

Vážení čtenáři,

jsem rád, že Vás mohu oslovit v květnovém čísle Chemických listů. Rok 2004 bude za sedm měsíců pravděpodobně hodnocen jako rok obratu jak v ekonomickém a společenském dění v České republice, tak také v činnosti České společnosti chemické. Jaké je současné postavení ČSCH v naší republice a Evropě? Společnost má asi 2700 členů v příznivém generačním rozložení, patří mezi středně veliké evropské národní chemické společnosti a je začleněna do řady odborných domácích a zahraničních aktivit. Chemické listy jsou médiem přístupným všem odborníkům, kteří se zajímají o chemické vědy. Časopis je vydáván společně s Asociací českých chemických společností, finančně podporován, ale také respektován státními orgány České republiky, některými českými vysokými školami, Svazem chemického průmyslu a řadou obchodních a průmyslových firem působících v naší republice. Po odborné a společenské stránce je hodnocen čtenáři velmi dobře, jeho vědecká úroveň je vyjádřena relativně zajímavým „impact“ faktorem. Mimo vydávání Chemických listů se ČSCH spolupodílí na vydávání 4 evropských chemických časopisů. ČSCH má fungující pobočky v 6 krajích a 29 dobře pracujících odborných skupin, sama je spoluřešitelkou dvou projektů Evropské Unie, aktivně se účastní práce na evropském studijním profilu bakaláře a magistra v oboru chemických věd, je žádána o odborná vyjádření z oblastí průmyslové chemie a chemického výzkumu. Na dobré organizační a osobní úrovni jsou kontakty se sousedními národními chemickými společnostmi, jmenovitě Maďarskou, Německou, Polskou, Rakouskou, Slovenskou a Slovinskou chemickou společností. Probíhá jak výměna účasti mladé generace chemiků na národních sjezdech těchto společností, tak vzájemná výměna informací.

Kvalitativní změnou projde evropská spolupráce spolko-
vého života chemiků. Federace evropských chemických společností (FECS), založená v roce 1970 v Praze, měla až do roku 1990 smysl své existence především v překonávání izolace dané existencí dvou ekonomicky a ideologicky rozdílných systémů. Tento svůj hlavní cíl více či méně úspěšně plnila. Po otevření evropského prostoru pro země bývalého komunistického bloku se její dosavadní struktura stávala více a více formální a z pohledu chemiků nefunkční. V letošním roce je navržena všem 56 členským společnostem diskuse o kvalitativní změně FECS od roku 2005



v organizačně racionálněji uspořádanou Evropskou společnost pro chemické a molekulární vědy (EuChMS) se sídlem v Bruselu. Tím se přiblíží transformovaná FECS svým partnerům v Alianci pro chemické vědy a technologie v Evropě (AllChemE), která sdružuje další 4 evropské organizace (CEFIC, CERC3, COST a EFCE). Změna předpokládá finanční zabezpečení nové organizace jednotlivými členskými společnostmi v závislosti na počtu jejich členů. Předpokládám, že první roky existence EuChMS nebudou lehké a výrazně poklesne počet původních členů FECS, právě v důsledku nezbytnosti jejího samofinancování.

Ekonomické problémy asi stále zůstanou těmi nejdůležitějšími v reálném životě ČSCH a bude záležet jen na nás samotných, zda budou řešeny nářkem a nebo tvůrčím přístupem například v organizování atraktivních konferencí, pracovních seminářů, zapojením ČSCH do projektů jak národních, tak evropských a poskytováním profesionálních služeb sekretariátu společnosti subjektům působícím v chemii.

Rok 2005 je posledním rokem mého působení ve funkci předsedy ČSCH. Chtěl bych opustit tuto funkci s vědomím, že odcházím z odborné společnosti, která má své bohatství jak v ekonomické stabilitě, tak především v potenciálu členské základny.

Vilim Šimánek

MONOLITICKÉ STACIONÁRNÍ FÁZE PRO HPLC.

MÍSTO NAROZENÍ: PRAHA

FRANTIŠEK ŠVEC

Department of Chemistry, University of California, Berkeley, CA 94720-1460, USA
svec@uclink4.berkeley.edu

Došlo 25.3.03, přijato 20.5.2003.

Klíčová slova: HPLC, kolony, monolitické stacionární fáze, historie, porézní materiály, polymery, silika

Obsah

1. Prolog
2. Charakteristika monolitických materiálů
3. Makroporézní polymerní disky
4. Makroporézní polymerní kolony
5. Tubulární kolony s radiálním tokem
6. Komprimované gely
7. Monolitické kolony z anorganických materiálů
8. Reprodukovatelnost monolitických kolon
9. Epilog

1. Prolog

Když se na počátku šedesátých let minulého století tehdejší Ústav makromolekulární chemie ČSAV přestěhoval na Petřiny, zahájil širokou ofenzivu na poli výzkumu polymerů připravovaných z 2-hydroxyethyl-methakrylátu, tedy z monomeru, který byl nedávno předtím vyvinut profesorem Wichterlem. Jedním z nejznámějších produktů tohoto výzkumu jsou kontaktní čočky, o nichž již bylo napsáno mnoho. Málokdo ovšem ví, že zhruba ve stejnou dobu se v laboratoři M. Kubína zrodila i první monolitická separační média¹. Pracovníci této laboratoře hledali alternativní materiály, jež by mohly nahradit v té době velmi populární Sephadex při separacích využívajících mechanismus gelové filtrace. Protože 2-hydroxyethyl-methakrylátové gely byly připravovány v široké paletě porozit, nebylo od věci vyzkoušet jejich aplikaci i v této oblasti. Houbovitý elastický gel byl připraven radikálovou polymerací 22% vodného roztoku monomeru ve skleněné trubce, poté vyjmut, vyvařen ve vodě a zasunut do skleněné kolony, v níž byl i použit. Ačkoliv velmi malá průchodnost tohoto gelu (pouhé 4 ml.h⁻¹) a nízká účinnost nedovolily docílit očekávaných separací, první monolitická kolona byla na světě. O několik let později pak dvě nezávislé skupiny v Německu a v USA použily kolony obsahující polyurethanové pěny s otevřenými póry připravené napěněním *in situ*²⁻⁴. Tyto kolony již umožnily

dosáhnout účinnějších separací jak v plynové, tak i v kapalinové chromatografii, leč stále nedosahovaly kvalit v té době špičkových chromatografických médií, a tudíž se neprosadily. A tak se stalo, že monolitické kolony pak zapadly nadlouho v zapomnění. K jejich znovuzrození došlo zvláštní shodou okolností opět v Praze na konci osmdesátých let. Od tohoto okamžiku se také začíná odvíjet novodobá historie monolitů, která je popsána v následujících řádcích.

2. Charakteristika monolitických materiálů

Monolity jsou separační média, která lze přirovnat k jediné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Proti typickým kolonám plněným drobnými částicemi, monolity neobsahují mezičásticové prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku. Proto musí veškerá mobilní fáze nutně protékat póry monolitu. Během minulého desetiletí byla zveřejněna celá řada originálních přístupů zahrnujících jak přípravu systémů vyznačujících se pouze některými prvky charakteristickými pro monolity (jako je snížený objem mezičásticových prostorů), tak i technologie skutečně monolitické. Do první skupiny patří např. kazety naplněné vrstvenými listy modifikované celulosy či srolované tkaniny. Monolity druhého typu jsou reprezentovány stlačenými hydrofilními gely, polymerními makroporézními disky, kolonami a trubkami, jakož i monolity na bázi siliky, což je dnes již vžitý termín pro materiály na bázi oxidu křemičitého. Některé z těchto materiálů již doznaly i praktického uplatnění. Tabulka I shrnuje současné komerčně dostupné monolitické separační jednotky.

Výše zmíněný konvektivní tok póry významně zrychluje přenos hmoty v koloně⁵. Na rozdíl od difúze, která je hlavní hnací silou přenosu hmoty z kapaliny proudící podél částic v běžné koloně do jejich pórů, konvekce póry umožňuje značné zrychlení separací zejména velkých molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny či syntetické polymery, jejichž difúze je pomalá. Detailní teoretický popis přenosu hmoty v monolitických materiálech byl nedávno odvozen Ljapisev⁶.

3. Makroporézní polymerní disky

Tato forma vyvinutá v Ústavu makromolekulární chemie ČSAV v Praze je jedním z prvních skutečně fungujících monolitických separačních médií, jež byly použity k velmi rychlým a účinným separacím bílkovin⁷. Původní impuls k jejich vývoji přišel z petrohradského Ústavu makromolekulárních látek, kde Belenkii studoval chromatografii bílkovin v módu gradientové eluce, při níž použil celou řadu

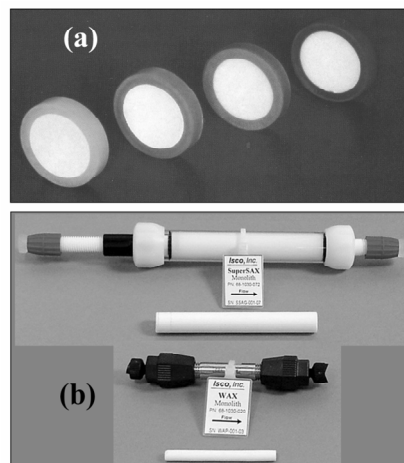
Tabulka I
Přehled současně vyráběných monolitických kolon pro HPLC

Produkt	Tvar	Výrobce	Web	Materiál	Separační módy
CIM Disk	disk	BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko	biaseparations.com	modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, hydrofobní interakce, obrácená fáze, bioafinitní
CB Silica plate	disk	Conchrom, Bremen, Německo	conchrom.de	modifikovaná silika	obrácená a normální fáze
SepraSorb	disk	Sepragen, San Leandro, Kalifornie, USA	sepragen.com	modifikovaná celuloza	iontová výměna
CIM Tube	trubka	BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko	biaseparations.com	modifikované polymethakrylátové kopolymery	iontová výměna
UNO	kolona	BioRad, Richmond, Kalifornie, USA	bio-rad.com	kopolymery methakrylamidových monomerů	iontová výměna
Swift	kolona	ISCO, Lincoln, Nebraska, USA	isco.com	modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, obrácené fáze
Chromolith	kolona	Merck, Darmstadt, Německo	chromolith.com	modifikovaná silika	obrácené fáze
Monoliths	kolona	LC Packings, Amsterdam, Holandsko	lcpackings.nl	polystyrenové kopolymery	obrácené fáze

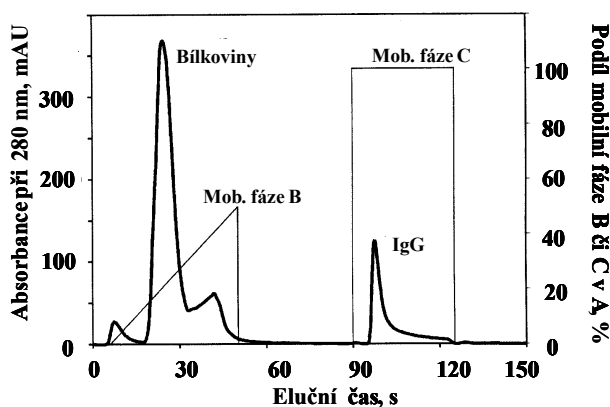
separačních médií i kolon lišících se geometrií. Zjistil přitom, že pouze jistá, většinou velmi slabá vrstva sorbentu v koloně, je postačující k dokonalé separaci, což vedlo k odvození teorie krátkých separačních loží⁸. Příprava krátkých kolon potřebných pro experimentální ověření této teorie s použitím drobných částic se však ukázala velice obtížnou, protože tyto vrstvy byly příliš neuspořádané a obsahovaly četné kanálky. Nezbylo tedy než se poohlédnout po separačních médiích nového typu, monolitických discích, jež byly pro tento účel vyvinuty v Praze a skutečně umožnily potvrdit teorii a docílit chromatografické separace s tehdy nevídanou rychlostí.

Příprava monolitů je jednoduchá. Získávají se radikálovou polymerací směsi, jež obsahuje monovinylový monomer s funkční či reaktivní skupinou jako je butyl- či glycidyl-methakrylát, síťovadlo, typický monomer se dvěma či více dvojnými vazbami např. divinylbenzen a ethylen-dimethakrylát, iniciátor, a porogenní rozpouštědlo. Tato směs se naplní do formy buď plochého nebo válcovitého tvaru, kde po zahřátí zpolymeruje. Po vyjmutí se pak z desky či roubíku vyrobí mechanickým obráběním disky⁹. Než-li získat disk s požadovanými funkčními skupinami přímou polymerací odpovídajícího monomeru, mohou se v následujícím stupni funkční skupiny vzniklého polymeru modifikovat^{10,11}. Většina diskových separačních médií se v současnosti připravuje z glycidyl-methakrylátu a ethylen-dimethakrylátu, přičemž první z těchto monomerů umožňuje jejich snadnou modifikaci a uplatnění v celé plejádě tech-

nik zahrnujících separace s obrácenými fázemi, s iontovou výměnou, s hydrofobními interakcemi a separace bioafinitní¹².



Obr. 1. (a) Fotografie CIM[®] disků o průměru 2 cm. Barva mezi-kružní je charakteristická pro monolit určený ke specifickému módu separace. (b) Fotografie monolitických kolon SWIFT[®] a odpovídajících monolitů z nich vyjmutých. Horní obrázek ukazuje skleněnou kolonu o rozměrech 100×10 mm, dolní nerezovou kolonu o rozměrech 50×4,6 mm. Fotografie byly získány laskavostí výrobců (BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko a ISCO, Inc., Lincoln, Nebraska, USA)



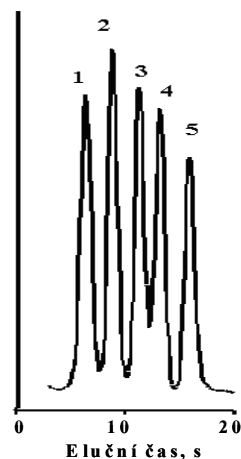
Obr. 2. Separace bílkovin z myších ascitů a izolace monoklonálního IgG s použitím dvou CIM® disků s různými funkčními skupinami umístěnými ve stejném pouzdře metodou kombinované kapalinové chromatografie (conjoint liquid chromatography, cit.¹⁴); Podmínky: Separací média: disky 12 mm průměr × 3 mm tloušťka, objem 0,34 ml; první disk CIM® QA, druhý disk CIM® Protein A; nástřik: 20 ml; mobilní fáze: A: 20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,4; B: 1 mol.l⁻¹ NaCl v A; C: 0,1 mol.l⁻¹ kyselina octová; gradient: 0–50 % B v A za 50 s, 100 % A po dobu 40 s, 100 % C po dobu 30 s; průtok: 4 ml.min⁻¹; UV detekce 280 nm

Disky se vkládají do pouzdra vyvinutého pro tento účel a celá jednotka pak slouží k separacím. Slovinská firma BIA Separations, jež tyto disky i pouzdra vyrábí¹³, zlepšila původní technologii a umísťuje porézní disky do polyolefinového mezikruží dobře viditelného na obr. 1a, které tvoří nepropustnou boční stěnu. I když monolit je sám o sobě dostatečně mechanicky pevný a lze s ním snadno manipulovat, mezikruží ho dále zpevňuje a omezuje nebezpečí odlamování jeho hran. Kromě toho plochý povrch prstence umožňuje pevné stisknutí monolitu v pouzdře, aniž by monolit sám byl vystaven nežádoucímu mechanickému namáhání. V téměř pouzdře lze snadno vyměňovat disky a celý systém použit pro nejrůznější separace. Do této pouzdra je rovněž možno vložit současně i několik disků lišících se funkčními skupinami a docílit vícerozměrné separace. Obr. 2 zobrazuje separaci bílkovin a IgG s použitím tzv. conjoint liquid chromatography (kombinované kapalinové chromatografie) spojené v pouzdře obsahujícím dva disky, jeden nesoucí iontově-výměnné skupiny a druhý protein A (cit.¹⁴).

Od samého počátku disky umožňovaly velmi rychlé a vysoce účinné separace bílkovin a nukleových kyselin. Podrobné studium mechanismu těchto separací vedlo Tennikovou k vypracování teorie popisující separace v tenkých monolitických vrstvách, jež byla shledána zcela odlišnou od separací docilovaných v podlouhlých kolonách včetně monolitických^{15,16}.

4. Makroporézní polymerní kolony

Další forma, podlouhlé monolitické kolony, byla vyvinuta na počátku devadesátých let¹⁷. Na rozdíl od disků jsou tyto monolity připravovány přímo v trubce kolony či



Obr. 3. Rychlá separace bílkovin v módu s obrácenými fázemi s použitím vysoké průtokové rychlosti²¹; Podmínky: monolitická poly(styren-co-divinylbenzenová) kolona: 50×4,6 mm; gradient mobilní fáze: 42 % - 90 % acetonitrilu v 0,15% vodném roztoku trifluoroctové kyseliny během 0,35 min; průtok 10 ml.min⁻¹; UV detekce při 280 nm; píky: ribonukleasa A (1), cytochrom c (2), hovězí sérový albumin (3), carbonátanhydrasa (4), ovalbumin (5)

v kapiláře, které se naplní polymerační směsí, uzavrou a za tepla zpolymerují. Monolit v nich pak zůstává během všech operací i použití. Obr. 1b představuje dvě monolitické kolony s různou velikostí připravené polymerací ve skleněné a nerezové trubce. Při přímé výrobě v koloně odpadá manipulace, avšak pouhá výměna monolitu za jiný v téže trubici je prakticky nemožná. Polymerační směs používaná pro přípravu těchto monolitů je do značné míry obdobná té, která vede k diskům. Protože délka těchto kolon je ve srovnání s disky mnohem větší, vystupuje více do popředí jejich průchodnost, které musí být dosaženo při použití rozumných tlaků. Mimořádně nízký odpor vůči proudění kapalin póry je předpokladem vysokých průtokových rychlostí vhodných k velmi rychlým separacím. Typická velikost pórů v monolitech činí 1 μm a obvykle se řídí typem a složením porogenního rozpouštědla použitého při přípravě¹⁸.

Buchmeiser nedávno demonstroval mírně odlišný postup spočívající v tzv. „ring-opening metathesis polymerization“ (ROMP, polymerace metathesí za otevření kruhu, cit.¹⁹), která sice vyžaduje speciální monomery, ale rovněž vede k dobře definovaným monolitům. Paleta výrobních technik byla doplněna i polymerací iniciovanou UV světlem zvláště výhodnou pro přípravu monolitů v kapilárách a mikrofluidních zařízeních²⁰. Tato metoda ovšem vyžaduje, aby forma, v níž reakce probíhá, byla transparentní pro UV světlo, což je např. snadno splněno v komerčních silikových kapilárách potažených Teflonem.

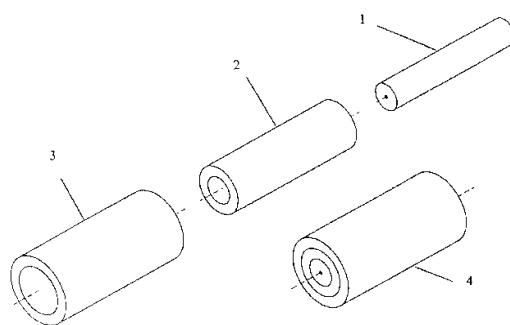
Funkční skupiny monolitických kolon připravených přímou polymerací jsou dány použitými monomery. Tento postup je např. velmi úspěšný pro přípravu monolitických kolon obsahujících poly(styren-co-divinylbenzen) vhodných pro mimořádně rychlé separace bílkovin demonstrované na obr. 3 (cit.²¹). Huber použil kapilární kolonu obdobného složení k vynikajícímu dělení nukleových kyselin²². Další

možností kontroly funkčních skupin je příprava monolitu s reaktivními skupinami a modifikace vzniklého polymeru. Již téměř klasickým příkladem jsou monolity na bázi glycidylmethakrylátu. Celá plejáda funkcionalizovaných monolitických kolon, lišících se velikostí i separačními mechanismy pro které se hodí, je tak snadno dostupná.

Typické modifikační reakce vedou k nové skupině monolitů reakcí původní funkční skupiny. Chceme-li však umocnit počet různých funkčních skupin, je lépe použít roubování. Při něm z každé povrchové skupiny roste řetězec obsahující četné nové funkční skupiny, které mohou významně zvýšit vazebnou kapacitu. V ideálním případě pak postačuje optimalizovat přípravu generického monolitu a chemii na povrchu pórů upravovat roubováním. Monolity, jejichž povrch lze roubovat, byly např. připraveny s použitím stabilních volných radikálů, které v latentní formě zůstávají přítomny na povrchu pórů a teprve po jejich zaplnění novou polymerační směsí se aktivují zahřátím a iniciují další polymerační reakci^{23,24}. Podobně lze navázat na povrch azoiniciátor a použít ho k roubování např. *N*-isopropylakrylamidu. Takto upravený monolit mění polaritu v závislosti na teplotě a byl použit k dělení bílkovin v hydrofobně-interakčním modu bez použití gradientu mobilní fáze. Postupně eluce bylo dosaženo pouhou změnou teploty kolony²⁵. Nespornou výhodou tohoto separačního procesu je snadná možnost recyklování mobilní fáze a menší zatěžování životního prostředí. Rovněž působení UV světla umožňuje iniciovat roubování uvnitř pórů, a tedy i velmi účinnou a snadnou kontrolu chemických funkčních skupin nejenom co do kvality, ale i co do jejich rozmístění, neboť část monolitu, jež je podrobena ozáření, se snadno vymezí přiloženou maskou. Tak lze do jediného monolitu umístit několik různých typů skupin a vytvářet celé separační systémy²⁶.

5. Tubulární kolony s radiálním tokem

Rychlost separace, které je možné dosáhnout v monolitických kolonách, je přitažlivá pro jejich použití pro separace v biotechnologických výrobcích. K tomu je však potřeba připravit objemné monolity. Postup uvedený v předchozí sekci se pro tento účel příliš nehodí, neboť polymerace jsou vesměs exothermní reakce, jež produkují teplo. Zatímco v malých kolonách do průměru cca 10 mm je snadné toto teplo odvést stěnami do okolního prostředí, přesné řízení teploty uvnitř nemíchaného polymerizujícího obsahu velkých kolon, které je potřebné pro získání materiálů s požadovanými porézními vlastnostmi a bez radiálních gradientů vlastností, je velice obtížná²⁷. Elegantní řešení tohoto problému nabídl Podgornik²⁸. Namísto plného monolitického bloku připravil monolit ve tvaru trubice, jejíž stěny jsou tenčí a teplota při polymeraci je tedy snáze udržována v požadované toleranci. Kromě to lze snadno měnit jak průměr tak i tloušťku této monolitické trubky. Zvětšení průměru při zachování stejné tloušťky stěny vede ke kvadratickému růstu celkového objemu separačního média a tedy i ke zvýšení separační kapacity. Použití několika tubulárních



Obr. 4. Konstrukce monolitické jednotky o velkém objemu s radiálním průtokem pro preparativní separace²⁸

monolitů zasunutých do sebe teleskopickým způsobem ukázaným na obr. 4 umožňuje dosáhnout objemů stacionární fáze zcela nepředstavitelných při použití klasického výrobního postupu. Tok těmito kolonami je radiální, většinou z vnějšku do středu. Vynikající permeabilita těchto monolitů usnadňuje jejich použití i při vysokých průtokových rychlostech. Tak např. tubulární kolona o objemu 800 ml vyráběná firmou BIA snadno toleruje radiální průtokovou rychlost 2 l.min⁻¹ a byla úspěšně použita k rychlé separaci bílkovin v preparativním měřítku.

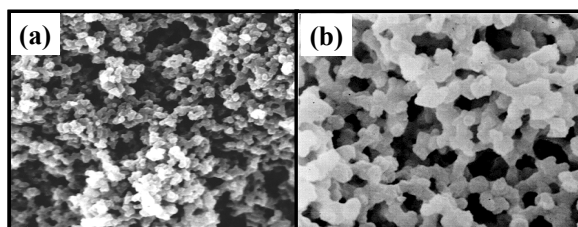
6. Komprimované gely

Současné s výzkumem disků probíhající v Praze, Hjertén v Uppsale experimentoval se silně zesílenými polyakrylamidovými gely. Neočekávaně přitom zjistil, že po stlačení sloupce gelu s použitím hydrostatického tlaku proudící kapaliny lze významně zvýšit jeho permeabilitu. Odtud pak byl již jenom krůček k přípravě gelu polymerizací vodného roztoku *N,N'*-metylenbis-akrylamidu a kyseliny akrylové v přítomnosti anorganické soli, nejčastěji síranu amonného, jeho stlačení na méně než 10 % původního objemu, a použití k separaci bílkovin v iontově-výměnném módu²⁹. Tato technologie byla posléze převzata firmou BioRad v Kalifornii, vylepšena použitím 1,4-diakrylpiperazinu jako síťovačla a použita k přípravě kolon známých pod značkou UNO. Interaktivní skupiny jsou zaváděny do těchto kolon kopolymerací. Protože příprava probíhá ve vodném roztoku a všechny komponenty musí tedy být rozpustné ve vodě, je počet způsobitelných monomerů, a tedy i separačních módů, značně omezen. Většina těchto monolitů nachází proto uplatnění v iontově-výměnných separacích. Výjimkou je monolit připravený z *N*-isopropylakrylamidu, který je použitelný pro hydrofobně-interakční separace bílkovin³⁰. Výroba monolitů pro separace s obrácenými fázemi touto technologií by však byla velmi obtížná, protože vhodné monomery nejsou rozpustné ve vodě. Podobně jako předešlé monolity, i tyto mají velice výhodný profil vanDeemterovy závislosti účinnosti na průtoku a umožňují použití velkých průtokových rychlostí aniž utrpí kvalita separací. Hydrofilní povaha vlastní tomuto typu monolitů je předurčuje

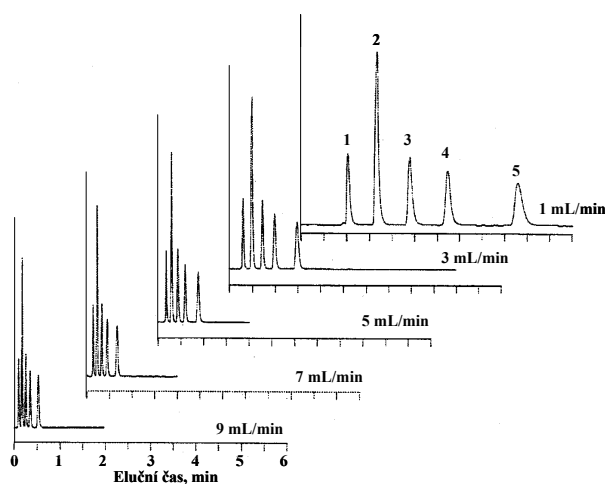
k separacím bílkovin, peptidů, nukleových kyselin i celých adenovirů³¹.

7. Monolitické kolony z anorganických materiálů

Anorganické látky jsou velmi populární jako náplně kolon v kapalinové chromatografii. Není proto divu, že tyto materiály byly použity i k přípravě monolitických kolon. Tanaka využil tyčinek z oxidu křemičitého s precizně kontrolovanými porézními vlastnostmi vyvinutých Nakanishim a Sogou³² a docílil vysoce účinných separací malých molekul³³, které jsou velmi obtížně dosažitelné se všemi výše uvedenými organickými monolity. Na rozdíl od nich však silikové monolity nemohou být připravovány *in situ*, neboť ztuhnutí během hydrolytické iniciované polykondenzace tetraalkoxysilanů v přítomnosti poly(ethylenoxidu) jako porogenu je doprovázeno značným poklesem objemu. Např.



Obr. 5. SEM obrázky morfologie polymerního (a) a silikového (b) monolitu



Obr. 6. Separace β -blokátorů s obrácenými fázemi při různých průtokových rychlostech s použitím monolitické kolony Chromolith³⁴; Podmínky: kolona: silikový monolit RP 18e, 50×4,6 mm i.d.; mobilní fáze: 20 : 80 acetonitril/0,1 % trifluoroctová kyselina ve vodě; průtok: 1–9 ml.min⁻¹, UV detekce při 254 nm, píky: atenolol (1), pindolol (2), methoprolol (3), celiprolol (4), bisoprolol (5)

tyčinka o průměru 4,6 mm se získá z formy o průměru 6 mm. Proto se tyčinky vyrábějí odděleně a poté uzavřou do smrštivé trubice z materiálu PEEK (poly(ether-ether-keton), která pak tvoří tělo kolony. Interaktivní skupiny, většinou C18, se navazují známými reakcemi na silikový monolit již umístěný v koloně. Díky značným objemovým změnám je možné připravit přímé tyčinky pouze do délky cca 15 cm, což do značné míry omezuje maximální délku kolon. Při větších délkách totiž dochází k ohýbání tyčinek. Merck (Darmstadt) vyrábí v současnosti tyto kolony ve dvou velikostech pro separace s obrácenými fázemi pod názvem Chromolith³⁴. Laboratorně byly již vyvinuty i kolony pro kapilární HPLC připravené přímo v kapilárách. Smrštivost je řízena kovalentním navázáním monolitu ke stěnám kapiláry³⁵.

Porézní struktura silikových monolitů je odlišná od organických monolitů. Zatímco struktura organických polymerů se skládá z pospojovaných skupin málo uspořádaných mikroglobulí s makropóry mezi nimi (obr. 5a), silikové monolity se skládají z dobře uspořádaných přibližně stejně velikých skeletů prostoupených téměř monodisperzními 1 μm velkými póry (obr. 5b). Skelety samy jsou též porézní a propůjčují těmto monolitům specifický povrch dosahující několika set $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, tedy vlastnost, jež je ceněna právě při separacích malých molekul. Obr. 6 zobrazuje velmi rychlé dělení léčiv. Nízký odpor k toku typický pro všechna monolitická média umožňuje použití kolony o vnitřním průměru 4,6 mm při průtokové rychlosti až 9 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, aniž by tlak přesáhl hodnotu 8 MPa, což jsou podmínky zcela nepředstavitelné pro stejnou kolonu naplněnou 5 μm částicemi³⁴.

Na rozdíl od organických monolitických kolon, které se mimořádně osvědčily při separacích velkých molekul, většina zatím popsáných separací používajících silikové monolity se týká malých molekul. To činí tyto kolony unikátními v celé rodině monolitů určených pro HPLC.

8. Reprodukovatelnost monolitických kolon

Spolu se zavedením monolitických kolon opět vystala ona věčná otázka chromatografistů týkající se reprodukovatelnosti. Typické sférické náplně chromatografických kolon s definovanými fyzikálními i chemickými vlastnostmi jsou vyráběny ve velkých množstvích a jednotlivé kolony plněny identickým materiálem. Toto plnění bývá kamenem úrazu a často je označováno za „černou magii“, protože reprodukovatelnost je právě nejvíce ovlivněna tímto výrobním stupněm a vědecká báze ke kontrole tohoto postupu chybí. Naproti tomu každá monolitická kolona, ať již získaná polymerizací *in situ* či připravená odděleně a poté uzavřená do kolony, je vlastně prototypem. Některé typy monolitických kolon dále vyžadují chemickou modifikaci, která se rovněž provádí v koloně. Pochopitelně, čím větší počet stupňů, tím větší rozptyl vlastností. Tak např. poly(styren-co-divinylbenzenové) monolitické kolony připravené v jediném stupni jsou velice dobře reprodukovatelné. Kupodivu však i silikové monolitické kolony,

jejichž mnohastupňová výroba patří k nejsložitějším, se vyznačují vcelku dobrou reprodukovatelností. Široká nezávislá studie prokázala, že reprodukovatelnost komerčních kolon Chromolith je plně srovnatelná s jejich plněnými protějšky. Např. variace v relativních retencích vykazovaly relativní směrodatnou odchylku 4 % pro většinu z dlouhé řady testovaných látek³⁶.

9. Epilog

Ačkoliv monolitické kolony, nazývané stacionárními fázemi čtvrté generace³⁷, jsou vcelku novou formou fází pro HPLC a mnoho ještě zbývá udělat, poznatky získané za předešlé období otvírají dveře k přípravě ještě účinnějších a rychlejších kolon s vlastnostmi šitými na míru požadované aplikaci. Guiochon nedávno napsal³⁸: „Vynález a vývoj monolitických kolon je významná změna v kolonové technologii, vpravdě první původní průlom, který se objevil v této oblasti od doby před sto lety, kdy Cvět vynalezl chromatografii.“ Velký objem experimentální práce nahromaděný do dnešních dnů, jakož i komerční dostupnost monolitických kolon, podporují úvahy o jejich značném potenciálu do budoucna. Jejich jedinečné vlastnosti odlišující je od všech ostatních kolon, zejména pak snadnost jejich přípravy, tolerance k velkým průtokovým rychlostem dosažitelným s použitím pouze mírných tlaků a velké rychlosti, s nimiž lze dosáhnout vynikajících separací, činí tyto kolony v jistých oblastech nezastupitelnými. Počet separací docílených s monolitickými kolonami i množství vyvinutých separačních metod zatím zdaleka nedosahuje počtů charakterizujících jejich mnohem starší protějšky plněné sférickými částicemi. Je však otázkou času, kdy toto již nebude pravdou, protože počet chromatografistů používajících monolitické kolony neustále roste a do jejich výzkumu jsou v současné době zapojeny pracoviště na všech kontinentech. I v České republice je několik skupin, které se angažují v této oblasti^{39–41}.

Rozsah tohoto sdělení umožnil pouze popis monolitických materiálů použitelných v HPLC. Řada dalších stejně slibných aplikací se však ukazuje i v dalších oblastech jako je elektrochromatografie⁴², mikrofluidní systémy, plynová chromatografie, heterogenní katalýza a kombinatoriální chemie. Zájemci o další informace je najdou v právě vydané objemné monografii⁴³.

Tato práce byla umožněna díky podpoře National Institute of General Medical Sciences, National Institutes of Health, grant GM-48364.

LITERATURA

- Kubín M., Špaček P., Chromeček R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **32**, 3881 (1967).
- Ross W. D., Jefferson R. T.: *J. Chrom. Sci.* **8**, 386 (1970).
- Hansen L. C., Sievers R. E.: *J. Chromatogr.* **99**, 123 (1974).
- Hileman F. D., Sievers R. E., Hess G. G., Ross W. D.: *Anal. Chem.* **45**, 1126 (1973).
- Roper D. K., Lightfoot E. N.: *J. Chromatogr., A* **702**, 3 (1995).
- Meyers J. J., Liapis A. I.: *J. Chromatogr., A* **852**, 3 (1999).
- Tennikova T. B., Švec F., Belenkii B. G.: *J. Liq. Chromatogr.* **13**, 63 (1990).
- Belenkii B. G., Podkladenko A. M., Kurenbin O. I., Mal'tsev V. G., Nasledov D. G., Trushin S. A.: *J. Chromatogr.* **645**, 1 (1993).
- Tennikova T. B., Bleha M., Švec F., Almazova T. V., Belenkii B. G.: *J. Chromatogr.* **555**, 97 (1991).
- Švec F., Jelinková M., Votavová E.: *Angew. Makromol. Chem.* **188**, 167 (1991).
- Hradil J., Jelinková M., Ilavský M., Švec F.: *Angew. Makromol. Chem.* **185/186**, 175 (1991).
- Tennikova T. B., Freitag R.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **23**, 27 (2000).
- Strancar A., Koselj P., Schwinn H., Josic D.: *Anal. Chem.* **68**, 3483 (1996).
- Strancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **76**, 49 (2002).
- Tennikov M. B., Gazdina N. V., Tennikova T. B., Švec F.: *J. Chromatogr., A* **798**, 55 (1998).
- Tennikova T. B., Freitag R., v knize: *Analytical and Preparative Separation Methods of Biomacromolecules* (H.Y. Aboul-Enein, ed.), kap. 8. M. Dekker, New York 1999.
- Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* **54**, 820 (1992).
- Viklund C., Švec F., Fréchet J. M. J., Irgum K.: *Chem. Mater.* **8**, 744 (1996).
- Buchmeiser M. R.: *Macromol. Rapid Commun.* **22**, 1082 (2001).
- Rohr T., Hilder E. F., Donovan J. J., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Macromolecules* **36**, 1677 (2003).
- Xie S., Allington R. W., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr., A* **865**, 169 (1999).
- Premstaller A., Oberacher H., Huber C. G.: *Anal. Chem.* **72**, 4386 (2000).
- Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J., Viklund C., Irgum K.: *Macromolecules* **32**, 6377 (1999).
- Viklund C., Irgum K., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Macromolecules* **34**, 4361 (2001).
- Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Adv. Mater.* **9**, 630 (1997).
- Peterson D. S., Rohr T., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Proteome Res.* **1**, 563 (2002).
- Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Chem. Mater.* **9**, 1898 (1997).
- Podgornik A., Barut M., Strancar A., Josic D., Koloini T.: *Anal. Chem.* **72**, 5693 (2000).
- Hjertén S., Liao J. L., Zhang R.: *J. Chromatogr.* **473**, 273 (1989).
- Hjertén S.: *Ind. Eng. Chem. Res.* **38**, 1205 (1999).
- Liao J. L.: *Adv. Chromatogr.* **40**, 467 (2000).
- Nakanishi K., Soga N.: *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 2518 (1991).

33. Tanaka N., Ishizuka N., Hosoya K., Kimata K., Minakuchi H., Nakanishi V, Soga N.: *Kuromatogurafī 14*, 50 (1993).
34. Cabrera K., Lubda D., Eggenweiler H. M., Minakuchi H., Nakanishi K.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 93 (2000).
35. Motokawa M., Kobayashi V, Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Jinnai H., Hosoya K., Ikegami T., Tanaka N.: *J. Chromatogr., A* 961, 53 (2002).
36. Kele M., Guiochon G.: *J. Chromatogr., A* 960, 19 (2002).
37. Iberer G., Hahn R., Jungbauer A.: *LC-GC (North America)* 17, 998 (1999).
38. Al Bokari M., Cherrak D., Guiochon G.: *J. Chromatogr., A* 975, 275 (2002).
39. Coufal P., Čihák M., Suchánková J., Tesařová E.: *Chem. Listy* 95, 509 (2001).
40. Coufal P., Čihák M., Suchánková J., Tesařová E., Bosáková Z., Štulík K.: *J. Chromatogr., A* 946, 99 (2002).
41. Kvasničková L., Glatz Z., Štěřbová H., Kahle V., Slaniņa J., Musil P.: *J. Chromatogr.* 916, 265 (2001).
42. Kvasničková L., Glatz Z., Kahle V.: *Chem. Listy* 97, 86 (2003).
43. Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z. (ed.): *Monolithic*

Materials: Preparation, Properties, and Applications. Elsevier, Amsterdam 2003.

F. Švec (*Department of Chemistry, University of California, Berkeley, USA*): **Monolithic Stationary Phases.**
Place of Birth: Prague

It is not generally known that monoliths, which are now the fastest growing segment of HPLC column technologies, were invented in Prague as early as the late 1960s. Although these early monoliths comprising a block of swollen hydrophilic gel did not perform flawlessly, the concept has been demonstrated. Unfortunately, after a few more approaches were unsuccessfully tested, this technology was almost forgotten until the late 1980s. At that time, two groups developed simultaneously synthetic polymer monoliths with an excellent performance in the separation of proteins. Interestingly enough, one of them was again in Prague. This new generation of monoliths triggered a broad interest in this technology and has led to development of a wide variety of formats and materials. This review also describes in some detail the current most successful monolithic formats such as discs and columns as well as a plethora of materials that were used for their preparation.

PŘÍJEM, BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST A METABOLISMUS ROSTLINNÝCH POLYFENOLŮ U ČLOVĚKA

JIŘÍ SLANINA A EVA TÁBORSKÁ

Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Komenského nám. 2, 662 43 Brno
jslanina@med.muni.cz

Klíčová slova: biologická dostupnost, polyfenoly, flavonoidy, fenolové kyseliny, kvercetin, chlorogenová kyselina, antioxidanty

Obsah

1. Úvod
2. Příjem polyfenolů
3. Resorpce a přeměny polyfenolů v trávicím traktu
 - 3.1. Procesy v tenkém střevě
 - 3.2. Procesy v tlustém střevě
4. Metabolismus polyfenolů po jejich resorpci
5. Analýza a koncentrace polyfenolů a jejich metabolitů v plazmě a moči
6. Biologická dostupnost a antioxidační kapacita plazmy
7. Závěr

1. Úvod

V rostlinách se vyskytují strukturálně velmi různorodé fenolové sloučeniny. Vzhledem k jejich širokému rozšíření a vysoké koncentraci v rostlinách jsou běžnou součástí lidské potravy. Nejběžnějšími rostlinnými polyfenoly jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany. V současnosti roste zájem o studium těchto přírodních látek, protože jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných nemocí jako je rakovina a kardiovaskulární choroby. Zvýšený příjem červeného vína, které je zvláště bohaté na polyfenoly, je jedním z pravděpodobných vysvětlení tzv. „francouzského paradoxu“⁴, tedy relativně vysokým obsahem tuků v potravě a nízkou mortalitou na kardiovaskulární onemocnění ve Francii¹. Epidemiologická data upozorňují na korelaci mezi množstvím flavonoidů v potravě a snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění, v některých klinických studiích až o více než 50 % (cit.²). Nižší pravděpodobnost nádorových onemocnění u osob, které konzumují více potravin bohatých na polyfenoly, není tak zřejmá a akceptovaná u odborné veřejnosti, jako je tomu u kardiovaskulárních onemocnění. Přesto i zde některé studie naznačují, že příjem potravin obsahující určité polyfenoly, může chránit organismus před některými formami rakoviny, především rakoviny plic³, trávicího traktu^{4,5} a rakoviny prsu u žen a rakoviny prostaty u mužů⁵. Rovněž řada experimentů na laboratorních zvířatech a nádorových buňkách

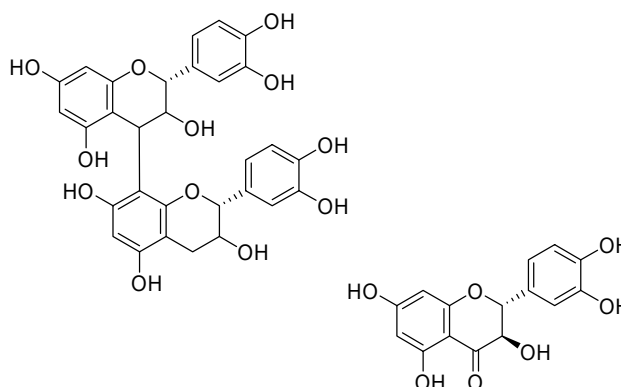
prokázala antikarcinogenní účinky rostlinných polyfenolů.

Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhášet reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižovat riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice. Mechanismy antiaterogenního působení polyfenolů byly nedávno shrnuty v přehledném článku⁶. Byla navržena řada mechanismů, kterými mohou polyfenoly přítomné v potravě člověka chránit před vznikem rakoviny⁷, zahrnují řadu účinků na úrovni přenosu signálů, které se uplatňují při kontrole buněčného cyklu, apoptózy a angiogenézy. Mohou se uplatnit také antiestrogenní účinky některých tříd polyfenolů, především isoflavonů, lignanů a stilbenů, shrnuté v přehledném článku⁸.

Málo je však známo o tom, zda a v jakém množství jsou rostlinné polyfenoly resorbovány z trávicího traktu člověka, jaké je rozpětí koncentrací v krevní plazmě, jak jsou metabolizovány a vylučovány z organismu. Rovněž znalosti o jejich množství v potravinách nejsou zdaleka kompletní.

2. Příjem polyfenolů

Rostlinné polyfenoly jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními účinky v naší stravě. Jejich denní příjem byl odhadnut na 1 g a je tedy výrazně vyšší než je příjem antioxidačních vitamínů, jako jsou tokoferoly, karoteny nebo askorbová kyselina⁹. Rovněž v testech antioxidační aktivity polyfenoly často předčí vitamíny nebo endogenní antioxidanty jako je např. kyselina močová. Obsah polyfe-



Obr. 1. Strukturální vzorec prokyanidin(4→8)dimeru (proanthokyanidin) a (+)-katechinu (flavanol)

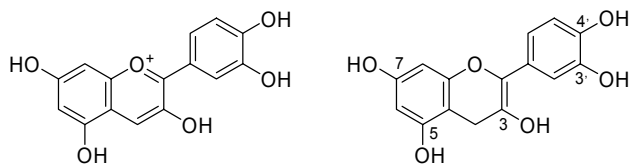
Tabulka I

Orientační obsah polyfenolů v běžně konzumovaném množství některých potravin a nápojů^{9,15,43,44}

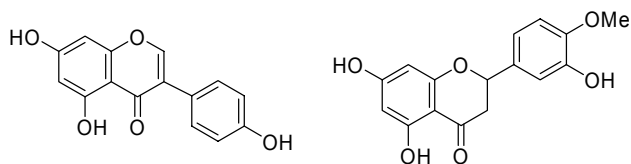
Potravina	Množství potraviny	Obsah polyfenolů		Hlavní polyfenoly
		HPLC	Folinovo činidlo ^a	
Brambory	200 g	30 mg	60 mg	chlorogenová kys.
Rajčata	100 g	10 mg	40 mg	fenolové kyseliny
Jablka	200 g	240 mg	460 mg	proanthokyanidiny
Višně	50 g	280 mg	280 mg ^b	anthokyany
Pšeničná mouka	100 g	75 mg	75 mg ^b	ferulová kyselina
Hořká čokoláda	20 g	100 mg	170 mg	proanthokyanidiny
Červené víno	100 ml	100 mg	200 mg	proanthokyanidiny
Káva	200 ml	150 mg	180 mg	chlorogenová kys.
Černý čaj	200 ml	140 mg	200 mg	katechiny

^a Stanoveno spektrofotometricky pomocí Folinova činidla na základě redukčních vlastností polyfenolů. Obsahy polyfenolů jsou nadhodnoceny u vzorků obsahujících askorbovou kyselinu, případně jiné redukující látky, např. siřičitany (víno).

^b Hodnoty stanovené pomocí Folinova činidla chybí, proto jsou nahrazeny hodnotami získanými pomocí HPLC



Obr. 2. Strukturální vzorec kyanidinu (anthokyanidin) a flavonolu kvercetinů (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon)



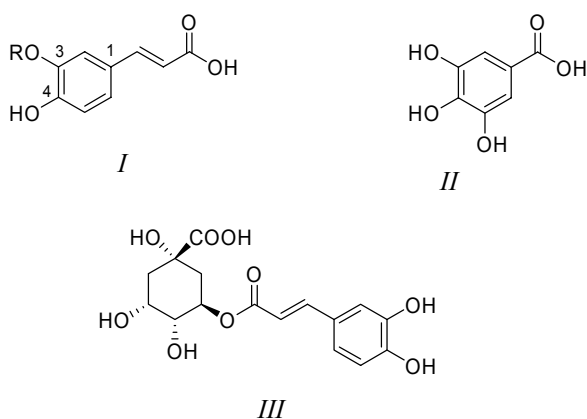
Obr. 3. Strukturální vzorec genisteinu (isoflavon) a hesperetinu (flavanon)

nolů v některých běžně konzumovaných potravinách je uveden v tab. I. Hlavními zdroji polyfenolů jsou především nápoje (víno, káva, čaj, ovocné džusy), čokoláda a ovoce. Celkový obsah polyfenolů v pivě je také vysoký, přibližně 350 mg.l⁻¹, ale část z toho připadá na Maillardovy produkty.

Na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolové kyseliny přibližně jednou třetinou a ostatní polyfenoly (např. lignany^{8,10} a stilbeny¹¹) tvoří minoritní podíl⁹. Flavonoidy můžeme rozdělit do několika

strukturálních tříd, v závislosti na oxidačním stavu heterocyklu obsahujícím atom kyslíku (obr. 1 až 3). Biosyntéza flavonoidů byla nedávno uvedena v tomto časopise¹². V rostlinách se flavonoidy vyskytují převážně jako β-glykosidy. Sacharidovou složkou je nejčastěji glukosa nebo rhamnosa, může to být také glukuronová kyselina, galaktosa nebo jiný sacharid. Nejčastěji je připojen jeden glykosyl, někdy však jsou substituovány dva nebo tři hydroxyly polyfenolu. Aglykon nebo sacharidová složka může být dále substituována hydroxykyselinou, např. kyselinou jablečnou nebo galovou.

Z flavonoidů se v potravě nejčastěji vyskytují oligomerní proanthokyanidiny a flavanoly (katechiny), viz obr. 1, průměrný denní příjem každé skupiny převyšuje 100 mg (cit.⁹). Oligomerní proanthokyanidiny, ve kterých je spojeno 2–11 flavanolových jednotek, nejčastěji vazbou C4–C8, mají výrazné adstringentní vlastnosti a vyskytují se zejména v ovoci, čokoládě a červeném víně. Katechiny přijímáme především v čaji, ovoci a čokoládě. Anthokyany (obr. 2) jsou barevné pigmenty ovoce a červeného vína, jejich denní příjem je velmi rozdílný, může dosáhnout až 200 mg (cit.^{9,22}). Flavonoly (obr. 2) se vyskytují v ovoci, zelenině (cibule) i v nápojích (čaj), avšak v poměrně malém množství a tedy jejich denní příjem byl odhadnut pouze na 20 mg (cit.¹³). Přesto patří, především kvercetin a jeho deriváty jako je rutin, k nejčastěji studovaným flavonoidům. Je to dáno jejich komerční dostupností a významnou biologickou aktivitou¹⁴. Rutin se používá jako venofarmakum. Isoflavony (obr. 3) se řadí mezi fytoestrogeny, vyskytují se především v sóji⁸, na celkovém příjmu flavonoidů se podílejí jen z malé části, jejich příjem byl v Japonsku stanoven jen na 30–40 mg.den⁻¹ (cit.⁹). Flavanony z citrusového ovoce



(obr. 3), stejně jako flavony a isoflavony, přispívají k průměrnému dennímu příjmu polyfenolů maximálně několika desítkami miligramů.

Fenolové kyseliny, např. kyselina kávová (*Ia*, R=H), ferulová (*Ib*, R=CH₃) nebo galová (*II*) se nejčastěji nacházejí v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Nejběžnější látkou tohoto typu je kyselina chlorogenová (*III*), tedy 5-koфейlchinová kyselina. Kyselina chlorogenová se vyskytuje ve vysokém množství v kávě (50–150 mg v šálku kávy). Konzumenti kávy tak mohou přijímat více fenolových kyselin než flavonoidů. Dále se nachází mimo jiné v bramborách a v mnoha dalších druzích zeleniny a ovoce. Kyselina ferulová je nejčastěji součástí vlákniny, kde je esterovou vazbou vázána na hemicelulose. Kyselina galová se vyskytuje rovněž ve formě esterů, např. v galotaninech je navázána na glukosu¹⁵.

Příznivý vliv rostlinných polyfenolů na zdraví člověka, dokumentovaný jak klinickými studiemi, tak pokusy na zvířatech a buněčných kulturách, podnítil zájem o studium biologické dostupnosti těchto látek. Nové poznatky, v mnohém revidující původní předpoklady, jsou předmětem tohoto sdělení, které je zaměřeno především na biologickou dostupnost a metabolismus glykosidů kvercetinů, jež jsou z flavonoidů nejčastěji studovány, a na chlorogenovou kyselinu, nejrozšířenější fenolovou kyselinu v naší potravě.

3. Resorpce a přeměny polyfenolů v trávicím traktu

Hlavním místem resorpce polyfenolů v trávicím traktu je tenké a tlusté střevo. Existují však důkazy, že některé polyfenoly přijímané v nápojích se mohou částečně resorbovat již v dutině ústní. Po vypití zeleného čaje byla koncentrace katechinů ve slinách o dva řády vyšší než v plazmě. Eliminace katechinů ze slin (poločas 10–20 min) byla mnohem rychlejší než z plazmy. Ve slinách byla také zjištěna esterasa hydrolyzující epigalokatechingalát (*IV*) na epigalokatechin¹⁶.

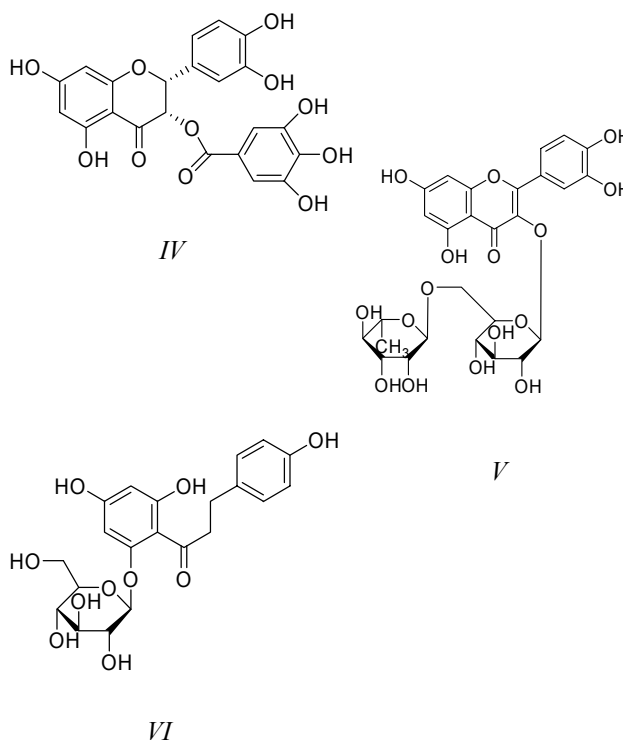
Tabulka II
Resorpce polyfenolů v tenkém střevě u osob s ileostomií

Polyfenol	Míra resorpce [%]	Lit.
Kvercetin	24 ± 9	17
Kvercetin-3-rutinosid	17 ± 15	17
Kvercetin-3-glukosid	52 ± 15	17
Chlorogenová kyselina	33 ± 17	18
Kávová kyselina	95 ± 4	18

3.1. Procesy v tenkém střevě

Původně se předpokládalo, že polyfenoly nemohou být resorbovány z trávicího traktu člověka ve formě relativně polárních glykosidů nebo esterů. Míra jejich resorpce byla považována za nízkou a závislou na schopnosti střevní mikroflóry uvolnit nepolární aglykony, což je nutně spojeno s jejich rozsáhlou mikrobiální degradací. Tyto teoretické představy byly v souladu s experimentálními daty dokumentující nízkou a proměnnou absorpci některých polyfenolů u lidí a zvířat.

Překvapivé výsledky však přineslo studium resorpce polyfenolů v trávicím traktu u pacientů s ileostomií, tedy s chirurgickým vývodem poslední části tenkého střeva břišní



stěnou s odváděním jeho obsahu. Mikrobiální degradace sloučenin v tenkém střevě je minimální a podíl resorbovaného polyfenolu se dá vypočítat z jeho příjmu a z množství stanoveného v ileostomickém výtoku^{17,18}. Byla nalezena vysoká míra resorpce některých polyfenolů v tenkém střevě, viz tab. II. Resorpce kvercetin-3-*O*-glukosidu byla vyšší než resorpce rutinu (kvercetin-3-rutinosidu, *V*) a překvapivě vyšší než samotného aglykonu kvercetinu¹⁷. Zajímavým nálezem byla také vysoká míra absorpce fenolových kyselin, kyseliny kávové (*Ia*) a kyseliny chlorogenové (*III*), ukazující, že fenolové kyseliny mohou být snáze resorbovány z trávicího traktu než flavonoidy¹⁸. Všechny studie o biologické dostupnosti kyseliny chlorogenové publikované do roku 1999 vedly k závěru, že se tato fenolová kyselina neresorbuje z trávicího traktu člověka a živočichů¹⁹. Resorpce chlorogenové kyseliny z trávicího traktu však byla nedávno zjištěna u jedinců s ileostomií¹⁸ a je v souladu s jejím průkazem v plazmě a moči²⁰.

Přestože se některé flavonoidy pravděpodobně resorbují z trávicího traktu ve formě glykosidů, odštěpení polární složky je nebytné pro prostou difúzi většiny polyfenolů přes kartáčový lem tenkého střeva. Neenzymová deglykosidace v lidském těle, např. v kyselém prostředí žaludeční šťávy, neprobíhá. Pro přeměnu glykosidů v tenkém střevě má největší význam enzym laktasa (laktasa-florizin hydrolasa EC 3.2.1.23 a 62). Enzym je lokalizován na vnější straně membrány kartáčového lemu enterocytů, může tedy působit na polyfenoly v lumen tenkého střeva. Laktasa je především zodpovědná za hydrolyzu mléčného cukru, disacharidu laktosy. Enzym má i druhé aktivní místo schopné hydrolyzovat méně polární glykosidy, jako jsou β -glykosylceramidy a působí také na dihydrochalkonglukosid florizin (*VI*). Laktasa je poměrně nespecifická β -glukosidasa, která je schopna také štěpit flavonoidní monoglukosidy i diglukosidy, nehydrolyzuje však kvercetin-3-rhamnoglukosid (rutin, *V*). Glykosidy flavonoidů jsou překvapivě hydrolyzovány spíše laktasovou doménou laktasy-florizin hydrolasy²¹. Přes 75 % světové populace (90 % Afričanů a Asiátů, ale pouze 5 % Evropanů) má fenotyp spojený s nízkou aktivitou laktasy v dospělosti.

Laktasa není jedinou savčí glukosidasou. Cytosolová β -glukosidasa je lokalizována v různých tkáních včetně enterocytů a kolonocytů, zvláště pak v játrech. Má užší substrátovou specifitu než laktasa, na rozdíl od laktasy nehydrolyzuje např. kvercetin-3-glukosid²¹.

V krvi savců a člověka byly nalezeny některé glykosidy flavonoidů. Hydrolyza sacharidové složky není tedy pravděpodobně nutnou podmínkou účinné resorpce všech polyfenolů. V lidské plazmě a moči byly opakovaně nalezeny anthokyany, např. kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid²². Glukosidy kvercetinu byly také detekovány v krevní plazmě dobrovolníků^{23,24}, tento náleze však není plně akceptován celou odbornou komunitou. Odpůrci upozorňují na možnost záměny glukosidů za glukuronidy, protože mají při HPLC na reverzní fázi v kyselém mobilní fázi velmi blízké retenční časy a na vysokou aktivitu tkáňových β -glukosidas. Předpokládá se, že glukosidy flavonoidů mohou být transportovány do enterocytů pomocí glukosového přenašeče

závislém na Na^+ (sodium-dependent glucose cotransporter – SGLT 1). V enterocytech mohou být hydrolyzovány na aglykony a transportovány do portální krve ve formě aglykonů nebo glykosidů²⁵.

3.2. Procesy v tlustém střevě

Polyfenoly, které nejsou resorbovány v tenkém střevě, se dostávají do tlustého střeva, kde jsou metabolizovány střevními bakteriemi. Z flavonoidu rutinu (kvercetin-3-rutinosid, *V*) je bakteriálními α -rhamnosidasami odštěpen aglykon kvercetin. Chlorogenová kyselina (*III*) je hydrolyzována bakteriálními esterasami na kyselinu kávovou a kyselinu chinovou. Produkty hydrolyzy, zbavené polární složky, se mohou resorbovat nebo častěji jsou dále metabolizovány střevními bakteriemi. Typickými přeměnami jsou redukční nebo hydrolytické reakce. Aglykony flavonoidů jsou rozštěpeny v místě pyranového cyklu, obvyklými produkty jsou fenolové kyseliny (např. 3-hydroxyfenytoctová a 3,4-dihydroxyfenytoctová kyselina, cit.^{9,26}). Fenolové kyseliny tvoří značnou část (30–60 %) metabolitů potravou přijatých flavanoidů²⁷. Fenolové kyseliny podléhají v tlustém střevě dehydroxylačním reakcím, častěji je redukován hydroxyl v *para* poloze aromatického jádra, např. z kyseliny kávové tak vzniká kyselina *meta*-kumarová (*VII*). Dále dochází k bakteriální hydrogenaci v místě dvojné vazby, kyselina kávová se přeměňuje na kyselinu 3,4-dihydroxyfenylpropionovou (*VIII*), zatímco zkrácení postranního řetězce za vzniku derivátů kyseliny benzoové probíhá pravděpodobně až po resorpci kyselin v játrech²⁶.

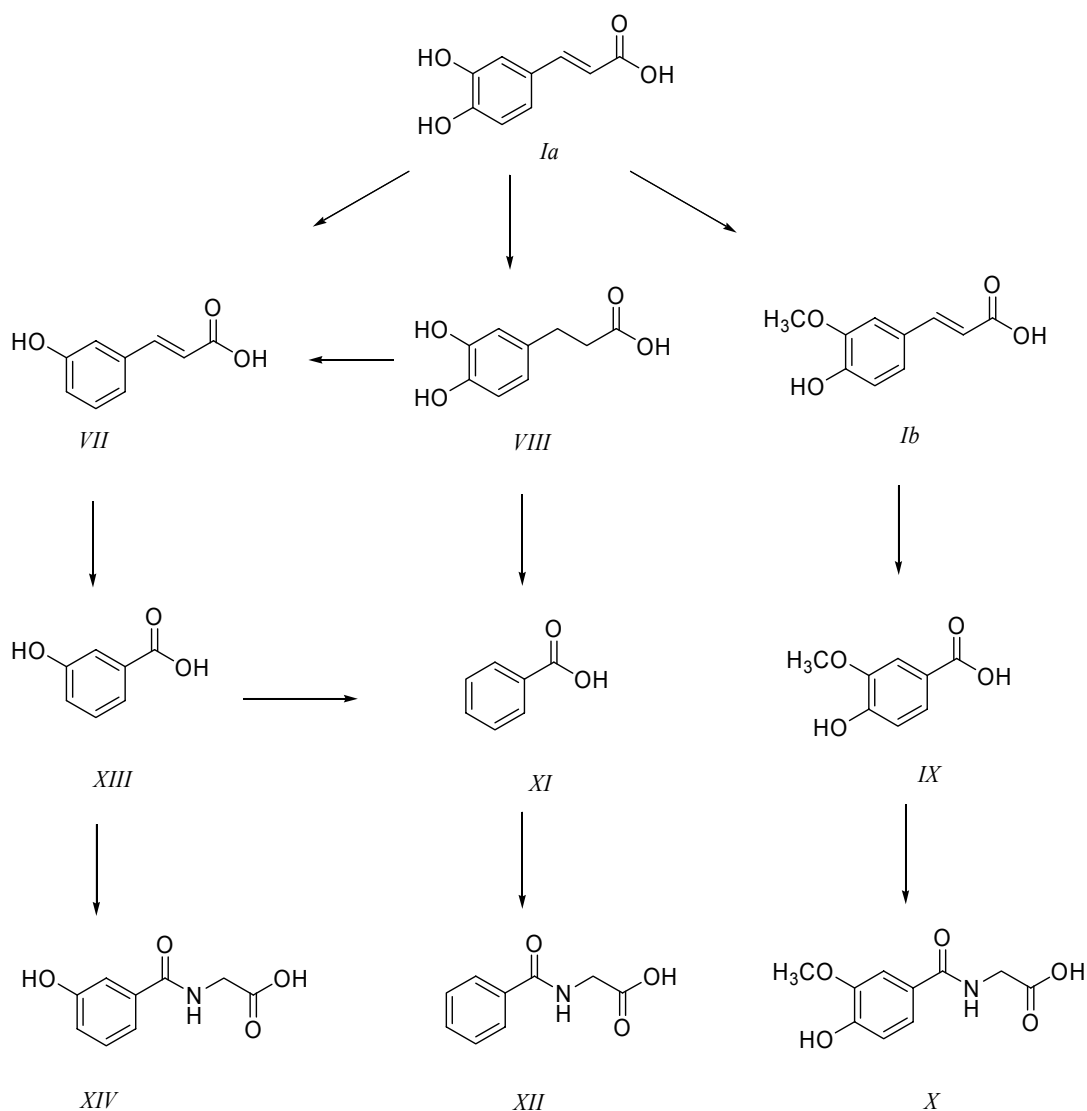
Je nutné poznamenat, že koncentrace polyfenolů v tlustém střevě vzhledem k jejich omezené resorpci v tenkém střevě a resorpci vody v tlustém střevě může dosáhnout vysokých hodnot, řádově v mmol.l^{-1} a může působit preventivně proti vzniku kolorektálního karcinomu⁹.

Polyfenoly omezují resorpci železa tvorbou stabilních komplexů s nehemovým železem v trávicím traktu²⁷. Nižší resorpce železa může mít negativní dopad na populaci náchylnou na jeho nedostatek (děti, těhotné ženy). Na druhou stranu zvýšený příjem železa je možný rizikový faktor aterosklerózy²⁸.

4. Metabolismus polyfenolů po jejich resorpci

Po resorpci z trávicího traktu jsou polyfenoly dále metabolizovány enzymy přítomnými v tkáních člověka. Přeměny jsou velmi podobné metabolismu léčiv a jiných xenobiotik. Polyfenoly se konjugují s kyselinou glukuronovou, sírovou nebo glycinem, podléhají methyloci nebo kombinaci těchto přeměn, což vede společně s bakteriálními přeměnami v trávicím traktu k velkému počtu metabolitů.

Po resorpci jsou polyfenoly konjugovány s kyselinou glukuronovou buňkami střevní mukózy²⁹, dále mohou být v játrech nebo i v jiných tkáních konjugovány s kyselinou glukuronovou nebo sulfatovány. Methylocace katechol-*O*-methyltransferasou (COMT) probíhá v játrech nebo v ledvinách. Kyselina kávová (*Ia*) se metabolizuje COMT na



Obr. 4. Zjednodušené schéma metabolických přeměn kyseliny kávové^{26,31}

kyselinu ferulovou (*Ib*), zkrácením postranního řetězce se tvoří kyselina vanilová (*IX*), konjugací s glycinem vanilylglycin (*X*), viz obr. 4. Methylována může být také hydroxylová skupina v *para* poloze aromatického jádra²⁶.

UDP-glukuronyltransferasy jsou lokalizovány na membránách endoplazmatického retikula a tvoří velkou skupinu enzymů. Jejich aktivita silně závisí na složení potravy, příjmu xenobiotik a genetickém polymorfismu. Fenolsulfotransferasy jsou cytosolové enzymy a jejich aktivita je v populaci velmi rozdílná a není indukovatelná xenobiotiky³⁰. Fenolové kyseliny také podléhají konjugaci s glycinem³¹ nebo jsou odbourány na hydroxyderiváty kyseliny benzoové, případně až na kyselinu benzoovou (*XI*), viz obr. 4. Kyselina benzoová poskytuje konjugaci s glycinem kyselinu hippurovou (benzoylglycin, *XII*). Značná část hippurátu vylučovaného močí je produktem odbourání fenolových

kyselin, případně flavonoidů. S glycinem se konjuguje také kyselina 3-hydroxybenzoová (*XIII*) a 4-hydroxybenzoová. Přesná struktura konjugátů polyfenolů (s kyselinou sírovou nebo glukuronovou) vznikajících v organismu většinou není známa²⁶.

Na rozdíl od většiny léčiv, které jsou často podány v jednorázové dávce větší než 100 mg, což vede k saturaci konjugčních enzymů a k významné koncentraci nekonjugovaného léčiva v krevním séru, koncentrace nekonjugovaných polyfenolů v plazmě po příjmu rostlinné potravy jsou velmi nízké. Jakmile jsou však rostlinné polyfenoly podány ve farmakologických dávkách, objeví se vysoká koncentrace nekonjugovaného polyfenolu v krvi. Dávka rovněž ovlivňuje hlavní místo biotransformace polyfenolu. Velké dávky polyfenolu jsou metabolizovány převážně v játrech, malá množství jsou přeměňována již střevní mukózou,

k sekundárním reakcím pak dochází v játrech⁹.

Předpokládá se, že konjugované polyfenoly díky své amfipatické struktuře mohou být lokalizovány na povrchu LDL-lipoproteinů a účinně tak bránit jejich oxidační modifikaci³². Byly zaznamenány velké interindividuální rozdíly v metabolismu polyfenolů pravděpodobně způsobené genetickým polymorfismem (např. rozdílná aktivita laktasy, glukuronyltransferas a COMT) a složením střevní mikroflóry.

5. Analýza a koncentrace polyfenolů a jejich metabolitů v plazmě a moči

Množství polyfenolu v krevní plazmě a moči se stanovuje většinou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou, fluorescenční nebo hmotnostní detekcí. Detekce v UV oblasti je méně vhodná s ohledem na nedostatečnou citlivost a specifitu detekce, někdy se používá pro stanovení v moči. Při některých aplikacích se stanovovaly pouze aglykony, většinou se však volí metody zahrnující stanovení konjugovaných polyfenolů. K hydrolyze konjugátů se nejčastěji používá enzymový preparát z *Helix pomatia* s β -glukuronidasovou a sulfatasovou aktivitou, méně často se používá kyselá hydrolyza.

Je-li polyfenol podán dobrovolníkům v množstvích vyskytujících se v potravě, jeho koncentrace v krevní plazmě většinou nepřekračuje $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, při vyšších dávkách $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Rozdílný způsob metabolismu glukosidů kvercetinů a rutinů (kvercetin-3-rhamnoglukosidu) se odráží v rozdílných farmakokinetických datech. Hydrolyza glukosidů kvercetinů v tenkém střevě pomocí laktasy nebo cytosolové β -glukosidasy vede k rychlému nárůstu koncentrace kvercetinů v krvi dobrovolníků a maximální koncentrace kvercetinů je dosaženo již po 30 min od jeho příjmu. Naproti tomu z rutinů je uvolněn aglykon kvercetin až v tlustém střevě bakteriálními α -rhamnosidasami a vrcholu hladiny kvercetinů v krvi je dosaženo až po 6 h. Rovněž maximální koncentrace kvercetinů byla v případě podání kvercetin-4'-glukosidu ($3,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) podstatně vyšší než u rutinů ($0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$, cit.³³).

Polyfenoly se vylučují z organismu převážně ve formě polárních ve vodě dobře rozpustných konjugátů močí a žlučí. Předpokládá se, že může docházet k enterohepatálnímu oběhu polyfenolů, který prodlužuje vylučování polyfenolů z organismu. Poločas eliminace kvercetinů je neobvykle vysoký (18–24 h, cit.³⁴), způsobený pravděpodobně jeho silnou vazbou na plazmatické bílkoviny. U jiných polyfenolů byl zjištěn mnohem kratší poločas (1–2 h, cit.^{9,35}).

Močí se vylučuje většinou jen malá část přijatého polyfenolu. Výsledky velice závisí na typu původního polyfenolu a často se podstatně liší v různých studiích²⁷. Vysoký výdej byl zjištěn pro isoflavonoidy ze sóji (28–49 % podané sloučeniny)³⁶, flavonony citrusového ovoce (1–30 %)³⁷, katechiny z čaje (4–6 %)³⁸ a anthokyanidiny červeného vína (1–7 %)^{9,27}. Vysoké hodnoty výdeje močí byly zjištěny také u kyseliny kávové (11 %), pro její ester kyselinou chlorogenovou jsou téměř 100krát nižší³⁴. Výdej kvercetinů močí je

naopak poměrně nízký (přibl. 1 %)²⁷. Koncentrace některých metabolitů v moči (3-hydroxyhippurát (XIV), 4-hydroxyhippurát a 3-hydroxyphenylacetát) výrazně převyšuje koncentrace původních polyfenolů v moči.

6. Biologická dostupnost a antioxidační kapacita plazmy

Jak už bylo uvedeno, koncentrace původních rostlinných polyfenolů v plazmě jsou poměrně nízké a mohou jen málo přispívat ke zvýšení antioxidační kapacity plazmy, které bylo často zjištěno po příjmu potravy bohaté na rostlinné polyfenoly^{39,40}. K nárůstu antioxidační kapacity plazmy tak přispívají především metabolity. Antiradikálová aktivita některých metabolitů, které si zachovávají katecholovou strukturu nebo vznikají částečnou *O*-methylací (např. ferulová kyselina), je srovnatelná s výchozími polyfenoly⁴¹. Dlouhodobý zvýšený příjem polyfenolů vedl k vzestupu koncentrace lipofilních antioxidantů (α -tokoferol, β -karoten) v plazmě. Schopnost rostlinných polyfenolů chránit LDL lipoproteiny před oxidační modifikací je dobře dokumentována *in vitro*. Méně je zřejmé, zda skutečně dochází ke zvýšení odolnosti LDL lipoproteinů proti oxidaci po příjmu potravy bohaté na polyfenoly. Vazba polyfenolů na plazmatické bílkoviny může oslabit jejich schopnost chránit LDL před oxidací *in vivo*⁴¹.

7. Závěr

Příjem a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka patřily ještě nedávno k málo studovaným oblastem jejich výzkumu. Rostlinné polyfenoly představují významnou část antioxidantů přítomných v naší potravě a souvislost mezi jejich příjmem a zvýšením rizika onemocnění spojených s porušením antioxidační rovnováhy je v současnosti široce diskutována. Doposud nelze učinit jednoznačně závěry ohledně biologických účinků rostlinných polyfenolů v množstvích přijímaných potravou. Je však nutné zdůraznit, že některé polyfenoly ve vysokých koncentracích vykazují řadu nepříznivých účinků, např. prooxidační, mutagenní, genotoxickou a strumigenní aktivitu. Dlouhodobý efekt a bezpečnost příjmu rostlinných polyfenolů v dávkách, které převyšují jejich obsah v potravinách (např. různé potravinové doplňky), není známa⁴².

Biodostupnost a biotransformace jsou faktory, které významným způsobem limitují fyziologické účinky rostlinných polyfenolů. Výsledky získané v posledních letech ukazují, že po příjmu polyfenolů podléhají velice rozsáhlým a různorodým přeměnám jak v trávicím traktu, tak v samotném organismu. Proto je nutné věnovat více pozornosti studiu účinků jejich metabolitů. Znalost rozsahu koncentrací rostlinných polyfenolů a jejich metabolitů v krvi a tkáních je rovněž důležitá pro interpretaci výsledků experimentů získaných na buněčných kulturách, stejně jako pokusů na zvířecích modelech.

Autoři děkují Grantové agentuře ČR za finanční podporu projektu č. 303/00/D062 a 521/02/1129.

LITERATURA

1. Renaud S., De Lorgeril M.: *Lancet* 339, 1523 (1992).
2. Hollman P. C. H., Katan M. B.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 937 (1999).
3. Le Marchand L., Murphy S. P., Hankin J. H., Wilkens L. R., Kolonel L. N.: *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 154 (2000).
4. Giovannucci E.: *Am. J. Epidemiol.* 147, 1043 (1998).
5. Adlercreutz H.: *Lancet Oncol.* 3, 364 (2002).
6. Matějková Š., Gut I.: *Remedia* 4, 272 (2000).
7. Tůmová L.: *Česk. Farm.* 44, 18 (1995).
8. Moravcová J., Kleinová T.: *Chem. Listy* 96, 282 (2002).
9. Scalbert A., Williamson G.: *J. Nutr.* 130, 2073S (2000).
10. Slanina J.: *Chem. Listy* 94, 111 (2000).
11. Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I., Buckiová D., Křisa B.: *Chem. Listy* 95, 602 (2001).
12. Čepička J., Karabín M.: *Chem. Listy* 96, 90 (2002).
13. Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Katan M. B., Kromhout D.: *Nutr. Cancer* 20, 21 (1993).
14. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C.: *Pharmacol. Rev.* 52, 673 (2000).
15. Clifford M. N.: *J. Sci. Food Agric.* 80, 1033 (2000).
16. Yang C. S., Lee M. J., Chen L.: *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 8, 83 (1999).
17. Hollman P. C. H., de Vries J. H., van Leeuwen S. D., Mengelers M. J., Katan M. B.: *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1276 (1995).
18. Olthof M. R., Hollman P. C. H., Katan M. B.: *Am. J. Clin. Nutr.* 131, 66 (2001).
19. Choudhury R., Srail S. K., Debnam E., Rice-Evans C. A.: *Free Radical Biol. Med.* 27, 278 (1999).
20. Cremin P., Kasim-Karakas S., Waterhouse A. L.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 1747 (2001).
21. Day A. J., Canada F. J., Díaz J. C., Kroon P. A., Mclauchlan R., Faulds C. B., Plumb G. F., Morgan M. R. A., Williamson G.: *FEBS Lett.* 468, 166 (2000).
22. Mülleder U., Murkovic M., Pfannhauser W.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 53, 61 (2002).
23. Paganga G., Rice-Evans C. A.: *FEBS Letters* 401, 78 (1997).
24. Aziz A. A., Edwards C. A., Lean M. E. J., Crozier A.: *Free Radical Res.* 29, 257 (1998).
25. Walgren R. A., Lin J. T., Kinne R. K. H., Walle T.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 837 (2000).
26. Rechner A. R., Kuhnle G., Bremmer P., Hubbard G. P., Moore K. P., Rice-Evans C. A.: *Free Radical Biol. Med.* 33, 220 (2002).
27. Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C.: *Biomed. Pharmacother.* 56, 276 (2002).
28. Ma J., Stampfer M. J.: *Clin. Chem.* 48, 601 (2002).
29. Spencer J. P. E., Chowrimootoo G., Choudhury R., Debnam E. S., Srail S. K., Rice-Evans C.: *FEBS Lett.* 458, 224 (1999).
30. Tapiero H., Tew K. D., Ba G. N., Mathé G.: *Biomed. Pharmacother.* 56, 200 (2002).
31. Booth A. N., Emerson O. H., Jones F. T., DeEds F.: *J. Biol. Chem.* 229, 51 (1957).
32. Terao J., Piskula M. K.: *Nutrition* 15, 790 (1999).
33. Hollman P. C., Bijsman M. N., van Gameren Y., Cnossen E. P., de Vries J. H., Katan M. B.: *Free Radical Res.* 31, 569 (1999).
34. Olthof M. R., Hollman P. C. H., Vree T. B., Katan M. B.: *J. Nutr.* 130, 1200 (2000).
35. Donovan J. F., Bell J. R., Kasim-Karakas S., German J. B., Walzem R. L., Hansen R. J., Waterhouse A. L.: *J. Nutr.* 129, 1662 (1999).
36. Zhang Y., Wang G. Y., Song T. T., Murphy P. A., Hendrich S.: *J. Nutr.* 129, 957 (1999).
37. Erlund I., Meririnne E., Alfthan G., Aro A.: *J. Nutr.* 131, 235 (2001).
38. Lee M. J., Wang Z. Y., Li H., Chen L., Sun Y., Gobbo S., Balentine D. A., Yang C. S.: *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 4, 393 (1995).
39. Whitehead T. P., Robinson D., Allaway S., Syms J., Hale A.: *Clin. Chem.* 41, 32 (1995).
40. Serafini M., Maiani G., Ferro-Luzzi A.: *J. Nutr.* 128, 1003 (1998).
41. Pietta P. G.: *J. Nat. Prod.* 63, 1035 (2000).
42. Skibola C. F., Smith M. T.: *Free Radical Biol. Med.* 29, 375 (2000).
43. Adam A., Crespy V., Levrat-Verny M. A., Leenhardt F., Leuillet M., Demigné C., Rémésy C.: *J. Nutr.* 132, 1962 (2002).
44. Leontowicz H., Gorinstein S., Lojek A., Leontowicz M., Číž M., Soliva-Fortuny R., Park Y. S., Jung S. T., Trakhtenberg S., Martin-Belloso O.: *J. Nutr. Biochem.* 13, 603 (2002).

J. Slanina and E. Táborská (*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*): **Intake, Bioavailability, and Metabolisms of Plant Polyphenols in Humans**

The total intake of plant polyphenols in humans is ca. 1 g/day, a major part accounts for flavonoids and phenolic acids. The main polyphenol dietary sources are beverages (tea, coffee, wine, fruit juice) and fruits. There is a great uncertainty in the intake of several classes of plant polyphenols, such as oligomeric proanthocyanidins and phenolic acids. The intestinal absorption of polyphenols is probably high, but the plasma concentration of the parent polyphenol is low. A majority of polyphenols is subject to hydrolysis in digestive tract and is then metabolized by the colonic microflora largely to phenolic acids, which can be also absorbed. After absorption, polyphenols and their metabolites are further bound in tissues. These transformations lead to a number of metabolites, which mostly retain the antioxidant activity.

VYUŽITÍ METATÉZE PŘI SYNTÉZE CHEMICKÝCH SPECIALIT

JIŘÍ KOPEČNÝ, LADISLAV KURC
a LIBOR ČERVENÝ

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
libor.cerveny@vscht.cz

Došlo 20.3.03, přijato 10.12.03.

Klíčová slova: metatéze olefinů, katalyzátory metatéze,
Re₂O₇

Obsah

1. Úvod
2. Metatéze olefinů
 - 2.1. Katalyzátory metatéze
 - 2.2. Katalyzátor Re₂O₇/Al₂O₃
3. Aplikace metatéze
 - 3.1. Nesubstituované olefiny
 - 3.2. Substituované olefiny
4. Cis-trans izomerie
5. Závěr

1. Úvod

V moderní organické syntéze jsou široce užívány katalytické reakce, které umožňují a zjednodušují přípravu organických látek. Jednou z nich je metatéze, reakce nenasycených organických molekul, nazývaná dříve disproportionace olefinů. Jde o transalkylidační reakci, která může probíhat buď mezi dvěma stejnými molekulami (homometatéze, ang. self-metathesis) nebo v systému obsahujícím více nenasycených sloučenin (kometatéze, ang. co-metathesis, cross-metathesis), a to inter- i intramolekulárně. Podle charakteru substrátu může probíhat v plynné i kapalně fázi. Velký syntetický potenciál metatéze vedl ke studiu literatury a dostupné literární informace o reakci a jejím využití byly shrnuty v následujícím přehledu.

Do současnosti byla představena velmi široká paleta katalyzátorů metatéze. Od doby objevení katalytických účinků přechodových kovů byly připraveny homogenní i heterogenní katalyzátory nejrůznějších struktur. Mezi kovy užívané v katalýze metatéze můžeme najít zejména W, Mo, Re, Ru, méně už Rh, Ti, Nb, Ta, Os, V či Ir.

2. Metatéze olefinů

Reakční schéma metatéze navrhl Bradshaw¹. Při reakci dochází k rozpadu a opětovnému vzniku dvojně vazby

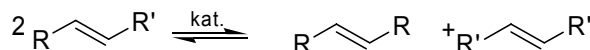


Schéma 1: Reakční schéma metatéze

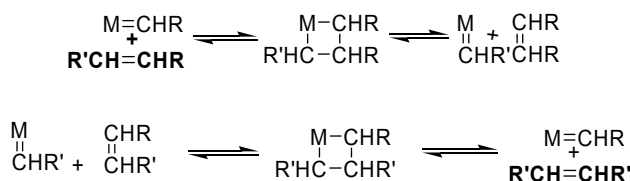


Schéma 2: Interakce karbenového komplexu s kovem s volným olefinem

(schéma 1). Důkazem se stala reakce směsi deuterovaného (CD₃-CD=CD-CD₃) a neznačeného but-2-enu. Produkty byly analyzovány a byla prokázána přítomnost but-2-enu-*d*₄ (CD₃-CD=CH-CH₃). Tato reakce byla pojmenována jako metatéze roku 1964 Calderonem².

Při metatézi dochází k výměně atomů nebo skupin atomů mezi dvěma molekulami, bez změny charakteru vazeb. Metatéze olefinů je obzvlášť zajímavá z hlediska možnosti sestavovat organickou molekulu z jednotlivých „bloků“, a tak zjednodušit nebo mnohdy dokonce umožnit syntézu chemické látky. Metatézi je možno aplikovat na nenasycené látky nejrůznějších struktur.

Metatéze je transalkylidační reakce a je všeobecně přijato, že probíhá tzv. metalo-karbenovým mechanismem³ (schéma 2). Propagačního kroku se účastní karbenový komplex s kovem (M=CHR) a volný olefin. Alken se váže na karbenový komplex s kovem a následně vytváří s kovem metalocyklobutanový intermediát. Metalocyklický intermediát je nestabilní a rozpadá se za vzniku nového karbenového komplexu s kovem a nového alkenu.

Vznik metalokarbenového komplexu probíhá přes stádium π-allylového a následně metalocyklobutanového komplexu. Studium mechanismu iniciace metatéze vedlo Greena a spol.⁴ k závěru, že hydrid přechodového kovu koordinovaný π-allylovou skupinou může přecházet na metalocyklobutanový komplex buď intramolekulární migrací vodíku do polohy 2 π-allylového ligandu, nebo intermolekulárním přesmykem vodíku (hydridového iontu) nekoordinovaného aktivního místa taktéž do polohy 2 π-allylové skupiny. Mechanismus vzniku metalocyklobutanového komplexu je uveden ve schématu 3.

Výsledkem obou navržených mechanismů je vznik

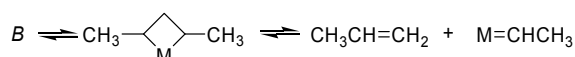
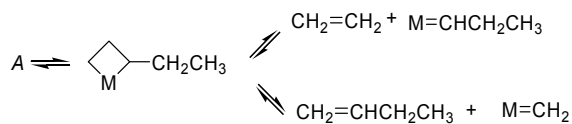
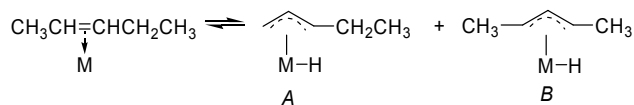


Schéma 3: Mechanismus vzniku metalocyklobutanového komplexu a jeho následný rozklad za vzniku karbenových komplexů s kovem

metalocyklobutanového komplexu. Za terminační stupeň metatéze je možno považovat rozpad nestabilního metalocyklobutanového komplexu⁵.

2.1. Katalyzátory metatéze

Klasické homogenní katalyzátory na bázi W a Mo obsahují kokatalyzátory, které mají charakter Lewisovy kyseliny a umožňují vznik aktivního karbenového komplexu *in situ*. Skupinu vysoce aktivních a selektivních moderních homogenních katalyzátorů představují katalyzátory na bázi komplexů ruthenia⁶ (Grubbsovy katalyzátory) a molybdenu (Schrockovy a Schrock-Hoveydyovy katalyzátory), převzaté z práce Rouhiho⁶ (viz schéma 4). Tyto katalytické systémy se užívají jak při metatézi esterů nenasycených kyselin, nenasycených etherů a nitrilů, tak i nesubstituovaných olefinů.

Aktivní složku heterogenních katalyzátorů tvoří nejčastěji Re_2O_7 , WO_3 nebo MoO_3 . Sloučeniny (zejména chloridy) W nebo Mo, které jsou používány v homogenní katalýze, jsou často zakotveny na stejných typech nosičů, jaké se používají u heterogenních katalyzátorů metatéze.

Katalyzátory můžeme rozdělit na klasické katalyzátory s aktivní oxidovou formou přechodového kovu, které se

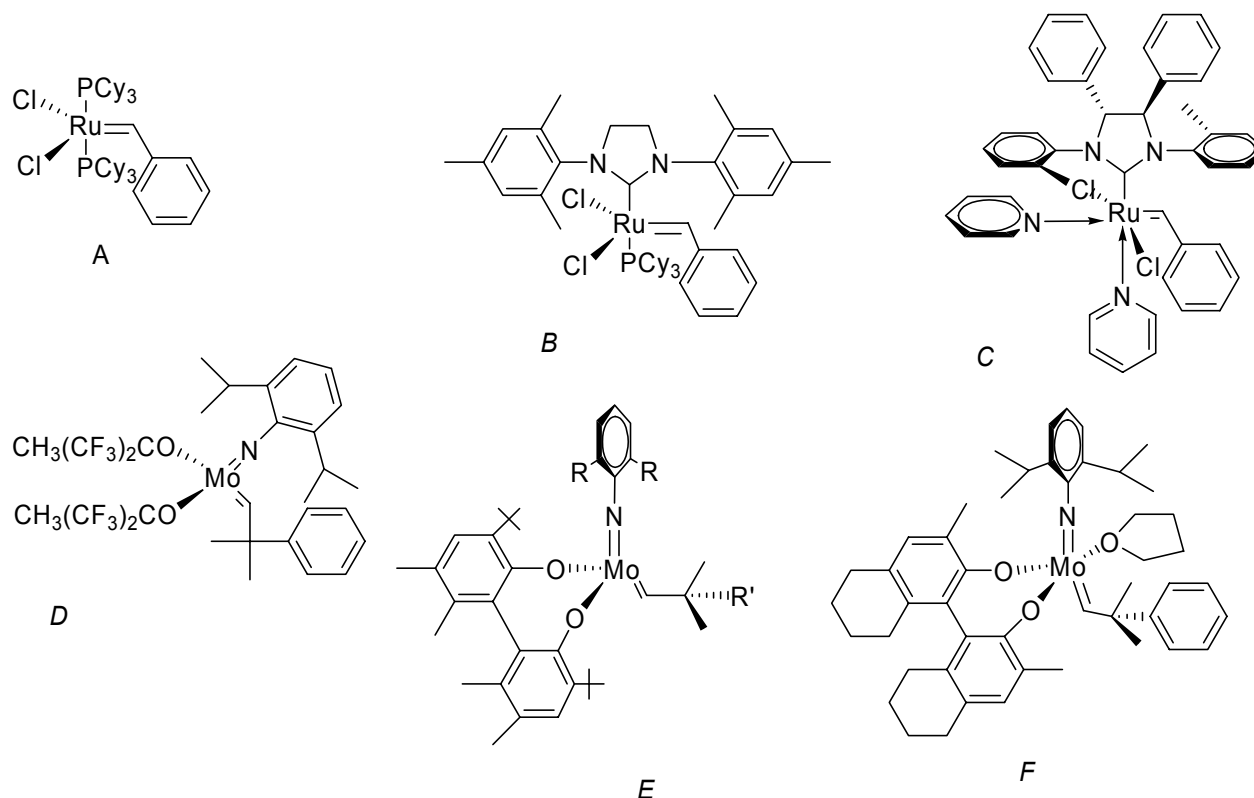


Schéma 4: Moderní homogenní katalyzátory metatéze

A) Grubbsův katalyzátor, B) Grubbsův katalyzátor druhé generace, C) Grubbsův chirální rutheniový katalyzátor, D) Schrockův katalyzátor, E) F) Schrock-Hoveydyov katalyzátory

získávají impregnací nosiče anorganickými solemi, a na katalyzátory získané rozkladem odpovídajících komplexních sloučenin na nosiči. Mezi nejčastěji užívané oxidové katalyzátory metatéze patří například $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{SiO}_2$, $\text{MoO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{MoO}_3/\text{SiO}_2$, $\text{WO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$, WO_3/SiO_2 a další. Druhou skupinu tvoří WCl_6 , WOCl_4 , $\text{W}(\text{CO})_6$, $\text{Mo}(\text{CO})_6$, $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$, $\text{Mo}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$ a další organokovové struktury. Katalyzátory druhé skupiny, připravené rozkladem komplexních sloučenin, se užívají na nosičích $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, SiO_2 , $\text{SiO}_2\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$.

Heterogenní katalyzátory, zejména získané rozkladem komplexních sloučenin (např.: $\text{Mo}(\text{CO})_6/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}/\text{Al}_2\text{O}_3$), se používají v přítomnosti promotorů, např. AlEt_3 , AlMe_3 , SnBu_4 , SnEt_4 atd.

Prekurzorem katalyticky aktivní formy jsou buď oxidy kovů v nejvyšším oxidačním stupni, např. $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{WO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{MoO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ nebo komplexy s formálně nulovým mocenstvím kovu $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{W}(\text{CO})_6/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{Mo}(\text{CO})_6/\text{Al}_2\text{O}_3$. Vedle alumosilikátových nosičů mohou být použity ZrO_2 , TiO_2 a jiné. Katalyzátory se odlišují účinností a použitelností, která závisí na podmínkách reakce (teplota, stabilita katalyzátoru) a vlastnostech užitého substrátu (polární skupiny, molekulová hmotnost, počet a typ substituentů substrátu).

Z hlediska využití metatéze v průmyslovém měřítku je nepochybně výhodnější užívat heterogenní katalytické systémy. Heterogenní katalyzátory na bázi Mo jsou účinné až za zvýšených teplot (373–623 K). Z dostupných informací^{3,7} se jako velmi atraktivní jeví možnost použití heterogenních katalyzátorů na bázi Re_2O_7 . Při užití vhodného nosiče o vysokém povrchu s minimalizovaným vlivem jeho kyselé funkce dosahuje katalyzátor vysoké účinnosti a selektivity již za velmi mírných reakčních podmínek, v mnoha případech za laboratorní teploty. Z těchto důvodů byla při studiu literatury věnována největší pozornost heterogennímu katalyzátoru typu $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{nosič}$.

2.2. Katalyzátor $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3$

Rhenium je obsaženo v zemské kůře ve velmi nízké koncentraci (~1 ppb). Celková světová zásoba, kterou je možno dostupnými technikami získat, je kolem 3000 t. Rhenium je získáváno jako vedlejší produkt při těžbě molybdenových rud⁸.

Rhenium bylo již v době objevení transalkylidačních katalytických účinků oxidu rhenistého používáno v reformingových katalyzátorech⁹ a také od třicátých let minulého století v hydrogenačně-dehydrogenačních systémech. Zde se však vyskytuje rhenium ve formě kovu na nosičích typu aktivního uhlí, křemeliny nebo modifikované aluminu. Dodnes se vedle užití v katalýze metatéze používá v petrochemických technologiích. Jako katalyzátor metatéze se používá především na nosičích typu Al_2O_3 a $\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{SiO}_2$. Na nosiči tvořeném čistým oxidem křemičitým katalyzátor nevykazuje prakticky žádnou účinnost.

Optimální pracovní teplota katalyzátoru je mezi 293–373 K, což ho řadí mezi neaktivnější katalyzátory metatéze a vůbec neaktivnější oxidové katalyzátory.

Byly taktéž studovány katalyzátory obsahující rhenium v jiné formě než Re_2O_7 . Reakcí promotoru $(\text{CH}_3)_4\text{Sn}$ s Re_2O_7 vzniká CH_3ReO_3 . Mathew a spol.¹⁰ studovali aktivitu katalyzátoru $\text{CH}_3\text{ReO}_3/\text{SiO}_2\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$ při metatézi okt-1-enu. Katalytickou aktivitu při metatézi (*E*)-dec-4-enu vykazuje i oxidový katalyzátor bez aktivní složky obsahující atom Re (cit.¹¹).

3. Aplikace metatéze

Metatéze olefinů obsahujících funkční skupiny je reakce, která umožňuje přípravu celé řady chemických specialit⁷. Metatéze je cenným nástrojem jejich syntézy.

3.1. Nesubstituované olefiny

Lineární α -olefiny mohou být mimo jiné selektivně připraveny ethenolýzou olefinů s vnitřní dvojnou vazbou. Nacházejí uplatnění při výrobě změkčovadel, syntetických maziv a povrchově aktivních látek. Symetrické olefiny s dvojnou vazbou uvnitř řetězce lze selektivně připravit metatézí α -olefinů na velmi aktivních katalyzátorech obsahujících Re, které jsou málo účinné při bočních zejména kyselé katalyzovaných izomeračních reakcích. Příkladem mohou být produkty homometatéze hex-1-enu, okt-1-enu, dec-1-enu, totiž dec-5-en, tetradec-7-en, resp. oktadec-9-en. Jedno z možných použití těchto symetrických olefinů je v chemii syntetických maziv¹².

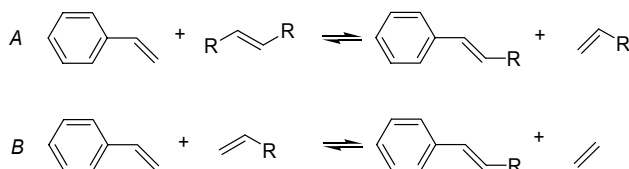


Schéma 5: Příprava alkenylbenzenového skeletu kometatézí styrenu s olefinem s vnitřní dvojnou vazbou (A), resp. s α -olefinem (B)

3.2. Substituované olefiny

Symetrické cyklické olefiny, např. 1,2-di(cyklohex-3-en-1-yl)ethen, se vyrábějí homometatézí 4-vinylcyklohex-1-enu. Produkt se používá při výrobě retardérů hoření. Většina katalyzátorů průmyslově použitých je na bázi $\text{WO}_3\cdot\text{SiO}_2/\text{MgO}$. Není však vyloučeno, že by se katalyzátor nedal nahradit jiným, obsahujícím jinou aktivní složku. Warwel a Winkemüller¹³ studovali metatézi substituovaných olefinů na katalyzátoru $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3$. Výrobu vyšších alkylbenzenů, používaných k výrobě detergentů, lze realizovat mnoha cestami. Vedle tradiční kyselé katalyzované alkylace benzenu α -olefiny je možno vyšší alkylbenzenový skelet

připravit selektivně taktéž metatézi a následnou hydrogenaci nenasyčeného alkenylového substituentu (schéma 5).

Autoři¹³ studovali kometatézi olefinů a 4-vinylcyklohex-1-enu nebo styrenu. Při kometatézi obecně může docházet taktéž k homometatetickým reakcím. Produkty těchto reakcí, stilben, resp. 1,2-di(cyklohex-3-en-1-yl)ethen, lze převést na žádané produkty kometatézí se symetrickými olefiny s dvojnou vazbou uprostřed molekuly. Při této reakci se používá katalyzátor $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-R}_4\text{Sn}$ ($\text{R} = \text{alkyl}$). Zvýšení selektivity hlavní kometatézí reakce lze docílit také přebytkem olefinu v reakční směsi.

Finkelstein a spol.¹⁴ se zabývali studiem metatéze alkylidencykloalkanů, alkenylycykloalkanů a spirosloučenin. Jako produkty byly získávány látky terpenových a isoterpenových struktur. Látky podobných struktur se nacházejí v přírodních esencích. Katalyzátor $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Bu}_4\text{Sn}$ nebyl selektivní k metatézi methylidencyklopropanu, vznikaly

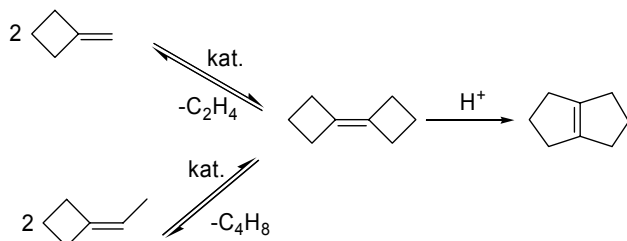


Schéma 6: Vznik bicyklobutylidenu a jeho následná izomerizace

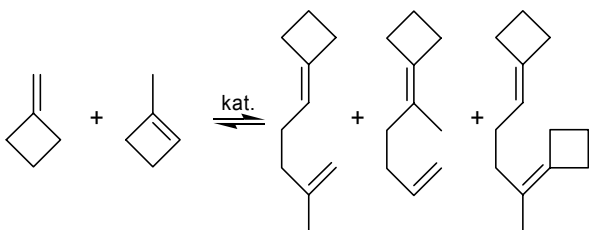


Schéma 7: Příprava analogů přírodních terpenů sumárního vzorce $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$

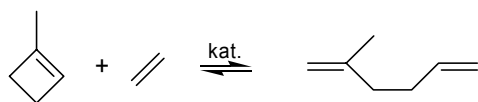


Schéma 8: Reakční schéma ethenolýzy methylcyklobutenu

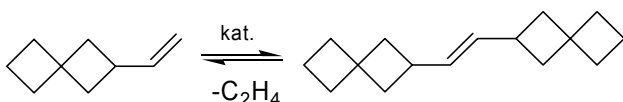


Schéma 9: Příklad metatetické přeměny alkenylspirosloučenin

především produkty metatéze 1-methylcykloprop-1-enu. Katalyzátor byl však aktivní při metatézi methylidencyklobutanu, který přecházel na bicyklobutyliden (viz schéma 6). Selektivita na bicyklobutyliden byla zvyšována odstraňováním produktu z reakční zóny. Za těchto podmínek bylo dosaženo selektivity $> 98\%$ při výtěžku 70–75%. Při delším kontaktu reakční směsi s katalyzátorem docházelo ke kyselé katalyzované izomerizaci produktu na 1,2,3,4,5,6-hexahydropentalen.

Široké možnosti aplikace produktů metatéze alkylidencyklobutanových derivátů nabízí kometatéze methylidencyklobutanu s olefiny¹⁴. Reakce methylidencyklobutanu a jeho nenasyčených cyklických izomerů se shodným sumárním vzorcem C_5H_8 vedly k syntéze sloučenin se sumárním vzorcem $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$, které strukturně odpovídají přírodním terpenům (schéma 7).

Otevření methylcyklobutenového kruhu nabízí možnost syntetizovat isoprenoidy. Dvojně vazby v polohách 1,5 jsou charakteristické pro mnoho přírodních látek. Nejjednodušší reakcí tohoto typu je ethenolýza 1-methylcyklobut-1-enu s použitím $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Bu}_4\text{Sn}$, kterou se získává 2-methylhexa-1,5-dien (viz schéma 8), klíčový meziprodukt syntézy terpenoidů.

Stejní autoři¹⁴ použili ke kometatézi, která umožnila taktéž vznik sloučenin terpenoidních struktur, cyklopenten a methylcyklobuten.

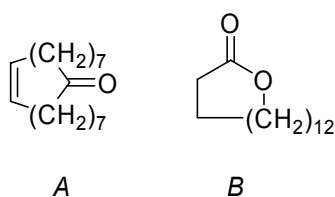
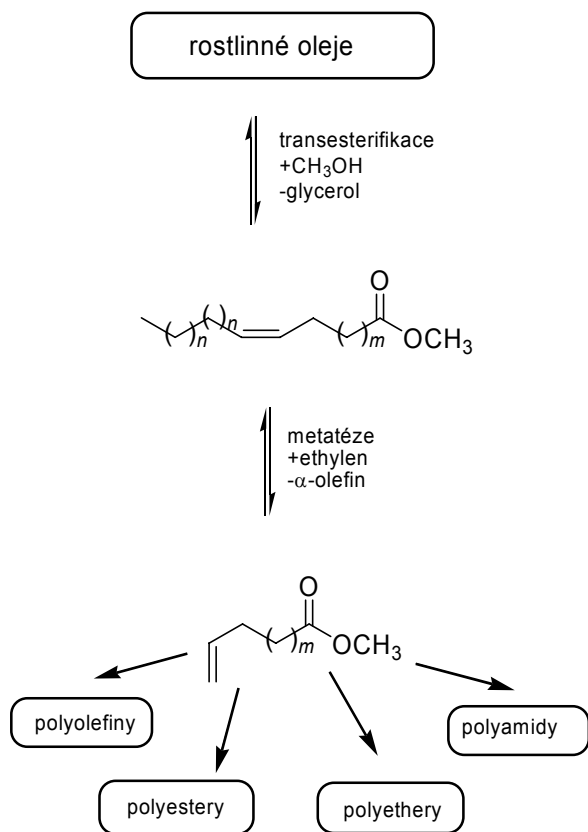
Bicyklobutyliden byl získán i v případě použití ethylidencyklobutanu jako reaktantu. Aktivita katalyzátoru $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Bu}_4\text{Sn}$ není v tomto případě závislá na poloze dvojně vazby. Také spirosloučeniny s vinylovou skupinou podléhají metatézi¹⁴, viz schéma 9.

Rovněž metatéze konjugovaných dienů poskytuje širokou škálu hodnotných chemických specialit¹⁵. Například při kometatézi hexa-2,4-dienů vzniká jako jeden z produktů okta-2,4,6-trien, který se používá jako atraktant gamet mořské řasy *Sargassum Horneri*. Mořské řasy se používají jako potraviny, některé jako zdroj polysacharidů.

K homometatézi konjugovaných dienů nebo kometatézi dienů s olefiny lze použít katalyzátor $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-(CH}_3)_4\text{Sn}$. Konjugované alkadienyl-alkanoáty jsou důležité aromatické ingredience v potravinářství, nápojích a tabáku. Některé dienové alkoholy a estery mají taktéž insekticidní účinky. Kometatézí okta-3,5-dienů a (okt-7-en-1-yl)-acetátů lze připravit (dodeka-7,9-dien-1-yl)-acetát, jehož (7E, 9Z)-izomer je feromonem *Lobesia Bottrany*, škůdce vinné révy. Woerlee a spol.¹⁵ ke kometatézi použili 2,5-dimethylhexa-2,4-dien spolu s methylesterem kyseliny pent-4-enové. Vzniká směs produktů, z které je nejhodnotnější methylester kyseliny 7-methylokta-4,6-dienové. Zde se však autoři¹⁵ o stereoizomerní konfiguraci nezmiňují.

Jako první heterogenní katalyzátor metatéze esterů nenasyčených mastných kyselin byl použit systém $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-R}_4\text{Sn}$ (nejčastěji $\text{R} = \text{ethyl, methyl, butyl, oktyl}$). Katalyzátor vykazoval vysokou aktivitu i selektivitu v reakčních systémech, kde homogenní katalyzátory aktivní nebyly. Heterogenní katalyzátory⁷ bez použití promotorů nevykazují prakticky žádnou účinnost. Bylo však zjištěno⁷, že katalytický systém $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-(CH}_3)_4\text{Sn}$ je při metatézi

methylesteru kyseliny pent-4-enové při mírně zvýšené teplotě (323 K) aktivní a vysoce selektivní. Ze syntetického hlediska otevírá kometatéze esterů nenasyčených mastných kyselin nové syntetické cesty k homologům těchto esterů, které se jinými postupy připravují velmi obtížně. Ethenolýza¹⁶ methylesteru (*Z*)-oktadec-9-enové (olejové) kyseliny poskytuje methylester kyseliny dec-9-enové. Tento nenasyčený ester je klíčovým meziproduktem syntézy (*E*)-9-oxodec-2-enové kyseliny, feromonu včelích královen, a syntézy kyseliny 9-oxodekanové, meziprojektu syntézy prostaglandinů¹⁶. Vedle ethenolýzy methylesteru olejové

Schéma 10: Civeton (*A*) a exaltolid (*B*)Schéma 11: Příprava a následné využití esterů ω -nenasyčených mastných kyselin z obnovitelných zdrojů

kyseliny probíhá v reakčním systému taktéž homometatéze, proto je výhodné pro potlačení homometatéze provádět reakci v autoklávu za zvýšeného tlaku ethenu (5 MPa). Pozitivní vliv na selektivitu reakce mělo taktéž zvyšování poměru katalyzátor/substrát. S použitím rozpouštědla (hexanu) bylo dosahováno vyšších konverzí.

Aktivitou katalyzátorů kometatéze esterů nenasyčených mastných kyselin se zabývali Elison a spol.¹⁷ Jak již bylo zmíněno, katalyzátory při metatézis substrátů s polárními skupinami jsou podstatně méně aktivní než při metatézis nesubstituovaných olefinů. Proto se další výzkum zabýval zejména zvýšením aktivity katalyzátorů, a to především z důvodu možného průmyslového využití. Homometatézis esterů nenasyčených mastných kyselin jsou získávány diestery nenasyčených kyselin, které se používají k syntéze polymerů, a jiné užitečné chemické produkty¹⁸ jako například civeton ((*Z*)-cykloheptadec-9-en-1-on) nebo exaltolid (cyklopentadekano-15-lakton), základní meziprojektu syntézy vonných látek. Civeton (viz schéma 10) vzniká Dieckmannovou kondenzací diesterového produktu homometatéze methyl-oleátu^{19,20}. Jiná možná cesta syntézy civetonu spočívá v intramolekulární metatézis nenasyčených ketonů, buď pentatriakonta-9,26-dien-18-onu nebo nonadeka-1,18-dien-10-onu²¹. Pokud byla použita reakční směs o nízké koncentraci reaktantů (10^{-2} – 10^{-4} mol.dm⁻³), byly získány směsi izomerů cykloheptadec-9-en-1-onu v poměru *E/Z* ~ 1. Syntézou civetonu „vše v jedné baňce“ se zabývali Hamasaki a spol.²² Při ní se vychází z methylesteru kyseliny dec-9-enové a k urychlení metatéze autoři použili Grubbsův katalyzátor⁶ (viz schéma 4).

Kometatézis esterů nenasyčených vyšších mastných kyselin s nižšími olefiny, např. but-2-enem nebo pent-2-enem vznikají estery mastných kyselin s nižší molekulovou hmotností, které mohou být použity k výrobě povrchové aktivních látek¹⁸. Kometatézis ethyl-oleátu a dec-5-enu vzniká směs *E*- a *Z*-izomerů ethyl-tetradec-9-enoátu, prekurzoru feromonů¹⁸. Ethenolýzou esterů nenasyčených vyšších mastných kyselin vznikají monoestery nižších mastných kyselin s terminální dvojnou vazbou, které nacházejí mnohá využití. Například methyl-dec-9-enoát se používá jako monomer pro syntézu polymerů a kopolymerů, může být použit při výrobě nylonu-10. Hydrogenolytickým štěpením esterů vznikají alkoholy, které se používají jako maziva a změkčovadla¹⁸.

Ethenolýzou olivového oleje lze připravit oleje nižších molekulových hmotností. Produkt je důležitým meziproduktem výroby jedlých olejů.

Studiem metatéze nenasyčených látek získaných z obnovitelných zdrojů se zabývali Warwel a spol.²³ (viz schéma 11). Homometatézis methylesterů ω -nenasyčených mastných kyselin s použitím katalyzátoru B₂O₃-Re₂O₇/SiO₂.Al₂O₃-SnBu₄ získali odpovídající diestery. Konverzi reakce lze s výhodou posouvat odstraňováním vznikajícího ethenu evakuací reakčního systému.

Na stejném typu katalyzátoru byla studována polykondenzace produktů transesterifikace alkenoátů s dioly (butan-1,4-diol, ethylenglykol) (viz schéma 12).

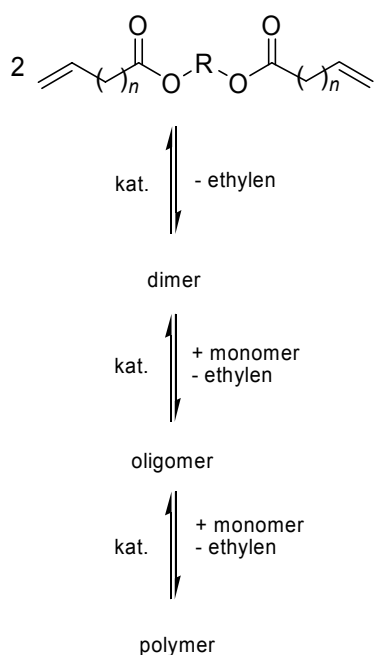


Schéma 12: Polykondenzace alkandiol-dialkenoátu

Triacylglyceroly¹⁴ obsahující určité množství nenasyčených acylů s délkou řetězce C₁₂–C₁₆ a polohou dvojně vazby C₉ mají insekticidní účinky. Biologickou aktivitu má často směs stereoizomerů s velmi přesným poměrem *E*- a *Z*-izomerů. Podobně i u látek používaných ve vonných substancích, například tzv. listových alkoholů²⁴, je vyžadována zcela konkrétní konfigurace. Mezi listové alkoholy patří např. (*E*)-hex-2-en-1-ol nebo (*Z*)-hex-3-en-1-ol.

Metatéze alkenylesterů s vhodnými olefiny, urychlována homogenními katalyzátory na bázi wolframu, nabízí možnost přípravy různých biologicky aktivních nenasyčených esterů a makrolidů²⁵, zejména insekticidních látek. Homogenní katalyzátory nevykazují katalytickou aktivitu v systémech obsahujících allylovou skupinu. Homometatéze allyl-acetátu je, podle Mola a Woerleeho²⁶ s použitím katalyzátoru Re₂O₇/Al₂O₃-(CH₃)₄Sn, možnou cestou přípravy 1,4-diacetoxybut-2-enu, který vzniká se selektivitou ~ 96 %. Podle autorů²⁶ lze k metatézi použít nenasyčené ethery, ketony a další substráty s polárními funkčními skupinami. Reakční doba se u těchto reakcí pohybuje řádově v hodinách, konverze je většinou nižší než 20 %. S použitím zmíněného katalytického systému bylo dosahováno velmi vysoké selektivity, většinou >96 %, a poměru *E*- a *Z*-izomerů ~2,5.

Kometatézi olefinů bez a s funkčními skupinami jsou získávány chemické speciality používané v mnoha různých oblastech. Například (deka-4,9-dien-1-yl)-acetát, produkt kometatézy cyklopentenu a (pent-4-en-1-yl)-acetátu, se používá kvůli své strukturní podobnosti s přírodními biologicky aktivními látkami jako meziprodukt při přípravě insekticidních přípravků.

Metatéze allyl(ethyl)etheru byla předmětem studia Levisallose a spol.²⁷ Ačkoli při použití homogenních katalyzátorů jsou konverze a selektivita reakce velmi nízké, při použití Re₂O₇/Al₂O₃-R₄Sn vznikal 1,4-diethoxybut-2-en, přičemž konverze reakce byla 40 % a žádaný produkt vznikal se selektivitou 98 %. Na shodném katalyzátoru byla studována²⁵ intramolekulární metatéze diallyletheru a 4-(allyloxy)but-1-enu. Produkty 2,5-dihydrofuran, resp. 3,6-dihydro-2*H*-pyran, získávali se 100 % selektivitou. Podobné selektivitu dosahovali Mol a Woerlee²⁶ při metatézi nenasyčených ketonů (hex-5-en-2-on) s katalytickým systémem Re₂O₇/Al₂O₃-(CH₃)₄Sn.

Aktivitu katalyzátoru při kometatézi nenasyčených alkoholů a nenasyčených mastných kyselin s olefiny lze zvýšit použitím chránicí např. trimethylsilylové skupiny^{28,29}, která eliminuje vliv polárních funkčních skupin substrátů. Stejně chránicí skupiny, znázorněné na schématu 13, bylo použito¹⁴ při syntéze nenasyčených diolů. Pokud by byly přítomny v reakčním systému látky s volnými polárními funkčními skupinami, k metatézi by nedocházelo kvůli silné sorpci těchto látek na povrchu katalyzátoru.

Nakamura a Echigoya³⁰ použili heterogenní katalyzátor Re₂O₇/Al₂O₃ bez promotorů při kometatézi (*Z*)-1-chloroktadec-9-enu s různými olefiny (např.: hex-1-enem) za vzniku 14-chlortetradec-5-enu a tetradec-5-enu, přičemž dosahovali velmi nízké konverze. Pokud však použili stejný katalyzátor modifikovaný V₂O₅ nebo WO₃, dosahovali při stejné selektivitě vyšší konverze. Zajímavější výsledky publikovali Fridman a spol.³¹ K homometatézi nižších halogenovaných olefinů použili Re₂O₇/Al₂O₃-(Bu)₄Sn. Vinyl- a allylchlorid nebo -bromid podléhaly homometatézi s vysokou selektivitou^{26,31}. Z výsledků studia metatézy halogenovaných olefinů^{30,31} je zřejmé, že pro dosažení potřebné účinnosti katalyzátoru je nezbytné použít promotory. Katalyzátor s promotorem (CH₃)₄Sn byl použit taktéž k metatézi allyljodidu.

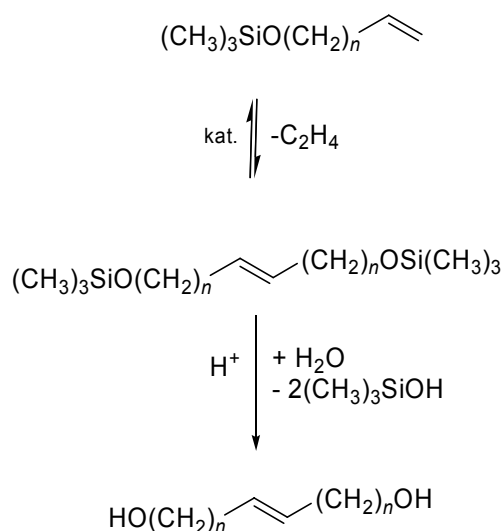


Schéma 13: Použití chránicí skupiny při metatéze a její následné hydrolytické odštěpení

Byla studována metatéze látek obsahujících dusík, např. nitrilů nenasyčených kyselin^{25,28}. Katalyzátor $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-R}_4\text{Sn}$ nevykazoval aktivitu k akrylonitrilu ani k but-3-ennitrilu. Kometatéze but-3-ennitrilu se symetrickým olefinem nicméně probíhala s konverzí kolem 25 %. Nitrily s delším ω -nenasyčeným řetězcem podléhaly kometatézi s vysokou selektivitou. Vzniklé nenasyčené dinitrily mohou být hydrogenovány na diaminy a použity při výrobě polyamidů nebo hydrolyticky převedeny na dikarboxylové kyseliny.

Při metatézi sloučenin obsahujících síru³ byl použit např. allyl(pentyl)sulfid, který podléhá metatézi na katalyzátoru $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-(CH}_3)_4\text{Sn}$ s nízkou konverzí ale s vysokou selektivitou na 1,4-bis(pentylsulfenyl)but-2-en.

S výhledem na možná uplatnění v organické syntéze studovali Finkelštejn a spol.^{3,14,32} metatézi olefinů obsahujících prvky IV. skupiny (Si, Ge). Za použití homogenních i heterogenních katalytických systémů studovali metatézi rozličných substrátů, např. allyl- a (but-3-en-1-yl)silanů. Metatéze substrátů na katalyzátoru $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SnBu}_4$ probíhala s vysokou konverzí (80 %) a vysokou selektivitou. Výsledkem studia bylo zjištění, že metatéze substrátů obsahujícího funkční skupiny s labilními vazbami (Si-allyl, Si-Si, čtyřčlenný kruh) je jednou z cest k syntéze látek, které by při přípravě jinými syntetickými postupy podléhaly strukturním přeměnám. Syntézou σ - π konjugovaných oligo-(silylen)vinyleňů se zabývali Kawai a spol.^{33,34} Reaktivita substrátů klesala s rostoucí velikostí substituentů na atomu křemíku. Intermolekulární metatézi (např.: dimethyldivinylsilanu) lze získávat sloučeniny polymerní.

4. Cis-trans izomerie

V předchozích kapitolách bylo zmíněno, že u chemických látek, obzvláště s biologickým účinkem, je nutné k vyvolání předpokládaného efektu zachovat nejen požadovanou konstituci látky, ale i její konfiguraci. Jelikož při syntéze nenasyčených látek může dojít ke vzniku dvou stereoizomerů, *E* a *Z*, a jejich následné dělení je velmi náročné a nákladné, je věnováno velké úsilí nalezení stereoselektivních syntetických postupů. V případě použití katalyzátorů při syntéze je do jisté míry možno jejich stereoselektivitu „nastavit“ na požadovanou úroveň (poměr *E/Z*) například řízenou otravou katalyzátoru, přidávkem promotoru³⁵ nebo jinou vhodnou úpravou reakčních a aktivačních podmínek (molární poměr reaktantů, teplota a doba aktivace).

Heterogenní katalyzátory se v závislosti na užití aktivní složce podstatně liší svou stereoselektivitou³⁶. Stereoselektivita katalyzátoru $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3$ je ve srovnání s katalyzátorem $\text{MoO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ výrazně vyšší.

V reakčním systému dochází taktéž k *E/Z* izomerizaci. Ta probíhá dvěma způsoby. Jednou je nemetatecká izomerizace přechodového stavu na aniontových místech povrchu katalyzátoru, druhou možností je izomerizace způsobená metatezí.

Byly zkoumány reakční rychlosti homometatéze izomerů but-2-enu³⁶. Na katalyzátoru s aktivní složkou Re_2O_7 byla rychlost přeměny izomeru *E*→*Z* výrazně vyšší než reakce

opačným směrem a probíhala výlučně metatezí, nemetatecký mechanismus se neuplatňoval. Při kometatézi but-1-enu a (*E*)- i (*Z*)-but-2-enu vznikal preferenčně (*E*)-pent-2-en. Nižší reaktivita (*Z*)-but-2-enu při kometatézi s but-1-enem koresponduje s výsledky metatecké stereoizomerizace (*Z*)-but-2-enu, při níž byla rychlost přeměny (*Z*)-but-2-enu na (*E*)-but-2-en nižší než přeměna (*E*)-but-2-enu na (*Z*)-but-2-en.

Moloy³⁵ potvrdil, že při etenolýze norbornenu při použití katalytického systému $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-(Me)}_4\text{Sn}$ vzniká přednostně (*Z*)-izomer 1,3-divinylcyklopentanu, zatímco při použití katalyzátoru bez promotoru vzniká převážně (*E*)-izomer. Koordinace promotoru s účinnou složkou vedla ke vzniku jiného typu aktivních míst, k vyšší stereoselektivité katalyzátoru a k tvorbě (*Z*)-izomeru.

Feromony hmyzu^{24,37-39}, (*Z*)-trikos-9-en, nebo (*Z*)-heptakos-13-en, (*Z*)-nonakos-13-en, (*Z*)-nonakos-14-en nebo 7,8-epoxy-2-methylotadekan³⁸, byly syntetizovány kometatézí odpovídajících olefinů (např. (*Z*)-trikos-9-en kometatézí dec-1-enu a pentadec-1-enu). Stereoselektivita použitých homogenních i heterogenních katalyzátorů však není diskutována. Poměr *cis-trans* izomerů v produktu lze ovlivnit několika způsoby. V práci Basaniaka⁴⁰ se uvádí, že v reakcích substituovaných α -olefinů je možno měnit poměr stereoizomerů produktů v přítomnosti homogenních katalyzátorů na bázi W odstraňováním vzniklého ethenu z reakční směsi ve prospěch izomeru *E*, což zároveň vede ke zvýšení konverze. Při kometatézi interního olefinu s ω -alkenylacetátem bylo zjištěno, že velký vliv na poměr stereoizomerů produktu má poměr stereoizomerů vstupního olefinu s vnitřní dvojnou vazbou, stejně jako vzájemný poměr reaktantů. Velikost molekuly olefinu neměla na výsledný poměr stereoizomerů produktu podstatný vliv.

Při použití heterogenních katalyzátorů s účinnou složkou obsahující atom Mo nebo Re vzniká podle Finkelšteina a spol.¹⁴ prakticky nezávisle na struktuře olefinů a teplotě směs izomerů s poměrem *E/Z* ~ 4. Odlišných výsledků bylo dosaženo při kometatézi α -olefinů a (*Z*)-cykloalkenů. Zde se poměr *E/Z* měnil v rozmezí 0,4–4,2 v závislosti na konverzi, přičemž se vzrůstající konverzí tento poměr rostl. S klesající velikostí nenasyčeného cyklu byla preferována tvorba *Z*-izomeru.

Z literárních pramenů je zřejmé, že poměr *E/Z* lze do jisté míry nastavovat modifikací katalyzátoru. Stereoselektivita heterogenních katalyzátorů bude jistě předmětem dalšího studia.

5. Závěr

Z výsledků studia literatury plyne, že metatéze je vhodným nástrojem syntézy chemických specialit. Zejména metatéze látek s funkčními skupinami naznačuje moderní cestu k syntéze celé řady cenných chemických látek. Vhodnými promotory lze zvýšit aktivitu heterogenních katalyzátorů a za mírných reakčních podmínek připravovat látky s vysokou selektivitou (nad 90 %) i konverzí.

LITERATURA

1. Bradshaw C. P. L., Howman E. J., Turner L.: *J. Catal.* **7**, 269 (1967).
2. Calderon N.: *Chem. Eng. News* **45**, 51 (1967).
3. Mol J. C.: *Catal. Today* **51**, 289 (1999).
4. Cooper N. J., Green M. L. H.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 761.
5. McCoy J., Farona M.: *J. Mol. Catal.* **66**, 51 (1991).
6. Rouhi A.: *Chem. Eng. News* **80**, 29 (2002).
7. Mol J. C.: *J. Mol. Catal.* **15**, 35 (1982).
8. Streck R.: *J. Mol. Catal.* **76**, 169 (1992).
9. Ryashentseva M. A.: *Petroleum Chem.* **41**, 14 (2001).
10. Mathew T. M., Plessis J. A. K., Prinsloo J. J.: *J. Mol. Catal., A: Chem.* **148**, 157 (1999).
11. Buffon R., Jannini M. J. D. M., Abras A., Mol J. C., Wit A. M., Kellendonk F. J. A.: *J. Mol. Catal., A: Chem.* **149**, 275 (1999).
12. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7. vydání, http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/articles/a13_227/sect2-fs.html, staženo 19.11.2003.
13. Warwel S., Winkel Müller W.: *J. Mol. Catal.* **28**, 247 (1985).
14. Finkelštein E. S., Bykov V. I., Portnych E. B.: *J. Mol. Catal.* **76**, 33 (1992).
15. Woerlee E. F. G., Bosma R. H. A., Eijl J. M. M., Mol J. C.: *Appl. Catal.* **10**, 219 (1984).
16. Bosma R. H. A., Aardweg F., Mol J. C.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 1132.
17. Ellison A., Coverdale A. K., Dearing P. F.: *Appl. Catal.* **8**, 109 (1983).
18. Mol J. C.: *J. Mol. Catal.* **90**, 185 (1994).
19. McMurry J. E., Fleming M. P., Kees K. L., Krepski L. R.: *J. Org. Chem.* **43**, 3255 (1978).
20. Krapcho A. P., Lovey A. J.: *Tetrahedron Lett.* **12**, 957 (1973).
21. Plugge M. F. C., Mol J. C.: *Synlett* **1991**, 507.
22. Hamasaki R., Funakoshi S., Misaki T., Tanabe Y.: *Tetrahedron* **56**, 7423 (2000).
23. Warwel S., Brüse F., Demes C., Kunz M., Rüsche M.: *Chemosphere* **43**, 39 (2001).
24. Kukula P., Klusoň P., Červený L.: *Chem. Listy* **91**, 342 (1997).
25. Mol J. C.: *Chemtech* **1983**, 250.
26. Mol J. C., Woerlee E. F. G.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 330.
27. Levisalles J., Rudler H., Villemin D.: *J. Organomet. Chem.* **164**, 251 (1979).
28. Mol J. C.: *J. Mol. Catal.* **65**, 145 (1991).
29. Warwel S., Döring N., Biermanns F. J.: *Fat Sci. Technol.* **89**, 335 (1987).
30. Nakamura R., Echigoya E.: *Chem. Lett.* **1977**, 1227.
31. Fridman R. A., Liberov L. G., Nosakova S. M., Smirnova R. M., Baschirov A. N.: *Izv. AN SSSR, Ser. Khim.* **28**, 2816 (1979).
32. Finkelštein E. S., Ušakov N. V., Portnych E. B.: *J. Mol. Catal.* **76**, 133 (1992).
33. Kawai T., Shiga K., Suzuki T., Iyoda T.: *J. Mol. Catal., A: Chem.* **140**, 287 (1999).
34. Kawai T., Shiga K., Iyoda T.: *J. Mol. Catal., A: Chem.* **160**, 173 (2000).
35. Moloy K. G.: *J. Mol. Catal.* **91**, 291 (1994).
36. Engelhardt J., Ysinka I.: *J. Mol. Catal.* **28**, 169 (1985).
37. Rossi R.: *Synthesis* **1977**, 817.
38. Küpper F. W., Streck R.: *Z. Naturforsch., B* **31**, 1256 (1976).
39. Tsuboi S., Masuda T., Takeda A.: *J. Org. Chem.* **47**, 4478 (1982).
40. Basaniak D. S.: *J. Mol. Catal.* **28**, 107 (1985).

J. Kopečný, L. Kurc, and L. Červený (*Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **Metathesis Utilization in Synthesis of Fine Chemicals**

The review deals with utilization of metathesis of both substituted and unsubstituted olefins in organic synthesis, which can lead to a wide scale of fine chemicals. Active heterogeneous catalysts offer the opportunity of using metathesis on industrial scale.

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH A JEJÍ POUŽITÍ

EVA ZATLOUKALOVÁ

Ústav patologické fyziologie 1. LF UK Praha,
U nemocnice 5, 128 53 Praha 2
ezatl@lf1.cuni.cz

Došlo 11.2.2003, přepracováno 5.12.03, přijato 3.2.04.

Klíčová slova: afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, proteiny, histidinová značka, kobaltnaté ionty

Obsah

1. Úvod
2. Vazebná místa bílkovin
3. Kovové ionty
4. Chelatující ligandy
5. Vliv chromatografických podmínek
6. Aplikace a výhody afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech

1. Úvod

Afinitní chromatografie je metoda, při níž afinitní ligand (afinant) vázaný na matici specificky a reversibilně reaguje s určitým biopolymerem, respektive specifickým místem tohoto biopolymeru.

Afinitní sorbenty mohou obsahovat buď afinanty biospecifické, tj. takové, u nichž je interakce založena na biologické aktivitě bílkoviny (protilátky, inhibitory, receptory, lektiny), nebo ligandy skupinově specifické, které interagují s určitým seskupením aminokyselin na povrchu bílkoviny (hydrofobní sorbenty, barviva, imobilizované ionty kovů). Na vazbě biopolymeru k imobilizovanému afinitnímu ligandu se podílejí různé molekulární síly a interakce (iontové síly, hydrofobní interakce, vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, Londonovy dispersní síly, interakce dipólů). Sorpce zpravidla zahrnuje několik typů interakcí¹.

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech je separační metoda založená na specifických interakcích biopolymerů v roztoku s ionty kovů, které jsou vázány na stacionární fázi. Podmínkou separace je, aby biopolymer, nejčastěji bílkovina, byl schopen tvořit s iontem dostatečně stabilní komplex. Účinnost metody je srovnatelná s biospecifickými sorbenty³.

Původně se tato metoda nazývala afinitní chromatografie na kovových chelátech. Vzhledem k tomu, že nejde jen o cheláty, byl název v roce 1983 změněn na afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, pro který se

vžila zkratka IMAC² (Immobilized metal ion affinity chromatography).

Kovové ionty jsou na nerozpuštěné matici imobilizovány chelatujícími ligandy. Separovaný biopolymer se pak k iontu kovu váže přes vhodnou reaktivní skupinu. Kovové ionty jako akceptory elektronů interagují se skupinami, které elektrony mohou naopak poskytnout. Takovými donory elektronů jsou v biomolekulách atomy dusíku, síry a kyslíku, případně fosforu. K vazbě bílkovin dochází vytěsněním některých slabě vázaných molekul ligandů (vody) z komplexů a jejich nahrazením molekulami bílkovin.

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech (IMAC-Co²⁺) se používá pro separaci a charakterizaci biologických makromolekul. Jelikož tak lze úspěšně separovat proteiny značené histidinem, má IMAC-Co²⁺ význam i pro izolaci rekombinantních proteinů.

2. Vazebná místa bílkovin

Bílkoviny se na kov vážou přes povrchové aminokyseliny jako histidin, cystein, tryptofan, kyselina glutamová, kyselina asparagová, tyrosin, lysin, arginin, případně fosfatové skupiny fosfoproteinů⁴. U metaloproteinů je možná i interakce přes jejich vazebné místo pro kov. Skupiny na povrchu bílkoviny interagují s různými ionty kovů kvantitativně i kvalitativně odlišně.

Dvojvalné ionty jako Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ a Co²⁺ preferují vazbu k dusíku. Vazbu bílkovin na IMAC-Co²⁺ tedy zprostředkují převážně imidazolové skupiny histidinů přítomných na povrchu proteinu. Skutečnost, že histidinu je v průměrné molekule bílkovin relativně málo (jen asi 2 %, z toho jen část na povrchu), umožňuje bílkoviny dělit dle počtu histidinových zbytků přítomných na povrchu⁵.

V roce 1989 Sulkowski definoval minimální vazebné požadavky pro imobilizované kovové ionty. Podle této definice imobilizované Cu²⁺ ionty mohou vázat protein obsahující alespoň jeden povrchový histidin. Ni²⁺ a Zn²⁺ ionty potřebují pro vazbu proteinu dva sousední histidiny a imobilizované Co²⁺ ionty vyžadují přítomnost alespoň dvou histidinů, které jsou na povrchu bílkoviny blízko sebe⁶. Asociační konstanta komplexu Cu²⁺-protein bude tedy v průměru vyšší než u komplexu Co²⁺-protein⁷. Díky tomu je IMAC-Co²⁺ i účinným nástrojem pro studium topografie proteinů⁸.

Pro izolaci bílkovin metodami genetického inženýrství se používá tzv. histidinová značka (His-tag), kterou lze do molekuly přidat (obvykle na její N-konec).

3. Kovové ionty

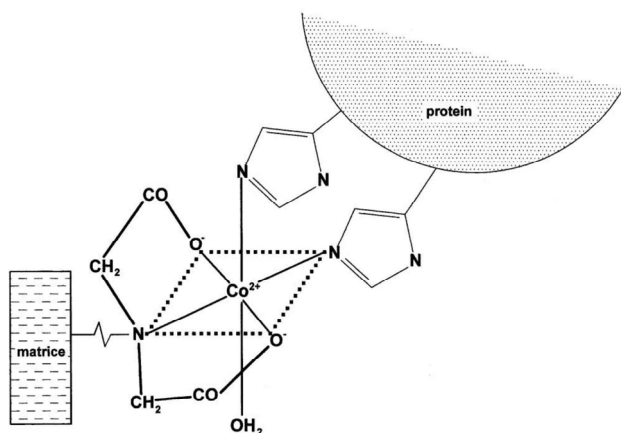
Vazebné vlastnosti komplexu imobilizovaný kov – protein se liší podle typu použitého kovu. Kovové ionty můžeme rozdělit podle míry jejich polarizovatelnosti na

tvrdé a měkké. Povaha kovových iontů, jakožto tvrdých či měkkých Lewisových kyselin, určuje jejich afinitu k nukleofilním skupinám biopolymerů. Ionty kovů s vlastnostmi tvrdých Lewisových kyselin (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} a In^{3+}) mají nejvyšší afinitu ke kyslíku, tvrdé Lewisově bázi. Ionty kovů (Cd^{2+} , Hg^{2+} a Tl^{3+}), které se chovají jako měkké Lewisovy kyseliny a jsou polarizovatelné snáze než tvrdé ionty kovů, preferují interakci se sírou, jako měkkou Lewisovu bázi. Ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} patří ke kovům středního typu a přednostně interagují s dusíkem, ale v menší míře i s kyslíkem a sírou⁹. Vazby mezi biopolymery a tvrdými ionty kovů mají iontový charakter, vazby s měkkými ionty kovů mají především kovalentní povahu a se středními ionty kovů se tvoří hlavně vazby koordinační. Vedle těchto typů vazeb se na interakci podílejí i slabší, ale často početnější, coulombické a hydrofobní interakce¹⁰.

4. Chelatující ligandy

Afinita komplexu kov – protein je také značně ovlivněna typem chelatujícího ligandu. Imobilizace kovu na nosič prostřednictvím vhodného chelatujícího ligandu umožňuje ponechat kovovému iontu právě takový počet stupňů volnosti, aby mohl definovaně vázat molekulu proteinu. Pokud bude kov na nosič imobilizován příliš silně, nebudou kovovému iontu dost afinity pro vazbu proteinu a interakce kov – protein bude nedostačující. Naopak, bude-li kov vázán k nosiči příliš slabě, mohl by jeden kovový iont vázat několik molekul proteinů a tvořit agregáty se změněnými vlastnostmi. Může se též uvolnit kovový iont z nosiče do roztoku³.

Seřadíme-li chelatující ligandy podle vzrůstajícího počtu vazeb, kterými k sobě poutají kovový iont, zjistíme, že zároveň klesá počet vazeb, kterými může kovový iont poutat molekulu proteinu. Pro kovy středního typu, tedy i pro Co^{2+} , je nejpoužívanějším chelatujícím ligandem iminodiacetátová kyselina (IDA). Na obr. 1 je schématická vazba matrice,



Obr. 1. Domnělá struktura hexakoordinovaného kobaltnatého komplexu

chelatujícího ligandu s kobaltným iontem a adsorbovaného proteinu. Ve schématu je ponechána slabě navázaná molekula vody.

5. Vliv chromatografických podmínek

Adsorpci bílkovin ovlivňuje nejen typ kovu a chelatujícího ligandu, vlastnosti matrice a raménka (distanční spojky, spaceru), ale i další faktory, jako množství kovu imobilizovaného k nosiči, složení a pH mobilní fáze, koncentrace solí, případně přítomnost různých aditiv.

Matrice pro IMAC musí splňovat stejné podmínky jako pro ostatní chromatografické metody. Ze studovaných materiálů se nejlépe osvědčují agarosové gely². Lepší sterickou přístupností molekul bílkovin k imobilizovaným kovovým iontům umožňuje použití raménka, které tvoří můstek mezi matricí a chelatujícím ligandem.

Chování sorbentů před a po imobilizaci kovových iontů se může výrazně lišit. Vliv imobilizace kovového iontu na afinitu bílkovin k danému sorbentu nelze předem předpovědět.

Vlastnosti chromatografického nosiče ovlivňuje i množství navázaných kovových iontů. Se vzrůstajícím množstvím imobilizovaného kovu adsorpce bílkovin i selektivita vazby roste^{10,11}.

Pro nasycení sorbentu kovem je nutné ze sloupce slabě navázané kovové ionty odstranit promýváním. Ionty kovu, které zůstanou vázány na sorbentu po promytí, pak tvoří prakticky uniformní soubor adsorpčních míst. Hrozí-li nebezpečí uvolňování kovu do mobilní fáze, je vhodné zařadit sloupec se sorbentem bez kovu, který uvolněný kovový iont zachytí. V některých případech se pro tento účel používá i sloupec chelatujícího sorbentu, který s danými kovovými ionty tvoří pevnější komplex než použitý sorbent. Výhodné je také použití iontů, které jsou barevné nebo tvoří zbarvené komplexy. Takové kovy je možné snadno detegovat v eluátu¹².

Průběh chromatografie dále závisí na vlastnostech mobilní fáze. Eluční síla mobilní fáze je ovlivněna jejím složením. Pro IMAC- Co^{2+} platí, že eluční síla roste v řadě acetát < fosfát < chlorid¹³.

Adsorpce proteinů obecně roste s klesajícím pH a s klesající iontovou silou. U IMAC naopak vyšší iontová síla potlačuje nespecifický ionexový charakter nosiče a adsorpce proteinů roste s iontovou silou a s pH (cit.^{14,15}). Vliv pH na adsorpci proteinů lze vysvětlit tím, že na IMAC- Co^{2+} se proteiny váží hlavně přes své histidinové zbytky. Ty jsou při nízkém pH protonizovány a vzájemně se s kovovými ionty odpuzují¹⁰.

Faktory ovlivňující retenci biopolymerů ovlivňují také jejich uvolnění. Eluce může být nespecifická, např. snížením koncentrace solí, změnou (obvykle snížením) pH pufru, zvýšením teploty nebo přidávkem detergentů či denaturačních činidel (dodecylsírán sodný, Tween 80, močovina)¹⁶, nebo specifická přidávkem látek soutěžících o vazebná místa (pufry obsahující imidazol, histidin či histamin), které molekuly biopolymeru vytěšňují. Také lze použít pufr

Tabulka I
Aplikace afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech

Aplikace	Biopolymer	Experimentální podmínky / Vazebné vlastnosti	Lit.
Separace bílkovin	interferon β	vazba přes thiolovou skupinu Cys na pozici číslo 17	17
	transferin	při izolaci ze séra či plazmy je transferin eluován v druhém vrcholu (po imunoglobulinu); afinita k Co^{2+} klesá s rostoucí saturací transferinu železem	18, 36
	albumin	IDA- Co^{2+} navázána na 1,4-butanediol diglycidyl Sepharosu 6B nebo na Sephacryl S-300	18
	imunoglobulin (Ig)	dtto; modifikace histidinových zbytků v Ig diethyl-dikarbonátem způsobuje porušení vazebných vlastností	18
	perforin	izolace v přítomnosti 1 M-NaCl a 10 % betainu; IMAC- Co^{2+} na rozdíl od IMAC- Cu^{2+} neváže současně i granzymy	19
	jednořetězcové fragmenty monoklonální protilátky proti <i>terc</i> -butylester- <i>S</i> -(2,4-dinitrofenyl)glutathionu	izolace v přítomnosti 8 M močoviny; po skončení IMAC- Co^{2+} renaturace <i>in vitro</i> gelovou permeační chromatografií	20
	přenašeč γ -aminomáselné kyseliny	izolace v přítomnosti 1% dodecylmaltosidu a inhibitorů proteas; k eluovanému proteinu přidána 0,5 mM-EDTA minimalizující proteolýzu	21
	granzym B (značený histidinem)	izolace ve formě neaktivního zymogenu; odstranění nespecificky navázaných proteinů 0,1 M-NaCl, eluce 0,5 M imidazolem; po IMAC- Co^{2+} aktivace enterokinasou	22
	Vir B4 ATPasa (značená histidinem)	izolace v přítomnosti 2 % modifikovaného Eaglova média (Dulbecco), k navázání proteinu použita vsádková metoda	23
	„myoglobin – like“ kyslíkový přenašeč (značený histidinem)	izolace při nízké (0,5 mM imidazol) i vysoké (4 M-KCl) iontové síle, FPLC uspořádání	24
	laktosový (Lac) represor	separace Lac represoru jako hlavního kontaminantu při izolaci histidinem značených proteinů z buněk nesoucích <i>lacI^q</i> gen; izolace na nosiči TALON, vymytí pufrů o pH 5 a 6 a pufrům s 15 mM imidazolem	25
	lecitin:cholesterolacyltransferasa (LCAT) (značená histidinem)	k navázání proteinu použita vsádková metoda, eluce pufrům s 50 mM imidazolem a 10% glycerolem	26
	transkripční faktor HIF 2 α (faktor indukovaný hypoxií)	vazba HIF 2 α na Co^{2+} přes vysoce konzervovanou degrační doménu; izolace v přítomnosti 0,5% Tritonu X-100	27
	selenoprotein P	FPLC uspořádání; ze studovaných kovových iontů (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} a Cd^{2+}) poskytuje IMAC- Co^{2+} nejvyšší selektivitu	28
	laktátdehydrogenasa (LDH)	studium vazebných vlastností peptidů vzniklých štěpením LDH bromcyanem – za vazbu je odpovědný 32. aminokyselinový zbytek na N-konci LDH; izolace v přítomnosti 9 mM imidazolu, eluce 75 mM imidazolem	29
	N-terminální ektodoména receptoru pro TSH (tyreotropní hormon) (značená histidinem)	navázání receptoru vsádkovou metodou; izolace v přítomnosti 5 mM imidazolu, eluce gradientem imidazolu (10–500 mM)	30

Tabulka I – pokračování

Aplikace	Biopolymer	Experimentální podmínky / Vazebné vlastnosti	Lit.
	β -glukuronidasa (značená histidinem)	IMAC- Co^{2+} poskytuje vyšší selektivitu než IMAC na jiných kovových iontech (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+})	31
	ATPasa přenášející měď	vazba přes Cys; izolace ve formě fúzního proteinu s glutathion-S- transferasou	32
Imunoafinitní nosiče	antigeny	izolace proteinů pomocí protilátek orientovaně navázaných na imobilizovaných kobaltitých iontech (protilátky se nejprve reverzibilně naváží na Co^{2+} ionty, Co^{2+} se pak oxidují H_2O_2 na Co^{3+} , čímž se vazba protilátek stane ireverzibilní)	33
	glukosaoxidasa	dtto; metoda využita i k vícevrstvé imobilizaci enzymu přes protilátku či její fragmenty F(ab)_2 ; takto imobilizovaný enzym je stabilnější vůči denaturačním podmínkám (vysoká iontová síla, teplota, organická rozpouštědla)	34
Negativní adsorpce	jednotlivé isoformy enzymů, konkurenční proteiny	požadovaný protein se neváže na nosič a protéká kolonou, zatímco konkurenční látky jsou zadržovány	7
Diagnostické účely	PSMA (prostate-specific membrane antigen)	izolace a stanovení markeru pro karcinom prostaty; pryskyřice TALON s navázanými Co^{2+} ionty byla vsádkově inkubována s buněčným lyzátem, eluce gradientem (10–200mM) imidazolu	35
Separace DNA a oligonukleotidů	DNA, oligonukleotidy	vazba přes histidinové zbytky vnesené genovým inženýrstvím	7
Studium struktury a funkce metaloproteinů	apokarboxypeptidasa A	enzym deaktivovaný chelatujícími činidly lze reaktivovat průtokem přes tandemové kolony IDA- Zn^{2+} , IDA- Co^{2+} a IDA- Ni^{2+}	10
Studium topografie bílkovin	modelové proteiny vybrané na základě různého chromatografického chování (thioredoxin, ubikvitin, kalmodulin, lysozym, cytochrom c, myoglobin)	stanovení distribuce histidinových molekul, jejich přístupnost koordinaci, počet, zda jsou sousední či vzdálené a vliv okolních aminokyselin	8
	receptor pro estradiol (Er)	zjištěna vazebná místa pro Co^{2+} ; interakce receptoru s imobilizovanými Co^{2+} ionty inhibuje vazbu Er k estradiolu, možnost podobných vlastností i u receptorů pro ostatní steroidní hormony	37
Katalýza	enzymy	kolona slouží jako reaktor pro katalytické reakce	3
Imobilizace biopolymerů	enzymy (např. alkalická fosfatasa, maltosadehydrogenasa, laktátdehydrogenasa); citlivé bílkoviny, které v roztoku snadno denaturují	kovalentní vazba na IDA- Co^{2+} (IDA- Cu^{2+} , IDA- Zn^{2+}), zvýšení stability proteinů, možnost jejich opětovného uvolnění (pomocí EDTA)	38

s kovovým iontem, pro který má bílkovina vyšší afinitu, než pro kov imobilizovaný¹⁰.

6. Aplikace a výhody afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech

Využití metody je shrnuto v tabulce I.

Parametry IMAC dovolují různé typy jejího uspořádání, počínaje nízkotlakou chromatografií, přes HPLC, až po uspořádání multimodální či tandemové.

Sorbenty pro IMAC-Co²⁺ svými vlastnostmi dovolují použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, která může v jednom stupni vyčistit bílkoviny až desettisíckrát. Metoda proto bývá označována jako vysoce selektivní (HS-IMAC, cit.¹⁰).

IMAC-Co²⁺ je metodou, při níž má vysoká iontová síla příznivý vliv na pevnost sorpce, a proto může být výhodně kombinována s metodami jako ionexová, hydrofobní nebo thiofilní chromatografie. Pro tyto doplňující se metody je vžitě označení multimodální chromatografie¹⁰.

Při tandemovém uspořádání jsou kolony obsahující různé sorbenty řazeny do série a jsou používány pro současnou separaci více bílkovin. Další možností je využití kaskádových kolon, kdy po eluci z jedné kolony následuje sorpce na jiném nosiči, založená na odlišném sorpčním principu. Vzorek protéká postupně více kolonami, které se liší např. typem kovového iontu či chelatajícího ligandu³.

IMAC je charakteristická vysokou kapacitou. Chelatající činidla jsou v sorbentu přítomna v koncentraci 10 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ gelu. Chelatající činidla tvoří s kovovými ionty stechiometrický komplex (1:1). Teoreticky může 1 ml gelu vázat 1 až 10 g bílkoviny o molekulové hmotnosti 100 kDa. Prakticky lze využít 10–20 % této kapacity, což odpovídá maximálně 200 mg bílkoviny na 1 ml gelu.

Další výhodou IMAC-Co²⁺ je vysoká selektivita frakcionace, která je určována pouze chelatajícím ligandem a kovem. Nezanedbatelný je i stabilizační efekt používaného prostředí (vysoká iontová síla, přítomnost kovových iontů) na molekuly bílkovin. Vzhledem k tomu, že kovem neobsazené chelatající skupiny nosiče váží kationty přítomné v roztoku, nerostou v IMAC kolonách mikroorganismy a eluované roztoky jsou zpravidla sterilní³.

Ionty kovů mohou být ze sloupce snadno odstraněny, např. roztokem EDTA. Gel může být proto regenerován až několikrát během několika let bez ztráty chelatajících schopností. Po odstranění předchozího kovu lze na tentýž nosič navázat jiný kovový ion.

Problematika tohoto výzkumu je podporována MŠMT ČR (grant MSM 111100003).

LITERATURA

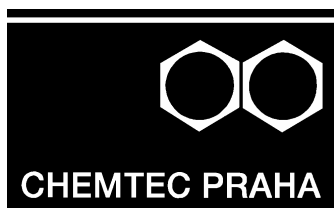
1. Turková J.: *Bioaffinity Chromatography*. Elsevier, Amsterdam 1993.
2. Porath J., Belew M.: *Affinity Chromatography and Biological Recognition*. Academic Press, New York 1983.
3. Kučerová Z.: Chem. Listy 85, 526 (1991).
4. Hemdan E. S., Porath J.: J. Chromatogr. 323, 255 (1985).
5. Klapper M. H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 1018 (1977).
6. Sulkowski E.: BioEssays 10, 170 (1989).
7. Chaga G. S.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 313 (2001).
8. Hemdan E. S., Zhao Y. J., Sulkowski E., Porath J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1811 (1989).
9. Pearson R. G.: J. Am. Chem. Soc. 85, 3533 (1963).
10. Gooding K. M., El Rassi Z., Horváth C.: *HPLC of Biological Macromolecules* (Gooding K. M., Regnier F. E., ed.), kap 6. Marcel Dekker, New York 2002.
11. Kagedal L.: *Protein Purification* (Janson J. C., Ryden L., eds.), str. 227 – 251. VCH, New York 1989.
12. Scopes R. K.: *Protein Purification. Principles and Practice*. Springer-Verlag, New York 1994.
13. El Rassi Z., Bacolod M. D.: J. Chromatogr. 512, (1990).
14. El Rassi Z., Horváth C.: J. Chromatogr. 359, 241 (1986).
15. Kato Y., Nakamura K., Hashimoto T.: J. Chromatogr. 354, 511 (1986).
16. Porath J., Olin B.: Biochemistry 22, 1621 (1983).
17. Sulkowski E., Vastola K., Oleszek D., von Muenchhausen W.: *Affinity Chromatography and Related Techniques*. Proc. 4th International Symposium, Veldhoven, 22–26 June 1981 (Gribnau T.C.J., Visser J. and Nivard R.J.F., eds.), str. 313. Elsevier, New York 1982.
18. Al-Mashikhi S. A., Nakai S.: J. Dairy Sci. 71, 1756 (1988).
19. Winkler U., Pickett T. M., Hudig D.: J. Immunol. Methods 191, 11 (1996).
20. Ren X., Gao S., You D., Huang H., Liu Z., Mu Y., Liu J., Zhang Y., Yan G., Luo G., Yang T., Shen J.: Biochem. J. 359, 369 (2001).
21. Li X., Villa A., Gownley C., Kim M. J., Song J., Auer M., Wang D.: FEBS Lett. 494, 165 (2001).
22. Sun J., Bird C. H., Buzza M. S., McKee K. E., Whistock J. C., Bird P. I.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 251 (1999).
23. Dang T. A., Zhou X. R., Graf B., Christie P. J.: Mol. Microbiol. 32, 1239 (1999).
24. Piatibratov M., Hou S., Brooun A., Yang J., Chen H., Alam M.: Biochim. Biophys. Acta 1524, 149 (2000).
25. Owens R. M., Grant A., Davies N., O'Connor C. D.: Protein Expression Purif. 21, 352 (2001).
26. Chisholm J. W., Gebre A. K., Parks S. J.: J. Lipid Res. 40, 1512 (1999).
27. Yuan Y., Beitner-Johnson D., Millhorn D. E.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 288, 849 (2001).
28. Sidenius U., Farver O., Jons O., Gammelgaard B.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. 735, 85 (1999).
29. Chaga G., Hopp J., Nelson P.: Biotechnol. Appl. Biochem. 29, 19 (1999).
30. Cornelis S., Uttenweiler-Joseph S., Panneels V., Vassart G., Costagliola S.: Biochemistry 40, 9860 (2001).
31. Zhang C. M., Reslewic S. A., Glatz C. E.: Biotechnol.

- Bioeng. 68, 52 (2000).
32. DiDonato M., Narindrasorasak S., Forbes J. R., Cox D. W., Sarkar B.: *J. Biol. Chem.* 272, 33279 (1997).
 33. Hale J. E.: *Anal. Biochem.* 231, 46 (1995).
 34. Jan U., Husain Q., Saleemuddin M.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34, 13 (2001).
 35. Xiao Z., Jiang X., Beckett M. L., Wright G. L. Jr.: *Protein Expression Purif.* 19, 12 (2000).
 36. Sulkowski E.: *Frontiers in Bioprocessing* (Sikdar S. K., Bier M., Todd P., ed.). CRC Press, Boca Raton 1990.
 37. Medici N., Minucci S., Nigro V., Abbondanza C., Armetta I., Molinari A. M., Puca G. A.: *Biochemistry* 28, 212 (1989).
 38. Coulet P. R., Carlsson J., Porath J.: *Biotechnol. Bioeng.* 23, 663 (1981).

E. Zatloukalová (*Institute of Pathophysiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague*): **Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography and Its Application**

Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) is a group-specific affinity separation technique,

which is based on specific interactions between molecules in solution and metal ions fixed to a solid support. Metal ions, being electron acceptors, react with ligands and electron-donor groups of biomolecules. In biomolecules, electron donors are surface-exposed atoms of nitrogen, sulfur and oxygen, potentially also phosphorus. As biomolecules (e.g. proteins) are bound to metal chelates, weakly bound ligands (e.g. water) are displaced from the metal chelate complex. Elution of the target proteins is achieved mostly by protonation (lowering pH) or by addition of a competing agent (e.g. imidazole). The IMAC with Co^{2+} relies on the formation of weak coordination bonds between Co^{2+} ions and basic groups of proteins, in particular histidine residues. The use of the IMAC with Co^{2+} shows distinct advantages such as high loading, mild elution conditions, simple regeneration and low cost. The technique is therefore used for various purposes, including preparative and analytical purification of proteins and study of their surface topography. Efficient purification of recombinant proteins with engineered histidine affinity tags attached to the N- or C- terminus is another important application of this method.



11. ročník mezinárodního veletrhu chemie a plastů

6. – 8. října 2004
Areál Výstaviště Praha

11. ročník veletrhu CHEMTEC PRAHA se bude tradičně konat v prostorách Průmyslového paláce na pražském Výstavišti. Souběžně ve stejném termínu proběhne ve střední hale Průmyslového paláce mezinárodní veletrh čistící a úklidové techniky, čistících technologií, chemie, pomůcek a služeb CLEANTEC 2004. V levém křídle Průmyslového paláce se představí zástupci chemického průmyslu z ČR včetně zahraničních vystavovatelů, v pravém křídle se budou prezentovat firmy zabývající se dovozem a výrobou laboratorní techniky, laboratorního nábytku, zpracování plastů, životního a pracovního prostředí, odborné spolky. Novinkou letošního ročníku bude stánek *Chemická informatika*, jehož cílem je ucelená prezentace veškeré dostupné literatury v oboru, včetně její elektronické podoby. Na stánku bude probíhat živá prezentace databází s chemickou tematikou dislokovaných po celém světě a v návaznosti na tuto prezentaci bude na veletrhu představen nově otevíraný studijní obor na VŠCHT *Informatika a chemie*. Současně v rámci odborných seminářů proběhne série přednášek na téma: Informace – nejcennější chemický produkt.

CHEMTEC PRAHA vstupuje do druhé desítky své existence s cílem přispět k prezentaci chemie jako moderního oboru, který pozitivním způsobem ovlivňuje kvalitu našeho života. Stal se místem setkání předních manažerů, odborníků a specialistů z odvětví chemického průmyslu a chemie. O jeho významu svědčí každoroční záštita Ministerstva průmyslu a obchodu ČR a přítomnost jeho předních představitelů na této akci.

Nedílnou součástí veletrhu je doprovodný program odborných seminářů, které pořádá Svaz chemického průmyslu. Letošní témata odráží vstup České republiky do EU:

- Nová chemická politika v EU po jejím rozšíření. Vývoj REACH a jeho důsledky pro chemickou legislativu v ČR, postoje Ministerstva životního prostředí ČR k tomuto vývoji.
- Změny předpisů regulujících zahraniční obchod i obchod mezi členskými zeměmi EU po jejím rozšíření. Panelová diskuse k otázkám souvisejícím s legislativou obchodu chemickými látkami podléhajícími zvláštnímu režimu, postoje Ministerstva průmyslu a obchodu k této problematice. Regulace obchodu chemickými látkami podléhajícími zvláštnímu režimu, postoje Ministerstva zdravotnictví k této problematice.

Organizátorem akce je společnost INCHEBA PRAHA za odborné garance Svazu chemického průmyslu. Bližší informace o veletrhu jsou uvedeny na stránkách www.chemtecp Praha.cz.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

POSTUP IZOTACHOFORÉTIČKÉHO STANOVENÍ KYSELINY THIODIGLYKOLOVÉ V MOČI ZA ODSOLENÍ A ÚPRAVY pH ANALYZOVANÉHO VZORKU

JAROMÍRA CHÝLKOVÁ^a a RENÁTA FADRŇÁ^b

^aÚstav ochrany životního prostředí, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Doubravice 41, 533 53 Pardubice; ^bÚstav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8 fadrna@jh-inst.cas.cz

Došlo 3.2.03, přepracováno 1.10.03, přijato 21.10.03.

Klíčová slova: kyselina thiodiglykolová, TDGA, izotachoforéza, vinylchlorid, odsolení vzorku moči

Úvod

Mezi škodlivé látky zatěžující pracovní prostředí patří vinylchlorid (VC), monomer při výrobě polyvinylchloridu.

Akutní intoxikace VC se projevuje narkotickými účinky, při nichž je potlačena činnost dýchacího centra a ovlivněna činnost srdce. Při dlouhodobé expozici dochází k poškození cév, kostí a kůže¹. Na jeho karcinogenní účinky bylo poukázáno až v roce 1971 (cit.²), kdy byly při pokusech na zvířatech pozorovány angiosarkomy jater a jiných orgánů³. U lidí vystavených VC byly zjištěny příznaky poškození jater, funkční změny dýchacího ústrojí, zvýšený výskyt nádorových onemocnění a chromosomové aberace. V současnosti je proto VC řazen mezi prokázané chemické karcinogeny⁴ a mutageny¹.

VC se do organismu dostává nejčastěji inhalační cestou nebo orálně. Určitý podíl je v nezměněné formě vyloučen plicemi, část se postupně odbourává až na oxid uhličitý, který se vydechuje. Jeho metabolity se vylučují močí a stolicí⁵. VC vstupuje také do intermediálního metabolismu a nakonec je vyloučen ve formě fyziologických metabolitů jako je močovina, kyselina glutamová, methionin, serin a jiné⁴. Na základě pokusů na zvířatech uvádí většina autorů tři hlavní metabolity VC vylučované močí: *S*-(karboxymethyl)cystein, thiodiglykolová kyselina (TDGA) a *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxyethyl)cystein⁴. Modelové znázornění mechanismu vylučování TDGA močí bylo zveřejněno v literatuře⁶.

VC není však jediným zdrojem TDGA v moči. TDGA je metabolitem i některých jiných látek, které můžeme rozdělit do dvou skupin: látky související s profesionální expozicí, např. vinylidenchlorid⁷ nebo 1,2-dichlorethan⁸, a látky

obsažené v normální stravě, např. *S*-(karboxymethyl)cystein přítomný v česneku, ředkvičkách, cibuli a dalších druzích zeleniny. Nález TDGA u sledovaných osob je proto třeba uvažovat v kontextu s těmito možnostmi a podle potřeby i stanovení opakovat⁶.

Jednou z používaných metod pro stanovení thiodiglykolové kyseliny v moči je plynová chromatografie. Před vlastní analýzou je ale třeba kyselinu z moči izolovat a následně ji převést na těkavou sloučeninu⁹. Tento vícestupňový proces je časově náročný a je zatížen chybami. Další využitelnou metodou je adsorpční voltametrie. Stanovení TDGA je možné až po oddělení rušivých složek na koloně plněné práškovým PVC (cit.^{10–13}). Vhodnou metodou je také kapilární izotachoforéza^{14,15}. Umožňuje separovat a stanovit iontové látky (buď kationty nebo anionty) na základě různé pohyblivosti iontů v elektrickém poli. Pohyb nabitých částic je způsoben napěťovým spádem podél dráhy jejich pohybu.

Aplikace poslední uvedené metody pro stanovení TDGA, popsána v lit.¹⁶, má údajně před ostatními výhodu v tom, že není třeba TDGA před analýzou izolovat a moč nijak upravovat. Jako vedoucí elektrolyt přítom sloužil roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,01 mol.l⁻¹, upravený β -alaninem na pH 3,4 pro předseparační kolonu a pH 4,3 pro analytickou kolonu. Koncovým elektrolytem byla kyselina octová o koncentraci 0,01 mol.l⁻¹. Určité problémy však při tomto stanovení pramenily z charakteru vzorku. Litr moči obsahuje totiž v průměru 8 g chloridů, 23 g močoviny, 2,1 g anorganických fosfátů, 1,2 g kreatinu, 0,7 g kyseliny močové, 0,08–0,8 g kyseliny hippurové, 0,05–0,46 g kyseliny citronové¹⁷ a mnoho dalších látek. Koncentrace jednotlivých aniontových složek moči převyšuje ovšem několikanásobně koncentraci sledované TDGA a zmíněné složky mohou proto výrazně ovlivňovat její stanovení.

Problémy pramenící z charakteru moči jako složitého biologického vzorku byly popsány i v diplomové práci¹⁸. Přestože její autorka použila elektrolytový systém doporučený autory v lit.¹⁶, vysoké koncentrace solí (fosforečnany, citráty, chloridy) způsobily, že se TDGA nedostatečně separovala od ostatních složek a její stanovení nebylo reprodukovatelné. U vzorků s menším obsahem doprovodných solí bylo stanovení reprodukovatelnější, zatímco u více zasolených vzorků poskytla izotachoforéza podstatně hůře rozlišené zóny, takže stanovené hodnoty TDGA byly v průměru nižší kvůli nedokonalému oddělení zóny TDGA od zón ostatních solí přítomných v moči.

Ukázalo se tak, že se při aplikaci výše popsaného postupu a při výše uvedených relativně vysokých koncentracích solí (fosforečnanů, citrátů, chloridů) často získávají nereprodukovatelná data a přílišný počet odlehlých hodnot. Cílem této práce bylo proto zdokonalit způsob stanovení tak, aby opakovatelnost analýz byla lepší než $\pm 3\text{--}5\%$.

Experimentální část

Přístrojová technika

Izotachforetické stanovení TDGA v moči bylo prováděno analyzátozem ZKI-01 (ÚRVJ, Spišská Nová Ves). Objem použitého dávkovacího kohoutu byl 27 μl , vnitřní průměr předseparační kapiláry 0,8 mm a analytické kapiláry 0,3 mm a délka předseparační kapiláry byla 22 cm a analytické kapiláry 17 cm. K měření pH sloužil pH-metr MV 870 (Monokrystaly, Turnov) se skleněnou elektrodou. Dále byly při zpracování vzorků použity odstředivka M 52 (Chirana, Stará Turá) a digitální váhy 1702 MP8 (Sartorius, Goettingen).

Chemikálie a roztoky

Jako vedoucí elektrolyt byl použit roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$, upravený kyselinou ε -aminokapronovou (6-aminohexanovou) na pH 4,0, obsahující 0,01 hm.% (hydroxyethyl)celulose. Koncovým elektrolytem byl $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ roztok octové kyseliny.

K odstranění solí ze vzorku moči byl použit 95 obj.% ethanol.

Zásobní $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ roztok TDGA byl připraven rozpouštěním tuhé TDGA 99 hm.% (Fluka) v destilované vodě. Další používané roztoky TDGA byly připravovány jeho ředěním.

Koncentrace dalších použitých zásobních roztoků solí čistoty p. a. (Lachema Brno) činila rovněž $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$.

Vzorky moči byly zpracovány bezprostředně po odběru, popřípadě byly uchovávány v lednici po nezbytně dlouhou dobu.

Výsledky a diskuse

Stanovení TDGA v moči představuje analýzu poměrně složité matrice. Separaci stanovované kyseliny může ovlivnit přítomnost řady aniontů, a to často v koncentracích několikanásobně vyšších, než je koncentrace TDGA.

Byl proto vyzkoušen postup, při kterém byla solnost vzorků moče před jejich analýzou výrazně snížena. Vzorky moči byly zbavovány solí přidávkem ethanolu (95 obj.%) v poměru 1:8 nebo 1:10. Poté byla směs chlazená po dobu jedné hodiny při teplotě $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Vyloučily se krystaly, které byly odstředěny. Výsledný čirý roztok byl podroben izotachforetické separaci. Předseparační kolonou procházel konstantní proud o velikosti $250 \mu\text{A}$, analytickou pak proud $50 \mu\text{A}$. Signál konduktometrických detektorů byl zaznamenáván liniovým zapisovačem při rychlosti posunu papíru $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$. Vzorky moči byly dávkovány dávkovacím kohoutem. Na izotachforeogramech vzorků moči byly identifikovány zóny chloridů, fosforečnanů, citrátů, siřičitanů, síranů

a šťavelanů. Na většině záznamů byla také zóna solí TDGA. Po provedeném odsolení bylo třeba upravit pH prostředí, v němž probíhá separace tak, aby isotachforetické zóny byly dobře rozlišitelné a měřitelné.

Ze získaných záznamů vyplývalo, že nejvýznamnějšími doprovodnými anionty ovlivňujícími zónu TDGA byly fosforečnany, protože jich ve vzorku po odsolení zůstalo relativně nejvíce. Rozdělení těchto dvou zón v závislosti na pH vedoucího elektrolytu bylo sledováno na modelových vodných roztocích. Roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ TDGA a $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ hydrogenfosforečnanu draselného byl izotachforetický proměřován v operačním systému vedoucího elektrolytu $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl a koncového elektrolytu $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ CH_3COOH za stejných podmínek, lišících se pouze hodnotou pH vedoucího elektrolytu. Ta byla upravována přidávkem β -alaninu nebo ε -aminokapronové kyseliny tak, aby se nacházela mezi 3,3 až 4,8.

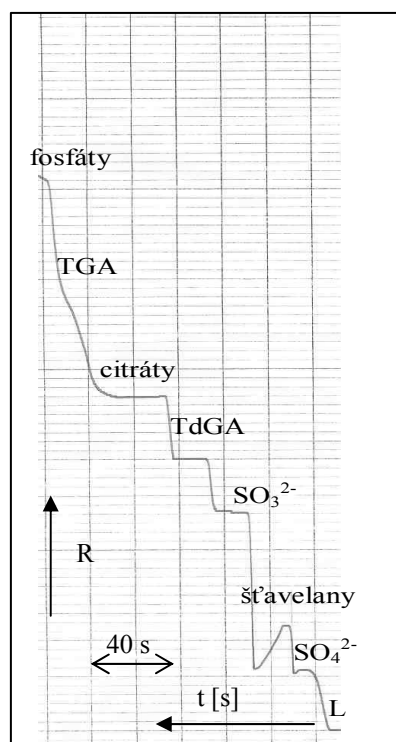
Bylo zjištěno, že probíhá-li separace při pH 3,4, jsou rozdíly v pohyblivostech sledovaných iontových látek velmi malé a hrozí nebezpečí, že při malé odchylce v nastavení pracovní hodnoty pH (například na 3,3) se tyto látky nerozdělí a splynou v jednu zónu. Odečtené a tedy i vyhodnocené množství TDGA je pak výrazně vyšší, než její skutečná koncentrace. Při vyšších hodnotách pH, a to v rozmezí 4,0–4,8, se relativní výška zón $((h_x - h_L) / (h_T - h_L))$, kde h_x je výška zóny sledovaných iontů, h_L je výška zóny vedoucího elektrolytu a h_T výška zóny koncového elektrolytu u TDGA zvyšuje jen nepatrně, a to v rozmezí 0,37–0,47, kdežto u fosforečnanových iontů jsou změny významnější, a to od 0,58 do 1 (kdy fosforečnanové ionty splynou s koncovým elektrolytem). Vyšší hodnoty pH ze sledovaného intervalu jsou tedy pro analýzu TDGA ve vztahu k rušivým fosforečnanům vhodnější.

Při analýze moči bylo třeba počítat s množstvím látek acidobazického charakteru o vysokých koncentracích ovlivňujících chování této matrice. Dosažení vyšších hodnot pH bylo však mimo pufrční oblast β -alaninu a ten byl proto na rozdíl od práce¹⁶ ve vedoucím elektrolytu nahrazen ε -aminokapronovou kyselinou (ε -AMK), jejíž pK_A je 4,43, což vysvětluje lepší pufrční kapacitu ε -AMK při daných podmínkách.

Obdobná studie vlivu pH na stanovení TDGA byla provedena i u vzorků moči, neboť vedle fosforečnanů zde hrála značnou roli i přítomnost siřičitanů s pohyblivostí blízkou TDGA. Vzorek moči byl přítom analyzován stejným způsobem jako modelový roztok. Ze získaných izotachforeogramů bylo patrné, že hodnota pH výrazně ovlivňuje separaci jednotlivých složek, celkový vzhled, přehlednost a vyhodnotitelnost záznamu. Probíhala-li separace při pH 3,8–4,0, byly jednotlivé sousedící zóny přítomných složek dostatečně odděleny a měření byla dobře opakovatelná. Se zvyšující se hodnotou pH se začínala zóna TDGA přibližovat předchozí zóně (patřící zřejmě siřičitanům), při pH 4,6 se tyto zóny úplně neseperoaly, což se projevilo vznikem smíšené zóny. Nalezené množství TDGA se proto snížilo. Vyšší hodnoty pH pak způsobily splynutí zón výše uvedených iontů a vedly tedy k podstatně vyšším výsledkům, než byla

Tabulka I
Srovnání výsledků izotachoforetického a voltametrického stanovení TDGA v deseti různých vzorcích moči

Číslo vzorku	TDGA [mg.l^{-1}]	
	izotachoforeticky	voltametricky
1	79,1	88,2
2	29,4	24,1
3	7,3	5,2
4	54,7	45,2
5	39,5	35,8
6	26,4	26,5
7	113,7	95,6
8	125,2	124,0
9	116,0	117,0
10	89,3	75,4



Obr. 1. Záznam izotachoforetické analýzy vzorku moči po odsolení v prostředí 86,4 obj.% ethylalkoholu (vedoucí elektrolyt $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl}$, pH 4,0 (kyselina ϵ -aminokapronová), 0,01 hm.% (hydroxyethyl)celulosa; koncový elektrolyt $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$; proud pro předseparační kolonu $250 \mu\text{A}$, proud pro analytickou kolonu $50 \mu\text{A}$)

skutečná koncentrace TDGA. Z výše uvedených výsledků vyplynulo, že pro stanovení TDGA v moči je vhodné pH v rozmezí 3,8 až 4,0.

Příklad izotachoforeogramu odsoleného vzorku moči, získaného za popsaných optimálních podmínek v analytické koloně, je uveden na obr. 1 a ilustruje zřetelné oddělení zóny TDGA od okolních zón a její dobrou vyhodnotitelnost. Velmi dobrou lineární závislost délky zóny TDGA na jejím zvyšujícím se obsahu ve vzorku moči, zpracované navrženým postupem, dokumentuje rovnice kalibrační křivky: $l = 0,2788c + 8,5541$, kdy $R^2 = 0,9987$ (kde l je délka zóny [mm], c je koncentrace TDGA [mg.l^{-1}] a R^2 je koeficient determinance). Relativně významná nenulová délka zóny při nulové koncentraci TDGA je dána tím, že kalibrační přímka byla měřena přímo ve vzorku moči, který obsahoval nízkou koncentraci TDGA, a ne v základním elektrolytu. Proto i při nulovém objemu přidávaného standardního roztoku byla zaznamenána zóna TDGA. Zjištěná opakovatelnost stanovení TDGA testovaná ve vzorcích moči byla velice dobrá, $c_{\text{TDGA}} = 90,3 \pm 1,4 \text{ mg.l}^{-1}$ ($n=5$).

Vzhledem k tomu, že analyzované moči se značně liší jak kvalitativně, tak obsahem přítomných solí, může u koncentrovanějších vzorků nastat situace, že zvolený operační systém vykazuje nedostatečnou pufrací kapacitu. To se projeví tak, že zóny analyzovaných iontů nemají konstantní vodivost (vodivost zóny klesá či stoupá). V tomto případě je třeba zvýšit koncentraci vedoucích iontů (Cl^-) na hodnotu $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$. Tato změna vede zároveň ke zvýšení koncentrace pufrujícího protiiontu, kterým je upravováno pH vedoucího elektrolytu.

Výsledky izotachoforetického stanovení TDGA byly porovnávány s výsledky získanými voltametrickou metodou¹³. Bylo proměřeno 10 různých vzorků moči s různým obsahem TDGA. Stanovené koncentrace jsou uvedeny v tabulce I, z níž je vidět poměrně dobrá shoda mezi oběma metodami v širokém koncentračním rozsahu. V souladu s literaturou lze pak eventuelně přepočítat obsah TDGA na obsah kreatininu. Každý vzorek moči v závislosti např. na denní době odběru, zdravotním stavu atd. má různou hustotu, která je charakterizována právě obsahem kreatininu. Proto se často uvádí v biochemické literatuře hodnoty mg TDGA na g kreatininu¹⁹ a nikoli mg TDGA na litr moči.

Navržený postup měření se ukázal vhodným pro stanovení TDGA jako produktu metabolismu VC v moči.

LITERATURA

1. Marhold J.: *Přehled průmyslové toxikologie – Organické látky*, sv. 1, str. 103. Avicenum, Praha 1986.
2. Viola P. L., Bigotti A., Caputo A.: *Cancer Res.* 31, 516 (1971).
3. Creech J. L. Jr., Johnson M. N.: *J. Occup. Med.* 16, 150 (1974).
4. Samcová E.: *Chem. Listy* 88, 723 (1994).
5. Watanabe P. G., McGowan G. R., Gehring P. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 36, 339 (1976).
6. Samcová E., Roth Z.: *Prac. Lek.* 47, 64 (1995).
7. McKenna M. J., Zempel J. A., Braun W. H., Gehring P.

- J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45, 821 (1978).
8. Yllner S.: *Toxicology* 30, 257 (1971).
9. Samcová E.: *Prac. Lek.* 47, 58 (1995).
10. Dlasková Z., Dvořáková L., Bašová P., Pelclová D., Navrátil T.: *Chem. Listy* 95, 184 (2001).
11. Dlasková Z., Pelclová D., Surovcová H., Navrátil T.: *Lek. Listy* 30, 5 (2000).
12. Dlasková Z., Chýlková J., Navrátil T., Pelclová D.: *Chem. Listy* 94, 837 (2000).
13. Dlasková Z., Navrátil T., Heyrovský M., Pelclová D., Novotný L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 164 (2003).
14. Boček P. a kol.: *Analytická kapilární izotachofóreza*. Academia, Praha 1987.
15. Everaerts F. M., Beckers J. Z., Verheggen Th. P. E. M.: *Isotachopheresis. Theory, instrumentation and applications*. Elsevier, Amsterdam 1976.
16. Křivánková L., Samcová E., Boček P.: *Electrophoresis* 5, 226 (1984).
17. Murray R. K.: *Harperova biochemie* (J. Kraml Ed.). Nakladatelství a vydavatelství H+H, Praha 1998.
18. Panušová P.: *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1998.
19. Bardoděj Z., David A., Šedivec V., Škramovský S., Teisinger J.: *Expoziční testy v průmyslové toxikologii*. Avicenum, Praha 1989.

J. Chýlková and R. Fadrná (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Procedure for Isotachophoretic Determination of Thiodiglycolic Acid in Urine Using Desalination of the Analyzed Sample**

A procedure for the isotachophoretic determination of thiodiglycolic acid (TDGA) in urine after desalination and pH adjustment of analyzed samples was elaborated. The salts present in urine were precipitated by addition of ethanol. TDGA was determined in anionic isotachophoretic mode in 0.01 M HCl as a leading electrolyte containing 0.01 % (2-hydroxyethyl)cellulose at pH 4.0 (adjusted with 6-aminohexanoic acid). 0.01 M acetic acid was used as a terminating electrolyte. The reproducibility of TDGA determination was very good, the relative standard deviation was less than 1.5 % for a concentration of TDGA 90 mg.l⁻¹.

IDENTIFIKACE PROTEINŮ KOMBINACÍ PEPTIDOVÉHO MAPOVÁNÍ A FRAGMENTACE SULFONOVANÝCH PEPTIDŮ

JURAJ LENČO^{a,b} a JIŘÍ STULÍK^a

^aProteomové centrum pro studium intracelulárního parazitizmu bakterií, Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, ^bÚstav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

jurasch@seznam.cz

Došlo 17.6.03, přepracováno 18.12.03, přijato 21.1.04.

Klíčová slova: identifikace proteinů, MALDI-TOF MS, rozpad za iontovým zdrojem

Úvod

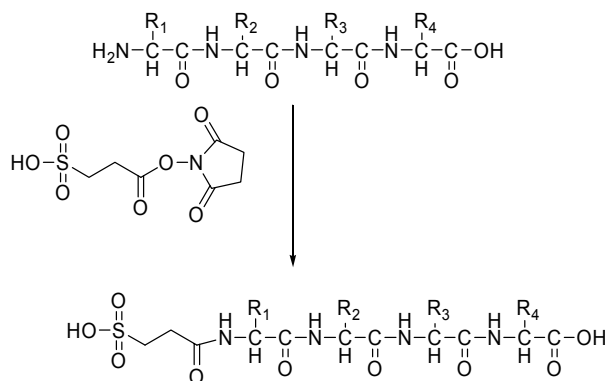
Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) je rutinně používaná technika pro identifikaci proteinů. Spolu s vysokorozlišovací dvojrozměrnou polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (2D-PAGE) patří ke klasickým metodám proteomiky.

Na přístrojích MALDI-TOF se identifikace proteinů provádí především metodou peptidového mapování (PMF – peptide mass fingerprinting, cit.¹). Metoda PMF je založena na enzymovém štěpení proteinu sekvenčně specifickou proteasou. Při enzymatickém štěpení trypsinem vznikají peptidy s argininem nebo lysinem na C-konci. Hmotnostní spektrum získané ze směsi proteolytických štěpů představuje specifickou charakteristiku proteinu. Měřenou veličinou je poměr hmotnost/náboj (m/z). Hodnoty m/z odečtené ze spektra lze v databázových programech porovnat s teoreticky vypočtenými hodnotami m/z proteolytických štěpů. Na základě shody experimentálních a teoretických hodnot lze ke spektru s určitou jistotou přiřadit protein.

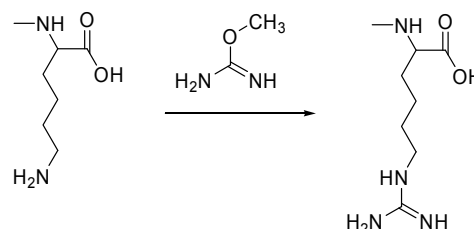
Jednoduchost a rychlost přípravy vzorků pro analýzu MALDI-TOF, rychlost samotné analýzy a snadné vyhodnocení spekter činí tuto metodu ideální pro rutinní identifikaci proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE. V některých situacích však není možné protein jednoznačně identifikovat pouze ze spektra proteolytických štěpů. V těchto případech je potřebné určit sekvenci aminokyselin v proteinu. Moderní hmotnostní spektrometry MALDI-TOF jsou schopny poskytnout informace o sekvenci aminokyselin v analýze PSD (post-source decay – rozpad za iontovým zdrojem)²⁻⁴. Analýzu PSD lze lokalizovat i některé posttranslační modifikace⁴. Pro usnadnění analýzy PSD jsou hmotnostní spektrometry některých výrobců vybaveny speciálními typy reflektromu, např. reflektorem se zakřiveným polem (curved-field

reflectron, cit.⁵).

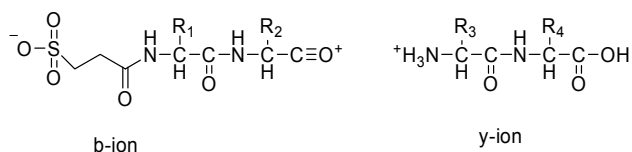
Fragmentace peptidu na aminokyseliny nebývá úplná a výsledná spektra PSD jsou často velmi komplikovaná. V posledních letech byly vypracovány techniky, které problémy spojené s analýzou PSD překonávají. Keough zavedením silně kyselých sulfoskupin na N-koncovou aminoskupinu peptidu dosáhl dramatického zvýšení fragmentace. Při analýze PSD derivatizovaných peptidů byly generovány především γ - a β -ionty⁶, tedy ionty vznikající fragmentací peptidu v místě peptidové vazby. Výrazný pokrok přineslo zavedení ve vodě stabilního sukcinimidylesteru 3-sulfopropanové kyseliny, který je schopen připojit sulfoskupinu k N-koncové aminoskupině peptidu i ve vodním prostředí (obr. 1, cit.⁷). Aby u peptidů zakončených lysinem zůstala nederivatizována ϵ -aminoskupina lysinu, je nutné ji blokovat. Reakce s hydrogensulfátem *O*-methylisomočoviny je při zásaditém pH velmi selektivní (obr. 2, cit.⁸). Negativně nabitá sulfoskupina na N-konci dodává β -iontu celkový neutrální náboj (obr. 3), což zjednodušuje jeho detekci. Výsledné spektrum PSD s chemicky asistovanou fragmentací (CAF) je tedy složeno výhradně z γ -iontů, což usnadňuje interpretaci spektra. Velmi výhodné je proteolytické štěpy adsorbovat na reverzní fázi C₁₈ např. v ZipTip špičkách. Při reakcích s takto imobilizovanými peptidy se lze vyhnout komplikacím s čištěním a izolací a celý postup je výrazně urychlen⁹.



Obr. 1. Příklad reakce N-koncové aminoskupiny tetrapeptidu se sukcinimidylesterem 3-sulfopropanové kyseliny; při reakci se molekulová hmotnost peptidu zvyšuje o 136,0 Da



Obr. 2. Schéma blokování ϵ -aminoskupiny lysinu přeměnou na homoarginin; při reakci se molekulová hmotnost peptidu zvyšuje o 42,0 Da



Obr. 3. Příklad fragmentace derivatizovaného tetrapeptidu; při fragmentaci vznikají výhradně b- a y-ionty; díky celkovému neutrálnímu náboji není b-ion detegovatelný

Pro analýzu proteinového profilu bakterie *Francisella tularensis* byl zvolen přístup využívající separační techniku 2D-PAGE a identifikaci MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Pro identifikaci byl použit program ProteinProspector verze 3.4.1 (University of California, San Francisco Mass Spectrometry Facility, USA) a volně dostupná databáze NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Experimentální část

Chemikálie a přístroje

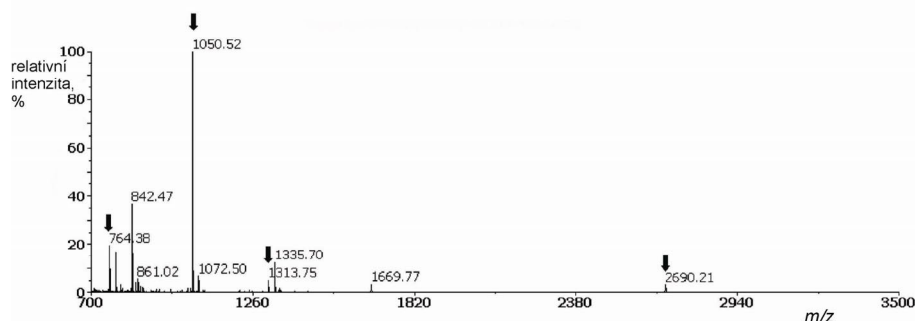
Pro přípravu roztoků byla použita deionizovaná voda připravená na aparatuře Milli-Q PF plus od firmy Millipore (Bedford, USA) a acetonitril (AcN) stupně čistoty LiChrosolv[®] od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Kyselina trifluoroctová (TFA) spektrofotometrické čistoty byla vyrobena firmou Aldrich (Milwaukee, USA). Chemikálie a pufrы potřebné pro derivatizaci (modifikátor lysinu, činidlo pro CAF, ukončovací činidlo, pufr pro modifikátor lysinu, pufr pro CAF činidlo) byly součástí soupravy pro CAF-MALDI sekvenování Ettan[™] (CAF-MALDI sequencing kit firmy Amersham Bioscience, Uppsala, Švédsko).

Jako matrice byly použity 4-hydroxy- α -kyan-skořicová kyselina (CHCA) a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB). Obě matrice byly dodány v rekrystalizované formě firmou LaserBio Labs (Sophia-Antipolis Cedex, Francie). Analýza byla prováděna na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF Voyager-DE[™] STR firmy Applied Biosystems (Framingham, USA).

Příprava vzorků pro analýzu

Proteiny určené pro identifikaci byly vyříznuty z gelu 2D-PAGE obarveném Coomassie modří G250. Po trypsinovém štěpení byly vzniklé peptidy z gelu extrahovány roztokem 50% AcN / 0,5% TFA. Extrakty byly ve vakuové centrifuzě koncentrovány na přibližný objem 10 μ l. Měření PMF bylo prováděno s oběma maticemi. Použití DHB matrice obvykle vedlo k vyššímu počtu píků ve spektru. Jestliže byla identifikace nejednoznačná, vzorek byl derivatizován a podroben analýze PSD.

Derivatizace byla prováděna dle instrukcí výrobce s některými výjimkami. Přidáním 10% roztoku NaHCO₃ bylo pH extraktu posunuto na alkalickou stranu. K extrahovaným peptidům byl přidán pufr s modifikátorem lysinu. Reakce probíhala dvě hodiny při 37 °C. Poté byl přidán roztok 5% TFA, aby pH roztoku bylo kyselé. Peptidy s modifikovanými lysinovými zbytky byly navázány na reverzní fázi C₁₈ v ZipTip špičkách (Millipore Corp. Bedford, USA) a promyty roztokem 0,1% TFA. K imobilizovaným peptidům byl přidán roztok činidla pro CAF v pufru. Reakce byla zastavena pipetováním ukončovacího roztoku. Peptidy byly promyty roztokem 0,1% TFA a eluovány roztokem 50% AcN / 0,1% TFA. Pro analýzu PSD byla použita směs derivatizovaných peptidů s CHCA nebo DHB maticí. Protože derivatizace měnila molekulové hmotnosti peptidů, bylo nejdříve změřeno spektrum v pozitivním reflektornovém módu a z něj byl vybrán matečný ion určený k analýze PSD. Jestliže experimentálně zjištěná sekvence souhlasila s teoretickou sekvencí předběžně určenou při PMF, program Data Explorer verze 4.0 (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA) píky fragmentů s tolerancí $\pm 0,5$ Da označil příslušnými y-ionty s indexem, který udával počet aminokyselin v daném fragmentu. Výhodou je, že při fragmentaci se odštěpuje i 3-sulfopropanová kyselina. Tím se nemění molekulové hmotnosti fragmentů, nemá-li však peptid na C-konci lysin. V tom případě narůstají molekulové hmotnosti všech fragmentů o 42,0 Da a v předběžné sekvenci je nutno nahradit lysin homoargininem.

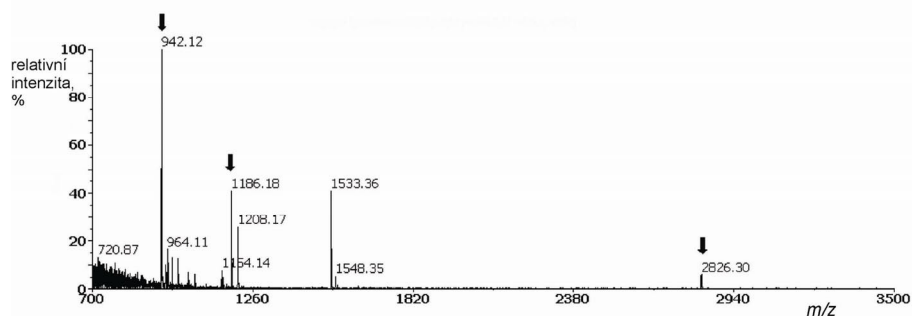


Obr. 4. Spektrum PMF neznámého proteinu po trypsinovém štěpení; spektrum bylo změřeno v pozitivním reflektornovém módu s maticí CHCA; šipky označují peptidy, kterými byl protein předběžně identifikován

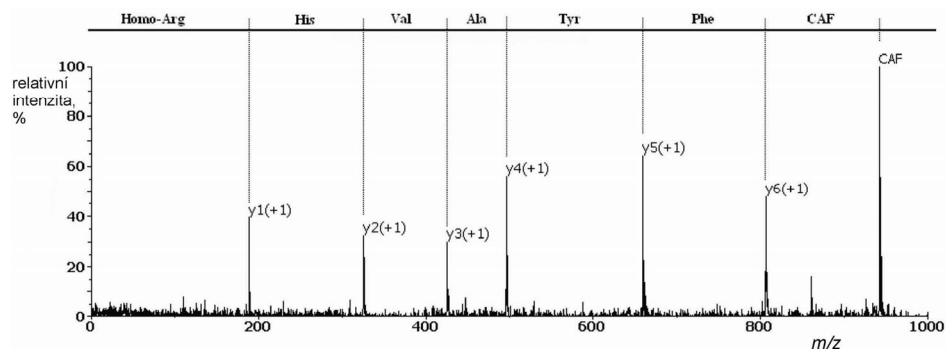
Výsledky a diskuse

Úspěšnost identifikace proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF je závislá na mnoha faktorech, mezi které patří např. množství a vlastnosti proteinu, typ barvení gelu 2D-PAGE, protokol pro enzymatické štěpení proteinu, příprava matrice a vzorku pro analýzu, kontaminace vzorku a jeho purifikace. Až na výjimky byly proteiny identifikovány metodou PMF. Jestliže byl protein identifikován menším počtem peptidů než pět, nebo aminokyseliny peptidů pokryly méně než 20%

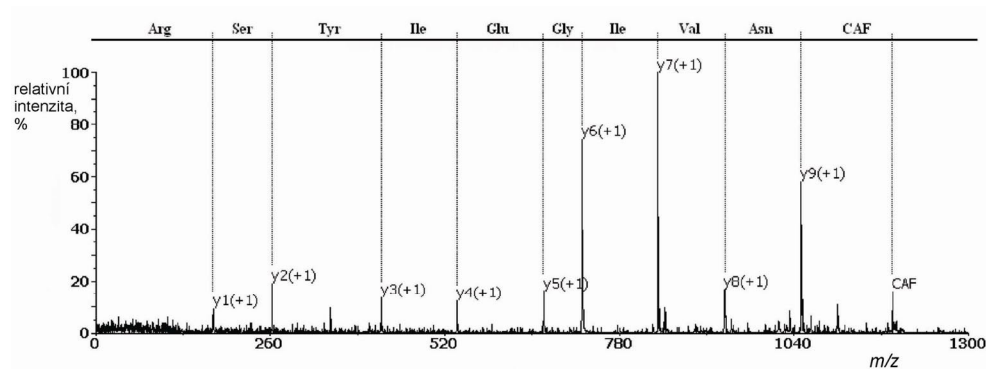
aminokyselinové sekvence proteinu a nebo hodnota isoelektrického bodu a molekulová hmotnost proteinu vykazovaly výrazné rozdíly proti hodnotám zjištěným z 2D-PAGE, byla identifikace potvrzena analýzou PSD s CAF, jak je ukázáno na příkladu. Spektrum PMF (obr. 4) bylo porovnáno se spektrem derivatizovaných peptidů (obr. 5). Rozdíly od původních hodnot byly 136 Da u piku 1186,18 a 2826,30 a 178 Da u piku 942,12. Rozdíl 178 Da svědčí o modifikaci původního lysinu na C-konci na homoarginin. Kompletní série y-iontů potvrdila předpokládanou sekvenci aminokyselin Phe-Tyr-Ala-Val-His-Lys v peptidu o původní hodnotě



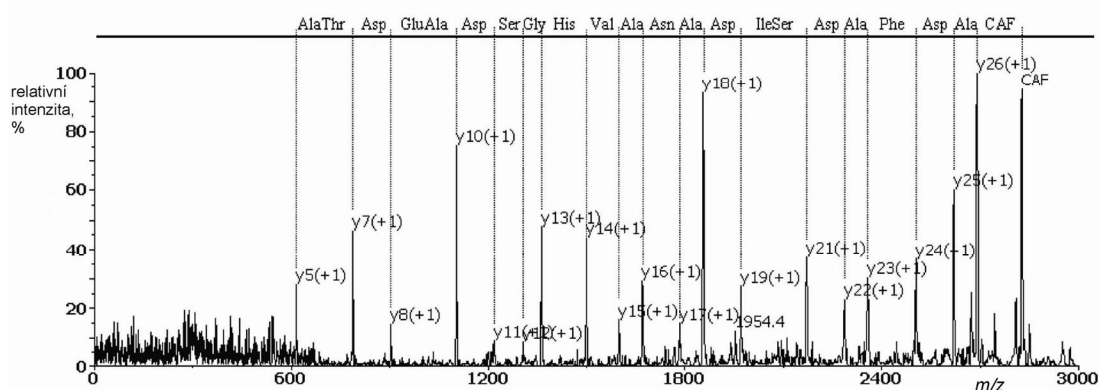
Obr. 5. Spektrum měřené po derivatizaci peptidů v pozitivním reflektorném módu s matricí DHB; šipky značí peptidy, u kterých byla provedena analýza PSD



Obr. 6. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 942,1, matrice CHCA



Obr. 7. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 1186,2, matrice CHCA

Obr. 8. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 2826,3, matrice CHCA

m/z 764,38 (obr. 6) a Asn-Val-Ile-Gly-Glu-Ile-Tyr-Ser-Arg v peptidu o původní hodnotě m/z 1050,52 (obr. 7). Téměř kompletní série iontů y_{26} - y_5 potvrdila část předpokládané sekvence Ala-Asp-Phe-Ala-Asp-Ser-Ile-Asp-Ala-Asn-Ala-Val-His-Gly-Ser-Asp-Ala-Glu-Asp-Thr-Ala-Ala-Gln-Glu-Ile-Arg v peptidu o původní hodnotě m/z 2690,21 (obr. 8). Při běžném potvrzení identifikace je postačující určit část sekvence u jednoho peptidu a porovnat ji se sekvencí předběžně určenou při PMF. Zobrazený příklad tyto požadavky tedy výrazně přesahuje.

Slabé místo protokolu pro derivatizaci peptidů je manipulace se ZipTip špičkami. Zvládnutí této techniky vede k úspěšné derivatizaci vzorků. Derivatizované peptidy jsou velmi snadno fragmentovány, a proto pro výběr matečných iontů je někdy nutné použít tzv. „chladnou“ matici DHB. Matrice DHB se v některých případech osvědčila i pro vlastní analýzu PSD.

Závěr

PSD s CAF je technika určená pro sekvenování peptidů o neznámé primární struktuře (tzv. *de-novo* sekvenování) na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. V naší laboratoři našla uplatnění jako prvek, který výrazně zjednodušuje a ulehčuje získání a vyhodnocení spekter PSD pro potvrzení identifikace proteinů.

Ettan™ souprava pro CAF-MALDI sekvenování byla laskavým darem od prof. C. R. Noe z Ústavu farmaceutické chemie Univerzity Vídeň. Tato práce je součástí projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt č. LN00A033).

LITERATURA

1. Henzel W. J., Watanabe C., Stults J. T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 931 (2003).
2. Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R., Jaeger E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, 105 (1992).

3. Šedo O., Havel J.: *Chem. Listy* 97, 109 (2003).
4. Chaurand P., Leutzenkirchen F., Spengler B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 91 (1999).
5. Cornish T. J., Cotter R. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 781 (1994)
6. Keough T., Youngquist R. S., Lacey M. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7131 (1999).
7. Liminga M., Carlsson U., Larsson C., Maloisel J. L., Palmgren R., Keough T., Youngquist R. S.: *Proceedings of 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, May 27-31 2001.* Chicago 2001.
8. Keough T., Lacey M. P., Youngquist R. S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2348 (2000).
9. Hellman U., Bhikhabhai R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1851 (2002).

J. Lenčo^{a,b} and J. Stulík^a (^a*Proteome Center for the Study of Intracellular Parasitism of Bacteria, Purkyně Military Medical Academy, Hradec Králové*, ^b*Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové*): **Identification of Proteins by Combination of MALDI-TOF Peptide Mass Fingerprinting and Fragmentation of Sulfonated Peptides**

The MALDI-TOF MS is an ideal method for routine identification of proteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). However, in some cases the outputs from peptide mass fingerprinting (PMF) do not enable unambiguous identification of proteins. In such situation, determination of a partial amino acid sequence of the target protein would be extremely helpful in the PMF identification. Sequencing using MALDI-TOF post-source decay (PSD) usually generates complex spectra and the fragmentation is not complete. PSD sequencing with chemically assisted fragmentation allows to avoid these problems. Application of both methods in identification of proteins of *Francisella tularensis* is presented.

RECENZE

Modern Carbonyl Olefination (Takeshi Takeda, ed.)
vydaná WILEY-VCH, Weinheim 2004.
Stran 349, ISBN 3-527-30634-X.

Kniha je rozčleněna do sedmi kapitol:

1. The Wittig Reaction (Michael Edmonds and Andrew Abell, 17 stran, 62 referencí)
2. The Peterson and Related Reactions (Naokazu Kano and Takayuki Kawashima, 86 stran, 447 referencí)
3. The Julia Reaction (Raphaël Dumeunier and István E. Markó, 47 stran, 179 referencí)
4. Carbonyl Olefination Utilizing Metal Carbene Complexes (Takeshi Takeda and Akira Tsubouchi, 49 stran, 136 referencí)
5. Olefination of Carbonyl Compounds by Zinc and Chromium Reagents (Seihiro Matsubara and Koichiro Oshima, 23 stran, 44 referencí)
6. The McMurry Coupling and Related Reactions (Michel Ephritikhine and Claude Villiers, 63 stran, 297 referencí)
7. Asymmetric Carbonyl Olefination (Kiyoshi Tanaka, Takumi Furuta and Kaoru Fuji, 57 stran, 111 referencí)

Jak již naznačuje výčet kapitol, jsou pokryty na jedné straně „klasické reakce“ - Wittigova, Petersonova a poněkud méně známá „Julia reaction“ (využití anionů sulfonů), na druhé straně jsou zahrnuty novější metody využívající reaktivity organokovových činidel – McMurryho reakce, olefinace pomocí karbenových komplexů přechodných kovů a organických sloučenin zinku a chromu. Samostatná kapitola je věnována dosud málo rozvíjené asymetrické olefinaci (například diferenciaci enantiotopních karbonylových skupin, desymetrizace enantiotopních karbonylových skupin nebo kinetické štěpení racemických karbonylových sloučenin). Nejedná se o vyčerpávající review, ale o výběr, který ukazuje možnosti jednotlivých reakcí. Značná pozornost je přitom věnována mechanismu a stereochemii.

Každý organický chemik zabývající se organickou syntézou občas řeší problém, jak zavést do molekuly dvojnou vazbu. Tento, podle mého názoru velmi zdařilý svazek, umožňuje poměrně rychlou orientaci při výběru metody a činidla při zamýšlené syntetické operaci a lze jej proto doporučit každému, kdo se zabývá organickou syntézou.

Dalimil Dvořák

I. Chorkendorff,
J. W. Niemantsverdriet:
Concepts of Modern Catalysis and Kinetics
Wiley-VCH, Weinheim 2003.
Stran 452, ISBN 3-527-30574-2.

Kniha si klade za cíl seznámit čtenáře s pokročilejšími základy katalýzy a kinetiky katalyzovaných reakcí, včetně

vysvětlení základních principů a poskytnutí úvodu do odborné terminologie v této oblasti užívané. Sami autoři vidí v této knize učebnici pro studenty chemických a technologických vědních oborů, a tomu odpovídá i její koncepce – kniha je samonosná a většinu textu je možné pochopit bez nutnosti konzultace s odkazovanými materiály. Je též doplněna dosti obsáhlým souborem kontrolních otázek a cvičných příkladů.

Prakticky od samého začátku je výklad katalýzy úzce spojen s výkladem různých aspektů kinetiky katalytických reakcí a v tomto aspektu kniha *Concepts of Modern Catalysis and Kinetics* nezůstává nic dlužna svému názvu. Kinetice, která je představena jako nástroj pro výzkum a popis katalytické aktivity, je zde věnována velká pozornost. V úvodních kapitolách je vysvětlení základních pojmů a jeví v katalýze doplněno úvodem do kinetiky homogenně i heterogenně katalyzovaných reakcí a teorie reakční rychlosti. Poté je čtenář seznámen se základními vlastnostmi pevných katalyzátorů a metodami jejich charakterizace. Na tento výklad pak navazuje detailní popis povrchové reaktivity a sorpčních procesů v heterogenně katalytických systémech. Poslední, nezanedbatelná část knihy je věnována praktickým aplikacím v katalýze ve třech zvolených oblastech – v heterogenně katalyzovaných hydrogenacích, ve zpracování ropy a v environmentální katalýze.

Největší přínos této knihy lze spatřovat především v šíři a ucelenosti popisu kinetických aspektů katalýzy, která je u knihy učebnicového zaměření naprosto výjimečná. Zatímco v jiných oblastech katalýzy (např. charakterizace katalyzátorů), lze najít učebnice popisující je v dostatečné šíři, student zaměřený na podrobnější studium kinetiky byl doposud nucen čerpat znalosti z většího počtu specializovanějších publikací, což značně ztěžovalo počáteční orientaci v problému. Tato kniha však v oblasti kinetiky katalyzovaných reakcí přináší jak základy, tak i výsledky moderních teoretických a experimentálních studií a jejich aplikaci ve velkých průmyslových procesech.

Petr Zámostný

Chemistry and Mathematics: Two Scientific Languages of the 21st Century

vydaná Nova Acta Leopoldina (2003), 88 (330).
ISSN:0369-5034.

Recenzovaná publikace představuje sborník příspěvků konference konané ve dnech 11.–13.10. 2001 v Göttingenu. Konference byla věnována problematice komunikace a písemného vyjádření myšlenek grafickými symboly (ideografií) ve vědeckých oborech matematika a chemie, jakož i styčným bodům komunikace v těchto oborech.

Ideogramy na rozdíl od piktogramů reprezentují kon-

krétní slovo, jež je součástí psaného jazyka. Jako jazyk je obvykle chápán systém verbálních znaků, které jsou typické pro komunitu lidí, kteří tak vyjadřují své myšlenky a chtějí, aby tyto myšlenky byly pochopeny ostatními členy komunity. Vědecký jazyk matematiky, stejně jako chemie, bývá zpravidla nesrozumitelný „normálním lidem“ a před položením základů moderní teoretické chemie se vyvíjely odděleně. I v chemii ale přišla doba, kdy si badatelé uvědomili, že každá věda, jejíž experimentální výsledky mohou být vyjádřeny čísly, se stává vhodnou oblastí pro použití matematiky. Matematika se tak stala „aplikovanou“ a je široce využívána v mnoha vědních odvětvích.

Sborník obsahuje kromě úvodního slova celkem osm odborných sdělení. Jednotlivé příspěvky se k nastiněné problematice vyjadřují z nejrůznějších úhlů pohledu. Je zdůrazňováno informační bohatství systematického chemického názvosloví a zápisu molekulové struktury, na jejichž podkladě lze dedukovat některé charakteristické vlastnosti látky, která je tímto způsobem popsána (např. ve stati *Chemie jako ideografický jazyk*). Další příspěvky se věnují např. problematice vyjádření topologie krystalů, popisu struktur, které se chovají jako lineární motory na molekulární úrovni, nebo porovnání příbuzných pojmů v matematice a výpočetní chemii. Některé příspěvky v sobě mají silný filozofický náboj a zamýšlejí se nad uplatňováním dedukce, intuice a představitosti v matematice a v chemii, nebo zkoumají historický vývoj jazyka chemických oborů.

Sborník představuje soubor zajímavých článků, poukazujících na styčné plochy matematiky a chemie. Již z různorodosti přístupu k předmětu konference je ale zřejmé, že odhadovat budoucí vývoj sblížení obou vědeckých jazyků je obtížné a jak známo, v předpovědích budoucnosti se člověk často mýlí. Jako příklad nám může posloužit citát, který pronesl v roce 1977 Ken Olsen, prezident společnosti Digital Computer: „Neexistuje žádný důvod, aby člověk chtěl mít doma počítač“.

Pavel Chuchvalec

Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Part 87, (W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, eds) Springer, Wien, 1. vydání, 2003. 222 stran, ISBN 3-211-02780-7. Cena 160,50 €.

Kniha se soustřeďuje na přehled informací o přírodních látkách ve dvou částech A) *Cephalostatin Analogues – Synthesis and Biological Activity* autorů Timo Flessner, Rolf Jautelat, Ulrich Scholz a Ekkehard Winterfeldt, a B) *Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (Fluorescent and Non-Fluorescent Pseudomonas spp.)* z pera pana Herberta Budzikiewicze.

Prvá část popisující syntézu a biologickou aktivitu cephalostatinů má tři hlavní oddíly věnující se postupně otázkám konkrétní syntézy bissteroidních pyrazinů, možnosti funkcionalizace kruhů A-D a chemii spiroketalů příbuzných cephalostatinům. Tato první část má 80 stran a je extraktem z 119 citací, které zahrnují literaturu do roku 2001 a uvádějí i citace z časopisu „Collection“.

Druhá část popisující siderophory Pseudomonadaceae *sensu stricto*, tj. fluorescentní i nefluorescentní *Pseudomonas* spp., je rozdělena na šest podkapitol, popisujících typické siderophory fluorescentních pseudomonad, pyoverdiny, ostatní siderophory fluorescentních pseudomonad, bakteriální metabolismus dvojmocného i trojmocného železa, problematiku vtažení pseudomonas a zdraví, zemědělství a problémů životního prostředí. V několika dodatcích uvádějí autoři seznam zkratk, přehled bakteriálních specií, sbírek bakteriálních kultur. Odkazy dělí autoři na knihy, články, přehledy a původní práce. Druhá část knihy je obsažnější, má 157 stran a uvádí přes 530 citací článků a 16 citací knih, kapitol a přehledů.

Za grafické znázornění chemických struktur bych pochválil pány Flessnera, Jautelata, Scholze a Winterfeldta, kdežto autora části druhé, pana Budzikiewicze nikoli; i když možná jen za estetický dojem. Obě části však přinášejí utříděný a kvalitní přehled v oblasti vymezené titulem. Knihu doplňuje rejstřík autorů citovaných prací a rejstřík předmětný. Citace uvádějí literaturu až do roku 2003.

Osmdesátý sedmý Zechmeister by neměl chybět v příruční knihovně žádného chemika, který se zabývá přírodními a biologicky účinnými látkami.

Pavel Drašar



56. sjezd chemických společností

„Chemie uhlí a uhlíkatých materiálů pro 21. století“

Ostrava

6. – 9. září 2004

pod záštitou

**Ing. Evžena Tošenovského,
hejtmana Moravskoslezského kraje**

a

**prof. Ing. Václava Roubíčka, CSc.,
senátora ČR a protektora VŠB-TU Ostrava**

Sekce sjezdu

Chemie uhlí, produktů jejich zpracování a chemie uhlíkatých materiálů
Analytická chemie a chemometrie
Anorganická chemie
Organická, bioorganická a farmaceutická chemie
Fytochemie
Potravinářská chemie
Chemie životního prostředí, rizikové látky v chemii a jejich likvidace
Fyzikální chemie a chemická fyzika
Makromolekulární chemie a technologie polymerů
Chemické vzdělávání, chemická informatika a historie chemie
Petrochemie
Jaderná chemie
Chemie a struktura materiálů
Průmyslová chemie
Sekce mladých

Bližší informace na www.osu.cz/prf/schs



SIGMA-ALDRICH



IV. MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH BIOLOGŮ, BIOCHEMIKŮ A CHEMIKŮ

9. 6. – 12. 6. 2004

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali

Martin Fusek, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

IV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků

Mezioborová konference mladých biologů, biochemiků a chemiků vstupuje letos do svého čtvrtého ročníku. Redakční rada Chemických listů mne požádala, abych napsal krátký úvodník do sborníku konference. Chtěl bych se zmínit o třech aspektech. Za prvé – velmi si vážím práce odborné komise, která hodnotí abstrakty. Letos se sešlo dohromady více než 130 abstraktů a odborná komise má 14 dní na posouzení. Za časů mého studia se tradovalo, že asistenti na VŠCHT hodnotí písemné práce rozhozením po hlavním schodišti v „Áčku“. Práce komise, která vybírá abstrakta na naši konferenci, vypadá rozhodně jinak. Hodnocení prací věnuje mnoho času. Aby byla situace ještě komplikovanější, naše termíny se kryjí s termíny podávání grantových zpráv a přihlášek. O to více bych chtěl poděkovat celé komisi, pracující ve složení Dr. Blahoš, doc. Drašar, Dr. Kotora, Dr. Pospíšilová, Dr. Starý a prof. Ulrichová a chtěl bych také říci, že jen díky jejich pečlivé práci je kvalita konference velmi vysoká. To je druhý bod, který bych chtěl zdůraznit. Práce, které se scházejí, jsou stále kvalitnější, a je stále těžší vybrat účastníky konference. Vloni navštívili konferenci prof. Pačes, doc. Moravcová, Dr. Bartůněk, Dr. Tureček a všichni nám, organizátorům, tlumočili stejný dojem – úroveň jak odborná, tak formální je na nejvyšším stupni a je každým rokem složitější vybrat vítěze v jednotlivých kategoriích. Moje třetí poznámka, a zároveň veliký dík, patří Ing. Ireně Krumlové, tajemnici České společnosti pro biochemii a molekulární biologii. Od prvního ročníku pomáhá jak v organizaci, ale také ve finančním zajištění celé akce. S velkým nasazením bojuje o granty, které pomáhají zvládnout stále rostoucí náklady. Bez ní a jejího úsilí bychom nebyli schopni tuto akci v daném rozměru udržet.

Na závěr – přeji čtvrtému ročníku mnoho zdarů a všem mladým hodně úspěchů v jejich vědecké práci.

Martin Fusek

ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE FORMS DNA ADDUCTS *IN VIVO*; A NOVEL MODE OF ITS ANTINEOPLASTIC ACTION

DAGMAR AIMOVÁ and **MARIE STIBOROVÁ**

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, The Czech Republic
dagmar_aimova@seznam.cz

Ellipticine is a potent antineoplastic agent, whose mode of action is considered to be based mainly on DNA intercalation and/or inhibition of topoisomerase II. We found that ellipticine also forms covalent DNA adducts *in vitro* and that the formation of DNA adducts is dependent on the activation of ellipticine by cytochrome P450 (CYP) (cit.¹). This implicates the potential importance of several CYPs in producing more active ellipticine metabolite(s). Here, we investigated the capacity of ellipticine to form DNA adducts *in vivo*. Male Wistar rats were treated with ellipticine, and DNA from various organs was analyzed by ³²P-postlabeling. Ellipticine-specific DNA adduct patterns, similar to those found *in vitro*, were detected in most test organs. The highest level of DNA adducts was found in liver, followed by spleen, lung, kidney, heart and brain. One major and one minor ellipticine-DNA adducts were found in DNA of all these organs of rats exposed to ellipticine. Besides these, two or three additional adducts were detected in DNA of liver, kidney, lung and heart. The predominant adduct formed in rat tissues *in vivo* was identical to the deoxyguanosine adduct generated in DNA by ellipticine *in vitro*. Correlation studies showed that the formation of this major DNA adduct *in vivo* is mediated by CYP3A1- and CYP1A-dependent reactions. The additional aim of the present work was to study whether ellipticine could influence the expression of the major CYPs participating in its metabolism. An expression of CYP1A1/2 proteins in liver of rats of both sexes is strongly induced by treatment of animals with ellipticine. The expression levels of CYP1A1/2 in treated rats are one order of magnitude higher than those in control animals. The CYP1A1/2 induction is strongly dependent on concentration of ellipticine applied to experimental animals and on the time of their exposition. The induction of other isoforms of cytochromes P450 (CYP2B, 2E1, 3A) was negligible. The results presented here are the first report showing the formation of CYP-mediated covalent DNA adducts by ellipticine *in vivo*, and confirm the formation of covalent DNA adducts as a new mode of ellipticine action. In addition, they indicate that a long-term treatment of humans with ellipticine might stimulate its pharmacological efficiency against cancer diseases.

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/01/0996) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

REFERENCES

- 1) Stiborová M., Bieler C. A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.* 62, 1675 (2001).

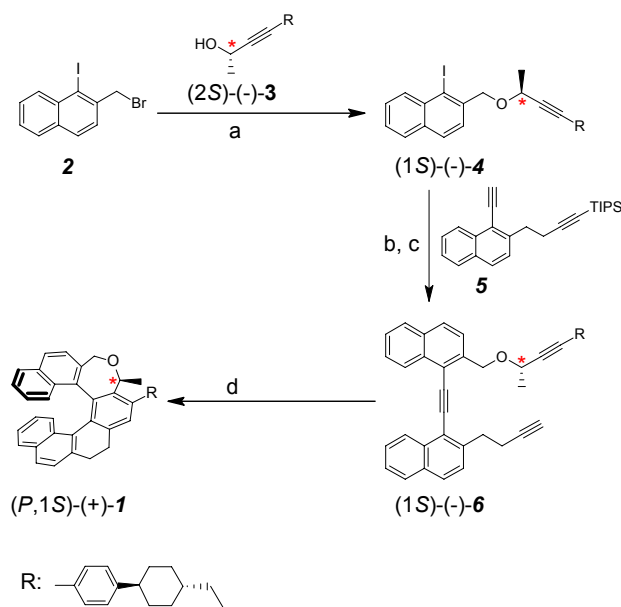
VYUŽITÍ DIASTEREOSELEKTIVNÍ [2+2+2] CYKLOIZOMERACE TRIYŇŮ PRO PŘÍPRAVU HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH LÁTEK

ZUZANA ALEXANDROVÁ, IRENA G. STARÁ, FILIP TEPLÝ, PETR SEHNAL, IVO STARÝ, DAVID ŠAMAN a MILOŠ BUDĚŠINSKÝ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
alexa@uochb.cas.cz

V minulosti jsme vyvinuli obecný způsob přípravy helikálně chirálních látek, který je založen na intramolekulární [2+2+2] cykloizomeraci aromatických triyňů za katalýzy^{1,2} kobaltem (I) či niklem (0). Nedávno jsme pozorovali, že centrum chiralitity ve výchozím triyňu může řídit stereoselektivitu cyklizace³. Tímto způsobem je pak kontrolována helicitita produktu.

S využitím této syntetické metodologie jsme připravili neracemickou helikálně chirální látku (*P,1S*)-(+)-**1**, jejíž struktura je odvozená od helicenů⁴. Syntéza vychází z dostupného bromjodidu **2**. V prvním kroku byl působením hydridu draselného generován alkoholát odvozený od (*2S*)-(-)-**3**, který byl poté alkylován bromjodidem **2** za vzniku látky (*1S*)-(-)-**4**. Sonogashirův coupling diacetylenu **5** s naftyljodidem (*1S*)-(-)-**4** a následná desilylace účinkem tetrabutylamoniumfluoridu vedly k požadovanému triyňu (*1S*)-(-)-**6**. Syntetická sekvence byla završena intramolekulární [2+2+2] cykloizomerací triyňu (*1S*)-(-)-**6** za katalýzy komplexem kobaltu, a byla tak získána požadovaná helikálně chirální látka (*P,1S*)-(+)-**1**.



- (a) KH, THF; (b) Pd(PPh₃)₄, CuI (kat.); (c) Bu₄NF; (d) CpCo(CO)₂ (1 ekv.)

Bude zkoumáno využití této látky a jejích analogů v oblasti kapalných krystalů, kde helikální aromáty nebyly ještě systematicky studovány.

Podporováno GA ČR (reg. č. 203/02/0248) a ÚOCHB AV ČR (výzkumný projekt č. Z4 055 905).

LITERATURA

1. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Rulíšek L., Fiedler P.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9175 (2002).
2. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Vyskočil Š., Fiedler P.: *J. Org. Chem.* **68**, 5193 (2003).
3. Alexandrová Z.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha (2003).
4. Urbano A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 3986 (2003).

SYNTHESIS OF 3,3' SUBSTITUTED [2]STAFFANE DERIVATIVES AND NMR STUDY OF THEIR INCLUSION COMPLEXES WITH β -CYCLODEXTRIN IN WATER

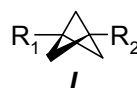
PETR BARTOŠ and **CTIBOR MAZAL**

Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic
bartos@chemi.muni.cz, mazal@chemi.muni.cz

Derivatives of bicyclo[1.1.1]pentane (BCP) **I** were recognized as very interesting class of compounds due to their structural features. For example, BCP cage represents a basic construction module for rigid rod like molecules – [n]staffanes **II**, the fundamental part of suggested molecular size construction set¹. Having the set of predefined properties with appropriate tools of supramolecular chemistry in hand, one might be able to construct novel molecular materials. Since practically useful synthesis of [1.1.1]propellane had been found, synthetic aspects of BCP chemistry became relatively developed recently². On the other hand, there is little known about supramolecular chemistry of BCP derivatives so far. Inspired with Berg et al. (cf.³) describing complexation of bicyclo[2.2.2]octane derivatives with cyclodextrins (CD) and with CD-based pseudo-rotaxane model⁴ in our minds, we focused our interest to the host-guest chemistry of BCPs.

Iodide **Ia** and [2]staffanes **IIa-b** formed sparingly soluble complex with β -CD upon mixing in D₂O/DMSO-d₆ solvent mixture at 303 K precluding their further study by solution NMR methods. Hydrophilic [2]staffane-3,3'-diol **IIId** has been prepared from **IIa** via iodine/lithium exchange followed with oxidation of dilithium **IIc** with molecular oxygen. Solution NMR analyses revealed formation of 1:1 host-guest complex **III** of **IIId** and β -CD at 303 K in water. Association constant of the complex **III** has been estimated to be $K_a = 3015 \text{ M}^{-1}$ at 303 K in water.

Financial support from Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (projects ME 571 and FRVŠ 574/2003) is acknowledged with thanks.



Ia R₁,R₂:I

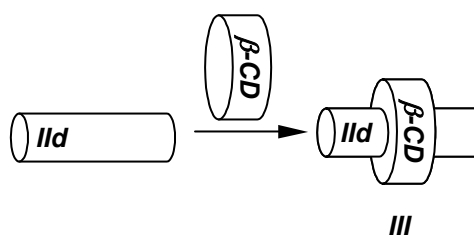


IIa R₁,R₂:I; n=2

IIb R₁,R₂:Si(CH₃)₃; n=2

IIc R₁,R₂:Li; n=2

IIId R₁,R₂:OH; n=2



REFERENCES:

1. Kaszynski P., Friedli A. C., Michl J.: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 601 (1992).
2. Levin M. D., Kaszynski P., Michl J.: *Chem. Rev.* **100**, 169 (2000).
3. Berg U., Bladh N., Hjelmencrantz A.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2001**, 1850.
4. Nepogodiev S. A., Stoddart J. F.: *Chem. Rev.* **98**, 1959 (1998).

DEVELOPMENT OF LATERAL FLOW IMMUNOASSAYS FOR DETECTION OF FOODBORNE PATHOGENS *Listeria* SPP. AND *Listeria monocytogenes*

MARTINA BLAŽKOVÁ^a, PAVEL RAUCH^a, JAN H. WICHERS^b, and AART VAN AMERONGEN^b

^a*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 16628 Praha, Czech Republic,* ^b*Agrotechnology and Food Innovations (A&F), Wageningen University and Research Centre, P.O. Box 59, 6700 AA, Wageningen, The Netherlands*
blazkovm@vscht.cz

A lateral flow immunoassay (LFIA) is a single step method that is based on the principle of immunochromatography. These simple and rapid strip tests require only sample addition at one end of the device. Due to wicking (capillary) effects, the sample is drawn into the interstitial spaces of the membrane. While continuing along this flow path, the sample contacts the dried reagent, usually a labeled antibody, which then migrates with the analyte to a capture zone containing immobilized antibodies. At this zone, the analyte-antibody complex binds to the immobilized antibody; signal is visible as a black line.

The genus *Listeria* includes six species: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, and *L. grayi*. The severe disease listeriosis caused by these bacteria is one of the most deadly bacterial infections

currently known. Only *L. monocytogenes* has been recognized as an important foodborne pathogen causing infections in both man and animal. *L. ivanovii* is primarily pathogenic for cattle and sheep. The other *Listeria* spp. are considered to be avirulent, although *L. innocua* may occasionally cause disease in ruminants and *L. seeligeri* has been implicated in at least one case of human listeriosis. *Listeria* spp. can be isolated from a diversity of environmental sources, including soil, water, effluents, a large variety of foods, and the feces of humans and animals.

The aim of our work was to develop rapid and simple method for general detection of genus *Listeria* and specific determination of *Listeria monocytogenes*. Two polyclonal antisera had previously been developed. With these antisera ELISAs had been set up, one specific for *Listeria* spp., and the other specific for *L. monocytogenes*. In the present study these antibodies were used to develop easy-to-use Lateral Flow ImmunoAssays that only require the addition of culture supernatant into the sampling window.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, No. 525/03/0350.

PA-III LLEKTIN Z HUMÁNNÍHO PATOGENU *Pseudomonas aeruginosa* A JEHO INTERAKCE S OLIGOSACHARIDY

MARTINA BUDOVÁ^a, CHARLES SABIN^b, EDWARD P. MITCHELL^c, NECHAMA GILBOA-GARBER^d, ANNE IMBERTY^b, and MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,e}

^aNational Centre for Biomolecular Research and ^eDepartment of Biochemistry, Masaryk University, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic, ^bCERMAV-CNRS, 601 rue de la Chimie, BP 53, 38041 Grenoble, France, ^cESRF, Experiments Division, BP 220, 38043 Grenoble, France, ^dBar Ilan University, Faculty of Life Sciences, Ramat Gan 52900, Israel budova@chemi.muni.cz

Pseudomonas aeruginosa je gram-negativní potenciálně patogenní bakterie, která je schopna infikovat téměř každou lidskou tkáň a např. u pacientů s cystickou fibrosou způsobuje těžkou infekci plic. Nejčastější příčinou úmrtí pacientů s cystickou fibrosou jsou právě důsledky kolonizace plic touto bakterií. *P. aeruginosa* produkuje významné množství lektinů v vzájemných D-galaktosu a L-fukosu, PA IL (LecA) a PA IIL (LecB), které jsou pravděpodobně odpovědné za primární rozpoznání hostitele a následnou adhezi bakterie a jsou úzce spjata s virulencí tohoto patogenu¹.

Na rozdíl od většiny lektinů, jež vykazují relativně nízkou afinitu k monomerním cukerným ligandům, interakce PA-III s fukosou je charakterizována afinitní konstantou v mikromolární oblasti. Strukturální analýza prokázala, že PA-III lektin je tetramer složený ze čtyř identických podjednotek, každá z nich obsahuje vazebné místo se dvěma Ca²⁺ ionty, které se přímo podílí na vazbě sacharidu a jsou pravděpodobně příčinou neobvykle silné interakce mezi proteinem a cukerným zbytkem². Význam četných aminokyselin především kyselého charakteru zapojených do interakce se sacharidy a jejich podíl

na vazbě nám pomáhá odhalit jejich cílená mutagenese a následná charakterizace mutantů. Zvláštností vazebného místa je i zapojení C-terminálního glycinu sousedního monomeru do přímé interakce se sacharidem.

Krystaly PA-III lektinu se daří připravit v dostatečné velikosti, což nám otevřelo novou možnost řešení kvartérní struktury proteinu na atomární úrovni neutronovou difrakcí. V současné době probíhá příprava plně deuterovaného proteinu, jež by měl umožnit pohled především na vodíkové atomy, které jsou přímo zapojeny do interakce, ať už kyselých aminokyselin ve vazebném místě či hydroxylových skupin sacharidu.

LITERATURA

1. Imberty A., Wimmerová M., Mitchell E. P., Gilboa-Garber N.: *Microb. Infect.*, 6, 222 (2004).
2. Mitchell E., Houles C., Sudakevitz D., Wimmerová M., Gautier C., Pérez S., Wu A. M., Gilboa-Garber N., Imberty A.: *Nature Struct. Biol.* 9, 918 (2002).

ANTENNA RING AROUND TRIMERIC PHOTOSYSTEM I IN A PHOTOSYNTHETIC PROKARYOTE *Prochlorothrix hollandica*

L. BUMBA^{a,b}, M. HUŠÁK^b, and F. VÁCHA^{b,c}

^aFaculty of Biological Sciences; ^bInstitute of Plant Molecular Biology, Czech Academy of Sciences; ^cInstitute of Physical Biology, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
bumba@umbr.cas.cz

Three known species of prochlorophytes (*Prochloron didemni*, *Prochlorothrix hollandica* and *Prochlorococcus marinus*) are an unusual group of prokaryotes which perform oxygenic photosynthesis¹. They are apparently related to cyanobacteria but they lack water-soluble phycobilisomes while they synthesize chlorophyll (chl) *b* and to form an intrinsic chl*a/b* light-harvesting antenna. The chl*a/b*-binding proteins (encoded by *pcb* genes) are not closely related to the *lhc* genes encoding a superfamily of the light-harvesting antenna proteins of green plastids, but instead are similar to the iron-stress induced *isiA* gene of cyanobacteria and to CP43, a chl*a*-antenna protein of photosystem II (cf.²). In *P. hollandica* three Pcb antenna proteins (*pcbA-C* gene products) have been detected³. Here we show how the antenna proteins structurally interact with the photosystem I (PSI) reaction center in *P. hollandica*. The isolated thylakoid membranes of *P. hollandica* were solubilized by mild detergent dodecyl-β-D-maltoside and subjected to a sucrose density gradient centrifugation. On the basis of protein composition and spectroscopic data the lowest green fraction of sucrose gradient contained polypeptides of the PSI reaction center complex associated with the Pcb proteins. In order to reveal how the PSI complex interact with the Pcb proteins the fraction was negatively stained with uranyl acetate, subjected to electron microscopy and obtained images processed with SPIDER image analysis package⁴. Single particle analysis showed a Pcb-PSI supercomplex to be a more circular particle with a diameter of about 32 nm. This

structure is remarkably similar to that of the IsiA-PS I supercomplex isolated from cyanobacteria grown under iron-deficient condition⁵ and to the Pcb-PSI supercomplex isolated from a low-light adapted *Prochlorococcus* strain SS120 [6]. We conclude that in thylakoid membranes of *P. hollandica* the trimeric PSI complex is surrounded by the ring of 18 Pcb subunits and in so doing significantly increases the size of the light-harvesting system of PSI.

This work was supported partially by a project LN00A141 and project CEZ 12300001 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

REFERENCES

- Partensky F., Garczarek L.: In *Photosynthesis in Algae* (Larkum A.W., Douglas S., Raven J.A., eds), p. 29-62. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 2003.
- La Roche J., van der Staay G. W. M., Partensky F., Ducret A., Aebbersold R., Li R., Golden S. S., Hiller R. G., Wrench P. M., Larkum A. W. D., Green B. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 15244 (1996).
- van der Staay G. W. M., Yurkova N., Green B. R.: *Plant Mol. Biol.* 36, 709 (1998).
- Frank J., Radermacher M., Penczek P., Zhu J., Li Y. H., Ladjadj M., Leith A.: *J. Struct. Biol.* 116, 190 (1996).
- Boekema E.J., Hifney A., Yakushevskaya A. E., Piotrowski M., Keegstra W., Berry S., Michel K. P., Pistorius E. K., Kruij J.: *Nature* 412, 745 (2001).
- Bibby T. S., Nield J., Partensky F., Barber J.: *Nature* 413, 590 (2001).

NEW PHOTOACTIVE SYSTEMS FOR DRIVING CHEMICAL REACTIONS

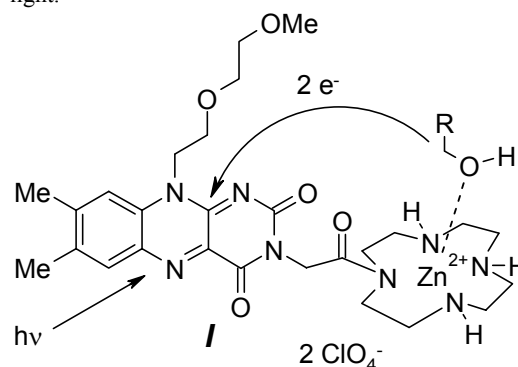
RADEK CIBULKA^a and BURKHARD KÖNIG^b

^aDepartment of Organic Chemistry, Prague Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6;

^bDepartment of Organic Chemistry, University of Regensburg, Universitätsstraße 31, D-93053 Regensburg, Germany. cibulka@vscht.cz.

Catalyzed reactions have been investigated in chemistry for a long time. In general, a catalyst only lowers the activation barrier of an exothermic reaction, which then proceeds faster. On the other hand, utilization of light energy allow running of some endothermic processes (e. g. photosynthesis, water oxidation). The aim of our long-term project is to develop molecular devices, which are capable to mediate or catalyze endothermic chemical reactions under mild conditions when irradiated by visible light. Such catalyst should consist of suitable chromophore, which collects light energy, and binding site for the substrate. This system should allow to "pump" additional energy into the catalyst-substrate complex and thus to drive endothermic conversion of the substrate to product utilizing intramolecular photoinduced electron transfer (PET). In this work, the catalyst I containing covalently bound flavin and zinc(II)-cyclen unit were prepared and tested for photoinduced electron-transfer reactions. The Lewis-acidic

zinc(II)-cyclen in the catalyst may act as the binding site for a substrate, while flavin represents chromophore that becomes strong oxidizing (or reducing) agent upon irradiation by visible light.



Scheme 1

It was found that the flavin-zinc(II)-cyclen derivative I mediates efficiently photoinduced electron-transfer oxidation of 4-methoxybenzyl alcohol (Scheme 1) in acetonitrile and in water. After reduction by sodium dithionite and after irradiation, molecule I cleaves efficiently model of thymine dimer thus mimicking photolyase³. Presence of the covalently bound zinc(II)-cyclen subunit is crucial for efficient functioning of flavin photocatalyst.

REFERENCES

- Ward M. D.: *Chem. Soc. Rev.* 26, 365 (1997).
- Klinke R. R., König B.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2002, 121.
- Heelis P. F., v knize: *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, (Müller F., ed.), vol. 1, chap. 5. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Heelis P. F., Hartman R. F., Rose S. D.: *Chem. Soc. Rev.* 1995, 289.

IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE NOVÝCH PEPTIDOVÝCH ANTIBIOTIK Z HMYZU

ALICE CIENCIALOVÁ^{a,b}, JIŘÍ JIRÁČEK^a a MARTINA MACKOVÁ^c

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bKatedra biochemie PŘF UK, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, ^cKatedra biochemie a mikrobiologie, FPBT, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
ciencial@uochb.cas.cz

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) uvádí, že rezistence k antimikrobiálním látkám je stále vážnější zdravotní problém¹. Dochází k nárůstu rezistence bakterií vůči současným antibiotikům (rezistence *Salmonella typhimurium* k tetracyklinům vzrostla z 0 % v roce 1948 k 98 % v roce 1998) (lit.²). Každou hodinu zabíjí bakteriální infekce na naší planetě 1500 lidí a z toho polovina jsou děti mladší pěti let. Tato zjištění vedou ke snaze najít nové účinné

antimikrobiální látky, které by ničily mikroorganismy a přitom by se vůči nim obtížně vytvářela rezistence³.

Třída hmyzu se zdá být novým, slibným zdrojem přírodních látek s antimikrobiální aktivitou. V posledních letech byly právě z rozličných druhů hmyzu izolovány peptidy, které vykazovaly zajímavou *in vitro* aktivitu proti mikroorganismům rezistentním ke konvenčním antibiotikům. Právě tyto peptidy by se mohly stát vzorem pro tvorbu nových terapeutických zbraní v boji s mikroorganismy⁴.

Mouchu *Sarcophaga bullata*, zástupce řádu diptera s dokonalou proměnou, jsme si vybrali ze širokého spektra hmyzích druhů. Tato moucha je vystavena a odolává širokému spektru mikroorganismů z prostředí, ve kterém žije a přežívá. Naším cílem je identifikace a charakterizace nových peptidů nebo proteinů účastnících se imunitní odpovědi proti bakteriálním infekcím.

Výchozím materiálem pro izolaci je hemolymfa larev mouchy *Sarcophaga bullata*, které ukončily období žíru a začaly období tzv. toulavého chování. V tomto období jsou larvy injektovány sterilním entomologickým špendlíkem nebo entomologickým špendlíkem namočeným v bakteriální suspenzi (*E.coli*, *Staph. aureus*). Za 24 hod je z indukovaných larev izolována hemolymfa. Hemolymfa je rozdělena na hrubé frakce, které jsou dále chromatograficky děleny. RP-HPLC izolované frakce jsou dále podrobeny charakterizaci fyzikálně chemickými metodami: UV-VIS spektroskopie, aminokyselínová analýza, hmotnostní spektroskopie (MALDI), SDS elektroforéza, tryptický digest a sekvenace. U vybraných izolovaných frakcí je zjišťována antimikrobiální aktivita proti bakteriím *E.coli* a *Staph. aureus*.

Tato práce je podporována výzkumným záměrem AV OZ 4055 905.

LITERATURA

1. Hancock R. E. W.: Lancet 349, 418 (1997).
2. Teuber M.: Cell. Mol. Life Sci. 56, 755 (1999).
3. Tan Y. T., Tillett D. J., McKay I. A.: Mol. Med. Today 6, 309 (2000).
4. Dimarcq J. L., Hunneyball I.: Drug Discov. Today 8, 107 (2003).

AKTIVACE SEKRETOVANÝCH ASPARTÁTOVÝCH PROTEAS KVASINKY *Candida parapsilosis*

J. DOSTÁL

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, Praha 6, 166 10

V posledních letech na celém světě dramaticky narůstá výskyt mykotických infekcí způsobených kvasinkami rodu *Candida*. Jedním z významných zástupců této skupiny je *C. parapsilosis*. Mezi virulentní faktory u *C. parapsilosis* řadíme schopnost produkce extracelulárních aspartátových proteas (Saps). V genomu *C. parapsilosis* byla doposud prokázána přítomnost tří genů kódujících Saps (SAPP1-3). Mechanismus, jakým probíhá aktivace jednotlivých proteas z neaktivního proenzymu, nebyl doposud u *C. parapsilosis* popsán.

Naši pozornost jsme soustředili na izoenzymy Sapp1p a Sapp2p. Ty byly exprimovány v buňkách *E. coli* a pomocí chromatografických metod přečištěny. Aktivace obou izoenzymů probíhala nejprve autokatalyticky v kyselém prostředí. Po dvou hodinách aktivace Sapp1p byl výsledkem vznik maturního proteinu, který byl však o jednu aminokyselinu kratší než autentická Sapp1p izolovaná přímo z *C. parapsilosis*. U Sapp2p probíhal autoaktivací proces velmi pozvolna a k úplné aktivaci došlo až po třech dnech. Vzniklý protein byl o osm aminokyselin delší a vykazoval nízkou proteolytickou aktivitu ve srovnání s autentickou Sapp2p. V modelu tzv. „asistované aktivace“ proenzymu byl při analýze použit trypsin, nahrazující serinovou processingovou proteasu z *C. parapsilosis*. Propeptid byl v tomto případě u obou izoenzymů odštěpen v očekávaném místě.

Z výsledků je zřejmé, že přestože je sekvenční podobnost obou izoenzymů (Sapp1p, Sapp2p) vysoká, jejich způsoby aktivace a substrátové specifity jsou velmi rozdílné.

SYNTEZA DERIVÁTŮ ELIPTICINU A VÝPOČTY JEJICH INTERAKCÍ S PÁRY BÁZÍ DNA (*AB INITIO* A EMPIRICKÉ POTENCIÁLY)

MARTIN DRAČÍNSKÝ^a, JAN SEJBAL^a a OBIS D. CASTAÑO^b

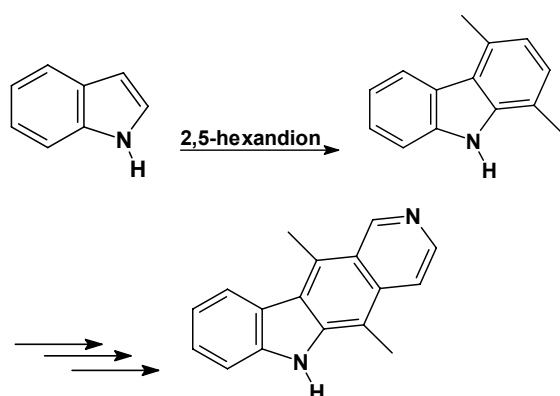
^aKatedra organické chemie a radiochemie PřF UK, Albertov 6, 12843 Praha 2, ^bDepartamento de química física, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Španělsko martindraca@yahoo.com

Elipticin a jeho deriváty (zejména 9-hydroxyderiváty) jsou protinádorová léčiva¹. Dosud není znám mechanismus jejich působení, silná vazba na DNA (zejména interkalace) je však nutnou podmínkou jejich účinku².

Je známa celá řada metod přípravy elipticinu a jeho derivátů^{3,4}, žádná však není zcela univerzální pro přípravu různě substituovaného základního skeletu. Jako nejvhodnější se ukázala syntéza vycházející z indolu a 2,5-hexandionu. Tímto způsobem jsou v jednom reakčním kroku vybudovány kruhy A, B a C elipticinu.

Jednou z možností, jak studovat interakce DNA s interkalátory je výpočetní chemie. Nejjednodušší model pro popis interkalujících systémů je jeden pár bází a jedna molekula interkalátoru⁵. I pro tento jednoduchý model jsou výpočty interakční energie *ab initio* velmi náročné (jak časově, tak na počítačové vybavení) a pro rozsáhlejší systémy jsou zcela neproveditelné. Empirické potenciály se běžně používají pro výpočet geometrií a dalších vlastností (včetně termodynamických) a lze je použít i v případě velkých molekul (DNA, proteiny).

V této práci byly provedeny výpočty *ab initio* interakční energie pěti různých derivátů elipticinu s páry bází DNA (adenin-thymin a guanin-cytosin) a byla zkoumána závislost interakční energie na vzdálenosti mezi interkalátorem a párem bází a na úhlu pootočení mezi nimi. Výsledky byly porovnány se třemi různými empirickými potenciály a byla vyhodnocena účinnost jednotlivých potenciálů.



LITERATURA

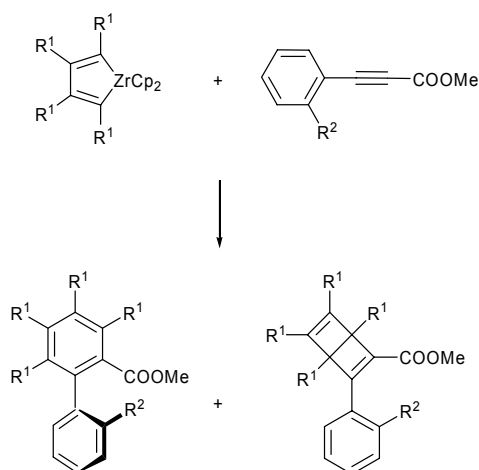
1. Fosse P., Rene B., Charra M., Paoletti C., Saucier J. M.: *Mol. Pharm.* **42**, 590 (1992).
2. Auclair C.: *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 1(1987).
3. Gribble G. W., Saulnier M. G.: *Heterocycles* **23**, 1277 (1985).
4. Barone R., Chanon M.: *Heterocycles* **16**, 1357 (1981).
5. Řeha D., Kabeláč M., Ryjáček F., Šponer J., Šponer J. E., Elstner M., Suhai S., Hobza P.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3366 (2002).

PŘÍPRAVA ATROPOIZOMERNÍCH BIARYLŮ POMOCÍ CYKLOTRIMERIZACE ALKYNŮ

LENKA DUFKOVÁ a MARTIN KOTORA*

Přirodovědecká fakulta UK, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, kotora@natur.cuni.cz

Schéma 1



Cyklotrimerizace je alternativní možností přípravy polysubstituovaných atropoizomerních biarylů vedle tradičně

využívaných cross-couplingových reakcí. Při cyklotrimerizaci dochází ke vzniku vysoce substituovaných arenů ze tří různých alkyňů. V případě, že jeden z alkyňů je ortho-substituovaný arylalkyn, lze očekávat vznik potenciálně atropoizomerních biarylů.

Reakcí tetraalkylsubstituovaných zirkonacyklopentadienů s ortho-arylpropynoáty v přítomnosti stechiometrického množství CuCl^1 nebo $\text{NiBr}_2(\text{PPh}_3)_2$ (cit.²) dochází ke vzniku biarylů z alkyňů. Reakce v přítomnosti $\text{NiBr}_2(\text{PPh}_3)_2$ se nijak nevymykaly z předpokládaného průběhu (schema 1), nicméně v případě reakcí s CuCl byl kromě biarylů pozorován i vznik příslušných Dewarových benzenů. Jejich tvorba je důkazem odlišného, dosud nepozorovaného, reakčního mechanismu.

Tímto postupem jsme připravili řadu 2,2'-disubstituovaných potenciálně atropoizomerních biarylů v přijatelných výtěžcích. Navíc byl objeven další možný reakční mechanismus rozkladu zirkonacyklopentadienů.

LITERATURA

1. (a) Takahashi T., Xi Z. F., Kotora M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 361. (b) Takahashi T., Xi Z. F., Yamazaki A., Liu Y. H., Nakajima K., Kotora M.: *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 1672 (1998).
2. Takahashi T., Tsai F. Y., Li Y. Z., Nakajima K., Kotora M.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 11093 (1999).

MICROTUBULES DISARRAY RESULTS IN HUMAN GLUCOCORTICOID RECEPTOR DEGRADATION IN HeLa CELLS

ZDENĚK DVOŘÁK^a, MARTIN MODRIANSKÝ^a, PATRICK MAUREL^b, and JEAN-MARC PASCUSSE^b

^aInstitute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 3, 77515 Olomouc, Czech Republic; ^bCNRS - INSERM - UI28, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier, France.

The role of microtubules in steroid hormone dependent hGR activation is not fully understood yet. It was demonstrated recently that colchicine down-regulates hGR driven genes in primary human hepatocytes by a mechanism involving inhibition of hGR nucleo-cytoplasmic shuttling. In search of further reason of hGR inactivation in addition to inhibition of its translocation, we used HeLa cells as a model, since they possess endogenous and functional hGR. We bring the evidence that microtubules disarray in HeLa cells by three structurally different microtubule disrupting compounds (MDC): colchicine, nocodazole, and vincristine, results in rapid time- and dose-dependent hGR protein degradation. Proteasome-ubiquitine pathway was found to be involved in degradation process as revealed by its reversibility by proteasome inhibitor MG132 and increased level of ubiquitinated hGR protein in cells pre-treated with MG132 prior to the MDCs treatment. On the other hand, degradation was observed for neither wt-hGR nor hGR mutants S226A and K419A in transiently transfected COS-1 cells. Thus, proteasome-ubiquitine mediated hGR degradation following microtubule disruption is the main reason for hGR inactivation

in HeLa cells and may be true for other cell types. Taking in account the time course experiments, the hGR degradation precedes inhibition of nucleo-cytoplasmic shuttling.

This work was supported by INSERM postes verts grant CS/RN/02/no1442 and MSM 151100003.

FYZIOLOGICKÉ ASPEKTY BIODEGRADACE FENOLICKÝCH LÁTEK – POROVNÁNÍ MODELOVÉ KVASINKY A BAKTERIE

ARIANA FIALOVÁ

*Sevapharma, a.s. Korunní 108, CZ-101 03, Praha 10, Vysoká škola chemicko-technologická, ÚKCHB, Technická 5, CZ-166 28, Praha 6
fialovaa@centrum.cz*

Aromatické látky na bázi fenolu mohou být kontaminující složkou životního prostředí, kam se dostávají z odpadů z průmyslu, havárií a starých zátěží. Fenoláty jsou jednou ze složek ropy a ropných produktů, fenol se vyskytuje v odpadech z farmaceutického, koželužného a petrochemického průmyslu. Biodegradační metody v kombinaci s fyzikálně-chemickými principy jsou jednou z efektivních a ekologických variant, jak odstranit tyto toxické látky z kontaminovaných lokalit.

Se zájmem poznat biochemické pozadí biodegradací a optimalizovat tyto procesy byla provedena řada mikrobiologických a biochemických testů. Pro tyto účely byly vybrány jako modelové mikroorganismy na fenoláty adaptovaná kvasinka *Candida maltosa* a sbríková bakterie *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595. Tyto dvě populace byly podrobeny řadě biodegradačních experimentů na různé aromáty (fenol, katechol, resorcinol, *p*-kresol, DNP, *p*-hydroxybenzoát, hydrochinon, salicylát, benzoát, *p*-chlorfenol aj.), z nichž většinu je schopná alespoň jedna z populací degradovat.

Populace byly podrobeny několikaleté adaptaci na vysoké koncentrace fenolu (až 1,7 g.l⁻¹ v médiu) a porovnány schopnosti a fyziologické parametry populací před a po adaptaci.

V zájmu objasnění mechanismů degradace byly stanovovány klíčové enzymové aktivity (fenol hydroxylasa, katechol 1,2-dioxygenasa, benzoát 1,2-monooxygenasa) a průběhy jejich indukce, aktivit a substrátové specifity ve formě hrubého bezbuněčného extraktu byly zkoumány v souvislosti s degradačními drahami testovaných polutantů.

S cílem zvýšit růstové a degradační rychlosti byly testovány přísady různých látek (glukosy, resorcinolu, huminových preparátů), které mohou mít za určitých podmínek pozitivní vliv na efektivitu biodegradačních procesů.

Dosažené výsledky, porovnávací fyziologické aspekty biodegradací fenolátů u modelové kvasinky a bakterie, mohou sloužit nejen jako bližší charakteristika vlastností a možností využití obou testovaných mikrobiálních populací, ale i jako podklad pro další studium enzymového vybavení v souvislosti s výzkumem cílených genetických úprav daných kmenů.

STUDIUM TVORBY RETROVIROVÝCH KAPSID JAKO NOSIČŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN

ŠÁRKA HAUBOVÁ, PAVEL ULBRICH a TOMÁŠ RUML

*Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
haubovas@vscht.cz*

Studium retrovirů nabývá v poslední době na významu nejen v souvislosti s chorobou AIDS, ale i z důvodu jejich schopnosti vbalovat do svých částic nukleové kyseliny. Porozumění procesu tvorby retrovirových kapsid a mechanismu inkorporace nukleových kyselin může výrazně přispět k dalšímu využití těchto systémů pro terapeutické účely. Naše práce je zaměřena na studium tvorby nezralých kapsid Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV) v *in vitro* systému. M-PMV je vhodným modelem pro studium tvorby kapsid a jejich zrání, jelikož tvorba nezralé kapsidy, intracelulární transport těchto nezralých částic a pučení jsou časově i prostorově oddělené procesy. Retrovirový polyproteinový prekurzor Gag obsahuje strukturální proteiny, které mají klíčové postavení při řízení a tvorbě retrovirových částic, a to matrixový protein (MA), fosfoprotein (PP), protein p12, kapsidový protein (CA), nukleokapsidový protein (NC) a protein p4.

V naší laboratoři byly nalezeny podmínky, při kterých se ze strukturálního prekurzoru Gag i jeho delečních mutantů tvoří *in vitro* správně sbalené kapsidy. Zaměřili jsme se na minimalizovanou doménu Gag, a to na fúzní kapsidový a nukleokapsidový protein, který obsahuje domény zodpovědné za interakce při skládání kapsidy. Sledovali jsme vlastnosti jak proteinu CANC, tak i proteinu CANC bez *N*-koncového prolinu, jelikož bylo již dříve zjištěno, že *N*-koncový prolin má zásadní vliv na tvar vznikajících částic. Byly studovány vlivy pH, koncentrace zinečnatých iontů a iontové síly a vlivy přítomnosti oligonukleotidů a RNA na tvorbu nezralých kapsid *in vitro*. Bylo zjištěno, že oligonukleotidy a vybrané nukleové kyseliny jsou do částic účinně inkorporovány a jejich přítomnost výrazně usnadňuje tvorbu kapsid. Velikost a tvar vznikajících kapsid byly sledovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Schopnost účinně inkorporovat do vznikajících kapsid nukleovou kyselinu může být v budoucnu využita při vývoji vektorů pro genové terapie. K tomuto přispívá i skutečnost, že lze k *N*-koncové sekvenci CA-NC připojit libovolný peptid, který může sloužit ke směrování kapsid do cílových tkání, aniž by byla porušena schopnost skládat kapsidy.

Práce byla podpořena granty MŠMT LNOOA079 a CEZ:J19/18:223300006.

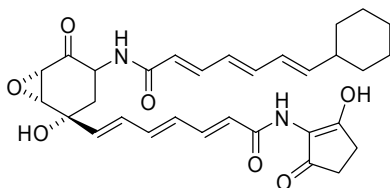
STUDIUM BIOSYNTÉZY C₅N JEDNOTKY ANTIBIOTIK MANUMYCINOVÉHO TYPU

KATEŘINA HEJDUKOVÁ, KATEŘINA PETŘÍČKOVÁ a MIROSLAV PETŘÍČEK

Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky,
Videňská 1083, 142 20 Praha 4
hejkat@biomed.cas.cz

Kyselina 5-aminolevulová (5-ALA) je prekurzorem pyrolů i tzv. C₅N jednotky (viz vzorec, část odpovídající 2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enonu) specifické pro antibiotika manumycinového typu. Na základě prohledávání genomu několika streptomycetových kmenů, zaměřeného na přítomnost genů charakteristických pro obě biosyntetické cesty 5-ALA, tzv. C₅ a C₄ cesty, jsme prokázali, že zatímco 5-ALA potřebná na tvorbu pyrolů je poskytována C₅ cestou, 5-ALA vznikající C₄ cestou je využívána výhradně pro produkci manumycinových antibiotik. Gen *als*, kódující klíčový enzym C₄ cesty, byl využit k naklonování kompletního shluku genů pro biosyntézu antibiotika asukamycinu.

Dále jsme se zaměřili na detailnější popis mechanismu biosyntézy manumycinových antibiotik, konkrétně na biosyntézu C₅N jednotky. Cílem bylo naklonovat a exprimovat v *E. coli* geny pravděpodobně zodpovědné za syntézu a cyklizaci ALA za vzniku C₅N jednotky a ověřit jejich enzymovou aktivitu. Geny *als* (kódující aminolevulinát syntázu) a *ald* (kódující aldolázu) byly klonovány do expresních vektorů pQE31 a pMAL-c2. Translační produkty obou zmíněných genů byly následně purifikovány pomocí afinitní chromatografie a použity pro ověření navržené funkce těchto genů.



Antibiotikum manumycinového typu – asukamycin

LITERATURA

- Hu Y.: Kandidátská disertační práce, University of Washington, Washington 2000.

MECHANISMUS PŮSOBENÍ ALOSTERICKÝCH MODULÁTORŮ METABOTROPNÍCH GLUTAMÁTOVÝCH RECEPTORŮ

VERONIKA HLAVÁČKOVÁ, JEAN-PHILIPPE PIN a JAROSLAV BLAHOŠ

Oddělení molekulární farmakologie, ÚEM AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
hlavackv@biomed.cas.cz

Hlavní excitační neuropřenašeč glutamát vyvolává a ovlivňuje synaptickou odpověď v nervovém systému aktivací dvou typů receptorů. Vazbou na tzv. ionotropní receptory způsobuje otevření kanálků pro Ca²⁺, a tím depolarizaci membrány neuronů. Druhým typem jsou receptory spřažené s G-proteiny (GPCR – G-protein Coupled Receptor) nazývané

metabotropní glutamátové receptory (mGluRs), které modulují signalizaci mezi neurony. Dodnes bylo vyklonováno na 8 podtypů mGluRs, které jsou podle sekvenční podobnosti, farmakologických a biochemických vlastností rozděleny do tří skupin. Pro svou farmakologickou rozmanitost a díky rozdílné expresi a lokalizaci pre- i postsynaptické jsou mGluRs slibným cílem pro vývoj nových léků, které by se uplatnily v léčbě mnoha neurologických onemocnění.

V současné době byla uznána hypotéza, že GPCRs různých typů mohou vytvářet funkční hetero- či homodimery nebo vyšší oligomery. Dimerizace ovlivňuje farmakologické vlastnosti receptorů, přenos signálu přes G-proteiny do nitra buňky, buněčný transport a další procesy. Na rozdíl od heteromerního GABAB receptoru, mGluRs vytvářejí homodimery, ačkoli oba receptory patří do společné třetí rodiny GPCRs. Zda se přenosu signálu a tedy vazby G-proteinů účastní obě podjednotky nebo jen jedna jako v případě GABAB receptoru, nás zajímalo v první části naší studie. Abychom mohli kontrolovat povrchovou expresi receptorů, využili jsme poznatků právě o GABAB receptoru. Tento receptor je tvořen podjednotkou GB1 a GB2. Podjednotka GB1 není schopna se dostat na povrch bez pomoci GB2 podjednotky a díky retenčnímu signálu v jejím C-konci je zadržována v endoplazmatickém retikulu. Pro objasnění přenosu signálu jsme také využili skutečnosti, že 2. a 3. intracelulární klička (i3) jsou důležité pro aktivaci G-proteinů. Bodovou mutací v i3 jsme zabránili přenosu signálu určité podjednotky a mohli tak sledovat přenos signálu do nitra buňky druhou, nemutovanou podjednotkou.

V druhé části naší práce jsme využili nových typů sloučenin, alosterických modulátorů. Tyto molekuly, ať už pozitivní nebo negativní alosterické modulátory, se váží do heptahelikální domény (HD), místa odlišného od vazebného místa pro glutamát (N-konec). Jaký je ale mechanismus působení alosterických modulátorů pouze na jednu podjednotku nebo celý dimer nebylo dosud objasněno. K zodpovězení této otázky jsme navrhli a vytvořili několik typů mutantních mGlu1 receptorů s vazebným místem pro negativní alosterický modulátor mGlu5 receptoru, MPEP (2-methyl-6-(fenyloxyethyl)pyridin) a sledovali jeho vliv na různé kombinace podjednotek receptorů v porovnání s negativním alosterickým modulátorem mGlu1 receptoru – BAY36-7620 [(3aS,6aS)-6a-naphtalen-2-ylmethyl-5-methyliden-hexahydro-cyclopental[c]furan-1-on].

Naše výsledky ukázaly, že obě podjednotky mGluR1 jsou schopny aktivovat G-proteiny a stejně tak každá z mutovaných podjednotek váže jednu molekulu MPEPu. Dokázali jsme také, že až při vazbě 2 molekul antagonisty na jeden dimer je teprve tento receptor antagonizován. Využití alosterických modulátorů v léčbě neurologických onemocnění má své výhody. Díky specifické vazbě do transmembránové domény vykazují tyto látky 1) absolutní podtypovou selektivitu, 2) zachovávají prostorové i dočasné uspořádání receptoru, a tak jsou schopny ovlivnit již existující fyziologickou signalizaci.

Tento projekt byl podporován GA ČR (301/03/1183 a 309/03/H095) a GA AV (B5039402).

ASSOCIATION OF EF-Tu WITH BIOLOGICAL MEMBRANES AND ITS AGGREGATION INCREASES FACTOR'S NANO-SWITCH POTENTIAL

MARTIN HOLUB, LADISLAVA KALACHOVÁ, SILVIE BEZOUŠKOVÁ, and JAROSLAV WEISER

*Mikrobiologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
holub@biomed.cas.cz*

Protein synthesis elongation factor Tu (EF-Tu) represents one of the major components of translation system in prokaryotes. It participates on correct positioning of the incoming aminoacyl-tRNA on the ribosome where polypeptide chain is synthesised. Besides this, EF-Tu is proposed to function in other parts of the cell metabolism as well. The protein is represented by three-domain structure and behaves like a typical G (guanine nucleotide binding) protein. Interaction of flexible domain 1 containing GDP/GTP binding pocket with more rigid domains 2 and 3 allows it to work as a molecular switch changing between “on” and “off” conformation upon binding of GDP or GTP. There are available specific inhibitors of EF-Tu, which are able to “freeze” the protein in either “on”, or “off” conformation as an example can be mentioned kirromycin or pulvomycin.

There have been described several post-translation modifications of the protein some of them playing the role in translation, others important for its potential functions outside of the elongation cycle. In *E. coli*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* a part of EF-Tu population, which is located on the membrane, can be methylated in response to starvation for an essential nutrient.

E. coli and *T. thermophilus* EF-Tu were found to be phosphorylated *in vivo*, and the phosphorylated fraction remained stable under different conditions. Since the phosphorylated residue (Thr-382) is conserved in all known EF-Tu corresponding sequences from other species, the phosphorylation might be a common phenomenon and the phosphorylated form of EF-Tu might play a fundamental role in the physiology of all organisms. EF-Tu was also described recently as a major component of cytoskeleton like structures in *Mycoplasma pneumoniae* cells and most importantly it was identified there as a protein binding fibronectin which is a multifunctional protein interacting with molecular motor like structures in eukaryotes.

In order to study potential role(s) of EF-Tu post-translation modifications in *Streptomyces* we studied its heterogeneity, content and distribution in several *Streptomyces* strains and compared it with that in *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. For that purpose we have prepared membrane, ribosomal and soluble cell fractions by differential centrifugation and EF-Tu was detected in the fractions by western blot technique. Using 2D-electrophoresis of proteins we analysed cell membrane proteomes in several *Streptomyces* strains during development and compared it with that of non-differentiating *Mycobacterium*.

We described previously a spontaneous polymerisation of EF-Tu from *Streptomyces aureofaciens*, which might serve as a protective mechanism for EF-Tu present in spores or

enables the protein to play a structural role. Aggregates are formed under physiological conditions and give rise to filamentous structures large enough to be visible in the light microscope. We have developed simple and effective method for purification of large amounts of the aggregated protein, which retains its nucleotide binding activity. We found that two closely related strains of *Streptomyces aureofaciens* contain EF-Tu capable of spontaneous aggregation. We purified EF-Tu from both strains using above mentioned method and use them in comparative studies in order to understand better the structural and functional basis of this phenomenon. Using 2D electrophoresis of purified proteins and their hydrolysis products we analysed their structural differences and heterogeneity resulting from their post-translation modifications.

NOVÉ MOŽNOSTI *ON-LINE* PREKONCENTRACE ANALYTŮ V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

JANA HORÁKOVÁ, VÍTĚZSLAV MAIER a JURAJ ŠEVČÍK

Katedra analytické chemie Přírodovědecká Fakulta Univerzity Palackého, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc

Metody kapilární elektroforézy (CE) se dnes stávají čím dále častěji využívanějšími separačními technikami. Jejimi hlavními výhodami jsou nenáročná instrumentace, nízká spotřeba vzorku a zejména vysoká separační účinnost. Slabinou CE je nedostatečná koncentrační citlivost, zvláště při použití UV-VIS detekce. K částečné eliminaci tohoto problému slouží *on-line* prekoncentrační techniky založené na využití principů přechodné izotachoforézy, stacking nebo sweeping efektu.

Prezentovaná nová kapilárně elektroforetická *on-line* prekoncentrační technika umožňuje stanovovat nanomolární koncentrace slabých elektrolytů pomocí klasických UV-VIS detektorů. Vhodnost navrženého postupu je demonstrována na stanovení benzoové a sorbové kyseliny ve vzorcích stolního oleje a ovocné šťávy. Filozofie *on-line* prekoncentrace je založená na vhodném experimentálním uspořádání dvou pracovních elektrolytů, které se liší svým složením a použitým pH. Na elektrolytickém rozhraní těchto dvou pracovních elektrolytů dochází k elektroforetické imobilizaci stanovených analytů. Po dostatečném „nakoncentrování“ analytů je jejich následná mobilizace a separace umožněna namigrováním micelotvorních látek do separační kapiláry.

Vlastní metoda se může z metodického hlediska rozdělit na dvě fáze: akumulaci a mobilizaci. V námi demonstrovaném případě jsou ve fázi akumulaci použité modelové analyty (benzoová a sorbová kyselina) rozpuštěny v borátovém pufru o pH 9,5. Při tomto pH dochází k jejich ionizaci. Protože obě kyseliny jsou slabými elektrolyty, jsou záporně nabitě a migrují ke kladně nabitě elektrodě. Při této migraci „naráží“ molekuly kyselin (disociované v borátovém elektrolytu) na rozhraní fosfátového pufru o pH 2,5. Nízká hodnota pH tohoto elektrolytu způsobí jejich deionizaci (ztratí náboj), a tudíž přestanou v kapiláře v tomto místě migrovat. Po dostatečně dlouhé době elektrokinetického dávkování vzorku dochází k

zakoncentrování analytů v pH rozhraní. Následně je nutné nakoncentrované neionizované analyty rozseparovat a nechat domigrovat k detektoru. Nastupuje druhá fáze – mobilizační, při které se analyty „rozpohybují“ pomocí zavedení SDS molekul do kapiláry v koncentraci, která umožní tvorbu jejich micel. Protože v námi demonstrovaném případě jsou SDS micely záporně nabitě a jsou schopny do svých molekul inkorporovat v daném elektroforetickém prostředí neionizované molekuly benzoové a sorbové kyseliny, dochází k jejich separaci a následné detekci. Identifikace benzoové a sorbové kyseliny probíhá na základě rozdílných vlnových délek (benzoová kyselina při 200 nm a sorbová kyselina při 260 nm).

Námi vyvinutá *on-line* prekoncentrační technika kapilární elektroforézy umožňuje stanovení velmi nízkých koncentrací slabých elektrolytů (v námi demonstrovaném případě $LOQ = 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$). Vzhledem ke stabilitě elektrolytického rozhraní metoda umožňuje až 4-hodinový elektrokinetický nástřik modelových analytů.

Autoři děkují za podporu výzkumnému záměru MSM 153100013 Ministerstva školství ČR.

TISSUE SPECIFIC ALTERNATIVE SPLICING IN THE GENE FOR AHP5, A HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSFER PROTEIN FROM *Arabidopsis thaliana*

J. HRADILOVÁ^a a B. BRZOBOHATÝ^{b*}

^aLaboratory of Plant Molecular Physiology, Masaryk University Brno, Faculty of Science, Kotlářská 2, 611 37, Brno, ^bInstitute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 61265 Brno, Czech Republic.

A multistep two-component system is involved in signal transduction in *Arabidopsis* and consists of a sensory histidine kinase, a phosphotransfer factor and a response regulator. Factors with histidine-containing phosphotransfer domains (AHPs) transfer the phosphoryl group from membrane localised receptor (histidine kinases) to effectors (response regulators) localised in the nucleus. Five AHPs have been identified in *Arabidopsis*. AHPs are small proteins (14,5 – 18 kDa), with a predicted acidic isoelectric point (5.5–3.9) and a typical phosphotransfer domain, including the conserved sequence XHQQKGSSXS. AHP5 comprises six exons and five introns. RNA was prepared using Trizol reagent from different plant tissues: leaves, roots, shoot, flowers, siliques and seedlings. Using RT-PCR we detected two products (AHP5s and AHP5l). Following sequencing, the second intron was found intact at position 211 bp in the longer product (AHP5l). Real time RT-PCR showed that the ratio between spliced and nonspliced products is in tested tissues significant different. Other AHPs (AHP1, AHP2, AHP3 and AHP4) were established to be normally spliced. AHP5l comprises two open reading frames, and in the longer of them the phosphotransfer domain is preserved intact as the original reading frame is not altered. This protein has a predicted molecular mass of 11.7 kDa and the putative isoelectric point is 7.72.

PROTILÁTKY PROTI RECEPTORŮM SPŘAŽENÝM S G - PROTEINEM

D. HÝBLOVÁ^{a,b}, L. VESELSKÝ^b, J. VELEK^c a B. ŽELEZNÁ^b

^aPřírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, ^bÚstav molekulární genetiky, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 37 Praha 6, ^cÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 hyblova.dasa@seznam.cz

Extracelulární části angiotenzinového (AT1, AT2) a trombinového receptoru (TR) pracují spřažené s G-proteinem. Tyto receptory mají komplikovanou strukturu se sedmi transmembránovými úseky. Snažili jsme se detegovat receptory AT1, AT2 a TR v lyzátu buněčných membrán. K tomu jsme využili protilátky připravené proti syntetickým peptidům odpovídajícím určité sekvenci extracelulární části těchto receptorů. Adsorpci antigenního peptidu na připravené protilátky jsme potvrdili jejich specifitu. Připravené protilátky lze použít k imunoprecipitaci receptorů z lyzátů buněčných membrán a lze jimi rovněž sledovat expresi receptoru na úrovni proteinu za různých fyziologických podmínek.

Připravili jsme velké množství protilátek proti vybraným sekvencím extracelulárních částí receptoru AT1 (sekvence 169-188, 14-23), AT2 (sekvence 184-195, 193-204) a trombinového (sekvence 44-52, 244-268). Byly připraveny syntézou jako násobné antigenní peptidy na lyzinovém heptameru. Těmito peptidy jsme opakovaně imunizovali králíky a z jejich krve izolovali sérum. Získané polyklonální protilátky jsme testovali imunochemickou metodou ELISA. Z orgánů dospělých potkanů kmene Wistar a z nenarozených embryí myši jsme izolovali buněčné membrány a jejich lyzát rozdělili pomocí SDS elektroforézy, přenesli z gelu na NC-membránu (Western blot), kde jsme je detegovali připravenými protilátkami. Jako sekundární protilátku jsme použili prasečí protilátku proti králičímu imunoglobulinu značenou křenovou peroxidasou. Substrátem byl H₂O₂, detekci jsme prováděli ECL nebo chlornaftolem. K imunoprecipitaci lyzátů buněčných membrán v neionogenním detergentu jsme použili Protein G-Sepharosu CL 4-B.

Z připravených polyklonálních králičích protilátek jsme vybrali ty, které mají dostatečně vysoký titer, rozeznávají jak peptid, proti kterému byly připraveny, tak receptor z lyzátu buněčných membrán a po imunoabsorpci antigenním peptidem tuto schopnost ztrácejí. Pro AT1 je to protilátka proti peptidu (169-188), pro AT2 je to protilátka proti peptidu (184-195) a pro TR je to protilátka proti peptidu (44-52).

Pomocí protilátky proti AT1 receptorům jsme zjistili vyšší expresi AT1 receptoru na úrovni proteinu v tukové tkáni u vasektomovaných potkanů proti normálním zvířatům. U potkanů vystavených chladovému stresu jsme nepozorovali výrazné změny na úrovni AT1 AT2 proteinu v tukové tkáni, ačkoli byly předtím zaznamenány změny na úrovni mRNA pro tyto receptory.

Imunoabsorpcí se nám podařilo potvrdit specifitu protilátek připravených proti sekvencím receptoru AT1 (sekvence 169-188), AT2 (sekvence 184-195) a trombinového (sekvence 44-52). Do budoucna bychom chtěli receptor

imunoprecipitovaný jednou protilátkou detegovat protilátkou proti jiné části receptoru a získat imunoprecipitát v takovém množství, aby jej bylo možno z blotu sekvenovat, a tak plně potvrdit specifitu protilátky.

PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE ENZYMŮ MODIFIKOVANÉ ORTHO-METABOLICKÉ DRÁHY BAKTERIÁLNÍHO KMENE *Achromobacter xylosoxidans* A8

**ZDENĚK CHODORA^a, VĚRA JENČOVÁ^a, HYNEK
STRNAD^a, MILUŠE HROUDOVÁ^a a VÁCLAV PAČES^b**

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav
molekulární genetiky, AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 28
Praha 6
chodoraz@vscht.cz

Jedním z hlavních ekologických problémů současnosti je kontaminace životního prostředí halogenderiváty aromatických uhlovodíků, jako jsou například polychlorované bifenyly (PCB), chlorbenzoáty (CB) nebo chlorfenoxycetáty. V nedávné době byla izolována řada bakterií schopných využívat chloraromatické sloučeniny jako alternativní zdroj uhlíku a energie. Většina těchto bakterií transformuje za aerobních podmínek tyto sloučeniny na chlorkatecholy, které jsou některými kmeny bakterií metabolizovány pomocí enzymů modifikované *ortho*-metabolické dráhy na běžné buněčné metabolity. Tato dráha je tvořena čtyřmi enzymy: chlorkatechol 1,2-dioxygenasa, chlormukonát cykloisomerasa, (chlor)dienlaktón hydrolasa a (chlor)maleacetát reduktasa. Geny kódující tyto enzymy jsou obvykle lokalizovány na plasmidech. Znalosti získané studiem těchto metabolických drah mají využití při řízených bioremediacích oblastí kontaminovaných halogenderiváty aromatických uhlovodíků. Bakteriální kmen *Achromobacter xylosoxidans* A8 byl izolován z půdy kontaminované polychlorovanými bifenyly. Je schopen utilizace 2-chlor a 2,5-dichlorbenzoátu. Při sekvenční analýze plasmidové DNA pA81 tohoto kmene byl identifikován operon *mocpR-ABCD*, kódující enzymy modifikované *ortho*-metabolické dráhy. Za účelem funkční analýzy *mocpABCD* genů byly připraveny expresní vektory nesoucí jednotlivé *mocp* geny, které byly exprimovány v *E. coli* BL21(DE3). Pro všechny *Mocp* proteiny (*Mocp* A, *Mocp* B, *Mocp* C, *Mocp* D) byla vypracována purifikační schémata poskytující jednotlivé proteiny o homogenitě dostatečné pro enzymové analýzy. Byly provedeny základní charakteristiky těchto enzymů: stanovení optimální reakční teploty a pH, získání kinetických dat pro různé substráty (Km, Vlim), stanovení molekulové hmotnosti, podjednotkového složení a stanovení izoelektrického bodu.

BIOCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE FAKTORŮ PODÍLEJÍCÍCH SE NA REGULACI KONDENZACE CHROMATINU BĚHEM MEIOTICKÉHO DĚLENÍ

LUCIE JELÍNKOVÁ a MICHAL KUBELKA

Ústav živ. fyziologie a genetiky AV ČR, Rumburská 89, 277 21
Liběchov

Sbalení chromatinu do kompaktního chromosomu je komplexní proces, jehož se účastní mnoho faktorů. Faktory, které se podílejí na kondenzaci během mitotického dělení jsou popsány, ale existuje málo informací o průběhu kondenzace během meiotického dělení. Cílem práce je charakterizovat faktory, které se podílejí na regulaci kondenzace chromosomů během meiotického zrání prasečích oocytů.

Nejvýznamnějším faktorem zodpovědným za morfologické změny během meiotického dělení je tzv. MPF (M-phase promoting factor), což je komplex cyklin-dependentní kinasy *cdc2* a regulační podjednotky cyklinu B. Předpokládá se, že je klíčovým faktorem regulujícím přechod G2/M během buněčného cyklu všech buněk. S kondenzací chromatinu jsou spojovány modifikace histonů, především jejich fosforylace. V poslední době se ukazuje, že mnohem významněji než histon H1 (který byl původně považován za důležitý) je do tohoto děje zapojen histon H3 a jeho fosforylace na Ser 10, se kterou je spojována Aurora B kinasa. Dále se na kondenzaci podílí komplex pěti podjednotek nazývaný kondensin, ten je tvořen jádrem dimeru SMC proteinů (Structural Maintenance of Chromosome Proteins) a třemi podjednotkami nepatřící k SMC proteinům (CAP-D2, CAP-H, CAP-G); tyto podjednotky jsou fosforylovány. Fosforylace histonu H3 je důležitá pro nasednutí kondensinu na DNA, po němž následuje sbalování chromatinu za účasti ATP do nadšroubovicových struktur.

Sledovali jsme změny ve fosforylaci histonu H1 a H3, expresi Aurora B kinasy během meiotického zrání oocytů. Pomocí imunoblotu jsme sledovali fosforylaci histonu H3 na Ser 10 specifickou polyklonální protilátkou spolu s expresí Aurora B kinázy. Tyto změny jsme porovnali s aktivitou *Cdc2* kinasy. Změny ve fosforylaci H3 na Ser 10 jsme sledovali u oocytů kultivovaných jednak v kontrolním médiu, jednak za přítomnosti inhibitorů *cdk*-kinas (Butyrolactone I) a proteosyntézy (cycloheximide), a to s využitím imunoblotingu a kinasové esej. Expresi dvou členů kondensinového komplexu (CAP-D2 a CAP-H) jsme sledovali na úrovni mRNA metodou RT-PCR.

Zjistili jsme, že k aktivaci histonu H3, tedy fosforylaci na Ser 10, dochází ve stádiu MI (1. meiotická metafáze) a pokračuje do fáze MII (2. meiotická metafáze), ve stádiu GV (germinal vesicle – na počátku zrání) není histon H3 fosforylován (imunoblot a kinasová esej).

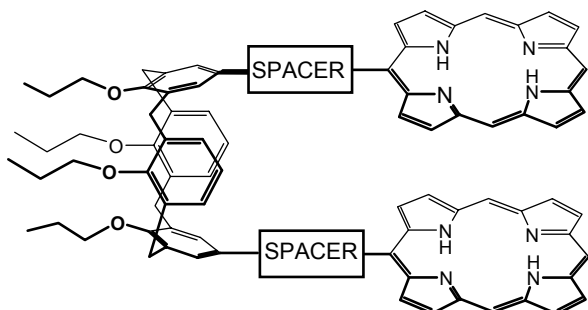
SYNTÉZA NOVÝCH CALIXARENOPORFYRINŮ A STUDIUM JEJICH KOMPLEXAČNÍCH VLASTNOSTÍ

MARTIN KÁŠ, IVAN STIBOR a PAVEL LHOTÁK

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,
166 28 Praha
kasm@vscht.cz

Tato práce se zabývá přípravou a studiem komplexačních vlastností nových calixarenoporfyriinových derivátů. Tyto konjugáty byly připravovány pro svou předpokládanou

schopnost interagovat s fullereny C60 a C70 a jako látky vhodné pro výstavbu dalších molekulárních senzorů.



Při studiu konjugátů calix[4]arenů a thiacalix[4]arenů s porfyriny byla objevena jejich schopnost komplexovat fullereny C60 a C70. Za interakce způsobující komplexaci fullerenu jsou odpovědné porfyrinové jednotky těchto konjugátů, zatímco calixarenový skelet slouží jako vhodné „molekulární lešení“ umožňující preorganizaci prostorového uspořádání molekuly. Sledován byl vliv tohoto prostorového uspořádání na sílu komplexace fullerenu. Komplexace byly sledovány pomocí ¹H NMR.

LITERATURA

1. Arimura T., Nishioka T., Ide S., Furube A., Murata S., Tachiya M.: *J. Chem. Research*. 2002, 333.
2. Dudič M., Lhoták P., Stibor I., Lang K., Prošková P.: *Org. Lett.* 5, 149 (2003).
3. Dudič M., Lhoták P., Stibor I., Dvořáková H., Lang K.: *Tetrahedron* 58, 5475 (2002).
4. Arimura T., Nishioka T., Ide S., Suga Y., Sugihara H., Murata S., Tachiya M.: *J. Photochem. Photobiol., A*. 145, 123 (2001).

INDUKCE LIPAS V KVASINKÁCH RODU GEOTRICHUM A STANOVENÍ JEJICH STEREOSPECIFICITY A SELEKTIVITY PRO NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY

ZDENĚK KEJÍK^a, MARIE ZAREVÚCKA^b, KATEŘINA DEMNEROVÁ^a a ZDENĚK WIMMER^b

^a Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Technická 5, 16628 Praha 6; ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 16610 Praha 6
zarevucka@uochb.cas.cz

α - a γ -Linolenové kyseliny jsou prekurzory ikosanoidů. Jejich deficit vede mimo jiné ke kardiovaskulárním chorobám. Běžně jsou tyto kyseliny dodávány potravou. U nemocných a starších osob je syntéza ikosanoidů značně snížena. Linolenové kyseliny je tedy nutno podávat ve zvýšených dávkách v potravinových doplňcích. Nejčastěji se užívají oleje, které obsahují tyto kyseliny v různých koncentracích v

závislosti na původu oleje. Jednou z možných metod¹ pro zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin je hydrolyza triacylglycerolů, obsahujících nenasycené mastné kyseliny, prováděná lipasami, které mají specifitu pro tento typ kyselin. Jako vhodné organismy pro získání lipas byly vybrány kvasinky *Geotrichum fragrans* 48 a *Geotrichum candidum* (0302, 4012, 4013). Pro indukci lipas byla použita dvě různá média s olivovým olejem jako induktorem. V médiu, které obsahovalo pepton jako zdroj dusíku, byla přednostně indukována extracelulární lipasa. Naopak v médiu, které obsahovalo močovinu jako zdroj dusíku, byla přednostně indukována lipasa vázaná na povrch buňky. Aktivované lipasy byly stabilizovány a bylo stanoveno jejich optimální pH, stereospecificita a selektivita vůči nenasyceným mastným kyselinám. Tyto enzymy budou dále použity pro obohacení jedné z frakcí získané enzymatickou hydrolyzou oleje ze semen černého rybízu o nenasycené mastné kyseliny.

Autoři děkují MŠMT za finanční podporu pomocí projektu COST D13.10 (součást mezinárodní pracovní skupiny COST D13/0014/01) a COST D30.001.

LITERATURA

1. Zarevúcka M., Vacek M., Wimmer Z., Stránský K., Koutek B., Demnerová K.: *Chem. Listy* 97, 206 (2003).

AEROBNÍ FOTOTROFNÍ BAKTERIE JAKO NOVÝ ČLÁNEK MOŘSKÉHO UHLÍKOVÉHO CYKLU

MICHAL KOBLÍŽEK^a, ZBIGNIEW S. KOLBER^b a PAUL G. FALKOWSKI^c

^aMikrobiologický ústav AV ČR, Opatovický mlýn, 379 81 Třeboň; ^bMBARI, 7700 Sandholdt Road, Moss Landing, CA 93901, USA; ^cInstitute of Marine and Coastal Sciences, Rutgers, New Brunswick, NJ 08901, USA

Nedávný objev přítomnosti aerobních fototrofních bakterií v tropickém Pacifiku vzbudil silný zájem o tuto skupinu mikroorganismů. Následná studie prokázala, že v oligotrofních vodách severovýchodního Tichého oceánu tvoří tyto organismy kolem 10 % mikrobiálního společenstva. Aerobní fototrofní představují malou podskupinu Proteobakterií. Obsahují fotosyntetická reakční centra tvořená bakteriochlorofylem a na rozdíl od svých blízkých příbuzných purpurových bakterií jsou striktně aerobní.

Sledovali jsme přítomnost fototrofních bakterií v různých lokalitách světového oceánu pomocí kinetické fluorometrie v infračervené oblasti. V Tichém oceánu (stanice ALOHA, Hawaii, USA) se množství bakteriochlorofylu pohybovalo kolem 1–2 pM, relativní podíl fototrofie analyzované z poměru množství pigmentů bakteriochlorofylu a chlorofylu byl kolem 2 %. V Černém a Baltském moři bylo pozorované množství bakteriochlorofylu vyšší (5–50 pM), ovšem poměr pigmentů byl pouze kolem 1 %.

Kolem 40 kmenů ftoheterotrofních bakterií bylo vyizolováno z různých oblastí světového oceánu. Na základě sekvenace genů 16S ribozomální podjednotky a fotosyntetického reakčního centra a s přihlédnutím k

fyzilogickým a biochemickým charakteristikám byly vyizolované kmeny zařazeny do dvou základních rodů *Roseobacter* a *Erythrobacter* náležejících do skupiny α -Proteobakterií. Pomocí kinetické fluorometrie a absorpční spektroskopie bylo prokázáno, že všechny izoláty obsahují funkční bakteriální reakční centra. Schopnost asimilace CO₂ byla prokázána pomocí inkorporace radioaktivního bikarbonátu. Na druhou stranu získané kmeny nebyly schopny čistě autotrofního růstu a vyžadovaly přítomnost organického substrátu. Pomocí současného měření respirace a fotosyntézy bylo zjištěno, že tyto organismy mohou částečně nahrazovat energii oxidativní fosforylace pomocí fotofosforylace. Fotosyntetická reakční centra tak slouží jako alternativní zdroj ATP. Tato metabolická strategie je zřejmě výhodná v mořském ekosystému charakteristickém omezenými zdroji živin. Výrazný podíl v pelagických bakteriálních společenstvech a fotoheterotrofní typ metabolismu signalizují významnou roli aerobních fototrofních bakterií v mořském uhlíkovém cyklu.

LITERATURA

1. Koblížek M., Beja O., Bidigare R. R., Christensen S., Benitez-Nelson B., Vetriani C., Kolber M. K., Falkowski P. G., Kolber Z. S.: Arch. Microbiol. 180, 327 (2003).
2. Koblížek M., Falkowski P. G., Kolber Z. S.: Deep Sea Res. Odesláno k publikaci.
3. Koblížek M., Sagan S., Kolber Z. S., Falkowski P. G.: Limnol. Oceanogr. Odesláno k publikaci.
4. Kolber Z. S., Van Dover C. L., Niederman R. A., Falkowski P. G.: Nature 407, 177 (2000).
5. Kolber Z. S., Plumley F. G., Lang A. S., Beatty J. T., Blankenship R. E., VanDover C. L., Vetriani C., Koblížek M., Rathgeber C., Falkowski P. G.: Science 292, 2492 (2001).

TKÁŇOVĚ SPECIFICKÉ ÚČINKY ANTIESTROGENŮ, ANTIGESTAGENŮ A FYTOESTROGENŮ U MYŠÍ

EVA KÖHLEROVÁ

Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4

V poslední době se zájem endokrinologů soustřeďuje na tzv. endocrine disruptors. Jsou to chemické látky, které mimikují nebo inhibují aktivity přirozených hormonů, nebo mění funkce nervového, imunitního a endokrinního systému. Výsledkem jejich působení v organismu může být rakovina prsu, varlat, prostaty a jiných orgánů, endometrios, poruchy reprodukce a anomálie sexuálního chování.

V současné době je celosvětovou snahou vypracovat vhodný model pro detekci hormonálních aktivit přirozených i syntetických látek. Na našem myším modelu jsme simultánně studovali biologické aktivity látek s vlastnostmi agonistů a antagonistů steroidních hormonů v různých cílových tkáních. Pokusy *in vivo* totiž umožňují posoudit biologické účinky agonistů, antagonistů i parciálních agonistů daleko přesněji než pokusy *in vitro*. Např. vazebné studie nerozlišují antagonisty od

agonistů, některé látky jsou aktivní v podmínkách *in vitro*, zatímco v podmínkách *in vivo* jsou bez účinku a naopak. Tkáňové kultury mohou reagovat podle druhu tkáně na stejný hormon různě a naopak některé buněčné linie mohou reagovat stejně na různé hormony.

Ke studiu byly použity outbrední myši kmene C3H/HeN. Zvířata byla ustájena ve zvěřinci při světelném režimu 12 h světlo/ 12 h tma, krmena nutričně kompletní peletovanou dietou a vodou *ad libitum*. Mladé samice a samci byli do pokusu zařazeni v 18 dnech věku. Samice, které byly použity jako dospělé, byly ovariektomovány mezi 21.–24. dnem věku. Dospělí samci byli kastrováni 10–20 dní před zařazením do pokusu. Zvířatům byly subkutánně aplikovány antiestrogeny, antigestageny, fytoestrogeny a diethylstilbestrol v 50 μ l olejového vehikula. Biologická aktivita těchto látek byla hodnocena podle růstu mléčné žlázy, dělohy, semenných váčků a sleziny. Růst mléčné žlázy byl hodnocen na základě stanovení procentického zastoupení epiteliálních struktur v celožlázových preparátech.

PŮSOBENÍ RESVERATROLU NA KVASINKOVÉ BUŇKY *Saccharomyces cerevisiae*

IRENA KOLOUCHOVÁ^a, KAREL MELZUCH^a, VLADIMÍR FILIP^b a JAN ŠMIDRKAL^b

^aÚstav kvasné chemie a bioinženýrství a ^bÚstav mléka a tuků, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilben) a ostatní polyfenolické látky přítomné v přírodních materiálech jsou v současné době v popředí světového zájmu díky svému příznivému účinku na lidský organismus. Tyto látky patří mezi antioxidanty. Jejich působení se dává do souvislosti s pozitivním ovlivněním metabolismu tuků a se snížením počtu kardiovaskulárních a nádorových onemocnění.

Z těchto důvodů byla resveratrolu věnována mimořádná pozornost a jeho obsah byl sledován ve vínech, rostlinách, ovoci a zelenině a také byl zkoumán jeho vliv na tkáňové kultury. Dosud se ale nikdo nezabýval jeho účinkem na mikrobiální populace, zejména na kvasinky, které se s resveratrole v průběhu procesu kvašení dostávají do kontaktu ve velice širokém rozmezí od desetin mg.l⁻¹ až po 10 mg.l⁻¹. Snažili jsme se proto zjistit vliv různých koncentrací resveratrolu na buňky *Saccharomyces cerevisiae* (a zároveň vliv rozpouštědla – ethanol, DMSO – pro resveratrol) a jeho působení na buňky v prostředí oxidativního stresu. Dalším hlediskem bylo hledání případného protektivního účinku resveratrolu, který byl nalezen při jeho přidávku u tkáňových kultur.

Stanovení resveratrolu bylo prováděno metodou HPLC s elektrochemickou detekcí a účinky resveratrolu na kvasinkové buňky byly sledovány pomocí růstových křivek a měřením aktivit enzymů, které mohou být ovlivněny oxidativním stresem nebo přítomností resveratrolu – peroxidasa, polyfenoloxidasa, katalasa, lakasa.

Bylo zjištěno, že resveratrol nemá ve zkoumaném rozmezí 50 μ g.l⁻¹ – 10 mg.l⁻¹ významnější vliv na růst buněk

Saccharomyces cerevisiae ssp. Malaga ani na diploidní laboratorní kmen *Saccharomyces cerevisiae* YF. Větší vliv má naopak použité rozpouštědlo pro resveratrol, kde zvláště vyšší koncentrace DMSO v médiu (5,5 %) způsobovala menší nárůst populace. Z hlediska oxidativního stresu je koncentrace peroxidu vodíku 0,1 % pro buňky *Saccharomyces cerevisiae* letální, ale při kultivaci buněk s resveratrolem tato koncentrace letální není. Dále bylo zjištěno, že v prostředí vyššího oxidativního stresu si buňka vytvořila vyšší množství proteinů a zvyšovala aktivitu katalasy. Z hlediska aktivit katalasy a lakasy má resveratrol protektivní účinek pro kvasinkovou buňku v podmínkách oxidativního stresu do koncentrace 0,5 mg.l⁻¹.

IZOLACE A CHARAKTERIZACE MEMBRÁNOVÉHO GLYKOPROTEINU CD36 ZE SRDEČNÍHO SVALU A KREVŇNÍCH DESTIČEK LABORATORNÍHO POTKANA

K. KONTROVÁ^a, J. ZÍDKOVÁ^a, V. ZÍDEK^b, K. MIKULÍK^c, J. PĚKNICOVÁ^d, P. PALEČKOVÁ^a a M. PRAVENEČ^b

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha, ^bFyziologický ústav AV ČR, 142 20 Praha, ^cMikrobiologický ústav AV ČR, 142 20 Praha, ^dÚstav molekulární genetiky AV ČR, 166 37 Praha

CD36 je integrální membránový glykoprotein vyskytující se na povrchu řady buněk jako multiligandový receptor. Uplatňuje se např. ve vazbě s trombospondinem-1, kolagenem, oxidovanými lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) a erytrocyty infikovanými *Plasmodium falciparum*. Je exprimován v krevních destičkách, monocytech, makrofázích a také v buňkách s aktivním metabolismem dlouhožetězcových mastných kyselin jako jsou tuková tkáň, tenké střevo a srdeční sval. Spontánní delece v genu kódujícím tento protein vede k poruchám metabolismu glukosy a lipidů jako je esenciální hypertenze (vysoký krevní tlak nevzniklý následkem jiné nemoci), inzulínová rezistence nebo obezita. Vysoký krevní tlak je považován za jeden z hlavních rizikových faktorů mozkové mrtvice, infarktu myokardu a selhání ledvin.

Pro studium biochemické a genetické podstaty těchto faktorů se využívá některých inbredních kmenů laboratorního potkana, zejména hypertenzního kmene SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) a kontrolního normotenzního kmene WK (Wistar Kyoto). Z genetických analýz kmene SHR a kongenního kmene SHR-4 s použitím DNA-biočipů vyplynulo, že významným faktorem ovlivňujícím zmíněné metabolické poruchy je právě protein CD36. Cílem naší práce byla izolace proteinu CD36 ze srdeční tkáně a krevních destiček obou kmenů a jejich následná strukturní, biochemická a imunochemická charakterizace.

Vypracovali jsme několikastupňovou metodu izolace membránových proteinů ze srdečního svalu i krevních destiček. Pomocí HPLC ionexové chromatografie byl purifikován protein CD36 ze srdeční tkáně. Aktivní frakce byly použity k imunizaci a přípravě králičích polyklonálních

protilátek. Imunochemické studie pomocí Ouchterlonyho techniky a dvourozměrné imuno elektroforézy neprokázaly rozdíl v imunologické reaktivitě proteinu CD36 u kmene SHR a WK. Dvourozměrná elektroforéza s izoelektrickou fokuzací v prvním rozměru prokázala vznik několika izoform proteinu CD36, které mohou být způsobeny rozdílnými posttranslačními modifikacemi. Studium posttranslačních modifikací proteinu CD36 prozatím neodhalilo významné rozdíly v glykosylaci mezi proteiny CD36 obou studovaných kmenů. K imunodetekci proteinu CD36 jsme použili monoklonální křížově reagující protilátka proti lidskému CD36 trombospondinovému receptoru. Pomocí nepřímé fluorescenční techniky byly zjištěny podstatné rozdíly v expresi proteinu CD36 na povrchu nativních krevních destiček mezi kmeny SHR, kontrolního kmene WK a transgenních kmenů SHR linie 10 a 19. Procentuální zastoupení krevních destiček s povrchovým receptorem CD36 bylo u spontánně hypertenzního kmene výrazně sníženo asi o 35 % proti kontrolnímu kmeni WK. U transgenních kmenů SHR/TG10 a SHR/TG19 byl jasný trend návratu k normálnímu počtu pozitivních buněk.

METATÉZE – UŽITEČNÝ NÁSTROJ MODERNÍ ORGANICKÉ SYNTÉZY

JIRÍ KOPEČNÝ

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav organické technologie, Technická 5, Praha
kopecnyj@vscht.cz

V moderní organické syntéze jsou široce užívány katalytické reakce, které umožňují a zjednodušují přípravu organických látek. Jednou z nich je metatéze, reakce nenasycených organických molekul, nazývaná dříve disproportionace olefinů. Při reakci dochází k rozpadu a opětovnému vzniku dvojné vazby, schéma 1.

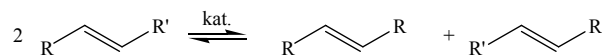


Schéma 1: Reakční schéma metatéze

Při metatézi dochází k výměně atomů nebo skupin atomů mezi dvěma molekulami, bez změny charakteru vazeb. Metatéze olefinů je obzvláště zajímavá z hlediska možnosti sestavovat organickou molekulu z jednotlivých „bloků“, a tak zjednodušit, nebo mnohdy dokonce umožnit, syntézu chemické látky. Metatézi je možno aplikovat na nenasycené látky nejrůznějších struktur.

Při studiu modelové reakce metatéze linárních α -olefinů s použitím vysoce selektivního heterogenního katalyzátoru na bázi $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3$ byla věnována pozornost katalytické aktivitě a selektivitě v závislosti na měněných podmínkách reakce a aktivace katalyzátoru. Katalytický systém je aktivní již za laboratorní nebo mírně zvýšené teplotě. Katalyzátor je možno po opětovné aktivaci opakovaně použít k reakci bez výrazného snížení aktivity.

NESYMETRICKY FUNKCIONALIZOVANÉ 1,1'-BINAFTYLOVÉ LIGANDY PRO CHIRÁLNÍ ROZPOZNÁNÍ ZWITTERIONTŮ

SIMONA KOŠČOVÁ^a, MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ^a, IVANA ČÍSAŘOVÁ^b a JANA HODAČOVÁ^a

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bPřírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2

V oblasti molekulárního rozpoznání organických sloučenin byl v posledních letech zaměřen zájem na aminokyseliny jako důležitou třídu biomolekul¹. Z literatury je znám pouze nízký počet ligandů schopných chirálního rozpoznání aminokyselin jako zwitteriontů².

Naše cílové ligandy se skládají ze 3 základních strukturálních částí, centrální axiálně chirální 1,1'-binaftalenové jednotky, ke které jsou připojeny zbývající 2: vazebné místo pro amoniový kation (crown etherový fragment) a vazebné místo pro karboxylový anion (močovinový, thiomčovinový nebo amidický fragment).

Obecně lze k přípravě nesymetricky funkcionalizovaných binaftalenů použít dva syntetické přístupy. První využívá známých opticky aktivních binaftylových prekurzorů. Následné opracování jejich skeletu vede k cílovým opticky aktivním sloučeninám. Nevýhoda spočívá ve vysokém počtu následných reakčních kroků. Tento princip jsme uplatnili při syntéze ligandů I. Druhou syntetickou strategií představuje nesymetrický coupling vhodně substituovaných 2-naftolů³. Racemický produkt couplingové reakce je nutné dále štěpit na antipody. Oproti prvnímu přístupu je výhodou druhého nízký počet reakčních kroků, ale nevýhodou je nutnost vypracovat metodu štěpení produktu na enantiomery. Oxidativním couplingem byly získány ligandy II.

V současné době probíhají studie připravených ligandů z hlediska jejich komplexačních vlastností zwitteriontů.

Práce byla vypracována v rámci grantu GA ČR 203/01/0067 a projektu AV ČR Z4 055 905.

LITERATURA

- Atwood J. L., Davies J. E. D., Mac Nicol D. D., Vögtle F. (Eds.): *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. Elsevier, Oxford 1996.
- Galán A., Andreu D., Echavarren A. M., Prados P., de Mendoza J.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1511 (1992).
- Hovorka M., Ščigel R., Gunterová J., Tichý M., Závada J.: *Tetrahedron* 48, 9503 (1992).

EXPRESÉ GENU OTEVŘENÉHO ČTECÍHO RÁMCE 7 KÓDUJÍCÍ NUKLEOKAPSIDOVÝ PROTEIN N VIRU REPRODUKČNÍHO A RESPIRAČNÍHO SYNDROMU PRASAT PROSTŘEDNICTVÍM BAKULOVIROVÉHO VEKTORU V HMYZÍCH BUŇKÁCH

E. KOSINOVÁ, I. PŠIKAL, R. TESAŘÍK a L. RODÁK

Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 32, Brno
kosinova@vri.cz

Bakuloviry jsou používány jako expresní vektory pro získávání heterologních proteinů s vysokým výtěžkem. Pro rekombinace je používán virus AcMNPV (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus), který se pomnožuje v hmyzích buňkách (Sf-9) kultivovaných *in vitro*, odvozených z hmyzu řádu Lepidoptera, zejména larev čeledi Noctuidae, druhu *Spodoptera frugiperda*.

V systému Bac-N-Blue (Invitrogene) je transferovým vektorem plazmid *E. coli*, který obsahuje gen pro polyhedrin pod kontrolou silného promotoru *ph.*, dále DNA sekvence pro kompletaci homologních úseků 5' konce bakteriálního *LacZ* genu, gen ORF1629 nutný k replikaci bakuloviru, polylinker pro vložení cizorodé DNA a signály pro terminaci transkripce a polyadenylaci. Prostřednictvím homologní rekombinace je do rekombinantního bakuloviru tak vnesen, kromě požadovaného inzertu, gen k produkci β-galaktosidázy a gen ORF1629 k obnovení replikační schopnosti rekombinantního bakuloviru, který byl v transfekci použit v linearizované formě. Selektce rekombinantních bakulovirů (occ-) je umožněna kompletací *LacZ* genu a plaky tvořené tímto fenotypem jsou modře zbarvené v přítomnosti chromogenu.

V eukaryotním systému exprese rekombinantních proteinů byl zkonstruován rekombinantní bakulovirus exprimující kompletní gen (ORF7) evropského sérotypu viru PRRS (V-516), který kóduje 128 aminokyselin (aa) strukturálního nukleokapsidového proteinu N. Klon bakuloviru D-1/5/20 byl purifikován plakovou technikou selekcí modrých plaků a po 6. pasáži dosahoval títu 2,2x10⁸ PFU.ml⁻¹. Produkce a identita rekombinantního N proteinu (rN) o velikosti ~15 kD byla ověřována v SDS-PAGE v redukujících podmínkách a imunoblotovací technikou s PRRS pozitivním polyklonálním prasečím sérem a s monoklonální protilátkou WB 4 získanou z CVL Weybridge, Anglie. Běžně byly dosahovány koncentrace rN proteinu 80 až 250 μg.ml⁻¹.

Rekombinantní antigen (rN) viru PRRS byl použit v koncentraci 2 μg.ml⁻¹⁶ k sestavení nepřímého ELISA testu (PRRS IgG rELISA) k průkazu PRRSV protilátek v sérech prasat. K ověření diagnostických parametrů soupravy bylo paralelně vyšetřeno 154 sér prasat diagnostickou soupravou IDEXX HerdCheck® ELISA. Porovnáním diagnostických parametrů obou metod ukazuje na větší specifitu (95 %) PRRS IgG rELISA při detekci protilátek proti evropskému sérotypu viru PRRS než IDEXX ELISA. Tento výsledek byl determinován tím, že 25 sér ze 154 bylo diagnostikováno v rELISA jako PRRSV pozitivní a v IDEXX ELISA PRRSV negativní. Citlivost detekce specifických protilátek v PRRS IgG rELISA dosáhla 93 %.

Tato práce je součástí grantu MO3-99-01 Ministerstva zemědělství České republiky.

AEROBNÍ DEGRADACE NITROFENOLOVÝCH LÁTEK VE VODNÉM PROSTŘEDÍ POMOCÍ SMĚSNÉ POPULACE

A. KOSTEČKOVÁ^a, Z. PRONÁYOVÁ^a, J. PÁČA^a, J. PÁČA jr.^b a M. STIBOROVÁ^b

^aÚstav kvasné chemie a bioinženýrství, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-

technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,
^bPřírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra
 biochemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2
 Alena.Kosteckova@vscht.cz

Nitroaromatické sloučeniny představují závažné kontaminanty znečišťující životní prostředí. Tvoří základní stavební jednotky mnohých barviv, výbušnin, rozpouštědel, plastů a dále slouží jako prekurzory pro produkci aminoaromatických derivátů. V půdě se mohou akumulovat v důsledku hydrolyzy organofosforových insekticidů. Mnohé z těchto sloučenin jsou toxické pro většinu živých organismů a 4-NF spolu s dalšími třemi zástupci nitrofenolů je zapsán na listině prioritních polutantů evidované US Environmental Protection Agency.

Pro první fázi experimentů, jenž byla zaměřena na adaptaci biodegraderů, byla použita směsná mikrobiální populace získaná ze zeminy dlouhodobě kontaminované nitroaromatickými látkami z podniku Synthesia Pardubice. Pokusy probíhaly při teplotě 28 °C na trepačkách za aerobních podmínek v Erlenmayerových baňkách obsahujících 100 ml BSM média. Jako jediný zdroj uhlíku pro adaptaci byly použity roztoky mononitrofenolů (2-NF, 3-NF, 4-NF), dinitrofenolů (2,4-DNF, 2,6-DNF) a dále jejich směs. Počáteční koncentrace jednotlivých látek byly 5 mg.l⁻¹ pro mononitrofenoly a 1 mg.l⁻¹ pro dinitrofenoly.

Další fáze studia byla zaměřena na sledování biodegradčních charakteristik 2-NF, 3-NF a 4-NF během jednorázových aerobních submersních kultivací s volnými buňkami. Z výsledků vyplývá, že za těchto podmínek byla populace schopna degradovat cca 30 mg.l⁻¹ 2-NF během 5 hodin, stejnou koncentrací 4-NF během 3 hodin. Z analýzy HPLC je patrné, že v průběhu degradace nedocházelo k tvorbě a akumulaci žádných metabolitů.

V současné době jsou prováděny experimenty degradace směsi mononitrofenolů s počáteční koncentrací každého z nich 20 mg.l⁻¹. Výsledky ukazují, že při době zdržení cca 3,5 h je možno odbourat 93–98 % vstupujících látek.

Práce byla finančně podporována GA ČR – projekt 104/03/0407.

SYNTEZA NOVÝCH CHIRÁLNÍCH POLYAZAMAKROCYKLŮ [3+3] CYKLOKONDEZAČNÍ REAKCÍ

**MICHALA KOZÁKOVÁ, MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ a
 JANA HODAČOVÁ**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám.
 2, 166 10 Praha 6
 kozakova@uochb.cas.cz

V nedávné době byla objevena zcela unikátní reakce *trans*-1*R*,2*R*-diaminocyklohexanu s tereftaldehydem, při které téměř kvantitativně vzniká produkt [3+3] cyklokondenzace 1 aniž by byl použit templátový efekt nebo metoda velkého zředění^{1,2}. Snadnou redukcí Schiffovy báze 1 byl ve vysokém výtěžku získán hexaamin 2 (Schéma 1), u kterého byla při

komplexačních studiích izomerních benzentrikarboxylátů zjištěna vysoká selektivita k benzen-1,3,5-trikarboxylátu³.

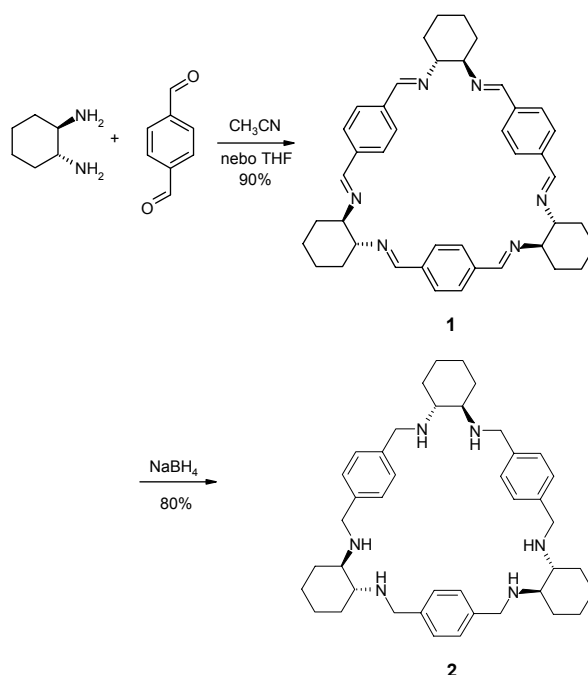


Schéma 1

Cílem našeho dalšího studia je ověřit možnosti využití [3+3] cyklokondenzace pro přípravu analogických chirálních polyazamacrokryklů. Byla studována reakce *trans*-1*R*,2*R*-diaminocyklohexanu s dalšími rigidními dialdehydy 3-8, pro jejichž přípravu byla vypracována nová syntetická metodika.

Práce byla provedena za finanční podpory GA ČR (203/03/0087) a v rámci výzkumného projektu Z4055905.

LITERATURA

1. Chadim M., Hodačová J., Buděšínský M., Závada J., Junk P. C.: *Tetrahedron: Asymmetry* 12, 127 (2001).
2. Gawroński J., Kolbon H., Kwit M., Katrusiak A.: *J. Org. Chem.* 65, 5768 (2000).
3. Chadim M., Hodačová J., Závada J., Aguilar J., García-España E., Luis S. V., Miravet J. F.: nepublikované výsledky.

VÝZNAM TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU c-Myb PRO TVORBU, MOTILITU A ŽIVOTASCHOPNOST MESENCHYMOVÝCH BUNĚK

**E. KREJČÍ^a, V. KARAFIÁT^b, M. DVOŘÁKOVÁ^b, J.
 KRÁLOVÁ^b, P. ŠNAJDR^a, S. MANDÍKOVÁ^b, P.
 BARTŮNĚK^b, M. GRIM^a a M. DVOŘÁK^b**

^aAnatomický ústav, 1.LF UK, U Nemocnice 3, 12800 Praha 2
^bÚstav molekulární genetiky, AV ČR, Flemingovo náměstí 2,
 16637 Praha 6

Transkripční faktor c-Myb je znám především jako jeden z klíčových regulátorů terminální diferenciace hemopoetických buněk obratlovců. Podle nepočetných literárních údajů je exprimován i v některých nekrvetvorných embryonálních tkáních, ale o jeho případné úloze v časných fázích embryogeneze není dosud nic známo.

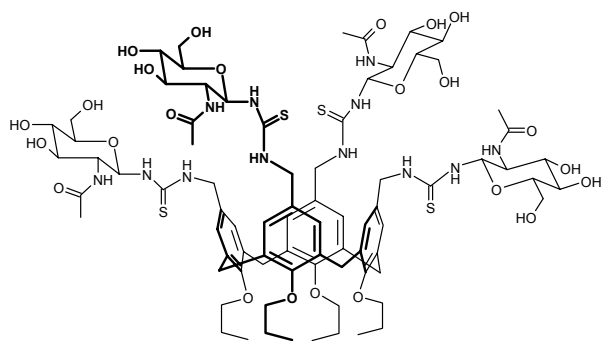
S použitím řady detekčních metod jsme zjistili, že ve vyvíjejícím se kuřecím embryu je c-Myb exprimován velmi brzy, již na začátku gastrulace, a to ve většině buněk. Experimenty s c-Myb antisense oligonukleotidy ukázaly, že inhibice tohoto protoonkogenu v explantátech periferních částí neurální ploténky blokuje migraci buněk neurální lišty. Naopak mírně zvýšená exprese vede ke vzniku buněk neurální lišty i z centrální části neurální ploténky, kde k tomu za přirozených podmínek nedochází. V migrujících mesenchymových buňkách vede snížení exprese c-Myb k poruchám jejich motility a jeho úplná eliminace indukuje apoptosu. Tato pozorování dokládají vývojový význam transkripčního faktoru c-Myb pro tvorbu, motilitu a životaschopnost mesenchymových buněk, a tím jeho novou úlohu v časně embryogenezi.

Podpořeno grantem 304/03/0463 od GA ČR.

GLYKOMIMETIKA A GLYKODENDRIMERY NA BÁZI CALIX[4]ARÉŇŮ JAKO IMUNOSTIMULANTY

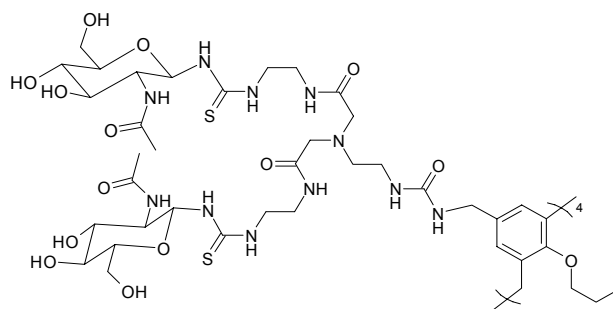
K. KŘENEK^{a,b}*, P. KRIST^a, P. LHOTÁK, I. STIBOR^b a V. KŘEN^a

^aLaboratoř Biotransformací, Mikrobiologický ústav AV ČR, 142 20 Praha 4; ^bÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 166 28 Praha 6
krenek@biomed.cas.cz



Deriváty 2-acetamido-2-deoxy- β -D-hexopyranos se vyznačují vysokou afinitou vůči aktivačním receptorům krysích, popřípadě lidských lymfocytů a přirozených zabíječů, tzv. NK buněk (natural killer cells)¹. Po otestování aktivity mono- a oligosacharidových ligandů jsme se rozhodli připravit polyvalentní ligandy na bázi glykokonjugátů a glykodendrimerů², které se vyznačují mnohem vyšší aktivitou než nízkomolekulární ligandy. Syntéza těchto sloučenin je podpořena faktem, že receptor NK buněk má dvě aktivační místa, tudíž zde může dojít k uplatnění efektu multivalence³.

Nedávno byly publikovány práce popisující glykokonjugáty s calix[4]areny^{4,5}. Lipofilní calixarén by měl zajistit silnější interakci s membránou cílové buňky než dříve připravené sloučeniny. Proto jsme se rozhodli použít calix[4]aren jako konstrukci nesoucí deriváty aminocukrů. Změna konformace calixarénu nám dovoluje zvolit rozdílné prostorové uspořádání cukerných jednotek. Substituce spodního okraje calixarénu a změna spaceru připojujícího cukerné jednotky pak dovolí měnit afinitu vůči aktivačním receptorům NK buněk.



Hlavní náplní této práce je připravit neoglykokonjugáty calix[4]arénů s 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosou, syntéza PAMAM dendrimerů s calixarénovým jádrem a testování aktivity těchto sloučenin vůči aktivačním receptorům krysích a lidských NK buněk. Dále bude diskutována stabilita a rozpustnost připravených sloučenin.

Tato práce byla podpořena granty COST D13 (MSMT OCD13.50) a D25 (MSMT OCD25.002)

LITERATURA

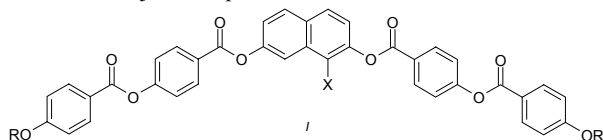
1. Křen V., Martinková L.: *Curr. Med. Chem. Rev.* 8, 1303 (2001).
2. Krist P., Herkommerová-Rajnochová E., Raulvová J., Semenuk T., Vavrušková P., Pavlíček J., Bezouška K., Petruš L., Křen V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 11 (2001).
3. Bezouška K., Křen V., Kieburg C., Lindhorst T.K.: *FEBS Lett.* 426, 243 (1998).
4. Sansone F., Chierici E., Casnati A., Ungaro R.: *Org. Biomol. Chem.* 1, 1802 (2003).
5. Casnati A., Sansone F., Ungaro R.: *Acc. Chem. Res.* 36, 246, (2003).

KAPALNĚ KRISTALICKÉ LÁTKY BANÁNOVITÉHO TVARU ODVOZENÉ OD SUBSTITUOVANÝCH 2,7-DIHYDROXYNAFTALENŮ

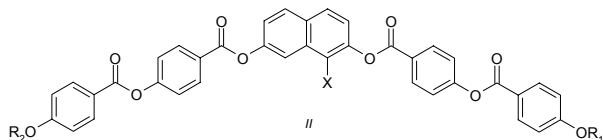
MARTIN KUCHAR^a, JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b, PŘEMYSL VANĚK^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,
^bFyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
Kuchar1@centrum.cz

V rámci výzkumu nových kapalných krystalů banánového typu¹ byla vypracována metodika syntézy 1-substituovaných 2,7-dihydroxynaftalenů a 4(4'-alkyloxybenzen-1'-karboxyloxy)benzoových kyselin. Z těchto prekurzorů byly připraveny kapalné krystaly obecného vzorce **I**. U těchto látek bylo studováno mesomorfní chování v závislosti na substituci centrálního jádra a na délce koncových alkoxylových skupin. Dále byla připravena řada nesymetrických kapalně krystalických látek s terminální dvojnou vazbou koncového alkylového řetězce **II**. Polymeraci těchto látek vznikají kapalně krystalické polymery, od nichž očekáváme zajímavé optoelektronické vlastnosti.



X = H, CH₃, NO₂, Cl, CN
R = C₆H₁₃, C₆H₁₇, C₁₀H₂₁, C₁₂H₂₃



X = H, CH₃, NO₂, Cl, CN
R₁ = C₁₀H₂₁
R₂ = (CH₂)₆CH=CH₂

Práce byla podporována grantem GA ČR 106/00/0580 a 202/02/0840, výzkumným záměrem MŠMT MSM 223100001 a projektem COST D14 WG 0015.

LITERATURA

1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weissflog W., Diele S., Pelzl G.: J. Mater. Chem. 13, 2104 (2003).

VYUŽITÍ SYNTETICKÝCH siRNA NA FUNKČNÍ ANALÝZU PROTEÍNU p53 POMOCÍ DNA ČIPOV

BRANISLAV KUSENDA, SOŇA ŠTRUNCOVÁ, ROMANA BORSKÁ, BORIS TICHÝ a ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno

Utlmování genové exprese (gene silencing) sprostředkované dvojřetězcovými molekulami RNA bylo popsáno jako RNA interferencia (RNAi), sloužící jako mechanismus posttranskripční regulace exprese a jako obranný mechanismus buněk proti virům a transpozónům.

siRNA (small interfering RNA) s délkou 19–23 bp vznikají z dlouhých dsRNA molekul působením enzymu DICER a stávají se součástí komplexu RISC (RNA-induced silencing

complex), který se s vysokou špecifitou viaže na komplementární mRNA, což způsobuje jejich destrukci a posttranskripční utlmení genové exprese.

Vysoká špecifita interakce siRNA a mRNA, založená na komplementaritě bází, umožňuje rozpoznání a odlišení mutantních RNA a jejich špecifickou inaktivaci. To umožňuje navrhovat syntetické siRNA proti transkripčním produktům mutantních forem nádorového supresorového genu p53. Mutace genu pro protein p53 se vyskytují u více než 50 % lidských nádorových buněk, což vede k jeho neschopnosti zúčastňovat se na regulaci bunčového cyklu a spustit apoptotickou dráhu. Preto sa utlmenie exprese nefunkčného genu pre proteín p53 prostredníctvom siRNA javí ako progresívny postup pri protinádorovej terapii.

Efektivnosť utlmovania exprese sprostredkovanej syntetickými siRNA a detailná charakterizácia zmien expresných profilov je vyhodnocovaná technológiou DNA čipov (microarrays).

Práce byla podporována grantem MŠMT 1K04017C a výzkumným záměrem MZ 00065 26 97 05.

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) OF COMPLEMENT RECEPTOR (CR) 1 GENE IS NOT INVOLVED IN SUSCEPTIBILITY TO SARCOIDOSIS

M. KVEZERELI^a, E. GARR^c, F. MRAZEK^a, E. KRIEHOVA^a, J. DRABEK^a, V. KOLEK^b, R. M. DU BOIS^c, J. C. GRUTTERS^d, K. I. WELSH^c, and M. PETREK^a

^aDepartment of Immunology, ^bDepartment of Respiratory Medicine, Palacky University, Olomouc, ^cClinical Genomics Group, Royal Brompton Hospital, London, UK, ^dDepartment of Pulmonology, Sint Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

According to a recent study in Italian population¹, C→G substitution of the CR1 gene (SNP5507) may play a crucial role in granuloma formation in pulmonary sarcoidosis, probably by decreasing the rate of the immune complex clearance.

We wished to verify, if this SNP is associated with susceptibility to sarcoidosis and/or its clinical course also in other populations.

CR1 SNP5507 was genotyped by PCR-SSP, differences among gene(allele) frequencies in patient and control groups were assessed by 2x2 Chi² test.

Allele and genotype frequencies for SNP5507 in the CR1 gene in Dutch (NL) and Czech (CZ) populations were similar and, therefore, significant differences in Italian (IT) population were not confirmed (see table). Further, no association of investigated SNP and clinical subsets of sarcoidosis (based on the chest X-ray stage, steroid therapy and Lofgren syndrome) was observed.

Table I, Comparison of CZ, NL, and IT Patients

	CZ Patients n=110	CZ Controls n=319	NL Patients n=116	NL Controls n=62	IT Patients* n=91	IT Controls n=94
Genotype frequency						
CC	110	319	116	62	91	94
CG	0.60(68)	0.66(212)	0.58(67)	0.68(42)	0.50(46)	0.64(60)
GG	0.40(42)	0.34(107)	0.39(45)	0.26(16)	0.32(29)	0.30(28)
	0	0	0.03(4)	0.06(4)	0.18(16)	0.06(6)
Allele frequency						
C	220	638	232	124	182	188
G	0.80(178)	0.83(531)	0.77(179)	0.81(100)	0.66(121)	0.79(148)
	0.20 (42) [†]	0.17 (107)	0.23(53) [‡]	0.19(24)	0.34(61) ^ξ	0.21(40)

[†]Chi²=0.66,P=0.57; [‡]Chi²=0.58,P=0.53; ^ξ Chi²=6.98,P=0.008

No association was found between SNP5507 in the CR1 gene and susceptibility to sarcoidosis and disease course.

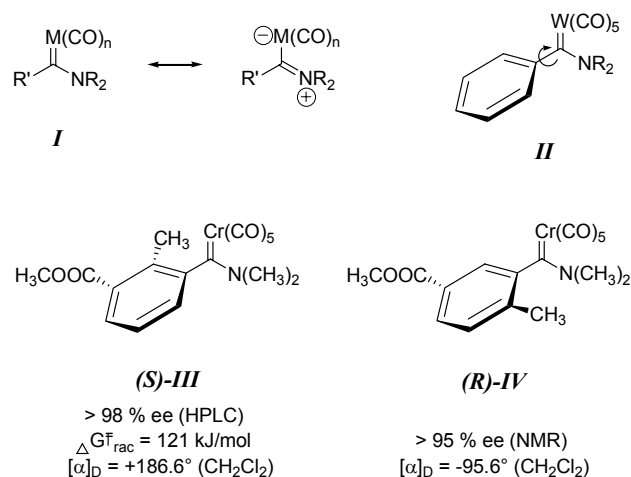
REFERENCES

- Zorzetto M., Bombieri C., Ferrarotti I., Medaglia S., Agostini C., Tinelli C., Malerba G., Carrabino N., Beretta A., Casali L., Pozzi E., Pignatti P.F., Semenzato G., Cuccia M.C., Luisetti M.: Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 27 (1), 17 (2002).

NOVÝ DRUH CHIRALITY KARBENOVÝCH KOMPLEXŮ: AXIÁLNĚ CHIRÁLNÍ KARBENOVÉ KOMPLEXY CHROMU

LUDEK MECA a DALIMIL DVOŘÁK*

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
mecal@vscht.cz, dvorakd@vscht.cz



Fischerovy aminokarbenové komplexy **I** jsou užitečnými stavebními bloky pro organickou syntézu¹, neboť umožňují

selektivní výstavbu cyklů, a to i několika v jednom reakčním kroku. Při použití komplexů, obsahujících chirální substituent R na dusíku, bylo u mnoha reakcí dosaženo dobrých diastereoselektivit².

NMR spektrum sloučeniny **II** (M = W a R' = Ph) ukazuje na bráněnou rotaci kolem vazby PhC (cit.³). Zjistili jsme, že nahrazení jediného *ortho* vodíku methylovou skupinou zvýší racemizační bariéru do takové míry, že jednotlivé enantiomery jsou stabilní při laboratorní teplotě. Budou představeny syntetické cesty ke komplexům **III** a **IV** včetně preparativního štěpení na čisté enantiomery.

Podporováno GA ČR (reg. č. 203/00/0316)

LITERATURA

- Dörwald F. Z.: *Metal Carbenes in Organic Synthesis*, str. 34. Wiley, Weinheim 1999.
- Wulff W. D.: *Organometallics* 17, 3116 (1998).
- Casey C. P., Vollendorf N.W., Haller K. J.: J. Am. Chem. Soc. 106, 3754 (1984).

EXPRESE GENU SAPP2 KVASINKY *Candida parapsilosis*

MICHAELA MERKEROVÁ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, Praha 6, 166 10

Aspartátové proteasy sekretované oportunně-patogenními kvasinkami rodu *Candida* jsou považovány za jeden z faktorů virulence (spolu s dimorfismem, či se schopností adheze na hostitelský povrch). U *C. parapsilosis* byly zatím identifikovány 3 geny kódující tyto proteasy: SAPP1 – 3. Dosavadní znalosti o produktu genu SAPP2 jsou rozporuplné. SAPP2 byl považován za pseudogen, případně za gen, který je exprimován za dosud nezjištěných podmínek. Jiní autoři naopak tvrdili, že se jim proteasu Sapp2p podařilo z kultivačního média izolovat. Cílem této práce bylo expresi SAPP2 analyzovat nejprve na genové úrovni a dále pokud možno i na úrovni genového produktu.

Pomocí RT-PCR bylo zkoumáno, za jakých podmínek je SAPP2 exprimován v tekutém médiu. Zatímco gen SAPP1 je transkribován pouze v médiu, kde jsou jediným zdrojem dusíku exogenní bílkoviny, transkript SAPP2 byl detegován i v kompletním médiu. Expres SAPP2 navíc není závislá na pH tak silně, jako SAPP1. Transkript SAPP2 jsme detegovali i v buňkách, které byly kultivovány při pH 5 a 6. Naopak gen SAPP1 je exprimován jen v prostředí o pH < 5.

Přestože je SAPP2 exprimován za všech námi testovaných podmínek, dlouho se nedařilo odpovídající produkt z kultury získat. Nakonec bylo izolováno malé množství Sapp2p pomocí chromatofokuse. Koncentrace Sapp2p v kultivačním médiu byla však přibližně stokrát nižší než koncentrace Sapp1p. To je také pravděpodobně důvodem, proč nebyl produkt genu SAPP2 blíže charakterizován již dříve.

THE DETERMINATION OF N-METHYLCARBAMATE PESTICIDES IN BABY FOOD

BARBORA MIČKOVÁ^a, JITKA ZROSTLÍKOVÁ^a, JANA HAJŠLOVÁ^a, PAVEL RAUCH^a, and ANGEL MONTOYA^b

^a*Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6;* ^b*Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n. 46022-Valencia. Spain*

N-Methylcarbamate pesticides such as carbaryl, carbofuran and methiocarb were introduced worldwide as substituents of persistent organochlorine compounds, due to their broad spectrum of activity and their low bioaccumulation potentials. Though pesticides are indispensable chemicals in modern civilization, the exposure to their residues poses a potential hazard for humans, especially for children.

In this work, a correlation study of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and a liquid chromatography–electrospray mass spectrometric (HPLC/ESI/MS/MS) method for the determination of N-methyl carbamate insecticides carbofuran, carbaryl and methiocarb in fruit baby food is presented. The comparison of performance characteristics of the two methods was carried out by simultaneous analysis of apple-strawberry baby food (GPC purified) extracts spiked with N-methylcarbamates at six different concentration levels. Results obtained by ELISA correlated well with those obtained by LC/MS/MS, both in terms of trueness and precision. Recoveries, i.e. the ratio of the determined concentration to the known spiked concentration, were in the 60–100 % range for ELISA and in the 73–104 % range by LC/MS/MS with the RSDs from 7 replicate analyses 3.6–23.3 % and 1.7–8.2 %, respectively. The influence of sample pre-treatment on the analytical performance of immunoassay method was also assessed. Using ELISA recoveries close to 90% were obtained even in crude non-purified baby food extracts. The results clearly indicate that the developed ELISA is suitable for the fast, quantitative and reliable determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb

in baby food even for the analysis of crude non-purified extracts.

VLIV TĚŽKÝCH KOVŮ NA PRODUKCI EXOPOLYMERŇNÍCH LÁTEK A SLOŽENÍ BUNĚČNÉ STĚNY U KVASINEK

JIŘÍ MIKEŠ, MARTINA SIGLOVÁ, ALENA ČEJKOVÁ, JAN MASÁK a VLADIMÍR JIRKŮ

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, ÚKCHB, Technická 5, 166 28 Praha 6
jiri.mikes@vscht.cz*

Odpadní vody kontaminované těžkými kovy představují vážné riziko pro všechny živé organismy. Neustále je vyvíjeno úsilí naleznout alternativní přístupy k chemickým a fyzikálním metodám odstraňování těchto iontů z prostředí. Aplikace živých buněk, jejich součástí a polymerních produktů se dlouhodobě jeví jako velmi vhodný způsob eliminace iontů těžkých kovů, který je i ekonomicky výhodný. Role bakterií v těchto bioremediačních procesech je prostudována mnohem podrobněji než v případě kvasinek a plísní. Vzhledem k výrazným odlišnostem v jejich složení a v jejich schopnosti produkovat exopolymerní sloučeniny (EPS), se nabízí široká škála potenciálních vazebných míst pro ionty těžkých kovů. Všechny eukaryotní mikroorganismy jsou schopné separovat těžké kovy¹. Dominantní podíl výsledků v této oblasti se týká kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*². Ve skutečnosti se jedná o proces, ve kterém hraje roli celá řada faktorů, především složení kultivačního média a koncentrace a druh iontu těžkého kovu. Podíl EPS v tomto procesu je v současnosti předmětem výzkumu^{3,4}.

Akumulace iontů kadmia, chromu, olova, niklu a zinku pomocí eukaryotních buněk a jejich EPS byla testována u 16 druhů kvasinek a plísní v mikrokultivačním zařízení Bioscreen C a v Erlenmayerových baňkách na laboratorní třepačce. Byla sledována schopnost produkovat EPS a rozsah změn ve složení buněčné stěny v kultivačním prostředí v přítomnosti a bez přítomnosti iontů těžkých kovů. Na konci kultivací v Erlenmayerových baňkách byly separovány buňky a EPS, u nichž bylo charakterizováno jejich chemické složení a zjištěny podíly množství navázaných těžkých kovů. Výrazně se na této schopnosti projevila koncentrace kovů v kultivačním médiu. Lze konstatovat, že existují dva základní přístupy, kterými se kvasinka snaží vyrovnat se s přítomností iontů těžkých kovů v prostředí. Ionty mohou být hromaděny v buněčných součástech a nebo vázány funkčními skupinami polysacharidů a bílkovin v EPS. To, který způsob u buňky převládne, závisí na druhu mikroorganismu, ale z velké části také na složení kultivačního média a koncentraci iontů. Z hlediska vazby kovu v buněčné stěně hraje významnou roli podíl mannosové a glukosové složky. Je-li tento poměr menší než 1, je schopnost akumulovat ionty kovů v buněčné stěně výraznější. Tato skutečnost však může být stíněna produkcí EPS s afinitou vůči danému kovu.

Získané výsledky by měly v budoucnu sloužit pro cílenou přípravu mikrobiální biomasy schopné účinně eliminovat konkrétní těžký kov. Zároveň by se měly stát vstupní

informací pro studium chování populací kvasinek a plísní v biofilmových konsorciích vystavených stresu v podobě přítomnosti iontů těžkých kovů.

Děkujeme paní Ing. Daně Savické z ÚBM VŠCHT za většinu mikroorganismů použitých v této práci.

LITERATURA

1. Sag Y.: *Separ. Purif. Method.* 30, 1 (2001).
2. Volesky B., Mayphillips H. A.: *Appl. Microbiol. Biot.* 42, 797 (1995).
3. Suh J. H., Yun J. W., Kim D. S.: *Bioprocess. Eng.* 21, 1 (1999).
4. Breierova E., Vajczikova I., Sasinkova V., Stratilova E., Fiserova M., Gregor T., Sajbidor J.: *Z Naturforsch. C.* 57, 634 (2002).

EXPERIMENTÁLNÍ OVĚŘENÍ FUNKCE PROTEINŮ Z GENOMICKÝCH PROJEKTŮ: DEHALOGENAČNÍ AKTIVITA MYKOBAKTERIÁLNÍHO PROTEINU RV2579

MARTA MONINCOVÁ^a, YUJI NAGATA^b, ZBYNĚK PROKOP^a, ANDREA JESENSKÁ^a, SOŇA MARVANOVÁ^a, JANA SÝKOROVÁ^a, MASATAKA TSUDA^b a JIRÍ DAMBORSKÝ^{a*}

^aNárodní centrum pro výzkum biomolekul, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ^bDepartment of Environmental Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai 980-8577, Japonsko
jiri@chemi.muni.cz

Haloalkandehalogenasy jsou mikrobiální enzymy štěpící vazbu mezi uhlíkem a halogenem u halogenovaných alifátů. Tyto enzymy jsou předmětem stále intenzivnějšího výzkumu vzhledem k jejich potenciálnímu využití jako průmyslových a environmentálních biokatalyzátorů a biosenzorů. V DNA databázích je uložena řada sekvencí vykazujících podobnost se sekvencemi známých haloalkandehalogenas. Jednou z domnělých haloalkandehalogenas je protein Rv2579, jehož gen *rv2579* byl nalezen v genomu lidského patogena *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Počítačový model proteinu Rv2579 byl srovnán s krystalovou strukturou haloalkandehalogenasy LinB ze *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (cit.¹). Tato analýza ukázala, že z 19 aminokyselin, které tvoří aktivní centrum a vstupní tunel, je 6 aminokyselin rozdílných mezi Rv2579 a LinB. Abychom zjistili vliv záměny těchto aminokyselin, byly do LinB vnášeny substituce vyskytující se u Rv2579. Mutace byly vnášeny postupně a kumulativně a výsledný šestinasobný mutant by měl mít rekonstruováno aktivní místo Rv2579. U tohoto mutantního enzymu byla experimentálně prokázána dehalogenázová aktivita a bylo potvrzeno, že Rv2579 patří do rodiny haloalkandehalogenas.

Současně byl gen *rv2579* přenesen z *Mycobacterium bovis*² do *Escherichia coli*, protein Rv2579 byl exprimován a purifikován. Čistý protein Rv2579 vykazoval dehalogenasovou

aktivitu. Pro mutantní enzym i Rv2579 byly stanoveny kinetické konstanty K_m a k_{cat} pro 1-chlorbutan a 1,3-dibrompropan. Kinetické vlastnosti obou zmiňovaných enzymů se významně neliší, a tím se potvrdilo, že šestinasobnou substitucí bylo rekonstruováno aktivní místo Rv2579 v LinB. Zde popsány experiment rekonstrukce aktivního místa enzymu s předpokládanou funkcí v příbuzném enzymu se známou funkcí lze použít k charakterizaci domnělých enzymů z genomických a proteomických studií.

LITERATURA

1. Jesenská A., Sedláček I., Damborský J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 219 (2000).
2. Marek J., Vevodova J., Kuta-Smatanova I., Nagata Y., Svensson L. A., Newman J., Takagi M., Damborský J.: *Biochemistry* 39, 14082 (2000).

KROK URČUJÍCÍ RYCHLOST SYNTÉZY KOMPOZITU POLYPYRROL/NAFION/POLYPYRROL

SABINA MORAVCOVÁ a KAREL BOUZEK

*Ústav anorganické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
moravcos@vscht.cz*

Vodivé polymery (CP) jsou v posledním desetiletí vedle dalších potenciálních aplikací intenzivně studovány rovněž s ohledem na jejich možné využití v palivových článcích typu PEM (Proton Exchange Membrane). V tomto ohledu se výzkum dostupný v odborné literatuře soustředil především na jejich využití jako alternativního nosiče katalyzátoru. V rámci předchozí práce se naše pozornost soustředila na studium metodiky přípravy kompozitu Nafion/polypyrrol (NP)¹. Ze studovaných se jako nejvhodnější ukázala být tzv. difúzní metoda. Ta je založena na chemické oxidaci monomeru difundujícího membránou tvořící přepážku mezi roztokem monomeru a oxidačního činidla. Připravený kompozit vykazuje dostatečnou mechanickou stabilitu a elektrochemickou aktivitu. Pro přípravu základní části nízkoteplotního palivového článku typu PEM tzv. „Membrane Electrode Assembly“ (MEA) je nezbytné připravit tuto polymerní vrstvu na obou stranách PEM. Jak vyplynulo z předchozích experimentů, krokem řídicím kinetiku růstu filmu vodivého polymeru je transport monomeru přes kompozit, především pak přes film polypyrrolu (PPy). Cílem této práce je určit hodnotu permeability kompozitu, porovnat ji s čistou membránou Nafion 117 a navrhnout vhodnou metodu syntézy sekundární elektrody.

Ke stanovení permeability membrány pokryté filmem PPy pro pyrrol (Py) byly použity následující dvě metody: (i) optimalizace z kinetiky růstu PPy filmu a (ii) difúze Py kompozitem. Hlavní předností metody (i) představuje fakt, že poskytuje hodnotu permeability PPy filmu v průběhu syntézy. Výsledky tedy nejsou ovlivněny změnami struktury již připraveného kompozitu v průběhu jeho uskladnění, popř. opakovaného vystavení účinkům roztoku monomeru. Výhodou metody (ii) je pak především možnost přímého vyhodnocení experimentálně zjištěných dat. Eliminovány jsou tudíž možné

chyby způsobené zavedenými zjednodušujícími předpoklady, popř. numerickým vyčíslením matematického modelu.

Z výsledků provedených difúzních experimentů (metoda (ii)) vyplynulo, že PPy film vykazuje permeabilitu o 3 řády nižší než čistý Nafion. To se projevuje zpomalením rychlosti růstu filmu s trváním syntézy. Významnější je však skutečnost, že metoda (ii) (optimalizace permeability z kinetiky růstu PPy vrstvy) vykazuje permeabilitu PPy pro Py přibližně o jeden řád vyšší. Je tedy zřejmé, že PPy film v průběhu uskladnění, popř. následného vystavení účinkům roztoku monomeru, podléhá blíže nespecifikované konsolidaci mající za následek významné snížení jeho propustnosti. V důsledku tohoto faktu lze předpokládat, že syntéza sekundární vrstvy bude silně bržděna přítomností vrstvy primární a to výrazně více, než by bylo možno očekávat na základě analýzy kinetiky jejího růstu. To je v souladu s experimentálními výsledky syntézy sekundární PPy vrstvy. Přítomnost vrstvy nebyla pomocí rastrovací elektronové mikroskopie lomu kompozitu detegována ani po 15 hodinách polymerace (tj. její tloušťka byla menší než 0,3 μm), ačkoliv podle hodnoty permeability získané metodou (i) by tloušťka měla dosahovat přibližně 10 μm . Přítomnost vrstvy PPy však jasně prokázaly provedené elektrochemické experimenty. Změřené voltametrické křivky vykazují tvar typický pro PPy. Je zřejmé, že k úspěšné syntéze sekundární vrstvy je zapotřebí zvolit odlišný přístup, který nebude natolik ovlivněn nízkou propustností PPy vrstvy. Na základě dosud provedených experimentů se jako nejvhodnější jeví být elektropolymerace na povrchu chemicky připraveného PPy o minimální tloušťce přibližně 0,1 μm .

LITERATURA

- Moravcová S., Bouzek K.: v: *Sigma Aldrich konference mladých chemiků, biochemiků a molekulárních biologů*, 4. -7. 6. 2003 Devět skal, Žďárské vrchy; Chem. Listy 97, 299 (2003).

REAKTIVACE MUTANTNÍHO PROTEINU p53 JE ZÁVISLÁ NA Hsp90

PETR MÜLLER a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK

Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 65653 Brno

Protein p53 je transkripční faktor patřící mezi nejdůležitější nádorové supresory. Genotoxickým stresem dochází v buňce k jeho aktivaci, vazbě na DNA a spuštění transkripce cílových genů zodpovědných za zástavu buněčného cyklu nebo apoptózu. Inaktivace p53 bodovou mutací je jednou nejčastějších genetických změn v nádorové buňce. Bodová mutace vede ke ztrátě DNA-vazebné aktivity a/nebo k nestabilitě struktury proteinu p53. Mutace měnící konformaci DNA-vazebné domény jsou často teplotně senzitivní a dávají nám tak naději vyvinout terapii založenou na reaktivaci funkce mutovaného p53.

V našich studiích jsme prokázali teplotně senzitivní charakter mutovaného proteinu p53 285Lys v buňkách nádorové linie karcinomu prsu BT474. Obnova transaktivčních schopností tohoto mutanta ve 32 °C byla prokázána (i) detekcí cílových proteinů p21^{WAF1} a MDM2 a

(ii) využitím reportérového genu LacZ řízeného promotorem závislým na vazbě funkčního p53. Následovně byla ověřena i změna konformace DNA-vazebné domény p53 v průběhu reaktivace. V buňkách vystavených teplotě 32 °C byla detegována změna konformace nativního proteinu p53 za pomoci imunoprecipitace protilátkou Pab1620 rozlišující nemutovanou konformaci p53 a protilátkou Pab240 rozlišující mutovanou konformaci p53. Metodou imunoprecipitace byla dodatečně prokázána tvorba stabilního komplexu mezi mutovaným p53, MDM2 a Hsp90. Inhibice Hsp90 Geldanamycinem vede k rozrušení tohoto stabilního komplexu a hladina p53 i MDM2 klesá. Vliv stresového proteinu Hsp90 na p53 byl zkoumán i v procesu reaktivace mutantního p53 ve 32 °C. Použitím 2 μM Geldanamycinu bylo prokázáno, že Hsp 90 je jako chaperon nezbytný pro změnu konformace proteinu p53 a obnovu jeho transaktivčních funkcí. Bez funkčního Hsp90 nedochází při snížení teploty ani ke změně konformace proteinu p53, ani k obnově jeho transaktivčních schopností.

Objev nových nízkomolekulárních látek měnících konformaci p53 přináší nové perspektivy do léčby nádorů nesoucích mutaci v genu p53. Reaktivace mutantů p53 by se mohla stát vysoce účinnou a zejména specifickou terapií. Námí prokázaná závislost reaktivace mutovaného proteinu p53 na Hsp90 tak přináší zásadní informace objasňující mechanismus reaktivace mutovaného p53 a vede k cílenějšímu hledání nových způsobů terapie zaměřené na p53.

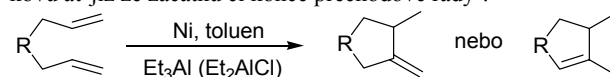
Tato práce byla podporována granty: IGA MZ ČR NC/7131-3 a GA ČR 301/02/0831

NIKLEM KATALYZOVANÁ CYKLIZACE 1,6-DIENŮ: NOVÁ CESTA K PŘÍPRAVĚ KARBO- A HETEROCYKLIČKÝCH LÁTEK.

DAVID NEČAS, MATYÁŠ TURSKÝ a MARTIN KOTORA

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 6, 128 43 Praha 2
david.necas@seznam.cz*

V poslední době byla příprava karbocyklických a heterocyklických sloučenin z terminálních dienů věnována pozornost mnoha pracovních skupin. Byly vypracovány postupy cyklizace založené na radikálových reakcích¹, dále katalytické reakce využívající komplexů různých přechodných kovů (Pd², Rh², Ru³ či Ni⁴), a nebo reakce založené na použití stechiometrického množství komplexů různých přechodných kovů ať již ze začátku či konce přechodové řady⁵.



R=CH(COOEt)₂; fluoren; Ph₂Si; anilin

Katalýza pomocí přechodných kovů je většinou založena buď na komplexech stabilních, ale relativně drahých přechodných kovů (Pd, Rh, Ru), nebo na komplexech

levnějších kovů (Ni), které jsou však náročné na přípravu a citlivé na reakční podmínky. Námí navržený katalytický systém na bázi komplexů niklu a organohlinitých sloučenin je snadno použitelný a připravitelný z ekonomicky nenáročných a komerčně dostupných látek. Tento systém vykazuje velice dobrou katalytickou aktivitu a je tolerantní k celé řadě funkčních skupin.

Tento projekt byl financován z grantu FRVŠ č. 2800.

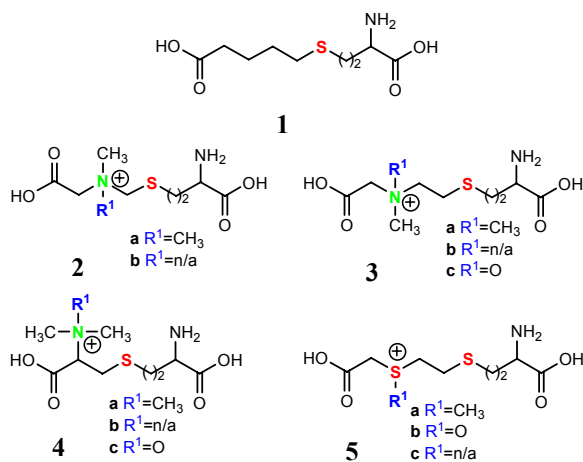
LITERATURA

1. Reigitz M., Giese B.: *C-Radikale. In methoden der Organischen Chemie*, sv. E19A, Houben- Weyl, Stuttgart, Germany 1989.
2. Grigg R., Malone J. F., Mitchell T. R. B., Ramasubbu A., Scott R. M.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 1984, 1745.
3. Miyaki Y., Onishi T., Ogoshi S., Kurosawa H.: *J. Organomet. Chem.* 616, 135 (2000).
4. Radetich B., RajanBabu T. V.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 8007 (1998).
5. RajanBabu T. V., Nugent W. A., Taber D. F., Fagan P. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7128 (1988).

ANALOGY TRANZITNÍHO STAVU JAKO INHIBITORY LIDSKÉHO ENZYMU BETAIN:HOMOCYSTEIN S-METHYLTRANSFERASY

HANA NETUŠILOVÁ, MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ, IVAN ROSENBERG a JIŘÍ JIRÁČEK

*Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
Hana.Netusilova@uochb.cas.cz*



Betain:homocystein S-methyl transferasa (BHMT) patří mezi jediné tři savčí enzymy metabolizující homocystein. Dalšími jsou methionin synthasa a cystathionin β -synthasa, jejichž nesprávná nebo nedostatečná funkce je považována za příčinu hyperhomocysteinemie, nezávislého rizikového faktoru především kardiovaskulárních onemocnění. Role BHMT v hyperhomocysteinemii ani fyziologická funkce enzymu nejsou

známy. Pro jejich pochopení je nutné provést biologické studie *in vivo* s dostatečně potentním a selektivním inhibitorem.

Nedávno byla určena krystalová struktura lidské rekombinantní BHMT v komplexu s 5-(3-amino-3-karboxypropylsulfanyl)pentanovou kyselinou (**1**), připravenou na našem pracovišti¹. Inhibiční účinky látky **1** nejsou dostatečně silné (IC₅₀ v řádu μM) pro využití k experimentům *in vivo*. Na základě získaných strukturních informací však byla navržena série nových potenciálních inhibitorů – analogů tranzitního stavu. V první fázi jsme se věnovali syntéze a inhibičním *in vitro* testům sloučenin typu 2-5.

Nejsilnějšími dosud popsanými inhibitory BHMT jsou pseudo-peptidy s fosfinátovou skupinou². Proto v budoucnu hodláme syntetizovat a otestovat inhibiční účinky látek strukturně blízkých sloučeninám **1** – **5**, které budou obsahovat fosfinátovou, fosfonátovou a fosfodiesterovou vazbu.

Tento projekt je podporován granty A4055302 (GA AV ČR), 203/01/1166 (GA ČR) a výzkumným projektem Z4055905.

LITERATURA

1. Evans J. C., Huddler D. P., Jiracek J., Castro C., Millian N. S., Garrow T. A., Ludwig M. L.: *Structure* 10, 1159 (2002).
2. Collinsova M., Castro C., Garrow T. A., Yiotakis A., Dive V., Jiráček J.: *Chem. Biol.* 10, 113 (2003).

pS2 – MARKER OF ESTROGENIC ACTIVITY

JITKA NEUBAUEROVÁ^a, JANA PĚKNICOVÁ^b, MICHAEL BOUBELÍK^b, VENDULA KYSELOVÁ^b, and DANIELA BUCKIOVÁ^a

*^aInstitute of Experimental Medicine and ^bInstitute of Molecular Genetic, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4
neubauerova@biomed.cas.cz*

MCF-7 human breast cancer cell line, the estrogen receptor-positive, is commonly used model for *in vitro* testing of potentially endocrine disrupting-compounds. Their endocrine effects include mimicking or antagonizing natural endogenous estrogens, altering synthesis and metabolism of natural estrogens, and modifying estrogen receptor levels. The aim of this study was evaluation of estrogenic activity of two xenoestrogens (bisphenol A, nonylphenol) and two phytoestrogens (resveratrol, genistein) in various concentrations. We have used method, based on quantification of expression of endogenous estrogen-regulated gene pS2 in MCF-7 cells. The expression of pS2 gene in MCF-7 cells is regarded as marker of activation of estrogen receptors and was described entirely for compounds of estrogen character. Concentrations ranges of tested compounds were: bisphenol A: [10 – 8 – 10 – 6 M], nonylphenol: [10 – 8 – 10 – 6 M], resveratrol: [10 – 5 – 10 – 4 M] and genistein: [10 – 6 – 10 – 4 M]. The levels of pS2 transcript in MCF-7 cells were assessed using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and were normalized to G3PDH. Our results showed, that xenoestrogens

bisphenol A and nonylphenol induced the expression of pS2 gene in an increasing dose-dependent manner in the range of tested concentrations. Exposure of MCF-7 cells to resveratrol resulted in an inhibition of the pS2 gene expression. Treatment of MCF-7 cells with genistein at the lowest and the highest tested concentration inhibited the expression of pS2 gene. Maximal induction of the pS2 gene expression was registered at 10⁻⁵ M concentration. We have demonstrated that the cell-based endogenous gene expression assay using RT-PCR-ELISA method provides sensitive and rapid model for screening of chemicals with possible estrogenic properties. We have compared our results testing estrogenicity of the selected compounds in vitro (the expression of estrogen-responsive gene pS2 and the effect on proliferation of MCF-7 cells, E-screen) with their effects on fertility in vivo and we have not proved any connection. The correlation of results of RT-PCR-ELISA and E-screen method is problematic; it is more efficient to compare the cell proliferation with levels of the pS2 protein product not the pS2 transcript. However, we have noted certain agreements, namely in case of resveratrol and nonylphenol. In conclusion, the results of the present study support the hypothesis, that the expression of pS2 gene is basically the marker of proliferating activity.

The grants GACR 303/00/1651 and IGA MH NJ5851-3/2000 supported this study.

SEPARATION OF NUCLEAR PROTEIN COMPLEXES BY BLUE NATIVE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

Z. NOVÁKOVÁ^a, Z. HODNÝ^a, P. MAN^b, and P. HOZÁK^a

^a*Department of Cell Ultrastructure and Molecular Biology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, ^bMass Spectrometry Laboratory, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4*

The nucleus of eukaryotic cell is functionally and structurally compartmentalized. To understand the structure and function of individual nuclear domains, the knowledge about the protein composition of complexes building up these structures is needed. We explored therefore the potential of previously developed method for separation of membrane protein complexes in native state, the blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) (lit¹), for separation of large nuclear protein complexes coupled with mass spectrometry analysis.

In this study we demonstrate that modifications in solubilization of nuclear protein complexes and composition of separative gel are prerequisite for efficient separation by BN-PAGE, moreover, these improvements enable subsequent mass spectrometric identification of separated protein complex composition.

The usefulness of the method in nuclear research is demonstrated by 1), immunological detection of several nuclear protein complexes separated by blue native

electrophoresis, and 2), mass spectrometric identification of protein components and subunits of separated nuclear protein complexes.

REFERENCES

- Schagger H., von Jagow G.: *Annal. Biochem.* 199, 223 (1991).

VÝVOJ MIKROREAKTORŮ PRO PŘÍPRAVU A IZOLACI SPECIFICKÝCH GLYKOPEPTIDŮ

Š. OUZKÁ^a, J. JEŽOVÁ^a, L. KORECKÁ^a, R. STEFANESCU^b, M. PRZYBYLSKI^b a Z. BÍLKOVÁ^c

^a*Katedra Analytické chemie, ^bFachbereich Chemie, University of Konstanz, Universitaetstrasse 10, 784 57 Konstanz, Germany, ^cKatedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice, ČR*
Sarka.Ouzka@seznam.cz

Hlavním cílem našeho projektu je vyvinout diagnostickou metodu pro detekci fyziologické i patologické glykosylace různých glykoproteinů. Pro vysokomolekulární molekuly s komplexní a vysoce heterogenní strukturou je technika peptidového mapování velice obtížná. Vhodnější je pracovat s tzv. specifickým („signálním“) peptidem, který nese specifickou informaci potřebnou k identifikaci daného (glyko)proteinu.

Jako modelový glykoprotein pro studium konzervativní N-glykosylace byla vybrána molekula IgG. Specifickým peptidem IgG je nanopetid s oligosacharidovým řetězcem v pozici aminokyseliny asparaginu 297.

K modifikaci oligosacharidových řetězců fragmentů IgG byly použity mikroreaktory (IMERs) s enzymy neuraminidasou a β-galaktosidasou. K izolaci různě přirozeně glykosylovaných i námi modifikovaných fragmentů IgG byla použita metoda lektinové afinitní chromatografie. Po imobilizaci streptavidinu na magnetické mikropartikelky (0,2–2 μm; s karboxylovou funkční skupinou) byla využita vysokoafinitní interakce biotin – streptavidin k imobilizaci biotinylovaných lektinů: Concanavalin A (s afinitou k α-D-mannose a α-D-glukose), lektin *Griffonia simplicifolia* I (s afinitou k terminálním α-D-galaktosovým a N-acetyl-α-D-galaktosaminovým zbytkům) a lektin *Griffonia simplicifolia* II (s afinitou k N-acetyl-D-glukosaminovým zbytkům).

TPCK-trypsinový mikroreaktor byl použit ke specifickému naštěpení Fc fragmentu IgG. Pomocí připravených lektinových afinitních mikroreaktorů byly ze směsi fragmentů vyzolovány různě glykosylované specifické peptidy IgG. Eluované frakce byly analyzovány pomocí MALDI-TOF-MS. Získané signály molekulového iontu s *m/z* 4020 (z GS-I), 3869 (z GS-II) a 3711 (z Con A) odpovídají našim teoretickým předpokladům o molekulové hmotnosti různě glykosylovaných specifických peptidů IgG. MALDI-TOF se ukázala jako vhodná technika pro studium heterogenity glykosylace IgG.

Tato práce byly podpořena granty MSMT VZ 253100002 a GA ČR 203/02/0023.

AEROBNÍ DEGRADACE FENOLU SMĚŠNOU MIKROBNÍ POPULACÍ V PRŮTOČNÝCH REAKTORECH

JAN PÁČA Jr.^a, ALENA KOSTEČKOVÁ^b, MARIE STIBOROVÁ^a a JAN PÁČA^b

^aKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Albertov 2030, 128 40 Praha 2; ^bÚstav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
jan.paca@volny.cz

V současné době je vedle fyzikálně chemických či chemických způsobů odstraňování škodlivých látek z prostředí platnou variantou také biologické čištění, avšak za podmínky, že dané látky jsou biologicky rozložitelné. Biologické čištění je ekonomicky výhodnější oproti fyzikálně chemickým a chemickým procesům při stejné účinnosti čištění. Fenol patří mezi aromatické polutanty, které jsou přítomny v průmyslových odpadech, a to hlavně z výroby koksárenských, petrochemických, farmaceutických a z výroby umělých hnojiv, barviv, výbušnin, fungicidů a fenolformaldehydových pryskyřic. Z odpadních vod je fenol vzhledem k rychlejšímu a všestrannějšímu metabolismu mikroorganismů lépe odstraňován v aerobním prostředí.

Práce se zabývá problematikou degradace fenolu z vodného prostředí. K degradaci byly použity průtočné náplňové reaktory. Pro imobilizaci buněk byla použita kokosová vlákna, dva druhy pěnového polyuretanu, porézní skleněné kuličky a expandovaná břídllice. Jako biokatalyzátor sloužila speciálně připravená směšná mikrobiální populace. Degradace probíhaly při teplotě 30 °C a pH 7,2.

Experimentálně bylo testováno, který z použitých náplňových materiálů je pro imobilizaci buněčné populace nejvhodnější, dále vliv vstupní koncentrace fenolu a z toho plynoucí vliv organické zátěže, vliv hydraulické doby zdržení a vliv obsahu dusíku v simulované odpadní vodě na provozní charakteristiky bioreaktorů.

Výsledky ukázaly, že degradační aktivita biosystému závisí nejen na velikosti vstupní zátěže a na materiálu náplně reaktorů, ale i na době zdržení kapalné fáze v reaktoru a na obsahu dusíku v simulované odpadní vodě.

Autoři děkují za podporu GA ČR (grant 104/03/0407) a Ministerstvu školství České republiky (MSM 113100001).

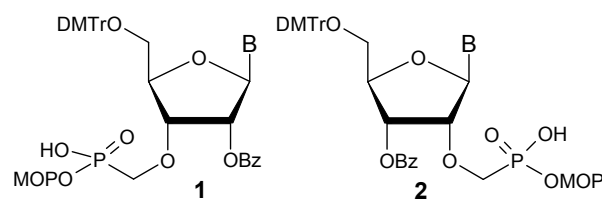
NOVEL ENZYME-STABLE OLIGORIBONUCLEOTIDES WITH PHOSPHONATE-BASED INTERNUCLEOTIDE LINKAGE: EVALUATION OF HYBRIDIZATION PROPERTIES

ONDŘEJ PÁV, MARCELA NOVOTNÁ, MILENA MASOJÍDKOVÁ, and IVAN ROSENBERG

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6
pav@uochb.cas.cz

In our previous papers^{1,2} we have reported the hybridization properties of the 3'-5' and 2'-5' phosphonate ApA dimers with polyU. We have found that all four regioisomeric dimers bearing the isopolar nonisosteric 3'(2')-O-CH₂-P-O-5' or 3'(2')-O-P-CH₂-O-5' types of internucleotide linkage are capable of forming much more stable triplex-like complexes with polyU than the natural ApAs.

In order to verify the usefulness of this modified linkage in longer oligoribonucleotides, we have synthesized monomers **1** and **2** and incorporated them into oligoribonucleotides using phosphotriester condensation method to produce a set of novel ribo-nonamers with phosphonate internucleotide linkage.



B = A^{Bz}, G^{iBu}, U, C^{Bz}

Bz = Benzoyl, DMTr = 4,4'-Dimethoxytrityl, MOP = 4-Methoxy-1-oxido-2-picolylyl

We have observed that phosphonate linkage is completely stable against ribonucleases. Therefore, this linkage can be inserted into critical sites of modified oligomers (e.g. ribozymes, siRNA, or antisense oligonucleotides).

The hybridization properties were evaluated by measurements of thermal stabilities of duplexes composed of one strand partially-modified with phosphonate units and the unmodified counterpart. Obtained T_m values of duplexes were compared with that of unmodified ones. Phosphonate oligomers exhibited lower melting points than the natural ones. Obviously, insertion of extra methylene group into internucleotide linkage causes the conformational changes of the modified sugar-phosphate backbone due to the lengthening of internucleotide linkage. In order to explain this behaviour, the NMR conformational analysis and molecular dynamics simulation experiments have already been started.

It is worth to notice that no nuclease-resistant modifications of internucleotide linkage have so far been reported in ribo series. Support by grants A4055101 (Acad. Sci., Czech Republic) and 203/01/1166 (GA, Czech Republic) under research project Z4055905 is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Pressová M., Endová M., Točík Z., Liboska R., Rosenberg I.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 8, 1225 (1998).
2. Hanuš J., Barvík I., Ruzsová-Chmelová K., Štěpánek J., Turpin P.-Y., Bok J., Rosenberg I., Petrová-Endová M.: Nucl. Acids. Res. 29, 5182 (2001).

ASSEMBLY FACTORS OF FIFO ATP SYNTHASE ACROSS GENOMES

ANDREA PÍČKOVÁ^a, MARTIN POTOCKÝ^b and JOSEF HOUŠTĚK^a

^a*Department of Bioenergetics, Institute of Physiology and Centre of Integrated Genomics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague;* ^b*Department of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague*
pickovaa@biomed.cas.cz

The energy needs of aerobic organisms are met primarily through the action of F1FO ATP synthase, which catalyses ATP synthesis coupled to respiration in the process of oxidative phosphorylation. The ATP synthase is comprised of a peripheral catalytic moiety (F1) with highly conserved oligomeric structure and an integral membrane part (FO), which composition differs among organisms¹.

The mitochondrial ATP synthase does not self-assemble in vivo. The assembly is a complex process dependent on the concerted action of both genomes, protein import into mitochondria and the assembly pathway itself. Work with respiratory deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae* has led to the identification of five proteins that serve chaperon-type functions during the enzyme assembly. Atp11p and Atp12p mediate assembly of F1 component². Another yeast protein, Fmc1p, is required for F1 assembly at elevated growth temperature³. Atp10p and Atp22p are essential for FO formation where Atp10p binds selectively^{4,5} to the mitochondrially-encoded subunit a. Recently, orthologues of yeast Atp11p and Atp12p were described and characterised in mammalian cells^{6,7}.

Here we present computational survey of ATP synthase assembly factors from all available genomes. Atp11p and Atp12p orthologues were detected in all eukaryotic lineages that are capable of ATP synthesis via the oxidative phosphorylation and seem to be critical for biogenesis of ATP-synthase. Atp12p orthologues were further found within alpha-proteobacteria, putative endosymbiotic ancestors of mitochondria. Unexpectedly, presence of Atp10p orthologues is limited to evolutionary distant taxa including Fungi, Dictyosteliida, stramenopiles and land plants; interestingly, phylogeny analysis of FO-a subunit revealed existence of two main groups distinguishable by the presence/absence of Atp10p orthologues. While Fmc1p orthologues seem to be restricted to the members of Fungi, Atp22p appears to be present in the genus *Saccharomyces* only. Additionally, our comparative sequence analysis identified evolutionary conserved residues, putative functional domains and their basic structural features for Atp10p, Atp11p and Atp12p orthologues. These results provide basis for detailed molecular analysis of the ATP synthase-specific chaperones.

This work was supported by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic (NE 6533-3) and the Charles University (12/2002/C).

REFERENCES

- Leyva J. A., Bianchet M. A., Amzel L. M.: *Mol. Membr. Biol.* 20, 27 (2003).
- Ackerman S. H.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1555, 101 (2002).
- Lefebvre-Legendre L., Vaillier J., Benabdelhak H., Velours J., Slonimski P. P., di Rago J. P.: *J. Biol. Chem.* 276, 6789 (2001).

- Ackerman S. H., Tzagoloff A.: *J. Biol. Chem.* 265, 9952 (1990).
- Helfenbein K. G., Ellis T. P., Dieckmann C. L., Tzagoloff A.: *J. Biol. Chem.* 278, 19751 (2003).
- Wang Z. G., White P. S., Ackerman S. H.: *J. Biol. Chem.* 276, 30773 (2001).
- Picková A., Paul J., Petruzzella V., Houstek J.: *FEBS Lett.* 551, 42 (2003).

PEROXIDASE-MEDIATED ELLIPTICINE-DNA ADDUCT FORMATION EXPLAINS THE SELECTIVE EFFICIENCY OF THIS ANTICANCER DRUG AGAINST BREAST CANCER AND LEUKEMIA

JITKA POLJAKOVÁ and MARIE STIBOROVÁ

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2

Ellipticine and its more soluble derivatives exhibit promising results in the treatment of breast cancer and acute myeloblastic leukemia. The inhibition of topoisomerase II after intercalation into DNA was considered an important property for its cytotoxicity. The CYP-dependent activation leading to DNA adduct formation, we found to be generated in vitro, is a novel mechanism for the ellipticine pharmacological action¹. Target tumor cells express, beside CYP1A1, 1B1, 3A4, also peroxidases (myeloperoxidase or lactoperoxidase) in higher levels than cells of peritumoral tissues. Since the participation of peroxidases in metabolism of ellipticine has not been identified yet, the aim of the present work is to extend our knowledge on this issue. Lactoperoxidase, myeloperoxidase and a model plant peroxidase (from horseradish) were used in our study. Ellipticine is oxidized by all these peroxidases via a radical mechanism. Using mass spectrometry (MALDI-TOF, EI) we identify that ellipticine is primarily oxidized to a one electron reaction product (radical) producing a dimer as the major metabolite. Its formation is inhibited by radical trapping agents (glutathione, NADH) and by DNA or deoxyguanosine 3'-monophosphate. During oxidation of ellipticine by peroxidases, two ellipticine-DNA adducts, which were generated by CYP-mediated reaction¹, are also formed. Identities of adducts formed by CYPs and peroxidases were confirmed by co-chromatography on HPLC. Deoxyguanosine was determined as a target deoxynucleoside for ellipticine covalent binding in DNA. The involvement of myeloperoxidase and lactoperoxidase in an increase of ellipticine pharmacological efficiency in the target tumor tissue is discussed.

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/01/0996) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

REFERENCES

- Stiborová M., Bieler C. A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.* 62, 1675 (2001).

PHOSPHOLIPASE D-MEDIATED SIGNALLING IS REQUIRED FOR POLAR GROWTH OF TOBACCO POLLEN TUBES

MARTIN POTOCKÝ^{a,b}, RADEK BEZVODA^a, IRENA BRABCOVÁ^b, OLGA VALENTOVÁ^b and VIKTOR ŽÁRSKÝ^{a,c}

^aDepartment of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University, 128 40 Prague; ^bDepartment of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, 166 28 Prague, ^cInstitute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, 165 02 Prague
potockym@vscht.cz

Pollen tubes expand by tip growth and extend directionally toward the ovule to deliver sperms during pollination. They provide an excellent model system for the study of cell polarity control and tip growth, because they grow into uniformly shaped cylindrical cells in culture. However, mechanisms underlying tip growth are still poorly understood in pollen tubes¹.

The molecular machines that drive protein transport through the secretory pathway function exert their activities on the surfaces of membrane bilayers. It is now clear that the various lipid components of these bilayers play direct and versatile roles in modulating the activity of proteins that either themselves constitute core components of the membrane trafficking machinery, or represent proteins that regulate such core components².

Phospholipase D (PLD) cleaves structural phospholipids producing phosphatidic acid (PA), second messenger implicated in a number of signalling cascades regulating cytoskeletal rearrangements, vesicular trafficking, secretion, ion fluxes, membrane remodelling, and defence responses in eukaryotic cells³. We have previously reported that PLD and PA have a role in the process of polarised plant cell expansion as represented by pollen tube growth⁴.

Here we present data further supporting direct involvement of PLD in vesicle budding/transport machinery together with initial molecular characterisation of PLD isoforms from tobacco pollen. PLD-mediated PA production in vivo can be blocked by primary alcohols, which serve as a substrate for the transphosphatidylation reaction. Exocytosis and endocytosis was rapidly blocked in the presence 0.35 % 1-butanol whereas secondary and tertiary butanol isomers, which are ineffective in transphosphatidylation, did not show any effect. Moreover, membrane traffic could be restored by addition of exogenous PA-containing liposomes. Using degenerated RT-PCR approach, we have cloned five tobacco PLD cDNAs form three PLD subfamilies and examined their expression levels. Roles of distinct isoforms were tested with antisense oligonucleotides strategy.

This work was supported by grant FRVS G4/663 and by the research centre Signalling Pathways in plants (LN00A081) of the Ministry of Education of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Hepler P. K., Vidali L., Cheung A. Y.: *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 159 (2001).
2. Bankaitis V. A., Morris A. J.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 389 (2003).
3. Wang X. M.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 408 (2002).
4. Potocký M., Elias M., Profotová B., Valentová O., Zarský V.: *Planta* 217, 122 (2003).

CHOLINESTERASE BASED PIEZOELECTRIC BIOSENSOR FOR DETECTION OF ORGANOPHOSPHATES

JAN PŘIBYL^a, JAN HALÁMEK^b, ALEXANDER MAKOWER^b, and PETR SKLÁDAL^a

^aDepartment of Biochemistry, Masaryk University Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^bDepartment of Analytical Biochemistry, University of Potsdam, Karl-Liebknecht Str. 24-25, 144 76 Golm, Germany
pribyl@chemi.muni.cz

Organophosphates (OP) are known as a group of compounds exhibiting strong inhibition effect on the enzymatic activity of cholinesterase. The resulting blocking of nerve system forms the basis for application of organophosphates as insecticides and nerve agents. A possibility of military exploitation, as well as the demand for rapid and sensitive environmental screening, focused attention to the sensitive analytical methods able to detect OP presence in short time and preferably allowing "field monitoring". A main advantage of biosensors¹ is integration of a physical-chemical transducer together with a bio-recognition element, allowing to monitor biological effect of compounds in the analysed sample. Cholinesterase² (ChE) is the enzyme commonly incorporated in the neurotransmitter system. It contains serine in its catalytic centre and this residue becomes specifically inhibited with OPs and carbamates. The combination of ChE with the electrochemical transducer allowed construction of sensitive analytical devices^{3,4} with ability to determine cholinesterase inhibitors in short time.

In this contribution, a novel combination of a piezoelectric transducer with the immobilized reversible cholinesterase inhibitor, cocaine derivative BZE-DADDO (lit.⁵), was used for construction of an affinity biosensor. The piezoelectric transducer provided not only sensitive analytical device, but also an outstanding ability to monitor affinity interaction in real time. The recorded signal was proportional to the amount of the enzyme-inhibitor complex formed on the sensing surface. The determined kinetic parameters assisted in a better description and understanding of the studied interaction. Using the reversible ChE inhibitor (cocaine derivative) allowed full regeneration of the sensor biorecognition layer. The cocaine derivative BZE-DADDO (containing terminal primary aminogroup) was immobilized on the gold surface of piezoelectric sensor as the conjugate with 11-mercaptopundecanoic acid. The long-chain thiocompounds provided compact and highly stable self-assembling monolayer on the gold surface. The experiments were performed in the

flow-trough mode, total duration of one experiment containing base line stabilization, association phase, equilibration of signal and regeneration of sensing surface was 25 minutes.

Initially, stability of the biorecognition layer was studied; for 10 sequential experiments, the achieved reproducibility was better than 9%. The main part of experiments was focused on application of the developed biosensor for determination of organophosphate inhibitors in aqueous samples. The obtained limit of detection for strong ChE inhibitors (diisopropyl-fluorophosphate, paraoxon) was 10^{-9} mol.l⁻¹. For weaker inhibitors as chlorpyrifos-oxon and chlorfevinphos, the detection limits were 6×10^{-8} and 1.4×10^{-7} mol.l⁻¹, respectively. The precision of measurements was typically in the range 8–14%. Finally, performance of the biosensor was tested on real samples - spiked river water (three various concentrations of diisopropylfluorophosphate were used: 10^{-5} , 5×10^{-7} and 5×10^{-9} mol.l⁻¹). The measured values of inhibitor concentrations determined using piezoelectric biosensor were 9 to 27% higher than the expected levels, i.e. the presence of the target compounds was always correctly detected.

The developed piezoelectric biosensor was useful for real time monitoring of the enzymatically active cholinesterase as well as for detection of cholinesterase inhibitors. The novel and original principle of the piezoelectric enzyme biosensor appears promising for rapid and cost-effective screening of cholinesterase inhibitors.

LITERATURE:

1. Rechnitz G. A.: *Electroanalysis* 3, 73 (1991).
2. Taylor P.: *J. Biol. Chem.* 266, 4025 (1991).
3. Nunes G. S., Skládal P., Yamanaka H., Barceló D.: *Anal. Chim. Acta* 362, 59 (1998).
4. Makower A., Haláček J., Skládal P., Kernchen F., Scheller F. W.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 1329 (2003).
5. Haláček J., Makower A., Skládal P., Scheller F. W.: *Biosens. Bioelectron.* 17, 1045 (2002).

TVORBA NÁSTROJŮ GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ PRO CÍLENOU DISRUPCI A DELECI GENŮ OSMOTOLERANTNÍ KVASINKY *Zygosaccharomyces rouxii*

LENKA PŘIBYLOVÁ a HANA SYCHROVÁ

*Oddělení Membránového transportu, Fyziologický ústav AVČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
pribyll@biomed.cas.cz*

Zygosaccharomyces rouxii se řadí mezi nejvíce osmotolerantní druhy kvasinek, tj. takové, které jsou schopné přežít v prostředí s nízkou aktivitou vody (např. koncentrované roztoky cukrů či solí). Je to druh sice blíže příbuzný a podobný modelové kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, ale výrazně se liší právě vysokou osmotolerancí. Schopnost odolávat vysokému osmotickému tlaku udílí *Z. rouxii* patrně přítomnost specifických genů. Identifikace těchto genů a jejich exprese v *S. cerevisiae* by tedy mohly významně přispět ke zlepšení vlastností průmyslových kmenů *S. cerevisiae*.

Dosud bylo v *Z. rouxii* identifikováno jen několik genů podílejících se na odpovědi na osmotický stres (např. HOG1, SOD2), ale žádný z nich není druhově specifický. Podrobnější charakterizaci specifických vlastností omezuje fakt, že pro *Z. rouxii* zatím nebyl vytvořen efektivní soubor nástrojů genového inženýrství, a zejména možnost cílených disrupcí a delecí genů stále zůstává otázkou. Zatím existují jen dva typy auxotrofních mutantů (Leu- a Ura-), pro něž jsme v naší předchozí práci optimalizovaly transformační proceduru a ověřily využití plasmidových vektorů s auxotrofními markery URA3 a LEU2. Pro delece genů jsou však velmi výhodné tzv. disrupční kazety, které využívají existence dominantních markerů, např. genů propůjčujících organismu rezistenci k toxické látce. Pro kvasinku *Z. rouxii* zkoumáme možnost využití genů, zajišťujících jiným druhům organismů rezistenci k toxickým sloučeninám geneticinu (kazeta loxP-kanMX-loxP používaná pro *S. cerevisiae*) a L-azetidín-2-karboxylátu (gen MPR1 pocházející ze *S. cerevisiae*).

Pokud potvrdíme existenci vysoké frekvence homologní rekombinace u *Z. rouxii*, bude využití kombinace dominantního (kanMX) a auxotrofního (URA3) markeru velmi výhodné pro opakovanou disrupci (deleci) genů prostřednictvím tzv. systému Cre-loxP. Budou tak moci být připraveny kmeny s vícenásobnými auxotrofními mutacemi či s mutacemi způsobujícími osmosenzitivitu. Tyto mutanty pak budeme transformovat genomovou bankou *Z. rouxii*, a pokusíme se tak izolovat geny zodpovědné za vysokou osmotoleranci této kvasinky.

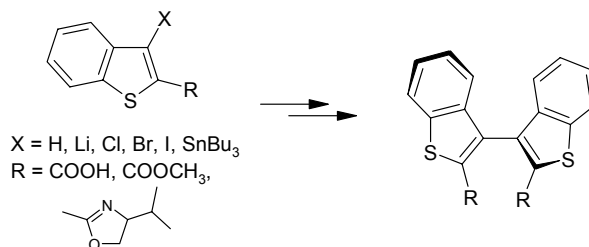
Tato práce byla podpořena granty AVOZ 5011922 a GA ČR 204/01/0272 a 204/03/H066.

SYNTÉZA A ELEKTROCHEMICKÉ STUDIUM AXIÁLNĚ CHIRÁLNÍCH SLOUČENIN ODVOZENÝCH OD BENZOTHIOFENU

MICHAL REJŇÁK^a, JIŘÍ SVOBODA^a, JIŘÍ KLÍMA^b a JIŘÍ LUDVÍK^b

^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bÚstav fyzikální chemie J. Heyrovského, AV ČR, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8

Michal.Rejnak@vscht.cz



V rámci našeho systematického výzkumu kondenzovaných heterocyklů¹ byla vypracována syntéza bi(benzothiofeneových) derivátů vycházející ze snadno dostupných derivátů benzothiofenu s využitím standardních metod tvorby vazby aryl-aryl.

Dále byla studována alternativní metoda přípravy odpovídajících dimerů za podmínek elektrochemické redukce². Uvedené prekurzory (X = Cl, Br, I) byly podrobeny studiu elektrochemických vlastností z hlediska dvouelektronové dehalogenace a zejména možnosti ovlivnění mechanismu ve prospěch jednoelektronové redukční dimerizace.

Takto získané dimerní sloučeniny budou dále využity pro syntézu složitějších bi(benzothiofenových) systémů a pro design látek s kapalně-krystalickým chováním.

Projekt výzkumu byl podporován granty GA ČR č. 106/00/0582 a 202/02/0840, výzkumným záměrem MŠMT MSM 223100001 a projektem COST D14 WG 0015.

LITERATURA

- Mézlová M., Petříčková H., Kozmík V., Svoboda J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 68, 1020 (2003).
- Rejňák M., Klíma J., Svoboda J., Ludvík J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 242 (2004).

SYNTEZA OLIGOKARBOXYLOVÝCH KYSELIN S TRIPTYCENOVÝM SKELETEM

MARKÉTA RYBÁČKOVÁ, MARTIN BĚLOHRADSKÝ, PETR HOLÝ a JIŘÍ ZÁVADA

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

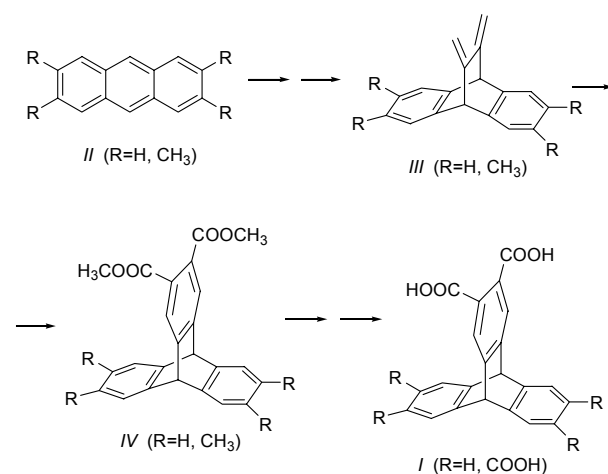


Schéma 1

Oligokarboxyloxylen kyseliny s triptycenovým skeletem představují rigidní supramolekulární stavební bloky, které by mohly pomocí dvojíých vodíkových vazeb vytvářet v krystalech zajímavé porézní struktury.

Pro syntézu oligokarboxyloxylen triptycenových kyselin **I** byl navržen obecný syntetický postup (Schéma 1). Výchozími sloučeninami jsou methylderiváty antracenu **II**, které lze získat známými syntetickými postupy. Další kroky jsou odvozeny od postupů provedených na podobných strukturách^{1,2}. Adiční reakcí antracenových derivátů **II** s 1,4-dichlorbut-2-enem a následnou eliminací dvou molekul HCl vznikají deriváty **III**.

Ty Diels-Alderovou adicí s dimethylesterem kyseliny but-2-ynediové a následnou aromatizací poskytují triptycenyové diestery **IV**. Posledním krokem po hydrolyze dimethylesterů je oxidace methylových skupin vedoucí k hexakyselině a isomerním tetrakyselinám (podle počtu a poloh methylových skupin výchozích antracenů).

Na syntézu těchto kyselin, prováděnou v současné době, bude navazovat studium jejich krystalových struktur rentgenovou strukturální analýzou.

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/03/0087).

LITERATURA:

- Hart H., Bashir-Hashemi A., Luo J., Meador M. A.: *Tetrahedron* 42, 1641 (1986).
- Butler D. N., Snow R. A.: *Can. J. Chem.* 53, 256 (1975).

INTERAKCE OBALOVÝCH GLYKOPROTEINŮ S MATRIXOVÝM PROTEINEM MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU

LENKA SEDLÁČKOVÁ, JAN LIPOV a TOMÁŠ RUML

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Na povrchu všech retrovirů se nacházejí obalové glykoproteiny. Povrchový glykoprotein (SU) zprostředkovává vazbu virové částice na receptory hostitelské buňky. Transmembránový glykoprotein (TM) se účastní fúze virové membrány s membránou hostitelskou a umožňuje tak vstup viru do buňky. Oba jsou translatovány ve formě polyproteinového prekurzoru Env, který je štěpen v Golgiho aparátu buněčnou proteasou na dvě podjednotky (SU, TM). Předpokládá se, že inkorporace glykoproteinů do virové membrány je umožněna specifickou interakcí cytoplazmatické domény TM s polyproteinovým prekurzorem Gag, což je prekurzor strukturálních proteinů viru. Tato stabilní interakce již byla prokázána například u prekurzoru Pr55^{Gag} a glykoproteinu gp41 v nezralých částicích HIV-1 (cit.¹). Dále je pravděpodobné, že za tuto interakci je odpovědný matrixový protein, který se ve zralém virionu nachází těsně pod lipidovým obalem a tvoří obal virové kapsidy. Jeho přímá interakce s cytoplazmatickou doménou obalového glykoproteinu byla také prokázána u HIV-1 (cit.²).

Předmětem našeho studia je interakce cytoplazmatické domény TM s prekurzorem Pr78^{Gag}, resp. s matrixovým proteinem Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV). U tohoto viru lze očekávat jinou situaci než v případě HIV-1, neboť M-PMV patří mezi retroviry, které skládají nezralé částice v cytoplazmě a ty jsou poté transportovány k cytoplazmatické membráně, kde dojde k uvolnění virové částice. U HIV-1 dochází ke skládání virové částice až u cytoplazmatické membrány. Ke studiu interakcí používáme nezralé viriony získané transfekcí tkáňové kultury COS-1. Získané viriony jsou ultracentrifugační „spin-thru“ metodou vystaveny detergentu, jehož působením dochází k rozpadu jejich lipidového obalu, nikoliv však celé virové částice. Nyní je podrobně zkoumáno, zda je interakce TM a Pr78^{Gag} stabilní

jako u HIV1, aby vydržela působení detergentu. Dále bude ve tkáňových kulturách sledováno, zda je matrixový protein schopen se uvolňovat z buněk ve formě částic podobných virionu (VLP) a jeho chování, bude-li koexprimován spolu s obalovými glykoproteiny³, resp. s TM. *In vivo* studie jsou doplněny sledováním interakcí rekombinantně připravených proteinů *in vitro*.

LITERATURA

1. Wyma D. J., Kotov A., Aiken C.: *J. Virol.* 74, 9381 (2000).
2. Cosson P.: *EMBO J.* 15, 5783 (1996).
3. Gonzalez S. A., Affranchino J. L., Gelderblom H. R., Burny A.: *Virology* 194, 548 (1993).

STIMULACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK PERIFERNÍ KRVE PROTEINY TEPELNÉHO ŠOKU U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK A VZTAH K POTRANSPLANTAČNÍM KOMPLIKACÍM

LUCIE SEDLÁČKOVÁ^a, PETR SEDLÁČEK^b a ILONA HROMADNÍKOVÁ^a

^aPediatrická klinika a ^bKlinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN v Motole, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Transplantace hematopoetických kmenových buněk je uznávanou léčbou pro určitá maligní i nemaligní hematologická onemocnění, některé genetické choroby a solidní tumory. Hlavní komplikací po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) je reakce štěpu proti hostiteli (GvHR). Příčinou této reakce je buď neúplná shoda v HLA-systému dárce a příjemce, nebo neshoda v antigenech, které nejsou kódovány v hlavním systému histokompatibility. Přestože se provádí imunofarmakologická profylaxe, vzniká akutní GvHD (graft-versus-host disease) u HLA-alogenních identických transplantací v 30-60%. Pravděpodobnost vzniku akutní GvHD ještě stoupá při neshodě v HLA systému a v případě nepříbuzných dárců. Nemocní s touto komplikací jsou ohroženi infekcemi jednak v důsledku samotné akutní GvHD, jednak v důsledku nutné intenzivní imunosupresivní léčby. Akutní GvHD a k ní přidružené infekční komplikace významně přispívají k léčbou způsobené mortalitě po alogenní transplantaci. Časně po transplantaci před přihojením transplantátu jsou pacienti také ohroženi těžkými infekcemi bakteriálního nebo mykotického původu v důsledku imunitní deficiencie. Po přihojení frekvence bakteriálních komplikací klesá, pokud ovšem nedojde ke vzniku GvHD. Riziko infekcí trvá až do normalizace imunitního stavu během jednoho až dvou let po transplantaci.

Proteiny tepelného šoku (hsp) jsou vysoce konzervativní molekuly (sekvenční homologie až 50% mezi lidskými a bakteriálními hsp) přítomné u prokaryotních a eukaryotních buněk. Za fyziologických podmínek jsou přítomny v nízkých koncentracích v cytoplasmě. Při buněčném stresu (infekce, zánět apod.) se jejich exprese zvyšuje. Hsp se podílí na stabilizaci proteinů a jejich transportu mezi intracelulárními kompartmenty, účastní se také prezentace peptidů na pozadí

MHC molekul. Hsp představují hlavní imunodominantní antigeny u širokého spektra mikrobiálních patogenů, jejichž prostřednictvím stimuluje infekční agens imunitní systém hostitele.

Předmětem našeho studia je měření odpovědi mononukleárních buněk periferní krve dětí před a po HSCT na stimulaci rekombinantním lidským hsp60 a hsp70. Výsledky stimulací u pacientů srovnáváme s hodnotami stimulací zdravých dárců a hledáme souvislosti s potransplantačními komplikacemi (infekce, GvHD). Předběžné studie, provedené zatím jen u hsp60, ukázaly signifikantně vyšší stimulace u pacientů před a po transplantaci, u kterých byla diagnostikována bakteriální kolonizace, sepse či mykotická infekce, a to ve srovnání s pacienty bez známek infekce a se zdravými dárci. U pacientů se objevovaly nejčastěji tyto infekční agens: *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Aspergillus species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida crusei*. Pacienti testovaní po transplantaci měli kompletní dárcovskou krvetvorbu. Předpokládáme, že hsp60 stimuluje nejen imunitní systém pacienta, ale také mononukleární buňky transplantátu, což může přispět k rozvinutí dalších potransplantačních komplikací včetně GvHD.

Práce byla podpořena grantem TRANSEUROPE, no. QLRT-2001- 01936 a VZ 111300005.

SYNTÉZA FUNKCIONALIZOVANÝCH NERACEMICÝCH HELICENŮ

PETR SEHNAL, IRENA G. STARÁ, FILIP TEPLÝ, ZUZANA ALEXANDROVÁ, IVO STARÝ, DAVID ŠAMAN a PAVEL FIEDLER

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
sehnal@uochb.cas.cz

Heliceny se postupně uplatňují v různých oblastech chemie a materiálové vědy¹. Z těchto důvodů se v poslední době objevily nové metody syntézy helikálních molekul^{2,3}. V naší laboratoři jsme vyvinuli efektivní způsob přípravy funkcionalizovaných derivátů helicenů, který je založen na diastereoselektivní [2+2+2] cykloizomeraci aromatických trienů za katalýzy přechodnými kovy.

Jako modelová sloučenina byl připraven helikální alkohol (*P,1S*)-(+)-**6** v opticky čisté formě. Asymetrická syntéza vychází z 3-methoxy-salicylaldehydu², který lze v šesti krocích převést na neracemický stavební blok (*1S*)-(-)-**2**. Následuje Sonogashirův coupling diynu (*1S*)-(-)-**2** s jodidem **3**, který po následné desilylaci vede ke klíčovému chirálnímu trienu (*1S*)-(-)-**4**. Sterický průběh diastereoselektivní [2+2+2] cykloizomerace za katalýzy CoI je řízen přítomným asymetrickým centrem. Reakce poskytuje pouze diastereoizomer (*P,1S*)-(+)-**5**. V dalším kroku je methylová skupina selektivně odstraněna za vzniku opticky čistého helikálního alkoholu (*P,1S*)-(+)-**6**.

similar set of substrates, it is tempting to speculate their functional crosstalk.

To assess possible role of DASH expression pattern in pathogenesis of rheumatic diseases on systemic as well as local levels, we have studied DASH molecules in blood plasma, synovial fluid and in the mononuclear cells separated from both abovementioned materials from patients with rheumatoid (RA) and psoriatic (PsA) arthritides. The total plasma DPP-IV-like specific activity was significantly lower in patients with RA and PsA compared to the controls ($p < 0.01$ and $p < 0.02$, respectively) and was correlating inversely with the number of lymphocytes. In the case of RA, DPP-IV-like activity negatively correlated with the plasma C-reactive protein and with the standard Disease Activity Score. The DPP-IV-like specific activity was insignificantly lower in the synovial fluid from patients with RA compared to PsA. There was a positive correlation between the number of synovial fluid lymphocytes as well as monocytes with the synovial fluid DPP-IV-like activity. Gel chromatography of blood plasma samples revealed two MW forms of DPP-IV-like activity in patients and only one in controls. RT-PCR analysis of DASH molecules expressed demonstrated presence of transcripts of four DASH members, DPP-IV, DPP-8, attractin and fibroblast activation protein- α in mononuclear cells of both synovial fluid and blood of all patients and controls. Presence of DPP-IV and attractin was revealed also by flow immunocytochemistry.

Our results suggest that aberrations of complex DASH pattern, rather than the DPP-IV activity alone, participate on the pathogenesis of RA and PSA.

Work was supported by grant IGA 7746-3.

REFERENCES

1. Sedo A., Malik R.: Biochim. Biophys. Acta 1550, 107 (2001).

INHIBICE GENU SRC A ČASNÝ VÝVOJ ORGANISMU *Xenopus laevis*

RADEK ŠINDELKA, ZOLTÁN FERJENTSÍK a JIŘÍ JONÁK

Oddělení Biosyntézy proteinů, ÚMG AV ČR, 166 36 Praha 6
sindelka@img.cas.cz

c-Src patří do skupiny protein-tyrosin kinas, které jsou přítomné ve všech buněčných typech obratlovců. Usuzuje se, že se Src kinasy exprimují již v počátečním vývoji organismů, ale přesné detaily funkce a působení nejsou do dnešní doby téměř u žádného vyššího organismu zcela objasněny.

Vhodným modelem pro studium vývojově důležitých genů je organismus *Xenopus laevis* (Drápatka vodní). Jeho výhodou je dokonalá znalost vývojových stádií, snadná manipulovatelnost a vysoká regenerační schopnost. Proto je dnes *Xenopus* jedním z nejpoužívanějších modelových organismů pro transgenezi a mikrochirurgické zákroky.

Funkce genů je možno studovat dvojím přístupem, a to buď nadprodukcí, nebo blokací. Nadprodukce genu src u *X.*

laevis byla provedena spermiíovou transgenezí již v 90. letech. Byla zjištěna souvislost mezi zvýšenou produkcí v-Src i c-Src kinasy ve tkáních nad určitý práh a abnormálním vývojem. S tím také koreloval úbytek kadherin-kateninových komplexů, kterými se zajišťuje adhezivita mezi buňkami. V dnešní době probíhá studium funkce genu src druhým způsobem, tedy blokací genu src a jeho vlivu na časný vývoj *X. laevis*.

Pro inhibici genu src jsme zvolili dva přístupy. Prvním je klasický knock-out genu pomocí konstruktů složeného ze dvou komplementárních ramen středního úseku, který se skládá z referenčního genu (např. GFP pod kontrolou CMV promotoru). Výhodou této metody je trvalá blokáce genu a snadné sledování úspěšnosti mikroinjekce a homologní rekombinace. Dalším přístupem je použití technologie RNA interference (RNAi). Jejím principem je vnášení krátkých, asi 22 bp dlouhých, dsRNA molekul (siRNA- small interfering RNA). Tyto dsRNA se po rozestoupení naváží na komplementární úsek mRNA inhibovaného genu. Komplex mRNA a ssRNA je poté rozeznáván proteiny s endonukleázovou aktivitou. Po rozštěpení je tedy mRNA nefunkční a exprese genu pozastavena. Účinnost této metody je limitována časem rozpadu siRNA, který se pohybuje obvykle okolo jednoho až dvou týdnů. Inhibice není 100 %, lze očekávat blokaci genu okolo 50–70 %.

V našich pokusech jsme používali konstrukt pro knock-out, jehož struktura vychází z plazmidu pCR-2.1-TOPO (Invitrogen). Po injikaci lineárního plazmidu společně se spermatickými jádry do neoplozených vajíček, jsme úspěšnost přenosu sledovali pomocí fluorescenční mikroskopie. Pro důkaz homologní rekombinace bylo nutno použít ještě další metody, jako PCR a dalších. Naopak siRNA jsme injikovali do *in vitro* oplozených vajíček, nejlépe před prvním dělením. Sníženou hladinu exprese mRNA pro gen src jsme poté sledovali použitím metody real-time PCR s detekcí SYBRGreen. Principem je sledování fluorescenčního signálu, který pochází z interkalační barvičky, fluoreskující při tvorbě dsDNA. Intenzita signálu tedy odpovídá množství cDNA, které je vloženo do PCR reakce, a to je přímo úměrné mRNA, která je vložena do reverzní transkripce. Srovnáním prahové hodnoty s hodnotami pro referenční geny EF-1 α , GAPDH a N-tubulin jsme získali relativní kvantitu mRNA pro src gen. Paralelně jsme zjišťovali expresní profil mRNA pro kinasy rodiny Src v závislosti na vývojovém stádiu *X. laevis*. Kromě relativních hodnot jsme zjišťovali také absolutní kvantitu v jednotlivých stádiích. Metodou Western blot jsme určili proteinový profil kinasy c-Src.

PROFILY MASTNÝCH KYSELIN Z BUNĚK TERMOFILNÍCH BAKTERIÍ

LUCIE ŠIRÍŠŤOVÁ, LEONA PAULOVÁ a KAREL MELZICH

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
lucie.siristova@vscht.cz

V naší práci jsme se soustředili na hledání alternativních metod identifikace bakteriálních zástupců tvořících směsné

populace termofilních mikroorganismů. Analýza spektra buněčných mastných kyselin představuje jednu z moderních metod identifikace a částečně též klasifikace některých mikroorganismů. V první fázi výzkumu jsme se zaměřili na charakterizaci čistých kmenů termofilních bakterií pomocí profilů mastných kyselin. Pro dané účely byly vybrány tyto kmeny termofilních bakterií: *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus species*, *Thermus ruber*. Kmeny bakterií byly před vlastní analýzou kultivovány za konstantních podmínek na syntetickém médiu obohaceném vitamíny. Při kultivaci na běžném růstovém médiu s přidávkou mikrobiálních lyzátů by mohlo dojít k zabudování lipidů a mastných kyselin do buněčných stěn bakterií a tím ke zkreslení získaných spekter mastných kyselin. Po nakultivování daných kmenů byla biomasa lyofilizována z důvodu přesného stanovení bakteriální sušiny bez narušení lipidových součástí. S optimalizovaným množstvím lyofilizované biomasy se provedla hydrolyza v alkalickém prostředí, přičemž byly mastné kyseliny uvolněny z buněčných obalů a extrahovány do dichlormethanu, který byl následně odpařen. Tím bylo dosaženo izolace mastných kyselin od buněčných zbytků. Dalším přípravným krokem pro analýzu byla esterifikace mastných kyselin, kdy bylo přidáno methylační činidlo (směs methanolu a fluoridu boritého) a vzniklé methyl estery byly poté extrahovány do hexanu. Takto připravený vzorek byl analyzován plynovou chromatografií s plameno-ionizačním detektorem na kapilární koloně s nepolární fází a po vyhodnocení byla získána spektra mastných kyselin pro jednotlivé kmeny termofilních mikroorganismů. Identifikace některých důležitých mastných kyselin byla provedena plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem.

VÝVOJ CIRKADIÁNNÍCH OSCILACÍ V SCN BĚHEM ONTOGENEZE POTKANA

MARTIN SLÁDEK

Ústav experimentální medicíny AV ČR, Videňská 1083,
142 20 Praha 4
sladek@biomed.cas.cz

V suprachiasmatickém jádře hypothalamu (SCN) je umístěn centrální oscilátor (pacemaker), zodpovědný za tvorbu cirkadiánních rytmů v savčím organismu. Tyto rytmy jsou v něm generovány díky systému vzájemně propojených transkripčních a translačních zpětnovazebných smyček tvořených hodinovými geny a vyvíjí se již prenatálně. Cílem naší práce bylo prozkoumat vývoj molekulárního pacemakeru během ontogeneze.

Březi potkani a samice s mláďaty byly v den experimentu vypuštěny do stálé tmy a zabíjeny v 2-hodinových intervalech. Denní profily mRNA genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* a *Clock* v SCN 19-denních embryí, 3-denních a 10-denních mláďat byly stanoveny pomocí *in situ* hybridizace. Denní profily proteinů *PER1*, *PER2* a *CRY1* v SCN 19-denních embryí byly stanoveny imunocytochemicky. U 19-denních embryí nebyly nalezeny signifikantní rytmy exprese u žádného z testovaných genů ani nebyly detegovány žádné imunopozitivní buňky v SCN. Hladiny mRNA *Per1*, *Cry1* a *Clock* byly nízké, zatímco

hladina *Bmal1* mRNA byla vysoká a hladina *Per2* mRNA na střední hodnotě. U 3-denních mláďat byl již nalezen signifikantní rytmus mRNA *Per1*, *Per2* a *Bmal1*, který se postupně zvýraznil a u 10-denních mláďat dosahoval u těchto genů včetně *Cry1* větší amplitudy. Hladina mRNA *Clock* nevykazovala podle očekávání žádný rytmus. Celkově naše data ukazují postupný vývoj molekulárního pacemakeru v SCN, od nerytmického u 19-denních embryí až po vysoce rytmický u 10-denních mláďat.

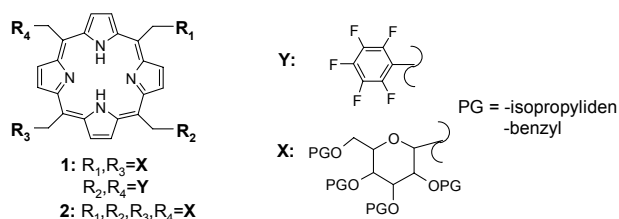
C-GLYKOSIDY JAKO SUPRAMOLEKULÁRNÍ SYNTONY ANEB SYNTÉZA A VYUŽITÍ C-meso-GLYKOSYLOVANÝCH PORFYRINŮ

PETR ŠTĚPÁNEK^a, LADISLAV KNIEŽO^b, MYKHAYLO DUKH^a a PAVEL DRAŠAR^{a,b}

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10, Praha 6; ^bÚstav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6
petr.stepanek@vscht.cz

Sloučeniny, ve kterých je aktivní struktura (farmakofor, chromofor, „leading structure“) spojena s vektorem typu peptidového, oligonukletidového, či sacharidového¹ segmentu, vzbuzují stále větší zájem. Použití chirálního polárního vektoru, odvozeného od struktury sacharidu, předurčuje takovou supramolekulární strukturu jako možný prostředek pro molekulární rozpoznávání v polárním (např. vodném) prostředí, což je vlastnost dosud zatím relativně vzácná. Podobné sloučeniny odvozené od porfyrinu jsou díky svým unikátním vlastnostem studovány i jako senzibilizátory pro fotodynamickou terapii či pro silné interakce s DNA a nukleotidy².

Cílem práce je konstrukce konjugátů se spojením porfyrin-sacharid, ve kterých je cukerný skelet připojen k makrocyclovému v *meso* poloze pomocí robustní, avšak flexibilní C-C vazby, která je na rozdíl od klasické *O*-glykosidické vazby odolná vůči hydrolytickému, potažmo enzymovému štěpení. dále je pak zaměřena na studium různých možností přístupu k syntéze *C-meso*-glykosylovaných porfyrinů.



Byly prověřeny dvě rozdílné strategie syntézy. První, vedoucí k oligopyrrolovému heterocyklu typu *1*, byla založena na jeho postupné výstavbě z dipyrrolových prekurzorů, zatímco druhá, vedoucí k porfyrinu typu *2*, vycházela z přímé cyklizace aldehydů s pyrrolem. Série látek tohoto nového typu byla plně charakterizována a v současnosti se dále studuje jejich širší praktické využití i obě syntetické cesty.

Práce byla provedena v rámci řešení výzkumného záměru MŠMT č. 223300006.

LITERATURA:

1. Mikata Y., Ouchi Y., Tabata K., Ogura S.-I., Okura I., Ono H., Yano S.: *Tetrahedron Lett.* 8, 3007 (1998).
2. Sirish M., Schneider H.-J.: *Chem. Commun.* 2000, 23

PROTEIN, PŘI JEHOŽ PROTEOLÝZE DOJDE K ZVÝŠENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI: ŠPATNÝ VTIP, ANEBO PROBLÉM VYŘEŠENÝ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ?

MIROSLAV ŠULC, RADIM OSIČKA, PETER ŠEBO a VLADIMÍR HAVLÍČEK

Mikrobiologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 00 Praha 4

msulc@biomed.cas.cz

Fyziologické koncentrace vápníku způsobují autoproteolytické štěpení peptidové vazby Asp414-Pro415 RTX (Repeat in ToXin) proteinu gramnegativního lidského patogenu *Neisseria meningitidis*. Výsledkem tohoto štěpení jsou ovšem kromě N-koncového a C-koncového fragmentu navíc minimálně dva proteiny s vyšší molekulovou hmotou (HMW) než původní protein na SDS-PAGE elektroforéze. Tyto HMW proteiny jsou na Western blotu rozpoznávány protilátkou stejně jako původní protein.

Cílem analýzy bylo zjistit strukturu těchto HMW proteinů. K identifikaci předpokládaného vzájemného propojení jsme použili štěpení proteasou v gelu podle protokolu, následnou extrakci peptidů a jejich frakcionaci systémem mikroHPLC. Jednotlivé frakce peptidů byly následně identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF, která našla v každé peptidové směsi HMW proteinů umělé peptidy, jejichž hmota neodpovídala teoretickému štěpení proteasou celého proteinu. Proto jsme tyto peptidy podrobili fragmentaci a na základě dceřiných iontů experimentu PSD (Post Source Decay) navrhli jejich strukturu. Potvrzení crosslinkované struktury bylo provedeno štěpením jinou proteázou, esterifikací karboxyskupin a modifikací aminoskupin.

Výsledkem práce je identifikace tvorby dosud nepopsané isopeptidové vazby Asp-Lys crosslinkované struktury během vápníkem způsobeného proteolytického štěpení RTX proteinu gramnegativního patogenu člověka.

NOVÉ ANORGANICKÉ HETEROCYKLIKÉ SLOUČENINY FOSFAZENOVÉHO TYPU OBSAHUJÍCÍ VE STRUKTUŘE ATOM KOVU

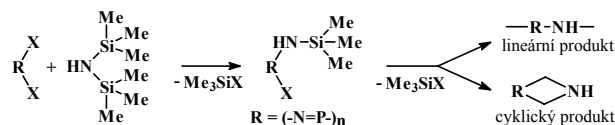
JAN TARABA^a, MARIE KLOUPAROVÁ^b, PAVLÍNA GAJDOVÁ^b a ZDIRAD ŽÁK^a

^aKatedra anorganické chemie Přírodovědecké fakulty MU v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^bStřední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská 65, 600 00 Brno
taraba@chemi.muni.cz

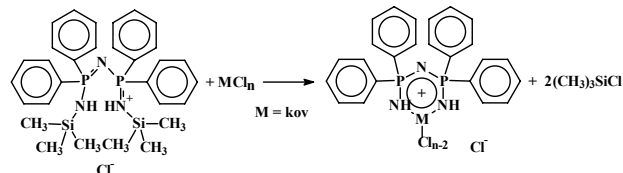
Anorganickým heterocyklickým sloučeninám je, zvláště pak v poslední době, věnována značná pozornost, nejen kvůli možnosti průzkumu vztahu vazebných možností a molekulové struktury, ale i stále častější využívání heterocyklických sloučenin, obsahujících kovy i nekovy, v praxi. Možnosti využití jsou např. pokovování ve vakuu, příprava nových polymerů, homogenní katalýza, využití biologické aktivity (bio-degradovatelné zemědělské ochranné prostředky, léčiva, selektivní jedy) atd.

V odborné literatuře jsou uváděny obecné trendy přípravy 6-ti členných cyklických sloučenin fosfazenového typu, které obsahují ve své struktuře heteroatom. Na počátku příprav 6-ti členných heterocyklů byl objev látky „Imidobis(aminodifenylfosforan) chlorid“ (Ph₂PNH₂)₂NCl (cit.¹). Z této publikace vychází celá řada prací zabývajících se syntézou a strukturou 6-ti členných heterocyklů. Za všechny uveďme např. práce^{2,3} – příprava heterocyklů přechodných kovů (W, V, Re ...), všechny reakce v pracích popisované jsou reakce mezi halogenidy přechodných kovů a (Ph₂PNH₂)₂NCl (při reakci se uvolňuje HCl a reakce je většinou rovnovážná). Pokud jde o přípravu heterocyklů s nepřechodnými kovy i nekovy, uvedeme práci⁴ (heterocykly s Al, Ga a In). Zde autoři volí postup přípravy přes sloučeniny typu MMe₃ (M = Al, Ga, In) reakcí s HN(PR₂NSiMe₃)₂ (R = Ph, NMe₂) a odštěpení molekuly methanu. Nevýhodou tohoto postupu je obtížné získávání reaktantů a malá výtěžnost reakce.

V našem základním výzkumu této problematiky jsme zvolili pro přípravu nových heterocyklů reakci halogenidů přechodných i nepřechodných kovů s *N,N'*-bistrimetylsilyl-tetrafenyldifosfazenium chloridem N(Ph₂PNHSiMe₃)₂Cl. Probíhající děj by se dala popsat jako reakce desilylačního typu:



Výhodou námi zvoleného syntetického postupu je vysoká výtěžnost reakcí a čistota získaných produktů. Z reakčního systému odpadá trimethylchlorosilan jako vedlejší produkt a zároveň zde slouží jako rozpouštědlo. Tento syntetický postup se nám jeví jako nejvýhodnější a s jeho pomocí se nám podařilo připravit několik nových 6-ti členných anorganických heterocyklických sloučenin. Probíhající chemická reakce se dá zapsat obecnou rovnicí:



LITERATURA

1. Cox J. W.: *Chem. Commun.* 1969, 205.
2. Roesky H. W., Katti V.: *Angew. Chem.* 98, 447 (1986).
3. Katti V., Roesky H. W.: *Inorg. Chem.* 26, 4032 (1987).
4. Hasselbring R., Roesky H. W.: *Z. Naturforsch.* 48B, 43 (1993).

EXPRESSION OF NOVEL CC CHEMOKINE (CCL) 21 AND ITS RECEPTOR CCR11 IN PATIENTS WITH PULMONARY SARCOIDOSIS

A. TSYRULNYK^a, A. ARAKELYAN^a, F. MRAZEK^a, A. GIBEJOVA^a, V. KOLEK^b, and M.PETREK^a

^aDepartments of Immunology and ^bRespiratory Medicine, Medical Faculty, Palacky University, 771 47 Olomouc

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown cause, characterized by accumulation of activated T cells and macrophages at sites of ongoing inflammation, notably in the lung. The mechanism of inflammatory cell recruitment is not clear. We have previously shown that the expression of CC chemokine ligand 19 (CCL19/MIP-3 beta) and of its specific receptor CCR7 is significantly increased in sarcoidosis, namely in more advanced disease. Recently, novel CC chemokine receptor 11 (CCR11) has been also shown to interact specifically with CCL19 and CCL21. We have, therefore, investigated CCR11 and CCL21 mRNA's expression in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells from patients with pulmonary sarcoidosis and control subjects.

BALF cells were obtained by standard bronchoalveolar lavage (BAL) from 29 patients with pulmonary sarcoidosis and 9 control subjects. CCR11 and CCL21 mRNA's expression were semiquantitated by reverse-transcription polymerase chain reaction using normalization to the expression of the beta-actin gene.

CCR11 mRNA expression was significantly upregulated in BALF cells from sarcoid patients (S) compared to control subjects (C) (Mean \pm SEM: C, 0.44 \pm 0.04; S, 0.82 \pm 0.10; $p = 0.01$). Further subanalysis has shown that the CCR11 mRNA expression paralleled disease course (Stages I, II, III): it tended to be higher at more complicated radiographical (CXR) stages of the disease (C, 0.44 \pm 0.04; S-I, 0.72 \pm 0.10; S-II, 0.85 \pm 0.20; S-III, 1.04 \pm 0.20). Immunocytochemistry of BALF cells showed that CCR11 protein is localised in ciliated bronchial cells and also in few macrophage like cells (1-2 % of total amount of the BALF cells). Expression of CCL21 mRNA was not detected in BALF cells from sarcoid patients nor from control subjects.

Expression of CCL21 was not found in BALF cells and thus should be investigated in sarcoid tissues. Upregulation of CCR11 mRNA in BALF cells of patients with sarcoidosis is consistent with overexpression of its chemokine ligand 19(CCL19/MIP-3beta) and therefore, may play a role in inflammatory cell migration to sarcoid lung. The significance of cellular localisation of CCR11 should be further studied. This novel chemokine receptor, therefore, represents a candidate for studies of pathobiological mechanisms of inflammatory cell recruitment in sarcoid lung.

ENZYMY BAKTERIE *Comamonas testosteroni* PARTICIPUJÍCÍ NA BIODEGRADACI FENOLU

MICHAL TUREK, JAN PÁČA Jr. a MARIE STIBOROVÁ

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Albertov 2030, 12840 Praha 2
jan.paca@volny.cz*

Biodegradace fenolických látek enzymovými systémy živých organismů se může uplatnit při biologické dekontaminaci životního prostředí. Tyto postupy jsou levnější a pro životní prostředí přirozenější a šetrnější. Mezi nejvýznamnější zdroje kontaminace fenoly patří výroby na zpracování hnědého uhlí, odpadní vody ze zpracování hnojiv a léků či různý organický odpad. V poslední době se stále zvyšuje množství informací a poznatků o mikroorganismech schopných přežít v přítomnosti fenolických látek a dokonce je i využívat jako zdroj uhlíku a energie. Na našem pracovišti studujeme enzymovými systémy bakterie *Comamonas testosteroni*, které jsou schopné využívat fenol pro svůj růst. Hydroxylace fenolu na katechol je prvním, limitujícím krokem aerobní degradace fenolu. Následně přeměny tohoto produktu katalyzuje u prokaryot katechol-2,3-dioxygenasa (EC 1.13.11.2), která oxiduje katechol za vzniku semialdehydu kyseliny 2-mukonové (META dráha), který se dále metabolizuje na pyruvát.

Cílem práce bylo získání buněčného materiálu, zjištění nejefektivnější desintegrační metody a charakterizace a lokalizace jednotlivých enzymových systémů degradujících fenol ve studované bakterii. Nejvhodnější desintegrační metodou se jeví sonikace bakteriálních buněk. Na rozdíl od suspenze desintegrovaných buněk *C. testosteroni*, nebyla fenolhydroxylasová aktivita detegována v cytosolární frakci. Detegovali jsme ji pouze ve vzorcích, které jsme odebrali ještě před izolací cytosolární frakce. Katechol-2,3-dioxygenasa naopak vykazovala vysokou aktivitu i v čistém cytosolu. Je pravděpodobné, že fenolhydroxylasa je u této bakterie ve zvýšené míře citlivá k některému kroku izolace, nebo je membránově vázána. V buňkách studované bakterie došlo působením fenolu během kultivace buněk k indukci enzymů odpovědných za jeho metabolismus.

Tato práce je pilotní studií využití bakterie *C. testosteroni* v biodegradacích s cílem jejího potenciálního využití v bioremediacích.

Autoři děkují za podporu MŠMT ČR (MSM113100001) a GA ČR (104/03/0407).

KATALYTICKÁ KO-CYKLOTRIMERIZACE 6-ALKYNYLPURINŮ S α,ω -DIYNY – NOVÁ METODA PRO PŘÍPRAVU 6-ARYLPURINŮ

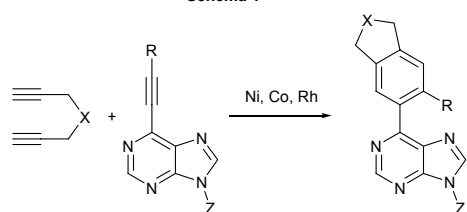
PAVEL TUREK^{a,b}, MICHAL HOCEK^b a MARTIN KOTORA^{a,b,*}

^aKatedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha 2, ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6, *hocek@marilyn.uochb.cas.cz; kotora@natur.cuni.cz*

Purinové báze modifikované v poloze 6 a jejich deriváty nukleosidů a nukleotidů vykazují široké spektrum biologické aktivity. Kromě cytotoxicity 6-methylpurinů a jejich nukleosidů

dů je známo, že acyklické nukleotidy připravené z 6-(di)alkylaminopurinů jsou silná antivirotika. V poslední době bylo popsáno, že některé 6-arylpuriny mají cytostatickou aktivitu, zatímco 6-aryl-9-benzylpuriny vykazují antimykobakteriální vlastnosti.

Schéma 1



R = H, Bu, Ph;
X = C(COOEt)₂, C(COOEt)(COMe), C(COMe)₂, C(COOEt)CN, O, NPh, CH₂, (CH₂)₂;
Z = Bn, THP

Dosud používané metody jejich přípravy jsou převážně založené na využití cross-couplingových reakcí, které jsou však omezeny výběrem vhodných reakčních partnerů. Proto jsme vypracovali novou metodu přípravy 6-arylpurinů, která spočívá v [2+2+2]-cyklotrimerizaci 6-alkynylpurinů s diyny, která je katalyzována komplexy přechodných kovů (zejména komplexy Ni a Co)¹. Touto cestou je možné získat z jednoduchých výchozích sloučenin trisubstituované purylbenzeny, jejichž příprava by byla jinou metodou obtížná, či dokonce nemožná (Schéma 1). U vybraných 6-arylpurinů bylo provedeno testování na biologickou aktivitu.

Dále jsme vypracovali novou metodu pro přípravu pentasubstituovaných 6-arylpurinů. Reakce jsme v tomto případě založili na stechiometrické reakci zirkonacyklopentadienu s 6-alkynylpuriny v přítomnosti NiBr₂(PPh₃)₂.

Práce byla provedena za podpory grantu GA ČR/203/01/0836 a 203/00/0036 a 203/03/0035.

LITERATURA

1. Turek P., Katora M., Hocek M., Cisařová I.: *Tetrahedron Lett.* 44, 785 (2003).

SYNTÉZA CALIX[4]ARENŮVÝCH GLYKOKONJUGÁTŮ

KAROLÍNA VÁCLAVÍKOVÁ^a, IVAN STIBOR^a, PAVEL LHOTÁK^a a VLADIMÍR KŘEN^b

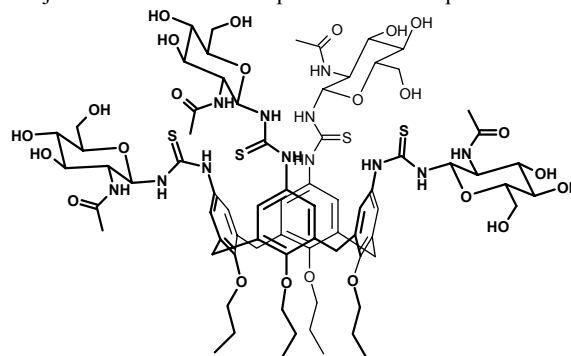
^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 16628 Praha 6;

^bLaboratoř biotransformací; Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 14220, Praha 4

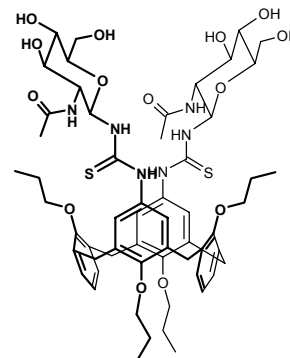
Calixareny jsou cyklické oligomery *p*-substituovaných fenolů spojených navzájem methylenovými můstky. Jsou široce využívány jako stavební kameny pro konstrukci sofistikovaných struktur pro supramolekulární chemii.

Cukry hrají důležitou roli v biologických systémech. Calixarenové glykonjugáty tak představují skupinu receptorů s potencialem biologickou aktivitou. Přítomnost polyhydroxylovaných chirálních substituentů v molekulách calixarenů

může indukovat jejich rozpustnost ve vodě a uplatnění těchto látek jako molekulárních receptorů ve vodném prostředí.



Bylo zjištěno, že *N*-acetamido-2-deoxy-β-D-hexapyranosy vykazují vysokou afinitu k aktivním receptorům krysích přirozených zabíječských buněk. Tyto buňky představují zvláštní skupinu lymfocytů schopných ničit nádorové buňky. Aktivita krysích zabíječských buněk může být zvýšena přítomností cukerných ligandů. Protože receptor obsahuje dvě aktivní místa, lze předpokládat, že polyvalentní sacharidové deriváty calixarenů mohou mít vyšší afinitu k těmto receptorům.



Podstata syntézy cílových molekul spočívá v adici aromatického aminoderivátu calix[4]arenu na isothio-cyanátovou skupinu sacharidu. Nově připravené „calixcukry“ obsahují dvě nebo čtyři cukerné jednotky spojené s horním okrajem calix[4]arenu prostřednictvím thiomocovinových můstků. Jelikož je možné připravit různé konformery calix[4]arenu (kónická, částečně kónická, 1,3-alternátní), lze získat calixarenové glykonjugáty s různým prostorovým uspořádáním cukerných jednotek.

STUDIUM REZISTENCE NÁDOROVÝCH BUNĚK VŮČI PACLITAXELU A DALŠÍM TAXANŮM A MOŽNOSTI JEJÍHO OVLIVNĚNÍ

RADKA VÁCLAVÍKOVÁ^a, MARIE EHRlichOVÁ^b, JAROSLAV TRUKSA^b, IWA OJIMA^c, AHCENE BOUMENDJEL^c, JAN KOVÁŘ^b a IVAN GUT^a

^aOdborná skupina pro biotransformace, SZÚ, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, ^bÚstav molekulární genetiky AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^cDepartment of Chemistry, State University of New York at Stony Brook, NY, USA,

^d*Department de Pharmacochimie Moleculaire, Faculte de Pharmacie de Grenoble, 38706 La Tronche, France
rvaclavikova@szu.cz*

Rezistence nádorových buněk vůči chemoterapeutikům označovaná jako MDR (multidrug resistance) je významnou překážkou v terapii nádorových onemocnění. Její významnou příčinou je zvýšená exprese membránového transportéru P-glykoproteinu (Pgp) v nádorových buňkách, která má za následek zrychlené a nadměrné vylučování léčiva z buněk¹. Tím se snižuje cytotoxický účinek léčiva.

V této studii byl sledován transport významného protinádorového léčiva paclitaxelu ze skupiny taxanů buněčnými liniemi rakoviny prsu, a to jak sensitivními (MDA-MB-435), kde jsme neprokázali ani expresi P-gp pomocí western blotting ani expresi mRNA, tak rezistentními vůči adriamycinu (NCI/ADR-RES), kde jsme prokázali jak expresi P-gp proteinu, tak vysokou expresi mRNA. Senzitivní buňky vstřebávaly až 8× více paclitaxelu, než jejich rezistentní linie. Vylučování vstřebaného paclitaxelu u sensitivních buněk bylo 2×-3× pomalejší než u rezistentních buněk.

K dispozici jsme měli rovněž nové syntetické analogy taxanů SBT-1214, SBT-1216 a SBT-1103 s mnohonásobně vyšší cytotoxicitou vůči rezistentním buňkám, což je činí potenciálně velmi perspektivní při terapii rezistentních nádorů. Rychlost jejich vstřebávání uvedenými liniemi byla podobná vstřebávání paclitaxelu u sensitivních buněk. Přesto, že se intenzivně váží na P-gp, nezvýšily vstřebávání paclitaxelu ani jeho vylučování použitými buněčnými liniemi. SBT-1214 toto vstřebávání dokonce snížil.

Při hledání možnosti snížení rezistence nádorových buněk vůči paclitaxelu jsme sledovali kombinace paclitaxelu s inhibítorem P-gp Verapamilem, které vedly k významné stimulaci vstřebávání a inhibici vylučování paclitaxelu v rezistentních buňkách narozdíl od sensitivních. Byly sledovány také další kombinace paclitaxelu s celkem 13 syntetickými látkami z řady derivátů přírodních flavonoidů (deriváty auronů, chalkonů a flavonů), které se přímo váží k Pgp. Některé z těchto látek účinně zvyšovaly vstřebávání paclitaxelu nádorovými buňkami a inhibovaly jeho vylučování, takže je lze považovat za vhodné kandidáty pro potlačení rezistence nádorových buněk vůči paclitaxelu.

Tato práce byla podporována grantem IGA NL/7567-3.

LITERATURA

1. Litman T., Durley T. E., Stein W. D., Bates S. E.: Cell Mol Life Sci 58, 931 (2001).

STATICKÁ A DYNAMICKÁ ADHEZE A JEJÍ VYUŽITÍ V DIAGNOSTICE TROMBASTENICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

MARTINA VANÍČKOVÁ^a, PETRA KRÍŽOVÁ^a, JAN E. DYR^a a PETR CIESLAR^b

^aÚstav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2, ^b1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, U Nemocnice 2, 128 20 Praha 2
martina.vanickova@uhkt.cz

Hemostáza je soubor obranných mechanismů organismu sloužící k zástavě krvácení. Nedílnou součástí tohoto děje je adheze krevních destiček v místě poškození¹. Interakce mezi fibrin(ogenem a GPIIb-IIIa, nejhojněji zastoupeným membránovým receptorem krevních destiček, je pro adhezi nezbytná². Snížení počtu (trombocytopenie) a funkční poruchy krevních destiček (trombocytopenie) způsobují různě závažné krvácivé stavy³. Adheze je klíčová funkce destiček, přitom ale žádný jednoduchý test pro rutinní diagnostiku zatím nebyl navržen. Vyvinuli jsme metodologii adheze krevních destiček, která zahrnuje přípravu adhezivních povrchů a proteinů, úpravu počtu krevních destiček ve vzorku, adhezi za statických a dynamických podmínek a vyhodnocení obrazovou analýzou⁴.

Při statické i dynamické adhezi jsme zjistili, že počet destiček v plazmě a v krvi má velký vliv na množství adherovaných destiček. Tento jev zatím nebyl podrobněji sledován, proto jsme studovali závislost adheze na počtu destiček v plazmě a krvi. Postupnou centrifugací jsme připravili vzorky se sníženým počtem krevních destiček. Jako adhezivní povrch jsme použili fibrinový dimer s definovaným množstvím vázaného trombinu syntetizovaný na krycí sklička potažená polystyrenem a na stěny mikrotitračních jamek. Adhezi jsme vyhodnotili metodou stanovení aktivity laktátdehydrogenasy uvolněné z lyzovaných adherovaných destiček a metodou analýzy obrazu, kde jsme sledovali změny procentového pokrytí povrchu adherovanými destičkami a také jejich morfologické vlastnosti.

Získanou závislost jsme použili ke studii adheze a morfologie krevních destiček pacientů, u kterých funkční poruchy destiček bývají často doprovázeny i sníženým počtem destiček v krvi. Vzorky z jejich krve jsme tak mohli srovnat se vzorky zdravých jedinců se stejným počtem destiček. U pacientů trpících blíže neurčenou trombocytopatií a poruchou primární hemostázy jsme nezjistili defektní adhezi destiček na fibrinový dimer. Při obrazové analýze snížení či zvýšení adheze destiček pacientů bylo způsobeno morfologickými odchylkami adherovaných destiček. U pacientky trpící dědičným onemocněním Glanzmannova trombastenienie jsme potvrdili defekt GPIIb-IIIa. Zjistili jsme, že užívání aspirinu nemá přímý vliv na adhezi normálních krevních destiček na fibrinový dimer, ovlivněna je pouze jejich agregace.

Měření schopnosti krevních destiček adherovat na definované povrchy může přinést nové poznatky vedoucí k dalšímu objasnění funkce krevních destiček a jejich membránových glykoproteinů. Takto získané vědomosti mohou přispívat k vývoji nových přístupů v diagnostice nebo léčení onemocnění, při kterých dochází k poruchám krevní srážlivosti, i k vývoji hemokompatibilních biomateriálů.

LITERATURA

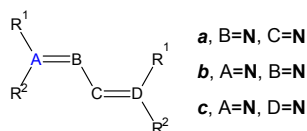
1. Blockmans D., Deckmyn H., Vermynen J.: Blood Rev. 9, 143 (1995).
2. Zaidi T. B., McIntire L. V., Farrell D. H., Thiagarajan P.: Blood 88, 2967 (1996).
3. George J. N.: Lancet. 355, 1531 (2000).
4. Krížová P., Ryšavá J., Vaníčková M., Cieslar P., Dyr J. E.: Sborn. Lék. 104, 223 (2003).

CRISS-CROSS CYKLOADICE NA ALIFATICKÝCH CYKLICKÝCH KETAZINECH A SMÍŠENÝCH AZINO-ALDAZINECH

JIŘÍ VERNER

*Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
jverner@chemi.muni.cz*

Criss-cross cykloadice jsou podskupinou 1,3-dipolárních cykloadic. Je známa celá řada dipolarofilů a jejich criss-cross cykloadice na 1,4 monosubstituovaných 2,3-diazabuta-1,3-dienech (azinech)¹ (**Ia**). Reakce na jiných diazabutadienech jsou vyjimečné, jako například criss-cross cykloadice na 1,2-diazabuta-1,3-dienech (**Ib**) a 1,4-diazabuta-1,3-dienech (glyoxaliminech)²⁻⁵ (**Ic**) (Schéma 1).



V případě reakcí 1,4 disubstituovaných 2,3-diaza-1,3-butadienů (ketazinů) vznikají spirocyklické criss-cross produkty^{6,7}. Prostudovali jsme reaktivitu nesymetrických aldazino-azinů, které poskytují dle očekávání criss-cross produkty. U těchto látek lze očekávat komplexační vlastnosti a vzhledem k extrémní nerozpustnosti některých derivátů je možné využití jako sorbentů ve chromatografii.

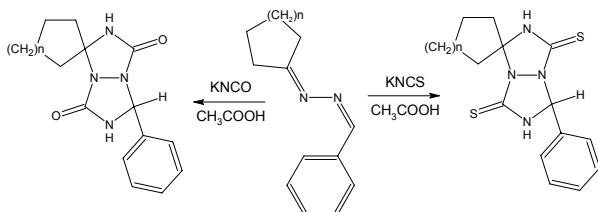


Schéma 2

LITERATURA

1. Wagner-Jauregg T.: *Synthesis* 1976, 349.
2. Sakamoto M., Tomimatsu Y., Miyazawa K., Tokoro K.: *Yakugaku Zasshi*, 92, 1462 (1972).
3. Masahiko Takahashi, Shinji Takahashi: *Heterocycles* 31, 883 (1990).
4. Verner J., Taraba J., Potáček M.: *Tetrahedron Lett.* 43, 4833 (2002).
5. Verner J., Potáček M.: *Central Eur. J. Chem.* 2, 220 (2004).
6. Dutt D.B., Guha P.C.: *Curr. Sci.* 18, 297, (1949).
7. Schantl J. G., Gstach H., Hebeisen P., Lanznaster N.: *Tetrahedron* 41, 5525 (1985).

DEVELOPMENT OF AN ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF ISOFLAVONES

MICHAELA VÍTKOVÁ, RADKA KOBLOVSKÁ, ZUZANA MACKOVÁ, and OLDŘICH LAPČÍK

Institute of Chemical Technology, Technická 3, 16628 Prague 6, Czech Republic

Isoflavones are plant secondary metabolites typical for leguminous plants, however they were found also in certain non-leguminous taxa. Isoflavones were reported to display a wide scale of biological effects in plant-consuming animals including humans. They are endocrinologically active due to interaction with estrogen receptors and due to modulation of several hormonogenic metabolic pathways. Genistein is well known inhibitor of tyrosine-protein kinases – the enzymes acting in post-receptor events of peptide hormone signaling. Dietary isoflavones have been reported protective against several types of neoplasias, cardiovascular diseases and menopausal symptoms.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were developed for determination of the most important isoflavones – i.e. genistein, daidzein and biochanin A in biological materials. The indirect competitive ELISA format uses polyclonal rabbit antibodies formed against conjugates of carboxymethyl isoflavones with bovine serum albumin (BSA). Haptens, genistein and daidzein were coupled to the BSA at the position C 7 and C 4' and biochanin A at the position C 7. The same isoflavone-BSA conjugates were used for coating of microtitration plates.

The methods for 4'-derivatives of genistein and daidzein and for 7-derivatives of daidzein and biochanin A were highly sensitive (150 values of the standard curves ranged between 0.1-2 ng·ml⁻¹, that is 4–100 pg-well). The attempt to establish a method specific for 7-derivatives of genistein according to the same scheme was not successful. For this reason, ovalbumin was used as an alternative carrier protein in the conjugate for coating of plates. This format turned out well and is used in further experiments. Cross reactivities of all systems were in comparable range and in very good agreement with previously established RIA methods.

This study was supported by Grant 22 33 00004 from the Grant Agency of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

INTERFERON- α INDUCTION OF PML NUCLEAR BODIES IS SUPPRESSED BY TRICHOSTATIN A

JANA VLASÁKOVÁ, ZORA NOVÁKOVÁ, ZDENĚK HODNÝ, and PAVEL HOZÁK

Department of Cell Ultrastructure and Molecular Biology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4-Krč

The nucleus of the eukaryotic cell is a complex organelle compartmentalized into structural and functional domains. One of these nuclear domains are matrix-associated multi-protein

complexes, promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML NBs). The gene product, PML protein, is essential for proper formation and integrity of PML NBs. Although the biochemical function of PML and PML NBs remain still unclear, there is an evidence for its contribution in response to a variety of cell states like cancer, apoptosis, and viral infections.

It is known that type I and II interferons (IFNs) dramatically increase the transcription of the PML gene through an IFN-stimulated response elements (ISRE and GAS) present in the PML gene promoter. Additionally, IFNs increases expression of other structural component of PML NBs, Sp100, which is mediated by the same response elements. The up-regulation of these proteins, which are the main structural components of PML NBs, can contribute to the observed increase in the number of PML NBs.

In this study we have shown that trichostatin A, an inhibitor of protein deacetylases, strongly reduces IFN-stimulated increase of PML NBs number. Consistently with this observation, trichostatin A also inhibits IFN-induced up-regulation of the main structural components of PML NBs – PML and Sp100. Although TSA-induced protein hyperacetylation has an overall stimulatory effect on gene expression, our findings indicate that the IFN-induced activation of these two genes is inhibited at some stage by acetylation event of an unknown regulatory component.

A BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND FROM THE SEEDS OF *Tamarindus indica*

M. VODENIČAROVÁ^a, S. PÁVEK^a, A. LOJEK^b, and A. EBRINGEROVÁ^c

^aCPN s.r.o., Dolní Dobrouč 56102, ^bInstitute of Biophysics, Kralovopolska 135, 616 65 Brno, ^cInstitute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic
vodenicarova@contipro.cz

Tamarindus indica is a large tree growing in tropical and subtropical regions. It is one of the most important plant resources as food materials and all parts of the plant have therapeutic uses^{1,2}. The germ obtained from the seed contains high molecular xyloglucan. Xyloglucan has an immunostimulating effect, but there was not obtained an antioxidative activity in alcoholic and water extract prepared from germ. Seed coats are a byproduct of tamarind gum production and are reported to be a low-cost source of antioxidants extractable with methanol, ethanol and ethylacetate. In these extracts, a variety of dihydroxy types of benzene derivatives has been identified as the main component³.

This study reports on the composition and general structural and molecular characteristics as well as various biological activities of the compound isolated from the seed coats by aqueous alkali extraction and isopropanol extraction. The water – soluble alkali extracted material of tamarind seed coat (AEMTSC) comprises a high molecular mass heteroxylan (Mp ~ 90 kDa) closely associated with phenolic compounds. It exhibited significantly higher antioxidative activity as

measured by total peroxy radical trapping antioxidant parameter (TRAP) and DPPH radical scavenging method in comparison to isopropanol extract. The antioxidative capacity is comparable with trolox. The reduction of phospholipid peroxidation in the presence of AEMTSC is more than 90 % for concentration of AEMTSC more than 0,05 % (wt.). AEMTSC is fully soluble in water and represents a potent natural additive in cosmetic and pharmacy.

REFERENCES

1. Lanhers M. C., Fleurentin J., Guillemni F.: *Ethnopharmacol.* 18, 42 (1996).
2. Shankaracharya N. B.: *J. Food Sci. Technol.* 35, 193 (1998).
3. Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Yamamoto A., Kawakishi S., Osawa T.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 2671 (1994).

CHELERYTHRINE INHIBITION OF OXIDATIVE BURST IN DMSO-DIFFERENTIATED HL-60 CELLS PRECEDES PROTEIN KINASE C INHIBITION

JIRÍ VRBA and MARTIN MODRIANSKÝ

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Chelerythrine (CHE), a quaternary benzophenanthridine alkaloid with anti-inflammatory properties, is known to inhibit protein kinase C (PKC)-dependent phosphorylation. We examined the effect of CHE and three other alkaloids, sanguinarine (SA), dihydrosanguinarine (dihSA) and dihydrochelerythrine (dihCHE), on PKC-dependent oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells. Phorbol myristate acetate (PMA) directly activates PKC thus triggering NADPH oxidase assembly and oxidative burst. Both CHE and SA inhibit PMA-induced oxidative burst, monitored as superoxide radical generation, with IC₅₀ of 2.9 μM and 1.8 μM, respectively. Western blotting analyses of the whole cell lysate obtained from PMA-activated differentiated HL-60 cells in the presence or absence of alkaloids showed that inhibition of PKC activity required at least ten-fold higher concentrations of CHE (> 30 μM) or SA (> 20 μM) than those necessary for inhibition of PMA-induced superoxide generation. Staurosporine, a potent PKC inhibitor, inhibits both oxidative burst and PKC activity with comparable effectiveness. DihSA and dihydroCHE at concentrations > 30 μM affected neither PMA-induced oxidative burst nor PKC activity. Comparison of effects displayed by CHE and SA with those displayed by their dihydro derivatives accentuates the requirement for the presence of C=N⁺ region in the molecules, while slight difference in side chains seems to be inessential. As low concentrations of CHE do not affect the phosphorylating activity of PKC, which directly activates NADPH oxidase assembly via phosphorylation of p47^{phox}, we conclude that CHE inhibits oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells primarily by direct inhibition of NADPH oxidase.

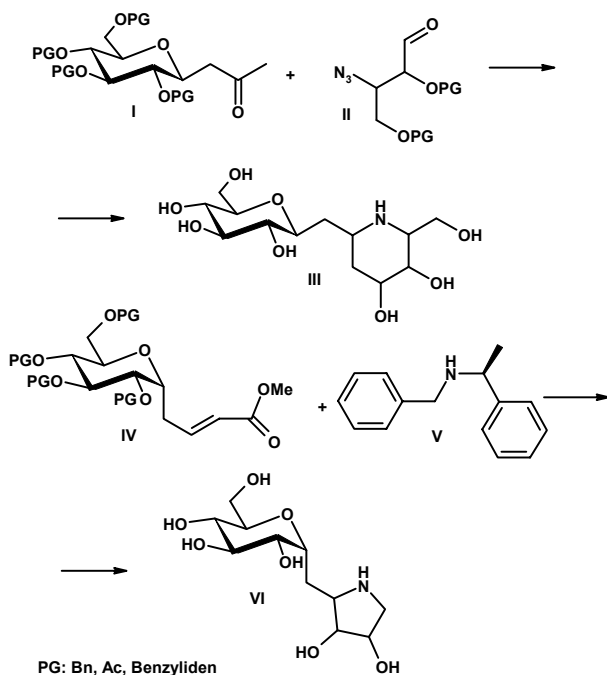
This research was supported by grant MSM 151100003.

NOVÉ PŘÍSTUPY V SYNTÉZE IMINO-C-DISACHARIDŮ LUKÁŠ WERNER a LADISLAV KNIEŽO

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6
lukas.werner@vscht.cz

Polyhydroxylované glykosylmethylpiperidiny a pyrrolidiny (imino-C-disacharidy) jsou potenciálními inhibitory glykosidas a glykosyltransferas. Jako takové mohou být pravděpodobně využity v terapii řady chorob ovlivněním mechanismu komunikace buňka-buňka nebo buňka patogen. Inhibiční účinek je dán přítomností „C glykosidové“ vazby, která je enzymově rezistentní, a dále přítomností endocyklického dusíku, který je při fyziologickém pH protonován. Vzniklý kation tak napodobuje tranzitní stav řady glykosylačních reakcí, jež se například podílejí na syntéze povrchových receptorů buněk.

Pro syntézu glykosylmethylpiperidinů a pyrrolidinů jsme vypracovali dva nové postupy, jejichž předností je zejména snadná ekonomická i experimentální dostupnost výchozích látek a široká variabilita produktů umožněná pouze obměnou výchozího sacharidu.



Příprava piperidinového derivátu vychází z glukosylacetony¹ **I**, který je podroben aldolizaci s aldehydem **II**. Po redukcí azidové skupiny, následně reduktivní aminaci a odstranění chránicích skupin se získá cílový glykosylmethylpiperidin **III**. Cesta k derivátu pyrrolidinu využívá stereoselektivní adice Daviesova aminu² **V** na methyl-3-(glukosylmethyl)akrylát **IV**. Na vzniklý β -amino ester je poté adována lithná sůl thiazolu. Následuje redukce karbonylové skupiny, transformace thiazolu na methylester a při odstranění chránicích skupin z dusíku se zároveň uzavře

laktamový kruh. Posledními kroky jsou deprotektce a redukce laktamu na finální glykosylmethylpyrrolidin **VI**.

Tato práce byla podporována GA ČR, v rámci grantu č. GA 203/03/0497

LITERATURA

- Rodrigues F., Vanad Y., Lubineau A.: Chem. Commun. 2000, 2049.
- Bunnage M. E., Burke A. J., Davies S. G.: Tetrahedron: Asymmetry 6, 165 (1995)

STUDIUM VZÁJEMNÝCH INTERAKCÍ KAPSIDOVÉHO PROTEINU HIV-1

MARCELA WILDOVÁ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, odd. biochemie proteinů, Flemingovo nám. 2, Praha 6, 166 10

Pro skládání nezralých kapsid HIV-1, tvořených polyproteiny Gag a Gag-Pol, i pro skládání zralého, plně infekčního core je nepostradatelná schopnost kapsidového proteinu (CA) tvořit dimery a vyšší multimery. Vzhledem k významu dimerizace CA v životním cyklu HIV-1 se dá předpokládat, že inhibice dimerizace by vedla k zastavení skládání nových virových částic, a tím k zablokování životního cyklu viru. Proto by sloučeniny, zabraňující dimerizaci CA, mohly být novými léky, zabraňujícími replikaci HIV-1.

Tato práce se zabývá vývojem metody, která by mohla být využita k testování inhibitorů dimerizace CA. Byl připraven konstrukt kódující CA s *N*-koncovou fúzí k histidinové kotvě. Po expresi v *E. coli* BL21(DE3) byl protein CA pomocí této kotvy purifikován na koloně naplněné NiNTA agarosou a imobilizován na NiNTA mikrotitrační destičky. Bylo prokázáno, že připojení histidinové kotvy neovlivňuje konformaci CA a nemá vliv ani na jeho multimerizaci.

Jako interakční partner pro protein CA, imobilizovaný prostřednictvím histidinové kotvy na NiNTA mikrotitračních destičkách, byl připraven CA na *N*-konci značený biotinem. Při testování peptidových inhibitorů dimerizace CA na mikrotitrační destičce bude množství CA značeného biotinem detegováno fluorescenčně.

PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT V-MYB TRANSFORMOVANÝCH MONOBLASTŮ JE NEZÁVISLÁ NA KASPÁZÁCH

EVA ZAHRADNÍČKOVÁ^a, KAREL SOUČEK^b a JAN ŠMARD^a

^aMasarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ^bBiofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
zahradka@sci.muni.cz

Programovaná buněčná smrt (PCD) je geneticky determinovaný mechanismus, kterým jsou nežádoucí buňky eliminovány během vývoje organismu, při infekci, nebo při

jejich poškození cytotoxickými látkami. Poruchy mechanismů zajišťujících PCD představují pro organismus značné riziko, protože mohou být příčinou vychýlení rovnováhy mezi tvorbou a zánikem buněk, a tak se podílet na vzniku nádorů. Rozlišují se dva hlavní typy PCD: (1) apoptóza, která je zajišťována rodinou cystein-asparylových proteas (kaspas), a (2) autofagie, která je nezávislá na kaspázách a je charakteristická přítomností autofagických vakuol.

V této práci jsme studovali programovanou buněčnou smrt na modelech dvou promonocytických buněčných linií – lidských buňkách U937 a kuřecích monoblastech transformovaných onkogenem *v-Myb* BM2. PCD byla v obou liniích indukována třemi látkami s rozdílným mechanismem účinku – camptothecinem, cykloheximidem a oxidem arsenitým. Buněčná smrt byla posuzována podle stavu mitochondriálního membránového potenciálu, fragmentace DNA, depolymerizace F-aktinu, štěpení cílových proteinů (PARP a lamin B) a aktivity kaspáz. Zjistili jsme, že programovaná buněčná smrt v buňkách linie BM2 probíhá nezávisle na kaspázách, zatímco v buňkách U937 nastává typickým mechanismem apoptózy, který je založen na kaspasové aktivitě. Specifickou sondou pro detekci autofagických vakuol jsme navíc prokázali, že camptothecin v buňkách BM2 (a nikoliv v buňkách U937) indukuje autofagii.

Tyto výsledky naznačují, že onkoprotein *v-Myb*, který je v buňkách linie BM2 konstitutivně exprimován, zřejmě zabráňuje aktivaci kaspáz při indukci programované buněčné smrti. To vede ke spuštění alternativního mechanismu buněčné smrti, který využívá jiných, na kaspázách nezávislých proteas. Onkoprotein *v-Myb* viru ptačí myeloblastózy indukuje akutní monoblastickou leukémií *in vivo* a transformuje myelomonocytické buňky *in vitro*. Zda k tomuto účinku alespoň částečně přispívá negativní vliv *v-Myb* na aktivitu kaspas, je předmětem dalšího výzkumu.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM143100008 MŠMT České republiky.

ZKRÁCENÉ ANALOGY INZULÍNU: VLIV MODIFIKACÍ V C-KONCOVÉ ČÁSTI B-ŘETĚZCE NA BIOLOGICKOU AKTIVITU

LENKA ŽÁKOVÁ^a, TOMISLAV BARTH^a, JIŘÍ JIRÁČEK^a a ŠTEFAN ZÓRAD^b

^aÚstav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bÚstav experimentální endokrinologie Slovenské akademie věd, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, Slovenská republika zakova@uochb.cas.cz

Analogy inzulínu se připravují hlavně pro léčbu a výzkum onemocnění diabetes mellitus. Modifikace v inzulínovém řetězci mohou nejen měnit fyzikálně-chemické vlastnosti inzulínu, ale mohou také přispívat k objasnění vazby inzulínu s jeho receptorem. Insulin se změnami vlastnostmi může mít například jinou distribuci v těle a usnadňovat tak diabetikům léčbu. O interakci inzulínu s jeho receptorem existují prozatím pouze kusé informace. Jde o

složitý proces spojený s konformačními změnami jak molekuly inzulínu tak receptoru a tudíž jakýkoliv další poznatek je vítán.

Naše nové analogy inzulínu jsou modifikovány v C-koncové části B-řetězce inzulínu. Zde se v pozicích B24-B26 nacházejí aromatické aminokyseliny, které jsou zodpovědné jak za agregaci inzulínových monomerů do zásobní formy, tak za interakci inzulínu s jeho receptorem^{1,2}. Všechny analogy jsou zkrácené o poslední 4 aminokyseliny B27-B30, které mohou být z hormonu eliminovány bez jakéhokoliv vlivu na biologickou aktivitu³. Jednotlivé pozice aromatického tripletu B24-B26 byly modifikovány *N*-methylací peptidové vazby a zároveň záměnou TyrB26 za jinou aminokyselinu aromatického charakteru. *N*-methylace peptidové vazby jednak způsobuje zvýšenou flexibilitu této vazby a jednak znemožňuje amidu peptidové vazby tvořit vodíkový můstek. Dále se předpokládá, že substituce methylovou skupinou zvyšuje hydrofobicitu tohoto úseku. Kombinace *N*-methylace a substituce TyrB26 za jinou aminokyselinu se odrazilo na biologické aktivitě jednotlivých analogů.

Všechny analogy byly připraveny kombinací syntézy peptidů na pevné fázi a enzymové semisyntézy. K charakterizaci analogů byla použita jednak vazba ¹²⁵I-inzulínu na plazmatické membrány tukové tkáně potkanů a zároveň stimulace transportu ³H-glukosy na izolovaných potkaních adipocytech.

LITERATURA

1. Nakagawa S. H., Tager H. S.: J Biol Chem 261, 7332 (1986).
2. Mirmira R. G., Nakagawa S. H., Tager H.S.: J Biol Chem 266, 1428 (1991).
3. Fischer W. H., Saunders D., Brandenburg D., Wollmer A., Zahn H.: Biol Chem Hoppe Seyler 366, 521 (1985).

IZOLACE A CHARAKTERIZACE PROMOTORŮ *Corynebacterium glutamicum* REGULOVANÝCH ZMĚNAMI TEPLoty

MARTINA ZEMANOVÁ, MIROSLAV PÁTEK a JAN NEŠVERA

Mikrobiologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 14220 Praha zemanovm@biomed.cas.cz

Corynebacterium glutamicum je grampozitivní nesporující bakterie využívaná k průmyslové produkci aminokyselin. V posledních letech značně vzrostla znalost o uspořádání genů účastnících se biosyntézy různých aminokyselin, stále se však příliš mnoho neví o molekulárních signálech regulujících expresi těchto genů. Pro poznání mechanismů regulace exprese genů na transkripční úrovni má klíčový význam znalost struktury a funkce iniciačních signálů (promotorů). Regulovatelné promotory, které mohou být během fermentace „zapnuty“ nebo „vypnuty“ působením vnějších faktorů (např. změnami teploty), mohou zajistit regulované zvýšení exprese vybraných genů.

Pro cílené získávání promotorů *C. glutamicum*, jejichž aktivita je regulována změnami teploty, byly využity údaje o

úplné sekvenci nukleotidů chromozomu *C. glutamicum* zveřejněné v databázi GenBank. Metodou PCR byly připraveny fragmenty DNA nesoucí promotory genů *clpB*, *clpC* (kódují heat shock proteiny s chaperonovou aktivitou) a *sigE* (kóduje sigma podjednotku RNA polymerasy indukovanou působením vnějších stresových faktorů) z *C. glutamicum*, u nichž lze předpokládat regulaci jejich exprese změnou teploty. Na základě počítačové analýzy sekvence nukleotidů fragmentů nesoucích uvedené promotory byly navrženy oblasti, které by se mohly podílet na regulaci aktivity těchto promotorů. Před genem *clpB* byly nalezeny dvě operátorové sekvence HAIR (zjištěné před geny kódujícími heat shock proteiny u jiných bakterií) a promotorové sekvence rozlišované alternativními sigma podjednotkami RNA polymerasy. Tyto promotorové sekvence byly zjištěny i před genem *clpC*. V oblasti – 35 hexameru promotoru P-*sigE* byla zjištěna palindromová sekvence, která by mohla sloužit jako operátor při regulaci aktivity tohoto promotoru.

Fragmenty obsahující promotory P-*clpB*, P-*clpC* a P-*sigE* byly vloženy do promoter-probe vektoru pET2, který nese reportérový gen *cat*, kódující enzym chloramfenikolacetyltransferasu (CAT). Vzniklé konstrukty byly přeneseny transformací do buněk *C. glutamicum*. U klonů *C. glutamicum* obsahujících promotory P-*clpB*, P-*clpC* a P-*sigE* v pET2 byla stanovena CAT jak po růstu při teplotě 30 °C, tak po různě dlouhém (7–60 minut) teplotním šoku (37 °C, 45 °C a 50 °C). Výsledky prokázaly zvýšenou aktivitu promotorů P-*clpB*, P-*clpC* a P-*sigE* po teplotním šoku. Metodou primer extension byl přesně lokalizován transkripční start mRNA, do níž se přepisuje gen *sigE* a byly definovány sekvence klíčových hexamerů – 10 (CAAAAT) a – 35 (TAGATT) hexamerů promotoru P-*sigE*.

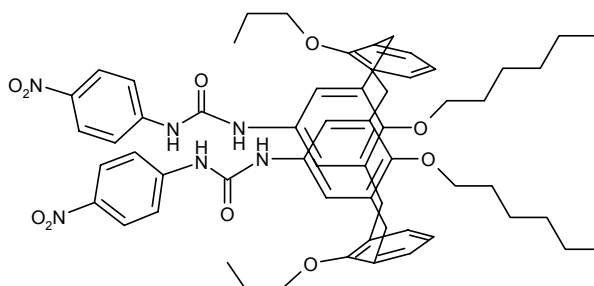
KOMPLEXACE NEUTRÁLNÍCH MOLEKUL MOČOVINOVÝM RECEPTOREM

PETRA ZLATUŠKOVÁ^a, JAN BUDKA^a, JAN SÝKORA^b, PAVEL LHOTÁK^a a IVAN STIBOR^a

^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 125, 165 02 Praha 6
Petra.Zlatuskova@vscht.cz

Calixareny jsou makrocyclické sloučeniny v poslední době s úspěchem často používané jako výchozí látky pro syntézu molekul vhodných ke komplexaci kationtů, aniontů i iontových párů. Spojením calixarenu s vhodně substituovanou močovinnou jednotkou byl získán receptor aniontů, vhodný zejména pro komplexaci karboxylátů.

Při komplexačních studiích prováděných s touto látkou bylo zjištěno, že má schopnost komplexovat i neutrální molekuly, jako například DMSO, sulfolan nebo aceton. Byly provedeny rozsáhlé komplexační studie pro zjištění preferencí této sloučeniny vůči malým molekulám. Zároveň byly srovnány její komplexační vlastnosti s analogickými močovinnými deriváty.



Struktura této látky byla mimo jiné potvrzena i rentgenostrukturální analýzou.

LITERATURA

1. Van Loon J. D., Arduini A., Coppi L., Verboom W., Pochini A., Ungaro R., Harkema S., Reinhoudt D. N.: *J. Org. Chem.* 55, 5639 (1990).
2. Timmerman P., Boerrigter H., Verboom W., Reinhoudt D. N.: *Recl. Trav.Chim. Pays-Bas* 114, 103 (1995).
3. Brody M. S., Schalley C. A., Rudkevich D. M., Rebek Jr. J.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 1640 (1999).
4. Budka J., Lhoták P., Michlová V., Stibor I.: *Tetrahedron Lett.* 42, 1583 (2001).



SIGMA-ALDRICH

REJSTŘÍK AUTORŮ

- Aimová Dagmar 273
 Alexandrová Zuzana 273, 302
 Arakelyan A. 307
- Barth Tomislav 313
 Bartoš Petr 274
 Bartůněk P. 288
 Bělohradský Martin 301
 Bezoušková Silvie 281
 Bezvoda Radek 299
 Bílková Z. 296
 Blahoš Jaroslav 280
 Blažková Martina 274
 Borská Romana 290
 Boubelík Michael 295
 Boumendjel Ahcene 308
 Bouzek Karel 293
 Brabcová Irena 299
 Brzobohatý B. 282
 Buckiová Daniela 295
 Buděšinský Miloš 273, 287, 288, 295
 Budka Jan 314
 Budová Martina 275
 Bumba L. 275
- Castaño Obis D. 277
 Cibulka Radek 276
 Cienfialová Alice 276
 Cieslar Petr 309
 Čiřarová Ivana 287
- Čejková Alena 292
- Damborský Jiří 293
 Demnerová Kateřina 284
 Dostál J. 277
 Drábek J. 290
 Dračinský Martin 277
 Drařar Pavel 305
 du Bois R. M. 290
 Dufková Lenka 278
 Dukh Mykhaylo 305
 Dvořák Dalimil 291
 Dvořák M. 288
 Dvořák Zdeněk 278
 Dvořáková M. 288
 Dyr Jan E. 309
- Ebryngerová A. 311
 Ehrlichová Marie 308
- Falkowski Paul G. 284
 Ferjentsik Zoltán 304
 Fialová Ariana 279
- Fiedler Pavel 302
 Filip Vladimír 285
- Gajdová Pavlína 306
 Garr E. 290
 Gibejová A. 307
 Gilboa-Garber Nechama 275
 Glogarová Milada 289
 Grim M. 288
 Grutters J. C. 290
 Gut Ivan 308
- Hajřilová Jana 292
 Halámek Jan 299
 Haubová řárka 279
 Havlíček Vladimír 306
 Hejduková Kateřina 279
 Hlaváčková Veronika 280
 Hocek Michal 307
 Hodačová Jana 287, 288
 Hodný Zdeněk 296, 310
 Holub Martin 281
 Holý Petr 301
 Horáková Jana 281
 Houřtěk Josef 297
 Hozák Pavel 296, 310
 Hradilová J. 282
 Hromadníková Ilona 302
 Hroudová Miluře 283
 Huřák M. 275
 Hýblová D. 282
- Chodora Zdeněk 283
- Imberty Anne 275
- Jelínková Lucie 283
 Jenčová Věra 283
 Jesenská Andrea 293
 Jeřová J. 296
 Jiráček Jiří 276, 295, 313
 Jirků Vladimír 292
 Jonák Jiří 304
- Kalachová Ladislava 281
 Karafiát V. 288
 Káš Martin 283
 Kejik Zdeněk 284
 Klíma Jiří 300
 Klouparová Marie 306
 Kniežo Ladislav 305, 312
 Kobliřek Michal 284
 Koblovská Radka 310
 Köhlerová Eva 285
- Kolber Zbigněw S. 284
 Kolek V. 290, 307
 Kolouchová Irena 285
 König Burghard 276
 Kontrová K. 286
 Kopečný Jiří 286
 Korecká L. 296
 Kosinová E. 287
 Kostečková Alena 287, 297
 Kořčová Simona 287
 Kotorá Martin 278, 294, 307
 Kovář Jan 308
 Kozáková Michala 288
 Králová J. 288
 Krejčí E. 288
 Kriegová E. 290
 Krist P. 289
 Křen Vladimír 289, 308
 Křenek K. 289
 Křířová Petra 309
 Kubelka Michal 283
 Kuchař Martin 289
 Kusenda Branislav 290
 Kvezereli M. 290
 Kyselová Vendula 295
- Lapčík Oldřich 310
 Lhoták Pavel 283, 289, 308, 314
 Lipov Jan 301
 Lojek A. 311
 Ludvík Jiří 300
- Macková Martina 276
 Macková Zuzana 310
 Maier Vítězslav 281
 Makower Alexander 299
 Man P. 296
 Mandíková S. 288
 Marvanová Soňa 293
 Masák Jan 292
 Masojídková Milena 297
 Maurel Patrick 278
 Mazal Ctibor 274
 Meca Luděk 291
 Melzoch Karel 285, 303, 304
 Merkerová Michaela 291
 Mičková Barbora 292
 Mikeř Jiří 292
 Mikulík K. 286
 Mitchell Edward P. 275
 Modrianský Martin 278, 311
 Monincová Marta 293
 Montoya Angel 292
 Moravcová Sabina 293

- Mrázek F. 290, 307
Müller Petr 294
- Nagata Yuji 293
Nečas David 294
Nešvera Jan 313
Netušilová Hana 295
Neubauerová Jitka 295
Nováková Zora 296, 310
Novotná Marcela 297
Novotná Vladimíra 289
- Ojima Iwo 308
Osička Radim 306
Ouzká Š. 296
- Páca Jan 287, 297
Páca Jan Jr. 287, 297, 307
Pačes Václav 283
Palečková P. 286
Pascussi Jean-Marc 278
Pátek Miroslav 313
Paulová Leona 304
Páv Ondřej 297
Pávek S. 311
Pěknicová Jana 286, 295
Petrek M. 290, 307
Petříček Miroslav 279
Petříčková Kateřina 279
Pícková Andrea 297
Pin Jean-Philippe 280
Poljaková Jitka 298
Pospíšilová Šárka 290
Potocký Martin 297, 299
Pravenec M. 286
Prokop Zbyněk 293
Pronáyová Z. 287
Przybylski M. 296
Příbyl Jan 299
Příbylová Lenka 300
Pšikal I. 287
- Rauch Pavel 274, 292
Rejňák Michal 300
Rodák L. 287
- Rosenberg Ivan 295, 297
Ruml Tomáš 279, 301
Rybáčková Markéta 301
- Sabin Charles 275
Sedláček Petr 302
Sedláčková Lenka 301
Sedláčková Lucie 302
Sehnal Petr 273, 302
Sejbal Jan 277
Sekavová Barbora 303
Scholzová E. 303
Siglová Martina 292
Šiříšřová Lucie 304
Skládal Petr 299
Sládek Martin 305
Souček Karel 312
Stará Irena G. 273, 302
Starý Ivo 273, 302
Stefanescu R. 296
Stibor Ivan 283, 289, 308, 314
Stiborová Marie 273, 287, 297, 298, 307
Strnad Hynek 283
Svoboda Jiří 289, 300
Sychrová Hana 300
Sýkora Jan 314
Sýkorová Jana 293
- Šaman David 273, 302
Šebo Peter 306
Ševčík Juraj 281
Šindelka Radek 304
Šmarda Jan 312
Šmidrkal Jan 285
Šnajdr P. 288
Štěpánek Petr 305
Štruncová Soňa 290
Šulc Miroslav 306
- Taraba Jan 306
Teplý Filip 273, 302
Tesařík R. 287
Tichý Boris 290
Truksa Jaroslav 308
Tsuda Masataka 293
- Tsyrunyk A. 307
Turek Michal 307
Turek Pavel 307
Turský Matyáš 294
- Ulbrich Pavel 279
- Václavíková Karolína 308
Václavíková Radka 308
Vácha F. 275
Valentová Olga 299
van Amerongen Aart 274
Vaněk Přemysl 289
Vaničková Martina 309
Velek J. 282
Verner Jiří 310
Veselský L. 282
Vítková Michaela 310
Vlasáková Jana 310
Vodeničarová Melita 311
Vojtěšek Bořivoj 294
Vrba Jiří 311
- Weiser Jaroslav 281
Welsh K. I. 290
Werner Lukáš 312
Wichers Jan H. 274
Wildová Marcela 312
Wimmer Zdeněk 284
Wimmerová Michaela 275
- Zahradníčková Eva 312
Zarevúcká Marie 284
Závada Jiří 301
Zemanová Martina 313
Zídek V. 286
Zídková J. 286
Zlatušková Petra 314
Zórad Štefan 313
Zrostlíková Jitka 292
- Žák Zdirad 306
Žáková Lenka 313
Žárský Viktor 299
Železná B. 282

PRESS RELEASE

Brussels, 2 April 2004



Deadline on 3 September 2004 for INTAS calls 2004

In 2004, the calls of INTAS, the International Association for the promotion of cooperation with scientists from the New Independent States (NIS) of the former Soviet Union, either address specific scientific & interdisciplinary subjects (thematic calls), or encourage international cooperation with industrial or national partners (collaborative calls with Airbus S.A.S., Kazakhstan and Uzbekistan)

In line with its mission and strategic plans, INTAS officially published on 2 April 2004 its **Thematic and Collaborative Calls 2004**. A particular attention has been given to scientists from NIS countries weakly represented in the international research programmes: Armenia, Azerbaijan, Georgia, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Moldova, Tajikistan, Turkmenistan and Uzbekistan. The web based submission system is now open for:

- ✓ INTAS Thematic Call for Proposals for Research Projects and Networks on **Information Technology** (indicative budget Euro 1 million)
- ✓ INTAS Thematic Call for Proposals for Research Projects and Networks on **Position Sensitive Detectors** (indicative budget Euro 800,000)
- ✓ INTAS Thematic Call for Proposals for Research Projects and Networks on **Transforming Societies: East and West** (indicative budget t Euro 1.5 million)
- ✓ INTAS Collaborative Call with Airbus for Proposals for Research Projects in the field of **Aeronautics** (indicative budget t Euro 1 million)
- ✓ INTAS Collaborative Call with Kazakhstan for Proposals for Research Projects on **Management of Man-made Pollution** (indicative budget Euro 1.5 million)
- ✓ INTAS Collaborative Call with Uzbekistan for Proposals for Research Projects on **Sustainable Development through the Use of Local Natural Resources and New Technologies** (indicative budget Euro 1 million)

In parallel to these calls, the INTAS programme for Young NIS Scientist Fellowships (indicative budget Euro 2.5 million) fosters the mobility of researchers in Europe and enables them to either pursue or start their career in Science. Additionally, special support to promote innovation and marketing of innovative results derived from INTAS funded projects is offered through the INTAS Innovation Grants with an indicative budget of € 500,000 for 2004.

The deadline for all the above INTAS calls is 3 September 2004, 13H00 Brussels time.

The **General Rules** and a **Technical Guide** on the electronic submission for each of the actions can be obtained on <http://www.intas.be>, Section "Funding Opportunities". For further questions on the INTAS calls 2004, please send an e-mail to infopack@intas.be

For general information about INTAS, please contact the Public Relations Team at intas@intas.be or by fax: +32-2-549 01 56, or check our web site at <http://www.intas.be>

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	231	EDITORIAL	231
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Monolitické stacionární fáze pro HPLC. Místo narození: Praha F. Švec	232	Monolithic Stationary Phases. Place of Birth: Prague F. Švec	232
Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka J. Slanina a E. Táborská	239	Intake, Bioavailability, and Metabolisms of Plant Polyphenols in Humans J. Slanina and E. Táborská	239
Využití metatéze při syntéze chemických specialit J. Kopečný, L. Kurc a L. Červený	246	Metathesis Utilization in Synthesis of Fine Chemicals J. Kopečný, L. Kurc, and L. Červený	246
Afinitní chromatografie na imobilizo- vaných kobaltnatých iontech a její použití E. Zatloukalová	254	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography and Its Application E. Zatloukalová	254
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Postup izotachoforetického stanovení kyseliny thiodiglykolové v moči za odsolení a úpravy pH analyzovaného vzorku J. Chýlková a R. Fadrná	260	Procedure for Isotachophoretic Determination of Thiodiglycolic Acid in Urine Using Desalination of the Analyzed Sample J. Chýlková and R. Fadrná	260
Identifikace proteinů kombinací peptidového mapování a fragmentace sulfonovaných peptidů J. Lenčo a J. Stulík	264	Identification of Proteins by Combination of Peptide Mass Fingerprinting and Fragmentation of Sulfonated Peptides J. Lenčo and J. Stulík	264
RECENZE	268	BOOK REVIEWS	268
SIGMA-ALDRICH KONFERENCE – SBORNÍK	271	SIGMA-ALDRICH KONFERENCE – ABSTRACTS	271

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 98 (2004), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 128, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 114 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORŮ/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchovalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: M. Bláhová, M. Ferles, B. Valter, I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORŮ/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/ EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, J. Churáček, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Mišek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE OPŘEDPLATNĚM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: mblahova@csvts.cz, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2004 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 140 Kč, roční plně předplatné 2004 (12 čísel) 1440 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 720 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2004 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností.