

Dvorní rada prof. dr. Karel Preis 1846–1916

V loňském roce uplynulo 160 let od narození a 90 let od úmrtí jednoho z největších průkopníků moderní české chemie a současně zakladatele našeho časopisu, prof. Karla Preise, po němž je pojmenována cena, udělovaná redakcí za nejlepší práci otištěnou v *Chemických listech* v daném roce.

I *Chemické listy* měly vloni kulaté výročí – 100 let od vydání prvního čísla pod tímto názvem. Věc je ale složitější, protože měly přímého předchůdce, *Listy chemické*: jejich vůbec první číslo vyšlo sice už v září 1876, ale jejich první ročník je datován 1877; letos je to tedy 130 let, což je určitě hodno připomenutí, alespoň úvodníkem.

Je zajímavé číst texty, které s tímto mužem souvisejí. Mám k dispozici jeho nekrolog¹ (autorem je prof. Josef Hanuš) z pátého čísla *Chemických listů* z roku 1916, který je půvabný svou češtinou, jakož i neméně půvabný text² našeho bývalého redaktora Dr. Ing. Jiřího Guta, DrSc. (1923–2002), který vtipně zarámoval rok založení *Listů chemických* úvahou o rysech tehdejšího života obecného (počínaje informací, že v té době ještě nestálo Národní divadlo, a konče otázkou, zda si tehdejší redaktoři svítili petrolejkou nebo svíčkou).

Když jsem začal psát tento úvodník, přemýšlel jsem, v jaké situaci byla v době největší odborné aktivity prof. Preise věda vůbec a česká zvláště, tedy na konci devatenáctého století. Tehdy uplynulo zhruba teprve sto let od zásadních objevů a vzniku teorií Lomonosova, Lavoisiera, Daltona a dalších, kteří proměnili alchymii v chemii a fyziku. Co vlastně tenkrát měli chemici k dispozici pro svou práci? Pravděpodobně určitou primitivní formu elementární organické analýzy, srovnávací anorganickou analýzu, odměrnou a vázkovou analýzu, bodotávek, polarimetr, kalorimetr,.... Spektrální analýza byla v plenkách, skleněné nádoby si chemici museli většinou sami vyfoukávat, zátky sloužily místo zábrusů, plynové hořáky místo elektrického ohřevu... Kolik druhů speciálních chemikálií byli tehdy výrobci schopni dodat? Desítky? Desíttisíce, jako dnes, určitě ne. O to víc vynikne heroismus badatelů druhé poloviny 19. století – jako bývalý „cukrář“ se skláním v obdivu před dílem Preisova vrstevníka, německého vědce Emila Fischera, který pouhým trpělivým rozkrystalováním vyizoloval a pomocí charakteristických reakcí popsal snad všechny monosacharidy, aniž by měl k dispozici jakoukoliv chromatografii, o strukturní analýze ani nemluvě.

Při takových kulatých výročích, jaká měl vloni prof. Preis, se sluší připomenout jeho zásluhy. On vlastně patřil k první generaci významných novodobých českých chemiků, na niž navazovaly další generace: Preisův žák Emil Votoček (*1872), dále Rudolf Lukeš (*1897), František Šorm, Otto Wichterle (oba *1913), a „homologická“ řada dalších. V Preisově době vrcholila hospodářská a částečně i politická emancipace našeho národa, dovršovalo se obrození, což mělo pochopitelně za následek snahu „mít všechno národní“ – nejen umění, ale i vědu a průmysl. Je to doba vzniku českého chemického názvosloví, „pěstování lučby v jazyce mateřském“, doba prvních odborných publikací v češtině a zakládání odborných časopisů. Prof. Preis již v mladém věku pochopil, že u nás chybí odborná chemická periodika jako



důležitý komunikační prostředek nejen k publikaci odborných článků, ale i ke smelování chemické komunity.

Sjednocující funkci měl i Spolek českých chemiků, u jehož vzniku prof. Preis stál. Již v roce 1872 založil „Časopis pro průmysl cukerní, orgán Spolku pro povznesení cukrovarnického průmyslu v království Českém“; na první straně svého úvodu píše „...že nesmějí se oči před hrozící budoucností uzavíratí a ruce malomyslně v klín skládat, důkaz to jak vážně situace našeho průmyslu byla již v té době posuzována“. Ten vycházel v obou zemských jazycích (německy jako „Zeitschrift für Zuckerindustrie, Organ des Vereines zur Hebung der Zuckerfabrikation in Königreiche Böhmen“), ale po třech letech zanikl. Později Preis založil a vlastním nákladem začal vydávat *Listy cukrovarnické* (1882). Ty vycházejí dodnes pod současným názvem *Listy cukrovarnické a řepařské* (od r. 1992).

Proč právě cukrovarnictví? Nesmíme zapomenout, že koncem 19. stol. bylo cukrovarnické (jakož i pivovarnické) odvětví průmyslu daleko významnější a prestižnější než dnes – bylo v něm zaměstnáno větší procento lidí, cukr se více vyvážel apod. Význam tohoto oboru vyplývá i z toho, že prof. Preis založil také Výzkumnou stanici cukrovarnickou a Cukrovarské muzeum.

Mezitím ale došlo r. 1876 k již zmíněnému založení *Listů chemických*, které ve své nynější přesmyčce na *Chemické listy* existují dodnes a jejichž vydávání bylo za celou dobu přerušeno jen kratičce (1944–5), takže patří k nejstarším, prakticky nepřetržitě vydávaným chemickým časopisům vůbec.

Roku 1869 byla pražská technika rozdělena na českou a německou část, a právě v pedagogické činnosti na České technice spočívá těžiště zásluh prof. Preise. Vychoval celou řadu chemiků, vydal řadu učebnic. Prošel všemi stupni, kterých může pedagog dosáhnout: byl nejprve asistentem (u prof. V. Šafaříka), pak docentem, mimořádným a řádným profesorem, děkanem i rektorem. Dosáhl i státních ocenění: byl dvorním radou a obdržel Řád železné koruny. Roku 1893 byl zvolen řádným členem Královské české společnosti nauk.

Závěrem bych chtěl vyslovit přání, aby dílo prof. Preise zůstalo v paměti i budoucích generací, a aby se v naší zemi urodil dostatek osobností jeho kalibru.

Jiří Podešva

LITERATURA

1. Hanuš J.: *Chem. Listy* 10, 115 (1916).
2. Gut J.: *Chem. Listy* 92, 99 (1998).

MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE MIKROBIÁLNÍCH NAD(P) A Zn-DEPENDENTNÍCH ALKOHOLDEHYDROGENAS

ANNA KOTRBOVA-KOZAK, JIŘÍ SAJDOK
a PAVEL KOTRBA

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
pavel.kotrba@vscht.cz

Došlo 18.12.06, přijato 2.2.07.

Klíčová slova: alkoholdehydrogenasa, primární struktura,
katalytický mechanismus, katalytický Zn^{2+} , strukturální
 Zn^{2+} , vazba kofaktoru

Obsah

1. Úvod
2. Struktura a katalytický mechanismus alkoholdehydrogenasy (ADH) z koňských jater (HLADH) – model pro ADH skupiny I
 - 2.1. Binární komplex ADH z koňských jater (HLADH) s NAD(H)
 - 2.2. Katalytický mechanismus ADH
3. Mikrobiální ADH skupiny I
 - 3.1. Vzájemná identita aminokyselinových sekvencí a konzervované aminokyselinové zbytky
 - 3.2. Konzervované aminokyselinové zbytky a nábojová (protonová) štafeta
 - 3.3. Vazba katalytického Zn^{2+}
 - 3.4. Vazba strukturálního Zn^{2+}
 - 3.5. Konzervované aminokyselinové zbytky a specifická vazba kofaktoru
 - 3.6. Vztah struktury ADH a substrátové specifity
4. Závěr

1. Úvod

Vzájemná přeměna primárních a sekundární alkoholů s normálním nebo větveným alifatickým řetězcem, cyklických sekundárních alkoholů, hemiacetalů a aromatických alkoholů na odpovídající aldehydy a ketony je jednou ze základních reakcí v prokaryotních a eukaryotních organismech. Oxidoreduktasy katalyzující tyto reakce mohou být z hlediska požadavku na kofaktor rozděleny do tří kategorií. Nejlépe charakterizovaná je první kategorie, nikotinamidnukleotid (NAD^+)- nebo nikotinamidnukleotid fosfát ($NADP^+$)-dependentní alkoholdehydrogenasy (ADH). ADH živočišného, rostlinného a mikrobiálního původu z této kategorie byly dále rozděleny na základě

strukturálních a funkčních charakteristik do tří skupin¹: skupina I zahrnuje Zn^{2+} -dependentní ADH s polypeptidovým řetězcem dlouhým přibližně 350 aminokyselinových zbytků. Analýza dostupných genomových sekvencí poukázala na jejich obecnou přítomnost v mikroorganismech z nejrozličnějších taxonomických skupin^{2,3}. Skupinu II tvoří ADH s polypeptidovým řetězcem dlouhým přibližně 250 aminokyselinových zbytků^{2–5}. Typickým zástupcem jsou ADH z *Drosophila* spp. (cit.⁶). Tyto ADH jsou obecně považovány za nezávislé na přítomnosti iontu kovu, avšak Niefind a spol.⁷ ukázali, že ADH z *Lactobacillus brevis* (LbRAdh) je aktivní pouze v případě, že obsahuje strukturální ion Mg^{2+} nebo Mn^{2+} . Skupina III zahrnuje ADH aktivované bivalentními kationty kovů s polypeptidovým řetězcem dlouhým asi 385 aminokyselinových zbytků, nebo 900 u multifunkčních enzymů^{3,8}. Typickým zástupcem je ADH kódovaná genem *adhB* ze *Zymomonas mobilis*⁹. ADH řazené do druhé kategorie využívají jako kofaktory pyrrolochinolin chinon (PQQ), hem spolu s PQQ nebo kofaktor F_{420} (cit.^{3,8,10}). Třetí kategorií jsou alkoholoxidasy, které jsou schopny katalyzovat pouze nevratnou oxidaci alkoholů podle rovnice $R-CH_2OH + O_2 \rightarrow RCHO + H_2O_2$. Tyto ADH využívají při katalýze flavinadenindinukleotid^{8,11,12}.

Podle Thomsona a spol.¹³ byla v počátku evoluce alkoholdehydrogenas (ADH) na Zemi ovlivněna dvěma hlavními faktory: *i*) (mikro)organismy schopnými v prostředí bohatém na sacharidy produkovat a tolerovat ethanol a vytvářet tak prostředí toxické pro ostatní organismy, *ii*) schopností těchto organismů využívat zdroj uhlíku a energie uložený ve formě ethanolu, což jim v konkurenčním prostředí přinášelo další fyziologickou výhodu. Tento evoluční tlak pak zřejmě nutil i další organismy vyvinout si vlastní ADH. Učebnicovým příkladem jsou octomilky *Drosophila* spp., které jsou již v larválním stádiu schopny díky ADH tolerovat vysoké koncentrace ethanolu v dietě¹⁴ a dospělci jsou ethanol schopni v případě nouze i využívat jako zdroj uhlíku a energie¹⁵.

ADH jsou u řady mikroorganismů často esenciální součástí katabolismu. Reduktasová aktivita umožňuje u anaerobních bakterií získat oxidovaný kofaktor pro další pokračování oxidoredukčních pochodů v energetickém metabolismu^{9,16,17}. Tento směr reakce je průmyslově významný nejen v potravinářství, ale i pro produkci rozpouštědel¹⁶, pro produkci průmyslového ethanolu jako náhrady fosilních paliv^{18–20} nebo jsou ADH využívány pro stereospecifickou biosyntézu chirálních alkoholů^{21–23}. Oxidace alkoholů na odpovídající aldehydy a ketony a vznik redukováného kofaktoru mohou být součástí vstupu alkoholů jako zdroje uhlíku a energie do centrálního metabolismu. Tato role ADH je u mikroorganismů běžná a vede např. k produkci kyseliny octové bakteriemi *Acetobacter* spp., je zásadní pro růst methylotrofních mikroorganismů^{24,25} nebo

oxidaci přirozených sloučenin a xenobiotik bakteriemi rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter* nebo *Rhodococcus*^{26–29}.

2. Struktura a katalytický mechanismus alkoholdehydrogenasy (ADH) z koňských jater (HLADH) – model pro ADH skupiny I

Skupina NAD(P), Zn-dependentních ADH zahrnuje enzymy vyskytující se ve formě homodimerů (především rostlinné a živočišné ADH) a homotetramerů (většina mikrobiálních ADH). Typickými zástupci jsou homodimerní ADH z koňských jater (HLADH) a homotetramer ScADHI ze *Saccharomyces cerevisiae*⁸. Ačkoliv pro ScADHI a její mutantní formy existuje velké množství biochemických dat, terciární a kvarterní struktura tohoto enzymu doposud nebyla krystalograficky uspokojivě vyřešena¹⁷. Oproti tomu pro HLADH jsou dostupné nejen enzymologické studie, ale velmi dobře experimentálně charakterizována je terciární a kvarterní struktura apoenzymu, holoenzymu a jejich různých mutantních forem. HLADH je tak v současnosti používána jako vzor pro ostatní ADH této skupiny. Proto je vhodné nejprve uvést zásadní poznatky získané pro tento enzym, které mají obecný význam pro pochopení průběhu vzniku komplexu enzym-kofaktor-substrát a mechanismu enzymové reakce.

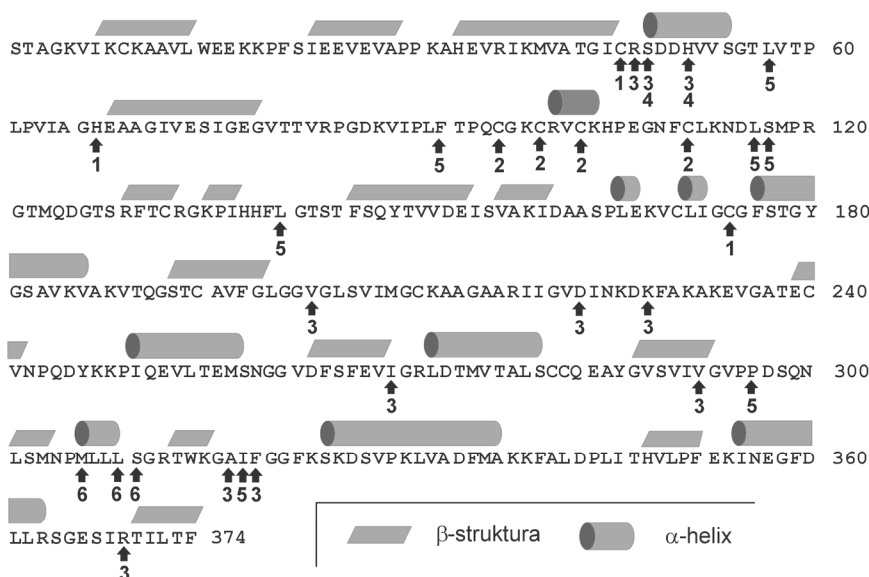
2.1. Binární komplex ADH z koňských jater (HLADH) s NAD(H)

HLADH je homodimer složený v nativní formě z podjednotek o 374 aminokyselinových zbytcích a mole-

kulové hmotnosti 40 kDa. Na obr. 1 je znázorněna aminokyselinová sekvence a sekundární struktury isoenzymu E, který byl používán v nativní nebo mutované formě ve většině biochemických a krystalografických studií. Každá podjednotka HLADH se sestává z katalytické a NAD⁺-vazebné domény, které jsou od sebe odděleny dlouhou štěrbinou. Ukazuje se, že tato konformace je společná všem terciárním strukturám NAD(P), Zn-ADH bez ohledu na kvarterní strukturu, tj. počet podjednotek v nativním enzymu. Stejně tak všechny NAD(P), Zn-ADH obsahují v každé podjednotce jeden katalyticky aktivní ion Zn²⁺. Podjednotky většiny ADH skupiny I včetně HLADH obsahují navíc jeden Zn²⁺ vázaný v zinkovém prstu, který stabilizuje strukturu enzymu.

Konformační změny doprovázející vznik binárního komplexu

Při vzniku komplexu HLADH-NAD dochází patrně nejprve k vazbě adenosinové části kofaktoru, která je následována navázáním jeho nikotinamidové části³⁰. NAD (H) je poté lokalizován podél štěrbinu mezi oběma doménami³¹. Tato vazba indukuje konformační změnu zahrnující přiblížení obou domén a reorganizaci smyčky mezi aminokyselinovými zbytky 293 až 298. To umožní přiblížení zbytků 46 až 60 katalytické domény do aktivního centra, přičemž některé atomy se přitom posunou až o 9 Å. Zároveň dochází k mírnému posunu NAD(H)-vazebné domény (o 1,5 Å) tak, aby se optimalizovala poloha aminokyselinových zbytků interagujících s koenzymem. Důsledkem těchto konformačních změn je zpevnění vazebných interakcí HLADH s koenzymem, zúžení štěrbinu mezi oběma doménami a vytvoření, pro katalýzu nezbytného, nevodného prostředí v aktivním místě. Postranní řetězce

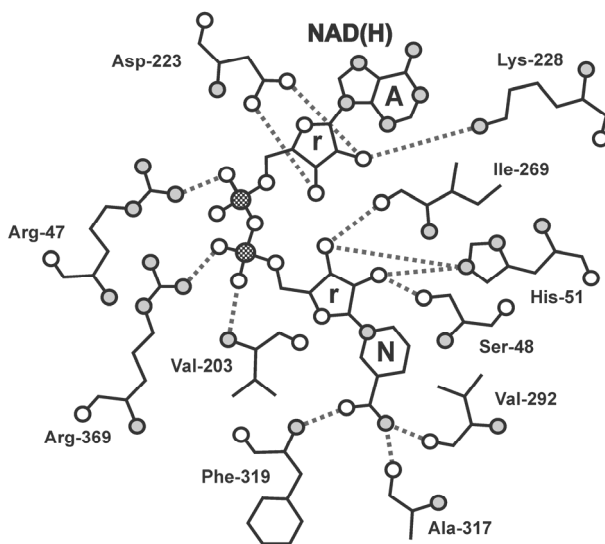


Obr. 1. Aminokyselinová sekvence alkoholdehydrogenasy z koňských jater (HLADH); vyznačeny jsou sekundární struktury a šipkami aminokyselinové zbytky účastníci se vazby katalytického (1) a strukturálního Zn²⁺ (2), vazby kofaktoru (3) transportu H⁺ (4) a výstavby hydrofobního válce aktivního místa (5 zbytky z jedné a 6 zbytky z druhé podjednotky dimeru)

těchto aminokyselin navíc vytváří jakýsi hydrofobní válec, do kterého je zasunut postranní řetězec substrátu. Válec je tvořen soustředěním postranních řetězců Leu-57, 116, 141, Ser-48, 117, Phe-93, Pro-296 a Ile-318 jedné podjednotky homodimeru a Met-306, Leu-309 a Ser-310 z druhé podjednotky (obr. 1). Dalšími reaktivními komponentami v asi 20 Å hluboké štěrbině aktivního místa jsou vedle NAD(H) a iontu Zn^{2+} tetraedrálně koordinovaného zbytky Cys-46, His-67 a Cys-174 a molekulou vody také postranní řetězce His-51 a Ser-48 účastníci se přenosu protonu (kap. 2.2.). HLADH je schopna oxidovat vedle ethanolu i vyšší, větvené i aromatické alkoholy, což je dáno dostačující velikostí štěrbinu aktivního místa. Není však schopna na rozdíl od S isoenzymu využívat jako substrátů steroidy. Důvodem rozdílné substrátové specifity jsou především mutace v oblasti smyčky mezi Phe-110 až Arg-120, jež je součástí hydrofobní štěrbinu. Delece hydrofilní Asp-115 a substituce objemného postranního řetězce Phe-110 za Leu (číslování zbytků je pro isoformu E) vede kromě patrné změny v hydrofobicitě aktivního místa a sterických nároků aminokyselinových zbytků (Phe110Leu) především k lokální reorganizaci této smyčky. Ta indukuje další konformační změny a zvětšení objemu štěrbinu aktivního místa z 250 Å³ pro isoenzym E na 500 Å³ u isoenzymu S (cit. ³²).

Aminokyselinové zbytky vážící NAD(H)

Jak je znázorněno na obr. 2, je vazba koenzymu zprostředkována vodíkovými můstky a iontovými interakcemi s O a N atomy postranních řetězců aminokyselin nebo peptidových vazeb Arg-47, Ser-48, His-51, Val-203, Asp-223, Lys-228, Val-292, Ile-269, Ala-317 a Phe-319 (cit. ³¹). Pro efektivní přenos hydridového ekvivalentu mezi alko-



Obr. 2. Vazba kofaktoru v alkoholdehydrogenase z koňských jater (HLADH); interakce aminokyselinových zbytků s NAD(H) je znázorněna přerušovanou čarou. Atomy O jsou vyznačeny bílými, N šedými a P bíločernými kroužky. A: adenin, N: nikotinamid, r: ribosa

holem a kofaktorem je významná van der Waalsovská interakce Val-203 a nikotinamidu. Krystalografické studie³³ ukázaly, že záměna Val203 za menší Ala má za následek další zúžení štěrbinu, avšak současně prodloužení vzdálenosti mezi reagujícími atomy C1 substrátu a C4 nikotinamidu kofaktoru o 0,8 Å. To vede ke zvýšení aktivní energie pro přenos vodíkového ekvivalentu³⁴ a tím k 50násobnému snížení katalytické účinnosti mutovaného enzymu Val203Ala oproti nemutovanému. Další zásah v okolí vazebného místa NAD(H), záměna Phe93Trp, sice vedl k přiblížení reagujících atomů o 0,4 Å, avšak interakce Trp s karboxamidovou skupinou nikotinamidu naopak nedovolovala plně uzavření štěrbinu aktivního místa a dvojnásobný mutant Val203Ala/Phe93Trp vykazoval v porovnání s nemutovaným enzymem 75násobné snížení katalytické účinnosti³⁵.

Závislost tvorby komplexu HLADH-NAD⁺ a HLADH-NADH na hodnotě pH byla popsána již v prvotních studiích tohoto enzymu³⁶. V obou případech klesá rychlostní konstanta asociace enzymu s kofaktorem při pH > 9. Z pohledu rovnovážných disociačních konstant komplexu se „afinita“ NAD⁺ k apoenzymu zvyšuje o více než jeden řád růstem pH v rozmezí hodnot 6 až 10: Rovnovážná disociační konstanta $K_{E,NAD}$ je při pH 7 rovna 0,15 mM a při pH 9 pak $K_{E,NAD}$ klesá na hodnotu 4 μM (cit. ³⁷). Oproti tomu afinita NADH na pH nezávisí ($K_{E,NADH} = 0,3 μM$) v rozmezí hodnot 6 až 8, avšak klesá o jeden řád při zvýšení pH na 10 ($K_{E,NADH} = 4 μM$). Bylo učiněno několik pokusů rozlišit, zda za závislost vazby obou forem kofaktorů na pH a uvažovanou kritickou roli ionizovatelné skupiny o pK_a 9,2 (cit. ³⁸) je zodpovědná (de)protonace zbytků His-51 nebo Lys-228 či disociace molekuly vody vázané v aktivním centru na Zn^{2+} (přehled uvádí Pettersson³⁹), avšak pro žádný z nich nebylo dosaženo plné shody s experimentálními daty a situace je patrně složitější.

LeBrun a Plapp⁴⁰ ukázali, že Lys-228 je ionizovatelnou skupinou kontrolující pK_a 9,2 a předpokládají, že interakce jeho ε-NH₃⁺ s pyrofosfátem NAD(H) může usnadňovat vznik binárního komplexu, ve kterém je však nakonec Lys-228 propojen vodíkovým můstkem s hydroxylem ribosy adenosinu (obr. 2). Při představě mnohonásobných kolizí apoenzymu a kofaktoru daných Brownovým pohybem (difuzní model) Adolph a spol.³⁰ předpokládají, že pro prvotní vazbu adenosinové části společně oběma kofaktorům, která je závislá na pH, je důležitý celkový náboj enzymu a poté obzvláště aktuální náboj aminokyselinových zbytků (patrně včetně Lys-223) vážících pyrofosfátovou část molekuly kofaktoru (obr. 2). V souladu s touto představou je i skutečnost, že rychlostní konstanta pro vazbu oxidované i redukované formy kofaktoru je vyšší pro isoenzym S, což je patrně dáno náhradou Glu-366 z isoenzymu E za Lys, jehož zbytek je pak orientován směrem k pyrofosfátu kofaktoru³².

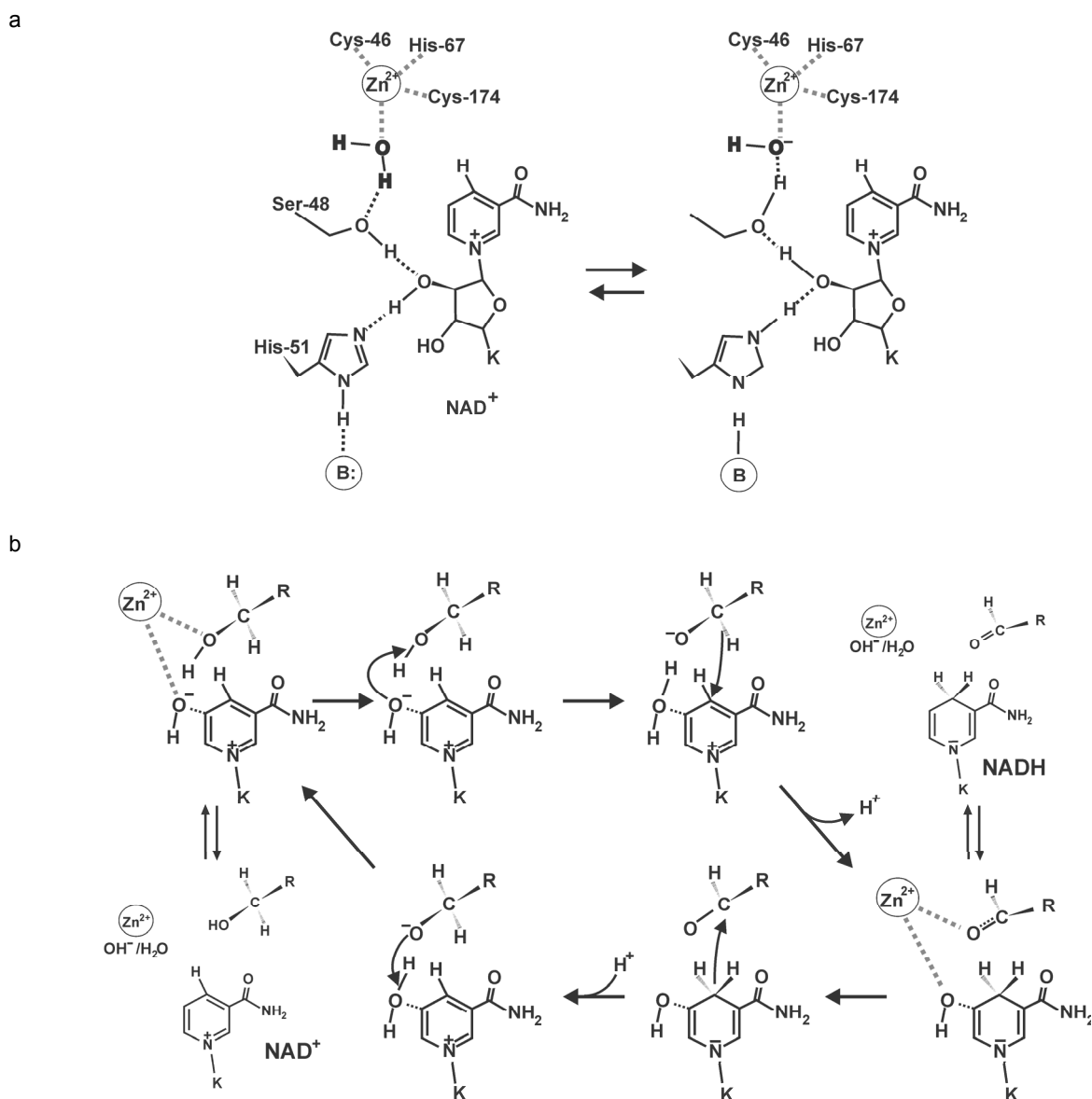
Rychlost vazby redukovaného nikotinamidu NADH je již na pH nezávislá. Oproti tomu vazba kladně nabitě nikotinamidové části NAD⁺ je díky elektrostatické repulzi pomalá při nižších hodnotách pH a rychlejší při vyšším

pH, což je vysvětlováno její interakcí s hydroxylem vody vázaným na Zn^{2+} (kap. 2.2), který tímto neutralizuje kladný náboj nikotinamidu a tak při pH 10 snižuje $K_{E,NAD}$ na hodnotu shodnou s $K_{E,NADH}$.

2.2. Katalytický mechanismus

Prvním krokem při oxidaci alkoholu je vazba NAD^+ a následující konformační změna enzymu vede k posunu pK_a molekuly vody vázané na Zn^{2+} z hodnoty 9,6 na hodnotu 7,6 (při současném navázání alkoholu klesá pK_a vody až na hodnotu 4,5). Důsledkem snížení hodnoty pK_a vody

dochází k disociaci protonu, který však nemůže být vzhledem k hydrofobnímu prostředí uvolněn přímo do štěrbin aktivního místa a je prostřednictvím systému vodíkových vazeb mezi H_2O , hydroxylem zbytku Ser-48, 2' hydroxylem ribosy NAD^+ a imidazolem His-51 odveden na povrch enzymu (tzv. protonová štafeta; obr. 3a). Následně dochází k vazbě alkoholu na Zn^{2+} , který zajistí jeho stabilizaci, orientaci pro oxidační reakci a elektrofilní povaha iontu kovu usnadní přenos hydridového ekvivalentu (obr. 3b). Alkohol je vázán ve formě alkoholátu, uvolněný proton přijímá hydroxylová skupina a vzniká pentakoordinovaný komplex Zn^{2+} . Po přenosu hydridového



Obr. 3. Schematické znázornění části katalytického mechanismu alkoholdehydrogenasy z koňských jater (HLADH); a) Protonová štafeta. b) Reakční mechanismus přenosu vodíkového ekvivalentu (podle cit.⁴²)

ekvivalentu na C4 nikotinamidové části kofaktoru dochází k oddisociování vzniklého aldehydu nebo ketonu a poté k uvolnění NADH (cit.³⁹). Vzhledem k tomu, že volná aktivní energie pro uvolnění NADH (17 kcal mol^{-1}) je o 5 kcal mol^{-1} vyšší než pro vznik komplexu HLADH-NAD⁺ (cit.⁴¹), je tento poslední krok považován za řídicí děj reakce. V opačném směru reakce patrně nezáleží na pořadí vazby NADH a aldehydu (ketonu) v aktivním místě, ale při uvolňování produktů je disociace NAD⁺ posledním krokem. ADH vykazují při přenosu hydridového ekvivalentu na NAD⁺ stereospecifitu a lze je tak rozdělit do dvou tříd: ADH třídy A přenášející hydridový ekvivalent do *pro-R* polohy nikotinamidové části kofaktoru a ADH třídy B přenášející hydridový ekvivalent do *pro-S* polohy. Rozdíl je dán opačnou konformací nikotinamidu vázaného na apoenzym, která je způsobena jeho 180° rotací okolo glykosidové vazby s ribosou. HLADH patří do třídy A.

Krystalografická studie komplexu HLADH-NADH s rozlišením na atomární úrovni (1 Å) potvrdila platnost tohoto modelu a poskytla významnou informaci o roli molekuly vody v aktivním centru při aktivaci redukovaného nikotinamidu pro přenos hydridového ekvivalentu⁴². Ukazuje se, že hydroxylový anion je prostřednictvím zbytku Ser-48 přesunut směrem k C6 nikotinamidu a vznik NADH-OH⁻ aduktu vede k distorzi heterocyklu a redistribuci elektrického náboje na nikotinamidu nebo jeho redukované formě. Tímto způsobem může být usnadněn přenos hydridového ekvivalentu. Navíc je pravděpodobné, že tento adukt vzniká již v binárním komplexu HLADH-NAD(H) a k disociaci molekuly vody patrně není třeba snížení pK_a na 4,5 uváděné jako důsledek vazby alkoholu v aktivním centru.

3. Mikrobiální ADH skupiny I

3.1. Vzájemná identita aminokyselinových sekvencí a konzervované aminokyselinové zbytky

V současné době je dostupná celá řada primárních struktur mikrobiálních NAD(P), Zn-ADH a pro některé byla vyřešena i krystalová struktura. To umožňuje porovnání jednotlivých ADH s ohledem na předpokládaný reakční mechanismus, požadavek na kofaktor a případně i substrátovou specifitu a kvarterní strukturu. S rostoucím množstvím sekvenčních projektů lze navíc předpovědět aminokyselinovou sekvenci dalších potenciálních ADH této skupiny^{2,3}. V následujícím textu však budou diskutovány pouze vybrané mikrobiální ADH, které byly charakterizovány i biochemicky. V tabulce I jsou uvedena označení používaná pro jednotlivé ADH, jejich požadavek na kofaktor a identifikátory (přístupová čísla) v databázi Swiss-Prot, kde lze nalézt kompletní primární strukturu a další odkazy na zdroje informací o charakteristických vlastnostech dané ADH.

Rozsah identity aminokyselinových sekvencí mikrobiálních ADH (tabulka II) je obecně vyšší než při srovnání

s HLADH, která dosahuje nejvyšší identity s EcAdhC (45 %) a GsAdhT (30 %). S výjimkou EnADHII, ScADHVI a ScADHVII lze vysokou identitu převyšující 50 % pozorovat mezi ADH kvasinek a plísní a zejména pak mezi isoenzymy. Mezi bakteriálními ADH je identita menší a vysoký stupeň vzájemné identity vykazují ZmAdhA a EcAdhP (79% identita), PaAdhA a SmAdhA (66% identita) a CbAdh a TbAdh (75% identita). Posledně jmenované však, podobně jako ReAdh, RerAdh, EcAdhC, PpCamD a PpXylB vykazují poměrně nízkou identitu s ostatními mikrobiálními ADH. Aminokyselinové sekvence archaebakteriálních ApAdh a SsAdh jsou identické z 39 % a vykazují poměrně výraznou identitu pohybující se mezi 25 až 35 % i s řadou ostatních mikrobiálních ADH.

Sun a Plapp⁴³ při porovnání sekvencí živočišných ADH skupiny I našli pouze 9 konzervovaných aminokyselinových zbytků, přičemž žádný z nich se neúčastní katalýzy, ale všechny hrají strukturální roli a jsou vysoce konzervovány i v mikrobiálních ADH. Jedná se o Gly-66, 71, 77, 192, 201, 204, 236, 320 a Val-81 v sekvenci HLADH (pokud nebude uvedeno jinak, odpovídá v dalším textu číslování pozic aminokyselinových zbytků všech ADH zbytkům HLADH, jak je uvedeno v porovnání primárních struktur na obr. 4).

V mikrobiálních ADH lze navíc identifikovat další 4 přísně konzervované zbytky odpovídajících Cys-46, Asp-49, His-67 a Glu-68 (obr. 4). Tyto zbytky plní jak katalytickou, tak strukturální úlohu a jejich konzervovanost ukazuje na větší evoluční příbuznost mezi mikrobiálními ADH. Pravděpodobně nejkonzervovanějším sekvenčním motivem je sekvence Gly-His-Glu-X₂-Gly-X₅-Gly-X₂-Val mezi pozicemi 66 až 80, která obsahuje jeden z ligandů katalytického Zn²⁺ odpovídající His-67 HLADH (X značí jakoukoliv aminokyselinu). Výjimku tvoří ApAdh se substitucí Gly77Ala a EnADHII, ScADHVI a VII se substitucemi Val80Ala, Val80Ser a Val80Cys v uvedeném pořadí. Ve většině porovnaných mikrobiálních ADH je vysoce konzervována i sekvence Cys-His-(Thr nebo Ser)-Asp-X-His zbytků 46 až 51. Tuto konsezní sekvenci však díky záměně v pozici 47 neobsahují CbAdh a TbAdh s Thr-47 a ReAdh, PpCamD, ScADHVI, ScADHVII a EcTHD s Gly-47. Katalyticky významný His-51 je nahrazen Phe u EcAdhC, RerAdh, Gly u EnAdhII a Val u PpXylB.

Kromě aminokyselinových zbytků diskutovaných v následujících kapitolách jsou v porovnávaných mikrobiálních ADH vysoce konzervovány také Asp-87, Gly-199 a Ala-211.

3.2. Konzervované aminokyselinové zbytky a nábojová (protonová) štafeta

Záměna Ser-48 za Thr-48 nepředstavuje z hlediska funkce protonové štafety významný zásah do výše popsaného mechanismu katalýzy. Rozdílná velikost obou zbytků však může mít při dané velikosti štěrby aktivního místa význam s ohledem na substrátovou specifitu enzymu. Cre-

Tabulka I
Vybrané mikrobiální NAD(P), Zn-dependentní alkoholdehydrogenasy

Označení	Organismus	Kofaktor	Swiss-Prot ^a
AfADHI	<i>Aspergillus flavus</i>	NAD(H)	P47147
ApAdh	<i>Aeropyrum pernix</i>	NAD(H)	Q9Y9P9
CaADHI	<i>Candida albicans</i>	NAD(H)	P43067
CbAdh	<i>Clostridium beijerinckii</i>	NADP(H)	P25984
EcAdhC	<i>Escherichia coli</i>	NAD(H)	P25437
EcAdhP	<i>E. coli</i>	NAD(H)	P39451
EcTHD	<i>E. coli</i>	NAD(H)	P07913
EnADHI	<i>Emericella nidulans</i>	NAD(H)	P08843
EnADHII	<i>E. nidulans</i>	NAD(H)	P54202
EnADHIII	<i>E. nidulans</i>	NAD(H)	P07754
GsAdhHT	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NAD(H)	P42328
KIADHI	<i>Kluyveromyces lactis</i>	NAD(H)	P20369
KIADHII	<i>K. lactis</i>	NAD(H)	P49383
KIADHIII	<i>K. lactis</i>	NAD(H), NADP(H)	P49384
KIADHIV	<i>K. lactis</i>	NAD(H), NADP(H)	P49385
KmADHI	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NAD(H)	Q07288
KmADHII	<i>K. marxianus</i>	NAD(H)	Q9P4C2
PaAdhA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NAD(H)	Q9HTD9
PpCamD	<i>Pseudomonas putida</i>	NAD(H)	P09347
PpXylB	<i>P. putida</i>	NAD(H)	P39849
PsADHI	<i>Pichia striptidis</i>	NAD(H)	O00097
PsADHII	<i>P. striptidis</i>	NAD(H)	O13309
ReAdh	<i>Ralstonia eutropha</i>	NAD(H)	P14940
RerAdh	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NAD(H)	Q6YBW1
ScADHI	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NAD(H)	P00330
ScADHII	<i>S. cerevisiae</i>	NAD(H)	P00331
ScADHIII	<i>S. cerevisiae</i>	NAD(H)	P07246
ScADHVI	<i>S. cerevisiae</i>	NADP(H)	Q04894
ScADHVII	<i>S. cerevisiae</i>	NADP(H)	P25377
SmAdhA	<i>Shinorhizobium melioli</i>	NAD(H)	O31186
SpADHI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NAD(H)	P00332
SsADH	<i>Sulfobolus solfataricus</i>	NAD(H)	P39462
TbAdh	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	NADP(H)	P14941
ZmAdhA	<i>Zymomonas mobilis</i>	NAD(H)	P20368

^a Přístupové číslo v databázi Swiss-Prot (www.expasy.ch/sprot/)

aser a spol.⁴⁴ připravili mutantní ScADHI, v níž záměna Thr-48 za Ser-48 umožnila enzymu oxidovat i objemnější alkoholy. Ačkoliv byly vyřešeny krystalové struktury dvou enzymů s Thr-48, GsAdhHT (cit.⁴⁵) a PaAdhA (cit.⁴⁶), autoři se analýze aspektu substrátové specifity nevěnovali. Nicméně tyto studie potvrdily, že poloha postranního řetězce Thr odpovídá jeho účasti na přenosu protonu.

Z hlediska vazby kofaktoru (obr. 2) a především mechanismu funkce protonové štafety (obr. 3a) jsou zásadnější záměny v pozici His-51 za Phe v EcAdhC, RerAdh, Gly v EnADHII a EcTHD a za Val v PpXylB. Záměnu His-51 za Val, Ser, Tyr a Lys lze nalézt i u některých homologických živočišných a rostlinných ADH (cit.^{43,47}), přičemž katalytická účinnost pro oxidaci ethanolu je u variant

Tabulka II

Vzájemná identita (v %) mezi primárními strukturami mikrobiálních NAD(P), Zn-dependentních alkoholdehydrogenas^a

	HLADH	EcAdhC	CbAdh	TbAdh	ReAdh	RerAdh	EnADHII	PaAdhA	SmAdhA	GsAdhHT	EcAdhP	ZmAdhA	SpADHI	PsADHI	PsADHII	CaADHI	ScADHI	ScADHII	KmADHII	KLADHI	KLADHII	KmADHI	KLADHIV	ScADHIII	KLADHIII	AfADHI	EnADHIII	EnADHI	ScADHVI	ScADHVII	PpCamD	PpXylB	ApAdh	SsADH	EcTHD		
HLADH	*	45	19	26	21	19	12	24	22	30	23	24	19	23	20	21	23	22	21	23	24	25	23	22	22	17	20	22	15	16	21	31	20	24	26		
EcAdhC		*	20	23	24	20	17	29	25	28	25	25	23	26	25	26	25	25	23	25	24	24	25	24	22	26	24	24	11	13	24	30	19	25	26		
CbAdh			*	75	35	15	11	16	18	17	16	16	14	14	15	15	14	13	13	12	14	13	14	14	17	16	15	16	11	16	14	17	20	18	19		
TbAdh				*	35	16	11	19	18	20	20	16	17	16	16	14	16	12	14	11	15	11	15	13	14	14	13	15	17	15	19	17	19	18	19		
ReAdh					*	21	17	24	24	19	20	22	17	19	16	17	16	19	13	15	13	14	16	17	14	16	17	18	17	16	25	18	22	20	24		
RerAdh						*	25	30	31	29	28	27	24	24	27	24	23	25	23	24	25	26	23	22	22	24	22	23	18	16	21	18	33	21	23		
EnADHII							*	34	40	38	33	33	43	41	41	42	40	40	42	41	40	39	41	40	40	38	39	38	26	25	16	16	25	26	24		
PaAdhA								*	66	61	43	42	44	42	43	43	42	43	42	42	42	43	42	40	41	42	45	44	26	28	25	30	35	30	29		
SmAdhA									*	56	42	40	43	42	41	42	39	40	41	41	41	40	39	39	40	42	43	45	26	27	19	25	33	33	25		
GsAdhHT										*	52	53	44	42	41	44	41	42	40	41	41	42	41	41	41	41	40	43	42	32	29	23	28	36	33	27	
EcAdhP											*	79	36	34	34	36	35	37	34	35	35	35	34	34	35	35	36	33	25	25	22	23	27	31	24		
ZmAdhA												*	35	36	37	36	35	36	35	35	35	36	36	35	35	35	35	31	24	25	23	21	27	32	21		
SpADHI													*	51	52	52	52	52	51	49	49	50	48	48	49	53	54	49	23	24	16	20	27	26	19		
PsADHI														*	80	78	71	71	74	72	72	71	72	72	75	62	58	59	24	22	22	20	25	31	18		
PsADHII															*	76	74	75	76	74	76	74	76	74	77	61	59	58	21	21	18	19	29	30	17		
CaADHI																*	73	73	75	74	71	70	74	74	74	60	59	58	23	23	20	20	25	29	18		
ScADHI																	*	93	85	85	81	79	79	79	80	56	55	54	23	21	17	19	27	29	19		
ScADHII																		*	84	83	80	79	78	78	80	57	56	55	24	20	17	19	26	29	18		
KmADHII																			*	86	83	81	79	78	80	57	56	56	22	22	17	18	24	30	17		
KLADHI																				*	89	85	78	81	83	57	56	56	22	22	17	18	28	30	17		
KLADHII																					*	86	77	78	82	55	55	54	22	21	16	18	29	29	16		
KmADHI																						*	77	77	79	57	56	56	23	22	17	20	28	29	17		
KLADHIV																							*	82	82	57	59	57	23	21	15	20	28	30	17		
ScADHIII																								*	82	56	56	54	23	20	16	20	24	29	18		
KLADHIII																									*	59	56	55	22	20	17	20	30	29	17		
AfADHI																									*	83	81	23	23	17	19	26	29	21			
EnADHIII																										*	78	25	23	18	17	23	26	21			
EnADHI																										*	26	24	18	21	26	29	20				
ScADHVI																										*	63	15	15	21	20	20					
ScADHVII																											*	19	14	23	19	22					
PpCamD																												*	23	17	23	22					
PpXylB																													*	26	22	24					
ApAdh																													*	39	19						
SsADH																														*	20						
EcTHD																															*						

^a Porovnání bylo provedeno s použitím programu Clustal W v. 1.83 (matrice blosum 30; Gap open penalty = 5; Gap extension penalty = 0,2) na serveru ebi.ac.uk

polymorfni lidské π ADH obsahující His-51, Ser-51 a nebo Tyr-51 takřka shodná⁴⁸. Je zajímavé, že v žádné z porovnávaných ADH není His-51 zaměněn za Gln. Cílelná mutagenese tohoto zbytku za isosterický Gln totiž naznačila, že i když došlo k 11násobnému snížení katalytické účinnosti mutanta His51Gln, karboxamidová skupina může v protonové štafetě imidazolium nahradit⁴⁹. Oproti tomu Ser-51 stejně jako Lys-51 jsou teoreticky schopny nepřímé vazby s ribosou kofaktoru prostřednictvím molekuly vody, avšak v nevodném prostředí aktivního místa je tento způsob vazby nepravděpodobný, stejně jako participace obou zbytků na přenosu protonu⁵⁰. Tyr-51 je, podobně jako His-51, potenciálně schopen přímo tvořit vodíkové vazby s 2' kyslíkem ribosy, ale Davis a spol.⁴⁸ ukázali, že jeho postranní řetězec se neúčastní na přenosu vodíkového iontu. Je zřejmé, že Val, Phe a Gly nejsou schopny s ohledem na nepolární nebo chybějící postranní řetězec bezprostředně interagovat s pyrofosfátem NAD(P)H ani

vytvářet vodíkové vazby pro přenos protonu z molekuly vody. Inoue a spol.⁴⁷ ukázali, že přenosu vodíkového iontu u PpXylB s Val-51 se s největší pravděpodobností účastní imidazolová skupina His-47. Záměna His-47 za isosterický Gln totiž vedla k 125násobnému snížení katalytické účinnosti při oxidaci benzaldehydu a 400násobnému snížení účinnosti v opačném směru reakce. Další záměna, Val51His, vedoucí k dvojnásobnému mutantu His47Gln/Val51His, měla v porovnání s His47Gln mutantem za následek 12násobné zvýšení katalytické účinnosti při oxidaci a 26násobné zvýšení při redukci substrátů, což ukázalo na pouze částečné obnovení funkce protonové štafety. V navrženém reakčním mechanismu vycházejícím z experimentálních dat a počítačového modelu PpXylB, His-47 neinteraguje s pyrofosfátem kofaktoru, jak by odpovídalo analogickému Arg-47 u HLADH (obr. 2), ale je propojen vodíkovým můstkem s kyslíkem 2' hydroxyly ribosy (podobně jako His-51 u HLADH a nahrazuje jej i v tomto ohledu). Lze

spekulovat o tom, že obdobný mechanismus by mohl být řešením i pro protonovou štafetu EnADHIII, EcAdhC a RerAdh a pro odpovídající rostlinné a živočišné ADH.

3.3. Vazba katalytického Zn^{2+}

Dva z ligandů katalytického iontu Zn^{2+} , Cys-46 a His-67, jsou konzervovány ve všech porovnávaných mikrobiálních ADH (obr. 4). V pozici třetího ligandu, Cys-174, je Asp u CbAdh, TbAdh, ReAdh, Pro u ApAdh, ScADHVI, ScADHVII, Ala u PpCamD a Asn u EcTHD. Krystalové struktury určené pro CbAdh, TbAdh a ApAdh umožnily identifikovat jako třetí ligand Zn^{2+} v CbAdh a TbAdh kyslíkový atom karboxylu Asp-174 (cit.⁵¹) a v ApADH Asp-177 (cit.⁵²).

Vysoce konzervovaný Glu-68 byl v případě EcAdhP, SsAdh, CbAdh a TbAdh identifikován jako možný čtvrtý ligand Zn^{2+} , který tak vytěšňuje z vazby molekulu vody (cit.^{51,53,54}). Pro většinu NAD(P), Zn-dependenčních ADH, jejichž struktury byly vyřešeny, nejsou vysoce konzervované zbytky Glu-68 a Asp-49 považovány za přímé ligandy Zn^{2+} , ale za součást jeho druhé koordinační sféry. V případě HLADH vytváří Asp-49 vodíkový můstek s imidazolem His-67 (obr. 3a), jeden kyslík karboxylu

Glu-68 interaguje s guanidiniem Arg-369 (obr. 2) a druhý je pak lokalizován v blízkosti iontu Zn^{2+} . Postranní řetězce Asp-49 a Glu-68 zřejmě stabilizují kov v aktivním místě a prostřednictvím polarizačního efektu zvyšují elektrofilitu Zn^{2+} , čímž usnadňují přenos vodíkového ekvivalentu. Vysoce konzervovaná Glu-68 je nezbytná např. pro katalýzu u ScADHI a její záměna za Gln vedla ke ztrátě aktivity enzymu⁵⁵. Ačkoli počítačová simulace naznačila, že Glu-68 může dočasně Zn^{2+} koordinovat a usnadňovat tak výměnu substrátů a vody v průběhu katalýzy⁵⁶, výše zmíněná krystalografická studie HLADH s rozlišením na atomární úrovni⁴² se tomuto aspektu nevěnovala a z prezentované struktury nelze Glu-68 takovou roli připsat.

Možnost participace Glu-68 na přímé koordinaci Zn^{2+} v CbAdh a TbAdh zdůvoňovali Korkhin a spol.⁵¹ skutečností, že na rozdíl od silné interakce Glu-68 s Arg-369, která může být potenciálně ekvivalentní dvěma vodíkovým můstkům, je Arg-369 v CbAdh a TbAdh nahrazen Lys. S jeho ϵ -NH₂ skupinou vytváří vodíkový můstek pouze jeden z kyslíků karboxylu Glu-68 a druhý pak koordinuje Zn^{2+} . Nicméně stejná tetraedrální koordinace byla identifikována i v případě apoforem SsAdh a EcAdhP s Arg-369 (cit.^{53,54,57}). Po vazbě kofaktoru však v binárních komplexech došlo jak u SsAdh, tak TbAdh vlivem konfor-

část 1.

		***		**	
HLADH	42	ATGICRSDDHVVVSG	-----	TLVTPLPVIA	GHEAAGIVVESIGEGVT--TVRPGDKV- 89
EcAdhC	36	HTGVCHTDAFTLISGDD	-----	PEGVFPVVLGHEGAGVVEVGEVVT	--SVKPGDHVI 85
CbAdh	33	AVSPCTSDIHTV	-----	FEGALGDRKNMILGHEAVGVEVVEVGEVVK	--DFKPGDRVI 82
TbAdh	33	AVAPCTSDIHTV	-----	FEGAIGERHNMLGHEAVGVEVVEVGEVVK	--DFKPGDRVI 82
ReAdh	33	TTTICGTDVH-I	-----	LKGEYPAKGLTVGHEPVGIIIEKLGSAVT	--GYRFGQRVI 81
RerADH	34	AAGVCHSDDFIMS	-----	LPEQYTYGLPLTLGHEGACKVAAVGEGVEGLDIGNVNVVY	86
EnADHII	44	HSGVCHSDFGIMTNTW	----	KILFPPTQPGVGGHEGVGVKVKLGAGAEASGLKIGDRVG	99
PaAdhA	40	ASGVCHTDLHAAEGDW	-----	PVKPPLPFIIPGHEGVGVVAAVGSGVVT	--RVKEGDRVG 90
SmAdhA	36	ATGVCHTDLHAAKGDW	-----	PVRPNPFFIPGHEGVGVVAKLGAEVVT	--RLKEGDRVG 86
GsAdhHT	34	ACGVCHTDLHAAHGDW	-----	PVKPKLPLIPGHEGVGVVEVVEVGPVVT	--HLKVGDRVG 84
EcAdhP	33	CCGVCHTDLHVKNDF	-----	GDKTGVILGHEGIGVVAEVGPGVVT	--SLKPGDRAS 81
ZmAdhA	33	YCGVCHTDLHVKNDF	-----	GDETGRITGHEGIGIVKQVGEVVT	--SLKVGDRAS 81
SpADHI	42	YTGVCHTDLHALQGDW	-----	PLPAKMPLIGHEGAGVVKVAGVTR	--LKTGDRVG 92
PsADHI	40	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLDTKLPVGGHEGAGVVGIGSNVT	--GWEIGDYAG 90
PsADHII	40	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLDTKLPVGGHEGAGVVGALGENVT	--GWEIGDYAG 90
CaADHI	42	YSGVCHTDLHARKGDW	-----	PLATKLPVGGHEGAGVVGMCENVK	--GWKIGDFAG 92
ScADHI	40	YSGVCHTDLHAWHGDW	-----	PLPVKLPVGGHEGAGVVGMCENVK	--GWKIGDYAG 90
ScADHII	40	YSGVCHTDLHAWHGDW	-----	PLPTKLPVGGHEGAGVVGMCENVK	--GWKIGDYAG 90
KLADHI	42	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLPTKLPVGGHEGAGVVGMCENVK	--GWKIGDFAG 92
KLADHII	40	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLPTKLPVGGHEGAGVVGMCENVK	--GWNIGDFAG 90
KLADHIV	43	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLPVKLPVGGHEGAGIVVAKGENVK	--NFEIGDYAG 93
KmADHI	40	YSGVCHTDLHAWQGDW	-----	PLDTKLPVGGHEGAGIVVAMGENVT	--GWEIGDYAG 90
KmADHII	39	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLDTKLPVGGHEGAGVVGMDNVK	--GWKIGDLAG 89
ScADHIII	43	YSGVCHTDLHAWHGDW	-----	PLPVKLPVGGHEGAGVVGIGSNVK	--GWKIGDLAG 93
KLADHIII	42	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLPTKLPVGGHEGAGVVGMCENVK	--GWNIGDFAG 92
EnADHI	40	YSGVCHTDLHAMMHW	-----	PIPVKMPLVGGHEGAGIVVAKGELV	--HEFEIGDQAG 90
EnADHIII	40	YSGVCHTDLHAMKGDW	-----	PLPSKMPLIGHEGAGVVKAGELVKDEDKIGDRAG	92
AfADHI	40	YSGVCHTDLHALKGDW	-----	PLPVKMPLVGGHEGAGVVGARGDLVT	--EFEIGDHAG 90
PpCamD	36	LGGVCGSDVHIVSGE	-----	AGAMPFPIILGHEGIGRIEKLGTGVTTDYAGVPVKQG	87
ApAdh	50	GAGVCHTDLHLVQGMW	----	HELLQPKLPYTLGHENVGYIEEVAEGVE	--GLEKGDVPI 10:
SsAdh	36	--GVCHSDVHMRQGRFNLRIVEDLGVKLPVTLGHEIACKIEEVGDEVV	----	--GYSKGDVLA 91	
ScADHVI	42	ACGVCGSDIHCAGHW	-----	GNMKMPLVGGHEIIVGVKVKLGPKSN	--SGLKVGDRVG 92
ScADHVII	42	ACGICGSDFIHIAVGNW	-----	GPVPEVQILGHEIIGRVVVKVSKCH	--TGKIGDRVG 92
EcTHD	34	KTAICGTDVHIYNWDE	-----	WSQKTIIPVPMVGGHEVVGVEVVGIGQEVK	--GFKIGDRVS 86
PpXylB	36	ATGLCHTDLVCRD	-----	QHYPVPLPMVFGHEGAGVVERVGSAAVK	--KVQPGDHV- 83

Obr. 4. Porovnání vybraných úseků aminokyselinových sekvencí mikrobiálních NAD(P), Zn-dependenčních alkoholdehydrogenas; diskutované aminokyselinové zbytky jsou označeny hvězdičkou. Označení jednotlivých ADH je stejné jako v tabulce I a čísla indikují pozici prvního nebo posledního zbytku v uváděné části jejich sekvencí. Aminokyselinové zbytky konzervované alespoň ve 30 ADH jsou v rámečcích. Pomlčky upravují polohy homologních úseků, část 1.

část 2.

HLADH	91	PLFTPCGGKCRVCKHPEGNCLKND		170	CLIGCGFSITGYG	HLADH
EcAdhC	86	PLYTABEGECEFCRSGKTNLCVAVR		165	CLLGCQVTTGIG	EcAdhC
CbAdh	84	-----PCTTPDWRSLVQAGFQQHS		146	VMITDMMTSGFH	CbAdh
TbAdh	84	-----PAITPDWRTSEVQRGYHQHS		146	VMIPDMMTGTFH	TbAdh
ReAdh	83	-----GAICPNFNYSYAAQDGVASQD		159	LMCPDIMSITGFK	ReAdh
RerADH	88	PWGCNOWNHCSOGLENYCSRAQELG		-----	-----	RerADH
EnADHII	101	KWISSACGQPPQODGADGLCFNOK		159	APLLCAGVTVYA	EnADHII
PaAdhA	92	PWLYTACGCCHECLTGWETLCESEQ		150	APILCAGVTVYK	PaAdhA
SmAdhA	88	PWLHTACGCCTPRTGWETLCSQQ		146	APVLCAGVTVYK	SmAdhA
GsAdhHT	86	PWLYSACGHCDYCLSGQETLCEHOK		144	APIFCAGVTVYK	GsAdhHT
EcAdhP	83	AWFYEGCGHCEYCNNGNETLCRSVK		141	SSITCAGVTVYK	EcAdhP
ZmAdhA	83	AWFFKGGHCEYCVSGNETLCRNVE		141	SSITCAGVTVYK	ZmAdhA
SpADHI	94	KWMNSCGNCEYCMKAETTCPHIQ		152	APIMCAGITCYR	SpADHI
PsADHI	92	KWLNGSCLNCEFCQHSDEPNCAKAD		150	APILCAGITVYK	PsADHI
PsADHII	92	KWLNGSCLQCEYCVTAHESNCPDAD		150	APILCAGITVYK	PsADHII
CaADHI	94	KWLNGSOMSCFEFCQQAEPNCGEAD		152	APILCAGVTVYK	CaADHI
ScADHI	92	KWLNGSOMACEYCELGNESNCPHAD		150	APILCAGITVYK	ScADHI
ScADHII	92	KWLNGSOMACEYCELGNESNCPHAD		150	APILCAGITVYK	ScADHII
KLADHI	94	KWLNGSOMSCYEYCELSNESNCPHAD		152	APVLCAGVTVYK	KLADHI
KLADHII	92	KWLNGSOMSCYEYCELSNESNCPHAD		150	APILCAGVTVYK	KLADHII
KLADHIV	95	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD		153	APILCAGVTVYK	KLADHIV
KmADHI	92	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD		150	APILCAGVTVYK	KmADHI
KmADHII	91	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD		149	APILCAGVTVYK	KmADHII
ScADHIII	95	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD		153	APILCAGVTVYK	ScADHIII
KLADHIII	94	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD		152	APILCAGVTVYK	KLADHIII
EnADHI	92	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD		150	APVLCAGITVYK	EnADHI
EnADHII	94	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD		152	APILCAGITVYK	EnADHII
AfADHI	92	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD		150	APVLCAGITVYK	AfADHI
PpCamD	92	WAFIALCHRHCSCTVLDLTFWDNST		144	LPDHAQPEALAA	PpCamD
ApAdh	104	-HPAVTDGTCLARAGEDMHCENLE		161	VEMAPLADAGIT	ApAdh
SsAdh	93	-NFWQEGENYCRIGEEHLCDSPR		150	APLTCSGITTYR	SsAdh
ScADHVI	96	QVFSCLCQRCKNDNEPYCTKFFV--		156	HLAAPLLCGGLT	ScADHVI
ScADHVII	96	QALACFCERCCKSDNEQYCTNDH--		157	PLAAPLLCGGIT	ScADHVII
EcTHD	89	GHITCGHCRNRGRGTRHLORNTIGV		148	DPFGNAVHTALS	EcTHD
PpXylB	86	TFYTCGSCDAQLSGDPTSCANSFGP		165	GPLGCGIQTGAG	PpXylB

část 3.

HLADH	91	PLFTPCGGKCRVCKHPEGNCLKND	230	NEGFDLL-RSGE-SIRTILT	374
EcAdhC	86	PLYTABEGECEFCRSGKTNLCVAVR	225	NDAFDLM--HEGKSIIRVIRY	369
CbAdh	84	-----PCTTPDWRSLVQAGFQQHS	205	EEALLMKDKPKDLIKAVIL	351
TbAdh	84	-----PAITPDWRTSEVQRGYHQHS	205	EKAFMLMKDKPKDLIKAVIL	351
ReAdh	83	-----GAICPNFNYSYAAQDGVASQD	218	VAAVDLAFANQRDGVLKAIKIP	361
RerADH	88	PWGCNOWNHCSOGLENYCSRAQELG	209	AEAYRRLAA-GTSLGRAVVP	345
EnADHII	101	KWISSACGQPPQODGADGLCFNOK	219	TEIFKEM-EEGKLGQGRVVDL	366
PaAdhA	92	PWLYTACGCCHECLTGWETLCESEQ	208	NQILDQM-RAGQIEGRIVLEM	342
SmAdhA	88	PWLHTACGCCTPRTGWETLCSQQ	204	NAIFERM-EEGKIDGRIVL	338
GsAdhHT	86	PWLYSACGHCDYCLSGQETLCEHOK	202	NEVDFRM-LKGINGRIVLTL	336
EcAdhP	83	AWFYEGCGHCEYCNNGNETLCRSVK	200	NTIFTEM-EEGKIRGRVVDL	334
ZmAdhA	83	AWFFKGGHCEYCVSGNETLCRNVE	200	NQIFDEM-EHGKFTGRVVDL	334
SpADHI	94	KWMNSCGNCEYCMKAETTCPHIQ	211	PDVYRLM-HENKIAGRIVL	348
PsADHI	92	KWLNGSCLNCEFCQHSDEPNCAKAD	209	PKVYELM-EAGKIVGRVVDL	346
PsADHII	92	KWLNGSCLQCEYCVTAHESNCPDAD	209	ASVYELM-EQKILGRVVDL	346
CaADHI	94	KWLNGSOMSCFEFCQQAEPNCGEAD	211	PEVFKLM-EEGKILGRVVDL	348
ScADHI	92	KWLNGSOMACEYCELGNESNCPHAD	209	PEIYEKM-EKGQIVGRVVDL	346
ScADHII	92	KWLNGSOMACEYCELGNESNCPHAD	209	PEIYEKM-EKGQIAGRIVVDL	346
KLADHI	94	KWLNGSOMSCYEYCELSNESNCPHAD	211	PSIYEKM-EKGAIAGRIVVDL	348
KLADHII	92	KWLNGSOMSCYEYCELSNESNCPHAD	209	ADVYDKM-VKGEIVGRVVDL	346
KLADHIV	95	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD	212	PEAYELM-EQKILGRVVDL	349
KmADHI	92	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD	209	ASVYDKM-VKQIVGRVVDL	346
KmADHII	91	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD	208	PEIYEKM-EQKIVLGRVVDL	345
ScADHIII	95	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD	212	PKVYDLM-EKGIAGRIVVDL	349
KLADHIII	94	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD	211	PKVYELM-EQKILGRVVDL	348
EnADHI	92	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD	209	PKIYELM-EQGRIAGRIVLEM	347
EnADHII	94	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD	211	PQTFELM-GQGIAGRIVLEI	350
AfADHI	92	KWLNGSOMSCYELCQGYESNCLQAD	209	PKIFELM-EQGIAGRIVLEI	347
PpCamD	92	WAFIALCHRHCSCTVLDLTFWDNST	209	EASKALELVKAGALIKPVIDS	359
ApAdh	104	-HPAVTDGTCLARAGEDMHCENLE	225	NDVLERL-EKGEVLGRAVLIP	359
SsAdh	93	-NFWQEGENYCRIGEEHLCDSPR	211	ANEAINLNFKAIGRQVLIP	348
ScADHVI	96	QVFSCLCQRCKNDNEPYCTKFFV--	217	VHEAFERMEKGDVYRFTLVG	353
ScADHVII	96	QALACFCERCCKSDNEQYCTNDH--	218	VSHAFTRMESGDVYRFTLVG	354
EcTHD	89	GHITCGHCRNRGRGTRHLORNTIGV	202	QKGFDM-RSQ-SGKVLISW	340
PpXylB	86	TFYTCGSCDAQLSGDPTSCANSFGP	225	NRAAEDS-EKGV-TLKPVLRI	365

Obr. 4. Porovnání vybraných úseků aminokyselinových sekvencí mikrobiálních NAD(P), Zn-dependentních alkoholdehydrogenas; diskutované aminokyselinové zbytky jsou označeny hvězdičkou. Označení jednotlivých ADH je stejné jako v tabulce 1 a čísla indikují pozici prvního nebo posledního zbytku v uváděné části jejich sekvencí. Aminokyselinové zbytky konzervované alespoň ve 30 ADH jsou v rámečcích. Pomlčky upravují polohy homologických úseků, část 2. a 3.

mační změny k úplnému zrušení bezprostřední koordinace Zn^{2+} zbytkem Glu-68. V případě CbAdh a EcAdhP byl Zn^{2+} koordinován Glu-68 pouze u jedné podjednotky tetramerů holoenzymu. Role tohoto aminokyselinového zbytku při katalýze tak zůstává nevyjasněna a vzhledem k tomu, že záměna Glu-68 za Ala v TbAdh neměla na katalytickou účinnost enzymu výrazný vliv⁵⁸, tento zbytek nemusí být nutně esenciálním prvkem katalytického mechanismu.

3.4. Vazba strukturního Zn^{2+}

Dalším významným sekvenčním motivem ADH je Cys-X₂-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys, který odpovídá vazebnému motivu zinkového prstu, kde sulfhydrylové skupiny Cys vytvářejí tetraedrální koordinační sféru strukturního iontu Zn^{2+} . Zinkový prst je významný pro stabilitu řady ADH (cit.^{59,60}). Tento motiv je u většiny porovnávaných ADH lokalizován mezi zbytky odpovídajícími pozici 97 až 111 nebo 95 až 109 (obr. 4). Pro řadu dalších ADH je vazba strukturního Zn^{2+} předpovídána na základě přítomnosti nebo absence motivu zinkového prstu (chybí u RerAdh, CbAdh, TbAdh). Krystalografické studie CbADH a TbAdh, které vykazují celkovou konformaci obdobnou ostatním homologním ADH, ukázaly, že tyto dva enzymy skutečně neobsahují strukturní ion Zn^{2+} a odpovídající smyčka je u CbAdh stabilizována prostřednictvím iontových vazeb mezi Asp-89 a Lys-111 (číslování odpovídá CbAdh) a vodíkovým můstkem mezi Glu-94 a Asn-104 (cit.⁵¹).

V motivu zinkového prstu je v sekvenci ApAdh nahrazen první Cys-97 zbytkem Asp a v sekvenci SsAdh zbytkem Glu. Krystalografická studie těchto dvou enzymů z termofilních bakterií prokázaly přítomnost strukturního Zn^{2+} a účast kyslíku karboxylu Asp-97 a Glu-97 na jeho koordinaci^{52,53}. S ohledem na termostabilitu ApAdh a SsAdh byly navrženy dvě hypotézy vysvětlující opodstatněnost karboxylu v koordinační sféře strukturního Zn^{2+} . Jednou z možností navrženou pro ApAdh je, že slabší vazba mezi kyslíkem a Zn^{2+} může vést ke zrušení koordinační vazby, čímž dojde k posunu čtvrtého Cys zinkového prstu směrem k třetímu a vzniku disulfidové vazby, která může přispívat k fixaci struktury enzymu při vyšších teplotách⁵². Podrobněji byl studován tento aspekt v případě SsAdh a bylo prokázáno, že přítomnost strukturního Zn^{2+} je u tohoto enzymu nezbytná pro termostabilitu a odolnost vůči denaturačním činidlům⁶¹. Záměna Glu-97 za Cys a vytvoření „ideálního“ zinkového prstu sice neměla vliv na aktivitu enzymu při nízkých teplotách, ale negativně ovlivnila jeho termostabilitu⁶². Z krystalové struktury tohoto enzymu pak vyplývá, že jeden z kyslíků karboxylu Glu-97 koordinuje Zn^{2+} a druhý je prostřednictvím vodíkových můstků vázán k dusíkovým atomům peptidové vazby mezi zbytky Gly-99 a Asn-101 a prostřednictvím molekuly vody k přiléhající podjednotce, což patrně společně přispívá k fixaci struktury, kterou by zbytek Cys v této poloze nemohl zajistit⁵³.

3.5. Konzervované aminokyselinové zbytky a specifická vazba kofaktoru

Asp-223 je konzervována ve všech mikrobiálních NAD(H)-dependentních ADH skupiny I (obr. 4). Dostupné krystalové struktury odpovídajících bakteriálních ADH povzrují, že, podobně jako v případě HLADH (obr. 2), vytvářejí kyslíkové atomy karboxylu Asp-223 vodíkové můstky s 2' a 3' hydroxyly ribosy adenosinové části NAD(H). Stejně vodíkové můstky byly identifikovány i v počítačovém modelu ScADHI, II a III (cit.¹⁷) a s ohledem na vysoký stupeň identity (tabulka II) a homologie (obr. 4) lze jejich tvorbu předpokládat i u jiných ADH kvasinek a plísní. Fosforylace 2' hydroxyly ribosy v NADP(H) brání z důvodu elektrostatické repulze karboxylu Asp-223 a 2' fosfátu vazbě tohoto kofaktoru. Mikrobiální NADP(H)-dependentní ADH proto Asp-223 postrádají a navíc v blízkosti pozice 223 obsahují zbytek bazického Arg. V souladu s výše uvedenou rolí Asp-223, její záměna za Gly umožnila tvorbu komplexu NADP(H) s ScADHI (cit.⁶³). Naopak záměna Gly v poloze 223 za Asp umožnila vazbu NAD(H) v TbAdh (cit.⁵¹). Tyto změny však vedly ke snížení katalytické účinnosti binárních komplexů ScADHI-NADP(H) a TbAdh-NAD(H) na 1 % původní aktivity nemutovaných forem s přirozeným kofaktorem.

Závěr, že aminokyselinový zbytek 223 determinuje specifitu dané ADH vůči kofaktoru kontraindikuje skutečnost, že K1ADHII a IV obsahující Asp-223 jsou schopny využívat i NADP(H) jako kofaktor (tabulka I). S ohledem na širokou substrátovou specifitu těchto ADH Bozzi a spol.⁶⁴ předpokládají, že schopnost využívat NADP(H) je dána vysokou flexibilitou aminokyselinových zbytků v okolí šterbiny aktivního místa, která umožní deponovat zbytek Asp-223 mimo vazebné místo kofaktoru.

Vazby NAD(H) se v HLADH účastní Arg-47 a 369 (obr. 2), přičemž bazická aminokyselina Arg nebo Lys jsou v pozici 369 striktně konzervovány ve všech porovnávaných sekvencích (obr. 4). Většina mikrobiálních ADH také konzervuje v pozici 47 bazický His, pro který byla podle očekávání u ApAdh (cit.⁵²), PaAdhA (cit.⁴⁶), BsAdhHT (cit.⁴⁵), EcAdhP (cit.⁵⁴) a SsAdh (cit.⁵⁷) experimentálně prokázána role analogická Arg-47. Oproti tomu ScADHVI a VII, ReAdh a PpCamD mají v této pozici Gly a CbAdh a TbAdh obsahují Thr-47. Jak je patrné z tabulky I, záměny nesouvisí se specifitou ke kofaktoru. Z těchto ADH byly vyřešeny pouze struktury CbAdh a TbAdh a Korkhin a spol.⁵¹ roli Thr-47 při vazbě NADP(H) nepřipisují.

Lys-228, jemuž je na obr. 2 přisuzována tvorba vodíkové můstky s hydroxylem ribosy, je v mikrobiálních ADH poměrně konzervován a chybí pouze v sekvenci ZmAdhA, TbAdh, CbAdh, EnADHIII, EcAdhP a SsAdh a v ReAdh a EcTHD je v této pozici Arg. Krystalografická studie⁵⁷ ukázala, že funkci Lys-228 přebírá u SsAdh blízký

zbytek Arg (Arg-205 v sekvenci SsAdh). Z dalších aminokyselin účastnicích se přímé interakce ADH s NAD(H) byly již popsány His-51 a Ser-48 a případná diskuse významu dalších aminokyselin v blízkém okolí přesahuje rámec tohoto přehledu.

3.6. Vztah struktury ADH a substrátové specifity

Obecně je přijímána teze, že substrátová specifita enzymu je determinována především velikostí (objemem) štěrbiny aktivního místa a přítomností nabitých nebo polarizovatelných skupin. Jak bylo uvedeno pro E a S isoenzymy HLADH, velikost štěrbiny aktivního místa je dána nejen délkou postranních řetězců hydrofobních aminokyselin, ale také indukovanými změnami struktury v souvislosti s aminokyselinovými záměnami. Důležité jsou patrně objemy aminokyselinových zbytků bezprostředně uvnitř aktivního místa, zbytků na stěnách štěrbiny aktivního místa a zbytků lokalizovaných při „vstupu“ do této štěrbiny⁸. Předpoklad, že důvodem schopnosti HLADH (isoenzym E) katalyzovat v porovnání s ScADHI oxidaci objemnějších alkoholů vzhledem k menším postranním řetězcům na stěnách štěrbiny experimentálně potvrdili Creaser a spol.⁴⁴. Mutant ScADHI, v němž byl Trp-93 substituován za menší a hydrofobnější Phe a Thr-48 za menší Ser, vykazoval vyšší katalytickou aktivitu s 3 až 8 uhlíkatými alifatickými alkoholy než nemutovaná forma ScADHI.

4. Závěr

S rostoucím počtem biochemických a především krystalografických studií alkohol dehydrogenas získáváme stále detailnější náhled na vztah jejich struktury a funkce. V této práci jsme se zaměřili na mikrobiální NAD(P), Zn-dependentní ADH a pokusili jsme se shrnout poznatky o funkčním významu konzervace specifických aminokyselinových zbytků v jejich primárních strukturách. Toto srovnání také umožňuje do určité míry predikovat reakční mechanismus, požadavek na kofaktor a případně i substrátovou specifitu homologních ADH, pro něž jsou dostupné pouze údaje o primární struktuře.

Tato práce vznikala za finanční podpory MŠMT ČR (granty č. 1M6837805002 a MSM6046137305).

LITERATURA

- Jörnvall H., Persson B., Jeffery J.: *Eur. J. Biochem.* 167, 195 (1987).
- Jörnvall H., Hoog J. O., Persson B.: *FEBS Lett.* 445, 261 (1999).
- Radianingtyas H., Wright P. C.: *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 593 (2003).
- Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H., Persson B.: *Eur. J. Biochem.* 269, 4409 (2002).
- Persson B., Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H.: *Chem. Biol. Interact.* 143–144, 271 (2003).
- McKinley-McKee J. S., Winberg J. O., Pettersson G.: *Biochem. Int.* 25, 885 (1991).
- Niefind K., Müller J., Riebel B., Hummel W., Schomburg D.: *J. Mol. Biol.* 327, 317 (2003).
- Reid M. F., Fewson C. A.: *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 13 (1994).
- Kalnenieks U., Galinina N., Toma M. M., Marjutina U.: *FEBS Lett.* 522, 6 (2002).
- Gorish H.: *Biochem. Biophys. Acta* 1647, 98 (2003).
- Ander P., Marzullo L.: *J. Biotechnol.* 53, 115 (1997).
- Szamecz B., Urban G., Rubiera R., Kucsera J., Dorgai L.: *Yeast* 22, 669 (2005).
- Thomson J. M., Gaucher E. A., Burgan M. F., De Kee D. W., Li T., Aris J. P., Benner S. A.: *Nat. Genet.* 37, 630 (2005).
- Geer B. W., Dybas L. K., Shanner L. J.: *J. Exp. Zool.* 250, 22 (1989).
- Pecsenye K., Lefkovitch L. P., Giles B. E., Saura A.: *Hereditas* 121, 225 (1994).
- Chen J. S.: *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 263 (1995).
- Leskovac V., Trivic S., Pericin D.: *FEMS Yeast Res.* 2, 481 (2002).
- Roehr M. (ed.): *The Biotechnology of Ethanol Classical and Future Applications.* Wiley-VCH, Weinheim 2001.
- Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 258 (2003).
- Gray K. A., Zhao L., Emptage M.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 141 (2006).
- Hummel W.: *Trends Biotechnol.* 17, 487 (1999).
- Weckbecker A., Hummel W.: *Biotechnol. Lett.* 26, 1739 (2004).
- Ernst M., Kaup B., Müller M., Bringer-Meyer S., Sahm H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 629 (2005).
- Goodwin P. M., Anthony C.: *Adv. Microb. Physiol.* 40, 1 (1998).
- Brautaset T., Jakobsen O. M., Flickinger M. C., Valla S., Ellingsen T. E.: *J. Bacteriol.* 186, 1229 (2004).
- Ramos J. L., Marques S., Timmis K. N.: *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 341 (1997).
- Margesin R., Labbe D., Schinner F., Greer C. W., Whyte L. G.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3085 (2003).
- Larkin M. J., Kulakov L. A., Allen C. C.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 282 (2005).
- Peng X., Taki H., Komukai S., Sekine M., Kanoh K., Kasai H., Choi S. K., Omata S., Tanikawa S., Harayama S., Misawa N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 824 (2006).
- Adolph H. W., Kiefer M., Cedergren-Zeppezauer E.: *Biochemistry* 36, 8743 (1997).
- Eklund H.: *Biochem. Soc. Trans.* 17, 293 (1988).
- Adolph H. W., Zwart P., Meijers R., Hubatsch I., Kiefer M., Lamzin V., Cedergren-Zeppezauer E.:

- Biochemistry 39, 12885 (2000).
33. Bahnson B. J., Colby T. D., Chin J. K., Goldstein B. M., Klinman J. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 12797 (1997).
 34. Billeter S. R., Webb S. P., Agarwal P. K., Iordanov T., Hammes-Schiffer S.: J. Am. Chem. Soc. 123, 11262 (2001).
 35. Colby T. D., Bahnson B. J., Chin J. K., Klinman J. P., Goldstein B. M.: Biochemistry 37, 9295 (1998).
 36. Brändén C.-I., Jörnvall H., Eklund H., Furungren B., v knize: *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.) sv. 11, str. 103. Academic Press, New York 1975.
 37. Leskovac V., Trivic S., Anderson B. M.: Eur. J. Biochem. 264, 840 (1999).
 38. Andersson P., Kvassman J., Lindström A., Oldén B., Pettersson G.: Eur. J. Biochem. 133, 425 (1981).
 39. Pettersson G.: CRC Crit. Rev. Biochem. 21, 349 (1987).
 40. LeBrun L. A., Plapp B. V.: Biochemistry 38, 12387 (1999).
 41. Pocker Y., Page J. D.: J. Biol. Chem. 265, 22101 (1990).
 42. Meijers R., Morris R. J., Adolph H. W., Merli A., Lamzin V. S., Cedergren-Zeppezauer E. S.: J. Biol. Chem. 276, 9316 (2001).
 43. Sun H. W., Plapp B. V.: J. Mol. Evol. 34, 522 (1992).
 44. Creaser E. H., Murali C., Britt K. A.: Protein Eng. 3, 523 (1990).
 45. Ceccarelli C., Liang Z. X., Strickler M., Prehna G., Goldstein B. M., Klinman J. P., Bahnson B. J.: Biochemistry 43, 5266 (2004).
 46. Levin I., Meiri G., Peretz M., Burstein Y., Frolow F.: Protein Sci. 13, 1547 (2004).
 47. Inoue J., Tomioka N., Itai A., Harayama S.: Biochemistry 37, 3305 (1998).
 48. Davis G. J., Carr L. G., Hurley T. D., Li T. K., Bosron W. F.: Arch. Biochem. Biophys. 311, 307 (1994).
 49. LeBrun L. A., Park D. H., Ramaswamy S., Plapp B. V.: Biochemistry 43, 3014 (2004).
 50. Eklund H., Müller-Wille P., Horjales E., Futer O., Holmquist B., Valee B. L., Höög J.-O., Kaiser R., Jörnvall H.: Eur. J. Biochem. 193, 303 (1990).
 51. Korkhin Y., Kalb A. J., Peretz M., Bogin O., Burstein Y., Frolow, F.: J. Mol. Biol. 278, 967 (1998).
 52. Guy J. E., Isupov M. N., Littlechild J. A.: J. Mol. Biol. 331, 1041 (2003).
 53. Esposito L., Sica F., Raia C. A., Giordano A., Rossi M., Mazzarella L., Zagari A.: J. Mol. Biol. 318, 463 (2002).
 54. Karlsson A., El-Ahmad M., Johansson K., Shafqat J., Jörnvall H., Eklund H., Ramaswamy S.: Chem. Biol. Interact. 143, 239 (2003).
 55. Ganzhorn A. J., Plapp B. V. J.: Biol. Chem. 263, 5446 (1988).
 56. Ryde U.: Protein Sci. 4, 1124 (1995).
 57. Esposito L., Bruno I., Sica F., Raia C. A., Giordano A., Rossi M., Mazzarella L., Zagari A.: Biochemistry 42, 1439 (2003).
 58. Kleifeld O., Shi S. P., Zarivach R., Eisenstein M., Sagi I.: Protein Sci. 12, 468 (2003).
 59. Magonet E., Hayen P., Delforge D., Delaive E., Remacle J.: Biochem. J. 287, 361 (1992).
 60. Jelokova J., Karlsson C., Estonius M., Jörnvall H., Hoog J.O.: Eur. J. Biochem. 225, 1015 (1994).
 61. Raia C. A., Dauria S., Rossi M.: Biocatalysis 11, 143 (1994).
 62. Ammendola S., Raucci G., Incani O., Mele A., Tramontano A., Wallace A.: Protein Eng. 8, 31 (1995).
 63. Fan F., Lorenzen J. A., Plapp B. V.: Biochemistry 30, 6397 (1991).
 64. Bozzi A., Saliola M., Falcone C., Bossa F., Martini F.: Biochim. Biophys. Acta 1339, 133 (1997).
- A. Kotrbova-Kozak, J. Sajdok, and P. Kotrba**
(*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Molecular Characterization of Microbial NAD(P) and Zn-Dependent Alcohol Dehydrogenases**
- Alcohol dehydrogenases (ADHs; EC 1.1.1.1), a subset of oxidoreductases requiring NAD(P) as a cofactor, are present virtually in all life forms. Among them, Group I ADHs are Zn-dependent enzymes of ca. 350 amino acid residues. Owing to biochemical characterization and crystallographic studies on Group I ADHs allowing for information on structure-function relationship, much knowledge is available on the role of specific amino acid residues. Over the last decade a significant amount of work has been done also on molecular characterization of bacterial and yeast Group I ADHs, making it possible to estimate, among others, structure-function relationships in the ADHs for which only primary structure is available. In this paper we review the role of conserved amino acid residues of well characterized microbial NAD(P) and Zn-dependent ADHs in catalysis, sequestration of catalytic and structural zinc, cofactor binding and substrate specificity.

RASTLINNÉ LIPOXYGENÁZY – ŠTRUKTÚRA A MECHANIZMUS BOKATALÝZY

MARIÁN VANKO, IVANA HOLKOVÁ, MAREK
OBLOŽINSKÝ, FRANTIŠEK BILKA a LÝDIA
BEZÁKOVÁ

*Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiaková 8, 832 32 Bratislava
vanko@fpharm.uniba.sk*

Došlo 10.11.05, prepracované 27.3.06, prijaté 30.3.06.

Kľúčové slová: lipoxigenázy, lipoxigenázová metabolická cesta, dioxygenácia mastných kyselín, peroxidácia lipidov, oxylipíny

Obsah

1. Úvod
2. Všeobecná charakteristika LOX
3. Klasifikácia a nomenklatúra rastlinných LOX
4. Substrátová špecifita rastlinných LOX
5. Subcelulárna lokalizácia LOX
6. Štruktúra lipoxigenáz
7. Polohová špecifita produktov v LOX reakcii
8. Kinetický model katalýzy
9. Záver

1. Úvod

U rastlín je prakticky každá somatická bunka kompetentná pre aktiváciu obrannej reakcie, ktorej podstatou je aktivácia transkripcie špecifických génov. Obranná reakcia je časovo a priestorovo koordinovaný komplexný systém signálov, vedúci k expresii génov defenzívnej reakcie. Povaha environmentálneho stresového faktora a vlastnosti patogénom, resp. parazitom kódovanej molekuly – elicitora – sú dve premenné, ktoré modulujú expresiu obranných génov po kvalitatívnej i kvantitatívnej stránke.

Výskum v oblasti signalizácie a metabolizmu rastlín za posledné desaťročia priniesol detailnejší pohľad na regulačné procesy prebiehajúce v rastline na úrovni bunky. Identifikácia ako aj biochemická a molekulárno-biologická charakterizácia enzýmov pôsobiacich v jednotlivých stupňoch biosyntézy signálnych molekúl viedla k uceleniu pohľadu na tieto metabolické dráhy. Výskum v oblasti signalizácie v procesoch defenzívnych reakcií rastliny a procesov rastu a vývinu je už od začiatku spojený s lipoxigenázami.

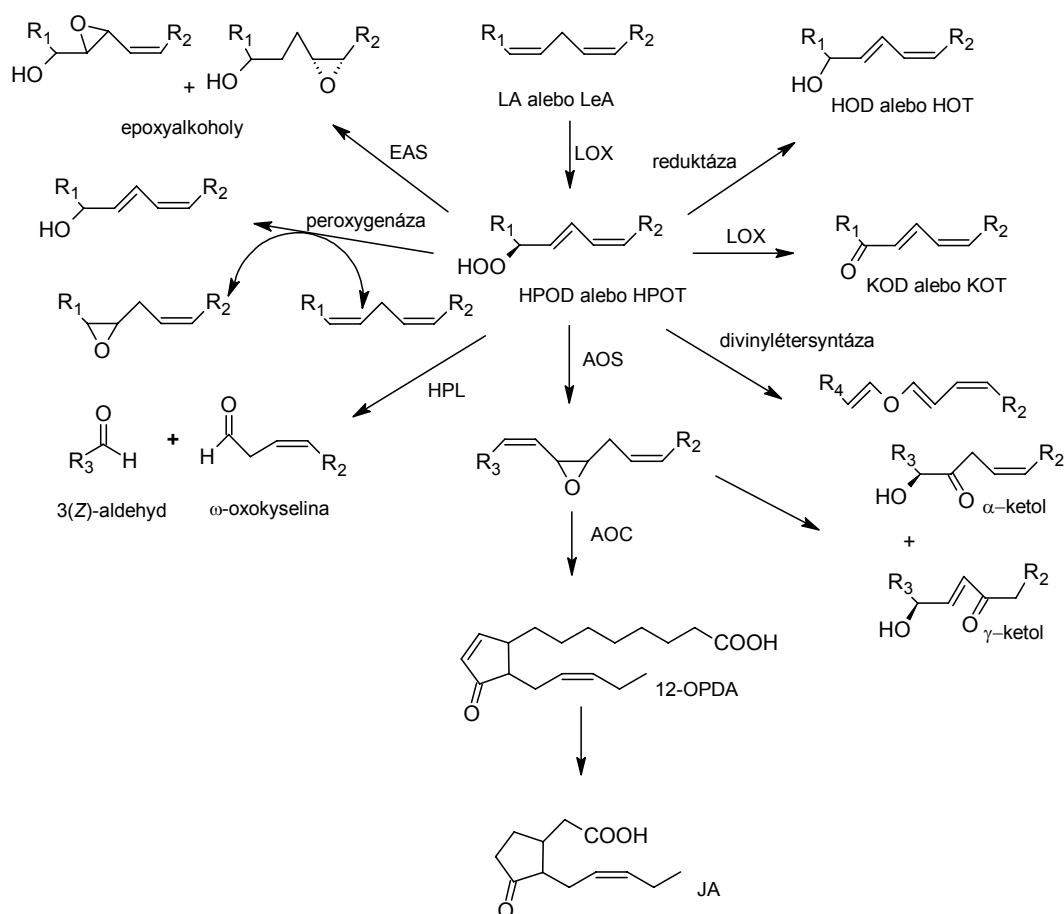
2. Všeobecná charakteristika LOX

Lipoxigenázy (LOX; linoleát : oxygen oxidoreduktázy, EC 1.13.11.12) sú rodinou dioxygenáz obsahujúcich nehémové, nesulfidové železo. Tieto enzýmy sú rozšírené v ríši rastlín i živočíchov. Katalyzujú polohovo- a stereospecifickú inzerciu molekulového kyslíka do molekuly nenasýtenej mastnej kyseliny za tvorby príslušných hydroperoxidov. Lipoxigenázy majú významné postavenie v metabolizme polynenasýtených mastných kyselín. Sú zapojené nielen do ich katabolizmu, ale aj do signalizačných procesov prostredníctvom účasti na tvorbe signálnych molekúl (kyselina jasmónová a jej deriváty). Enzýmy nadväzujúce na lipoxigenázu premieňajú hydroperoxydy mastných kyselín na zlúčeniny s rozdielnou biologickou aktivitou. V súvislosti s produkciou hydroperoxidov mastných kyselín s následným poškodením bunkových štruktúr končiacim programovanou smrťou bunky majú lipoxigenázy úlohu aj v oxidačnom strese.

Kvôli svojej pozícii na začiatku komplexnej metabolickej dráhy, označovanej ako lipoxigenázová dráha (obr. 1), lipoxigenázy limitujú dostupnosť substrátov pre enzýmy v nasledujúcich vetvách. V tomto zmysle sa stáva zaujímavým objektom štúdia pre objasnenie procesov, ktoré sú závislé od jej zapojenia do metabolizmu lipidov. Hromadia sa dôkazy naznačujúce existenciu prepojenia medzi signalizáciou jasmonátmi a biosyntézou sekundárnych metabolitov, konkrétne alkaloidov^{1,2}. Účasť lipoxigenáz v signalizačných procesoch a ich funkcie v súvislosti s oxidačným stresom a programovanou bunkovou smrťou posúva význam poznatkov o tejto enzýmovej rodine z teoretickej oblasti do roviny praktického využitia aplikácie poznatkov v medicíne a farmácii.

3. Klasifikácia a nomenklatúra rastlinných LOX

U rastlín boli identifikované 2 typy lipoxigenáz, líšiac sa polohovou izomériou tvorených produktov, ktoré sú označované ako 9-LOX a 13-LOX. Napriek tomu, že profil produktov reakcie vykazuje majoritné zastúpenie konkrétneho polohového izoméru ($\approx 95\text{--}98\%$), polohová špecifita rastlinných lipoxigenáz nie je absolútna a v niektorých prípadoch je pomer oboch polohových izomérov takmer ekvimolárny. Klasifikácia na 9-LOX a 13-LOX vychádza teda podobne ako u živočíšnych lipoxigenáz z polohovej špecifity hydroperoxidových produktov. Lipoxigenázy živočíchov sú klasifikované s ohľadom na polohovú špecifitu produktov dioxygenácie kyseliny arachidónovej^{3,4}. Keďže kyselina arachidónová nepredstavuje dominantnú zložku rastlinných lipidov, resp. nie je



Obr. 1. **Lipoxygenázová metabolická cesta**; LA – kyselina linolová, LeA – kyselina linolénová, HOD/HOT – kyselina hydroxyoktadecadiénová/hydroxyoktadekatriénová, KOD/KOT – kyselina keto-oktadecadiénová/ keto-oktadekatriénová, HPOD/HPOT – kyselina hydroperoxyoktadecadiénová/ hydroperoxyoktadekatriénová, EAS – epoxyalkoholsyntáza, LOX – lipoxygenáza, AOS – allenoxid-syntáza, 12-OPDA – kyselina 12-oxofytodiénová, JA – kyselina jasmónová

prirodeným substrátom rastlinných lipoxygenáz, sú rastlinné LOX klasifikované na 9- a 13-LOX, s ohľadom na polohovú izomériu produktov dioxygenácie kyseliny linolovej⁵. Najnovšie a zároveň komplexnejšie klasifikácie lipoxygenáz vychádzajú z komparačných analýz primárnej štruktúry lipoxygenáz⁶. Rastlinné LOX možno na základe všeobecnej sekvenčnej podobnosti rozdeliť do rodín, v rámci ktorých existujú medzidruhové rozdiely, odrážajúce evolučné vzťahy týchto molekúl. Molekulové rodiny zahŕňajú okrem uvedených rozdielov i rozdiely v subcelulárnej lokalizácii enzýmov a polohovej špecifite produktov, ktoré sú odrazom ich štrukturálnych vlastností.

Na základe sekvenčnej homológie sú v súčasnosti rastlinné LOX zatriedované do dvoch typov – LOX-1 a LOX-2. Typ LOX-1 sa vyznačuje viac ako 75% sekvenčnou podobnosťou, pričom v ich štruktúre absentuje tzv. tranzitný peptid, ktorý je charakteristický pre typ LOX-2. Táto sekvencia aminokyselín je zodpovedná za

translokáciu LOX do plastidov. Typ LOX-2, ktorý disponuje tranzitným peptidom vo svojej štruktúre, vykazuje homológiu primárnej štruktúry na úrovni 35 % (cit.⁶).

4. Substrátová špecifita rastlinných LOX

Lipoxygenázy katalyzujú dioxygenáciu polynenasýtených mastných kyselín s (1Z, 4Z)-pentadiénovým zoskupením. Nízka rozpustnosť kyseliny linolénovej vo vode obmedzuje jej využitie ako substrátu solubilných lipoxygenáz⁷. Je teda pravdepodobné, že iniciálnym substrátom v biosyntéze oktadekanoidov sú bunkových lipidy membrán, ktoré sú atakované lipoxygenázami asociovanými s biologickými membránami⁸. Na druhej strane, zvýšená aktivita fosfolipázy A₂ pozorovaná pri elicitácii bunkových kultúr a poranení intaktných rastlín naznačuje analógiu so signálnymi kaskádami u živočíchov, kde sub-

strát pre tvorbu prostaglandínov a leukotriénov uvoľnený z lipidov membrán špecifickou fosfolipázou využívajú cyklooxygenázy a lipoxygenázy. U dvoch 13-LOX izolovaných zo sóje (typ LOX-1) a jednej 13-LOX z korenkov uhorky bola preukázaná utilizácia mastných kyselín viazaných vo fosfolipidoch^{9,10}, čím sa potvrdilo zapojenie LOX do zvyšovania permeability membrán. Dôsledkom zmeny fyzikálno-chemických vlastností membrán vyplývajúcej zo zmeny ich zloženia je zvýšenie toku asimilátov a iónov¹¹ cez membránové štruktúry. U 13-LOX z lipidových teliesok uhorky, u 13-LOX z kľúčnych rastlín jačmeňa a u vegetatívneho zásobného proteínu LOX (VLXD) z listov sóje bola preukázaná aktivita na reťazcoch esterifikovaných mastných kyselín^{12,13}. Na základe súčasných poznatkov z experimentov *in vitro* a analýz lipidov zastúpených v membránach nemožno jednoznačne vysloviť záver, či lipoxygenázy preferujú voľné alebo esterovo viazané mastné kyseliny. Dá sa predpokladať, že preferovanie jedného, alebo druhého typu substrátu súvisí s biologickou funkciou konkrétnej izoformy LOX.

5. Subcelulárna lokalizácia LOX

Ukázalo sa, že väčšina rastlinných lipoxygenáz patrí medzi solubilné proteíny^{5,8,14}. V rastlinných bunkách bol popísaný viacnásobný výskyt lipoxygenáz vo viacerých subcelulárnych kompartmentoch súčasne. Popri cytosolových lipoxygenázach¹⁵ boli identifikované i LOX vo vonkajšej vrstve lipidových teliesok^{16,17}, v chloroplastoch^{18–20}, tiež v mitochondriách²¹ a vo vakuolách^{22,23}. V kľúčnych listoch rôznych rastlín sa popri solubilných LOX našli i membránovo viazané izoformy lokalizované v mikrozómoch²⁴ a v plazmatickej membráne²⁵. Presnejšia subcelulárna lokalizácia v mitochondriách nebola zatiaľ popísaná, pretože po deštrukcii mitochondrií sonikáciou nebolo možné určiť, či enzým pochádza z matrixu alebo z membrány. Zatiaľ nebola popísaná ani štruktúra tohto enzýmu, ktorá by odhalila prítomnosť *N*-terminálnej aminokyselinovej sekvencie charakteristickej pre membránovo asociované lipoxygenázy.

Dôkazy rozdielnej subcelulárnej lokalizácie lipoxygenáz nábádajú k úvahám o zapojení jednotlivých izoenzýmov v konkrétnych oddieloch bunky do procesov tvorby odlišných oxylipínov. Paralelne s objavom enzýmových izoform lipoxygenáz vznikla potreba klasifikácie a systematizácie členov tejto veľkej rodiny proteínov.

6. Štruktúra lipoxygenáz

Aminokyselinová sekvencia polypeptidového reťazca LOX bola študovaná vo viacerých biologických zdrojoch. Zatiaľ však boli zdokumentované kryštálové štruktúry proteínov len u dvoch lipoxygenáz – sójovej v ríši rastlín a kráľičej v ríši živočíchov. Tieto proteíny zdieľajú všeobecný spôsob usporiadania sekundárnej štruktúry

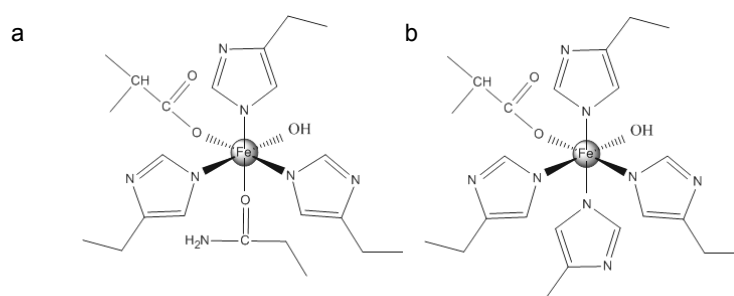
a obsahujú veľmi podobné väzbové miesta s nehemovým železom^{26–29} (viz obr. 2).

Sójová LOX-1 (m.h. 94,3 kDa) pozostáva zo sekvencie 839 aminokyselín^{27,30}. Molekula má tvar elipsoidu rozmerov cca 900 × 650 × 600 nm (cit.⁹). Sekundárna štruktúra sójovej lipoxygenázy pozostáva hlavne z α -helikálne usporiadaných častí polypeptidového reťazca.

Proteín rastlinných lipoxygenáz je tvorený jednoduchým polypeptidovým reťazcom s relatívnou molekulovou hmotnosťou v rozmedzí 94–104 kDa (cit.⁹). V štruktúre rastlinných lipoxygenáz možno rozlíšiť 2 domény: menšiu *N*-terminálnu doménu (doména I) a väčšiu *C*-terminálnu doménu (doména II) obsahujúcu aktívne miesto²⁶. Vzhľadom na prítomnosť bočných reťazcov aminokyselín zodpovedajúcich za katalytickú aktivitu v *C*-koncevej časti lipoxygenázy (doména II) je táto doména alternatívne označovaná aj ako katalytická.

Katalytická doména pozostáva z 18–22 α -helikálne usporiadaných úsekov polypeptidového reťazca a jedného (kráľičia LOX) alebo dvoch (sójová LOX) antiparalelných β -listov, ktoré formujú kavitu aktívneho miesta. Okolie centrálného kovového atómu bolo analyzované röntgenovou štruktúrnou analýzou³¹. Aktívnym miestom sójovej LOX prebiehajú dva dlhé centrálné helixy (helix 9 a helix 18), ktoré majú vnútorný π -helikálny úsek³². Zriedkavo sa vyskytujúce π -helikálne usporiadanie polypeptidového reťazca vytvára v helixe natiahnutie, umožňujúce účasť postranných reťazcov histidínu na tvorbe koordinačnej väzby s $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (cit.³³). Tri histidínové ligandy pre atóm železa vykazujú evolučnú konzervovanosť^{34,35}. U rastlinných lipoxygenáz je kation železa ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) okrem imidazolových kruhov histidínu koordinovaný karboxylovou skupinou *C*-terminálneho izoleucínu, kyslíkom karbamidovej skupiny asparagínu a hydroxidovým aniónom, resp. molekulou vody. Rovnako ako imidazolové ligandy v postranných reťazcoch histidínu, je pre zachovanie funkcie esenciálny *N*-terminálny izoleucín^{36,37}. Pozícia hydroxidového aniónu v smere do kavity poukazuje na jeho funkciu pri odtrhnutí vodíkového radikálu (H^{\cdot}) zo substrátu. Karboxylová skupina *C*-terminálneho izoleucínu a karbamidová skupina asparagínu sú lokalizované v neväzbovej vzdialenosti od kationu železa. Medziatómová vzdialenosť vylučuje existenciu kovalentnej väzby medzi Fe^{2+} a asparagínom²⁸. Asparagín, koordinačne viazaný ku kationu železa, je štruktúrnym znakom rastlinných lipoxygenáz. Živočíšne lipoxygenázy majú na tejto koordinačnej pozícii imidazolový ligand – histidín^{36–38}.

Prvé kryštalografické analýzy lipoxygenázy ukázali existenciu dlhej tenkej dutinky prechádzajúcej molekulou lipoxygenázy, ktorá je vyplnená vodou. V súčasnosti sú identifikované a čiastočne charakterizované dve také formácie u sójovej LOX-1 (sLO-1) a tri u sójovej LOX-3 (sLO-3). Do *C*-terminálnej domény ústia dve kavity označované ako I a II, zbíhajúce sa v oblasti aktívneho miesta. Lievikovito formovaná kavita I predstavuje prístupovú cestu pre molekulu kyslíka do reakčného centra s kationom železa. Dlhá a tenká kavita II, umožňujúca



Obr. 2. Aktívne miesto rastlinných lipoxygenáz (a) a živočíšnych lipoxygenáz (b)

vstup molekuly polynenasýtenej mastnej kyseliny plní funkciu väzbového miesta pre substrát. Zvláštnosťou sójovej LOX-3 (sLO-3) je prítomnosť tretej kavity, prebiehajúcej od miesta väzbového železo k rozhraniu β -valca v *N*-terminálnej doméne a katalytickej domény. Kavita III, väzbové miesto železa a kavita II formujú súvislý kanálik cez molekulu proteínu.

N-terminálna doména u lipoxygenáz z oboch zdrojov (živočíšna i rastlinná) je tvorená z 8 antiparalelných β -listov formujúcich valec (tzv. β -barel), pričom u rastlinného enzýmu je táto doména signifikantne väčšia (150 AK) v porovnaní so živočíšnym enzýmom (110–115 AK). *N*-koncová doména predstavuje ďalšiu odlišnosť medzi rastlinnými a živočíšnymi lipoxygenázami. Hoci funkcia β -valca nie je potvrdená, na základe podobnosti s C2 doménou niektorých lipáz sa predpokladá jeho význam pri asociácii enzýmu s biologickými membránami²⁹. Táto funkcia bola potvrdená u lipoxygenázy z lipidových teliesok uhoriek³⁹. Toto usporiadanie zohráva podobnú funkciu u živočíšnej 5-LOX pri asociácii s membránou bunkového jadra⁴⁰.

7. Polohová špecifita produktov v LOX reakcii

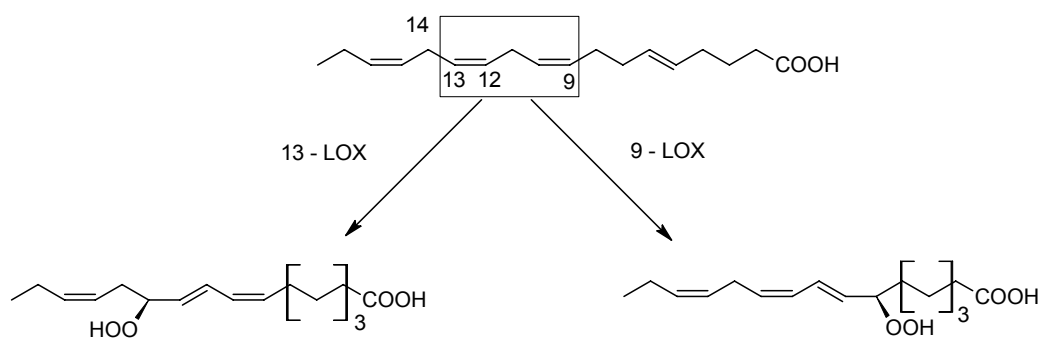
Pozícia dioxygenácie polynenasýtenej mastnej kyseliny vedúca k hydroperoxidovému produktu vyplýva z mechanizmu katalýzy reakcie sprostredkovej lipoxygenázami. Polohová špecifita lipoxygenáz je výsledkom dvoch procesov: *i*) polohovo- a stereo-špecifickej eliminácie atómu vodíka z reťazca mastnej kyseliny obsahujúceho viaceré alylmetylenové motívy (napr. kyselina linolénová, arachidónová alebo eikozapentaénová), *ii*) polohovo- a stereošpecifickej inercie molekule kyslíka.

V prvom kroku dochádza k eliminácii vodíkového radikálu z atómu uhlíka, ktorý sa v dôsledku orientácie substrátu v aktívnom mieste dostáva do dosahu hydroxidovej skupiny na koordinačnej sfére kationu železa, zodpovedajúcej za tento krok. Tento proces je závislý na „hlbke“ vniknutia substrátu do väzbového miesta enzýmu

a optimálnej vzájomnej priestorovej orientácie dvojice enzým–substrát. Vzniknutý radikál je stabilizovaný rezonančným efektom, z čoho v závislosti od polohy násobných väzieb v molekule substrátu vyplývajú 2 potenciálne polohy inercie molekule kyslíka. Radikál môže teoreticky prešmykovať v smere [+2] alebo [–2] vzhľadom na polohu eliminácie vodíkového radikálu. Priestorové vlastnosti reakčného centra obmedzujú možnosti naviazania O₂ z dvoch pozícií len na jednu. Poloha eliminácie atómu vodíka, spôsob stabilizácie utvoreného radikálu a priestor aktívneho centra tak tvoria kritériá determinujúce polohovú izomériu hydroperoxidu mastnej kyseliny, ktorý vzniká v dioxygenačnej reakcii katalyzovanej lipoxygenázou.

8. Kinetický model katalýzy

Lipoxygenázy katalyzujú polohovo- a stereošpecifickú dioxygenáciu mastných kyselín a lipidov na chirálne konjugované hydroperoxydy týchto substrátov. Kinetický model katalýzy dioxygenácie nenasýtených mastných kyselín bol navrhnutý na základe detailnejšieho štúdia sójovej lipoxygenázy (sLO). Lipoxygenázy pracujú usporiadaným bi-uni mechanizmom, v ktorom kyselina linolénová resp. linolová iniciálne reaguje s katalytickým centrom enzýmu (Fe³⁺-OH) za vzniku radikálu mastnej kyseliny⁴⁴. Tento krok je nasledovaný interakciou rezonančne stabilizovaného radikálu s molekulou kyslíka, prístupujúcou do aktívneho miesta enzýmu inou dutinkou ako polynenasýtená mastná kyselina. Vznik radikálu mastnej kyseliny (L[•]) je krok, v ktorom hydroxidový anión (Fe³⁺-OH) na koordinačnej sfére železa (obr. 3) odtrhne a prijme z (1*Z*,4*Z*)-pentadiénového systému mastnej kyseliny vodíkový radikál (H[•])^{30,44,45} pričom dochádza k redukcii kationu železa (Fe²⁺-OH₂)⁴⁶. Kyslík (O₂) sa rýchlo zlučuje s radikálovým intermediátom za vzniku hydroperoxylového radikálu mastnej kyseliny, ktorý zaniká prebratím vodíkového radikálu z redukovanej formy železa (Fe²⁺-OH₂). Mechanizmus dioxygenácie nenasýtených mastných kyselín je uvedený na obr. 4. Hoci prítomnosť Fe-centier



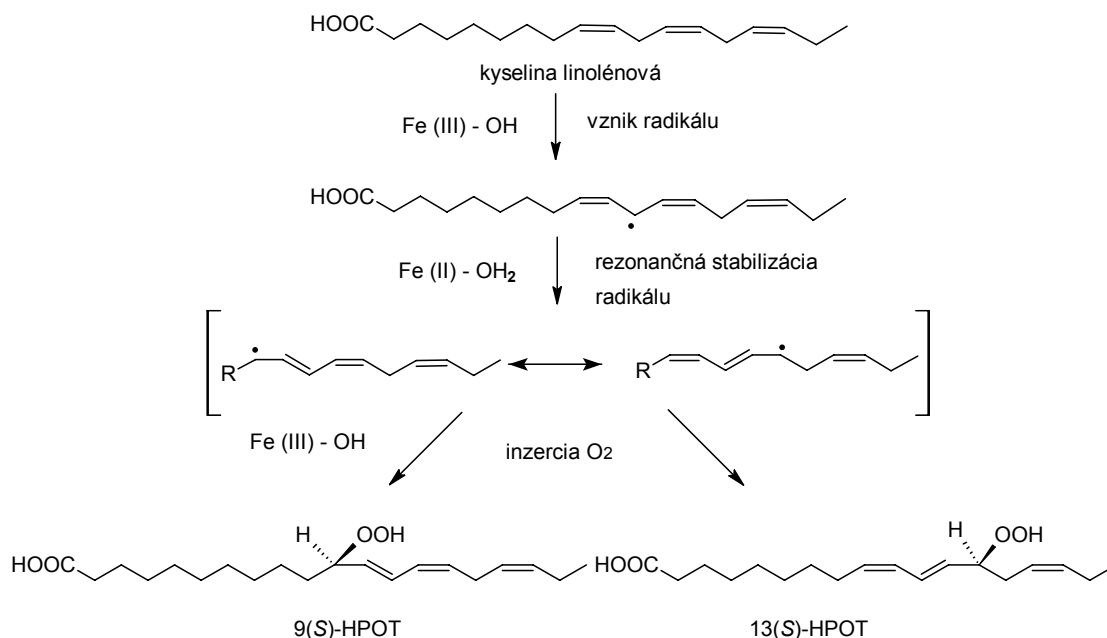
Obr. 3. Polohové izoméry hydroperoxidových produktov reakcie katalyzovanej lipoxygenázou

u oxygenáz je často nevyhnutná pre aktiváciu molekuly kyslíka, neexistuje relevantný dôkaz o interakcii tohto kofaktora s molekulou O_2 počas žiadneho stupňa katalytického cyklu⁴⁴.

Za podmienok saturácie enzýmu kyslíkom (O_2) je tvorba radikálového intermediátu (L^*) krokom, ktorý limituje rýchlosť dioxygenácie mastných kyselín⁴⁷. V neprítomnosti O_2 dochádza k hromadeniu radikálov polynenasýtených mastných kyselín. Akumulácia radikálov je pozorovateľná spektroskopicky ako úbytok absorpcie UV charakterizujúci mieru oxidácie Fe^{3+} (cit.⁴⁸), resp. EPR signál zodpovedajúci radikálu mastnej kyseliny (L^*)

(cit.⁴⁹).

Ireverzibilné odtrhnutie vodíkového radikálu (H^*) z mastnej kyseliny kineticky rozdeľuje celkovú katalýzu na 2 čiastkové reakcie – redukčnú a oxidačnú⁴⁴. Vyššie popísaná redukčná fáza zahŕňa udalosti od vstupu a priestorovej orientácie substrátu v aktívnom mieste až po vytvorenie radikálu mastnej kyseliny (L^*). Na rozdiel od redukčnej fázy je oxidačná fáza zatiaľ málo popísaná. Neobjasnené zostávajú i ďalšie detaily enzymovej katalýzy, vrátane spôsobu vnikania molekulového kyslíka do reakčného centra a vstupu mastnej kyseliny do blízkosti oktaedrálného komplexu železa.



Obr. 4. Mechanizmus dioxygenácie mastných kyselín lipoxygenázami; (9S)-HPOT – kyselina (9S)-hydroperoxyoktadekatriénová, (13S)-HPOT – kyselina (13S)-hydroperoxyoktadekatriénová

9. Záver

Za posledných 10 rokov postúpilo poznanie lipoxygenáz, ich funkcií a lokalizácie v rastlinných bunkách značne dopredu, a to najmä vďaka kombinovanému genetickému a biochemickému prístupu k štúdiu oktadekánovej (lipoxygenázovej) dráhy. Znalosti o štruktúre lipoxygenáz sú viazané na úspešnosť pokusov o ich izoláciu, purifikáciu a následnú kryštalizáciu proteínov. Doteraz bola úspešne vyriešená štruktúra len u sójovej a králičej lipoxygenázy. Súčasné poznatky o štruktúre rastlinných LOX vychádzajú teda zo štúdia kryštálovej štruktúry sójovej lipoxygenázy a identifikácie sekvencie aminokyselín lipoxygenáz z iných rastlinných a živočíšnych zdrojov. Rovnako aj dnešné predstavy o mechanizme katalýzy dioxygenácie mastných kyselín sú výsledkom kombinovania rôznych prístupov. Mechanizmus zabezpečenia polohovej špecifity a stereošpecifity lipoxygenáz bol navrhnutý na základe znalostí o priestorovom usporiadaní aktívneho miesta enzýmu a vplyvu zmien primárnej štruktúry v tejto časti molekuly enzýmu. Poznatky o rastlinných lipoxygenázach možno úspešne aplikovať aj na živočíšne lipoxygenázy na základe pomerne vysokej homológie týchto enzýmov.

Vo väčšine prác sa predpokladá, že rastlinné lipoxygenázy pôsobia *in vivo* na voľné nenasýtené mastné kyseliny rovnako ako pri experimentoch s izolovanými LOX. Najnovšie experimentálne práce prinášajú dôkazy o pôsobení lipoxygenáz na esterovo viazané substráty. Tento typ lipoxygenáz bol identifikovaný napr. v lipidových telieskach a chloroplastoch. Pôsobenie chloroplastových LOX na esterifikované substráty je zaujímavé z hľadiska objasnenia postavenia lipoxygenáz v transdukcii signálov na environmentálne podnety. Napriek výrazným pokrokom v štúdiu lipoxygenáz zostávajú stále niektoré aspekty naďalej neobjasnené a sú predmetom ďalšieho úsilia v poznávaní týchto enzýmov.

LITERATURA

- Menke F. L. H., Parchman S., Mueller M. J., Kijne J. W., Mamelink J.: *Plant Physiol.* 119, 1289 (1999).
- Haider G., von Schrader T., Fusslein M., Blechert S., Kutchan T. M.: *Biol. Chem.* 381, 741 (2000).
- Yamamoto S.: *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117 (1992).
- Schewe T., Rapaport S. M., Kühn H.: *Adv. Enzymol. Mol. Biol.* 58, 191 (1986).
- Gardner H. W., Weisleder D., Plattner R. D.: *Plant Physiol.* 97, 1059 (1991).
- Shibata D., Axelrod B.: *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 12, 213 (1995).
- Brash A. R.: *J. Biol. Chem.* 274, 23679 (1999).
- Siedow J. N.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42, 145 (1991).
- Brash A. R., Ingram C. D., Harris T. M.: *Biochemistry* 26, 5465 (1987).
- Matsui K., Nishioka M., Ikeyoshi M., Matsumura Y., Mori T., Kajiwaru T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1390, 8 (1998).
- Serhan C., Anderson P., Goodman E., Dunham P., Weissman G.: *J. Biol. Chem.* 256, 2736 (1981).
- Fuller M. A., Weichert H., Fischer A. M., Feussner I., Grimes H. D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 146 (2001).
- Holtman W. L., Vredenburg-Heistek J. C., Schmitt N. F., Feussner I.: *Eur. J. Biochem.* 248, 452 (1997).
- Hildebrand D. F.: *Physiol. Plant.* 76, 249 (1989).
- Wang C. X., Avdiushko S., Hildebrand D. F.: *Plant Mol. Biol.* 40, 783 (1999).
- Feussner I., Kindl H.: *FEBS Lett.* 298, 223 (1992).
- Matsui K., Irie M., Kajiwaru T., Hatanaka A.: *Plant Sci.* 85, 23 (1992).
- Budnitskaia E. V., Borisova I. G.: *FEBS Lett.* 24, 359 (1972).
- Feussner I., Hause B., Vörös K., Parthier B., Wastermack C.: *Plant J.* 7, 949 (1995).
- Schaffrath U., Zabbai F., Dudler R.: *Eur. J. Biochemistry* 267, 5935 (2000).
- Braidot E., Petrusa E., Micolini S., Tubaro F., Vianello A., Macri F.: *J. Exp. Bot.* 55, 1655 (2004).
- Trannbarger T. J., Franceschi V. R., Hildebrand D. F., Grimes H. D.: *Plant Cell* 3, 973 (1991).
- Vernooy-Gerritsen M., Leunissen J. L. M., Veldink G. A., Vliegenhart J. F. G.: *Plant Physiol.* 76, 1070 (1984).
- Feussner I., Kindl H.: *FEBS Lett.* 298, 223 (1992).
- Nellen A., Rojahn B., Kindl H.: *Z. Naturforsch.* 50c, 29 (1995).
- Boyington J. C., Gaffney B. J., Amzel L. M.: *Biochem. Soc. Trans.* 3, 744 (1993).
- Minor W., Steczko J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J. T., Walter R., Axelrod B.: *Biochemistry* 35, 10687 (1996).
- Skrzypczak-Jankun E., Amzel L. M., Kroa B. A., Funk M. O.: *Proteins* 29, 15 (1997).
- Gillmor S. A., Villasenor A., Fletcher R., Sigal E., Browner M. F.: *Nat. Struct. Biol.* 4, 1003 (1997).
- Tomchick D. R., Phan P., Cymborowski M., Minor W., Holman T. R.: *Biochemistry* 25, 7509 (2001).
- Minor W., Steczko J., Bolin J. T., Otwinowski Z., Axelrod B.: *Biochemistry* 32, 6320 (1993).
- Boyington J. C., Gaffney B. J., Amzel L. M.: *J. Biol. Chem.* 265, 12771 (1990).
- Gaffney B. J.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25, 431 (1996).
- Steczko J., Axelrod B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 686 (1992).
- Steczko J., Donoho G. P., Clemens J. C., Dixon J. E., Axelrod B.: *Biochemistry* 31, 4053 (1992).
- Chen X.-S., Kurre U., Jenkins N. A., Copeland N. G., Funk C. D.: *J. Biol. Chem.* 269, 13979 (1994).
- Hammarberg T., Zhang Y. Y., Lind B., Radmark O., Samuelsson B.: *Eur. J. Biochem.* 230, 401 (1995).
- Suzuki H., Kishimoto K., Yoshimoto T., Yamamoto

- S., Kanai F., Ebina Y., Miyatake A., Tanabe T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1210, 308 (1994).
39. May C., Höhne M., Gnau P., Schwennesen K., Kindl H.: *Eur. J. Biochem.* 267, 1100 (2000).
 40. Chen X.-S., Funk C. D.: *J. Biol. Chem.* 276, 811 (2001).
 41. Feussner I., Kühn H., Wasternack C.: *Trends Plant Sci.* 6, 268 (2001).
 42. Hornung E., Walther M., Kühn H., Feussner I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4192 (1999).
 43. Jisaka M., Kim R. B., Boeglin W. E., Brash A. R.: *J. Biol. Chem.* 275, 1287 (2000).
 44. Glickman M. H., Klinman J. P.: *Biochemistry* 35, 12882 (1996).
 45. Scarrow R. C., Trimitsis M. G., Buck C. P., Grove G. N., Cowling R. A., Nelson M. J.: *Biochemistry* 33, 15023 (1994).
 46. Lehnert N., Solomon E. I.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 294 (2003).
 47. Glickman M. H., Klinman J. P.: *Biochemistry* 34, 14077 (1995).
 48. Jonsson T., Glickman M. H., Sun S. J., Klinman J. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 10319 (1996).
 49. Nelson M. J., Cowling R. A., Seitz S. P.: *Biochemistry* 33, 4966 (1994).

M. Vanko, I. Holková, M. Obložinský, F. Bilka, and L. Bezáková (*Department of Cell and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Plant Lipoxygenases – Structure and Mechanism of Biocatalysis**

Lipoxygenases (LOX; EC 1.13.11.12) catalyse regio- and stereospecific insertion of molecular oxygen into the (Z,Z)-penta-1,4-diene system of polyunsaturated fatty acids, producing fatty acid hydroperoxides. Plant lipoxygenases are involved in lipid degradation, regulation of growth and development, senescence and also in defense reactions of plants. Resolution of LOX crystal structure, determination of amino acid sequence in LOX proteins and steric properties of their active sites, spectrophotometric observation of cyclic changes in the iron oxidation state, and the radical formation in the catalysis resulted in the present knowledge of LOX catalytic mechanisms. The presence of several enzyme isoforms in the same cell and evidence of their different subcellular localization leads to the speculation that diverse isoforms could be involved in different branches of lipoxygenase metabolic pathways. Today, LOXs are studied as enzymes that take part in signal transduction processes in plant cells.

VŠCHT Praha přijme pro Ústav chemického inženýrství technika/laboranta

Náplň práce:

Experimentální práce na poloprovodních aparaturách (např. nádoba s mechanickými míchadly, destilační kolona), v některých případech řízených počítačem, zpracování experimentálních dat na PC. Technické zabezpečení: zásobování chemikáliemi a jejich příprava (míchání roztoků, odměrná analýza), údržba a montáže při výstavbě a rekonstrukcích experimentálních zařízení, údržba a inventarizace technického zázemí.

Požadavky:

SŠ technického/chemického směru, MS Office

Nabízíme:

zajímavou práci v moderně vybavené laboratoři
příležitost k profesnímu rozvoji
pracoviště v blízkosti metra
zaměstnanecké výhody (pružnou pracovní dobu, příspěvek na stravování, rekreaci, penzijní připojištění, návštěvu kulturních zařízení)

Nástup: dle dohody

Kontakt: doc. Dr. Tomáš Moucha, tel. 220443299, 728870278

ROZMRAZOVACÍ SMĚSI A JEJICH VLIV NA OKOLÍ LETIŠŤ

IVO JIŘÍČEK^a, JAN MACÁK^a, VÁCLAV JANDA^a, MARTINA PAZDEROVÁ^b
a PAVEL MALÝ^b

^a Ústav energetiky, Fakulta technologie ochrany prostředí, VŠCHT Praha, Technická 6, 166 28 Praha 6, ^b Výzkumný a zkušební letecký ústav, a.s., Beranových 130, 199 05 Praha -Letňany
jiriceki@vscht.cz

Došlo 3.3.06, přijato 12.10.06.

Klíčová slova: rozmrazovací a mrazuvzdorné látky, aditiva, koroze, toxicita

Obsah

1. Úvod
2. Rozmrazování a mrazuvzdornost
3. Kapaliny pro ošetření letadel
 - 3.1. Aditiva kapalin
4. Prostředky na letištní plochy
 - 4.1. Aditiva prostředků
 - 4.2. Domácí směs na plochy
5. Vliv na prostředí letišť
6. Závěr

1. Úvod

Bezpečný provoz na letištích v zimním období je závislý na dostatečném rozmrazování pojezdových ploch a letadel před vlastním vzletem. Námraza na křídle v podobě středně hrubého smirku podstatně snižuje aerodynamický vztlak¹ a uvolnění ledu z trupu může poškodit vzadu umístěné motory. Prostředky pro rozmrazování na letištích představují směsi chemických látek, které ovlivňují materiály i životní prostředí v okolí letišť. Chemický vliv na materiály letadel, letištní techniku a vybavení odletových a přistávacích drah se projevuje jako degradace a koroze podvozků, pohyblivých regulačních prvků, citlivých elektronických systémů, pojezdových a postřikových vozů či osvětlení a signalizace pojezdových ploch.

Používané chemické prostředky obsahují složky snižující teplotu tání ledu a aditiva. Bez aditiv, tvořících asi 2 % obsahu, by žádný z prostředků neprošel náročným certifikačním řízením. Negativní stránkou aditivace je zvýšení toxicity, prodloužení doby biologické rozložitelnosti směsi a zvětšení spektra látek, které se tak dostávají do půdy

a odpadních vod letišť. Výsledkem jsou regulace na letištích, které prosazují stále vyšší restriktce na skladování, kvalitu a použití rozmrazovacích prostředků a dále množství vypouštěných vod s obsahem rozmrazovacích složek.

2. Rozmrazování a mrazuvzdornost

Mechanické odstraňování sněhu je mnohem efektivnější při současném použití chemických přípravků. Rozmrazovací prostředky mají za úkol porušení adhezní vazby mezi povrchem a ledem a dále působit preventivně proti jeho další kumulaci. Rozmrazovací prostředky se používají na odstranění již existující vrstvy sněhu a ledu. Výhodnější způsob, který šetří dávku, je zabránění vzniku vazby načasováním aplikace prostředku na čistý povrch ještě před vznikem námrazy. Takové prostředky se nazývají mrazuvzdorné a obsahují další aditiva jako například zahušťovadla, která umožňují delší setrvání prostředku na povrchu.

V praxi se však čistě mrazuvzdorné kapaliny používají pouze na letadla. Použití na dráhy je sporné. Vyžaduje monitoring počasí a hodnocení času odezvy na jeho změny. I přesto se může stát, že při předpovědi blížící se sněhové bouřky a následné aplikaci mrazuvzdorného prostředku se bouřka na poslední chvíli oblasti vyhne nebo nedojde ke kumulaci očekávaného množství sněhu. Letiště pak nemusí souhlasit s odměnou za odvedenou práci. Chemické prostředky na dráhy se proto aplikují současně s mechanickým odstraňováním sněhu až po prvním spadu sněhu a výrobci deklarují, že jejich prostředky mají integrovanou funkci: rozmrazovací i mrazuvzdornou. Rozlišovat prostředky podle jejich funkce na rozmrazovací a mrazuvzdorné tak má smysl pouze u kapalin na letadla. Prostředky na plochy budeme dále označovat jako rozmrazovací s vědomím jejich integrovaného charakteru.

3. Kapaliny pro ošetření letadel

Přestože k rozmrazování letadel jsou navrhovány i prostředky na přírodní bázi jako např. koncentrát máčecí vody mokrého mletí kukuřice², Společností automobilových inženýrů SAE, Mezinárodní organizací pro normy ISO a Evropskou asociací leteckých dopravců AEA jsou certifikované pouze ethylenglykol, diethylenglykol a propylenglykol^{3–5}. Diethylenglykol má nejvyšší teplotu eutektika, u ethylenglykolu byla zjištěna toxicita při požití, a proto je propylenglykol nejvíce prosazovanou alternativou⁶. Přehled kapalin je uveden v tabulce I.

Ochranu proti další akumulaci námrazy, sněhu nebo ledu vyjadřuje u každé kapaliny doba zdržení HOT (hold-over time), který závisí na množství účinné látky, teplotě

Tabulka I
Přehled kapalin na ošetření letadel

Norma a značení	Účinek	Koncentrace glykolu původní [%]	Koncentrace glykolu při aplikaci [%]	Doba zdržení [min]	Barva
SAE AMS 1424, ISO 11075, typu I	rozmrazovací	90	20–65	3	oranžová
SAE AMS 1428, ISO 11078, typu II/IV	mrazuvzdorný	65	65	20/80	zelená

vzduchu a intenzitě srážek. Rozmrazovací kapaliny s krátkou dobou zdržení označované jako kapaliny typu I jsou aplikované pod tlakem přednostně ve směsi s horkou vodou. Při velmi nepříznivých povětrnostních podmínkách je někdy doba zdržení kratší než je čas potřebný pro přemístění letadla na odletovou dráhu. V tomto případě je nutná ochrana mrazuvzdornou kapalinou s prodlouženou dobou zdržení (až 80 minut v závislosti na počasí, typ II/IV). Mrazuvzdorné kapaliny se též využívají při ošetření letadel odstavených přes noc za velmi nepříznivých povětrnostních podmínek při mrznoucím dešti. Ráno se smytá kapalina krátce před startem obnoví, čímž se dosáhne podstatného snížení dávky.

Z chemického hlediska představují kapaliny typu I koncentrovaný roztok glykolu (90 %), vody (8 %) a aditiv (2 %). Před aplikací se ředí podle teploty okolí. Kapaliny typu II/IV obsahují až 65 % glykolu, komplex polymerů a kopolymerů jako zahušťovadla a před použitím se neředí.

Při odmrazování venku za silných větrných podmínek uniká velká část aplikované kapaliny typu I buď přestříkem, nebo odkapem na plochu. Pokud není vyřešen systém sběru, kapaliny jsou smyty deštěm do odpadních vod. Film zbývající na povrchu letadla je stržen během rolování a odletu. Pseudoplasticita kapalin typu IV umožňuje nanášení pod tlakem v kapalném stavu a přilnutí k povrchu letadla ve formě gelu. Ten vydrží na povrchu až do doby, než letadlo dosáhne určité rychlosti (asi 120 km h⁻¹), jeho rozptyl podél odletové dráhy je pak stejný jako u kapalin typu I. Část z tohoto materiálu je smyta do odpadních vod.

Ke snížení zatížení životního prostředí glykoly je prosazován program, který se skládá ze tří částí: redukce, sběru a recyklace. Cílem redukce je snížení dávky (např. předeheřevem) či koncentrace glykolu v dávce. Čím méně vznikne odpadních glykolových vod, tím menší je znečištění prostředí a menší nároky na jejich vyčištění. Cílem sběru je zachycení pokud možno ještě koncentrovaných odkapů pomocí centralizovaného stanoviště s jímkou či pojízdných vakuových odsávačů. Recyklace glykolu je

podporovanou technologií vzhledem k jeho ceně asi 30 Kč za litr. Její výhodnost se uvádí⁷ při koncentraci glykolu v odpadní vodě vyšší než přibližně 5 %.

Z nových technologií na ošetření letadel má velkou perspektivu ošetření infračerveným zářením schválené Americkým federálním úřadem letectví FAA. Tato technologie slibuje podstatnou redukci používaných objemů kapalin s glykoly.

3.1. Aditiva kapalin

Aditiva mohou tvořit smáčedla, puify, barviva, inhibitory koroze a zahušťovadla. Smáčedla snižují povrchové napětí kapalin a pomáhají přilnutí k povrchu. Navrhovány jsou například tenzidy na bázi sulfonovaných sloučenin, diaminů a alkoholaminů⁸. Puify udržují konstantní reakci kapalin, úpravu na hodnotu pH > 9 zabezpečují hydroxidy, fosforečnany a křemičitany alkalických kovů, případně další alkálie. Barvení kapalin se používá za účelem snížení dávky tím, že je vidět plocha, na které je již prostředek nanesen. Obecně jsou kapaliny typu I barveny oranžově, kapaliny typu II/IV zeleně. Trendem je použití netoxických, potravinářských barviv či dokonce fotoreaktivních barviv, která po nanesení rychle degradují.

Korozní inhibitory brání korozní reakci smáčených komponent. Neinhibované glykolické roztoky se vyznačují agresivitou vůči uhlíkovým ocelím a slitinám hliníku⁹. Ze své podstaty jsou korozní inhibitory látky s vysokým reaktivním potenciálem. Toxické triazoly, např. tolyltriazol (5-methyl-1*H*-benzotriazol) a benzotriazol (1*H*-benzotriazol) jsou postupně nahrazovány jinými látkami.

Vývoj v ČR prokázal^{10,11}, že pro alkalizované roztoky propylenglykolu může být výhodné použití inhibitorů na bázi alkyldikarboxylových kyselin, jejich solí či amidů. V tabulce II jsou porovnány inhibiční účinnosti při korozi kovů zjištěné vyhodnocením polarizačních odporů měřených elektrochemickou impedanční spektroskopií EIS. Měřeny byly i tři komerční směsi od výrobce Kilfrost Ltd.,

Tabulka II
Účinnost inhibice koroze oceli a duralu ve směsi 1 a komerčních směsích KS (Kilfrost) na bázi propylenglykolu

Prostředek	Směs 1	KS typu IV	KS typu I s triazol	KS typu I
Účinnost pro ocel, %	88	0	82	78
Účinnost pro dural, %	48	20	4	20

jejichž koncentrace byla upravena na 50 % PG. První je typu IV, druhá je typu I s inhibitorem koroze na bázi triazolů a poslední typu I bez triazolů. Hodnoty jsou srovnávány s výsledky v neinhibovaném alkalizovaném roztoku 50 % PG. Podle této zkoušky by rozmrazovací pokusná směs č. 1 s inhibitorem na bázi soli kyseliny sebakové představovala lepší ochranu při styku s ocelí a slitinami hliníku než směsi komerční.

4. Prostředky na letištní plochy

Prostředky povolené pro údržbu letištních ploch jsou ethylenglykol, propylenglykol, isopropylalkohol, močovina, octan hořečnatu-vápenatý, octan sodný, mravenčan sodný a octan draselný.

Posyp inertním materiálem (pískem, šterkovou drtí) ani solemi na bázi chloridů nejsou povoleny pro použití v těch částech letiště, kde jsou provozována letadla. Použití kapalin čistě na bázi glykolů¹² na plochy je výjimečné vzhledem k ceně, vysoké hodnotě biologické spotřeby kyslíku BSK a negativnímu vlivu na brzdný účinek přistávací dráhy. Levný a vysoce účinný isopropylalkohol (bod tání $-88,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) vyžaduje speciální manipulaci a může poskytnout pouze minimální mrazuvzdornou ochranu vzhledem k jeho těkavosti. Nevýhodou isopropylalkoholu je vysoká hořlavost, a proto nemůže splnit kritéria normy pro kapalné prostředky na plochy SAE AMS 1435 bez vysokých dávek potenciálně toxických aditiv proti vzplanutí a korozi.

Mnohem většího využití dosáhly prostředky na bázi močoviny, ať už se jedná o směs s ethylenglykolem¹³ nebo močovinu v čisté formě^{14,15}. Z důvodu vlivu na životní prostředí (nadměrný vnos biologicky využitelného dusíku a z toho pramenící eutrofizace povrchových vod) se od použití granulované močoviny upouští, přestože zvláště pro malá letiště představovala levný a snadno skladovatelný prostředek.

Octan hořečnatu-vápenatý¹⁶ je sám inhibitor koroze. V prostředí biologicky degraduje na neškodné hydrogenuhličitanu a uhličitany, i když samozřejmě za cenu odčerpávání rozpuštěného kyslíku z vody. Má ale pomalý rozmrazovací účinek a vyšší cenu. Nepoškozuje beton, a proto je používán čistý nebo jako antikoroziní přísada do solných směsí na rozmrazování dálnic a mostů. Při aplikaci octanu sodného v dehydratované granulované formě s aditivou je rozpouštění exotermní. To zrychluje rozmrazovací účinek a šetří dávku prostředku, přičemž se dávkuje pouze 2/3 množství odpovídající močovíně. Mravenčan sodný je většinou používán ve formě peletů nebo granul s aditivou především inhibitory koroze, tak aby splnil požadavky normy pro pevné prostředky na plochy SAE AMS 1431. Pokud je smočen kapalným prostředkem na plochy, stejného účinku se dosáhne při dávce odpovídající poloviční dávce močoviny. Obecnou nevýhodou tuhých prostředků je obtížnost nanášení za silného větru. Současné smáčení kapalnou rozmrazovací směsí je možné, vyžaduje však složitější řešení rozmetacího stroje.

Od svého prvního použití v roce 1991 jsou aditivované roztoky více než 50% octanu draselného nejpoužívanějším prostředkem na letištních plochy. Čistý octan draselný je běžným potravinářským doplňkem a tudíž v malých dávkách netoxický k živým organismům, vykazuje však vliv zvláště na měď, zinek, cín, hořčík a jejich slitiny⁹.

Moderní rozmrazovací prostředky na bázi kapalných roztoků mravenčanů mají vyšší rozmrazovací účinek, avšak i vyšší agresivitu vůči leteckým materiálům. Při aplikaci představují větší ohrožení pro letištní materiály než octany, neboť napadají neželezné i železné kovy. Mravenčany se stávají korozivnější při naředění pod kritickou koncentrací, účinnost inhibitoru koroze však se zředěním silně klesá. Použité anodické inhibitory ve směsích totiž vyžadují určitou koncentraci inhibitoru, aby se mohl vytvořit pasivní film na povrchu kovů. Např. při korozi slitin železa v octanových směsích dojde v důsledku zředění inhibitoru pod kritickou koncentrací ke vzniku octanu železitého, který v neutrálním až bazickém prostředí hydrolyzuje na bazický octan železitý $[\text{FeOH}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$. Tato látka je nerozpustná ve vodě a tudíž vytváří dodatečnou ochrannou vrstvu na povrchu. V tomto smyslu mohou být octanové ionty při $\text{pH} > 7$ považovány za anodický inhibitor pro železo a jeho slitiny.

U mravenčanových prostředků při zředění inhibitoru a následně korozní reakci vzniká mravenčan železitý, který v neutrálním až bazickém prostředí hydrolyzuje na bazický mravenčan železitý $[\text{Fe}_3(\text{OH})_2(\text{HCOO})_7 \times 4 \text{H}_2\text{O}]$. Tato látka je rozpustná ve vodě (5 % při $19\text{ }^{\circ}\text{C}$) a ochranná vrstva se tak netvoří. To je jedním z důvodů vyšší aditivace mravenčanových prostředků.

4.1. Aditiva prostředků

Aditiva mohou tvořit pufr, zahušťovadla, látky proti spékání granulí a inhibitory koroze. Látky upravující viskozitu a pufrací kapacitu se neliší od látek používaných do kapalin na letadla. Proti spékání se používají plnidla a vysoušedla, např. uhličitany či křemičitany hořčíku a vápníku, alumosilikáty a silikagely.

K minimalizaci koroze rozmrazovacích prostředků na bázi octanů alkalických kovů byla navržena¹⁷ také směs fosforečnanu alkalického kovu a dusitanu alkalického kovu v množství 3–5 g kg^{-1} směsi. Dusitany jsou jedovaté již v nízkých koncentracích a vzhledem k nebezpečí průniku do pitných vod je jejich použití dnes již málo představitelné. Jako náhrada dusitanů pro směsi na bázi octanu alkalických kovů byly navrženy¹⁸ látky ze skupiny triazolů a imidazolů. Tyto inhibitory se používaly až do doby, než byla zjištěna jejich obtížná rozložitelnost a kumulace v půdách v okolí letiště. Většina výrobců proto dnes deklaruje, že jejich prostředky neobsahují triazoly. Jiní autoři¹⁹ navrhuje jako náhradu za triazoly prostředek na bázi kyseliny aminotrimethylen-fosfonové. Z výsledků studia biodegradability a toxicity fosfonových kyselin plyne, že fosfonové kyseliny jsou dobře rozložitelné a jejich přidavek v roztoku octanu či mravenčanu draselného nijak výrazně nezvyšuje toxicitu výsledné směsi²⁰. Zvyšuje se však vnos

Tabulka III

Brzdňý koeficient pro komerční směsi KS1 (Clariant) a KS2 (Verdugt) a směs č. 2

Doba od aplikace, min	Brzdňý koeficient podle Saab Friction Meter					
	neošetřený povrch	KS2 octan	KS1 mravenčan	KS1 octan	KS2 mravenčan	směs č. 2 octan
15	0,33	0,43	0,49	0,44	0,48	0,47
25	0,33	0,42	0,47	0,44	0,46	0,44

fosforu do životního prostředí a zvyšuje se eutrofizace vod.

4.2. Domácí směs na plochy

Navržená směs č. 2 na plochy^{21,22} je patentově chráněný aditivovaný roztok octanu a/nebo mravenčanu. Aditiva tvoří alkalizační přísada, přísada na úpravu viskozity a inhibitor koroze na bázi směsi zinečnaté soli a alkylfosfonové kyseliny. Z posudku Státního zdravotního ústavu plyne²³, že pro směs č. 2 není nutný bezpečnostní list, neboť není nebezpečným přípravkem ve smyslu zákona č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích. Pro manipulaci je nicméně doporučeno zamezit styku s očima a použít ochranného oděvu a rukavic. Tři srovnávací zkoušky, které jsou uvedeny dále, byly vybrány jako vzorové pro dokumentaci rozsahu práce.

1. Porovnání schopnosti acetátové verze směsi č. 2 narušit vrstvu námrazy a zlepšit brzdňý koeficient se dvěma komerčními kapalinami od dvou výrobců (Verdugt a Clariant) bylo provedeno měřením²⁴ na provozní ploše 40 × 200 metrů Letiště Praha v prosinci roku 2002. Brzdňé koeficienty byly stanoveny při rychlosti 60 km h⁻¹ zkušebním zařízením Saab Friction Tester (certifikovaný FAA) vždy po 15 a 25 min od aplikace 30 g m⁻² prostředků. Plocha byla před aplikací strojově upravena tak, aby se na ní nenacházel volný sníh. Souvislá vrstva ledu a zmrzlého sněhu měla tloušťku 4 mm při teplotě vozovky -2,5 až -1,8 °C a relativní vlhkosti 86–96 %. Výsledky brzdňého koeficientu jsou uvedeny v tabulce III. Sami piloti si pro zjednodušení vytvořili slovní hodnocení brzdňého účinku přistávací dráhy jako rozmezí brzdňých koeficientů. Hodnocení „dobré“ (brzdňé koeficienty > 0,40) by splňovaly všechny naměřené údaje pro upravené plochy, neošetřená plocha by byla hodnocena jako „střední“ (pro rozmezí 0,30–0,35). Naměřené hodnoty odpovídají teoretickým předpokladům, kdy z hlediska schopnosti tavit sníh a led vycházejí nejlépe

kapaliny na bázi mravenčanu draselného, směs č. 2 však mezi kapalinami na bázi octanů vychází minimálně jako srovnatelná či lepší.

2. Poškození povrchu cementového betonu v 20% roztocích rozmrazovacích směsí bylo zkoumáno²⁵ podle upravené normy ČSN 731326. Vzorky betonu byly získány z Letiště Praha (dříve ČSL s.p.) a odpovídaly materiálu pojezdových drah. Po úpravě na krychle o hraně 150 mm byla nejprve zjištěna povrchová nasákavost, poté byla tělesa ponořena do roztoků rozmrazovacích směsí výrobců Clariant, a Verdugt, močoviny a směsi č. 2. Teplota směsi byla cyklicky střídána v rozmezí +20 a -20 °C, přičemž teplotní změna trvala 45 min a každá z mezních hodnot teplot byla udržována po dobu 15 min. Zkoušky byly ukončeny po uplynutí 150 cyklů a uvolněný materiál byl vysušen a zvážen. Vypočtené hodnoty plošného úbytku ρ_a v g m⁻² jsou uvedeny v tabulce IV. Nejvyšší úbytky byly získány v roztoku 20% močoviny, což lze přičíst absenci zahušťovací přísady. Optimalizací viskozity bylo dosaženo srovnatelných hodnot plošných úbytků směsi č. 2 a komerčních směsí.

3. Vliv různého provedení inhibitoru koroze ve směsi č. 2 na letecké materiály, jako jsou hliníkové slitiny (typ 2024, 7075), hořčíkové slitiny (elektron), uhlíkovou ocel, pozinkovanou ocel a měď byl posuzován²⁶ elektrochemickými zkouškami a zkouškou ponorem (ASTM F483-98). Podle této zkoušky jsou upravena tělesa, ponořena do rozmrazovacích prostředků při teplotě 38 ± 2 °C. Z hmotnostních diferencí těles (sušených do konstantní hmotnosti) na začátku, po 24 hodinách a na konci 168 hodinové zkoušky byla vypočítána korozní rychlost podle vzorce:

$$r = (K \cdot m) / (A \cdot T \cdot \rho) \quad (1)$$

kde r je korozní rychlost v mm/rok, K konstanta, jejíž hodnota je pro korozní rychlosti v mm/rok rovna 8,76·10⁴, m naměřený úbytek kovu (g), A exponovaná plocha vzorku (cm²), T doba expozice v prostředí (h) a ρ je hustota kovu (g cm⁻³). Vybrané výsledky pro měď, uhlíkovou a pozin-

Tabulka IV

Poškození povrchu cementového betonu v 20% roztocích komerčních směsí KS1 (Clariant), KS2 (Verdugt), močoviny a směsi č. 2

Plošný úbytek [g m ⁻²]			
KS1 octan	KS2 mravenčan	močovina	směs č. 2 octan
2,89	3,42	4,66	3,25

Tabulka V

Vliv inhibitoru na korozní rychlosti kovů v aditivovaném 50% octanu draselném

Materiál	Korozní rychlost r [mm/rok]			
	bez inhibitoru	kyselina 1-hydroxyethan-1,1- -difosfonová	kyselina aminotrimethyl- fosfonová	kyselina 2-karboxyethyl- fosfonová
Měď	0,150	0,004	0,005	0,006
Uhlíková ocel	0,120	0,009	0,008	0,006
Pozinkovaná ocel	0,323	0,020	0,120	0,008

kovanou ocel v alkalizovaném 50% octanu draselném s 0,01 % octanu zinečnatého jsou uvedeny v tabulce V. Každá z použitých kyselin 1-hydroxyethan-1,1-difosfonová, aminotrimethyl-fosfonová a 2-karboxyethyl-fosfonová, jako inhibitory koroze dokázala snížit korozní rychlost kovů ve srovnání s neinhibovaným roztokem. Nejlepší výsledky však vykazuje systém s kyselinou 2-karboxyethyl-fosfonovou, což zdůvodňujeme stericými a synergickými efekty při inhibici korozní reakce.

5. Vliv na prostředí letišť

Rozmrazení velkého komerčního letadla vyžaduje 1000–2000 litrů kapaliny a středně velké letiště v severním pásmu může spotřebovat až 500 m³ kapalin během zimy. Použití prostředků na bázi propylenglykolu a ethylenglykolu nelimituje ani tolik jejich toxicita, ale hlavně skutečnost, že na jejich rozklad je spotřebováno velké množství rozpuštěného kyslíku. Pro představu je uváděno, že chemická spotřeba kyslíku CHSK jednoho litru čistého propylenglykolu se rovná hodnotě CHSK pro 6000 litrů odpadní vody z domácnosti²⁷. Množství glykolu, které se uvolní při startu velkého letadla s mrazuvzdornou ochranou může obsahovat množství BSK₅ ekvivalentní odpadním vodám z 5000 domácností nashromážděných za celý den. Čistý propylenglykol vykazuje BSK₅ = 1000 g l⁻¹ (CHSK = 1850 g l⁻¹), čistý ethylenglykol má BSK₅ = 400 až 800 g l⁻¹ (CHSK = 1400 g l⁻¹). Hodnoty BSK a CHSK kapalin na letadla jsou pak odvislé od použité koncentrace organické látky. Ethylenglykol a propylenglykol jsou relativně snadno biologicky rozložitelné látky a biologické čištění odpadních vod principiálně není problém. Problémem je velká nevyrovnanost v množství i kvalitě těchto odpadních vod. Biologická čistírna tedy zpravidla následuje za mohutně dimenzovanými vyrovnávacími nádržemi. Nepříznivý je však průnik glykolů do vod mimo ohraničený prostor letiště, znamenající zátěž pro vodní ekosystém.

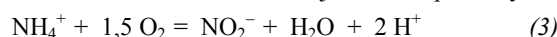
U prostředků na plochy je patrný odklon od užívání močoviny. Kromě jiného může být toxická k vodním organismům i v nízkých koncentracích a to v důsledku její hydrolyzy na oxid uhličitý a amoniak podle reakce:



Amoniak v neionizované formě má značné negativ-

ní důsledky na ryby (*Pimephales promelas*, *Carassius auratus*, *Oncorhynchus mykiss*) s letální koncentrací LC₅₀ 1–10 mg l⁻¹. Produkce amoniaku je tím vyšší, čím je vyšší pH a teplota.

Vedle toho při biologické nitrifikaci amonných iontů spotřebovávají produkty její hydrolyzy velké množství kyslíku. Při nitrifikaci se také snižuje hodnota pH vody.



Známy je i již zmíněný podíl dusíkatých látek na zvyšování eutrofizace vod, která se může projevovat nežádoucím bujením řas a sinic.

Kapaliny na bázi octanu a mravenčanu draselného představují zřejmě nejmenší zátěž pro životní prostředí z důvodu jejich dobré biologické rozložitelnosti. Komerční kapaliny obsahující octan vykazují BSK₅ zhruba 180 g l⁻¹, kapaliny s mravenčanem 40 g l⁻¹. Monitorování na letištích zahrnují periodické měření následujících parametrů: amoniak, BSK₅, CHSK, celkové nerozpustné látky, oleje a tuky, glykoly, kovy (měď, olovo a zinek) a pH. V zimních měsících jsou v dešťových nádržích letišť běžně přítomny koncentrace octanu a propylenglykolu řádů stovek až několika tisíců mg l⁻¹. Tyto odpadní vody jsou pak zpravidla biologicky čistěny společně se splaškovými vodami.

6. Závěr

Jakékoliv snahy o radikální snížení spotřeby rozmrazovacích kapalin na letištích jsou v přímém rozporu s bezpečností letecké dopravy, která je pro provozovatele prvořadá. Cílem je proto postupné hledání kompromisu, přičemž vývoj u rozmrazovacích kapalin na letadla směřuje k optimalizaci dávky a recyklaci aditivovaných glykolů.

U kapalin na plochy dokázala regulace na letištích zahrnující limity pro srážkové vody vytlačit některé dříve používané rozmrazovací směsi na bázi močoviny. Zřejmý je posun k účinnějším směsným či čistě mravenčanovým prostředkům, které však vyžadují vyšší aditivaci. Někteří výrobci sázejí na nízký účinek jednotlivých aditiv na životní prostředí. Jiní však prohlašují, že středně toxická aditiva, které používají oni, vykonávají několik funkcí najednou a v případě náhrady vícero látkami méně toxic-

kými by kombinovaná toxicita byla vyšší. Moderní rozmrazovací směsi včetně domácí rozmrazovací směsi (uvedené v textu jako směs 2) nejsou nebezpečnými látkami ve smyslu zákona 365/2003 Sb.

Autoři děkují výzkumnému záměru MSM 6046137304 za částečnou finanční podporu.

LITERATURA

- Valarezo W. O., Lynch F. T., McGhee R. J.: *J. Aircr.* 30, 807 (1993).
- CZ patent č. 2274-98 A3.
- EP patent č. 0564721 A1.
- GB patent č. A1026150.
- CZ patent č. 287716 B6.
- EPA-821-R-00-001, <http://www.epa.gov/waterscience/guide/airport/airport.pdf>, (2000).
- Rincón C., Zárate J. M. O., Mengual J. I.: *J. Membr. Sci.* 158, 155 (1999).
- US patent č. A4585571.
- Corrosion Survey Database (COR·SUR). NACE International, The Corrosion Society (2002).
- Jiříček I., Kalivodová J., Macák J., Bouška D., Vošta J., Novotná M., Malý P., Hloušek P., Červený P.: *Opportunities for Cooperation in Research and Development*, Institute of Chemical Technology, Prague, 77 (2003).
- Macák J., Bouška D., Vošta J., Jiříček I., Pazderová M., Červenka J., Malý P.: CZ užitný vzor č. 13839 (2004).
- US patent č. 4,283,297.
- WO patent č. 8602089.
- US patent č. 4,698,173a.
- EP patent č. 0824575.
- US patent č. 4,855,071.
- EP patent č. 0375214.
- US patent č. 5,238,592.
- US patent č. 6,149,833.
- Kononova S. V., Nesmejanova M. A.: *Biochemistry* 67, 184 (2002).
- Jiříček I., Kalivodová J., Macák J., Červenka J., Pazderová M., Malý P.: CZ patent č. 295752 B6, (2005).
- Jiříček I., Kalivodová J., Macák J., Červenka J., Pazderová M., Malý P.: EP patent č. 1516899, (2006).
- Bezpečnostní list Ex 402352. Státní zdravotní ústav, Praha 2004.
- Hloušek P., Kadlec J., Kalivodová J.: Výzkumná zpráva 7-ST-1. ČSL, s.p., Praha 2002.
- Pazderová M.: Výzkumná zpráva 7-ST-2. VZLÚ, a.s., Praha 2002.
- Jiříček I., Kalivodová J., Macák J.: Výzkumná zpráva 7-ST-3. ÚE VŠCHT, Praha 2002.
- Betts K. S.: *Environ. Sci. Technol.* 33, 210A (1999).

I. Jiříček^a, J. Macák^a, V. Janda^a, M. Pazderová^b, and P. Malý^b (^a*Department of Energetics, Institute of Chemical Technology, Prague* ^b*Research and Test Air Institute Co., Prague*): **Deicing Agents and Their Impact at Airports**

Wintertime aircraft and runway deicing programs have to ensure both the safety of passengers and low environmental impact of the measures taken. A number of traditional freeze-point depressants were used for this purpose such as ethylene glycol and urea for runways and ethylene glycol for aircraft deicing. Because of pollution threat coupled with the difficulty in containing and controlling runway run-off, the use of traditional deicers in the Czech Republic is declining. A new line of deicing agents was developed and compared with imported products. A patented runway agent is an acetate- or formate-based mixture with an additive. The additive, making a few per cent in the mixture, is made of a thickener, pH regulator and a zinc alkylphosphonate complex as corrosion inhibitor. The agent is harmless for the environment, with oxygen demand lower than traditional deicers. Fish-toxic nitrogen degradation products like urea were eliminated. The formate-based agent can melt ice and snow more effectively, thus improving air traffic at the airport. The aircraft agent is based on buffered propylene glycol with an alkanedioic acid corrosion inhibitor. It showed excellent performance in standard corrosion tests when compared with conventional products.

MOBILITA, TRANSFORMACE A ZÁKLADNÍ METODY STANOVENÍ SLOUČENIN ARSENU V PŮDĚ A ROSTLINÁCH

JIŘINA SZÁKOVÁ^a, MARTIN MIHALJEVIČ^b
a PAVEL TLUSTOŠ^a

^a Katedra agrochemie a výživy rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, ^b Ústav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 6, 128 43 Praha 2
szakova@af.czu.cz

Došlo 20.9.05, přepracováno 11.4.06, přijato 22.6.06.

Klíčová slova: arsen, speciace, půda, rostlina, mobilita, příjem, transformace

Obsah

1. Úvod
2. Geochemické, pedologické a biologické aspekty přístupu arsenu a jeho sloučenin pro rostliny
3. Analytické metody stanovení sloučenin arsenu ve vzorcích rostlin a půd
 - 3.1. Příprava vzorků k analýze
 - 3.2. Instrumentální analytické metody stanovení sloučenin arsenu v biologických materiálech
4. Závěr

1. Úvod

Hlavním cílem analytického stanovení rizikových prvků je získání podkladů pro hodnocení vlivu kontaminace na lidskou populaci i další složky životního prostředí, identifikace možných zdrojů znečištění a hledání souvislosti mezi úrovní kontaminace a případným vlivem na zdraví člověka nebo životní prostředí. Je tedy nutno zkoumat a pochopit transportní mechanismy chemických prvků, aby bylo možno pochopit jejich chemický cyklus v biosféře. V biologických systémech jsou však mobilita a transport chemických prvků závislé zejména na chemické formě daného elementu. Stanovení celkového obsahu prvků ve vzorcích není tedy v tomto případě dostačující. Nolan a spol.¹ v této souvislosti zmiňují biopřístupnost prvků, která charakterizuje takový podíl prvku, který je v daném systému biologicky aktivní. U suchozemských rostlin jde např. o takové formy prvku v půdě, které mohou být přijímány kořeny rostlin během vegetačního cyklu a mohou ovlivnit životní cyklus daných rostlin. Distribuci prvku do přesně definovaných specií v daném systému,

což představuje isotopové složení, valenční stav, anorganické sloučeniny a komplexy, organokovové sloučeniny, organické a makromolekulární sloučeniny a distribuci prvku do rozličných chemických a fyzikálních forem, jako je zastoupení podílu volných iontů, komplexů a chelátů daných prvků v roztoku nebo amorfní a krystalické formy těchto prvků v tuhé fázi pak nazýváme specií.

Arsen patří mezi prvky, u kterých je problematika speciace teoreticky i prakticky velmi dobře zpracována². V České republice nepředstavuje problematika kontaminace zemědělské půdy arsenem nejaktuálnější problém, ale je nutno vzít v úvahu vliv spalování hnědého uhlí, které má po celém světě mimořádně vysoké obsahy arsenu³. Dalším problémem pak jsou jednotlivé lokality, kde se nacházejí ložiska barevných a vzácných kovů, které jsou doprovázeny zvýšenými obsahy arsenu. Nejznámější z těchto lokalit je oblast Kutné Hory, kde středověká těžba stříbra zanechala poměrně masivní kontaminaci životního prostředí arsenem. Hlavním zdrojem arsenu je zde arsenopyrit a různé sekundární minerály⁴. Oblast Mokrsko je pak jedním z největších ložisek zlata v oblasti Českého masivu se zásobou zlata, která představuje až 80–100 tun. Ruda obsahuje zvýšená množství arsenu (až 1 %), který je obsažen zejména v arsenopyritu a arsenem bohatém pyritu⁵. Geochemické aspekty případného uvolňování arsenu z arsenových minerálů do vodního prostředí byly již intenzivně studovány⁶. Mobilita arsenu a jeho sloučenin v půdě a jeho biopřístupnost rostlinám však ještě vyžaduje intenzivní výzkum.

2. Geochemické, pedologické a biologické aspekty přístupu arsenu a jeho sloučenin pro rostliny

Arsen patří mezi nejintenzivněji studované rizikové prvky z důvodu jeho toxicity pro člověka i ostatní živočichy. Rovněž fytotoxicita tohoto prvku je známa. Chaney⁷ považuje hladinu As v rostlinách 0,01–1 mg kg⁻¹ za normální a obsahy 3–10 mg kg⁻¹ za fytotoxické. Ze zemědělských plodin jsou na účinky As nejcitlivější luštěniny. Fytotoxicita As se u rostlin projevuje plasmolýzou pletiv kořenů a žloutnutím listů vedoucím až k nekróze špiček a okrajů listů⁸. Po přidavku 100 mg kg⁻¹ arsenu v podobě kyseliny arseničné do půdy se obsah tohoto prvku v zelenině pohyboval v rozmezí od < 0,01 mg kg⁻¹ v kukuřici a zelí do 3,0 mg kg⁻¹ v bramborách⁹. Byl rovněž prokázán vliv zvýšené koncentrace As na snížení absorpce některých mikroprvků jako B, Cu, Mn a Zn rostlinami¹⁰. Porovnání analytických dat popisujících distribuci arsenu v říčních a jezerních sedimentech a v půdách v Kanadě a v USA ukázalo, že variabilita obsahů arsenu v těchto

materiálech je určována především geologickými charakteristikami podloží¹¹. Je ale známo, že arsen se v různých složkách životního prostředí vyskytuje ve velkém počtu anorganických i organických sloučenin, které se od sebe liší chemickými vlastnostmi, toxikologickými charakteristikami, biopřístupností pro rostliny a chováním v systému půda – rostlina. Přehled základních dosud identifikovaných sloučenin arsenu publikovali Francesconi a Kuehnelt².

Hlavními zdroji arsenu v půdě jsou arsenopyrit (FeAsS) a další sulfidy obsahující As jako hlavní nebo stopovou komponentu, např. lölingit (FeAs₂) nebo pyrit (FeS₂) s obsahem arsenu. Po uvolnění ze sulfidů je As(III) oxidován na As(V) a v závislosti na jeho koncentraci mohou sloučeniny arsenu koprecipitovat s nově tvořenými hydro-oxidy železa (HFO) nebo mohou být adsorbovány na povrchu těchto minerálů, popřípadě se mohou zapojit do obou procesů. HFO jsou nejdůležitějšími sorbenty As v půdách, ale svůj význam mají i oxohydroxidy hliníku a jílové minerály^{6,12,13}.

V prostředí s vysokou primární koncentrací As a současně Ba, Ca, Fe, K, Mg a Pb mohou zvětráváním sulfidů vznikat sekundární minerály, zejména arseničnany. Nejčastěji jsou zmiňovány karminit (Pb(Fe³⁺)₂(AsO₄)₂(OH)₂), kaňkit (Fe³⁺)₂(AsO₄) · 3 H₂O), farmakosiderit (K(Fe³⁺)₄(AsO₄)₃(OH)₄ · 6–7 H₂O), pikrofarmakolit (H₂Ca₄Mg(AsO₄)₄ · 11 H₂O), talmesit (Ca₂Mg(AsO₄) · 2 H₂O), tilasit (CaMg(AsO₄)F) a skorodit (FeAsO₄ · 2 H₂O) (cit.^{14,15}). Stupeň oxidace sulfidů závisí na koncentraci kyslíku, počtu iontů železa, teplotě a přítomnosti acidofilních mikroorganismů.

Zemědělství rovněž představuje možné riziko vstupu organických i anorganických sloučenin arsenu do životního prostředí, protože se tyto sloučeniny používají jako pesticidy a též jako přídavky do krmných směsí v drůbežářském průmyslu¹⁶. Tyto přípravky nejsou v Evropě schváleny k používání, ale studium transformací těchto sloučenin a vlivu přídavku těchto sloučenin do půdy na zemědělské plodiny může pomoci objasnit případné nepříznivé dopady jejich aplikace.

Mobilita arsenu v půdě je velmi nízká ve srovnání s mobilnějšími elementy, jako jsou kadmium nebo zinek. Koncentrace výměnně vázaného arsenu stanoveného ve 27 vzorcích kontaminovaných půd se pohybovala v rozmezí 1,2–19 % celkového obsahu¹⁷. V souboru 35 vzorků půd, které se lišily celkovým obsahem arsenu a fyzikálně-chemickými vlastnostmi nepřekročil obsah arsenu extrahovatelný roztokem 0,01 mol l⁻¹ CaCl₂ 1,22 % celkového obsahu tohoto prvku¹⁸. Baroni a spol.¹⁹ stanovili, že vodou extrahovatelné obsahy arsenu v půdách, které obsahovaly 5,3–1226 mg kg⁻¹ celkového arsenu se pohybovaly v rozmezí 0,010–0,040 mg kg⁻¹. Pouze v extrémně kontaminované luční půdě (2035 mg kg⁻¹) dosáhl vodou extrahovatelný obsah arsenu hodnoty 8,48 mg kg⁻¹. Z literatury je známo, že arsen je v půdě přítomen zejména ve formě arseničnanu, ale v redukčních podmínkách se snadno přeměňuje na arsenitan^{20–23}. Pokud hodnota redox potenciálu půdní suspenze poklesla pod 0 mV, pak byl přítomný ar-

sen převážně ve formě As(III). Za oxidačních podmínek byl přítomen As(III) i As(V) (cit.²³). Byla prokázána i přítomnost malého množství metylovaných sloučenin v půdě^{22,24}. Tlustoš a spol.²⁵ našli ve vodním extraktu nekontaminované půdy 91 % arseničnanu, 6 % arsenitanu a 3 % dimethylarsinátu (DMA). V této souvislosti byl diskutován i vliv typu a původu půdy, a také hladiny celkového arsenu v půdě^{26,27}. Byly také popsány rozdílné sorpční charakteristiky jednotlivých sloučenin arsenu v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech půdy^{28,29}. Chování metylovaných sloučenin arsenu v půdě se liší od anorganických sloučenin tohoto prvku, přičemž zejména adsorpční charakteristiky DMA na oxidy železa (goethit a ferrihydrit) ukázaly nižší schopnost adsorpce této sloučeniny ve srovnání s As(V) a methylarsonátem (MA)³⁰.

Důležitou roli při oxidaci a redukcí arsenu v půdě, sedimentech, čistírenských kalech apod. hraje aktivita mikrobiální biomasy^{31,32}. Půdní bakterie jsou také schopny redukovat arseničnan na arsenitan a poté je methylovat na dimethylarsan. Rovněž houby jsou schopny konvertovat organické i anorganické sloučeniny arsenu na těkavé methylarsany^{33,34}. Metabolická aktivita specifických mikrobiálních populací půdní biomasy hraje významnou roli ve speciální anorganického arsenu v půdním roztoku. V aerobních půdních podmínkách byla v modelovém experimentu pozorována rychlá mikrobiální oxidace arsenitanu na arseničnan; redukce arseničnanu však zaznamenána nebyla³⁵. Možnost ztrát arsenu z půdy tvorbou těkavých arsanů studovali Michalke a spol.³⁶ v průběhu anaerobní inkubace čistírenských kalů a prokázali přítomnost arsenodivíku, methylarsanu, dimethylarsanu a trimethylarsanu. Rovněž studium tvorby těkavých sloučenin arsenu čistými kulturami mikroflory anaerobního čistírenského kalu (*Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium thermo-autotrophicum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *D. gigas*, a *Clostridium collagenovorans*) prokázalo přítomnost všech výše uvedených sloučenin arsenu a navíc jedné sloučeniny, kterou se nepodařilo identifikovat. Také Abedin a spol.³⁷ popsali významné ztráty arsenu jeho těkáním v podobě metylovaných arsanů v půdním roztoku odebraném v oblasti rhizosféry rostlin rýže. Je tedy zřejmé, že pro detailní popis transformace a imobilizace sloučenin arsenu v půdě je třeba v dalším výzkumu zaměřit pozornost i na tvorbu těkavých sloučenin arsenu během vegetace. Vliv mikrobiální aktivity v půdě na transformaci arseničnanu na arsenitan a na výskyt MA a DMA v kontaminovaných půdách popsal i Pongratz³⁸. Carbonell-Barrachina a spol.³⁹ studovali transformaci arsenu v čistírenských kalech a zjistili, že dominantní podíl mobilního arsenu v tomto materiálu tvořila DMA. Lze tedy potvrdit, že mikrobiální transformace sloučenin arsenu hraje velmi významnou roli ve změnách mobility tohoto prvku v půdě, ale tento problém není ještě dostatečně prozkoumán. Rovněž objasnění účinku půdní organické hmoty a biologických parametrů půdy na transformaci a biopřístupnost arsenu zůstává významným tématem pro další výzkum.

Příjem jednotlivých sloučenin arsenu v půdě rostlinami a jejich fyto toxicitu shrnul Sheppard⁴⁰ a Dembitsky a Řezanka⁴¹. Hlavní roli v tomto případě hrají půdní vlastnosti a zdroj kontaminace arsenem. Ukázalo se např., že anorganické sloučeniny arsenu jsou pětikrát toxicitější na písčitéch než na jílovitých půdách. Flustoš a spol.⁴² také zaznamenali vyšší fyto toxicitu DMA po experimentálním přidavku této sloučeniny do písčité půdy ve srovnání s půdou hlinitou. V této práci se také anorganické sloučeniny arsenu projeví jako méně toxické ve srovnání s DMA. Důvodem však byla zejména vyšší mobilita DMA v půdě a tedy vyšší podíl biopřístupného arsenu ve srovnání s anorganickými sloučeninami. V hydroponické kultuře byl arsen přijímán kořeny fazolu v pořadí As(V) > As(III) > MA > DMA (cit.⁸). Rovněž u rostlin rýže v kapalně půdní suspenzi se ukázalo, že DMA byl rostlinami méně přijímán ve srovnání s anorganickými sloučeninami arsenu⁴³. Příjem arsenu rostlinami rýže se zvyšoval úměrně se zvyšující se koncentrací As(III) v suspenzi při nízkém redox potenciálu této suspenze. Methylarsonát (MA) pak byl rostlinami rýže přijímán více než anorganické sloučeniny a tento příjem se zvyšoval s klesajícím pH a redox potenciálem suspenze^{23,43}. Jiang a Singh⁴⁴ pěstovali rostliny jílku (*Lolium perenne* L.) a ječmene (*Hordeum vulgare* L.) v hlinité půdě kontaminované arsenem jednak ve formě arsenitanu a jednak ve formě arseničnanu a pozorovali významnější negativní vliv arsenitanu na výnos obou plodin ve srovnání s arseničnanem. Rozdíly v obsazích arsenu v rostlinách po aplikaci arsenitanu a arseničnanu byly ale nevýznamné. Marin a spol.⁴³ rovněž studovali přesun arsenu do jednotlivých částí rostlin rýže pěstované v půdní suspenzi s přidavkem jednotlivých sloučenin arsenu. Bylo zjištěno, že obsahy arsenu v listech se rychleji zvyšovaly po přidavku DMA do půdní suspenze, zatímco přidavek As(III), As(V) a MA do půdní suspenze vedl k vyšším obsahům arsenu v kořenech. Baroni a spol.¹⁹ monitorovali obsahy arsenu v půdě a v 64 vzorcích rostlin v oblasti zasažené důlní činností a ukázali, že obsahy arsenu v rostlinách byly velmi nízké bez ohledu na úroveň kontaminace půdy v daném místě. Pouze ve vzorku máty vodní (*Mentha aquatica* L.) byly stanoveny vyšší obsahy arsenu v nadzemní biomase (216 mg kg⁻¹) a v kořenech (540 mg kg⁻¹) a rovněž v kořenech rákosu obecného (*Phragmites australis* L.), kde bylo nalezeno 688 mg As kg⁻¹. Chang a spol.⁴⁵ zjistili, že tzv. faktory transferu arsenu (dané jako poměr celkového obsahu prvku v rostlině a v půdě) v nadzemních částech 11 druhů rostlin rostoucích na půdě kontaminované odpady z důlní činnosti nepřekročily hodnotu 0,01.

Ve vzorcích extraktu buněk tkáňové kultury barvinku menšího (*Vinca minor* L.) pěstovaného v médiu s přidavkem arseničnanu byly stanoveny obsahy arsenitanu, arseničnanu a též menší podíly MA a DMA (cit.⁴⁶). Tyto výsledky naznačují, že vyšší rostliny jsou schopny methylovat sloučeniny arsenu. Tato skutečnost však není v současné době zcela objasněna a vyžaduje podrobnější zkoumání chování sloučenin arsenu v rhizosféře a v rostlinách. V kořenech ředkvičky (*Raphanus sativus* L.) byl dominantní sloučeninou arsenitan, zatímco arseničnan byl více

zastoupen v listech. Vysoké podíly DMA v rostlinách (17 % v kořenech a 18 % v listech) ve srovnání s půdou, kde bylo více než 90 % arsenu přítomno ve formě arseničnanu, rovněž naznačují schopnost rostlin ředkvičky methylovat sloučeniny arsenu^{25,47}. Výskyt jednotlivých sloučenin arsenu ve vyšších rostlinách a jejich distribuce do vyšších částí těchto rostlin jsou jednoznačně ovlivněny druhem rostliny^{48,49}. Vliv druhu rostliny na výskyt sloučenin arsenu a jejich koncentraci demonstrovali i Geiszinger a spol.⁵⁰. Zatímco v extraktech nadzemní biomasy srhy laločnaté (*Dactylis glomerata* L.) a jitrocelu kopinatého (*Plantago lanceolata* L.) rostoucích v oblasti kontaminované arsenem byly stanoveny převážně anorganické sloučeniny arsenu, v extraktech nadzemní biomasy jetele lučního (*Trifolium pratense* L.) rostoucího v téže lokalitě byly stanoveny převážně organické sloučeniny arsenu, kdy převažoval MA. V dalších pracích pak byl v různých druzích vyšších rostlin popsán příjem zejména anorganických sloučenin^{51–53}.

Sledování methylace arsenu v rostlinách psinečku tenkého (*Agrostis tenuis* Sibth.) ukázalo, že arseničnan, který byl přidán do kultivačního média, byl přijat kořeny rostlin, přeměněn na arsenitan, a později methylován v listech, kde byla zaznamenána zvýšená aktivita enzymu methyltransferasy⁵³. Abedin a spol.³⁷ naznačili v krátkodobém experimentu s kořeny klíčnic rostlin rýže, že příjem MA a zvláště DMA byl nižší ve srovnání s anorganickými sloučeninami arsenu. Vzhledem k tomu, že pracovali pouze s kořeny rostlin, můžeme o případném přesunu sloučenin arsenu do nadzemní biomasy na základě těchto výsledků jen spekulovat. V nedávné době zkoumali Quaghebeur a Rengel⁵⁴ v nádobovém experimentu přesun arsenu z kořenů do nadzemní biomasy huseníčku Thalova (*Arabidopsis thaliana* L.) a rovněž potvrdili význam arsenitanu v těchto procesech. Distribuce arsenu v jednotlivých částech rostlin je ovlivněna celkovým obsahem arsenu v rostlině a také stavem výživy rostliny. V této souvislosti jsou významné zejména obsahy fosforu, které významně ovlivňují příjem a transformaci jednotlivých sloučenin arsenu^{55,56}. Vysoký podíl DMA v plodech paprik⁵⁷ naznačuje, že vysoký obsah DMA je obvyklý pro rozmnožovací orgány rostlin, ale pro potvrzení této domněnky je třeba mnoha dalších experimentů.

Carbonell-Barrachina a spol.⁵⁸ diskutovali mechanismus tolerance rostlin vůči kontaminaci arsenem a rozlišili: *i*) omezený příjem arsenu kořeny nebo omezený transport tohoto prvku do nadzemní biomasy (odmítání), *ii*) zabudování arsenu do buněčné stěny a buněčných kompartmentů (detoxikace) a *iii*) specifické metabolické pochody (biochemická tolerance). V souvislosti s tímto bodem je v poslední době diskutována možnost tvorby komplexů arsenu s fytochelatinu^{59,60}.

Pro studium pohybu prvků v rhizosféře je vhodné volit takové rostliny, které jsou schopny kumulovat vysoké obsahy prvků, což se snáze projeví významnými změnami v půdním roztoku v oblasti rhizosféry. Arsen však patří mezi prvky, které jsou vyššími rostlinami přijímány jen velmi omezeně. Ma a spol.⁶¹ popsali jako vůbec první kap-

radinu *Pteris vittata*, která je schopná ve své nadzemní biomase akumulovat extrémní koncentrace arsenu (až do 23 g kg^{-1}). V poslední době bylo popsáno i několik dalších druhů kapradin včetně *Pityrogramma calomelanos*⁶², a *Pteris cretica*, *Pteris longifolia* a *Pteris umbrosa*⁶³, které jsou schopné akumulovat arsen v podobných koncentracích jako *Pteris vittata*. Ma a spol.⁶¹ popsali, že arsen je v listech kapradiny *Pteris vittata* zastoupen (ze 47–80 %) právě v anorganické formě. *Pityrogramma calomelanos* je druh kapradiny hojně rostoucí na půdách vysoce kontaminovaných arsenem v oblasti jižního Thajska. Tato rostlina je schopna kumulovat arsen zejména v listech (až $8,4 \text{ g As kg}^{-1}$ sušiny), zatímco oddenky této rostliny obsahovaly pouze 88–310 mg As kg^{-1} sušiny⁶². Z celkového obsahu arsenu v oddencích kapradiny bylo vodou extrahováno přibližně 60 %, přičemž 95 % tohoto podílu bylo přítomno jako arseničnan. Naproti tomu arsen obsažený v listech kapradiny byl vodou extrahovatelný mnohem snadněji (86–93 %) a převládající sloučeninou byl arsenitan (60–72 %). Organické sloučeniny arsenu byly nalezeny jen v některých vzorcích a pouze ve stopových koncentracích. Výsledky naznačují, že *P. calomelanos* je schopna za rok odstranit z půdy až 2 % celkového obsahu arsenu.

Fitz a spol.⁶⁴ pěstovali *P. vittata* v půdě obsahující $2,27 \text{ g As kg}^{-1}$ a obsah arsenu v jednotlivých částech rostliny klesal v pořadí mladé listy > staré listy >> oddenky > kořeny. Během kultivace se zvýšil obsah rozpustných organických sloučenin v půdním roztoku v oblasti rhizosféry o 86 %, což vedlo ke zvýšení rozpustnosti Fe v důsledku vzniku komplexů. Přestože rostliny odebraly z půdy poměrně velké množství arsenu, jeho obsah v půdním roztoku v oblasti rhizosféry po skončení vegetačního období nepoklesl. Důvodem je pravděpodobně vysoká pufrací schopnost půdy a tvorba komplexů s organickými sloučeninami. Metoda postupné extrakce půdy v oblasti rhizosféry a okolní půdy naznačily, že arsen byl přijímán rostlinami zejména z méně mobilních frakcí. Je tedy zřejmé, že *P. vittata* je vhodnou rostlinou pro studium chování arsenu v oblasti rhizosféry, ale v našich podmínkách má jen omezenou možnost uplatnění např. pro fytořediční účely. Rovněž vysoké procento arsenitanu v nadzemní biomase této rostliny není mezi vyššími rostlinami typické.

3. Analytické metody stanovení sloučenin arsenu ve vzorcích rostlin a půd

3.1. Příprava vzorků k analýze

Vzhledem k tomu, že většina instrumentálních analytických technik používaných pro stanovení sloučenin arsenu vyžaduje přípravu roztoku (viz dále), je pro věrohodné stanovení obsahů sloučenin arsenu v rostlinné biomase nezbytné zvolit takový extrakční postup, který uvolní analyty pokud možno kvantitativně a bez jakékoli chemické změny. Byla vyvinuta celá řada extrakčních postupů od extrakce vodou za laboratorní teploty po extrakci vybra-

ným rozpouštědlem za zvýšeného tlaku nebo extrakce za zvýšené teploty s mikrovlnným ohřevem. Výsledky získané takto odlišnými postupy jsou pak jen obtížně porovnatelné. Metody stanovení sloučenin arsenu v suchozemských biologických materiálech jsou mnohem méně propracované než metody extrakce těchto sloučenin ve vzorcích rostlin z vodních ekosystémů. I v tomto případě jsou však výsledky často velmi variabilní. V případě mořské řasy *Hijikia fusiforme* se extrahovatelnost sloučenin arsenu pohybovala od 33 % extrahovatelných směsí methanol-voda (9:1) až do 74 % extrahovatelných $1,5 \text{ mol l}^{-1}$ roztokem kyseliny fosforečné⁶⁵. U sladkovodní řasy *Chlorella vulgaris* se extrahovatelnost pohybovala v rozmezí od 74 % extrahovatelných vodou až do 100 % extrahovatelných směsí methanol-voda, kde podíl methanolu přesahoval 40 obj.%. Fosfátový pufr v koncentraci $0,03 \text{ mol l}^{-1}$ byl schopen vyextrahovat 84 % celkového obsahu arsenu v řase⁶⁶. Extrahovatelnost arsenu z ponořených zelených částí vodních rostlin směsí methanol-voda (9:1) pak nepřesáhla 16,1 % celkového obsahu arsenu⁶⁷.

Při analýzách suchozemských rostlin se ukázalo, že extraktant na bázi směsí methanol-voda je ve většině případů málo účinný. Například extrakce vzorků rýže ukázala účinnost jen 24–36 % (cit.⁶⁸). Podobně nízké extrahovatelné obsahy arsenu stanovili při použití směsí methanol-voda i Bohari a spol.⁶⁹, kteří úspěšně zvýšili účinnost extrakce rostlinného materiálu přidávkem kyseliny fosforečné. Extrakce vzorků broskvových listů však ukázala lepší extrahovatelnost arsenu směsí methanol-voda (3:1) ve srovnání s extrakcí vodou⁷⁰ a podobná situace byla zaznamenána i při analýze vzorků lyofilizovaných jablek⁷¹.

Pro zvýšení účinnosti extrakce se používá např. extrakce za zvýšené teploty s mikrovlnným ohřevem s využitím různých vodních extrakčních činidel jako je voda, 10% $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ (cit.⁷²), $0,3 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina fosforečná⁶⁹ nebo 2 mol l^{-1} kyselina trifluoroctová⁶⁸. Použitím těchto postupů bylo dosaženo téměř 100% extrahovatelnosti arsenu z různých částí vyšších rostlin. Ukázalo se ale, že při použití kyseliny trifluoroctové pro extrakci zrna rýže se v průběhu extrakce arseničnan částečně redukuje na arsenitan⁶⁸. Dalším postupem doporučeným pro kvantitativní extrakci sloučenin arsenu z vyšších rostlin je použití ultrazvukové lázně⁷¹ nebo kontinuální extrakce za zvýšeného tlaku^{55,73}. Dosavadní výsledky pak naznačují, že extrahovatelnost arsenu nezávisí jen na použitém činidlo a druhu analyzované rostliny, ale i na konkrétní části této rostliny a na množství sloučenin arsenu v těchto rostlinách. Porovnání osmi extrakčních činidel (demineralizovaná voda, směs methanol-voda v různých poměrech, methanol, 20 mmol l^{-1} fosfátový pufr a směs methanol-fosfátový pufr) použitých pro extrakci sloučenin arsenu z různých částí rostliny papriky (*Capsicum annum*, L.) ukázalo, že zatímco u plodů a kořenů paprik byla neúčinnějším extraktantem demineralizovaná voda, u nadzemní zelené biomasy bylo nejvyšší účinnosti extrakce dosaženo s použitím 20 mmol l^{-1} roztoku fosfátového pufru při pH 6; tato extrahovatelnost však nepřesáhla 50 % celkového

obsahu arsenu v zelené nadzemní biomase paprik. Se zvyšujícím se obsahem methanolu v extrakční směsi byl pozorován pokles účinnosti extrakce arsenu ze všech analyzovaných částí rostlin papriky. V plodech paprik byly stanoveny As(III), As(V) a DMA. V zelené nadzemní biomase a kořenech byl hlavní sloučeninou As(V), dále As(III) a též malé podíly DMA a MA (nepřesahující 5 %). Praktické hodnocení vlivu sloučenin arsenu na životní prostředí a na chování těchto sloučenin ve vyšších rostlinách může být zkresleno použitím různých extrakčních činidel v jednotlivých experimentech nebo na jednotlivých kontaminovaných místech⁵⁷. Jak zdůrazňuje Francesconi⁷⁴, podmínky extrakce vhodné pro jednu sloučeninu arsenu mohou být zcela nevhodné pro sloučeninu jinou. Pro správnou interpretaci výsledků speciace arsenu ve vzorcích vyšších rostlin bude analýza jednotlivých vzorků vždy vyžadovat podrobnou úpravu či modifikaci extrakčního postupu.

Poněkud jiná je situace u vzorků půd obsahujících řadu anorganických a organických komponent, které mohou obsahovat As ve své struktuře nebo na svých povrchích. Množství jednotlivých forem arsenu se v tomto případě nejčastěji odhaduje použitím takového loužidla, při kterém nastane vhodná desorpční rovnováha nebo se daná fáze As rozpustí. Volba chemické sloučeniny použité pro extrakci se řídí zejména předpokládanými formami As obsaženými v půdách. Silné kyseliny nejsou schopny kvantitativně uvolnit prvky pevně vázané na silikátovou matici půdních vzorků, přesto se využívají tyto extrakční metody pro přibližný odhad celkového obsahu prvků v půdě, především při zevrubné znalosti půdních parametrů. Lze konstatovat, že tato činidla uvolňují potenciálně mobilizovatelný obsah prvků v půdě, tj. takový podíl, který lze změnou fyzikálně-chemických podmínek (pH, sorpční kapacita, obsah půdní organické hmoty) převést na podíl rostlinám přístupný. Roztoky neutrálních solí uvolňují z půdy frakce prvků přibližně odpovídající podílu prvků přijímaných rostlinami. Jsou tedy velmi vhodné při studiu přestupu prvků z půdy do rostlin⁷⁵. Pro stanovení biopřístupných podílů arsenu v kontaminované půdě a následné hodnocení hygienických rizik při expozici člověka vysokým koncentracím tohoto prvku byly testovány i extrakční metody simulující podmínky v zaživacím traktu člověka^{76,77}.

Metody postupné extrakce se v praxi používají pro stanovení frakcí chemických prvků v půdách, sedimentech, čistírenských kalech a jiných biologických odpadech, kompostech, popílcích, tuhých spadech, odpadech z těžby minerálů a rud^{78,79}. Byly vyvinuty s cílem přesněji definovat zastoupení prvků v jednotlivých frakcích půdy. Obvykle tyto metody zahrnují tři až sedm samostatných stupňů a je tedy přirozené, že jde o metody časově náročné, vyžadující zkušený laboratorní personál a samozřejmě odpovídající instrumentální analytické vybavení. V rámci metody postupné extrakce se používá řada extrakčních činidel, přičemž každé následující je buď účinnější, nebo chemicky zcela odlišné od předchozího. Selektivita jednotlivých činidel je pak ovlivněna zejména chemickými vlastnostmi zvoleného extraktantu, experimentálními parametry, pořadím jednotlivých stupňů, vlivy matrice, jako např. read-

sorpcí prvků, a heterogenitou vzorku. Nejčastější stupně metody postupné extrakce shrnují např. Hlavay a spol.⁸⁰.

Srovnání výsledků získaných pěti různými metodami postupné extrakce ukázalo významnou rozdílnost analytických dat získaných jednotlivými metodami, zvláště u snadno extrahovatelných podílů arsenu⁸¹. Data nevykazují žádné významné závislosti obsahů arsenu extrahovatelných jednotlivými metodami ani průkazný vliv sledovaných půdních charakteristik. Zdá se, že bude nutno doplnit další poznatky o případné readsorpci či redistribuci mobilních forem arsenu v průběhu extrakce, jak upozorňují např. Gómez-Ariza a spol.⁸². Rovněž je pro další experimenty nutno doporučit práci s rozsáhlejšími soubory vzorků, které umožní věrohodnější a podloženější statistické hodnocení výsledků. Největší rozdíly mezi výsledky získanými jednotlivými extrakčními postupy lze nalézt u frakce popsáné jako součet frakcí vázaných na oxidy. Je známo, že oxalátový pufr uvolňuje zejména podíly prvků vázaných na krystalické oxidy železa, zatímco roztok hydroxylamin-hydrochloridu je popisován jako činidlo uvolňující zejména prvky vázané na oxidy manganu. Byla pozorována readsorpce arsenu extrahovaného z půdy okyseleným roztokem hydroxylamin-hydrochloridu ($0,25 \text{ mol l}^{-1}$) na povrch goethitu. Tento jev byl úspěšně potlačen přidávkou kyseliny šťavelové do reakční směsi⁸³.

Odlišné postavení půdní chemie arsenu ve srovnání s ostatními běžně sledovanými rizikovými prvky vedlo k individuálnímu přístupu ve vývoji vhodných metod postupné extrakce. Například Keon a spol.⁸⁴ definují slabě a silně adsorbované podíly arsenu, podíl arsenu koprecipitovaný s půdními oxidy a s amorfními monosulfidy, podíl arsenu koprecipitovaný s krystalickými hydroxid-oxidy železa, dále arsen vázaný ve formě oxidů, podíl arsenu koprecipitovaný s pyrity a konečně sulfidy arsenu. Mihaljevič a spol.⁸⁵ srovnávali čtyři metody postupné extrakce včetně klasické metody dle Tessiera a spol.⁸⁶ především z geochemického pohledu. Konstatovali, že pouze metoda, kterou publikovali Hall a spol.⁸⁷, se ukázala jako vhodná pro frakcionaci arsenu, protože obsahy tohoto prvku extrahovatelné z modelově připravené směsi minerálů odpovídaly hodnotám očekávaným. Tato metoda zahrnuje: i) výměnnou frakci extrahovatelnou 1 mol l^{-1} roztokem CH_3COONa , ii) frakci vázanou na amorfní oxohydroxidy železa extrahovatelnou 1 mol l^{-1} roztokem $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ v $0,25 \text{ mol l}^{-1}$ HCl , iii) frakci vázanou na krystalické oxohydroxidy železa extrahovatelnou $0,25 \text{ mol l}^{-1}$ roztokem $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ve 25% CH_3COOH , iv) frakci vázanou na sulfidy a organickou hmotu extrahovatelnou $8,8 \text{ mol l}^{-1}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + 3,2 \text{ mol l}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a nakonec v) zbytkovou frakci získanou celkovým rozkladem vzorku ve směsi HF-HClO_4 . Autoři zároveň zdůraznili, že metoda není dostačující pro přesnou kvantifikaci jednotlivých frakcí arsenu, ale slouží pouze k odhadu distribuce arsenu do labilních, méně labilních a zbytkových forem tohoto prvku v kontaminovaných půdách. Hudson-Edwards a spol.⁸⁸ pak shrnují, že před volbou vhodné metody postupné extrakce je třeba zajistit co nejdetailnější popis fyzikálně-chemických

a geochemických vlastností studovaných půd. Dále pak doporučují použít vždy více než jednu extrakční metodu, případně použít některé doplňkové analytické techniky pro ověření správnosti výsledků.

Száková a spol.⁸⁹ hodnotili vliv extrakčního činidla na extrahovatelnost mobilních podílů sloučenin arsenu v půdě. Byla testována půda s experimentálním přidavkem roztoků arsenitanu, arseničnanu, MA a DMA v koncentraci 15 mg As kg⁻¹ půdy. Vzorky byly extrahovány demineralizovanou vodou, 0,01 mol l⁻¹ roztokem CaCl₂ a 0,05 mol l⁻¹ roztokem (NH₄)₂SO₄. Srovnáváme-li použité extrakční činidla, pak s výjimkou vzorku půdy po přidávku MA vykazoval síran amonný vyšší extrakci As(III) ve srovnání s chloridem vápenatým a deionizovanou vodou. Zatímco v kontrolních vzorcích extrahovatelné podíly arsenu nepřesáhly 1 % celkového obsahu arsenu v půdě, experimentální přidavek sloučenin arsenu se odrazil ve vyšší extrahovatelnosti tohoto prvku (1,4–8,1 % celkového obsahu arsenu), přičemž se projevil vliv sloučeniny arsenu aplikované do půdy i použitého extrakčního činidla. Ze stanovených sloučenin arsenu převládal arseničnan s malými podíly arsenitanu, MA a DMA v závislosti na sloučenině arsenu aplikované do půdy. Po aplikaci MA do půdy byla v extraktech stanovena kyselina methyларsonitá (MA(III)), což naznačuje vliv mikrobiální činnosti v půdě. Lze konstatovat, že použité extraktanty mohou vést k podobné interpretaci výsledků stanovení sloučenin arsenu, protože distribuce arsenu v jednotlivých sloučeninách tohoto prvku byla porovnatelná u všech tří testovaných činidel. Je však také zřejmé, že přesnější hodnocení transformace arsenu v půdě bude v dalším výzkumu vyžadovat detailnější výzkum mobility arsenu a jeho sloučenin v průběhu vegetace pokusných rostlin včetně sledování procesů v rhizosféře. Při studiu forem stopových látek v půdách se v poslední době loužící postupy doplňují speciálními spektroskopickými metodami mikrorentgenové absorpce či mikrorentgenové fluorescence, které specifikují vazbu arsenu na daném fázovém rozhraní⁹⁰.

3.2. Instrumentální analytické metody stanovení sloučenin arsenu v biologických materiálech

V posledních 20 letech byla vyvinuta celá řada instrumentálních analytických technik použitelných pro stanovení jednotlivých sloučenin arsenu v nejrůznějších materiálech z oblastí životního prostředí, přičemž v posledních 4 letech bylo publikováno více než 400 aplikací těchto technik. Jejich kompletní přehled připravili Francesconi a Kuehnelt². Tento přehled zahrnuje i levné a jednoduché rozlišení As(III) a As(V) spektrofotometrickými metodami, které našlo uplatnění zejména v analýzách vod. Další technikou, která byla testována, je pak kombinace vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) s využitím optické emisní spektrometrie (OES) jako elementově specifické techniky detekce. Tato metoda je však omezena nízkou citlivostí metody OES. Atomová absorpční a atomová fluorescenční spektrometrie (AAS a AFS) v kombi-

naci s technikou generování hydridů (HG), někdy v kombinaci s kolekcí vymrazováním následovanou plynovou chromatografií jsou rovněž poměrně levné techniky, které jsou používány pro stanovení sloučenin tvořících těkavé hydridy (As(III), As(V), MA, DMA) zejména ve vzorcích vody nebo moči. Podobné uplatnění má i technika HPLC-HG-AAS, nebo HPLC-HG-AFS, přičemž byla popsána i varianta, kdy jsou sloučeniny arsenu rozdělené HPLC rozloženy UV zářením či aplikací oxidačních činidel a poté redukovány na AsH₃ a zaváděny do detekčního systému. Účinnost rozkladu však závisí na druhu sloučenin arsenu přítomných ve vzorku a také na matici analyzovaného vzorku⁹¹.

Kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (HPLC-ICPMS) je robustní a velmi citlivou technikou, která umožňuje identifikaci a kvantifikaci širokého spektra sloučenin arsenu. Kvantifikace těchto sloučenin je však založena na srovnání se standardy příslušných sloučenin, je proto závislá na tom, zda jsou tyto sloučeniny k dispozici a neumožňuje identifikaci nových sloučenin arsenu. Mobilní fáze použitelná pro tuto techniku nesmí obsahovat vysoké koncentrace organických rozpouštědel, proto není tato technika vhodná pro stanovení nepolárních sloučenin arsenu, jako např. arsenolipidů. Přes tato omezení je technika HPLC-ICPMS v současné době nejrozšířenější metodou stanovení sloučenin arsenu. U materiálů s obsahem redukovatelných sloučenin arsenu (voda, moč, půda) lze pak s úspěchem využít kombinace HPLC-HG-ICPMS (cit.^{92,93}).

Z dalších méně rozšířených technik je třeba zmínit plynovou chromatografii v kombinaci s hmotnostním spektrometrem (GC-MS), která je použitelná jen pro těkavé sloučeniny arsenu; ostatní sloučeniny vyžadují derivatizaci. Kombinace HPLC-MS-MS pak umožňuje identifikaci neznámých sloučenin arsenu a získání podrobných informací o struktuře těchto sloučenin^{94,95}. Kapilární elektroforéza s UV nebo MS detekcí (CE-UV, CE-MS) nedosahuje detekčních limitů dostatečně nízkých pro biologické vzorky⁹⁶. Rentgenová spektroskopie je technikou, která umožňuje stanovení sloučenin arsenu ve vzorku *in situ* a nevyžaduje převedení tuhých vzorků do roztoku. Tato technika je s úspěchem používána zejména u vzorků sedimentů a půd⁹⁷, ale i u biologických materiálů s vyšším obsahem arsenu⁹⁸. Lze ji však použít pouze k stanovení celkových obsahů arsenu. Pro stanovení sloučenin arsenu ve vodě či půdách lze využít i elektrochemických metod^{99–101}.

4. Závěr

Je zřejmé, že biopřístupnost sloučenin arsenu v půdě je závislá na procesech sorpce a biotransformace těchto sloučenin jak v oblasti rhizosféry, tak i v okolní půdě a speciace arsenu v půdním roztoku je odpovědná za kvantitativní a kvalitativní aspekty speciace arsenu v rostlinách. V souvislosti s možnostmi analytického stanovení sloučenin arsenu je třeba shrnout, že přestože metody frakcionace prvků v půdě a speciace sloučenin arsenu v půdě

a rostlinách patří k moderním analytickým postupům a mohou významně napomoci k poznání procesů transformace arsenu v těchto materiálech, existují při jejich aplikaci mnohá omezení. Široké spektrum používaných metod ztěžuje vzájemné porovnání výsledků, používaná extrakční činidla často nejsou dostatečně selektivní a výsledky dostatečně citlivě neodrážejí změny sledovaných parametrů. Pro zvýšení věrohodnosti výsledků těchto typů analýz je vhodné v konkrétních experimentech kombinovat použité techniky, případně využít další použitelné techniky, jako např. při analýzách půd techniku difuzního gradientu v tenkém filmu (diffusive gradient in thin films, DGT) či stanovení mobility prvků v půdním roztoku odebraném během vegetace. U rostlin je pak třeba dále rozvíjet a optimalizovat metody extrakce či využít nedestruktivních technik, tedy např. laserové ablace nebo rentgenové spektrometrie.

Problematika byla řešena v rámci výzkumného projektu GA ČR číslo 205/06/0298.

LITERATURA

- Nolan A. L., Lombi E., McLaughlin M. J.: *Austr. J. Chem.* 56, 77 (2003).
- Francesconi K. A., Kuehnelt D.: *Analyst* 129, 373 (2004).
- Yudovich Y. E., Ketris M. P.: *Int. J. Coal Geol.* 61, 141 (2005).
- Hyršl J., Kaden M.: *Aufschluss* 43, 95 (1992).
- Morávek P., Janatka J., Pertoldová J., Straka E., Ďurišová J., Pudilová M.: *Econ. Geol. Monogr.* 6, 252 (1989).
- Mihaljevič M., Sistr L., Ettler V., Šebek O., Průša J.: *J. Geochem. Explor.* 81, 59 (2004).
- Chaney R. L.: *Final Report of the Workshop on the Internat. Transportation*. Pan American Health Organisation, Washington 1985.
- O'Neill P., v knize: B. J. Alloway (ed.): *Heavy Metals in Soils*. Str. 83. Blackie, Londýn 1990.
- Pyles R. A., Woolson E. A.: *J. Agric. Food Chem.* 30, 866 (1982).
- Carbonell-Barrachina A., Burlo-Carbonell F., Mañtaix-Beneito J.: *J. Plant Nutr.* 17, 1887 (1994).
- Grosz A. E., Grossman J. N., Garrett R., Friske P., Smith D. B., Darnley A. G., Vowinkel E.: *Appl. Geochem.* 19, 257 (2004).
- Pichler T., Hendry M. J., Hall G. E. M.: *Canad. Environ. Geol.* 40, 495 (2000).
- Raven K. P., Jain A., Loeppert R. H.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 344 (1998).
- Frost R. L., Klopogge J. T.: *Spectrochim. Acta, Part A* 59, 2797 (2003).
- Filippi M., Goliáš V., Pertold Z.: *Environ. Geol.* 45, 716 (2004).
- Jackson B. P., Bertsch P. M.: *Sci. Technol.* 35, 4868 (2001).
- Brouwere K. D. E., Smolders E., Merckx R.: *Eur. J. Soil Sci.* 55, 165 (2003).
- Szákóvá J., Tlustoš P., Balík J., Pavlíková D., Vaněk V.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 363, 594 (1999).
- Baroni F., Boscagli A., DiLella L. A., Protano G., Riccobono F.: *J. Geochem. Explor.* 81, 1 (2004).
- Masscheleyn P. H., Delaune R. D., Patrick W. H. Jr.: *Environ. Sci. Technol.* 25, 1414 (1991).
- McGeehan S. L., Naylor D. V.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 337 (1994).
- Bowell R. J.: *Environ. Geochem. Health* 16, 84 (1994).
- Marin A. R., Masscheleyn P. H., Patrick W. H. Jr.: *Plant Soil* 152, 245 (1993).
- Garcia-Manyes S., Jimenez G., Padro A., Rubio R., Rauret G.: *Talanta* 58, 97 (2002).
- Tlustoš P., Goessler W., Szákóvá J., Balík J.: *Appl. Organomet. Chem.* 16, 216 (2002).
- Bissen M., Frimmel F. H.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 367, 51 (2000).
- Bowell R. J., Morley N. H., Din V. K.: *Appl. Geochem.* 9, 15 (1994).
- Smith E., Naidu R., Alston A. M.: *J. Environ. Qual.* 28, 1719 (1999).
- Smith E., Naidu R., Alston A. M.: *J. Environ. Qual.* 31, 557 (2002).
- Lafferty B. J., Loeppert R. H.: *Environ. Sci. Technol.* 39, 2120 (2005).
- Meng X. G., Jing C. Y., Korfiatis G. P.: *ACS Symp. Ser.* 835, 70 (2003).
- Dopp E., Hartmann L. M., Florea A.-M., Rettenmeier A. W., Hirner A. W.: *Crit. Rev. Toxicol.* 34, 301 (2004).
- Baker M. D., Innis W. E., Mayfield C. I., Wong P. T. S., Chau Y. K.: *Environ. Technol. Lett.* 4, 89 (1983).
- Frankenberger W. T. Jr, Losi M. E., v knize: *Bioremediation: Science and Applications*. (Skipper H. D., Turco R. F. (ed.), str. 173. Soil Science Society of America, Madison 1995.
- Macur R. E., Jackson C. R., Botero L. M., McDermott T. R., Inskeep W. P.: *Environ. Sci. Technol.* 38, 104 (2004).
- Michalke K., Wickenheiser E. B., Mehring M., Hirner A. V., Hensel R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2791 (2000).
- Abedin M. J., Feldmann J., Meharg A. A.: *Plant Physiol.* 128, 1120 (2002).
- Pongratz R.: *Sci. Total Environ.* 224, 133 (1998).
- Carbonell-Barrachina A. A., Jugsujinda A., Burlo-Carbonell F., Delaune R. D., Patrick W. H.: *Water Res.* 34, 216 (2000).
- Sheppard S. C.: *Water Air Soil Pollut.* 64, 539 (1992).
- Dembitsky V. M., Řezanka T.: *Plant Sci.* 165, 1177 (2003).
- Tlustoš P., Balík J., Szákóvá J., Pavlíková D.: *Rostl. Vyr.* 44, 7 (1998).
- Marin A. R., Masscheleyn P. H., Patrick W. H. Jr.:

- Plant Soil 139, 175 (1992).
44. Jiang Q. Q., Singh B. R.: Water Air Soil Pollut. 74, 321 (1994).
 45. Chang P., Kim J. Y., Kim K. W.: Environ. Geochem. Health 27, 109 (2005).
 46. Cullen W. R., Reimer K. J.: Chem. Rev. 89, 713 (1989).
 47. Tlustoš P., Goessler W., Száková J., Pavlíková D., Balík J.: Plant, Soil Environ. 50, 540 (2004).
 48. Schmidt A. C., Mattusch J., Reisser W.: Proc. ISEB 2001 Meeting "Phyto-remediation" Leipzig, May 2001. Str. 117.
 49. Kuehnelt D., Lintschinger J., Goessler W.: Appl. Organomet. Chem. 14, 411 (2000).
 50. Geiszinger A., Goessler W., Kosmus W.: Appl. Organomet. Chem. 16, 245 (2002).
 51. Zhang W. H., Cai Y., Tu C., Ma L.Q.: Sci. Total Environ. 300, 167 (2002).
 52. Tu C., Ma L. Q.: J. Environ. Qual. 31, 641 (2002).
 53. Wu J. H., Zhang R., Lilley R. M.: Funct. Plant Biol. 29, 73 (2002).
 54. Quaghebeur M., Rengel Z.: Physiol. Plant. 120, 280 (2004).
 55. Vela N. P., Heitkemper D. T., Stewart K. R.: Analyst 126, 1011 (2001).
 56. Quaghebeur M., Rengel Z. Smirk M.: J. Anal. At. Spectrom. 18, 128 (2003).
 57. Száková J., Tlustoš P., Goessler W., Pavlíková D., Balík J.: Appl. Organomet. Chem. 19, 308 (2005).
 58. Carbonell-Barrachina A. A., Burlo-Carbonell F., Burgos-Hernandez A., Lopez E. Mataix-Beneito J.: Sci. Hortic. 71, 167 (1997).
 59. Raab A., Feldmann J., Meharg A. A.: Plant Physiol. 134, 1113 (2004).
 60. Gupta G. K., Tohoyama H., Joho M., Inouhe M.: J. Plant Res. 117, 253 (2004).
 61. Ma L. Q., Komar K. M., Tu C., Zhang W. H., Cai Y., Kennelley E. D.: Nature 409, 579 (2001).
 62. Visoottiviseth P., Francesconi K., Sridokchan W.: Environ. Pollut. 118, 453 (2002).
 63. Zhao F. J., Dunham S. J., McGrath S. P.: New Phytol. 156, 27 (2002).
 64. Fitz W. J., Wenzel W. W., Zhang H., Nurmi J., Štípek K., Fischerová Z., Schweiger P., Köllensperger G., Ma L. Q., Stinger G.: Environ. Sci. Technol. 37, 5008 (2003).
 65. Kuehnelt D., Irgolic K. J., Goessler W.: Appl. Organomet. Chem. 15, 445 (2001).
 66. Goessler W., Lintschinger J., Száková J., Mader P., Kopecký J., Doucha J., Irgolic K. J.: Appl. Organomet. Chem. 11, 57 (1997).
 67. Zheng J., Hintelmann H., Dimock B., Dzurko M. S.: Anal. Bioanal. Chem. 377, 14 (2003).
 68. Heitkemper D. T., Vela N. P., Stewart K. R., Westphal C. S.: J. Anal. At. Spectrom. 16, 299 (2001).
 69. Bohari Y., Lobos G., Pinochet H., Pannier F., Astruc A., Potin-Gautier M.: J. Environ. Monit. 4, 596 (2002).
 70. He B., Fang Y., Jiang G. B., Ni Z. M.: Spectrochim. Acta, Part B 57, 1705 (2002).
 71. Caruso J. A., Heitkemper D. T., B'Hymer C.: Analyst 126, 136 (2001).
 72. Quaghebeur M., Rengel Z.: Plant Physiol. 132, 1600 (2003).
 73. Schmidt A. C., Reisser W., Mattusch J., Popp P., Wennrich R.: J. Chromatogr., A 889, 83 (2000).
 74. Francesconi K. A.: Appl. Organomet. Chem. 17, 682 (2003).
 75. Száková J., Tlustoš P., Balík J., Pavlíková D., Balíková M.: Chem. Listy 95, 179 (2001).
 76. Ruby M. V., Davis A., Schoof R., Eberle S., Sellstone C. M.: Environ. Sci. Technol. 30, 422 (1996).
 77. Juhasz A. L., Smith E., Weber J., Naidu R.: Proc. 8th Int. Conf. on the Biogeochemistry of Trace Elements, Adelaide 2005. Str. 148.
 78. Filgueiras A. V., Lavilla I., Bendicho C.: J. Environ. Monit. 4, 823 (2002).
 79. Száková J., Sysalová J., Tlustoš P.: Plant, Soil Environ. 51, 376 (2005).
 80. Hlavay J., Prohaska T., Weisz M., Wenzel W. W., Stinger G. J.: Pure Appl. Chem. 76, 415 (2004).
 81. Tlustoš P., Száková J., Stárková A., Pavlíková D.: Centr. Eur. J. Chem. 3, 830 (2005).
 82. Gómez-Ariza J. L., Giráldez I., Sánchez-Rodas D., Morales E.: Anal. Chim. Acta 399, 295 (1999).
 83. Wenzel W. W., Kirchbaumer N., Prohaska T., Stinger G., Lombi E., Adriano D. C.: Anal. Chim. Acta 436, 1 (2001).
 84. Keon N. E., Swartz C. H., Brabander D. J., Harvey C., Hemond H. F.: Environ. Sci. Technol. 35, 2778 (2001).
 85. Mihaljevič M., Poňavič M., Ettler V., Šebek O.: Anal. Bioanal. Chem. 377, 723 (2003).
 86. Tessier A., Campbell P. G. C., Bisson M.: Anal. Chem. 51, 844 (1979).
 87. Hall G. E. M., Vaive J. E., Beer R., Hoashi M.: J. Geochem. Explor. 56, 59 (1996).
 88. Hudson-Edwards K. A., Houghton S. L., Osborn A.: Trends Anal. Chem. 23, 745 (2004).
 89. Száková J., Tlustoš P., Goessler W., Pavlíková D., Balík J., Schlagenhaufen C.: Anal. Bioanal. Chem. 382, 142 (2005).
 90. Sparks D. L.: Environmental Soil Chemistry, 2. vyd. Academic Press, San Diego 2002.
 91. Sanchez-Rodas D., Geiszinger A., Gomez-Ariza J. L., Francesconi K. A.: Analyst 127, 60 (2002).
 92. Wei X. Y., Brockhoff-Schwegel C. A., Creed J. T.: J. Anal. At. Spectrom. 16, 12 (2001).
 93. Nakazato T., Tao H., Taniguchi T., Isshiki K.: Talanta 58, 121 (2002).
 94. Larsen B. R., Astorga-Llorens C., Florencio M. H., de Bettencourt A. M.: J. Chromatogr. 926, 167 (2001).
 95. Pergantis S. A., Wangkarn S., Francesconi K. A., Thomas-Oates J. E.: Anal. Chem. 72, 357 (2000).

96. Sun B. G., Macka M., Haddad P. R.: *Electrophoresis* 23, 2430 (2002).
97. Paktunc D., Foster A., Laflamme G.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 2067 (2003).
98. Langdon C. J., Meharg A. A., Feldmann J., Balgar T., Charnock J., Farquhar M., Pearce T. G., Semple K. T., Cotter-Howells J.: *J. Environ. Monit.* 4, 603 (2002).
99. Ferreira M. A., Barros A. A.: *Anal. Chim. Acta* 459, 151 (2002).
100. Muñoz E., Palmero S.: *Talanta* 65, 613 (2005).
101. Cepriá G., Alexa N., Lordos E., Castillo J. R.: *Talanta* 66, 875 (2005).

J. Száková^a, M. Mihaljevič^b, and P. Tlustoš^a
(^a *Department of Agrochemistry and Plant Nutrition, Czech University of Agriculture, Prague*, ^b *Institute of Mineralogy, Geochemistry and Mineral Resources, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Mobility, Transformation, and Essential Methods of Determination of Arsenic Compounds in Soil and Plants**

The influence of sorption and biotransformation of As compounds and their speciation in rhizosphere and/or in the bulk soil on bioavailability of these compounds is evident. Various analytical methods of determination of As compounds in soil and plants are available for investigation of transformation of As in soil and plants. However, many limitations of these methods were reported. A variety of methods make difficult a comparison of results from individual laboratories, selectivity of extraction agents is frequently insufficient, and the results do not sufficiently reflect changes in experimental parameters. For improvement of credibility of the results, a combination of two or more techniques is recommended. For soil samples, diffusive gradient in thin films or determination of As mobility in soil solution collected during vegetation period are available. For plants, optimization of extraction techniques or application of non-destructive techniques such as X-ray spectrometry and laser ablation are necessary in further research.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ Cr(III) A Cr(VI) METODOU IONTOVÉ CHROMATOGRRAFIE

PAVEL JANOŠ^a, PAVEL KURÁŇ^b a MILENA
ŘÍDKÁ^b

^a *Fakulta životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty
Purkyně, Králova Výchina 7, 400 96 Ústí nad Labem,*

^b *Výzkumný ústav anorganické chemie, a. s., Revoluční 84,
400 01 Ústí nad Labem
janos@fzp.ujep.cz*

Došlo 12.9.05, přepracováno 13.4.06, přijato 22.6.06.

Klíčová slova: iontová chromatografie, stanovení kovů,
chrom(III), chrom(VI)

Úvod

Chrom se vyskytuje v životním prostředí převážně v oxidačních stupních III (jako chromitý kation) a VI (chromanový či dichromanový anion), přičemž obě formy se dramaticky liší svou toxicitou, mobilitou a dalšími vlastnostmi důležitými pro posouzení vlivů na lidské zdraví či přírodní ekosystémy. Spektrální analytické metody – atomová absorpční spektrometrie (AAS) či spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, ICP-MS) – nejčastěji používané pro stanovení kovů, neumožňují rozlišení oxidačních stavů prvků bez náročné separace a předúpravy vzorků. Ke stanovení chromu v různých oxidačních stavech lze využít některých známých spektrofotometrických metod¹. Selektivita těchto metod však obvykle není dostačující pro analýzu složitých reálných vzorků, např. různých složek životního prostředí, a proto je třeba použít předběžnou separaci², což komplikuje analýzu a zvyšuje nebezpečí nežádoucího posunutí rovnováhy mezi oběma oxidačními stavy chromu.

Významnou úlohu ve speciální analýze (kam lze zařadit i rozlišení oxidačních stavů prvků) hrají moderní separační techniky, zejména různé varianty kapalinové chromatografie, z nichž ty, které se používají pro separaci iontů, jsou známy pod souhrnným názvem iontová chromatografie^{3–8}. Cr(VI) lze stanovit metodami iontové chromatografie s vodivostní⁹ nebo přímou fotometrickou¹⁰ detekcí. Častěji se však při detekci využívá vysoce citlivé pokolonové derivatizační reakce Cr(VI) s difenylkarbazidem (DPC) (cit.^{9,11}). Pro současné stanovení kationtů a aniontů metodami iontové chromatografie se kationty

kovů převádějí na vhodné záporně nabitě komplexy⁷. Chromité kationty tvoří dostatečně stabilní komplexy s EDTA a podobnými komplexotvornými činidly. Komplexy Cr(III) jsou intenzivně zbarvené a využívají se též při spektrofotometrickém stanovení chromu^{1,2,12–14}. Tvorba komplexů Cr(III) je za pokojové teploty poměrně pomalá, a proto se při chromatografické analýze obvykle připravují před nástřikem na kolonu za zvýšené teploty (předkolonová derivatizace)⁹. Při derivatizaci je třeba především zabránit redukci případně přítomného chromanového aniontu. Použití EDTA jako derivatizačního činidla proto není nejvhodnější, neboť může způsobovat redukci Cr(VI) (cit.¹²), na rozdíl od příbuzných činidel, jako jsou kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová (PDCA) nebo kyselina cyklohexan-1,2-diamin-*N,N,N',N'*-tetraoctová (CDTA) (cit.^{1,12}).

Pro současné stanovení chromu v obou nejdůležitějších oxidačních stavech (III a VI) byla v této práci použita tzv. multifunkční kolona Dionex IonPac CS5A. Separace probíhala iontově výměnným mechanismem – Cr(VI) byl separován ve formě příslušných oxoaniontů a detegován fotometricky s využitím pokolonové derivatizace s DPC, zatímco chromitý kation byl před vlastní chromatografickou analýzou převeden na barevný komplex reakcí s CDTA. Při návrhu chromatografického systému byl použit postup doporučený firmou Dionex⁹. Složení mobilní fáze bylo modifikováno tak, aby iontově chromatografická metoda byla použitelná pro analýzu širokého spektra technických a jiných složitých vzorků, přičemž byly brány v úvahu následující požadavky:

1. Mobilní fáze by měla mít dostatečně vysokou pufráčnou kapacitu, která by udržovala požadované pH během derivatizace a separace. Proto byl za základ mobilní fáze (a derivatizačního činidla) použit poměrně koncentrovaný roztok octanu amonného.
2. Mobilní fáze by měla obsahovat anion s vysokou eluční schopností, aby byly anionty Cr(VI) eluovány v přijatelném čase. Jak chromany, tak dichromany totiž patří mezi nejsilněji zadržované anionty v iontové chromatografii¹⁵. Jako silné eluční činidlo byl proto do mobilní fáze přidán chloristan¹⁰.
3. Mobilní fáze by měla vykazovat určité komplexotvorné vlastnosti, které by bránily hydrolyze vícevalentních kationtů kovů (včetně Cr³⁺), které bývají přítomny v mnoha typech reálných vzorků. Komplexotvorné vlastnosti vykazuje octanový pufr jako hlavní složka mobilní fáze. Navíc bylo do mobilní fáze přidáno malé množství komplexotvorného činidla CDTA.
4. Ionty Γ^- používané v některých postupech⁹ jako silné elující anionty mohou za určitých podmínek redukovat Cr(VI), a proto byly nahrazeny chloristanovými ionty.

Jedním z kritických parametrů mobilní fáze je hodno-

ta pH. Při použití mobilních fází s příliš nízkou hodnotou pH je pík příslušející Cr(VI) nízký a špatně vyvinutý, a proto se doporučují spíše alkalické mobilní fáze^{9,11}. Naopak pro tvorbu komplexu chromitého kationtu s CDTA je zapotřebí kyselé prostředí^{1,13}. Vyhovujícím kompromisem pro vznik komplexu Cr(III) a úspěšnou separaci Cr(III) a Cr(VI) jsou hodnoty pH mobilní fáze v rozmezí asi 4–6 (cit.^{9,11}).

Navržená metoda byla použita při analýze různých technických materiálů (chromovacích lázní) a vzorků životního prostředí.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Iontový chromatograf ICS-1000 (Dionex, Sunnyvale, USA) se skládal z vysokotlakého izokratického čerpadla, elektronicky ovládaného smyčkového dávkovače Rheodyne s dávkovací smyčkou 50 μl , vakuového odplyňovacího zařízení a kolonového termostatu. Pokolonové derivatizační zařízení PC10 se skládalo z pneumatického dávkovače, směšovacího zařízení a reakční smyčky o objemu 375 μl . K detekci byl použit fotometrický detektor AD 25 (Dionex) pracující při vlnové délce 530 nm. Separace probíhala na koloně IonPac CS5A (4 \times 250 mm) plněné vicefunkčním měničem iontů o zrnitosti 9 μm obsahujícím jak aniontově výměnné kvartérní amoniové skupiny, tak kationtově výměnné sulfonové funkční skupiny. Před analytickou kolonou byla zařazena předkolona IonPac CG5A plněná stejným měničem iontů. Obě kolony vyrábí firma Dionex. Podle údajů výrobce je kapacita analytické kolony 40 μekv . pro anionty a 20 μekv . pro kationty. Během měření byly kolony termostátovány na 30 $^{\circ}\text{C}$. Průtok mobilní fáze byl 1,2 ml min^{-1} a průtok pokolonového derivatizačního činidla byl 0,6 ml min^{-1} .

Chemikálie

Kyselina cyklohexan-1,2-diamin- N,N,N,N' -tetraoctová (CDTA, Chelaton 4) a další chemikálie s výjimkou methanolu byly čistoty p.a (Lachema Neratovice). Methanol (HPLC-grade) byl od Labscan Analytical Sciences, Dublin, Irsko. Roztoky byly připravovány v deionizované vodě ze zařízení Demi Ultra 20 (Goro, Praha) využívajícího reverzní osmózy a směsného měniče iontů k čištění vody.

Zásobní roztok A obsahoval 20 mmol l^{-1} CDTA a 1000 mmol l^{-1} octanu amonného. Zásobní roztok B obsahoval 100 mmol l^{-1} chloristanu sodného. Mobilní fáze byla připravována smícháním zásobních roztoků A a B v potřebném poměru a zředěním vodou. Pokud není uvedeno jinak, byla používána mobilní fáze o složení 100 mmol l^{-1} octanu amonného, 10 mmol l^{-1} chloristanu sodného, 2 mmol l^{-1} CDTA, pH bylo 5,5 \pm 0,1. Standardní roztoky Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci 1000 mg l^{-1} byly

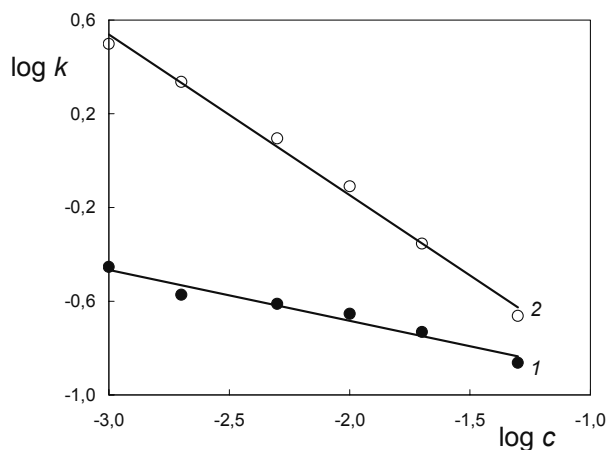
připraveny ze síranu chromitého a dichromanu draselného podle⁹. Před měřením byly podle potřeby ředěny deionizovanou vodou. Pokolonové derivatizační činidlo obsahovalo 2 mmol l^{-1} difenylkarbazidu (DPC), 450 mmol l^{-1} kyseliny sírové a 10 % (v/v) methanolu⁹.

Příprava vzorků

Díky vysoké pufrací kapacitě derivatizačního roztoku i mobilní fáze nevyžadují vzorky odpadních vod obvykle úpravu pH ani jinou předběžnou úpravu. Koncentrované vzorky, jako např. chromovací lázně, byly před analýzou ředěny vodou. Vzorky obsahující vysoké koncentrace Cr(III) byly ředěny mobilní fází. K předkolonové derivatizaci – přípravě komplexů Cr(III) s CDTA – se používá zásobní roztok A (viz výše). 10 ml vzorku se smíchá s 10 ml roztoku A a mírně vaří po dobu 5 min (cit.¹³). Po ochlazení se doplní vodou na objem 100 ml.

Výsledky a diskuse

CDTA tvoří s kovy většinou komplexy typu 1 : 1 (cit.^{13,16}). Komplexům CDTA s Cr(III) je přisuzováno složení vyjádřené vzorcem $[\text{CrL}]^{-}$ nebo CrLX_2 kde L odpovídá CDTA a X je H_2O , OH^{-} nebo octanový anion¹³. Lze předpokládat, že komplexy Cr(III) s CDTA nesou parciální záporný náboj, což je důležité pro jejich separaci mechanismem aniontové chromatografie. Retenci komplexu Cr(III)-CDTA i aniontů Cr(VI) lze ovlivňovat nejnápadněji změnou koncentrace chloristanu v mobilní fází. V obou případech retence klesá s rostoucí koncentrací chloristanu (viz obr. 1). Závislosti logaritmu retenčního



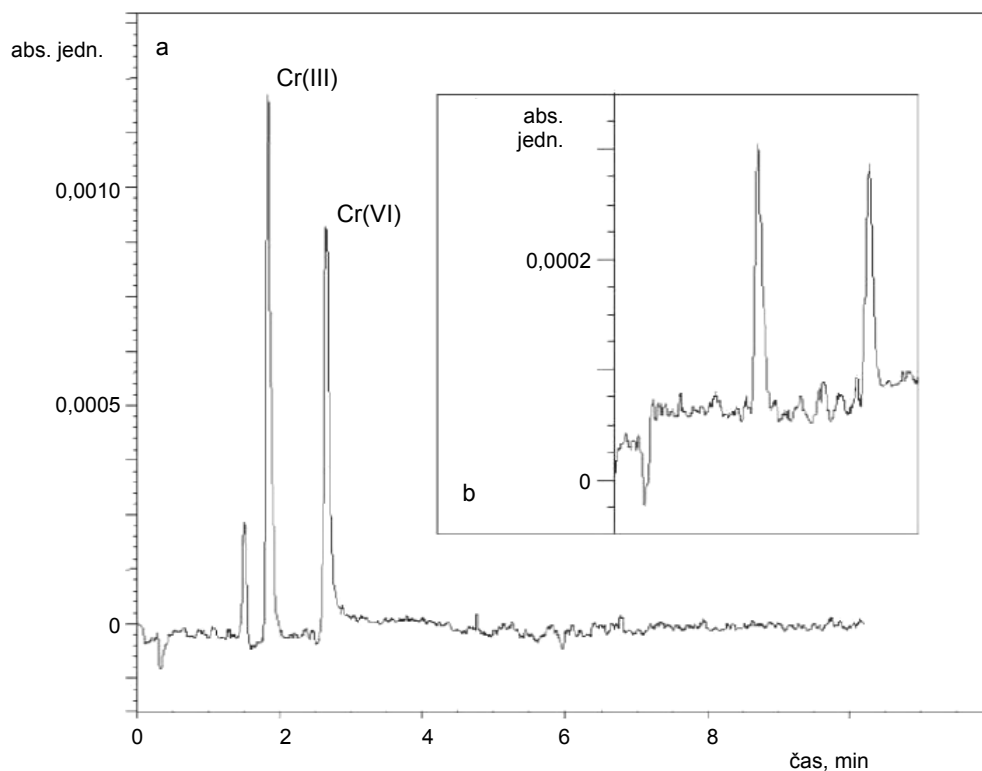
Obr. 1. Závislosti logaritmu retenčního faktoru k na logaritmu koncentrace NaClO_4 v mobilní fází; kolony: IonPac CS5A (4 \times 250 mm) a IonPac CG5A (4 \times 50 mm), Dionex. Mobilní fáze: 100 mmol l^{-1} octan amonný + 2 mmol l^{-1} CDTA + 1–50 mmol l^{-1} NaClO_4 , pH 5,5 \pm 0,1. Fotometrická detekce při 530 nm s využitím pokolonové derivatizace s difenylkarbazidem. Průtok mobilní fáze 1,2 ml min^{-1} , průtok pokolonového derivatizačního činidla 0,6 ml min^{-1} , teplota 30 $^{\circ}\text{C}$. 1 – Cr(III), 2 – Cr(VI)

faktoru na logaritmu koncentrace chloristanu jsou lineární v souladu s předpokládaným iontově výměnným mechanismem retence. Ačkoliv při dané hodnotě pH (cca 5,5) je formální náboj chromanového aniontu blízký jedné¹⁸, směrnice logaritmické závislosti na obr. 1 je menší (v absolutní hodnotě) než jedna. Podobné závislosti byly často pozorovány (i pro běžnější anionty, jako jsou např. chloridy či dusičnany) při použití tzv. polyaniontových eluentů, tj. eluentů obsahujících více než jeden druh elujícího iontu – pro podrobnější vysvětlení a příslušné teoretické vztahy viz např.^{19,20}. Z praktického hlediska je důležité, že směrnice závislosti na koncentraci chloristanu se liší pro jednotlivé separované látky, což umožňuje snadnou optimalizaci separace.

Na základě výše uvedených úvah bylo pro současné stanovení Cr(III) a Cr(VI) zvoleno následující složení mobilní fáze: 100 mmol l⁻¹ octan amonný, 10 mmol l⁻¹ NaClO₄, 2 mmol l⁻¹ CDTA, pH 5,5±0,1. Příklad separace je uveden na obr. 2a. Základní charakteristiky metody stanovení Cr(III) a Cr(VI) jsou shrnuty v tabulce I. Navržená metoda umožňuje stanovení Cr(III) na úrovni 10⁻¹ mg l⁻¹ a Cr(VI) na úrovni 10⁻³ mg l⁻¹ s vysokou přesností, což je

postačující pro analýzu většiny technických vzorků a vzorků z oblasti životního prostředí. V případě nutnosti je možné další snížení mezí detekce a stanovitelnosti úpravou instrumentálních parametrů (především zvětšením nastříkovaného objemu vzorku a optimalizací pokolonové derivatizace), jak navrhli Thomas a spol.²² pro stanovení Cr(VI) v pitné vodě.

Navržená metoda byla aplikována při analýze různých technických vzorků a vzorků životního prostředí (odpadních vod, vodných výluhů, chromovacích lázní) obsahujících vysoké koncentrace dalších iontů, jako jsou kationty alkalických kovů a kovů alkalických zemin, kationty přechodných kovů, chloridy či síranové anionty. Riziko redukce Cr(VI) ionty Fe(II) či huminovými látkami, které mohou být přítomny v některých typech vzorků, je do značné míry minimalizováno při zvolené hodnotě pH²³. Bez předkolonové derivatizace je navržená metoda vhodná pro stanovení stopových koncentrací Cr(VI) za přítomnosti vysokých koncentrací Cr(III), což bylo využito při analýze použitých chromovacích lázní a sledování jejich zneškodňování různými redukčními činidly. Jak je vidět z obr. 2b, stopové množství Cr(VI) – 2 μg l⁻¹ – je možno stanovit za



Obr. 2. Separace Cr(III) a Cr(VI); a) Separace modelové směsi obsahující 1 mg l⁻¹ Cr(III) a 0,01 mg l⁻¹ Cr(VI). b) Stanovení stopového množství (cca 2 μg l⁻¹) Cr(VI) za přítomnosti velkého přebytku (cca 10 mg l⁻¹) chromitých iontů bez předkolonové derivatizace (vyčerpaná chromovací lázeň po redukcí SO₂). První pik odpovídající Cr(III) vzniká v důsledku ředění vzorku mobilní fází obsahující CDTA a dokazuje, že v malé míře reaguje Cr(III) s CDTA i za studena. Mobilní fáze: 100 mmol l⁻¹ octan amonný + 2 mmol l⁻¹ CDTA + 2 mmol l⁻¹ NaClO₄, pH 5,54, ostatní podmínky jako na obr. 1.

Tabulka I
Charakteristiky metody - stanovení Cr(III) a Cr(VI)

Charakteristika	Cr(III)	Cr(VI)
Mez detekce ^a , $\mu\text{g l}^{-1}$	111	1,20
Mez stanovitelnosti ^b , $\mu\text{g l}^{-1}$	370	3,89
Linearita, mg l^{-1}	do 15 ($r = 0,996$)	do 0,2 ($r = 0,994$)
Citlivost ^c , $\text{abs.jedn.min.l.mg}^{-1}$	$9,78 \cdot 10^{-5}$	$9,37 \cdot 10^{-3}$
Opakovatelnost – vyšší koncentrace ^d (rel. směrodatná odchylka, %)	0,56	3,71
Opakovatelnost – nižší koncentrace ^e (rel. směrodatná odchylka, %)	3,70	3,89

^a Trojnásobek směrodatné odchylky²¹, ^b desetinásobek směrodatné odchylky²¹, ^c směrnice kalibrační přímky, ^d pro 15 mg l^{-1} Cr(III) a $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ Cr(VI), $n = 7$, ^e pro 1 mg l^{-1} Cr(III) a $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ Cr(VI), $n = 7$

přítomnosti až $5 \cdot 10^5$ – násobného přebytku Cr(III). Některé příklady stanovení jsou uvedeny v tabulce II.

Při analýze tuhých vzorků je kritickým stupněm extrakce převedení jednotlivých forem chromu do roztoku, aniž dojde k posunu rovnováhy, zejména k redukci Cr(VI). Pro selektivní stanovení Cr(VI) v tuhých materiálech, jako jsou půdy, kaly, sedimenty, pevné odpady²³, cement a příbuzné materiály²⁴, prachové částice^{25,26}, pigmenty²⁷ či biologické materiály²⁸, byla navržena různá extrakční činidla. V poslední době se objevují snahy o harmonizaci a standardizaci těchto postupů, nicméně zdá se, že plně uspokojivé řešení vyhovující pro široké spektrum materiálů (zejména vzorků životního prostředí) nebylo dosud na-

lezeno – podrobnější diskusi lze nalézt v přehledném článku²³. Problematika spolehlivé extrakce Cr(VI) z tuhých vzorků nebyla ovšem předmětem tohoto článku. Bylo pouze demonstrováno, že navržená iontově chromatografická metoda umožňuje analýzu extrakčních roztoků používaných ve zmíněných pracích. Nejčastěji se k extrakci Cr(VI) používají alkalické uhličitanové pufrů (NaOH/Na₂CO₃/NaHCO₃)^{23,24,26}. Fosforečnanový pufr obsahující MgSO₄ byl navržen k extrakci Cr(VI) za přítomnosti redukčních činidel^{23,25}. Analýzy obohacených vzorků (viz tabulka II) ukazují, že iontově chromatografická metoda je kompatibilní s nově vyvíjenými extrakčními postupy pro selektivní stanovení Cr(VI) v tuhých vzorcích.

Tabulka II
Stanovení Cr(VI) v obohacených vzorcích

Matrice vzorku	Dáno Cr(VI) [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Nalezeno Cr(VI) ^a [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Výtěžnost [%]
Cr(III) ^b , cca 10 mg l^{-1}	10	9,55 (0,27)	93,3–97,6
Cr(III) ^b , cca 10 mg l^{-1}	5	5,10 (0,43)	95,1–108,9
$0,28 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$ ^c	10	10,50 (0,24)	103,9–106,7
$0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4 + 0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ MgSO}_4$, pH 6,98 ^d	10	9,98 (0,08)	99,5–100,1
$0,28 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH} + 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4 + 0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ MgSO}_4 + 10 \text{ mg l}^{-1}$ humínových kyselin ^e	10	9,79 (0,99)	92,4–103,3

^a V závorce uvedeny směrodatné odchylky, $n = 4$, ^b vyčerpaná chromovací lázeň redukována SO₂, ředěno mobilní fází, ^c extrakční roztok pro stanovení Cr(VI) v tuhých vzorcích²³, ^d extrakční roztok pro stanovení Cr(VI) v tuhých vzorcích^{23,25}, ^e modelový roztok simulující extrakci Cr(VI) z tuhých vzorků obsahujících humínové látky (např. půd) s využitím standardního postupu²³

Tato práce vznikla jako součást řešení projektů výzkumného centra „Pokročilé sanační technologie a procesy“ podporovaného MŠMT, projekt č. 1M0554.

LITERATURA

1. Malát M.: *Absorpční anorganická fotometrie*. Academia, Praha 1973.
2. Malát M.: *Extrakční spektrofotometrie kovů a nekovů*. SNTL, Praha 1988.
3. Haddad P. R., Jackson P. E.: *Ion Chromatography. Principles and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1990.
4. Janoš P., Pacáková V., Štulík K., Šulcek Z.: Chem. Listy 82, 804 (1988).
5. Pacáková V., Štulík K., v knize: *Nové směry v analytické chemii* (Zýka J., ed.), sv. 5, str. 88. SNTL, Praha 1989.
6. Janoš P.: Chem. Listy 86, 734 (1992).
7. Nesterenko P. N.: Trends Anal. Chem. 20, 311 (2001).
8. Kubáň P., Guchardi R., Hauser P. C.: Trends Anal. Chem. 24, 192 (2005).
9. Dionex Corp.: *Determination of Chromium by Ion Chromatography*. Technical Note TN 24. Dionex, Sunnyvale 1991.
10. Janoš P.: Fresenius' J. Anal. Chem. 342, 195 (1992).
11. Pobozy E., Wojasinska E., Trojanowicz M.: J. Chromatogr., A 736, 141 (1996).
12. Verma M. R., Buchar V. M., Agrawal K. C., Sharma R. K.: Microchim. Acta 47, 766 (1959).
13. Selmer-Olsen A. R.: Anal. Chim. Acta 26, 482 (1962).
14. den Boef G., Poeder B. C.: Anal. Chim. Acta 30, 261 (1964).
15. Smith F. C., Chang R. C.: *The Practice of Ion Chromatography*. John Wiley, New York 1983.
16. Radanovic D. J.: Coord. Chem. Rev. 54, 159 (1984).
17. Kotrlý S., Šůcha L.: *Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry*. John Wiley, New York 1985.
18. Hirokawa T., Nishino M., Aoki N., Kiso Y.: J. Chromatogr. 271, D1 (1983).
19. Janoš P., Aczel P.: J. Chromatogr., A 749, 115 (1996).
20. Janoš P.: J. Chromatogr., A 789, 3, (1997).
21. EURACHEM: *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. LGC, Teddington 1998. České vydání: Suchánek M. (ed.): *Vhodnost analytických metod pro daný účel. Kvalimetrie 9*. EURACHEM-ČR, Praha 1999.
22. Thomas D. H., Rohrer P. E., Jackson P. E., Pak T., Scott J. N.: J. Chromatogr., A 956, 255 (2002).
23. Pettine M., Capri S.: Anal. Chim. Acta 540, 231 (2005).
24. Podgieter S. S., Panichev N., Potgieter J. H., Panicheva S.: Cement Concrete Res. 33, 1589 (2003).
25. Borai E. H., El-Sofany E. A., Abdel-Halim A. S.: Trends Anal. Chem. 21, 741 (2002).
26. Hazelwood K. J., Drake P. L., Ashley K., Marcy D.: J. Occup. Environ. Hyg. 1, 613 (2004).
27. Korolczuk M., Grabarczyk M.: Talanta 66, 1320 (2005).
28. Harzdorf C., Lewalter J.: Regul. Toxicol. Pharmacol. 26, S86 (1997).

P. Janoš^a, P. Kuráň^b, and M. Řídká^b (^a J.E. Purkyně University, Faculty of Environment, Ústí nad Labem, ^b Research Institute of Inorganic Chemistry, Ústí nad Labem): **Determination of Cr(III) and Cr(VI) by Ion Chromatography**

Simultaneous separation and determination of Cr(III) and Cr(VI) was carried out on a multifunctional ion-exchange column Dionex IonPac CS5A in the anion-exchange mode. Cr(III) cations were converted to negatively charged complexes by pre-column derivatization with cyclohexane-1,2-diamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (CDTA) prior to separation. The mobile phase contained 100 mmol l⁻¹ ammonium acetate, 10 mmol l⁻¹ sodium perchlorate and 2 mmol l⁻¹ CDTA. Post-column derivatization with diphenylcarbazide was employed for photometric detection of Cr(VI). The proposed method allows to determine Cr(III) at a level of 10¹ mg l⁻¹ and Cr(VI) at 10⁻³ mg l⁻¹ with high precision. Relative standard deviations of repeatability ranged from 0.6 to 3.9 % in dependence on the analyte concentration. The procedure was used for analyses of various industrial (plating baths) as well as environmental samples.

VSOĽOVACÍ EFEKT, VÝPOČET AKTIVITNÝCH KOEFICIENTOV A STANOVENIE GIBBSOVÝCH PRENOSOVÝCH FUNKCIÍ K^+ , Ba^{2+} $[Co(bipy)_3]^{2+}$ a $[Co(bipy)_3]^{3+}$ V ZMESIACH VODA–ACETONITRIL

JÁN BENKO^a, OLGA VOLLÁROVÁ^a, MONIKA
ARANYOSIOVÁ^a a ADAM BALD^b

^aKatedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Univerzita
Komenského, Prírodovedecká fakulta, 842 15 Bratislava,
Slovenská republika, ^bKatedra didaktiky chémie,
Univerzita Łódź, Fakulta fyziky a chémie, Pomorska 163,
94 236 Łódź, Poľsko

benko@fns.uniba.sk, vollarova@fns.uniba.sk,
aranyosiova@fns.uniba.sk, laurent@uni.lodz.pl

Došlo 19.12.05, prepracované 27.4.06, prijaté 8.6.06.

Kľúčové slová: Gibbsove prenosové funkcie, stanovenie
rozpustnosti solí

Meranie vsoľovacieho efektu, výpočet aktivitných koeficientov a stanovenie Gibbsových prenosových funkcií pikrátu draselného ($K(pic)$), pikrátu báratého ($Ba(pic)_2$), pikrátu tris(bipyridil)kobaltnatého ($[Co(bipy)_3](pic)_2$) a pikrátu tris(bipyridil)kobaltitého ($[Co(bipy)_3](pic)_3$) z vody do zmesi voda–acetonitril je súčasťou dvoch úloh pokročilého cvičenia z fyzikálnej chémie. Zo závislosti rozpustnosti týchto látok vo vode a vo vodných roztokoch dusičnanu sodného sa získali experimentálne hodnoty ich aktivitných koeficientov. Experimentálne výsledky sa konfrontovali s teoretickými predpoveďami podľa Debyeovej a Hückelovej teórie silných elektrolytov. Zo zmeny rozpustností $K(pic)$, $Ba(pic)_2$, $[Co(bipy)_3](pic)_2$ a $[Co(bipy)_3](pic)_3$, pri prechode z vody do zmesi voda–acetonitril, sa stanovili Gibbsove prenosové funkcie solí. S použitím extratermodynamického predpokladu sa vypočítali Gibbsove prenosové funkcie individuálnych iónov. Z priebehu závislosti Gibbsových prenosových funkcií sa posúdil vplyv náboja, hydrofilných a hydrofóbných vlastností vyšetrovaných iónov na zmenu solvatácie pri prechode z vody do zmesi voda–acetonitril.

Úvod

Časť pokročilého cvičenia z fyzikálnej chémie (8. semester na Prírodovedeckej fakulte UK v Bratislave) je zameraná na štúdium vlastností vodných a zmesných vodno–nevodných roztokov. V tomto semestri sa predpokladá samostatný prístup študentov k zadanej problemati-

ke, preto skôr ako začnú študenti vlastné experimentálne merania, urobia literárnu rešerš z pôvodných údajov v literatúre. V prípade aktivitných koeficientov je to nielen pôvodná práca Debye a Hückela publikovaná v r. 1923 (cit.¹), ale aj prvé experimentálne práce J. N. Brønsteda a V. K. La Meera, zamerané na experimentálne stanovenie aktivitných koeficientov z rozpustností málo rozpustných komplexných solí kobaltu ($[Co(NH_3)_6][Fe(CN)_6]$) publikované v r. 1924 a 1927 (cit.^{2,3}). Na tomto mieste je vhodné upozorniť na to, že teória aj experiment vznikli v rovnakom období nezávisle na sebe. Konfrontácia experimentálnych a teoretických výsledkov ukázala, že Debyeova a Hückelova teória je v dobrej zhode s experimentálnymi výsledkami. Študenti sa na tomto príklade môžu presvedčiť, ako sa experiment a teória navzájom dopĺňajú.

V ďalšej úlohe, v teoretickej príprave, sa študenti najprv zoznámia s jednoduchou Bornovou teóriou solvatácie iónov⁴, ďalej si preštudujú literatúru, v ktorej sa solvatácia popisuje ako zložitejší proces, v ktorom sa berú do úvahy nielen interakcie ión–dipól ale aj interakcie dipól–dipól, dipól–indukovaný dipól, Van der Waalsove interakcie a geometria interagujúcich častíc⁵. Pri experimentálnej príprave vychádzajú z práce⁶, v ktorej sa pre získanie prenosových funkcií individuálnych iónov zaviedol extratermodynamický predpoklad, podľa ktorého je prenosová funkcia solí daná súčtom prenosových funkcií iónov, z ktorých sa skladá. Ako referenčné soli, pre získanie Gibbsových prenosových funkcií individuálnych iónov, sa použili prenosové funkcie tetrafenylfosfónium tetrafenylborátu ($(Ph)_4PB(Ph)_4$) a tetrafenylarzáonium tetrafenylborátu ($(Ph)_4AsB(Ph)_4$) (cit.⁷), v ktorej sa Gibbsova prenosová funkcia rozdelila rovnako medzi katión a anión. K tejto voľbe viedla rovnaká štruktúra katiónu a aniónu a malá hustota náboja. Za tohto predpokladu prenosovú funkciu katiónu a aniónu vyjadruje vzťah (1):

$$\Delta_r G^0_{[(Ph)_4 P]^+} = \Delta_r G^0_{[B(Ph)_4]^-} = 1/2 \Delta_r G^0_{[(Ph)_4 PB(Ph)_4]} \quad (1)$$

Vzhľadom na časovú náročnosť meraní, jeden študent meria rozpustnosti len jednej látky. Svoje výsledky si na seminári študenti navzájom konfrontujú a na základe preštudovanej literatúry a vlastných experimentálnych výsledkov diskutujú o ich interpretácii. Pre obe úlohy je potrebné použiť dostatočne málo rozpustnú soľ, no zároveň rozpustnosť musí byť taká, aby sa jej koncentrácia dala stanoviť bežnými metódami s dostatočne veľkou presnosťou. Vhodnými látkami sa pre takéto merania ukázali soli vo forme pikrátov, ktoré majú veľký absorpčný koeficient a dajú sa stanoviť spektrofotometricky.

Teoretická časť

Aktivitné koeficienty

Pre výpočet aktivitných koeficientov veľmi zriedených roztokov sa používa jednoduchý vzťah (2):

$$\log \gamma_{\pm} = -A |z_+ z_-| \sqrt{I} \quad (2)$$

kde I je iónová sila roztoku, z_+ , z_- sú nábojové čísla iónov, pre vodné roztoky $A=0,509 \text{ mol}^{-1/2} \text{ dm}^{3/2}$ pri 298,2 K, koeficient A sa dá vypočítať podľa vzťahu (3):

$$A = 1,8246 \cdot 10^6 \rho^{1/2} (\epsilon_r T)^{3/2} \quad (3)$$

kde ρ je hustota roztoku, ϵ_r je relatívna permitivita rozpúšťadla a T je teplota v K. Pri vyšších koncentráciách elektrolytov sa pozorovala negatívna odchýlka od Debyeovho a Hückelovho limitného zákona, ktorý neuvažuje rozmery iónu. Ak sa do úvahy zoberú aj rozmery iónu pre stredný aktivitný koeficient z Debyeovej a Hückelovej teórie vyplýva vzťah (4):

$$\log \gamma_{\pm} = -A |z_+ z_-| \sqrt{I} / (1 + Ba\sqrt{I}) \quad (4)$$

kde a je empirický parameter zohľadňujúci veľkosť iónov (vzdialenosť najtesnejšieho priblíženia), pre vodné roztoky parameter $B=3,29 \text{ nm}^{-1} \text{ mol}^{-1/2} \text{ dm}^{3/2}$ pri 298,2 K. Koeficient B sa dá vypočítať podľa vzťahu (5):

$$B = 50,29 \cdot 10^8 \rho^{1/2} (\epsilon_r T)^{-1/2} \quad (5)$$

Na stanovenie aktivitných koeficientov z rozpustnosti je potrebné namerať rozpustnosť málo rozpustnej soli v prostredí indiferentného elektrolytu. Z podmienky termodynamickkej rovnováhy vyplýva, že súčin rozpustnosti K_s málo rozpustnej soli vo vode a vo vodnom roztoku indiferentného elektrolytu musí byť konštantný (6):

$$K_s = x^x y^y c_0^{(x+y)} \gamma_{\pm}^{(x+y)} = x^x y^y c^{(x+y)} \gamma_{\pm}^{(x+y)} \quad (6)$$

x a y sú nábojové čísla iónov málo rozpustnej soli, c_0 , c sú jej rovnovážne koncentrácie – rozpustnosti vo vode a vo vodnom roztoku indiferentného elektrolytu, γ_{\pm} sú príslušné aktivitné koeficienty.

Ak aktivitné koeficienty vyjadríme pomocou Debyeovho a Hückelovho limitného zákona (2) a dosadíme do rovnice (6) dostaneme rovnicu (7), resp. s použitím rozšíreného Debyeovho a Hückelovho vzťahu rovnicu (8), obe rovnice vyjadrujú závislosť rozpustnosti od iónovej sily:

$$\log(c/c_0) = A |z_+ z_-| (\sqrt{I} - \sqrt{I_0}) \quad (7)$$

$$\log(c/c_0) = A |z_+ z_-| \left[\sqrt{I} / (1 + Ba\sqrt{I}) - \sqrt{I_0} / (1 + Ba\sqrt{I_0}) \right] \quad (8)$$

kde I_0 je iónová sila nasýteného roztoku málo rozpustnej soli vo vode, I je iónová sila nasýteného roztoku málo rozpustnej soli v roztoku indiferentného elektrolytu

(v tomto prípade si treba uvedomiť, že výsledná iónová sila je súčtom iónovej sily indiferentného elektrolytu a iónovej sily málo rozpustnej soli).

Gibbsove prenosové funkcie

Gibbsove prenosové funkcie solí sa vypočítali z ich rozpustností vo vode a v zmesi voda–acetonitril podľa vzťahu (7):

$$\Delta_r G^{\circ} = -nRT \ln \frac{S_x \gamma_{\pm x}}{S_0 \gamma_{\pm 0}} \quad (9)$$

kde $\Delta_r G^{\circ}$ je štandardná prenosová Gibbsova energia, n je súčet nábojových čísel katiónu a aniónu, S_x a S_0 sú rozpustnosti vo vyšetrovanom prostredí a vo vode, ktorá je referenčným prostredím, $\gamma_{\pm x}$ a $\gamma_{\pm 0}$ sú príslušné stredné aktivitné koeficienty. V prípade, keď sa jedná o málo rozpustné soli, sa považuje pomer $\gamma_{\pm x}/\gamma_{\pm 0} \sim 1$. Korektnosť tohto zjednodušenia sa dá overiť, porovnaním nekorigovaných hodnôt Gibbsových prenosových funkcií s korigovanými hodnotami pomocou aktivitných koeficientov. Pre výpočet aktivitných koeficientov sa v tomto prípade hodí vzťah (4), ktorý dáva dobré výsledky pre K(pic) a Ba(pic)_2 ak $Ba=1$ a pre $[\text{Co(bipy)}_3](\text{pic})_2$ a $[\text{Co(bipy)}_3](\text{pic})_3$ ak $Ba=1,5$, ako sa to ukázalo v predchádzajúcej úlohe.

Koeficienty A a B sa vypočítali podľa vzťahov (3) a (5), potrebné hodnoty relatívnej permitivity a hustoty sa prebrali z prác^{8,9}.

Zmena solvatácie iónov, pri prechode z referenčného rozpúšťadla do zmesného prostredia, závisí od viacerých faktorov, ktoré sa uplatňujú rôzne pri rôznych koncentráciách, preto je potrebné detailnejšie vyšetriť závislosť prenosových funkcií od pomeru koncentrácií zmesných rozpúšťadiel. Záporné hodnoty prenosových funkcií indikujú, že ión je v danom prostredí lepšie stabilizovaný, ako v referenčnom a naopak. Z Gibbsových energií sa ale nedá jednoznačne povedať, či bude ión lepšie solvatovaný. V prenosovej Gibbsovej energii je zahrnutá nielen zmena v interakciách ión–molekuly rozpúšťadla ale aj medzi molekulami rozpúšťadla navzájom. V prípade zmesi voda–acetonitril je v intervale koncentrácií $0,2 \leq x_{\text{AN}} \leq 0,7$ oblasť mikroheterogenít, tvorených molekulami jedného druhu. V oblasti $x_{\text{AN}} \geq 0,7$ ako aj $x_{\text{AN}} \leq 0,2$ sa zachováva mierne modifikovaná štruktúra rozpúšťadla, ktoré je v nadbytku. Na rozdiel od výrazne štruktúrovanej vody je acetonitril málo štruktúrovaný, v kvapaline sa uplatňujú dipól–dipólové medzimolekulové interakcie¹⁰. Ión v svojom okolí môže ovplyvniť vzájomné interakcie medzi molekulami rozpúšťadla tak, že tieto budú predstavovať rozhodujúci príspevok na celkovej hodnote prenosovej Gibbsovej energie. Pre získanie lepšieho obrazu o solvatácii iónov v roztokoch sa zvykne kombinovať niekoľko metód, ako sú kalorimetria, stanovenie zmeny tepelných kapacít roztokov a parciálnych mólových objemov iónov¹¹, prípadne využiť teoretické výpočty interakčných energií medzi iónom a molekulou rozpúšťadla¹².

Experimentálna časť

Chemikálie

Pikrát draselný a pikrát bárnatý sa pripravili neutralizáciou kyseliny pikrovej čistoty p.a. (Merck) s KOH a Ba(OH)₂, prekryštalizovali sa z vodného roztoku. [Co(bipy)₃](pic)₂ a [Co(bipy)₃](pic)₃ sa pripravili vyzrážaním z príslušných chloristanových solí pikrátom sodným. [Co(bipy)₃](ClO₄)₂ a [Co(bipy)₃](ClO₄)₃ sa pripravili postupom publikovaným v literatúre¹³. Čistota chloristanových solí sa skontrolovala elementárnou analýzou. [Co(bipy)₃](pic)₂ a [Co(bipy)₃](pic)₃ sa prekryštalizovali zo zmesi voda–acetonitril. Acetonitril a NaNO₃ boli čistoty p.a. (Merck). Na prípravu roztokov sa použila deionizovaná voda. Tieto látky študenti v rámci tohoto cvičenia nepripravovali, dostali ich hotové.

Stanovenie rozpustnosti

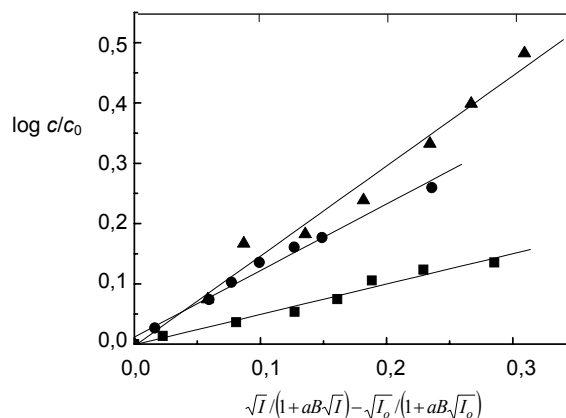
Pre urýchlenie dosiahnutia stavu nasýtenia sa použil ultrazvukový generátor Tesla UC 005 AJ1 s výkonom 30W a frekvenciou 50 kHz. Na dosiahnutie stavu nasýtenia stačilo vystaviť vzorku, umiestnenú v temperovanej nádobke pri 25 °C, účinkom ultrazvuku po dobu 15 min. Ultrazvukový kúpeľ sa chladil vodou, aby nedošlo k prehriatiu vzorky vplyvom ultrazvuku. Rozpustnosti získané touto metódou sa porovnali s rozpustnosťami, ktoré sa získali miešaním pri 25 °C počas 24 h. Výsledky získané oboma postupmi sa zhodovali v rámci experimentálnych chýb. Koncentrácie sa po vhodnom zriedení merala fotometricky na spektrálnom fotometri Specol 210 (Carl Zeiss, Jena) pri λ=360 nm. Overil sa Lambertov a Beerov zákon a vypočítali sa absorbné koeficienty K(pic), Ba(pic)₂, [Co(bipy)₃](pic)₂ a [Co(bipy)₃](pic)₃ (ε=13 500, ε=27 000, ε=28 000 a ε=43 000 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹).

Výsledky a diskusia

Z rozpustností (*S*) K(pic), Ba(pic)₂ a [Co(bipy)₃](pic)₃ vo vode a v roztokoch NaNO₃ v intervale c_{NaNO₃} (0–0,5) mol dm⁻³ sa vyhodnotila závislosť $S=f(I)$ podľa vzťahov (7) a (8). Ukázalo sa, že Debyeov a Hückelov limitný zákon, vzťah (1), sa pre výpočet aktivných koeficientov nehodí. V tomto prípade pre výpočet aktivných koeficientov, vyhovuje rozšírený vzťah (3), ako to ilustruje obr. 1. Experimentálne a teoretické hodnoty smernice závislosti

$$\log(c/c_0) = f \left[\sqrt{I} / (1 + Ba\sqrt{I}) - \sqrt{I_0} / (1 + Ba\sqrt{I_0}) \right]$$

sú v tabuľke I. Z tejto tabuľky vidno, že experiment sa dobre zhoduje s teóriou, ak v rovnici (3) $Ba = 1$ pre K(pic) a Ba(pic)₂ čo odpovedá parametru $a=0,3$ nm, a $Ba = 1,5$ pre [Co(bipy)₃](pic)₃ v tomto prípade $a=0,454$ nm. Podobné hodnoty *a* použili autori v práci¹⁴ pri výpočte aktiv-



Obr. 1. Závislosť $\log(c/c_0) = f \left[\sqrt{I} / (1 + Ba\sqrt{I}) - \sqrt{I_0} / (1 + Ba\sqrt{I_0}) \right]$ pre ■ – K(pic), ● – Ba(pic)₂ a ▲ – [Co(bipy)₃](pic)₃ pri 298,2 K, kde $aB=1$ pre K(pic) a Ba(pic)₂ a $aB=1,5$ pre [Co(bipy)₃](pic)₃

Tabuľka I

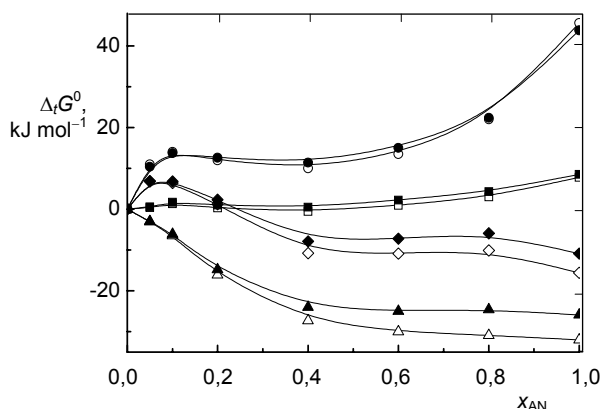
Experimentálne α_{exp} a teoretické hodnoty smernice α_{teor} závislosti $\log(c/c_0) = f \left[\sqrt{I} / (1 + Ba\sqrt{I}) - \sqrt{I_0} / (1 + Ba\sqrt{I_0}) \right]$ pre vyšetrované elektrolyty pri 298,2 K

Látka	α_{teor}	α_{exp}	<i>a</i> [nm]	<i>aB</i>
K(pic)	0,509	0,503±0,031	0,300	1
Ba(pic) ₂	1,018	1,155±0,073	0,300	1
[Co(bipy) ₃](pic) ₃	1,524	1,482±0,070	0,454	1,5

ných koeficientov pikrátov alkalických kovov $a=3$ nm, a pre veľké ióny, ako sú tetrafenylfosfóniový alebo tetrafenylborátový ión $a=5$ nm.

Rozdiely medzi teoretickými a experimentálnymi hodnotami môžu byť niekedy spôsobené vznikom iónových asociátov, hlavne v koncentrovanejších roztokoch elektrolytov. V našom prípade sa vznik takýchto asociátov dá zanedbať, aj pre komplexný ión s nábojom 3+ vzhľadom na nízke koncentrácie a relatívne malú nábojovú hustotu komplexného iónu.

Z rozpustností Ba(pic)₂, K(pic) (cit.¹⁵), [Co(bipy)₃](pic)₂ (cit.¹⁵) a [Co(bipy)₃](pic)₃ (cit.¹⁵) vo vode a v zmesiach voda–acetonitril sa vypočítali Gibbsove prenosové funkcie podľa vzťahu (9). Prenosová funkcia pikrátového iónu sa vypočítala z prenosovej funkcie K(pic) a prenosovej funkcie K⁺ (cit.¹⁶). Na obr. 2 sú závislosti prenosových funkcií individuálnych iónov bez a s korekciou na aktivitné koeficienty. Z týchto závislostí vidno, že hydrofilné ióny K⁺ a Ba²⁺ sú v zmesi voda–acetonitril destabilizované. Z poradia prenosových funkcií jednoduchých iónov, ako aj vzhľadom na výrazne polárnejší charakter mole-



Obr. 2. Závislosť $\Delta_t G^\circ$ od koncentrácie acetonitrilu pre \blacksquare \square – K^+ , \bullet \circ – Ba^{2+} , \blacktriangle \triangle – $[Co(bipy)_3]^{2+}$ a \blacklozenge \lozenge – $[Co(bpy)_3]^{3+}$ pri 298,2 K, plné symboly odpovedajú hodnotám korigovaným na aktivitné koeficienty

kuly acetonitrilu ($\mu=3,9$ D), v porovnaní s molekulou vody ($\mu=1,7$ D), interakcie ión–dipól nebudú hrať dominantnú úlohu. Pri prechode z výrazne zoštruktúrovaného prostredia vody, do menej štruktúrovaného acetonitrilu, môže hrať úlohu zmena kavitačného príspevku vzhľadom na veľkosť prenášaného iónu. Kladné hodnoty $\Delta_t G^\circ$ poukazujú na preferenčnú solvataciu iónov K^+ a Ba^{2+} vodou.

Na rozdiel od jednoduchých iónov sú oba komplexné ióny pri prechode z vody do acetonitrilu stabilizované, pričom významnejšie je stabilizovaný komplexný ión s nábojom 2+. Nakoľko sa veľkosťou tieto ióny líšia nepatrne, príspevok od kavitačného člena ku celkovej $\Delta_t G^\circ$ bude porovnateľný. Hydrofóbny charakter ligandov však umožňuje interakcie komplexného iónu s nevodným rozpúšťadlom, ktoré má na rozdiel od vody amfifilný charakter, t.j. obsahuje v molekule hydrofilnú ako aj hydrofóbnu skupinu $-CH_3$. Pozorovaný rozdiel v $\Delta_t G^\circ$ pre komplexné ióny Co^{III} a Co^{II} bude pravdepodobne súvisieť so skutočnosťou, že hydrofóbne interakcie, ktorými sú komplexné ióny stabilizované, sa môžu významnejšie prejavovať pre hydrofóbny ión s nižším nábojovým číslom.

Zo závislostí prenosových funkcií od koncentrácie acetonitrilu vidno, že pre soli, kde sa rozpustnosť menila veľmi málo so zmenou koncentrácie acetonitrilu, možno korekciu na aktivitné koeficienty zanedbať. V prípade kobaltitých komplexov, sa rozpustnosť menila o dva rády a hodnoty prenosových funkcií korigované na aktivitný koeficient sa líšili od nekorigovaných hodnôt maximálne o 6 kJ mol⁻¹, no celkový trend závislostí ostal zachovaný.

LITERATÚRA

- Debye P. J. W., Hückel E.: *Physikal. Z.* 24, 185, 305 (1923).
- Brönsted J. N., La Meer V. K.: *J. Am. Chem. Soc.* 45, 555 (1924).
- La Meer V. K., King C. V. Mason C. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 49, 363 (1927).
- Born M.: *Z. Phys.* 1, 45 (1920).
- Bokris J. O'M., Reddy A. K. N.: *Modern Electrochemistry*, kap. 2. Plenum Press, New York 1973.
- Alexander R., Parker A. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5549 (1967).
- Cox B. G., Natarajan R., Waghorne W. E.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 75, 86 (1979).
- Moreau C., Douheret G.: *J. Chem. Thermodyn.* 8, 403 (1976).
- Stelenberger K.-H.: *Master Thesis*. J. Kepler University, Linz 1994.
- Nakanishi K.: *Chem. Soc. Rev.* 1993, 177.
- Marcus Y.: *Biophys. Chem.* 51, 111 (1994).
- Cramer J. C.: *Essential of Calculation Chemistry*, kap. 11, 12. J. Wiley, 2002.
- Burstall F. H., Nyholm R. S.: *J. Chem. Soc.* 1952, 3570.
- Popovych O., Gibofsky A., Berne D. H.: *Anal. Chem.* 44, 811 (1972).
- Benko J., Vollárová O., Gritzner G.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, 1471 (2001).
- Cox B. G., Natarajan R., Waghorne W. E.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 75, 86 (1979).

J. Benko^a, O. Vollárová^a, M. Aranyosiová^a, and A. Bald^b (^a Department of Physical and Theoretical Chemistry, Faculty of Science, Komenský University, Bratislava, Slovak Republic, ^b Department of Didactics of Chemistry, Faculty of Chemistry and Physics, University of Łódź, Łódź, Poland): **The Salting-in Effect, Calculation of Activity Coefficients and Determination of Gibbs Transfer Functions of K^+ , Ba^{2+} , $[Co(bpy)_3]^{2+}$ a $[Co(bpy)_3]^{3+}$ in Water–Acetonitrile Mixtures**

Solubilities of K, Ba and tris(2,2'-bipyridine)cobalt (3+) picrates in water and aqueous sodium nitrate were measured and their activity coefficients were determined from the solubility dependences on ionic strength. By comparing experimental and theoretical results it was found that the extended Debye-Hückel relation is appropriate for calculation of activity coefficients of the salts in the ionic strength range $I=0-0,5$ mol dm⁻³. Gibbs transfer functions of the ions were calculated from the salt solubilities in water-acetonitrile mixtures using an extra-thermodynamic presumption. In the case of $[Co(bpy)_3]^{2+}$ and $[Co(bpy)_3]^{3+}$, the hydrophobic nature of ligands has a decisive influence on change in solvation. The experiments are included in advanced practical training in physical chemistry.

KOROZNÍ VLASTNOSTI A SLOŽENÍ PÓROVÉ VODY BENTONITŮ

EVA HYNKOVÁ^a, ZUZANA ČECHOVÁ^a
a GALINA SÁDOVSKÁ^b

^a *Centrum experimentální geotechniky, Fakulta stavební, České vysoké učení technické, Thákurova 7, 166 29 Praha 6, ^b Katedra anorganické technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Legii 565, 532 10 Pardubice*
evi.bednarova@seznam.cz, galina.sadovska@upce.cz

Došlo 29.4.05, přepracováno 3.10.05, přijato 10.11.05.

Klíčová slova: bentonit, pórová voda, extrakční technika, koroze

Úvod

Bentonit je reziduální jílovitá hornina, vzniklá mechanickým a chemickým zvětráváním matečné horniny v alkalickém prostředí. Charakteristickým znakem je vrstevnatá struktura a výskyt velmi jemných částic¹. Dominantní složkou bentonitu je montmorillonit $\text{Al}_2(\text{Si}_2\text{O}_5)_2(\text{OH})_2$ (až 60 % částic pod 0,1 μm), který má strukturu trojvrstvy a je nositelem základních charakteristických vlastností: malá propustnost, vysoká sorpční schopnost, bobtnání, plastičnost a pro tyto vlastnosti je jednou z hlavních složek inženýrských bariér pro izolování úložišť kontaminovaných odpadů.

Vysoce radioaktivní odpad se bude v ČR pravděpodobně ukládat do hlubinného úložiště, které má být vybudováno do r. 2050 a situováno do granitoidního prostředí. Prostor mezi horninovým prostředím a kontejnerem s radioaktivním odpadem bude vyplněn několikastupňovým těsněním na bázi bentonitů, které se v jednotlivých místech multibariérového systému budou vyskytovat buď ve formě stavebních prefabrikátů nebo ve formě lisovaných granulí či jako sypká hmota.

Navržená konstrukce hlubinného úložiště musí splňovat požadavky bezpečného uložení vysoce radioaktivního odpadu po dobu až 100 000 let. Na definitivní návrh celého úložného systému budou mít vliv výsledky výzkumu provedeného v mnoha oblastech vědy (např. jaderná fyzika, chemie, geologie, geotechnika, materiálové inženýrství, strojírenství atd.). Základním požadavkem na funkci hlubinného úložiště je dlouhodobé izolování radioaktivního odpadu, tj. zamezení jeho negativního působení na biosféru.

MOCK-UP.CZ je fyzikální model vertikálního způsobu ukládání kontejneru s vyhořelým radioaktivním palivem, který byl zkonstruován v Centru experimentální geotechniky (CEG), Fakulty stavební ČVUT v Praze.

Česká republika má velké zásoby bentonitů na několika lokalitách. Bentonity těžené a upravované aktivací (natrifikace) jsou hořečnato-vápenaté nebo vápenato-hořečnaté.

V ČR se nenacházejí sodné bentonity typu „wyoming“. Pro budování úložiště se předpokládá využití bentonitů z domácích zdrojů.

Teoretická část

Pórová voda

Znalost chemie pórové vody v (jílové) bentonitové bariéře je podstatná pro posouzení návrhu úložiště radioaktivního odpadu². Složení pórové vody řídí procesy zahrnující uvolnění a transport radionuklidů: koroze kontejneru, oxidace – rozpouštění odpadové matrice, sorpce na minerálním povrchu, rozpouštění radionuklidů, atd.

Problém izolace „skutečného“ zeminového výluhu, získání spolehlivých dat o chemii pórové vody při velmi nízké rozpustnosti a vlhkosti jílového systému nebyl dosud vyřešen.

Metodika kombinuje následující postupy:

- různé metody extrakce pórové vody,
- fyzikálně-chemické a mineralogické charakterizace bentonitů,
- geochemické modelování.

Korozní proces

Korozí se rozumí samovolně probíhající proces znehodnocování materiálů vlivem okolního prostředí. Děje, které jsou příčinou korozního poškození, jsou fyzikálně-chemické povahy. Nejčastější příčinou koroze jsou elektrochemické reakce.

Korozí kovů lze rozdělit do tří základních skupin:

- elektrochemická koroze,
- koroze kovů plyny,
- fyzikální rozpouštění.

Koroze se může z hlediska výsledného efektu projevat v následujících formách: rovnoměrná, důlková, šterbinová, interkrystalická, koroze při namáhání atd.

Stanovení korozních úbytků ve vodných výluzích bentonitů je prováděno podle předpisu normy ISO 8407, platné pro stanovení korozně inhibičních vlastností pigmentů (statická metoda). Výsledky těchto testů poskytují prvotní informace o korozních vlastnostech bentonitů a jejich směsí a umožňují vybrat vhodný bentonit nebo jeho směs s nízkými korozními účinky a dobrými geotechnickými vlastnostmi, popř. materiál pro kontejner s radioaktivním odpadem.

Stanovení ukazatelů plošné rovnoměrné koroze

Z naměřených hodnot hmotnosti, času a plochy lze stanovit ukazatele plošné rovnoměrné koroze definované vztahy (1)–(5). Korozní úbytek hmotnosti na jednotku plochy vypočteme podle vztahu:

$$K_m = \frac{(m - m_1) \cdot 10^4}{S} \quad (1)$$

kde K_m – korozní úbytek na jednotku plochy, m (m_1) – hmotnost plechů před (po) testu, S – povrch plechu.

Pro úbytek rozměrů platí:

$$U_R = \frac{K_m}{10^3 \cdot \rho} = \frac{10 \cdot (m - m_1)}{S \cdot \rho} \quad (2)$$

kde U_R – úbytek rozměrů, ρ – hustota plechu.

Hodnota hmotnostního úbytku je dána jako:

$$X = \frac{K_m}{K_{m(\text{voda})}} \cdot 100 \quad (3)$$

kde $K_{m(\text{voda})}$ – korozní úbytek na jednotku plochy v redestilované vodě, X – hmotnostní úbytek.

Korozní rychlost při hmotnostních úbytcích je vyjádřena vztahem (4) a pro korozní rychlost při rozměrových úbytcích platí vztah (5):

$$v_k = \frac{K_m}{t_1} \quad (4)$$

$$v_u = \frac{U_R \cdot 365}{t_1} \quad (5)$$

kde t_1 – doba expozice plechů; v_k – korozní rychlost hmotnostních úbytků; v_u – korozní rychlost rozměrových úbytků.

Experimentální část

Materiál a metodika pro korozní testy

Bentonit a jejich směsi (písek, grafit) užitá pro korozní testy:

RMN	průmyslově mletý bentonit z lokality Rokle
bG	průmyslově vyráběný bentonit
ČV	průmyslově mletý bentonit z lokality Černý Vrch
RoP	přírodní bentonit z lokality Rokle
HrP	přírodní bentonit z lokality Hroznětín
StP	přírodní bentonit z lokality Stránce
SkP	přírodní bentonit z lokality Skalná

Kovové plechy užívané pro testování:

Ocel tř. 11 (standard – norma ISO 8407)

Ocel 11 373 s obsahem uhlíku 0,15 % – užívaná pro konstrukci topidla a pláště ve fyzikálním modelu MOCK-UP.CZ

Měď

Velká pozornost byla věnována materiálu (MOCK-UP.CZ), protože měl být použit pro konstrukci modelu hlubinného úložiště radioaktivního odpadu.

Stanovení korozních úbytků ve vodných výluzích bentonitů

Vodný výluh bentonitů a jeho směs byl připraven jako 10 hm.% suspenze. V pravidelných časových intervalech po 1, 7, 14 a 28 dnech byla proměřována vodivost a pH této 10% suspenze a redestilované vody.

Po 28 dnech byly do suspenze vloženy kovové plíšky (o rozměrech 2 × 5 cm) očištěné lihem a acetonem. V pravidelných intervalech po 1, 7, 14 a 28 dnech byla měřena vodivost a hodnota pH suspenze s plechem. Po 28 dnech byly plíšky vyjmuty ze suspenze a odmořeny vhodným odmořovacím činidlem (např. pro plechy ocele tř. 11 bylo k odmoření použito 20% HCl s přídavkem urotropinu (5 g urotropinu na 1 l roztoku) po dobu 20 min). Pak byly plechy opláchnuty vodou, očištěny acetonem a zváženy.

Materiál a metodika pro extrakci pórové vody

Extrakce vodou byla provedena pro vzorky bentonitů z českých lokalit Rokle (RoP), Stránce (StP), Skalná (SkP).

Analytické metody

Pro přípravu vzorků a stanovení různých parametrů vodného výluhu získaného extrakcí tuhé fáze vodou byly použity tyto metody:

vodivost byla měřena elektrochemickou celou při teplotě 20 °C, koncentrace anionů SO_4^{2-} a Cl^- byly stanoveny iontovou chromatografií, výměnné kationy jílu byly stanoveny metodou AAS, zásaditost vzorků vod byla stanovena potenciometricky.

Extrakční technika pro získání pórové vody

Byly připraveny suspenze bentonitů o různých hmotnostních poměrech tuhé a kapalně fáze $s:l$ (1:2, 1:4, 1:10 a 1:16) s destilovanou vodou. Po 48 hodinách kontaktu obou fází třepáním byla kapalná fáze odfiltrována. U získaných kapalných fází bylo stanoveno chemické složení, pH a vodivost. Tyto a další geotechnické parametry jsou důležité pro geochemické modelování hlubinného úložiště radioaktivního odpadu.

Pórová voda byla extrahována za laboratorních podmínek (teplota 20 °C, tlak 101,5 kPa). Po ukončení testů byly nádoby s pórovou vodou uzavřeny a skladovány při teplotě 4 °C, dokud nebyly analyzovány.

Za nízký poměr tuhé a kapalně fáze $s:l$ jsou považovány všechny ty poměry, kde $s < l$ a $l = s + 1$. Při extrakci

Tabulka Ia
 Složení některých bentonitů^a

Složení [%]		RoP	StP	ČV
Chemické	CaCO ₃	6,34	3,29	6,31
	MgCO ₃	5,11	4,49	7,48
	FeCO ₃	0,51	0,23	0,20
Silikátové	SiO ₂	53,72	61,71	46,93
	CaO	3,42	1,79	5,83
	MgO	2,76	2,28	4,71
	Na ₂ O	0,94	0,34	0,81
	K ₂ O	1,24	0,91	1,03
	Ti ₂ O	1,35	2,51	2,89
	Al ₂ O ₃	19,48	15,95	17,16
	Fe ₂ O ₃	13,85	15,95	18,67
Mineralogické		montmorillonit nontronit	montmorillonit nontronit	montmorillonit nontronit
		křemen	křemen	křemen
		anatas	snatas	anatas
		kaolinit	kaolinit	kaolinit
		slída	illit	kalcit
				živec
Obsah org. látek		0,25	0,10	0,12
Obsah jíł. minerálů		77	80	77

^a Údaje pochází ze zdrojů Keramost a.s., Most, závod Obrnice

 Tabulka Ib
 Základní parametry českých bentonitů

Parametr	ČV	RMN	HrP	StP	RoP	SkP	bG
ρ_s , kg cm ⁻³	2880	2831	2670	2787	2803	2786	2746
ρ_d , kg cm ⁻³	839	776	1285	1338	1144	1120	934
ρ_v , kg cm ⁻³	923	865	1847	1698	1633	1218	997
S_M , m ² g ⁻¹	41,7	67,2	21,1	–	89,4	–	31,2
w_s , %	–	–	31	24	42	20	29
w_p , %	44	49	42	38	50	46	41
w_L , %	386	132	102	95	100	82	311
I_p	342	83	61	57	50	36	–
I_A	9	10	8	7	17	3	–
n	71	73	53	52	59	60	–
Q , J g ⁻¹	10,2	10,4	8,0	8,7	5,3	–	8,4
Q_d , J g ⁻¹	36,0	43,7	47,7	58,9	60,4	–	40,8
w , hm.%	9	9	10	8	15	9	8

I_A – index koloidní aktivity jíłů, I_p – index plasticity; n – porozita, Q – hydratační teplo, Q_d – hydratační teplo po vysušení, w – vlhkost, w_L – mez tekutosti, w_p – mez plasticity, w_s – mez smrštění, ρ_d – objemová hmotnost (ČSN 721010), ρ_s – zdánlivá hustota pevných částic zeminy (ČSN 721011), ρ_v – objemová hmotnost přirozeně vlhké zeminy (ČSN 721010)

pórové vody lisováním (squeezingem) při tlaku 80 MPa bylo pracováno s poměry $s:l$, kde $s > l$ (např. 4:1,5), které jsou považovány za vysoké.

Výsledky a diskuse

Základní parametry testovaných bentonitů

Složení bentonitů a základní parametry (hydratační teplo, hustota, konzistenční limity, měrný povrch, index plasticity a index koloidní aktivity) jsou uvedeny v tabulce Ia a Ib.

Výsledky korozních testů

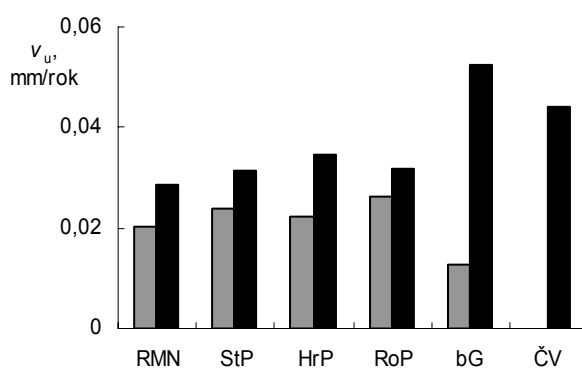
Jedním ze zvolených korozních testů pro posouzení korozních účinků bentonitů bylo stanovení korozních úbytků ocelových plechů ve vodných výluzích bentonitů. Z naměřených hodnot byly stanoveny podle vztahů (1) až (5) ukazatele plošné rovnoměrné koroze K_m , U_R , v_k , v_U , X viz. tab. II a III.

Bentonity nezátížené teplotou vykazují pro ocel, ze které je konstruován fyzikální model hlubinného úložiště MOCK-UP.CZ, nižší hodnoty hmotnostních úbytků než pro ocel tř. 11 (deklarované za standard). Tytéž experimenty byly provedeny též pro vzorky mědi. Ukazatelé plošné rovnoměrné koroze jsou výrazně nižší než pro ostatní materiály.

Vliv naleziště betonu

Bylo zjištěno, že teplotně nezátížené bentonity vykazují hodnotu hmotnostních úbytků koroze 80–95 % (vztaženo k hodnotě redestilované vody). Vyšší hodnoty X mají bentonity z lokalit Černý Vrch a bentonit G (obr. 1). Korozní úbytek rozměrů se pohybuje v intervalu 0,03–0,05 mm rok⁻¹.

Bentonity z různých lokalit, které mají obdobné složení, vykazují podobné korozní účinky. Vyšší korozní účinky u bentonitu z lokality Černý Vrch jsou pravděpodobně způsobeny vyšším obsahem sodíku v nenatřifikovaném bentonitu.



Obr. 1. Hodnoty hmotnostních úbytků teplotně nezátížených bentonitů; ■ ocel tř. 11, □ MOCK-UP.CZ

Tabulka II

Ukazatelé plošné rovnoměrné koroze – ocel tř. 11

Parametr	H ₂ O	RMN	ČV	StP	HrP	RoP	bG
K_m , g m ⁻²	43,90	29,60	45,79	32,33	35,62	32,78	54,31
U_R , mm	$5,47 \cdot 10^{-3}$	$3,84 \cdot 10^{-3}$	$5,95 \cdot 10^{-3}$	$4,20 \cdot 10^{-3}$	$4,63 \cdot 10^{-3}$	$4,26 \cdot 10^{-3}$	$7,05 \cdot 10^{-3}$
X , %	100	83	128	91	100	92	152
v_k , g m ⁻² d ⁻¹	0,896	0,604	0,934	0,660	0,727	0,669	1,108
v_U , mm rok ⁻¹	$4,073 \cdot 10^{-2}$	$2,864 \cdot 10^{-2}$	$4,430 \cdot 10^{-2}$	$3,127 \cdot 10^{-2}$	$3,446 \cdot 10^{-2}$	$3,171 \cdot 10^{-2}$	$5,254 \cdot 10^{-2}$

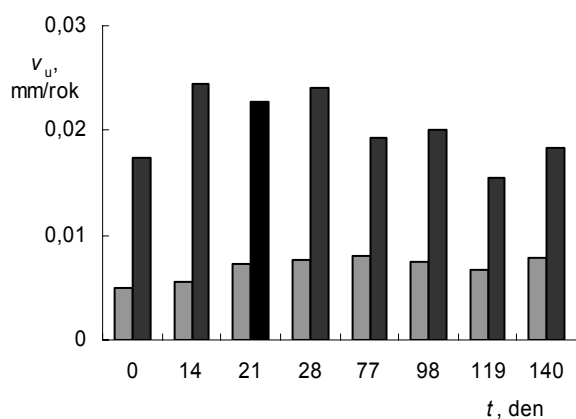
Tabulka III

Ukazatelé plošné rovnoměrné koroze – ocel MOCK-UP.CZ

Parametr	H ₂ O	RMN	StP	HrP	RoP	bG
K_m , g m ⁻²	35,68	21,95	25,77	23,96	28,08	13,52
U_R , mm	$4,63 \cdot 10^{-3}$	$2,73 \cdot 10^{-3}$	$3,21 \cdot 10^{-3}$	$2,98 \cdot 10^{-3}$	$3,50 \cdot 10^{-3}$	$1,69 \cdot 10^{-3}$
X , %	100	50	59	55	64	31
v_k , g m ⁻² d ⁻¹	0,728	0,448	0,526	0,489	0,573	0,276
v_U , mm rok ⁻¹	$3,452 \cdot 10^{-2}$	$2,035 \cdot 10^{-2}$	$2,390 \cdot 10^{-2}$	$2,223 \cdot 10^{-2}$	$2,603 \cdot 10^{-2}$	$1,256 \cdot 10^{-2}$

Doba zatěžování teplotou 200 °C

Korozní testy s teplotně zatíženým bentonitem RMN a jeho směsí s pískem a grafitem byly provedeny pro ocel tř. 11 a měď. O teplotně zatížených vzorcích RMN lze konstatovat, že hodnota hmotnostních úbytků koroze je o 40 % vyšší než pro vzorky nezatížené (obr. 2), závislost na době zatěžování nebyla zjištěna v časovém intervalu 14–42 dnů. U směsi (85 % RMN, 5 % grafitu, 10 % křemičitého písku) nebyla zjištěna závislost korozních efektů na době zatěžování v časovém intervalu 14–840 dnů.



Obr. 2. Hodnoty hmotnostních úbytků tepelně zatíženého bentonitu RMN; ■ ČSN, □ Cu

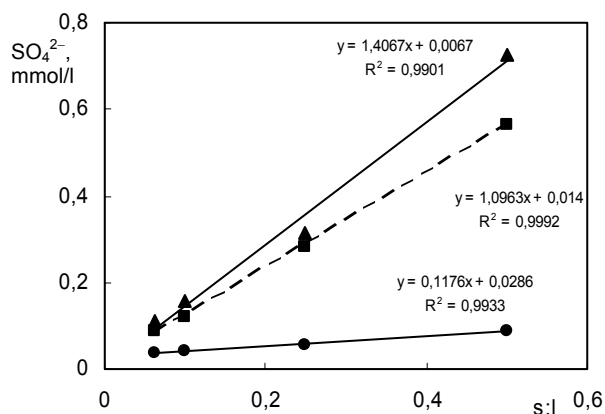
Vliv příměsí na korozní procesy

Grafit byl k bentonitu přidáván pro zvýšení tepelné vodivosti těsnícího materiálu. Ve směsích s obsahem grafitu v rozmezí 0–10 % a proměnným množstvím bentonitu v rozmezí 80–90 % doplněných konstantním množstvím písku (10 %) nebyla zjištěna závislost korozních úbytků na obsahu grafitu. Testy byly provedeny pro ocel tř. 11 a měď se shodnými výsledky v závislosti na obsahu grafitu. Ukazatelé korozních účinků jsou pro měděné plíšky výrazně nižší než pro standardní ocel tř. 11.

Složení pórové vody získané extrakcí bentonitů vodou

Výsledky analýz získaných vzorků jsou shrnuty v tabulce IV.

Sádrovec pravděpodobně reguluje koncentraci síranů v kapalně fázi. Koncentrace síranů vykazuje lineární závislost na poměru $s:l$ při nízkých poměrech tuhé a kapalně fáze (obr. 3), pouze při nízkém poměru $s:l$ je veškerý síran rozpuštěn ve vodné fázi. Získané lineární závislosti koncentrace SO_4^{2-} na poměru $s:l$ vykazují vysokou hodnotu spolehlivosti $R^2 > 0,99$.



Obr. 3. Koncentrace síranů jako funkce $s:l$; ● Rokle, ■ Stráncé, ▲ Skalná

Koncentrace hydrogenuhličitanu se při nízkých poměrech $s:l$ udržuje relativně konstantní (viz. tab. IV), je kontrolována rozpustností vápence. V případě HCO_3^- je nutné vzít v úvahu i rozpuštěný vzdušný CO_2 a zahrnout do výpočtu parciální tlak CO_2 (cit.²). Koncentrace vzdušného CO_2 rozpuštěného v destilované vodě za laboratorních podmínek je 0,5 ppm (cit.³). V porovnání se zjištěnými koncentracemi je patrné, že toto množství výrazně neovlivní stanovený obsah HCO_3^- ve vzorcích.

Všechny výsledky ukazují, že výměnné reakce kationů (rozpuštěné/srážecí reakce pro příměsí stopových minerálních fází bentonitu) musí hrát základní roli v chemii pórové vody.

Závěr

Bezpečné uložení radioaktivního odpadu předpokládá vyřešení řady nestandardních inženýrských i jiných problémů. Výrazně komplikovaným požadavkem na dlouhodobou spolehlivost je konstrukce hlubinného úložiště. Konstrukci je nutné založit na poznacích získaných s využitím všech experimentálních nástrojů a procesů.

S ohledem na vlastnosti bentonitů (jílů) by mohly být získané poznatky využitelné nejen při ukládání vysoce radioaktivních odpadů, ale též ostatních kontaminovaných odpadů.

Na základě výsledků korozních testů se jeví měď jako nejvhodnější konstrukční materiál.

Chemické složení pórové vody závisí na poměru $s:l$, je kontrolováno iontově výměnou reakcí a rozpouštěním rozpustných zbytků minerálů v bentonitu.

V chemii pórové vody českých bentonitů (jílů) jsou dominantními ionty SO_4^{2-} , Na^+ a Ca^{2+} . Koncentrace iontů v pórové vodě jsou ovlivněny rozpustností chloridů, uhličitánů, síranů a rovněž výměnnou reakcí kationtů ve smektitu.

Tabulka IV

Chemické složení bentonitů v kontaktu s destilovanou vodou při různých nízkých poměrech *s:l* (doba kontaktu 48 h, extrakce vodou)

Parametr	Jednotka	Koncentrace při různém poměru tuhé a kapalné fáze (<i>s:l</i>)				
		1:2	1:4	1:10	1:16	
RoP	Cl ⁻	mg l ⁻¹	< 5	< 5	< 5	< 5
	SO ₄ ²⁻	mg l ⁻¹	8,5	5,3	4	3,5
	HCO ₃ ⁻	mmol l ⁻¹	1,52	1,01	1,01	1,32
	Al ³⁺	mg l ⁻¹	< 0,05	1,142	0,06	< 0,05
	Ca ²⁺	mg l ⁻¹	5,387	4,011	3,583	4,751
	Mg ²⁺	mg l ⁻¹	2,521	1,931	1,903	2,299
	Na ⁺	mg l ⁻¹	6,685	4,982	3,779	3,036
	K ⁺	mg l ⁻¹	4,103	3,302	2,754	2,859
	Fe ³⁺	mg l ⁻¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH		7,4	7,65	7,61	7,31
vodivost	mS cm ⁻¹	168	125,3	112,7	129,7	
StP	Cl ⁻	mg l ⁻¹	< 5	< 5	< 5	< 5
	SO ₄ ²⁻	mg l ⁻¹	54,3	26,9	11,7	8,5
	HCO ₃ ⁻	mmol l ⁻¹	1,62	1,21	1,01	1,21
	Al ³⁺	mg l ⁻¹	< 0,05	< 0,05	0,782	1,262
	Ca ²⁺	mg l ⁻¹	18,575	3,758	1,593	4,151
	Mg ²⁺	mg l ⁻¹	2,9	4,9	2,074	0,368
	Na ⁺	mg l ⁻¹	29,75	26,85	9,55	9,5
	K ⁺	mg l ⁻¹	4,576	3,413	2,206	3,009
	Fe ³⁺	mg l ⁻¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH		6,54	6,55	6,83	6,74
vodivost	mS cm ⁻¹	280	201	124,8	139,4	
SkP	Cl ⁻	mg l ⁻¹	< 5	< 5	< 5	< 5
	SO ₄ ²⁻	mg l ⁻¹	69,8	30,4	15,1	10,5
	HCO ₃ ⁻	mmol l ⁻¹	0,31	0,31	0,31	0,31
	Al ³⁺	mg l ⁻¹	11,63	18,41	10,16	3,227
	Ca ²⁺	mg l ⁻¹	4,326	0,474	0,221	n.d.
	Mg ²⁺	mg l ⁻¹	3,41	1,47	0,533	0,569
	Na ⁺	mg l ⁻¹	10,06	4,29	2,948	3,105
	K ⁺	mg l ⁻¹	13,85	22,2	5,047	5,436
	Fe ³⁺	mg l ⁻¹	7,509	13,43	2,351	6,61
	pH		6,45	6,66	7,09	7,1
vodivost	mS cm ⁻¹	225	117	71,3	75,6	

Koncentrace nejběžnějších anionů SO₄²⁻ a HCO₃⁻ v pórové vodě jsou řízeny rozpustností sádrovce a vápence.

Koncentrace kationtů jsou především ovlivňovány výměnou reakcí ve smektitu, která je zřejmě vyvolána rozpouštěním více rozpustných příměsí (vápence a sádrovce) v bentonitu.

LITERATURA

1. Kašpar J., Připustil V., v knize: *Surovinové zdroje průmyslu*. Str. 116. SNTL, Praha 1970.
2. Cuevas J., Villar M. V., Fernandez A. M., Gomez P., Martin P. L.: *Appl. Geochem.* 12, 473 (1997).
3. Revie R. W., v knize: *Uhlig's Corrosion Handbook*. Str. 531. John Wiley & Sons, 2000.

E. Hynková^a, Z. Čechová^a, and G. Sádovská^b
(^a Centre of Experimental Geotechnics, Faculty of Civil Engineering, Czech Technical University, Prague, ^b Department of Inorganic Technology, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice):
Corrosion Properties and Composition of Pore Water From Bentonites

Isolation of high-radioactive waste is provided by a multilayer system (waste container, engineering barrier and natural barrier). The engineering barriers retard transport of a contaminant to surrounding geosphere in the case

of container corrosion. Due to its properties, bentonite is considered the main structural material for the engineering barrier. Its properties (impermeability, swelling, plasticity, sorption) must not impair, which would threaten safe functioning of the barrier. Its corrosion properties are tested to find a bentonite or its mixture possessing lower corrosion effects and properties which do not substantially change. For assessment of its performance in a nuclear waste repository, knowledge of the chemistry of the pore water in the bentonite barrier is essential. However, the problem of isolation of the soil solution has not yet been solved.

ALS Laboratory Group
 ANALYTICAL CHEMISTRY & TESTING SERVICES



Oznámení o volné pracovní pozici

V současné době hledáme vhodné kandidáty k obsazení pracovní pozice
Specialista - analytická chemie - plynová chromatografie

Náplň práce :

- Zavádění nových metod, jejich validace a akreditace
- Podpora chodu laboratoře po odborné stránce
- Měření a analytická činnost (GC a GC/MS)
- Práce s LIMS
- Spolupráce na systému kontroly kvality

Požadavky :

- VŠ chemického směru – VŠCHT, PřF
- Zkušenosti z akreditované laboratoře výhodou
- **Zkušenosti s chromatografickými metodami, zejména s GC a GC/MS alespoň 2 roky**
- Zkušenosti s vedením malého týmu výhodou
- Pečlivost, spolehlivost, samostatnost
- Flexibilita, ochota učit se novému
- Týmový hráč
- Komunikativní znalost AJ výhodou
- Práce na PC

Nabízíme :

- Zázemí mezinárodní společnosti
- Zajímavou práci na moderních přístrojích
- Platové podmínky odpovídající dané pozici
- Zaměstnanecké výhody – 5 týdnů dovolené, stravenky, penzijní připojištění apod.

V případě zájmu zašlete prosím Váš profesní životopis na HR oddělení – **Iлона Kratochvilová, HR Manager, Tel. 284 081 586, ilona.kratochvilova@alsglobal.com**

NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

DOPORUČENÍ IUPAC

Graphical Representation Standards for Chemical Structure Diagrams

The purpose of a chemical structure diagram is to convey information – typically the identity of a molecule – to another human reader or as input to a computer program. Any form of communication, however, requires that all participants understand each other. Recommendations are provided for the display of two-dimensional chemical structure diagrams in ways that avoid ambiguity and are likely to be understood correctly by all viewers. Examples are provided in many areas, ranging from issues of typography and color selection to the relative positioning of portions of a diagram and the rotational alignment of the diagram as a whole. Explanations describe which styles are preferred and which should be avoided. Principal recommendations include: Know your audience: diagrams that have a wide audience should be drawn as simply as possible. Avoid ambiguous drawing styles. Avoid inconsistent drawing styles.

Otiskujeme synopsi názvoslovného návrhu, který byl připraven divizí IUPAC pro chemické názvosloví a reprezentaci struktur. Návrh je určen k posouzení a kritice chemické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o texty návrhů se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.
Ústav makromolekulární chemie AV ČR
Heyrovského nám. 2
162 06 Praha 6
tel.: 296 809 322, fax: 296 809 410,
e-mail: kah@imc.cas.cz

Návrh je též vystaven na webové stránce IUPAC na adrese http://www.iupac.org/reports/provisional/abstract07/brecher_300607.html

Připomínky k návrhům je třeba zaslat do 30. června 2007 na adresu:

Jonathan Brecher
CambridgeSoft Corporation
100 Cambridge Park Drive
Cambridge, MA 02140, USA
tel: (1 617) 5889307
fax: (1 617) 5889380
e-mail: jsb@cambridgesoft.com

Glossary of Terms Related to Kinetics, Thermodynamics and Mechanisms of Polymerization

This document presents recommended definitions of basic terms related to polymerization processes, principally to the kinetics, thermodynamics, and mechanisms of polymerization.

Otiskujeme synopsi názvoslovného návrhu z oboru chemie polymerů, který byl připraven divizí IUPAC pro polymery. Návrh je určen k posouzení a kritice chemické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o texty návrhů se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.
Ústav makromolekulární chemie AV ČR
Heyrovského nám. 2
162 06 Praha 6
tel.: 296 809 322, fax: 296 809 410
e-mail: kah@imc.cas.cz

Návrh je též vystaven na webové stránce IUPAC na adrese http://www.iupac.org/reports/provisional/abstract07/moad_310707.html

Připomínky k návrhům je třeba zaslat do 31. července 2007 na adresu:

Dr. Graeme Moad
CSIRO Molecular Science
Bag 10
Clayton South, VIC 3787
Australia
tel: (61) 395452509
fax: (61) 395452446
e-mail: graeme.moad@csiro.au

Glossary of Terms Related to Solubility

This glossary defines 151 terms used to describe solubility and related phenomena. The definitions are consistent with one another and with recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry for terminology and nomenclature.

Otiskujeme synopsi názvoslovného návrhu z oboru analytické chemie, který byl připraven divizí IUPAC pro

analytickou chemii. Návrh je určen k posouzení a kritice chemické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o texty návrhů se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.
Ústav makromolekulární chemie AV ČR
Heyrovského nám. 2
162 06 Praha 6
tel.: 296 809 322, fax: 296 809 410
e-mail: kah@imc.cas.cz

Návrh je též vystaven na webové stránce IUPAC na adrese http://www.iupac.org/reports/provisional/abstract07/shaw_310707.html

Připomínky k návrhům je třeba zaslat do 31. července 2007 na adresu:

Prof. David G. Shaw
(University of Alaska at Fairbanks)
85 E. India Row, No. 26 A
Boston, MA 02110, USA
tel: (1) 6177217638
fax: (1) 6172278762
e-mail: ffdgs@uaf.edu

Vážení čtenáři,

společnost Sigma Aldrich s.r.o. ve spolupráci s Českou společností chemickou navazuje po dvouleté přestávce na tradici úspěšných seminářů, které byly zaměřeny na dvě hlavní témata – extrakci tuhou fází (SPE) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Podobně jako v minulých ročnících chceme přinést informace o posledních trendech a o zajímavých aplikacích z praxe v přednáškách významných českých odborníků.

Odbornými garanty semináře jsou za Českou společnost chemickou

Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.,

předseda Odborné skupiny analytické chemie,

RNDr. Václav Kašíčka, CSc.,

předseda Odborné skupiny chromatografie a elektroforézy.

Vzdělávací seminář s certifikátem

SPE A HPLC SEMINÁŘ

Aktuality a příklady z praxe

se bude konat 12.6. 2007 na

Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, posluchárna CH1

Hlavova 8, 128 43 Praha 2.

Podrobnější informace a přihlášku na seminář najdete na internetové adrese:

<http://www.sigmaaldrich.com/> pod záložkou semináře, SPE-HPLC.

Účastnický poplatek

Vložené ve výši 400,- Kč včetně DPH zahrnuje certifikát o absolvování semináře, CD s přednáškami těch autorů, kteří budou souhlasit s tímto způsobem uveřejnění a organizační náklady.

Srdečně vás zveme!

Dana Procházková, Sigma-Aldrich s.r.o.

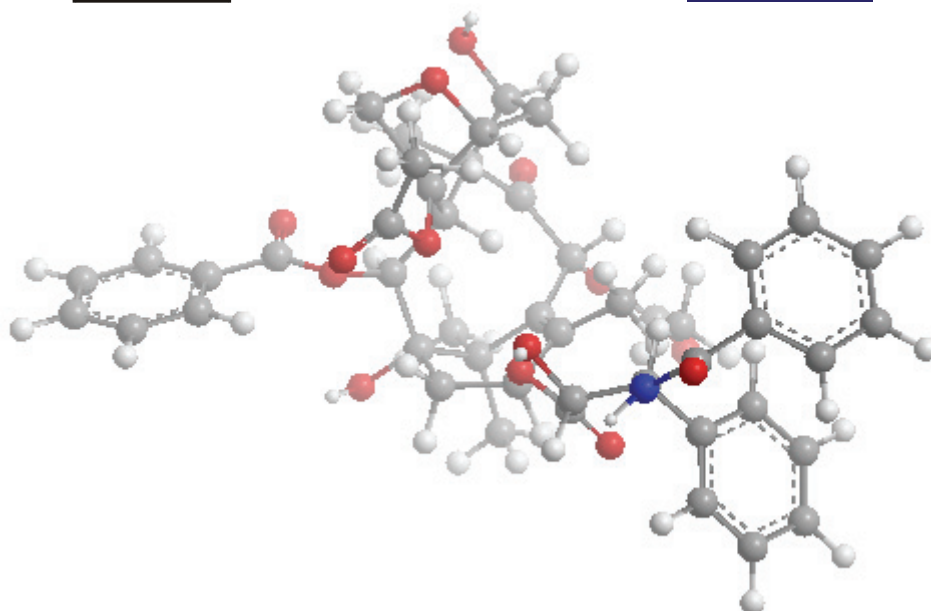
a za Českou společnost chemickou

Jiří Barek

Václav Kašíčka



SIGMA-ALDRICH



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

12.6. – 15.6. 2006

Devět skal - Žďárské vrchy

sborník redigovali
Radmila Řápková, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

VII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků

Tzv. „Konference mladých“ oslaví letos již 7.výročí. Byla jsem požádána o napsání úvodního slova ke sborníku prací tohoto ročníku. Myslím, že již není třeba velkého opěvování akce, která se za těch 7 let dostala do povědomí české vědecké společnosti a získala si značnou prestiž. U jejího zrodu stál můj (dnes již bývalý) kolega Martin Fusek. Chtěla bych mu tímto poděkovat za nápad, který tato setkání odstartoval a slíbit, že společně s ostatními nadšenci, bez nichž by uskutečnění všech ročníků bylo nemyslitelné (mám na mysli především odbornou komisi, která vybírá účastníky i vítěze), budu v této tradici pokračovat.

Zároveň bych ráda zmínila, že firma Sigma-Aldrich obnovila po mnoha letech své působení na Slovensku a proto bych si přála, aby se dalšího ročníku konference zúčastnili též mladí vědečtí nadšenci ze Slovenska. Jistě by to přineslo další zpestření, ještě větší konkurenci i možnost navázat nové kontakty.

Sedmému ročníku konference přeji hodně zdaru, všem účastníkům hodně úspěchů a pěkných zážitků a odborné komisi opětovně zvládnutí nelehkého úkolu vybrat vítěze.

Daniela Dornerová
Sigma-Aldrich Praha

STRUKTURNĚ FUNKČNÍ STUDIE AFINITNÍCH ZMĚN V LEKTIN-SACHARIDOVÝCH SYSTÉMECH; POČÍTAČOVÁ CHEMIE VE SLUŽBÁCH PROTEINOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

JAN ADAM^a, MARTINA POKORNÁ^a, CHARLES SABIN^b, ZDENĚK KRÍŽ^a, ANNE IMBERTY^b, JAROSLAV KOČA^a a MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,c}

^aNárodní centrum pro výzkum biomolekul a ^cKatedra biochemie, PřF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ^bCERMAV-CNRS, 601 rue de la Chimie, BP 53, 38041 Grenoble, Francie

Současné výpočetní kapacity a metody dovolují provádět sofistikované simulace a modelování složitých, avšak z hlediska života organismů fundamentálních procesů, jakými jsou biomolekulární interakce. Tyto postupy v sobě skrývají vysoký potenciál z hlediska úspory experimentálního času a prostředků.

Lektiny jsou skupinou bílkovin vyznačující se schopností vázat sacharidové struktury s vysokou afinitou a specificitou. Sacharidy se vyznačují vysokou variabilitou konformačních možností, ať už z hlediska izomerie nebo intermolekulárních struktur, což z nich činí důležité agens v procesu rozpoznávání, zprostředkovaného právě lektiny. Propojení praktických metod molekulární biologie a strukturních a funkčních analýz (X-ray krystalografie, termodynamické metody) je klíčové pro porozumění vzájemným souvislostem mezi strukturou a vlastnostmi proteinů. Čím úplnější je toto porozumění, tím účinněji je možno posléze designovat proteiny s definovanými požadovanými vlastnostmi – proteinové inženýrství.

Studium závislosti afinitních změn při mutacích lektinu PA-III kombinací výše uvedených postupů odhalilo klíčovou roli aminokyselinového složení vazebného místa pro vazebné preference¹. Studované mutanty byly rovněž vytvořeny *in silico* a využity pro dokovací experimenty, jejichž výsledky byly korelovány s experimentálními daty. Cílem projektu je na základě postupu “od známého k neznámému” vyvinout spolehlivou *in silico* metodu pro předpovídání neznámých, budoucích interakcí, a to jak z hlediska strukturního, tak termodynamického – usnadnit tak budoucí aplikace proteinového inženýrství.

Podporováno grantem GA ČR GD204/03/H016.

LITERATURA

1. Adam J., Pokorná M., Sabin C., Mitchell E. P., Imberty A., Wimmerová M.: podáno k tisku.

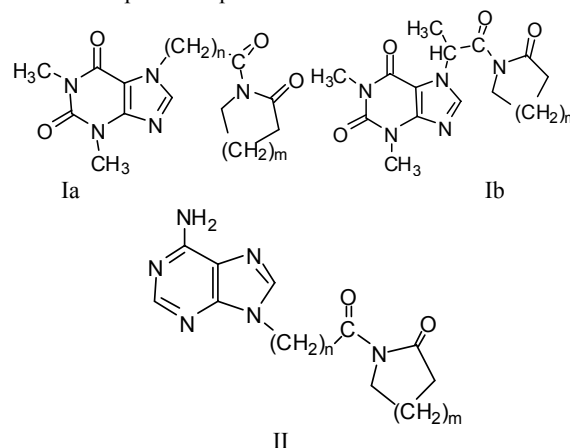
DERIVÁTY THEOFYLINU A ADENINU JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ

TOMÁŠ BARTL, PETRA STAŠKOVÁ, JAROSLAVA RAMBOUSKOVÁ, IVANA MILÁČKOVÁ, PETRA ŽÁDNIKOVÁ, RENATA JIŘÍKOVSKÁ a LUDEK BENEŠ

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno
tbartl@vfu.cz

Neurodegenerativní choroby představují závažnou skupinu onemocnění centrální nervové soustavy. Velká pozornost je těmto onemocněním věnována v souvislosti s prudkým nárůstem výskytu v lidské populaci a často progresivním průběhem, který vede k postupnému úbytku kognitivních funkcí. U řady z nich je narušena schopnost správného úsudku, logického uvažování, schopnost orientace, v pokročilých stádiích dochází ke ztrátě kontaktu s realitou a celkovému rozpadu osobnosti¹. Onemocnění končí smrtí pacienta, kauzální léčiva nebyla doposud vyvinuta.

Jako potenciální léčiva těchto onemocnění byla připravena skupina derivátů purinu. Sloučeniny odvozené od purinových bází theofylinu Ia ($n=1-5$; $m=1-3$), Ib ($m=1-3$) a adeninu II ($n=1-3$; $m=1-3$) obsahují ve své molekule ω -laktamový kruh, který je charakteristický pro celou řadu kognitivně zesilujících a antikonvulzivně působících léčiv. Délka acylového řetězce, který spojuje purinové jádro s laktamovým kruhem, ovlivňuje lipofilitu sloučenin a tím i distribuci těchto potenciálních léčiv v organismu. Při přípravě theofylinových a adeninových derivátů byly zvoleny odlišné syntetické postupy, neboť reaktivita a chemické vlastnosti výchozích purinových sloučenin jsou zcela rozdílné. Struktura připravených sloučenin byla potvrzena metodami NMR a IČ spektroskopie.



Na základě TLC na rezevní fázi (RP-8), použití výpočetní techniky a chemických databází² byl u připravených theofylinových sloučenin učiněn odhad rozdělovacích koeficientů. Vybrané sloučeniny byly testovány na antioxidační efekt a aktivitu vůči aminopeptidasám a kaspasám, které do rozvoje neurodegenerativních chorob zasahují. Testované sloučeniny vykazovaly mírnou inhibiční aktivitu vůči aminopeptidasám.

V souvislosti s přechodem od léčiv charakteru racemátů k opticky čistým enantiomerům byl připravený racemát sloučeniny Ib rozdělen za použití HPLC na chirální koloně s obsahem selektoru allobiohydrolasy a detekce UV-VIS na jednotlivé enantiomery.

LITERATURA

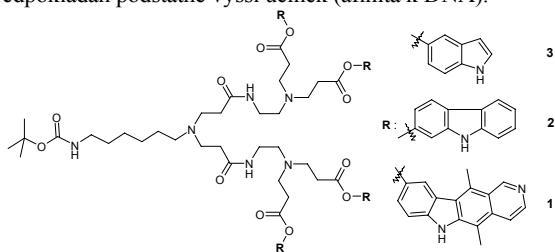
1. Tanzi R. E., Bertram L.: Cell 120, 545 (2005).
2. <http://146.107.217.178/lab/alogps/start.html>, staženo 1. listopadu 2006.

MULTIVALENTNÍ DERIVÁTY ELLIPTICINU

**P. BAŠOVÁ^{a,b}, K. KŘENEK^a, R. GAŽÁK^a,
K. BEZOUŠKA^b a V. KŘEN^a**

^aLaboratoř Biotransformací, Mikrobiologický ústav AV ČR, 142 20 Praha 4; ^bKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Albertov 230, 128 40 Praha 2

Ellipticin (**1**) je cytostatikum, jehož deriváty jsou již v I. a II. fázi klinických testů. Pevládajícími mechanismy protinádorového účinku jsou *i*) interkalace do dvojšroubovicové struktury DNA, *ii*) inhibice topoizomerasy II a *iii*) selektivní inhibice fosforylace proteinu p53. Výhodou ellipticinu je jeho vysoká účinnost a poměrně nízká toxicita. Hematologická toxicita je prakticky nulová. Díky provedeným SAR studiím je nyní možné jeho strukturu dále optimalizovat. U multivalentních molekul nesoucích jako ligandy ellipticin, je předpokládán podstatně vyšší účinek (afinita k DNA).



Hlavní náplní této práce je příprava PAMAM dendrimerů 1. a 2. generace a jeho konjugátů se strukturálními analogy 9-hydroxyellipticinu - 5-hydroxyindolem (**3**) a 2-hydroxykarbazolem (**2**) a příprava 9-hydroxyellipticinu (Schéma 1) jako ligandu pro konjugaci s možností dalšího navázání celého konjugátu na proteiny. Hydroxylace ellipticinu v poloze C-9 nesnižuje jeho biologické účinky (dokonce zvyšuje), proto je možné tuto skupinu použít s výhodou pro konjugaci.

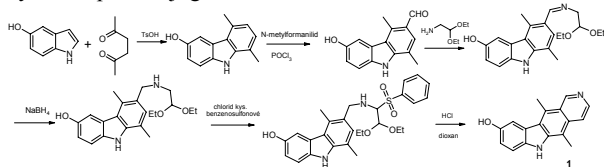


Schéma 1

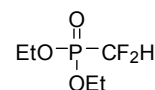
Tato práce byla podpořena granty GA AV ČR IAA400200503, MŠMT OC136 a IM 4635608802

DIFLUOROMETHYLFOSFONÁT JAKO (CF₂H)- A (CF₂)²- SYNTETICKÝ ANALOG

PETR BEIER^a, MIKHAIL ZIBINSKY^b a G. K. SURYA PRAKASH^b

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6; ^b Loker Hydrocarbon Res. Inst., University of Southern California, 837 Bloom Walk, Los Angeles, CA 90034-1661, USA beier@uochb.cas.cz

Selektivně fluorované sloučeniny hrají stále důležitější úlohu při přípravě nových moderních biologicky aktivních látek a funkčních materiálů^{1,2}. Jedním z novějších typů fluorovaných funkčních skupin je difluoromethyl (-CF₂H) a difluoromethylen (-CF₂-), které mohou být použity při náhradě stericky a elektronicky blízkých skupin -OH nebo -CH₂OH resp. -O- (lit.³⁻⁵). V současné době je nejefektivnější metodou při přípravě těchto typů látek nukleofilní difluoromethylace difluoromethyl fenylyl sulfonem (PhSO₂CF₂H)⁶⁻⁸.



1

Diethyl difluoromethylfosfonát (**1**) byl rovněž použit jako syntetický analog (CF₂H)- a (CF₂)₂- skupin při reakci s karbonylovými sloučeninami a akyl bromidy, Schéma 1.

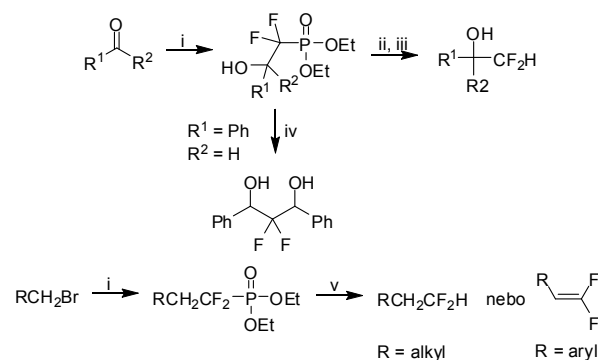


Schéma 1: *i*) **1**, LDA, *ii*) K₂CO₃, *iii*) LiOH, *iv*) báze, PhCHO, *v*) *t*-BuOK.

LITERATURA

- Hiyama T. (Ed.): *Organofluorine Compounds, Chemistry and Applications*. Springer, New York 2000.
- Kirsch P.: *Modern Fluoroorganic Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim 2004.
- Sasson R., Hagooley A., Rozen S.: *Org. Lett.* 5, 769 (2003).
- Yudin A. K., Prakash G. K. S., Deffieux D., Bradley M., Bau R., Olah G. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1572 (1997).
- Erickson J. A., McLoughlin J. I.: *J. Org. Chem.* 60, 1626 (1995).
- Prakash G. K. S., Hu J., Mathew T., Olah G. A.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 42, 5216 (2003).
- Prakash G. K. S., Hu J., Wang Y., Olah G. A.: *Org. Lett.* 6, 4315 (2004).
- Prakash G. K. S., Hu J., Wang Y., Olah G. A.: *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 2218.

IDENTIFYING PHOSPHORYLATION SITES IN THE RETINOBLASTOMA TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN MAT3

KATEŘINA BIŠOVÁ^{a,b} and JAMES G. UMEN^b

^a*Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Opatovický Mlýn, the Czech Republic;* ^b*The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA*

Retinoblastoma (RB) tumor suppressor related proteins are negative regulators of the cell cycle whose activity is thought to be controlled through phosphorylation by cyclin dependent kinases (CDKs). Although 16 phosphorylation sites have been mapped in human and mouse RB, the functional significance of individual phosphorylations remains unclear, and the role of RB phosphorylation in plants and green algae has not been carefully examined. The *Chlamydomonas* MAT3 gene encodes a RB homolog whose loss leads to premature cell cycle entry and supernumerous cell divisions. We have used in vivo labeling to show that MAT3 is a phosphoprotein, and are employing several strategies to identify its phosphorylation sites. Twelve tryptic peptides that contain either phospho-serine or phospho-threonine were detected from in vivo labeled MAT3, indicating that the protein is multiply phosphorylated. In parallel we have developed an in vitro kinase assay on recombinant MAT3 using cell extracts or partially purified cyclin dependent kinase preparations. In vitro phosphorylation of MAT3 is sensitive to the CDK inhibitor roscovitine, suggesting that CDKs are the major kinase activity for MAT3. Both mass spectrometry and phosphopeptide mapping were used to identify sites of phosphorylation on recombinant MAT3, and most of the in vitro sites match those seen in vivo. Moreover, kinase activity towards several sites on MAT3 appears to be cell cycle regulated, with increased activity present in post-Commitment and mitotic extracts. Efforts are now under way to confirm sites of phosphorylation by use of point mutations and deletions in recombinant MAT3. The functional significance of phosphorylation at different sites will be tested by introducing phosphoacceptor mutations into a MAT3 gene and assessing their ability to complement a mat3 deletion mutant.

ZVÝŠENÍ BIOSYNTÉZY LIGNANŮ BUNĚČNOU KULTUROU SCHISANDRA CHINENSIS PŘÍDAVKEM POLYMERNÍCH ADSORBENTŮ

**LENKA BŘEZINOVÁ^a, JIŘÍ SLANINA^a,
HELENA VLAŠINOVÁ^b, IRENA BOHATCOVÁ^b
a LADISLAV HAVEL^b**

^a*Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Komenského nám. 2, 662 43 Brno;* ^b*Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
lbrezin@med.muni.cz*

Plody *Schisandra chinensis* se používají po staletí v zemích Dálného východu jako tonikum a antitusikum. Účinnými sloučeninami jsou lignany s unikátní strukturou odvozenou od dibenzo[a,c]cyklooktadienu. Tyto lignany vykazují široké spektrum biologických účinků, včetně

antivirové, antioxidační a hepatoprotektivní aktivity¹. Některé lignany *S. chinensis* inhibují replikaci viru HIV *in vitro*. Nedávno bylo zjištěno, že lignan γ -schizandin účinně inhibuje P-glykoprotein, jehož zvýšená exprese je nejčastější příčinou rezistence na cytostatika². Množství lignanů v plodech je poměrně nízké (přibližně 1 % sušiny) a skládá se nejméně z 30 různých lignanů³, jejichž obsah je velmi variabilní. Tyto okolnosti značně znevýhodňují rostlinný materiál jako zdroj pro získání čistých lignanů. Buněčné kultury *S. chinensis* mohou představovat výhodný zdroj těchto sekundárních metabolitů.

Kultury *S. chinensis*, odvozené z endospermu a nezralých zygotických embryí, byly pěstovány na mediu Murashige a Skoog a mediu VW5. Embryogenní kultury byly založeny na mediích s přísadkami růstových regulátorů (thidiazuron, 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina a benzylaminopurin)⁴. V naší práci jsme studovali možnost ovlivnění biosyntézy lignanů přísadkami dvou neutrálních polymerních adsorbentů, Amberlite XAD-2 (nepolární adsorbent) a Amberlite XAD-7 (středně polární adsorbent) do kapalného média během kultivace buněk. Analýza šesti hlavních lignanů (schizandrin, gomisin A, deoxyschizandrin, gomisin N, γ -schizandrin a wuweizisu C) byla provedena pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Pokud byly buněčné kultury inkubovány bez přísadky adsorbentů, většina lignanů byla lokalizována převážně intracelulárně (71–98 %). Přídavek polymerních adsorbentů zvýšil nejen množství lignanů lokalizovaných extracelulárně (z 2–29 % na 7–99,9 %), ale také výrazně zvýšil celkovou biosyntézu lignanů (3–130krát). Zatímco Amberlite XAD-7 snižoval růst některých kultur a to až o 40 %, Amberlite XAD-2 neovlivňoval růst kultur oproti kontrole. Zjistili jsme také rozdílnou selektivitu vazby lignanů na polymerní pryskyřice. Zatímco Amberlite XAD-2 zvyšoval celkovou produkci deoxyschizandrinu, který tvořil 86–94 % všech adsorbovaných lignanů, Amberlite XAD-7 zvyšoval zejména množství wuweizisu C, který zahrnoval 55–79 % všech adsorbovaných lignanů na polymerní pryskyřici.

Přídavek nepolárních polymerních adsorbentů je velmi efektivní prostředek k převedení lignanů do extracelulárního prostředí a ke zvýšení produkce těchto sekundárních metabolitů. Lignany adsorbované polymerní pryskyřicí pak mohou být snadno získány bez destrukce buněčné kultury, což je velkou výhodou vzhledem k pomalému růstu kultur.

Tato práce je podporována grantem GA ČR 522/07/0995.

LITERATURA

1. Hancke J. L., Burgos R. A., Ahumada F.: *Fitoterapia* 70, 451 (1999).
2. Qiangrong P., Wang T., Lu Q., Hu X.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 406 (2005).
3. Slanina J., Táborská E., Lojková L.: *Planta Med.* 63, 277 (1997).
4. Smíšková A., Vlašínová H., Havel L.: *Biol. Plant.* 49, 451 (2005).

THE INCORPORATION OF BLOOD PLATELET CELLULAR PRION PROTEIN IN MEMBRANE RAFTS INDICATES ITS PHYSIOLOGICAL FUNCTION

ADÉLA BROUČKOVÁ and **KAREL HOLADA**

*Institute of Immunology and Microbiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Studničkova 7, 128 20 Prague 2
Adela.Brouckova@lf1.cuni.cz*

Prion diseases, so called transmissible spongiform encephalopathies, are neurodegenerative diseases, which affect both humans and animals. The pathological prion protein PrP^{Sc}, which is a conformationally altered isoform of the host cellular prion protein (PrP^C), is supposed to be the causative agent¹.

PrP^C is expressed on many cell types and also on blood components. The individual expression is highest in lymphocytes and monocytes, however, the total amount is higher in platelets and red blood cells².

The lack of PrP^C physiological function might be the fundamental of prion diseases, therefore it is a big challenge for scientists. Several studies have indicated that PrP^C might have role in oxidative stress. The most studied is PrP^C in nervous system, as it is obviously included in pathophysiology of prion diseases. Hence, it was proposed that PrP^C might play a role in the physiology of neurons, namely neurite outgrowth and synaptic function. The function of PrP^C in signalling events is also studied. Several authors suggested its involvement in signal transduction of lymphocytes and monocytes. Many signalling molecules could be found in special membrane compartments called membrane rafts. Membrane rafts are liquid-ordered microdomains rich in cholesterol and sphingolipids³. They also participate in platelet activation processes.

In present study we followed the localization of platelet PrP^C in membrane rafts. Platelets were either resting or activated by thrombin receptor activating peptide (TRAP). We studied how the platelet activation affects the distribution of PrP^C between raft and non-raft regions in cytoplasmic membrane of platelets and their organelles. For this purpose we isolated cytoplasmic membrane and organelles by differential centrifugation both from resting and activated platelets and subsequently we analyzed protein localization in rafts. Membrane rafts were isolated by density gradient centrifugation after their extraction from membrane using detergent Igepal CA-360. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) was used for cholesterol depletion and thus abolition of protein interaction with rafts. The presence of PrP^C and control proteins known to associate with membrane rafts (CD59, CD36) was determined by Western blot. Platelets were also stained for fluorescence microscopy to observe PrP^C pattern.

Our experiments have demonstrated that approximately one third of platelet PrP^C is found in membrane rafts while the rest is not in raft fraction. Interestingly, cytoplasmic membrane and platelet organelles differed in this ratio. As for cytoplasmic membrane activation of platelets led to

increase of PrP^C incorporated in rafts. Using cholesterol depletion we confirmed the specificity of PrP^C localization in rafts. Finally, by fluorescence microscopy we have shown the punctuate staining of PrP^C suggesting its clustering in membrane rafts.

Our data suggest that localization and behaviour of PrP^C in membrane rafts might implicate its function in signalling cascades triggered in activated platelets.

Supported by GA ČR 310/05/H533.

1. Prusiner S. B.: *Brain Pathol.* 8, 499 (1998).
2. Holada K., Vostal J. G.: *Br. J. Haematol.* 110, 472 (2000).
3. London E., Brown D. A.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1508, 182 (2000).

PROTEINY KARCINOMU PRSU METODOU SELDI-TOF MS

KRISTÝNA BROŽKOVÁ, DANA KNOFLÍČKOVÁ, PAVEL BOUČHAL, RUDOLF NENUTIL, a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK

Masarykův onkologický ústav, Oddělení patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Pokrok genomických a proteomických metod umožňuje posun medicíny k personalizovanému přístupu ve vztahu k fyziologii a genetickému pozadí konkrétního pacienta. Znalost kompletní sekvence lidského genomu umožňuje předpovědět dispoziční k určitému onemocnění, ale teprve rozšíření na funkční jednotky – proteiny – poskytuje komplexní obraz stavu daného jedince.

Analýza expresního profilu proteinů séra, plasmy, tkáně nebo moči může poskytnout široké spektrum informací o diagnóze, odpovídatosti na léčbu či monitorování progresu choroby. Technologie CIPHERGEN[®] založená na principu SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) je ideální nástroj pro identifikaci nových, specifických a citlivých biomarkerů v komplexních biologických vzorcích. Využití chromatografického povrchu čipů (iontoměniče, chelatační povrchy, hydrofobní povrchy aj.) pro specifickou vazbu částí proteinů z komplexní směsi v biologickém vzorku vede ke zjednodušení proteinového spektra, které je následně analyzováno a intenzita jednotlivých píků hodnocena statisticky.

V první fázi celé studie jsme optimalizovali lyzi tkáně, povrch čipu a nastavení měření. Analyzovali jsme 110 vzorků nádorové tkáně pacientek s diagnózou karcinomu prsu a 110 odpovídajících vzorků zdravé tkáně prsu. Celý soubor je charakterizován na běžně stanovené klinické znaky spojené s danou diagnózou. Získaná spektra v rozmezí 2 až 100 kDa byla kalibrována na hmotnostní standardy, intenzita byla normalizována dle celkového iontového proudu a detekovány píky o poměru signál/šum vyšší než 3. Statistická analýza byla provedena pomocí neparametrických testů Mann-Whitneyova resp. Kruskal-Wallisova (pro více

než dvě hodnoty kategorické proměnné), s cílem identifikovat píky se statisticky významným ($p \leq 0,001$) vztahem ke klíčovým parametrům hodnoceným kategoricky (negativní – pozitivní, 1–2–3 atd.).

Z klasických prediktivních parametrů koreloval s přítomností estrogenového receptoru alfa pik o hmotnosti 4927 Da a dva píky v oblasti 8700 Da. Pik korelující samostatně s přítomností progesteronového receptoru nebyl identifikován. Korelace s přítomností proteinu cyklinu D1 byla potvrzena u piků 3398 Da, 7553 Da a také v oblasti 8700 Da. Oproti tomu nebyl nalezen žádný jednoznačně korelující pik s amplifikací genu pro cyklin D1, amplifikací genu *Her-2/neu* ani s přítomností proteinu Her-2. Při analýze parametrů gradingu byly nalezeny píky korelující s jadernou polymorfii (2318 Da a 2428 Da), s mitotickou aktivitou (2307 Da), ale žádný z piků nekoreloval s kvantitou tubulárních formací. Dále nebyly nalezeny píky korelující s expresí cytokeratinu 5/6, MUC1, GCFP ani s velikostí nádoru nebo s přítomností uzlinových metastáz v době diagnózy. Vybrané píky byly dále purifikovány a postoupeny k identifikaci.

Práce byla podpořena z finančních zdrojů IGA MZ ČR NR / 8338-3/2005 a MŠMT LC06035.

ČESKÉ LÉČIVÉ ROSTLINY JAKO MOŽNÉ ZDROJE ANTIOXIDANTŮ

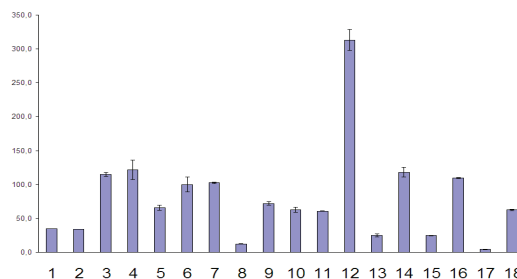
LUCIE BUŘIČOVÁ a ZUZANA RÉBLOVÁ

*VŠCHT, Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 3,
16628 Praha 6
lucie.buricova@vscht.cz*

Součástí výzkumu antioxidantů je také hledání nových zdrojů těchto látek. Mezi bohaté zdroje přírodních antioxidantů patří i léčivé rostliny. Z tohoto důvodu byly vybrané české léčivé rostliny (v potravinářství použitelné bez omezení a květ černého bezu, použitelný pro výrobu čajových směsí do výše 30 % hmotnosti)¹ porovnány mezi sebou na základě jejich celkové antioxidační aktivity.

Antioxidační aktivita sedmnácti českých léčivých rostlin byla stanovena v suchých drogách ve vepřovém sádle pomocí přístroje Oxipres a ve vodných (Obr. 1) a ethanolových extraktech metodou zhášení radikálu DPPH (2,2-difeny-1-pikryl-hydrazylu). Ve vodných extraktech byly stanoveny také veškeré látky s redukčními vlastnostmi (metodou FIA s amperometrickou detekcí)². Za hlavní metodu stanovení antioxidační aktivity byla zvolena metoda zhášení radikálu DPPH, neboť aktivity naměřené na přístroji Oxipres byly velmi nízké, na čemž se mohla, jako jeden z faktorů, podílet obtížná extrahovatelnost antioxidantů ze sušených drog přímo do sádla. Antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH dobře korelovala s celkovým obsahem látek s redukčními vlastnostmi. Díky korelaci těchto dvou metod můžeme říci, že antioxidační aktivita extraktů studovaných léčivých rostlin je způsobena především primárními antioxidanty, které je možné stanovit

elektrochemickými metodami na základě jejich snadné oxidovatelnosti.



Obr. 1: Celková antioxidační aktivita (AA) vodných extraktů, naměřená metodou DPPH, v mg askorbové kyseliny na 1 g sušené drogy (\pm směrodatná odchylka). (1-heřmánek květ, 2-borůvka plod, 3-ostružina plod, 4-jahoda list, 5-hluchavka květ, 6-meduňka nať, 7-maliník list, 8-čekanka kořen, nať, 9-máta nať, 10-lípa květ, 11-černý bez květ, 12-zelený čaj, 13-jeřáb červený plod, 14-dobromysl nať, 15-rakytník plod, 16-mateřídouška nať, 17-fenykl plod, 18-šípek plod)

Extrakce látek s antioxidačními účinky, zhášející radikál DPPH, byla účinnější horkou vodou než ethanolom za teploty místnosti. Antioxidační aktivity obou typů extraktů spolu však silně koreluje. Významnou antioxidační aktivitu (stanovenou jak ve vodném, tak v ethanolovém extraktu) vykazovaly rostliny čeledi *Rosaceae* (list jahodníku lesního, list maliníku a list ostružiníku), dále pak rostliny čeledi *Lamiaceae* (nať meduňky, nať mateřídoušky, nať máty peprné, nať dobromysly a květ hluchavky), spolu s květem lípy (z čeledi *Tiliaceae*) a květem černého bezu (z čeledi *Loniceraceae*). I když tyto rostliny měly nižší antioxidační aktivitu než zelený čaj, mohou být považovány za dobré zdroje antioxidantů vhodné nejen pro přímou konzumaci, ale také pro obohacování potravin (jejich koncentrovanými extrakty) za účelem zvýšení nutriční hodnoty.

LITERATURA

1. *Vyhláška č. 330/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro čaj, kávu a kávoviny.* Sběrka zákonů 1997, částka 110, str. 6713.
2. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: *Chem. Listy* 98, 174 (2004).

PYROSEQUENCING AS A TOOL FOR WHOLE GENOME SEQUENCING OF *Treponema pallidum* SUBSPECIES

**DARINA ČEJKOVÁ^a, PETRA MATĚJKOVÁ^a,
MICHAL STROUHAL^a, MARIE ZOBANÍKOVÁ^a,
DAVID ŠMAJS^{a,b}, and GEORGE M. WEINSTOCK^b**

^aDepartment of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, CZ; ^bHuman Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

Treponema pallidum includes several obligate human pathogens. *T. p. pallidum* is an agent of sexually transmitted syphilis, *T. p. pertenue* and *T. p. endemicum* causes yaws and endemic syphilis, respectively. Diseases caused by these subspecies are quite distinct, although at the DNA level the bacteria are nearly indistinguishable, being > 99% identical based on hybridization experiments and whole genome fingerprinting results.

Pyrosequencing (454 sequencing) is a massively-parallel sequencing-by-synthesis system. In this study, genomic DNA of *T. p. pertenue* CDC-2 was completely sequenced using 454 technology. In the first step, DNA (10 ng) was amplified using REPLI-g kit (QIAGEN) leading to 10.24 µg of amplified DNA. In the following step, 6 µg of whole genome amplified DNA was used for pyrosequencing. The total number of reads was 464,757 assembled in 1,669 contigs. The blastn analysis revealed 74 contigs homologous to *Treponema*. N50 contig length was 52 kb. Average read coverage for *T. pallidum* contigs was 36x. Obtained CDC-2 contigs covered 98.63 % of the genome sequence of *T. p. pallidum* Nichols strain (AE000520).

Seventy-four gaps found in the genome assembly varied between 1 bp and 5,963 bp. Gaps were clustered in 50 regions and amplification primers for these regions were designed using Primer3 software. The PCR amplified regions were sequenced by standard Sanger method. 28 gaps were successfully closed by this approach. Ten remaining gaps require primer walking approach and twelve require cloning of PCR product and sequencing of resulting clones. The CDC-2 genome (140,000 bp, i.e. 12 %) was compared to another yaws strain, Samoa D. Based on these preliminary results, more than 250 SNPs and approximately 200 single nucleotide and other short indels are expected in the complete genome sequence of CDC-2 strain.

Based on the analysis of assembled contigs, pyrosequencing approach showed limitations in highly repetitive regions and in homopolymer stretches. Discovery of sequence differences among different *T. pallidum* strains will lead to characterization of intra- and intersubspecies *Treponema pallidum* variability and to identification of virulence determinants.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 310/07/0321) and the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. NR/8967-4/2006).

ANALÝZA -1149 G/T SNP EXTRAHYPOFYZÁRNÍHO PROMOTORU GENU *PRL* U DIABETIKŮ I. TYPU

PAVLÍNA ČEJKOVÁ^a, MARKÉTA FOJTÍKOVÁ^b, CTIBOR DOSTÁL^b, LUDMILA TREŠLOVÁ^c, JOSEF MAREK^d a MARIE ČERNÁ^a

^aOdd. buněčné a molekulární biologie, 3. LF; ^bRevmatologická klinika, 1. LF; ^cDiabetologické centrum, 3. LF a FNKV; ^dIII. interní klinika, 1. LF a FNKV, Univerzita Karlova Praha

Prolaktin (PRL) je polypeptidový hormon produkovaný laktotrofními buňkami adenohipofýzy. Vedle svých endokrinních účinků PRL podobně jako cytokiny vykazuje schopnost ovlivnit maturaci a diferenciaci imunitních buněk. Zvýšené hladiny PRL (hyperprolaktinémie) byly detekovány u některých autoimunitních chorob, jako jsou systémový lupus erythematosus (SLE), revmatoidní artritida (RA) a psoriatická artritida (PsA). Expres prolaktinu však byla detekována také u extrahypofyzárních tkání včetně imunitních T lymfocytů a monocytů. Tato extrahypofyzární produkce je řízena alternativním promotorem, kde se v pozici -1149 nachází jednonukleotidový polymorfismus G/T. Vyšší hladiny exprese PRL mRNA v lymfocytech korelují s výskytem G alely.

Cílem této práce bylo zjistit potenciální úlohu PRL v patogenezi autoimunitního diabetes a určit distribuci -1149 G/T polymorfismu extrahypofyzárního promotoru PRL genu u T1DM pacientů.

Frekvence alel a genotypů -1149 G/T polymorfismu extrahypofyzárního promotoru prolaktinového genu jsme sledovali u středočeské populaci diabetiků (N=49) diagnostikovaných na základě stávajících kritérií WHO. Jako kontrolní soubor byli použiti dobrovolní dárci krve (N=104). PCR-RFLP: Genomická DNA byla izolována z periferní krve pomocí QiaAmp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Německo). K detekci alel a genotypů -1149 G/T SNP PRL byla použita metoda PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) s originálně navrženými oligonukleotidy. PCR produkty byly štěpeny XapI restrikcí endonukleasou, výsledné fragmenty separovány elektroforeticky na 4 % agarosovém gelu.

Genotypové a alelové frekvence -1149 G/T polymorfismu extrahypofyzárního promotoru prolaktinového genu se neliší mezi diabetickými pacienty a kontrolní skupinou: T1DM: GG = 40,8 %, GT = 40,8 %, TT = 18,4 %; kontroly: GG = 40,4 %, GT = 41,3 %, TT = 18,3 %. -1149 G/T polymorfismus extrahypofyzárního promotoru prolaktinového genu není asociovaný s autoimunitním T1DM. Zdá se tedy, že tento polymorfismus hraje roli pouze v systémových a nikoliv orgánových autoimunitních onemocněních.

Tato studie je součástí širšího projektu a byla finančně podpořena Výzkumným záměrem Ministerstva školství a mládeže MSM 0021620814: Prevence, diagnostika a terapie diabetes mellitus, metabolických a endokrinních poškození.

OPPOSITE EFFECTS OF TWO ZINC(II) DITHIOCARBAMATES ON NFκB PATHWAY

BORIS CVEK^a, ZDENĚK DVOŘÁK^a, JAN TARABA^b, LUKÁŠ MÜLLER^c, RADIM VRZAL^a, and JITKA ULRICOVÁ^a

^aDept Med. Chem. Biochem., Medical Faculty, Palacký University, Olomouc; ^bDept Chem., Faculty of Science, Masaryk University, Brno; ^cDept Anal. Chem., Faculty of Science, Palacký University, Olomouc
cvekb@seznam.cz

Inhibiting NFκB activation in anticancer and antiinflammatory therapy is of topical interest. Current research in molecular biology has dramatically advanced in the understanding of the cellular events involved in NFκB induction. Dithiocarbamates, in particular diethyldithiocarbamate and pyrrolidindithiocarbamate, have been known and widely used as strong inhibitors of NFκB signaling pathway for more than ten years. Their activity is frequently thought to be due to chelating of zinc or copper present in serum supplemented in the culture medium.

Zinc(II) diethyldithiocarbamate (Et₂Zn) and zinc(II) dibenzylidithiocarbamate (Bz₂Zn) were prepared by direct synthesis in aqueous milieu. They were structurally characterized by X-ray analysis (solid phase) and mass spectrometry (aqueous conditions). Et₂Zn and Bz₂Zn both in 20 μM concentration were applied to HeLa cells. The status of NFκB signaling was assessed as nuclear translocation of p65 subunit. Surprisingly, Et₂Zn activated NFκB pathway, while TNF-α dependent activation of NFκB was inhibited by Bz₂Zn. Our results are preliminary and further analyses comprising gene reporter assays will be performed.

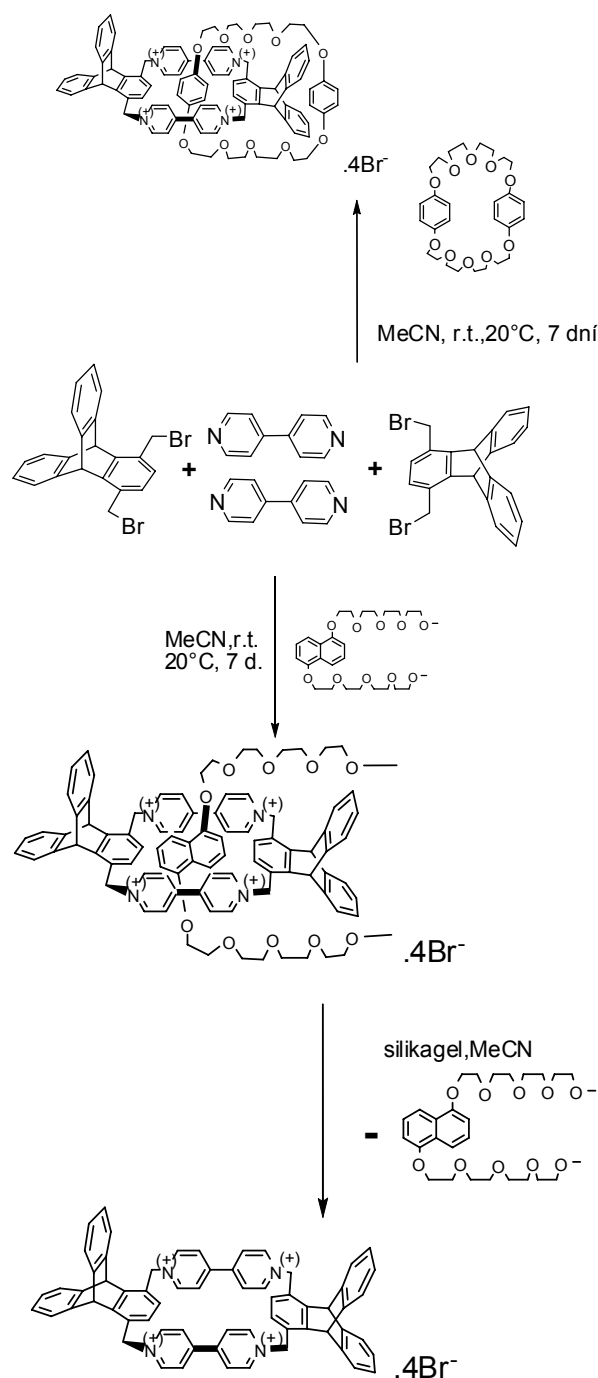
This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM 6198959216).

ELEKRONOVĚ DEFICITNÍ TRIPTYCENOVÉ CYKLOFANY: STRUKTURA A VLASTNOSTI

**VÁCLAV DEKOJ^a, MARTIN BĚLOHRADSKÝ^a,
DETLEF SCHROEDER^a a IVANA CÍSAŘOVÁ^b**

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bKatedra organické chemie PŘF UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
vaclav.dekoj@seznam.cz

Bipyridylové cyklofany s inkorporovaným triptycenovým skeletem představují zajímavé stavební bloky pro výstavbu supramolekul. Metodami templátově řízené syntézy byla připravena homologická řada [2]katenanů obsahujících triptycenový cyklofan jako jeden z makrocyclů katenanu. Mobilita jednotlivých cyklů v katenanech byla sledována metodami NMR a porovnána s vlastnostmi katenanu připraveného ve skupině prof. Stoddarta. Samostatné triptycenové cyklofany jsou elektronově chudé a snadno tvoří inkluzní *charge-transfer* komplexy s elektronově bohatými molekulami. Triptycenové cyklofany také vykazují zajímavé vlastnosti v oblasti studia fragmentace polykationických molekul v plynné fázi metodami hmotnostní spektroskopie.



PŘÍPRAVA TRITERPENOIDŮ SUBSTITUOVANÝCH NA KRUHU B A STUDIUM JEJICH KONFORMACE

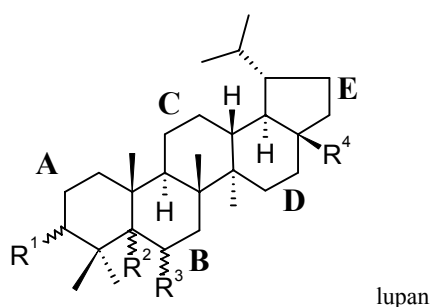
MARTIN DRAČÍNSKÝ a JAN SEJBAL

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

V přírodě se běžně vyskytují tetra- a pentacyklické triterpeny odvozené od více než 40 skeletů^{1,2}. V nedávné době byla u některých derivátů zjištěna významná anti-HIV a protinádorová aktivita. Některé polohy jsou u triterpenů získaných z přírodního materiálu substituovány běžně, jiné vzácně. Velmi vzácně se vyskytují triterpeny substituované na kruhu B. U některých derivátů lupanu se substituentem na kruhu B byla nalezena zajímavá biologická aktivita (např. antibakteriální³, hepatoprotektivní⁴, protinádorová⁵).

Syntéza triterpenoidů se substituentem na kruhu B je poměrně obtížná, protože kruh B je od ostatních částí skeletu oddělen kvartérními uhlíky, které nelze běžnými chemickými reakcemi “překročit”. V této práci byla zvolena strategie částečného odbourání kruhu A a jeho následné dobudování se současným zavedením dvojné vazby do kruhu B. Výchozí látkou byl betulín, který lze snadno izolovat z březové kůry. Jedenáctistupňovou syntézou byl připraven lup-5-en-3,28-diol. Dvojná vazba byla poté hydroborována a ze vzniklého hydroxyderivátu byla připravena série 16 látek s různými kyslíkatými substituenty na kruhu B (cit.⁶).

U některých nově připravených látek byla studována konformace kruhu A. Je zajímavé, že substituent na kruhu B ovlivňuje i konformaci kruhu A. Konformace kruhu A byla studována pomocí ¹H NMR spektroskopie (sledováním vicinálních interakčních konstant) a pomocí molekulového modelování. Kromě židlíčkové konformace byly nalezeny i dvě různé zkřížené vaničkové konformace. Výsledky molekulového modelování jsou ve velmi dobré shodě s experimentálními daty.



LITERATURA

1. Connolly J. D., Hill R. A.: *Meth. Plant Biochem.* 7, 331 (1991).
2. Mahato S. B., Nandy A. K., Roy G.: *Phytochemistry* 31, 2199 (1992).
3. Schuhly W., Heilmann J., Calis I., Sticher O.: *Planta Med.* 65, 740 (1999).
4. Adnyana I. K., Tezuka Y., Banskota A. H., Tran K. Q., Kadota S.: *Biol. Pharm. Bull.* 23, 1328 (2000).
5. Kouzi S. A., Chatterjee P., Pezzuto J. M., Hamann M. T.: *J. Nat. Prod.* 63, 1653 (2000).
6. Dračínský M., Hybelbauerová S., Sejbál J., Buděšínský M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71, 1131 (2006).

SYNTHESIS AND ANTI-TUBERCULAR ACTIVITY OF NEW ISONICOTINOYL HYDRAZONE DERIVATIVES

J. M. FÉRRIZ, J. VINŠOVÁ, A. IMRAMOVSKÝ, and E. VAVŘIKOVÁ

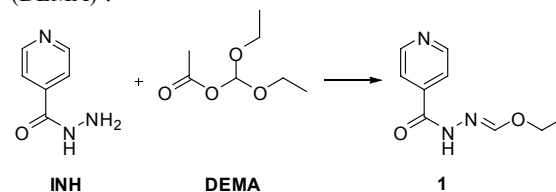
Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
ferriz@faf.cuni.cz

Isonicotinyl hydrazide (Isoniazid, INH) as a first-line anti-tubercular drug is widely applied in combination with other drugs such as Rifampicine, Pyrazinamide, Ethambutol for the treatment of tuberculosis (TB). Modification of this simple molecule is still up to date and has been the focus of the work for several research groups with the aim of improving biological activity and decreasing resistance¹.

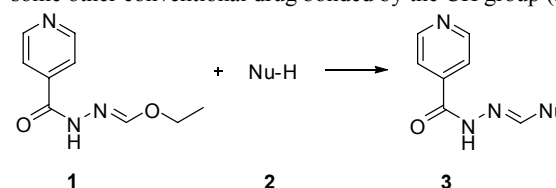
Synergetic act of INH and INH hydrazone is described in literature². This fact led us to prepare completely a new type of isonicotinoyl hydrazone series, where the hydrazone part is another biological active center.

This new type of molecule can be considered as a double active substance that can play the role of a prodrug with a prolonged liberation, where the hydrazone and the components involved in it, can also act synergetically.

The first step was the synthesis of the hydrazone **1** that is easily available from INH and diethoxymethyl acetate (DEMA)³.



The ethoxy group in compound **1** can be substituted by nitrogen nucleophiles like INH, PZA, PAS, some quinolones or sulfonamides etc. (**2**) to form products containing INH and some other conventional drug bonded by the CH group (**3**).



Some of the mentioned products (**3**) were tested *in vitro* for their antitubercular activity at Hansen's disease Center (Colorado State University) as well as in The National Reference Laboratory for *Mycobacterium kansasii*. The stabilities of these compounds were tested by means of a RP-HPLC method due to their decomposition in water-acetonitrile solution.

These compounds show very good activity against non tubercular strains in comparison with isoniazid as an internal standard. In view of this fact, active research of this topic continues.

This work was financially supported by the Research project MSM 002162082 and GAUK 285/2006/B-CH/FaF.

REFERENCES

1. Vinsova J., Imramovsky A., Jampilek J., Ferriz M. J., Dolezal M.: *Curr. Med. Chem.* (2007) under review.
2. De Logu A., Onnis V., Saddi B., Congiu C., Schivo M. L., Cocco M. T.: *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 275 (2002).
3. Košmrlj B., Koklič B., Polanc S.: *Acta Chim. Slov.* 43, 153 (1996).

AKTIVITY ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU SE ZVÝŠENOU HLADINOU PROLINU STRESOVANÝCH SUCHEM NEBO TEPLOTNÍM ŠOKEM

ZUZANA FRÝDLOVÁ^{a,b}, NAĎA WILHELMOVÁ^b, MARIE HAVLOVÁ^c a RADKA VAŇKOVÁ^c

^aUniverzita Karlova, PŘF, Katedra fyziologie rostlin, Albertov 6, 128 43 Praha 2; ^bÚstav exp. botaniky AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6, ^cÚstav exp. botaniky AV ČR, Rozvojová 236, 165 00 Praha 6, *Lysolaje frydlova@ueb.cas.cz*

Rostliny v přírodních podmínkách jsou často vystavené nepříznivým vlivům, v letním období zejména suchu a vysoké teplotě. Tyto stresory nepříznivě ovlivňují růst a vývoj rostliny a v neposlední řadě i výnosy. Stresové reakce jsou doprovázeny zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), které oxidací narušují rovnováhu buňky. K udržení stability buňky slouží zejména antioxidační enzymatický a neenzymatický systém, účastníci se odstraňování ROS. Jiným mechanismem je syntéza osmoticky aktivních látek, např. prolinu, jako adaptace na stres. Využili jsme rostliny *Nicotiana tabacum* (wild type - WT) a transgeniční se zvýšenou produkcí prolinu (M51) pro studium odpovědi enzymatického antioxidačního systému na abiotický stres a následné zotavení. Rostliny byly 10 dní stresovány suchem. Při teplotním šoku byla zvýšena kultivační teplota na 40 °C po 6 hodin. Vzorky zotavených rostlin byly odebrány 24 hodin po ukončení stresu. Enzymatická aktivita v extraktech cytosolických proteinů z listů a kořenů superoxidismutasy (SOD), askorbátperoxidasy (APX) a glutathionreduktasy (GR) byla měřena spektrofotometricky, aktivita katalasy (CAT) byla určena pomocí kyslíkové elektrody. Byly zjišťovány zvlášť aktivity v horním a dolním listovém patru a kořenech.

Odpovědi antioxidačních enzymů záleží jednak na jednotlivých částech rostlin i na stresu. Aktivita APX v listech kontrol působením obou stresů vzroste, kdežto v transgeničních klesá. V kořenech stresy vyvolají jen velmi malé změny aktivity APX. Aktivita katalasy v kořenech nebyla detekována vůbec. Po HS aktivita CAT klesá ve všech listech obou typů tabáku, po suchu roste a to i po recovery. Aktivita SOD v kontrolách po HS klesá, naopak v transgeničních roste. Vlivem sucha se mění jen v dolním patru listů, v horním se nemění. Po recovery ve všech listech

u obou typů tabáku aktivita SOD klesá. V kořenech je aktivita SOD největší a účinkem stresů se příliš nemění. Aktivita GR v podmínkách sucha se v listech obou rostlin výrazně zvýšila, po teplotním šoku naopak klesá, po zotavení se aktivita GR v dolních listech sníží a v horních listech mírně zvýší. Kromě SOD jsou působením stresů do větší míry ovlivněny aktivity v listech ve srovnání s kořeny. HS často působí inaktivaci enzymů, účinkem sucha aktivity obecně rostou. Po zotavení transgeničních rostlin aktivity CAT a APX v horní části rostliny a v kořenech vzrostly. Ve WT se po zotavení aktivity enzymů zvyšují pouze v kořenech.

Zvýšená hladina prolinu ovlivnila odpovědi aktivit antioxidačních enzymů, prolin zřejmě zasahuje do stresových odpovědi rostlinné buňky. Lze usuzovat, že transgeniční rostliny byly méně postiženy stresovými podmínkami, v důsledku čehož byly schopny po ukončení stresu obnovit ve vyšší míře antioxidační enzymatický systém.

Tyto výsledky jsou součástí grantového projektu č. 206/06/1306, financovaného GA ČR.

VLIV MASTNÝCH KYSELIN NA PROLIFERACI A VIABILITU PANKREATICKÝCH BETA BUNĚK

VLASTA FÜRSTOVÁ, TEREZA KOPSKÁ a JAN KOVÁŘ

Oddělení buněčné a molekulární biologie ÚBBMB, 3. LF Univerzity Karlovy, Ruská 87, 100 00 Praha 10 vlasta.furstova@tiscali.cz

Chronicky zvýšená hladina mastných kyselin (MK) v krvi přispívá ke ztrátě pankreatických beta buněk u onemocnění diabetes mellitus 2. typu a to zejména mechanismem apoptózy. Cytotoxicita MK u pankreatických beta buněk závisí pravděpodobně na délce jejich uhlíkového řetězce a stupni jejich saturace. Cílem práce bylo porovnat vliv různých nasycených a nenasycených MK (kyselina palmitová a stearová-nasycené, kyselina palmitolejová a olejová-cis dvojná vazba, kyselina elaidová-trans dvojná vazba, kyselina linolová-dvě dvojně vazby) na proliferaci a viabilitu beta buněk lidské linie NES2Y.

Pro testování vlivu MK jsme použili bezsérová, chemicky definovaná média umožňující přesně nastavit koncentrace jednotlivých mastných kyselin. Buňky linie NES2Y jsme inokulovali do jamek 96-jamkové destičky a nechali přisednout 24 hodin. Poté jsme vyměnili normální kultivační médium za médium obsahující jednotlivé mastné kyseliny vázané na bovinní sérový albumin (BSA) v následujících poměrech: 0,03 mM:2 % BSA, 0,1 mM:2 % BSA, 0,3 mM:2 % BSA, 1 mM:2 % BSA a 3 mM:5 % BSA. Kontrolní buňky jsme kultivovali v médiu obsahujícím 2 % a 5 % BSA. Po 48 a 96 hodinách kultivace jsme stanovili počet živých buněk po barvení trypanovou modří.

Zavedli jsme experimentální systém založený na bezsérových a chemicky definovaných médiích, který je vhodný pro studium vlivu mastných kyselin na beta buňky *in vitro*. U nasycených MK, tj. kyseliny palmitové a stearové, jsme zjistili výrazný vliv na proliferaci a viabilitu v závislosti

na aplikované koncentraci mastné kyseliny. Po 48 hodinách byl počet buněk při koncentraci 0,3 mM snížen oproti kontrole o 52 % u kyseliny palmitové a o 66 % u kyseliny stearové a téměř 100 % buněk kultivovaných s koncentracemi 1 mM a 3 mM bylo mrtvých. Nenasycené MK s *cis* dvojnou vazbou (kyselina palmitolejová, olejová a linolová) neměly v tomto časovém intervalu výraznější vliv na proliferační aktivitu s výjimkou nejvyšší použité koncentrace (3 mM), kde byl zřejmý pokles počtu buněk oproti kontrole (o 20–60 % v závislosti na použité MK). Inhibice proliferační aktivity vysokými koncentracemi *cis* nenasycených MK ve srovnání s kontrolou byla markantnější po 96 hodinách kultivace. Počet buněk poklesl oproti kontrole o 45–75% u koncentrace 1 mM a o 50–85% u koncentrace 3 mM v závislosti na použité MK. Efekt *trans* MK kyseliny elaidové byl odlišný v porovnání s jejím *cis* protějškem kyselinou olejovou. Nástup inhibičního působení na proliferaci se zde projevil po 96 hodinách působení již u koncentrace 0,1 mM, kdežto v případě kyseliny olejové až u koncentrace 1 mM.

Inhibice proliferace a indukce buněčné smrti u pankreatických beta buněk linie NES2Y vyvolané působením nasycených MK byly výrazně vyšší než po působení nenasycených MK. Účinné koncentrace byly přibližně 10x nižší a nástup účinku se projevil po kratší době kultivace. Naše výsledky jsou v souladu s některými literárními údaji o odlišném působení nasycených a nenasycených MK na pankreatické beta buňky. Rozdíl v účinku kyseliny elaidové a olejové poukazuje na možnost vlivu *cis* a *trans* izomerie dvojně vazby na biologické účinky MK.

Zvýšená hladina glukosy a mastných kyselin jsou považovány za hlavní spouštěcí mechanismy ztráty beta buněk u DM2T.

Cytotoxicita MK u pankreatických beta buněk závisí pravděpodobně na délce jejich uhlíkového řetězce a stupni jejich saturace. Přesné molekulární mechanismy, kterými indukují buněčnou smrt, však nejsou známy. Na modelu linie lidských pankreatických beta buněk chceme porovnat vliv různých nasycených a nenasycených MK: palmitová a stearová (nasycené), palmitolejová a olejová (*cis* dvojná vazba), elaidová (*trans* dvojná vazba), linolová (dvě dvojně vazby). Zároveň chceme přispět k poznání molekulárních mechanismů indukce buněčné smrti těmito MK. Zaměříme se hlavně na roli mitochondriální dráhy indukce apoptózy. Budeme sledovat aktivaci exekučních a iniciačních kaspas, případně jiných typů proteas, uvolňování proapoptotických faktorů z mitochondrií (cytochrom c atd.), změny mitochondriálního membránového potenciálu a změny exprese a buněčné lokalizace proteinů rodiny Bcl-2. Získané poznatky přispějí nejen k pochopení mechanismů indukce buněčné smrti MK u beta buněk, ale také by mohly přispět k nalezení nových způsobů terapie DM2T založených na inhibici apoptózy těchto buněk.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem 3. LF UK MSM 0021620814.

MONOCHLORINATED PHENOLS STUDIED BY ELECTROCHEMICAL QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE (EQCM)

MATILDA GERNÁTOVÁ a PAVEL JANDERKA

*Institute of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno
mgernatova13@yahoo.co.uk, janderka@chemi.muni.cz*

The quantitation of phenolic compounds in environmental, industrial and food samples is currently of great interest. The electrooxidation of phenols has thus received considerable attention in connection with the development of voltammetric and amperometric schemes for their monitoring^{1–4}. Advanced oxidation processes and other methods can be also used for study of degradation and oxidation processes of phenols^{5,6}. Unfortunately, the oxidation of phenolic compounds at solid electrodes produces phenoxy radicals which couple to form a passivating polymeric film on the electrode^{7–9}. The electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) allows real-time measurements of electrochemically induced mass changes at electrode surfaces. Such dynamic monitoring of instantaneous mass changes offers great promise for investigating the kinetics and mechanism of numerous potential-controlled surface reactions^{3,7,10}.

An electrochemical quartz crystal microbalance model RQCM 603200 (Maxtek INC., California, USA) with a 5 MHz AT-cut quartz crystal was used. A three-electrode compartment cell with platinum electrode as a working electrode, reversible hydrogen electrode as a reference electrode and Pt sheet as a counter electrode were used. EQCM was connected with Autolab potentiostat (Ecochemie, Netherlands) used for I/E data recording. The solutions were deaerated with argon 5.0 (Messer, min. 99.999 vol. %) at 1 atm. pressure. 0.5 M H₂SO₄ was used as a supporting electrolyte. The studied monochlorophenols (CPs) were *o*-CP, *m*-CP and *p*-CP, each obtained from Merck and used as received. We also studied chlorobenzene as a parent compound.

This work was supported by research project INCHEMBIOL No. 0021622412 from the Ministry of Education, Youth and Sport.

REFERENCES

- Gernátová M., Janderka P.: Chem. Listy 100, 877 (2006).
- Ežerskis Z., Jusys Z.: J. Appl. Electrochem. 31, 1117 (2001).
- Ureta-Zañartu M. S., Bustos P., Diez M. C., Mora M. L., Gutiérrez C.: Electrochim. Acta 46, 2545 (2001).
- Cañizares P., García-Gómez J., Sáez C., Rodrigo M. A.: J. Appl. Electrochem. 34, 87 (2004).
- Pera-Titus M., García-Molina V., Baños M. A., Giménez J., Esplugas S.: Appl. Catal., B 47, 219 (2004).
- Polcaro A. M., Palmas S.: Ind. Eng. Chem. Res. 36, 1791 (1997).

7. Ežerskis Z., Stalnonis G., Jusys Z.: *J. Appl. Electrochem.* 32, 49 (2002).
8. Muna G. W., Tasheva N., Swain G. M.: *Environ. Sci. Technol.* 38, 3674 (2004).
9. Codognoto L., Machado S. A. S., Avaca L. A.: *J. Appl. Electrochem.* 33, 951 (2003).
10. Wang J., Jiang M., Lu F.: *J. of Electroanal. Chemistry* 444, 127 (1998).

STUDY OF INVOLVEMENT OF CELLULAR PRION PROTEIN IN ERYTHROPOESIS IN MICE

**HANA GLJEROVÁ^a, MARTIN PANIGAJ^a,
JAN ŽIVNÝ^b and KAREL HOLADA^a**

^a*Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague;* ^b*Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague*

The essential event in pathology of prion diseases is conversion of cellular prion protein (PrP_c) to its conformational isomer-abnormal infectious prion protein (PrP^{Sc}). Four cases of prion transmission by blood transfusion have been recently reported. However, the mechanism of prion transmission by blood and a physiological function of PrP_c in blood cells remain unclear. PrP_c is expressed on CD34⁺ hematopoietic stem cells and its expression is regulated during blood cell differentiation. Interestingly, the expression of erythroid cell specific α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP) is downregulated in patients suffering from prion infection. AHSP is expressed in erythroid cells where it acts as a chaperone preventing precipitation of α -globine subunits. These facts suggest connection between erythropoiesis and prion pathogenesis.

The aim of our study was to find if PrP_c plays a role in erythropoiesis. An acute haemolytic anemia was induced in mice by intra peritoneal (i.p.) administration of phenylhydrazine (PHZ) in dose of 80 mg/kg. The course of anemia was studied in mice with normal expression of PrP_c (wild type, WT) and PrP_c knock out mice (PrP^{-/-}). The effect of PHZ on the erythropoiesis was evaluated by analysis of hematocrit (HCT) and erythropoietin (EPO) levels in plasma and kidney. EPO expression in kidney was analysed by quantitative RT-PCR. As an endogenous control 18S rRNA was used. Levels of EPO in plasma were evaluated using sandwich ELISA, HCT was counted manually. A rapid decrease in HCT was observed in both WT and PrP^{-/-} mice during first day after induction of anemia. Drop of HCT was followed by increase in expression of EPO mRNA in kidneys and higher plasma levels of EPO. PrP^{-/-} mice showed significantly lower HCT during third to fifth day after induction of anemia and higher production of EPO mRNA and higher EPO levels in plasma suggesting involvement of PrP_c expression in erythropoiesis. To confirm the role of PrP_c in erythropoiesis the effect of PHZ in PrP^{-/-} mice and Tga20 mice (PrP^{-/-} mice with 20 copies of Prnp gene randomly reintroduced) was compared. Tga20 mice displayed lower decrease of HCT and lower production of EPO in

comparison to PrP^{-/-} mice. The course of anemia induced by PHZ was significantly deeper in PrP^{-/-} mice. This phenomenon could be explained as a result of lower ability of PrP^{-/-} mice to deal with the oxidative stress caused by PHZ. Reintroduction of PrP_c gene in Tga20 mice rescued the animals from severe anemia. Our results suggest that PrP_c may play a supporting role in the erythropoiesis.

Supported by: GA ČR 310/04/0419, 310/05/H533, MSM 0021620806

POUŽITÍ SQUARE WAVE VOLTAMETRIE PRO STANOVENÍ FLAVONOIDŮ A JEJICH TESTY JAKO POTENCIONÁLNÍCH INDUKTORŮ CYTOCHROMŮ P450

**PAVEL HANUŠTIAK^a, PETR HODEK^b,
RADKA MIKELOVÁ^c, VOJTĚCH ADAM^d,
MIROSLAVA BEKLOVÁ^a, LADISLAV ZEMAN^e,
a RENÉ KIZEK^{d,*}**

^a*Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE, VFU, Palackého 1-3, 612 42 Brno;* ^b*Katedra biochemie, PŘF UK, Albertov 2030, 128 40 Praha;* ^c*Katedra teoretické a fyzikální chemie, PŘF MU, Kotlářská 37, 611 37, Brno;* ^d*Ústav chemie a biochemie, a* ^e*Ústav výživy zvířat a pícninářství, AF MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno*
kizek@sci.muni.cz

O biologickém působení flavonoidů na živočichy je známo málo. Flavonoidy jsou nízkomolekulární heterocyklické sloučeniny a jsou klasifikovány jako sekundární rostlinné metabolity všudypřítomné v rostlinné říši. Podle jejich struktury je dělíme na flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, anthokyany, isoflavony, dihydroxyflavonoly a chalkony. V našem experimentu jsme vybrali některé flavonoidy jako potencionální induktory cytochromů P450 u samců laboratorních potkanů¹⁻³. Studie byla zaměřena na indukci CYP1A1, hlavního cytochromu P450, který se účastní aktivace některých karcinogenů. Pomocí techniky Western blotting jsme zjistili, že některé flavonoidy, například syntetický β -naftoflavon nebo přírodní flavonoidy jako chrysin či diosmin, účinně stimulují expresi CYP1A1 ve střevní i jaterní tkáni. Jiné testované flavonoidy, například hesperetin, hesperidin a naringin neindukují expresi CYP1A1 ve střevech a játrech potkanů. Poté, co jsme vyzkoušeli některé flavonoidy jako potencionální induktory cytochromu P450, jsme navrhli vhodné elektrochemické stanovení vybraných flavonoidů (quercetin, quercitrin, rutin, chrysin, diosmin) v tělních tekutinách. Jako stacionární techniku pro toto stanovení jsme vybrali metodu square wave voltametrie za použití uhlíkové pastové elektrody a provedli její optimalizaci, při které jsme sledovali základní elektroanalytické chování jednotlivých flavonoidů. Na základě takto získaných výsledků jsme pro vlastní stanovení zvolili následující podmínky: frekvence 180 Hz, potenciálový krok 1,95 mV a fosfátový pufr o pH 7,0. Limit detekce (3 S/N) se pro flavonoidy pohyboval od jednotek po desítky nM, vyjma diosminu, u kterého se limit detekce

nacházel v řádu jednotek μM koncentrace. Optimalizovanou metodu jsme použili pro stanovení flavonoidů v lidské moči. Zjistili jsme, že lidská moč významně neovlivňuje signál flavonoidů (návratnost signálů přesáhla 90 %) a můžeme je tedy bezpečně stanovit i v přítomnosti lidské moči. V návaznosti na získané výsledky jsme se poté pokusili navrhnout i senzor pro analýzu některých flavonoidů v lidské moči. Získané experimentální výsledky byly také využity pro analýzu flavonoidů v játrech potkanů krmených quercetinem pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

Práce na tomto projektu byla podporována granty: Liga proti rakovině Praha 2006 a RASO 2007.

LITERATURA

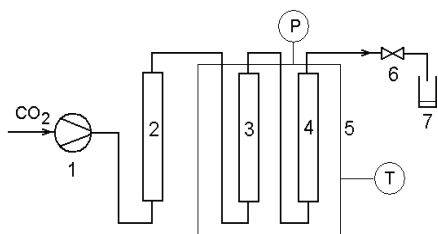
1. Klejdus B., Mikelová R., Petřelová J., Potešil D., Adam V., Stiborová M., Hodek P., Vacek J., Kizek R., Kuban V.: *J. Chromatogr. A* 1084, 71 (2005).
2. Klejdus B., Mikelová R., Petřelová J., Potešil D., Adam V., Stiborová M., Hodek P., Vacek J., Kizek R., Kuban V.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 5848 (2005).
3. Klejdus B., Vacek J., Adam V., Zehnalek J., Kizek R., Trnková L., Kuban V.: *J. Chromatogr. B* 806, 101 (2004).

VYUŽITÍ LIPAS Z *Geotrichum candidum* 4013 PRO PŘÍPRAVU FARMACEUTICKÝ VÝZNAMNÝCH LÁTEK

KLÁRA HLAVSOVÁ^a, MARIE ZAREVÚCKA^b, MARTINA MACKOVÁ^a a HELENA SOVOVÁ^c

^aVŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6; ^cÚCHP AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6

Kvasinka *Geotrichum candidum* 4013 produkuje lipasu vázanou na buňku a extracelulární lipasu. Byly použity pro hydrolyzu oleje ze semen černého rybízu (*Ribes nigrum*), který obsahuje vysoké procento nenasycených mastných kyselin. Hydrolyza probíhala a) za atmosférického tlaku, ve vodě při 25 °C a b) v superkritickém CO₂ (SC-CO₂) za tlaku 15 MPa, teplotě 40 °C a průtoku CO₂ 0,43-0,48 g.min⁻¹ (Obr. 1).



Obr. 1: Reaktor pro enzymovou hydrolyzu oleje v SC-CO₂: (1) kompresor, (2) prostor sycení vodou, (3) prostor sycení olejem, (4) reaktor obsahující enzym, (5) vodní lázeň, (6) mikrometrický ventil, (7) ampulka s reakční směsí

Enzymové reakce v SC-CO₂ kombinují výhody biokatalyzátorů (substrátovou specifitu za mírných reakčních podmínek) a superkritických tekutin (rychlý transport hmoty, snadné dělení reakčních produktů od rozpouštědla a ohleduplnost k životnímu prostředí).

Při hydrolyze za atmosférického tlaku a v SC-CO₂ byly získány frakce obsahující směsi acylglycerolů (tri-, di-, mono-), glycerolu a volných mastných kyselin. Vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie. Bylo zjištěno, že se při hydrolyze přednostně uvolňují nejen nasycené mastné kyseliny, u kterých to lze při použití 1,3-specifického enzymu očekávat, protože jsou v triacylglycerolech rostlinných olejů umístěny převážně v pozicích *sn1* a *sn3*, ale také olejová a linolová kyselina. V menším měřítku byla odštěpována také α -linolenová kyselina. Po porovnání výsledků bylo zjištěno, že vyšších výtěžků bylo dosaženo při reakci v SC-CO₂ oproti hydrolyze za atmosférického tlaku. Díky odštěpení nasycených mastných kyselin a olejové kyseliny došlo k obohacení frakcí acylglycerolů o nenasycené mastné kyseliny, které v molekule obsahují více dvojných vazeb. Nenasycené mastné kyseliny, zvláště obsahují-li ve své molekule více dvojných vazeb, jsou pro lidský organismus velmi důležité, a jelikož je nedokáže syntetizovat, je nutné nenasycené mastné kyseliny získávat potravou. Hydrolysa oleje využívající lipasy produkované kmenem *Geotrichum candidum* 4013 by mohla být novým a účinným způsobem přípravy potravinových doplňků, které obsahují tyto zdravé prospěšné kyseliny.

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/04/120).

FREKVENCE VYBRANÝCH GENOVÝCH POLYMORFISMŮ ASOCIOVANÝCH SE ZÁNĚTLIVÝM STŘEVNÍM ONEMOCNĚNÍM – STUDIE PACIENTŮ Z ČR A SR

JAN HOŠEK^a, LADISLAVA BARTOŠOVÁ^{b*}, JANA SVOBODOVÁ^b, ELIŠKA VECHETOVÁ^b, MICHAL KOLORZ^b, PETER LOUČKA^b, a MILAN BARTOŠ^a

^aÚstav přírodních léčiv, ^bÚstav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity, Brno 612 42, Palackého 1-3 bartosoval@vfu.cz

Zánětlivé střevní onemocnění (IBD) je nemoc charakterizovaná chronickým zánětem gastrointestinálního traktu. Rozlišují se dva klinické subtypy, Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC), které se od sebe odlišují na základě rozdílných klinicko-patologických znaků^{1,2}. Kumulace onemocnění v rodinách, konkordance mezi monozygotickými dvojčaty či etnické rozdílnosti podávají důkaz o vlivu genetických faktorů na vznik tohoto onemocnění¹.

V České republice je prevalence CD 18-22 případů a UC 40-45 případů na 100 000 obyvatel³. Doposud však chyběla data o četnostech mutací v IBD-susceptibilních genech. Proto jsme se zaměřili na určení četností mutací u

genů, které jsou v literatuře zmiňovány nejčastěji. Jedná se o tři mutace v genu NOD2 (R702W, G908R a 1007fs), mutaci K469E v genu ICAM-1 a deleční mutaci CCR5Δ32 v genu CCR5.

Do studie bylo zahrnuto 47 pacientů s CD, 12 s UC a 63 zdravých dobrovolníků. DNA byla izolována z periferní krve vyšetřovaných jedinců. Požadovaný úsek DNA, na němž se vyskytoval hledaný polymorfismus, byl amplifikován pomocí polymerasové řetězové reakce. Získané amplicony byly štěpeny restriktivními endonukleasami, které jsou pro jednotlivé polymorfismy specifické. Produkty štěpení byly elektroforeticky rozděleny na agarosovém gelu a vizualizovány ethidium bromidem. Asociace přítomnosti mutantní alely s CD nebo UC byla statisticky vyhodnocena χ^2 –testem pomocí kontingenčních tabulek.

Z našich výsledků vyplývá, že mezi skupinou zdravých dobrovolníků a skupinou pacientů s UC není žádný signifikantní rozdíl v přítomnosti sledovaných mutací genu NOD2. I přes malý počet pacientů s UC se toto zjištění shoduje s výsledky rozsáhlé evropské studie⁵. Naopak byla prokázána vazba mezi CD a polymorfismem 1007fs v genu NOD2. Tato mutace má i podle předešlých studií^{5,6} nejvýraznější korelaci k onemocnění. U mutace K469E v genu ICAM-1 jsme prokázali asociační vazbu jak s CD, tak i s UC. Deleční mutace CCR5Δ32 vykazuje srovnatelnou frekvenci u všech tří srovnávaných skupin, což odpovídá dřívějším pozorováním jiných autorů⁴. Důležitým poznatkem naší studie bylo zjištění, že u pacientů s CD signifikantně vzrůstá počet zmutovaných genů a tím i počet mutací, které nesou. To podporuje tvrzení, že se v případě IBD jedná o polygenní dědičnost¹.

Naše práce doplňuje celoevropské studie hledající kandidátní geny IBD. Na podkladě těchto skutečností bude jednou možné navrhnout genetické testy jako doplňující diagnózu ve sporných případech IBD.

Práce byla vypracována za finanční podpory grantů IGA VFU č. 28/2006/FaF a IGA MZ č. NR9342-3/2007.

LITERATURA

1. Podolsky D. K.: N. Engl. J. Med. 347, 417 (2002).
2. Mathew C. G., Lewis C. M.: Hum. Mol. Genet. 13, R161 (2004).
3. Lukáš M., v knize: *Lékařské repetitorium* (Houdek L., ed.), s. 294-296, Galén, Praha 2003.
4. Herfarth H., Polok-Kopp B., Göke M., Press A., Oppermann M.: Immunol. Lett. 77, 113 (2001).
5. Lesage S., Zouali H., Cézard J.-P. and the EPWG-IBD group, Colombel J.-F. and the EPIMAD group, Belaiche J. and the GETAID group, Almer S., Tysk C., O'Morain C., Gassull M., Binder V., Finkel Y., Modigliani R., Gower-Rousseau C., Macry J., Merlin F., Chamillard M., Jannot A.-S., Thomas G., Hugot J.-P.: Am. J. Hum. Genet. 70, 845 (2002).
6. Özen S. C., Dağlı Ü., Kiliç M. Y., Törtüner M., Çelik Y., Özkan M., Soykan I., Çetinkaya H., Ülker A., Özden A., Bozdayi A. M.: J. Gastroenterol. 41, 304 (2006).

STUDIUM HOMEBOXOVÝCH GENŮ SLADKOVODNÍ MEDÚZY *Craspedacusta sowerbyi*

**MILUŠE HROUDOVÁ^{a,b}, ZDENĚK KREJČÍK^b,
HYNEK STRNAD^b, ČESTMÍR VLČEK^b a VÁCLAV
PAČES^b**

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6; ^bÚstav molekulární genetiky AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
hroudovm@vscht.cz

Sladkovodní medúza *Craspedacusta sowerbyi* je zástupcem živočišného kmene žahavci (Cnidaria), který se v posledních letech stal předmětem intenzivního studia v oblasti molekulární genetiky a vývojové biologie. Komplexní genom žahavců, kontrastující s jednoduchou stavbou jejich těl, je v mnoha ohledech podobnější genomům vyšších obratlovců, včetně člověka, než je tomu u některých evolučně vyšších živočichů (*Drosophila melanogaster*, *Ceanorhabditis elegans*).

Významnou skupinou genů regulujících ontogenezi jsou homeoboxové geny kódující transkripční faktory. Jejich struktura je silně konzervována v genomech všech živočichů a některých rostlin. V raných stádiích vývoje žahavce se podílejí na formování důležitých morfologických znaků, jako je například tělesná symetrie, dále na vývoji nervové soustavy a smyslových orgánů. Jsou součástí významných signálních drah.

V rámci tohoto projektu byly v genomech dvou žahavců (*Hydra magnipapillata* a *Nematostella vectensis*) identifikovány homeoboxové geny pomocí počítačové HMM analýzy („Hidden Markov Model“). Jednotlivé geny byly zařazeny do rodin. Pro další studium u *Craspedacusta sowerbyi* byly vybrány některé méně časté rodiny (POU, DLX, LIM). Na jejich homeodomény a specifické domény byly navrženy degenerované primery. Metodou PCR bylo získáno několik genových fragmentů. Sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že se jedná o fragmenty 3 genů patřících do rodiny POU.

Tato práce bude dále pokračovat prodloužením těchto fragmentů na celé geny metodou RACE a sledováním transkripce jednotlivých získaných genů pomocí *in situ* hybridizace v různých tkáních dospělých jedinců a některých vývojových stádií. V současné době je konstruována fosmidová knihovna genomových fragmentů (30–45 kb), která bude mimojiné použita pro analýzu okolí studovaných homeoboxových genů. Naše laboratoř provádí částečnou analýzu genomu *Craspedacusta sowerbyi* za použití výše zmíněných fosmidových klonů pomocí sekvenačního systému GS20. V blízké budoucnosti se zaměříme také na studium celkového genového repertoáru tohoto a některých dalších žahavců sekvenační analýzou cDNA.

Tato studie byla podporována výzkumnými záměry a granty MŠMT 1M6837805002 (Center for Applied Genomics) a NB Project AC CZ AV0Z50520514.

STANOVENÍ A VÝZNAM METHYLACE PROMOTORU E6 GENU LIDSKÉHO PAPILLOMAVIRU 16 V INTRAEPITELIÁLNÍCH LÉZÍCH A KARCINOMECH DĚLOŽNÍHO ČÍPKU

PAVLA HUBLAROVÁ^a, PAVLA ROTTEROVÁ^b, LEOPOLD ROTTER^c, ZDENA HORTÍKOVÁ^d, VINAY BADAL^e, RUDOLF NENUTIL^a a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK^a

^aOdd. onkol. a exper. patologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, ^b1. Patologicko – anatomický ústav, FN u sv. Anny Brno, Pekařská 53, 656 91 Brno, ^cGynekologicko – porodnická klinika FN Brno, Obilní trh 11, 602 00 Brno, ^dSanatorium Helios, Štefánikova 12/16, 602 00 Brno, ^eInst. Mol. Cell Biol., 61 Biopolis Drive, Proteos, Singapore, 138673, Malaysia
hublarova@mou.cz

Lidské papillomaviry (HPV) jsou malé neobalené dsDNA viry s kružnicovým genomem. Vysoce rizikové kmeny HPV často infikují sliznici děložního čípku u žen a jsou prokazatelně příčinou vzniku intraepiteliálních lézí (CIN) a karcinomu děložního čípku. Mezi nejrizikovější kmeny patří HPV 16 a 18. Proteiny rané fáze exprese E6 a E7 jsou v kooperaci schopné transformovat buňky infikovaného epitelu funkčním vyřazením dvou nejdůležitějších antionkogenů – p53 a pRb. E6 v součinnosti s ubikvitin ligasou hostitelské buňky označí p53 pro degradaci, zatímco E7 umožní fosforylaci pRb, a uvolní tak z vazby transkripční faktor E2F, který spouští v buňkách expresi proteinů zodpovědných za přechod do S fáze. Vzhledem k vysokému počtu infikovaných žen a relativně nízkému počtu karcinomů děložního čípku, se předpokládá existence epigenetického mechanismu kontroly vývoje CIN a karcinomu. Přítomnost methylací CpG ostrůvků v promotoru genu pro E6 a E7 protein jsou součástí regulace životního cyklu HPV, stejně jako přirozené obrany buněk proti cizorodé DNA.

V naší práci nejprve detekujeme přítomnost HPV 16 a 18 pomocí PCR s nově navrženými, vysoce specifickými primery, jako kontroly používáme nádorové cervikální linie SiHa (HPV16 pozitivní), HeLa (HPV18 pozitivní) a HT3 (HPV negativní). U HPV 16 pozitivních vzorků provádíme stanovení methylace v promotoru genu E6 pomocí specifické endonukleasy McrBc. Pozitivní kontrolou je nádorová cervikální buněčná linie CaSki s několika sty methylovaných kopií genu HPV 16, negativní kontrolou je linie SiHa s jednou aktivní kopií genu HPV16.

Cílem našeho projektu je stanovit frekvenci výskytu HPV 16 a 18 nejen u pacientek s CIN a karcinomem děložního čípku ale i u náhodně vybraného vzorku populace asymptomatických žen. U HPV16 pozitivních vzorků je průběžně prokazována methylace virového genomu.

Celkem bylo analyzováno 93 kartáčkových stěrů od zdravých žen, kde se pozitivita HPV 16 pohybovala okolo 70 %, což představuje ve srovnání s odbornou literaturou výrazně vyšší procento. Tento výsledek potvrzuje vysokou citlivost nově zavedeného systému detekce, který je zároveň i vysoce specifický. U skupin pacientek s patologickými

stupni CIN je incidence HPV 16 u CIN I 80 % (n=5); u CIN II 83 % (n=6) a u CIN III 93 % (n=90). U karcinomů děložního čípku byla přítomnost HPV 16 prokázána v 55 % případů (n=35). Celková incidence HPV 16 a 18 je u CIN III a karcinomů okolo 95 %, což se shoduje s daty uváděnými v literatuře. Na stanovení methylací genomu HPV 16 se v současné době intenzivně pracuje, a proto zatím nelze vyvodit jednoznačné závěry. Očekáváme, že po vyhodnocení methylací bude možné vyjádřit individuální riziko pro ženy infikované HPV16 a rovněž bude možné prosadit tuto metodu mezi základní diagnostiku CIN.

Tato práce je podporována granty VZ MOÚ MZO 00209805 a Centrum MŠMT LC06035.

TRANSFORMACE ROSTLIN *Nicotiana tabacum* BAKTERIÁLNÍM GENEM *bphC* PRO DIHYDROXYBIFENYLDIOXYGENASU

ZUZANA CHRASTILOVÁ^a, MARTINA NOVÁKOVÁ^{a,b}, MARTINA MACKOVÁ^{a,b}, TOMÁŠ MACEK^{b,a} a MIKLÓS SZEKERES^c

^aÚstav biochem. mikrobiol., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6; ^bÚOCHB AV ČR, Odd. přírodních látek, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^cInstitute of Plant Biology, Biol. Res. Ctr. Hungarian Acad. Sci., P.O.Box 521 H-6701, Szeged, Hungary
chrastiz@vscht.cz

Globální industrializace zapříčinila únik velkého množství toxických látek do životního prostředí. Mezi tyto toxické látky patří také polychlorované bifenylly (PCB), zvláště díky jejich perzistentnosti v životním prostředí a možnosti jejich úniku do potravního řetězce. Jednou z možností dekontaminace znečištěných ploch je využití biologických systémů, které jsou veřejností akceptovány a jsou šetrné k životnímu prostředí. Existuje mnoho způsobů, jak zvýšit účinnost odstraňování xenobiotik, jedním z nich je např. využití geneticky modifikovaných organismů.

Cílem této práce je zvýšit schopnost rostlin degradovat PCB vnesením vhodného genu do rostlinného genomu, a tím zvýšit účinnost degradace PCB v rostlinách. Pro tento účel byl vybrán bakteriální gen *bphC* z degradační dráhy polychlorovaných bifenylů bakterie *Comamonas testosteroni* B356. Produkt genu *bphC* (enzym 2,3-dihydroxybifenyl-1,2-dioxygenasa) štěpí bifenylový kruh, zjednodušuje strukturu a umožňuje další metabolisaci v rostlinách. V minulosti již byly připraveny rostlinné konstrukty obsahující gen *bphC* ve fusi s detekčním markerem GUS (gen pro β-glukuronidasu), LUC (gen pro luciferasu) a s histidinovou kotvou a ve všech případech byl použit promotor kvěťákové mozaiky CaMV 35S. Připravené plasmidy byly vneseny do bakterie *Agrobacterium* GV3101 (pPM90RK), pomocí které byly rostliny *Nicotiana tabacum* transformovány. Nejdříve byla ověřena účinná exprese fúsních genů *bphC*/GUS, *bphC*/LUC a *bphC*/His v rostlinných buňkách metodou agrobakteriální infiltrace - transienční exprese. Poté následovala trvalá transformace rostlin za použití agrobakterií. Bylo připraveno

12 linií transgenních rostlin: 3 linie s geny *bphC*/GUS, 5 linií s geny *bphC*/LUC a 4 linie s genem *bphC*/His. Přítomnost transgenů byla detekována na úrovni DNA i mRNA metodou PCR, popř. RT-PCR. Expres genů *bphC*/GUS v liniích G1, G2, G3 a genů *bphC*/LUC v liniích L1, L2, L3, L4, L5 byla prokázána histochemicky. Z linií H1, H2, H3, H4 (obsahujících gen *bphC*/His) byl izolován enzym BphC. Ten byl dále identifikován za použití metody Western blot s následující imunochemickou detekcí. Enzymatická aktivita enzymu BphC produkovaného transgenními rostlinami bude v budoucnu stanovena.

Práce byla sponzorována grantem MŠMT Centrum IM06030.

VÝVOJ METODY PRO STANOVENÍ ADUKTŮ STYREN OXIDU V LIDSKÉM GLOBINU

MICHAL JÁGR, JAROSLAV MRÁZ a VLADIMÍR STRÁNSKÝ

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10
michaljagr@centrum.cz

Cílem této práce je vývoj citlivé analytické metody vhodné ke stanovení aduktů styren 7,8-oxidu (SO) s aminokyselinami v lidském globinu. SO vzniká v organismu metabolickou aktivací styrenu pomocí cytochrom P450 dependentního-monoxygenasového systému. SO má genotoxické a mutagení účinky¹.

Biologické monitorování expozice člověka styrenu a SO, které jsou významnými surovinami v průmyslu plastických hmot, je v současné době založeno zejména na stanovení metabolitů kyseliny mandlové a fenylglyoxylové v moči². Jinou perspektivní možností je využití tvorby aduktů SO s některými nukleofilními aminokyselinami přítomnými v globinu. V minulosti jsme provedli GC/MS a LC/MS analýzu pronasového hydrolyzátu globinu inkubovaného se SO *in vitro*, kde jsme detekovali kvantitativně nejvýznamnější adukty SO s cysteinem (SO-Cys), histidinem (SO-His) a lysinem (SO-Lys). Identitu těchto sloučenin jsme potvrdili pomocí předem syntetizovaných standardů³. V globinu lidí exponovaných *in vivo* styrenu a SO je ovšem obecně velmi nízká hladina aduktů SO (např. pro adukty SO s *N*-koncovým valinem u myši exponovaných i.p. styrenu byly publikovány hodnoty na úrovni 15-305 pmol.g⁻¹ globinu)⁴. Proto bylo nutné vyvinout dostatečně citlivou analytickou metodu schopnou stanovení podobně nízkých hladin i u aduktů SO-Cys, SO-His a SO-Lys. V projektu je diskutováno využití metody extrakce na tuhé fázi (SPE) za účelem obohacení hydrolyzátu globinu o adukty spolu se současným zbavením se většiny ostatních aminokyselin. Metoda SPE byla založena na rozdílné hydrofilitě SO-Cys, SO-His a SO-Lys aduktů ve srovnání s ostatními aminokyselinami. SPE kolonka Strata-X vykázala ve srovnání s kolonkami jiných výrobců a stacionárních fází nejlepší schopnosti v retenci těchto aduktů. Přitom většina ostatních aminokyselin, vyjma fenylalaninu a tryptofanu nebyla na kolonkách zadržována.

Bylo nutno i optimalizovat metodu derivatizace aduktů pro jejich GC a GC/MS analýzu. Adukty byly silylovány za produkce trimethylsilyl (TMS) či tert-butyldimethylsilyl derivátů (TBDMS) a nebo byly acylovány chlormravenčany. TBDMS silylace (na rozdíl od TMS) poskytovala s dobrou reprodukovatelností pro každý adukt jediný, dostatečně stabilní derivát. Zato po derivatizaci aduktů chlormravenčany nedošlo k detekci předpokládaných derivátů. Proto byla nadále používána derivatizace za vzniku TBDMS derivátů.

Tato práce byla podporována interním projektem SZÚ na podporu mladých vědců č.4901-54.

LITERATURA

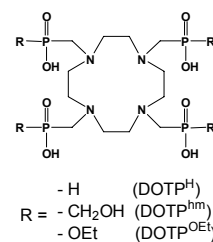
1. Linhart I.: Drug Metab. Rev. 33, 353 (2001).
2. Manini P., De Palma G., Andreoli R., Goldoni M., Mutti A.: Int. Arch. Occup. Environ. Health. 77, 433 (2004).
3. Jäger M., Mráz J., Ctibor K., Stránský V., Pospíšil M.: Biomed. Papers. 149, 82 (2005).
4. Pauwels W., Vodička P., Severi M., Plná K., Veulemans H., Hemminki K.: Carcinogenesis 17, 2673 (1996).

TETRAFOSFOROVÁ ANALOGA LN-DOTA: KOMPLEXY BEZ VODY VE VNITŘNÍ KOORDINAČNÍ SFÉRE

ZUZANA JANDUROVÁ

Katedra anorganické chemie, PřF UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha
jandurov@natur.cuni.cz

Výjimečnost MRI („Magnetic Resonance Imaging“), klinického nástroje pro diagnostiku například nádorů, podněcuje vývoj stále lepších CA („Contrast Agents“) zvyšujících kvalitu snímků¹. Kritickou vlastností CA je přítom účinnost přenosu magnetické informace z Gd³⁺ iontu látky k molekulám vody v jejím okolí. Koordinace vody přímo k Gd³⁺ iontu není nezbytná, pokud je druhá hydratační sféra komplexu, tvořená molekulami vody vázanými vodíkovými můstky k ligandu, dostatečně rozvinuta a může tak docházet k přenosu i prostřednictvím sféry této. Za účelem detailního prozkoumání vlivu pouze druhé hydratační sféry byly syntetizovány tři tetrafosforová analoga ligandu DOTA (DOTP^H, DOTP^{hm}, DOTP^{OEt}) s různě hydrofilními rameny, která jsou zároveň natolik objemná, že již neumožňují koordinaci vody přímo ke Gd³⁺ iontu.



Ligandy a jejich komplexy byly charakterizovány potenciometricky a RTG analýzou, která, stejně jako luminiscenční měření, potvrdila absenci přímo koordinované vody. Studium struktury Ln³⁺ komplexů v roztoku odhalilo odlišnost komplexů Ln-DOTP^H a Ln-DOTP^{OEt} (směs izomerů) od komplexu třetího, Ln-DOTP^{hm} (majoritní symetrický izomer RRRR), což může být způsobeno vodíkovými vazbami mezi rameny komplexu s hydroxomethyl-ovými skupinami. Analýza ¹⁷O LIS („Lanthanide Induced Shifts“) také poukazuje na odlišnou polohu molekul vody druhé sféry u komplexů Ln-DOTP^{hm}. Relaxometrickou studií byl nakonec prokázán nezanedbatelný vliv druhé sféry studovaných komplexů na parametry určující relaxivitu, přičemž počet molekul vody ve druhé hydratační sféře koreloval s hydrofilicitou ligandů.

Studie byla podporována GA ČR (No. 203/03/0168) a projekty COST D38 a DiMI.

LITERATURA

1. Merbach A. E., Tóth É.: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. John Wiley & Sons, New York (2001).

VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH BIOAFINITNÍCH MIKROREAKTORŮ PRO IZOLACI IMUNOGLOBULINU E Z LIDSKÉHO SÉRA

**BARBORA JANKOVIČOVÁ^a, ŠÁRKA RÖSNEROVÁ^b,
LUCIE FOJTÍKOVÁ^b, JOSEF KRÁLOVSKÝ^b a
ZUZANA BÍLKOVÁ^a**

^a*Katedra biologických a biochemických věd a ^bKatedra analytické chemie, FCHT, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice
Barbora.Jankovicova@upce.cz*

Magnetické bioafinitní mikroreaktory jsou systémy, které splňují požadavky kladené na metody pro izolaci a detekci diagnosticky významných látek v komplexním biologickém materiálu. Vysoká selektivita a specifita metody je zde zajištěna tvorbou biospecifického páru vázaného ligandu s izolovanou látkou. Magneticky aktivní pevná fáze přináší snadnou manipulaci a miniaturizaci celého systému.

Protilátky třídy IgE (tj. imunoglobulin E) mají značný klinický význam. Zvýšené hladiny specifických IgE protilátek jsou hlavní příčinou alergických reakcí, které se pro svůj rostoucí trend v populaci stávají závažným medicínským problémem. Koncentrace IgE ve fyziologickém lidském séru je v porovnání s ostatními sérovými proteiny velmi nízká (do 200 IU/ml). Cílem této práce je vyvinout rychlou a účinnou metodu izolace protilátek třídy IgE ze sér senzibilizovaných pacientů. Tyto protilátky budou použity k přípravě specifického imunosorbentu pro vyhledávání klinicky významných tzv. alergogenních epitopů komplexního alergenu. Příprava vakcín pro specifickou imunoterapii obsahujících pouze epitopy s alergogenním

potenciálem může významně snížit rizikost hyposenzibilizační léčby a tedy i zátěž pro pacienta.

Výběr metod pro účinnou izolaci IgE molekul byl volen podle nároků na čistotu a výtěžnost metody. K izolaci IgE ze sér senzibilizovaných pacientů byla použita metoda frakcionované precipitace, technika chromatografie na měničích iontů a metoda bioafinitní chromatografie a to buď pomocí lektinu Concanavalinu A nebo pomocí specifických anti-IgE protilátek. K přípravě specifických bioafinitních nosičů byly použity magnetické mikročástice SiMAG-active (Chemicell, Německo) a Estapor (Merck, Německo), podmínky vazby byly optimalizovány. Frakce IgE získané různými metodami, příp. jejich kombinací, byly porovnány, čistota a množství izolovaného IgE byly ověřovány technikami SDS-PAGE a ELISA.

Tato práce byla podpořena fondem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM 0021627502) a Grantovou agenturou ČR (grant GA ČR č. 203/05/0241).

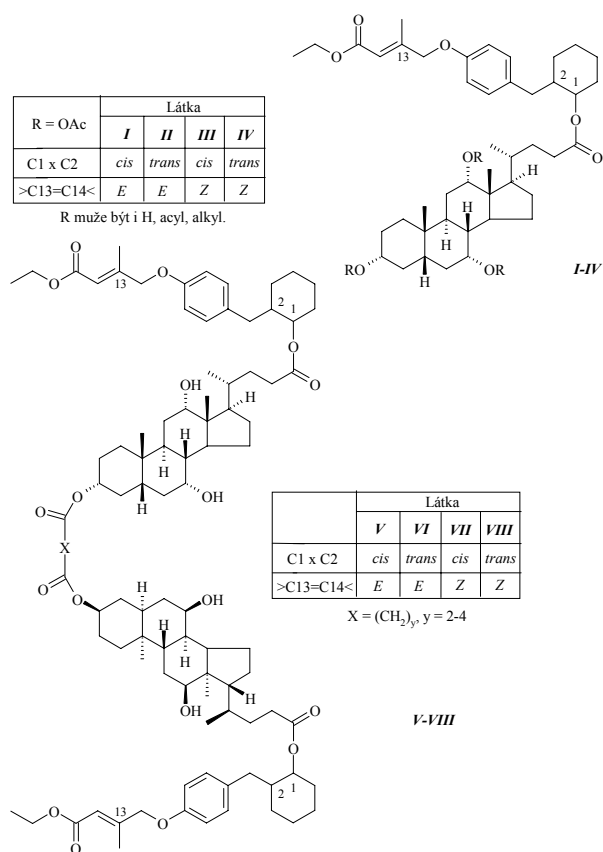
STEROIDNÍ SLOUČENINY JAKO NOSIČE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

**ONDŘEJ JURČEK^{a,b}, ZDENĚK WIMMER^b
a PAVEL DRAŠAR^a**

^a*Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT, Technická 5, 160 28 Praha 6; ^b ÚEB AV ČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4
ondrej.jurcek@vscht.cz*

Steroidní látky jsou běžně přítomny v tělech rostlin a živočichů. Jejich získávání je založeno především na izolaci z těchto přirozených přírodních zdrojů. Ekologickým a účinným způsobem jejich získávání je extrakce pomocí rozpouštědel za superkritických podmínek (např. CO₂ za superkritických podmínek), která je prováděna v naší laboratoři. Separované steroidní sloučeniny (fytosteroly a fytoekdysteroidy) mohou být dále používány pro syntézy supramolekulárních struktur. Naším hlavním cílem je syntetizovat takové steroidní sloučeniny, složené z jedné či více steroidních jednotek, které by byly schopny úspěšně vnést a postupně a pomalu uvolňovat biologicky aktivní látky v organismu.

Současným modelem je pro nás aplikace juvenoidů (bioanalogů juvenilních hormonů – biologicky aktivních a účinných látek vhodných k regulaci početnosti populací hmyzích škůdců) do těla vybraných škodlivých druhů hmyzu^{1,2}. Interakce mezi biologicky aktivní látkou a steroidní sloučeninou může být zajištěna jak vazebně, tak ne vazebně. Bylo připraveno několik prekursorů supramolekulárních struktur I-IV a několik steroidních sloučenin V-VIII s nejlépe výstižným anglickým označením *cleft type*, kde k interakci s juvenoidem dochází prostřednictvím esterové vazby. Sloučeniny byly poskytnuty pro biologické testování.



Za finanční podporu projektu 2B06024 (SUPRAFYT) a projektu MSM6046137305 děkujeme MŠMT ČR.

LITERATURA

- Wimmer Z., Rejzek M., Zarevúcka M., Kuldová J., Hrdý I., Němec V., Romaňuk M.: J. Chem. Ecol. 23, 605 (1997).
- Wimmer Z., Kuldová J., Hrdý I., Bennettová B.: Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 442 (2006).

FARMAKOGNOSTICKÁ STUDIE TAXONU *Helianthus annuus* L.

JANA KARLÍČKOVÁ^a, ZUZANA ŘEHÁKOVÁ^a,
KATEŘINA KUBÍKOVÁ^a, LUDEK JAHODÁŘ^a a
VLADIMÍR BUCHTA^b

^aKatedra farmaceutické botaniky a ekologie, ^bKatedra biologických a lékařských věd, FarmF, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
jana.karlickova@faf.cuni.cz

Při prováděném screeningu antifungální aktivity 50 druhů čeledi Asteraceae vykázal taxon *Helianthus annuus* L. v tomto *in vitro* testu signifikantní aktivitu¹. Na základě

pozitivního výsledku byla provedena analýza rostlinného materiálu a pilotní studie biologické aktivity.

Byla provedena macerace sušených listů vodou, následovalo vytřepání dichlormethanem, chloroformem a butanolem². Další část listové drogy byla sonikována 80% ethanolom. Byl proveden test na akutní toxicitu (Tubifex tubifex test), který využívá kroužkovce (nitěnky) a slouží nám jako doprovodný test pro zachycení zajímavého extraktu (bioassay-guided separace). Akutní toxicita byla stanovena u butanolového podílu (EC₅₀=0,0131 g/ml) a vodného podílu (EC₅₀=0,0724 g/ml). Protože butanolový podíl vykázal v tomto testu aktivitu, byl dále dělen na sloupci silikagelu, vzniklo 34 frakcí, které byly postupně spojovány na základě vyhodnocení výsledků tenkovrstvé chromatografie. Vzniklé spojené frakce (pojmenované HEA) byly testovány pomocí DPPH testu na antiradikálovou aktivitu. Pozitivní výsledek DPPH testu byl získán u těchto frakcí HEA: HEA 6-8 (EC₅₀=0,213 mg/ml), HEA 25-28 (EC₅₀=0,132 mg/ml), HEA 29 (EC₅₀=0,353 mg/ml), HEA 30 (EC₅₀=0,153 mg/ml). U těchto frakcí s pozitivním výsledkem v DPPH testu byla použita i jiná metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) pro stanovení antiradikálové aktivity. Pouze frakce 6-8 vykázala po 4 min 7x nižší aktivitu než standard Trolox v tomto *in vitro* testu.

Dále byl zpracováván i chloroformový podíl, byl dělen na Sephadexovém sloupci a získány 3 frakce (frakce 1, frakce 2, frakce 3). Všechny frakce byly podrobeny DPPH testu a pozitivní svým výsledkem byla frakce 2 (EC₅₀=0,41mg/ml) a frakce 3 (EC₅₀=0,118mg/ml), u nich byla provedena i metoda FRAP – pouze u frakce 3 byla naměřena aktivita po 4 min 6x nižší než u standardu³.

Antifungální aktivita byla provedena u ethanolového extraktu, dichlormethanového a butanolového podílu, frakcí HEA 20-21, HEA 20-24, HEA 29 pomocí Mikrodituční bujónové metody v destičkách na 8 kmenech (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigellii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*). U ethanolového extraktu byla aktivita prokázána u všech testovaných kmenů hub, u butanolového podílu pouze u *Trichophyton mentagrophytes*. Ethanolový extrakt bude dále zpracováván a testován na antiradikálovou a fototoxickou aktivitu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GAUK 118/2006/B BIO.

LITERATURA

- Jahodar L., Buchta V., Ryglova H., Jun D., Opletal L.: 3rd International Symposium of Natural Drugs Proceedings (Borrelli F, ed.), Naples, 2-4 October 2003, str. 249 (Plenary Lecture).
- Macías, A.F., Molinillo, J.M.G., Torres, A.: Phytochemistry 45, 683 (1997).
- Řeháková Z., Karlíčková J., Jahodář L., Kubíková K., Brojerová E., Kolečkář V., Opletal L.: Book of Abstracts Joint Meeting 2006, October 4-7, Marburg (bez editora), str. 107.

AUTOKRINNÝ A PARAKRINNÝ MECHANISMUS ÚČINKU VEGF U ASTROGLIÁLNYCH NÁDOROV

**PETRA KNÍŽETOVÁ^a, ALICE HLOBILKOVÁ,
MONIKA LÉVKOVÁ a ZDENĚK KOLÁŘ**

Ústav patológie, Lekárska fakulta, Univerzita Palackého,
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
knizetko@yahoo.com

Angiogenéza je dôležitým procesom v progresii nádoru. Vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF) je multifunkčným cytokínom zodpovedným za angiogenézu, vaskulárnu permeabilitu, a hyperkoagulabilitu u viacerých typov nádorov. VEGF pôsobí prostredníctvom dvoch receptorov Flt-1 a KDR (VEGFR1 a VEGFR2), exprimovaných na povrchu cievného endotelu, pričom transdukcia signálu prebieha prostredníctvom PI3K/Akt/PKB, PLC γ /PKC a MAPK signálnych dráh. Následne po prenose signálu dochádza k proliferácii, migrácii endoteliálnych buniek, či indukcii ich permeability.

Spomedzi nádorov centrálného nervového systému sú najpočetnejšími nádory astrogliálneho pôvodu. Doba prežívania pacientov s nádormi označovanými ako „high grade“ je niekoľko mesiacov s maximom do dvoch rokov. Tieto nádory sa vyznačujú zvýšenou proliferáciou, hypervaskularizáciou, výraznou angiogenézou, a tvorbou fokálnych nekroz. Viaceré štúdie poukazujú na úlohu VEGF v patofyziológii astrogliálnych nádorov v zmysle jeho parakrinného pôsobenia na nádorové cievné elementy. Jeho zvýšená expresia signifikantne koreluje so zvýšenou progresiou nádoru. Napriek faktu, že bola dokázaná expresia VEGF receptorov aj na úrovni gliálnych elementov nádoru, neexistuje detailná štúdia zaoberajúca sa priebehom intracelulárnej signalizácie VEGF v zmysle jeho autokrinného pôsobenia.

V našej práci sme sa zaoberali účinkom VEGF na proliferáciu, motilitu a migráciu astrogliálnych nádorových línií, ako aj priebehom signálnej dráhy VEGF na intracelulárnej úrovni. Podarilo sa nám dokázať koexpresiu VEGF a VEGFR1/2 u všetkých nami testovaných astrogliálnych nádorových línií. Tento dôkaz bol nevyhnutným predpokladom pre potvrdenie autokrinného pôsobenia VEGF. MTT proliferačný test potvrdil mitogénny účinok VEGF a už po piatich minútach pôsobenia indukoval tvorbu „stress fibers“, čo jednoznačne poukazuje na zvýšenú motilitu buniek. Reorganizácia aktínového cytoskeletu prebiehala v smere migrácie buniek. Na intracelulárnej úrovni dochádzalo po aplikácii VEGF k masívnej fosforylácii ERK1/2Thr202/Tyr204. Vzhľadom na koaktiváciu signálnych dráh PI3K/Akt/PKB, Ras/c-Raf a PLC γ /PKC u endotelu vplyvom VEGF, sme stanovili hladinu fosforylovaných foriem AktSer473, PLC γ Tyr783. Miera fosforylácie AktSer473 a PLC γ Tyr783 nebola signifikantne zvýšená. Súčasná aplikácia VEGF a c-Raf inhibítora (GW5074) potlačila jeho stimulačný účinok. Pri súčasnom pôsobení VEGF v kombinácii s inhibítorom PI3K (wortmannin) a inhibítorom PLC γ (U73122), nedochádzalo k potlačeniu VEGF závislej aktivity ERK1/2Thr202/Tyr204.

Vyššie uvedené výsledky poskytujú nový náhľad na úlohu VEGF ako auto/ parakrinného regulátora progresie astrogliálnych nádorov stimuláciou proliferácie a motility nádorových buniek na strane jednej, stimuláciou nádorovej angiogenézy na strane druhej.

Táto práca bola financovaná grantom IGAMZCRNR/7828-3 a MSM6198959216.

NEURÁLNI DIFERENCIACE EMBRYONÁLNYCH NÁDOROVÝCH BUNĚK P19 JE OVLIVNĚNA ZMĚNOU INTRACELULÁRNÍHO REDOXNÍHO STAVU

ROMAN KONOPKA^{ab}, JIŘÍ PACHERNIK^b, ANTONÍN LOJEK^a a LUKÁŠ KUBALA^a

^aBiofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno;
^bPřírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Pluripotenti embryonální kmenové buňky a embryonální nádorové buňky (EC) je možné *in vitro* diferenciovat do různých buněčných typů. Bezsérové prostředí indukuje v EC buňkách neurální diferenciaci, proces který je umocněn působením kyseliny retinové. Předpokládá se, že signální dráhy aktivované během neurální diferenciaci, jsou senzitivní na intracelulární redoxní stav daný rovnováhou mezi intracelulárně produkovanými reaktivními metabolity kyslíku (RMK) a hladinou intracelulárních antioxidantů. Proto byla sledována možnost ovlivnění neurální diferenciaci EC buněk *in vitro* modulací intracelulárního redoxního stavu. EC buňky P19 byly ovlivněny antioxidanty glutationem, N-acetyl cysteinem, kyselinou askorbovou a inhibitory enzymů podílejících se na intracelulární produkci RMK difenyl jodidem a apocyninem. Neurální diferenciaci byla sledována na základě změny exprese proteinů charakteristických pro pluripotenti nebo nervové buňky po dobu 1-4 dnů. Testované antioxidanty snižovaly expresi Oct-4 (znak pluripotence) a E-cadherinu (znak buněk odlišných od neurálních) a zároveň zvyšovaly expresi N-cadherinu (znak neurálních buněk) oproti neovlivněným buňkám. Vybrané antioxidanty tedy urychlovaly diferenciaci buněčné linie P19 do neurálních buněk. Naše výsledky potvrdily význam redoxního stavu buňky v regulaci buněčné diferenciaci u pluripotenti buněk P19.

DEFENCE RESPONSE OF *Brassica napus* AGAINST PATHOGEN *Leptosphaeria maculans* - COMPATIBLE AND INCOMPATIBLE INTERACTION

**BARBORA KORBELOVÁ^{ab}, VLADIMÍR ŠAŠEK^a,
LENKA BURKETOVÁ^a and OLGA VALENTOVÁ^b**

^aInstitute of Experimental Botany, AS CR, Na Karlovce 1a, 160 00 Prague 6; ^bDepartment of Biochemistry and Microbiology, ICT Prague, Technická 3, 160 28 Prague 6
korbelova@ueb.cas.cz

The subject of this research is a study of defence response of *Brassica napus* against fungal pathogen *Leptosphaeria maculans* using microscopy, spectrophotometry and molecular biology methods. The fungus *Leptosphaeria maculans* (Desm.) represents the most serious disease, causing so-called “blackleg disease” of oilseed rape and canola. This threatening disease is spread worldwide, including the Czech Republic, where causes significant yield losses. Two isolates of *L. maculans* (virulent and avirulent) are used in this research.

During the defence response to the pathogen the plants produce callose which is detected by spectrofluorometry and microscopy methods using aniline blue. Callose accumulation is increased during defence response *B. napus* against *L. maculans* and differs in compatible and incompatible interaction. Reactive oxygen species, esp. hydrogen peroxide, is another of the defence response change. Determination of hydrogen peroxide is done using xylenol orange *in vitro* and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) *in situ*. Accumulation speed of hydrogen peroxide is different in using virulent and avirulent isolates in case avirulent isolate accumulation is speedier. DAB staining shows hydrogen peroxide accumulation near *L. maculans* hyphae. The antioxidant enzyme activity is measured by spectrophotometry method using product increasing or substrate decreasing. Increasing of guaiacol dependent peroxidase activity is significant using avirulent isolate *L. maculans*. The infect plants induce pathogenesis-related proteins. This induction is studied by PR genes expression using RT-PCR. The gene expression is higher in infect plant than control plant.

Acquired results purvey knowledge of defence response of *B. napus* to *L. maculans* compatible and incompatible interaction.

Supported by grants MŠMT KONTAKT CZ-4 a MŠMT IP05ME825, MŠMT MD_45_2, and GAČR 522/03/0353.

ZMĚNA ENANTIOSELEKTIVITY A SUBSTRÁTOVÉ SPECIFITY HALOGENALKANDEHALOGENASY PROTEINOVÝM INŽENÝRSTVÍM

TÁŇA KOUDELÁKOVÁ^a, ZBYNĚK PROKOP^a, YUKARI SATO^b, MARTA MONINCOVÁ^a, ANDREA JESENSKÁ^a, LUCIE GRODECKÁ^a, TOSHYIA SENDA^c, YUJI NAGATA^b a JIŘÍ DAMBORSKÝ^a

^aLoschmidtovy laboratoře, Masarykova univerzita, Brno;

^bDepartment of Life Sciences, Tohoku University, Sendai, Japonsko; ^cNational Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokio, Japonsko
jiri@chemi.muni.cz; <http://loschmidt.chemi.muni.cz/peg/>

Objev enantioselektivity u halogenalkandehalogenas (EC 3.8.1.5) umožnil využití enzymů této proteinové rodiny k výrobě některých alkoholů s vysokou optickou čistotou. Opticky čisté alkoholy mohou být využívány jako prekurzory léčiv, agrochemikálií nebo potravinářských aditiv. Opticky čisté

alkoholy lze připravit pomocí dehalogenas enantioselektivní hydrolyzou racemických směsí halogenovaných sloučenin. Jedinečná enantioselektivita vůči různým druhům substrátů byla prokázána u halogenalkandehalogenasy DbjA izolované z bakterie *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Cílem tohoto projektu bylo rozšířit enantioselektivitu DbjA na jiné enzymy z rodiny halogenalkandehalogenas metodami proteinového inženýrství. Pro úpravu místně řízenou mutagenézí byla vybrána dehalogenasa DhaA z bakterie *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064, která se DbjA nejvíce strukturálně podobá.

Hlavní rozdíl mezi DhaA a DbjA spočívá v přítomnosti inserce ₁₃₉HHTEVAEEQDH₁₄₉ vložené mezi hlavní a víčkovou doménou DbjA. Kódující sekvence byla vnesena do genu *dhaA* pomocí inverzní polymerasové řetězové reakce. Dále bylo v DhaA zrekonstruováno aktivní místo DbjA kumulativní místně řízenou mutagenézí. Substitucemi v místě 8 aminokyselin (W141F, P142A, F144A, G171R, A172V, K175G, C176G a V245A) vzniklo 6 nových rekombinantních genů, které byly heterologně exprimovány v bakterii *Escherichia coli* BL21 (DE3). Čisté proteiny byly získány afinitní chromatografií. Sekundární struktura proteinů byla ověřena měřením cirkulárního dichroismu. Dehalogenasová aktivita mutantních proteinů vůči 1,3-dibrompropanu a jejich enantioselektivita se sadou β-substituovaných alifatických bromalkanů a jedním β-halogenovaným esterem byly testovány plynovou chromatografií. Finální mutantní enzym byl testován spolu s DhaA a DbjA na substrátovou specifitu se sadou 30 substrátů s cílem porozumět změnám vneseným do aktivního místa mutacemi.

Všechny proteiny byly produkovány v rozpustné formě. Měření cirkulárního dichroismu ukázalo, že dva proteiny nejsou poskládané. Toto pozorování bylo v souladu se zjištěním, že ze šesti mutantních proteinů byly jen čtyři aktivní vůči 1,3-dibrompropanu. Finální kumulativní mutant vykazoval specifickou aktivitu srovnatelnou s přirozeným enzymem DhaA. Všechny aktivní proteiny byly testovány na enantioselektivitu. Inserce unikátní sekvence spolu se změnami aktivního místa sice nevedla ke zvýšení enantioselektivity s 2-brompentanem, částečně však zvýšila enantioselektivitu s 2-bromhexanem a 2-bromheptanem a významně zlepšila enantioselektivitu vůči ethyl-2-brompropionátu (E-hodnota se zvýšila ze 72 na >200). Finální mutantní enzym též vykazoval pozměněnou substrátovou specifitu, která se lišila jak od DhaA, tak od DbjA. Finální mutantní protein byl výrazně aktivnější vůči 1,2-dibromethanu, 1-brom-2-chlorethanu a 4-brombutyronitrilu než oba výchozí enzymy.

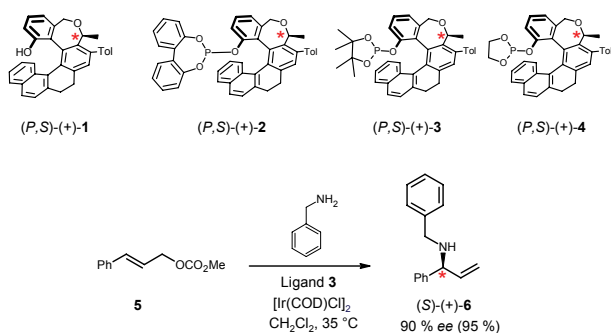
PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ FOSFITŮ ODVOZENÝCH Z HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH LÁTEK

ZUZANA KRAUSOVÁ^a, PETR SEHNAL^a, IRENA G. STARÁ^{a,*}, IVO STARÝ^{a,*}, DAVID ŠAMAN^a a PETER EILBRACHT^b

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^bOrganische Chemie, Fb 3, Dortmund University, Otto-Hahn-Str. 6, D-44221 Dortmund, Germany
alex@uochb.cas.cz

Využití inherentně chirálních helicenů v asymetrické katalýze je dosud minimální, ačkoliv by robustní helikální ligandy mohly být účinnými induktory chiralit. Námi vyvinutý obecný způsob přípravy helikálně chirálních látek, který je založen na intramolekulární [2+2+2] cykloizomeraci aromatických triynů za katalýzy¹ kobaltem(I) či niklem(0), umožňuje připravit tyto látky v preparativním měřítku². Takto byl připraven analog [6]helicenu **1** v opticky čisté formě.

Látky **2** až **4** byly připraveny reakcí helicenu **1** s příslušnými fosforochloriditými v přítomnosti hydridu sodného v THF. Vzniklé fosfity byly využity jako chirální ligandy při enantioselektivní allylové aminaci. Nadějně výsledky byly dosaženy s ligandem **3**, kdy reakcí látky **5** s benzylaminem za katalýzy komplexem iridia(I) vzniká produkt **6** v 95% výtěžku a 90% enantiomerním nadbytku.



Podporováno Grantovou agenturou ČR (reg. č. 203/07/1664), Ministerstvem průmyslu a obchodu/Zentiva (reg. č. FI-IM/073), a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumné centrum: Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg. č. LC05A57).

LITERATURA

- (a) Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Rulišek L., Fiedler P.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9175 (2002). (b) Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Vyskočil Š., Fiedler P.: *J. Org. Chem.* **68**, 5193 (2003).
- Stará I. G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšínský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* **13**, 2547 (2005).

ENZYMOVÉ SYSTÉMY BAKTERIE *Comamonas testosteroni* PARTICIPUJÍCÍ NA PRVÉ FÁZI BIODEGRADACE FENOLU

V. KREMLÁČKOVÁ^a, M. TUREK^a, J. PÁČA Jr.^a, J. PÁČA^b a M. STIBOROVÁ^a

^aKatedra biochemie, PřF UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^bÚstav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6 verukremla@centrum.cz

Bakterie *Comamonas testosteroni* je významným primárním degradérem fenolu. Je schopna využít fenolické látky jako jediný zdroj energie a uhlíku pro svůj růst. Tato schopnost biodegradace fenolických polutantů může být uplatněna při biologických dekontaminacích znečištěného životního prostředí. První a současně limitující reakcí aerobní degradace fenolu je hydroxylace na catechol. Za tento krok je zodpovědná především NADPH-dependentní fenolhydroxylasa (EC 1.14.13.7). Catechol je u prokaryot následně štěpen katechol-2,3-dioxygenasou (EC 1.13.11.2) na semialdehyd kyseliny 2-hydroxymukonové (META dráha), který se dále metabolizuje až na pyruvát. Tento konečný produkt buňky začleňují do svého intermediárního metabolismu. V předkládané studii dokumentujeme, že je NADPH-dependentní fenolhydroxylasa, primární enzym biodegradace fenolu, exprimována v *C. testosteroni*, konkrétně v cytoplasmě studované bakterie. Výsledky experimentů signalizují, že NADPH-dependentní fenolhydroxylasa je tímto mikroorganismem exkretována do vnějšího prostředí (růstového média), ve kterém je aktivní. Výše uvedená flavinová monooxygenasa byla částečně purifikována (frakční precipitace polyethylenglykolem 6000, gelová permeační chromatografie na sloupci Sepharosy-4B) s výtěžkem 0,15 % z celkové aktivity enzymu. Získaný enzym byl charakterizován z hlediska kinetiky degradace fenolu a byla stanovena jeho molekulová hmotnost. Jedná se o protein složený ze čtyř podjednotek o celkové molekulové hmotnosti ~240 kDa. Předkládaná práce je pilotní studií, ve které byla NADPH-dependentní fenolhydroxylasa z *C. testosteroni* poprvé purifikována. Významná je též charakterizace enzymu, která přispívá k návrhu a optimalizaci biologického složení bioreaktorů používaných pro degradaci fenolů z odpadních vod.

Finančně podporováno GAČR (grant 303/05/2195 a 104/04/0686).

MYELOPEROXIDASA SE VÁŽE NA EXTRACELULÁRNÍ MATRIX V ZÁVISLOSTI NA GLYKOSAMINOGLYKANECH

LUKÁŠ KUBALA^a, STEPHAN BALDUS^b, ANTONÍN LOJEK^a a JASON P. EISERICH^c

^aBiofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; ^bDepartment of Cardiology, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany 20246; ^cDept of Internal Medicine, Dept of Physiology and Membrane Biology, School of Medicine, University of California, Davis, CA USA

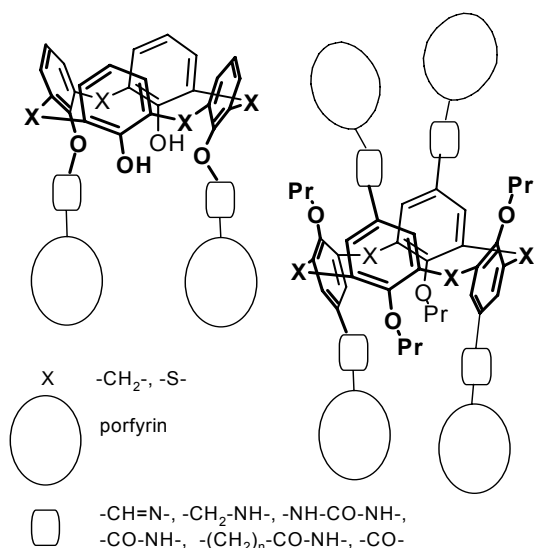
Myeloperoxidasa je enzym hojně exprimovaný v neutrofilních granulocytech hrající významnou roli v akutních a chronických zánětlivých chorobách. Během zánětlivé reakce je myeloperoxidasa uvolňována aktivovanými neutrofilními granulocyty do krve, váže se na endoteliální výstelku, prochází endotelem a je ukládána do subendoteliálního prostoru. Avšak mechanismus ukládání myeloperoxidasy a ovlivnění její enzymatické aktivity není známo. Proto byla sledována modulace vazby myeloperoxidasy na

extracelulární matrix a její komponenty. Dále byla sledována modulace enzymatické aktivity myeloperoxidasy v přítomnosti složek extracelulární matrix. Bylo prokázáno, že myeloperoxidasa se váže jak na izolovanou extracelulární matrix, tak na její složky, purifikovaný fibronektin a kolagen. Vazba myeloperoxidasy byla závislá na přítomnosti glykosaminoglykanů, testovaného heparinu a chondroitinu. Nadbytek heparinu a chondroitinu blokoval vazbu myeloperoxidasy na extracelulární matrix. Myeloperoxidasa v přítomnosti fibronektinu a kolagenu vykazovala mírně zvýšenou enzymatickou aktivitu oxidace a chlorinace modelových substrátů. Celkově získané výsledky prokázaly vazbu myeloperoxidasy na extracelulární matrix závislou na glykosaminoglykanech a enzymatickou aktivitu navázané myeloperoxidasy.

NOVÉ (THIA)CALIXAREN-PORFYRINOVÉ RECEPTORY PRO KOMPLEXACI FULLERENŮ

ONDŘEJ KUNDRÁT, JAN BUDKA, IVAN STIBOR a PAVEL LHOTÁK

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



Receptory vzniklé spojením (thia)calix[4]arenu s porfyrinovými jednotkami prostřednictvím vhodného můstku, známé též jako molekulární pinzety, jsou v poslední době významnou skupinou látek schopných komplexovat fullereny C₆₀ a C₇₀. Porfyrinová část interaguje s fullerénem, zatímco (thia)calixarenový skelet slouží jako vhodné molekulové lešení. Ukazuje se, že míru asociace lze ovlivnit různými způsoby, a to např. volbou rozpouštědla (benzen vs. toluen), nebo derivatizací porfyrinové části (elektronově bohaté vs. elektronově chudé, příp. žádné substituenty). Tvorba komplexu závisí taktéž na použitém calixarenu

(calixaren vs. thiacalixaren), na místě spojení obou jednotek (horní vs. dolní okraj calixarenu), na počtu připojených porfyrinových jednotek k (thia)calixarenu a v neposlední řadě na výběru vhodné spojky (iminová, aminová, amidová, močovinná, etherická, esterová funkce). Vhodnou kombinací jednotlivých možností bylo dosaženo i vysoké selektivity komplexace C₇₀/C₆₀, která bude využita pro dělení směsí fullerénů.

LITERATURA

1. Lhoták P.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1675.
2. Dudič M., Lhoták P., Stibor I., Petříčková H., Lang K.: New J. Chem. 28, 85 (2004).
3. Hosseini A., Taylor S., Accorsi G., Armaroli N., Reed C. A., Boyd P. D. W.: J. Am. Chem. Soc. 128, 15903 (2006).
4. Káš M., Lang K., Stibor I., Lhoták P.: Tetrahedron Lett. 48, 477 (2007).
5. Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori N., Miyano S.: Chem. Rev. 106, 5291 (2006).

APOPTÓZA NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ V PRŮBĚHU AKUTNÍHO ZÁNĚTU

TEREZA LANGROVÁ^{a,b}, ZBYŠEK SLÁDEK^{a,b} a DUŠAN RYŠÁNEK^b

^aÚstav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno, ^bOddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32, Brno
xlangrov@node.mendelu.cz

Apoptóza neutrofilů a následná fagocytóza apoptotických neutrofilů makrofágy jsou důležité pro úspěšné ukončení reakcí akutního zánětu mléčné žlázy. Apoptóza je charakterizována specifickými biochemickými kroky, které ji odlišují od nekrózy. Jedním z nich je translokace fosfatidylserinu (PS) z vnitřní na vnější vrstvu cytoplazmatické membrány buňky, která podstupuje apoptózu. Detekce raného stádia apoptózy se provádí pomocí fluorescein-konjugovaného Annexinu V, který má přirozenou afinitu k PS. Váže se s translokovaným PS a tím umožňuje detekci apoptotických buněk.

Cílem této studie bylo zjistit změny v podílu apoptotických neutrofilních granulocytů v průběhu rezoluce zánětlivé reakce mléčné žlázy skotu. Zánětlivá reakce byla indukována komponenty buněčné stěny G⁺ bakterií (muramylidipeptid-MDP) a G⁻ bakterií (lipopolysacharid-LPS), jako inertní induktor byl použit PBS.

Průběh zánětlivé reakce po indukci byl sledován ve čtyřech časových bodech - 24 h a 48 h (iniciace zánětlivé reakce), 72 h a 168 h (rezoluce zánětlivé reakce). Průtokovou cytometrií byl zjištěn celkový počet buněk, podíl neutrofilních granulocytů (neutrofilů), podíl apoptotických a nekrotických neutrofilů. Průběh zánětlivé reakce se lišil v závislosti na použitém induktoru. Po indukci PBS bylo zjištěno výrazné zvýšení apoptotických neutrofilů během iniciace zánětlivé reakce, během rezoluce pak snižování podílu apoptotických neutrofilů. Po indukci MDP a LPS byl

průběh zánětlivé reakce charakteristický pozvolným nárůstem podílu apoptotických neutrofilů, zánětlivá reakce měla tedy delší dobu trvání.

Z výsledků studie je zřejmé, že bakteriální toxiny, MDP a LPS, výrazně prodlužují dobu trvání akutního zánětu. Zdraví mléčné žlázy závisí na rychlém odstranění apoptotických neutrofilů makrofágy a návratu postižené tkáně do původního stavu. Proto by látky modulující apoptózu neměly být opomíjeny při studiu zánětlivé reakce organismu.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE 0002716201.

PREPARATION OF WELL DEFINED SILICA NANOPARTICLES AND THEIR ENCAPSULATION VIA *IN-SITU* EMULSION/MINIEMULSION POLYMERIZATION

MARIÁN LEHOCKÝ

*Institute of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Nad Stráněmi 4511, 760 05 Zlín
lehocky@post.cz*

The importance and advantages of monodispersed nanometer-sized particles were shown not only in the scientific field, but also in various industrial applications, e.g. catalysts, pigments, pharmacy, etc. Of these particles, SiO₂ nanoparticles are used to make electronic substrates, thin film substrates, electrical insulators, thermal insulators humidity sensors, etc. The properties of amorphous silica of high specific surface area, from the smallest colloidal particles to macroscopic gels, depend largely on the chemistry of the surface of the solid phase. This is of practical importance in the technology of cracking catalysts, mineral processing, ceramics and adsorbents. It is also directly involved in the manufacture and use of siliceous fillers and thickening agents in organic systems including paints, inks, elastomers, and lubricating greases. Within the last decade, a much clearer picture of the nature of siliceous surfaces has been obtained, and new products based on chemical modifications of these surfaces have been developed. Nevertheless, the knowledge of chemical functionalities on the silica nanoparticle surfaces is still poor and has not been fully described.

The prepared/commercial silica nanoparticles were modified and encapsulated by in situ emulsion/miniemulsion polymerization of poly(styrene) in order to obtain hybrid organic/inorganic nanocomposites. The innovation of this process is made by use of SPM as a co-surfactant during the polymerization.

In this work, the chemical surface composition, wettability, porosity, and thermal properties, of silica nanoparticles were investigated prior to the preparation of the nanocomposites. The characterization during different stages of process such as nanoparticles activation, surface modification, and encapsulation with polystyrene was accessed by FT-IR spectroscopy, TEM and SEM.

ACTIVATION OF CASPASE-12 IN LYTIC OR APOPTOTIC CELLS INFECTED BY VACCINIA VIRUS RECOMBINANTS

JANA LIŠKOVÁ, MARTINA SPIŠÁKOVÁ, MARIE KALBÁČOVÁ, and ZORA MĚLKOVÁ

*Institute of Immunology and Microbiology, 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic
janefox@biolog.cz*

Vaccinia virus (VV) infection of most cell types induces a lysis of the cell that is considered equivalent to necrosis. However, we have previously observed that VV infection of two epithelial cell lines, HeLa G and BSC-40, increased activation and activity of caspases, compared to mock-infected cells. Despite of the lytic character of infection, these effects were prevented by simultaneous expression of Bcl-2 by VV. Expression of Bcl-2 decreased also cleavage of a death substrate cytokeratin-18 in HeLa G cells, while it increased its levels in BSC-40 cells as it induced their apoptosis by an unknown mechanism. We have further observed that expression of Bcl-2 by VV induced changes in levels of free calcium in cytoplasm as well as in organelles. Therefore, we have focused on activation of caspase-12 and the role of calpain during VV infection and in Bcl-2-induced apoptosis.

We infected several cell lines with recombinant vaccinia viruses expressing Bcl-2 or control genes luciferase or chloramphenicol acetyltransferase (CAT) in the presence or absence of two different inhibitors of calpain (calpain inhibitor V and calpastatin peptide). Then we analyzed the samples by western blotting using antibodies against caspase-12, several death substrates as well as against spectrin alpha-II, a specific substrate of calpain.

Our results show that pro-caspase-12 is cleaved into a fragment corresponding to the size of an active caspase-12 during VV infection in BSC-40, HeLa G and 143TK(-) cells. Simultaneously, the cleavage of spectrin alpha-II was observed in VV infected cells. Inhibition of calpain activity by calpastatin peptide or calpain inhibitor V (0.2 and 2 μM) somewhat increased levels of active caspase-12 and decreased cleavage of spectrin alpha-II. The effects of calpain inhibitors on levels of other death substrates like PARP or cytokeratin-18 are currently being analyzed.

SYNTÉZA A VLASTNOSTI RACEMICKÝCH A OPTICKY ČISTÝCH AZAHELICENŮ

JIŘÍ MÍŠEK^a, FILIP TEPLÝ^a, IRENA G. STARÁ^{a*}, MILOŠ TICHÝ^a, DAVID ŠAMAN^a, IVANA CÍSAŘOVÁ^b a IVO STARÝ^{a*}

^aÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6. ^aKatedra anorganické chemie, Karlova Univerzita, Albertov 2030, 128 40 Praha 2
misek@uochb.cas.cz

Azaheliceny jsou helikálně chirální sloučeniny, skládající se z *ortho*-anelovaných benzenových a pyridinových kruhů. Jejich unikátní topologie a elektronické vlastnosti by mohly vést k řadě aplikací v enantioselektivní katalýze, molekulární elektronice, chirálním rozpoznávání apod. Dosud však chybí jednoduchá a obecná metoda přípravy azahelicenů¹. Z těchto důvodů jsme vyvinuli novou metodu syntézy azahelicenů, která je založena na [2+2+2] cyklotrimerizaci², vychází z jednoduchých stavebních bloků a umožňuje připravit řadu jinak nedostupných izomerů. Příkladem je syntéza 1-aza[6]helicenu 4 (Schéma 1).

Konfiguračně stabilní hexacyklické deriváty byly rozštěpeny na enantiomery a byla určena jejich racemizací bariéra. Schopnost koordinovat přechodné kovy byla demonstrována přípravou stříbrných komplexů, jejichž struktura byla potvrzena rentgenostrukturní analýzou (např. komplex (*P,P*)-5 viz. Obr. 1.). Dále byla zjištěna vysoká protonová afinita u většiny připravených sloučenin.

Další komplexační studie, měření bazicit v roztoku a použití opticky aktivních azahelicenových derivátů v asymetrické katalýze bude dále zkoumáno.

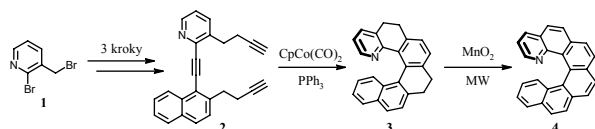
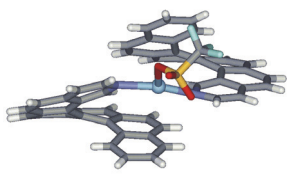


Schéma 1.



Obr. 1.

Podporováno Grantovou agenturou ČR (reg. č. 203/07/1664), Ministerstvem průmyslu a obchodu/Zentiva (reg. č. FI-IM/073) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumné centrum: Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, LC05A57).

LITERATURA

1. Urbano A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3986 (2003).
2. Stará I. G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšínský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* 13, 2547 (2005).

DEGRADACE PCB V ROSTLINNÝCH BUŇKÁCH

**JITKA NAJMANOVÁ^{a,b}, MARTINA MACKOVÁ^{a,b},
TOMÁŠ MACEK^{c,b,a} a LUCIE KOCHÁNKOVÁ^c**

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV

ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^cÚstav chemie ochrany prostředí, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
najmanoj@vscht.cz

Metabolismus xenobiotik u rostlin lze obecně dělit do třech fází. Aktivační (1. fáze), zahrnuje procesy oxidace, redukce nebo hydrolyzy xenobiotika. Této fáze se účastní několik enzymových systémů, jsou to hlavně systémy monooxygenas (oxidas) s cytochromem P-450 jako terminální oxidasou a peroxidasy. Ve druhé fázi (konjugační) se reaktivní skupiny xenobiotik spojují s funkčními skupinami endogenních molekul (např. sacharidy, glutathion, aminokyseliny) za účasti transferas. Ve 3. fázi jsou rozpustné nefytotoxické konjugáty ukládány do vakuol. Funkce a mechanismus působení rostlinných enzymů při transformaci xenobiotik však nejsou doposud zcela dostatečně prostudovány. Peroxidasy hrají důležitou roli v celém metabolismu rostliny, kde se účastní řady fyziologických funkcí¹.

S cílem objasnit funkci rostlinných peroxidas různých druhů při transformaci polychlorovaných bifenyly byly izolovány surové buněčné extrakty z *Nicotiana tabacum* (tabák virginský), *Armoracia rusticana* (křen selský) a *Solanum nigrum* (lilek černý). Surové enzymové extrakty byly částečně purifikovány síranem amonným do 20–80 % nasycení a následně odsoleny. Preparáty kultur *Solanum nigrum* a *Nicotiana tabacum* byly použity pro reakce *in vitro* s individuálními kongenery polychlorovaných bifenyly. Účinnost přeměny se u obou rostlinných druhů lišila, zároveň se projevila různá účinnost přeměny vůči strukturně odlišným kongenerům. Nejvyšší konverze byla u obou dvou druhů analyzována u 4-chlorbifenyly (PCB3), téměř 80 % původní koncentrace (10 μmol/l). Dihydroxy-2,5- dichlorbifenylyl byl identifikován metodou GC-MS jako produkt reakce peroxidasy kultury *Nicotiana tabacum* s 2,5-dichlorbifenyly (PCB9). Naproti tomu produkty reakce peroxidasy kultury *Solanum nigrum* se stejnou sloučeninou byly 2-chlorbifenylyl, trichlorbifenyly a hydroxybenzoové kyseliny.

Během kultivace tkáňové kultury *Nicotiana tabacum* s polychlorovanými bifenyly byly po nativní elektroforese pozorovány změny v isoenzymovém složení peroxidasy. Některé isoenzymy byly přítomností PCB inhibovány, u některých se naopak aktivita zvýšila. Specifická aktivita peroxidasy v 10. dnu kultivace s PCB byla sedmkrát vyšší než u kontroly (bez PCB).

Při kultivaci kultury *Nicotiana tabacum* s PCB-9 v přítomnosti inhibitoru peroxidas, propylgalátu, byla degradace PCB-9 méně účinná (o 10 %) než bez inhibitoru. Dvě separované isoenzymové frakce kultury *Nicotiana tabacum* prokázaly stejnou účinnost transformace PCB-3.

Tato studie ukázala, že rostlinné peroxidasy jsou schopné metabolizovat PCB na hydroxylované deriváty polychlorovaných bifenyly.

Autoři děkují grantové podpoře MSMT IP05745ME a MSMT Centrum IM06030.

LITERATURA

1. Sandermann H.: *Pharmacogenetics* 4, 225 (1994).

**PROTEIN p53 ZASTAVUJE PROLIFERACI
A INDUKUJE DIFERENCIACI v-MYB
TRANSFORMOVANÝCH MONOBLASTŮ**

**JARMILA NAVRÁTILOVÁ^a, VIKTOR HORVÁTH^b,
ALOIS KOZUBÍK^{a,b}, ANTONÍN LOJEK^{a,b}
a JAN ŠMARDA^a**

^aÚstav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU,
Kotlářská 2, 611 37 Brno; ^bBiofyzikální ústav AV ČR,
Královopolská 135, 612 65 Brno
smarda@sci.muni.cz

Protein p53 je transkripční faktor známý pro svůj zásadní vliv na regulaci buněčné proliferace, programované buněčné smrti a diferenciace. V této práci jsme exprimovali exogenní p53 v buňkách linie ptačích monoblastů BM2 transformovaných onkogenem *v-myb* viru ptačí myeloblastózy (AMV). Prokázali jsme, že buňky BM2 produkují mutantní endogenní protein p53. Protože mutantní formy p53 mohou tvořit s p53 wt neaktivní tetramery a působit tak jako dominantně negativní inhibitory funkce p53 wt¹, exprimovali jsme v buňkách BM2 cDNA kódující lidský protein p53. Tento protein se na mutantní kuřecí protein p53 neváže a tetramery s ním netvoří².

Ukázali jsme, že i přes velmi nízkou sekvenční homologii ptačího a lidského proteinu p53 (53 %) je lidský protein p53 v buňkách BM2 funkční: zastavil proliferaci BM2 ve fázi G2 buněčného cyklu a mírně snížil jejich viabilitu (20 %). Buňky exprimující p53 také vykazovaly zvýšenou produkci reaktivních kyslíkových radikálů, což jsme prokázali NBT testem a testem chemiluminiscence, zvýšenou aktivitu nespecifických esteras, sníženou intracelulární pH a změny exprese povrchových markerů. Všechny tyto znaky svědčí pro to, že lidský p53 vyvolal diferenciaci monoblastů BM2 do stadia monocytů. Zatímco protein p53 si udržel schopnost ovlivňovat diferenciaci buněk BM2, schopnost vyvolat apoptózu jsme neprokázali. Absence apoptózy u buněk BM2 exprimujících lidský p53 patrně souvisí s nedostatečnou schopností tohoto proteinu aktivovat expresi genu *bax*, což jsme prokázali transaktivačními testy. Naše výsledky ukazují, že i výrazné mezidruhové strukturální rozdíly nemusí eliminovat funkci důležitých proteinů. I když lidský protein p53 ztratil schopnost indukce programované buněčné smrti v BM2 buňkách, jeho schopnost regulace proliferace a diferenciace byla i v těchto podmínkách zachována a to dokonce za přítomnosti funkčního onkoproteinu *v-Myb*.

Tato práce byla sponzorována grantem 301/06/0036 Grantové agentury České republiky a grantem MSM0021622415 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy české republiky.

LITERATURA

1. Chan W. M., Siu W. Y., Lau A., Poon R. Y.: Mol. Cell. Biol. 24, 3536 (2004).
2. Mateu M. G., Fersht A. R.: Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 96, 3595 (1999).

**IZOLACE A CHARAKTERIZACE
ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ Z LAREV
MASAŘKY *Neobellieria bullata***

**TEREZA NEUBAEROVÁ^a, ALICE CIENCIALOVÁ^b,
MARTINA MACKOVÁ^a, TOMÁŠ MACEK^{a,b}
a JIŘÍ JIRÁČEK^b**

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3,
Praha 6, 166 28; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV
ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
tereza.neubauerova@vscht.cz

Stále klesající účinnost dosud vyvinutých antibiotik staví do popředí mikrobiologických výzkumů hledání nových látek s antimikrobiálním účinkem, například na bázi krátkých peptidů. Jako zdroj izolace takových peptidů jsme vybrali organismus, který často přichází do střetu s bakteriálními infekcemi – masařku *Neobellieria bullata*.

Indukci antibakteriálních peptidů jsme prováděli bakteriálním pathogenem *Escherichia coli* v larválním stadiu tohoto organismu. Po několika hodinové inkubaci byla získána hemolymfa, ze které byly postupnou centrifugací a různými druhy srážení izolovány nízkomolekulární peptidy. Tyto peptidy byly dále děleny chromatografickými metodami (RP-HPLC, adsorbční a ionexovou chromatografií) na jednotlivé frakce. Identifikace a charakterizace těchto frakcí byla prováděna metodami SDS-PAGE, hmotnostní spektrometrií a N-terminální sekvenací. Konečným krokem bylo porovnání zjištěných sekvencí s databázemi peptidů. Antimikrobiální aktivita frakcí získaných po purifikačních krocích byla testována dvěma metodami. Pro prvotní screening byla použita difúzní metoda, v níž se hodnotí průměry zón vytvořených v důsledku inhibice růstu mikroorganismu. Tato metoda umožňuje jednoduchým způsobem a s velmi malým množstvím testované látky vyřadit neaktivní frakce. Celý průběh růstu mikroorganismu a záznam potenciálního antimikrobiálního účinku získaných peptidových frakcí byl sledován na přístroji BIOSCREEN C. Ten kromě kontinuálního sledování růstu po dobu několika hodin umožňuje i provedení pokusu v několika paralelách. Na základě měření je možné i statistické kvantitativní vyhodnocení inhibice, a to porovnáním tzv. specifické růstové rychlosti a maximální rychlosti testovacího mikroorganismu. Jako testovací modelové mikroorganismy byly vybrány obávané patogeny, zástupci gramnegativních bakterií - *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, grampozitivní zástupce - *Staphylococcus aureus*.

Z výsledků je zřejmá inhibiční aktivita několika frakcí získaných po methanolovém srážení a RP-HPLC, které byly identifikovány v hemolymfě indukovaných larev, zatímco v neindukovaných larvách se tyto frakce nevyskytovaly. Jedna z frakcí (M13) v koncentraci cca 1000 µg.ml⁻¹ stoprocentně inhibovala růst *Pseudomonas aeruginosa*, zatímco další frakce M14 inhibovala *S aureus* i *E. coli* a v případě M15 byla inhibice růstu detekována pouze u *Staphylococcus aureus*. Později byly tyto frakce identifikovány jako sapeciny A a C. Účinné koncentrace výše uvedených frakcí se řádově shodovaly s koncentracemi komerčních antibiotik (vankomycin, kanamycin).

Práce na tomto projektu byla sponzorována granty GAČR 203/05/0832 a grantem FRVŠ 1676 G4/ 2007.

OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ PROTEINŮ PŘI STÁRNUTÍ LISTŮ TABÁKU (*Nicotiana tabacum* L.)**PETRA NEUWIRTHOVÁ^{a,b} a NAĎA WILHELMOVÁ^b**^aUniverzita Karlova, PŘF, Katedra biochemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2; ^bÚstav experimentální botaniky, AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6
neuwirthova@ueb.cas.cz

Volné radikály produkované při aerobní respiraci způsobují oxidační poškození, které se s přibývajícím věkem kumuluje, a je tak příčinou stárnutí a smrti. Terčem působení volných radikálů jsou základní buněčné složky – lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Nejčastějším produktem oxidace proteinů jsou sloučeniny s karbonylovou skupinou, aldehydy a ketony, vznikající na řetězcích aminokyselin. Proteiny se liší v citlivosti na poškození volnými radikály. Senescence je také regulovaná fytohormony, např. cytokininy, které jsou považovány za inhibitory senescence.

Sledovaly jsme změny obsahu cytosolických proteinů, jejich oxidační poškození, jakým způsobem je ovlivněno oxidační poškození cytosolických proteinů cytokininy a zda lze nalézt korelaci mezi oxidačním poškozením proteinů a nástupem senescence listu. K pokusům jsme použily rostliny tabáku (*Nicotina tabacum* L.), jak kontrolní, tak transgeniční rostliny s pozměněnou koncentrací cytokininů.

V průběhu senescence listů tabáku dochází ke změnám obsahu cytosolických proteinů. Pomocí spektrofotometrických metod a SDS-elektroforézy jsme zjistily, že celkový obsah cytosolických proteinů klesá v listech v závislosti na jejich stárnutí. Nejvíce proteinů obsahují mladé listy, nejméně staré listy tabáku. Nejvíce proteinů obsahují v rostlinné buňce chloroplasty, a tak je přirozené, že se stárnutím klesá i velikost a počet těchto organel. Zastoupení jednotlivých proteinů se však v závislosti na stáří mění. Koncentrace většiny cytosolických proteinů v listech v závislosti na stáří klesá, ale mohou se vyskytovat i proteiny, které jsou v senescenci syntetizovány. V našem případě takovýmto proteinem byl cytosolický protein o velikosti 66 kDa. Kontrolní rostliny obsahovaly v mladých listech více proteinů, než transgeniční rostliny, ve starých listech byl ale tento poměr obrácený. To pravděpodobně souvisí s omlazením listů transgeničních rostlin v důsledku zvýšené syntézy cytokininů. Tyto výsledky se shodují i se zpomalenou degradací chlorofylů.

Během přirozené senescence listů tabáku dochází také k nárůstu celkového obsahu oxidačně poškozených cytosolických proteinů. Oxidační poškození proteinů jsme měřily pomocí DNPH vázajícího se na karbonylové skupiny a jejich obsah jsme stanovily spektrofotometricky jako koncentraci vzniklého dinitrofenylhydrazonu. Výsledky ukázaly, že průběh koncentrace oxidovaných proteinů má charakter signálu pro spuštění senescence. V nejstarších listech nebylo nejvíce oxidovaných proteinů, protože už v nich docházelo k jejich odbourávání, tzn. už v nich probíhala senescence. Transgeniční rostliny vykazovaly obdobné hodnoty, jako kontrolní rostliny. Proto se zdá, že metabolismus oxidovaných proteinů je pravděpodobně řízen

nezávisle na hladině cytokininů a souvisí pouze s věkem listu.

Tyto výsledky jsou součástí grantového projektu financovaného GA ČR (č. 522/03/0312).

STIMULACE NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ LIPOPOLYSACHARIDEM JE SPOJENA S FOSFORYLACÍ REGULAČNÍ PODJEDNOTKY p47phox NADPH OXIDASY**KATEŘINA OKÉNKOVÁ^{a,b}, ROMAN KONOPKA^{a,b}, a LUKÁŠ KUBALA^a**^aBiofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; ^bPřírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Oxidativní vzplanutí fagocytů, charakteristické intenzivní produkcí volných kyslíkových radikálů, je indukováno řadou prozánětlivých mediátorů. Za zvýšenou produkcí volných radikálů je zodpovědná NADPH oxidasa. Během stimulace fagocytů dochází k aktivaci jednotlivých podjednotek NADPH oxidasy spojených s jejich fosforylací a změnou lokalizace vazbou na membránu fagozomu, přesný mechanismus stimulace však není znám. Proto jsme se zaměřili na lipopolysacharidem indukovanou aktivaci NADPH oxidasy v lidských neutrofilních granulocytech a myších makrofázích RAW 264.7. Oxidativní vzplanutí bylo detekováno luminolem-amplifikovanou chemiluminiscencí s použitím různých aktivátorů -opsonizovaného zymosanu (OZP), forbol myristát acetátu (PMA), kalciového ionoforu (CaI) a bakteriálního peptidu *N*-formylmethionyl-leucyl-fenylalaninu (FMLP), spouštějících oxidativní vzplanutí odlišnými mechanismy. Byla sledována fosforylace klíčové podjednotky NADPH oxidasy p47phox a vliv inhibitorů ERK1/2 a p38 kinas na lipopolysacharidem indukovanou fosforylací p47phox. Lipopolysacharidem indukovaná stimulace byla zjištěna jak u lidských neutrofilních granulocytů, tak myších makrofágů RAW 264.7 a byla rovněž spojená s výrazným zesílením oxidativního vzplanutí - toto zesílení bylo rozdílné u jednotlivých aktivátorů. Stimulace fagocytů korelovala se zvýšením fosforylace p47phox, která byla ovlivněna inhibitory vybraných kinas. Výsledky prokázaly, že stimulace fagocytů lipopolysacharidem, vedoucí ke zvýšení oxidativního vzplanutí, je spojena s fosforylací regulační podjednotky p47phox.

OVER-EXPRESSION OF HUMAN ASPARTYL (ASPARIGINYL) β -HYDROXYLASE IN LEUKEMIA**EVA OTÁHALOVÁ^a, MICHAEL S. LEBOWITZ^b, and HOSSEIN A. GHANBARI^b**^aInstitute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague; ^bPanacea Pharmaceuticals, Inc., 207 Perry Parkway, Gaithersburg, MD 20877, USA

Human aspartyl (aspariginyl) β -hydroxylase (HAAH) has been established as an excellent biomarker for cancer diagnosis based on its biochemical and cellular properties and known biological function. The enzyme normally catalyzes a protein modification, the β -hydroxylation of aspartyl and/or aspariginyl residues found in EGF-like domains of blood clotting factors, proteins of the extracellular matrix and various cellular signaling proteins¹. Increased HAAH expression has been detected at the protein and mRNA levels specifically in tumor cells. Over-expression of HAAH results in its translocation to the cellular surface² where it is a potential target for antibody-based cancer therapy.

By immunohistochemical staining we identified HAAH over expression in more than 20 different types of cancer, including leukemias. HAAH was not detected to an appreciable extent in normal tissues including non-cancerous (benign) proliferative disorders. We identified the HAAH protein by ELISA and Western blotting in the serum of cancer patients. The protein was undetectable in sera from non-diseased individuals and thus serum protein levels of HAAH are diagnostic for cancer. To detect HAAH at the mRNA level we developed a quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Treatment of cancer cells with anti-HAAH monoclonal antibodies (anti-HAAH mAbs) in vitro lead to the loss of malignant phenotype - proliferation, motility and invasiveness.

We found increased expression of the HAAH transcript (~5-fold and ~10-fold) in leukocytes from patients with both chronic myelogenous leukemia (CML) and acute myelogenous leukemia (AML) respectively. In case of AML we studied HAAH as a possible marker to diagnose and monitor disease treatment as well as minimal residual disease. In the case of CML we have proven HAAH to be a suitable tool for the determination of responders and non-responders to Imatinib therapy prior to the initiation of treatment. For this purpose we have developed a clinically proven assay to follow HAAH transcript changes caused by the presence of Imatinib. Furthermore we studied influence of anti-HAAH mAbs on primary cells driven from patients with AML and CML.

We proved HAAH to be a suitable tool for the determination of likely response to Imatinib during CML treatment. HAAH may also be helpful in AML monitoring.

REFERENCES

1. Lavaissiere L., Jia S., Nishiyama M., de la Monte SM., Stern AM., Wands JR., Friedman P.A.: *J. Clin. Invest.* 98, 1313 (1996).
2. Ince N., de la Monte S. M., Wands J. R.: *Cancer Res.* 60, 1261 (2000).

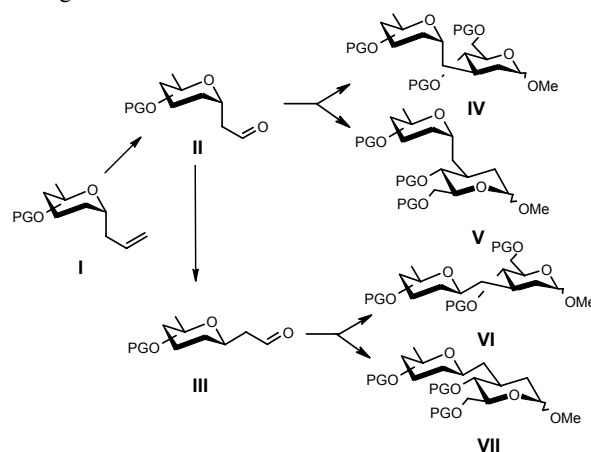
VYUŽITÍ α -GLYKOPYRANOSYLPROPENŮ PRO STEREOSELEKTIVNÍ SYNTÉZU (1 \rightarrow 3)-C-DISACHARIDŮ

KAMIL PARKAN a **LADISLAV KNIEŽO**

*Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
parkank@vscht.cz*

V posledních letech je věnováno velké úsilí nalezení nových syntetických cest směřujících k C-disacharidům, analogům přírodních disacharidů¹ a potenciálním inhibitorům glykosidas a glykosyltransferas. Spojení dvou monosacharidů přes methylenový můstek, kterým se C-disacharidy liší od přírodních disacharidů, způsobuje jejich rezistenci jak ke kyselé, tak i enzymatické hydrolyze.

Potenciálem námi navržené syntézy je možnost připravit ze snadno dostupných α -glykopyranosylpropenů I s vysokou stereoselektivitou až čtyři diastereomerní (1 \rightarrow 3) C disacharidy, ve kterých je příslušný α -glykopyranosylový nebo β -glykopyranosylový zbytek vázáný přes methylenový můstek s 2,3-dideoxy arabino-hexopyranosou v D nebo L konfiguraci.



Výchozí α -glykopyranosylpropen I byl ozonolýzou snadno transformován na chráněný α glykopyranosylacetaldehyd II, který jednoduchou epimerizací poskytl β -glykopyranosylacetaldehyd III. Z obou aldehydů II a III byly po Wittigově reakci a následné enantioselektivní cykloadiční reakci² získány čisté stereoisomery substituovaného dihydropyrany, které ve dvou dalších krocích poskytly čisté C-disacharidy IV a V, resp. VI a VII.

Práce byla provedena v rámci řešení výzkumného záměru MŠMT č. 6046137305.

LITERATURA

1. Dondoni A., Marra A.: *Chem. Rev.* 104, 2557 (2004).
2. Vích O., Kniežo L., Dvořáková H., Raich I. Valenta Š.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70, 2086 (2005).

MAPOVÁNÍ STRUKTURY INTERAKTOMU PROTEINU 14-3-3 ZA POMOCI BIKONJUGAČNÍCH TECHNIK A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

KATEŘINA PEŠLOVÁ^{a,b}, PETR NOVÁK^b, TOMÁŠ OBŠIL^c, PETR HOĐEK^a a MIROSLAV ŠULC^{a,b}

^aPřF UK, katedra biochemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2; ^bMikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; ^cFyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4.
peslova@biomed.cas.cz

Proteiny 14-3-3 tvoří širokou rodinu eukaryotických, dimerických proteinů, které se podílejí na regulaci mnoha buněčných procesů, mj. regulují signální dráhy nebo apoptózu, interakcí s klientními molekulami prostřednictvím fosfoserinového/fosfotreoninového vazebného motivu. Vazebná schopnost proteinů 14-3-3 je zcela závislá na dimerické struktuře, která je *in vivo* regulována cílenou fosforylací aminokyselin nacházejících se na rozhraní dimeru. Cílem této práce byla validace experimentálních a teoretických modelů^{1,2} struktury proteinu 14-3-3 pomocí progresivní metody chemických modifikačních činidel v kombinaci s analýzou získaných kovalentních aduktů technikou hmotnostní spektrometrie.

Nejprve byly provedeny optimalizační experimenty pro síťovací reakci s činidlem EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid), které vytváří spojení blízkých lysinových zbytků a *N*-konce, s *C*-koncem nebo postranními aminokyselinovými řetězci kyseliny asparagové a glutamové. Nejlepší podmínky byly nalezeny na základě vyhodnocení 1D elektroforeogramů a produkty těchto reakcí byly charakterizovány na peptidové úrovni po proteolýze v gelu hmotnostní spektrometrií. Stejný postup byl použit také pro biokonjugační reakce s bifunkčními síťovacími činidly DSG (*N*-hydroxysukcinimidyl glutarát) a DSS (*N*-hydroxysukcinimidyl suberát) vytvářející vazby mezi prostorově přiblíženými lysinovými zbytky. Kromě přirozeného, rekombinantního proteinu 14-3-3zeta byla za stejných podmínek biokonjugačních reakcí s uvedenými činidly studována také struktura mutovaného 14-3-3zeta se změnou serinu na pozici 58, který je jedním z *in vivo* regulačních míst. Výsledky z 1D elektroforeogramů ukazují, že mutant Ser(58)Asp není schopen vytvářet dimery, a potvrzují tak kritickou úlohu tohoto zbytku pro katalytickou aktivitu proteinu 14-3-3. Tento mutant byl také používán ve všech biokonjugačních experimentech pro porovnání míry interakce podjednotek proteinu 14-3-3 v různých reakčních podmínkách.

Hmotnostní analýzou (MALDI-TOF; LC-FTMS – z angl. Liquid Chromatography Fourier Transformation Mass Spectrometry) byly identifikovány intramolekulární a intermolekulární můstky v molekule proteinu 14-3-3zeta. Dle našich výsledků je *N*-terminální oblast jedné podjednotky prostorově více přiblížená k helixu D druhé monomerní jednotky, oproti krystalografickému modelu².

Obdobným přístupem je v naší laboratoři studována také interakce proteinu 14-3-3 s regulační doménou tyrosin hydroxylasy, která byla popsána jako jeden z vůbec prvních reakčních partnerů proteinů 14-3-3.

Tato práce byla finančně podporována grantem GA ČR(303/06/0928), institucionálním záměrem AV0Z50200510 a výzkumným centrem MŠMT Lc545.

LITERATURA

1. Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R. J., Fu H., Liddington R.: *Nature* 376, 191 (1995).
2. Obšil T., Ghirlando R., Klein D. C., Ganguly S., Dydá F.: *Cell* 105, 257 (2001).

VYUŽITÍ PIEZOELEKTRICKÝCH BIOSENZORŮ KE STANOVENÍ IMUNOGLOBULINŮ

**MIROSLAV POHANKA^{a,b}, OTO PAVLIŠ^a
a PETR SKLÁDAL^b**

^aCentrum biologické ochrany, 561 66 Těchonín; ^bKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Měření piezoelektrickými biosenzory patří k perspektivním metodám v oblasti imunodetekcí. Při konstrukci piezoelektrických biosenzorů se využívá standardní QCM (Quartz Crystal Microbalance), na jejichž zlatou elektrodu se kovalentně imobilizuje antigen příslušný ke stanovované protilátce. Díky piezoelektrickému jevu se vazba protilátky na antigen projeví fyzikálně měřitelnou veličinou – změnou frekvence kmitání. Velkou výhodou použité metody je absence potřeby jakéhokoliv značení či použití sekundární protilátky. Sledování vazby protilátky na antigen probíhá v reálném čase a z vazebných křivek je možno vypočítat základní kinetické konstanty. Tyto biosensory byly použity k modelové detekci specifických protilátek při probíhající tularemické infekci u laboratorních myší BALB/c a také k výběru a charakterizaci monoklonálních protilátek v rámci jejich přípravy.

Na QCM zlatou elektrodu, modifikovanou cysteaminem, byl pomocí glutardialdehydu vázán antigen připravený mrazícím cyklem z mikroorganismu *Francisella tularensis* LVS. Jako měřený vzorek posloužily myší séra nakažených tularemii (IMS) inokulací dávky LD₅₀, normální myší séra (NMC) a jako kontrola séra z myší, do nichž byl inokulován mikroorganismus *E. coli* (CMS). Během pětiminutového nanášení séra v plnoprůtočné cele bylo možno detekovat protilátky v IMS třetí den po inokulaci na hladině významnosti 0,95 (t-test, n=3) signálem 75 Hz, od pátého dne na hladině významnosti 0,99 signálem přes 80 Hz.

Pro charakterizaci monoklonálních protilátek (mAb) specifických proti *F. tularensis* byl použit senzor s lipopolysacharidovou (LPS) frakcí antigenu připraveného extrakcí v EDTA – Tris-HCl pufru z *F. tularensis* a pro účely negativní kontroly z *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. Tímto způsobem byly testovány kinetické parametry a specifičnost experimentálně připravené mAb. Rovnovážná konstanta K_a afinitní reakce pro protilátku 4H3BD3 byla stanovena 70492±6207, přičemž disociační konstanta reakce k_d činila 0,00644±0,00026 s⁻¹. Negativní kontrola získaná z biosenzoru s imobilizovaným LPS z *E. coli* nebo *B. subtilis* byla méně než 0,5 % oproti signálu z biosenzoru s LPS z *F. tularensis*. Byl rovněž sestaven graf pro přepočítání signálů na titr získaný metodou ELISA.

Analýza imunoglobulinů jak v klinické, tak v technologické oblasti je v současnosti možná jen s pomocí složitých

a materiálně náročných metod. Použití piezoelektrických biosenzorů poukazuje na možnost využití jednoduché aparatury v kombinaci s měřením nenáročným na reagenty.

FLUORESCENČNÍ SENZORY PRO ANIONY A ZPŮSOBY ZVÝŠENÍ JEJICH CITLIVOSTI

RADEK POHL^a a PAVEL ANZENBACHER Jr.^b

^aÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bCenter for Photochemical Science, Bowling Green State University, Bowling Green, Ohio 434 03, USA
pohl@uochb.cas.cz

Vývoj citlivých senzorů pro aniony zůstává stále výzvou pro chemiky. Hlavním důvodem je fakt, že anorganické aniony, na rozdíl od anorganických kationů, vykazují různou geometrii, značnou delokalizaci náboje a solvataci, a následkem toho je vázání anionů na senzor méně účinné. Senzory založené na změně fluorescence vyvolané vazbou anionu na senzor jsou zvláště atraktivní, protože jsou velmi citlivé při malé koncentraci analytu. Celkovou odezvu senzoru na přítomnost anionu lze zlepšit buď zvýšením afinity senzoru-anion nebo prostřednictvím citlivějšího přenosu signálu. První přístup znamená často složitou několikastupňovou syntézu cílového senzoru a ztrátu odezvy v reálném čase z důvodu pomalé disociace komplexu senzor-anion.

V našem příspěvku¹ jsme se zaměřili na zvýšení citlivosti již známého fluorescenčního senzoru pro aniony – DPQ^{2,3} (2,3-di(1*H*-2-pyrrolyl)chinolalinu). Prvním přístupem je připojení chromoforu, který je vhodný pro rezonanční přenos excitační energie, na původní DPQ senzor. Druhým přístupem je připojení konjugovaného chromoforu na původní senzor, což umožňuje delokalizaci excitovaného stavu konjugovaného systému. Oba přístupy umožňují zvýšit citlivost modifikovaných DPQ senzorů, což umožňuje používat tyto senzory v několikanásobně menším množství než původní DPQ senzor a snížit detekční limit pro některé aniony.

LITERATURA

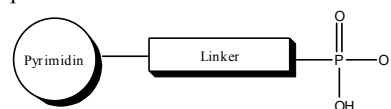
1. Pohl R., Aldakov D., Kubát P., Jursíková K., Marquez M., Anzenbacher P. Jr.: *Chem. Commun.* 2004, 1282.
2. Black C. B., Andrioletti B., Try A. C., Ruiperez C., Sessler J. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 10438 (1999).
3. Anzenbacher P. Jr., Try A. C., Miyaji H., Jursíková K., Lynch V. M., Marquez M., Sessler J. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10268 (2000).

NOVÉ MOŽNOSTI PYRIMIDINOVÝCH ACYKlickÝCH FOSFONÁTŮ V PROTINÁDOROVÉ CHEMOTERAPII: SYNTÉZY POTENCIÁLNÍCH MULTISUBSTRÁTOVÝCH INHIBITORŮ THYMINFOSFORYLASY

**KAREL POMEISL, ANTONÍN HOLÝ,
IVAN VOTRUBA a RADEK POHL**

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

Acyklické nukleosidové fosfonáty (ANP) představují významné sloučeniny z hlediska jejich farmakologického využití, neboť se vyznačují širokou škálou biologických aktivit¹ např. proti některým DNA-virům a retrovirům. V současnosti se náš výzkum zaměřuje také na syntézu katabolicky stálých pyrimidinových ANP derivátů, které jsou navrhovány jako nové typy potenciálních multisubstrátových inhibitorů thymidinofosforylasy²⁻⁴. Jelikož tento enzym plní důležitou roli v procesu angiogeneze, mohly by v budoucnu nalézt tyto sloučeniny uplatnění např. v protinádorové chemoterapii.



Obr. 1

V této studii jsme navrhli několik typů pyrimidinových ANP sloučenin, u kterých jsme současně sledovali jejich inhibiční aktivitu vůči thymidinofosforylase. Na základě biochemických výsledků jsme se dále pokusili modifikovat jejich strukturu s cílem ovlivnit inhibiční účinek v různých směrech, abychom tak lépe porozuměli jejich vztahu k struktuře enzymu. V mnoha případech byla a stále je tato snaha povzbuzována i vývojem takových syntetických postupů, které se vyznačují svojí jednoduchostí (např. fluorace ANP sloučenin^{2,3}, cross-coupling reakce atd.) či nízkou toxicitou produktů způsobenou toxickými nečistotami.

Tato studie byla podporována grantem GA ČR (Centrum Nová antivirologika a antineoplasmatika (1M0508), Evropské Unie (Descartes Prize HPAW-CT-2002-9001) a Gilead Sciences (Foster City, CA, USA).

LITERATURA

1. Holý A.: *Curr. Pharm. Design.* 9, 2567 (2003); b) Holý A. *In Recent Advances in Nucleosides: Chemistry and Chemotherapy* (Chu C. K., ed.) Elsevier, Amsterdam 2002, str. 167.
2. Votruba I., Pomeisl K., Tloušťová E., Holý A., Otová B.: *Biochem. Pharmacol.* 69, 1517 (2005).
3. Pomeisl K., Pohl R., Holý A., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70, 1465 (2005).
4. Pomeisl K., Pohl R., Holý A., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71, 595 (2006).

YEAST ADENINE DEAMINASES

HANA POSPÍŠILOVÁ and IVO FRÉBORT

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71, Olomouc
hana.pospisilova@upol.cz

Cytokinins are plant hormones, which play important role in plant development. Their level in plant tissues is controlled by the enzyme cytokinin dehydrogenase (CKX, EC 1.5.99.12)¹. According to older reports², some yeast and mammalian enzymes can cleave a cytokinin (or its derivative) to hypoxanthine and an amine derived from the N6 side-chain. We are searching for enzymes involved in such an alternative pathway of the cytokinin degradation that may be acting in plants and possibly also cleaving cytokinin-derived drugs in human cells³. Of this class of enzymes, bacterial adenine deaminase (ADE, EC 3.5.4.2; deamination of adenine to hypoxanthine and ammonia) was recently the first to have the crystal structure solved⁴, but no structure of eukaryotic adenine deaminase is available yet. On the amino acid sequence level, ADEs found in lower eukaryotes, such as Ascomycetes⁵, show higher degree of similarity with human adenosine deaminase (EC 3.5.4.4), which is being intensely studied for their participation in many diseases, than with prokaryotic enzymes.

Hence, yeast adenine deaminases SPBC1198.02 (*Schizosaccharomyces pombe*) and AAH1 (*Saccharomyces cerevisiae*) were chosen for the study due to their less complex genetic origin and partial amino acid sequence similarity to plant and animal enzymes. Full gene sequences that contain no introns were amplified by PCR from DNA of the yeasts, cloned into pDRIVE vector and replicated in *E. coli* TOP10 cells. Restriction analysis followed by sequence analysis confirmed correctness of the inserts. The genes were then cloned into pET101/D-TOPO expression vector under IPTG inducible promoter. The vector also facilitated the fusion of C-termini of the recombinant proteins to V5 epitope domain and 6xHis tag. The proteins produced in *E. coli* BL21 Star™(DE3) cells were detected in the cell extract by Western blotting with the antibody against the V5 epitope and purified by one step affinity chromatography on Ni-NTA. Optimum conditions for activity assay using UV monitoring of the substrate/product concentrations were found and specific activities and K_m values determined for both enzymes. Cytokinin degradation was observed only for the *S. pombe* enzyme. Large scale preparations of the enzymes for crystallographic trials are under way.

Supported by the grants MSM 6198959216 and GACR 522/06/0022.

REFERENCES:

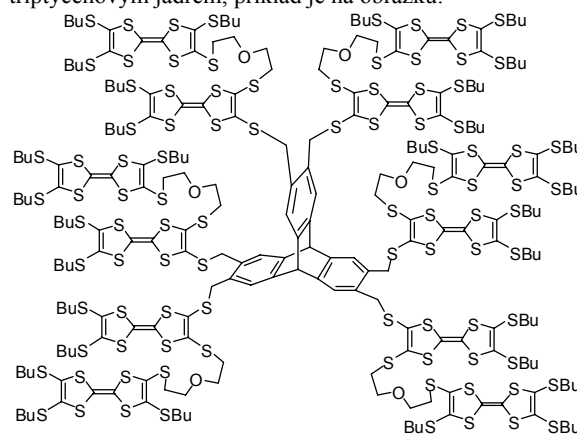
- Galuska P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Frébort I.: *Eur. J. Biochem.* 271, 3990 (2004).
- Dorée M. M., Terrine C.: *Physiol. Veg.* D. 275, 1503 (1972).
- Trávníček Z., Maloň M., Zatloukal M., Doležal K., Strnad M., Marek J.: *J. Inorg. Biochem.* 94, 307 (2003).
- Sugadev R., Kumaran D., Burley S. K., Swaminathan S.: *Crystal structure of an adenine deaminase*. New York Structural Genomics Research Consortium (Nysgrc), 2006/9/13 (PDB access 2ICS).
- Deeley M. C.: *J. Bacteriol.* 174, 3102 (1992).

SYNTEZA A VLASTNOSTI OLIGOMERNÍCH DERIVÁTŮ TETRATHIAFULVALENU S TRIPTYCENOVÝM JÁDREM

JIŘÍ RYBÁČEK^{a,b}, PETR HOLÝ^a, JIŘÍ ZÁVADA^a, KRISTINE KILSA^b a MOGENS B. NIELSEN^b

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^b Dept Chemistry, University of Copenhagen, Universitetsparken 5, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark

Tetrathiafulvalen (TTF) představuje elektronově bohatou strukturální jednotku hojně využívanou v materiálovém inženýrství či supramolekulární chemii¹. Za svou popularitu vděčí TTF nejen výborné syntetické dostupnosti mnoha jeho derivátů, ale především svým redoxním vlastnostem. Lze jej totiž snadno oxidovat ve dvou zpravidla vratných jednoelektronových krocích nejprve na radikál-kation a posléze na dikation. Za účelem studia vzájemného vlivu TTF jednotek různým způsobem rozložených v prostoru byla připravena série oligomerních (1 až 12 TTF jednotek) derivátů s geometricky výhodným triptycénovým jádrem, příklad je na obrázku.



Bis-, tetrakis- a hexakis(brommethyl)triptyceny se substitučním motivem ftalové či tereftalové kyseliny byly připraveny jednoduchým sledem reakcí (esterifikace, redukce a záměna hydroxyly za brom) z příslušných triptycénkarboxylových kyselin, jejichž syntéza byla již dříve vypracována v naší skupině². Následně byly těmito reaktivními halogenderiváty alkylovány mono- a dithioláty odvozené od příslušných tetrathiafulvalen-2,3,6,7-tetrathiolů. Elektrochemickými a spektroechemickými měřeními byl studován vztah mezi polohou půlvlnných potenciálů a absorpčních maxim oxidovaných částic a počtem a prostorovým uspořádáním TTF jednotek.

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/03/0087) a Danich Research Agency (grant #2111-04-0018).

LITERATURA

- Nielsen M. B., Lomholt C., Becher J.: *Chem. Soc. Rev.* 29, 153 (2000).

2. Rybáčková M., Bělohradský M., Holý P., Pohl R., Závada J.: *Synthesis* 12, 2039 (2006).

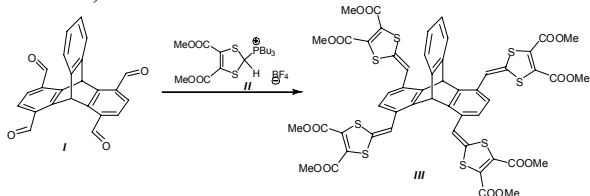
VYUŽITÍ TRIPTYCENKARBOXYLOVÝCH KYSELIN K SYNTÉZE OLIGOMERNÍCH DERIVÁTŮ 1,4-DITHIAFULVENU

MARKÉTA RYBÁČKOVÁ^{a,b}, JIŘÍ RYBÁČEK^{a,b}, MARTIN BĚLOHRADSKÝ^a, PETR HOLÝ^a, JIŘÍ ZÁVADA^a, KRISTINE KILSÁ^b a MOGENS B. NIELSEN^b

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^bDept of Chemistry, University of Copenhagen, Universitetsparken 5, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark

Tetrathiafulvalen je snadno oxidovatelný elektronový donor, který našel díky svým užitečným vlastnostem široké uplatnění v materiálové a supramolekulární chemii¹. Rozšíření konjugace pomocí olefinické, acetylenické nebo aromatické spojky vedlo k řadě derivátů s optimalizovanými vlastnostmi². Triptycenkarboxylové kyseliny³ představují rigidní stavební bloky, které jsou snadno dostupné ve dvou reakčních krocích ze substituovaných anthracenů a ukázaly se jako vhodné intermediáty pro syntézu řady funkčních derivátů triptycenu.

Fischerovu esterifikaci připravené estery lze snadno zredukovat účinkem LiAlH₄ na hydroxymethyltriptyceny a ty pak parciální oxidací (působením PCC nebo Swernovou oxidací) převést na odpovídající aldehydy. Wittigovou nebo Wittigovou-Hornerovou⁴ reakcí takto připravených aldehydů s fosfoniovou solí **II** nebo obdobným fosfonátem byla připravena řada triptycenen rozšířených derivátů tetrathiafulvalenu (příklad je uveden v následujícím schématu).



Elektrochemická měření ukázala, že u všech připravených látek dochází k dvěma nevratným oxidačním krokům. Připravené látky by v budoucnu mohly najít uplatnění v supramolekulární chemii při tvorbě komplexů.

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/03/0087) a Danich Research Agency (grant #2111-04-0018).

LITERATURA

- Nielsen M. B., Lomholt C., Becher J.: *Chem. Soc. Rev.* 29, 153 (2000).
- Nielsen M. B., Utesch N. F., Moonen N. N. P., Boudon C., Gisselbrecht J. P., Concilio S., Piotto S. P., Seiler P., Günter P., Gross M., Diederich F.: *Chem. Eur. J.* 8, 3601 (2002).

- Rybáčková M., Bělohradský M., Holý P., Pohl R., Závada J.: *Synthesis* 12, 2039 (2006).
- Salle M., Belyasmine A., Gorgues A., Jubault M., Soyer N.: *Tetrahedron Lett.* 32, 2897 (1991).

CHIRÁLNÍ MESO-SUBSTITUCE CALIX[4]PYRROLOVÝCH MAKROCYKLŮ

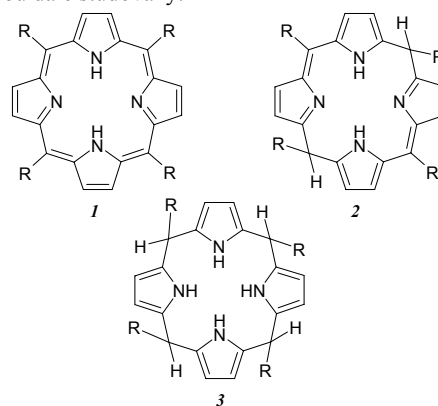
ONDŘEJ ŠIMÁK^{a,b}, PAVEL DRAŠAR^b, VLADIMÍR KRÁL^c a PAVEL MARTÁSEK^a

^aKlinika dětského a dorostového lékařství, I.LF UK v Praze, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2; ^bÚstav chemie přírodních látek, a ^cÚstav analytické chemie, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Ondrej.Simak@vscht.cz

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

Cílem práce je konstrukce konjugátů se spojením porfyrin-sacharid **1**, ve kterých je cukerný skelet připojen k makrocyklu v *meso* poloze pomocí C-C vazby, která je na rozdíl od klasické *O*-glykosidové vazby odolná vůči hydrolytickému, potažmo enzymovému štěpení. Kromě toho jsou studovány i *meso*-1,1-binaftylové calix[4]fyriny **2**, které mohou sloužit pro selektivní rozpoznávání sacharidů, ale i oligosacharidů v roztocích³.

V neposlední řadě se podařilo připravit *meso*-*C*-„glykosylované“ calix[4]pyrroly **3**. Ty mají díky flexibilitě pyrrolového jádra schopnost přizpůsobit se komplexovanému ligandu. Jejich spojení s chirálními sacharidy může pozitivně ovlivnit selektivitu komplexačních reakcí a zvýšit rozpustnost těchto látek v polárních systémech. Všechny látky jsou dále studovány.



Práce byla provedena v rámci řešení výzkumného záměru MŠMT č. 6046137305, projektu IP04OCD31.001 a grantu GA ČR 2003/06/0006.

LITERATURA

1. Mikata Y., Ouchi Y., Tabata K., Ogura S.-I., Okura I., Ono H., Yano S.: *Tetrahedron Lett.* 8, 3007 (1998).
2. Sirish M., Schneider H.-J.: *Chem. Commun.* 2000, 23.
3. Král V., Sessler J. L., Zimmerman R. S., Seidel D., Lynch V., Andrioletti B.: *Angew. Chem.* 112, 1097 (2000).

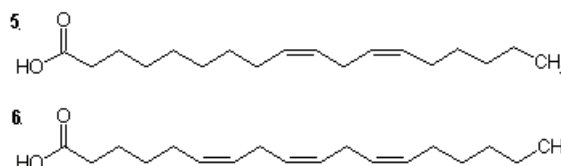
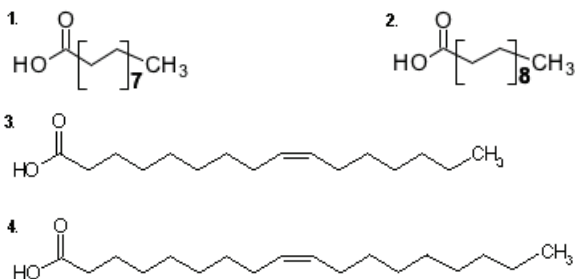
VLIV HNOJENÍ DUSÍKEM A FOSFOREM NA OBSAH OLEJE A MASTNÝCH KYSELIN U SLUNEČNICE ROČNÍ (*Helianthus annuus* L.)

PETR ŠKARPA

Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
pskarpa@seznam.cz

Dusík a fosfor se řadí mezi makrobiogenní živiny, ovlivňující řadu metabolických dějů v rostlinném organismu. Dusík se podílí zejména na proteosyntéze, je součástí pyrimidinových a purinových bází důležitých k tvorbě nukleových kyselin. Tvoří důležitou složku chlorofylu, zasahuje do metabolismu vitamínů i dalších biokatalytických látek. Fosfor je především součástí fosfolipidů, fosforylovaných sacharidů a peptidů, nukleových kyselin, adenylátů (NAD^+ , NADP^+) a sloučenin ADP, ATP. Jeho podíl na metabolických procesech souvisí s přenosem signálů, využitím a přeměnou energie. Obě tyto živiny mají významnou souvislost s metabolismem rostlinných enzymů, důležitých v biochemii lipidového metabolismu, které katalyzují reakce od acetylkoenzymu A až k výsledným produktům. Nejčastějšími rostlinnými lipidy jsou estery glycerolu a mastných kyselin.

Cílem experimentu bylo zjistit vliv dusíku a fosforu na obsah oleje v nažkách slunečnice a na tvorbu mastných kyselin nasycených (kyselina palmitová **1** a stearová **2**) a nenasycených (kyselina palmitolejová **3**, olejová **4**, linolová **5** a linoleová **6**).



Experiment byl založen vyšetřím slunečnice odrůdy Jazy formou nádobového pokusu ve 4 variantách (1. kontrola, 2. N v dávce 1g/nádoba, 3. N v dávce 1g/nádoba + P na úrovni 81 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a 4. N v dávce 1g/nádoba + P na úrovni 116 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ zeminy). V průběhu vegetace byly var. 2-4 dohnojeny dusíkem v dávce 1g /nádoba. Po sklizni byl stanoven v nažkách celkový obsah oleje (Twisselmann) a obsah mastných kyselin (plynová chromatografie). Z výsledků je patrné statisticky vysoce průkazné ($P \leq 0,01$) navýšení obsahu oleje oproti kontrole (51,8 % olejnatost), které se projevilo u všech variant hnojených dusíkem (v průměru o více než 6 % rel.). Vliv P na olejnatost nebyla prokázána. Obsah mastných kyselin se pohyboval v rozmezí: kys. palmitová 6,2–6,3 %, kys. stearová 3,4–3,7 %, kys. palmitolejová 0,06–0,07 %, kys. olejová 15,4–16,1 %, kys. linolová 74,1–74,4 % a kys. linoleová 0,12–0,13 %. Aplikace živin se pozitivně projevila pouze u kyseliny olejové. Její obsah se u 2. a 3. varianty zvýšil o více než 2 %, u varianty 4 téměř o 4,5 %. Avšak ani u jedné ze sledovaných kyselin nebyla zjištěna vlivem hnojení signifikantní ($P \leq 0,05$) změna v jejich obsahu.

VLIV UV ZÁŘENÍ NA BIOCHEMICKÉ PROJEVY APOPTÓZY NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ KRVE

PETR SLÁMA^{a,b}, ZBYŠEK SLÁDEK^{a,b} a DUŠAN RYŠÁNEK^b

^aÚstav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno, ^bOddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
xslama@node.mendelu.cz

UV záření je obecně považováno za induktor apoptózy buněk. Ke specifickým znakům apoptózy patří biochemické změny, které jsou nejčastěji realizované na cytoplazmatické membráně a v jádře. Biochemické změny, ke kterým dochází při apoptóze na cytoplazmatické membráně, zahrnují translokaci fosfatidylserinu. Fosfatidylserin je základní složkou cytoplazmatické membrány, je umístěn na její vnitřní straně. K translokaci fosfatidylserinu z vnitřní strany cytoplazmatické membrány na její povrch dochází v časném stádiu apoptózy. Tento děj umožňuje rozpoznání apoptotických buněk makrofágy a jejich následné odstranění fagocytózou. Annexin-V je přirozeným ligandem fosfatidylserinu a pokud je konjugován s FITC (fluorescein isothiocyanate), lze detekovat buňky podléhající časnému stádiu apoptózy.

Cílem práce bylo stanovení vlivu UV záření na biochemické projevy apoptózy neutrofilních granulocytů

(neutrofilů) krve *in vitro*. Vzorky krve byly na 30 minut vystaveny účinkům UV záření (germicidní lampa, 30 W, ve vzdálenosti 500 mm) a poté inkubovány jednu hodinu a čtyři hodiny při 37 °C a 5 % atmosféry CO₂. Pro studium apoptózy byla použita průtoková cytometrie. Apoptotické neutrofilů byly detekovány po předchozím simultánním barvení Annexin-V (FITC) a propidium jodidem.

Byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) v podílu apoptotických neutrofilů mezi kontrolními vzorky a vzorky ovlivněnými UV zářením. Po jedné hodině inkubace bylo zaznamenáno u kontrolních vzorků 11,1 % a po čtyřech hodinách inkubace 16,1 % apoptotických neutrofilů. U pokusných vzorků (UV záření) bylo zjištěno po jedné hodině inkubace 24,1 % a po čtyřech hodinách inkubace 30,3 % apoptotických neutrofilů.

Jak je z výsledků patrné, UV záření je spolehlivým induktorem apoptózy bovinních neutrofilů krve v *in vitro* podmínkách. Po expozici neutrofilů UV záření došlo přibližně k dvojnásobnému zvýšení podílu apoptotických neutrofilů oproti kontrolním vzorkům.

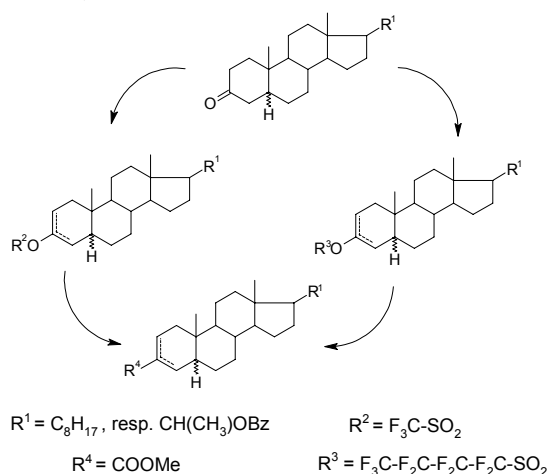
Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE 0002716201.

POUŽITÍ VINYL NONAFLÁTŮ A VINYL TRIFLÁTŮ PŘI Pd-KATALYZOVANÉ ALKOXYKARBONYLACI

EVA ŠTASTNÁ^{a,b} a HANA CHODOUNSKÁ^a

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^bKatedra organické a jaderné chemie PŘF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2
stastna@uochb.cas.cz, hchod@uochb.cas.cz

V současné době je velká pozornost věnována použití vinyl triflátů pro Pd-katalyzované reakce (např. Heckova reakce, Suzukiho či Sonogashirův coupling). Jejich výhodou je snadná příprava z karbonylových sloučenin (např. reakcí s anhydridem kyseliny trifluoromethansulfonové v přítomnosti báze).



Nevýhodou je nestabilita činidla na vzduchu. Proto se zájem obrací k činidlu, které je stabilnější, méně těkavé a jehož deriváty jsou velmi dobrou odstupující skupinou – nonafluorobutansulfonylfluorid¹.

Triflátová i nonaflátová skupina jsou vhodnými substráty pro Pd-katalyzovanou inserci oxidu uhelnatého za vzniku alkoxykarbonylových sloučenin^{1,2}. Uvedená metodika byla vyzkoušena na 5 α -cholestan-3-onu a (20*R*)-3-oxo-5 β -pregnan-20-yl benzoátu: 3-oxo skupina těchto ketonů byla převedena na vinyl nonaflát, resp. vinyl triflát. V příspěvku budou diskutovány různé syntetické a stereochemické aspekty uvedených syntéz. Popsané reakce představují vhodný způsob přípravy steroidních derivátů s hydrofilním, metabolicky stabilním substituentem v poloze 3, které jsou allosterickými inhibitory neuronových receptorů³.

Práce byla provedena v rámci výzkumného záměru ZA 055 0506, za podpory grantu GA AV IAA4055305.

LITERATURA

1. Lyapkalo I. M., Högermaier J., Reissig H. U.: *Tetrahedron* 60, 7721 (2004).
2. Skoda-Földes R., Kollár L.: *Chem. Rev.* 103, 4095 (2003).
3. Horák M., Vlček K., Chodounská H., Vyklický L. Jr.: *J. Neurosci.* 137, 93 (2006).

NAHLÉDNUTÍ DO STRUKTURY A FUNKCE LEKTINU RS20L Z BAKTERIÁLNÍHO FYTOPATOGENU *Ralstonia solanacearum*

ONDŘEJ ŠULÁK^a, NIKOLA KOSTLÁNOVÁ^a, JAN ADAM^a, EDWARD MITCHELL^b, ANNE IMBERTY^c a MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,d}

^aNatl Centre for Biomol. Res. & ^dDept Biochem., Masaryk University, Kotlářská 2, Brno; ^bE.S.R.F Experiment Division, BP220, F-38043 Grenoble cedex, France; ^cCERMAV-CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble cedex 09, France

Lektiny jsou proteiny neimunitního původu, které aglutinují buňky a precipitují glykokonjugáty. Tyto lektiny specificky rozpoznávají cukerné zbytky obsažené na povrchu buněčných stěn a membrán, a tak mění fyziologii ovlivňující aglutinaci, mitózu a další biochemické změny v buňce. Jejich specifita je obvykle definována monosacharidy a oligosacharidy, které jsou tak i nejlepšími inhibitory. Zájem o studium lektinů spočívá v jejich široké paletě vlastností a potenciálních aplikaci (zemědělství, farmakologie, imunologie, léčba rakovinného bujení atd.).

Ralstonia solanacearum je bakteriální fytopatogen způsobující hnilobná onemocnění mnoha ekonomicky významných zemědělských plodin, jako jsou například brambory, rajčata, lilek, banány, tabák a mnoho dalších. Největším problémem je, že proti tomuto patogennímu mikroorganismu doposud nebyla objevena účinná terapie a ani nebyla vyšlechtěna dostatečně rezistentní odrůda hospodářských plodin.

Rostlinné a živočišné patogeny využívají protein-sacharidových interakcí ke strategii rozpoznávání a invazi do hostitele. Hlavním smyslem studie je porozumění molekulárním mechanismům, které umožňují patogenní bakterii takto napadat, kolonizovat a ovlivňovat fyziopatologii jejich hostitele. Takovéto studie mohou napomoci k vytvoření koncepce účinného boje proti těmto patogenním agens.

Dle našich dosavadních znalostí, bakterie *R. solanacearum* produkuje tři rozpustné lektiny (RSL, RSIL a RS20L). RSL (MW 9900 Da) jeví cukernou specifitu k L-fukose² a částečnou sekvenční homologii s lektinem AAL z houby *Aleuria aurantia*³. RS-IL (MW 11601 Da)⁴ se podobá strukturou i vlastnostmi lektinu PA-IL z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která je lidským podmíněným patogenem. Liší se však cukernou specifitou⁵. Poslední z této trojice je lektin RS20L (MW 19906 Da), který vykazuje vazebnou schopnost k L-fukose, D-manose a D-xylose.

Tato práce popisuje strukturu a funkční vlastnosti RS20L. Tento lektin nemá sekvenční homologii s žádnou doposud známou aminokyselinovou sekvencí. Přestože vyřešení krystalové struktury naznačilo vysokou strukturní podobnost s živočišnými galektiny, RS20L D-galaktosu nerozpoznává.

Další funkční studie pomocí povrchové plazmonové rezonance (SPR) a mikrokolorimetrických metod umožnily charakterizovat vazebné vlastnosti (afinita, kinetika reakce) a termodynamické parametry.

Tato práce byla podporována Ministerstvem školství (MSM 0021622413) a Grantovou agenturou ČR (204/03/H016).

LITERATURA

1. Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangelot S., Arlat M., Billault A., Brottier P., Camus J. C., Cattolico L., Chandler M., Choise N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thebault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., Boucher C. A.: *Nature* 415, 497 (2002).
2. Kostlanova N., Mitchell E. P., Lortat-Jacob H., Oscarson S., Lahmann M., Gilboa-Garber N., Chambat G., Wimmerova M., Imberty A.: *J. Biol. Chem.* 280, 27839 (2005).
3. Wimmerova M., Mitchell E. P., Sanchez J. F., Gautier C., Imberty A.: *J. Biol. Chem.* 18, 27059 (2003).
4. Sudakevitz D., Kostlanová N., Blatman-Jan G., Mitchell E. P., Lerrer B., Wimmerová M., Katcoff D. J., Imberty A., Gilboa-Garber N.: *Mol. Microbiol.* 52, 691 (2004).
5. Mitchell E. P., Houles C., Sudakevitz D., Wimmerova M., Gautier C., Perez S., Wu A. M., Gilboa-Garber N., Imberty A.: *Nat. Struct. Biol.* 9, 918 (2002).
6. Seetharaman J., Kanigsberg A., Slaaby R., Leffler H., Barondes S. H., Rini J. M.: *J. Biol. Chem.* 273, 13047 (1998).

PROTEOMICKÁ A PEPTIDOMICKÁ CHARAKTERIZACE KLINICKY VÝZNAMNÝCH SPÓR VLÁKNITÝCH HUB HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

MIROSLAV ŠULC^{a,b}, KATEŘINA PEŠLOVÁ^{a,b}, MARTIN ŽABKA^b a VLADIMÍR HAVLÍČEK^b

^a*Přírodovědecká fakulta UK, Katedra biochemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2;* ^b*Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4*
msulc@biomed.cas.cz

Negativní působení houbových plísní na zdraví člověka zahrnuje alergie, infekční nemoci a mykotoxikózy. Alergie nepříznivě ovlivňují život více jak 20 % populace, systémové mykotické infekce jsou vážným problémem imunokompromitovaných pacientů po transplantacích a po chemoterapiích. Hlavní cestou průniku houbových plísní do lidského organismu je tvorba spor a jejich šíření vzduchem.

Cílem práce je nalezení specifických biomarkerů patogenicity kmenů sporulujících vláknitých hub se zaměřením na kmenově specifické peptidové sekundární metabolity či proteinové makromolekuly na povrchu spor. Kromě jejich identifikace a charakterizace je testována jejich imunomodulační aktivita.

Studovány jsou jak patogenní, tak nepatogenní kmeny sporulujících vláknitých hub rodu *Aspergillus*, *Beauveria*, *Emericella*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Pseudallescheria*, *Stachybotrys* a *Trichothecium*. Kromě přímé analýzy celých houbových spor pomocí MALDI-TOF či extraktů spor metodou hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC (s cílem hledání a optimalizace podmínek přípravy vzorku s aplikací pro rychlou vyšetřovací metodu) jsme použili většinu dostupných proteomických přístupů (1D nebo 2D elektroforéza, enzymové štěpení proteinové skvrny v gelu, charakterizace vzniklé peptidové směsi MALDI-TOF nebo LC-MS/MS analýzou – z angl. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry - s výslednou identifikací proteinu) pro nalezení proteinů, jejichž přítomnost či absence relevantně odlišuje klinicky patogenní kmeny vláknitých hub.

Většina testovaných druhů poskytuje reprodukovatelně poměrně jednoduchá ale specifická MALDI-TOF spektra v nízkém i vysokém rozsahu hodnot *m/z* a tak nabízí možnost využití pro metodu rychlého rozlišení a identifikace kmenů vláknitých hub. Detailní LC-MS/MS analýzou extraktů spor příbuzných kmenů *Beauveria* a *Paecilomyces* byl popsán a charakterizován nový cyklický peptid.

Proteomická analýza studovaných kmenů byla díky absenci genomových databází většiny studovaných kmenů úspěšná pouze LC-MS/MS analýzou. Ta poskytla velmi zajímavé výsledky především pro studovaný a klinicky významný kmen houby *Aspergillus*. Přítomnost identifikovaných proteinů (hydrofobin, superoxid dismutasa [Cu-Zn] a hemolysin) nejen odlišuje jednotlivé kmeny rodiny *Aspergillus* dle historie vzorku (původu) a tedy potenciální patogenicity, ale je i relevantní z pohledu možné virulence pozitivních kmenů a jejich interakce v těle hostitele.

Rychlost, nízký detekční limit a vysoká specifita metody identifikující patogenní kmen jsou základní kameny pro úspěšnou léčbu pacientů či zjištění kontaminace potravin, a hmotnostní spektrometrie jako analytická metoda splňuje všechny tyto požadavky.

Tato práce byla finančně podporována grantem GA ČR(203/05/P575), institucionálním záměrem AV0Z50200510 a výzkumným centrem MŠMT Lc545.

JAK POZNÁME ROSTLINU VHODNOU PRO FYTOREMEDIACI PROSTŘEDÍ ZNEČIŠTĚNÉHO TĚŽKÝMI KOVY?

VERONIKA ŠUPÁLKOVÁ^{a,b}, KAREL STEJSKAL^c, JOSEF ZEHNÁLEK^a, ANDREA KLECKEROVÁ^b, LADISLAV HAVEL^a a RENÉ KIZEK^b

^aÚstav chemie a biochemie, ^bÚstav biologie rostlin, Agronomická fakulta, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cKatedra biochemie, PFF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
vevek@centrum.cz, kizek@sci.muni.cz

Výsledky studií mechanismů detoxikace a metabolismu toxických těžkých kovů přispívají nejen k lepšímu pochopení základních biologických mechanismů probíhajících v živých organismech, ale také ke tvorbě nových biotechnologických postupů a zařízení. Nedávno byly objeveny rostlinné druhy, které jsou schopny těžké kovy akumulovat bez viditelné deprese a zpomalení růstu. Těto schopnosti je možné využívat právě u fytoremediací, která je definována jako užití zelených rostlin k přesunu, akumulaci nebo odstraňování kontaminantů z životního prostředí. Proti působení těžkých kovů působí v rostlině hned několik různých mechanismů, ale zdá se, že tím nejdůležitějším je syntéza látek bohatých na cystein, především glutathionu a fytochelatinů. Tyto polypeptidy mají základní strukturu $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, kde se dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteinu ($\gamma\text{-Glu-Cys}$) může opakovat 2 až 11krát (nejčastěji 2-5krát).

Předpokládá se, že rostliny, které mají větší schopnost akumulace těžkých kovů, jsou schopny syntetizovat vyšší množství obranných thiolových sloučenin^{1,2}. Proto jsme se v naší práci zaměřili na navržení vhodných technik pro posouzení schopnosti rostlin fytoremediovat půdu znečištěnou těžkými kovy pomocí detekce thiolových látek. Pro tyto účely jsme nejdříve využili techniku zvanou Brdičkova reakce. Použité buněčné suspenzní kultury tabákových buněk BY-2 a explantátové kultury embryí smrku různých klonů byly vystaveny koncentracím kadmiových a olovnatých iontů od 10 po 1 000 μM . Zjistili jsme, že se embryonální kultury vyznačují výrazně vyšší odolností vůči těžkým kovům.

Dále jsme jako experimentální model zvolili rostliny kukuřice, které jsme analyzovali pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí, kde byly limity detekce glutathionu a různých forem fytochelatinů okolo 1 respektive 10 ng/ml. Rostliny kukuřice byly vystaveny šesti různým koncentracím kadmia (50, 100,

150, 200, 400 a 500 μM) po dobu šesti dnů. Obsah thiolů u všech ovlivněných rostlin se vzrůstající koncentrací aplikovaného kadmia a dobou expozice vzrůstá asi o 500–1800 % (v porovnání s kontrolou). Na konci expozice byl roven přibližně 1700 ng na gram svěží hmotnosti u nejvyšší aplikované dávky. Zatímco obsah PC₂ mezi třetím a čtvrtým dnem expozice dosáhl svého maxima a poté se již příliš neměnil. A dále v důsledku využívání platinových derivátů jako efektivních cytostatik jsme se rozhodli zkoumat vliv cisplatin (0, 5, 10, 20, 40, 80 a 160 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) na okřehek po dobu pěti dnů. Od třetího dne dochází k výrazné metabolické změně, která je charakteristická prudkým poklesem obsahu volné cisplatin a výrazným vzestupem obsahu thiolových látek.

V této práci je ukázáno, že citlivé analytické techniky mohou sloužit jako nástroje pro charakterizaci různých rostlinných druhů s ohledem na jejich využití ve fytoremediacích.

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GA ČR 522/07/0692 a 1M06030.

LITERATURA

1. Petrlova J., Mikelova R., Stejskal K., Kleckerova A., Zitka O., Petrek J., Havel L., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L., Kizek R.: J. Sep. Sci. 29, 1166 (2006).
2. Potesil D., Petrlova J., Adam V., Vacek J., Klejduš B., Zehnalek J., Trnkova L., Havel L., Kizek R.: J. Chromatogr., A 1084, 134 (2005).

MECHANISM OF GENOTOXICITY OF THE ENVIRONMENTAL POLLUTANT 3-NITROBENZANTHRONE AND ITS METABOLITE 3-AMINOBENZANTHRONE

MARTINA SVOBODOVÁ^a, JANA MIZEROVSKÁ^a, VOLKER M. ARLT^b a MARIE STIBOROVÁ^a

^aDepartment of Biochemistry, Charles University, 128 40 Prague 2; ^bInstitute of Cancer Research, Sutton, Surrey SM2 5NG, UK

3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) is a suspected human carcinogen identified in diesel exhaust and air pollution. The main metabolite of 3-NBA, 3-aminobenzanthrone (3-ABA) has been found in urine samples of salt mine workers occupationally exposed to diesel emissions, demonstrating that human exposure to 3-NBA in diesel emissions can be significant and is detectable. 3-NBA is carcinogenic in rats, causing lung tumours after intratracheal instillation and is also an exceptionally potent mutagen. We identified the phase I and II enzymes, which are responsible for 3-NBA genotoxicity, participating in activation of 3-NBA and 3-ABA. Among the phase I enzymes, the most of the reductive activation of 3-NBA to form DNA adducts in vitro is attributable to NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1), while *N,O*-acetyltransferases (NATs), followed by sulfotransferases SULT1A1 and 1A2, are the major phase II enzymes activating 3-NBA. 3-ABA is oxidatively activated,

predominantly by human hepatic CYP1A1 and 1A2, to form the same DNA adducts as 3-NBA. Kinetics of 3-NBA reduction by NQO1 and that of 3-ABA oxidation by microsomal CYP enzymes was studied in detail. 3-ABA, found to be the main metabolite of 3-NBA in human, is the final reductive metabolite of this carcinogen formed also in vitro, by 3-NBA reduction with NQO1. 3-ABA is oxidized to N-OH-3-ABA derivative, which is responsible for formation of the DNA adducts. Structures of three major adducts were identified as 2-(2'-deoxyadenosin-N6-yl)-3-aminobenzanthrone, N-(2'-deoxyguanosin-N2-yl)-3-aminobenzanthrone and N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone. To evaluate the importance of hepatic cytosolic enzymes in relation to microsomal NADPH:cytochrome P450 (CYP) reductase (CPR) in the activation of 3-NBA in vivo, we treated hepatic CPR-null and wild-type C57BL/6 mice with 3-NBA. 3-NBA is predominately activated by cytosolic nitroreductases (NQO1) rather than microsomal CPR. In the case of 3-ABA, CYP1A1/2 enzymes are essential for the oxidative activation of 3-ABA in livers.

Supported GACR (303/05/2195) and MSMT CR (MSM002162080).

CHARAKTERIZACE RHIZOSFÉRNÍCH BAKTERIÍ KŘENU SELSKÉHO V PŮDĚ KONTAMINOVANÉ POLYCHLOROVANÝMI BIFENYLY

**ONDŘEJ UHLÍK^{a,b}, MILOSLAV ŠANDA^a,
KATEŘINA FRANČOVÁ^b, MARTINA MACKOVÁ^b
a TOMÁŠ MACEK^a**

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^bÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
ondrej.uhlik@seznam.cz

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou organické sloučeniny obecného vzorce C₁₂H_{10-x}Cl_x. Do 80. let byly PCB syntetizovány ve velkém množství. Když se zjistilo, že se akumulují v životním prostředí a mohou mít negativní vliv na lidské zdraví, byla jejich produkce zastavena. Protože chemické či fyzikální metody odstraňování těchto látek z životního prostředí jsou velmi nákladné, pozornost se soustřeďuje k fytořemediaci – využití konsorcií rostlin a jejich rhizosférních bakterií pro degradaci. Rostliny uvolňují do půdy organické látky, které podporují bakterie odbourávající organické kontaminanty; rhizosféra se tak stává dokonalým prostředím pro mikrobiální degradaci polutantu (rhizoremediace).

Jako modelový systém pro izolaci a následnou charakterizaci bakterií degradujících PCB jsme použili křen selský (*Armoracia rusticana*) a jeho rhizosférní bakterie. Protože interakce mezi rostlinou a jejími rhizosférními bakteriemi jsou ovlivněny celou řadou biologických a abiotických podmínek (např. stres způsobený růstem rostliny v kontaminované půdě), byly rostliny ošetřovány roztoky brassinosteroidů – fytohormonů, které napomáhají rostlině překonávat stres. Rhizosférní bakterie byly izolovány

kultivací na minerálním médiu s bifenyly jako jediným zdrojem uhlíku a poté podrobeny analýze ribosomálních proteinů s využitím MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Touto metodou je možné identifikovat bakterie na úrovni rodu, druhu i kmenu. Protože dosud nejsou přístupné databáze s těmito spektry, byla spektra izolovaných bakterií porovnávána se spektry v literatuře již popsaných degradérů PCB (*Burkholderia xenovorans* LB400, *Comamonas testosteroni* B356, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JAB1 a další) a metoda porovnávání spekter rovněž sloužila k monitorování kvalitativních změn v mikrobiotě. Žádný z doposud popsaných degradérů PCB nebyl detekován.

Izolované bakterie byly testovány na přítomnost *bphA1* genu (gen kódující první enzym bifenylového operonu – dráhy, kterou bakterie využívají pro degradaci PCB). Gram negativní nefermentující bakterie byly identifikovány pomocí sady NEFERMtest 24 (Lachema, ČR). Tato metoda se ale ukázala pro tyto účely jako nevhodná, a proto se přistoupilo k identifikaci (příp. klasifikaci) pomocí sekvenace genů kódujících 16S rRNA. Spektra identifikovaných bakterií pak poslouží k vytvoření knihovny, která umožní do budoucna podstatně jednodušší, levnější a rychlejší identifikaci bakterií degradujících PCB.

Tato práce byla podporována projekty MSMOC-111 Cost 859, MŠMT Grant NPVII 2B06156, GAČR 203/06/0563.

ANALÝZA TEPLA ZÁVISLÝCH MUTANTŮ p53 V LIDSKÝCH NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH H1299

**JANA VAŇKOVÁ^{a,b}, DIANA GROCHOVÁ^{a,b},
a JANA ŠMARDOVÁ^a**

^aLaboratoř molekulární patologie ÚPA FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, ^bÚstav experimentální biologie, Biologická sekce, PŘF Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
janca.vanca@seznam.cz

Nádorový supresor p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který v odpověď na buněčný stres transaktivuje své cílové geny a podílí se tak na kontrole buněčného cyklu, regulaci apoptózy a oprav DNA. U více než poloviny lidských nádorů byly nalezeny mutace v genu p53. Nejčastější jsou bodové mutace a to především v centrální doméně p53, která odpovídá za sekvenčně specifickou vazbu na DNA. Tyto mutace mají za následek ztrátu schopnosti proteinu p53 vázat se na DNA v promotorech cílových genů a tím aktivovat jejich transkripci.

Mutace v genu p53 lze detekovat různými metodami, například funkční analýzou separovaných alel v kvasinkách („functional analysis of separated alleles in yeast“ – FASAY), která využívá schopnosti lidského proteinu p53 fungovat i v kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae* jako transkripční faktor a následně transkripcí reportérského genu *ADE2*. Na selekčním médiu pak lze rozlišit bílé kolonie exprimující standardní p53 a červené kolonie exprimující mutantní p53. Výhodou FASAY je, že dokáže odlišit částečně inaktivující mutace p53, např.

teplotně závislé mutace p53, které způsobují růžové zbarvení kvasinkových kolonií.

S využitím metody FASAY jsme shromáždili 23 teplotně závislých (*td*) mutací p53 z různých lidských nádorů. V kvasinkovém expresním systému jsem studovali funkční a konformační vlastnosti *td* mutantů p53 vzhledem ke třem různým responsabilním elementům (RE) odvozeným z promotorových oblastí cílových genů p53 (*p21*, *bax*, *RGC*) ve třech různých teplotách (25, 30, 35 °C). Všechny analyzované varianty p53 jsme dále přechodně exprimovali v lidských nádorových buňkách H1299 odvozených z plicního karcinomu. V nich jsme provedli jejich transkripční a konformační analýzu vzhledem k typu RE (*p21*, *bax*, *RGC*) ve dvou různých teplotách (32, 37°C). Srovnávali jsme vlastnosti *td* mutantů p53 v kvasinkových a lidských buňkách.

Zjistili jsme, že *td* mutantů p53 se chovají velmi podobně jak v lidském, tak i kvasinkovém expresním systému. Vykazují teplotní závislost a diskriminativní charakter (tzn. liší se mírou afinity k různým RE) v lidských i kvasinkových buňkách. Analýza v lidských nádorových buňkách H1299 je citlivější. Zatímco FASAY hodnotí transkripční aktivitu proteinů p53 jen podle barevné škály kvasinkových kolonií, transkripční test v lidských buňkách založený na měření aktivity luciferasy umožňuje přesnější stanovení transkripčních schopností proteinů p53. Také dokáže rozeznat mutanty p53 s vyšší transkripční schopností než má standardní p53.

Podrobné studium různých funkčních variant proteinu p53 může pomoci pochopení procesů a funkce proteinu p53 v nádorových buňkách a navržení nových terapeutik reaktivujících p53.

Tato práce byla podpořena grantem MSM 0021622415.

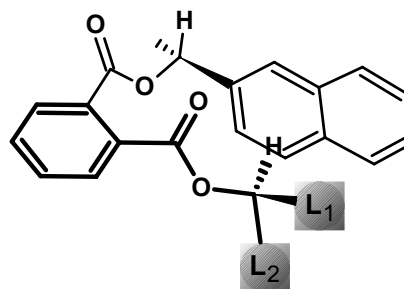
VYUŽITÍ MONOSUBSTITUOVANÝCH FTALOVÝCH KYSELIN PRO URČENÍ ABSOLUTNÍ KONFIGURACE CHIRÁLNÍCH ALKOHOLŮ POMOCÍ ¹H NMR

JAN VÁVRA a LUDVÍK STREINZ

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Oddělení přírodních látek, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha vavraj@email.cz, streinz@uochb.cas.cz

Jednokrokovou syntézou bez nutnosti chromatografie byly připraveny aryethylsubstituované ftalové kyseliny, které byly následně použity pro derivatizaci sady chirálních sekundárních alkoholů¹ metodou esterifikace s DCC/DMAP. Byly diskutovány hodnoty rozdílů chemických posunů $\Delta\delta$ v ¹H NMR v závislosti na přítomném aromátu (Ph, 1-Np, 2-Np). Díky nejvyšším hodnotám ve většině případů byla pro další experimenty vybrána kyselina 2-[[1-(2-naftyl)ethoxy]karbonyl]benzoová. Dále byla zjišťována korelace mezi absolutní konfigurací zkoumaného alkoholu a znaménkem $\Delta\delta$ příslušných diastereomerních vodíků na základě navrženého modelu (nejpravděpodobnější konformace vypočtena metodou geometrické optimalizace).

Bylo zjištěno, že pravidelnosti hodnot $\Delta\delta$ umožňují použití činidla pro stanovení absolutní konfigurace sekundárních alkoholů, avšak ukázalo se, že rozdíly posunů nejsou vyšší než např. u Mosherovy kyseliny. Přesto snadná a ekonomicky dostupná syntéza bez nutnosti dělení jednotlivých enantiomerů činidla činí tuto kyselinu zajímavou alternativou.



Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt č.203/05/2141).

LITERATURA

1. Seco J. M., Quinoa E., Riguera R.: Chem. Rev. 104, 17 (2004).

IZOLACE, PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASY KVASINKY *Candida tropicalis* PARTICIPUJÍCÍ NA PRVNÍ FÁZI BIODEGRADACE FENOLU

L. VILÍMKOVÁ, V. KREMLÁČKOVÁ, J. PÁČA a M. STIBOROVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2 lenvil@post.cz

Při biodegradacích dochází k rozkladu chemických látek prostřednictvím metabolického potenciálu řady mikroorganismů. Jedná se obvykle o metody ekonomické a šetrné k našemu životnímu prostředí. Kvasinka *Candida tropicalis* vykazuje schopnost využívat fenol jako hlavní zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Naše laboratoř pracuje s kmenem Ct2, který byl izolován z kontaminované půdy na Mostecku.

Na prvním kroku degradace fenolu, tedy jeho oxidaci na catechol, participují jak enzymy mikrosomální (systém oxygenas se smíšenou funkcí a cytochromem P450 jako terminální oxidasou), tak cytosolární. Zde se jedná o NADPH-dependentní fenolhydroxylasu (EC 1.14.13.7). Cytosolární NADPH-dependentní fenolhydroxylasa je fenolem indukována, buňky kultivované v mediu obsahujícím fenol vykazovaly zvýšenou aktivitu tohoto enzymu.

Izolace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy byla optimalizována na následující čtyři kroky: chromatografií na sloupci DEAE-Sepharosy (k eluci proteinů byl použit gradient NaCl), rechromatografií na stejném nosiči, frakční precipitací polyethylenglykolem 6000 a gelovou permeační

chromatografii na sloupci Sephacrylu S300. Purifikovaný enzym byl částečně charakterizován. Jedná se o tetramer o celkové molekulové hmotnosti 240 000. Kinetika enzymové reakce katalyzované tímto enzymem odpovídá reakční kinetice Michaelise a Mentenové. pH optimum tohoto enzymu leží v oblasti pH 7,4–7,6. Ze spektrální analýzy plyne, že se jedná o flavinový enzym. Kvalita získaného enzymového preparátu byla potvrzena pomocí SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).

Finančně podporováno GA ČR (grant 303/05/2195 a 104/04/0686) a MŠMT ČR (grant MSM 0021620808).

MODIFIKACE ČÁSTIC MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU PRO JEJICH TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ

**IRENA VORÁČKOVÁ, PAVEL ULBRICH,
ŠIMON BEDNÁŘ a TOMÁŠ RUML**

Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum aplikované genomiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 166 28 Praha 6

V poslední době vzrůstá počet studií zabývajících se terapeutickým využitím modifikovaných virových částic. Jedná se především o dopravu terapeutických genů do specifických tkání nebo imunoterapie. Výhoda virových vektorů spočívá v jejich účinné infekci buněk a ve velikosti nesené DNA či RNA.

Tato práce se zabývá modifikací částic připravených ze strukturních proteinů Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV) a jejich následným využitím pro genové terapie či imunizaci. Již dříve byl v naší laboratoři vyvinut vysoce účinný *in vitro* systém tvorby viru podobných částic ze strukturního polyproteinu Gag M-PMV a jeho delečních mutantů. Tohoto systému bylo využito při přípravě modifikovaných částic. Modifikace povrchu částic spočívala v *N*-koncovém prodloužení strukturního proteinu specifickým peptidem, který by částice složené *in vitro* cílil do určitých typů buněk. Pro směrování částic do specifických tkání byly vybrány peptidy, které interagují s rakovinnými buňkami prostaty a s endoteliálními buňkami. K imunoterapiím byl vybrán peptid, který je součástí membránového antigenu buněk prostaty (PSMA). Částice modifikované tímto peptidem je možné využít k imunizaci proti rakovině prostaty.

V obou případech se nám podařilo připravit modifikované částice. Schopnost peptidů cílit částice do recipientních buněk, vstup částic do buňky a uvolnění neseného terapeutického genu bude sledována na tkáňových kulturách. Imunizace připravenými částicemi bude testována na myším modelu.



SIGMA-ALDRICH

SEZNAM AUTORŮ

Adam, Jan	427, 458	Holada, Karel	430, 437
Adam, Vojtěch	437	Holý, Antonín	454
Anzenbacher Jr., Pavel	454	Holý, Petr	455, 456
Arlt, Volker M.	460	Hortíková, Zdena	440
Badal, Vinay	440	Horváth, Viktor	450
Baldus, Stephan	446	Hošek, Jan	438
Bartl, Tomáš	427	Hroudová, Miluše	439
Bartoš, Milan	438	Hublarová, Pavla	440
Bartošová, Ladislava	438	Chodounská, Hana	458
Bašová, P.	428	Chrastilová, Zuzana	440
Bednář, Šimon	463	Imberty, Anne	427, 458
Beier, Petr	428	Imramovský, A.	434
Beklová, Miroslava	437	Jágr, Michal	441
Bělohradský, Martin	433, 456	Jahodář, Luděk	443
Beneš, Luděk	427	Janderka, Pavel	436
Bezouška, K.	428	Jandurová, Zuzana	441
Bílková, Zuzana	442	Jankovičová, Barbora	442
Bišová, Kateřina	428	Jesenská, Andrea	445
Bohatcová, Irena	429	Jiráček, Jiří	450
Bouchal, Pavel	430	Jiříkovská, Renata	427
Broučková, Adéla	430	Jurček, Ondřej	442
Brožková, Kristýna	430	Kalbáčová, Marie	448
Březinová, Lenka	429	Karličková, Jana	443
Budka, Jan	447	Kilsá, Kristine	455, 456
Buchta, Vladimír	443	Kizek, René	437, 460
Burketová, Lenka	444	Kleckerová, Andrea	460
Buřičová, Lucie	431	Kniežo, Ladislav	452
Ciencialová, Alice	450	Knížetová, Petra	444
Císařová, Ivana	433, 448	Knoflíčková, Dana	430
Cvek, Boris	432	Koča, Jaroslav	427
Čejková, Darina	431	Kochánková, Lucie	449
Čejková, Pavlína	432	Kolář, Zdeněk	444
Černá, Marie	432	Kolorz, Michal	438
Damborský, Jiří	445	Konopka, Roman	444, 451
Dekoj, Václav	433	Kopská, Tereza	435
Dostál, Ctibor	432	Korbelová, Barbora	444
Dračínský, Martin	433	Kostlánová, Nikola	458
Drašar, Pavel	442, 456	Koudeláková, Táňa	445
Dvořák, Zdeněk	432	Kovář, Jan	435
Eilbracht, Peter	445	Kozubík, Alois	450
Eiserich, Jason P.	446	Král, Vladimír	456
Férriz, J. M.	434	Královský, Josef	442
Fojtíková, Lucie	442	Krausová, Zuzana	445
Fojtíková, Markéta	432	Krejčík, Zdeněk	438
Frančová, Kateřina	461	Kremláčková, V.	446, 462
Frébort, Ivo	454	Křen, V.	428
Frýdlová, Zuzana	435	Křenek, K.	428
Fürstová, Vlasta	435	Kříž, Zdeněk	427
Gažák, R.	428	Kubala, Lukáš	444, 446, 451
Gernátová, Matilda	436	Kubíková, Kateřina	443
Ghanbari, Hossein A.	451	Kundrát, Ondřej	447
Glierová, Hana	437	Langrová, Tereza	447
Grodecká, Lucie	445	Lebowitz, Michael S.	451
Grochová, Diana	461	Lehocký, Marián	448
Hanuštiak, Pavel	437	Levková, Monika	444
Havel, Ladislav	429, 460	Lhoták, Pavel	447
Havlíček, Vladimír	459	Lišková, Jana	448
Havlová, Marie	435	Lojek, Antonín	444, 446, 450
Hlavsová, Klára	438	Loučka, Peter	438
Hlobilková, Alice	444	Macek, Tomáš	440, 449, 450, 461
Hodek, Petr	437, 452	Macková, Martina	438, 440, 449, 450, 461

Marek, Josef	432	Stejskal, Karel	460
Martásek, Pavel	456	Stibor, Ivan	447
Matějková, Petra	431	Stiborová, M.	446, 462
Mělková, Zora	448	Stiborová, Marie	460
Mikelová, Radka	437	Stránský, Vladimír	441
Miláčková, Ivana	427	Streinz, Ludvík	462
Míšek, Jiří	448	Strnad, Hynek	438
Mitchell, Edward	458	Strouhal, Michal	431
Mizerovská, Jana	460	Svobodová, Jana	438
Monincová, Marta	445	Svobodová, Martina	460
Mráz, Jaroslav	441	Szekeres, Miklos	440
Müller, Lukáš	432	Šaman, David	445, 448
Nagata, Yuji	445	Šanda, Miloslav	461
Najmanová, Jitka	449	Šašek, Vladimír	444
Navrátilová, Jarmila	450	Šimák, Ondřej	456
Nenutil, Rudolf	430, 440	Škarpa, Petr	457
Neubaerová, Tereza	450	Šmajš, David	431
Neuwirthová, Petra	451	Šmarda, Jan	450
Nielsen, Mogens B.	455, 456	Šmardová, Jana	461
Novák, Petr	452	Šťastná, Eva	458
Nováková, Martina	440	Šulák, Ondřej	458
Obšil, Tomáš	452	Šulc, Miroslav	452, 459
Okénková, Kateřina	451	Šupálková, Veronika	460
Otáhalová, Eva	451	Taraba, Jan	432
Páca Jr., J.	446	Teplý, Filip	448
Páca, J.	446, 462	Tichý, Miloš	448
Pačes, Václav	438	Trešlová, Ludmila	432
Pachernik, Jiří	444	Turek, M.	446
Panigaj, Martin	437	Uhlík, Ondřej	461
Parkan, Kamil	452	Ulbrich, Pavel	463
Pavliš, Oto	453	Ulrichová, Jitka	432
Pešlová, Kateřina	452, 459	Umen, James G.	428
Pohanka, Miroslav	453	Valentová, Olga	444
Pohl, Radek	454	Vaňková, Jana	461
Pokorná, Martina	427	Vaňková, Radka	435
Pomeisl, Karel	454	Vávra, Jan	462
Pospíšilová, Hana	454	Vavříková, E.	434
Prakash, G. K. Surya	428	Vechetová, Eliška	438
Prokop, Zbyněk	445	Vilímková, L.	462
Rambousková, Jaroslava	427	Vinšová, J.	434
Rěblová, Zuzana	431	Vlašínová, Helena	429
Rösnerová, Šárka	442	Vlček, Čestmír	438
Rotter, Leopold	440	Vojtěšek, Bořivoj	430, 440
Rotterová, Pavla	440	Voráčková, Irena	463
Ruml, Tomáš	463	Votruba, Ivan	454
Rybáček, Jiří	455, 456	Vrzal, Radim	432
Rybáčková, Markéta	456	Weinstock, George M.	431
Ryšánek, Dušan	447, 457	Wilhelmová, Nad'a	435, 451
Řeháková, Zuzana	443	Wimmer, Zdeněk	442
Sabin, Charles	427	Wimmerová, Michaela	427, 458
Sato, Yukari	445	Zarevúcka, Marie	438
Sehnal, Petr	445	Závada, Jiří	455, 456
Sejbal, Jan	433	Zehnálek, Josef	460
Senda, Toshiya	445	Zeman, Ladislav	437
Schroeder, Detlef	433	Zibinsky, Mikhail	428
Skládal, Petr	453	Zobaniková, Marie	431
Sládek, Zbyšek	447, 457	Žabka, Martin	459
Sláma, Petr	457	Žádníková, Petra	427
Slanina, Jiří	429	Živný, Jan	437
Sovová, Helena	438		
Spišáková, Martina	448		
Stará, Irena G.	445, 448		
Starý, Ivo	445, 448		
Stašková, Petra	427		



OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	371	EDITORIAL	371
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Molekulární charakterizace mikrobiálních NAD(P) a Zn-dependentních alkoholdehydrogenas	372	Molecular Characterization of Microbial NAD(P) and Zn-Dependent Alcohol Dehydrogenases	372
A. Kotrbova-Kozak, J. Sajdok a P. Kotrba		A. Kotrbova-Kozak, J. Sajdok, and P. Kotrba	
Rastlinné lipoxygenázy – struktúra a mechanismus biokatalýzy	384	Plant Lipoxygenases – Structure and Mechanism of Biocatalysis	384
M. Vanko, I. Holková, M. Obložinský, F. Bilka a L. Bezáková		M. Vanko, I. Holková, M. Obložinský, F. Bilka, and L. Bezáková	
Rozmrazovací směsi a jejich vliv na okolí letišť	391	Deicing Agents and Their Impact at Airports	391
I. Jiříček, J. Macák, V. Janda, M. Pazderová a P. Malý		I. Jiříček, J. Macák, V. Janda, M. Pazderová, and P. Malý	
Mobilita, transformace a základní metody stanovení sloučenin arsenu v půdě a rostlinách	397	Mobility, Transformation, and Essential Methods of Determination of Arsenic Compounds in Soil and Plants	397
J. Száková, M. Mihaljevič a P. Tlustoš		J. Száková, M. Mihaljevič, and P. Tlustoš	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Stanovení Cr(III) a Cr(VI) metodou iontové chromatografie	406	Determination of Cr(III) and Cr(VI) by Ion Chromatography	406
P. Janoš, P. Kuráň a M. Řídká		P. Janoš, P. Kuráň, and M. Řídká	
Vsolňovací efekt, výpočet aktivitních koeficientů a stanovení Gibbsových přenosových funkcí K ⁺ , Ba ²⁺ [Co(bipy) ₃] ²⁺ a [Co(bipy) ₃] ³⁺ v zmesiach voda-acetonitril	411	The Salting-in Effect, Calculation of Activity Coefficients and Determination of Gibbs Transfer Functions of K ⁺ , Ba ²⁺ , [Co(bpy) ₃] ²⁺ a [Co(bpy) ₃] ³⁺ in Water–Acetonitrile Mixtures	411
J. Benko, O. Vollárová, M. Aranyosiová a A. Bald		J. Benko, O. Vollárová, M. Aranyosiová, and A. Bald	
Korozní vlastnosti a složení pórové vody bentonitů	415	Corrosion Properties and Composition of Pore Water From Bentonites	415
E. Hynková, Z. Čechová a G. Sádovská		E. Hynková, Z. Čechová, and G. Sádovská	
NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE	422	NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY	422
VII KONFERENCE SIGMA-ALDRICH	425	VII SIGMA-ALDRICH CONFERENCE	425

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 101 (2007), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 131, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 117 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORŮ/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hettflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámotný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvicka (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/ EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Mišek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE 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://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2007 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plně předplatné 2007 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2007 (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 • Dáno do tisku 2.5.2007.