

Věda žije!

„Moderní život na nás žádá vědomosti, kterých nemáme; užíváme věci, kterým nerozumíme; zasahujeme do dějů, o kterých nevíme skoro nic. Stát za nás a v našem jménu hospodář s výchovou, s hygienou, s technikou, s právními pojmy i se samotnou vědou; a my o nich neznáme nic nebo skoro nic. Jsme povoláni kontrolovat věci, o kterých jsme informováni málo nebo špatně. Nikdy v dějinách světa nebylo tolik možností a tak naléhavá potřeba univerzálního vzdělání; a právě v té době selháváme my a selhává i věda, která nám to vzdělání má dát. Vědění nebude k ničemu, nebude-li stále a pozorně obraceno v obecné vzdělání. Má-li věda vyvádět lidi nejenom z jejich nevědomosti, ale i z mezí jejich životní specializace, musí začít sama u sebe; musí hledat cesty k tomu, aby nezůstala jen profesí odborníků, nýbrž znovu se stávala součástí kultury. Dřív se tomu říkalo popularizace vědy; to znamená, že se věda snažila být populární a zábavná. Dnes jde o něco víc: aby věda byla dělná a životně aktivní, aby pomáhala utvářet život a odpovídat na jeho otázky; pročež rekneme tomu raději demokratizace vědy.“¹

Tři čtvrtě století uplynulo, a Čapková slova stále platí. Rozvinuli jsme způsoby, jak pracovat s daty, která nemusíme mít v hlavě. Ke klasickým encyklopediím přibyla Wikipedie, Google a počítačové databáze s důmyslnými metodami dobývání dat, a přece jsme nuceni zaměřovat se na čím dál menší zlomky vědění. V dnešní době vědci běžně sledují v úzce specializovaných oborech tisíce publikací ročně a desítky jich sami produkují. Tato čísla se neustále zvyšují, stejně jako se stále zefektivňují nástroje přístupu k těmto informačním zdrojům. Společnost však čím dál více postrádá osobnosti schopné dávat srozumitelné a přitom správné odpovědi na důležité otázky. Jejich místo si osobují šarlatánští obchodníci s jednoduchými odpověďmi na všechno. Čím dál častěji se setkáváme s „demokratizací“ vědy tím, že veřejnost anebo kabinet jejich vyvolených zástupců rozhodují, čím se věda má a smí zabývat. Občas se nám věda „demokratizuje“ i tak,

že odborníci namísto bádání zaujmají jen stanoviska. Místo vědy dělné a tvůrčí je spíše žádána věda námezdní, věda montující laciné inovace jako výrobky na běžícím pásu. Vyznavači kultu peněz požadují, aby věda dělala peníze, anebo si na žádné nedělala nárok. Tedy, co vlastně dělá věda, když nepřináší okamžitý zisk? Čím je nám užitečná? Proč bychom si místo její podpory neměli postavit třeba kus nové dálnice?

Přestože málokdo veřejně pochybuje, že věda je klíčovou součástí dnešní společnosti, nelze spoléhat na to, že dostatečný prostor pro vědecké bádání je již předem zaručen osvícenou přízní kulturní společnosti. Ukazuje se, že musí být neustále budován a obhajován, že jeho vymezení musí vycházet z aktivní komunikace vědecké obce s veřejností.

V tomto prostředí přišlo na svět Fórum Věda žije! Sdružili se v něm převážně mladí vědeckí pracovníci, když krize české vědní politiky a financování vědy bezprostředně ohrozila existenci Akademie věd. Tato krize však nepadá pouze na Akademii, ale postihuje celý systém hodnot vědecké práce, včetně vysokoškolského vzdělávání. Na konci roku 2009 se proto Fórum Věda žije! transformovalo v občanské sdružení, jehož cílem je podpořit komunikaci mezi vědci, vládními a nevládními organizacemi a veřejností, podněcovat otevřenou diskusi o vědní politice a reformě vědy a výzkumu v ČR a popularizovat výsledky vědecké práce. Věříme, že právě posílení tohoto dialogu je cesta k transparentnímu a kvalifikovanému rozhodování ve vědní politice. Vynasnažíme se, aby Fórum Věda žije! úspěšně pokračovalo na této cestě.

Jan Macháček
Marek Piliarik

LITERATURA

1. Čapek K.: Věda a život, listopad 1934.

BIOSENZORY K VČASNÉ DETEKCI OTRAVNÝCH LÁTEK

ŠÁRKA BIDMANOVÁ^{a,b}, MIROSLAV
POHANKA^c, JIŘÍ CABAL^c, ZBYNĚK PROKOP^{a,b}
a JIŘÍ DAMBORSKÝ^{a,b}

^a Loschmidovy laboratoře, Ústav experimentální biologie a Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5/44, 625 00 Brno, ^b Enantis, s.r.o., Palackého třída 1802/129, 612 00 Brno, ^c Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany v Brně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
miroslav.pohanka@gmail.com

Došlo 16.2.09, přepracováno 10.6.09, přijato 29.10.09.

Klíčová slova: nervově paralytické látky, zpuchýřující otravné látky, biosenzor, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, halogenalkandehalogenasa, fosfotriesterasa

Obsah

1. Úvod
2. Nervově paralytické látky
 - 2.1. Historický úvod k nervově paralytickým látkám
 - 2.2. Vlastnosti nervově paralytických látek
 - 2.3. Účinky nervově paralytických látek
 - 2.4. Současné prostředky detekce nervově paralytických látek
 - 2.5. Biosenzory pro detekci nervově paralytických látek
3. Zpuchýřující otravné látky
 - 3.1. Historický úvod ke zpuchýřujícím otravným látkám
 - 3.2. Vlastnosti zpuchýřujících otravných látek
 - 3.3. Účinky zpuchýřujících otravných látek
 - 3.4. Současné prostředky detekce zpuchýřujících otravných látek
 - 3.5. Biosenzory pro detekci zpuchýřujících otravných látek
4. Budoucnost biosenzorů v detekci otravných látek

1. Úvod

Bojové otravné látky jsou chemické sloučeniny vykazující negativní účinky na živé organismy. Z hlediska ustáleného členění dělíme ve vojenství používané otravné látky na nervově paralytické, zpuchýřující, všeobecně toxické (otravné), dusivé a psychoaktivní¹.

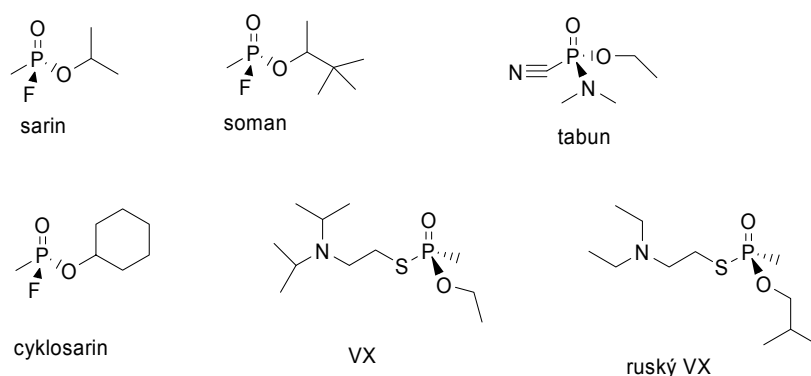
Za hlavní epizodu použití otravných látek můžeme považovat 1. světovou válku². Masivně byly tyto látky nasazeny Irákem v průběhu irácko-iránské války³. V současné době nepředstavuje hlavní riziko použití otravných látek ve válečném konfliktu, ale spíše jejich zneužití teroristickými skupinami v rámci prosazování svých cílů nebo jejich použití některými totalitními státy^{4,5}. Jako modelový příklad teroristického zneužití otravných látek může sloužit použití nervově paralytické látky sarin sektou Óm Šinrikjó v tokijském metru⁶.

Včasná detekce otravných látek je důležitým faktorem pro nasazení vhodných profylaktických opatření, mobilizaci složek záchranného systému a evakuaci osob z ohrožené oblasti. V tomto přehledu jsou popsány možnosti rychlé detekce dvou významných skupin otravných látek, nervově paralytických a zpuchýřujících. Hlavní pozornost je věnována oblasti biosenzorů, která svým rozvojem zasahuje i do oblasti vojenství.

2. Nervově paralytické látky

2.1. Historický úvod k nervově paralytickým látkám

Ve srovnání s yperity a některými otravnými látkami použitými v průběhu 1. světové války jsou nervově paralytické látky mnohem mladší. U jejich zrodu stál Gerhard Schrader, výzkumný pracovník německé společnosti Bayer, která byla v té době součástí koncernu IG Farben⁷. Ve snaze hledat účinné pesticidy rozpoznal v roce 1936 toxické účinky *O*-ethyl-dimethylamidokyanofosfátu (obr. 1). Tato sloučenina je dobře známa pod názvem tabun. Dva roky po tabunu byl objeven sarin, 2-(fluormethylfosforyl)oxypropan, a rok před koncem 2. světové války byl objeven soman, 2-(fluoro-methyl-fosforyl)oxy-3,3-dimethylbutan. Tato řada nervově paralytických látek byla nazývána „G“ podle země přípravy „Germany“. Poslední objevenou látkou řady G byl cyklosarin, fluor-methylfosforyloxycyklohexan. V 50. letech minulého století v období studené války byla zavedena „V“ řada, jejíž název je odvozen od slova „Victory“. Jsou to organofosfáty obsahující ve své struktuře aminoethan-thiol⁸. Mezi dobře známé zástupce patří látka VX, *S*-(2-diizopropylaminoethyl)-*O*-ethyl methylfosfonothionát) a ruská látka VX, *N,N*-diethyl-2-(methyl-/2-methylprooxy/fosforyl) sulfanylethanamin. Dodnes rozporuplné informace provází existenci látky typu „novichok“ vyvinuté v bývalém Sovětském svazu v 70. – 80. letech minulého století. Na rozdíl od výše zmíněných nervově paralytických látek nejsou látky typu novichok detailně známy⁹.



Obr. 1. Chemické struktury vybraných nervově paralytických látek

2.2. Vlastnosti nervově paralytických látek

Nervově paralytické látky jsou organické sloučeniny s vlastnostmi odpovídajícími funkčním skupinám přítomným v jejich struktuře. Snadno se vypařují, jejich těkavost odpovídá jiným otravným látkám. Například výparnost, tj. maximální koncentrace ve vzduchu, sarinu je $2,2 \text{ g m}^{-3}$. Znamé nervově paralytické látky jsou v laboratorních podmínkách bezbarvé kapaliny. Z chemického hlediska je zajímavý rozklad nervově paralytických látek ve vodném prostředí. Fosfor v centru organofosfátu může být snadno napaden nukleofilním činidlem¹⁰. Organofosfáty se v alkalickém prostředí rychle rozkládají, proto jsou k odmořování kontaminovaných povrchů velmi často využívány roztoky hydroxidů.

2.3. Účinky nervově paralytických látek

Nervově paralytické látky stejně jako organofosforové pesticidy jsou látky inhibující dva velmi důležité enzymy v lidském těle: acetylcholinesterasu (AChE, EC 3.1.1.7), která je lokalizována v neurosynapsích a na povrchu erytrocytů, a plasmatický enzym butyrylcholinesterasu (BChE, EC 3.1.1.8)¹¹. Mechanismus inhibice je založen na esterifikaci serinu v aktivním centru enzymu. Cholinesterasa po této modifikaci již není schopna plnit svoji biologickou roli¹². Inhibice cholinesteras organofosfáty je ireverzibilní¹³.

Vizuálně se první fáze otravy organofosfáty projeví zúžením zornic. Další symptomy mohou být slinění, křeče a neuromuskulární dysfunkce¹⁴. Smrt nastává zejména z důvodu paralýzy dýchacího svalstva. Nástup symptomů otravy je velmi rychlý. Pro symptomatickou léčbu otrav organofosfáty se používá atropin¹⁵, efektivnějším přístupem je reaktivace cholinesteras za pomoci oximů¹⁶.

2.4. Současné prostředky detekce nervově paralytických látek

Hlavním nositelem technologií pro rychlou detekci otravných látek a jejich identifikaci v rámci České republiky jsou specializovaná armádní pracoviště a útvary, jednotky záchranného systému a některé forenzní laboratoře. Pro rychlý průkaz přítomnosti nervově paralytických látek se mohou použít jednoduché detekční průkazníky¹⁷. K nejjednodušším patří průkazníkové papírky a páskové detektory. Armáda České republiky je z této třídy detektorů vybavena průkazníkovými papírkami PP-3 a Detehit, produkty české proveniencce. Průkazníkové papírky detegují odděleně látky typu G a V v kapalné formě. K detekci je využívána selektivní rozpustnost vybraných barviv v otravných látkách. Průkazník Detehit deteguje nervově paralytické látky na základě inhibice imobilizované acetylcholinesterasy kolorimetricky pomocí Ellmanova činidla. Je schopen zjišťovat nervově paralytické látky ve vzduchu, vodě, potravinách a po stěru i na pevném povrchu.

Složitějším typem detektorů jsou instrumentální chemické průkazníky CHP-71 a CHP-5. Oba průkazníky k detekci využívají detekční trubičky vhodné pro jednotlivé typy otravných látek. Trubičky dodávané v současné době pro detekci nervově paralytických látek využívají principu shodného s detektorem Detehit. Starší verze těchto trubiček využívaly pro detekční účely barevné změny acidobazického indikátoru.

Pro rychlé stanovení nervově paralytických látek ve vzduchu je možné použít i automatické signalizátory ruské proveniencce GSP-11, GSA-12 a historicky překonaný typ GSP-1. Signalizátory GSP-11 a GSA-12 využívají k detekci nervově paralytických látek sledování inhibice použitých cholinesteras, přičemž aktivita enzymů je sledována kolorimetricky. Přístroj GSP-1 využíval k detekci nervově paralytických látek Schonemannovu reakci, což limitovalo detekci jen na látky typu G. U všech tří typů je reakce realizována na textilní pásce po automatickém nástřiku jednotlivých reagentů. Zcela odlišným typem při-

stroje jsou miniaturizované hmotnostní spektrometry¹⁸, např. RAID-1, RAID-M, RAID-S a RAID-E (Bruker Daltonics). Naměřená data z okolního prostředí jsou porovnávána s databází uloženou v paměti přístroje a při shodě se signalizuje přítomnost otravné látky ve vzduchu. Nevýhodou těchto přístrojů může být falešně negativní detekce vzorků obsahujících látku typu „novichok“, jejíž přesná struktura není veřejně známá a není proto uložena v databázi.

2.5. Biosenzory pro nervově paralytické látky

Biosenzor je zařízení sestávající se z biorekogniční složky a fyzikálně-chemického převodníku (senzoru). Vhodnou biorekogniční složkou jsou díky své citlivosti vůči působení nervově paralytických látek acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa. V rámci současného výzkumu však převládá zájem o acetylcholinesterasu jako rekogniční element^{19,20}. Ve spojení s cholinesterasami již byly popsány elektrochemické i optické biosenzory¹⁹ (tab. I). Elektrochemické biosenzory založené na cholinesterasách mohou jednoduše využívat potenciometrický princip, kdy je aktivita cholinesteras vyjádřena jako změna pH média. Acidifikace je dosaženo přidáním nativního substrátu acetylcholinu (resp. butyrylcholinu), což vede k uvolnění kyseliny octové snižující pH média²¹.

Druhou skupinou elektrochemických biosenzorů jsou amperometrické, které ve spojitosti s acetylcholinesterasou nejčastěji používají alternativní substrát acetylthiocholin. Uvolněný thiocholin může být snadno oxidován na dithiol při vloženém potenciálu přibližně 400 mV proti nejčastěji používané argentschloridové elektrodě. Napětí je možno dále redukovat použitím modifikujících látek²². Tento přístup může být použit k diagnostice otrav organofosfáty

sledováním aktivity krevních cholinesteras²³. Amperometrický biosenzor s imobilizovanou butyrylcholinesterasou byl např. použit ke konstrukci detekčního systému pro stanovení nervově paralytických látek ve vzduchu²⁴. Bylo možno detegovat již 0,1 mg sarinu v krychlovém metru vzduchu. Biosenzor může fungovat i v rámci systému injektujícího kapalné vzorky do reakční cely²⁵. Časová odezva na přítomnost organofosfátu je velmi rychlá - může se pohybovat v řádu několika vteřin. Jinou možností je nahradit biosenzor jednoduchým senzorem a cholinesterasu injektovat do reakční cely současně s analyzovaným vzorkem²⁶. Detekce VX a ruské VX (obr. 1) za pomoci amperometrického biosenzoru prokázala funkčnost biosenzoru zkonstruovaného Joshimem a spol.²⁷. Pro konstrukci biosenzoru autoři použili grafitová nanovlákná jako vhodnou matici k imobilizaci cholinesterasy. Detekční systém založený na principu elektrochemického biosenzoru je i v prototypu zařízení BioNA v dispozici Ministerstva obrany České republiky.

Pro konstrukci biosenzorů s cholinesterasami jako rekogničními složkami je možné použít i optické převodníky. I v tomto případě je koncentrace analytu vztažena na míru inhibice cholinesteras. Aktivita cholinesteras může být převedena na fluorescenci vhodným činidlem citlivým na acidifikaci média vlivem uvolněné kyseliny octové, např. pyraninem²⁸. Metodicky odlišným přístupem je použití indoxylacetátu jako substrátu cholinesteras. Vznikající indigová modř je fotometricky velmi dobře stanovitelná²⁹.

Biosenzory pro stanovení nervově paralytických látek nemusí být založeny pouze na cholinesterasách. Některé studie zabývající se biosenzory využívají fosfotriesterasy (EC 3.1.8.1), enzymy schopné hydrolyzovat organofosfáty. Jejich hlavní výhodou oproti cholinesterasám spočívá v jiném principu sledování koncentrace analytu. Zatímco

Tabulka I
Přehled (bio)senzorů pro detekci nervově paralytických, vybraných pesticidů a zpuchýřujících otravných látek a jejich analogů

| Převodník | Rekogniční element | Analyt | Limit detekce | Selektivita |
|-----------------------------------|--------------------------|---|------------------------|-------------|
| <i>Nervově paralytické látky</i> | | | | |
| Elektrochemický ²⁴ | butyrylcholinesterasa | sarin | 0,1 mg m ⁻³ | skupinová |
| Elektrochemický ²⁵ | acetylcholinesterasa | paraoxon | 200 pg | – vysoká |
| Elektrochemický ²⁷ | fosfotriesterasa | VX, ruský VX | 0,2–0,8 μM | |
| Optický ³³ | fosfotriesterasa | paraoxon, malathion, coumaphos, diazinon | 1 – 250 ppt | |
| Elektrochemický ⁵⁰ | acetylcholinesterasa | sarin | 0,2 μM | |
| Elektrochemický ⁵¹ | acetylcholinesterasa | sarin, soman, tabun, cyklosarin, VX | 0,6–15 pM | |
| <i>Zpuchýřující otravné látky</i> | | | | |
| Elektrochemický ³⁸ | – | thiodiglykol | – | nízká |
| Mechanický ³⁹ | – | sirný yperit, VX | 0,94 ppm | – |
| Optický ⁴⁰ | <i>Nostoc, Chlorella</i> | dibutyl sulfid, yperit, tabun, tributylamin | vysoký | nízká |
| Piezoelektrický ⁴³ | protilátky | sirný yperit | – | vysoká |

u biosenzorů s imobilizovanými cholinesterasami dochází v přítomnosti organofosfátů k ireverzibilní inhibici, fosfotriestery tento analyt pouze štěpí a životnost biosenzoru tím není nutně poznamenána. Z hlediska fyzikálního principu jsou pak tyto biosenzory založeny na sledování změny pH v kombinaci s pH elektrodou (potenciometrické) nebo optickým převodníkem s vhodným pH senzitivním chromogenem. Možná je i detekce odstupujícího ligandu jako je např. *p*-nitrofenol vznikající z pesticidu paraoxonu³⁰. Současně je důležité zohlednit zásadní rozdíl mezi analýzou organofosfátů za pomoci fosfotriestery a cholinesteras. Vzorek s nízkou koncentrací organofosfátů způsobí jen velmi malou změnu sledovaného pH média při štěpení fosfotriestery, cholinestery však signál amplifikují a k jejich inhibici stačí jen velmi málo molekul organofosfátů. Při použití fosfotriestery musí být méně koncentrovaný vzorek dávkován ve velkém množství. Jako příklady aplikací biosenzorů s fosfotriestery můžeme zmínit detekci paraoxonu s fosfotriestery imobilizovanou na povrchu pH elektrody³¹. Tímto biosenzorem bylo možno detegovat paraoxon s limitem detekce 100 nM. Stejnou limitu detekce dosáhli pro pH elektrodu Karnati a spol.³². Velmi dobrých výsledků dosáhli za použití optických vláken White a Harmon³³. Vybrané organofosforové pesticidy bylo možno detegovat již v řádu ppt.

3. Zpuchýřující otravné látky

3.1. Historický úvod ke zpuchýřujícím otravným látkám

Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny otravných látek jsou yperity. Sirný yperit připravil poprvé Desprez v r. 1822, avšak jeho zpuchýřující účinky byly rozpoznány až v r. 1860. Sirný yperit byl použit jako chemická zbraň poprvé během 1. světové války v roce 1917. Později byly zpuchýřující otravné látky několikrát použity v místních válečných konfliktech a stále patří k chemickým bojovým látkám, které by potenciálně mohly být zneužity. Důvodem je relativně snadná a levná příprava a velké množství dosud skladovaných zásob, včetně těch, které již měly být zlikvidovány na základě Úmluvy o zákazu chemických

zbraní^{34,36}.

Kromě sirného yperitu, *bis*-(2-chlorethyl)sulfidu (HD), zahrnuje skupina zpuchýřujících otravných látek seskviyperit, 1,2-*bis*-(2-chlorethylmerkapt)ethan (Q), oxolový yperit, *bis*-(2-chlorethylmerkapt)ethyl ether (T) a dusíkové yperity, ethyl-*bis*-(2-chlorethyl)amin (HN-1), methyl-*bis*-(2-chlorethyl)amin (HN-2) a *tris*-(2-chlorethyl)amin (HN-3) (obr. 2). Mezi zpuchýřující otravné látky patří též lewisit, 2-chlorvinylidichlorarsin, fosgenoxim a dichloroformaldoxim^{34,36}.

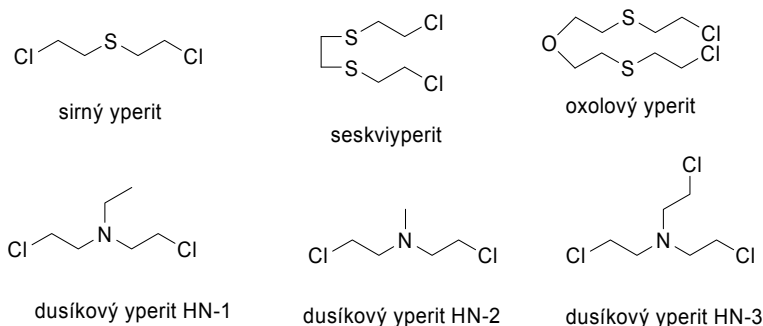
3.2. Vlastnosti zpuchýřujících otravných látek

Yperity jsou vysoce toxické chemické bojové látky. Čistý sirný yperit je bezbarvá kapalina téměř bez zápachu, technicky je nažloutlý až hnědočerný s typickým zápachem po hořčici. Je velmi málo rozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. Dusíkové yperity jsou nažloutlé až nahnědlé kapaliny rozpustné v nepolárních rozpouštědlech^{34,37}.

3.3. Účinky zpuchýřujících otravných látek

Yperity jsou známými karcinogeny, mutageny a teratogeny. Působí jako alkylační činidla, která po průniku do buňky rychle reagují s nukleofily prostřednictvím episulfoniového iontu. V buňkách dochází k narušení proteosyntézy, k inhibici aktivity enzymů a k rozpadu buněčných membrán. Sirný yperit a dusíkový yperit HN-2 byly v minulosti využívány jako chemoterapeutika při léčbě psoriázy a mykóz³⁵.

Již krátkodobá expozice yperitem vede k poškození očí, kůže a dýchacího traktu. Nejcitlivěji reagují na yperit oči, dochází ke zhoršení vidění až ztrátě zraku. Zasažení kůže yperitem se projevívá svěděním a tvorbou erytémů, později se tvoří puchýře, jejichž hojení bývá zpravidla komplikováno sekundární infekcí. Inhalace yperitu vede ke kýchání a kašlání, vysoké dávky mohou způsobit pulmonární edém. Dlouhodobá expozice je spojena s výskytem kožních a respiračních tumorů. Yperit má v koncentracích používaných v bojových konfliktech smrtící účinky^{35,37}.



Obr. 2. Chemické struktury vybraných zpuchýřujících otravných látek

3.4. Současné prostředky detekce zpuchřujících otravných látek

Početní zastoupení a konstrukční pestrost přístrojů pro včasnou detekci zpuchřujících látek je menší než u nervově paralytických látek, úměrně významu a nebezpečnosti detegovaných látek. Sirný yperit lze detegovat průkazníkovým papírkem PP-3 a to rozpouštěním barviva Dye Red E. Průkazníky CHP-71 a CHP-5 jsou vybaveny taktéž trubičkami pro detekci zpuchřujících látek (trubičky se žlutými pruhy)¹⁷. Jako detekčního principu je využíváno reakce yperitu s ethylderivátem Michlerova ketonu. Yperity a lewisity lze detegovat přístrojem RAID-1 výše uvedeným způsobem¹⁸.

3.5. (Bio)senzory pro detekci zpuchřujících otravných látek

Potenciál využití (bio)senzorů leží především v jejich selektivitě, kontinuálnosti a finanční nenáročnosti provozu. Nabízejí tak slibnou alternativu k používaným chemickým průkazníkům a vysoce přesným, avšak nákladným zařízením pracujícím na principu mobilních hmotnostních spektrometrů. Příklady stávajících (bio)senzorů pro detekci zpuchřujících otravných látek jsou shrnuty v tab. I. Petetin a spol.³⁸ použili senzor SnO₂ pro detekci par thiodiglykolu, strukturního analogu yperitu. Princip senzoru spočívá v interakci mezi redukující molekulou a povrchem senzoru z SnO₂, která vede k dočasnému vzrůstu vodivosti. Tyto interakce jsou závislé na teplotě senzoru, která může dosáhnout až 600 °C. Při vysokých teplotách však dochází k rozpadu thiodiglykolu na další složky, které také vyvolávají nespecifickou odezvu senzoru. Z tohoto důvodu není zmíněný typ senzoru vhodný pro detekci teplotně nestabilních sloučenin jako je thiodiglykol. Loui a spol.³⁹ vyvinuli kompaktní soubor piezorezistivních mikroramének pro detekci plynů, včetně yperitu. Každý sensorový element souboru se skládá z polymerů alkenů nanosených na jedné straně mikroraménka. Plynné analyty rychle difundují do polymerního filmu, který reverzibilně nabobtná a změni povrchové napětí, což vede k mechanickému prohnutí mikroraménka a vzniklá výchylka pak vytváří změny v piezorezistenci. Senzor umožňuje stanovení yperitu s limitem detekce 0,94 ppm, avšak s velmi nízkou selektivitou.

Detekce yperitu za pomoci biosenzorů nebyla dosud široce studována, především kvůli nedostatku vhodných biorekogničních elementů. Optický biosenzor využívající celé buňky fotosyntetizujících organismů *Chlorella* a *Nostoc* testovali Sanders a spol.⁴⁰. Biosenzor monitoroval odezvu fotosystému II na přítomnost yperitu, dibutyl sulfidu, analogu yperitu a některých nervově paralytických látek. Tento biosenzor nebyl selektivní, ani neumožnil dostatečně citlivou detekci agens.

Vyšší selektivitu stanovení zajišťuje využití biorekogničních elementů, které specificky reagují s analytem, jako jsou selektivní enzymy, protilátky nebo molekulárně vtištěné polymery (angl. molecularly imprinted polymers,

plastické protilátky). Lieske a spol.⁴¹ připravili protilátky proti sirnému yperitu. K imunizaci využili haptenu kyseliny 4-(2-chloroethyl)benzoové navázaný na hemocyanin. Specifitu protilátek pro yperit sledovali metodou ELISA. Zároveň yperit se na protilátku navázal, thiodiglykol, produkt hydrolyzy yperitu, s protilátkou neinteragoval. Boopathi a spol.⁴² připravili a charakterizovali molekulárně vtištěné polymery pro rozpoznávání yperitu. Polymery byly připraveny tvorbou pre-polymerizačního komplexu mezi monomery kyseliny metakrylové a molekulami yperitu. Poté následovala polymerizace v přítomnosti zesilovacího činidla, což vedlo k tvorbě nanoporézních polymerů. Tyto polymery byly schopny specificky rozpoznat a navázat molekuly yperitu. Skládal a spol.⁴³ připravili a testovali polyklonální a monoklonální protilátky proti sirnému yperitu. Monoklonální protilátky byly získány s použitím nosných bílkovin hovězího sérového albuminu a tyroglobulinu. Tyto protilátky pak využili v piezoelektrickém imunosenzoru pro detekci yperitu. Tento biosenzor byl testován s vysokými koncentracemi yperitu a dosahoval krátké doby odezvy a vysoké selektivity.

Pro detekci yperitu nejsou k dispozici žádné biosenzory využívající selektivní enzymovou aktivitu, protože enzymy přeměňující yperit nebyly do nedávné doby známy. Objev konverze yperitu bakteriálními enzymy halogenalkandehalogenasami (EC 3.8.1.5)⁴⁴ otvírá novou oblast vývoje biosenzorů k účinné detekci této skupiny otravných látek. Dehalogenasy izolované ze *Sphingobium japonicum* UT26 (cit.⁴⁵), *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (cit.⁴⁶) či *Mycobacterium bovis* 5033/66 (cit.⁴⁷) katalyzují hydrolyzu sirného yperitu za vzniku thiodiglykolu, chloridového iontu a protonu. Byla též pozorována slabá aktivita halogenalkandehalogenas k dusíkovým yperitům (Prokop a spol., nepublikované výsledky). Další enzymy aktivní k yperitu mohou být výhledově získány z bakterie *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968), která je schopna využívat chemický analog yperitu, 2-chlorethyl-ethylsulfid, jako jediný zdroj uhlíku a energie (štěpí vazbu C-S)⁴⁸, z basidiomycet *Coriolus versicolor* (IFO 30340) a *Tyromyces palustris* (IFO 0507), které jsou schopny degradovat bis-(2-bromoethyl)sulfid taktéž štěpením vazby C-S (cit.⁴⁹).

4. Budoucnost biosenzorů pro detekci bojových látek

Potenciál biosenzorů leží především v jejich vysoké selektivitě, kontinuální detekci analytu a finanční nenáročnosti provozu. Vysokou selektivitu stanovení může přinést použití specifických biorekogničních elementů, jako jsou enzymy a protilátky. Nové objevy přírodních katalyzátorů, enzymů, aktivních k různým otravným látkám dnes otvírají slibnou oblast vývoje biosenzorů. Účinek různých enzymů lze také snadno kombinovat bez rizika vzájemného negativního ovlivnění a umožnit tak přípravu univerzálního biosenzoru citlivého k více typům otravných látek (multienzymový biosenzor).

LITERATURA

1. *Český obranný standard 666503 – Automatické signalizátory bojových otravných látek a průmyslových škodlivin*. Ministerstvo obrany, Praha 2007.
2. Prockop L. D.: *J. Neurol. Sci.* 249, 50 (2006).
3. Balali-Mood M., Hefazi M.: *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 273, 99 (2006).
4. Patočka J., Fusek J.: *Cent. Eur. J. Public Health* 12, 75 (2004).
5. Salem H.: *Int. J. Toxicol.* 22, 465 (2003).
6. Yanagisawa N., Morita H., Nakajima T.: *J. Neurol. Sci.* 249, 76 (2006).
7. Reutler S.: *Environ. Health Perspect.* 107, 985 (1999).
8. Watson A. P.: *Exotoxicol. Environ. Saf.* 23, 328 (1992).
9. Antonijević B., Stojiljković M. P.: *Clin. Med. Res.* 5, 71 (2007).
10. Montauban C., Beqos A., Bellier B.: *Anal. Chem.* 76, 2791 (2004).
11. Eddleston M., Buckley N. A., Eyer P., Dawson A. H.: *Lancet* 371, 597 (2008).
12. Taylor P., Wong L., Radic Z., Tsigelny I., Bruggemann R., Hosea N. A., Berman H. A.: *Chem. Biol. Interact.* 119, 3 (1999).
13. Curtil C., Masson P.: *Ann. Pharm. Fr.* 51, 63 (1993).
14. Hsieh B. H., Deng J. F., Ger J., Tsai W. J.: *Neurotoxicology* 22, 423 (2001).
15. Marrs T. C.: *Pharmacol. Ther.* 58, 51 (1993).
16. Lundy P. M., Raveh L., Amitai G.: *Toxicol. Rev.* 25, 231 (2006).
17. *Koncepcie chemické služby Hasičského záchranného sboru České republiky*. Ministerstvo vnitra, Praha 2005.
18. Chauhan S., Chauhan S., D'Cruz R., Faruqi S., Singh K. K., Varma S., Singh M., Karthik V.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 113 (2008).
19. Pohanka M., Jun D., Kalasz H., Kuca K.: *Prot. Pept. Lett.* 15, 795 (2008).
20. Pohanka M., Jun D., Kuca K.: *Anal. Lett.* 40, 2351 (2007).
21. Flores F., Artigas J., Marty J. L., Valdes F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 476 (2003).
22. Arduini F., Ricci F., Tuta C. S., Moscone D., Amine A., Palleschi G.: *Anal. Chim. Acta* 580, 155 (2006).
23. Pohanka M., Hrabínová M., Kuca K.: *Sensors (Bazel)* 8, 5229 (2008).
24. Arduini F., Amine A., Moscone D., Ricci F., Palleschi G.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 1049 (2007).
25. Pohanka M., Jun D., Kuca K.: *Sensors (Bazel)* 8, 5303 (2008).
26. Pohanka M., Kuca K., Jun D.: *Anal. Lett.* 41, 2214 (2008).
27. Joshi K. A., Prouza M., Kum M., Wang J., Tang J., Haddon R., Chen W., Muschandani A.: *Anal. Chem.* 78, 331 (2006).
28. Vamvakaki V., Fournier D., Chaniotakis N. A.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 384 (2005).
29. Villatte F., Bachman T. T., Hussein A. S., Schmid R. D.: *Biotechniques* 30, 81 (2001).
30. Paliwal S., Wales M., Good T., Grimsley J., Wild J., Simonian A.: *Anal. Chim. Acta* 596, 9 (2007).
31. Zourob M., Ong K. G., Zeng K., Mouffouk F., Grimes C. A.: *Analyst* 132, 338 (2007).
32. Karnati C., Du H., Ji H. F., Xu X., Lvov Y., Muchandani A., Mulchandani P., Chen W.: *Biosens. Bioelectron.* 22, 2636 (2007).
33. White B. J., Harmon H. J.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 1977 (2005).
34. Patočka J., Bajgar J., Cabal J., Fusek J., Herink J., Kassa J., Štětina R.: *Vojenská toxikologie*. Grada Publishing, Praha 2004.
35. Saladi R. N., Smith E., Persaud A. N.: *Clin. Exp. Dermatol.* 31, 1 (2005).
36. Prokop Z., Opluštil F., DeFrank J., Damborský J.: *Biotechnol. J.* 1, 1370 (2006).
37. Kehe K., Szinicz L.: *Toxicology* 214, 198 (2005).
38. Petetin L., Berger F., Chambaudet A., Planade R.: *Sens. Actuators, B* 78, 166 (2001).
39. Loui A., Ratto T. V., Wilson T. S., McCall S. K., Mukerjee E. V., Love A. H., Hart B. R.: *Analyst* 133, 608 (2008).
40. Sanders C. A., Rodriguez M. Jr., Greenbaum E.: *Biosens. Bioelectron.* 16, 439 (2001).
41. Lieske C. N., Klopčič R. S., Gross C. L., Clark J. H., Dolzine T. W., Logan T. P., Meyer H. G.: *Immunol. Lett.* 31, 117 (1992).
42. Boopathi M., Suryanarayana M. V. S., Nigam A. K., Pandey P., Ganesan K., Singh B., Sekhar K.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 2339 (2006).
43. Skládal P., Příbyl J., Šafář B.: *Anal. Lett.* 40, 1347 (2007).
44. Prokop Z., Damborský J., Opluštil F., Jesenská A., Nagata Y. (Masarykova univerzita, Brno): WO 2006/128390 (A1).
45. Nagata Y., Miauchi K., Damborský J., Manová K., Ansorgová A., Takagi M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3707 (1997).
46. Kulakova A. N., Stafford T. M., Larkin M. J., Kulakov L. A.: *Plasmid* 33, 208 (1995).
47. Jesenská A., Pavlová M., Strouhal M., Chaloupková R., Těšínská I., Monincová M., Prokop Z., Bartoš M., Pavlík I., Rychlík I., Mobius P., Nagata Y., Damborský J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6736 (2005).
48. Kilbane J. J., Jackowski K.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 65, 370 (1996).
49. Itoh N., Yoshida M., Miyamoto T., Ichinose H., Warriishi H., Tanaka H.: *FEBS Lett.* 412, 281 (1997).
50. Pohanka M., Binder J., Kuca K.: *Def. Sci. J.*, v tisku.
51. Pohanka M., Dobes P., Drtinová L., Kuca K.: *Electroanalysis*, v tisku. DOI: 10.1002/elan.200804528 (2009).

Š. Bidmanová^{a,b}, M. Pohanka^c, J. Cabal^c, Z. Prokop^{a,b}, and J. Damborský^{a,b} (^a*Loschmidt Laboratories, Institute of Experimental Biology and National Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Brno,* ^b*Enantis Ltd., Brno,* ^c*Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Hradec Králové:*
Early Warning Biosensors for Detection of Chemical Warfare Agents

Chemical warfare agents are toxic compounds showing negative effects on living organisms. This review focuses on detection of nerve and blister agents, which are two most important classes of chemical warfare agents. Main attention is paid to the construction and use of biosensors. Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and phosphotriesterase are presented as convenient biorecognition components of biosensors for detection of nerve agents, while dehalogenases are useful for detection of mustard agents.

UNIKÁTNE ŠTRUKTÚRNE A FUNKČNÉ VLASTNOSTI A_1A_0 ATPÁZ/syntáz Z ARCHAEA

MONIKA VIDOVÁ a PETER ŠMIGÁŇ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika
monika.vidova@savba.sk

Došlo 25.11.09, prijato 25.1.10.

Kľúčové slová: Archaea, metanogény, A_1A_0 ATPáza/syntáza

Obsah

1. Úvod
2. Klasifikácia ATPáz
3. Štruktúra a funkcia A_1A_0 ATPázy/syntázy
 - 3.1. Funkcia A_1A_0 ATPázy/syntázy
 - 3.2. Spriahajúci ión
 - 3.3. Štruktúra A_1A_0 ATPázy/syntázy
 - 3.4. Vlastnosti A_1A_0 ATPázy/syntázy
4. Genetický a molekulový prístup k štúdiu A_1A_0 ATPázy/syntázy u metanoarchaea
 - 4.1. Genetický prístup u metanoarchaea
5. Záver

1. Úvod

Veľká skupina prokaryotov, ktoré sa významne odlišujú od ostatných baktérií geneticky, biochemicky a štruktúrne, bola zaradená do samostatnej vývojovej domény Archaea. Mnohé z nich žijú v extrémnych environmentálnych podmienkach – v ľudskom ponímaní, nezlučiteľných so životom: striktná anaerobióza, vysoké tlaky, teploty nad 100 °C, v hĺbkach baní či na morských dnách, v kombinácii s vysokou slanosťou morskej vody (až 5 M), v blízkosti termálnych prameňov, vulkánov, poprípade v pH rozmedzí od takmer 0 až po 11,5 (cit.¹). V súčasnosti sa ale ukazuje, že archaea sa nachádzajú aj v iných, nespočetných lokalitách biosféry.

Archaea v sebe nesú tajomstvo evolúcie, ktorého podhalenie má istú dávku atraktívnosti. Je pochopiteľné, že vedci v posledných rokoch pátrajú po týchto nezvyčajných organizmoch, po ich biochemických mechanizmoch, prvopočiatočných spôsoboch konzervácie energie, po bunkových zložkách, pomocou ktorých odolávajú uvádzaným extrémnym podmienkam. Nie je jasné, ako je chránená citlivá genetická informácia, ako sa realizujú opravy a chyby DNA, keď po 3,5 miliardách rokov v takých ex-

trémnych podmienkach si uchovávajú svoje unikátne vlastnosti.

Z bioenergetického hľadiska nachádzame u týchto mikroorganizmov okrem substrátovej fosforylácie a chemiosmózy nové unikátne formy konzervácie energie², ktoré nám podhaľujú bioenergetické princípy a mechanizmy vznikajúce v počiatočných fázach života. Ústredným enzýmom bunkovej bioenergetiky je aj u Archaea, ktoré patria medzi najstaršie organizmy na Zemi (najnovšie poznatky v tomto smere odhadujú ich vek na 3,5–3,8 miliardy rokov)^{3,4}, podobne ako u baktérií a eukaryotov – enzým ATP syntáza. Archaeálna ATPáza reprezentuje novú triedu ATPáz – A_1A_0 ATPázu. V tejto práci sa zameriame na popisovanie súčasných poznatkov o štruktúre a funkcii A_1A_0 ATPáz u Archaea, ale obzvlášť sa zameriame na popisovanie tohto enzýmu u metanogénov. Poznávanie tohto enzýmu obohacuje naše poznatky o evolúcii bioenergetických systémov, ale zároveň otvára možnosti na poznávanie molekulových mechanizmov fungovania ATP syntázy. Všetky tieto poznatky okrem teoretických prínosov vytvárajú nový potenciál pre moderné biotechnológie a nanotechnológie budúcnosti.

2. Klasifikácia ATPáz

Molekuly ATP patria medzi centrálné komponenty energetického metabolizmu ako univerzálne energetické platidlo všetkých typov buniek – Archaea, Prokaryoty a Eukaryoty. Podstatné množstvo ATP je v bunkách tvorené ATP syntázami. Tieto enzýmy sú multisubjednotkové, membránovo viazané komplexy, ktoré sa vyskytujú u všetkých foriem života a reprezentujú najdôležitejšie bioenergetické enzýmy buniek. Reakcia katalyzovaná ATP syntázou je reverzibilná a smer reakcie je kontrolovaný termodynamicky.

Pederson a Carafoli v roku 1987 na základe štruktúrnych a funkčných kritérií kategorizovali protón-translokujúce ATPázy do troch skupín: P-ATPáza, V-ATPáza a F-ATPáza (cit.⁵). V 90. rokoch minulého storočia bola do tejto skupiny ATPáz zaradená aj novo objavená ATPáza. Napriek podobnostiam sa nedala jednoznačne priradiť ani k jednému z už klasifikovaných typov ATPáz. Z tohto dôvodu bola vytvorená nová trieda ATPáz, nesúca pomenovanie podľa organizmov, v ktorých sa nachádza, teda archaeálna A-ATPáza (cit.⁶). Pre úplnosť v krátkosti spomenieme základné črty jednotlivých typov ATPáz/syntáz.

F-ATPáza/syntáza využíva elektrochemický potenciál H^+ iónov ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) alebo Na^+ iónov ($\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$) na poháňanie syntézy ATP. Na druhej strane je schopná pracovať reverzibilne a využiť energiu hydrolýzy ATP na vytváranie elektrochemického gradientu protónov alebo sodných ió-

nov. Nachádza sa v cytoplazmatickej membráne väčšiny baktérií, a u eukaryotov na vnútornej membráne mitochondrií a v tylakoidných membránach chloroplastov.

V-ATPáza, na rozdiel od F-ATPázy, počas evolúcie stratila schopnosť syntetizovať ATP a energiu z hydrolyzy ATP využíva na vytvorenie strmého iónového gradientu (najmä H^+) cez membránu. Vzniknutý elektrochemický potenciál sa využíva na poháňanie transportu rôznych živín, využíva sa pri rozličných aktivitách v endomembránach, vedie k aktivácii hydrolytických enzýmov v lyzozómoch⁷. Možno ju nájsť v eukaryotických vakuolách, najmä vo vakuolách rastlín a húb (podľa toho nesie pomenovanie – vakuolárna V-ATPáza), taktiež bola nájdená u niektorých baktérií a archaea.

P-ATPáza patrí do veľkej rodiny transmembránových púmp. Ide o široko distribuovaný membránový enzým v rámci celého fylogenetického stromu, ktorý efektívne premieňa energiu hydrolyzy ATP do elektrochemického iónového gradientu. Tento typ ATPáz sa podieľa na poháňaní transmembránového pohybu širokej škály anorganických iónov ako sú: H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , prípadne ióny kovov: Cu, Zn, Pb, Ag. Okrem toho niektoré P-ATPázy sa podieľajú na transporte lipidov⁸. Označenie P-ATPáza odráža molekulový mechanizmus práce tohto enzýmu, pri ktorej vzniká vysoko-energetický aspartylfosfoenzýmový medziprodukt (phosphoryl-enzyme intermediate) a svojou štruktúrou sa výrazne odlišuje od ostatných ATPáz⁹.

Poznatky o týchto ATPázach/syntázach sú už mnohonasobne popísané v moderných učebniciach biochémie, kde sú sprevádzané veľmi dobrou, farebnou i grafickou vizualizáciou. Navyše, na internete je možné nájsť aj animácie, ktoré umožňujú získať predstavu o molekulových mechanizmoch tvorby ATP^{10,11}.

Následne sa sústredíme hlavne na analýzu poznatkov, ktoré sa dotýkajú archaeálnej A_1A_0 ATPázy/syntázy.

3. Štruktúra a funkcia A_1A_0 ATPázy/syntázy

Napriek veľkej variabilite a zároveň unikátnosti energie konzervujúcich mechanizmov u Archaea, podieľajúcich sa na energizácii membrán, majú tieto mechanizmy jednu membránovú komponentu spoločnú. Je to archaeálna ATPáza/syntáza, ktorá má kľúčové postavenie v bunkovej bioenergetike. Predpokladalo sa, že aj archaea ATP syntáza bude vykazovať špecifické, ale hlavne rozdielne vlastnosti od prokaryotov a eukaryotov. Už počiatočné štúdiá naznačili na rozdielnosť archaeálnej ATP syntázy od F- a V-typov ATPáz. Z týchto dôvodov bola, ako už bolo vyššie uvedené, vytvorená nová skupina – A_1A_0 ATPáz/syntáz.

Archaeálna A-ATPáza bola popísaná ako energiu premieňajúca, s blízkym vzťahom k vakuolárnej V-ATPáze, vyšších eukaryotov, ako aj k F-ATPázam, vyskytujúcich sa v eubaktériách, mitochondriách a chloroplastoch. A-ATPáza využíva ako spriahajúci ión H^+ , prípadne Na^+ ión, a je zložená z 10 podjednotiek ($A_3 : B_3 : C : D :$

$E : F : G : H : I : K_x$), pričom aktuálna stechiometria podjednotky K je závislá od organizmu ($x = 12, 6, 4$ alebo iba 1)¹². Vzhľadom k štruktúrnym poznatkom, podjednotkovému zloženiu a aminokyselinovej sekvencii sa viac podobá na V-ATPázu. Na druhej strane, na základe schopnosti pracovať ako ATP syntáza a syntetizovať bunkové ATP, za využitia iónového gradientu, sa funkčne podobá na F-ATPázu¹³. Nakoľko ATPáza/syntáza z metanoarchaea patrí medzi najpreskúmanejšie z hľadiska A_1A_0 ATPáz/syntáz a zároveň metanoarchaea sú najpočetnejšia skupina Archaea, zameriame sa na analýzu tohto enzýmu hlavne u týchto mikroorganizmov.

3.1. Funkcia A_1A_0 ATPázy/syntázy u metanoarchaea

Je známe, že tvorba metánu nie je spojená so substrátovou fosforyláciou, ale s fosforyláciou poháňanou iónovým gradientom. Práce Blauta a Gottschalka poskytli prvý dôkaz pre prítomnosť chemiosmotického mechanizmu v procese konzervácie energie u metanogénov¹⁴. Títo autori preukázali postupnú sekvenciu udalostí pri tvorbe elektrochemického potenciálu protónov, metánu a ATP u buniek *Methanosarcina berkeri*. Ich experimentálne výsledky jasne ukazujú poradie udalostí a to: metanogéniza \rightarrow tvorba elektrochemického potenciálu $\mu_{H^+} \rightarrow$ syntéza ATP; z čoho vyplýva, že ATP u metanogénov je tvorené chemiosmotickým mechanizmom, a že A-ATP syntáza je pravdepodobne zodpovedná za tvorbu ATP aj u týchto mikroorganizmov^{13,14}.

Kompletné génové sekvencie metanogénov naznačujú na prítomnosť génov kódujúcich len A-ATPázu. Keďže fosforylácia poháňaná elektrochemickým gradientom iónov je jediná cesta pre tieto organizmy ako syntetizovať ATP (sú striktné chemiosmotické)¹⁵, je to veľmi dôležitý indikátor, že A-ATPáza pracuje ako ATP syntáza *in vivo*. Zo získaných experimentálnych údajov možno konštatovať, že purifikované A-ATPázy, vrátane A-ATPázy/syntázy z metanoarchaea, sú veľmi nestabilné. Doposiaľ používané izolačné a purifikačné metódy viedli k izolácii nekompletných enzýmov a izolovaný enzým je nestabilný. Len nedávno sa podarilo izolovať a purifikovať A_1A_0 ATP syntázu z termofilu *Methanocaldococcus jannaschii*¹⁶. Napriek tomu sa tento enzým nepodarilo využiť pre rekonštitúciu do lipozómov, nakoľko tieto sú pri teplote 80 °C nestabilné.

Získať priamy experimentálny dôkaz o tom, že archaeálna ATPáza je skutočne ATP syntáza, bolo komplikované. V roku 2007 sa v laboratóriu prof. Müllera podarilo vyvinúť molekulárnu stratégiu umožňujúcu nadprodukcii A_1A_0 ATPázy/syntázy vo funkčnom stave v *Escherichia coli*. Tento experimentálny prístup otvoril možnosti pre štúdium biochemických vlastností tohto enzýmu¹⁷.

3.2. Spriahajúci ión

Mechanizmus energetického spriahnutia u Archaea nie je doposiaľ jasný. Existuje určitá neistota o spriahajúcom ióne, ktorý metanoarchaeálna A-ATPáza

využíva. Nakoľko sú metanogény striktné závislé na Na^+ iónoch a v priebehu metanogenézy vytvárajú $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ a $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ súčasne, bola navrhnutá hypotéza, že oba tieto gradienty môžu byť priamo využívané na poháňanie tvorby ATP A-ATPázou/syntázou. Experimentálne údaje podporujúce túto hypotézu boli získané u viacerých metanoarchaea: Müller a spol.^{18–20} a Šmigáň a spol.²¹. Pre ťažkosti získať celistvý, purifikovaný enzým nebola iónová špecificita A-ATPázy/syntázy doteraz jednoznačne určená. Meta-noarchaea sú jediné mikroorganizmy, ktoré produkujú dva primárne, elektrochemické gradienty, sodný $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ a protónový $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, paralelne. Z týchto dôvodov sa metanogény musia vysporiadať s problémom, ako využiť oba gradienty pri syntéze bunkového ATP. Jedna z predstáv uprednostňuje mechanizmus, v ktorom $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ vytváraný metyltransferázovou reakciou je konvertovaný prostredníctvom Na^+/H^+ antiportera na $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, a ten sa následne využíva na poháňanie syntézy ATP prostredníctvom H^+ - A_1A_0 ATPázy/syntázy. Otázka, či existuje jedna A-ATPáza, ktorá vie využívať oba gradienty $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ a $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ súčasne, a môže meniť špecificitu podľa stavu a dostupnosti toho-ktorého iónu alebo má špecificitu iba pre jeden ión (H^+ alebo Na^+) a kooperuje s Na^+/H^+ antiporterom, je napriek veľkému úsiliu stále otvorená.

Otvára sa niekoľko ďalších otázok, ktoré doposiaľ neboli vyriešené. U Archaea organizmov boli v genóme nájdené génové klastre pre F-ATPázu, hoci sa nepotvrdila ich syntéza. Zo štúdií s F-ATPázou je známe, že modifikácii iba niekoľkých aminokyselín sa zmení iónová špecificita tohto enzýmu. Taktiež by mohli v teoretickej rovine na membráne existovať až dve A-ATPázy (jedna pre H^+ , druhá pre Na^+), hoci na základe experimentálnych dát sa od tejto hypotézy upúšťa. Nedávno bol v genóme *Methanothermobacter thermoautotrophicus* medzi neznámymi proteínmi anotovaný Na^+/H^+ antiporter a taktiež bol na proteolipide u niektorých A-ATPáz nájdený väzbový motív pre Na^+ ión¹⁸. Komplexnosť tohto problému je dôvodom, prečo sa ho nepodarilo doposiaľ vyriešiť.

Protón-translokujúca ATPáza/syntáza je vo všeobecnosti prezentovaná ako evolučne primárna forma tohto enzýmu, zatiaľ čo Na^+ -translokujúca ATPáza/syntáza niektorých prokaryotov je zvyčajne predstavovaná ako exotická adaptácia na prežitie v drsných enviromentálnych podmienkach. Detailným štúdiom štruktúry F- a V-typu ATPáz, ich podjednotkového zloženia a porovnaním fylogenetických analýz sa dostáva do popredia nová hypotéza. Táto hypotéza poukazuje na evolučné vzťahy medzi protón- a sodík-translokujúcimi ATPázami/syntázami. Naznačuje, že Na^+ -translokujúce ATPázy sa vyskytujú síce ojedinele, no využitie Na^+ gradientu pre syntézu ATP prostredníctvom Na^+ -translokujúcej ATPázy predstavuje najstaršiu formu membránovej bioenergetiky. Je pravdepodobné, že prapôvodná, pre Na^+ nepriepustná membrána, ale priepustná pre H^+ , obsahujúca sadu Na^+ -transportných enzýmov, bola evolučným predchodcom štruktúrne zložitejšej membrány, nepriepustnej pre H^+ . Využívanie H^+ , ako spriahajúceho iónu, sa zdá byť evolučne mladšou inováciou²².

Odpoveď ohľadne iónovej špecificity A-ATPázy ostáva zatiaľ otvorená. Nie je však vylúčené, že ako H^+ tak aj Na^+ môžu v doméne Archaea slúžiť ako spriahajúce ióny.

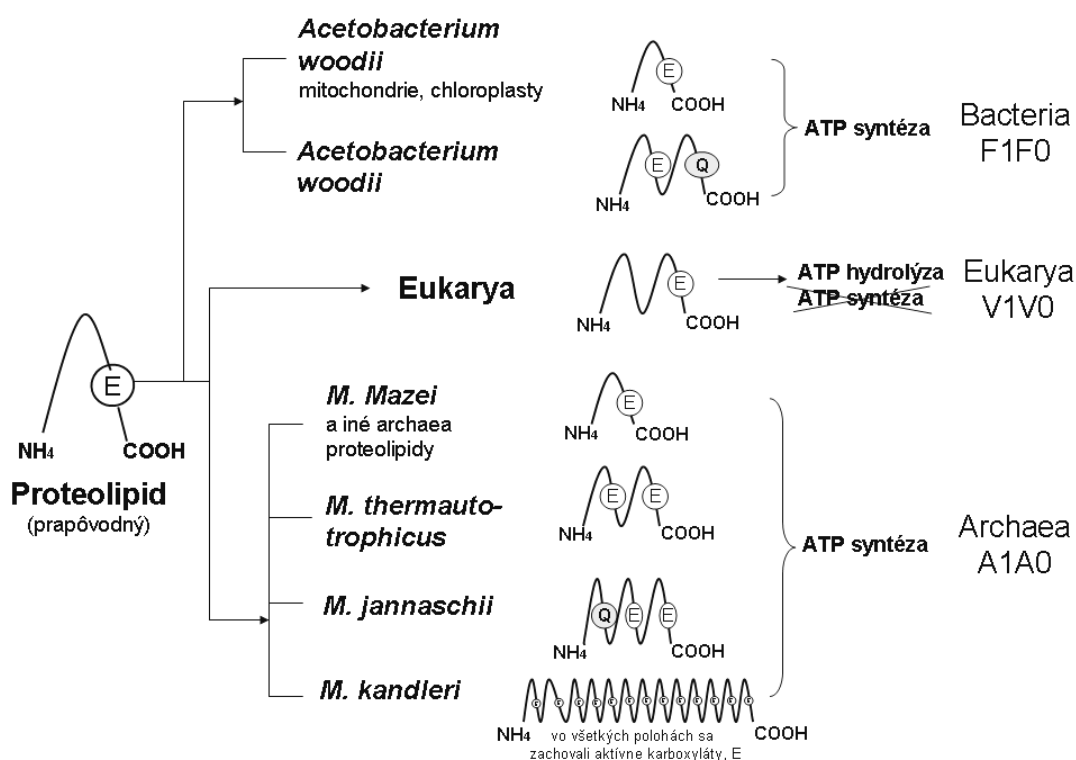
3.3. Štruktúra A_1A_0 ATPázy/syntázy

Sekvenčné analýzy ukazujú, že V-, F- a A-ATPázy sú homológické, a že sa vyvinuli zo spoločného, prapôvodného génu, tzv. progénu. Z týchto dôvodov A-ATPáza/syntáza zdieľa vlastnosti jednak eukaryotických V_1V_0 ATPáz a F_1F_0 ATP syntáz (prítomných v baktériách, chloroplastoch a mitochondriách). Tento enzým má morfológicky, podobne ako ATPázy F- a V-typu, 2 hlavné časti: membránovo-viazanú časť A_0 , ktorá tiež obsahuje iónový kanál pre transportovaný ión, časť A_1 exponovanú do cytoplazmy. Obe časti sú prepojené spojovacou časťou, tzv. „stopkou“.

Membránová A_0 doména

Na rozdiel od F- a V-typu ATPáz, obsahuje iba dve podjednotky označované I a K. Molekulová hmotnosť podjednotky I sa pohybuje v rozmedzí 72–76 kDa a je veľmi podobná podjednotke *a* V-ATPázy. Obsahuje hydrofilný N-terminálny a hydrofóbny C-terminálny koniec. U hydrofilnej N-terminálnej časti sa predpokladá, že je vysoko α -helikálna a funkčne podobná podjednotke *b* F-ATPázy. Hydrofóbná C-terminálna časť podjednotky I má sedem transmembránových helixov a u tejto časti je predpoklad, že je funkčne podobná *a* podjednotke V-/F-ATPázy. V podjednotke I je zachovaný arginínový aminokyselinový zvyšok, ktorý je nositeľom kladného náboja v A_0 časti a je predpoklad, že tento arginínový zvyšok je esenciálny pre translokáciu spriahajúceho iónu. Jeho lokalizácia sa môže vzhľadom na organizmus odlišovať¹⁹.

Druhá podjednotka A_0 domény je podjednotka K, pre svoje hydrofóbne vlastnosti je označovaná ako proteolipid. Proteolipidy z metanoarchaea sú vo všeobecnosti vzájomne veľmi podobné (do 50 %) a taktiež zdieľajú identitu s inými archaea proteolipidmi. Až do 33 % sú podobné s bakteriálnymi a eukaryotickými proteolipidmi V-ATPáz. Purifikované a charakterizované proteolipidy z niektorých archaea, takmer vo všetkých prípadoch, vykazovali molekulovú hmotnosť približne 8 kDa a štruktúrne tvorili 2 transmembránové helixi¹⁹. Navyše aj genómová sekvenácia u archaea predpokladá 8 kDa proteolipid. Spomínaná 8 kDa veľkosť proteolipidu z archaea organizmov korešponduje s veľkosťou proteolipidu z F-ATPázy a predpokladalo sa, že práve táto skutočnosť je zodpovedná za to, že A-ATPáza vykazuje funkčné vlastnosti F-ATPázy, čím sa myslí hlavne na jej funkciu ATP syntázy. Ďalšie štúdium ukázalo, že enzymatická schopnosť A-ATPázy syntetizovať ATP nesúvisí s veľkosťou proteolipidu, ale s počtom protonizovateľných skupín pripadajúcich na proteolipid. F-ATPáza má 12, A-ATPáza z *M. jannaschii* 8 a V-ATPáza len 6 protonizovateľných skupín pripadajúcich na *c* subjednotku. Toto v prepočte znamená, že u V-ATPázy majú iba 2 protonizovateľné skupiny na katalytické centrum. Takéto množstvo je ale nedostatočné na to,



Obr. 1. Rôznosť proteolipidov (c, K subjednotiek) u ATPáz¹⁸. V priebehu evolúcie došlo k duplikácii až triplikácii proteolipidu u niektorých ATPáz. V obrázku sú vyznačené aktívne karboxyláty podieľajúce sa na transporte protónov. Písmeno E označuje kyselinu glutámovú, písmeno Q označuje glutamín. Substitúcia Q za E predstavuje stratu väzbového miesta pre protón. Glutamín sa na prenosu H⁺ nemôže podieľať

aby V-ATPáza katalyzovala syntézu ATP. Na druhej strane ale V-ATPáza umožňuje vytvoriť značný protónový gradient (funkčná vlastnosť V-ATPázy), ktorého tvorba je poháňaná hydrolýzou ATP¹⁴.

V priebehu evolúcie došlo u ATPáz, síce v rozsahu celého fylogenetického stromu, no len u niektorých organizmov, k duplikácii a triplikácii (u *Methanopyrus kandleri* až k polyplikácii) proteolipidu²³, príklad je uvedený na obr. 1. Je tu ilustrovaný v prírode ojedinelý typ Na⁺-F₁F₀ ATPázy z *Acetobacterium woodii*, je to zatiaľ jediná objavená ATPáza s danými vlastnosťami. Táto ATPáza obsahuje vo svojom rotore zmes c podjednotiek – typu F₀ a typu V₀ a na základe bunkovej potreby je schopná prepínať medzi syntézou a hydrolýzou ATP²⁵.

Jednou zo zaujímavých črt A-ATP syntázy je, že so spomínanou duplikáciou či triplikáciou proteolipidu sa automaticky nezachoval počet väzbových miest pre translokujúci protón na subjednotke c. V priebehu evolúcie došlo k substitúcii aktívneho karboxylového zvyšku kyseliny glutámovej (E, Glu), podieľajúcej sa na väzbe a translokácii protónu, na glutamínový zvyšok (Q, Gln), ktorý už nemôže viazať H⁺. Počet väzbových miest pre translokujúci H⁺ na subjednotke c závisí od daného organizmu. U *M.*

thermautotrophicus došlo k duplikácii a väzbové miesto je zachované na druhom a štvrtom helixe, ale u *M. jannaschii* (triplikácia) je väzbové miesto zachované iba vo štvrtom a šiestom helixe, pretože v druhom helixe sa vyskytuje vo väzbovom mieste spomínaná glutamínová substitúcia²³ (obr. 1).

Popísané proteolipidy sú v membráne zoskupené a tvoria rotor A-ATPázy, podobne ako to bolo preukázané u F- a V-ATPáz. U väčšiny archaea sa často vyskytuje vzájomné zoskupenie 12 proteolipidov, u *M. thermotrophicus* a pyroccocov je to len 6 kópií a 4 kópie u *M. jannaschii*. Počet podjednotiek závisí od teploty rastu daného organizmu a platí, že čím je teplota rastu vyššia, tým je počet podjednotiek proteolipidu, ktoré tvoria rotor, nižší. Na druhej strane, s rastúcou teplotou stúpa počet kovalentných väzieb medzi podjednotkami a zvyšuje sa stabilita a funkcia v cytoplazmatickej membráne^{23,24} (obr. 2).

Cytoplazmatická A₁ doména

Obsahuje katalytické miesta pre ATP/ADP a má pseudo-hexagonálne usporiadanie podjednotiek A a B. Toto usporiadanie bolo navrhnuté pomocou elektrónmik-

vysvetľujú existenciu spoločného, dávneho progénu, ktorý tvoril základ pre evolučnú diferenciáciu jednotlivých ATPáz²⁵.

Sekvenčné porovnávanie génov jednotlivých ATPáz však poukázali na veľké nezhody medzi podjednotkami spojovacích stopiek. Na základe týchto homologických šablón sa do popredia dostáva domienka, že pozícia centrálnej spojovacej stopky bola v prvopočiatkoch evolúcie obsadená translokujúcim polymérom, a ten bol v najväčšej miere pozmenený v priebehu evolúcie²⁶.

3.4. Vlastnosti A₁A₀ ATPázy/syntázy

Štúdium tohto enzýmu je komplikované pre problémy spojené s jeho purifikáciou a problémy získať ho v kompletnom podjednotkovom zložení a v dostatočnom množstve. Napriek tomu inhibičné a funkčné mechanizmy sledované v natívnych podmienkach v kooperácii

s poznatkami s izolovaným enzýmom podávajú čiastočný obraz o tomto enzýme.

Všetky doposiaľ preštudované ATPázy metanogénov majú pH optimum približne okolo 5,0–5,2. Výnimkou je enzým z *Methanosarcina thermophila* a *Methanocaldococcus jannaschii*, ktoré majú optimum pH 7,0. Hydrolyzujú substráty v preferencii ATP > GTP > ITP > TTP > UTP > CTP. Sú stimulované dvojmocnými kationmi Mg²⁺ a Mn²⁺, ale nie Na⁺ iónmi. Sulfidy, glycerol a etanol stimulujú ich enzýmovú aktivitu¹⁹.

Pre pochopenie molekulových mechanizmov ATPáz vyskytujúcich sa u Archaea sa našiel a využíva sa celý rad inhibítorov. Archaeálne ATPázy sa značne líšia citlivosťou k inhibítorom ATPáz prokaryotov a eukaryotov. V tomto sa môže odrážať práve ich rozdielna primárna štruktúra. Pre utvorenie si obrazu o inhibítoroch, ktoré sa používajú pri štúdiu A-ATPázy/syntázy, a ostatných ATPáz, je priložená prehľadná tabuľka I známych inhibítorov spolu s popísaným spôsobom inhibície^{7,28}.

Tabuľka I
Prehľadná tabuľka známych inhibítorov ATPáz^{7,28}.

| Typ ATPázy | Inhibitor ^a | Spôsob inhibície |
|------------|---|--|
| V-ATPáza | NEM | špecifický inhibítor V-ATP viažuci sa na cysteinové zvyšky podjednotky A (viaže nukleotid) a pôsobí ako sférická prekážka |
| | NBC-Cl, azido-ATP | štruktúrny analóg ATP |
| | DCCD | reaguje s proteolipidom (karboxylová skupina kys. glutámovej), blokácia transportu protónu |
| | DES | inhibuje membránovo-viazanú časť |
| | ADP, exogénne fosforečnany | kompetitívna a nekompetitívna inhibícia ATP-hydrolyzy |
| | NO ₃ ⁻ | oxidačný efekt, chaotropná látka, spôsobuje vzájomné oddelenie V ₁ a V ₀ častí, inhibuje membránovo-viazanú časť (IC ₅₀ 40mM) |
| | bafilomycín A1 dinukleotidy VO ₃ ⁻ , triton, alkylové zlúčeniny, makrolidové antibiotiká: bafilomycín, konkanamycín | špecifický inhibítor alosterická inhibícia |
| F-ATP | Oligomycín, alkylové zlúčeniny azid sodný DCCD | odpojovač, inhibuje cytochrómoxidázu obdobne ako u V-ATP reaguje s proteolipidom, blokácia transportu protónu |
| | NO ₃ ⁻ , VO ₃ ⁻ | oxidačný efekt, chaotropná látka |
| | DES | inhibuje membránovo-viazanú časť |
| | P-ATP | VO ₃ ⁻ azidy, ouabain |
| A-ATP | NO ₃ ⁻ bafilomycín A, DCCD, DES | inhibícia cytoplazmatickej časti inhibuje membránovo-viazanú časť |

^aNEM – *N*-etylmaléinimid, NBC-Cl – 4-chlor-7-nitrobenzofurazán, DCCD – *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid, DES – dietylstilbestrol

Vo všeobecnosti je A-ATPáza necitlivá k azidu, oligomycínu a vanadičnanu. Na druhej strane ju inhibuje N,N' -dicyklohexylkarbodiimid (DCCD), bafilomycín, dietylstilbestrol (DES) a dusičnany.

Metanoarchaeálna A-ATPáza je inhibovaná bafilomycínom A_1 , ale v koncentráciách o tri poriadky vyšších, ako sú potrebné pre inhibíciu V_1V_0 -ATPázu.

Dusičnany pri vysokých koncentráciách môžu pôsobiť ako chaotropné látky. Majú podobný účinok ako detergenty a spôsobujú oddelenie cytoplazmatickej – hydrofilnej A_1 od membránovej – hydrofóbnej A_0 časti. Vzhľadom k tomu, že dusičnany môžu fungovať ako oxidačné činidlo, môžu v A-ATPáze oxidovať –SH skupiny enzýmu. To samozrejme môže ovplyvniť aktivitu enzýmu, hlavne, ak sú –SH skupiny prítomné v katalytickom mieste, resp. v jeho blízkosti. To je možné práve u halobakteriálnej A_1A_0 -ATPázy, ktorá obsahuje cysteínové zvyšky v blízkosti katalytického miesta na podjednotke A. Za vhodných podmienok dusičnany môžu interagovať s ktoroukoľvek podjednotkou podieľajúcou sa na prenose iónu, resp. samotného rotačného momentu a tým znížiť aktivitu enzýmu²⁷.

Metanoarchaeálna A_1A_0 -ATPáza nie je inhibovaná N -etylmaleinidom (NEM), zatiaľ čo halobakteriálna A_1A_0 -ATPáza je. Túto odlišnosť možno pripísať rozdielnej primárnej štruktúre týchto ATPáz. Podjednotka A halobakteriálnej A_1A_0 -ATPázy obsahuje dosť cysteínových zvyškov v blízkosti katalytického miesta, na rozdiel od metanoarchaeálnej A_1A_0 -ATPázy, ktorá ich neobsahuje¹⁹.

4. Genetický a molekulový prístup k štúdiu ATPázy/syntázy u metanoarchaea

Pre hlbšie a detailnejšie poznanie biochemických a molekulových mechanizmov syntézy ATP u metanoarchaea sa okrem klasických biochemických metód, genetických metód (izolácia spontánnych alebo mutagénom indukovaných mutáncií), využíva prístup založený na metódach molekulovej biológie.

4.1. Genetický prístup u metanoarchaea

Systematický genetický prístup k štúdiu transformácie energie u baktérií a kvasiniek priniesol celý rad významných zistení a vysvetlení molekulových mechanizmov syntézy ATP. U metanoarchaea sme genetický prístup k riešeniu týchto problémov zaviedli v našom laboratóriu v roku 1997. Zistenia, že je možné pripraviť u *M. thermotrophicus* ΔH mutantov so zmenami v systémoch transformácie energie, umožnili aplikáciu metód a techník bakteriálnej genetiky (za striktno anaeróbných podmienok) na štúdium A-ATPázy/syntázy.

V rámci genetického prístupu k štúdiu A_1A_0 -ATPázy/syntázy u metanoarchaea sa v našom laboratóriu podarilo pripraviť niekoľko spontánnych mutantov kmeňa *M. thermotrophicus* ΔH rezistentných k relevantným inhibítorom súvisiacich s transformáciou energie: N,N' -di-

cyklohexylkarbodiimidu (DCCD)²⁹, harmalínu, tributylcín chloridu (TBT)³⁰, neomycínu³³, dusičnanom, 3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilidu (TCS)^{34,35}, amiloridu³⁷. Ide o sériu mutantov, u ktorých sa na základe použitých inhibítorov predpokladalo, že došlo k léziám v dvoch hlavných membránovo-viazaných enzýmových komplexoch, ktoré sa významne podieľajú na bioenergetických procesoch. Ide o enzýmové komplexy: A-ATPázy a Na^+/H^+ -antiporter. Štúdium týchto mutantov už prinieslo celý rad zaujímavých výsledkov dotýkajúcich sa transformácie energie u metanoarchaea^{29,30,32–35}.

Získané experimentálne výsledky potvrdili naše predpoklady a analýzy vyizolovaných mutantov ukázali (okrem iného), že niektoré majú zmeny v ATPázovom systéme. Z tohto hľadiska treba spomenúť hlavne TBT mutant, ktorý pri detailnejšom štúdiu vykazoval zmeny citlivosti oproti divému kmeňu v ATPázových systémoch aj v procese metanogenézy. Toto naznačovalo, že došlo u TBT rezistentného mutantu k zmene v A_1A_0 -ATPázovom operóne a táto zmena by mohla byť zodpovedná za danú rezistenciu. Sekvenácia kompletnej A_1A_0 -ATPázovej operóny u TBT rezistentného mutantu odhalila tri mutačné zmeny v dvoch podjednotkách A_1A_0 -ATPázy. A to v podjednotke A – Val₃₃₈Ala a v podjednotke B – Leu₂₅₂Ile a Ser₂₉₃Ala. Tieto výsledky implikujú, že za zmeny senzitivity TBT-rezistentného mutantu sú zodpovedné mutačné substitúcie v A_1A_0 -ATP syntázovom operóne³⁰.

Aj iný selektívny inhibítor ATPáz, DCCD, sa ukázal ako extrémne cenný pri dešifrovaní komplexnosti syntézy ATP. U viacerých metanogénov je ATPáza tiež ihibovaná týmto inhibítorom. Z týchto dôvodov sme predpokladali, že mutant rezistentný k DCCD by mohol mať pozmenenú A_0A_1 ATP syntázu, čo by ponúkalo potenciálny experimentálny nástroj pre štúdium tohto enzýmového komplexu aj u metanogénov. Prekvapujúco, mutant rezistentný k DCCD nevykazoval zmeny v štruktúrnych génoch (atp) pre A_0A_1 ATP syntázu. Experimentálne údaje získané pri štúdiu DCCD rezistentného kmeňa naznačujú, že DCCD rezistencia je dôsledkom zvýšenej exprese A_0A_1 ATP syntázy. Z tohto je možné usudzovať, že za rezistenciu k DCCD sú zodpovedné gény podieľajúce sa na regulácii exprese A_0A_1 ATP syntázy²⁹. Ukazuje sa, že systematický genetický prístup k problémom konzervácie energie u metanoarchaea môže byť veľmi nápomocný, tak ako to je u baktérií a kvasiniek.

Tieto štúdiá tiež otvárajú cestu k pochopeniu evolúcie membránových ATPáz/syntáz a pomáhajú porozumieť evolúcii bioenergetických systémov. Zároveň otvára nové pohľady na evolúciu samotných biologických membrán, ktorá bola kooperačným procesom tak bioenergetických systémov, ako aj lipidickej dvojvrstvy a membránových proteínov^{26,31}.

5. Záver

V poslednom období bol zaznamenaný obrovský pokrok v poznávaní štruktúry, funkcie a molekulových mecha-

nizmov kľúčového enzýmu ATPázy/syntázy, ktorý je zodpovedný za syntézu ATP v bakteriálnej cytoplazmatickej membráne, vo vnútornej mitochondriálnej membráne a v membráne tylakoidov v chloroplastoch. Poznávanie bioenergetických mechanizmov tvorby bunkového ATP u Archaea, ktoré žijú z hľadiska človeka v extrémnych podmienkach, ukázalo celý rad významných odlišností tvorby bunkového ATP. Cieľom tohto prehľadného článku je poukázať na progres, ktorý bol dosiahnutý pri štúdiu archaeálnej A_1A_0 ATPázy/syntázy. Experimentálne zistenia získané pri štúdiu A_1A_0 ATPázy/syntázy jednoznačne preukázali, že A_1A_0 ATPáza/syntáza reprezentuje novú skupinu ATPáz, nakoľko sa výrazne odlišuje od F_1F_0 ATPáz a V_1V_0 ATPáz. A_1A_0 ATPázy/syntázy boli doposiaľ najlepšie preštudované u metanoarchaea. Tieto štúdie ukázali, že A_1A_0 ATPázy/syntázy sú zložené z dvoch domén, ktoré pracujú ako dva rotačné motory a sú spojené prostredníctvom dvoch stopiek – centrálnej a periférnej, podobne ako u F_1F_0 ATPáz. U Archaea je A_0 doména odlišná a jej zloženie, ktoré je variabilné, závisí od rastových podmienok. Práce, ktoré sa sústreďujú na poznávanie tohto enzýmu, poskytujú celú radu nových poznatkov súvisiacich so štruktúrou a molekulovými mechanizmami funkcie tohto enzýmu. Napriek veľkému pokroku pri štúdiu A_1A_0 ATPázy/syntázy, molekulové mechanizmy tvorby bunkového ATP prostredníctvom tohto enzýmu zostávajú nevyjasnené. Je dôležité zdôrazniť, že tieto štúdia otvárajú nové pohľady na tvorbu ATP u extrémne starých mikroorganizmov, ktoré obývajú našu planétu približne 3,5 miliardy rokov, ale aj sprístupňujú pochopenie evolúcie kľúčového bioenergetického enzýmu – ATPázy a umožňujú nazrieť na prvotné procesy života týchto organizmov a ich energiu konzervujúce mechanizmy.

LITERATÚRA

1. http://books.google.sk/books?id=j71AYPZick4C&pg=PA24&lpg=PA24&dq=pH+scale+of+living+Archaea&source=bl&ots=Ah5clb2_EY&sig=daq7J3NU0-N0a02PARsOwG-P2kH0&hl=sk&ei=tbmfSuegLouknQPb0cXNDw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2#v=onepage&q=pH%20scale%20of%20living%20Archaea&f=false, stiahnuté 3. 9. 2009.
2. Thauer R. K., Kaster A.-K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R.: *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 579 (2008).
3. <http://www.biologyreference.com/Ar-Bi/Archaea.html>, stiahnuté 3. 9. 2009.
4. http://en.wikipedia.org/wiki/Archaea#Origin_and_evolution, stiahnuté 3. 9. 2009.
5. Pedersen P. L., Carafoli E.: *Trends Biochem. Sci.* 12, 186 (1987).
6. Fox G. E., Pechman K. R., Woese C. R.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 44 (1977).
7. Finbow E., Herrison M.: *J. Biochem.* 324, 697 (1997).
8. Puts C. F., Holthuis J. C. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 603 (2009).
9. Scarborough G. A.: *J. Exp. Biol.* 203, 147 (2000).
10. <http://www.youtube.com/watch?v=3y1dO4nNaKY&feature=related>, stiahnuté 3.9.2009.
11. <http://www.youtube.com/watch?v=uOoHKCMAUMc>, stiahnuté 3. 9. 2009.
12. Roth R., Bachofen R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1201, 271 (1994).
13. Blaut M., Gottschalk G.: *J. Biochem.* 141, 217 (1984).
14. Grüber G., Wieczorek H., Harvey W., Müller V.: *J. Exp. Biol.* 204, 2597 (2001).
15. Mitchell P.: *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*. Glynn Research, Bodmin 1968.
16. Lingl A., Stetter K. O., Mayer F., Kellermann J., Müller V.: *Extremophiles* 7, 249 (2003).
17. Schmidt S., Pflüger K., Kögl S., Spanheimer R., Müller V.: *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 44 (2007).
18. Müller V.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 115 (2004).
19. Müller V., Ruppert C., Lemker T.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 15 (1999).
20. Coskum U., Radermachers M., Müller V., Ruiz T., Grüber G.: *J. Biol. Chem.* 279, 22759 (2004).
21. Šmigáň P., Majerník A., Greksák M.: *FEBS Lett.* 349, 424 (1994).
22. Mulkidjanian A. Y., Galperin M. Y., Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V.: *Biol. Direct* 3, 13 (2008).
23. Ruppert C., Wimmers S., Lemker T., Müller V.: *J. Bacteriol.* 180, 3448 (1998).
24. Müller V., Lemker T., Lingl A., Weidner C., Coskumb Ú., Grüber G.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10, 167 (2005).
25. Müller V., Lingl A., Lewalter K., Fritz M.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 455 (2005).
26. Mulkidjanian A. Y., Makarova K. S., Galperin M. Y., Koonin E. V.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 892 (2007).
27. Hirata T., Iwamoto-Hihara A., Sun-Wada G.-H., Okajima T., Wada Y., Futai M.: *J. Biol. Chem.* 278, 23714 (2003).
28. Chen W., Koninsky J.: *J. Bacteriol.* 175, 5677 (1993).
29. Nováková Z., Šurín S., Blaško J., Majerník A., Šmigáň P.: *F. Microbiol.* 53, 237 (2008).
30. Nováková Z., Bobálová J., Vidová M., Hapala I., Šmigáň P.: *FEMS Mikrobiol. Lett.* 298, 255 (2009).
31. Mulkidjanian A. Y., Galperin M. Y., Koonin E. V.: *Trends Biochem. Sci.* 34, 206 (2009).
32. Šmigáň P., Polák P., Majerník A., Greksák M.: *FEBS Lett.* 420, 93 (1997).
33. Majerník A., Čuboňová L., Polák P., Šmigáň P., Greksák M.: *Anaerobe* 9, 31 (2003).
34. Čuboňová L., Šurín S., Majerník A., Šmigáň P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 23 (2004).
35. Čuboňová L., Majerník A., Šmigáň P.: *F. Microbiol.* 49, 147 (2004).
36. Kish-Trier E., Wilkens S.: *FEBS Lett.* 583, 3121 (2009).
37. Šurín S., Čuboňová L., Majerník A., Šmigáň P.: *F. Microbiol.* 51, 313 (2006).
38. Ihara K., Abe T., Sugimura K. I., Mukohata Y.: *J. Exp. Biol.* 172, 475 (1992).

M. Vidová and P. Šmigáň (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Unique Structural and Functional Properties of A_1A_0 ATPase/Synthase from Archaea**

ATP synthases are present in every life form being the key enzymes of cellular bioenergetics. The enzyme from the Archaea forms a new class of ATPases, A_1A_0 ATP synthase. This enzyme has unusual structural and functional features, which separate it from F_1F_0 and V_1V_0 ATPases as a distinct enzyme class – A_1A_0 ATPase/synthase. It contains the transmembrane A_0 domain and the cytoplasmatic A_1 domain, including a specific site for ATP synthesis. The A_1 domain is linked to the A_0 part by D-subunit, a structural and functional analog of the γ -subunit of F_1F_0 ATPase. The genomic approach to the study of this enzyme combined with methods of molecular biology, biochemistry and structural biology, will extend the study of A_1A_0 ATPase/synthase and ATP synthesis to the molecular level.

MORFOLOGIE, CHEMICKÁ STRUKTURA, VLASTNOSTI A MOŽNOST VYUŽITÍ PŠENIČNÉHO B-ŠKROBU

EVŽEN ŠÁRKA a ZDENĚK BUBNÍK

Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
evzen.sarka@vscht.cz

Došlo 28.4.09, přijato 9.7.09.

Klíčová slova: B-škrob, amylosa, amylopektin, škrobová zrna, mazovatění, hydrolýza

Obsah

1. Úvod
2. Rozdělení velikosti škrobových zrn
3. Měrný povrch
4. Obsah amylosy, chemická struktura a ultrastruktura amylopektinu
5. Dopad struktury amylopektinu na vnitřní uspořádání škrobových zrn
6. Lipidové komplexy
7. Krystalinita
8. Parametry mazovatění
9. B-škrob v průmyslové výrobě
 - 9.1. Jemnozrnný škrob jako produkt
 - 9.2. Průmyslová hydrolýza jemnozrnného škrobu
 - 9.3. Možnost chemické modifikace jemnozrnného škrobu

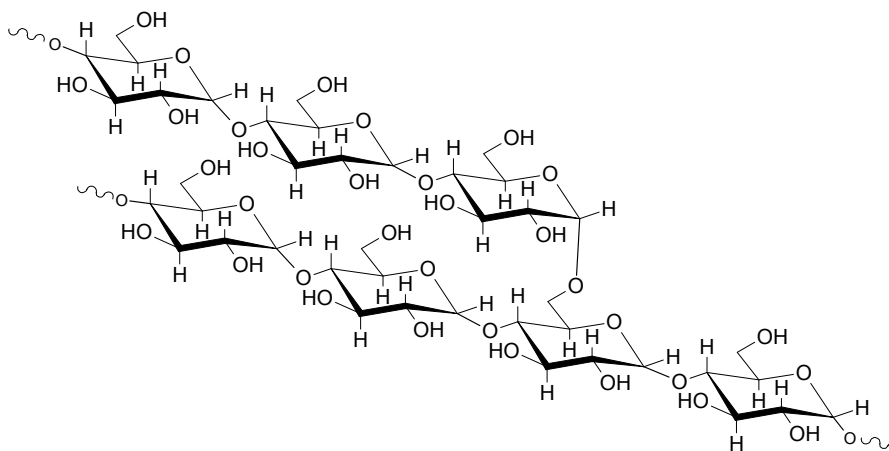
10. Aplikační možnosti jemnozrnného škrobu (vedlejšího produktu)
 - 10.1. Potravinářské a krmivářské využití jemnozrnného škrobu
 - 10.2. Další aplikace jemnozrnného škrobu

1. Úvod

Škrob patří mezi fyziologicky a hospodářsky nejdůležitější polysacharidy. Ukládá se v zásobních orgánech rostlin (např. hlízách brambor nebo v semenech kukuřice, pšenice a rýže) ve formě škrobových zrn, která se nerozpouštějí ve studené vodě. Hlavními složkami škrobu jsou dva α -D-glukany – lineární amylosa s α -(1→4) glykosidovými vazbami a větvený amylopektin, obsahující α -(1→4) a α -(1→6) vazby, kromě toho škrobová zrna obsahují i menší množství dalších složek jako jsou lipidy a proteiny.

Cereální škroby, konkrétně pšenice, ječmen, žito a tritikale, mají ve srovnání s hlízovými škroby dva odlišné typy škrobových zrn – větší zrna, označovaná též jako A-škrob, a menší zrna B-škrobu. Tato zrna se liší chemickým složením, ultrastrukturou amylopektinu, způsobem jeho uložení ve škrobovém zrnu a dalšími z toho vyplývajícími vlastnostmi.

Při zpracování pšeničné mouky na škrob se dvě velikostní skupiny škrobových zrn při rafinaci oddělují, takže výsledným produktem je komerční škrob s hlavní frakcí zrn 10–40 μ m a vedlejší produkt s menšími škrobovými zrny. Jeho využitelnost je dosud omezená a hledají se proto další možnosti jeho použití. Podkladem pro možné aplikace jsou znalosti o chemickém složení, struktuře a dalších vlastnostech tohoto produktu.



Obr. 1. Amylopektin

V úvodu bych si dovilil malou poznámku, týkající se symboliky. Historicky existuje označování škrobu jako A a B (event. C) podle velikosti škrobových zrn a s ní související kvalitou (s rozdílným obsahem lipidů a proteinů). Řetězce amylopektinu, charakterizující jeho rozvětvení, jsou v literatuře označovány rovněž jako A, B a C, což s předchozím označením nemá žádnou souvislost. Navíc i krystalinita má podobné označení – polymorfni formy jsou značeny jako A, B, C, event. V. Text článku je koncipován tak, aby při zachování zavedené tradiční symboliky nedošlo k záměně.

2. Rozdělení velikosti škrobových zrn

Jak již bylo zmíněno, velikost zrn pšeničného škrobu souvisí s jeho chemickým složením, které následně může ovlivňovat jeho funkční vlastnosti.

Ke sledování velikosti částic lze využít řadu metod např. optickou nebo elektronovou mikroskopii¹, příp. i doplněnou vyhodnocením metodou analýzy obrazu², sedimentační metody³, metodu laserové difrakce⁴, měření měrného povrchu⁵ ad.

Podle Leebe a Schumanna⁶ jsou zrna pšeničného A-škrobu čočkovitého tvaru s příčnou vzdáleností 20–30 μm . Menší B-zrna jsou kulovitá a mají průměr 2–8 μm . Fotografie skenového elektronového mikroskopu ukázaly, že pšeničný škrob má větší podíl menších zrn než je tomu u tritikale nebo ječmene⁷. Rozměr zrn pšeničného B-škrobu závisí na tvrdosti pšeničného zrna, která je důležitým parametrem při prodeji a nákupu pšenice. Některé měkké pšenice mají škrobová zrna B-škrobu i o velikosti nad 10 μm (cit.⁸). Někdy je B-škrob ještě dále dělen na dvě skupiny: menší zrna o průměru pod 2,8 μm (C-škrob) a středně velká zrna o průměru 2,8–9,9 μm (cit.⁹).

3. Měrný povrch

Pro řadu aplikací je důležitější veličinou než velikost částic měrný povrch, který určuje přenos energie i hmoty. Stanovuje se např. metodou BET, která používá pro své měření adsorpční izotermu dusíku⁵. Měrný povrch je úzce spjat s velikostí částic a jejich hustotou. Pro A- a B-škrobová zrna se vzhledem k jejich velikosti pochopitelně liší. Je definován:

$$s_{\text{sp}} = \Sigma s_i / m \quad (1)$$

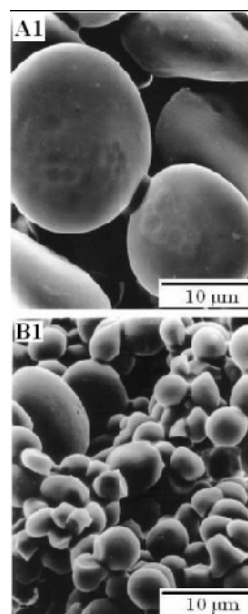
kde Σs_i je součet povrchu jednotlivých částic a m je jejich celková hmotnost. Rovnici (1) lze dále pro homogenní částice upravit:

$$s_{\text{sp}} = \Sigma V_i / (\rho_s \cdot \Sigma V_i) \quad (2)$$

kde ΣV_i je součet objemů jednotlivých částic.

Pokud by šlo o monodisperzní systém a předpokládali bychom kulovité částice, pak:

$$s_{\text{sp}} = \frac{\pi d_s^2}{\rho_s \cdot \frac{\pi}{6} \cdot d_s^3} = \frac{6}{\rho_s \cdot d_s} \quad (3)$$



Obr. 2. Fotografie skenového elektronového mikroskopu nativního pšeničného škrobu podle Van Hunga a Mority¹²

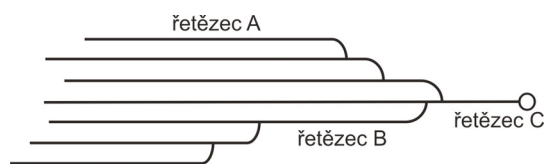
kde d_s označuje průměr částice, ρ_s – hustota částice. Pokud bychom dále uvažovali velikost škrobového zrna 20 μm , hustotu škrobu 1600 kg m^{-3} , vyšel by podle rovnice (3) měrný mezifázový povrch 188 $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$. Pro průměr zrna 5 μm podobnou kalkulací vychází 750 $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$.

Tento přibližný propočít je ve velmi dobré shodě (zvláště pro kulovitá zrna B-škrobu) s naměřenými údaji Morrisona¹¹ pro specifický povrch zrn A-škrobu 240 až 280 $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ a pro B-škrob 700–760 $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$. To potvrzuje, že škrobová zrna mají hladký, téměř neporézní povrch, podle fotografií elektronového mikroskopu jen s občasnými dutinami (viz obr. 2).

4. Obsah amylosy, chemická struktura a ultrastruktura amylopektinu

Obsah amylosy (jde o podíl amylosy v celkovém obsahu škrobu), může být stanoven několika způsoby. Tzv. zdánlivý obsah amylosy se stanovuje měřením jodové afinity škrobů zbavených lipidů pomocí dimethylsulfoxidu s využitím potenciometrického autotitrátoru¹³. Tzv. absolutní obsah amylosy se určí metodou Takedy a spol.¹⁴ odečtením afinity jodu amylopektinu od hodnoty afinity celkového škrobu zbaveného lipidů. Jinou možností stanovení amylosy je použití enzymových setů^{15–17}.

Údaje o obsahu amylosy pro zrna B-škrobu se u různých autorů liší. Podle Eliassona¹⁸ mají tato zrna nižší obsah amylosy než je tomu u zrn A-škrobu; podobně Ao a Jane⁷ zjistili absolutní obsah amylosy u zrn A-škrobu ve výši 30,9 %, zatímco B-zrna dosahovala hodnoty 25,5 %. Salman a spol.¹⁹ ale naopak žádné významné rozdíly



Obr. 3. Schématická struktura amylopektinu

v obsahu amylosy pro různé typy škrobových zrn ani kolorimetricky ani enzymově neprokázali.

V běžně užívané nomenklatuře větvení amylopektinu podle Peata a spol.²⁰ jsou A-řetězce amylopektinu definovány jako nerozvětvené, na rozdíl od B-řetězců, na které jsou vazbou α -(1→6) navázány další A nebo B-řetězce. Makromolekula také obsahuje C-řetězec, který nese jedinou koncovou redukující skupinu. U amylopektinu krátké řetězce vytvářejí shluky (klastry), jednotky těchto klastrů jsou vzájemně propojeny delšími řetězci²¹. Zjednodušeně ukazuje toto uspořádání obr. 3, rovné linie zde představují glykosidové vazby α -(1→4) a rozvětvení vazby α -(1→6).

Při hledání struktury amylopektinu se nejprve oddělí jednotlivé řetězce isoamylasou. Délka řetězců amylopektinu je následně analyzována metodou Wonga a Jane²² vysokorychlostní aniontovou kapalinovou chromatografií vybavenou on-line amyloglukosidasovým reaktorem s pulsní amperometrickou detekcí (HPAEC-ENZ-PAD).

Podle Ao a Jane⁷ mají zrna pšeničného B-škrobu kratší řetězce (řetězce A a B₁ o polymeračním stupni (DP) 6 až 12 glukosových jednotek – 25,2 %, o DP 13–24, 46,8 %), a ne tak dlouhé řetězce B₂ (DP > 37) jak je tomu u A-škrobu (DP 6–12, 21,8 % a DP 13–24, 43,3 %). Pšeničný B-škrob se skládá z rozvětvenějších řetězců o DP 6–25 a obsahuje jen malý podíl řetězců o DP ≥ 26. Tedy A-škrob obsahuje více řetězců B₂, ale méně krátkých řetězců A a B₁, než B-škrob.

Podobně i Salman a spol.¹⁹ zjistili, že poměr řetězců s DP 6–12 je nižší u A-škrobu než u B-škrobu, zatímco střední a dlouhé řetězce jsou hojnější u zrn A-škrobu. Také Sahlström a spol.²⁴ konstatují, že malé částice obsahují větší podíl nejkratších amylopektinových řetězců (DP < 8).

Oproti tomu podle Vermeylena a spol.²⁷ krátké a středně dlouhé řetězce s DP 8–24 jsou častější ve frakcích malých částic, zatímco velmi krátké (DP < 8) a dlouhé (DP 25–60) řetězce byly více zastoupeny u velkých částic. To je v souladu s předchozím zjištěním Tanga a spol.²⁵.

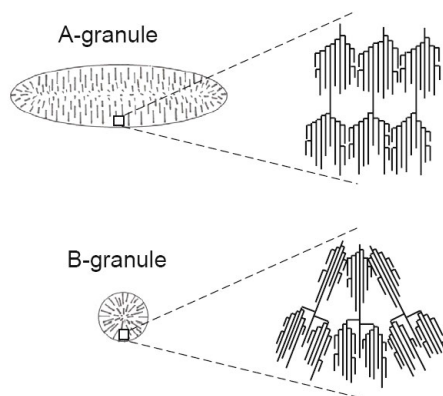
V oblasti neredukujících konců a ve střední části řetězců amylopektinu se tvoří antiparalelní dvojité šroubovice s uspořádanou (krystalovou) třírozměrnou strukturou²⁶. Podle Vermeylena a spol.²⁷ jsou tyto dvojité šroubovice spojené s kostrou amylopektinu kratší u malých škrobových zrn.

5. Dopad struktury amylopektinu na vnitřní uspořádání škrobových zrn

Předpokládá se, že zrna A a B-škrobu mají ve vnitřní struktuře jinak uspořádanou amylosu a amylopektin. Výzkum optických map ukázal, že u čočkovitých zrn A-škrobu tritikale, pšenice a ječmene jsou molekuly amylopektinu orientovány kolmo na osovou rovinu škrobového zrna a jsou uspořádány rovnoběžně²⁸. Molekuly amylopektinu, které obsahují více řetězců B₂, ale méně kratších řetězců A a B₁, jsou válcovitého tvaru, což umožňuje jejich snadnější uspořádání do rovnoběžného uspořádání v čočkovitém škrobovém zrně (obr. 4). Toto uspořádání má i za následek vytvoření rýhy na okraji osově roviny.

Na druhé straně amylopektin u B-škrobu, u kterého můžeme předpokládat větší podíl krátkých řetězců (řetězce A a B₁) a menším podíl řetězců B₂, má kónický tvar, který může být snadno zařazen do kulovitého škrobového zrna.

Paralelní uspořádání válcovitých molekul amylopektinu u A-škrobu by mohlo vysvětlovat vyšší podíl krystalinity než je tomu u kónicky tvarovaného amylopektinu u zrn B-škrobu⁷.

Obr. 4. Struktura škrobového zrna A- a B-škrobu a molekulární struktura podle Ao a Jane⁷, zveřejněno se souhlasem Jane

Podle Jane²⁹ kulovité částice B-škrobu, vázané pomocí proteinů a různých polysacharidů, obsahují mimo to uvnitř škrobového zrna propojené dutiny se značnou porózitou.

6. Lipidové komplexy

Zrna B-škrobu obsahují více lipidů než je tomu u A-škrobu. Lipidy vytvářejí šroubovicové komplexy s amylosou, čímž brání nabobtnání. Jde většinou o monoacyl-lysofosfolipidy³⁰.

Podle Eliassona¹⁸ je nejvýznamnější rozdíl mezi zrny A a B-škrobu v mnohem vyšší entalpii, která je způsobena

amyloso-lipidovými komplexy B-zrn. Obecně platí, že všechny nevoskové (non-waxy) cereální škroby obsahují lipidy přibližně úměrně obsahu amylosy³². Ale zrna A-škrobu *Triticaceae* obsahují více amylosy než B-zrna, a přesto menší částice obsahují více lipidů³³.

7. Krystalinita

Škrobová zrna jsou částečně krystalická a skládají se z uspořádaných oblastí, které obsahují dvojité šroubovice vytvořené z řetězců amylopektinu a z neuspořádaných amorfních oblastí. Dvojité šroubovice, které vznikají vytvořením vodíkových můstků mezi některými hydroxylovými skupinami koncových řetězců amylopektinu, se podílejí na tvorbě krystalinity škrobových zrn³⁴.

Informace o krystalinitě se získává sledováním difrakčních obrazců rentgenového záření.

Amylosa ve škrobových zrnech je amorfní, a tak zrna B-škrobu vykazují vyšší krystalinitu (35,5 %) než zrna A-škrobu (32,4 %). Běžné škroby vykazují nižší krystalinitu než škroby získané z voskových (waxy) odrůd¹.

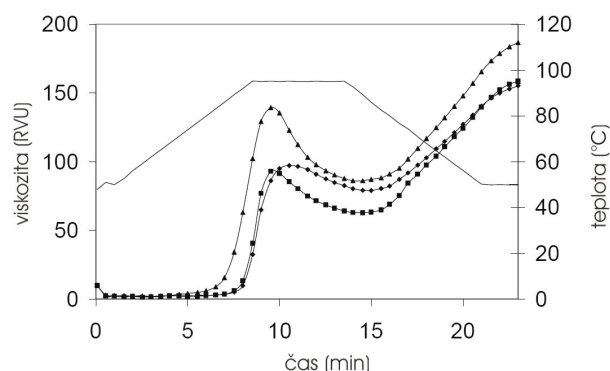
Krystalická forma A se vyskytuje u cereálních škrobů. Umístění charakteristických difrakčních píků formy A nezávisí na velikosti částic, což svědčí o rovnoměrné hustotě jednotlivých krystalitů v různých škrobových frakcích. U pšeničných škrobů se zjišťuje sekundární krystalinita formy B, která schází u malých škrobových zrn. Některé enzymy štěpící škrob jsou specificky sdruženy s velkými škrobovými zrny a scházejí ve frakcích malých škrobových zrn. Podle Vermeylena a spol.²⁷ jsou tyto enzymy snad biochemickým klíčem ke krystalinitě B velkých čočkovitých zrn.

8. Parametry mazovatění

Moderní metodou pozorování tepelných vlastností nativních a retrogradovaných škrobů je diferenční skenovací kalorimetrie. Klasickou metodou je sledování průběhu viskozity suspenze. V obou případech je suspenze škrobu zahřívána s konstantním gradientem teploty na čas.

Pokud jde o parametry mazovatění nativních škrobů Van Hung a Morita³⁵ a podobně Vermeylen a spol.²⁷ zjistili, že počáteční teploty u zrn A- a B-škrobu jsou podobné, zatímco vrcholová teplota (ve středu teplot mazovatění) a koncová teplota jsou u zrn A-škrobu významně nižší než u B-škrobu. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozím výzkumem^{36–38}. Někteří autoři však došli k odlišnému závěru; Seib³⁹ uvádí, že škrobová zrna A-škrobu mají vyšší počáteční teplotu mazovatění a nižší vrcholovou a koncovou teplotu mazovatění v porovnání s B-škrobem; Ghiasi a spol.⁴⁰ sdělují, že obě skupiny škrobových zrn mají podobné režimy mazovatění.

V průběhu mazovatění zrna A-škrobu nabobtnávají přednostně v osové rovině, takže se zakřívují a ohýbají do charakteristického tvaru. Toto chování je společné všem



Obr. 5. Viskozitní profil pšeničného škrobu podle Ao a Jane⁷; ■ pšeničný škrob celkově, ▲ A škrob, + B škrob, — teplota

škrobovým zrnům typu A, ale nedochází k němu u zrn B-škrobu pšenice, ječmene, rýže a tritikale nebo u luštěninových, kořenových a hlízových škrobů¹¹.

Viskozitní křivky pšeničného škrobu ukazuje obr. 5. Viskozitní křivka zrn A-škrobu má vyšší vrchol – vyšší konečnou viskozitu i vyšší viskozitu při udržované konstantní teplotě, než je tomu u B-škrobu. Viskozita při ochlazování disperze A-škrobu, která odpovídá tvorbě sítí, je v porovnání s viskozitou B-škrobu rovněž vyšší. To může být vysvětleno tím, že A-škrob obsahuje více amylosy a více dlouhých řetězců amylopektinu než B-škrob⁷.

9. B-škrob v průmyslové výrobě

9.1. Jemnozrnný škrob jako produkt

Jak již bylo uvedeno, při průmyslové výrobě škrobu jsou škrobová zrna rozdělena na dvě kategorie – komerční škrob první jakosti (obsahující převážně A-škrob) a vedlejší produkt, obsahující především B-škrob. V některých učebnicích nebo ve firemní literatuře týkající se výroby škrobu se lze setkat i se zjednodušeným označením těchto produktů jako A-, B-škrob, případně ještě A-Plus nebo A-Minus škrob^{56–58}.

Důvod separace zrn A- a B-škrobu je dvojitý:

- jednak nelze jemnozrnný škrob jednoduše předsušit filtrací na vakuovém filtru (malá zrna způsobují velký odpor filtračního koláče),
- kromě toho, jak již bylo zmíněno, B-škrob má horší jakost – vyšší obsah proteinů (asi 1,1 %, cit.⁴¹), a rovněž vyšší obsah lipidů a pentosanů⁴².

Množství jemnozrnného škrobu jako vedlejšího produktu bývá v pšeničných škrobárnách ČR asi 10 % vyrobeného jakostního pšeničného škrobu.

Ve skutečnosti je podíl malých zrn v poměru ke komerčnímu produktu vyšší – např. Meusser a spol.⁴³ uvádějí hodnotu 27 % A-produktu. To je ve shodě s měřením Raekera a spol.⁹, kteří zjistili objemové rozdělení zrn

v rozmezí 9,7–15,2 % pro zrna o průměru pod 2,8 μm , 13,4–27,9 % pro střední zrna o průměru 2,8–9,9 μm a 57,9–76,9 % pro velká zrna o průměru nad 9,9 μm .

Vysvětlení pro tento významný rozdíl není pouze jediné, ale hraje zde roli současné působení několika faktorů:

- dřívější separační technologie nedokázaly dosáhnout vysoké výtěžnosti (i malých částic),
- již dnes využívaná možnost převedení části zrn B-škrobu do komerčního produktu, resp. meziproductu (viz dále),
- část malých škrobových částic odchází kromě do vedlejšího produktu i do jiných proudů výrobního schématu, jejichž konečným produktem jsou pentosany, odpadní voda apod.

Podle Zwitserloota⁴⁴ lze při úpravě technologie při separaci suspenzí a následné enzymové hydrolýze dosáhnout výtěžnosti škrobu z mouky 70 % a pouze 5 % jemnozrnného škrobu, tedy snížit podíl jemnozrnného škrobu na 7 % vyrobeného potravinářského škrobu.

9.2. Průmyslová hydrolýza jemnozrnného škrobu

V současnosti jsou ve světě jedním z hlavních výrobců ze škrobu škrobové hydrolyzáty (maltodextriny, glukosové, maltosové a glukoso-fruktosové sirupy). Při hydrolýze dochází působením minerální kyseliny nebo častěji pomocí enzymového zpracování ke zkrácení řetězců amylosy a amylopektinu, výsledkem štěpení je celá řada oligosacharidů (především maltosy) a glukosy. Při výrobě glukoso-fruktosových sirupů se cíleně za katalýzy glukosoisomerasou část glukosy isomerizuje na fruktosu.

Přestože již je provozně odzkoušeno využití určitého podílu menších částic k tomuto procesu, názory v odborných článcích se liší.

Yonemoto a spol.⁴⁵ uvádějí, že i přes vyšší krystalinitu jsou malé částice ochotnější k enzymové hydrolýze než ty velké, což vysvětluje jejich větším povrchem. Tyto výsledky byly potvrzeny Maneliem a spol.⁴⁶ Dextriny, které se uvolňují během hydrolýzy ze zrn B-škrobu, obsahují více lineárních řetězců a mají v průměru kratší délku, než odpovídající řetězce ze zrn A-škrobu.

Naopak Sakintuna a spol.⁴⁷ zjistili, že větší škrobová zrna (> 30 μm) jsou ochotnější k hydrolýze než menší (< 10 μm).

Robins a spol.⁴⁸ navrhli modifikaci enzymového procesu. pH suspenze jemnozrnného škrobu, která vznikne po separaci na filtračních odstředivkách, se upraví na 6,5–6,9 a přidá se α -amylasa. Poté se škrob zahřeje na 95 °C v paroproudém zahříváči a čerpá se do dvou nádrží (koagulačních tanků) s dobou zdržení 5 hodin. Vysoká teplota způsobí nabobtnání a puknutí zrn škrobu, což umožní α -amylase rozštěpit škrob do kratších řetězců. Kromě toho vyvolá koagulaci rozpustných bílkovin, které se později oddělí.

Následná filtrace, jak klasická, tak na ionexech, se zdá být hlavním problematickým bodem využití B-škrobu při enzymové hydrolýze. Kromě již uvedených proteinů

dochází k uvolňování tuků z amylo-lipidových komplexů. Důsledkem mohou být zakalené sirupy, snížení filtrační rychlosti, zhoršení výtěžnosti³² a je potřeba počítat s vyšší spotřebou pomocného materiálu.

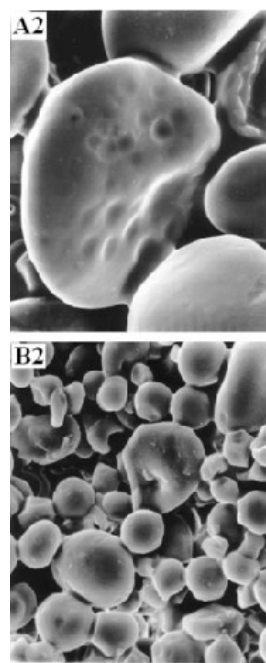
9.3. Možnost chemické modifikace jemnozrnného škrobu

Chemická modifikace škrobu se většinou provádí pod teplotou mazovatění, tedy při zachování struktury původních škrobových zrn. Toto řešení je výhodné pro separaci a další zpracování suspenze po proběhnutí reakci. Tudiž struktura zrna velmi ovlivňuje složení škrobového derivátu. Chemická činidla pronikají s různou účinností povrchem nebo kanálky dovnitř škrobových zrn. Zpravidla jsou amorfní části zrn substituovány snadněji než krystalické oblasti, přesto lze na škrobová zrna působit rozličnými technikami v závislosti na jejich architektuře, typu krystalové struktury, obsahu amylosy a přítomnosti minoritních složek.

Amylosa má sklon být substituována do vyššího stupně než amylopektin, který je přednostně substituován v rozvětvených oblastech²¹.

Jemnozrnný škrob má výhodné vlastnosti pro modifikace, kde výsledným produktem jsou škroby přizpůsobené individuálním potřebám, např. pro speciální papíry.

Větší škrobová zrna mají vyšší reaktivitu s acetanhydridem než malá. Pasty fosforylovaných zesítěných škrobů z malých částic jsou stabilnější než z velkých, zatímco pasty z acetylovaného škrobu a acetylovaného



Obr. 6. Fotografie skenového elektronového mikroskopu fosforylovaného a zesítěného A a B pšeničného škrobu podle Van Hunga a Mority¹²

zesítěného škrobu z malých a velkých částic mají podobnou odolnost vůči zmrazení a rozmrazení. Skenová elektronová mikroskopie ukazuje, že část zrn je zasazena povrchovou erozí způsobenou procesem chemické modifikace (obr. 6). Povrchy velkých zrn vykazují větší poškození po modifikaci než malá zrna. Důsledkem je, že zrna různé velikosti mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti modifikovaného škrobu¹².

Bae a spol.⁵⁰ se zabývali fyzikálními vlastnostmi extrudovaných vláken hydroxypropylovaných normálních a vysoce amylosových škrobů. Substituce zvětšila prodloužení a pružnost extrudátů. Hydroxypropylované škroby a hydroxypropylované a současně zesítěné škroby z A zrn byly více substituované než z B zrn⁵¹.

10. Aplikální možnosti jemnozrnného škrobu (vedlejšího produktu)

10.1. Potravinářské a krmivářské využití jemnozrnného škrobu

Klasicky se tento nesusušený vedlejší produkt používá jako surovina pro výrobu lihu, přísad do krmiv pro dobytek nebo se aplikuje jako náhražka mléka v krmivech pro telata.

Byly hledány možnosti, zda lze jemnozrnný škrob vzhledem ke své granulometrii a chemickému složení použít i k dalšímu potravinářskému zpracování. Bylo zjištěno, že malá a větší škrobová zrna pšenice a ječmene vykazují rozdílné chování při vaření piva⁵², pečení^{24,51,53} a extruzi⁵¹. Velmi malé částice způsobují zeslabení těsta, více zastoupená zrna ovlivňují tvar první části farinografické křivky, způsobují tak delší dobu vývinu těsta, větší stabilitu, delší dobu maximálního nárůstu a vyšší číslo kvality. Čím vyšší je obsah velkých škrobových zrn (> 16 μm), tím menší je změknutí těsta a farinografická plocha. Čím větší je průměrná hodnota velikostí zrn, tím delší je doba maximálního nárůstu a menší zeslabení těsta; čím větší je nejčastěji zastoupený rozměr zrna, tím menší je stupeň zeslabení těsta a farinografická plocha⁵⁴.

Zhao a Whistler⁵⁵ referují o nosičích ochucovadel vyrobených z kulovitých agregátů škrobových zrn, tímto způsobem by tedy bylo možné v omezeném množství jemnozrnný pšeničný škrob využívat.

10.2. Další aplikace jemnozrnného škrobu

V současné době se jemnozrnný škrob používá jako pojivo ve slévárenství a k výrobě vlnitých lepenek⁴⁴.

Poměrně nová aplikace jemnozrnného škrobu je k výrobě biodegradabilních plastů. Obnovitelné materiály přitahují pozornost ze dvou hlavních důvodů: jednak ekologického a dále vzhledem k tomu, že zdroje ropy jsou časově omezené³¹. Výhodou škrobu je, že je obnovitelný, biodegradovatelný, snadno dostupný a relativně levný.

Výhodu jemnozrnného škrobu lze předpokládat

v tom, že menší zrna se v plastu lépe dispergují a jsou přístupnější pro mikroorganismy¹⁰. Tato hypotéza vychází z výzkumu Ahameda⁴⁹, který používal škrob z rostlin *Chenopodium quinoa* a *Amaranthus paniculatas* jako plnivo LDPE. Granule škrobu tohoto původu (menší než 1 μm) tvoří např. ve srovnání s kukuřičným škrobem v daném filmu lepší disperze, což vede k vyššímu sklonu k pozdější degradaci.

Bylo rovněž zjištěno, že škrobová zrna menší velikosti zlepšují tažné vlastnosti polyetylenových filmů plněných škrobem. Speciální jemné frakce pšeničného škrobu by měly vytvářet podstatně tenčí filmy, než použije-li se kukuřičný škrob²³.

Přehledný článek byl zpracován v rámci řešení grantového projektu GA ČR 525/09/0607 „Biodegradabilní kompozitní materiály na bázi B-škrobu s upotřebením v zemědělství.“

LITERATURA

1. Becker A., Hill S. E., Mitchell J. R.: *Starch/Stärke* 53, 121 (2001).
2. Šárka E., Bubník Z.: *Starch/Stärke* 61, 457 (2009).
3. Farmakis L., Sakellarakis J., Koliadima A., Gavril D., Karaiskakis G.: *Starch/Stärke* 52, 275 (2000).
4. Park S. H., Wilson J. D., Seabourn B. W.: *J. Cereal Sci.* 49, 98 (2009).
5. Otsuka M., Hasegawa H., Matsuda Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 45, 894 (1997).
6. Leeb C. V., Schumann H. P., v knize *Product Design and Engineering. Best Practices. Volume 2, Rawmaterials, Additives and Applications* (Bröckel U., Meier W., Wagner G., ed.), kap. Starch and starch-based products. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
7. Ao Z., Jane J.-L.: *Carbohydr. Polym.* 67, 46 (2007).
8. Bechtel D. B., Zayas I., Dempster R., Wilson J. D.: *Cereal Chem.* 70, 238 (1993).
9. Raeker M. O., Gaines C. S., Finney P. L., Donelson T.: *Cereal Chem.* 75, 721 (1998).
10. Kupec J., Charvátová K., Křesálková M.: *Chem. Listy* 97, 155 (2003).
11. Morrison W. R., v knize *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Uniqueness of wheat starch. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
12. Van Hung P., Morita N.: *Starch/Stärke* 57, 413 (2005).
13. Yoo S.-H., Jane J.-L.: *Carbohydr. Polym.* 49, 297 (2002).
14. Takeda C., Takeda Y., Hizukuri S.: *Cereal Chem.* 60, 212 (1983).
15. Stawski D.: *Food Chem.* 110, 777 (2008).
16. Jones A., Urban J., Copikova J.: *Biol. Plant.* 42, 303 (1999).
17. Šimková D., Papoušková L.: Enzymatic determination

- of amylose/amylopectin content in samples of winter wheat and in starch of potato varieties for industry utilisation. *Sborník 4. konference Polysacharidy/ Polysaccharides (CD-ROM), ČSCH, Praha, 13.-14.11.2008.*
18. Eliasson A.-C., v knize: *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Characterisation of wheat starch and gluten as related to end-use properties. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 19. Salman H., Blazek J., Lopez-Rubio A., Gilbert E., Hanley T., Copeland L.: *Carbohydr. Polym.* 75, 420 (2009).
 20. Peat S., Whelan W. J., Thomas G. J.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1952, 4546.
 21. Bertoft E., v knize: *Starch in Food: Structure, Function and Applications.* (Eliasson A.-C., ed.) kap. Analysing starch structure. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2004.
 22. Wong K. S., Jane J.-L.: *J. Liq. Chromatography* 20, 297 (1997).
 23. Griffin G. J. L., v knize: *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Wheat starch in the formulation of degradable plastics. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 24. Sahlström S., Bævre A. B., Bråthen E.: *J. Cereal Sci.* 37, 285 (2003).
 25. Tang H., Ando H., Watanabe K., Takeda Y., Mitsunaga T.: *Carbohydr. Res.* 330, 241 (2001).
 26. Velišek J.: *Chemie potravin 1.* OSSIS, Tábor 1999.
 27. Vermeylen R., Goderis B., Reynaers H., Delcour J. A.: *Carbohydr. Polym.* 62, 170 (2005).
 28. French D.: *Denpun Kagaku* 19, 8 (1972).
 29. Jane J.-L., v knize: *Starch. Structure and Functionality.* (Frazier P. J., Richmond P., Donald A. M., ed.), kap. Starch functionality in food processing. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1997.
 30. Morrison W. R.: *J. Cereal Sci.* 8, 1 (1988).
 31. Yu L., Dean K., Li L.: *Progress in Polym. Sci.* 31, 576 (2006).
 32. Lauro M., Suortti T., Poutanen K., v knize: *Starch. Structure and Functionality.* (Frazier P. J., Richmond P., Donald A. M., ed.), kap. The role of amylose-lipid complex in the enzymatic hydrolysis of starch granules. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1997.
 33. Tester R.F., v knize: *Starch. Structure and Functionality.* (Frazier P. J., Richmond P., Donald A. M., ed.), kap. Starch: The polysaccharide fractions. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1997.
 34. Murphy P., v knize: *Handbook of Hydrocolloids.* (Phillips G. O., Williams P. A., ed.), http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=168&VerticalID=0 kap. Starch. Woodhead Publishing 2000.
 35. Van Hung P., Morita N.: *Carbohydr. Polym.* 59, 239 (2005).
 36. Eliasson A.-C., Karlsson R.: *Starch/Stärke* 35, 130 (1983).
 37. Soulaka A. B., Morrison W. R.: *J. Sci. Food Agric.* 36, 709 (1985).
 38. Peng M., Gao M., Abdel-Aal E.-S. M., Hucl P., Chibbar R. N.: *Cereal Chem.* 76, 375 (1999).
 39. Seib P.A.: *Oyo Toshitsu Kagaku* 41, 49 (1994).
 40. Ghiasi K., Hoseney R.C., Varriano-Marston E.: *Cereal Chem.* 25, 111 (1982).
 41. Knight J. W., Olson R. M., v knize: *Starch: Chemistry and Technology.* (Whistler L. R., ed.), kap. XV. Academic Press, New York 1965-1967.
 42. Galliard T., Bowler P., Towersey P. J.: v knize *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Minor components of wheat starch and their technological significance. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 43. Meusser F., Althoff F., Huster H., v knize: *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Developments in the extraction of starch and gluten from wheat flour and wheat kernels. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 44. Zwitserloot W. R. M., v knize: *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Production of wheat starch and gluten: Historical review and development into new approach. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 45. Yonemoto P., Calori-Domingues M. A., Franco C. M. L.: *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 27, 761 (2007).
 46. Manelius R., Qin Z., Avall A. K., Andtfolk H., Bertoft E.: *Starch/Stärke* 49, 142 (1997).
 47. Sakintuna B., Budak O., Dik T., Yondem-Makascioglu F., Kincal N. S.: *Chem. Eng. Commun.* 190, 883 (2003).
 48. Robins C., Bridge A., Stuart T.: Patent WO/1995/018776.
 49. Ahamed N. T., Singhal R. S., Kulkarni P. R., Kale D. D., Mohinder P.: *Carbohydr. Polym.* 31, 157 (1996).
 50. Bae S. O., Lim S. T.: *Cereal Chem.* 75, 449 (1998).
 51. Chiotelli E., Le Meste M.: *Cereal Chem.* 79, 286 (2002).
 52. MacGregor A. W., Morgan J. E.: *Cereal Foods World* 31, 688 (1986).
 53. Soulaka A. B., Morrison W. R.: *J. Sci. Food Agric.* 36, 719 (1985).
 54. Sebecic B., Sebecic B.: *Starch/Stärke* 51, 445 (1999).
 55. Zhao J. G., Whistler R. L.: *Food Technol.* 48, 104 (1994).
 56. Boháčenko I., Vydrová H. ve skriptu *Technologie sacharidů* (Kadlec P., ed.), kap. Chemie a technologie škrobu. VŠCHT, Praha 2000.
 57. Kodet J., Babor K.: *Modifikované škroby, dextriny a lepidla.* SNTL, Praha 1991.
 58. Firemní literatura GEA Westfalia Separator, <http://www.westfalia-separator.com/downloads/pdf/9997-0816-000.pdf>, staženo 26.4.2009.

E. Šárka and Z. Bubník (*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology Prague*): **Morphology, Chemical Structure, Properties and Applications of Wheat B-Starch**

Compared to other cereal or tuber starches, wheat starch shows mainly two different types of granules, the A-starch and B-starch, which are separated in starch processing. These types differ not only in size or shape but also in chemical structure of amylopectin, arrangement in granules, and lipid and protein contents. Chemical composition and structure of starch influence on physicochemical

properties (specific surface, crystallinity, gelatinization characteristics) and functionality.

Processing of B-starch (filtration, drying) is problematic for its small particles. Nevertheless, the challenge for other uses of B-starch has been taken up in designing new technological processes. Hence B-starch becomes a valuable raw material in other processes. Examples of its applications in enzymatic processes producing syrups, in modifications affording tailor-made starches, for flavour carriers, baking, extrusion and, last but not least, in biodegradable polymers are given.

FLAVINY – PERSPEKTIVNÍ KATALYZÁTORY OXIDACÍ A REDUKCÍ

RADEK CIBULKA

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

Došlo 14.9.09, přijato 25.1.10.

Klíčová slova: flaviny, flavoenzymy, biokatalýza, organokatalýza, oxidace, isoalloxaziny, alloxaziny, riboflavin, flaviniové soli

Obsah

1. Úvod
2. Chemické vlastnosti flavinů
3. Funkce flavinů ve flavoenzimech
 - 3.1. Biokatalýza s využitím flavoenzymů
4. Katalytické systémy založené na derivátech flavinů
5. Závěr

1. Úvod

Flaviny jsou skupina biologicky aktivních látek, jejichž společným strukturním rysem je isoalloxazinové seskupení (cit.^{1–4}) (obr. 1). Díky konjugovanému systému dvojných vazeb absorbují isoalloxaziny světlo v oblasti okolo 450 nm, což způsobuje jejich intenzivní žluté zbarvení. Žlutá barva dala derivátům isoalloxazinu společný název flaviny odvozený z latinského *flavus*, žlutý. V literatuře se někdy řadí mezi flaviny rovněž deriváty izomerního alloxazinu (obr. 1).

Flaviny jsou obsaženy jako kofaktory v různých typech enzymů katalyzujících redoxní přeměny^{3–6}, např. v oxidasách, disulfidových oxidoreduktasách, monooxygenasách, dehydrogenasách a elektron-transferasách; působí zde jako univerzální oxidační a redukční činidla. Kromě

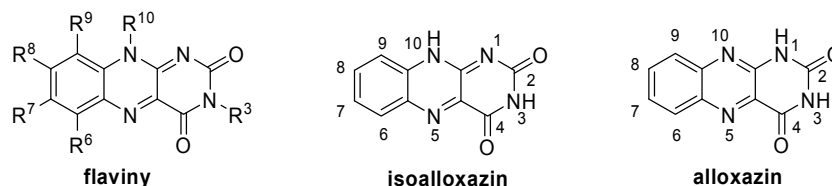
toho však flaviny díky svým fotofyzikálním vlastnostem^{1,7,8} hrají důležitou úlohu ve fotoreceptorech^{9,10} a v enzymech vyžadujících pro svou činnost světlo, např. v DNA-fotolyasách^{7,11,12}. Snadný přechod flavinů do excitovaného stavu a následné vyzařování světla při přechodu na základní energetickou hladinu je podstatou bioluminiscence^{3,13}.

Práce z posledních let ukazují, že flaviny jsou perspektivními katalyzátory oxidačních a redukčních reakcí rovněž v umělých systémech. Cílem tohoto přehledného článku je seznámit čtenáře s nejdůležitějšími chemickými vlastnostmi flavinů, které jsou v přímé souvislosti s jejich schopností zapojovat se do redoxních procesů, a podat přehled o dosud známých katalytických systémech využívajících deriváty flavinů. Vybrané příklady funkcí flavinů v enzymech navíc naznačují další směry možného využití flavinů v organické syntéze.

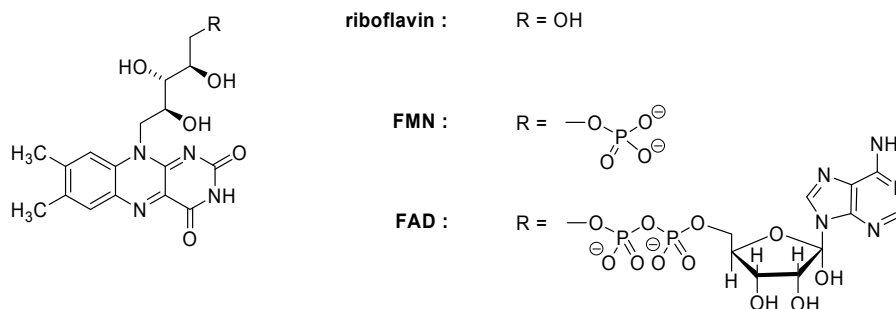
2. Chemické vlastnosti flavinů

Nejnámějším zástupcem flavinů je riboflavin (obr. 2), který patří do skupiny vitaminů B (riboflavin = 7,8-dimethyl-10-ribitylisoalloxazin = vitamin B₂). Riboflavin slouží především jako zdroj flavinů pro vyšší živočichy a člověka, kteří nemají enzymovou výbavu pro jejich syntézu. V enzymech se však flaviny nalézají především ve formě flavinmononukleotidu (FMN) a flavinadeninidnukleotidu (FAD) (obr. 2). V dalších schématech jsou pro zjednodušení flaviny znázorňovány obecně jako 10-substituované 7,8-dimethylalloxaziny.

Široké uplatnění flavinů jako redoxních činidel v biologických systémech je dané jejich schopností zúčastňovat se jedno- i dvouelektronových oxidací a redukcí^{1–4}. Redoxní děje probíhají v molekulách flavinů prostřednictvím azadienového seskupení, které je v konjugaci s karbonylovými skupinami dihydropyrimidinového jádra (schéma 1). Přijetím jednoho elektronu přechází flavin **FL** na stabilní radikál **FL-H[•]**, v literatuře označovaný jako semichinon. Přijetím dvou elektronů nebo hydridového iontu se flavin redukuje na dihydroderivát **FL-H₂**, který je na rozdíl od výchozího flavinu a semichinonu téměř bezbarvý. Semichinon se podle pH prostředí může vyskytovat



Obr. 1. Vztah mezi strukturou flavinů, isoalloxazinu a alloxazinu včetně číslování obou heterocyklických skeletů (flavinové substituenty jsou číslovány podle polohy na heteroaromatickém systému)

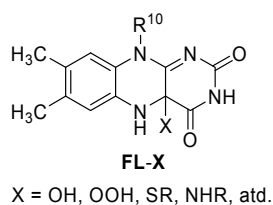


Obr. 2. Biologicky významné flaviny

v neutrální formě (viz schéma 1), která je modrá, nebo po ztrátě protonu jako anion, který je červený.

Dvouelektronovou redukci flavinů v umělých systémech lze provést analogicky jako ve flavoenzimech účinkem hydridového iontu, jehož zdrojem může být např. kyanoborohydrid sodný¹⁴. Nejčastěji využívaným redukčním činidlem pro generování dihydroflavinu z flavinu je však dithioničitan sodný^{1,14,15} nebo vodík v přítomnosti palladiového katalyzátoru¹. Redukci flavinu lze provést rovněž elektrochemicky; v závislosti na rozpouštědle a pH dochází k jednoelektronové redukci za vzniku semichinonu nebo k dvouelektronové redukci¹⁶.

Pro funkci flavinů jako kofaktorů je rovněž důležitá jejich schopnost reagovat s nukleofily či elektrofily^{1–4}. Nukleofily reagují s flaviny v jejich oxidované formě v polohách 5 a 4a. Elektrofily reagují ochotně s redukovanými flaviny, a to výhradně v poloze 4a. Pro-



Obr. 3. Obecná struktura C4a-adtů flavinů

dukty reakcí flavinů v poloze 4a, tzv. C4a-adtů **FL-X**, jsou relativně stabilní a představují meziproducty řady transformací katalyzovaných flavoenzymů (obr. 3).

3. Funkce flavinů ve flavoenzimech

Katalytická funkce flavoenzymů je podmíněná tím, že flavinový kofaktor se v katalytickém cyklu zúčastňuje dvou redoxních dějů. Nejprve je redukován jedním substrátem v redukčním stupni katalytického cyklu a následně je v oxidačním stupni oxidován jiným substrátem (schéma 2). Ve většině flavoenzymů jsou oba děje dvouelektronové, v některých případech se oxidační část cyklu skládá ze dvou jednoelektronových procesů^{1–6}.

Z hlediska funkce flavoenzymů v biologickém systému je vždy podstatný jeden z redoxních dějů katalytického cyklu. Druhý děj pak slouží k regeneraci aktivní formy flavoenzymu. V případě enzymů katalyzujících redukci substrátu (příklad viz řádek 1, tabulka I) je aktivní částicí dihydroflavin, který je většinou generován z oxidované formy účinkem NAD(P)H. V případě oxidas je dihydroflavin vznikající v redukční části katalytického cyklu oxidován účinkem kyslíku¹ (příklady viz řádky 2–3, tabulka I). Mechanismus reakce dihydroflavinů **FL-H₂** s kyslíkem je poměrně složitý, neboť zahrnuje více paralelně probíhajících cest¹⁷. Hlavní cesta vede přes tvorbu flavin-4a-

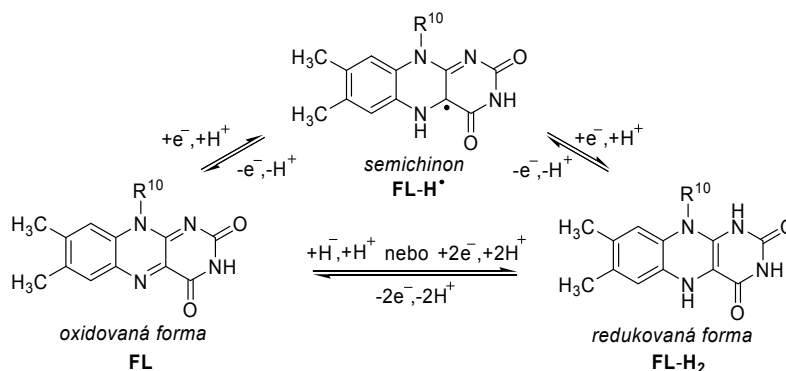


Schéma 1. Různé oxidační stupně flavinů

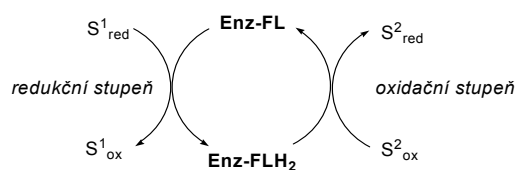


Schéma 2. Účinkování flavoenzymů v katalytickém cyklu

hydroperoxidu **FL-OOH**, který se velmi rychle rozkládá na konečné produkty, peroxid vodíku a oxidovanou formu flavinu **FL** (schéma 3).

Hlavním významem reakce kyslíku s redukováným flavinem v oxidasách je obnovení oxidované formy kofaktoru. Ve flavinových monooxygenasách však tato reakce slouží ke generování flavin-4a-hydroperoxidu **FL-OOH**, který v organismech vystupuje jako „přírodní peroxokyselina“. **FL-OOH** se může zúčastňovat oxidací probíhajících jak elektrofilním, tak nukleofilním mechanismem (schéma 4). Jako elektrofil vystupuje flavin-4a-hydroperoxid **FL-OOH** především v aromatických hydroxylasách. V organismech však flavin-4a-hydroperoxid **FL-OOH** oxiduje elektrofilním mechanismem i další substráty, jako terciární aminy či sulfidy, čímž se podílí na jejich degradaci^{3–6}. Jako nukleofil reaguje flavin-4a-peroxidový anion **FL-OO⁻** při Baeyerových-Villigerových oxidacích ketonů (schéma 4). Pro funkci monooxygenasy je nezbytný kofaktor NAD(P)H, který je obnovován spřaženým enzymovým systémem, a dále kyslík, který je stechiometrickým oxidačním činidlem. Po přenosu aktivovaného kyslíku na

substrát je katalytický cyklus v monooxygenasách uzavřen tvorbou 4a-hydroxyflavinu **FL-OH**, který eliminací vody poskytuje oxidovaný flavin (schéma 4).

3.1. Biokatalýza s využitím flavoenzymů

V posledních desetiletích jsou některé flavoenzymy^{5,6}, především Baeyer-Villiger-monooxygenasy^{18,19} (BVMO), předmětem intenzivního výzkumu v oblasti biokatalýzy. Z hlediska možného využití v biokatalýze je z této skupiny enzymů nejvíce studována cyklohexanon-monooxygenasa (CHMO), která vykazuje vysokou regioselektivitu a stereoselektivitu při Baeyerových-Villigerových oxidacích cyklohexanonů a cyklobutanonů, a 4-hydroxyacetofenon-monooxygenasa (HAPMO), která oxiduje aromatické ketony na arylestery karboxylových kyselin. Kromě aplikací na přírodních substrátech^{18,19} (cyklické a aromatické ketony) byly BVMO úspěšně testovány při oxidaci sulfidů na sulfoxidy²⁰ a terciárních aminů na *N*-oxidy²¹. Obě tyto reakce probíhají na rozdíl od Baeyerových-Villigerových reakcí elektrofilním mechanismem. Nukleofilní mechanismus se předpokládá u epoxidace²² a oxidace boru²³ katalyzované CHMO. Baeyerovy-Villigerovy oxidace, sulfoxidace a epoxidace probíhají v přítomnosti přírodní CHMO s dobrou enantioselektivitou. Nevýhodou je však poměrně úzký okruh substrátů, pro které je CHMO dostatečně účinná. Spektrum využitelnosti BVMO se daří rozšířit cílenou přípravou jejich mutantů^{24,25}.

Nevýhodou využití monooxygenasy pro syntetické aplikace ve větším měřítku je nezbytnost stechiometrické

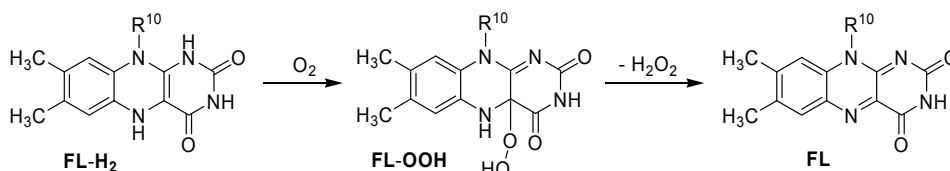


Schéma 3. Reakce dihydroflavinu s kyslíkem

Tabulka I

Příklady oxidační a redukční části katalytického cyklu ve flavoenzymech¹

| Řádek | Enzym | Redukční stupeň katalytického cyklu | Oxidační stupeň katalytického cyklu |
|-------|-------------------------|--|---|
| 1 | Glutathion-reduktasa | $\text{NADPH} \longrightarrow \text{NADP}^+$ | $\text{R-S-S-R} \longrightarrow 2 \text{RSH}$ |
| 2 | Oxidasa D-aminokyseliny | | $\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ |
| 3 | Vanilylalkohol-oxidasa | | $\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ |

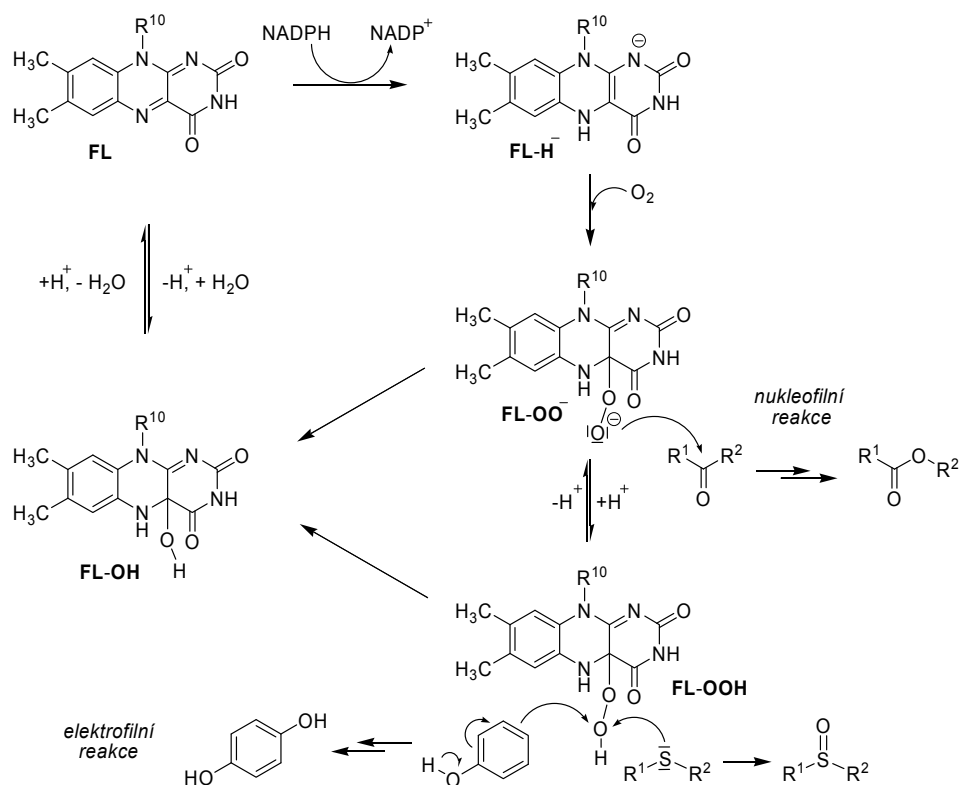


Schéma 4. Vznik a působení flavin-4a-hydroperoxidu ve flavoenzimech

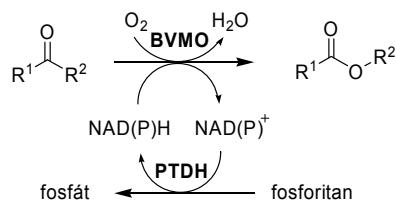


Schéma 5. Oxidace ketonů s využitím spřaženého systému enzymů

ho množství NAD(P)H. Tento problém může vyřešit použití celých buněk, ve kterých je tato forma kofaktoru regenerována jejich enzymovým aparátem. Například buňky *E. coli* obsahující CHMO byly využity k produkci laktonů z příslušných cyklických ketonů v kilogramovém měřítku²⁶. Buňky rekombinantu *E. coli* poskytující styrenmonooxygenasu byly využity při přípravě (*S*)-styrenoxidu epoxidací styrenu v množství 400 g (cit.²⁷). Dalším přístupem umožňujícím regeneraci NAD(P)H je použití dvou enzymů. Příkladem může být Baeyerova-Villigerova oxidace s využitím systému fenyliceton-monooxygenasa (PAMO) – fosforitan-dehydrogenasa (PTDH). PAMO zabezpečuje vlastní oxidaci ketonu, přičemž produkuje NADP⁺, který je zpět redukován pomocí PTDH na úkor fosforitanu, který je oxidován na fosfát²⁸ (schéma 5).

Vanilylalkohol-oxidasa (VAO) patří do skupiny flavinových oxidas. Jejím přírodním substrátem je vanilylalkohol, který VAO oxiduje na vanilin. VAO však byla úspěšně otestována na celé řadě jiných substrátů, například při oxidaci ethylbenzenu na 1-fenylethan-1-ol²⁹. Tato hydroxylace probíhá s enantioselektivitou³⁰ až 94 % *ee* s preferencí konfigurace *R*. Výhodou oxidas jako biokatalyzátorů je skutečnost, že nepotřebují pro svoji činnost další kofaktor.

Tzv. „old-yellow enzyme“ (OYE) představuje první izolovaný flavoenzym^{2,31}. Jeho biologická funkce však není dosud zcela objasněna. Tento enzym obsahující FMN jako kofaktor vystupuje především jako reduktasa, přičemž jako redukční činidlo využívá NADH. Jako biokatalyzátor byl OYE využit například při hydrogenaci α,β -nenasycených ketonů³². Výměnou kofaktoru FMN za 8-kyanoflavin dojde k přeměně OYE z reduktasy na desaturasu, která katalyzuje dehydrogenace ketonů a aldehydů na α,β -nenasycené deriváty³³ (schéma 6).

4. Katalytické systémy založené na derivátech flavinu

Všechny umělé katalytické systémy na bázi flavinů pracují podobně jako monooxygenasy – využívají fla-

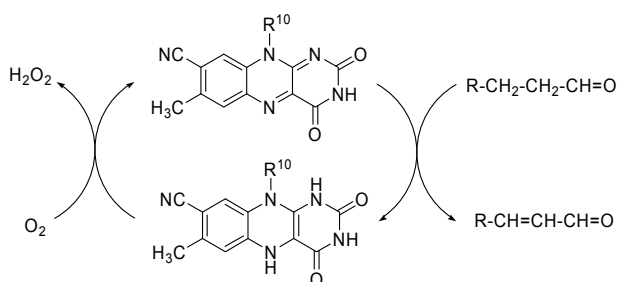


Schéma 6. Oxidace aldehydů účinkem OYE s modifikovaným kofaktorem

vinhydroperoxy pro zavádění kyslíku do molekuly substrátu. V umělých systémech jsou však příslušné hydroperoxy **FL-OOH** velmi nestabilní, což nedovoluje jejich využití jako oxidačních činidel. Problém se řeší použitím jejich 5-alkylanalog **I-OOH**, která lze připravit z odpovídajících 5-alkylflaviniových solí **I** reakcí s peroxidem vodíku, nebo reakcí 5-alkyldihydroflavinů **I-H₂**

s kyslíkem³⁴ (schéma 7). Uměle připravené 5-alkylflavin-4a-hydroperoxy oxidují podobně jako flavin-4a-hydroperoxy ve flavinových monooxygenasach terciární aminy, sulfidy či ketony. Uvedené oxidace byly prováděny nejprve ve stechiometrickém uspořádání, tj. smícháním substrátu s vypočteným množstvím předem připraveného flavin-4a-hydroperoxy. V posledních letech však byly úspěšně otestovány systémy, ve kterých je flavin-4a-hydroperoxy generován *in situ* z příslušné flaviniové soli přítomné v katalytickém množství^{34,35} (schémata 7–10). Stechiometrickým oxidačním činidlem v těchto systémech je buď peroxid vodíku nebo kyslík.

Při použití peroxidu vodíku jako stechiometrického oxidačního činidla je flavin-4a-hydroperoxy **I-OOH** generován reakcí flaviniové soli **I** s peroxidem vodíku (schéma 8). Systém založený na soli **Ia** byl úspěšně využit pro chemoselektivní oxidace sulfidů na sulfoxidy³⁶; **Ib** katalyzuje Baeyerovu-Villigerovu oxidaci³⁷ cyklobutanů. Murahashi³⁶ se zabýval kinetickým studiem oxidace sulfidů peroxidem vodíku v methanolu s využitím 5-ethyl-3,7,8,10-tetramethylisoalloxazinium-perchlorátu (**Ia**) jako

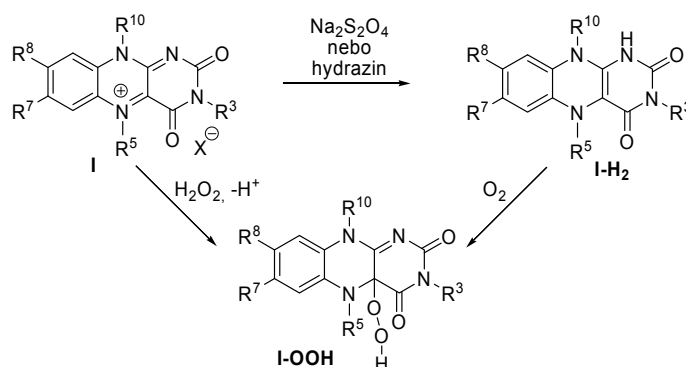
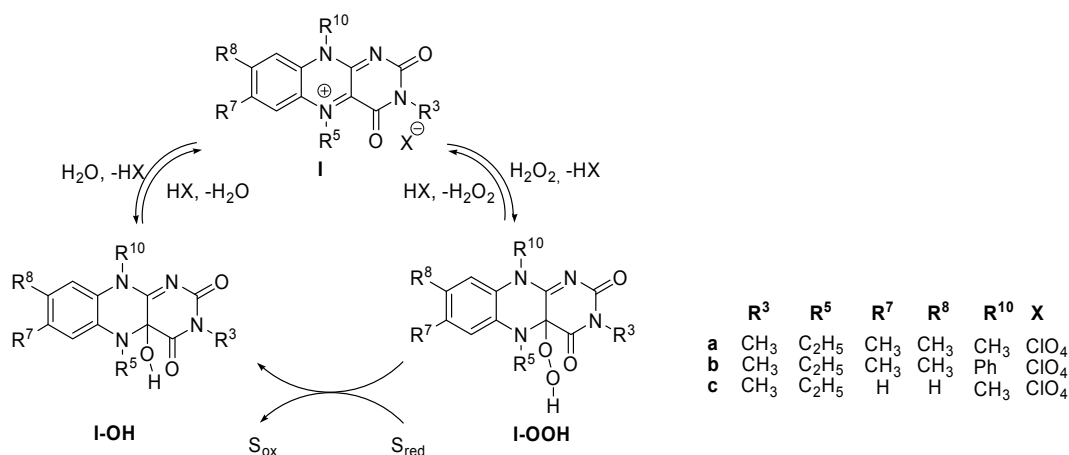


Schéma 7. Příprava 5-alkylflavin-4a-hydroperoxidů

Schéma 8. Průběh oxidace peroxidem vodíku v přítomnosti isoalloxaziniových solí **I**

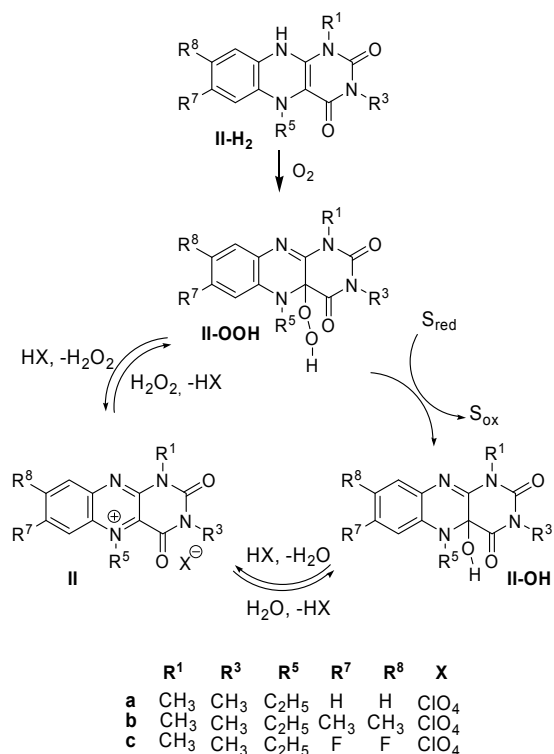


Schéma 9. Průběh oxidace peroxidem vodíku v přítomnosti alloxazinových soli II

katalyzátoru. Výsledky ukázaly, že rychlost určujícím dějem katalytického cyklu je tvorba soli I z pseudobáze I-OH.

Bäckvall se spolupracovníky optimalizoval strukturu flavinových soli s cílem dosažení co nejvyšší účinnosti katalyzátoru^{34,38,39}. Vedle derivátů isoalloxazinu I testoval rovněž deriváty alloxazinu II. Ve svých experimentech používal flavinové katalyzátory ve formě jejich dihydroderivátů I-H₂ a II-H₂, které sloužily jako prekurzory příslušné flavinové soli I, resp. II. Oxidace katalyzované deriváty alloxazinu II probíhají obdobným mechanismem jako oxidace katalyzované isoalloxaziny I. Autoři^{38,39} předpokládají, že za aerobních podmínek nejprve dochází k tvorbě flavin-4a-hydroperoxidu II-OOH reakcí dihydroderivátu II-H₂ s kyslíkem (schéma 9). Dále už flavin-4a-hydroperoxid II-OOH vzniká v každém katalytickém cyklu reakcí flavinové soli II s peroxidem vodíkem přidaným jako stechiometrické oxidační činidlo do reakční směsi.

Bäckvall zjistil, že za použitých podmínek jsou deriváty alloxazinu II daleko účinnějšími katalyzátory oxidací než deriváty odvozené od isoalloxazinu I (cit.³⁸). Tuto skutečnost autoři vysvětlují usnadněním rychlosti určujícího děje celého katalytického cyklu, totiž vzniku flavinové soli II z hydroxyflavinu II-OH, díky tvorbě aromatického pyraziniového jádra. Mezi testovanými alloxazinovými deriváty IIa-c je nejúčinnější 5-ethyl-1,3-dimethylalloxazinium-perchlorát (IIa) vznikající z 5-ethyl-1,3-di-

methyl-5,10-dihydroalloxazinu (IIa-H₂). Přídavek látky IIa-H₂ v množství 1,8 mol.% vzhledem k substrátu urychloval oxidaci 4-methylthioanisolu peroxidem vodíku 74× ve srovnání s nekatalyzovanou reakcí³⁸. Ještě většího urychlení oproti nekatalyzované reakci (až 136násobné v případě derivátu IIa) vykazují flavinové soli při oxidacích thioanisolu peroxidem vodíku v micelách hexadecyltrimethylamonium-nitrátu^{40,41}. Toto zvýšení poměru rychlosti katalyzované a nekatalyzované reakce je způsobeno jednak urychlením katalyzované reakce a jednak zpomalením nekatalyzované reakce v prostředí kationických micel. Flaviny II-H₂ katalyzují rovněž oxidaci terciárních aminů na N-oxidy⁴². Například oxidace benzyldimethylaminu byla v methanolu 67× rychlejší v přítomnosti 2,5 mol.% látky IIa-H₂ než bez přítomnosti katalyzátoru.

Druhý katalytický systém^{34,43,44}, využívající jako stechiometrické oxidační činidlo kyslík, byl testován pouze s isoalloxazinovými deriváty I (schéma 10). Pro funkci tohoto katalytického cyklu je nezbytná přítomnost stechiometrického množství redukčního činidla A_{red} (například hydrazinu) generujícího dihydroflavin I-H₂ ze soli I. Reakcí I-H₂ s kyslíkem pak vzniká flavin-4a-hydroperoxid I-OOH, který oxiduje substrát. Rovněž tento systém je chemoselektivní a poskytuje pouze sulfoxidy bez přeoxidování na sulfony. Za přítomnosti 1 mol.% soli Ia za aerobních podmínek (1 atm O₂) bylo dosaženo vysokých výtěžků (> 95 %) jak v případě oxidace sulfidů, tak terciárních aminů.

Oxidace kyslíkem za katalýzy flavinovými solemi jsou prováděny nejčastěji ve fluorovaných alkoholech pro dosažení vyšší koncentrace rozpuštěného kyslíku. Relativně kyselá fluoralkoholy v oxidačních systémech využívajících hydrazin k redukci soli I rovněž ovlivňují reaktivitu

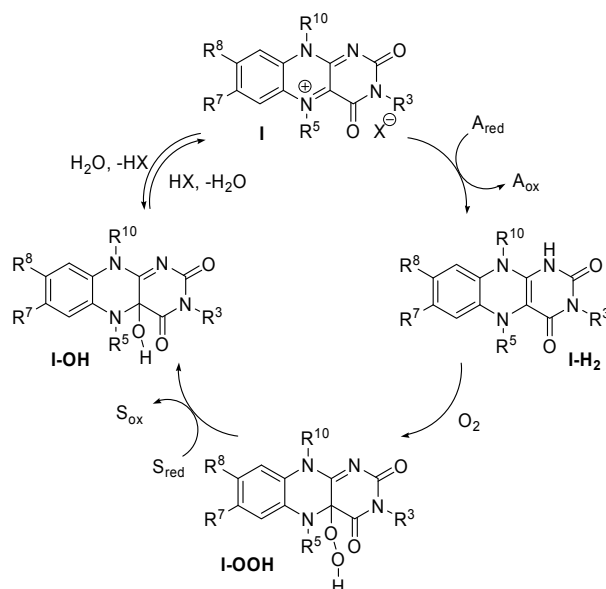
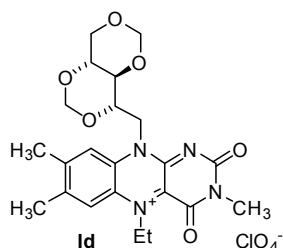


Schéma 10. Průběh oxidace kyslíkem v přítomnosti isoalloxazinových soli I

hydrazinu. Hydrazin je díky α -efektu silnějším nukleofilem ve srovnání se sulfidy či aminy a reaguje v nefluorovaných alkoholech s flavin-4a-hydroperoxidem přednostně namísto substrátu⁴⁴; oxiduje se při tom na diimid. Ve fluorovaných alkoholech je však jeho nukleofilita snížena interakcí s rozpouštědlem, a proto přednostně probíhá oxidace sulfidu či aminu.

Analogický systém využívající sůl **Id** jako katalyzátor a zinek jako redukční činidlo oxiduje cyklobutanony ve směsi rozpouštědel acetonitril-ethylacetát-voda 8:1:1 ve smyslu Baeyerovy-Villigerovy reakce. Oxidace probíhá i v přítomnosti 4-methylthioanisolu nebo cyklooktenu; vzniká pouze malé množství sulfoxidu a žádný epoxid⁴⁵.

Využití chirálních flaviniových solí pro stereoselektivní oxidace je zatím spíše sporadické. Shinkai^{46,47} a Murahashi⁴⁸ připravili chirální soli **III** a **IV**, v jejichž přítomnosti prováděli oxidace aryl(methyl)sulfidů peroxidem vodíku. S využitím 10 molárních procent látky (+)-**III** bylo dosaženo při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ *ee* 19 až 65 %. Sůl **IV** katalyzovala oxidaci methyl(naftyl)sulfidu s *ee* až 72 %. V přítomnosti planárně chirální bisflaviniové soli **V** byly při $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ oxidovány *p*-substituované 3-fenylcyklobutanony peroxidem vodíku na příslušné laktony s *ee* 61 až 68 % (cit.⁴⁹). V případě 3-(4-fluorfenyl)cyklobutanonu bylo při $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ dosaženo *ee* až 74 %.



Jak bylo uvedeno dříve, flaviniové soli oxidují hydrazin na diimid, který je známý jako mírné redukční činidlo pro nenasyčené vazby. Na těchto skutečnostech je založen systém, který využívá katalytické množství flaviniové soli **I**, 1–2 ekvivalenty hydrazinu jako prekurzoru diimidu a kyslík⁵⁰, který slouží k reoxidaci přechodně vznikajícího dihydroflavinu **I-H₂** na flavin-4a-hydroperoxid **I-OOH** (schéma 11). Tento systém realizovaný v alkoholech redukuje vazbu C=C, a to dokonce v přítomnosti nukleofilní síry v sulfidech⁵¹ (nevzniká sulfoxid).

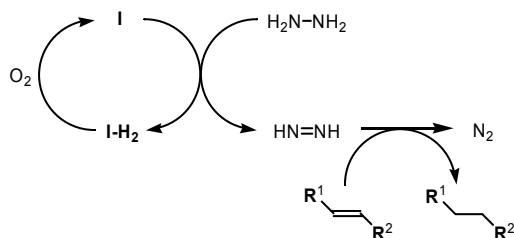
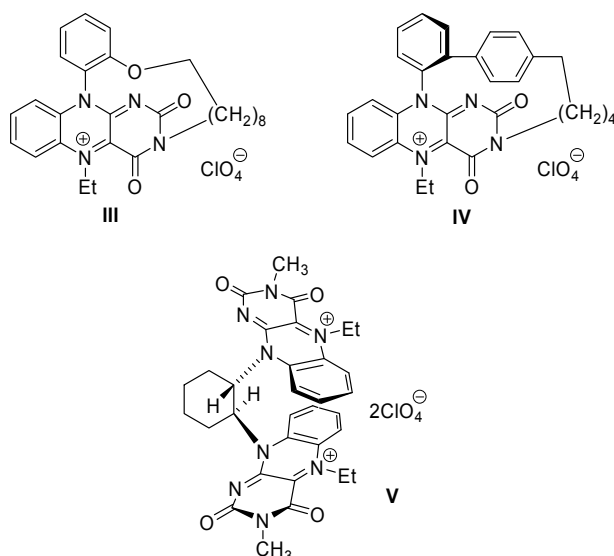


Schéma 11. Redukce alkenů diimidem generovaným z hydrazinu účinkem flaviniové soli **I**



5. Závěr

V průběhu posledních dvaceti let lze zaznamenat zvýšený zájem o výzkum v oblasti katalýzy flavinovými deriváty. Byly popsány účinné systémy využívající flaviniové soli jako katalyzátory oxidace sulfidů, aminů a cyklických ketonů. Externím oxidačním činidlem je kyslík nebo peroxid bez přítomnosti kovu. Jedná se tedy po všech stránkách o systémy šetrné k životnímu prostředí. Při výběru reakcí vhodných pro katalýzu flavinovými deriváty se autoři inspirovali biologickými procesy katalyzovanými flavoenzymy. Z uvedených příkladů chování flavinů ve flavoenzymech navíc vyplývá, že seznam substrátů by nemusel být konečný a že flaviny by mohly být využitelné i pro jiné typy transformací. Prvním takovým příkladem je redukce alkenů diimidem generovaným účinkem flaviniových solí.

Práce byla sepsána za podpory MŠMT České republiky (výzkumný záměr č. MSM 6046137301).

LITERATURA

1. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Müller F., ed.). CRC, Boca Raton 1991.
2. Massey V.: *Biochem. Soc. Trans.* 28, 283 (2000).
3. Palfey B., Massey V., v knize: *Comprehensive Biological Catalysis* (Sinnott M., ed.), sv. 3, str. 83. Academic Press, London 1998.
4. Ghisla S., Massey V.: *Eur. J. Biochem.* 181, 1 (1989).
5. Moonen M. J. H., Fraaije M. W., Rietjens I. M. C. M., Laane C., van Berkel W. J. H.: *Adv. Synth. Catal.* 344, 1023 (2002).
6. Joosten V., van Berkel W. J. H.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 195 (2007).
7. *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences* (Silva E., Edwards A. M., ed.), sv. 6.

- RSC Publishing, Cambridge 2006.
8. Kowalczyk M., Sikorska E., Khmelinskii I. V., Komasa J., Insińska-Rak M., Sikorski M.: *J. Mol. Structure: Theochem* 756, 47 (2005).
 9. Losi A., Gärtner W.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1168 (2008).
 10. Losi A.: *Photochem. Photobiol.* 83, 1283 (2007).
 11. Heelis P. F., Hartman R. F., Rose S. D.: *Chem. Soc. Rev.* 1995, 289.
 12. Sancar A.: *Chem. Rev.* 103, 2203 (2003).
 13. Tu S.-C.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 183 (2008).
 14. Ghisla S., Hartmann U., Hemmerich P., Müller F.: *Liebigs Ann. Chem.* 1973, 1388.
 15. Kuhn R., Weygand F.: *Chem. Ber.* 67, 1409 (1934).
 16. Niemz A., Imbriglio J., Rotello V. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 887 (1997).
 17. Massey V.: *J. Biol. Chem.* 269, 22459 (1994).
 18. Kamerbeek N. M., Janssen D. B., van Berkel W. J. H., Fraaije M. W.: *Adv. Synth. Catal.* 345, 667 (2003).
 19. Mihovilovic M. D.: *Curr. Org. Chem.* 10, 1265 (2006).
 20. Colonna S., Gaggero N., Pasta P., Ottolina G.: *Chem. Commun.* 1996, 2303.
 21. Ottolina G., Bianchi S., Belloni B., Carrea G., Danieli B.: *Tetrahedron Lett.* 40, 8483 (1999).
 22. Colonna S., Gaggero N., Ottolina G., Pasta P., Zambianchi F.: *Tetrahedron Lett.* 43, 1797 (2002).
 23. Branchaud B. P., Walsh C. T.: *J. Am. Chem. Soc.* 107, 2153 (1985).
 24. Reetz M. T., Brunner B., Schneider T., Schulz F., Cluothier M., Kayser M. M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 4075 (2004).
 25. Reetz M. T., Daligault F., Brunner B., Hinrichs H., Deege A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 4078 (2004).
 26. Hilker I., Wohlgenuth R., Alphand V., Furstoss R.: *Biotechnol. Bioeng.* 92, 702 (2005).
 27. Panke S., Held M., Wubbolts M. G., Witholt B., Schmid A.: *Biotechnol. Bioeng.* 80, 33 (2002).
 28. Pazmino D. E. T., Snajdrova R., Baas B.-J., Ghobrial M., Mihovilovic M. D., Fraaije M. W.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2275 (2008).
 29. Drifhout F. P., Fraaije M. W., Jongejan H., van Berkel W. J. H., Franssen M. C. R.: *Biotechnol. Bioeng.* 59, 171 (1998).
 30. van Heuvel R. H. H., Fraaije M. W., Mettevi A., Laane C., van Berkel W. J. H.: *J. Mol. Catal., B* 11, 185 (2001).
 31. Williams R., Bruce N. C.: *Microbiology* 148, 1607 (2002).
 32. Stott K., Saito K., Thiele D. J., Massey V.: *J. Biol. Chem.* 268, 6097 (1993).
 33. Murthy Y. V. S. N., Meah Y., Massey V.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5344 (1999).
 34. Gelalcha F. G.: *Chem. Rev.* 107, 3338 (2007).
 35. Bäckvall J.-E., v knize: *Modern Oxidation Methods* (Bäckvall J.-E., ed.), str. 193. Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2004.
 36. Murahashi S.-I., Oda T., Masui Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 111, 5002 (1989).
 37. Mazzini C., Lebreton J., Furstoss R.: *J. Org. Chem.* 61, 618 (1996).
 38. Minidis A. B. E., Bäckvall J.-E.: *Chem. Eur. J.* 7, 297 (2001).
 39. Lindén A. A., Hermanns N., Ott S., Krüger L., Bäckvall J.-E.: *Chem. Eur. J.* 11, 112, (2005).
 40. Bergstad K., Bäckvall J.-E.: *J. Org. Chem.* 63, 6650 (1998).
 41. Baxová L., Cibulka R., Hampl F.: *J. Mol. Catal., A* 277, 53 (2007).
 42. Cibulka R., Baxová L., Dvořáková H., Hampl F., Měnová P., Mojr V., Plancq B., Sayin S.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 973 (2009).
 43. Imada Y., Iida H., Ono S., Murahashi S.-I.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 2868 (2003).
 44. Imada Y., Iida H., Ono S., Masui Y., Murahashi S.-I.: *Chem. Asian J.* 2006, 136.
 45. Imada Y., Iida H., Murahashi S.-I., Naota T.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 1704 (2005).
 46. Shinkai S., Yamaguchi T., Kawase A., Kitamura A., Manabe O.: *Chem. Commun.* 1987, 1506.
 47. Shinkai S., Yamaguchi T., Manabe O., Toda F.: *Chem. Commun.* 1988, 1399.
 48. Murahashi S.-I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 34, 2443 (1995).
 49. Murahashi S.-I., Ono S., Imada Y.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2366 (2002).
 50. Imada Y., Iida H., Naota T.: *J. Am. Chem. Soc.* 127, 14544 (2005).
 51. Smit C., Fraaije M. W., Minnaard A. J.: *J. Org. Chem.* 73, 9482 (2008).

R. Cibulka (*Department of Organic Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **Flavins – Promising Oxidation and Reduction Catalysts**

Flavins contained in flavoenzymes are versatile oxidizing and reducing agents. This fact inspired many researchers to test flavin derivatives as oxidation or reduction catalysts in organic synthesis. In this article, flavin-based catalytic and biocatalytic systems are reviewed. Relevant flavin properties are discussed in the context with their possible catalytic applications.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ MODERNÍCH REVERZNÍCH STACIONÁRNÍCH FÁZÍ NA BÁZI OXIDU ZIRKONIČITÉHO PRO ANALÝZU BIOAKTIVNÍCH PEPTIDŮ

LUCIE JANEČKOVÁ^a, JANA SOBOTNÍKOVÁ^a,
EVA TESAŘOVÁ^b a ZUZANA BOSÁKOVÁ^a

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,
^a Katedra analytické chemie, ^b Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
lucie.janeckova@t-email.cz

Došlo 13.11.08, přijato 5.6.09.

Klíčová slova: HPLC, kolony na bázi oxidu zirkoničitého, bioaktivní peptidy

Úvod

Studium a analýza biologicky aktivních látek je předmětem výzkumu mnoha vědních oborů, zejména biochemie, analytické chemie, molekulární biologie, farmakologie a medicíny. Schopnosti detegovat, kvantifikovat a modelovat biologicky významné molekuly jsou nepostradatelné pro studium základních životních funkcí¹. Z pohledu analytické chemie jde o vývoj selektivních a účinných separačních metod pro analýzy složitých směsí těchto látek. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie tyto požadavky splňuje; poskytuje rychlé a účinné separace s vysokým rozlišením. Tuto metodu lze s úspěchem aplikovat na analýzu biologicky aktivních peptidů², látek slabého až výrazného bazického charakteru. Separace těchto látek o velmi nízkých koncentracích je umožněna vhodnou volbou stacionární a mobilní fáze.

V technice HPLC zaujímá dominantní pozici reverzní separační mód (RP-HPLC)^{3–9}. Nejrozšířenějším nosičem stacionární fáze v RP-HPLC se stal silikagel, polymerní oxid křemičitý. Silikagelové částice jsou mechanicky stabilní a mají velký povrch, který lze modifikovat navázáním stacionární fáze a získat tak rozmanité systémy s různými mechanismy dělení. Hlavní nevýhodou silikagelu je jeho nestabilita při extrémních hodnotách pH a vyšších teplotách^{10,11}. Při nízkých hodnotách pH (pH < 2) je siloxanová vazba nestabilní a dochází ke ztrátě navázané stacionární fáze; při vyšších hodnotách pH (pH > 8) se silikagel rozpouští. Omezení v hodnotách pH mobilní fáze je limitující faktor zvláště při separacích bazických látek.

Zbytkové silanolové skupiny na povrchu silikagelu také značně komplikují separační proces¹². Tyto nežádoucí vlastnosti silikagelu vedly k vývoji nových nosičů stacionární fáze, které by rozšířily pracovní rozsah hodnot pH a teploty a poskytly tak nové možnosti při vyvíjení analytických metod¹³.

Výzkum vlastností některých kovů (Zr, Ti, Al) a jejich oxidů vedl k perspektivním výsledkům^{13–15}. Oxid zirkoničitý (ZrO₂) se zdá být teplotně a chemicky nejstabilnější ze studovaných oxidů^{16–21}. ZrO₂ je amfoterní oxid, vykazující kationtově- i aniontově-výměnné interakce, které závisejí na hodnotě pH a povaze použitého pufru^{14,22,23}. Pro látky iontové povahy tedy existují sekundární interakce (iontově-výměnné) s povrchem nosiče, které významně ovlivňují selektivitu a retenci analytů. Atom Zr ve vazbě Zr-O-Zr má volné d-orbitály, což ho činí akceptorem elektronového páru, je tedy Lewisovou kyselinou. To umožňuje silné ligandově-výměnné interakce s Lewisovými zásadami, mezi které patří např. fosforečnanové, fluoridové, octanové nebo karboxylové ionty či hydroxyskupiny^{23–26}. Dochází k silné adsorpci těchto iontů z mobilní fáze na povrch částic ZrO₂, který je tak dynamicky modifikován. Adsorbovaná Lewisova zásada se pak chová jako iontově-výměnná skupina a může se účastnit iontově-výměnných interakcí s ionizovatelnými analyty.

Modifikací povrchu ZrO₂ organickými polymery (polybutadienem a polystyrenem) byly vyvinuty nové stacionární fáze²⁷ stabilní v celém rozsahu pH (1–14) a při teplotách do 200 °C, které lze využít v reverzním módu HPLC. Separace je založena jednak na hydrofobních interakcích molekul analytů se stacionární fází, a dále na iontově-výměnných interakcích s adsorbovanou Lewisovou bází. Tento smíšený retenční mód lze s úspěchem aplikovat na separaci peptidů¹⁸.

Nonapeptidy, Arg-vasopresin, oxytocin a další strukturně i funkčně blízké peptidy, vykazují značnou biologickou aktivitu nejen v lidském organismu. Arg-vasopresin, známý pod označením antidiuretický hormon (ADH), má fyziologickou úlohu v ledvinách²⁸, reguluje retenci vody a zvyšuje její zpětné vstřebávání²⁹. Vyvoláním vazokonstrikce také zvyšuje krevní tlak. Oxytocin má vliv na frekvenci a sílu kontrakce hladké svaloviny dělohy; toho se využívá v porodnictví. Nové poznatky v oblasti zkoumání fyziologických funkcí nonapeptidů se týkají procesů učení a paměti, sociálního a sexuálního chování, úzkosti, deprese a agresivity^{30–34}. Arg-vasopresin mj. podporuje agresi a dominanci³⁴, charakteristické znaky samčího sociálního chování. Oxytocin má vliv na sexuální a sociální chování u obou pohlaví, ale hraje významnou roli v mateřství. Arg-vasotocin^{31,32,35,36} je vývojově starší hormon, vyskytující se u nižších obratlovců. Působí antidiuretický jako Arg-vasopresin a má vliv na sexuální chování podobně jako oxytocin. Lys-vasopresin je syntetický derivát Arg-

vasopresinu s nižší anti-diuretickou aktivitou.

V této práci bylo studováno chromatografické chování nonapeptidů na moderních separačních médiích s nosičem ZrO₂ a reverzními stacionárními fázemi polybutadienem (PBD) a polystyrenem (PS). Tyto stacionární fáze byly nejdříve charakterizovány Waltersovým testem, jedním z testů pro reverzní stacionární fáze. Dále byly na těchto stacionárních fázích optimalizovány separační podmínky, tzn. byl studován vliv složení mobilní fáze (typ, koncentrace a pH pufru, typ a množství organického modifikátoru) a vliv teploty na separační parametry (retenční faktor, účinnost, rozlišení, symetrie píků) jednotlivých analytů. V optimalizovaných separačních systémech byly určeny kvantifikační parametry – limity detekce a stanovitelnosti pro vybrané nonapeptidy.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Veškerá měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu, který se skládal z gradientového čerpadla Ecom Beta 10, UV-VIS spektrofotometrického detektoru Sapphire 800 a vakuového odplyňovače mobilní fáze Ecom Vacuum Degasser DG 3014 (vše Ecom, Praha, ČR). K dávkování byl použit dávkovací ventil Rheodyne, model 7725i s 5 µl dávkovací smyčkou (Cotati, USA). Pro sběr dat a vyhodnocení chromatogramů byl použit program Clarity, verze 2.3.0.174 od firmy Data Apex (Praha, ČR).

Roztoky pufrů a peptidů byly připravovány odvážením příslušných množství na analytických vahách APX-100 (Denver Instruments, USA). Hodnota pH pufru byla kontrolována pH-metrem 3510 (Jenway, Velká Británie). Kolony byly termostatovány v termostatu Column Oven LCO 101 (Ecom, ČR).

K separaci byly použity kolony Discovery Zr-PBD a Discovery Zr-PS (Supelco, Bellefonte, USA). Obě kolony mají shodné parametry, tj. rozměry 25 cm × 4,6 mm, velikost částic 5 µm, velikost pórů 300 Å.

Chemikálie a vzorky

Acetonitril Chromasolv[®] pro HPLC byl získán od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Fosforečnanový pufr (NaH₂PO₄·2 H₂O, p.a.; Na₂HPO₄·12 H₂O, p.a.) byl produktem firmy Penta (Chrudim, Česká republika), kyselina fosforečná (p.a., 85%) a hydroxid sodný (p.a.) pro úpravu pH pufru byly od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). Deionizovaná voda byla připravována v přístroji Milli Q (Millipore, Milford, USA).

Pro Waltersův test byly použity následující chemikálie: antracen (purum, >98%, HPLC; Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko), *N,N*-diethyl-*m*-toluamid (*N,N*-DETA; purum, >99%, GC, Fluka Chemie AG) a benzen (HPLC grade, Sigma-Aldrich).

Vzorky nonapeptidů byly komerční syntetické preparáty, produkty firmy Sigma-Aldrich. Jejich pořadí amino-

Tabulka I

Struktury studovaných nonapeptidů

| Peptid | Sekvence aminokyselin |
|----------------|-------------------------------------|
| Oxytocin | Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly |
| Arg-vasotocin | Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly |
| Arg-vasopresin | Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly |
| Lys-vasopresin | Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly |

kyselin ukazuje tabulka I. Mezi cysteinovými zbytky v poloze 1 a 6 se tvoří disulfidický můstek. Bez dalších úprav byly tyto látky rozpuštěny v deionizované vodě a byly tak získány zásobní roztoky o koncentraci 1 mg ml⁻¹. Z těchto zásobních roztoků byla připravena směs peptidů pro jejich analýzu a sada roztoků pro kvantifikaci jednotlivých peptidů. K určení mrtvého času byl použit uracil (Sigma-Aldrich), jehož zásobní roztok měl koncentraci 0,1 mg ml⁻¹.

Výsledky a diskuse

Pro analýzu nonapeptidů byl použit systém reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC). Byly použity dvě kolony se zirkoniovým nosičem modifikovaným polybutadienem (Discovery Zr-PBD) a polystyrenem (Discovery Zr-PS). Tyto stacionární fáze byly nejdříve otestovány Waltersovým testem, dále byly na těchto stacionárních fázích optimalizovány podmínky pro separaci čtyř biologicky aktivních nonapeptidů a pro optimalizované separační systémy byly určeny kvantifikační parametry – limity detekce a stanovitelnosti.

Na základě údajů z literatury^{18,37} byly mobilní fáze pro optimalizaci separace nonapeptidů zpravidla složeny z acetonitrilu (ACN) a fosforečnanového pufru a pro detekci peptidů byla zvolena vlnová délka 214 nm.

Waltersův test – testování vlastností reverzních stacionárních fází

Z několika testů pro reverzní stacionární fáze byl vybrán test podle Walterse³⁸, určující index hydrofobnosti a silanolový index v prostředí acetonitrilu. Označení silanolový index není příliš vhodné pro stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého, avšak jeho hodnota vypovídá o polárních interakcích analytů se stacionární fází a jejím nosičem. Silanolový index byl z těchto důvodů označen v této práci jako index polarit.

Index hydrofobnosti (HI) je podíl retenčních faktorů antracenu a benzenu, při použití mobilní fáze ACN/voda (65/35, v/v). Index polarit (SI) je podíl retenčních faktorů *N,N*-diethyl-*m*-toluamidu (*N,N*-DETA) a antracenu, při použití čistého ACN jako mobilní fáze. Mrtvý čas kolony je určen retenčním časem uracilu v mobilní fázi ACN/voda (65/35, v/v). Experimentální podmínky, předepsané pro tento test, jsou: průtoková rychlost 1 ml min⁻¹, dávkován

Tabulka II

Hodnoty indexů hydrofobnosti a polarity pro použité stacionární fáze

| Kolona | Stacionární fáze | HI | SI |
|------------------|------------------|------|------|
| Discovery Zr-PBD | Zr-PBD | 5,40 | 1,00 |
| Discovery Zr-PS | Zr-PS | 5,52 | 0,98 |

1 μ l testovací směsi, UV detekce při 254 nm.

Z výsledků v tab. II je patrné, že obě kolony na bázi oxidu zirkoničitého mají velmi podobné separační vlastnosti pro nepolární analyty. Tyto kolony vykazují značně nepolární charakter, uplatňují se výrazné nepolární interakce stacionární fáze s analyty. Kolony se silikagelovým nosičem a reverzní stacionární fází poskytují hodnoty HI nižší; pro oktadecylové stacionární fáze (C_{18}) jsou běžné hodnoty HI menší nebo rovny 4, oktylové stacionární fáze (C_8) mají hodnoty HI menší nebo rovny 3 (cit.²).

Hodnota indexu polarit SI poskytuje informaci o polárních interakcích analytů se stacionární fází a jejím nosičem. Kolony se silikagelovým nosičem by měly mít hodnotu SI co nejmenší, protože pak nežádoucí interakce analytů a zbytkových silanolových skupin jsou minimální. U kolon na bázi ZrO_2 jsou hodnoty indexu polarit SI větší, což odpovídá předpokládanému mechanismu separace, kdy sekundární iontové interakce jsou žádoucí, jsou podporovány a navíc aktivovány dynamickou modifikací povrchu částic adsorbovanou Lewisovou zásadou.

Separace nonapeptidů na koloně Discovery Zr-PBD

Na koloně Discovery Zr-PBD bylo studováno chromatografické chování čtyř nonapeptidů. Změny iontové síly, pH a složení mobilní fáze a také pracovní teploty ovlivňují separaci a tyto vlivy byly během optimalizace studovány. Na základě údajů z literatury^{18,37,39} byly mobilní fáze pro optimalizaci separace nonapeptidů složeny z ACN a fosforečnanového pufru a pro detekci peptidů byla zvolena vlnová délka 214 nm.

Vliv pH a koncentrace pufru na retenční chování nonapeptidů

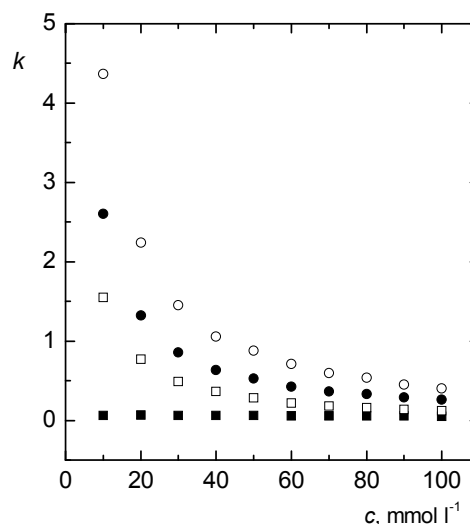
Interakce mezi analyty a reverzními kolonami na bázi zirkonia silně závisejí na použitém pufru. Literatura³⁹ poukazuje na vhodnost použití fosforečnanového pufru vzhledem k jeho nízké absorbanci a možnosti použití v celém rozsahu pH.

Výchozí podmínky separace nonapeptidů na koloně Discovery Zr-PBD byly následující: mobilní fáze složená z 20 obj.% ACN a 80 obj.% fosforečnanového pufru; koncentrace fosforečnanového pufru byla 50 mmol l^{-1} a hodnota pH byla 12. Tyto podmínky byly zvoleny na základě údajů z literatury³⁷ a také hodnot isoelektrických bodů zkoumaných nonapeptidů, které se nacházejí v alkalické oblasti. Zároveň chemická stabilita stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého dovoluje použití vyšších hodnot

pH mobilní fáze než stacionární fáze na bázi silikagelu. Za těchto podmínek oxytocin eluoval s mrtvým časem, hodnoty rozlišení pro ostatní analyty byly uspokojivé, avšak eluční křivky všech analytů byly nesymetrické, hodnoty faktorů asymetrie byly větší než 2.

Vliv pH použitého pufru na chování analytů byl studován v rozmezí hodnot 4–12. Vyšší hodnoty pH vodné složky mobilní fáze vedly ke zkrácení doby analýzy, ale ne ke zhoršení rozlišení analytů. Retence analytů v kyselé oblasti byla větší, oxytocin vykazoval retenci při pH 4 a 5, kdy však doba analýzy byla větší než 25 min, píky ostatních analytů byly rozmyté a hodnoty rozlišení zbytečně vysoké. Píky analytů nevykazovaly uspokojivou symetrii. Pro další optimalizaci bylo vybráno pH vodné složky mobilní fáze 10. Za těchto podmínek sice oxytocin eluoval s mrtvým časem, analýzy ovšem byly krátké (do 6 min), poskytovaly rozlišení větší než 1,2 a faktory asymetrie kolem hodnoty 2.

V dalším optimalizačním kroku bylo sledováno chromatografické chování nonapeptidů v rozmezí koncentrace fosforečnanového pufru 10–100 mmol l^{-1} . Obr. 1 ukazuje závislost retenčních faktorů k jednotlivých analytů na koncentraci použitého pufru. Nižší koncentrace fosforečnanového pufru způsobovala větší retenci všech analytů. Nízká iontová síla pufru o koncentraci 10 mmol l^{-1} byla příčinou velké retence Lys-vasopresinu ($k=4,4$), kdy analýzy byly delší než 14 min a píky analytů rozmyté. Oxytocin při vyšších koncentracích pufru koeluoval s uracilem, při koncentracích menších než 50 mmol l^{-1} vykazoval malou retenci, která se ovšem při snižující se koncentraci pufru nezvyšovala. Retenční faktor oxytocinu pro koncentrace



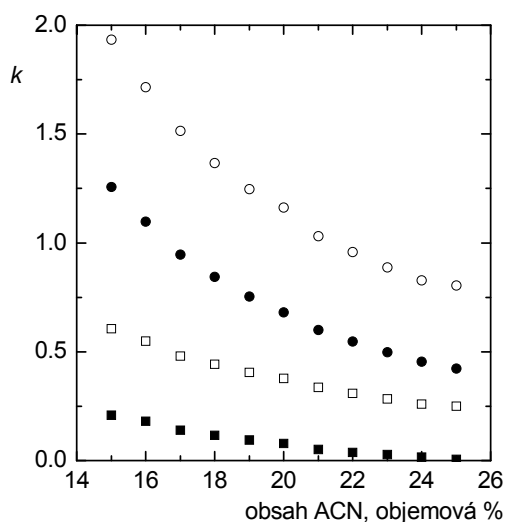
Obr. 1. Závislost retenčních faktorů k na koncentraci fosforečnanového pufru; separace na koloně Discovery Zr-PBD; mobilní fáze ACN/fosforečnanový pufr, pH 10 (20/80, v/v); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkovací smyčka 5 μ l; UV detekce při 214 nm; ■ oxytocin, □ Arg-vasotocin, ● Arg-vasopresin, ○ Lys-vasopresin

10–40 mmol l⁻¹ byl 0,06. Hodnoty rozlišení ostatních analytů při koncentracích nižších než 50 mmol l⁻¹ byly větší než 2,4, a tudíž dostatečné. Pro další optimalizaci byla tedy zvolena koncentrace fosforečnanového pufru 40 mmol l⁻¹. Při této koncentraci byla hodnota rozlišení oxytocinu nejvyšší, časy analýz byly kratší než 6 min a hodnoty faktorů asymetrie se stále pohybovaly kolem 2.

Vliv poměru organického modifikátoru a fosforečnanového pufru na retenční chování nonapeptidů

Pro studium vlivu poměru organického modifikátoru a fosforečnanového pufru byly použity výsledné podmínky výše uvedené. Mobilní fáze byla složena z ACN a fosforečnanového pufru o koncentraci 40 mmol l⁻¹ a hodnotě pH 10. Obsah ACN v mobilní fázi byl zkoušen v rozmezí 15–25 obj.% a byl měněn vždy po 1 %. Separace peptidů obecně je velmi citlivá na změnu obsahu organické složky v mobilní fázi, takže i malá změna v obsahu ACN, typicky jedno objemové procento, znamená významnou změnu v separačním chování těchto látek. Na obr. 2 je vynesena závislost retenčních faktorů *k* jednotlivých analytů na obsahu ACN v mobilní fázi.

Ze získaných výsledků je patrné, že s rostoucím obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi klesala retence všech studovaných látek. Větší eluční síla způsobovala nedostatečné rozlišení oxytocinu a jeho následnou eluci v mrtvém čase při použití mobilní fáze obsahující 23 a více obj.% ACN. Nižší obsah ACN sice vedl ke zlepšení rozlišení oxytocinu, ale rozlišení ostatních analytů se prak-



Obr. 2. Závislost retenčních faktorů *k* na obsahu ACN v mobilní fázi; separace na koloně Discovery Zr-PBD; mobilní fáze ACN/40 mmol l⁻¹ fosforečnanový pufr, pH 10; průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkovací smyčka 5 μl; UV detekce při 214 nm; ■ oxytocin, □ Arg-vasotocin, ● Arg-vasopresin, ○ Lys-vasopresin

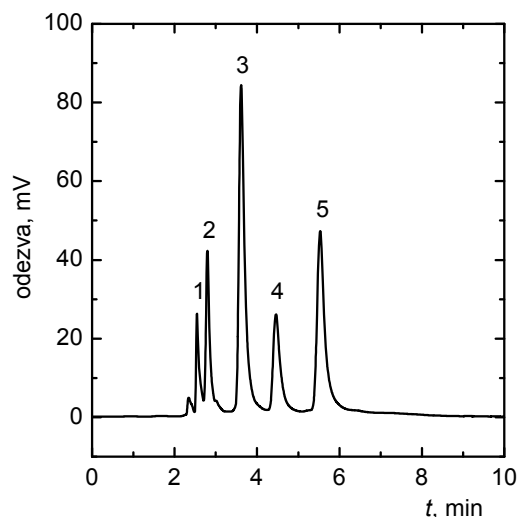
ticky neměnilo. Faktory asymetrie se stále pohybovaly kolem 2. Při použití mobilní fáze obsahující 18 obj.% ACN byly hodnoty rozlišení všech analytů dostatečné (větší než 2) a doba analýzy byla kratší než 7 min. Proto byly tyto podmínky z hlediska složení mobilní fáze zvoleny jako optimální pro separaci vybraných nonapeptidů na koloně Discovery Zr-PBD.

Vliv separační teploty na retenční chování nonapeptidů

Poslední parametr, jehož vliv na separaci byl studován, byla teplota kolony při analýze. Obecně zvýšená separační teplota zrychluje přenos hmoty během separačního procesu, a tak může pozitivně ovlivnit analýzu. Kolony na bázi oxidu zirkoničitého umožňují použití vyšších pracovních teplot než kolony se silikagelovým nosičem. Použitá kolona Discovery Zr-PBD byla termostátována a byly provedeny analýzy při teplotách 25–75 °C. Získané výsledky jsou shrnuty v tab. III.

Vyšší separační teplota snižuje viskozitu mobilní fáze; analýzy za vyšších teplot obecně vedou ke snížení retence analytů a ke zlepšení faktorů asymetrie. Použití vyšších teplot při analýzách na koloně Discovery Zr-PBD sice vedlo ke snížení retence analytů, avšak hodnoty faktorů asymetrie se výrazně nezlepšily. Píky analytů sice změnil tvar, byly vyšší a užší, ale stále vykazovaly jistou asymetrii. Na základě hodnot faktorů asymetrie a s přihlédnutím k zachování biologické aktivity studovaných látek byla vybrána jako nejvhodnější teplota 45 °C.

Obr. 3 ukazuje optimalizovanou separaci nonapeptidů na koloně Discovery Zr-PBD.



Obr. 3. Separace směsi nonapeptidů na koloně Discovery Zr-PBD; mobilní fáze ACN/40 mmol l⁻¹ fosforečnanový pufr, pH 10 (18/82, v/v); pracovní teplota 45 °C; průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkovací smyčka 5 μl; UV detekce při 214 nm, 1 – oxytocin, 2 – Arg-vasotocin, 3 – Arg-vasopresin, 4 – Arg-vasopresin, 5 – Lys-vasopresin

Tabulka III

Hodnoty retenčních faktorů k , rozlišení R_S a faktorů asymetrie A_F v závislosti na teplotě; separace na koloně Discovery Zr-PBD; mobilní fáze ACN/40 mmol l⁻¹ fosforečnanový pufr, pH 10 (18/82, v/v); průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkovací smyčka 5 μl; UV detekce při 214 nm

| Veličina | Analyt | Teplota [°C] | | | | | |
|----------|----------------|--------------|------|------|------|------|------|
| | | 25 | 35 | 45 | 55 | 65 | 75 |
| k | oxytocin | 0,12 | 0,11 | 0,10 | 0,08 | 0,07 | 0,06 |
| | Arg-vasotocin | 0,45 | 0,44 | 0,41 | 0,39 | 0,37 | 0,36 |
| | Arg-vasopresin | 0,85 | 0,80 | 0,75 | 0,68 | 0,63 | 0,58 |
| | Lys-vasopresin | 1,41 | 1,30 | 1,17 | 1,02 | 0,92 | 0,81 |
| R_S | oxytocin | 1,9 | 1,9 | 1,8 | 1,7 | 1,5 | 1,5 |
| | Arg-vasotocin | 3,5 | 3,6 | 4,0 | 4,2 | 4,4 | 4,7 |
| | Arg-vasopresin | 2,9 | 2,9 | 3,1 | 3,2 | 3,0 | 3,1 |
| | Lys-vasopresin | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,3 | 3,0 | 2,6 |
| A_F | oxytocin | 2,3 | 1,7 | 1,4 | 1,4 | 1,8 | 1,8 |
| | Arg-vasotocin | 2,5 | 2,3 | 2,0 | 2,1 | 2,0 | 2,1 |
| | Arg-vasopresin | 2,1 | 1,7 | 1,8 | 1,9 | 1,8 | 2,0 |
| | Lys-vasopresin | 2,0 | 1,9 | 1,9 | 1,8 | 1,9 | 2,0 |

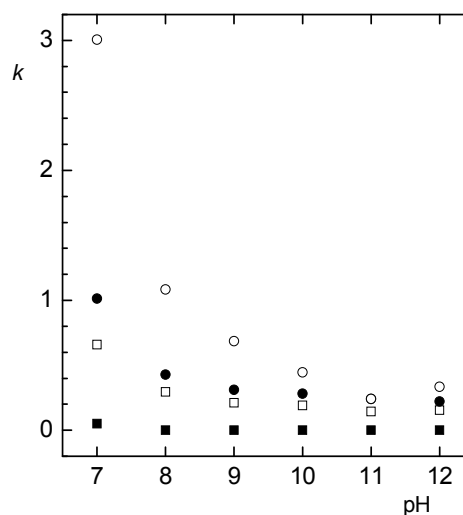
Separace nonapeptidů na koloně Discovery Zr-PS

Chromatografické chování vasopresinů bylo studováno také na koloně Discovery Zr-PS. Dle údajů výrobce má tato kolona nejméně hydrofobní stacionární fázi ze všech komerčních zirkoniových kolon a je kompatibilní s čistou vodnou mobilní fází. Proces optimalizace separace a výchozí podmínky byly stejné jako u kolony Discovery Zr-PBD. Mobilní fáze byla složena z 20 obj.% ACN a 80 obj.% fosforečnanového pufru; koncentrace pufru byla 50 mmol l⁻¹ a hodnota pH byla 12. Oxytocin eluoval s mrtvým časem a ostatní analyty vykazovaly ještě nižší retenci než na koloně Discovery Zr-PBD, nedošlo k jejich rozdělení na základní linii. Bylo tedy přistoupeno k jednotlivým krokům optimalizace.

Vliv pH a koncentrace pufru na retenční chování nonapeptidů

Vliv pH fosforečnanového pufru byl studován v rozmezí 5–12. Obr. 4 ukazuje závislost retenčních faktorů k na pH vodné složky mobilní fáze. Z vypočtených hodnot retenčních faktorů k , rozlišení R_S a faktorů asymetrie A_F jednotlivých analytů vyplývá, že nižší pH vodné složky mobilní fáze vedlo ke zvýšení retence a rozlišení analytů, ale ke zhoršení tvaru píků (faktorů asymetrie A_F). Oxytocin vykazoval retenci až při hodnotě pH 5, kdy ale retenční faktor Lys-vasopresinu měl hodnotu 21,6; čas analýzy tak byl velmi dlouhý (60 min) a píky později eluujících analytů byly značně rozmyté. Použití fosforečnanového pufru

o hodnotě pH 7 zkrátilo významně dobu analýzy (14 min), ale píky analytů stále vykazovaly značnou asymetrii. Při pH 11 došlo ke koeluci Arg-vasopresinu a Lys-vasopresinu. Pro další fázi optimalizace separace bylo tedy vybráno pH 9. Za těchto podmínek sice oxytocin nevyka-



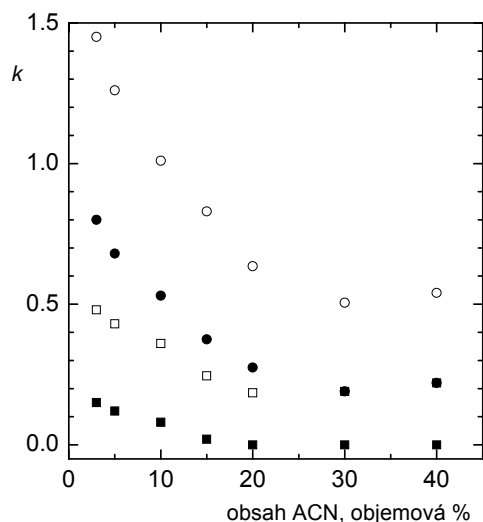
Obr. 4. Závislost retenčních faktorů k na hodnotě pH vodné složky mobilní fáze; separace na koloně Discovery Zr-PS; mobilní fáze ACN/50 mmol l⁻¹ fosforečnanový pufr (20/80, v/v); průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkovací smyčka 5 μl; UV detekce při 214 nm; ■ oxytocin, □ Arg-vasotocin, ● Arg-vasopresin, ○ Lys-vasopresin

zoval retenci, hodnoty rozlišení ostatních analytů ale byly dostačující (v rozmezí hodnot 1,2–3,8) a faktory asymetrie lepší než pro hodnotu pH 8.

Vliv koncentrace použitého pufru na retenci analytů byl sledován v rozmezí 10–100 mmol l⁻¹. Bylo zjištěno, že iontová síla vodné složky mobilní fáze má velký vliv na chromatografické chování studovaných analytů. Nízká koncentrace fosforečnanového pufru (10 mmol l⁻¹) vedla k prodloužení doby analýzy na 15 min, bylo dosaženo nejlepšího rozlišení pro Arg-vasopresin, ale rozlišení Arg-vasotocinu a Lys-vasopresinu bylo zbytečně velké. Za těchto podmínek vykazovaly píky největší asymetrii. Zvýšením iontové síly, tzn. zvýšením koncentrace pufru na 100 mmol l⁻¹ došlo sice ke zkrácení doby analýzy na 5 min, ale i k výraznému zhoršení rozlišení všech zadržovaných analytů, Arg-vasotocin a Arg-vasopresin byly neúplně rozdělené. Oxytocin stále nevykazoval retenci. Na základě hodnot faktorů asymetrie byla pro další experimenty vybrána koncentrace fosforečnanového pufru o hodnotě 50 mmol l⁻¹.

Vliv obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi na retenční chování nonapeptidů

Pro tuto fázi optimalizace byly použity výše popsané výsledky. Mobilní fáze byla složena z ACN a fosforečnanového pufru o koncentraci 50 mmol l⁻¹ a pH 9. Obsah ACN v mobilní fázi byl měněn v rozmezí 3–40 obj.%. Na obr. 5 je naměřena závislost retenčních faktorů *k* na obsahu ACN v mobilní fázi. Ze získaných dat vyplynulo, že vyšší obsah ACN v mobilní fázi (30 a 40 obj.%) vedl ke



Obr. 5. Závislost retenčních faktorů *k* na obsahu ACN v mobilní fázi; separace na koloně Discovery Zr-PS; mobilní fáze ACN/50 mmol l⁻¹ fosforečnanový pufr, pH 9; průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkovací smyčka 5 μl; UV detekce při 214 nm; ■ oxytocin, □ Arg-vasotocin, ● Arg-vasopresin, ○ Lys-vasopresin

koeluci Arg-vasotocinu a Arg-vasopresinu a k eluci oxytocinu v mrtvém čase. Snižováním obsahu ACN v mobilní fázi se zvyšovala retence všech analytů, tzn. i oxytocinu, který doposud retenci nevykazoval. Použitím mobilní fáze obsahující 5 obj.% ACN bylo dosaženo uspokojivých hodnot rozlišení i faktorů asymetrie všech analytů. Rozlišení bylo v rozmezí 1,9–4,4 a faktory asymetrie v rozmezí 0,95–1,8, a proto byla tato mobilní fáze zvolena jako nevhodnější pro separaci studovaných látek.

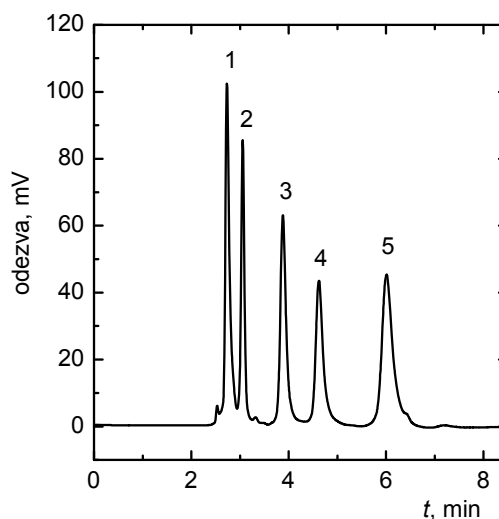
Vliv separační teploty na retenční chování nonapeptidů

Kolona Discovery Zr-PS byla termostátována a za optimalizovaných podmínek bylo sledováno retenční chování analytů při teplotách 25 °C, 35 °C, 45 °C a 55 °C. Tabulka IV shrnuje výsledky získané při tomto optimalizačním kroku. Analýzy za vyšších teplot vedly ke zlepšení faktorů asymetrie všech analytů, avšak zároveň se snížilo rozlišení s výjimkou Arg-vasotocinu. Při 55 °C se výrazně zhoršilo rozlišení oxytocinu. Z toho důvodu byla vybrána teplota 45 °C, při které je rozlišení všech analytů větší než 2 a faktory asymetrie menší než 1,6.

Chromatogram, ukazující separaci nonapeptidů na koloně Discovery Zr-PS za optimalizovaných podmínek, je na obr. 6.

Kvantifikace vybraných nonapeptidů

V optimalizovaných mobilních fázích na obou zirkoniových kolonách byly kvantifikovány tři vybrané nona-



Obr. 6. Separace směsi nonapeptidů na koloně Discovery Zr-PS; mobilní fáze ACN/50 mmol l⁻¹ fosforečnanový pufr, pH 9 (5/95, v/v); pracovní teplota 45 °C; průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkovací smyčka 5 μl; UV detekce při 214 nm; 1 – oxytocin, 2 – Arg-vasotocin, 3 – Arg-vasopresin, 4 – Arg-vasopresin, 5 – Lys-vasopresin

Tabulka IV

Hodnoty retenčních faktorů k , rozlišení R_S a faktorů asymetrie A_F v závislosti na teplotě; separace na koloně Discovery Zr-PS; mobilní fáze ACN/50 mmol l⁻¹ fosforečnanový pufr, pH 9 (5/95, v/v); průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkovací smyčka 5 μl; UV detekce při 214 nm

| Veličina | Analyt | Teplota [°C] | | | |
|----------|----------------|--------------|------|------|------|
| | | 25 | 35 | 45 | 55 |
| k | oxytocin | 0,15 | 0,15 | 0,13 | 0,09 |
| | Arg-vasotocin | 0,46 | 0,47 | 0,44 | 0,36 |
| | Arg-vasopresin | 0,79 | 0,80 | 0,71 | 0,56 |
| | Lys-vasopresin | 1,45 | 1,40 | 1,23 | 0,95 |
| R_S | oxytocin | 2,5 | 2,5 | 2,4 | 1,6 |
| | Arg-vasotocin | 4,2 | 4,4 | 4,9 | 5,2 |
| | Arg-vasopresin | 3,2 | 3,2 | 3,1 | 2,7 |
| | Lys-vasopresin | 4,3 | 4,2 | 4,2 | 4,1 |
| A_F | oxytocin | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,0 |
| | Arg-vasotocin | 1,7 | 1,6 | 1,5 | 1,2 |
| | Arg-vasopresin | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,4 |
| | Lys-vasopresin | 1,8 | 1,9 | 1,6 | 1,4 |

peptidy, tj. Arg-vasotocin, Arg-vasopresin a Lys-vasopresin. Oxytocin nebyl kvantifikován vzhledem k eluci blízké mrtvému času. Byla proměřena závislost velikosti odezvy jednotlivých analytů na vlnové délce v rozmezí 210–220 nm. Při vlnové délce 214 nm měly odezvy analytů maximální hodnotu, tudíž byla tato vlnová délka použita pro kvantifikaci.

Na koloně Discovery Zr-PBD byly kalibrační závislosti proměřeny v koncentračním rozmezí 1,56·10⁻⁴ až 1,00 mg ml⁻¹. Byly vyhodnoceny závislosti plochy (resp. výšky) píku na koncentraci příslušného analytu a určeny parametry normálních a logaritmických forem kalibračních křivek studovaných analytů. Směrnice logaritmických forem kalibračních křivek se pohybovaly v rozmezí 0,97 až 1,02. Korelační koeficienty ležely v intervalu <0,9988; 0,9999>, a proto mohly být kalibrační závislosti prohlášeny za lineární.

Kvantifikační studie byla také provedena na koloně Discovery Zr-PS při použití optimalizované mobilní fáze.

Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozmezí 3,13·10⁻⁴–1,00 mg l⁻¹. Směrnice logaritmických forem kalibračních křivek studovaných analytů ležely v intervalu <0,98;1,02>, korelační koeficienty se pohybovaly v rozmezí 0,9979–0,9999. Tato fakta svědčí o linearitě kalibračních závislostí.

Parametry kalibračních závislostí posloužily k výpočtu mezi detekce (LOD) a mezi stanovitelnosti (LOQ) studovaných nonapeptidů.

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Pro odezvu meze detekce platí:

$$y_D = 3 \cdot h_{\max}$$

kde h_{\max} je maximální kolísání základní linie slepého pokusu v oblasti dané 20násobkem pološířky píku stanovovaného analytu.

Pro odezvu meze stanovitelnosti (LOQ) platí:

$$y_S = 10 \cdot h_{\max}$$

Tabulka V

Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) nonapeptidů na kolonách Discovery Zr-PBD a Discovery Zr-PS

| Analyt | LOD [μg ml ⁻¹] | | LOQ [μg ml ⁻¹] | |
|----------------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | Zr-PBD | Zr-PS | Zr-PBD | Zr-PS |
| Arg-vasotocin | 1,0 | 2,4 | 3,3 | 8,0 |
| Arg-vasopresin | 2,4 | 6,7 | 7,9 | 22,3 |
| Lys-vasopresin | 1,8 | 5,6 | 5,8 | 18,7 |

Při výpočtu meze detekce a meze stanovitelnosti bylo využito závislosti výšky píku na koncentraci analytu.

Vypočtené hodnoty LOD a LOQ jednotlivých analytů na obou kolonách shrnuje tab. V.

Závěr

Chromatografické chování biologicky aktivních nonapeptidů bylo studováno na dvou reverzních kolonách na bázi ZrO₂, a to Discovery Zr-PBD s polybutadienovou stacionární fází a Discovery Zr-PS s polystyrenem jako stacionární fází. Ze získaných výsledků vyplývá velká podobnost použitých kolon. Chromatografické chování nonapeptidů se na obou kolonách výrazně nelišilo; trendy v retenci analytů při změnách separačních podmínek byly stejné či velmi podobné. Na koloně Discovery Zr-PS bylo dosaženo úspěšné separace při použití mobilní fáze složené z fosforečnanového pufru a obsahující pouze 5 obj.% ACN. Tyto podmínky separace jsou šetrné a umožňují zachování biologické aktivity analytů; zároveň přinášejí výhody v podobě úspory organického rozpouštědla. Lepší kvantifikační parametry ovšem poskytla kolona Discovery Zr-PBD.

Reverzní kolony na bázi ZrO₂ se ukázaly jako dobrá alternativa ke kolonám se silikagelovým nosičem pro separaci biologicky aktivních nonapeptidů. Odlišný retenční (interakční) mechanismus, široké možnosti modifikace povrchu ZrO₂ a možnost použití v celém rozsahu pH a při teplotách do 200 °C předurčují tyto stacionární fáze k dalším úspěšným aplikacím v separacích biomolekul.

Autoři děkují za finanční podporu výzkumnému projektu MSM 0021620857 (MŠMT ČR) a projektu Kontakt ME 895.

LITERATURA

- Buszewski B., Kowalska S., Kowalkowski T., Rozpędowska K., Michel M., Jonsson T.: *J. Chromatogr.*, B 845, 253 (2007).
- Mant C. T., Hogdes R. S.: *High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Claessens H. A., van Straten M. A.: *J. Chromatogr.*, A 1060, 23 (2004).
- García M. C.: *J. Chromatogr.*, B 825, 111 (2005).
- Gilar M., Olivova P., Daly A. E., Gebler J.C.: *J. Sep. Sci.* 28, 1694 (2005).
- Lee S. K., Row K. H.: *J. Chromatogr.*, B 800, 115 (2004).
- Larive C. K., Lunte A. M., Perkins M. D., Wilson G. S., Gokulrang G., Williams T.: *Anal. Chem.* 71, 389 (1999).
- Sereda T. J., Mant C. T., Hodges R. S.: *J. Chromatogr.*, A 776, 153 (1997).
- Lindeberg G.: *J. Chromatogr.* 193, 427 (1980).
- Nawrocki J.: *J. Chromatogr.*, A 779, 29 (1997).
- Andersen T., Nguyen Q. N. T., Trones R., Greibrokk T.: *J. Chromatogr.*, A 1018, 7 (2003).
- Trammell B., Ma L., Luo H., Jin D., Hillmayer M. A., Carr P. W.: *Anal. Chem.* 74, 4634 (2002).
- Nawrocki J., Dunlap C., McCormick A., Carr P. W.: *J. Chromatogr.*, A 1028, 1 (2004).
- Buchmeiser M. R.: *J. Chromatogr.*, A 918, 233 (2001).
- Kawahara M., Nakamura H., Nakajima T.: *J. Chromatogr.* 515, 149 (1990).
- Rigney M. P., Weber T. P., Carr P. W.: *J. Chromatogr.* 484, 273 (1989).
- Zhao J., Carr P. W.: *Anal. Chem.* 71, 5217 (1999).
- Sun L., Carr P. W.: *Anal. Chem.* 67, 2517 (1995).
- Dunlap C. J., McNeff C. V., Stoll D., Carr P. W.: *Anal. Chem.* 73, 598A (2001).
- Trüding U., Müller G., Unger K. K.: *J. Chromatogr.* 535, 111 (1990).
- Wirth M. J., Hearn M. T. W.: *J. Chromatogr.* 646, 143 (1993).
- Rigney M. P., Funkenbusch E. F., Carr P. W.: *J. Chromatogr.* 499, 291 (1990).
- Blackwell J. A., Carr P. W.: *Anal. Chem.* 64, 863 (1992).
- Nawrocki J., Rigney M. P., McCormick A., Carr P. W.: *J. Chromatogr.*, A 657, 229 (1993).
- Blackwell J. A., Carr P. W.: *J. Chromatogr.* 549, 59 (1991).
- Xiang D., Tang L., Blackwell J. A.: *J. Chromatogr.*, A 953, 67 (2002).
- Sigma-Aldrich: *Discovery Zr: Method Development Guidelines*, Supelco Bulletin 932, Bellefonte 2002.
- Hynie S.: *Farmakologie v kostce*, str. 235, 316. 2. přepracované vydání. Triton, Praha 2001.
- Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D.: *Barevný atlas farmakologie*, str. 164, 234, 2. vydání. Grada Publishing, Praha 2001.
- Curley J. P., Keverne E. B.: *Trends Ecol. Evol.* 20, 561 (2005).
- Goodson J. L., Lindberg L., Johnson P.: *Horm. Behav.* 45, 136 (2004).
- Do-Rego J.-L., Acharjee S., Seong J. Y. et al.: *J. Neurosci.* 26, 6749 (2006).
- Keverne E. B., Curley J. P.: *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 777 (2004).
- Storm E. E., Tecott L. H.: *Neuron* 47, 483 (2005).
- Goldstein D. L.: *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 78 (2006).
- Smeets W., Gonzalez A.: *Microsc. Res. Tech.* 54, 125 (2001).
- Krafková, E.: *Diplomová práce*. UK PFF, Praha 2004.
- Walters M. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70, 465 (1987).
- Soukupová K., Krafková E., Suchánková J., Tesařová, E.: *J. Chromatogr.*, A 1087, 104 (2005).

L. Janečková^a, J. Sobotníková^a, E. Tesařová^b, and Z. Bosáková^a (*Charles University in Prague, Faculty of Science, ^aDepartment of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Physical and Macromolecular Chemistry, Czech Republic*): **Application of Modern Reversed Phases Based on Zirconium Dioxide for the Analysis of Bioactive Peptides**

Separation of biologically active peptides was performed on polybutadiene (PBD) and polystyrene (PS) re-

versed phases based on zirconium dioxide. ZrO_2 as an alternative carrier to silicagel offers ion-exchange interactions, which are useful for separation of ionizable compounds. The parameters like buffer concentration and pH, the amount of organic modifier and temperature affected separation of nonapeptides. The retention characteristics (retention factor, resolution, peak symmetry, separation efficiency) were investigated. The systems consisting of acetonitrile and phosphate buffer of basic pH were found suitable for separation of vasopressin-related peptides.

TESTOVÁNÍ VLIVU VYBRANÝCH FAKTORŮ NA PRŮBĚH NITRIFIKACE KALOVÉ VODY

PAVEL ŠVEHLA^a, PAVEL JENÍČEK^b,
JAN HABART^a, ALEŠ HANČA^a a JIŘÍ BALÍK^a

^a Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, ^b Ústav technologie vody a prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice
svehla@af.czu.cz

Došlo 21.8.08, přijato 17.9.09.

Klíčová slova: odpadní vody, odstraňování dusíku, nitrifikace, amoniakální dusík, dusitaný, doba zdržení kalu, teplota, objemové zatížení amoniakálním dusíkem

Úvod

Sloučeniny dusíku jsou jedním z nejvýznamnějších polutantů vyskytujících se v odpadních vodách. Převažující formou dusíku v odpadních vodách je amoniakální dusík (N-amon). N-amon bývá z odpadní vody odstraňován v čistírnách odpadních vod (ČOV) ve většině případů biologickými metodami. Tradiční postup odstraňování dusíku z odpadních vod spočívá v biochemické oxidaci amoniakálního dusíku na dusičnany (nitrifikace) a v jejich následné biochemické redukci na plynný dusík (denitrifikace).

Nitrifikace je sledem na sebe navazujících biochemických reakcí, které probíhají ve dvou základních fázích. V první fázi (nitritace) se N-amon oxiduje na dusitaný s využitím činnosti bakterií rodu *Nitrosomonas* a *Nitrosococcus* a dalších mikroorganismů. Ve druhé fázi (nitratace) jsou vzniklé dusitaný oxidovány na dusičnany mikroorganismy rodu *Nitrobacter*, *Nitrospira* aj.^{1,2} Nitrifikační organismy jsou velice citlivé na podmínky panující v čistěné vodě¹. Proto je nitrifikace při biologickém čištění odpadních vod z hlediska celkové účinnosti odstranění N-amon v mnoha případech limitujícím procesem. Průběh nitrifikace je ovlivněn celou řadou faktorů, mezi které patří především teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, doba zdržení kalu v nitrifikačním reaktoru, zatížení systému dusíkatým znečištěním, výskyt různých toxických látek atd.

V podstatě na všechny tyto faktory jsou organismy oxidující dusitanový dusík (N-NO₂⁻) na dusičnanový (N-NO₃⁻) podstatně citlivější než organismy odpovědné za převedení amoniakálního dusíku na dusitanový. Během čištění odpadních vod proto může docházet k hromadění dusitanů. Tento jev je zpravidla nežádoucí, neboť často signalizuje nedostatečnou aeraci, popřípadě přetížení sys-

tému. Dusitanový dusík je navíc toxický a v odtoku z ČOV by jeho koncentrace měla být minimalizována. Na druhou stranu je však regulací podmínek při nitrifikaci možno využít cílenou akumulaci dusitanů k realizaci netradičních biologických postupů odstraňování dusíkatého znečištění z odpadních vod. Mezi tyto postupy patří zejména metoda nitritace/denitritace, která je zkrácenou verzí klasického postupu nitrifikace/denitrifikace. Biochemická oxidace N-amon je v tomto případě regulací podmínek v reaktoru řízena tak, aby jejím konečným produktem byly dusitaný, které jsou následně biochemicky redukovány za vzniku plynného dusíku N₂. Tato varianta biologického odstraňování N-amon je vhodná zejména pro čištění odpadních vod s vysokou koncentrací N-amon a nízkým koncentračním poměrem CHSK/N. Do této skupiny odpadních vod patří mimo jiné kalová voda vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu³.

Vybrané faktory ovlivňující průběh nitrifikace odpadních vod

Zatížení systému amoniakálním dusíkem

Účinnost nitrifikace je pochopitelně limitována zatížením nitrifikačního reaktoru amoniakálním dusíkem. Vysoké zatížení dusíkem vede v některých případech k hromadění dusitanů při nitrifikaci. Tento fakt může být spojen s inhibicí činnosti nitrifikačních organismů vyvolanou zvýšenou koncentrací meziproductů nitrifikace (zejména hydroxylaminu)⁴, neboť jejich tvorba je v případě vysokého zatížení systému dusíkem podstatně intenzivnější.

Teplota

Dalším faktorem ovlivňujícím významným způsobem průběh procesu nitrifikace je teplota. Nitrifikační bakterie jsou teplotně citlivější než mikroorganismy odstraňující z odpadních vod uhlíkaté organické znečištění. Optimální teplota se u nich pohybuje zpravidla okolo 30 °C (cit.¹). Teplota při biologickém čištění odpadních vod v podmínkách ČR je však zpravidla podstatně nižší. Tím je průběh nitrifikace do značné míry komplikován. Při poklesu teploty je potřeba počítat se snížením výkonnosti nitrifikačního reaktoru.

Také teplota bývá zmiňována mezi faktory, které mohou cíleně podporovat akumulaci dusitanů během nitrifikace a napomoci tak realizaci netradičních biologických postupů odstraňování dusíkatého znečištění. Většinou se v literatuře uvádí, že vyšší teploty během procesu napomáhají k akumulaci dusitanů. Konkrétní hodnoty teploty, jakých je pro dosažení účinné akumulace dusitanů v systému potřeba dosáhnout, se však v jednotlivých publikacích výrazně liší. V práci⁵ autoři například předpokládají, že optimální teplotní rozmezí je mezi 30 a 36 °C. V jiných publikacích je uváděna poněkud nižší teplota potřebná k tomu, aby v systému začaly převládat dusitaný nad du-

sičnany. Například autoři práce⁶ vycházejí z toho, že při teplotách vyšších než přibližně 20 °C rostou organismy oxidující amoniakální dusík rychleji než druhy odpovědné za biochemickou oxidaci dusitanů, při teplotách nižších než 20 °C je tomu naopak. Někdy se dokonce uvádí, že hromadění dusitanů mohou vyvolat naopak nízké teploty při biologickém čištění odpadních vod¹.

Doba zdržení kalu v reaktoru

Suspenze biomasy využívaná při biologickém čištění odpadních vod se nazývá aktivovaný kal. Nitrifikační bakterie, které se v aktivovaném kalu nacházejí, jsou obecně považovány za pomalu rostoucí organismy. Při době zdržení kalu (označované v technologii čištění odpadních vod také jako stáří kalu) kratší než je generační doba nitrifikačních organismů dochází k jejich vyplavování ze systému a nitrifikace nemůže probíhat¹. Nitritační organismy oxidující amoniakální dusík na dusitany však rostou v mnoha případech rychleji než nitratační organismy oxidující dusitanový dusík na dusičnanový. Z toho plyne možnost hromadění dusitanů při nižších hodnotách doby zdržení biomasy aktivovaného kalu. Regulací stáří kalu je možno dokonce vyvolat cílenou akumulaci dusitanů a prakticky tak zamezit vzniku dusičnanů při nitrifikaci odpadních vod. Tohoto principu využívá tzv. proces SHARON používaný především v Nizozemí v několika provozních aplikacích odděleného čištění kalové vody. Nitrifikační reaktor v tomto případě pracuje při době zdržení kalu totožné s hydraulickou dobou zdržení vstupující vody na principu chemostatu⁷. Tato skutečnost vede k získání potřebného složení mikrobiální populace v aktivovaném kalu, pomalu rostoucí nitratační organismy jsou ze systému vyplavovány. Zároveň je však při tomto uspořádání systému jeho výkonnost limitována rychlostí růstu nitritačních organismů. Například autoři práce⁸ zjistili při biologickém čištění kalové vody, že doba zdržení nižší než přibližně 1,2 dne způsobuje při provozu reaktoru na principu chemostatu významný pokles účinnosti nitritace v důsledku vyplavování nitritačních organismů.

Koncentrace amoniakálního a dusitanového dusíku

Při čištění kalové vody a jiných odpadních vod s vysokým obsahem dusíkatého znečištění může z hlediska průběhu nitrifikace hrát důležitou roli také koncentrace jednotlivých forem výskytu anorganického dusíku, zejména amoniakálního a dusitanového dusíku, které mohou v mnoha případech inhibičně působit na nitrifikační organismy^{9–11}. Toxický účinek se předpokládá především u nedisociovaných forem, tj. u NH_3 a HNO_2 . Nejčastěji se uvádí, že činnost nitratačních organismů je inhibována již při koncentraci NH_3 přesahující 0,1–1,0 mg l⁻¹ nebo při koncentraci HNO_2 přesahující 0,2–2,8 mg l⁻¹, zatímco nitritační organismy snášejí i hodnoty podstatně vyšší¹². Koncentrace volného amoniaku a volné kyseliny dusité velice úzce souvisí s hodnotou pH v systému a dalšími faktory, ze kterých je nejvýznamnějším teplota prostředí¹³.

Případný inhibiční vliv amoniakálního či dusitanového dusíku je proto nutno posuzovat se zřetelem na aktuální hodnotu pH a teploty. Některé studie ale vedou k závěru, že v určitých případech může být z hlediska nitrifikace inhibiční formou i disociovaný iont NO_2^- (cit.⁹).

Experimentální část

Vliv jednotlivých faktorů na průběh nitrifikace kalové vody je dlouhodobě testován v laboratořích KAVR ČZU v Praze a ÚTVP VŠCHT v Praze na modelech o pracovním objemu 1,5 l. Laboratorní modely pracují v režimu tzv. směšovací aktivace¹. Toto technologické uspořádání zajišťuje stabilní podmínky v reaktoru, aniž by během jeho provozu docházelo v krátkých časových úsecích k významným změnám v koncentraci jednotlivých forem dusíku a k výkyvům v hodnotách faktorů důležitých pro průběh nitrifikace (pH, koncentrace O_2 , teplota atd.). Za samotným nitrifikačním reaktorem je zařazena tzv. dosazovací nádrž¹, ve které dochází k sedimentaci biomasy aktivovaného kalu a její separaci od vyčištěné odpadní vody. Biomasa aktivovaného kalu je pak z dosazovací nádrže recirkulována zpět do nitrifikačního reaktoru. V reaktorech je zpracovávána kalová voda vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu na ústřední čistírně odpadních vod v Praze. Koncentrace N-amon v této vodě se během prováděných testů pohybovala v rozmezí od cca 800 do cca 1500 mg l⁻¹. Složení použité kalové vody je uvedeno v tab. I.

Přísun kalové vody do nitrifikačního reaktoru a recirkulaci biomasy zajišťují peristaltická čerpadla. Vzduch je do nitrifikačního reaktoru dodáván s využitím akvaristického vzduchovacího motorku. Ze systému není v základním uspořádání odváděn žádný přebytečný aktivovaný kal. Konfigurace modelů byla během prováděných testů různými způsoby měněna za účelem co možná neobjektivnějšího posouzení vlivu jednotlivých faktorů na průběh nitrifikace kalové vody. Jednotlivé odchylky od základního uspořádání modelu budou zmíněny níže.

Testy zaměřené na studium vlivu zatížení reaktoru amoniakálním dusíkem byly prováděny na výše popsaném laboratorním modelu, ve kterém byla zpracovávána kalová voda. Cílem těchto pokusů bylo zjistit maximální výkonnost reaktoru při laboratorní teplotě a vyhodnotit vliv objemového zatížení nitrifikačního reaktoru dusíkem na akumulaci dusitanů. Reaktor pracoval s biomasou, která byla vzhledem k její předcházející kultivaci schopna převést amoniakální dusík na dusitany při minimální produkci dusičnanů. Testování vlivu zatížení reaktoru dusíkem na akumulaci dusitanů probíhalo 148 dní. Od 1. do 71. dne se objemové zatížení reaktoru dusíkem pohybovalo mezi 0,3 a 0,7 kg m⁻³ d⁻¹. Následně bylo sníženo na hodnoty v rozmezí od 0,04 do 0,09 kg m⁻³ d⁻¹. Za těchto podmínek pracoval reaktor od 72. do 148. dne testu. Nárůst koncentrace dusičnanů po snížení zatížení reaktoru by svědčil o významném vlivu zatížení reaktoru na akumulaci dusitanů.

Tabulka I
Složení použité kalové vody

| Parametr | Jednotka | Průměr | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----------------------|--------|---------|---------|
| pH | – | 8,1 | 7,8 | 8,4 |
| KNK _{4,5} ^a | mmol l ⁻¹ | 95 | 79 | 123 |
| CHSK _h ^b | mg l ⁻¹ | 1470 | 690 | 3 170 |
| CHSK _f ^c | mg l ⁻¹ | 1210 | 560 | 2 640 |
| N-amon | mg l ⁻¹ | 1170 | 800 | 1500 |
| P-celk ^d | mg l ⁻¹ | 84 | 65 | 120 |
| VL ^e | mg l ⁻¹ | 2450 | 1280 | 5080 |
| VL _{org} ^f | mg l ⁻¹ | 1180 | 660 | 2270 |
| NL ^g | mg l ⁻¹ | 460 | < 10 | 2020 |
| NL _{org} ^h | mg l ⁻¹ | 310 | < 10 | 1040 |

^a Kyselinová neutralizační kapacita do hodnoty pH 4,5; ^b hodnota chemické spotřeby kyslíku homogenizovaného vzorku; ^c hodnota chemické spotřeby kyslíku odstředěného vzorku; ^d koncentrace celkového fosforu; ^e koncentrace veškerých látek; ^f koncentrace veškerých látek organických; ^g koncentrace nerozpuštěných látek; ^h koncentrace nerozpuštěných látek organických

Vliv teploty na průběh nitrifikace kalové vody je sledován na laboratorním modelu umístěném včetně veškerého příslušenství (peristaltická čerpadla, vzduchovací motorek, kanystry na vstupující a vystupující vodu atd.) v termostátované skříni umožňující v rozsahu 5–40 °C plynulou regulaci teploty. Pro inokulaci reaktoru byla použita biomasa, která byla schopna oxidovat N-amon na dusitany, aniž by docházelo k jejich další oxidaci na dusičnany. Teplota v reaktoru byla během popisovaných testů postupně snižována z hodnot běžných v laboratoři (cca 20–25 °C) až na 10 °C.

Vliv doby zdržení kalu na průběh nitrifikace kalové vody je testován na laboratorním modelu bez dosazovací nádrže a bez recirkulace kalu. Doba zdržení aktivovaného kalu v reaktoru je proto stejná jako aktuální hydraulická doba zdržení čištěné kalové vody, systém pracuje na principu chemostatu. Regulace doby zdržení kalu v reaktoru probíhá velice jednoduše změnami v průtoku čištěné vody. Během provozu reaktoru se hydraulická doba zdržení (a tím i doba zdržení kalu) pohybovala mezi cca dvaceti a třemi dny. Reaktor pracoval na začátku testů s biomasou schopnou za daných podmínek převést veškerý amoniakální dusík až na dusičnany a provést tak kompletní nitrifikaci. Testy probíhaly při laboratorní teplotě pohybující se mezi 21 a 27 °C. Sledován byl vliv doby zdržení kalu na výkonnost reaktoru a na výskyt akumulace dusitanů během nitrifikace.

Vliv extrémně vysokých koncentrací amoniakálního a dusitanového dusíku při nitrifikaci byl sledován při testech s kalovou vodou obohacenou o roztok amoniaku. Pro inokulaci reaktoru byla použita biomasa schopná úplně biochemické oxidace N-amon až na N-NO₃⁻. Koncentrace amoniakálního dusíku ve vstupní kalové vodě byla postupně zvyšována až na hodnoty pohybující se okolo 4 g l⁻¹.

Testy probíhaly bez regulace hodnoty pH, což omezovalo účinnost odstranění N-amon¹⁴. Koncentrace amoniakálního dusíku v reaktoru se proto dlouhodobě pohybovaly kolem 2 g l⁻¹. Koncentrace N-NO₂⁻ přesahovala při některých měřeních 1 g l⁻¹.

Výsledky a diskuse

Vliv zatížení systému amoniakálním dusíkem

Během dlouhodobých laboratorních testů s kalovou vodou bylo prokázáno, že při laboratorní teplotě je možno docílit prakticky úplně biochemické oxidace N-amon na dusitany i při objemovém zatížení dusíkem pohybujícím se okolo 1,6 kg m⁻³ d⁻¹. Vzhledem k teplotní citlivosti nitrifikačních organismů klesá významným způsobem výkonnost reaktoru s klesající teplotou (viz kapitola věnovaná vlivu teploty).

Radikální snížení zatížení reaktoru 72. den jeho provozu směřovaného k posouzení vlivu zatížení na akumulaci dusitanů vedlo k nárůstu koncentrace dusičnanů a současnému poklesu koncentrace dusitanů v odtoku ze systému. Nárůst koncentrace N-NO₃⁻ v období mezi 72. a 97. dnem nebyl příliš významný. Mezi 98. a 103. dnem došlo k prudkému nárůstu koncentrace N-NO₃⁻ a od 104. dne v odtoku z modelu byly zaznamenány koncentrace N-NO₂⁻ blízké nule a biochemická oxidace N-amon probíhala prakticky výhradně za vzniku dusičnanů. Koncentrace různých forem anorganického dusíku v odtoku a objemové zatížení dusíkem v jednotlivých fázích testování vlivu zatížení na akumulaci dusitanů jsou uvedeny v tab. II.

Tabulka II

Průměrné hodnoty koncentrace jednotlivých forem dusíku v odtoku a objemového zatížení dusíkem (B_V-N) ve třech fázích testování vlivu zatížení na akumulaci dusitanů

| Parametr | Jednotka | 1. – 71. den | 72. – 97. den | 104. – 148. den |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------|---------------|-----------------|
| N-amon | mg l ⁻¹ | 22 | 15 | 20 |
| N-NO ₂ ⁻ | mg l ⁻¹ | 1 270 | 1 200 | 0,9 |
| N-NO ₃ ⁻ | mg l ⁻¹ | 9 | 45 | 950 |
| B_V-N | kg m ⁻³ d ⁻¹ | 0,42 | 0,056 | 0,055 |

Na základě výsledků těchto testů je možno předpokládat, že v případě úmyslu využívat pro čištění odpadních vod s vysokým obsahem N-amon postup nitrítace/denitrítace bude zapotřebí systém provozovat při dostatečném zatížení amoniakálním dusíkem, a to i v době zapracování nitrifikačního reaktoru. Dosud provedené testy vedou k závěru, že minimální zatížení potřebné pro dlouhodobé udržení akumulace dusitanů se pohybuje v blízkosti hodnoty 0,3 kg m⁻³ d⁻¹. Tato hodnota však může při dlouhodobém provozu růst se stupněm adaptace a regenerace nitrifikační biomasy.

Vliv teploty

Při nízkých teplotách byla v souladu s očekáváním podstatným způsobem snížena výkonnost reaktoru. Zatímco při teplotách okolo 20 °C bylo dosaženo prakticky úplného odstranění N-amon z kalové vody při objemovém zatížení amoniakálním dusíkem do cca 1,6 kg m⁻³ d⁻¹, při teplotě 10 °C bylo dosaženo tohoto stavu při objemovém zatížení amoniakálním dusíkem okolo 0,25 kg m⁻³ d⁻¹. Zvýšení zatížení nad tuto hodnotu vedlo již k nárůstu koncentrace N-amon v odtoku a nárůstu hodnoty pH v reaktoru v důsledku přetížení systému. Hlavním produktem oxidace N-amon byly během celého období provozu reaktoru při teplotě 10 °C dusitany (cca 80–90 %). Výsledky testů zaměřených na studium vlivu teploty na průběh nitrifikace jsou velice nadějně, neboť naznačují možnost využití biologických postupů odstraňování dusíku z kalové vody a jiných odpadních vod podobného složení i v zimním období bez vyhřívání nitrifikačního reaktoru. Problémem je podstatné snížení výkonnosti nitrifikačního reaktoru při nízkých teplotách a z něj plynoucí nutnost výstavby reaktoru s podstatně větším objemem. Nepříliš významná tvorba dusičnanů při teplotě 10 °C naznačuje možnost využití postupu nitrítace/denitrítace pro samostatné čištění kalové vody a jiných odpadních vod podobného složení i při nízkých teplotách a nebyla tak potvrzena nutnost provozovat systém za účelem potlačení tvorby dusičnanů při vyšších teplotách zmiňovaná v literatuře^{5,6}.

Vliv doby zdržení kalu v reaktoru

Prakticky úplné převedení amoniakálního dusíku až na dusičnany bylo zaznamenáno při době zdržení kalu

mezi dvaceti a deseti dny. Zkrácení doby zdržení kalu na hodnoty mezi deseti a pěti dny vyvolalo nárůst koncentrace dusitanů. Snížení doby zdržení biomasy na hodnoty mezi cca čtyřmi a třemi dny již vedlo i k poklesu účinnosti nitrítace. Za daných podmínek se jako minimální doba zdržení kalu potřebná při laboratorní teplotě k udržení dostatečné účinnosti nitrítace jeví hodnota okolo čtyř až pěti dnů.

Potvrzení možnosti provozu nitrifikačního, resp. nitrifikačního, reaktoru bez recirkulace kalu je pozitivním zjištěním, protože v tomto uspořádání není nutno za vlastní reaktor zařazovat dosazovací nádrž. Při realizaci systému by tento fakt pochopitelně hrál významnou roli pro celkové investiční náklady. Je však potřeba kalkulovat také s omezením výkonnosti systému v tomto uspořádání, což je skutečnost, která tuto variantu silně znevýhodňuje vzhledem k nutnosti výstavby reaktoru podstatně většího objemu. Popsané testy probíhaly při maximálním objemovém zatížení nitrifikačního reaktoru dusíkem okolo 0,5 kg m⁻³ d⁻¹, přičemž v systému s recirkulací kalu bylo při laboratorní teplotě dosaženo zatížení až cca 1,6 kg m⁻³ d⁻¹, tedy objem nádrže by musel být přibližně třikrát větší. K dalšímu poklesu výkonnosti reaktoru by vedl provoz při nižších teplotách. Potřebný objem reaktoru by mohl být naopak významným způsobem zmenšen provozem reaktoru při teplotách odpovídajících teplotnímu optimu nitrifikačních organismů⁵. Tento předpoklad potvrzují například zkušenosti z provozu systému SHARON⁷. Případné zahřívání reaktoru by však ve většině případů negativním způsobem ovlivnilo ekonomiku provozu systému.

Vliv koncentrace amoniakálního a dusitanového dusíku

I při koncentraci N-amon ve vstupní čištěné vodě pohybující se okolo 4 g l⁻¹ bylo dosaženo bez regulace hodnoty pH v reaktoru účinnosti odstranění amoniakálního dusíku okolo 50 %, přičemž reaktor nevykazoval známky negativního působení vysoké vstupní koncentrace N-amon na průběh procesu oxidace amoniakálního dusíku, přestože koncentrace N-amon v reaktoru dosahovala hodnot mezi 1420 a 2600 mg l⁻¹ při koncentraci volného amoniaku až 4,4 mg l⁻¹. V období stabilního provozu reaktoru byly dominantní formou dusíku vznikající biochemickou oxidací N-amon dusičnany. Přechodný nárůst koncentrace dusi-

Tabulka III

Koncentrace jednotlivých forem dusíku v odtoku a další charakteristiky modelu při testování vlivu amoniakálního a dusitanového dusíku

| Parametr | Jednotka | Průměr | Minimum | Maximum |
|--|------------------------------------|--------|---------|---------|
| N-amon | – | 1890 | 1420 | 2600 |
| FA ^a | mg l ⁻¹ | 2,7 | 1,4 | 4,4 |
| N-NO ₂ ⁻ | mg l ⁻¹ | 630 | 5,2 | 1 170 |
| FNA ^b | mg l ⁻¹ | 2,2 | 0,04 | 4,9 |
| B _V -N | kg m ⁻³ d ⁻¹ | 0,78 | 0,34 | 1,52 |
| E _{N-amon} ^c | % | 48 | 41 | 67 |
| E _{N-NO₃} ^d | % | 35 | 13 | 65 |
| r _{V,N-amon} ^e | mg l ⁻¹ h ⁻¹ | 17,1 | 7,1 | 38,8 |
| r _{V,N-NO₃} ^f | mg l ⁻¹ h ⁻¹ | 11,3 | 2,5 | 30 |

^a Volný amoniak (free ammonia); ^b volná kyselina dusitá (free nitrous acid); ^c účinnost odstranění N-amon; ^d účinnost převedení N-amon na dusičnanový dusík; ^e objemová rychlost odstranění N-amon; ^f objemová rychlost převedení N-amon na dusičnanový dusík

tanového dusíku na hodnoty dosahující až 1170 mg l⁻¹ byl zaznamenán pouze při zvýšení objemového zatížení dusíkem. V této fázi testů bylo v reaktoru v důsledku nárůstu koncentrace dusitanového dusíku dosaženo koncentrace volné kyseliny dusité až 4,9 mg l⁻¹. Bylo však zjištěno, že po určité době probíhá nitrifikace amoniakálního dusíku až na dusičnany i v případě, že dojde k tomuto přechodnému nárůstu koncentrace dusitanového dusíku. Charakteristiky modelu při testování vlivu amoniakálního a dusitanového dusíku jsou uvedeny v tab. III.

Provedené testy vedly ke zjištění, že nitrifikace amoniakálního dusíku až na dusičnany může probíhat i v případě překročení koncentrací volného amoniaku a volné kyseliny dusité uváděných v literatuře jako inhibiční limity pro nitrifikační organismy^{12,15,16}. Tato skutečnost je patrně vyvolána dlouhodobou adaptací biomasy na extrémní podmínky panující v reaktoru^{17,18}.

LITERATURA

- Chudoba J., Dohányos M., Wanner J.: *Biologické čištění odpadních vod*. SNTL, Praha 1991.
- Benáková A., Hausner M., Müller E., Bartáček J., Wanner J., Wilderer P.: *Odpadní vody–Wastewater 2005, Teplice, 10.–12. 5. 2005*. Sborník přednášek 6. mezinárodní konference (Růžičková I., Koller M., Svojitka J., Wanner J., ed.), str. 73.
- Švehla P., Jeníček P., Habart J., Hanč A., Černý J.: *Chem. Listy 101*, 776 (2007).
- Yang L., Alleman J.E.: *Water Sci. Tech.* 26, 997 (1992).
- Ford D. L., Churchwell R. L., Kachtick J. W.: *J. Water Poll. Contr. Fed.* 52, 2726 (1980).
- Hao X., Heijnen, J. J., van Loosdrecht M. C. M.: *Water Res.* 36, 4839 (2002).
- van Kempen R., Mulder, J.W., Uijterlinde, C.A., Loosdrecht M.C.M.: *Water Sci. Tech.* 44, 145 (2001).
- Fux Ch., Boehler M., Huber P., Brunner I., Siegrist H.: *J. Biotechnol.* 99, 295 (2002).
- Buday J., Drtil M., Hutňan M., Derco J.: *Chem. Pap.* 53, 379 (1999).
- Král P., Králová J., Canziani R., Jeníček P.: *Odpadové vody 2006, Tatranské Zruby, 18.-20.10. 2006*. Zborník prednášok 4. konferencie s medzinárodnou účasťou (Bodík I., Hutňan M., ed.), str. 259.
- Auterská P., Novák L.: *Vodní hospodářství 56, Čistírenské listy, I* (2006).
- Anthonisen A. C., Loehr R. C., Prakasam T. B. S., Srinath E. G.: *J. Water Poll. Contr. Fed.* 48, 835 (1976).
- Pitter P.: *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 1999.
- Švehla P., Jeníček P.: *Odpadové vody 2004, Tatranské Zruby, 20.-22.10. 2004*, Zborník prednášok 3. konferencie s medzinárodnou účasťou (Bodík I., Hutňan M., ed.), str. 175.
- Abeling U., Seyfried C. F.: *Water Sci. Tech.* 26, 1007 (1992).
- Balmelle B., Nguyen K. M., Capdeville B., Cornier J. C., Deguin A.: *Water Sci. Tech.* 26, 1017 (1992).
- Wong-Chong G. M., Loehr R. C.: *Water. Res.* 12, 605 (1978).
- Turk O., Mavinic D. S.: *J. Water Poll. Contr. Fed.* 61, 1440 (1989).

Příspěvek byl vypracován v rámci řešení projektu podporovaného GA ČR číslo 104/07/P037, projektu financovaného MŠMT číslo 2B08082 a výzkumného záměru MSM 6046137308. Autoři práce děkují poskytovatelům za finanční podporu.

P. Švehla^a, P. Jeníček^b, J. Habart^a, A. Hanč^a, and J. Balík^a (^a *Department of Agro-environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences, Prague;* ^b *Department of Water Technology and Environmental Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Testing Selected Factors Influencing Nitrification of Sludge Water**

The influence of sludge age, ammonia and nitrite concentrations, temperature and the ammonia loading rate on biological treatment of reject water from sludge treatment was tested on laboratory scale. Nitrification of ammonia in reject water at the sludge age 4–5 days produced nitrites and nitrates. At high concentrations of ammonia and nitrites, nitrates were produced. The nitrification proceeds almost completely at 10 °C. The high ammonia loading rate seems to be most efficient of the tested factors, leading to nitrite accumulation.

HODNOCENÍ MOŽNÉHO VLIVU RIZIKOVÝCH PRVKŮ OBSAŽENÝCH V PŮDĚ NA ORGANISMUS ČLOVĚKA

JANA TREMLOVÁ, JIŘINA SZÁKOVÁ
a PAVEL TLUSTOŠ

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, jana.tremlova@af.czu.cz

Došlo 17.8.09, přijato 16.10.09.

Klíčová slova: As, Cd, Pb, biologická dostupnost, metoda postupné extrakce

Úvod

Definice biologické dostupnosti prvku vychází z faktu, že celkový obsah prvku v daném materiálu neposkytuje dostatek informací pro posouzení vlivu daného prvku na organismus a charakterizuje tedy ten podíl prvku, který je v daném systému biologicky aktivní¹. V případě suchozemských rostlin se např. jedná o takové formy prvku v půdě, které mohou být přijímány kořeny rostlin během vegetačního cyklu a mohou ovlivnit životní cyklus daných rostlin. Pro stanovení mobilních podílů prvků v půdě lze použít široké spektrum extrakčních činidel, kdy extrahovatelnost prvků závisí na použitém činidle, zdroji kontaminace půdy, a konkrétních půdních vlastnostech². Výsledky ukazují, že použití deionizované vody a neutrálních solí vede přes některé odlišnosti k vzájemně porovnatelným výsledkům jak ve vlastní extrahovatelnosti jednotlivých prvků, tak i při další interpretaci dat. Tato činidla jsou schopna z půdy uvolnit pouze slabě vázané, rostlinám snadno přístupné podíly prvků a jejich sloučenin^{3,4} a mohou sloužit k odhadu biologicky dostupného množství prvků pro rostliny.

Člověk přijímá toxické prvky zprostředkovaně prostřednictvím kontaminované zemědělské produkce, ale je třeba vzít v úvahu i přímý vstup půdy do trávicího traktu. Jak uvádí Státní zdravotní ústav (SZÚ) ve své odborné zprávě Zdravotní rizika kontaminace půdy městských aglomerací⁵, dospělý člověk přijme denně přibližně 60 mg půdy, u dětí je pak příjem vyšší a to zhruba 200–800 mg denně. V téže zprávě se např. uvádí, že v kontaminované oblasti Příbramska má problém s těžkými kovy (zvláště Cd, As, Pb) v půdě 100 % mateřských školek. Limitní hodnoty jsou zde překročeny několikanásobně (v případě kadmia 9×, u olova 6×, u arsenu 4,5×).

Vyvinutá metoda postupné extrakce (tzv. Physiological Based Bioavailability Extraction Test, PBET)^{6,7} je

využívána k hodnocení negativního dopadu půd ve vysoce kontaminovaných oblastech, kdy se testuje možný vstup rizikových prvků do organismu člověka její neúmyslnou konzumací. Postup zařazuje pro extrakci vzorku půdy postupně činidla, která simulují procesy v ústní dutině, v žaludku, ve dvanácterníku a v tenkém střevě. Bylo zjištěno, že výsledky tohoto *in vitro* trávicího procesu velmi dobře korelují ($r = 0,93$) s *in vivo* experimenty s využitím laboratorních potkanů⁶. Zjednodušená metoda nazvaná „Simple Bioavailability Extraction Test“ (SBET)⁸ pak simuluje pouze činnost žaludku. Tyto postupy byly již testovány nejen v případě chemických prvků, ale i pro hodnocení biologické dostupnosti polychlorovaných bifenylů⁹. V poslední době je tato metoda rozšiřována i pro hodnocení dostupnosti prvků z potravin rostlinného původu, jak dokumentuje recentní práce, která hodnotí dostupnost prvků z různých druhů zelenin rostoucích na kontaminované půdě¹⁰, nebo např. z popela vzniklého spalováním komunálního odpadu¹¹.

V našem experimentu jsme se pokusili otestovat extrahovatelnost As, Cd a Pb ze souboru půd lišících se úrovní kontaminace i fyzikálně-chemickými vlastnostmi metodou PBET a výsledky porovnat s některou z extrakčních metod používaných k odhadu podílu prvků přístupného rostlinám, v našem případě jsme zvolili extrakci 0,01 mol l⁻¹ roztokem CaCl₂.

Materiál a metody

Osm půdních vzorků lišících se fyzikálně-chemickými vlastnostmi a celkovým obsahem prvků (tab. I) bylo odebráno v lokalitách, kde se nacházejí zvýšené obsahy sledovaných prvků v půdě. Zvláště vysoké koncentrace sledovaných prvků se nacházejí v naplaveninách v povodí Litavky, kde byly v dřívějších dobách soustředěny proplachovny rud. Vzorky byly extrahovány následujícími extrakčními metodami:

1. Metoda PBET v modifikaci, kterou použili Abrahams a spol.¹² následovně: Příprava žaludeční šťávy: 1,25 g pepsinu, 0,50 g kyseliny citronové, 0,50 g kyseliny jablečné, 0,84 ml kyseliny mléčné, 1 ml kyseliny octové do 1 l vody, pomocí HCl upravit pH na 2,5±0,05. Množství 0,5 g půdního vzorku se naváží do plastové reakční nádoby a zalije se 50 ml připravené žaludeční šťávy. Nádoba se vloží do vodní lázně o teplotě 37 °C, která se třepe po dobu 1 h. Poté je odebrána suspenze o objemu 5 ml, je centrifugována, supernatant je slit a je stanoven obsah prvků. Do zbytku vzorku se dolije 5 ml žaludeční šťávy a upraví se pH na 7 pomocí nasyceného roztoku NaHCO₃. Poté se přidá 25 mg pankreatinu a 87,5 mg žluči. Vzorek se třepe na vodní lázni po dobu 1 h, pak je centrifugován (Hettich Universal 30 RF) po dobu 10 min při 3000 otáčkách/min, supernatant je slit a analyzován.
2. Z metod používaných pro odhad rostlinami přijatelného podílu prvků byla vybrána extrakce 0,01 mol l⁻¹ CaCl₂ v poměru 1 : 10 (navážka/objem) při teplotě

Tabulka I

Základní fyzikálně-chemické charakteristiky experimentálních půd dle jednotlivých lokalit a celkové obsahy sledovaných prvků

| Lokalita | TOC [%] | pH | KVK [mmol kg ⁻¹] | As [mg kg ⁻¹] | Cd [mg kg ⁻¹] | Pb [mg kg ⁻¹] | P ^a [mg kg ⁻¹] |
|--------------|---------|-----|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Kbely | 3,45 | 7,3 | 224 | 18,5±4,2 | 14,5±0,3 | 32,7±1,8 | 82 |
| Píšťany | 3,95 | 6,8 | 176 | 53,3±3,9 | 1,69±0,12 | 60,1±3,7 | 128 |
| Mokrsko | 2,20 | 5,5 | 105 | 1030±42 | 0,37±0,03 | 13,5±0,5 | 26 |
| Mikulov | 5,93 | 4,4 | 69,2 | 417±31 | 1,01±0,01 | 90±1 | 248 |
| Litavka | 2,31 | 5,8 | 54,5 | 611±20 | 27,4±0,6 | 2460±2 | 9,2 |
| Příbram | 3,88 | 6,3 | 165 | 69,7±3,9 | 3,62±0,47 | 559±19 | 81 |
| Kutná Hora 1 | 6,05 | 7,2 | 346 | 1430±127 | 13,8±0,0 | 67,8±1,7 | 51 |
| Kutná Hora 2 | 2,05 | 7,4 | 188 | 289±3 | 1,13±0,02 | 20,6±0,3 | 14 |

^a TOC – celkový obsah uhlíku, ^b KVK – kationtová výměnná kapacita, ^c mobilní obsah P stanovený metodou dle Mehlich III (cit.²¹)

místnosti¹³. Reakční směs byla mechanicky protřepávána po dobu 6 h a poté centrifugována (viz výše). Extrakty byly uloženy v chladničce ve zkumavkách při teplotě 6 °C až do doby měření.

Celkové obsahy prvků v půdách byly stanoveny z roztoků získaných po totálním rozkladu: 0,5 g suchého půdního vzorku bylo rozloženo na mokré cestě v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem v zařízení Ethos 1 (MLS GmbH, Německo) po dobu 33 min při teplotě 210 °C ve směsi 8 ml HNO₃, 5 ml HCl a 2 ml HF. Po ochlazení byla reakční směs kvantitativně převedena do 50ml Teflon[®] nádoby a odpařována do sucha při 160 °C. Odpařek byl poté rozpuštěn v 3 ml směsi HNO₃ a HCl (1+3), převeden do 25ml skleněné zkumavky, doplněn deionizovanou vodou a uschován při laboratorní teplotě do doby měření.

Obsah prvků v připravených mineralizátech a extraktech byl stanoven optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES) s axiální orientací plazmové hlavice na přístroji Varian VistaPro (Varian, Austrálie), vybavenou automatickým dávkovačem SPS-5. Intenzita signálu byla odečítána na následujících vlnových délkách: $\lambda = 193,7$ nm pro As, $\lambda = 214,4$ nm pro Cd a $\lambda = 220,4$ nm pro Pb.

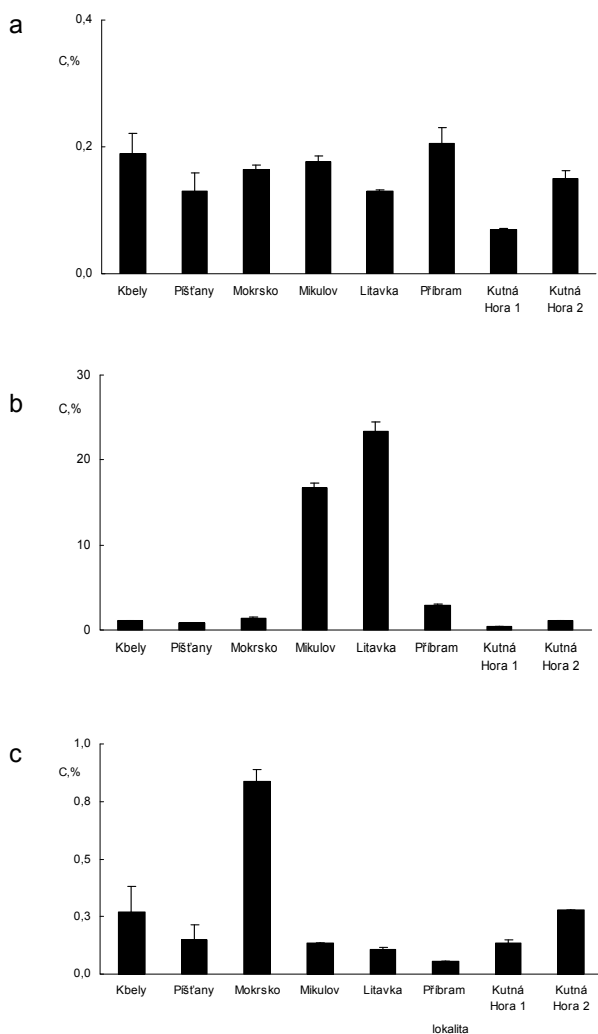
Výsledky a diskuse

Podíly prvků extrahovatelné 0,01 mol l⁻¹ CaCl₂ uvádí obr. 1. Jak již bylo řečeno, toto činidlo extrahuje takové podíly prvků, které korelují s podílem prvků přístupným rostlinám^{13,14} a bylo popsáno jako velmi efektivní zejména v případě Cd a Zn. Výsledky potvrdily vysokou mobilitu Cd v půdě, zejména u antropogenně kontaminované půdy v blízkosti Litavky. Nižší mobilita pak byla zaznamenána u půd z oblasti Kbel a Kutné Hory, které jsou rovněž kontaminovány antropogenní činností, ale vyznačují se vyso-

kou sorpční kapacitou, obsahem organické hmoty a především vysokou hodnotou pH, která je u mobility Cd rozhodující (tab. I). Rozdíl je také zřejmý při porovnání obou vzorků z lokality Kutná Hora, které se liší sorpční kapacitou i obsahem organické hmoty. V případě Pb byl podíl velmi nízký a nepřesáhl 1 % z celkového obsahu a to ani u půd s antropogenní kontaminací z lokalit Příbram a Litavka. U arsenu se potvrdila nízká extrahovatelnost tímto činidlem (nepřesáhla 0,2 %) přičemž nebyly zaznamenány rozdíly mezi půdami kontaminovanými důlní činností (Příbram, Kutná Hora) a půdami, kde je arsen pouze geogenního původu (Mikulov, Mokrsko).

Podíly prvků extrahovaných žaludeční šťávou, která simuluje chemické pochody probíhající v žaludku po požití půdy člověkem, se od předchozího extraktu významně liší (obr. 2). Rozdílné chování bylo zaznamenáno zejména u arsenu. As se ukázal jako prvek teoreticky více přístupný pro člověka než pro rostliny, tzn. že požití kontaminované půdy je pro člověka větší riziko než konzumace plodin pěstovaných na této půdě, protože přijatelnost arsenu rostlinami je zpravidla velmi nízká a to i na vysoce kontaminovaných půdách¹⁵. Pro kadmium se ukazuje vyšší extrahovatelnost u půdy z okolí Litavky, pro arsen u půd z lokalit Kbely a Píšťany. Výsledky jsou vyrovnanější než u extrakce 0,01 mol l⁻¹ CaCl₂, pravděpodobně z důvodu jednotného pH extrakční směsi u jednotlivých půd. Vyšší relativní mobilita se vyskytuje na nekontaminovaných půdách, což platí i v případě olova. Zejména na půdách z Příbramska, kde je právě olovo nejzávažnějším kontaminantem, je jeho mobilní podíl relativně nízký a nepřekračuje hodnotu 1,5 %.

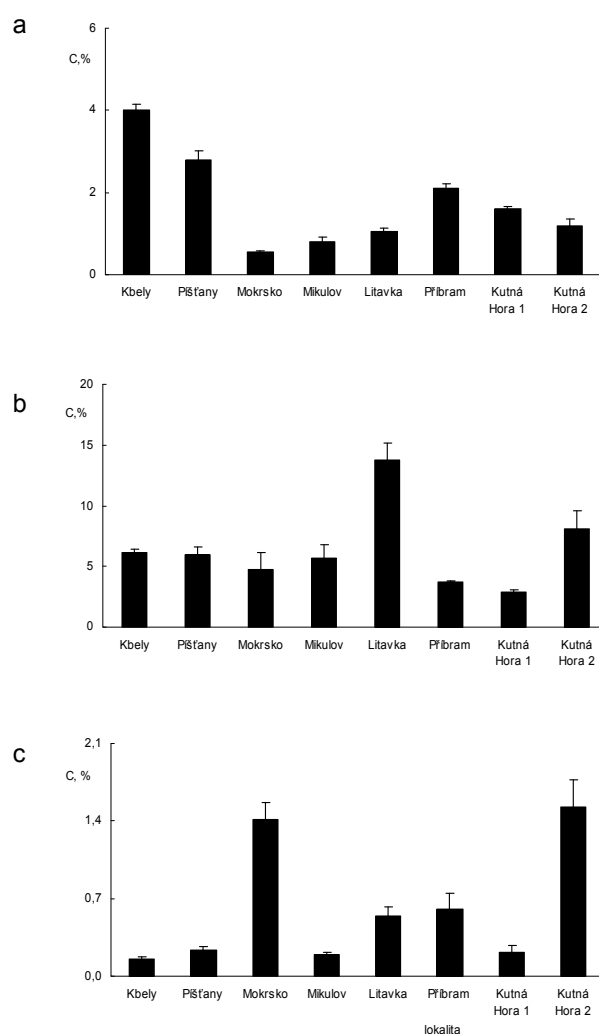
Extrahovatelné obsahy arsenu dosahují až k hodnotě 5 % celkového obsahu, což je srovnatelné s výsledky jiných studií^{16,17}. Ruby a spol.⁶ uvádějí, že při extrakci rizikových prvků z půdy může být výsledek ovlivněn nastavením hodnoty pH simulované žaludeční šťávy. Při zvýšení pH z 1,3 na 2,5 dochází ke snížení přístupnosti arsenu



Obr. 1. Podíly prvků extrahovatelné 0,01 mol l⁻¹ CaCl₂ (% z celkového obsahu); a) arsen, b) kadmium, c) olovo

o 16 % a olova dokonce o 65 %. V souvislosti s olovem upozorňují Tang a spol.¹⁸ a Furman a spol.¹⁹, že přístupnost tohoto prvku může být značně snížena vyšším obsahem fosforu v půdě. V našem případě se mobilní obsahy fosforu v půdě pohybovaly v rozmezí 9,2 mg kg⁻¹ (Litavka) – 248 mg kg⁻¹ (Mikulov) a významná závislost extrahovatelných obsahů olova na těchto hodnotách nebyla pozorována.

Extrakce simulovaným obsahem dvanácterníku vedla k velmi nejednoznačným výsledkům. Vlivem změny pH reakční směsi došlo k tomu, že se Cd a v některých případech i As zpět sorbovaly na půdu (Kbely, Příbram, Kutná Hora), takže nejen že nedošlo k dalšímu uvolňování prvků, ale ve srovnání se simulovanou žaludeční šťávou extrahovatelné podíly prvků poklesly. Vyšší přístupnost byla u arsenu v půdách z lokalit Kutná Hora a Mikulov (1,5 %), u kadmia na půdách z lokalit Mokrsko (22 %) a Píšťany



Obr. 2. Podíly prvků extrahovatelné simulovanou žaludeční šťávou (% z celkového obsahu); a) arsen, b) kadmium, c) olovo

(9,6 %), tedy v případě kadmia u půd s nízkou sorpční kapacitou. U olova se podíly tohoto prvku extrahovatelné simulovaným obsahem dvanácterníku pohybovaly u většiny experimentálních půd v rozmezí 1–4 %. U extrémně kontaminované půdy z okolí Litavky nedocházelo již dále k dalšímu uvolňování prvků. Uvolňování pokračovalo spíše u méně kontaminovaných půd z oblastí Mikulov, Mokrsko a Píšťany, kde můžeme předpokládat pevnější vazbu prvků na jednotlivé složky půdy ve srovnání s půdou kontaminovanou antropogenním působením a na které je třeba působit intenzivněji a po delší dobu.

Několik dřívějších studií však poukazuje na nízkou nebo limitovanou reprodukovatelnost testu v prostředí simulovaného obsahu dvanácterníku. Proto se data z této fáze v některých studiích nepoužívají pro vyhodnocování výsledků^{6,20}. Náš jednoduchý test ukazuje, že interpretace výsledků z použití extrakce simulovaným obsahem dva-

nácterníku je obtížnější než v případě simulované žaludeční šťávy. Hodnocení spolehlivosti a reprodukovatelnosti výsledků však ještě vyžaduje další intenzivní výzkum. Rozdíly ve srovnání s citovanými studiemi jsou také ovlivněny jiným původem a odlišnými vlastnostmi půd, které byly použity v jednotlivých experimentech.

Lze shrnout, že simulovaný trávicí trakt člověka je schopen extrahovat relativně velké množství těžkých kovů obsažených v půdní matici. Vyskytují se značné rozdíly v extrahovatelnosti mezi fází simulující procesy v žaludku a fází simulující procesy v tenkém střevě, resp. dvanácterníku. Zatímco kyselé prostředí v žaludku ve většině případů pomáhá prvky uvolňovat, tak po změně pH z kyselého na zásadité, které probíhá při vstupu do tenkého střeva, se nejen snižuje extrahovatelnost prvků, ale dochází i ke zpětné sorpci na půdu.

V některých případech jsou obsahy extrahovatelné pomoci PBET vyšší než u běžných metod extrakce, které se používají pro určení odhadu možné přijatelnosti těchto prvků rostlinami. Například u arsenu, kde je přijatelnost tohoto prvku rostlinami velmi nízká (extrahovatelnost $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ roztokem CaCl_2 nepřesahuje 1 % celkového obsahu), ale extrakce simulovanou žaludeční šťávou v některých případech dosahovala až 4 % celkového obsahu tohoto prvku. Bilance prvků přijatých trávicím traktem člověka přímo z půdy ve srovnání s množstvím daného prvku přijatého prostřednictvím kontaminované potravy ještě vyžaduje detailní výzkum, ale předložené výsledky potvrzují, že nechtěná konzumace půdy v kontaminovaných oblastech může přinášet určité zdravotní riziko.

Problematika byla řešena v rámci výzkumných projektů GA ČR 521/09/1150 a MSM 6046070901.

LITERATURA

- Nolan A. L., Lombi E., McLaughlin M. J.: *Austr. J. Chem.* 56, 77 (2003).
- Moral R., Gilkes R. J., Moreno-Caselles J.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33, 2781 (2002).
- Beckett P. H. T.: *Adv. Soil Sci.* 9, 143 (1989).
- Ure A. M., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51, 135 (1993).
- Státní zdravotní ústav, Zdravotní rizika kontaminace půdy městských aglomerací, 2007, www.szu.cz/uploads/documents/chzp/odborne_zpravy/OZ_07/puda_07.pdf, staženo 9.1.2009.
- Ruby M. V., Davis A., Schoof R., Berle S., Sellstone C. M.: *Environ. Sci. Technol.* 30, 422 (1996).
- Oomen A. G., Rompelberg C. J. M., Van de Kamp E., Pereboom D. P. K. H., De Zwart L. L., Sips A. J. A. M.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 13 (2004).
- Lee S. W., Lee B. T., Kim J. Y., Kim K. W., Lee J. S.: *Environ. Monitor. Assess.* 119, 233 (2006).
- Pu X. Z., Lee L. S., Galinsky R. E., Carlson, G. P.: *Toxicology* 217, 14 (2006).
- Intawongse M., Dean J. R.: *Environ. Pollut.* 152, 60 (2008).
- Chou J. D., Wey M. Y., Liang H. H., Chang S. H.: *J. Haz. Mat.* 168, 197 (2009).
- Abrahams P. W., Follansbee M. H., Hunt A., Smith B., Wragg J.: *Appl. Geochem.* 21, 100 (2006).
- Novozamsky J., Lexmond T. M., Houba V. J. G.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51, 47 (1993).
- Száková J., Tlustoš P., Balík J., Pavlíková D., Balíková M.: *Chem. Listy* 95, 179 (2001).
- Baroni F., Boscagli A., DiLella L. A., Protano G., Riccobono F.: *J. Geochem Explor* 81, 1 (2004).
- Devesa-Rey R., Paradelo R., Díaz-Fierros F., Barral M. T.: *Water Air Soil Pollut.* 195, 189 (2008).
- Lombi E., Hamon R. E., Wieshammer G., McLaughlin M. J., McGrath S. P.: *J. Environ. Qual.* 33, 908 (2004).
- Tang X. Y., Zhu Y. G., Chen S. B., Tang L. L., Chen X. P.: *Environ. Int.* 30, 536 (2004).
- Furman O., Strawn D. G., Heinz G. H., Williams B.: *J. Environ. Qual.* 35, 450 (2006).
- Sonmez O., Pierzynski G. M.: *Water Air Soil Pollut.* 166, 3 (2005).
- Mehlich A.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15, 1409 (1984).

J. Tremlová, J. Száková, and P. Tlustoš
(*Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences, Prague*): **An Assessment of Possible Effect of Risk Elements Contained in Soil on Human Organism**

Physiological Based Bioavailability Extraction Test (PBET) was tested at eight soils differing in their physico-chemical properties to assess the potential bioavailability of risk elements (As, Cd, Pb) via ingestion of the soil. The results showed that the simulated human gastrointestinal tract fluid is able to extract heavy metals fixed in soil matrix in considerable portion of the total element content. Significant differences were observed between the extractable element contents with simulated gastric fluid and simulated duodenal fluid. Comparison of PBET method and soil extraction with $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ solution of CaCl_2 , the extraction method simulating approximately the plant-available portions of risk elements showed higher mobility of soil elements by using the PBET test, especially in the case of As and Pb. For instance, arsenic belongs to the elements characterized by limited plant-availability and its extractability with $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ solution of CaCl_2 did not exceed 1 % of total content whereas the soil extraction with simulated gastric solution reached up to 4 % of total arsenic content. Therefore, potential risk of direct soil ingestion in contaminated areas should be taken into account and investigated in further research.

AGAROVÁ PRACOVNÁ ELEKTRÓDA AKO PODKLAD PRE DVOJVRSTVOVÚ LIPIDOVÚ MEMBRÁNU: ÚČINKY JEDNOSMERNÉHO NAPÄTIA

GALINA LAPUTKOVÁ, MICHAL LEGIŇ
a JÁN SABO

Ústav lekárskej biofyziky, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika,
Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovenská
republika

galina.laputkova@upjs.sk

Došlo 3.11.08, prepracované 9.7.09, prijaté 29.10.09.

Kľúčové slová: dvojvrstvová lipidová membrána na agarovom podklade, napätie, impedančná spektroskopia

Úvod

Počas minulých dekád bola venovaná značná pozornosť riešeniu problémov, ktoré súvisia s aplikáciou planárnych lipidových dvojvrstvových membrán pri konštrukcii biosenzorov. Krehkosť klasických dvojvrstvových lipidových membrán (BLM) však predstavovala hlavné obmedzenie, ktoré bránilo ich využitiu pri zisťovaní prítomnosti a koncentrácie biologických vzoriek či liečiv. Jedným zo spôsobov, ako prekonať tento zásadný nedostatok, bolo umiestnenie lipidového filmu na tuhú podložku, napríklad Au, Pt alebo hydrogél. Ide o vytváranie tzv. lipidových dvojvrstvových membrán na tuhom podklade – s-BLM. Práve povrchy tvorené agarom/agarózou ponúkajú širokú paletu atraktívnych vlastností dôležitých z hľadiska ich možných aplikácií. Agaróza je polysacharid pripravený chemickou modifikáciou agaru. Polysacharidové reťazce vytvárajúce sieťovú štruktúru majú podobu dvojitej závitnice¹. Veľkosť pórov v hydrogéli závisí od koncentrácie agarózy, obyčajne sa pohybuje medzi 100 a 300 nm. Prvýkrát bol ako gélová podložka na prípravu s-BLM použitý hrot soľného mostíka^{2,3}. Týmto spôsobom pripravené membrány majú elektrické vlastnosti podobné klasickým planárnym BLM a s-BLM umiestneným na kovových podkladoch. Okrem toho sa svojou stabilitou nelíšia od s-BLM vytváraných na ostatných druhoch tuhých podkladov. S cieľom rozšíriť hranice aplikácie s-BLM pri konštrukcii biosenzorov, bol navrhnutý spôsob vytvárania membrány horizontálne uloženej na vrstve agarózy umiestnenej na skle⁴. Vývoj lipidovej membrány až po vytvorenie dvojvrstvy bol v tomto prípade regulovaný pomocou hydraulického tlaku. Ďalšia z modifikácií spôsobu prípravy (cit.⁵) využíva umiestnenie membrány medzi dve vrstvy gélu tak, aby sa zvýšila jej ochrana pred poškodením. Pri dlhodobom sledovaní autori nezaznamenali poruchy celist-

vosti takto pripravenej lipidovej dvojvrstvy, v priebehu troch týždňov došlo dokonca k poklesu presakovania membrány na hodnoty porovnateľné s hodnotami uvádzanými pre klasické BLM. Podporná vrstva agarózy bola tiež úspešne použitá pri vytváraní dvojvrstvy na silikónovej fólii s otvorom s možnosťou pridania druhej vrstvy gélu pre stabilizáciu štruktúry membrány a obmedzeniu vyparovania⁶. Podklad z agaru/agarózy dovoľuje rovnako úspešne prekonať jednu z hlavných nevýhod systémov na pevných substrátoch – asymetriu dvoch vrstiev membrány vzhľadom na prostredie, s ktorým susedia. Voľba gélového substrátu môže zlepšiť spoľahlivosť s-BLM a zvýšiť jej stabilitu i s ohľadom na aplikované napätie. Ďalšie vlastnosti ako napríklad fluidita a samotesniaca schopnosť radí s-BLM na agare ku konvenčným BLM. V protiklade k s-BLM umiestnenej na kovovom podklade, s-BLM na agare neblokuje transport iónov. Otvára sa teda možnosť zostrojiť s-BLM senzor nielen výlučne na základe transportu elektrónov, ale aj iónového transportu⁷.

S-BLM môžu byť podrobené skúmaniu pomocou rôznych citlivých analytických metód vhodných pre štúdium povrchov, vrátane elektrochemickej impedančnej spektroskopie (EIS), za predpokladu, že podklad je elektricky vodivý. EIS používa excitačné napätie s nízkou amplitúdou, ktoré môže spôsobiť iba minimálne perturbácie systému. EIS ako nedeštruktívna a citlivá metóda poskytuje široké spektrum informácií o dominujúcich elektrických procesoch v študovanom systéme sa intenzívne využíva práve pri skúmaní rozhraní elektróda/elektrolyt. Vo veľkom počte prác bola potvrdená účinnosť EIS pri testovaní širokého spektra biomateriálov, predovšetkým pri štúdiu povrchov pokrytých lipidmi (napr. cit.^{8,9}) alebo povrchov s imobilizovanými biomolekulami rôzneho pôvodu (napr. cit.¹⁰). Výhodou EIS je možnosť použiť na interpretáciu získaných dát elektrický model pozostávajúci z kombinácie najmä rezistívnych a kapacitných prvkov, ktoré predstavujú skúmaný elektrochemický systém. Teoretická analýza EIS dát fitovaním – nájdením najlepšej aproximácie k experimentálnym krivkám – s pomocou modelu zastúpeného ekvivalentným elektrickým obvodom dovoľuje pochopiť chemické premeny a procesy spojené s elektródovým povrchom pokrytým biomateriálom.

Ako alternatíva k umiestneniu s-BLM na hrote soľného mostíka sa javí využitie hrotu pracovnej elektródy naplnenej agarom slúžiacom ako podklad pre membránu vytváranú tzv. tip-dip metódou. Pretože pracovná elektróda s hydrogélom bude použitá ako podložka pri štúdiu modelových lipidových membrán, je dôležité, aby bol systém stabilný v širokom intervale napätí, keďže vlastnosti podporného systému obsahujúceho gél môžu byť ovplyvnené i použitým dc napätím. Aplikované dc napätie môže hrať dôležitú úlohu aj pri formovaní sa s-BLM, čo sa v konečnom dôsledku môže odraziť na jej vlastnostiach a štruktúre. Zároveň môžu byť určité hodnoty použitého dc napätia užitočné pri inkorporácii a charakteristike niektorých zložiek membrány, napríklad proteínov. Vplyv dc napätia aplikovaného cez asymetrickú s-BLM umiestnenú na hrote 0,3 mm Ag drôtu pokrytého vrstvou teflónu

(cit.¹¹) sa prejavuje v zložitej závislosti Youngovho modulu pružnosti a kapacity membrány od napätia. Bolo preukázané, že zmeny kapacity membrány a jej mechanických parametrov závisia nielen od polarít, ale aj smeru a rýchlosti zmeny napätia. Podľa autorov pozorovaná závislosť elektrických a mechanických vlastností s-BLM od aplikovaného napätia môže byť vysvetlená zmenami povrchového potenciálu a redistribúciou rozpúšťadla. Cyklické meranie prúd/napätie boli použité i pri skúmaní integrity membrán (cit.¹²). Interval napätí bol počas experimentu obmedzený na 500 mV. Bolo stanovené, že stabilita membrán depozitovaných na Ag povrchu sa zlepšila a počet defektov sa znížil pri aplikácii negatívnych hodnôt dc napätia počas formovania sa dvojvrstvy. Podobne napätie rádovo ~ mV bolo aplikované naprieč membránou umiestnenou na Pt elektróde (cit.¹³). Pri nízkych hodnotách napätia boli zaznamenané lineárne voltampérové závislosti. Nad určitou kritickou hodnotou napätia sa stali nelineárnymi a vodivosť sa prejavila ako funkcia napätia.

Napätová závislosť si zasluhuje pozornosť aj z hľadiska možného elektroforačného vplyvu – javu, ktorý je zodpovedný za indukciu a následnú expanziu defektov v lipidovej bariére, či už ide o modelové alebo bunkové membrány^{14–16}. Dramatická zmena elektrického odporu môže značne uľahčiť transport veľkých makromolekúl¹⁷, pretože adsorbencia nabitých makromolekúl na povrchu lipidovej dvojvrstvy je obvyčajne nasledovaná elektroforačnou penetráciou cez povrch elektroforovaných membránových fragmentov. Výhody agarovej elektródy boli potvrdené tiež úspešnou inkorporáciou nemodifikovanej ssDNA do s-BLM depozitovanej na agarovom podklade¹⁸.

Cieľom tejto EIS štúdie sa preto stalo skúmanie vplyvu dc napätia na vlastnosti agarovej pracovnej elektródy s ohľadom na zabezpečenie optimálnych podmienok pre vytváranie stabilných s-BLM s jednoznačne definovanými vlastnosťami na jej hrote.

Experimentálna časť

Materiály

L- α -fosfatidylcholín z vaječného žĺtka (Sigma) bez úpravy, tak ako bol zakúpený, bol použitý na prípravu tzv. formovacieho roztoku. Formujúci roztok pozostával z etanolového roztoku lipidu a *n*-dodekánu v takom množstve, aby konečná koncentrácia lipidu bola 5% pri pomere etanolu k *n*-dodekánu 1:1 (v/v). Rovnako ako ostatné použité chemické látky *n*-dodekán (Sigma) bol čistoty p.a. Všetky elektrochemické experimenty boli uskutočnené v 0,1 mol l⁻¹ KCl. Na prípravu roztokov bola použitá deionizovaná voda (Millipore, Milli-Q-System, $R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, pH 5,5).

Použité prístroje a zariadenia

Na elektrochemickú analýzu bol použitý elektrochemický analyzátor Zahner IM6e (Kronach), ktorý umožňuje

plne počítačovo riadenú EIS. Absolútne hodnoty impedancie $|Z|(f)$ a fázového posunu $\varphi(f)$ boli zaznamenávané vo frekvenčnom intervale 1–1·10⁴ Hz resp. 1 MHz s amplitúdou perturbačného signálu 20 mV. EIS dáta boli analyzované fitovaním impedančných spektier k modelu reprezentovaného ekvivalentným elektrickým obvodom softvérom Zview2.

V termostatickej elektrochemickej bunke vyrobenej zo skla bola umiestnená pracovná elektróda, platinová pomocná elektróda a argentchloridová (3,5 mol l⁻¹ KCl) referenčná elektróda. Pracovná elektróda pozostávala z Ag/AgCl drôtika umiestneného v teflónovej trubičke s 0,5 mm vnútorným priemerom naplnenej 3% agarovým gélom v 0,1 mol l⁻¹ KCl. Kvôli minimalizácii rušivého elektrického šumu bola bunka umiestnená vo Faradayovej klietke. Všetky experimenty boli uskutočnené pri teplote 21,0 ± 0,2 °C v 0,1 mol l⁻¹ KCl s pH 7.

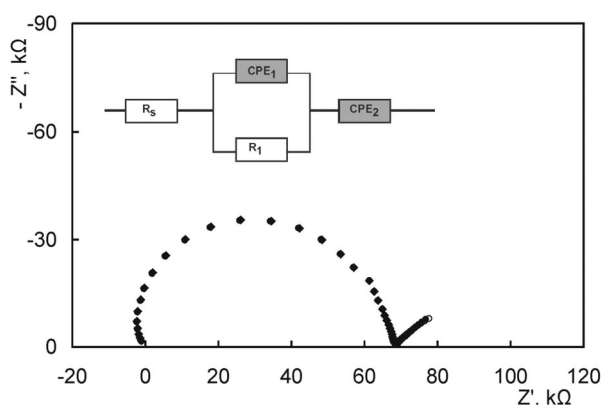
Príprava s-BLM

S-BLM boli vytvárané podobne ako v procedúre popísanej v prácach^{2,3} na hrote pracovnej elektródy tip-dip metódou. Teflónový obal elektródy poskytoval pre lipidovú membránu hydrofóbne ohraničenie, gél slúžil ako hydrofilný podklad. Hrot trubičky bol najprv zrezaný ostrým skalpelom a ponorený do formujúceho roztoku. Po uplynutí krátkej doby bol z formujúceho roztoku vyňatý a ponorený do vodného roztoku, čím sa začal proces samovoľného formovania sa membrány. Vystavenie vplyvu vodného prostredia podporuje také usporiadanie amfifilných molekúl lipidu, ktoré viedlo k vytváraniu lipidovej dvojvrstvy.

Výsledky a diskusia

Vplyv dc napätia na agarovú elektródu

Kvôli vlastnostiam gélových povrchov priaznivých pre vytváranie symetrických lipidových membrán bola najprv študovaná elektrochemická impedančná odozva agarovej pracovnej elektródy bez lipidového filmu ponorenej vo vodnom roztoku. Obr. 1 znázorňuje v Nyquistovom zobrazení impedančné spektrum pri rôznych hodnotách dc napätia (kvôli prehľadnosti sú uvedené len krivky pre (-0,2 V; 0 V; -0,2 V)) v prítomnosti 0,1 mol l⁻¹ KCl pri pH 7. V študovanom intervale frekvencií 1 Hz až 1 MHz pozostáva impedančné spektrum elektródy z dvoch častí. V oblasti vyšších frekvencií (1 MHz až 200 Hz) má tvar nepravidelnej polkružnice. Na zobrazení impedančného spektra v komplexnej rovine reálna časť impedancie v časti ramena spektra pri vyšších frekvenciách nadobúda záporné hodnoty. Záporné hodnoty impedancie môžu mať mnohoraké príčiny, môžu byť spôsobené osciláciami prúdu v potenciostatickom režime kvôli elektrostatickému efektu pri nízkych iónových silách alebo poklesom dostupného povrchu elektródy s rastom polarizácie^{19,20}. V intervale aplikovaných napätí (-0,4 V; -0,2 V; 0 V; -0,2 V; 0,4 V) sa



Obr. 1. Impedančné spektrum Ag/AgCl elektródy umiestnenej v teflónovej trubičke naplnenej 0,1 mol l⁻¹ KCl a ekvivalentný elektrický obvod zodpovedajúci membránou nepokrytej agarovej elektróde. Nyquistov diagram. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: 0,1 mol l⁻¹ KCl pri pH 7. R_s – odpor elektrolytu, kontaktov a spojov; CPE_1 – prvok s konštantnou fázou modelujúci pohyb nabitých častíc cez vrstvu agaru; R_1 – odpor vrstvy agaru; CPE_2 – prvok s konštantnou fázou modelujúci kapacitné vlastnosti rozhrania elektrolyt/agar, ○ +0,2 V, ● 0 V, ◆ -0,2 V

všetky tieto segmenty zodpovedajúce impedančným spektrám pre rôzne hodnoty napätí prekrývajú. V druhom úseku spektra (200 Hz až 1 Hz) je možné pozorovať odlišný obraz, tieto časti kriviek predstavujú priamky, ktoré sa mierne líšia navzájom v závislosti od použitého napätia.

Rozloženie získanej multifrekvenčnej ac odozvy na zmysluplné komponenty bolo uskutočnené modelovaním pomocou ekvivalentného elektrického obvodu. Zvolený ekvivalentný obvod (viď obr. 1) pozostáva z troch častí usporiadaných v sérii: rezistívneho prvku R_s , obvodu pozostávajúceho z paralelne zapojeného rezistívneho prvku

R_1 a prvku s konštantnou fázou CPE_1 a prvku s konštantnou fázou CPE_2 . Veľké množstvo údajov získaných analýzou EIS dát uvádzaných v literatúre potvrdzuje, že membránové systémy na tuhom podklade môžu byť vhodne reprezentované ekvivalentnými obvodmi, ktorých súčasťou sú práve prvky s konštantnou fázou CPE namiesto ideálnej kapacity. Takéto modely lepšie odrážajú neideálnu kapacitnú odozvu skúmaného systému^{21,22}. Hodnoty jednotlivých prvkov obvodu získané fitovaním v intervale frekvencií 1–1.10⁴ Hz sú uvedené v tab. I. Kvalitu fitovania je možné posúdiť podľa hodnôt χ^2 predstavujúcich druhú mocninu smerodajnej odchýlky experimentálnych dát od vypočítanej krivky, rovnako ako pomocou tzv. „Sum Squares“, čo je vážená suma štvorcov úmerná priemernej percentuálnej chybe medzi experimentálnymi dátami a vypočítanou krivkou. Zvolený model viedol k dobrým výsledkom fitovania. χ^2 dosiahli v meranej sérii hodnoty približne 1,8·10⁻⁶ a vážené sumy štvorcov približne 3,9·10⁻⁵.

Prvok CPE_1 elektrického obvodu môže modelovať pohyb nabitých častíc cez tuhú vrstvu agaru. Vypočítaná kapacita dosiahla hodnotu približne 1,1·10⁻¹⁰ F. Parameter neideálnosti CPE_1 -P sa blížil k hodnote 0,9; to znamená, že prvok s konštantnou fázou sa vlastnosťami približuje k vlastnostiam kondenzátora. Vlastnosti CPE_1 sa môžu prejaviť intenzívnejšie vďaka nehomogenitám v rozmeroch a tvare kapilárnych pórov v agare. Zodpovedajúci odpor R_1 dosahoval hodnotu okolo 7,5·10⁴ Ω.

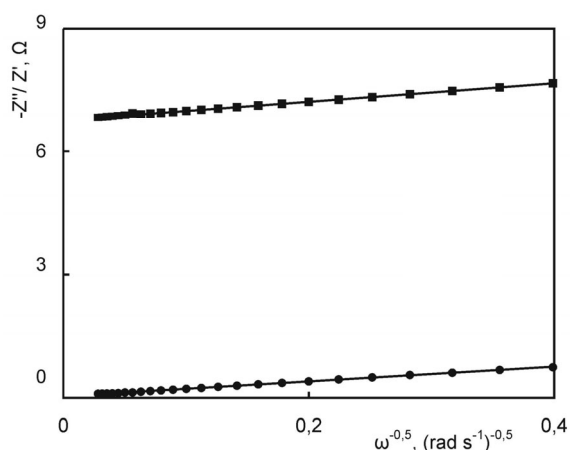
Modelovať kapacitné vlastnosti rozhrania elektrolyt/agar môže prvok s konštantnou fázou CPE_2 , ak rozhranie nie je ideálne hladké, je porózne alebo má povrch zodpovedajúci fraktálovej geometrii. Príslušná časť impedančného spektra môže byť dôsledkom difúzneho transportu náboja, ktorý dominuje v oblasti nižších frekvencií. Fitovanie prvku s konštantnou fázou CPE_2 k experimentálnej krivke viedlo k hodnote parametra neideálnosti CPE_2 -P približne 0,5. Takéto hodnoty CPE_2 -P môžu svedčiť o Warburgovej impedancii. Procedúra fitovania však preukázala lepšiu

Tabuľka I

Parametre agarovej elektródy bez lipidovej vrstvy získané fitovaním pre ekvivalentný elektrický obvod (viď obr. 1)

| U [V] | R_s^a [kΩ] | CPE_1 -T ^b [10 ⁻¹⁰ F] | CPE_1 -P | R_1^c [10 ⁴ Ω] | CPE_2 -T ^d [10 ⁻⁵ F] | CPE_2 -P | $\chi^2 \cdot 10^6^e$ | Sum Sq · 10 ⁵ ^f |
|------------|-----------------|--|------------|--------------------------------|---|------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 0,4 | 0,1 | 1,10 | 0,90744 | 7,48 | 3,74 | 0,46001 | 1,93 | 4,43 |
| 0,2 | 0,1 | 1,06 | 0,91181 | 7,47 | 3,51 | 0,45928 | 3,49 | 8,02 |
| 0 | 0,2 | 1,10 | 0,90806 | 7,52 | 3,68 | 0,46641 | 1,92 | 2,74 |
| -0,2 | 0,2 | 1,17 | 0,90234 | 7,55 | 4,05 | 0,47341 | 0,80 | 1,85 |
| -0,4 | 0,1 | 1,13 | 0,90017 | 7,57 | 4,11 | 0,48054 | 0,96 | 2,20 |

^a R_s – odpor elektrolytu, kontaktov a spojov; ^b CPE_1 – prvok s konštantnou fázou modelujúci pohyb nabitých častíc cez vrstvu agaru (T – kapacita, P – parameter neideálnosti); ^c R_1 – odpor vrstvy agaru; ^d CPE_2 – prvok s konštantnou fázou modelujúci kapacitné vlastnosti rozhrania elektrolyt/agar (T – kapacita, P – parameter neideálnosti); ^e χ^2 – druhá mocnina smerodajnej odchýlky experimentálnych dát od vypočítanej krivky; ^f Sum Sq – vážená suma štvorcov



Obr. 2. Randlesov diagram agarovej elektródy v kontakte s $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri $0,4 \text{ V}$; ■ Z' , ● $-Z''$

zhodu teoretických a experimentálnych dát pri použití frekvenčne závislého prvku s konštantnou fázou namiesto Warburgovej impedancie. V intervale frekvencií 1 až $1 \cdot 10^4 \text{ Hz}$ CPE_2 závisel od aplikovaného napätia v porovnaní s ostatnými prvkami ekvivalentného obvodu najvýraznejšie. Ako sa v priebehu experimentu menilo napätie od kladných po záporné hodnoty, bol pozorovaný mierny rast kapacity CPE_2 a zároveň rástla i hodnota parametra neideálnosti CPE_2 -P. Pri záporných hodnotách napätia sa mobilné nosiče náboja akumulujú na rozhraní. Pri nižších alebo kladných hodnotách sa väčšina nosičov pohybuje smerom od rozhrania.

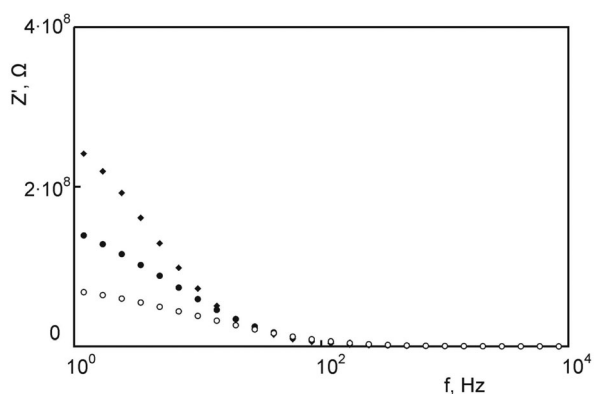
Užitočným indikátorom toho, či je difúzny proces významným prejavom študovaného systému, môže slúžiť Randlesov diagram. Zobrazenie reálnej

a imaginárnej časti impedancie Z vs. $\omega^{-1/2}$ by malo poskytnúť navzájom paralelné priamky ako potvrdenie procesov kontrolovaných difúziou. Ako je znázornené na obr. 2, získané priamky pre $0,4 \text{ V}$ sú paralelné. Podobný trend je možné pozorovať i pre ostatné hodnoty napätia.

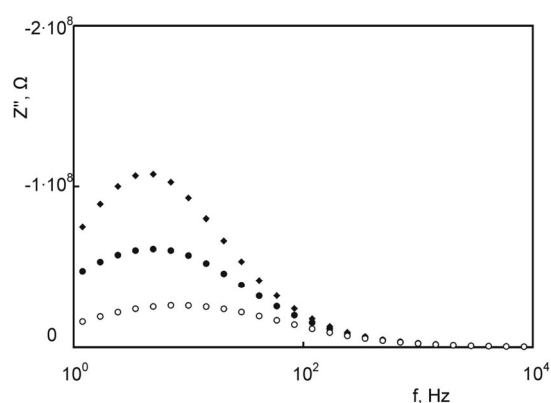
Odpor R_s zapojený v sérii predstavuje príspevok elektrolytu, kontaktov a spojov. V ideálnom prípade na hodnotu R_s nemá vplyv modifikácia povrchu elektródy. Určené hodnoty predstavovali $R_s \sim 0,1 \text{ k}\Omega$.

Vplyv dc napätia na vlastnosti s-BLM na agarovom podklade

Formovanie sa lipidovej dvojvrstvy v režime pokojového potenciálu sa prejavilo nápadnými zmenami impedancie študovaného systému. Lipidy použité na prípravu s-BLM boli elektricky neutrálne, aby bol vplyv napätia na lipidový film viac zreteľný. Utváranie sa membrány s veľkým odporom na hrote elektródy v určitej miere záviselo aj od objemu formujúceho roztoku adheujúceho k povrchu agaru, čo môže ovplyvňovať kvalitu a opakovateľnosť s-BLM^{23,24}. Následne po tom, ako sa vlastnosti s-BLM ustálili, tj. celková impedancia a fázový posun sa nemenili v čase, bola na sledovanie zmien vlastností membrány spôsobených aplikovaným napätím použitá EIS. Hodnoty reálne a imaginárnej časti impedancie na spektrách znázornených na obr. 3 a obr. 4 sumarizujú efekty spôsobené zmenou napätia (kvôli prehľadnosti sú uvedené len krivky pre $-0,2$ až $0,2 \text{ V}$). Na obr. 3 je znázornená zmena reálnej časti impedancie Z' ako funkcie frekvencie v intervale $1-1 \cdot 10^4 \text{ Hz}$. Aby bolo zaručené, že skúmaná membrána sa nachádza v stabilnom stave, medzi snímaním jednotlivých spektier bol zvolený časový interval 30 min. V aplikovanom intervale napätí sa v systéme prejavil pokles hodnôt reálnej časti impedancie Z' a súčasne došlo k jej znižovaniu i s rastom frekvencie. Pri každom z uvedených napätí krivky v oblasti vyšších frekvencií



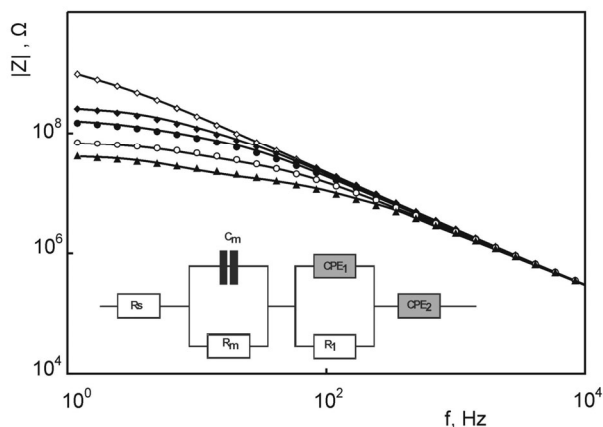
Obr. 3. Frekvenčná závislosť reálnej zložky impedancie Z' s-BLM na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri rôznom dc napätí. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri pH 7, ◆ $+0,2 \text{ V}$, ● 0 V , ○ $-0,2 \text{ V}$



Obr. 4. Frekvenčná závislosť imaginárnej zložky impedancie Z'' s-BLM na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri rôznom dc napätí. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri pH 7, ◆ $+0,2 \text{ V}$, ● 0 V , ○ $-0,2 \text{ V}$

splývajú. Z obr. 3 je rovnako zreteľný rast ac vodivosti, či už s rastom frekvencie alebo zmenou napätia, pri prechode z kladných po záporné hodnoty. Pozorované zmeny môžu byť spojené s redukciou schopnosti s-BLM vytvárať efektívnu bariéru vodivosti a môžu byť dôvodom pre vzostup ac vodivosti s-BLM pri vyšších frekvenciách. Na obr. 4 je znázornená séria frekvenčných závislostí imaginárnej zložky celkovej impedancie Z'' . Takýto typ závislosti je v literatúre označovaný ako „loss spectrum“. V iónových vodičoch dielektrické straty pozostávajú z dvoch zložiek: dc vodivostných strát a strát súvisiacich s dipólovou relaxáciou, ktorá je atribútom dipólovej relaxácie polarizácie priestorového náboja. Týmto typom spektra môže byť dokumentované obmedzenia pohybu iónov cez lipidovú vrstvu pod vplyvom elektrického poľa. Absencia Z'' píku v študovanom intervale frekvencií označuje absenciu disipácie prúdu v systéme. Na obr. 4 je pre každé spektrum viditeľný pík. Frekvencia zodpovedajúca tomuto širokému asymetrickému píku sa posúva do vyšších hodnôt pri poklese hodnôt napätia a pokračuje i po zmene jeho polaritý k záporným hodnotám. Rozširovanie píku pri raste napätia je potvrdením existencie napäťovo závislých relaxačných procesov v systéme. Okrem toho, hodnota impedancie tak isto klesá s posunom k záporným hodnotám, čo svedčí i o poklese kapacity membrány umiestnenej na podklade, pretože signifikantným príspevkom k Z'' je kapacita elektrickej dvojvrstvy. Nakoniec, všetky krivky splývajú v oblasti vysokých frekvencií, čo môže byť spôsobené akumuláciou priestorového náboja v materiáli.

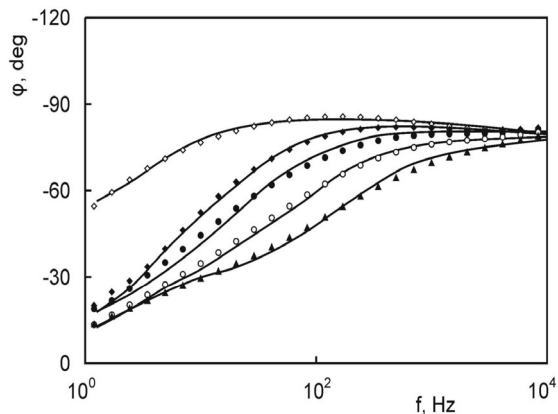
Obr. 5 a obr. 6 znázorňujú v uvedenom poradí frekvenčnú závislosť absolútnej hodnoty impedancie $|Z|$ a fázového posunu φ s-BLM umiestnenej na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri napätí meniacom sa



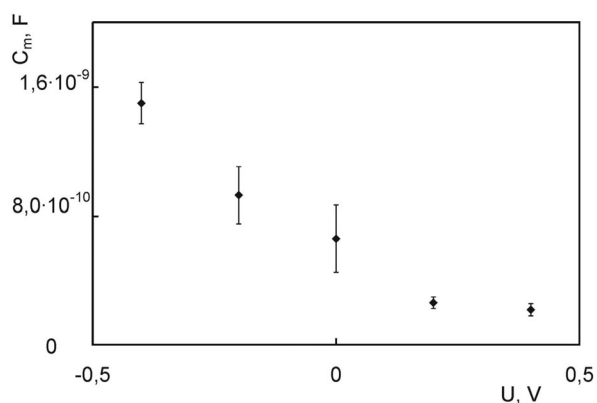
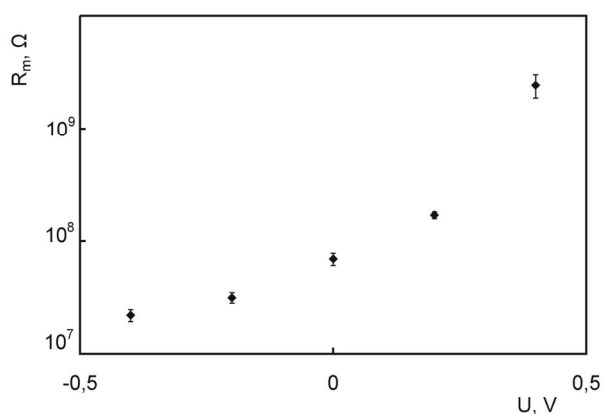
Obr. 5. Frekvenčná závislosť absolútnej hodnoty impedancie $|Z|$ s-BLM na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri rôznom dc napätí a ekvivalentný elektrický obvod zodpovedajúci s-BLM na agarovej elektróde. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri pH 7. Čiary – fit k ekvivalentnému elektrickému obvodu, \diamond +0,4 V, \blacklozenge +0,2 V, \bullet 0 V, \circ -0,2 V, \blacktriangle -0,4 V

v intervale od $-0,4$ do $0,4$ V. Interpretácia impedančných spektier bola uskutočnená pomocou ekvivalentného elektrického obvodu zobrazeného na kresbe vlozenej v obr. 5. Schéma obsahuje v porovnaní s obvodom zobrazeným na obr. 1 dva dodatočné prvky R_m a C_m zodpovedajúce odporu a kapacite lipidovej dvojvrstvy umiestnenej na hrote pracovnej elektródy. Zvolený model poskytol v intervale frekvencií $1-1 \cdot 10^4$ Hz fit k experimentálnym dátam s χ^2 rovným $7,7 \cdot 10^{-4}$ a váženou sumou štvorcov približne $1,6 \cdot 10^{-2}$ spriemerených pre sériu spektier. Fitovanie bolo uskutočnené pri zafixovaných hodnotách R_s , ktoré boli získané z príslušných spektier pre holú nepokrytú pracovnú elektródu. Výsledky fitovania sú horšie ako tie, ktoré boli dosiahnuté pre holú elektródu.

Odpor a kapacita lipidovej dvojvrstvy pri $0,4$ V stanovené pomocou ekvivalentného elektrického obvodu predstavovali $R_m = 2,45 \cdot 10^9 \Omega$, $C_m = 2,15 \cdot 10^{-10} \text{ F}$. Zodpovedajúci špecifický odpor a kapacita membrány dosahovali hodnoty $4,81 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-2}$ a $0,11 \mu\text{F cm}^{-2}$. Tak ako sa napätie menilo od kladných k záporným hodnotám, menili sa i hodnoty R_m a C_m znázornené na obr. 7 a obr. 8. Zmeny napätia spôsobili pokles odporu membrány na hodnotu $R_m = 2,19 \cdot 10^7 \Omega$ pri $-0,4$ V. Súčasne sa menila i kapacita membrány, ktorá kontinuálne rástla po hodnotu $C_m = 1,50 \cdot 10^{-9} \text{ F}$. Zodpovedajúce hodnoty špecifického membránového odporu a kapacity predstavujú $0,04 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-2}$ a $0,76 \mu\text{F cm}^{-2}$. Hodnoty špecifickej kapacity dosiahnuté pri $-0,4$ V sú porovnateľné s hodnotami, ktoré sa v literatúre udávajú pre konvenčné planárne BLM bez rozpúšťadla^{25,26}, rovnako ako pre BLM pripravené z hydrogenovaného vaječného lecitínu²⁷. Sú približne rovnako veľké aj pre BLM vytvárané z natívneho vaječného lecitínu pre napätie pohybujúce sa v intervale od 0 do $-0,2$ V



Obr. 6. Frekvenčná závislosť fázového posunu φ pre s-BLM na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri rôznom dc napätí. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri pH 7. Čiary – fit k ekvivalentnému elektrickému obvodu (obr. 5), \diamond +0,4 V, \blacklozenge +0,2 V, \bullet 0 V, \circ -0,2 V, \blacktriangle -0,4 V

Obr. 7. Závislost' kapacity membrány C_m od napätiaObr. 8. Závislost' odporu membrány R_m od napätia

(cit.²⁸). Z výsledkov našich experimentov vyplýva, že s-BLM vystavené kladným hodnotám napätia môžu sotva spĺňať kritéria kladené na regulárne lipidové dvojvrstvy, hoci ich špecifický membránový odpor svedčí o vysokej miere kompaktnosti lipidového filmu. Údaje zobrazené na obr. 7 vypovedajú o výraznej zmene kapacity, ktorá môže byť čiastočne vysvetlená spätným pohybom rozpúšťadla z lipidového filmu k okrajom agarového podkladu susediacim s teflonovým obalom. Skutočne, bolo zistené, že špecifická kapacita membrány dosahuje hodnotu $0,4 \mu\text{F cm}^{-2}$ vtedy, keď obsahuje také uhľovodíkové rozpúšťadlo ako je *n*-dekán^{25,29}. V našich experimentoch bola súčasne so zmenou kapacity membrány pozorovaná i výrazná zmena membránového odporu. Tak ako sa napätie menilo z kladných po záporné hodnoty, odpor membrány klesal súčasne s rastom kapacity membrány. Posun napätia smerom k záporným hodnotám by mohol spôsobiť oslabenie väzieb membrána/agarový podklad vedúce k destabilizácii štruktúry membrány. Zároveň by sa mohol zvyšovať počet

defektných miest a možných poškodení v štruktúre membrány, ktoré by pri hodnotách napätia prevyšujúcich $-0,4$ V mohli spôsobiť jej úplnú deštrukciu. Defektné miesta v lipidovej dvojvrstve môžu byť vyplnené molekulami vody, čo môže tiež prispieť k zmene dielektrických vlastností lipidového filmu pokrývajúceho podklad.

Záver

Cieľom práce bolo informovať o možnostiach použitia pracovnej elektródy naplnenej agarom ako hydrogélového podkladu pre formovanie stabilnej lipidovej dvojvrstvovej membrány tip-dip metódou. Z uskutočnených experimentov v predloženej práci vyplynuli nasledujúce závery. Vlastnosti podporného systému obsahujúceho gél sú dostatočne stabilné v aplikovanom intervale dc napätí. Na základe výsledkov získaných pre EIS možno konštatovať, že použitie agarovej elektródy poskytuje uspokojivé výsledky v intervale frekvencií $1-1 \cdot 10^4$ Hz. Prezentované vlastnosti v skúmanom intervale napätí preukázali vhodnosť pre depozitovanie s-BLM. Elektrické vlastnosti takto umiestnenej membrány významne záviseli od aplikovaného dc napätia. Hodnoty špecifickej kapacity s-BLM dosiahnuté pri $-0,4$ V sú porovnateľné s hodnotami, ktoré sú udávané pre konvenčné planárne BLM. Posun napätia smerom k záporným hodnotám bol sprevádzaný výraznou zmenou membránového odporu spôsobený rastom počtu defektných miest a možných poškodení v štruktúre membrány.

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore VEGA MŠ SR a SAV – č. grantu: 1/3403/06 a 1/0802/09.

LITERATÚRA

- Deriu A., Cavatorta F., Dicola D., Middendorf H. D.: *J. Phys.* **3**, 237 (1993).
- Yuan H., Leitmannova-Ottova A., Tien H. T.: *Mat. Sci. Eng.* **4**, 35 (1996).
- Lu X. D., Ottova A. L., Tien H. T.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* **39**, 285 (1996).
- Ide T., Yanagida T.: *Biochem. Biophys. Res. Com.* **265**, 595 (1999).
- Costello R. F., Peterson I. R., Heptinstall J., Walton D. J.: *Biosens. Bioelectron.* **14**, 265 (1999).
- Maurer J. A., White V. E., Dougherty D. A., Nadeau J. L.: *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2577 (2007).
- Asaka K., Tien H. T., Ottova A.: *J. Biochem. Biophys. Meth.* **40**, 27 (1999).
- Steinem C., Janshoff A., Ulrich W. P., Sieber M., Galla H. J.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1279**, 169 (1996).
- Legiš M., Laputková G., Sabo J., Vojčíková L.: *Physiol. Res.* **56**, S85 (2007).
- Terretaz S., Ulrich W. P., Vogel H., Hong Q., Dover L. G., Lakey J. H.: *Protein Sci.* **11**, 1917 (2002).

11. Hianik T., Passechnik V. I., Sargent D. F., Dlugopolsky J., Sokolikova L.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 37, 61 (1995).
12. Haas H., Lamura G., Gliozzi A.: *Bioelectrochemistry* 54, 1 (2001).
13. Basu R., De S., Ghosh D., Nandy P.: *Physica A (Amsterdam)* 292, 146 (2001).
14. Pliquett U., Langer R., Weaver J. C.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1239, 111 (1995).
15. Kotulska M., Kubica K., Koronkiewicz S., Kalinowski S.: *Bioelectrochemistry* 70, 64 (2007).
16. Kakorin S., Brinkmann U., Neumann E.: *Biophys. Chem.* 117, 155 (2005).
17. Rols M.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1758, 423 (2006).
18. Zhou H., Liu N., Gao Z., Wang H., Fang Y.: *Electrochem. Commun.* 10, 787 (2008).
19. Survila A., Mockus Z.: *Electrochim. Acta* 44, 1707 (1999).
20. Koper M. T. M.: *J. Electroanal. Chem.* 409, 175 (1996).
21. MacDonald R. J.: *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*. J. Wiley, New York 1987.
22. Vallejo A. E., Gervasi C. A., v knihe: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* (Tien H. T. Ottova A. ed.), str. 331. Elsevier, Amsterdam 2006.
23. Zhang H., Zhang Z., Li J., Cai S.: *Electrochem. Commun.* 9, 605 (2007).
24. Bordi F., Cametti C., Gliozzi A.: *Bioelectrochemistry* 57, 39 (2002).
25. Montal M., Mueller P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3561 (1972).
26. Purrucker O., Hillebrandt H., Adlkofer K., Tanaka M.: *Electrochim. Acta* 47, 791 (2001).
27. Antonov V. F., Anosov A. A., Norik V. P., Korepanova E. A., Smirnova E. Y.: *Eur. Biophys. J.* 32, 55 (2003).
28. Antonov V. F., Smirnova E. Yu., Shevchenko E. V.: *Lipid Membranes at the Phase Transitions*. Nauka, Moscow 1992.
29. Fujiwara H., Fujihara M., Ishiwata T.: *J. Chem. Phys.* 119, 6768 (2003).

G. Laputková, M. Legiň, and J. Sabo (*Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine, Šafárik University, Košice, Slovak Republic*): **Agar Working Electrode as a Support for Bilayer Lipid Membrane: Effects of Direct Current Bias Voltages**

The agar working electrode as a hydrogel support for bilayer lipid membranes (BLM) was studied by electrochemical impedance spectroscopy. The aim was to study the influence of dc bias voltage on the formation of a stable supported bilayer lipid membrane (s-BLM) on the electrode tip. It was concluded that the hydrogel support is sufficiently stable in the applied range of bias voltages. The agar electrode provides satisfactory results in the frequency range $1-1 \cdot 10^4$ Hz. The electrode properties suggest applicability in deposition of s-BLM. Electric properties of s-BLM significantly depend on the dc bias voltage. The specific membrane capacitance of s-BLM at -0.4 V was comparable with that of a conventional planar BLM. However, a shift to negative bias voltages led to a significant change of membrane resistance, possibly due to the increasing number of pores or defective structures in the lipid bilayer.



SIGMA-ALDRICH®



62. sjezd asociací českých a slovenských chemických společností

28. – 30. června 2010, Pardubice

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

62. sjezd asociací českých a slovenských chemických společností se koná při příležitosti oslav šedesátého výročí vysokého školství v Pardubicích pod záštitou děkana Fakulty chemicko-technologické.

Sekce sjezdu

- Anorganická chemie (včetně bioanorganické); garant: **I. Lukeš**
- Organická chemie (včetně bioorganické a farmaceutické); garant: **M. Sedlák**
- Analytická chemie (včetně bioanalytické); garant: **M. Holčapek**
- Fyzikální, teoretická a počítačová chemie; garant: **P. Čárský, M. Urban**
- Anorganické, kompozitní a polymerní materiály (včetně organických polymerů); garant: **Mir. Vlček, A. Kalendová**
- Přírodní látky (fytoceutika, biologická aktivita, fytofarmaka); garant: **V. Šimánek**
- Chemické vzdělávání, historie a popularizace chemie; garant: **H. Čtrnáctová**
- Průmyslová chemie (ChemProgres); garant: **J. Hanika**
- Potravinářská chemie (včetně doplňků stravy, nutraceutik); garant: **L. Červenka**
- Nanotechnologie (nanomateriály a nanotechnologie materiálově-chemického směru) garant: **G. S. Martynková** (ve spolupráci s projektem OP VpK – „TEAM – CMV“)
- Termická analýza a kalorimetrie; garant: **P. Šulcová**
- Environmentální inženýrství; garant: **J. Chýlková**

Organizační výbor: předseda – T. Wágner, H. Pokorná, A. Vlková, R. Řápková, K. Ventura, P. Mikulášek, L. Svoboda, P. Kalenda, Mir. Vlček, R. Svoboda, V. Zima, A. Komárková, L. Vařeková, M. Rolečková, B. Frumarová

Vědecký výbor: předseda – M. Frumar, J. Ulrichová, M. Drábik a odborní garanti jednotlivých sekcí

Předběžný program

Pondělí 28. 6. 2010

Registrace, ubytování (sjezdová kancelář recepce nové budovy Fakulty chemicko-technologické, Pardubice – Polabiny)

Slavnostní zahájení (Aula Arnošta z Pardubic, Univerzita Pardubice)

Plenární přednášející: prof. Dr. Michael Graetzel, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne Laboratoire de Photonique et Interfaces, Lausanne, Švýcarsko

Koncert

Uvítací večer

Úterý 29. 6. 2010

Plenární přednášky

Přednášky v sekcích, minisymposia

Zahájení všech plakátových sdělení a výstavy (prostory nové budovy FChT Pardubice – Polabiny), večer – Raut s vyhlášením vítěze CENY SHIMADZU 2010

Středa 30. 6. 2010

Plenární přednášky

Přednášky v sekcích, minisymposia

Vyhlášení vítězů plakátových sdělení a „Wine, cheese and ginger bread party“

Čtvrtek 1. 7. 2010

Exkurze, výlety

Termíny:

řádná registrace do 30. dubna 2010
zaslání abstraktu do 31. března 2010

Poplatky*:

| | |
|--------------------|-----------|
| účastník, člen** | 4400,- Kč |
| účastník, nečlen** | 5400,- Kč |
| student, člen** | 3400,- Kč |
| student, nečlen** | 4400,- Kč |

* uvedené ceny jsou včetně DPH

** AČChS, ASChFS, SChS, ČSCh

pozn.: poplatek zahrnuje konferenční materiály, občerstvení a společenský program

Kontakty:

62.sjezd@upce.cz

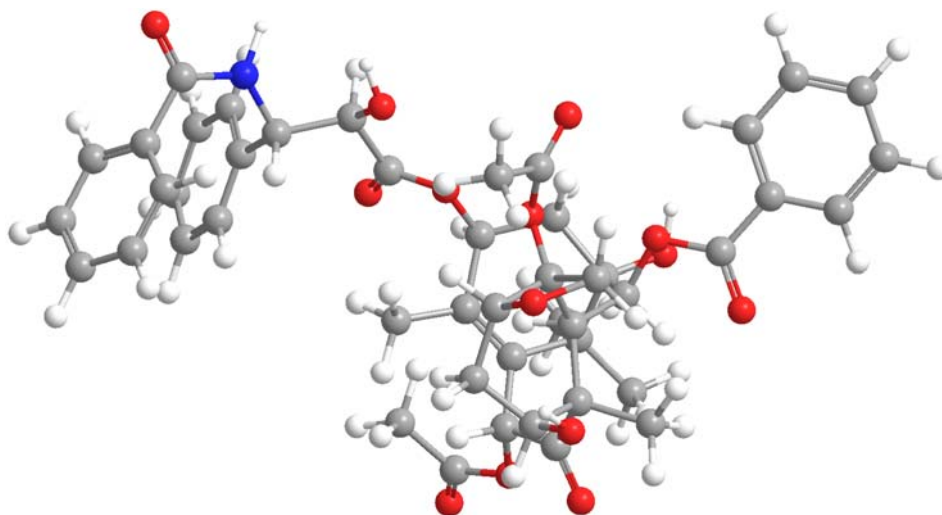
tomas.wagner@upce.cz

miloslav.frumar@upce.cz

Veškeré aktuální informace najdete na internetové adrese: <http://sjezdCsSch2010.upce.cz>.



SIGMA-ALDRICH



X. MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ
MLADÝCH BIOLOGŮ,
BIOCHEMIKŮ
A CHEMIKŮ
pořádané firmou Sigma-Aldrich

25.5. – 28.5. 2010

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali
Radmila Řápková, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

X. JUBILEJNÍ MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH BIOLOGŮ, BIOCHEMIKŮ A CHEMIKŮ

Před třemi lety jsem na tomto místě slibovala, že převezmu štafetu organizování konference, která se v letošním roce bude konat již po desáté. Též jsem vyslovila přání, abychom účast na této konferenci rozšířili o mladé vědce ze Slovenska.

U příležitosti každého jubilea dochází obvykle k pohledu zpět a k určitému bilancování a tak si dovoluji i já při tom ještě poměrně mladém jubileu o trochu hodnocení.

Na začátku stála myšlenka svést dohromady mladé vědce a dát jim příležitost předvést si navzájem, čím se zabývají, tzv. se otrkat, osvojit si techniku a dovednosti při prezentaci své práce, ale i prostě pobýt společně na příjemném místě a navázat kontakty s kolegy z příbuzných oborů a pracovišť.

Chlubiti se vlastními úspěchy sice není příliš vhodné, nicméně ohlasy i komentáře jiných (a především účastníků samých) potvrzují, že tzv. „Amerika“, jak ji rád nazývá Pavel Drašar podle místa konání jedné z prvních, je akce opravdu úspěšná. Mnozí z těch, kteří byli na konferenci ohodnoceni jako nejlepší, úspěšně pokračují ve vědecké kariéře a jsem ráda, že v mnoha případech ocenění na této konferenci přispělo alespoň v malé míře k těmto úspěchům.

Podarilo se již přivést na konferenci také mladé kolegy ze Slovenska a odborná komise má již po třetí alespoň jednoho člena právě ze Slovenska. Sice ještě trochu váhavý, nicméně viditelný nárůst slovenských účastníků, mě vede k víře, že akce již překonala česko-slovenskou hranici.

K jubilejnímu bilancování patří ovšem též dík těm, kteří každoročně neváhají obětovat svůj volný čas k přípravě akce, výběru účastníků, jejich hodnocení i výběru těch nejlepších. Je to především již zmíněná odborná komise, jíž patří velký dík za její práci a vytrvalost, jsou to kolegové z chemické i biochemické společnosti, kteří akci podporují a v neposlední řadě též pracovníci naší firmy, kteří organizují a zajišťují hladký průběh celé akce.

Do dalšího desetiletí nám všem přeji nepolevující nadšení, hodně mladých nadějných vědců i další nárůst povědomí o akci na Slovensku. A zároveň příznávám, že bych ráda uskutečnila myšlenku, kterou v jednom ze svých úvodů k této konferenci vyrazil Pavel Drašar, aby se podařilo zorganizovat mezinárodní finále, alespoň na úrovni středoevropského regionu.

Desátému ročníku „Ameriky“ zdar !

Daniela Dornerová
Sigma-Aldrich Praha

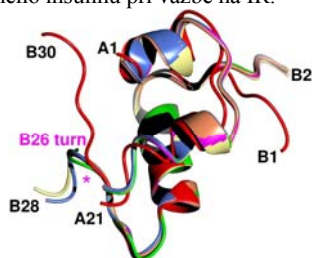
STRUKTURY VYSOCE AKTIVNÍCH ANALOGŮ INSULINU NAZNAČUJÍ AKTIVNÍ FORMU HORMONU

EMÍLIA ANTOLÍKOVÁ^a, JIŘÍ JIRÁČEK^{a*}, LENKA ŽÁKOVÁ^a, CHRISTOPHER J. WATSON^a, JOHAN P. TURKENBURG^b, GUY G. DODSON^b a MAREK A. BRZOWSKI^b

^aÚOCHB AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika, ^bDepartment of Chemistry, The University of York, Heslington, York, YO10 5YW, United Kingdom

Insulin je klíčový hormon, který reguluje hladinu krevní glukosy a má široký účinek v metabolismu proteinů a lipidů. Působení insulinu je zprostředkováno vazbou jeho monomeru na specifický receptor (IR). Navzdory dlouholetému úsilí není struktura IR v komplexu s insulinem známa a informace o struktuře insulinu jsou založeny pouze na neaktivních zásobních a multimerních formách hormonu. Předpokládá se, že molekula insulinu podléhá během vazby na IR konformačním změnám. Odklonem aminokyselin v pozicích B25-B30 od centrální části molekuly insulinu by mělo dojít k zpřístupnění aminokyselin A1-A3, které jsou důležitou součástí vazebného místa pro IR.

V této studii jsme se pokusili definovat strukturní znaky aktivní formy insulinu. Připravili jsme sérii analogů insulinu s modifikacemi v poloze B26 a určili jsme jejich vazebné afinity vůči IR a jejich krystalové struktury. Neaktivnější analog [NMeAlaB26]-DTI-NH₂ (465%) byl krystalizován jako monomer s novou konformací v pozicích B24-B26, která se vyznačuje β-ohybem typu II (B26-ohyb). Totožný či podobný B26-ohyb byl identifikován i dalších analogů s N-methylovanou či D-aminokyselinou v poloze B26. Důsledkem přítomnosti B26-ohybu v molekule insulinu je odklon aminokyselin B25-B26(B30) od centrální α-šroubovice a N-konce A-řetězce insulinu. Tím dochází k odhalení předtím skrytých aminokyselin A1-A3 (obr. 1). Konvergence struktur vysoce aktivních analogů insulinu naznačuje, že pozorovaný B26-ohyb by mohl být velmi podobný struktuře, která charakterizuje aktivní formu přirozeného insulinu při vazbě na IR.



Obrázek 1. Superpozice hlavního řetězce lidského insulinu (červeně) a několika analogů s N-methylací v pozici B26.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR LC06077, GA AVČR KJB400550702 a AVČR Z40550506.

LITERATURA

- Jiráček J., Žáková L., Antolíková E., Watson C. J., Turkenburg J. P., Dodson G. G., Brzozowski A. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v tisku.

EVALUÁCIA FLUORIMETRICKÉHO TESTU NA DETEKCIU CYTOTOXICKÉHO EFEKTU GÉNOVEJ TERAPIE SPROSTREDKOVANEJ MEZENCHÝMOVÝMI KMEŇOVÝMI BUNKAMI *IN VITRO*

LENKA BARANOVIČOVÁ^a a MIROSLAVA MATUŠKOVÁ^b

^aUniverzita Komenského v Bratislave, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava; ^bÚstav experimentálnej onkológie SAV, Laboratórium molekulárnej onkológie, Vlárská 7, 833 91 Bratislava, SR
Lenka.Baranovic@gmail.com

Mezenchýmové kmeňové bunky (mesenchymal stem cells; MSC) sú heterogénna populácia nediferencovaných multipotentných buniek s unikátnymi vlastnosťami. Ich schopnosť seba-obnovy a opravy poškodení je jedinečná. Dokážu rozpoznať chemické signály vysielané poškodeniami v organizme (trauma, fraktúra, nekróza, zápal, nádory...), krvnou cestou doputovať do takéhoto miesta, usídlit' sa, vplyvom rastových faktorov rýchlo proliferovať a diferencovať na príslušný typ tkaniva. Poškodenie tak zregenerujú bez jaziev či zrastov¹.

Podľa špeciálnej komisie, ktorá sa zaoberá MSC (The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy) musia tieto bunky spĺňať isté kritériá, aby získali status „MSC“. Po prvé musia byť schopné adherovať na plast za normálnych kultivačných podmienok. Po druhé musia exprimovať povrchové CD markery: CD105, CD73, CD90 a naopak nesmú exprimovať: CD45, CD31, CD14, CD11b, CD79α, CD19 a HLA II. triedy. Posledným kritériom je diferenciácia do troch bunkových typov – adipocytov, osteoblastov a chondroblastov za špecifických kultivačných podmienok².

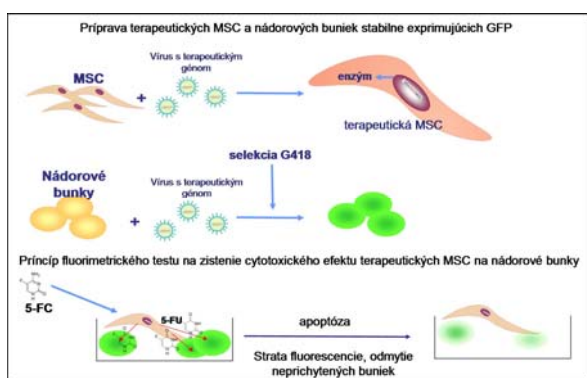
MSC sa vyskytujú v rôznych typoch tkanív derivovaných z mezenchýmu. Ich prítomnosť bola dokázaná v kostnej dreni, pupečníkovej krvi, v spojivových tkanivách, svaloch či v srdci. V Laboratóriu molekulárnej onkológie ÚEO SAV využívame MSC derivované z tukového tkaniva - AT-MSC (adipose tissue-derived MSC). Tukové tkanivo je získavané ako odpadový materiál po liposukcii. Jednoduchým postupom sa dajú z neho izolovať mezenchýmové kmeňové bunky.

Na základe poznatku, že MSC sú schopné vyhľadávať poškodenia a pomocou veľmi podobných signálov aj nádory, sa z nich stal atraktívny nástroj pre génovú terapiu, kde sa využívajú ako vektory. Geneticky modifikované AT-MSC obsahujú terapeutické gény, ktorých exprimovaním vznikajú enzýmy, konvertujúce netoxické predliečivá na toxické metabolity bezprostredne v blízkosti nádoru. Takýmto spôsobom by sa eliminovali nežiaduce účinky bežne používaných chemoterapeutík.

Využívame dva systémy MSC-sprostredkovanej génovej terapie - HSV-tk/GCV a CD/5-FC. Prvým terapeutickým génom je tymidínkináza (HSV-tk) derivovaná z vírusu *Herpes simplex*, ktorá fosforyluje netoxický ganciklovir (GCV) na ganciklovir-monofosfát. Ten je konvertovaný endogénnymi kinázami na veľmi toxický

ganciklovir-trifosfát. Exprimovaním druhého génu vzniká enzým cytozín-deamináza (CD), konvertujúca netoxický 5-fluorocytosín (5-FC) na vysoko toxický 5-fluorouracyl (5-FU).

V MSC-sprostredkovej terapii sme kokultivovali nádorové bunky stabilne exprimujúce zelený fluorescenčný proteín (green fluorescent protein; GFP) s AT-MSK nesúcimi jeden z terapeutických génov – TK alebo CD. Sledovali sme cytotoxický efekt HSV-tk/CD-MSK na nádorové bunkové línie a určili efektívnosť jednotlivých terapeutických systémov podľa tzv. fluorimetrického testu. Po 24 hodinách vzájomnej kultivácie oboch typov buniek sme pridali rôzne koncentrácie predliečiva – GCV/5-FC a následne po 48 h zmerali úbytok intenzity fluorescence pomocou fluorimetra POLARstar OPTIMA. Čím bola nižšia intenzita fluorescence, tým bolo viac uhynutých nádorových buniek a terapia sa javila ako účinnejšia. Následne sme porovnali efektívnosť eliminácie jednotlivých nádorových bunkových línií.



Obr. 1. Príprava terapeutických/GFP⁺ buniek a princíp fluorimetrického testu pomocou CD/5-FC terapie

Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0146/10 a APVV 0260-07.

LITERATÚRA

1. Delorme B., Chateauvieux S., Charbord P.: Regen Med. 1, 497 (2006).
2. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E.: Cytotherapy 9, 301 (2007).

CHARAKTERISTIKA LIDSKÝCH GRANULÓZOVÝCH BUNĚK ZÍSKANÝCH PŘI *IN VITRO* FERTILIZACI

LENKA BRŮČKOVÁ^a, TOMÁŠ SOUKUP, JIŘÍ MOOS, MARTINA MOOSOVÁ, JANA PAVELKOVÁ, KAREL ŘEŽÁBEK, BENJAMÍN VÍŠEK a JAROSLAV MOKRÝ

*Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Hradci králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové
bruckova@gmail.com*

Cílem naší práce bylo stanovení fenotypu a základních biologických charakteristik populace granulózových buněk (GCs, granulosa cells) získaných z folikulů lidských ovárií. GCs byly získány od 41 hormonálně stimulovaných žen podstupujících *in vitro* fertilizaci. Buňky byly transportovány při 37 °C ve folikulární tekutině, kultivovány v médiu DMEM/F12 obohaceném o růstové faktory (EGF, bFGF), folikuly stimulující hormon a 2% fetálního telecího séra. V průběhu experimentu jsme pozorovali významný vliv folikulární tekutiny na proliferaci buněk v prvním týdnu kultivace, umožňující získat velké množství buněk s vysokým proliferacním potenciálem.

Analýza ukázala, že GCs kultivované dlouhodobě *in vitro* potřebují pro prvních 20 populačních zdvojení 68–101 hodin. Viabilita kultivovaných buněk v proliferacní fázi se výrazně neměnila (92% ± 5). DNA analýza prokázala 46,7–61,6 % buněk v SG₂ fázi buněčného cyklu. Analýza fenotypu pomocí průtokové cytometrie prokázala vysokou pozitivitu pro znaky CD29, CD44, CD73, CD90, CD166, nízkou pozitivitu pro HLA-1 a negativitu pro znaky CD34, CD45, CD49e, CD71, CD105, CD146, CD222.

Sledovali jsme počet populačních zdvojení a čas potřebný na zdvojení celé populace buněk. Podařilo se nám vykultivovat línie GCs, která měla 3x vyšší počet populačních zdvojení. Byla také stanovena délka telomer, která klesala v závislosti na počtu dní *in vitro* kultivace. Pro vyloučení nádorové transformace buněk při kultivaci, byl u všech línií stanoven karyotyp. Jednotlivé línie byly navzájem porovnány a srovnány se stabilizovanou línií COV434 pocházející z granulózového nádoru. Podle našeho protokolu je možné dlouhodobě kultivovat GCs, které mohou poskytnout výborný model pro pochopení fyziologických dějů při folikulogenezi a studium patologických změn v lidském ováriu.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů ČR č. MSMT 0021620820, MSMT 0021627502 a IGA MZ č. NS/9781-3.

MONITOROVÁNÍ FOSFORYLACE CRKL A SRC KINÁZ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ LÉČENÝCH INHIBITORY TYROZINKINÁZ

LENKA CALÁBKOVÁ^a, RENÁTA MOJZÍKOVÁ^a, EDGAR FABER^b a VLADIMÍR DIVOKÝ^{a,b}

*^aÚstav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc; ^bHemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
lenka.calabkova@upol.cz*

Chronická myeloidní leukémie (CML) je onemocnění, které je asociováno se vznikem tzv. Filadelfského chromosomu (Ph) vlivem reciproké chromosomové translokace t(9;22)(q34;q11). Na genové úrovni takto vzniká nový fúzní gen *BCR-ABL* kódující konstitutivně aktivní Bcr-

Abl tyrozinovou kinasu (TK), která je nezbytná a dostačující pro nádorovou transformaci buňky¹. Specifické inhibitory tyrozinokinas (TKI) představují v současnosti první volbu při léčbě pacientů s CML.

V naší laboratoři jsme vyvinuli funkční *in vitro* test, který nám umožňuje sledovat míru účinnosti TKI v inhibici Bcr-Abl TK. Metodika je založena na inkubaci izolovaných leukocytů v přítomnosti TKI a následné detekci intracelulárních hladin aktivovaných resp. forforylovaných forem cílových molekul Bcr-Abl TK, především proteinu Crkl (specifický substrát Bcr-Abl TK) a kinas rodiny Src (SFK). Aktivace SFK je asociována s progresí onemocnění a rezistencí na léčbu. Pro zvýšení validity výsledku jsme od původního hodnocení rezistence/citlivosti pomocí imunoblotu² přešli na průtokovou cytometrii s imunodetekcí, která ve srovnání s imunoblotem nabízí jak kvalitativní, tak kvantitativní zhodnocení a je navíc laboratorně a co do spotřeby vzorku méně náročná.

Pomocí *in vitro* funkčního testu sensitivity leukocytů na TKI, který koreluje s průběhem onemocnění³, lze velmi účinně nejen predikovat odpověď nemocného na léčbu těmito TKI, ale zejména včasným odhalením nastupující rezistence na léčbu přispět k rozhodování o léčbě s cílem dosáhnout a udržet optimální léčebnou odpověď a zabránit progresi onemocnění^{4,5}.

Podpořeno granty NS9949-2, MSM6198959205 a společností Bristol-Myers Squibb.

LITERATURA

1. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V.: *Blood* 96, 3343 (2000).
2. Naušová J., Priwitzerová M., Jarošová M., Indrák K., Faber E., Divoký V.: *Čas. Lék. Česk.* 145, 377 (2006).
3. Solna R, Veselovska J, Rozmanova S, Faber E, Jarosova M, Holzerova M, Indrak K, Divoky V.: *Hematol J.* 93, a0558 (2008).
4. Veselovska J, Solna R, Jarosova M, Faber E, Urbankova H, Holzerova M, Balcarkova J, Indrak K, Divoky V.: *Blood* 112, a1624 (2008).
5. Faber E, Mojzíkova R, Plachy R, Rozmanova S., Stastny M., Divoka M., Jarosova M., Indrak K., Divoky V.: *Leuk. Res.* 34, e91 (2009).

IDENTIFIKACE NOVÝCH VAZEBNÝCH PARTNERŮ PRO ONKOPROTEIN MDM2 A JEJICH VLIV NA REGULACI MDM2 A P53 V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

KATEŘINA CETKOVSKÁ^a, KAREN H. VOUSDEN^b a STJEPAN ULDRIJAN^a

^a Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova Universita, Kamenice 5, 62500 Brno; ^b Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow G61 1BD, UK
uldrijan@med.muni.cz

Protein p53 je významným nádorovým supresorem a jeho funkce je nějakým způsobem narušena u většiny nádorů,

zejména mutacemi v genu pro p53. Nicméně u nemalé části nádorů, které mají gen pro p53 neporušený, je funkce proteinu vyřazena kvůli nadměrné expresi jeho negativního regulátoru, onkoproteinu Mdm2¹. Mdm2 slouží jako E3 ubikvitin ligasa a předurčuje p53 a své ostatní substráty, včetně sebe sama, k degradaci v proteasomu 26S.

Mechanismy regulující aktivitu proteinu Mdm2 v nádorových buňkách nejsou zatím zcela jasné. Za účelem identifikace nových interakčních partnerů a potenciálních regulátorů proteinu Mdm2 jsme provedli tandemovou afinitní purifikaci buněčných komplexů obsahujících centrální část proteinu Mdm2 z několika lidských buněčných linií. Tyto proteinové komplexy pak byly dále analyzovány hmotnostní spektrometrií.

Identifikovali jsme dva nové potenciální regulátory Mdm2 – bazální transkripční faktor GTF2I a protein USP48, který patří do rodiny ubikvitin-terminálních karboxyl-hydrolas a jehož funkce zatím není známa. Interakci těchto proteinů s Mdm2 jsme potvrdili pomocí imunoprecipitace a imunofluorescenčních relokalizačních experimentů.

Z ubikvitylačních experimentů vyplývá, že protein GTF2I silně zvyšuje hladinu ubikvitylace p53 a mohl by tak být negativním regulátorem p53. GTF2I se mimo jiné podílí na aktivaci transkripce cílových genů při narušení funkce endoplazmatického retikula (ER)². Pomocí luciferázového reportérového konstruktů se nám podařilo zjistit, že Mdm2 snižuje transkripční aktivitu GTF2I, což naznačuje, že protein Mdm2 může zasáhnout do buněčné odpovědi na poruchu funkce ER.

Přítomnost USP-domény u dalšího identifikovaného interakčního partnera USP48 naznačuje, že tento protein bude sloužit jako deubikvitylační enzym a stabilizovat tak již ubikvitylované substráty³. Naše výsledky ukazují, že USP48 opravdu stabilizuje Mdm2. V přítomnosti USP48 je však autoubikvitylace Mdm2 zesílena, což ukazuje, že USP48 reguluje stabilitu Mdm2 jiným, složitějším mechanismem, než jeho deubikvitylací.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 301/09/1324.

LITERATURA

1. Soussi T., Bérout C.: *Nat. Rev. Cancer* 1, 233 (2001).
2. Hong M., Lin M.Y., Huang J.M., Baumeister P., Hakre S., Roy A.L., Lee A.S.: *J. Biol. Chem.* 280, 16821 (2005).
3. Tzimas C., Michailidou G., Arsenakis M., Kieff E., Mosialos G., Hatzivassiliou E.G.: *Cell Signal.* 18, 83 (2006).

VANADOCENOVÉ KOMPLEXY SEKUNDÁRNÍCH AMINOKYSELIN: MODELOVÉ SYSTÉMY PRO STUDIUM MECHANISMU ÚČINKU METALLOCENOVÝCH CYTOSTATIK

TEREZA DĚDOURKOVÁ, JAROMÍR VINKLÁREK a JAN HONZÍČEK

Katedra obecné a anorganické chemie, FCHT, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
terca.d@post.cz

Interakce vanadocendichloridu a 1,1'-dimethylvanadocendichloridu s aminokyselinami obsahujícími sekundární aminoskupinu poskytuje tři strukturální typy komplexů (Schéma 1), kde dochází ke koordinaci:

A) jedné molekuly aminokyseliny pomocí atomu dusíku aminoskupiny a atomu kyslíku karboxylové skupiny chelátovým typem vazby,

B) dvou molekul aminokyselin prostřednictvím atomů kyslíku jejich karboxylových skupin monodentátním typem vazby,

C) jedné molekuly aminokyseliny přes oba atomy kyslíku karboxylové skupiny chelátovým typem vazby.

V komplexech s L-prolinem a N-methylglycinem byly nalezeny typy vazeb A) a B), zatímco N-fenylglycin tvořil s vanadocenovým fragmentem pouze komplex typu C).

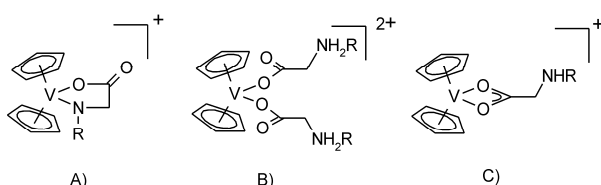


Schéma 1

Bylo izolováno 11 nových vanadocenových komplexů, které byly charakterizovány pomocí vhodných analytických a spektroskopických metod. V případě sedmi komplexů, které zahrnovaly všechny tři strukturální typy, byly připraveny monokrystaly vhodné pro rentgenostrukturální analýzu.

Připravené komplexy jednoznačně potvrdily možnost vazebné interakce metalocenového fragmentu se sekundárními aminokyselinami jako vhodného modelového systému pro možnou interakci s peptidy. Výsledky této práce podporují předpokládaný mechanismus účinku cytostaticky aktivních metalocenů inhibicí DNA procesních enzymů (proteinkinasa C a topoizomerasa II)¹, nebo transportních bílkovin (transferin)^{2,3}.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 203/09/0460.

LITERATURA

1. Kuo L. Y., Liu A. H., Marks T. J., v knize: *Metal Ions in Biological Systems*, kap. 33, s. 85. Marcel Dekker, New York 1996.
2. Nishida Y., Niinuma A., Abe K.: *Inorg. Chem. Commun.* 12, 198 (2009).
3. Du H., Xiang J., Zhang Y., Tang Y., Xu G.: *J. Inorg. Biochem.* 102, 146 (2008).

FUNKČNÍ ANALÝZA RING DOMÉN ONKOPROTEINŮ MDM2 A MDMX

PAVLÍNA DOLEŽELOVÁ, KATEŘINA CETKOVSKÁ a STJEPAN ULDRIJAN

*Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno
pdolezel@med.muni.cz*

Protein p53 je transkripční faktor vyznačující se schopností působit proti nádorové transformaci buněk a hraje klíčovou roli v regulaci buněčné odpovědi na stresové podněty, např. poškození DNA. Za normálních podmínek je hladina aktivního p53 v buňkách udržována na nízké úrovni především díky přítomnosti onkoproteinů Mdm2 a MdmX (cit.¹).

Zatímco Mdm2, jako E3 ubikvitin ligasa, indukuje degradaci p53 prostřednictvím 26S proteasomu, MdmX i přes svou značnou strukturální podobnost s Mdm2 postrádá ubikvitin ligázovou aktivitu. MdmX sám o sobě pouze účinně inhibuje transkripční aktivitu p53, avšak ve formě dimeru s Mdm2 se dokáže aktivně podílet¹ i na degradaci p53. Právě tvorba heterodimerů Mdm2-MdmX prostřednictvím RING domén vede ke stimulaci E3 ubikvitin ligasové aktivity Mdm2 (cit.²).

Pro objasnění strukturálních a funkčních rozdílů RING domén Mdm2 a MdmX jsme vytvořili sérii bodových mutantů Mdm2, u nichž byla vždy nahrazena krátká část RING domény Mdm2 odpovídající sekvenci MdmX. Pomocí relokalizačního testu a imunoprecipitace jsme ověřili jejich schopnost interagovat s RING doménou MdmX. Naše výsledky naznačují, že aminokyselina cystein v pozici 449 je nezbytná pro fyzickou interakci RING domény Mdm2 s MdmX. Pokud je tato kriticky důležitá aminokyselina vložena do RING domény MdmX, získá tento protein schopnost dimerovat s další molekulou MdmX.

Naše výsledky přispívají k identifikaci rozdílů v primární aminokyselinové sekvenci RING domén Mdm2 a MdmX, které jsou odpovědné za rozdíly ve funkci těchto proteinů a mohou přispět k nalezení mechanismů, jež umožní reaktivaci p53 v některých typech nádorů.

Tato práce vznikla za podpory grantu 301/09/132.

LITERATURA:

1. Uldrijan S., Pannekoek W.J., Vousden K.H.: *EMBO J.* 26, 102 (2007).
2. Kakai H., Lolez-Pajares V., Kim M.M., Wiederschain D., Yuan Z.-M.: *Cancer Res.* 67, 6026 (2007).

DYNAMIKA TRÁVICÍCH ENZYMŮ KLÍŠTĚTE

Ixodes ricinus

ZDENĚK FRANTA^a, JITKA KONVIČKOVÁ^a, HELENA PĚNIČKOVÁ^a, DANIEL SOJKA^a, MARTIN HORN^b, MICHAEL MAREŠ^b a PETR KOPÁČEK^a

*^a Parazitologický ústav BC AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^b Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Flemmingovo náměstí 2, 166 10 Praha
zdeny@paru.cas.cz*

Trávení hostitelské krve, základního zdroje živin a energie, představuje klíčovou událost v biologii klíšťat. Tito ektoparaziti na rozdíl od ostatního krev-sajícího hmyzu tráví hostitelské proteiny intracelulárně v kyselém prostředí trávicích vakuol buněk středního epitelu. Trávení bylo

nejlépe popsáno u klíštěte *Ixodes ricinus* (hlavního přenašeče lymfské boreliózy v Evropě) a je zajišťováno souborem cysteinových a aspartátových peptidas^{1,2}. V této práci jsme se zaměřili na studium mRNA, dynamiky a kvantitativní hladiny hlavních trávicích enzymů (cysteinových peptidas katepsinu L, B, C, legumainu a aspartátové peptidasy katepsinu D) ve střevě klíštěte *I. ricinus* v průběhu sání. Hladina mRNA byla studována pomocí kvantitativní Real Time PCR. Aktivita a molární koncentrace jednotlivých enzymů ve střevě klíštěte byly určovány pomocí specifických fluorescenčních substrátů a titrací aktivního místa specifickými inhibitory. Afinitně přečištěné polyklonální protilátky (připravené proti jednotlivým rekombinantním enzymům) byly využity k detekci cysteinových proteas (IrCB, IrCL a IrCC) uvnitř střevních buněk imunofluorescenční mikroskopií a k „western blot“ analýze těchto enzymů ve střevě klíštěte. Všechna takto získaná data ukazují, že k největším změnám dochází ke konci periody pomalého sání (4–6 dnů po přichycení na hostitele). Ta předchází prudkému příjmu hostitelské krve, kdy oplodněná samice nasaje až 70 % celkového objemu krve během 2 dnů. Důkladný expresní profil společně s biochemickou charakterizací jednotlivých peptidas otevírá nové možnosti v boji s klíšťaty a jimi přenášenými patogeny.

Tato práce vznikla za podpory grantu IAA600960910 (GA AVČR), KJB600960911 (GA AVČR) a Výzkumného centra LC06009 (MŠMT ČR).

LITERATURA

1. Sojka D., Franta Z., Horn M., Hajdušek O., Caffrey C.R., Mareš M., Kopáček P.: *Parasit. Vectors* 1, 7 (2008).
2. Horn M., Nussbaumerová M., Šanda M., Kovářová Z., Srba J., Franta Z., Sojka D., Bogyo M., Caffrey C.R., Kopáček P., Mareš M.: *Chem. Biol.* 16, 1053 (2009).

TOTÁLNÍ SYNTÉZA FERROCENESTRONU

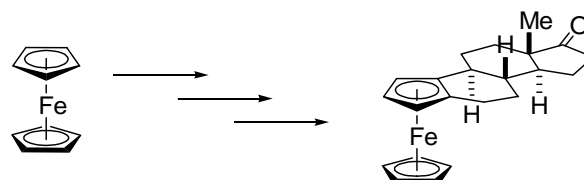
FILIP HESSLER^a a MARTIN KOTORA^{a,b,*}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
fhessler@c-box.cz; kotora@natur.cuni.cz

V posledních několika letech je věnována zvýšená pozornost novým sloučeninám ferrocenu s biologicky aktivními molekulami, a to pro své zajímavé vlastnosti^{1,2}. Příkladem takové látky může být ferrocifen, derivát antiestrogenu tamoxifenu. Nyní jsou testovány jeho účinky proti karcinomu prsu.

I když je známo několik konjugátů ferrocenu a steroidů, zatím ještě nebyla připravena sloučenina obsahující ferrocen přímo v steroidním skeletu. Na základě předchozích zkušeností z nedávné syntézy estronu³, jsme se rozhodli připravit první steroid s integrovaným ferrocenovým jádrem – ferrocenestron.

Syntéza vycházela z vhodně substituovaného chirálního ferrocenu s jeho následnými transformacemi pomocí reakcí katalyzovaných přechodnými kovy. Mezi tyto postupy patřily například oxidativní adice s navazující alkyací zprostředkovaná zirkonocenem, cross-coupling katalyzovaný komplexem palladia, enynová metathese katalyzovaná karbenovou sloučeninou ruthenia, a nakonec hydrogenace dvojných vazeb za použití heterogenních (Pd/C) či homogenních katalyzátorů (komplex Ir).



Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021620857 a IM0508 (Center for New Antivirals and Antineoplastics).

LITERATURA

1. Van Staveren D. R., Metzler-Nolte N.: *Chem. Rev.* 104, 5931 (2004).
2. Schatzschneider U., Metzler-Nolte N.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 1504 (2006).
3. Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *J. Org. Chem.* 73, 6202 (2008).

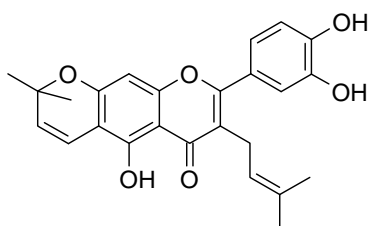
ANTIFLOGISTICKÉ VLASTNOSTI NOVĚ IZOLOVANÉ LÁTKY MA-13 Z *Morus alba*

JAN HOŠEK, KAREL ŠMEJKAL, VERONIKA ZAVALOVÁ, PETER KOLLÁR a MILAN BARTOŠ

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Palackého 1-3, 612 42 Brno
hosekj@vfu.cz

Moruše bílá (*Morus alba* L., *Moraceae*) je v tradiční čínské medicíně využívána při léčbě některých zánětlivých stavů. Zánět je součástí přirozené obrany těla, ale vyšší míra zánětu může tělo poškodit. Je také známa celá řada chronických zánětlivých onemocnění, která vyžadují dlouhodobou léčbu, proto představuje vývoj nových antiflogistik důležitý směr v rozvoji farmakoterapie.

Na základě screeningu látek izolovaných z *Morus alba* byla vybrána sloučenina MA-13 (schéma 1), která prokazovala největší schopnost tlumit expresi pro-zánětlivého cytokinu TNF α *in vitro* na linii lidských makrofágů THP-1 stimulovaných bakteriálním lipopolysacharidem (LPS). Proti-zánětlivá aktivita látky MA-13 byla dále podrobně studována na úrovni změny transkripce pro-zánětlivého cytokinu CCL2, pro-zánětlivých enzymů NOS2 a COX2 a proti-zánětlivého proteinu ZFP36. Expresie cytokinu TNF α byla taktéž sledována na úrovni translace. Většina genů těchto proteinů je pod transkripční kontrolou NF- κ B, proto byla změněna i schopnost látky MA-13 potlačovat translokaci tohoto transkripčního faktoru z cytoplasmy do jádra.



Struktura molekuly látky MA-13

Získané údaje prokazují schopnost látky MA-13 významně snižovat transkripci pro-zánětlivého cytokinu TNF α . Signifikantní úbytek TNF α byl také zaznamenán na úrovni translace, kdy MA-13 10 \times snížila celkové množství tohoto cytokinu v mediu u LPS-stimulovaných makrofágů. Transkripce dalšího pro-zánětlivého cytokinu – CCL2 – byla taktéž snížena, ale bez statistické průkaznosti. MA-13 měla vliv i na přepis genů pro-zánětlivých enzymů NOS2 a COX2, kdy jejich exprese byla oslabena. U jediného protizánětlivého genu – ZFP36 – byl zaznamenán pouze posun maxima jeho exprese o 2 hodiny. Schopnost MA-13 tlumit expresi pro-zánětlivých genů potvrzuje i skutečnost, že tato látka brzdí vstup NF- κ B do jádra, čímž inhibuje jeho funkci jako transkripčního faktoru. Ve všech sledovaných parametrech je MA-13 účinnější než indometacin, který je běžně užívaným antiflogistikem a který byl použit jako pozitivní kontrola.

Z výsledků této studie vyplývá, že látka MA-13 je nadějnou molekulou pro vývoj nového nesteroidního antiflogistika.

PROTEINY *Aspergillus fumigatus* ZAPOJENÉ DO INTERAKCE S HOSTITELEM

JOSEF HOUSER^a, JAN KOMÁREK^b, NIKOLA KOSTLÁNOVÁ^a, GIANLUCA CIOCI^c, ANNE IMBERTY^d a MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,b}

^aNCBR a ^bÚstav Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno;

^cESRF, 6 rue Jules Horowitz, 38043 Grenoble, France;

^dCERMAV-CNRS, BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France
houser@mail.muni.cz

Dlouho známá saprofytická houba – plíseň *Aspergillus fumigatus* (Kropidlák zakouřený) je nejen všudypřítomným alergenem, ale, jak se stále častěji ukazuje, také významným patogenem u pacientů s oslabenou imunitou. Tzv. invazivní aspergilóza zasahuje zejména plic, ale jsou známy případy invaze do ledvin, srdce či mozku. Vzhledem k tomu, že na mnohé kmeny běžná fungicidní léčba zabírá jen nedostatečně, dosahuje úmrtnost zasažených osob i desítek procent. Důkladné poznání mechanismů, které zprostředkovávají interakci patogen-hostitel a umožňují tak rozvoj infekce, by mělo vést k nalezení odlišných způsobů léčby.

U mnoha patogenních mikroorganismů slouží k vazbě na epiteliální povrchy hostitele proteiny ze skupiny lektinů. Prohledáním nedávno sekvenovaného genomu *Aspergillus*

fumigatus kmene Af293 byla nalezena necelá desítka genů kódujících potenciální lektiny. Několik z těchto genů bylo klonováno do plazmidových vektorů za účelem přípravy rekombinantních proteinů. Dosavadní výsledky nejen potvrzují širokou strukturní variabilitu lektinů v rámci zkoumaného druhu, ale rovněž vyzdvihují odlišnosti těchto molekul od homologických proteinů dosud zkoumaných u jiných organismů.

Připravené proteiny jsou zkoumány jak z hlediska strukturního, tak funkčního. Dosud bylo řešeno několik struktur, které byly získány metodou rentgenové difrakce. Z funkčního hlediska je zjišťována jak specifita interakce (SPR – měření rezonance povrchového plazmonu, glycanarray – širokospektrální test vazby cukerných struktur), tak termodynamické parametry pro biologicky významné ligandy (zejména techniky založené na mikrokolorimetrii). Kombinací získaných dat pak vytváříme komplexní pohled na tyto proteiny – možné faktory virulence.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR (MSM0021622413, LC6030, ME08008) a GA ČR (GA/303/09/1168, GD301/09/H004).

PROGRESIVNÍ MIKROSKOPICKÉ METODY V BIOMEDICÍNĚ

PAVEL HOZÁK

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha
hozak@img.cas.cz

Mikroskopie v současnosti zasahuje nebyvalou měrou do výzkumu v biomedicíně, neboť moderní postupy umožnily pozorovat změny v živých buňkách a tkáních a dokonce i elektronová mikroskopie již zvládá zobrazení biomolekul v nativní hydratované podobě. V přednášce budou diskutovány mikroskopické přístupy, které v posledních letech nejvíce rozšiřují naše poznání. Ze světelné mikroskopické metody bude pojednáno o technikách *in vivo* zobrazení a detekce interakcí mezi molekulami (FRAP, FRET, FCS). Z elektronové mikroskopie bude diskutována ultrastrukturální tomografie, kryomikroskopické metody a pokročilé metody ultrastrukturálního imunoznačení včetně speciálních šetrných postupů pro přípravu elektronmikroskopických vzorků (vysokotlaké zamrazování, kryosubstituce). Postupy budou dokumentovány na příkladu zkoumání vůbec prvního identifikovaného molekulárního motoru v buněčném jádře - myosinu 1C. Diskutovány budou perspektivy zobrazovacích metod v blízké budoucnosti.

HOTSPOT WIZARD: NÁSTROJ PRO INŽENÝRSTVÍ ENZYMŮ**EVA CHOVANCOVÁ, ANTONÍN PAVELKA a JIŘÍ DAMBORSKÝ**

*Loschmidovy laboratoře, Ústav experimentální biologie a Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno
akllupe@chemi.muni.cz*

Proteinové inženýrství se zabývá modifikací struktury proteinů s cílem lépe porozumět mechanismům jejich fungování a vylepšit jejich vlastnosti pro průmyslové aplikace. Jedním z klíčových kroků celého procesu je výběr aminokyselin, jejichž modifikace povede k požadovaným změnám proteinu. Racionální návrh mutací vyžaduje detailní znalost struktury a funkce proteinu a nemalé zkušenosti v této oblasti.

HotSpot Wizard¹ je webový server pro automatickou identifikaci pozic vhodných pro inženýrství aktivity, substrátové specifity a enantioselektivity enzymů. Pro tento účel integruje informace získané z několika bioinformatických databází a nástrojů, čímž umožňuje i běžnému uživateli jednoduše provést poměrně komplexní analýzu strukturálně-funkčních vztahů cílového enzymu.

HotSpot Wizard je volně přístupný přes webové rozhraní <http://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard>. Jediným povinným vstupem aplikace je 3D struktura enzymu. Během procesu výpočtu jsou nejprve získány anotace týkající se katalytických a jiných, pro funkci enzymu nepostradatelných, aminokyselin. Mutageneze těchto aminokyselin není doporučena. Následně jsou identifikovány aminokyseliny tvořící kapsu aktivního místa a stěny přístupových tunelů. Tyto aminokyseliny interagují se substráty a produkty reakce a představují tak velmi vhodný cíl pro modifikaci katalytických vlastností enzymu. V závěrečné fázi je na základě výpočtu evoluční konzervovanosti předpokládána bezpečnost mutageneze jednotlivých pozic. Na výstupu jsou jednotlivé aminokyseliny seřazeny podle jejich očekávané vhodnosti pro mutagenezi. Uživatel má pro jednotlivé pozice k dispozici informaci o jejich strukturální lokalizaci, funkčním významu, konzervovanosti a anotaci získané z databází. Výsledky jsou namapovány na strukturu enzymu a mohou být zobrazeny přímo v okně webového prohlížeče.

Na základě experimentálních dat získaných pro více než 6000 mutantů z Protein Mutant Database² a z primární literatury bylo potvrzeno, že mutageneze cílící pozice navržené HotSpot Wizardem poskytuje významně vyšší podíl funkčních mutantů než mutageneze náhodná. Experimentální data taktéž ukazují, že modifikací pozic navržených HotSpot Wizardem lze získat enzymy s novými katalytickými vlastnostmi¹.

LITERATURA

1. Pavelka A., Chovancová E., Damborský J.: *Nucleic Acids Res.* 37, W376 (2009).
2. Kawabata T., Ota M., Nishikawa K.: *Nucleic Acids Res.* 27, 355 (1999).

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKA DEFENSINU Z KLÍŠTĚTE *Ixodes ricinus***TEREZA CHRUDIMSKÁ*, NATALIA RUDENKO a LIBOR GRUBHOFFER**

*Biologické centrum v.v.i. AV ČR, Parazitologický ústav; Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, PŘF; Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
terezam@paru.cas.cz*

Součástí imunitní odpovědi klíšťat, ale i dalších živočichů, jsou defensiny, malé kationické proteiny (4 kDa). Defensiny byly nalezeny u velkého množství klíšťat^{1,2}. U evropského klíštěte *Ixodes ricinus* byly identifikovány dvě isoformy genu pro defensin - def1 a def2 (cit.³). Expres obou isoform byla indukována sáním, def1 byl exprimován u všech stádií klíštěte, zatímco def2 jen u dospělců - samic. U nasátých samic byla pozorována výrazná exprese def1 ve střevě, u def2 byla detegována ve všech zkoumaných orgánech. Synteticky připravené def1 a def2 vykazovaly silnou antimikrobiální aktivitu vůči Gram-pozitivním bakteriím již při nízkých koncentracích (tabulka I) a to i na multi-rezistentní kmen bakterie *Staphylococcus aureus* (MRSA). Naproti tomu neměly def1 a def2 žádný inhibiční vliv na Gram-negativní bakterie (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), kvasinky (*Candida albicans*) a viry (TBEV – virus klíšťové encefalitidy). Syntetický def2 je účinnější než def1. Tento rozdíl je pravděpodobně dán záměnou 1 aminokyseliny v jinak stejné aminokyselinové sekvenci obou isoform, kde def2 má v pozici 8 arginin, zatímco def1 aromatickou aminokyselinu fenylalanin.

Tabulka I, Minimální inhibiční koncentrace (MIC) def1 a def2

| Bakterie | MIC def1 [μM] | MIC def2 [μM] |
|-------------------------------------|---------------|---------------|
| <i>Microrcoccus luteus</i> | 0,75 | 0,4 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 1,5 | 0,75 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) | 50 | 25 |

Def1 ani def2 nemají hemolytické účinky na lidské erythrocyty při výše uvedených koncentracích. Stanovení minimální inhibiční koncentrace, diferenciální exprese a nízká toxicita obou isoform defensinu ukazuje, že defensiny hrají důležitou roli v imunitních pochodech klíštěte *I. ricinus*. Zároveň se dá o těchto klíšťecích proteinech uvažovat jako o potenciálních kandidátech pro vývoj nových antibiotik.

Tato práce vznikla za podpory grantů: Grantová agentura ČR 524/06/1479 a 206/09/H026; LC06009 a grantového projektu Parazitologického ústavu AVČR Z60220518.

LITERATURA

1. Chrudimská T., Chrudimský T., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L.: *Vet. Parasitol.* 167, 298 (2010).
2. Johns R., Sonenshine D.E., Hynes W.L.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 857 (2001).

3. Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L.: *Insect Mol. Biol.* 16, 501 (2007).

FUNKČNÁ ANALÝZA GÉNU *GDX1* KÓDUJÚCEHO HOMOLÓG GENTISÁT 1,2-DIOXYGENÁZY Z KVASINKY *Candida parapsilosis*

MICHAELA JAKÚBKOVÁ a **JOZEF NOSEK**

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina CH1, 842 15 Bratislava 4 jakubkova@fns.uniba.sk

Patogénna kvasinka *Candida parapsilosis* je unikátnym modelovým systémom pre štúdium katabolizmu aromatických zlúčenín. Na rozdiel od kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako aj blízko príbuzných druhov rodu *Candida* (napr. *C. albicans*) je *C. parapsilosis* schopná degradovať deriváty fenolu a kyseliny benzoovej dvomi enzymatickými dráhami³. Prvou je 3-oxoadipátová a druhou gentisátová dráha. Analýza kompletných sekvencií genómov kvasiniek *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* a *Lodderomyces elongisporus* odhalila, že väčšina druhov stratila počas evolúcie gény pre komponenty oboch enzymatických dráh¹. V genóme kvasinky *C. parapsilosis* sme však identifikovali otvorený čítací rámec (ORF) *CPAG03408*. Sekvencia korešpondujúceho proteínového produktu je homologická so sekvenciami gentisát 1,2-dioxygenázy z rôznych druhov organizmov. Tento enzým katalyzuje konverziu gentisátu (2,5-dihydroxybenzoátu) na maleylpyruvát, ktorý je následne sériou reakcií premenený na fumarát a pyruvát². Gén sme nazvali *GDX1* (gentisát dioxygenáza 1).

Hlavným cieľom našej práce je funkčná analýza génu *GDX1*. ORF génu *GDX1* sme klonovali do plazmidového vektora, ktorý umožňuje jeho kontrolovanú expresiu v bunkách kvasiniek. Priebeh enzymatickej reakcie po indukcii expresie génu sme v bunkách transformantov merali pomocou kyslíkovej elektródy. Naše výsledky naznačujú, že počas kultivácie buniek *C. parapsilosis* v médiu s glukózou ako jediným zdrojom uhlíka sú gény gentisátovej dráhy reprimované. Zistili sme, že k ich aktivácii dochádza počas kultivácie buniek v prítomnosti niektorých aromatických zlúčenín. Reguláciu expresie génu *GDX1* sme analyzovali aj prostredníctvom fúzie promotora génu *GDX1* s reportérovým markerom *LAC4*, ktorý kóduje β -galaktozidázu. Vnútro bunkovú lokalizáciu proteínového produktu génu *GDX1* sme stanovili pomocou fúzie so zeleným fluorescenčným proteínom (yEGFP3).

Táto práca vznikla s podporou grantu z agentúry VEGA (1/0219/08).

LITERATÚRA

1. Butler G., Rasmussen M.D., Lin M.F., Santos M.A.S., Sakthikumar S., et al.: *Nature* 459, 657 (2009).

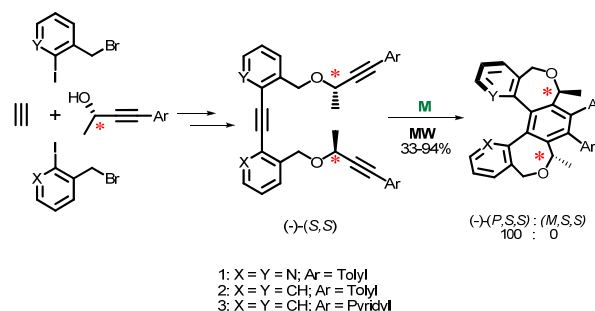
2. Eppink M.H., Cammaart E., Van Wassenaar D., Middelhoven W.J., van Berkel W. J.: *Eur. J. Biochem.* 267, 6832 (2000).
3. Middelhoven W.J., Coenen A., Kraakman B., Sollewijn Gelpke M.D.: *Antonie Van Leeuwenhoek* 62, 181 (1992).

ASYMETRICKÁ SYNTÉZA AZAHELICENŮ

ANDREJ JANČAŘÍK, **IRENA G. STARÁ*** a **IVO STARÝ***

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

Heliceny jsou inherentně chirální aromatické látky, které obsahují *ortho*-kondenzovaná benzenová jádra. Ačkoli jsou heliceny známe více jak 50 let, jejich efektivní příprava v opticky čisté formě v multigramovém měřítku dosud nebyla uspokojivě vyřešena. Jedním z možných řešení tohoto problému je diastereoselektivní syntéza opticky čistých látek podobných helicenum, která využívá chirální stavební bloky¹.



Klíčovým krokem syntézy je intramolekulární [2+2+2] cyklotrimerizace trienů poskytující aromát s helikální chiralitou, která je intenzivně studována naší skupinou^{1,2}. Jako nejúčinnější se jeví v případě pentacyklických azahelicenů reakce katalyzovaná kobaltem za současného působení mikrovlnného záření.

Podporováno GA AV ČR (reg. č. IAA400550916), MŠMT (Centrum pro biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg. č. LC512) a ÚOCHB AV ČR (tato studie je součástí výzkumného záměru Z4 055 0506).

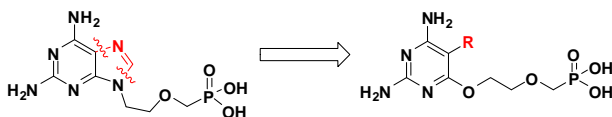
LITERATURA

1. Sehnal P., Krausová Z., Teplý F., Stará I. G., Starý I., Rulišek L., Šaman D., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 73, 2074 (2008).
2. Mišek J., Teplý F., Stará I. G., Tichý M., Šaman D., Císařová I., Vojtišek P., Starý I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2074 (2008).

„MAGICKÉ“ PYRIMIDINY MIMIKUJÍCÍ PURINOVÁ ANALOGA S BIOLOGICKOU AKTIVITOU**PĚTR JANSÁ a ANTONÍN HOLÝ**

*Centrum pro nová antivirovika a antineoplastika, Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, v.v.i. Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
jansa@uochb.cas.cz*

Systematickým studiem acyklických nukleosid-fosfonátů¹ (ANP) byla objevena nová skupina látek, která je strukturálně odvozena od 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidinu². Tyto sloučeniny vykazují vysokou protivirovou aktivitu a mohou být považovány za purinové deriváty s otevřeným imidazolovým kruhem („open-ring“ ANP). Modifikací polohy 5 pyrimidinového kruhu bylo dosaženo zvýšení antivirové aktivity³.



Cílem naší práce bylo vyvinout novou efektivní syntetickou cestu pro přípravu těchto 5 substituovaných derivátů ve větším měřítku a připravit následně nové deriváty s potenciální antivirovou aktivitou a případně i jejich proléčiva.

Za tímto účelem byla úspěšně vypracována postupná syntéza acyklické části molekuly opírající se o reakci chlorpyrimidinů s ethylenglykolem⁴ a následné zavedení fosfonátového zbytku pomocí tosyoxymethylfosfonátu.

Modifikací polohy 5 pak byly připraveny nové deriváty mimikující původní purinový kruh s vysokou anti-HIV aktivitou, která je o řád vyšší než u příslušného purinového analogu (adefoviru). Dvě látky byly převedeny na lipofilní proléčiva, která následně vykazovala nanomolární aktivity proti VZV.

Teorii obecného mimikování purinových kruhů pomocí vhodně substituovaných pyrimidinů jsme následně úspěšně otestovali při regulaci poruchy metabolismu purinových derivátů *in vitro* a dosáhli jsme lepších účinků než vykazují používané léky. Tento princip tedy může mít ještě další aplikace a „magické“ pyrimidiny se pak mohou stát novým směrem medicínální chemie purinových derivátů.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

LITERATURA

1. De Clercq E., Holý A.: *Nature Rev. Drug Disc.* 4, 928 (2005).
2. Holý A., Votruba I., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., Naesens L., De Clercq E., Balzarini J.: *J. Med. Chem.* 45, 1918 (2002).
3. Hocková D., Holý A., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., De Clercq E., Balzarini J.: *J. Med. Chem.* 46, 5064 (2003).
4. Dračínský M., Holý A., Jansa P., Kovačková S., Buděšínský M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 4117.

ŠTUDIUM APOPTOTICKÝCH BIELKOVÍN ZODPOVEDNÝCH ZA ROZVOJ LIEKOVEJ REZISTENCIE U LEUKEMICKÝCH PACIENTOV**JANA JUREČEKOVÁ, JOZEF HATOK, EVA BABUŠÍKOVÁ, ANDREA ŠTEFÁNIKOVÁ a PETER RAČAY**

*Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Malá Hora 4, 03601 Martin, Slovensko
jurecekova@jfmed.uniba.sk*

Hlavným cieľom cytotoxických chemoterapií je indukovať v nádorových bunkách apoptózu. Preto bielkoviny blokujúce apoptózu a látky stimulujúce proapoptotické bielkoviny predstavujú logické ciele pre vývoj nových možností terapie nádorových ochorení. Keďže zvýšená expresia viacerých antiapoptotických bielkovín Bcl-2 rodiny (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) bola zistená v mnohých typoch nádorov a hematologických malignanciách a je spájaná so zvýšenou rezistenciou na chemoterapiu, značná pozornosť je zameraná práve na tieto bielkoviny. V našej štúdií sme pozorovali vplyv inhibície antiapoptotických bielkovín Bcl-xL a Mcl-1 pomocou siRNA na citlivosť leukemických buniek na spektrum cytostatík. Zistili sme, že transfekcie prostredníctvom Bcl-xL a Mcl-1 siRNA nemali významný vplyv na citlivosť a prežívanie leukemických buniek. V našej práci sme navyše sledovali vplyv nízkomolekulového inhibítora ABT-737, inhibujúceho Bcl-2, Bcl-xL a Bcl-w, na indukciu apoptózy a prežívanie leukemických bunkových línií HL-60 a K-562. Pôsobenie ABT-737 vyvolalo u oboch bunkových línií indukciu apoptózy, pričom fragmentáciu DNA sme mohli pozorovať už po 3 h kultivácie. Citlivejšia na ABT-737 bola bunková línia HL-60 ($LC_{50} = 5 \mu\text{M}$), čo je možné vysvetliť relatívne nižšou expresiou Mcl-1.

Hlbšie štúdium bielkovín podieľajúcich sa na blokovaní apoptózy môže viesť k vytvoreniu nových terapeutických prístupov a tým k zlepšeniu prognózy ochorenia.

CENTRÁLNA ÚLOHA CDK2 V OSUDOVÝCH ROZHODNUTIACH mEK BUNIEK**ZUZANA KOLEDOVÁ, LEONA RAŠKOVÁ KAFKOVÁ, LENKA CALÁBKOVÁ, VLADIMÍR KRYŠTOF, ALWIN KRÄMER* a VLADIMÍR DIVOKÝ***

*Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, 775 15 Olomouc
zkoledova@gmail.com*

Cdk2 kináza riadi prechod z G1 do S fázy bunkového cyklu u somatických buniek. V odpovedi na poškodenie DNA je jej aktivita zablokovaná mechanizmami G1 kontrolného bodu, čím sa bunka zastaví v G1 fáze a zabráni sa replikácii poškodenej DNA. Myšie embryonálne kmeňové (mEK) bunky, ktoré sa od somatických buniek líšia krátkym bunkovým cyklom s jedinečnou štruktúrou, veľmi krátkou

G1 fázou a nefunkčným G1 kontrolným bodom¹, sú známe veľmi vysokou aktivitou Cdk2². V tejto práci prezentujeme naše výsledky štúdia úlohy Cdk2 v mEK bunkách, ktoré poukazujú na jej centrálnu úlohu v regulácii nielen bunkového cyklu, ale aj sebaobnovy: Špecifická downregulácia aktivity Cdk2 viedla k predĺženiu G1 fázy, nastoleniu bunkového cyklu podobného bunkovému cyklu somatických buniek, k expresii diferenciálnych markerov a k zmenám morfológie indikujúcim diferenciáciu mEK buniek. Navyše sme zistili, že mEK bunky sa po poškodení DNA v G1 fáze nezastavujú preto, lebo u nich nedochádza k zníženiu aktivity Cdk2, hoci obe dráhy G1 kontrolného bodu (Chk1/2-Cdc25A a 53-p21) sú aktivované. Cdk2 im uniká vďaka špecifickej centrozomálnej lokalizácii. Udržanie vysokej aktivity Cdk2 tak umožňuje zachovanie pluripotencie v podmienkach poškodenia DNA. Naše výsledky naznačujú existenciu priameho prepojenia medzi mechanizmami regulácie sebaobnovy a bunkového cyklu u EK buniek, v ktorom centrálnu úlohu zohráva Cdk2.

Táto práca vznikla za podpory grantov MZ NR/9508 a MŠMT 2B06077 a MSM 6198959205.

LITERATÚRA

- White J., Dalton S.: *Stem Cell Rev.* 1, 131 (2005).
- Stead E., White J., Faast R., Conn S., Goldstone S., Rathjen J., Dhingra U., Rathjen P., Walker D., Dalton S.: *Oncogene* 21, 8320 (2002).

BIOSYNTÉZA TETRAPYRROLŮ U NOVĚ OBJEVENÉ ŘASY *Chromera velia*

LUDEK KOŘENÝ^a, ROMAN SOBOTKA^b a MIROSLAV OBORNÍK^a

^a*Biologické centrum, Parazitologický ústav AVČR, České Budějovice* a ^b*Mikrobiologický ústav AVČR, Třeboň koreny@paru.cas.cz*

Prvoci skupiny Apicomplexa (výtrusovci) jsou intenzivně studováni, jelikož zahrnují významné parazity člověka, mezi něž patří např. původce malárie či toxoplazmózy. Tito parazité se vyvinuli z fotosyntetických řas o čemž svědčí přítomnost redukovaného plastidu, který sice již neplní svou fotosyntetickou funkci, ale stále v něm probíhají důležité procesy a je pro tyto parazity proto nezbytný. Jedním takovým procesem je syntéza hemu, která se tak jeví jako ideální cíl pro antimalarika.

Nedávno byla objevena nová jednobuněčná řasa, *Chromera velia*, která je těmto parazitům blíže příbuzná¹. Studium biosyntézy tetrapyrrolů u tohoto organismu by tak mohlo pomoci k rozluštění nevyjasněných otázek ohledně syntézy hemu u významných parazitů.

Podařilo se nám z této řasy získat kompletní sekvence téměř všech genů společné dráhy pro syntézu hemu a chlorofylu. Zjistili jsme, že stejně jako výtrusovci a heterotrofní eukaryota syntetizuje i *C. velia* tetrapyrroly z glycinu a succinyl-CoA, což je mezi fotosyntetickými organismy unikátní. Jedná se patrně o jediný organismus, který je

schopen syntetizovat chlorofyl *a* touto cestou. Všechna ostatní fotosyntetická eukaryota a rovněž i sinice totiž vyrábí chlorofyl i hem primárně z glutamátu. To, že je tato řasa schopna metabolizovat glycin na chlorofyl rovněž podpořily výsledky experimentů s radioaktivně značenými prekurzory. Fylogenetické studie jednotlivých genů biosyntetické dráhy ukázaly na společný původ těchto genů u *C. velia* a výtrusovců.

Tato práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury České republiky 206/08/1423.

LITERATURA

- Moore R. B., Oborník M., Janouškovec J., Chrudimský T., Vancová M., Green D. H., Wright S. H., Davies N. W., Bolch C. J. S., Heimann K., Šlapeta J., Hoegh-Guldberg O., Logsdon J. M., Carter D. E.: *Nature* 451, 959 (2008).

MODULACE EXPRESE P-GLYKOPROTEINU TECHNIKOU RNA INTERFERENCE

PETR KOSZTYU, PETR DOLEŽEL a PETR MLEJNEK^{*}

Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc mlejnek_petr@volny.cz

Mnohočetná léková rezistence (MDR) je hlavní překážkou k úspěšné chemoterapii u řady nádorových onemocnění. Rezistentní nádorové buňky jsou charakteristické sníženou citlivostí na celé spektrum protinádorových léčiv, které mají různou strukturu a odlišný mechanismus působení. Rezistence buněk je způsobena několika buněčnými mechanismy¹. Nejlépe charakterizovaným mechanismem, který přispívá k MDR fenotypu, je zvýšená exprese P-glykoproteinu, produktu genu *ABCB1* (*MDR1*)^{2,3}. P-glykoprotein je membránový ATP-dependentní transporter pumpující cytotoxickou látku ven z buňky, čímž se snižuje její cytotoxicita. Mnoho prací studujících rezistenci způsobenou P-glykoproteinem využívá buněčné nádorové linie získané z citlivých linií jejich selekcí. K celkové rezistenci nádorových buněk přispívá vedle zvýšené exprese P-glykoproteinu řada odlišných buněčných mechanismů¹.

K lepšímu pochopení vztahu mezi expresí P-glykoproteinu a rezistencí buněk na protinádorová léčiva jsme využili techniku RNA interference ke specifickému potlačení exprese genu *ABCB1* v buněčné linii K562/R, která se vyznačuje mnohočetnou lékovou rezistencí v důsledku zvýšené exprese P-glykoproteinu. Tato nádorová linie byla transfekována plazmidovým vektorem exprimujícím shRNA zaměřenou proti genu *ABCB1* a byly vyselektovány stabilní subklony. Takto jsme vytvořili buněčné linie K562/R/shABCB1-01-05, které exprimovaly různé množství P-glykoproteinu. Jeho množství se pohybovalo v rozmezí od 10 % až do 75 % nacházející se v linii K562/R. Z výsledků vyplývá, že vztah mezi expresí P-glykoproteinu a rezistencí

nádorových buněk není lineární. Při snižování exprese P-glykoproteinu sice postupně dochází k obnovení citlivosti buněk na protinádorová léčiva, což se ale významně projevilo až při snížení exprese P-glykoproteinu na úroveň 25–30 % v porovnání s rezistentní linií.

Práce je podpořena grantem MSM 6198959216 (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy) a částečně grantem NS/9627 (Ministerstvo zdravotnictví).

LITERATURA

1. Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E.: *Nat. Rev. Cancer* 2, 48 (2002).
2. Juliano R. L., Ling V.: *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152 (1976).
3. Endicott J. A., Ling V.: *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137 (1989).

ZVÝŠENÍ STABILITY ENZYMU INŽENÝRSTVÍM PŘÍSTUPOVÝCH TUNELŮ

TÁŇA KOUDELÁKOVÁ^a, RADKA CHALOUPKOVÁ^a, MARTINA PAVLOVÁ^a, CHRISTIAN ZIMMER^b, UWE T. BORNSCHEUER^b a JIŘÍ DAMBORSKÝ^a

^a*Loschmidovy laboratoře, Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno,*

^b*Abteilung Biotechnologie und Enzymkatalyse, Universität Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 4, D-17487 Greifswald tangerine@chemi.muni.cz*

Halogenalkandehalogenázy (EC 3.8.1.5), katalyzující hydrolyzu širokého spektra chlorovaných, bromovaných a jodovaných uhlovodíků, náleží k enzymové nadrodině α/β -hydrolas. Tyto robustní bakteriální enzymy mají vysoký aplikační potenciál, neboť přeměna často toxických halogenovaných sloučenin nalézá využití při biodegradacích, bioremediacích i dekontaminacích. Některé specifické aplikace vyžadují použití enzymů tolerantních k přítomnosti organického rozpouštědla či stabilních při vyšší teplotě. V této studii jsme se zaměřili na vylepšení stability halogenalkandehalogenasy DhaA, z bakteriálního kmene *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (cit.¹), v přítomnosti organického rozpouštědla.

Mutatní knihovna rekombinantního genu kódujícího tento enzym byla zkonstruována jeho náhodnou mutagenézou pomocí chybující *Taq* polymerasy. Sedm tisíc kolonií mutantní knihovny bylo otestováno na aktivitu v pufru obsahujícím dimethyl sulfoxid pomocí modifikované aktivní eseje využívající změny barvy pH indikátoru. Pozitivní varianty byly purifikovány a charakterizovány spektroskopii cirkulárního dichroismu a aktivních měření. Charakterizace pozitivních variant ukázala, že nejvíce strukturně stabilní a k přítomnosti dimethyl sulfoxidu tolerantní enzym byl mutant nesoucí substituci v přístupovém tunelu spojujícím aktivní místo enzymu s okolním prostředím.

Na základě těchto výsledků byla připravena sada mutantů nesoucích tunelové a povrchové mutace přítomné

v termostabilní DhaA vyvinuté Grayem a sp.². Aktivitní měření prokázala, že enzymy nesoucí mutace v tunelu byly v pufru s dimethyl sulfoxidem více stabilní než divoký typ. Varianty se substitucemi v tunelu, v porovnání s výchozím enzymem, též vykazovaly vylepšenou strukturní termostabilitu. Modifikace přístupových tunelů představuje novou strategii pro inženýrství stability halogenalkandehalogenas.

Tato práce vznikla za podpory grantů LC06010, IAA401630901 a MSM0021622412. Za finanční podporu zahraničních stáží TK patří poděkování FEMS a Universität Greifswald.

LITERATURA

1. Kulakova A. N., Larkin M. J., Kulakov L. A.: *Microbiology* 143, 109 (1997).
2. Gray K. A., Richardson T. H., Kretz K., Short J. M., Bartnek F., Knowles R., Kan L., Swanson P. E., Robertson D. E.: *Adv. Synth. Catal.* 343, 607 (2001).

PRODUKCE VAKUOLÁRNÍCH CYTOKININ DEHYDROGENAS Z *Arabidopsis thaliana* V KVASINKÁCH *Pichia pastoris*

MARTA KOWALSKA^a, PETR GALUSZKA^a, MÁRIA ŠMEHILOVÁ^a, TIBOR BÉRES^b a IVO FRÉBORT^a

^a*Katedra biochemie, PŘF, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc;* ^b*Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci a AV ČR mk3107@gmail.com*

Cytokininy jsou důležité signální molekuly v regulující dělení a diferenciaci rostlinných buněk¹. Klíčovou roli v katabolismu cytokininů hraje enzym cytokinin dehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12), který přeměňuje cytokininy a jejich ribonukleosidy s nenasyceným postranním řetězcem na adenin nebo adenosin a příslušný aldehyd. CKX proteiny jsou u různých druhů vyšších rostlin kódovány malými genovými rodinami čítajícími několik členů². Genová rodina CKX v *Arabidopsis thaliana* zahrnuje sedm členů (*AtCKX1-AtCKX7*). Isoenzymy *AtCKX* mají odlišné biochemické vlastnosti, regulaci exprese a různou buňčnou lokalizaci³.

Geny *AtCKX1* a *AtCKX3* kódující vakuolární cytokinin dehydrogenasy v *Arabidopsis thaliana* byly vybrány pro expresi proteinů v *Pichii pastoris*. Sekvence kódující *N*-terminální fragment, který podle programu SignalP 3.0 je vedoucím peptidem, byla v obou případech odstraněna před klonováním do pGAPZa vektoru a pro sekreci proteinů z kvasinkových buněk byla použita *N*-terminální signální sekvence α -faktor. Počáteční experimenty bohužel nevedly k sekreci aktivních proteinů. Přesnější analýza aminokyselinné sekvence *AtCKX1* a *AtCKX3* odhalila přítomnost regionu podobajícího se *N*-terminálnímu sekvence-specifickému vakuolárnímu třídícímu signálu (ssVSS), který typicky zahrnuje degenerovaný signál [N/L]-[P/I/L]-[I/P]-[R/N/S] (také nazývaný NPIR consensus sequence) a cílí proteiny do lytických vakuol⁴. Aktivní

vakuolární cytokinin dehydrogenasy byly získány v *Pichia pastoris* jedině po odstranění tohoto motivu.

Po úspěšné expresi a purifikaci studovaných proteinů byly stanoveny jejich substrátové specifity a preference pro elektronové akceptory.

Tato práce vznikla za podpory grantů MSM 6198959216 a GAČR 522/06/0703.

LITERATURA

1. Mok D.W., Mok M.C.: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 89 (2001).
2. Bilyeu K.D., Cole J.L., Laskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J., Kramer M.D., Morris R.O.: Plant Physiol. 125, 378 (2001).
3. Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina I.: J. Plant Res. 116, 241 (2003).
4. Vitale A., Raikhel N.V.: Trends Plant Sci. 4, 149 (1999).

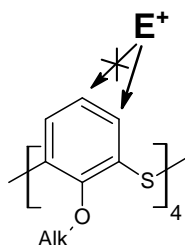
THIACALIXARENY – KRUCIÁLNÍ ROLE SULFIDICKÝCH MŮSTKŮ NA REAKTIVITU SYSTÉMU V POROVNÁNÍ S CALIXARENY

ONDŘEJ KUNDRÁT, JAN KROUPA, MICHAL HIML, VÁCLAV EIGNER, MICHAELA POJAROVÁ, JAN BUDKA a PAVEL LHOTÁK

Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice
kundrato@vscht.cz

Thiacalix[4]areny, mající sulfidické spojky namísto methylenových a patřící do skupiny látek formálně odvozených od calixarenů, nacházejí své uplatnění v supramolekulární chemii, tj. v chemii zabývající se designem a syntézou látek vhodných ke studiu ne vazebných interakcí.

Zatímco v calixarenové chemii se požadovaných sloučenin pro studium těchto sil dosahuje metodou fixace skeletu v patřičné konformaci a následné substituci nebo naopak, fixace thiacalixarenů po předchozí substituci poskytuje jako hlavní produkt nežádoucí konformer. Výzkum reaktivity již tetraalkylovaného systému ukazuje, že právě přítomnost atomů síry významně ovlivňuje chování systému způsobem v chemii calixarenů nepopsaným – přímé *meta*-substituce aromatického systému, alkylace můstkových atomů.



Tato práce se zabývá výše zmíněnými modifikacemi thiacalixarenového skeletu, vedoucí v mnoha případech

jednoduchými postupy k inherentně chirálním látkám, a rozdíly s obdobnými postupy v calixarenové chemii.

Tato práce vznikla za podpory Grantovou agenturou České republiky (grant 203/09/0691) a Grantovou agenturou Akademie věd České republiky (grant IAAX08240901).

LITERATURA

1. Lhoták P.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1675.
2. Kundrát O., Císařová I., Böhm S., Pojarová M., Lhoták P.: J. Org. Chem. 74, 4592 (2009).
3. Kundrát O., Dvořáková H., Císařová I., Pojarová M., Lhoták P.: Org. Lett. 11, 4188 (2009).
4. Kundrát O., Dvořáková H., Eigner V., Lhoták P.: J. Org. Chem. 75, 407 (2010).

OXIDACE ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY I CYTOCHROMY P450 DIKTUJE JEJÍ KARCINOGENNÍ A NEFROTOXICKÉ ÚČINKY

KATEŘINA LEVOVÁ^a, JANA ŠÍSTKOVÁ^a, EVA FREI^b, HEINZ H. SCHMEISER^b, VOLKER M. ARLT^c a MARIE STIBOROVÁ^a

^aKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030/8, 128 40 Praha 2,

^bNěmecké centrum výzkumu rakoviny, 69 120 Heidelberg,

^cInstitut výzkumu rakoviny, Sutton, Surrey, SM2 5NG, Velká Británie

Karcinogenní a nefrotoxický rostlinný alkaloid, aristolochová kyselina I (AAI), je příčinou onemocnění, označovaného jako nefropatie vyvolaná AAI (aristolochic acid nephropathy, AAN). Pro chorobu je charakteristické chronické ledvinné selhání, tubulointersticiální fibrosa a nádory močových cest. AAI participuje i na vývoji podobné fibrosy provázené nádory močových cest, balkánské endemické nefropatie (BEN). Zajímavá je však skutečnost, že ne všichni jedinci vystavení působení AAI onemocní těmito chorobami. Možným vysvětlením mohou být rozdílné hladiny a aktivity enzymů metabolizujících AAI. V práci sledujeme detoxikaci AAI *in vivo* a *in vitro* za použití myších modelů s „deletovaným“ genem pro enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasu v játrech (HRN), který je esenciální pro funkci cytochromu P450. Oproti jaterním mikrosomům kontrolních zvířat (obsahujících jaterní NADPH:cytochrom P450 reduktázu), které oxidují AAI na AAIa, jsou mikrosomy HRN myši v oxidaci AAI prakticky neúčinné. Dále byly sledovány hladiny aduktů vytvářených AAI s DNA u studovaných zvířecích modelů, které byly vystavené působení AAI. Výsledky naznačují, že jaterní cytochromy P450 snižují aktuální koncentraci AAI jak v játrech, tak i v ledvinách, a tím je chrání před tvorbou aduktů s DNA¹⁻⁴. Abychom zjistili, jakou úlohu v oxidaci AAI hrají jednotlivé cytochromy P450, použili jsme mikrosomální systémy myši, lidské, králičí a potkaní. Ze studií s lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450 bylo zjištěno, že neúčinnější v oxidaci AAI jsou CYP1A1 a CYP1A2.

Tato práce vznikla za podpory grantových agentur GAČR (303/09/0472, 305/09/H008) a MŠMT ČR (0021620808).

LITERATURA

- Schmeiser H.H., Stiborova M., Arlt V.M.: *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 141 (2009).
- Stiborová M., Frei E., Arlt V. M., Schmeiser H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55 (2008).
- Stiborová M., Frei E., Schmeiser H.H.: *Kidney Int.* 73, 1209 (2008).
- Šístková J., Hudeček J., Hodek P., Frei E., Schmeiser H.H., Stiborová M.: *Neuro Endocrinol Lett.* 29, 733 (2008).

KVALITATIVNE A KVANTITATIVNE ASPEKTY TECHNIKY PREPÍNANIA KOLÓN V ZÓNOVEJ ELEKTROFORÉZE NA ČIPE

MILAN LUC, MARIÁN MASÁR a DUŠAN KANIANSKY

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovensko
luc@fns.uniba.sk

Práca demonštruje analytický potenciál techniky prepínania kolón („column-switching“, CS) v on-line kombinácii zónová elektroforéza – zónová elektroforéza (ZE-ZE)¹ na čipe so systémom spájania kolón („column-coupling“, CC)². CS technika je realizovaná pomocou časovo riadeného prepínania smeru hnacieho prúdu medzi separačnými kanálkami na CC čipe, čo umožňuje definovaný prenos analytu/-ov z prvého do druhého separačného kanálika s minimálnym počtom interferujúcich zložiek matrice. Experimenty boli zamerané na kvalitatívne a kvantitatívne aspekty ZE-ZE separácií (i) modelovej (13 anorganických a organických kyselín) a (ii) reálnej vzorky (modelová vzorka „spikovaná“ 25-krát riedeným močom). Moč reprezentoval multikomponentnú biologickú matricu. Vysoké reprodukovateľnosti kvalitatívnych (RSD hodnoty migračných časov do 0,4 %) a kvantitatívnych parametrov (RSD hodnoty plôch pík analytov do 2,9 %) boli dosiahnuté za preferovaných pracovných podmienok (eliminovaný hydrodynamický a elektroosmotický tok). Výťažnosti analytov prenesených z prvého do druhého separačného stupňa boli v rozmedzí 94-101 %.

V ZE-ZE experimentoch s reálnou vzorkou bol sledovaný vplyv matrice (moč) na kvalitatívne a kvantitatívne parametre modelových analytov. RSD hodnoty migračných časov analytov boli do 0,5 %, zatiaľ čo RSD hodnoty plôch pík boli v intervale 1,1–4,9 %. Výťažnosti analytov v reálnej vzorke prenesených do druhého separačného stupňa sa pohybovali od 95 do 105 %.

Dosiahnuté výsledky naznačujú široké aplikačné možnosti CS techniky realizovanej na CC čipe najmä v situáciách, keď vzorka obsahuje multikomponentnú matricu s rozličným koncentračným zastúpením jednotlivých zložiek.

Táto práca bola podporená grantovými agentúrami VEGA (č. 1/0672/09), APVV (VVCE-0070-07) a GUK (UK/307/2009).

LITERATURA

- Kaniansky D., Masár M., Danková M., Bodor R., Rákociová R., Pilná M., Jöhncck M., Stanislawski B., Kajan S.: *J. Chromatogr., A* 1051, 33 (2004).
- Kaniansky D., Masár M., Bodor R., Žúborová M., Őlvecká E., Jöhncck M., Stanislawski B.: *Electrophoresis* 24, 2208 (2003)

ENZYMATICKÁ SYNTÉZA MODIFIKOVANÉ DNA A JEJÍ ŠTĚPENÍ RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEASAMI

HANA MACÍČKOVÁ-CAHOVÁ a MICHAL HOCEK*

UOCHB AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
cahova@uochb.cas.cz

Funkcionalizované nukleové kyseliny priťahujú v posledných letech stále väčšiu pozornosť. Nejenže nám môžu pomoci pri pochopení interakcií DNA či RNA s proteínmi, ale môžu také sloužit v řadě dalších aplikací, ať už se jedná o nanotechnologie či bioanalysu. V naší skupině jsme vyvinuli novou dvoukrokovou metodiku přípravy DNA nesoucí modifikaci na nukleových bazích. Vodné cross-coupling reakce halogenovaných deoxynukleosid trifosfátů (dNTP) s funkcionalizovanými boronovými kyselinami vedly k syntéze modifikovaných dNTP, které byly následně inkorporovány za využití polymeras do různých sekvencí ať už v primer extension experimentu nebo v polymerasové řetězové reakci^{1,2,3}. Ta ovšem nedovoluje přípravu DNA modifikované pouze v definované pozici, ale vzniká několikanásobně modifikovaná DNA. Pro přípravu DNA nesoucí modifikaci ve specifické poloze je třeba zvládnout práci s klasickými prostředky molekulární biologie například restrikcími endonukleasami či ligasami. Proto jsme se soustředili na studium interakce DNA nesoucí různé substituenty na bazích s některými běžně používanými restrikcími endonukleasami. Ukázalo se, že menší modifikace jako například acetylen v cílové sekvenci jsou některými restrikcími endonukleasami velmi dobře tolerovány. Ovšem jakákoliv stericky náročnější skupina počínaje fenylem může být využita při chránění DNA před štěpením těmito enzymy⁴.

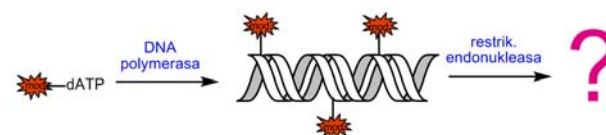


Schéma 1. Enzymatická syntéza modifikovanej DNA a následná interakce DNA s restrikcími endonukleasami

Tato práce je součástí výzkumného projektu Z4 055 0506, podporována Centrem pro biomolekuly a komplexní molekulární systémy (LC 512), Grantovou agenturou České

republiky (203/09/0317) a Výzkumným centrem Gilead science, Inc. (Foster City, CA).

LITERATURA

1. Čapek P., Cahová H., Pohl R., Hocek M., Gloeckner C., Marx A.: Chem. Eur. J. 13, 6196 (2007).
2. Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M.: Angew. Chem., Int. Ed. 47, 2059 (2008).
3. Cahová H., Pohl R., Bednářová L., Novaková K., Cvačka J., Hocek M.: Org. Biomol. Chem. 6, 3657 (2008).
4. Macíčková-Cahová H., Hocek M.: Nucleic Acids Res. 37, 7612 (2009).

ANALÝZA P53 MUTACÍ *IN VITRO* A *IN VIVO*

JITKA MALČÍKOVÁ^a, MARTIN TRBUŠEK^a, JANA ŠMARDOVÁ^b, JIRÍ DAMBORSKÝ^c, PETR KUGLÍK^d, BORIS TICHÝ^a, JIRÍ MAYER^a a ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ^a

^aCentrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK, FN Brno a LF MU, 625 00 Brno; ^bÚstav patologie, FN Brno, 625 00 Brno; ^cLoschmidt Laboratories, UEB a NCBI PŘF MU Kamenice 5/A4, 625 00; ^dOddělení lékařské genetiky, FN Brno, Černopolská 9, 625 00 Brno
jmalcikova@fnbrno.cz

Nádorový supresor p53 je ústředním regulátorem buněčného cyklu. Funguje převážně jako transkripční faktor a základním předpokladem pro jeho funkci je vazba k DNA. Jako klíčový protein zabráňující maligní transformaci bývá u nádorů často poškozen. Už vyřazení jedné alely vede k jeho nedostatečné funkci. V případě bodových mutací je navíc exprimován protein se změněnými vlastnostmi. U chronické lymfocytární leukémie (CLL) je přítomnost delecí genu *TP53* důležitým negativním prognostickým faktorem¹, zatímco význam mutací je intenzivně studován teprve v poslední době. V naší práci se zabýváme komplexní analýzou p53 mutací na několika úrovních *in vitro* i *in vivo*.

S využitím funkčních proteinových čipů umožňujících paralelní sledování DNA-vazebních schopností několika p53 mutovaných proteinů současně jsme zjistili, že mutant p53-R337C vykazuje vysokou vazbu k responzivním elementům cílových genů, srovnatelnou s wild-type proteinem. V reportérových genových testech však tento mutant transaktivoval cílové promotory pouze částečně a pomocí PCR v reálném čase jsme zjistili, že endogenní promotory nejsou mutantem R337C aktivovány téměř vůbec.² *In vivo* jsme pak na souboru 70 CLL pacientů s p53 abnormalitami studovali asociaci p53 delecí a mutací, vliv jednotlivých abnormalit na přežití pacientů a mechanismy vzniku p53 defektů. Ukázali jsme, že nejčastěji dochází ke kompletní inaktivaci genu delecí jedné a mutací druhé alely. Samotné delece jsou vzácné, ale samotné mutace se vyskytují poměrně často a mají významný negativní vliv na prognózu. Vznik nových p53 defektů je silně asociovan s předcházející léčbou³.

Naše výsledky ukazují, že samotná vazba p53 k DNA není dostatečná pro účinnou transaktivaci cílových genů a závěry získané *in vitro* nemusí vždy odpovídat reálné situaci v buňce. U CLL jsme doložili prognostický význam monoalelických p53 abnormalit (zejména mutací) a ukázali jsme, že na vzniku nových p53 defektů se významně podílí léčba, pravděpodobně prostřednictvím selekce rezistentních klonů.

Tato práce vznikla za podpory grantů IGA MZČR NS9858-4/2008 a NS10439-3/2009.

LITERATURA

1. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Krober A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P.: N. Engl. J. Med. 343, 1910 (2000).
2. Malcikova J., Tichy B., Damborsky J., Kabathova J., Trbusek M., Mayer J., Pospisilova S.: Biol. Chem., v tisku.
3. Malcikova J., Smardova J., Rocnova L., Tichy B., Kuglik P., Vranova V., Cejkova S., Svitakova M., Skuhrova Francova H., Brychtova Y., Doubek M., Brejcha M., Klabusay M., Mayer J., Pospisilova S., Trbusek M.: Blood 114, 5307 (2009).

AKTIVACE A DETOXIKACE BENZO[A]PYRENU CYTOCHROMEM P450 1A1 *IN VIVO* A *IN VITRO*

MICHAELA MOSEROVÁ^a, VĚRA KOTRBOVÁ^a, DAGMAR AIMOVÁ^a, MIROSLAV ŠULC^a, VOLKER M. ARLT^c, EVA FREI^b a MARIE STIBOROVÁ^a

^aUniverzita Karlova v Praze, Katedra biochemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2 ^bNěmecké centrum výzkumu rakoviny, 69 120 Heidelberg ^cInstitut výzkumu rakoviny, Sutton, Surrey SM2 5NG, Velká Británie
moserova@seznam.cz

Karcinogenní benzo[a]pyren (BaP) po aktivaci cytochromy P450 (CYP) kovalentně modifikuje DNA. Nedávné studie ukazují, že CYP1A1, dříve považovaný za nejdůležitější enzym aktivující BaP¹, může participovat spíše na jeho detoxifikaci než metabolické aktivaci, čímž chrání organismy proti toxicitě tohoto karcinogenu^{2,3}. V práci jsme sledovali tvorbu aduktů aktivovaného BaP s DNA a indukci enzymů a proteinů participujících na jeho metabolismu (CYP1A1/2, NADPH:CYP reduktasy, epoxid hydrolasy a cytochromu b₅) *in vivo*, v játrech modelového organismu myši. Cílem studie bylo zjistit, které enzymy se skutečně podílí na metabolické aktivaci BaP, a zda tato sloučenina ovlivňuje svou vlastní metabolickou aktivaci.

BaP zvyšuje expresi a aktivity CYP1A1/2 v játrech experimentálních modelů (laboratorní myš a potkan). BaP je rovněž schopen vytvářet adukty s DNA, především v játrech studovaných organismů. Vlivem indukce CYP1A1/2 a dalších aktivačních enzymů dochází ke stimulaci vzniku metabolitů BaP, které vytvářejí adukty s DNA *in vitro*. BaP je oxidován purifikovaným CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou za tvorby BaP-chinonu, 9-

hydroxy- a 3-hydroxy-BaP. Naproti tomu v mikrosomálnom systéme obsahujúcom okrem cytochromu P450 a jejich reductasy tiež cytochrom b₅ a epoxid hydrolasu je BaP oxidovaný na šesť metabolitů; 9,10-diol-, 4,5-diol a 7,8-diol-BaP, BaP-chinon, 9-hydroxy a 3-hydroxy-BaP. Prítomnosť epoxid hydrolasy a cytochromu b₅ v rekonstituovanom systéme CYP1A1 a jeho reductasy modulujú hladiny dvoch majoritných aduktů tvorených z 9-hydroxy-BaP a 7,8-diol-9,10-epoxid BaP. Výsledky potvrdzujú, že BaP indukuje CYP1A1/2, a tak moduluje vlastnú metabolickú aktiváciu a detoxikáciu vedúcu k vývoju nádorových chorôb.

Tato práce vznikla za podpory grantových agentur GAČR (303/09/0472, 305/09/H008), MŠMT (0021620808) a GAUK (127208).

LITERATURA

1. Baird W.M., Hooven L.A., Mahadevan B.: Environ. Mol. Mutagen 45, 106 (2005).
2. Uno S., Dalton T.P., Dragin N., Curran C.P., Derkenne S., Miller M.L., Shertzer H.G., Gonzalez F.J., Nebert D.W.: Mol. Pharmacol. 69, 1103 (2006).
3. Arlt V.M., Stiborová M., Henderson C.J., Thiemann M., Frei E., Aimová D., Singh R., Gamboa da Costa G., Schmitz O.J., Farmer P.B., Wolf C.R., Phillips D.H.: Carcinogenesis 29, 656 (2008).

MUTÁCIE FUNKČNÝCH OBLASTÍ TLR1, TLR2 A TLR4: ICH VPLYV NA VNÍMAVOSŤ VOČI PARATUBERKULÓZE U HOVÄDZIEHO DOBYTKA

RASTISLAV MUCHA^{a*}, MANGESH BHIDE^{a,b}, LUCIA KISOVÁ-VARGOVÁ^b, IVAN MIKULA jr.^b a IVAN MIKULA sr.^a

^aNeuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 854 10 Bratislava; ²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika rastislavmucha@gmail.com

Toll-like receptory (TLR) sú, ako transmembránové proteíny, dôležitou súčasťou nešpecifickej imunity a majú významnú úlohu v navodení obrany voči infekcii, vrátane *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Na základe mykobakteriálnej teórie prejavu paratuberkulózy existuje predpoklad, že mutácie v génoch TLR vyvolávajú neschopnosť týchto receptorov reagovať na špecifické znaky patologických mikroorganizmov (tzv. PAMP) a tým sa neaktivuje ani následná imunitná zápalová odpoveď.

Práca bola zameraná na detekciu mutácií génov TLR1, TLR2, TLR4 a určenie vzťahu medzi mutáciami a vnímavosťou voči MAP infekcii. Na základe poznatkov o TLR1 a TLR4 géne¹ sme sa pri detekcii mutácií v týchto génoch zamerali na extracelulárnu (LRR) doménu zodpovednú za rozpoznanie PAMP. U TLR1 sme objavili mutáciu Val220Met v LRR10 doméne na deviatej pozícii (LLR doména je zložená z 11 aminokyselín). Prítomnosť metionínu na tejto pozícii môže spôsobiť zoslabenie

vodíkových väzieb v proteínovej štruktúre LRR, čo vedie ku zníženej afinitě voči bakteriálnym PAMPom², teda táto mutácia môže spôsobiť zvýšenú vnímavosť voči MAP infekcii. U TLR4 sme dokázali, že časť extracelulárnej domény LRR11 je najviac polymorfným motívom v nami študovaných oblastiach LRR11 až LRR16. Mutácie na vonkajšej časti tejto štruktúry, napr. mutácia na štvrtej pozícii od LRR motívu, môžu ovplyvniť naviazanie PAMP na LRR³. Nami detegovaná mutácia u TLR4 na pozícii Asp299Gly je jedným z najlepších príkladov mutácie na štvrtej pozícii od LRR, ktorá spôsobuje zvýšenie vnímavosti voči MAP infekcii.

U TLR2 má veľký význam v prenose signálu vnútrobunková (TIR) doména. Podarilo sa nám detegovať mutáciu na pozícii Arg677Trp, ktorá mala výrazne preventívny charakter pre vnímavosť voči paratuberkulóze. Taktiež sme detegovali mutáciu na pozícii Arg753Gln. Táto tvorila výrazný *risk faktor* a v populácii, v ktorej sa vyskytovala, podstatne zvyšovala vnímavosť voči MAP infekcii.

Táto publikácia, bola vytvorená realizáciou projektu INFECTZOON – Centrum excelentnosti pre nákazy zvierat a zoonózy, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50% podiel) a na základe podpory grantu MŠSR VEGA-1/0608/09 (50% podiel).

LITERATÚRA

1. Matsushima N., Tanaka T., Enkhbayar P., Mikami T., Taga M., Yamada K., Kuroki Y.: BMC Genomics 8, 124 (2007).
2. Matsushima N., Tachi N., Kuroki Y., Enkhbayar P., Osaki M., Kamiya M., Kretsinger R.H.: Cell Mol. Life Sci. 62, 2771 (2005).
3. Bell J.K., Mullen G.E., Leifer C.A., Mazzoni A., Davies D.R., Segal D.M.: Trends Immunol. 24, 528 (2003).

STUDIUM MOLEKULÁRNYH PODSTATY POLYCYTHEMIA VERA

EVA OTÁHALOVÁ^a a JOSEF T. PRCHAL^b

^aÚstav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2, ^bUniversity of Utah, Salt Lake City, UT, USA eva.otahalova@uhkt.cz

Polycythemia vera (PV) je klonální hematologické onemocnění charakterizované zvýšenou erytropoézou. U více než 95 % pacientů s PV je detegována somatická bodová mutace v oblasti kódující tyrosinovou kinasu JAK2 (*JAK2 V617F*). Tato mutace vede ke konstitutivní aktivaci JAK2 a následně k abnormálně zvýšené erytropoéze. Přesná úloha této mutace při vzniku PV však zůstává neobjasněná. Současný výzkum se soustřeďuje na popis událostí, které expresi *JAK2 V617F* předchází. Náš projekt se proto zaměřuje na studium raných erytroidních progenitorů a na

vytipování dalších potenciálních genů či deregulací významných pro vznik a vývoj PV.

Mononukleární buňky (MNC) izolované z periferní krve 12 PV pacientů a 5 zdravých dárců jsme pomocí 21 denní *in vitro* kultury v trifázovém tekutém mediu¹ diferenciovali do erytroidní linie. Ve vzorcích napříč kultivací (den 1, 7, 14, 21) jsme pomocí BeadChip Illumina technologie sledovali genovou expresi a získaná data statisticky analyzovali v programu R². Výsledky jsme ověřili pomocí RT-PCR v reálném čase na rozšířeném souboru vzorků.

Použitá *in vitro* metoda umožnila selekci homogenních populací jednotlivých stádií erytroidních progenitorů z velmi heterogenní populace, jakou tvoří krevní MNC. Pomocí komparativních analýz jsme vytypovali skupinu kandidátních genů asociovaných s PV a deregulovaných v jednotlivých stádiích erytroidní expanze. Výsledky jsme dále korelovali s expresním profilem miRNA³ popsaném na souboru erytroidních progenitorů získaných za stejných podmínek.

Ačkoliv existuje řada komerčně dostupných programů pro předpověď potenciálních cílů jednotlivých miRNA, v některých případech vedou počítačové analýzy k výběru biologicky nerelevantních dat. Korelace expresních profilů miRNA a mRNA je tedy důležitá pro objasnění funkcí jednotlivých miRNA. V našem případě nabízí současné studium expresních profilů miRNA a mRNA na stejných vzorcích erytroidních progenitorů možnost detailnějšího poznání molekulární podstaty a patologie polycythemia vera.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK 200095.

LITERATURA

1. Gaikwad A., Nussenzveig R., Prchal J.T.: *Exp. Hematol* 35, 587 (2007).
2. Otahalova E., Bruchova H., Necas E., Prchal J.T.: *Vnitř. Lek.* 54, P61 (2008).
3. Bruchova H., Yoon D., Agarwal A.M., Mendell J., Prchal J.T.: *Exp. Hematol.* 35, 1657 (2007).

PLODY *Lonicera caerulea* L.: OD FYTOCHEMIE PO APLIKACI

IRENA PALÍKOVÁ^{a*}, KATEŘINA VALENTOVÁ^a, JAN ROHEL^b, SIMONA KAPRÁLOVÁ^b, VILÍM ŠIMÁNEK^a a JITKA ULRICOVÁ^a

^aÚstav lékařské chemie a biochemie, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc; ^bKlinika zubního lékařství, Palackého 12, 772 00 Olomouc
i.palikova@gmail.com

Lonicera caerulea L. (zimolez modrý) je původním keřem severní polokoule. Plody jsou bohatým zdrojem anthokyaninových barviv. V tradičním léčitelství Ruska a Číny se proto využívají pro své protizánětlivé a chemopreventivní účinky¹. Cílem naší práce bylo analyzovat složky plodu zimolezu modrého, připravit frakci bohatou na biologicky aktivní látky a dokázat její příznivé účinky *in vitro* i *in vivo*.

V plodech zimolezu modrého byla potvrzena přítomnost velkého množství fenolových látek, především anthokyaninů (kvanidin-3-glukosid), které jsme pro studium biologické aktivity zkoncentrovali do fenolové frakce (FF; 80 % anthokyaninů). Na subbuněčných modelech vykazovala FF redukční kapacitu, inhibovala radikálové poškození potkaních mikrosomálních membrán vyvolané *tert*-butylhydroperoxidem (*t*BH) i oxidaci lidských lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) indukovanou mědí². V koncentraci 1000 µg·ml⁻¹ vykazovala cytoprotektivní účinek na primární kultury potkaních hepatocytů a lidských endotelových buněk (HUVEC) po intoxikaci *t*BH (0,5 mmol·l⁻¹; 1,5h), v koncentraci 0,1 µg·ml⁻¹ na HUVEC po poškození oxidovanými LDL (200 µg·ml⁻¹; 2h). Protizánětlivé účinky celých plodů *L. caerulea* L. (10 %) v kombinaci s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami (5 %) byly potvrzeny na modelu zánětu tlustého střeva vyvolaného dextran-sulfátem sodným (5 %) u potkanů kmene Wistar. Experiment byl hodnocen histologickou analýzou tenkého a tlustého střeva a měřením parametrů oxidačního stresu (cyklooxygenasa, myeloperoxidasa, produkty lipoperoxidačního poškození, glutathionreduktasa, glutathiontransferasa).

Jednou z možností aplikace FF *Lonicera caerulea* L. je léčba pacientů s diagnostikovanou gingivitidou a parodontitidou. Frakce v kombinaci s extraktem *Macleaya cordata* ve formě zubního gelu příznivě působila na podpurné a pojivové tkáně zubu, zabraňovala adherenci gram-negativních bakterií, hlavní příčiny vzniku parodontálního onemocnění.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 6198959216 a FT-TA3/024.

LITERATURA

1. Heinrich J., Švarcová I., Valentová K.: *Chem. Listy* 102, 245 (2008).
2. Palíková I., Heinrich J., Bednář P., Marhol P., Křen V., Cvak L., Valentová K., Růžička F., Holá V., Kolář M., Šimánek V., Ulrichová J.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 11883 (2008).

NEGATIVNÍ VLIV RETROTRANSPONU LINE-1 NA LIDSKÝ GENOM: NOVÁ MOLEKULÁRNÍ PŘÍČINA VZNIKU β-TALASÉMIE

LUCIE PITERKOVÁ, JANA KUČEROVÁ a VLADIMÍR DIVOKÝ

Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
lucie.piterkova@upol.cz

Lidský genom obsahuje více než 500 000 kopií LINE-1 retrotransponu (long interspersed nuclear element, LINE-1, zkráceně L1), které představují zhruba 17 % jeho obsahu. L1 element se tak stal, co do počtu, nejúspěšnější sekvencí v rámci lidské evoluce. Retrotransposičně aktivních je v současné době pouze 100 kopií, které svou insercí mohou

kvantitativně a kvalitativně ovlivnit expresi mnoha genů. Většina de novo L1 insercí nemá vliv na lidský organismus, nicméně mohou se projevit i jako negativní mutageny a stát se tak příčinou řady lidských onemocnění¹.

Inserce funkčního retrotransposonu L1 (6 kb, GenBank: AF149422) do druhého intronu β -globinového genu je úplně novou etiologií β -talasémie u matky a dcery z ČR. β -talasémie jsou vrozené chronické anémie, vznikající v důsledku snížení, nebo absence syntézy β -globinového polypeptidového řetězce.

Spojením L1⁺ EBV transformovaných lymfocytů s myšími erytroleukemickými buňkami (MEL) jsme vytvořili buněčnou linii, která nám umožnila charakterizovat vliv přítomnosti L1 elementu na funkci β -globinového genu u postižených jedinců. Insercí L1 elementu do β -globinového genu poklesla hladina mRNA u mutované alely na 10 – 15 %. Majoritní podíl připadá na správně sestříženou formu mRNA, minoritní pak na 3 aberantní varianty. Zjistili jsme, že aberantní varianty jsou eliminovány mechanismem degradace defektních mRNA (nonsense mediated decay); při zablokování této dráhy se jejich exprese 2x zvýší. Dále jsme dokázali, že regulační enhancerová oblast na 3' konci β -globinového genu u mutované alely je methylovaná, narozdíl od kontroly. Po odstranění methylace zůstává však exprese nezměněna, z čehož usuzujeme, že methylace enhancerové oblasti není primární příčinou poklesu hladiny β -globinové mRNA, ale jen sekundárním jevem souvisejícím s dislokací promotoru a enhanceru. L1 element také ovlivňuje míru aktivity z β -globinového promotu, která byla u mutované alely snížena o 30 %.

Molekulárních mechanismů, kterými L1 element moduluje expresi lidských genů, bylo popsáno několik². V současné době však není jasné, které z nich a jakým způsobem přispívají k výslednému patologickému fenotypu. Jejich odhalení je důležité pro pochopení skutečného evolučního významu retrotransposonů a jejich funkce.

Tato práce byla podpořena granty MZ ČR NS9935-3 a MŠMT 6198959205.

LITERATURA

1. Belancio P., Deininger P.: *Genome Res.* 18, 3 (2008).
2. Han J.S., Szak S.T., Boeke J.D.: *Nature* 429, 6989 (2004).

VLIV OXIDU DUSNATÉHO NA PRODUKCI HEAT SHOCK PROTEINŮ

JANA PITERKOVÁ^a, LENKA LUHOVÁ^a, MAREK PETŘIVALSKÝ^{a,*}, ZUZANA MATULKOVÁ^a a BARBORA MIESLEROVÁ^b

^aKatedra biochemie, ^bKatedra botaniky, PŘF, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, marek.petrivalsky@upol.cz

Na rostliny působí řada abiotických a biotických stresových faktorů, jako je vysoká a nízká teplota, těžké kovy, UV záření nebo útok patogenů^{1,2}. Vystavení těmto

stresovým podmínkám vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), k nimž patří zejména oxid dusnatý (NO) a peroxid vodíku (H₂O₂)¹. Teplotní stres spolu s dalšími stresy způsobuje denaturaci nebo agregaci proteinů vedoucí až k buněčné smrti. Heat shock proteiny (Hsp), jejichž zvýšená produkce je charakteristická pro teplotně stresované organismy, působí v regulaci membránové fluidity a homeostáze proteinů a v ochraně před buněčnou smrtí³. Prezentovaná práce je zaměřena na stanovení exprese Hsp70 proteinů u dvou genotypů *Lycopersicon* spp. vlivem působení teplotního stresu, patogeneze (*Oidium neolyopersici*) a kombinace těchto stresových faktorů, dále byl studován vliv modulatorů koncentrace ROS a RNS. Mezi testované látky modulující koncentraci ROS a RNS patří donor NO (GSNO), lapač NO (PTIO) a inhibitor NADPH oxidasy (DPI). V rámci dané studie byl porovnán vliv teplotního a chladového stresu na produkci Hsp70 proteinů u dvou genotypů *Lycopersicon* spp. realizovaný na intaktních rostlinách a na listových discích. Chladový stres neměl výrazný vliv na produkci Hsp70 proteinů na rozdíl od teplotního stresu. V případě listových disků byl detekován nárůst produkce Hsp70 proteinů jako důsledek mechanického poškození rostlinného pletiva. Následující experimenty byly realizovány na listových discích vystavených teplotnímu stresu v prostředí modulatorů koncentrace ROS a RNS. Metodou Western blot byl prokázán vliv abiotického stresu, biotického stresu a jejich kombinace a regulační vliv koncentrace ROS a RNS na expresi Hsp70 proteinů. Během experimentu byly detegovány dva proteiny Hsp70 rodiny lišící se molekulovou hmotností, a to teplotně-inducibilní protein Hsp72 a konstitutivně exprimovaný protein Hsp75. Vlivem patogeneze nebo působením modulatorů koncentrace ROS a RNS docházelo ke zvýšení exprese Hsp75 proteinu. Byla také nalezena korelace mezi ROS a RNS a expresí Hsp70 proteinu.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM 6198959215 a grantu GAČR 522/08/H003.

LITERATURA

1. Pastori G. M., Foyer C. H.: *Plant Physiol.* 129, 460 (2002).
2. Smirnov N.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 214 (1998).
3. Parsell D. A., Lindquist S.: *Annu. Rev. Genet.* 27, 437 (1993).

TRANSKRIPČNÍ REGULACE CHAPERONOVÉHO SYSTÉMU HSP70 A HSP90 V NÁDOROVÉ BUŇCE

EVA RŮČKOVÁ, PETR MÜLLER a BOŘIVOJ VOJTĚSEK

Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno ruckova@mou.cz

Molekulární chaperony se podílejí na vytváření správné konformace polypeptidových řetězců po translaci, zabraňují jejich agregaci, umožňují proteinům vykonávat biologické

funkce, ale účastní se také jejich proteolytického odbourávání.

Pro nádorové buňky je vysoká aktivita chaperonů nezbytnou podmínkou pro překonání stresových podmínek způsobených genetickou nestabilitou, hypoxií nebo nadměrnou proliferací. Pro nádorovou buňku je zvláště důležitý protein Hsp90, který se podílí na stabilizaci řady onkogenních proteinů. Přestože je dlouhodobě známo, že ATPázová aktivita Hsp90 je u nádorové buňky v porovnání s buňkou nenádorovou až 100-násobně zvýšena, není přesně znám molekulární mechanismus vedoucí k těmto změnám. Hsp90 je v nádorových buňkách asociován s dalšími chaperony a ko-chaperony do multi-proteinových komplexů, které zprostředkovávají účinný folding a stabilizaci klientních proteinů. Lze se domnívat, že exprese ko-chaperonů, specifických proteinů kooperujících s Hsp90, může být jedním z důležitých faktorů zodpovědných za zvýšení aktivity Hsp90 v nádorových buňkách.

Z hlediska regulace rovnováhy mezi skládáním konformace proteinu nebo naopak jeho degradací jsou zajímavé ko-chaperony HOP a CHIP, které interagují s C-koncovou doménou Hsp90 a Hsp70. Protein HOP (Hsp70/Hsp90 organizing protein) zprostředkovává přenos klientních proteinů z Hsp70 na Hsp90 a podporuje tak skládání proteinů. Pro své schopnosti zesilovat funkci Hsp90 je považován za potenciální onkogen. Protein CHIP má naopak schopnost ubikvitinovat jak chaperony, tak i jejich klientní proteiny, a je proto odpovědný za jejich odbourávání proteazomem. Pro svou schopnost degradovat klienty Hsp90 je ko-chaperon CHIP pokládán za kandidátní tumor supresorový gen. Analýza exprese chaperonů v nádorových buňkách ukázala, že exprese proteinu CHIP byla stabilní, zatímco u proteinu HOP se zvyšovala po aktivaci HSF (heat shock factor) prostřednictvím inhibice Hsp90 a byla inhibována při nedostatku růstových stimulů.

Tyto rozdíly v regulaci exprese obou ko-chaperonů jsou v souladu s výsledky analýzy promotorových sekvencí. Promotor genu kódujícího CHIP má znaky typické pro house-keeping geny, obsahuje CpG ostrovy a SP1 vazebná místa. V promotoru genu pro HOP se naopak nachází dva vazebné elementy pro HSF a také několik vazebných míst pro onkogenní transkripční faktory, jako jsou E2F a c-myc. Zvýšená exprese ko-chaperonu HOP způsobená onkogenními transkripčními faktory může přispívat k nadměrné aktivitě Hsp90 a stabilizaci jeho klientních proteinů u nádorů. Indukce exprese proteinu HOP v důsledku inhibice Hsp90 může také omezovat terapeutický efekt inhibitorů Hsp90 narušením rovnováhy mezi hladinami obou ko-chaperonů a zamezením degradace klientních proteinů ubikvitin ligázou CHIP. Ko-chaperon HOP je z těchto důvodů nadějným cílem protinádorové terapie, který by mohl potencovat účinky inhibitorů Hsp90.

Tato práce je podporována granty GACR 301/08/1468 a MZ0M0U2005.

SYNTÉZA MONOSUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ CYKLODEXTRINŮ JAKO PREKURZORŮ PRO DALŠÍ APLIKACE

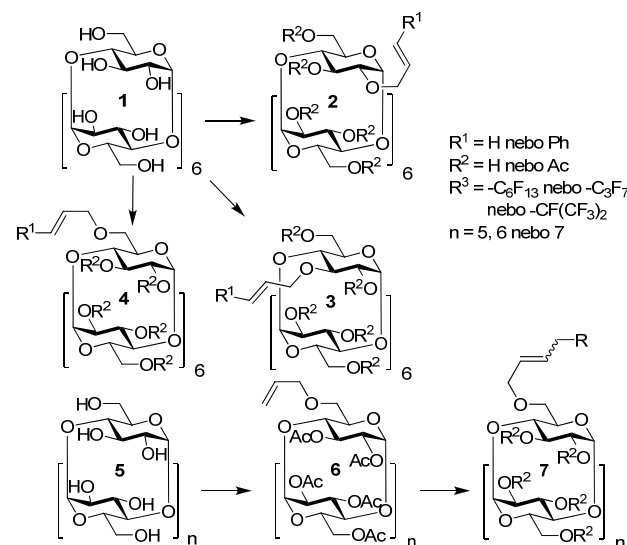
MICHAL ŘEZANKA^a, JINDŘICH JINDŘICH^a
a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 40 Praha 2; ^bÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
rezanka@natur.cuni.cz

Cykloextriny¹ jsou cyklické oligosacharidy složené z D-glukopyranosových jednotek spojených $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou, které tvoří rigidní kavitu. Těto strukturální vlastnosti cykloextrinů i jejich derivátů je hojně využíváno v chemické praxi. Aby bylo možné rozšířit využití cykloextrinů, je nezbytné připravit jejich vhodné deriváty.

Naše skupina se zabývá převážně syntézou monosubstituovaných derivátů cykloextrinů. Velmi výhodnými skupinami pro tuto monoderivatizaci jsou allylová nebo cinnamylová skupina², jelikož obsahují dvojnou vazbu, která je široce modifikovatelná.

Náš výzkum je zaměřen na přípravu allyl a cinnamyl derivátů α -CD (2–4) a derivátů α -, β - a γ -cykloextrinů 7 s fluorovanými postranními řetězci pro biomedicínské aplikace³ a studium agregačních vlastností 7 ve vodě.



Tento projekt je podporován granty MSM0021620857, IAA 400550609 a KAN 200200651.

LITERATURA

1. Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).
2. Jindřich J., Tišlerová I.: J. Org. Chem. 70, 9054 (2005).
3. Abila M., Durand G., Pucci B.: J. Org. Chem. 73, 8142 (2008).

NOVÝ PŘÍSTUP K AZAHELICENŮM A JEJICH VYUŽITÍ JAKO ORGANOKATALYZÁTORŮ PŘI ASYMETRICKÉ KINETICKÉ RESOLUCI RACEMICKÝCH ALKOHOLŮ

MICHAL ŠÁMAL, JIŘÍ MÍŠEK, IRENA G. STARÁ* a IVO STARÝ*

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

Finálním krokem při syntéze plně aromatických azahelicenů, který byl dosud v naší skupině používán, byla oxidativní aromatizace tetrahydroazahelicenů vzniklých [2+2+2] cykloisomerizací příslušných triynů. Aromatizace byla prováděna oxidem manganičitým za asistence mikrovlnného záření¹.

Z důvodů zvýšení výtěžků aromatizace byl navržen alternativní postup. Cyklotrimerizační reakcí byl připraven disubstituovaný tetrahydro[5]helicen, u kterého bylo možné efektivně provést aromatizaci kysele katalyzovanou eliminací kyseliny octové. Oxidativní aromatizace byla tedy nahrazena eliminačním mechanismem (Schéma 1). Kromě výrazného zvýšení výtěžku aromatizace byl zároveň snížen celkový počet reakčních kroků, což vedlo k vyššímu celkovému výtěžku aza[5]helicenu. Popsaný postup byl rovněž úspěšně aplikován při syntéze azahexahelicenů.

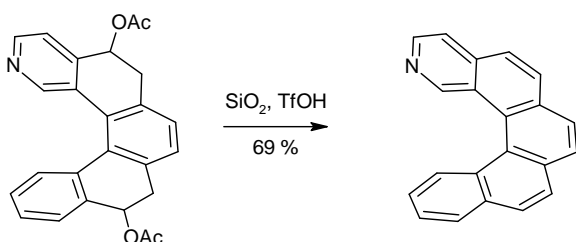


Schéma 1

Přítomnost nukleofilního a koordinujícího pyridinového dusíku ve spojení s helikální chiralitou molekuly předurčuje azaheliceny k využití v organokatalýze a jako ligandy při enantioselektivních reakcích katalyzovaných komplexy kovů. Optický čistý enantiomer 2-aza[6]helicenu byl použit při kinetické resoluci sekundárních alkoholů, především racemického 1-fenylethanolu².

Tato práce vznikla za podpory GA AV ČR (reg. č. IAA400550916), MŠMT (Centrum pro biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg. č. LC512) a ÚOCHB AV ČR (tato studie je součástí výzkumného záměru Z4 055 0506).

LITERATURA

- Míšek J., Teplý F., Stará I. G., Tichý M., Šaman D., Císařová I., Vojtíšek P., Starý I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2074 (2008).
- Šámal M., Míšek J., Stará I. G., Starý I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1151 (2009).

RESOLUCE HELQUATŮ NA ENANTIOMERY

LUKÁŠ SEVERA, LOUIS ADRIAENSSENS, JAN VÁVRA, DUŠAN KOVAL, VÁCLAV KAŠIČKA a FILIP TEPLÝ*

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

Nedávno jsme vyvinuli třístupňovou syntézu nové třídy helikálních extendovaných diquatů (helquatů). Helquaty představují novou kombinaci strukturálních motivů typických pro helicity a viologeny¹. Lze očekávat, že propojení těchto dosud oddělených oblastí výzkumu otevře atraktivní badatelská témata^{1,2}. Jelikož je helikální chiralita dominantní vlastností těchto nových systémů, zaměřili jsme se po úspěšném zvládnutí syntézy racematů na přípravu helquatů v opticky čisté formě.

Ionický charakter helquatů umožňuje využití výměny nechirálního aniontu za opticky čistý anion, čímž směs dvou enantiomerů snadno převedeme na směs dvou diastereoisomerů. Odlišná rozpustnost takových diastereoisomerů je klíčem k resoluci helquatů na enantiomery. Výhodou tohoto přístupu je dobrá dostupnost řady chirálních aniontů odvozených od levných přírodních kyselin³.

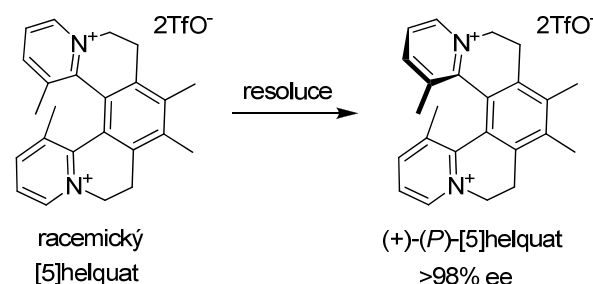


Schéma 1. Resoluce [5] helquatu

Pro určení zastoupení jednotlivých enantiomerů helquatu představujeme kapilární elektroforézu se sulfatovaným cykloextrinem jako chirální selektorem. U neracemických helquatů byly měřeny racemizační bariéry.

Tato práce vznikla za podpory GAČR P207/10/2391, 203/09/1614, 203/09/0705 a ÚOCHB AV ČR v.v.i. (Z4 055 0506).

LITERATURA

- Adriaenssens L., Severa L., Šalová T., Císařová I., Pohl R., Šaman D., Rocha S.V., Finney N.S., Pospíšil L., Slaviček P., Teplý F.: *Chem. Eur. J.* 15, 1072 (2009).
- Adriaenssens L.; Severa L.; Vávra J.; Šalová T.; Hývl J.; Čížková M.; Pohl R.; Šaman D.; Teplý F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1023 (2009).
- Jacques J., Collet, A., Wilen S. H.: *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, 2nd ed., Krieger, Malabar, Florida, 1994.

GAS-PHASE CHEMISTRY AS A MECHANISTIC TOOL FOR SOLUTION CHEMISTRY AND CATALYSIS

DETLEF SCHRÖDER

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

Mass spectrometry (MS) has numerous applications ranging from elemental¹ and molecular analysis² to various "omics" in biology³ and applications in medicine⁴. Olympic games, for example, nowadays involve not only sports but a lot of mass spectrometry for advanced doping tests⁵. The success of MS is due to the unique combination of high sensitivity and low sample requirements. Due to its widespread usage, mass spectrometry is continuously growing and offers excellent employment opportunities for qualified researchers.

Most analytical applications of MS evolve as a spin-off of fundamental studies situated at the interplay between physical, organic, and inorganic chemistry. Mass spectrometry, for example, requires the sample to be ionized which in turn leads to the determination of ionization energies and proton affinities. Similarly, the fragmentation of ions provide bond energies for organic, inorganic, and organometallic compounds which allow to understand chemical reactivity and predict particularly reactive species. A key advantage and simultaneously an important drawback is that gas-phase methods determine molecular properties in the absence of any "environment" (e.g. solvents, counter-ions etc.). The measured properties are therefore intrinsic for the species under study. As such they provide profound insight into concepts of chemical bonding and reactivity and allow direct comparison with theory. In turn, however, the intrinsic properties may only poorly correlate with bulk processes in which the environment is an inherent part of chemical reactivity. Consequently, the results obtained in gas-phase measurements need to be "translated" for their use in applied chemistry and several schemes for such conversions have been developed.

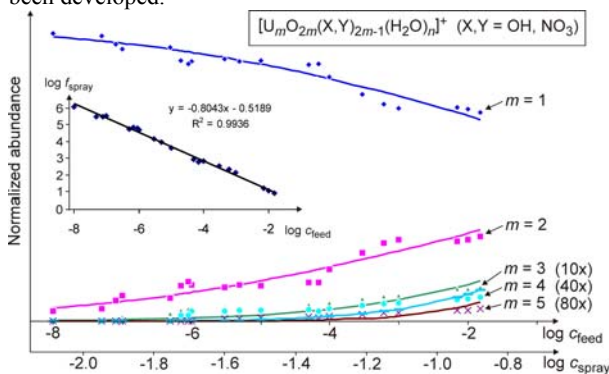


Figure 1. Mono- and oligonuclear uranyl cations observed via MS as a function concentration in solution

The first example of such a "translation" concerns solutions of uranyl nitrate in water⁶. While seemingly trivial,

the amount of oligonuclear uranyl species sampled via MS using electrospray ionization (ESI) increases with the concentration of the uranyl salt. For this system, we could establish a quantitative correlation between the gas-phase data and results from solution chemistry (Fig. 1), thereby allowing a direct connection between the situation in the gas phase and in the bulk.

The second example deals with chemical reactivity⁷. Under anaerobic conditions, Cu(I) can bring about a twofold C–S coupling of bisiminodisulfides in almost quantitative yield ($1 \rightarrow 2 + 3$; Fig. 2). ESI of the reaction solution yields an abundant signal of the copper(I) complex (1)Cu⁺. When this species is mass selected and heated by collisions with helium, it loses the neutral C–S coupling product **2** to afford the second C–S coupling as Cu(I) complex, (3)Cu⁺. The results demonstrate that the catalytic sequence can occur in the presence of a single copper atom and that no higher-order aggregates are required for a mechanistic rationale.

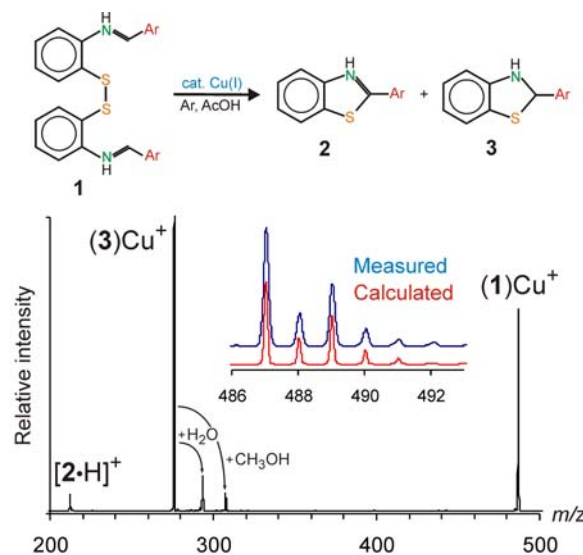


Figure 2. Cu(I)-mediated C–S coupling in solution and in the gas phase. The inset shows the measured and the modeled isotope cluster of the ion (1)Cu⁺

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z40550506) and the European Research Council (AdG HORIZOMS).

REFERENCES

1. Becker J. S., Jakubowski N.: *Chem. Soc. Rev.* 38, 1969 (2009).
2. Gross J. H.: *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2004.
3. James P.: *Quart. Rev. Biophys.* 30, 279 (1997).
4. Spáňel P., Smith D.: *Mass Spectrom. Rev.* 24, 661 (2005).
5. Hemmersbach P.: *J. Mass Spectrom.* 43, 839 (2008).
6. Tšierkezos N. G., Roithová J., Schröder D., Ončák M., Slaviček P.: *Inorg. Chem.* 48, 6287 (2009).
7. Šrogl J., Hyvl J., Révész A., Schröder, D.: *Chem. Commun.* 3463 (2009).

KOORDINAČNÍ CHEMIE A KATALYTICKÉ VYUŽITÍ HOMOLOGICKÝCH PYRIDYLFOSFINOFERROCENOVÝCH LIGANDŮ

PETR ŠTĚPNIČKA^{a,*}, JIŘÍ SCHULZ^a, THORSTEN KLEMMANN^b, ULRICH SIEMELING^b a IVANA CÍSAŘOVÁ^a

^aUniverzita Karlova, PŘF, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2; ^bUniversität Kassel, Heinrich-Plett-Strasse 40, D-34132 Kassel
stepnic@natur.cuni.cz, schulz@natur.cuni.cz

Bifunkční P^{III},N-donorové ligandy patří do skupiny takzvaných hemilabilních donorů¹. Díky možnosti koordinace k atomu kovu prostřednictvím měkkého (P^{III}) i tvrdého (N) donorového atomu a tvorbě nesymetrických chelátových komplexů nalezly tyto látky široké uplatnění v organické katalýze^{2,3}. Hemilabilní koordinace jednoho z donorových atomů ligandu umožňuje zároveň uvolnit koordinační místo pro přistupující substrát i stabilizaci katalyzátoru v průběhu katalytického cyklu.

Významnou pozici mezi P^{III},N-hemilabilními donory zaujímají pyridyl-fosfinové ligandy^{4,5}, které se vyznačují zajímavými elektronickými i sterickými vlastnostmi, jež lze cíleně modifikovat změnou povahy substituentů. Pro tento účel může být výhodným substituentem ferrocenové jádro, které vyniká velkou elektronovou bohatostí a dobře definovanou geometrií.

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli studovat dva homologické pyridyl-fosfinoferrocenové ligandy **1** (cit.⁶) a **2**, jejich koordinační chemii vůči palladiu a katalytické využití v palladiem katalyzované Suzukiho-Miyaurově reakci a kyanačních reakcích arylbromidů.

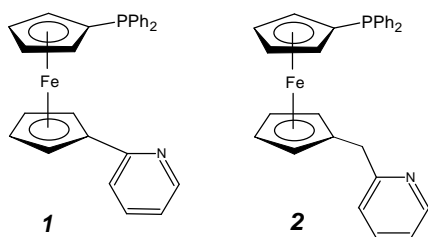


Schéma 1. Připravené pyridyl-fosfinoferrocenové ligandy

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/10/0176.

LITERATURA

1. Bader A., Lindner E.: *Coord. Chem. Rev.* 108, 27 (1991).
2. Guiry P. J., Saunders C. P.: *Adv. Synth. Catal.* 346, 497 (2004).
3. Maggini S.: *Coord. Chem. Rev.* 253, 1793 (2009).
4. Newkome G.R.: *Chem. Rev.* 93, 2067 (1993).
5. Chelucci G., Orrù G., Pinna G. A.: *Tetrahedron* 59, 9471 (2003).
6. Butler I. R.: *Organometallics* 11, 74 (1992).

FUNKČNÍ ANALÝZA TEPLOTNĚ ZÁVISLÝCH MUTANTŮ P53

JANA SLOVÁČKOVÁ^{a,b}, DIANA GROCHOVÁ^a, JARMILA NAVRÁTILOVÁ^b, JAN ŠMARDA^b a JANA ŠMARDOVÁ^{a,b}

^aLaboratoř molekulární biologie ÚPA FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno; ^bÚstav exp. biologie, Biologická sekce, PŘF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
jana.slovackova@gmail.com

Nádorový supresor p53 hraje důležitou roli v kancerogenezi. V odpovědi na různé stresové signály transkripční faktor p53 kontroluje důležité buněčné funkce tím, že ovlivňuje expresi svých cílových genů. Reguluje apoptózu, buněčný cyklus a genomovou integritu. U nádorů je ztráta funkce p53 velmi často způsobena mutací genu *p53*. Přibližně 10 % mutantů p53 je teplotně závislých, tzn. změnou teploty dochází k obnově jejich funkce. Tyto mutace mohou měnit nejenom celkovou transaktivační schopnost proteinu p53, ale také modifikovat transaktivační schopnost ve vztahu k jednotlivým cílovým genům (tzv. diskriminativní charakter).

Studovali jsme funkční vlastnosti 23 teplotně závislých (td) mutantů p53 (podrobně analyzovaných v kvasinkách¹) v lidské nádorové linii H1299 odvozené z nemalobuněčného plicního karcinomu. Sledovali jsme transaktivaci několika cílových genů p53 a potvrdili teplotní závislost a výrazný diskriminativní charakter u 20 mutantů, kteří preferenčně transaktivovali *p21* spíše než *bax*. Podle transaktivačních schopností jsme td mutanty p53 rozdělili do 4 funkčních skupin. Obecně lze říct, že celková transaktivační aktivita mutantů nepřevyšuje aktivitu standardní varianty p53, ačkoli míra transaktivace určitých cílových genů u některých mutantů v permissivní teplotě může být výrazně vyšší.

Td mutace p53 jsou snadněji reaktivovatelné než mutace zcela inaktivní¹⁻³. Obnovení funkce p53 může být vyvoláno například inhibitorem CDK roskovitinem. Ačkoli mechanismus účinku není zcela znám, pozorovali jsme u některých td mutantů p53 zřetelně zesílenou apoptotickou odpověď po působení roskovitinu jak v permissivní, tak i restriktivní teplotě. Funkční status p53 pravděpodobně ovlivňuje míru odpovědi nádorových buněk na roskovitin, slibnou protinádorovou látku, která v současné době podstupuje druhou fázi klinického testování.

Tato práce vznikla za podpory grantů NS/10448-3 IGA MZ a MŠMT 0021622415.

LITERATURA:

1. Grochová D., Vaňková J., Damborský J., Ravčuková B., Šmarda J., Vojtěšek B., Šmardová J.: *Oncogene* 27, 1243 (2008).
2. Boeckler F.M., Joerger A.C., Jaggi G., Rutherford T.J., Veprintsev D.B., Fersht A.R.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 10360 (2008).
3. North S., Pluquet O., Maurici D., El-Ghissassi F., Hainaut P.: *Mol. Carcinog.* 33, 181 (2002).

MATRICE HEMOGLOBINAS KLÍŠTĚČÍHO STŘEVA**DANIEL SOJKA^a, MARTIN HORN^b, ZDENĚK FRANTA^a, HELENA PĚNIČKOVÁ^a, PETR FRANTA^a, MICHAEL MAREŠ^b a PETR KOPÁČEK^a**^aParazitologický ústav BC AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^bÚstav organické chemie a biochemie AVČR, Flemmingovo náměstí 2, 166 10 Praha sojkadan@gmail.com

Příjem a trávení hostitelské krve je klíčovým dějem v životním cyklu krevsajících parazitů. U klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) se tento děj odehrává ve střevě, které je zároveň primární branou přenosu patogenů. Klíště patří mezi roztoče (Acari) a narozdíl od krevsajícího hmyzu tráví hemoglobin uvnitř buněk střevního epitelu. Hydrolyza není zprostředkována serinovými peptidasy a odehrává se v endo-lysozomech buněk střeva. Kombinací genetického (cDNA, PCR) a biochemického profilingu střevního epitelu sajících samic (specifické inhibitory a substráty, imaging pomocí activity based probes) se nám podařilo demonstrovat, že toto trávení je zprostředkováno maticí peptidas – orthologů enzymatických komplexů popsaných u nematod a platyhelminthů. Tento evolučně konzervovaný komplex zahrnuje cysteinové peptidasy papainového typu (cathepsin B, L, C – IrCB1, IrCL1, IrCC1) asparaginylovou endopeptidasu (IrAE1) a aspartovou peptidasu cathepsin D typu (IrCD1). Peptidasy jsou exprimovány při sání samic a degradují hemoglobin v kyselém pH. Selektivní inhibitory byly použity k určení rolí individuálních enzymů a společně s hmotnostní spektrometrií k sestavení štěpné mapy hemoglobinu s vyznačením míst štěpení jednotlivých enzymů ve třech časových intervalech. Tři primární endopeptidasy IrCD1, IrCL1 a IrAE1 byly exprimovány jako rekombinantní fúzní proteiny. Byly proti nim připraveny protilátky a testovány jejich potenciál jako anti-klíštěcí vakcíny. Aktivní enzymy byly biochemicky charakterizovány a byla studována jejich substrátová specifita pomocí knihoven fluorescenčních substrátů (P1- P4 positional screening library). Pomocí expresních profilů na úrovni mRNA, proteinů i aktivity, imunohistochemie a RNAi je studována jejich funkce *in-vivo* s možností zavést nové nástroje ke kontrole klíšťat a jimi přenášených patogenů.

Tato práce vznikla za podpory grantů IAA600960910 (GA AV), KJB600960911 (GA AV) a výzkumného centra LC06009 (MŠMT ČR).

STREPTAVIDIN - PROTILÁTKA NOVÝ FLEXIBILNÍ ZPŮSOB DOPRAVY ANTIGENŮ NEBO BIOLOGICKY AKTIVNÍCH MOLEKUL**ONDŘEJ STANĚK^a, HUI DONG^{b,c,d}, LALEH MAJLESSI^{b,c}, IRENA LINHARTOVÁ^a, CLAUDE LECLERC^{b,c} a PETER ŠEBO^a**^aMikrobiologický ústav AV ČR, Vítězská 1083, 142 20 Praha 4; ^bUnité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie,^cInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale U883, 75724 Paris Cedex 15, France; ^dJiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, 225009 Yangzhou, Jiangsu, China

Pro řadu diagnostických a vakcinačních aplikací je důležité dokázat specificky stimulovat imunitní odpověď T lymfocytů proti vybraným antigenům. K tomu je zapotřebí moci dopravovat cíleně příslušné antigeny do endosomu nebo cytosolu profesionálních antigen prezentujících buněk, především dendritických buněk (DB), jež mají aparát pro zpracování antigenů a prezentaci jejich fragmentů na svém buněčném povrchu, v komplexu s MHC glykoproteiny I. a II. třídy.

V této práci jsme vyvinuli nový systém pro dopravu antigenů do dendritických buněk. Je založen na kombinaci směřujících biotinylovaných protilátek, rozeznávajících specifické buněčné receptory a proteinových fúzí antigenů s tetramerním streptavidinem, vázícím s vysokou afinitou biotin.

Na streptavidin byly geneticky připojeny různé antigeny a to jak na N-, tak i na C-konec, případně na oba konce zároveň tak, aby byla zachována schopnost streptavidinu tvořit tetramery. Takto upravené proteiny byly produkovány v bakteriálních buňkách *E. coli* DE3 Artic Express, izolovány z cytosolického extraktu, případně z 2 M močovinného extraktu (precipitát v cytosolu) a tetramerní komplexy byly následně odděleny od monomerů a dalších nečistot pomocí afinitní chromatografie na Iminobiotin agarose.

Pro přímé zacílení antigen presentujících buněk byly použity různé biotinylované protilátky proti povrchovým receptorům, například DEC 205, CD11c a CD 206.

Jako modelový antigen jsme použili kuřecí Ovalbumin, jehož epitopy pro prezentaci na MHC I a MHC II molekulách byly geneticky připojeny na oba konce streptavidinu. Tetramerní komplexy streptavidinu, nesoucí tyto epitopy, byly použity k dopravě antigenu do primárních myších dendritických buněk *in vitro* a *in vivo* buňky pomocí protilátek proti povrchovým receptorům CD11c a CD 206 (manosový receptor). Epitopy byly vystavovány nejen s molekulami MHC II, ale i v komplexu s molekulami MHC I. Již při velmi nízkých koncentracích tetrametru (0,1–1 nM) se projevila výhoda cíleného směřování antigenů. Naše výsledky byly ověřeny na myším modelu s mykobakteriálními antigeny¹.

Tato práce vznikla za podpory grantů KAN200520702 a NPVII 2B06161

LITERATURA

1. Dong H., Stanek O., Langër U., Ung C., Degaiiffier N., Sebo P., Leclerc C., Majlessi L.: EP 09 290 987.8, application filed on December 23, 2009.

MUTACE NÁDOROVÉHO SUPRESORU P53 JSOU NEGATIVNÍM PROGNOSTICKÝM ZNAKEM U LYMFOMU Z BUNĚK PLÁŠŤOVÉ ZÓNY

LENKA ŠTEFANČÍKOVÁ^{a,b}, MOJMÍR MOULIS^{a,c},
PAVEL FABIAN^d, BARBORA RAVČUKOVÁ^a,
INGRID VÁŠOVÁ^c, JAN MUŽÍK^f, JITKA
MALČÍKOVÁ^e a JANA ŠMARDOVÁ^{a,b,c}

^aÚstav patologie a ^eInterní hemat. klinika, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, ^bÚstav exp. biologie, PŘF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^cLF MU a ^fIBA, Komenského 2, 662 43 Brno, ^dOddělení patologie, MOÚ, Žlutý kopec 7, 565 53 Brno
stefancikoval@seznam.cz

Lymfom z buněk pláštěvé zóny (Mantle cell lymphoma, MCL) je vzácným, ale velmi agresivním typem nádorového onemocnění lymfatických uzlin. Pro MCL je charakteristická přítomnost translokace t(11;14)(q13;q32), která způsobuje vysokou expresi cyklinu D1 a tím deregulaci buněčného cyklu. Aktivace cyklinu D, využívaná i diagnosticky, hraje klíčovou roli v rozvoji MCL, ale pro progresi onemocnění jsou nezbytné ještě další aberace¹. Mezi nimi se jako prognosticky významné ukázaly ty, které pozměňují geny pro regulátory buněčné odpovědi na poškození DNA.

V naší práci jsme se zabývali podrobnou analýzou p53, nádorového supresoru, který hraje důležitou roli při udržování genomové integrity somatických buněk. V reakci na poškození DNA způsobuje, prostřednictvím aktivace cílových genů, zástavu buněčného cyklu, opravy DNA, senescenci či apoptózu.

V souboru 33 pacientů s MCL jsme pomocí funkční analýzy v kvasinkách² a následného sekvenování cDNA detekovali 9 mutací genu p53. V osmi případech šlo o jednonukleotidovou záměnu, v jednom o delecii, která způsobila posun čtecího rámce a vytvoření předčasného stop kodonu. Delecii jsme potvrdili také sekvenováním gDNA a zjistili jsme, že vede k degradaci příslušné mRNA. V buňkách s mutací genu p53 dochází obvykle k akumulaci proteinu p53. Tu jsme pomocí westernova přenosu prokázali u všech případů MCL s jednonukleotidovou záměnou v genu p53. Ztrátu lokusu 17p13.3 specifického pro p53 jsme pozorovali s využitím metody FISH u 3 pacientů s mutací p53. Statistickou analýzou jsme prokázali, že přítomnost mutace p53 výrazně zkracuje délku přežívání pacientů s MCL. Ztráta funkce p53 je u MCL nezávislým negativním prognostickým faktorem³.

Práce byla podpořena IGA MZ NR/9305-3, MŠMT 0021622415 a GAČR 204/08/H054.

LITERATURA:

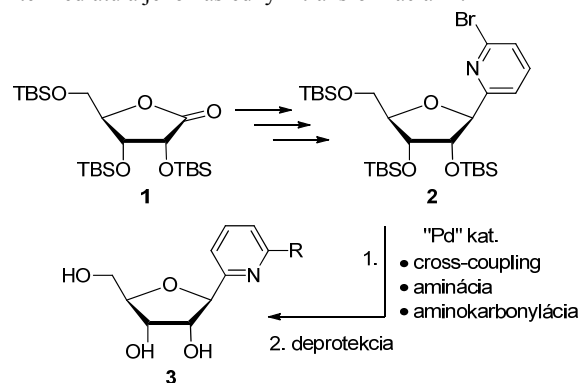
1. Pileri S.A., Falini B.: *Haematologica* 94, 1488 (2009).
2. Flaman J.M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Chappuis P., Sappino A.P., Limacher J.M., Bron L., Benhattar J., Tada M., Van Meir E.G., Estreicher A., Iggo R.D.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 3963 (1995).
3. Stefancikova L., Moulis M., Fabian P., Ravcukova B., Vasova I., Muzik J., Malcikova J., Falkova I., Slovackova J., Smardova J.: *Int. J. Oncol.* 36, 699 (2010).

MODULÁRNA SYNTÉZA 6-SUBSTITUOVANÝCH PYRIDÍN-2-YL C-RIBONUKLEOZIDOV

MARTIN ŠTEFKO^a a MICHAL HOCEK^{a*}

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Gilead Sciences & UOCHB Výzkumné Centrum, CZ-166 10 Praha 6
stefko@uochb.cas.cz, hocek@uochb.cas.cz

C-Nukleozidy představují potencionálně zajímavou skupinu látek charakterizovanou nahrazením labilnej C-N vazby, chemicky a enzymaticky stabilnější C-C vazbou. Súčasný syntetický přístup sa vo väčšine prípadov vyznačujú nedostatčnou anomerickou selektivitou, nízkymi výťažkami a nutnosťou optimalizovať syntézu každého nového C-nukleozidu¹. Z uvedených dôvodov sa v súčasnej dobe zaoberáme vývojom modulárnej syntézy, založenej na príprave multigramového množstva univerzálneho intermediátu a jeho následným transformáciam².



Adícia 6-brómopyridínliťia na TBS-chránený ribonolaktón **1** a následná *in situ* acylácia príslušného hemiketál alkoxidu poskytla acetál, ktorého redukciovou sa získal 6-brómopyridín-2-yl C-ribonukleozid **2** v 63% celkovom výťažku. Tento bol následne podrobený sériam paládium katalyzovaných aminácií, aminokarbonylácií a cross-coupling reakcií, ktoré po štiepení chrániacich funkčných skupín poskytli sériu voľných 1β-(6-alkyl-, 6-aryl-, 6-amino-, 6-karbamoyl- a 6-hetaryl-pyridín)-C-ribonukleozidov **3** (cit.^{2e}).

Táto práca je súčasťou výskumného projektu Z4 055 905, podporovaná centrom pre biomolekuly a komplexné molekulárne systémy (LC 512), Grantovou agentúrou AVČR (IAA400550902) a Gilead science, Inc. (Foster City, CA).

LITERATURA

1. Štambaský J., Hocek M., Kočovský P.: *Chem. Rev.* 109, 6729 (2009).
2. (a) Urban M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M. J. *Org. Chem.* 71, 7322 (2006); (b) Joubert N., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: *J. Org. Chem.* 72, 6797 (2007); (c) Štefko M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 1689; (d) Štefko M., Pohl R., Hocek M.: *Tetrahedron* 65, 4471 (2009); (e) Štefko M., Slavětinská L., Klepetářová B., Hocek M.: *J. Org. Chem.* 75, 442 (2010).

**STRUKTURA A FUNKCE
HALOGENALKANDEHALOGENAS
V ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDLECH**

**VERONIKA ŠTĚPÁNKOVÁ^a, RADKA
CHALOUPKOVÁ^a, MORTEZA KHABIRI^b, BABAK
MINOFAR^b, ZBYNĚK PROKOP^a, RÜDIGER
ETTRICH^b a JIŘÍ DAMBORSKÝ^a**

^aLoschmidtovy laboratoře, Masarykova univerzita, Kamenice
5/A4, 625 00 Brno, ^bÚstav systémové biologie a ekologie AV
ČR, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky
veronika@chemi.muni.cz

Enzymová katalýza v nekonvenčních solventech, představuje velmi zajímavou oblast enzymologie. Převedení biotransformací z vodného prostředí do organických rozpouštědel přineslo řadu výhod a zvýšilo tak efektivitu využití enzymů v řadě průmyslových aplikací¹. Přesto je mechanismus působení solventů na funkci enzymů stále málo známý a jejich vliv na aktivitu nelze předem odhadnout.

Cílem našeho projektu je pochopit a vysvětlit chování tří hydrolytických enzymů halogenalkandehalogenas (LinB ze *Sphingobium japonicum* UT26, DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064 a DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* USDA110) v prostředí organických rozpouštědel. Získané znalosti jsou důležité pro zvýšení aplikačního potenciálu studovaných enzymů. Testován byl vliv třinácti s vodou mísitelných organických rozpouštědel na aktivitu a stabilitu halogenalkandehalogenas. Přestože jsme studovali příbuzné enzymy, jejich tolerance k organickým rozpouštědlům byla různá. Halogenalkandehalogenasy DhaA a DbjA vykazovaly funkční stabilitu vůči většině testovaných rozpouštědel. V případě DbjA byl dokonce s několika substráty detegován nárůst aktivity. Naopak u LinB byla pozorována převážně inaktivace. V návaznosti na aktivitní měření byla provedena strukturální charakterizace enzymů v koncentracích organických rozpouštědel způsobujících úplnou inhibici. Použity byly metody cirkulárního dichroismu a fluorescenční spektroskopie. V několika případech zůstala struktura enzymů nezměněna, přestože byla v dané koncentraci solventu pozorována ztráta funkce.

Pro studium vlivu rozpouštědel na enzymy na atomární úrovni jsme použili molekulárně dynamické simulace ukazující změny ve struktuře enzymů a jejich interakce s molekulami solventu. Modelování odhalilo přímou souvislost mezi snahou molekul rozpouštědla penetrovat do aktivního místa s jeho inhibičním účinkem. Zatímco větší počet molekul v aktivním místě vedlo k inhibici, přítomnost jedné izolované molekuly pravděpodobně enzym aktivizuje. Tento předpoklad bude ověřen inhibičním kinetickým měřením v přítomnosti vybraných organických solventů.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů GA ČR 203/08/0114, GA AV IAA401630901 a GA MŠMT LC06010 a MSM0021622412.

LITERATURA

1. Klibanov A. M.: Nature 409, 241 (2001).

**VÝPOČETNÍ STUDIE CUCURBIT[N]JURILŮ
A KOMPLEXŮ PSEUDOROTAXANŮ**

**ZORA STŘELCOVÁ^a, PETR KULHÁNEK^a,
VLADIMÍR ŠINDELÁŘ^b a JAROSLAV KOČA^a**

^aNárodní centrum pro výzkum biomolekul; ^bÚstav chemie
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2,
612 35 Brno
stre@chemi.muni.cz

Výzkum v oblasti nanomolekul, jejich využití v lékařství, průmyslu i chemické výrobě patří k předním chemickým oborům současnosti. Ve své práci jsme se zaměřili na studium homologní řady cucurbit[n]jurilů ($n=5-10$). Jedná se o makrocyclické sloučeniny, schopné komplexovat ionty, malé organické molekuly i polypeptidy. Takto vzniklé komplexy, v nichž je lineární molekula provléknuta přes makrocycklus a celá struktura je termodynamicky stabilní, se nazývají pseudorotaxany.

Naše studie nabízí komplexní pohled na dynamické strukturální a vazebné vlastnosti cucurbit[n]jurilů. Do výpočetně-chemických simulací byl zahrnut i cucurbit[9]juril, jenž zatím nebyl izolován. V analýze získaných molekulově dynamických simulací jsme se zaměřili na strukturální vlastnosti - deformace cyklu v závislosti na počtu jednotek - a jeho flexibilitu. Pokročilé analýzy pak umožnily popis chování rozpouštědla v okolí cucurbit[n]jurilu. S využitím metod potenciálu střední síly, umožňující výpočet volné energie, jsme dále vyhodnotili energetické bariéry pro pohyb molekul vody v kavitě cucurbit[n]jurilu.

Získané výsledky byly dále použity při popisu vlastností pseudorotaxanů založených na cucurbit[n]jurilu a derivátech 4,4'-bipyridinu. V rámci experimentálních studií, bylo prokázáno, že takovéto komplexy, v nichž lineární molekula obsahuje dvě terminální COOH skupiny, prokazují různé konformační chování v závislosti na pH. Cyklická molekula se tak pohybuje kolem molekuly lineární a v důsledku toho lze tyto sloučeniny považovat za supramolekulární přepínače^{1,2}. Ve své práci jsme rozšířili experimentální studie o vyhodnocení profilů volných energií zmíněných intermolekulárních posunů a umožnili přesnější popis celého procesu na atomové úrovni.

Práce byla podpořena následujícími granty: MŠMT LC06030, MSM0021622413, GAČR: 301/09/H004.

LITERATURA:

1. Sindelar V., Silvi S., Kaifer A. E.: Chem. Commun. 2006, 2185.
2. Sindelar V., Silvi S., Parker S. E., Sobransingh D., Kaifer A. E.: Adv. Funct. Mater. 17, 694 (2007).

NOVÝ MAKROCYKLUS PRO SELEKTIVNÍ VÁZÁNÍ ANIONTŮ

JAN ŠVEC a VLADIMÍR ŠINDELÁŘ*

Ústav chemie, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
sindelar@chemi.muni.cz

Glykoluril je molekula používaná pro přípravu molekulárních klips a makrocyclických sloučenin^{1,2}. Hlavní pozornost je věnována makrocyclické sloučenině cucurbit[n]urilu připravené reakcí glykolurilu s formaldehydem. Cucurbit[n]uril váže interně i externě kationy³. Značné omezení při použití cucurbit[n]urilu však představuje jeho nerozpustnost v organických rozpouštědlech a pouze omezená rozpustnost ve vodném prostředí⁴. V naší práci představujeme syntézu a supramolekulární vlastnosti nového makrocyklu, který byl připraven z modifikovaného glykolurilu reakcí s formaldehydem. Na rozdíl od cucurbit[6]urilu má námi připravený makrocyklus výrazně větší objem kavity, má méně rigidní strukturu a je velice dobře rozpustný ve vybraných organických rozpouštědlech. Parciální kladný náboj v centrální části vnitřní kavity makrocyklu umožňuje interní vázání aniontů. Halogenidy jsou v makrocyklu vázány se stoupající afinitou v pořadí $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$. Vzhledem k těmto vlastnostem je nový makrocyklus testován pro řadu potencionálních aplikací.

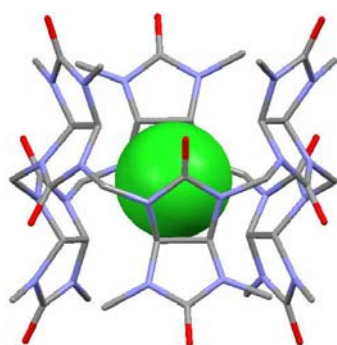


Schéma 1. Nový makrocyklus s interně vázaným Cl^-

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/10/0695.

LITERATURA

- Rowan A., Elemans J., Nolte R.: *Acc. Chem. Res.* 32, 995 (1999).
- Lagona J., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., Isaacs L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4844 (2005).
- Liu S., Ruspic Ch., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., Zavalij P. Y., Isaacs L.: *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15959 (2005).
- Lee J. W., Samal S., Selvapalam N., Kim H. J., Kim K.: *Acc. Chem. Res.* 36, 621 (2003).

APLIKACE FOSFINOFERROCENOVÝCH AMIDŮ ODVOZENÝCH OD AMINOKYSELIN JAKO LIGANDŮ V ENANTIOSELEKTIVNÍ KONJUGOVANÉ ADICI

JIŘÍ TAUCHMAN a PETR ŠTĚPNIČKA

Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2
tauchman@natur.cuni.cz

Organokovové sloučeniny se staly základními materiály moderní organické syntézy a dnes si jen těžko můžeme představit některou totální syntézu bez klíčového kroku zahrnujícího nukleofilní organokovové činidlo. Mezi nejrozšířenější syntetické metody pro tvorbu C–C vazby patří mědi katalyzovaná konjugovaná adice organokovových látek na α,β -nenasycené karbonylové sloučeniny^{1,2}. Použití chirálního komplexu mědi za využití především organozinečnatých nebo Grignardových činidel umožňuje provést katalytickou enantioselektivní verzi této reakce.

Nové chirální fosfinoferrocenové amidy nesoucí aminokyselinové pendantní skupiny prezentované v této práci (schéma 1) navazují na předchozí úspěšné využití podobných ligandů v katalýze a koordinační chemii³⁻⁵. Porovnání strukturálních a katalytických vlastností takových hybridních ligandů umožní zhodnotit vliv jednotlivých molekulárních částí na průběh katalytických reakcí.

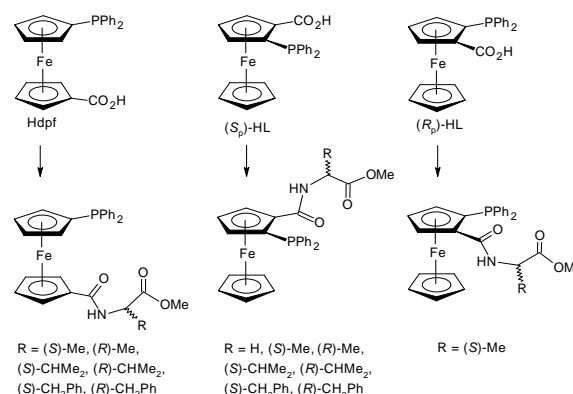


Schéma 1.

Tato práce vznikla za podpory GA UK (projekt č. 58009) a grantu MŠMT ČR LC06070.

LITERATURA

- Harutyunyan S. R., den Hartog T., Geurts K., Minnaard A. J., Feringa B. L.: *Chem. Rev.* 108, 2824 (2008).
- Jerphagnon T., Pizzuti M. G., Minnaard A. J., Feringa B. L.: *Chem. Soc. Rev.* 38, 1039 (2009).
- Lamač M., Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: *Organometallics* 26, 5042 (2007).
- Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: *New J. Chem.* 33, 1549 (2009).
- Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: *Organometallics* 28, 3288 (2009).

ANALÝZA SEKVENČNÍCH ZMĚN V LDLR GENU: OD MUTACÍ K ROZSÁHLÝM PŘESTAVBÁM A ZPĚT

LUKÁŠ TICHÝ, LUCIE DUŠKOVÁ, PETRA ZAPLETALOVÁ, LENKA KOPEČKOVÁ, ONDŘEJ LETOCHA a LENKA FAJKUSOVÁ

*Fakultní nemocnice Brno, Centrum molekulární biologie a genové terapie, Černopolní 9, 613 00 Brno
ltichy@fnbrno*

Mutace a přestavby v genu pro LDL receptor (*LDLR*) jsou příčinou familiární hypercholesterolemie (FH). FH je autosomálně dominantní dědičné onemocnění charakterizované izolovaným zvýšením LDL cholesterolu v krvi pacientů. Dlouhodobě zvýšená hladina LDL cholesterolu v krvi je stěžejním krokem v patofyziologických mechanismech vedoucích k ateroskleróze. Frekvence heterozygotů je 1/500, frekvence homozygotů nebo složených heterozygotů je udávána 1/1000000.

Gen pro LDL receptor je složen z 18 exonů rozložených do 45 kb (chrom. 19p13 (cit.¹), mRNA 5,3 kb (cit.²)). Do dnešního dne je popsáno více jak 1000 sekvenčních variant³ tohoto genu.

V rámci projektu MEDPED⁴ se výraznou měrou podílíme na vyhledávání pacientů, s mutací v genu *LDLR*. Celkem bylo v naší populaci nalezeno 75 typů kauzálních sekvenčních změn (z toho 18 dosud ve světě nepopsaných) a 9 typů rozsáhlých intragenových přestaveb. U jednotlivých intragenových přestaveb byly detailně charakterizovány body zlomu a stanoven mechanismus jejich vzniku. V souboru našich pacientů byly jako mechanismy vzniku rozsáhlých delecí/duplikací identifikovány nealelická homologní rekombinace a nehomologní spojování konců. Druhý jmenovaný mechanismus nebyl u genu *LDLR* popsán. Celkově bylo dosud analyzováno 1172 probandů, přičemž u 453 byla nalezena kauzální sekvenční změna, u 719 pacientů nalezena nebyla.

V minulých letech byla DNA analýza genu *LDLR* založena na přímé sekvenční analýze jednotlivých exonů. Tímto metodickým přístupem byly detegovány jednonukleotidové záměny, malé delece, inserce a duplikace. Pro analýzu rozsáhlých přestaveb byla zavedena metoda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

Vzhledem k velkému množství analýz byla v roce 2009 molekulárně genetická analýza genu *LDLR* modifikována a ve spolupráci se společností Asper Biotech Ltd. byl vyvinut čip založený na technologii APEX (Arrayed Primer Extension). Tento čip umožňuje detekci 75 mutací v genu *LDLR* vyskytujících se v české populaci a 75 mutací vyskytujících se s větší frekvencí v dalších světových populacích.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT LC06023 a 2B08060.

LITERATURA

1. Südhof T. C., Goldstein J. L., Brown M. S., Russell D. W.: *Science* 228, 815 (1985).
2. Yamamoto T., Davis C. G., Brown M. S., Schneider W. J., Casey M. L., Goldstein J. L., Russell D. W.: *Cell* 39, 27 (1984).
3. Fokkema I. F. A. C., Den Dunnen J. T., Taschner P. E. M.: *Hum Mutat.* 26, 63 (2005).
4. <http://www.athero.cz/projekt-medped/projekt-medped.html>, staženo 29.1.2010.

NOVÁ DIASTEREOSELEKTIVNÁ SYNTÉZA FENYLINDOLIZIDINOLŮV

EVA TÓTHOVÁ*, ŠTEFAN MARCHALÍN, PETER ŠAFAŘ a JOZEFÍNA ŽÚŽIOVÁ

*Oddelenie organickej chémie, Ústav organickej chémie, katalýzy a petrochémie, FCHPT, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
euka.tothova@gmail.com*

Indolizidínový skelet je súčasťou veľkého počtu prírodných zlúčenín, nachádzajúcich sa v rastlinnej a živočíšnej ríši, vykazujúcich široké spektrum biologickej aktivity. Medzi uvedenými zlúčeninami najvýznamnejšiu skupinu predstavujú polyhydroxyindolizidíny, z ktorých niektoré sú veľmi účinnými inhibítormi bunkových glykozidáz¹. Z prírodných polyhydroxyindolizidínových alkaloidov patria medzi najznámejšie kastanospermín, swainsonín a lentiginosín. Z uvedených zlúčenín je swainsonín prvým inhibítorm glykoproteinového typu úspešne vyselektovaným ako potenciálny liek proti rakovine. Nepriaznivý vplyv na centrálnu nervovú sústavu a vysoké náklady na jeho syntézu však v súčasnosti obmedzujú jeho praktické využitie^{2,3}. Pozornosť sa preto sústreďuje na analógy týchto alkaloidov s ekonomicky výhodnou syntézou a zároveň bez vedľajších účinkov.

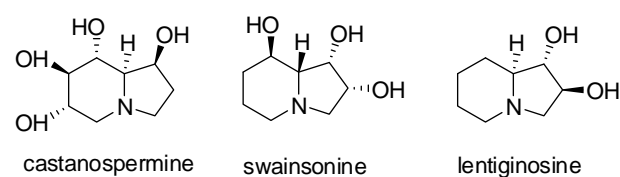


Schéma 1. Prírodné polyhydroxylované indolizidíny

Pretože štúdium vzťahu medzi štruktúrou a biologickou aktivitou nie je u vyššie spomenutých prírodných látok ukončené, syntéza nových analógov týchto zlúčenín stereodivergentnými metódami zostáva aktuálnou výzvou pre organických chemikov. Biologická aktivita týchto derivátov sa výraznejšie mení prevažne v závislosti od počtu, polohy a stereochemie hydroxylových skupín na indolizidínovom skelete.

Náš syntetický prístup k substituovaným indolizidínolom využíva internú asymetrickú indukciu, pričom chiralita sa v molekule indolizidínu derivuje z vhodne

zabudovaného stereogénneho centra z aminokyseliny. Kľúčovým krokom v syntéze cieľových zlúčenín-7-fenyлиндolizidín-8-olov je tandém diastereoselektívnych redukcii benzotieno[2,3-*f*]indolizindiónu: karbonylovej skupiny a tiofénového jadra^{4,5}.

Podarilo sa nám pripraviť analóg tyloforínu v 6-tich krokoch s dobrým celkovým výťažkom (20 %) z lacnej a ľahko dostupnej L-glutámovej kyseliny a benzotiofén-2-karbaldehydu.

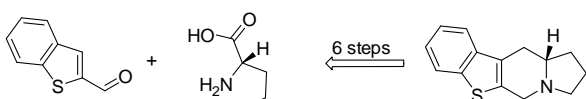


Schéma 2. Nový analóg tyloforínu

Originálna stratégia, založená na desulfurizačnom procese benzotiofénového kruhu ako kľúčového kroku, poskytuje jedinečnú cestu k zavedeniu fenylovej skupiny na indolizínový skelet. Zároveň sa pravdepodobne jedná o najpriamočiarejšiu metódu pre syntézu 7-substituovaných indolizidínolov, ktorá umožňuje efektívny dizajn nových substituovaných indolizidínov. V prvom kroku pravdepodobne dochádza k *cis*-adícii atómov vodíka na dvojité väzbu tiofenu. Zo sterických dôvodov je preferovaná adícia z konvexnej strany molekuly. V prípade *trans*-alkoholu však hydroxy skupina smerujúca na *exo*-stranu molekuly čiastočne bráni prístupu z tejto strany, v dôsledku čoho sa výrazne znižuje selektivita reakcie v porovnaní s *cis*-alkoholom. V ďalšom kroku prebieha redukcia karbonylovej skupiny na hydroxy skupinu.

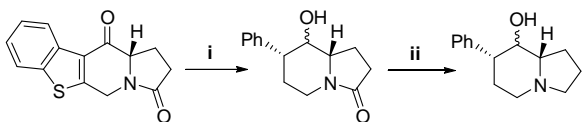


Schéma 3. Nové fenyлиндolizidiny: (i) NaBH₄ resp. L-Selectride, (ii) LAH

Všetky tieto deriváty si zaslúžia širšiu pozornosť, pretože predstavujú potenciálne biologicky aktívne látky, ktoré patria do skupiny prírodných alkaloidov. Zosyntetizované zlúčeniny sa podrobili antimikrobiálnym testom na vybraných druhoch mikroorganizmov. Zistilo sa, že antimikrobiálna aktivita pripravených indolizínových derivátov sa výrazne mení v závislosti od počtu, polohy a stereochemie substituentov na indolizidínovom skelete.

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0210-07 a VEGA MŠ SR 1/0161/08.

LITERATÚRA

1. Winchester B. G.: *Tetrahedron: Asymmetry* 20, 645 (2009).
2. El Nemr A. E.: *Tetrahedron* 56, 8579 (2000).
3. Pyne S. G.: *Curr. Org. Synth.* 2, 39 (2005).
4. Marchalín Š., Žúziová J., Kadlečíková K., Šafář P., Baran P., Dalla V., Daich A.: *Tetrahedron Lett.* 48, 697 (2007).

5. Šafář P., Žúziová J., Marchalín Š., Tóthová E., Prónayová N., Švorc L., Vrabel V., Daich A.: *Tetrahedron: Asymmetry* 20, 626 (2009).

PRODUKCE FEROMONU A JEHO PERCEPCIE U *Anastrephy fraterculus*

LUCIE VANÍČKOVÁ^{a,b}, BLANKA KALINOVÁ^a,
RUTH R. DO NASCIMENTO^c, RADKA BŘÍZOVÁ^b
a MICHAL HOSKOVEC^a

^aInfochemikálie, ÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^bÚstav chemie přírodních látek, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^cInstituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, BR 104 Norte Km 14, 57072-970, Maceió – AL, Brazílie
vanickova@uochb.cas.cz

Anastrepha fraterculus (Diptera; Tephritidae) je jedním z nejvýznamnějších tropických a subtropických škůdců ovocných plodů, podílející se každoročně na rozsáhlých škodách ve světovém zemědělství. Tyto jihoamerické mouchy z čeledi vrtulovitých mají velice složité předkopulační chování, kde významnou roli hrají samci produkované vizuální, chemické a akustické signály. Námluvy zahrnují různé typy pohybů těla, nohou a křídel. Samci se schromažďují v rojích na hostitelských stromech a chovají se teritoriálně. Lákaají samičky vícesložkovým těkavým feromonem. Feromon je produkován slinnými i rektálními žlázami a je posléze uvolňován ústním a řitním otvorem¹. Předchozími analýzami feromonu byly identifikovány dva monoterpeny limonen a β-ocimen, tři izomery seskviterpenu α-farnesenu, seskviterpeny β-bisabolena a α-bergamotenu, kyselina benzoová, nonanal, C₉-alkoholy, laktony anastrephin, epianastrephin a suspensolid, a čtyři alkyl pyraziny^{2,3}.

Naše studie prezentuje analýzu těkavých složek feromonu, pohlavně specifické rozdíly v percepci feromonu a produkci feromonu v závislosti na stáří a cirkadiálním rytmu.

Sexuálně zralí samci laboratorní kolonie *Anastrephy fraterculus* (poskytnuté laboratorně FAO/IAEA, Seiberdorff, Rakousko) byli použiti pro sběr těkavých složek feromonu. Látky byly zachyceny na sorbentu SuperQ, následně vymyty hexanem a analyzovány za použití plynové chromatografie ve spojení s elektroantenografickou detekcí (GC-EAD; kolony WAX a DB-1) a dvourozměrné plynové chromatografie s TOF hmotnostně-spektrometrickou detekcí (GC×GC-TOFMS). Identifikovali jsme u samců i samic šest antenálně aktivních (tj. na tykadlech) sloučenin, jmenovitě (*Z*)-3-nonenol, (*Z,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, geranylacetone, (*E,E*)-α-farnesen, suspensolid a epianastrephin. Pozorovali jsme pohlavně specifické rozdíly v percepci feromonu, samice byly více senzitivní k C₉-alkoholům než samci, citlivost na ostatní antenálně aktivní složky feromonu byla u obou pohlaví srovnatelná. Závislost produkce feromonu na stáří a cirkadiálním rytmu je nyní analyzována.

Naše data prokázala, že obě pohlaví jsou senzitivní k samčímu feromonu, ale samice jsou více senzitivní k (*Z*)-3-nonenolu a (*Z,Z*)-3,6-nonadien-1-olu. To naznačuje, že látky, vnímané stejně oběma pohlavími pravděpodobně mají

agregační funkci, zatímco látky vnímané rozdílně zprostředkují sexuální komunikaci.

Tato práce vznikla za podpory grantu Z405595.

LITERATURA

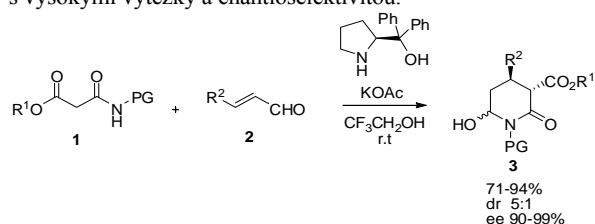
1. Claude W. T.: *J. Insect Physiol.* 53, 1087 (2003).
2. Cáceres C., Segura D. F., Vera M. T., Wornoyaporn V., Cladera J. L., Teal P.; Sapountzis P.; Bourtzis K., Zacharopoulou A., Robinson A. S.: *Bio. J. Lin. Soc.* 97, 152 (2009).
3. Lima I. S., House P. E., R. do Nascimento R.: *J. Braz. Chem. Soc.* 12, 196 (2001).

ENANTIOSELEKTIVNÍ PŘÍPRAVA PIPERIDIN-2-ONŮ POMOCÍ ORGANOKATALÝZY

JIŘÍ SCHIMER a JAN VESELÝ*

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
jxvesely@natur.cuni.cz*

Výzkum nových efektivních reakcí, které umožňují přípravu komplexních molekul ze snadno dostupných výchozích látek je i nadále cílem řady vědeckých pracovišť. Ačkoli je odvětví organické syntézy zvané *organokatalýza* stále ještě ne plně rozvinuté, byly do současnosti publikovány tisíce organokatalytických reakcí¹⁻⁴. Řada z nich se zabývá syntézou cyklických sloučenin obsahujících pouze uhlíkatý skelet či heterocyklických sloučenin obsahujících atomy N, O a S. Nicméně pouze malá pozornost byla věnována přípravě derivátů piperidin-2-onů, které slouží jako běžně používané prekurzory pro syntézu biologicky aktivních látek (polycyklické alkaloidy jako indol[2,3-*a*]chinolizidiny a benz[*a*]chinolizidiny). S ohledem na odbornou literaturu se naše skupina zaměřila na přípravu enantiomerně čistých derivátů piperidin-2-onů⁵. Jak je naznačeno na schématu příslušné deriváty **3** byly připraveny v jednom reakčním kroku s vysokými výtěžky a enantioselektivitou.



Jako příklad aplikace této nové metodiky bude v příspěvku diskutována asymetrickou syntéza antidepresiva (-)-Paroxetin.

Tato práce vznikla za podpory grantů MSM0021620857, GAČR (203/09/P193).

LITERATURA

1. Tietze L. F.: *Chem. Rev.* 1996, 115.
2. Wasilke J. C., Obrey S. J., Baker, R. T., Bazan, G. C.: *Chem. Rev.* 2005, 1001.

3. Berkessel R., Groger H.: *Asymmetric Organocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
4. List B.: *Chem. Rev.* 2007, 5413.
5. Valero G., Schimer J., Císařová I., Veselý J., Moyano A., Rios R.: *Tetrahedron Lett.* 2009, 1943-1946.

EFEKT INHIBITORŮ HISTONOVÝCH DEACETYLAS NA ACETYLACI HISTONŮ, METHYLACI DNA A EXPRESI GENU SMN

EVA ZAPLETALOVÁ^{a,b}, KRISTÝNA STEHLÍKOVÁ^a, MARIAN HLAVNÁ^a a LENKA FAJKUSOVÁ^{a,b}

*^aCentrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno; ^bÚstav experimentální biologie, PřF MU Brno, Kamenice5, 625 00 Brno
ezapletalova@fnbrno.cz*

Spinální svalová atrofie (SMA) je letální autozomálně recesivní neurodegenerativní onemocnění s incidencí cca. 1:5600. Onemocnění je způsobeno defektem v genu *Survival of motor neuron 1 (SMN1)*. Kopie genu *SMN1*, gen *SMN2*, se od *SMN1* liší pouze v 5 jednonukleotidových záměnách. Z genu *SMN2* vzniká pouze asi 10 % funkční mRNA a v závislosti na počtu kopií v genomu působí *SMN2* jako faktor modifikující fenotyp SMA.

V současné době byl prokázán pozitivní efekt léčby SMA pomocí inhibitorů histonových deacetylaz (HDACi). Tyto látky mohou upravit expresi genu *SMN2* ve prospěch většího množství funkčního proteinu SMN. Cílem naší studie bylo analyzovat mechanismy účinku těchto léků pomocí i) studia změn metylačního stavu DNA v promotorové oblasti genu *SMN2*; ii) studia změn acetylace histonů v promotorové oblasti genu *SMN2* a iii) studia změn exprese genu *SMN2* na úrovni mRNA a proteinu po působení inhibitorů histonových deacetylaz (VPA a M344).

U fibroblastových tkáňových linií odvozených od pacientů s SMA bylo po působení VPA a M344 zaznamenáno zvýšení acetylace histonů v promotorové oblasti genu *SMN* průměrně šestinásobně v oblasti okolo 1 kB proti směru transkripce a přibližně dvojnásobně v oblasti okolo 100 pb proti směru transkripce. Po působení HDACi došlo ke snížení metylace promotoru genu *SMN2* přibližně o 6 %. Signifikantní zvýšení exprese genu *SMN2* na úrovni mRNA ani na úrovni proteinu nebylo zaznamenáno.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR LC06023 a MSM0021622415.

LITERATURA

1. Kernochan L.E., Russo M.L., Woodling N.S., Huynh T.N., Avila A.M., Fischbeck K.H., Sumner C.J.: *Hum. Mol. Genet.* 14, 1171 (2005).
2. Riessland M., Brichta L., Hahnen E., Wirth B.: *Hum. Genet.* 120, 101(2006).
3. Hauke J., Riessland M., Lunke S., Eyüpoglu I.Y., Blümcke I., El-Osta A., Wirth B., Hahnen E.: *Hum. Mol. Genet.* 18, 2 (2009).

CHARAKTERIZACE VÝPOTKŮ Z ASEPTICKY SELHÁVAJÍCÍCH TOTÁLNÍCH ENDOPROTÉZ KYČLÍ/KOLEN A JEJICH VLIV NA LIDSKÉ OSTEOLASTY

ADÉLA ZDAŘILOVÁ^{a*}, ALENA RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ^a, JITKA ULRICHOVÁ^a a JIŘÍ GALLO^b

^a Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc; ^b Ortopedická klinika, FN Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
alfa.baba@seznam.cz

Totální endoprotéza (TEP) kolenního/kyčelního kloubu je jednou z nejspěšnějších a neúčinnějších metod k léčbě pokročilých stádií osteoartrózy kloubů. Nejčastějším důvodem selhávání TEP je aseptické uvolnění a periprotetická osteolýza. Oba dva případy souvisí s uvolňováním polyethylenových (PE) částic z implantátu¹. Otěrem vzniklé PE částice jsou fagocytovány okolními buňkami např. makrofágy, fibroblasty, osteoblasty, které poté produkují řadu signálních molekul vedoucích k akumulaci prekurzorů osteoklastů a jejich dozrávání na rozhraní kosti a implantátu. Působení signálních molekul je komplexní, protože současně inhibují indukci, dozrávání a funkci osteoblastů. PE částice zároveň stimulují pseudosynoviální buňky ke zvýšené sekreci výpotku, který roznáší po kloubu PE částice, signální molekuly a proteiny, které se podílí na resorpci kosti. Resorpce kosti v oblasti fixačního rozhraní endoprotézy vede až k aseptickému uvolnění implantátu.

Cílem studie bylo stanovit hladiny vybraných markerů zánětu ve výpotcích odebraných pacientům se selhávající TEP kolen/kyčlí, resp. stanovit vliv těchto výpotků na viabilitu lidských osteoblastů (SaOS-2).

Pacienti byli rozděleni do 4 skupin: I) bez TEP a bez artrózy ($n=2$); II) bez TEP s artrózou ($n=6$); III) s funkčními TEP a minimální osteolýzou ($n=8$) a IV) se selhávajícími TEP a osteolýzou ($n=36$).

Hypotéza: Předpokládali jsme, že kloubní výpotky pacientů skupiny IV budou obsahovat vyšší koncentrace mediátorů zánětu (TNF- α , IL-1 β , IL-6), vyšší hladiny RANKL a nižší hladiny antiosteoklastických molekul (OPG) a budou vykazovat vyšší toxicitu vůči SaSO-2 v porovnání s výpotky z ostatních skupin.

Výsledky: Dle očekávání byla naměřena vyšší hladina OPG ve skupině III ve srovnání se skupinou IV a nižší hladina RANKL ve skupině IV ve srovnání se skupinou III. Naproti tomu největší množství IL-6 bylo ve skupině II nikoli ve skupině IV. Hladiny prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β byly stanoveny pouze ve skupině IV; u ostatních skupin byly hodnoty pod limitem detekce. Většina výpotků ze skupiny IV snižovala viabilitu SaSO-2, ale tento účinek nebyl signifikantní v porovnání s výpotky z ostatních skupin.

Výsledky studie nepoukazují na větší toxické působení výpotků ze selhávajících kloubů na kultury lidských osteoblastů.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠM 6198959216.



SIGMA-ALDRICH

REJSTŘÍK AUTORŮ

| | | | |
|------------------------|--------------------|-----------------------------|----------|
| Adriaenssens, Louis | 381 | Koledová, Zuzana | 371 |
| Aimová, Dagmar | 376 | Kollár, Peter | 367 |
| Antolíkovi, Emília | 363 | Komárek, Jan | 368 |
| Arlt, Volker M. | 374, 376 | Konvičková, Jitka | 366 |
| Babušíková, Eva | 371 | Kopáček, Petr | 366, 384 |
| Baranovičová, Lenka | 363 | Kopečková, Lenka | 388 |
| Bartoš, Milan | 367 | Kořený, Luděk | 372 |
| Béres, Tibor | 373 | Kostlánová, Nikola | 368 |
| Bhide, Mangesh | 377 | Koszttyu, Petr | 372 |
| Bornscheuer, Uwe T. | 373 | Kotora, Martin | 367, 380 |
| Brůčková, Lenka | 364 | Kotrbová, Věra | 376 |
| Brzozowski, Marek A. | 363 | Koudeláková, Táňa | 373 |
| Břizová, Radka | 389 | Koval, Dušan | 381 |
| Budka, Jan | 374 | Kowalska, Marta | 373 |
| Calábková, Lenka | 364, 371 | Krämer, Alwin | 371 |
| Cetkovská, Kateřina | 365, 366 | Kroupa, Jan | 374 |
| Cioci, Gianluca | 368 | Kryštof, Vladimír | 371 |
| Císařová, Ivana | 383 | Kučerová, Jana | 378 |
| Damborský, Jiří | 369, 373, 376, 386 | Kuglík, Petr | 376 |
| Dědourková, Tereza | 365 | Kulhánek, Petr | 386 |
| Divoký, Vladimír | 364, 371, 378 | Kundrát, Ondřej | 374 |
| Do Nascimento, Ruth R. | 389 | Leclerc, Claude | 384 |
| Dodson, Guy G. | 363 | Letocha, Ondřej | 388 |
| Doležel, Petr | 372 | Levová, Kateřina | 374 |
| Doleželová, Pavlína | 366 | Lhoták, Pavel | 374 |
| Dong, Hui | 384 | Linhartová, Irena | 384 |
| Dušková, Lucie | 388 | Luc, Milan | 375 |
| Eigner, Václav | 374 | Luhová, Lenka | 379 |
| Ettrich, Rüdiger | 386 | Macíčková-Cahová, Hana | 375 |
| Faber, Edgar | 364 | Majlessi, Laleh | 384 |
| Fabian, Pavel | 385 | Malčíková, Jitka | 376, 385 |
| Fajkusová, Lenka | 388, 390 | Mareš, Michael | 366, 384 |
| Franta, Petr | 384 | Marchalín, Štefan | 388 |
| Franta, Zdeněk | 366, 384 | Masár, Marián | 375 |
| Frébort, Ivo | 373 | Matulková, Zuzana | 378 |
| Frei, Eva | 374, 376 | Matůšková, Miroslava | 363 |
| Gallo, Jiří | 391 | Mayer, Jiří | 376 |
| Galuszka, Petr | 373 | Mieslerová, Barbora | 379 |
| Grochová, Diana | 383 | Míkula Jr., Ivan | 377 |
| Grubhoffner, Libor | 369 | Míkula Sr., Ivan | 377 |
| Hatok, Jozef | 371 | Mínofar, Babak | 386 |
| Hessler, Filip | 367 | Míšek, Jiří | 381 |
| Himl, Michal | 374 | Mlejnek, Petr | 372 |
| Hlavna, Marian | 390 | Mojzíkovi, Renáta | 364 |
| Hocek, Michal | 375, 385 | Mokrý, Jaroslav | 364 |
| Holý, Antonín | 370 | Moos, Jiří | 364 |
| Honziček, Jan | 365 | Moosová, Martina | 364 |
| Horn, Martin | 366, 384 | Moserová, Michaela | 376 |
| Hoskovec, Michal | 389 | Moulis, Mojmír | 385 |
| Hošek, Jan | 367 | Mucha, Rastislav | 377 |
| Houser, Josef | 368 | Müller, Petr | 379 |
| Hozák, Pavel | 368 | Mužik, Jan | 385 |
| Chaloupková, Radka | 373, 386 | Navrátilová, Jarmila | 383 |
| Chovancová, Eva | 369 | Nosek, Jozef | 370 |
| Chrudimská, Tereza | 369 | Oborník, Miroslav | 372 |
| Imberty, Anne | 368 | Otáhalová, Eva | 377 |
| Jakůbková, Michaela | 370 | Palíková, Irena | 378 |
| Jančařík, Andrej | 370 | Pavelka, Antonín | 369 |
| Jansa, Petr | 371 | Pavelková, Jana | 364 |
| Jindřich, Jindřich | 380 | Pavlová, Martina | 373 |
| Jiráček, Jiří | 363 | Pěničková, Helena | 366, 384 |
| Jurečekovi, Jana | 371 | Petrivalský, Marek | 379 |
| Kalinová, Blanka | 389 | Piterková, Jana | 379 |
| Kaniansky, Dušan | 375 | Piterková, Lucie | 378 |
| Kapránová, Simona | 378 | Pojarová, Michaela | 374 |
| Kašička, Václav | 381 | Pospišilová, Šárka | 376 |
| Khabiri, Morteza | 386 | Prchal, Josef T. | 377 |
| Kišová-Vargová, Lucia | 377 | Prokop, Zbyněk | 386 |
| Klemann, Thorsten | 383 | Račay, Peter | 371 |
| Koča, Jaroslav | 386 | Rajnochová Svobodová, Alena | 391 |

| | |
|------------------------|---------------|
| Rašková Kafková, Leona | 371 |
| Ravčuková, Barbora | 385 |
| Rohel, Jan | 378 |
| Růčková, Eva | 379 |
| Rudenko, Nataliia | 369 |
| Řezanka, Michal | 380 |
| Řežábek, Karel | 364 |
| Severa, Lukáš | 381 |
| Schimer, Jiří | 390 |
| Schmeiser, Heinz H. | 374 |
| Schröder, Detlef | 382 |
| Schulz, Jiří | 383 |
| Siemeling, Ulrich | 383 |
| Slováčková, Jana | 383 |
| Sobotka, Roman | 372 |
| Sojka, Daniel | 366, 384 |
| Soukup, Tomáš | 364 |
| Staněk, Ondřej | 384 |
| Stará, Irena G. | 370, 381 |
| Stary, Ivo | 370, 381 |
| Stehliková, Kristýna | 390 |
| Stiborová, Marie | 374, 376 |
| Štělcová, Zora | 386 |
| Šafař, Peter | 388 |
| Šámal, Michal | 381 |
| Šebo, Peter | 384 |
| Šimánek, Vilím | 378 |
| Šindelář, Vladimír | 386, 387 |
| Šistková, Jana | 374 |
| Šmarda, Jan | 383 |
| Šmardová, Jana | 375, 383, 385 |
| Šmečilová, Mária | 373 |
| Šmejkal, Karel | 367 |
| Štefančíková, Lenka | 385 |
| Štefániková, Andrea | 371 |
| Štefko, Martin | 385 |
| Štěpánková, Veronika | 386 |
| Štěpnička, Petr | 383, 387 |
| Šulc, Miroslav | 376 |
| Švec, Jan | 387 |
| Tauchman, Jiří | 387 |
| Teplý, Filip | 381 |
| Tichý, Boris | 376 |
| Tichý, Lukáš | 388 |
| Tóthová, Eva | 388 |
| Trbušek, Martin | 376 |
| Turkenburg, Johan P. | 363 |
| Uldrijan, Stjepan | 365, 366 |
| Ulrichová, Jitka | 378, 391 |
| Valentová, Kateřina | 378 |
| Vaničková, Lucie | 389 |
| Vášová, Ingrid | 385 |
| Vávra, Jan | 381 |
| Veselý, Jan | 390 |
| Vinklárek, Jaromír | 365 |
| Víšek, Benjamín | 364 |
| Vojtěšek, Bořivoj | 379 |
| Vousden, Karen H. | 365 |
| Watson, Christopher J. | 363 |
| Wimmerová, Michaela | 368 |
| Zapletalová, Eva | 390 |
| Zapletalová, Petra | 388 |
| Závalová, Veronika | 367 |
| Zdařilová, Adéla | 391 |
| Zimmer, Christian | 373 |
| Žáková, Lenka | 363 |
| Žúziová, Jozefína | 388 |



Frontiers of Chemistry: From Molecules to Systems

A One-Day Symposium

On 21st May 2010 in Paris

at the Maison de la Chimie

(near the Eiffel Tower and Les Invalides)

Celebrating 10 Years of



Speakers



Gerhard Ertl
Nobel Prize 2007



Jean-Marie Lehn
Nobel Prize 1987



Roger Y. Tsien
Nobel Prize 2008



Ada Yonath
Nobel Prize 2009



Luisa De Cola



Alan R. Fersht



Marc Fontecave



Michael Grätzel



Michel Orrit



Nicolas Winssinger

Posters

will be displayed also online from 1st April.

www.chembiophyschem.org

Scientific committee

E. Amouyal, M. Che,
F.C. De Schryver,
A. R. Fersht, P. Göllitz,
J.T. Hynes, J.-M. Lehn

Topics

catalysis, biochemical imaging,
chemical biology, bionanotechnology,
proteomics, spectroscopy, solar cells

530320908



 WILEY-VCH

Where Chemistry Meets Life Science

14 national
chemical
societies of
EUChemSoc



EUChemSoc

are co-owners of
ChemBioChem



Austria



Belgium



Czech Republic



France



Germany



Greece



Hungary



Italy



Netherlands



Poland



Portugal



Spain



Sweden

Subscribe now!

For further information
and to subscribe please
send an E-mail to:

cs-journals@wiley.com
(North and South America)

service@wiley-vch.de
(Germany/Austria/Switzerland)

cs-journals@wiley.co.uk
(all other areas)

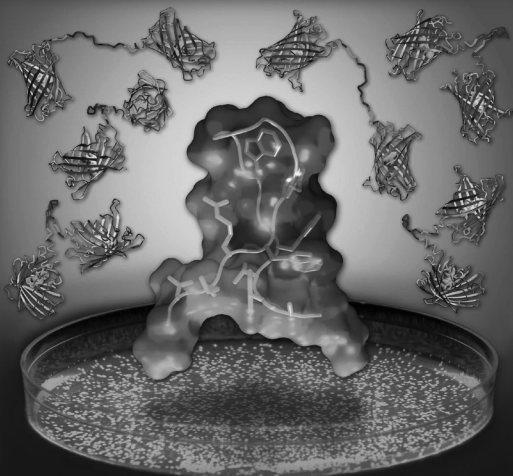
CBCHPX 8 (8) 833 - 960 (2007) - ISSN 1439-4227

D55712

A EUROPEAN JOURNAL

CHEM BIOCHEM

OF CHEMICAL BIOLOGY



**ISI Impact
Factor (2006):
4.100**



EUChemSoc



Minireview: Molecular Mechanisms of *agr* Quorum Sensing
in Virulent *Staphylococci*

Highlight: Light-Stimulated Patterning of Cells
Plus Original Contributions

Chemistry & Life Sciences

WILEY-VCH

an attractive mixture of:

- Short communications
- Full papers
- Reviews & Minireviews
- Highlights & Concepts
- News & Comments
- Book and Multimedia
Reviews

Chairmen of the Editorial Board:

Alan R. Fersht (UK)

Jean-Marie Lehn (France)

Editor:

Peter Göllitz

Managing Editor:

Lisa Abel

New in 2007: 18 issues per year



Visit **ChemBioChem** online
www.chembiochem.org



WILEY

InterScience®

DISCOVER SOMETHING GREAT



WILEY-VCH

| OBSAH | | CONTENTS | |
|---|-----|---|-----|
| ÚVODNÍK | 301 | EDITORIAL | 301 |
| REFERÁTY | | REVIEW ARTICLES | |
| Biosenzory k včasné detekci otravných látek Š. Bidmanová, M. Pohanka, J. Cabal, Z. Prokop a J. Damborský | 302 | Early Warning Biosensors for Detection of Chemical Warfare Agents Š. Bidmanová, M. Pohanka, J. Cabal, Z. Prokop, and J. Damborský | 302 |
| Unikátní štruktúrne a funkčné vlastnosti A₁A₀ ATPáz/syntáz z archaea M. Vidová a P. Šmigáň | 309 | Unique Structural and Functional Properties of A₁A₀ ATPase/Synthase from Archaea M. Vidová and P. Šmigáň | 309 |
| Morfologie, chemická struktura, vlastnosti a možnost využití pšeničného B-škrobu E. Šárka a Z. Bubník | 318 | Morphology, Chemical Structure, Properties and Applications of Wheat B-Starch E. Šárka and Z. Bubník | 318 |
| Flaviny – perspektivní katalyzátory oxidací a redukci R. Cibulka | 326 | Flavins – Promising Oxidation and Reduction Catalysts R. Cibulka | 326 |
| LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY | | LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS | |
| Využití moderních reverzních stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého pro analýzu bioaktivních peptidů L. Janečková, J. Sobotníková, E. Tesařová a Z. Bosáková | 334 | Application of Modern Reversed Phases Based on Zirconium Dioxide for the Analysis of Bioactive Peptides L. Janečková, J. Sobotníková, E. Tesařová, and Z. Bosáková | 334 |
| Testování vlivu vybraných faktorů na průběh nitrifikace kalové vody P. Švehla, P. Jeníček, J. Habart, A. Hanč a J. Balík | 343 | Testing Selected Factors Influencing Nitrification of Sludge Water P. Švehla, P. Jeníček, J. Habart, A. Hanč, and J. Balík | 343 |
| Hodnocení možného vlivu rizikových prvků obsažených v půdě na organismus člověka J. Tremlová, J. Száková a P. Tlustoš | 349 | An Assessment of Possible Effect of Risk Elements Contained in Soil on Human Organism J. Tremlová, J. Száková, and P. Tlustoš | 349 |
| Agarová pracovní elektróda ako podklad pre dvojvrstvou lipidovú membránu: Účinky jednosmerného napätia G. Laputková, M. Legiň a J. Sabo | 353 | Agar Working Electrode as a Support for Bilayer Lipid Membrane: Effects of Direct Current Bias Voltages G. Laputková, M. Legiň, and J. Sabo | 353 |
| X KONFERENCE SIGMA-ALDRICH | 361 | X SIGMA-ALDRICH CONFERENCE | 361 |

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 104 (2010), čís./no. 5 • LISTRY CHEMICKÉ, roč./vol. 134, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 120 • 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 Praha, 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 • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, M. Koman, J. Koubek, T. Míšek, 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 O PŘEDPLATNÉM, 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: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2010 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plné předplatné 2010 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBÓN & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2010 (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 • Molekulární námět na obálce: P. Holý • Dáno do tisku 28.4.2010.