným rádcem studentům i odborníkům zabývajícím se terapeutickými proteiny. Její hlavní přednost spatřuji v tom, že podává aktuální přehled této problematiky. Ten je doplněn některými nejdůležitějšími protokoly pro jednotlivé techniky.

Tomáš Ruml



Robert Ménard (ed.):
Malaria: Methods and Protocols

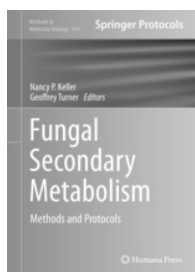
Vydal Humana Press 2013, 2. vydání,
626 stran, 75 obrázků, cena 133,70
Euro.
ISBN 978-1-62703-026-7

Malárie je vážné onemocnění způsobené parazitem *Plasmodium falciparum*, který je přenášen komáry. I přes pokrok ve výzkumu malárie a snahu zavádět jeho výsledky do lékařské praxe, umírají na tuto nemoc ročně až tři miliony lidí. Lze však konstatovat, že rozvoj metod molekulární genetiky v posledním desetiletí představuje slibnou perspektivu pro výzkum malárie. Toto druhé vydání knihy „Malaria: Methods and Protocols“ poskytuje detailní popis současných metod laboratorního výzkumu malárie. Kniha je poměrně obsáhlá a zahrnuje celkem 41 kapitol, rozdělených do sedmi tematických okruhů. První z nich se zabývá základním a dosud ne zcela zvládnutým krokem tohoto výzkumu, a sice technikami kultivace plasmodia *in vitro* i ve zvířecím modelu, laboratorních myších. Logicky navazuje část pojednávající o genetických metodách od přípravy a selekce stabilních transfektantů, či transientní transfekce, přes využití rekombinací pro změny genomu plasmodia, umlčení genů pomocí siRNA, až po metody standardizace klasifikace mutantů tohoto parazita. Třetí

část s názvem „OMIC techniques“ prezentuje metody kvantitativního PCR, mikročipů, vysokokapacitní metody sekvenování „nové generace“ pro analýzu expresního profilu či analýzu sekvenčních polymorfismů kmenů plasmodia. K nim se dále řadí metody proteomiky a metaboliky jako studium fosfoproteomu a hydrofilních metabolitů *P. falciparum*. Další část si všímá stavu infikovaných červených krvinek od jejich mikroskopického pozorování po metody izolace merozoitů *P. falciparum* a použití průtokové cytometrie pro zjištění intracelulárních Ca^{2+} iontů. Ty jsou totiž důležitým signálním poslem pro sekreci proteinů nutných pro invazi tohoto parazita. Následuje filtrační metoda měření hemodynamických vlastností, jakožto indikátoru deformačních změn erythrocytů, nebo použití mikroskopie atomárních sil pro analýzu infikovaných krvinek. Jsou diskutovány i některé dílčí a velmi specifické metody jako možnost překonání problémů při produkci membránového proteinu *P. falciparum* bohatého na cysteiny, sekvenování DNA získané imunoprecipitací specificky modifikovaných variant histonů, *in situ* zobrazování transkripčních míst *P. falciparum* v synchronizovaných krevních kulturách různých stádií infekce nebo luminiscenční zobrazování infikovaných krvinek v laboratorních myších s využitím transgenního *P. berghei* produkujícího luciferasu. Další metody se týkají studia zobrazování a kvantifikace stádií infekce před vstupem plasmodia do erythrocytů, jako je posuzování pohyblivosti sporozoitů, kvantifikace jejich vstupu do hepatocytů a přechodu do dalších buněk a posuzování různých stádií vývoje v hepatocytech včetně kvantifikace jednotlivých stádií *P. berghei*, produkujícího luciferasu. Další část knihy obsahuje kapitoly zabývající se imunitní odpovědí na infekci plasmodiem. Jsou zde metody přímé analýzy odpovědi lidských NK buněk nebo myších CD8 T buněk vakcinovaných atenuovaným *P. yoelii* a konstrukce modelových systémů jako jsou chimerní plasmodia pro imunologické studie nebo myší model s transgenním T-buněčným receptorem. Poslední oddíl je cílen na léčbu malárie. Popisuje metody testování inhibitorů, různé způsoby vakcinace a posuzování jejich účinnosti.

Knihy je rozsáhlým přehledem současných metod používaných pro studium malárie. Předpokládám, že vědeckí pracovníci zaměřeni na tuto oblast ji mohou ocenit.

Tomáš Ruml



Nancy P. Keller, Geoffrey Turner (ed.):

Fungal Secondary Metabolism: Methods and Protocols

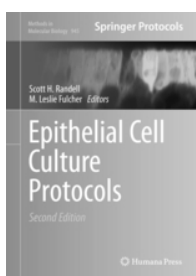
Vydal Humana Press 2012, 288 stran, 60 obrázků, cena 101,60 Euro. ISBN 978-1-62703-122-6

metabolitů. Sem spadá například řada antibiotik. Současné molekulárně biologické metody umožňují nové přístupy k identifikaci takovýchto látek a k cílené změně producentů tak, aby bylo dosaženo jejich zvýšené produkce např. cílenou mutagenezí regulačních domén v DNA. Navíc je možné využít genového inženýrství k optimalizaci produkovaných látek. Kniha: „Fungal Secondary Metabolism: Methods and Protocols“ si klade za cíl představit současně metodologie používané pro vyhledávání, produkci, purifikaci a testování sekundárních metabolitů. Počátek knihy je věnován přípravě genomových knihoven, vysokokapacitnímu sekvenování plísňových genomů a analýze sekvenčních dat, včetně možností identifikace klastřů genů kódujících enzymy biosyntetických drah sekundárních metabolitů. Další pasáž se týká způsobu kultivace plísní, indukce produkce sekundárních metabolitů a regulace fenotypového projevu změnami kultivačních podmínek. Dosažení požadovaného profilu metabolitů, stejného jako při růstu na povrchu pevného média za současného zvýšení kapacity by měla poskytovat metoda, při níž plísně prorůstají do porézního materiálu. Kultivace zde probíhá v rotujících lahvích s limitovaným množstvím tekutého média. Další kapitoly jsou zaměřeny na purifikaci a analýzu sekundárních metabolitů produkovaných různými rody plísní, včetně analýzy alkaloidů a těkavých látek. Druhá polovina knihy je orientována na metody pro přípravu geneticky modifikovaných kmenů, jako jsou cílené změny promotových oblastí a mutace genů, konstrukce vektorů a jejich použití k vnesení více genů zároveň. Následující kapitoly jsou zasvěceny speciálním metodám zahrnujícím vysokokapacitní identifikaci regulátorů produkce, studium proteinových komplexů purifikovaných tandemovou afinitní chromatografií, nebo využití diferenční analýzy 2D NMR spekter pro porovnání metabolomů. Závěr je pak dedikován kapitolám z různých oblastí, z nichž jedna je imunoprecipitace chromatinu protilátkami proti různě modifikovaným histonům pro identifikaci domén DNA, včetně tabulky udávající příklady vztahu těchto modifikací s konkrétními biosyntetickými drahami. Jsou prezentovány i protokoly pro využití cílené proteomické analýzy pro optimalizaci metabolických drah, studium interakcí regulačních proteinů uvnitř plísňových spor, purifikaci intracelulárních váčků, v nichž jsou akumulovány aflatoxiny, použití dutých vláken naplněných lidskými buněčnými liniemi a implantovaných do imunodeficientní myši, spojující *in vitro* a *in vivo* metodu vyhledávání nových cytostatik produkovaných plísněmi. Poslední kapitola popisuje analýzu fungální genové exprese pozměněné v důsledku odpovědi plísní na kontakt s hmyzím predátorem.

Knihy je dle mého názoru dobře zpracována a prezentuje některé aktuální techniky. Přestože není uceleným přehledem, věřím, že může odborníkům na tuto problematiku přinést cenné informace.

Tomáš Ruml

Je všeobecně známo, že plísně produkují velké množství rozmanitých látek, patřících do kategorie sekundárních



Scott H. Randell, M. Leslie Fulcher (ed.):

Epithelial Cell Culture Protocols

Vydal Humana Press 2012, 2. vydání, 469 stran, 82 obrázků, cena 117,65 Euro.
ISBN 978-1-62703-125-7

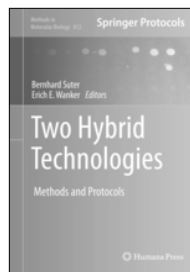
Epitel, jakožto vnější i vnitřní povrch organismu, je primárním místem interakce s mutageny a toxickými látkami. Kromě ochranné role má i sekreční funkci, neboť řada žláz je tvořena právě epitelovou tkání. Důležitá je i smyslová a podpůrná funkce epitelu. Se změnami epiteliálních buněk souvisí řada onemocnění, zejména nádorových. Proto jsou tyto buňky předmětem lékařského výzkumu a epiteliální buněčné linie se staly jedním z nejpožívanějších buněčných systémů. Toto druhé vydání knihy „Epithelial Cell Culture Protocols“ poskytuje podrobně popsané protokoly opatřené potřebným úvodem do problematiky.

Knihla popisuje metody přípravy a kultivace různých typů epiteliálních buněk od modifikace kultury buněk drozofily *Ras* onkogenem, po kultivaci buněk choroidního plexu pro studium struktury a funkce bariéry mezi krví a mozkomíšni tekutinou a patogenních stavů způsobených jejich poruchami. Další protokoly se týkají kultivace buněk epitelu oka, konkrétně spojivky, rohovky a její pigmentované vrstvy. Další lidské epiteliální buňky, jimž je věnována pozornost, jsou keratinocyty hltnu, ústní dutiny, jazyka, nosu a průdušek. Je zde popsána i klasická metoda kultivace lidských keratinocytů na podpůrné vrstvě myších embryonálních fibroblastů NIH 3T3 a kultivace samotných myších epidermálních keratinocytů. Protokoly pro kultivaci dalších epiteliálních buněk modelových organismů jsou uvedeny pro myši tracheální epitel a krysí alveolární epitel. Kultivace lidských a myších prsních epiteliálních buněk ve trojrozměrné kultuře je prezentována jako fyziologicky relevantní model, poskytující lepší přiblížení fyziologickým parametrům ve srovnání s buněčnou monovrstvou. Navazující kapitoly se týkají izolace a kultivace vybraných typů buněk jako např. epiteliálních buněk brzlíku, včetně jejich reagrace pro vytvoření funkčních štěpů brzlíku, nebo selektivní obohacení jaterního homogenátu o zárodečné buňky. Dále jsou nastíněny problémy dlouhodobé kultivace hepatocytů a možnosti eliminace jejich změn v buňky podobné fibroblastům v důsledku akumulace stresových vláken. Další protokoly prezentují způsoby kultivace epiteliálních buněk žlučníku, tenkého střeva, ledvin, ženských reprodukčních orgánů, prostaty a močových cest. Závěrečné kapitoly ukazují speciální metody jako je model pro testování efektu signalizačních molekul při tvorbě ektodermálních orgánů, nebo využití různých virových vektorů při přípravě lidských buněčných linií.

Knihla je dle mého názoru dobře zpracována a prezentuje řadu pokročilých technik kultivace epiteliálních bu-

něk. Věřím, že může být zajímavá zejména pro odborníky pracující v této oblasti.

Tomáš Ruml



Bernhard Suter, Erich E. Wanker (ed.):
Two Hybrid Technologies: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) Vol. 812

Vydal Humana Press, 2012, vydání první, 340 stran, pevná vazba, cena 89 €.
ISBN 978-1617794544

Při zkoumání takřka všech procesů, odehrávajících se v živých buňkách, hrají roli interakce mezi proteiny. Metody umožňující průzkum celých interaktomů jsou tudíž klíčové nejen pro systémovou biologii. Cílem klasických technik i nově vyvíjených metod je efektivní vyhledání proteinových interakcí, kvantifikace jejich síly a v neposlední řadě i jejich nezávislé ověření. Kniha „Two Hybrid Technologies“ si klade za cíl shrnutí protokolů pro zkoumání protein-proteinových interakcí klasickými dvojhybridními systémy, jejich variantami a dalšími *in vivo* metodami, a to ve dvou relativně striktně oddělených sekcích. Zatímco první část nás provede protokoly, používanými ve vysokokapacitním testování protein-proteinových interakcí, v části druhé jsou popsány inovativní metody vyhledávání interakcí mezi proteiny, které mají potenciál nahradit techniky stávající.

Od roku svého objevení v roce 1989 prochází metodika dvojhybridního kvasinkového systému bouřlivým vývojem, který je postupně shrnut v prvních 12 kapitolách knihy. Jsou zde shrnuty jak dva nejčastěji používané přístupy strategií testování, tak různá vylepšení. Čtenář v první části najde i kapitoly o specifických interaktomech, jako je např. virus – lidská buňka. V závěru jsou poté shrnuty techniky klasifikace interakcí a způsoby, jak oddělit falešně pozitivní od opravdových, biologicky relevantních interakcí.

V druhé části knihy stojí za pozornost popis membránového dvojhybridního systému, systému založeného na interakci tetracyklinového represoru a operátoru, vykazujícího významně nižší hladinu falešně pozitivních výsledků či tzv. fluorescentního dvojhybridního systému pro vizualizaci interakcí proteinů ve vybrané buňce. V úplném závěru najdeme kapitoly, zabývající se systémem MAPPIT (z angl. *Mammalian Protein-Protein Interaction Trap*) pro studium lidského interaktomu.

Některé kapitoly byly významně detailnější, než jiné, ale tato nekonzistence není na škodu, čtenář získává touto knihou zajímavý náhled nejen do historie, ale hlavně do budoucnosti sledování interakcí pomocí dvojhybridních systémů.

Jan Lipov