

O čem se (ne)mluví Mýtus o udržitelné produkci taxolu houbami

Vědecká komunita se občas setká s fascinující hypotézou, která rozproudivší představivost výzkumníků po celém světě. Zvláště když je publikována prestižním týmem v uznávaném periodiku *Science* a doprovázena komentářem se zvučným titulkem „Surprise! A Fungus Factory For Taxol?“ (Stone 1993). Jeden takový příběh se odehrál kolem hub a jejich údajné schopnosti produkovat taxol, silný protirakovinný prostředek, který se získává z kůry tisu (*Taxus*). V 90. letech vědci oznámili objev, že taxol může být produkován také houbou žijící uvnitř rostlin tisu. Objev byl přijat s nadšením, protože nabízel naději na udržitelný a levnější způsob výroby tohoto důležitého léku. Následovala lavina podobných studií o houbách produkujících taxol. Není divu, když roční prodeje taxolu jsou v řádech miliard dolarů a pořád rostou. Uplynulo 30 let a výroba taxolu z hub je stále v nedohlednu. Kde se stala chyba? Stále více studií poukazuje na řadu kontroverzí a samotná schopnost tvorby taxolu houbami se jeví jako pochybná. Není to celé jen příběh vědecké nedbalosti?

Taxol a jeho využití v medicíně

Taxol, známý také pod obchodním názvem paclitaxel, je jedním z nejvýznamnějších protirakovinných léků. Využívá se při léčbě různých typů rakoviny, včetně nádorů prsu, vaječníků a plic. Byl objeven jako součást programu NCI ve Spojených státech amerických, ve kterém byly hledány nové protirakovinné látky v přírodních produktech. V r. 1967 byl jako slibný kandidát identifikován taxol izolovaný z kůry tisu západoamerického (*T. brevifolia*). Izolace a produkce taxolu však byla kvůli nízké koncentraci látky v tisu náročná. Extrakce vyžadovala kácení tisíců, což mělo negativní dopad na životní prostředí a bylo neudržitelné. To také prodloužilo zavedení taxolu do klinické praxe, takže pacienti se ho dočkali až v r. 1992. Proto byly vyvinuty alternativní metody produkce, včetně semi-syntetických cest, které využívají prekurzor taxolu, baccatin III, získávaný z jehličí tisu červeného (*T. baccata*). Dalším významným krokem vpřed bylo zavedení buněčných kultur tisu. V posledních letech se také zkoumají geneticky modifikované mikroorganismy, do jejichž genomu byly vloženy geny tisu zodpovědné za syntézu taxolu. Tyto organismy, tedy konkrétně modifikovaná bakterie *Escherichia coli* a pivovarská kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, by mohly produkovat taxol nebo jeho prekurzory, což by mohlo dále zlepšit efektivitu a udržitelnost výroby. I po 30 letech zájem o taxol neupadá a jde o zavedený lék, od kterého se neustupuje. Současným trendem ve farmaceutickém výzkumu je hledání nových aplikací pro již schválená léčiva s dobře známými vedlejšími účinky.



1 Tis červený (*Taxus baccata*). Otto Wilhelm Thomé (1885). Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz

Taxol se nyní testuje jako lék na lupénku a neurodegenerativní onemocnění, jako jsou Alzheimerova a Parkinsonova nemoc.

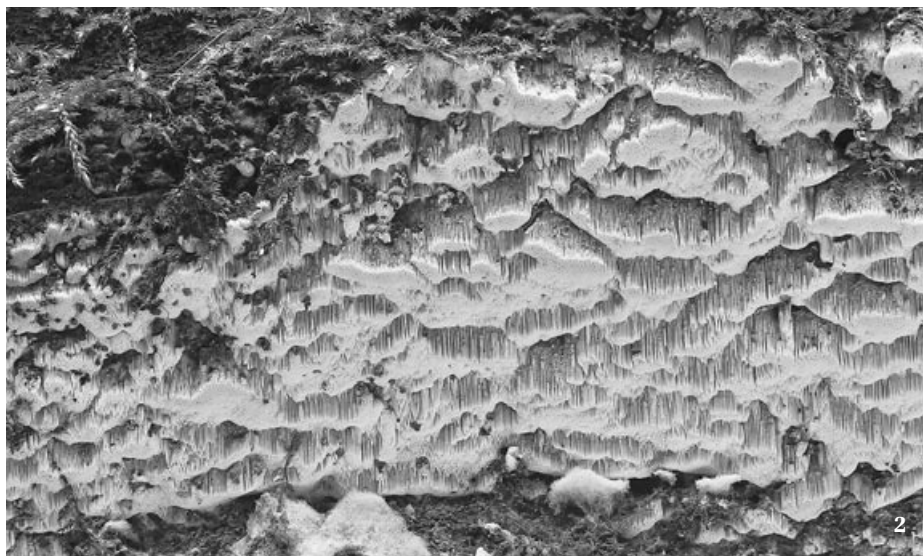
Překvapivý nález taxolu u hub a velké naděje

Příběh začal v r. 1993, kdy američtí vědci Andrea Stierle, Gary Strobel a Donald Stierle v časopise *Science* ohlásili, že objevili taxol v houbě izolované z kůry zdravého

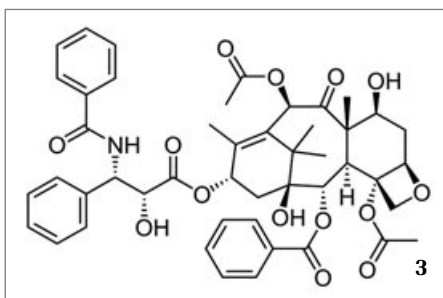
tisu západoamerického. Šlo tedy o endofytní houbu, žijící ve zdravých pletivech rostlin (blíže v *Živě* 2017, 5: 227–231). Tuto houbu zároveň popsali jako nový rod a druh *Taxomyces andreanae*. Výsledky skupiny G. Strobel byly přijaty bez výhrad, zejména proto, že tento vědec byl uznávaným odborníkem na extrakci a identifikaci taxolu. Naděje byla velká – možnost udržitelné produkce taxolu pomocí kultivace by mohla významně snížit náklady a environmentální dopady spojené s extrakcí z tisu. Navíc byla vyslovena hypotéza, že geny rostliny patrně přeskočily (horizontálním přenosem) do genomu hub. To také rozpoutalo studium metabolitů endofytů léčivých rostlin. Dokonce se nabízela možnost, že žádané metabolity léčivých rostlin by ve skutečnosti mohly být produkty trvale přítomných endofytních hub. Objev spustil vlnu hledání nejen taxolu u hub, ale i dalších léčiv z hub získaných z medicínálních rostlin. Původní článek sám má už skoro tři tisíce citací, včetně mnoha originálních prací, které udávají nález taxolu u řady druhů hub, izolovaných jak z rostlin, tak třeba ze srsti medvěda pandy. V současné době je taxol uváděn z více než 200 druhů hub ze 40 rodů napříč vřeko- i stopkovýtvarnými. Produkce houbového taxolu v tekuté kultuře se však pohybuje v řádech nanogramů až mikrogramů, výjimečně jednotek miligramů na litr. Toto mizivé množství je biotechnologicky nezájímavé, ale řada prací se věnuje navýšení jeho produkce. I přes nesmírnou lukrativnost tematiky je třeba přiznat, že taxol z hub nikdo komerčně nevyrábí a celé téma provází řada kontroverzí a pochybností. Naprostá většina studií vychází v okrajových vědeckých časopisech (včetně predátorských), má závažné metodické a formální nedostatky, často v rozporu se základními pravidly vědecké práce. Na tyto nedostatky upozornilo pět publikací, včetně prací Marca Stadlera z Helmholtz Centre for Infection Research (Německo) a M. Kolaříka (autora tohoto příspěvku) vzniklých v rámci EU projektu Mycobiomics. Pojďme si je shrnout a ukázat, že z houbového taxolu se stala místo továrny na lék továrna na články a citace, a přiznat si fakt, že taxol z hub nebude patrně nikdy komerčně získáván.

Neověřitelná tvrzení a metodologické nedostatky

Články z taxolové továrny na publikace vykazují jeden společný znak. Nejdou reprodukovat. Autoři totiž ignorují podmínku uložení studovaných kmenů do veřejných sbírek. Takže výsledky studií nelze nezávisle ověřit. Výjimkou je původní americký kmen druhu *Taxomyces andreanae*, který v r. 2013 detailně studoval německý tým Stefana Jenneweina a produkci taxolu nepotvrdil (Heinig a kol). Hlavní metodickou slabinou většiny prací jsou nedostatečné metody detekce. Nejčastěji se uplatňuje imunochemická detekce za použití monoklonálních protilátek, která je spojená s velkým rizikem falešně pozitivních výsledků. To zejména hrozí při studiu materiálů odlišných od pletiv tisu, pro která byla metoda vytvořena a ověřena. Studie často používaly kapalinovou chromatografii spolu s hmotnostní spektrometrií (HPLC-DAD a HPLC-MS), ale zřídka ověřovaly výsled-



2 Houba pórnatka bledoplavá (*Ceriporiopsis gilvescens*) tvoří rozlité plodnice na mrtvém dřevě. *Taxomyces andreanae* patří ve skutečnosti do rodu *Ceriporiopsis*, konkrétně do blízké příbuznosti druhu *C. gilvescens*, nebo je s ním totožná. Spolehlivé zařazení do druhu vyžaduje další studium severoamerických položek. Foto L. Zíbarová
3 Taxol, strukturně poměrně složitý diterpen. Z archivu autora



ky pomocí NMR spektroskopie (NMR – nukleární magnetická rezonance), což je nezbytné pro potvrzení struktury sloučenin. Navíc často chyběly pokusy o purifikaci (vyčištění od kontaminantů) a následnou detailní analýzu detekovaných sloučenin. Nedodržení těchto postupů, zvláště v případě tak složitých látek, jako je taxol, může vést k falešně pozitivním výsledkům, tedy záměně za podobné sloučeniny.

Pro naprostou většinu prací je také typická rezignace na spolehlivou identifikaci dané houby. Autoři houby určují jen podle morfologie, což není dostatečné. Pokud publikují sekvenční data, tak jen pro málo variabilní region ITS rDNA, který u studovaných hub většinou nepostačuje na spolehlivé určení. Takže i samotná informace o taxonomickém zařazení produkujícího kmene je v naprosté většině prací bezcenná. Toto je ostatně u studií chemických látek hub běžné. Dobře to demonstruje příběh druhu *T. andreanae*, který byl popsán na základě morfologie, což bylo v r. 1993 obvyklé. Zatímco celý genom této houby byl publikován již v r. 2013, až v r. 2022 napadlo vědce určit její taxonomickou identitu. Ostatně nebylo k tomu třeba nic jiného, než z publikovaného genomu vytáhnout úseky DNA používané pro zařazení hub do fylogenetického stromu (více Živa 2023, 6: 287–290). Výsledky ukázaly, že údajný *T. andreanae* patří ve skutečnosti do rodu pórnatka (*Ceriporiopsis*), což je běžný rod chorošovitých houby, tedy zástupce řádu chorošovitých (*Polyporales*), tvořící rozlité plodnice na mrtvém dřevě různých jehličnanů i listnáčů (obr. 2). Tyto houby nemají v kultuře žádné určovací znaky, proto v době popisu nebylo možné houbu blíže zařadit. Rod *Taxomyces* měl jakousi auru výjimečnosti a vzácnosti, takže nic nebránilo uvěřit jeho zázračným metabo-

lickým vlastnostem. Otázkou je, jestli by k podobné taxolové máni došlo i v případě, kdyby byl znám fakt, že tento rod houby není nijak vzácný a rozhodně není vázaný jen na tisy a endofytní způsob života.

Absence dat o genetickém pozadí produkce taxolu

V době objevu taxolu u hub, tedy v předgenomické době, se horizontální přenos genů mezi říši rostlin a hub jevil jako možný a častý. Příčinou byl fakt, že řada látek známých z rostlin se vyskytuje také v hubách. Příkladem přímo zmíněným v článku v Science je giberelin, důležitý fytohormon produkovaný naprostou většinou cévnatých rostlin. Ale poprvé byl objeven právě u hub, u vrčkovýtrusné houby *Gibberella fujikuroi* (nyní *Fusarium fujikuroi*), po které byl pojmenován. Až genomické studie ukázaly, že biosyntetické dráhy houbového a rostlinného giberelinu si nejsou příbuzné. Do dnešní doby nebyla možnost horizontálního genového přenosu mezi rostlinami a houbami empiricky doložena.

Další zásadní argument proti produkci taxolu houbami představuje genetická složitost tohoto procesu. Biosyntéza taxolu není zatím plně pochopena, nicméně je zřejmé, že zodpovědné geny nejsou uspořádány v jednom genovém klastru, na rozdíl od biosyntézy mnoha houbových metabolitů. Tento fakt sám o sobě činí často postulovaný horizontální přenos genů mezi tisem a endofytními houbami vysoce nepravděpodobným, ne-li nemožným. Přesto si mnoho výzkumných skupin tuto skutečnost neuvědomuje a snaží se hledat homologní geny z rostlinné biosyntetické dráhy taxolu u hub. Následný objev i jednoho genu z asi 19 potřebných je pak považován za diagnostický znak produkce taxolu. Nalezení homologu prvního genu v této dráze,

kódujícího taxa-4(5),11(12)-diene syntázu, uvádí řada prací, žádná z nich ale sekvence nepublikovala. Mnohé také zmiňují přítomnost některého z dalších potřebných genů, typicky doloženého přítomností PCR fragmentu získaného za použití primerů pro rostlinný gen, či jeho hybridizací. Opět bez publikace příslušných DNA sekvencí. Nakonec studium genomu originálního kmene *Taxomyces* ukázalo, že zde nejsou žádné geny s obdobnou sekvencí, jakou nacházíme v genomu tisu. Konečně řada přehledových publikací připouští, že produkce taxolu u hub vznikla nezávisle. Avšak žádná ze studií, které porovnávaly genom a transkriptom produkčních a neprodukčních mutantů stejného kmene, neposkytla jakýkoli náznak o možné biosyntetické dráze pro houbový taxol.

Ekologické a biochemické argumenty

Taxol je velmi účinný inhibitor beta-tubulinu, proteinu nezbytného pro všechny eukaryotické organismy. To znamená, že má silné antifungální a fytotoxické účinky. Houba, která by produkovala taxol, by tedy potřebovala vyvinout mechanismy na jeho detoxikaci, což by bylo energeticky náročné a snížilo by to její konkurenceschopnost. I samotná syntéza taxolu by byla pro houbu velmi energeticky náročná a opět to dále snižuje pravděpodobnost deklarované produkce.

Nafouklá bublina kolem endofytů léčivých rostlin

Zájem o taxol z endofytů tisu vycházel od počátku z mylného předpokladu, že endofyty tisu budou mít větší kapacitu pro produkci taxolu, a to díky možnosti horizontálního přenosu genů. Endofytní houby žijí ve zdravých rostlinných pletivech, uvnitř buněk nebo v mezibuněčných prostorách, aniž by způsobovaly jakýkoli symptom. Jen několik endofytních druhů hub tvoří vysoce provázané, obligátní symbiotické vztahy a jejich stabilní symbióza se udržuje šířením semen hostitele. Tito symbionti, kam patří rod *Neotyphodium* obývající trávy (lipnicovité – *Poaceae*), jsou hostitelsky specifictí a žijí endofytně po celý svůj život. Oproti tomu naprostá většina endofytních hub není hostitelsky specifická, mohou žít i jako saprotrofové nebo patogeny, v závislosti na okolních podmínkách. Příkladem jsou vrčkovýtrusné houby rodu dřevnatka (*Xylaria*) i druh *Taxomyces andreanae* (tedy vlastně *Ceriporiopsis andreanae*, Cheng a kol. 2022), s plodnicemi na mrtvém dřevě, kde vytvářejí spory. Tyto spory vyklíčí na zdravé rostlině, např. listu či borce, a houba žije jako endofyt. Po odumření rostliny dále žije jako saprotrof rozkládající mrtvou rostlinnou hmotu a vytváří plodnice. Endofytismus je pro tyto houby ale jen příležitostným a přechodným stadiem životního cyklu. Ačkoli mohou mít s hostitelskou dřevinou určité mutualistické vztahy, neexistuje žádný důkaz o koevoluci. Mimochoodem, studie hledající taxol mimo endofytní houby také ukazují široký záchyt taxolu. V důsledku to tedy znamená, že bioprospekce houbových endofytů je nafouklá bublina a neexistuje žádný důvod domnívat se, že mají větší biotechnologický potenciál než jiné houby.

Je houbový taxol podvod?

Podle literatury to vypadá, že taxol, strukturně složitý diterpen (obr. 3), extrémně složitý na biosyntézu, je poměrně častý houbový metabolit. Navíc je rozšířený například řadou velmi nepříbuzných druhů. Zde jsme shrnuli kritiku tohoto tvrzení. První objev v r. 1993 byl založen na v podstatě neměřitelné produkci 50 ng/l, ověřené z dnešního pohledu nedostatečnou metodikou. Obdobně následující práce prezentují buď nepřesvědčivé, či přímo podezřelé výsledky. Lze tedy říci, že taxol u hub je podvod?

Bez možnosti reprodukovat výsledky s autentickými kmeny, kde je deklarována větší produkce taxolu, to tvrdit nelze. Navíc je houbová produkce komplexních a minoritních látek velmi nestabilní – po čase uchování v kultuře může mizet, což dále ztěžuje ověření. Je ale velmi pravděpodobné, že k ověřování výsledků došlo a dochází. Tedy konkrétně ze strany farmaceutických firem, které od daných kmenů patrně daly ruce pryč a výsledky nemají důvod zveřejňovat. Publikace negativních výsledků představuje obecně problém, protože o ně časopisy nemají zájem.

Příběh o taxolu je tedy spíš varováním před unáhlenými závěry a zdůrazňuje potřebu kritického myšlení a důkladného ověřování vědeckých objevů. To, co bylo na začátku prezentováno jako hypotéza (např. horizontální přenos genů), je v dalších publikacích, které tvrzení přejímají,

uváděno jako fakt. Jakmile totéž převezmou stovky prací, hypotéza se stává neotřesitelnou realitou. Stejně tak se autoři odkazují na předešlé práce, které používají nedostatečnou metodiku, čímž ospravedlňují použití téže nesprávné metodiky. To, že originální práce vyšly před dávnými roky nebo v časopisech bez řádného recenzního řízení, už málokdo dohledává. A opět, stovkami následných citací se daný postup kodifikuje a stává normou. Originálních publikací o taxolu z hub je pouze několik set. Další tisíce však citují příběh taxolu jako důkaz úspěchu mykologie a bioprospekce, a ospravedlňují tím svůj výzkum. Jak přibývá originálních prací, je potřeba psát stále nové přehledové články o obrovském potenciálu taxolu z hub. Editoři časopisů se radují a podobně příspěvky rádi přijímají, protože zaručují dobrou citovanost. Autoři jedoucí na taxolové vlně, kde je hlavní získání publikací a citací, a tedy grantů, peněz a prestiže, pak nemají moc času na zamyšlení a čtení předešlých prací. Tuto ledabylost bych demonstroval konkrétním příkladem. Naše práce Tian Cheng a kol. (2022) poukázala na kontroverze ohledně taxolu. Článek nasbíral zatím 10 citací, skoro z poloviny z nich ale nemůžeme mít radost, protože odkazují na něco, o čem vůbec nepíšeme, popřípadě to zcela překrucují (bližší viz Stadler a Kolařík 2024). Zmínil bych práci Mahendry Raie a kol. (2023), která náš článek o taxonomii *T. andreae* cituje jako důkaz, že houbový rod

Phoma produkuje taxol. V našem textu se ale slovo *Phoma* nevyskytuje. Práce Kamalraje Subbana a Franka Kempkena (2022) nás zase uvádí jako důkaz přítomnosti genů pro syntézu taxolu v genomu neurčeného kmene *Fungal sp.* EF0021, který jsme prý izolovali z tisu a sekvenovali jeho genom.

Poděkování houbovému taxolu

Ať je houbový taxol virtuální, nebo skutečný, přes výše uvedená negativa v pozitivním slova smyslu zásadně pomohl rozvoji mykologie. Díky tomu bylo možné financovat studium endofytních i jiných hub a taxolem doložit širší dopad a aplikační potenciál, tedy nezbytné položky každé grantové žádosti. Tento boom pomohl nejen při hledání nových biologicky aktivních látek, ale také studiu diverzity, taxonomie a chemické ekologie. Leckterý obor by mohl taxol mykologům závidět. Je faktem, že na studium organismů s malým významem pro lidstvo se velmi obtížně shánějí finance a jsou jen minimálně prozkoumány. Představte si, kdyby se něco podobného našlo u hlenek, mechorostů nebo třeba chvostoskoků?

Článek vznikl s podporou Strategie AV21 Akademie věd ČR, programu Mycolife – svět hub a projektu MYCOBIOMICS financovaného programem H2020-MSCA-RISE.

Použitou literaturu uvádíme na webových stránkách Živý.

Lubomír Adamec

ZAUJALO NÁS

Negativní vlivy nanoplastů na metabolismus bublinatky obecné

Nanoplasty jsou syntetické polymery s částicemi menšími než 1 μm . Jejich přítomnost v mořských, sladkovodních i suchozemských ekosystémech vede k účasti téměř ve všech potravních řetězcích. Staly se jedním z hlavních globálních problémů životního prostředí.

Mikroskopická velikost umožňuje nanoplastům procházet biologickými bariérami a vstupovat do buněk a vysoký poměr povrchu ku objemu zvyšuje jejich reaktivitu. Současné studie naznačují, že nanoplasty jsou imunotoxické, neurotoxické, metabolicky, endokrinologicky i vývojově toxické a způsobují poškození orgánů i změny chování živočichů. Chronické vystavení nanoplastům může negativně ovlivnit i příjem potravy, což může mít vliv na plodnost a růst. Nanoplasty se snadno spojují s planktonem a rozptýlenými částicemi, a jsou tak dostupnější pro filtrující organismy.

Navíc se obohacují znečišťujícími látkami, jako jsou herbicidy, pesticidy a antibiotika, a podporují jejich příjem a hromadění v rostlinách, což vytváří základ pro zapojení nanoplastů do potravních řetězců, a tím i nebezpečí pro lidskou výživu. Jedním z nejčastějších plastů je polystyren, který převládá ve znečištění v mnoha řekách i ve výtocích z čističek odpadních

vod. Několik studií prokázalo negativní fyziologické účinky nanoplastů (zejména z polystyrenu) na suchozemské, zvláště užitkové rostliny – např. hromadění reaktivních forem kyslíku (ROS) silně zpomalujících růst a vývoj semenáčků anebo poruchy transpiračního toku. Ponořené vodní rostliny jsou přímo vystaveny působení nanoplastů, ale účinky na vodní rostliny i ekosystémy nejsou dosud jasné, přestože byl prokázán vliv na růst zákrutichy *Vallisneria spiralis* (Zhang a kol. 2022).

Yang Liu se spolupracovníky ze Státní univerzity a Čínské akademie věd v Pekingu sledovali růstové a fyziologické účinky nanoplastů u modelové vodní masožravé rostliny bublinatky obecné (*Utricularia vulgaris*), která se spolu s příbuznými druhy vyskytuje i v Evropě. Její vrcholové části prýtu dlouhé 10 cm byly pěstovány 15 dní v klimatizované komoře v malých akváriích v 10 \times ředěném minerálním živném roztoku s přídatkem polystyrenového nanoplastu o velikosti kuliček přesně 0,50 μm v dávkách od 0 do 10 mg/l, odpovídajících výskytu nanoplastů ve vodách. Jak bývá bohužel špatným zvykem v podobných růstových pokusech, autoři opomněli obohatit vodu CO_2 , takže rostliny trpěly jeho silným nedostatkem a růst byl obecně veli-

ce pomalý. Zjistili, že kuličky polystyrenu byly pohlcovány pastmi a z nich se dostávaly i do stonků a listů. Po 15 dnech se projevil snížení vrcholového růstu až o 73 % a přírůstek biomasy až o 60 % proti kontrole, ale obsah chlorofylů *a* a *b* se snížil jen o 28 %. Rostliny vystavené vyšším dávkám nanoplastu zřetelně trpěly oxidativním stresem, jak bylo možno soudit ze silně zvýšené hladiny malonyldialdehydu (produktu peroxidace membránových lipidů), peroxidu vodíku i aktivit trojice antioxidačních enzymů (katalázy, peroxidázy a superoxid dismutázy). Zvýšená hladina toxického peroxidu vodíku jako jedné z forem ROS dobře vysvětlovala, že rostliny ve vodě s nejvyšší dávkou nanoplastu měly tenké listy a odpadávaly jim pasti, takže předčasně zestárlý. Analýza prokázala z 548 nalezenejších metabolitů 291 se změněnou hladinou po vystavení nanoplastu – 25–34 % zjištěno ve vyšších a 32–40 % ve snížených hladinách. Byly porušeny důležité metabolické dráhy jako Krebsův cyklus a biosyntéza mnoha aminokyselin. Rostliny huře přijímaly z vody dusík a fosfor, což by na ekosystémové úrovni znamenalo sníženou schopnost porostů bublinek přispívat k samočištění vodního prostředí.

Vystavení bezkoženných bublinek dávkám nanoplastů, které se běžně vyskytují ve vodním prostředí, vede k výraznému zpomalení jejich růstu a k poruchám látkového i energetického metabolismu. Zapojení této biomasy rostlin do potravních řetězců pak přenáší toxické působení nanoplastů na řadu jiných organismů a projeví se i ve fungování vodních ekosystémů. [Water Research 2022, 227: e119339]