

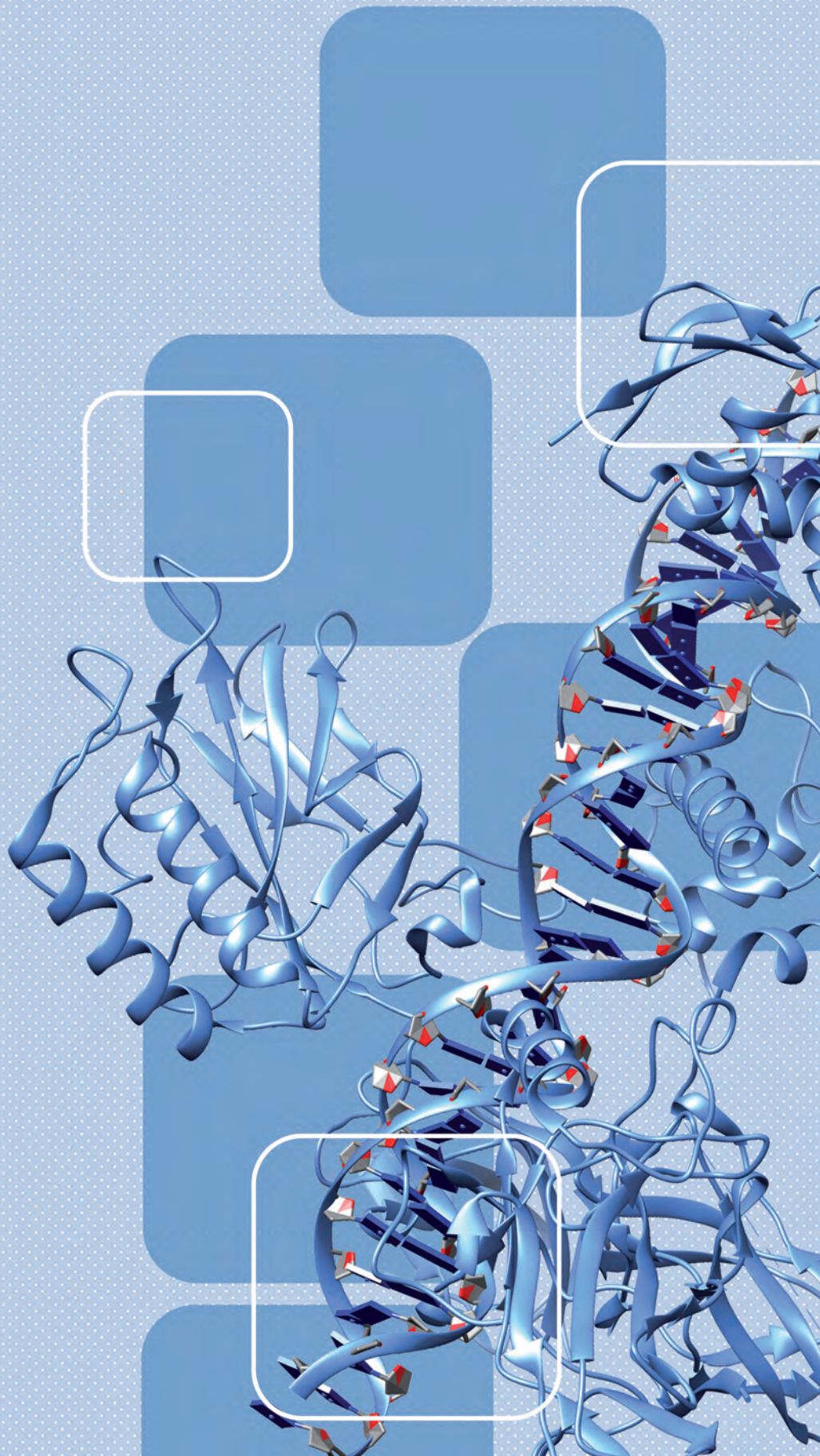
# Bio

Ročník 34 • Číslo 1/2024

# prospect

**BULLETIN  
BIOTECHNOLOGICKÉ  
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena  
Českého svazu  
vědeckotechnických  
společností (ČSVTS)  
a  
člena „European  
Federation  
of Biotechnology“  
(EFB)





# Bio prospect

Society address: University of Chemistry and Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.  
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: [danka.pokorna@vscht.cz](mailto:danka.pokorna@vscht.cz), IČO 00570397,  
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

---

## **BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY**

**founding member of the Czech Association of Scientific  
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and**

**member of European Federation of Biotechnology  
<http://www.efbiotechnology.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

**For more information contacts the editorial board or directly:**

Assoc. Prof. Dana Pokorna, PhD  
UCT Prague  
+420 220 443 151

# ÚVODEM

Vážení přátelé,

vítáme Vás v prvním čísle našeho letošního Bioprospectu, kdy dochází ke změně hlavní redaktorky. Dosavadní hlavní redaktorku doc. Ing. Petru Lipovovou, Ph.D. nahradí doc. Ing. Dana Pokorná, Ph.D. Doc. Lipovová zůstává členkou redakční rady a patří jí náš velký dík za dlouholetou činnost hlavní redaktorky. Vaše příspěvky posílejte nyní na adresu Danka.Pokorna@vscht.cz. Dochází též ke změnám v redakční radě. V tomto směru bychom rádi poděkovali všem členům redakční rady za dosavadní spolupráci, zejména těm, kteří odcházejí či odešli do důchodu nebo změnili své profesní aktivity. Redakční radu v průběhu roku doplníme o nové členy. Bohužel, v současné hektické době, jsme nebyli schopni účast všech nových členů rady projednat. Uvítáme všechny zájemce, kteří by se chtěli se na tvorbě Bioprospectu podílet. V případě zájmu laskavě kontaktujte doc. Pokornou.

Rádi bychom Vás požádali o sledování webových stránek naší společnosti, které se snažíme postupně aktualizovat (<http://bts.vscht.cz>) a webové stránky naší střešní organizace ČSVTS, kde můžete získat mnoho zajímavých novinek o činnosti ostatních členů ČSVTS.

Do činnosti společnosti zasáhly velké změny způsobené řadou náročných událostí, především „covidovou“ érou a dalšími komplikacemi (změnami ve struktuře výrobních podniků, výzkumných pracovišť i vysokoškolských útvarů) a budeme se s tím muset postupně vyrovnat.

Přesto i v letošním roce zůstávají členské příspěvky nezměněné a činí 300 Kč, respektive 150 Kč pro studenty a důchodce. Příslušnou částku, prosím, ukažte na bankovní účet společnosti 19534-061/0100 pod VS, kterým je Vaše členské číslo.

To je součást adresy nebo jej můžete zjistit na adrese Danka.Pokorna@vscht.cz.

V letošním roce uskutečníme opožděnou valnou hromadu naší společnosti a zvolíme její nové vedení. Zájem o kandidaturu, respektive návrhy na členy je možno podávat rovněž na adresu hlavní redaktorky Bioprospectu.

Jako obvykle si připomeneme některá zajímavá letošní výročí:

20 let v Evropské unii – Od 1. 9. 2004

50 let pražského metra – první úsek pražského metra byl otevřen 9. května 1974

a to Florenc (tehdy Sokolovská) – Kačerov „trasa C“.

600 let od smrti Jana Žižky (1424)

Významná výročí slavných českých hudebních skladatelů:

Bedřich Smetana 200 let od narození a 140 let od úmrtí

Antonín Dvořák 180 let od narození

Leoš Janáček 170 let od narození

Josef Bohumil Foerster 165 let od narození

Josef Suk 150 let od narození

1000 let prvních papírových bankovek v Číně  
První papírové peníze byly vyrobeny v čínské provincii Sečuan. Jmenovaly se JiaOZI. Papír se vyráběl z vnitřní kůry moruše a na bankovkách byly zvířecí motivy a lidské postavy. Papírové peníze postupně vyřešily nepraktické používání mincí nebo drahokamů. V Evropě se začaly papírové peníze používat až v 17. století ve Švédsku.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš, Dana Pokorná  
a kolektiv redakce Bioprospectu

# VESMÍRNÉ BIOTECHNOLOGIE – MIKROGRAVITACE S ČESKOU STOPOU

Zdeněk Opatrný<sup>1</sup>, Simona Lencová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra experimentální biologie rostlin PŘF UK, [opat@natur.cuni.cz](mailto:opat@natur.cuni.cz)

<sup>2</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, [lencovas@vscht.cz](mailto:lencovas@vscht.cz)

## Úvod

V polovině září se na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze (VŠCHT Praha) konal mezinárodní seminář s poněkud sci-fi názvem – **Vesmírné biotechnologie**. Pojednával o tématu, jež je ve společnosti stále více zmiňováno nejen jako vize, ale jako narůstající realita. Jeho organizátory byly jednak zmíněná VŠCHT Praha, jednak spolek Biotrin s mnohaletou vědecko-popularizační aktivitou v oboru mikrobiálních a rostlinných biotechnologií.

První autor tohoto článku není svojí profesí astrobiolog. K zájmu o kosmická dění jej od mládí lákala zejména literární sci-fi. S popisy budoucích vesmírných zahrad se prvně setkával v románech Stanislawo Lema, Raye Bradburyho či A. C. Clarka. S postupem let se samozřejmě rychle zpřesňovaly odborné informace o technologiích, zajišťujících astronautům/kosmonautům nejen potřebnou potravu, ale také recyklování všemožných „sekundárních produktů“ těchto cest. Měnily se také představy o vlastnostech takto pěstované „biomasy“. Místo přednostního využití jedlých mikroorganismů či řasových kultur pro různé typy „amarounů“ se objevily projekty skutečných skleníků, osázených nejrůznějšími rostlinami a plnicích tak i funkci psychologickou.

Někdy před pěti lety se na autora obrátila novinářka Lucie Tomanová, chystající článek o „**vesmírném obilí**“, iniciovaný zejména poznatky a výsledky nejprve čínských, a pak i amerických výzkumníků<sup>1</sup>. Obsahoval i různé úvahy o nadcházejícím propojení agrotechnologií kosmických s těmi pozemskými. Nejen o samotném kosmickém pěstování, ale zejména kosmickém šlechtění unikátních odrůd také pro pozemské agrosystémy. Autorka vycházela zejména z nadšených zpráv o „přidané hodnotě“ čínských orbitálních letů, vracejících se na Zemi s pytlíčky semen různých plodin, která byla vystavena všelikému kosmickému záření (či jiným působkům). A která pak na pokusných polích občas vykazovala i mimořádné výnosové vlastnosti. Citujeme: „**Výhodou nahodilých vesmírných mutací jsou tak nové kombinace užitečných genů a jimi kódovaných vlastností, které by nás na Zemi v laboratoři nenapadly. Obě metody je pak možné libovolně kombinovat. Jak vesmírná mutageneze, tak genové editace budou pravděpodobně klíčové pro přežití lidstva v budoucnu.**“

Opravdu budou? Bytostný skeptik samozřejmě začal uvažovat, zda ono spontánní vesmírné mutování opravdu zahrnuje **faktory/děje/mechanismy nám ještě neznámé a hlavně – na Zemi nerealizovatelné**. Nejedná se spíše o grandiózní mystifikaci, která by měla světu stále ještě nedůvěřivému k moderním

technikám genových modifikací či editací nabídnout alternativu tak evidentně přirozenou? Tedy různé koktejly kosmického záření, které již odedávna dopadá na pozemskou Gaiu, a je nesporným hybatelem všeliké mutageneze a tím pádem i spontánního evolučního šlechtění? Komerční důsledky takové strategie by mohly být zajímavé. Psal se rok 2021, druhý rok kovicenu. K osmé desítce autorova života mu katedra na počátku zimního semestru nabídla možnost propojit „slavení“ s odborným seminářem.

Zaměření přednášky si mohl volně vybrat. V realizaci popravdě moc nedoufal neb kovidová vlna s podzimem zase stoupala. A tak jsem si pro udržení co možná optimistické nálady posluchačů zvolil téma vážně nevážené – **Space Biotechnology**. Koneckonců, naznačuje to jak úvodní obrázek přednášky, tak titulok blogu o ní následně referující<sup>2</sup>.

Náš život provázejí nejrůznější náhody. Seminář se konal 26. října – a den na to zveřejnily *Frontieres of Plant Science* velmi zajímavou a odborně fundovanou minireview s názvem „**Space breeding: The next generation crops**“<sup>3</sup>. Samozřejmě také obsahovala soupis již zmíněných, zejména čínských zkušeností s pěstováním nejrůznějších plodin, jejichž semena či hlízy nějakou dobu pobývaly na orbitě. A konstatovala, že pozorované fenotypové odchylky jsou zřejmě důsledkem účinků masivního kosmického záření, „vyvolávajícího změny DNA a chromosomální aberace“. Ale autoři také zdůraznili potřebu důkladných genomických, proteomických i metabolomických analýz k objasnění jejich podstaty. A zmínili všeliké návaznosti pozemské a vesmírné technologie a přidali informaci, že v tomto kontextu se formují nové „průřezové“ vědní obory a aby těch -omiků nebylo málo, je třeba zavést do šlechtitelské praxe, té pozemní i té kosmické, také studia environmentální<sup>4</sup>.

**Autoři, vědomí si většinového laického pohledu na moderní genové manipulace, resp. nově genové editace, se kupodivu naopak obávali obecného nepřijetí takto vytvořených odrůd.** Inu uvidíme, jaká bude realita. Ono „kultovní“ kosmické záření však nebylo jediným uvažovaným původcem zjištěných fenotypových změn. Jaký vliv může mít třeba magnetismus? A samozřejmě významná role byla přisouzena **účinkům beztížného stavu – tedy mikrogravitaci**.

**Z tohoto spektra znalostí byl o dva roky později koncipován i náš seminář.**

Vystoupili na něm čtyři přednášející, jmenovitě doc. RNDr. Eduard Kejnovský, CSc., prof. RNDr. Zdeněk Opatrný, CSc., Mgr. Ivan Kulich, Ph.D. a Dr. Chris Dardick. A jeho cílem bylo nejen komentovat pokrok dané problematiky, ale také zařadit jej do širších



# SPACE BIOTECHNOLOGY

Astrobotany

Plant  
Astrobiology

Space  
Greenhouses

Space  
Breeding



Space  
Green Deal ?

Space Biofood ?

GMO free  
Universe ???

Zdeněk OPATRŇÝ

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN

říjen 2021

souvislostí. Neboť, ďábel často spočívá v detailu. Chceme-li se úspěšně přít o významu či existenci nějakého pojmu, je třeba si jej nejprve co nejlépe definovat. A bádáme-li nad „životem ve Vesmíru“, není od věci si onen „život“ co možná podrobně vymezit.

Seminář byl proto zahájen úvodní, „**nebiotechnologickou**“ přednáškou **Eduarda Kejnovského** s názvem „**Vznik života, dynamický genom a síť života**“. Velmi se nám totiž zalíbily různé řečnickovy publikace o „**říši acytot**“<sup>5</sup>, onu širokou definici pojmu „život“ ilustrující. A současně vedoucí k poznání, jakým způsobem/mechanismem se naším známým vesmírem dále šíří. K zjištění, jak univerzální je proces horizontálního/laterálního přenosu genů mezi nejrůznějšími „živými“ entitami. Jak směšná či hloupá je v tomto kontextu ideologie zastánců toho jediného „přírodního způsobu předávání“ genů jen prostřednictvím cest vertikálních (tatínka a maminky)? Nadále se totiž domníváme, že jen za součinnosti technik sexuálních a parasexuálních se mohou kosmičtí zemědělci dobrat takových rostlinných fenotypů, které by byly nejen dostatečně „životné“ v různých extrémních prostředích, ale také patřičně produktivní.

Přednáška druhá už byla výrazně **biotechnologická**. Ujal se jí **Zdeněk Opatrný** a dal jí název „**Vesmírné mikrogravitace s českou stopou**“. S cílem ilustrovat to na příkladech vzdálených od sebe sice půl století, ale úzce souvisejících.

**Ta první stopa?** Návštěvník budovy Viničná 5 patřící Přírodovědecké fakultě UK si stěží nepovšimne pamětní desky jejího prvního děkana (a před tím i UK rektora) **profesora Bohumila Němce** (1873 – 1966). Rakousko-Uherského i prvorepublikového politika (mj. potenciálního presidentského kandidáta v roce 1935, coby oponenta Edvarda Beneše), zároveň však i světem uznávaného vědce, rostlinného anatoma a fyziologa. Jen dva Češi byli členy věhlasné londýnské Linnéovy společnosti, a to Jan Evangelista Purkyně a Bohumil Němec. A svoje zastoupení v mezinárodně ceněných učebnicích rostlinné fyziologie si Bohumil Němec vysloužil zejména svým **objevem mechanismu rostlinné geo/gravirecepce**. Tedy zjištěním, že klíčovou složkou „pozitivního geotropizmu“ rostlinného kořene jsou zrnka přesýpavého škrobu v kolumele kořenové špičky.

Jak to občas v dějinách vědy bývá, není tento příběh bez původu. V prvé řadě v souvislosti s uznáním priority objevu. Potkaly se tam totiž dvě uznávané osobnosti. Mladý Bohumil Němec a v té době již velmi uznávaný Gottlieb Haberlandt. Němec již předběžně publikoval výsledky svých pokusů a teoretické závěry<sup>6</sup>. Haberlandt na základě těchto dat formuloval své úvahy<sup>7</sup>.

Za přečtení však stojí autentický Němcův záznam v Němcových vzpomínkách, vydaných až po listopadu 1989. Ani tehdy nikoliv snadno... I prvně, v roce 2002, ještě narazily na výraznou nepřízeň osudu. Teď už nikoliv politickou, ale přírodní. Nedlouho po vydá-

ní totiž depositum nových knih uložených v suterénu objektu Zámky na břehu Vltavy na Praze 8 navštívila srpnová povodeň. Jen málo se jich dostalo ke čtenářům. Moje dva výtisky získané „pod rukou“ mají po vysušení vazbu značně zvlněnou a pár listů slepených. Daleko šťastnější osud už mělo nové, rozšířené vydání z roku 2020. Tuhle opravdu krásnou knihu vřele doporučujeme milovníkům historie nejen vědecké, ale též politické a kulturní. Té naší i té zejména středo-evropské.

Na 145. stránce (tohle vydání jich má cca 550) můžete číst tento dotek historie: „*Byl jsem v zimě roku 1900 na návštěvě u prof. Vejdovského a hovořili jsme o statických orgánech, o jejichž statické funkci však prof. Vejdovský nebyl plně přesvědčen. Citoval jsem přitom slova Sachsova. Když jsem vyšel na ulici do chladného podzimního vzduchu, problesklo mi hlavou, že takovým statickým orgánem u rostlin jsou buňky, které obsahují přepadavá škrobová zrníčka. Znal jsem takové buňky z různých orgánů rostlinných, věděl jsem, že jsou umístěny právě v rostlinných orgánech, v nichž je tíže recepována (vrcholy kořenů a koleoptilí trav), měl jsem řadu pokusů, jimž scházela jenom syntéza jednotliví myšlenkou. Nemohl jsem spát rozčilenou touhou, abych provedl další pokusy a revidoval dosavadní. Hned druhého dne jsem se dal do práce a v krátké době jsem byl hotov. Nebylo sice možno odstranit mechanicky z buněk kořenových vrcholů škrobová zrnka, ale objevil jsme jinou metodu. Zalil jsem kořenové vrcholy do sádry a škrob z nich záhy zmizel. Když pak byl sádrový obal z nich odstraněn, počaly opět růst, ale nereagovaly geotropicky, dokud se v nich neobjevil zase přepadavý škrob*“<sup>8</sup>. Statolithová teorie byla na světě a ověřování souvislostí gravirecepce bezmála se všemi klíčovými jevy rostlinného života mělo před sebou více než stoletou budoucnost. Zájemci o tuto problematiku se o tom mohli recentně přesvědčit na konferenci, pořádané Přírodovědeckou fakultou počátkem června t.r. k připomenutí 150. výročí Němcova narození. Zdaleka se na ní nejednalo jen o jeho roli v poznávání biologie rostlin a zdaleka se netýkala jen oblasti rostlinné cytologie a anatomie. Bloku přednášek o současné relevantní vědě vévodila témata molekulárně biologická, propojená zejména se studiem metabolismu a funkce fytohormonů. Témata podpořená skvělou mezinárodní spoluprací, využívající špičkovou až unikátní techniku. Co by tak asi říkal profesor Němec, dávající před více jak sto lety rostlinným kořenům sádrový kabátek, na kouzla se současnou mikroskopickou výbavou a plejádou fluorescenčních sond, doplněná precizní molekulární analytikou?

**Stopa druhá**, stručně pojmenovatelná „biosatelit Kosmos 782“, se již netýká jen onoho rostlinného geo/gravitropismu. Vede už opět výrazně českou cestičkou **rostlinně-biotechnologickou**. Bohumil Němec sice se zájmem sledoval první úspěchy rostlinných „kalusových“ kultur z třicátých let<sup>9</sup>, ale na rozdíl od Haberlandta jim moc velký význam nepřikládal. A to až do konce svého života.

Ale dvacet let poté, v roce 1956, spatřila světlo světa první monografie s touto problematikou sepsaná

„na východ od železné opony“ autorů Řetovského a Petrů<sup>9</sup>. Obdobných manuálů bylo tehdy i v západním světě tak jako prstů jedné ruky. Z pražské laboratoře se postupně znalosti těchto *in vitro* technik rozšířily přes Wrocław do Moskvy. A vznikla světoznámá laboratoř prof. Raisy G, Butenko v tehdejšímu Institutu fyziologii rstenij, s níž náš Ústav experimentální botaniky udržoval mnohaleté vzájemně užitečné spolupráce. „Raječka“ si doma postupně vybudovala skvělé postavení odborné i politické. Inu, krom jiného byl její manžel armádním generálem a členem tehdejšího politbyra. A zřejmě i blízký oblasti kosmických letů, oblasti soupeření, ale i počínající spolupráce dvou hlavních velmocí.

A tak se zdařilo, že v době tvrdé studené války mohl na orbit putovat **sovětský satelit**, nesoucí náklad „**amerických biotestů**“ účinků **mikrogravitace na živé organizmy**. Mezi jinými také tkáňové kultury mrkve, schopné tvořit somatická embrya a z nich posléze až kvetoucí a plodné rostliny. Což nebyl už tehdy žádný zázrak, s mrkví pracovala již Eva Petrů. Ale až na počátku sedmdesátých let byly k mání fytohormony schopné je donutit k náročné ontogenezi. Úspěchu akce pomohla i další náhoda: americký tkáňovkář profesor Abraham Krikorian byl, jak zřejmo z jeho příjmení, rodem Armén<sup>10</sup>. A jak známo, Armén málem všude jiné Armény zná. No a tehdejší místoředitelem moskevského ústavu byl jistý Michail Christoforovič Čajlachjan. Jinak světově uznávaná kapacita studia mechanismů kvetení rostlin, spolupracující přednostně i s týmem „vývojářů v ŮEB“.

Let rakety Vostok nesoucí na své palubě **biosatelit Kosmos 782** byl úspěšný, leč krátký. Kultury šťastně přistály a z vytvořených somatických embryí po pár měsících vyrostly kvetoucí rostliny, celkovým fenotypem neodlišitelné od kontrolních. **Význam gravitace pro ranou rostlinnou embryogenesi se tak ani nepotvrdil, ani nevyvrátil, ani nepotvrdil**. Na to byl moc krátký.

Ale šla léta, dlouho bez přímých českých stop. Během nich se propastně rozvinuly techniky všemožných biologických analýz, od těch molekulárních přes cytologické, histologické, anatomické, morfologické. V již zmíněné minireview<sup>3</sup> tak najdete subkapitoly komentující výzkum buněčného růstu a diferenciaci, buněčného dělení, různé změny subcelulární, genové/bodové mutace, chromosomové aberace. Ale v podstatě jde o shrnutí dílčích výsledků na nejrůznějších modelech, zatím bez možnosti učinit z nich zřetelnější závěry. A také bez rozlišení toho, čím je vinna „radiace“ (simultánně neměřená) a kde vystupuje na scénu sama mikrogravitace.

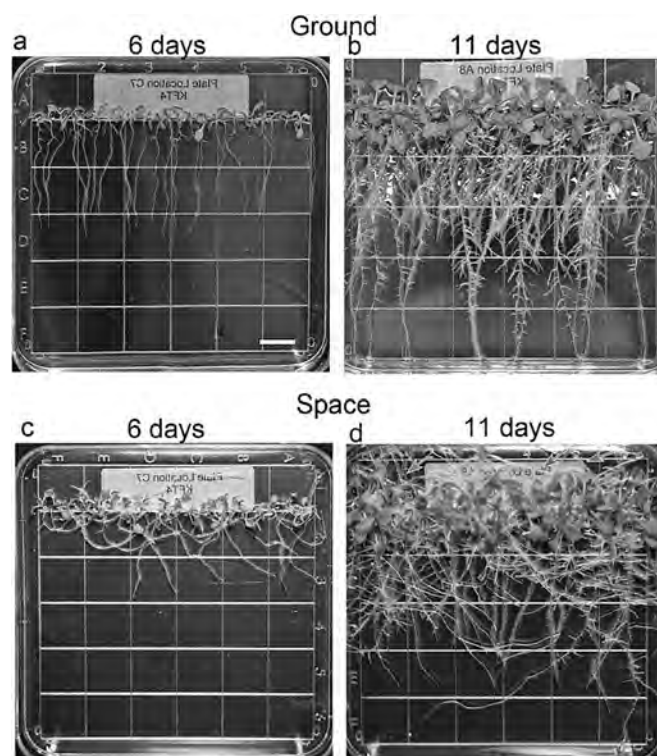
**Co na to práce současnější?** Další rozsáhlé mikrogravitační review publikoval rok po našem semináři „szegedský tým“<sup>11</sup>. Konstatuje m.j., že v podmínkách dlouhodobější mikrogravitace rostlinné objekty preferují (zrychlují) buněčné dělení před buněčným růstem. Možná z nějakého „pudu morfogenní sebezáchovy“ zesilují buněčné stěny či centrální lamelu. Onen environmentální zmatek je provázen změněnou expresí celé řady stresových genů. Ovlivněny jsou různé



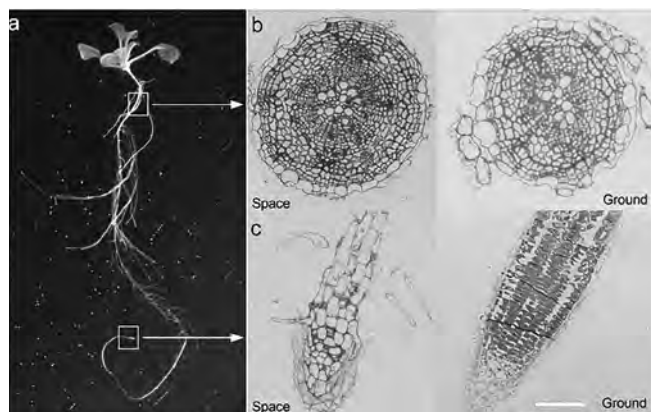
procesy vývojové – zejména klíčení semen. Ale tyto odpovědi jsou do značné míry druhově specifické. Nevyjadřuje se však nijak k možným mechanismům gravitačního účinku na změny genetické, resp. epigenetické.

Co na to další kosmické cesty? Informačním šlágrm z počátku června 2021 byl společný projekt firmy Space X Elona Muska a agrobotanické laboratoře Simona Gilroye z Madison University ve Wisconsinu. Na orbitě, ve společnosti tří astronautů, tehdy strávil několik dní transgenní bavlník. Cílem bylo zjistit, nakolik by v těchto podmínkách fungovaly změněné iontové kanály, coby jedna ze struktur ovlivnění vodního transportu v jeho kořenovém systému. A možná budoucí úpravy této značně žíznivé rostliny pro přežití v aridních oblastech. Opět – rostliny přežily cestu tam a zase zpátky a poté nastaly měsíce jejich pozemských analýz. Výsledky zatím neznáme a hned tak asi znát nebudeme.

Používat právě bavlník jako model **základního molekulárně biologického výzkumu** by ovšem chtěl leda vědecký kaskadér. Nepřekvapuje tedy, že další projekty s Gilroyovou účastí využívají klasiku, semenáčky huseničku *Arabidopsis thaliana*<sup>12</sup>. Hle, jak fantasticky či fantaskně klíčí a dále rostou její semenáčky na zemi (tedy v laboratoři Kennedyho centra na Cape Canaveral) či na orbitě (sledovány a fotografovány velitelem expedice 42 Barrym Wilmorem, který také prováděl odběr vzorků pro histologické analýzy). Jak by asi zaplesalo při tomto pohledu oko profesora Němce na zmatený gravitropismus jejich kořenů, způsobený asi zejména změnami v cukerném metabolismu a transportu, s důsledky na tvorbu buněčných stěn (Obr. 1, Obr. 2).



**Obr. 1:** Růst a větvení kořenů klíčících rostlin *A. thaliana* během kultivace jednak na ISS (mezinárodní vesmírné stanici), jednak na zemi – převzato<sup>12</sup>



**Obr. 2:** Odlišnosti v anatomické stavbě kořenové špičky klíčících rostlin pěstovaných na orbitě a na Zemi<sup>12</sup>

Zaplesalo by ale docela jistě při přednášce třetí z oblasti rostlinné hormonologie od **Mgr. Ivana Kulicha: Gravitace a růst kořene**. Však také důvodem byla účast přenášejícího ve výše zmíněném němčovském semináři. Tam měl příspěvek s velmi expresivním názvem: *Gravity early impact. A deep dive into the first five minutes of plant root banding*. Ale s tímto tématem se už raději blíže seznamte přímým shlédnutím přednášky

Po všech těch přednáškách reflektujících spíše základní výzkum měl závěr semináře zřetelně praktické zaměření – tedy jaké asi plodiny budeme v budoucnu v kosmu pěstovat?

Podívejme se ještě jednou na obrázky „orbitově pěstovaného huseničku“. Když je takto beztížně devastovaný i „obyčejný plevel“, co asi udělá s tisíce let vyplávanými pozemskými plodinami? Pokud bereme vážně naše budoucí dlouhodobé kosmické cesty či dokonce extraterestriální osidlování, není už na čase začít tady na Zemi šlechtit či spíše konstruovat jejich kosmické příbuzenstvo? Nečeká nás dlouhá tolkienovská „cesta tam a zase zpátky“?

Tuhle komplexní problematiku skvěle ilustrovala závěrečná přednáška **Dr. Chrise Dardicka „Biotechnologické plodiny pro mimozemské potravinové systémy“**, náš seminář uzavírající. Její zevrubné komentování považuji za zbytečné, blíže viz záznam<sup>13</sup>. V závěru najdete mimo jiné impresivní ilustraci strategie přípravy plodin s habitem vhodným pro limitované prostory kosmických lodí. Coby ovocnář se soustředil zejména na ovocné stromy (jabloně, švestky) či nejrůznější plodiny lilkovité (od rajčat po brambor). Ony zajímavé bonsaje jistě zaujmou i okrasné zahradníky. Co s nimi ale udělá dlouhodobá beztížnost? Jistě, technickým řešením může být umělá přitažlivost na kosmických lodích pro dlouhé cesty. Osidlované planety už budou mít tu vlastní, na níž se pozemský život (snad) postupně adaptuje. Ale je dobré být co možná nejlépe připraven.

## Závěr

Seminář Vesmírné biotechnologie byl, soudě dle reakcí účastníků poutavým úvodem do této velice komplexní problematiky. Prostoru pro výzkum zbývá spousta. Podrobnější informace o vesmírných biotech-

nologiích a záznamy přednášek prezentovaných na semináři můžete nalézt na našem webu<sup>13</sup>. A souhrnně, odborně i populárně je mu věnováno nové číslo našeho bulletinu Svět biotechnologií<sup>14</sup>.

Takže jakou podobu vlastně bude mít „kosmické šlechtění“? Opravdu je za nás udělá sám kosmos?

## Literatura

1. <https://www.materialtimes.com/tema/lany-vesmirneho-obili.html>, staženo 12. listopadu 2023.
2. <https://www.biotrin.cz/kosmicke-slechtění-nadeje-nebo-podfuk/>, staženo 12. listopadu 2023.
3. Mohanta TK, Mishra AK, Al-Harassi A: *Front. Plant. Sci.* 12 (2021).
4. Resende RT et al.: *Theor. Appl. Genet.* 134, 95-112 (2021).
5. Kejnovský E, Trifonov E: *Vesmír* 95/3, 3 (2016).
6. Němec B: *Ber Dtsch Bot.Ges.* 181(1), 241–245 (1900).
7. Haberlandt G: *Ber Dtsch Bot Ges.* 181(1), 261–272 (1900).
8. Němec B: *Rostlinopis.* sv. IV.1., 343 (1943).
9. Petrů E, Řetovský B: Nakladatelství československé akademie věd (1956).
10. Krikorian AD, Dutcher R, Quinn CE, et al.: *Adv. Space Res.* 1, 117-127 (1981).
11. Baba AI et al.: *Int. J. Molec. Sci.* 23, 10548 (2022).
12. Nakashima J, Pattathil S, Avci U, et al.: *Microgravity.* 9, 68 (2023).
13. <https://www.biotrin.cz/ohlednutí-za-seminárem-vesmirne-biotechnologie/>, staženo 12. listopadu 2023.
14. <https://www.biotrin.cz/nove-cislo-bulletinu-svet-biotechnologii-vesmirne-biotechnologie/>, staženo 12. listopadu 2023.

## Souhrn

Dlouhodobé kosmické lety či dokonce trvalý pobyt lidské rasy na jiných planetách vyžadují přítomnost dalších živých organismů, zejména rostlin. Ty by zajišťovaly řadu funkcí, od produkce potravin či vitaminů po recyklaci atmosféry mimozemských laboratoří. Byly by ovšem také vystaveny účinkům vesmírného prostředí, zejména radiaci či absenci přirozené gravitace s důsledky fyziologickými, ale také genetickými, resp. epigenetickými – a to jak negativními, v kontextu hladkého fungování kosmických skleníků, tak i kladnými, vedoucími (možná) k různým postupům alternativního šlechtění a jeho produktům. Právě ony produkty by byly využitelné i při řešení zcela aktuálních problémů extrémního stresu v různých částech naší planety. Co ze současného stavu informací o „kosmickém šlechtění“ lze zařadit mezi odbornou realitu, co jen mezi fikce? Součástí semináře o vesmírných biotechnologiích bylo i pojednání jak o tradicích tuzemského studia mechanismů rostlinného geotropismu na našich vědeckých institucích, tak o současném místním i mezinárodním výzkumu tohoto fenoménu pomocí špičkových molekulárních technik.

**Klíčová slova:** vesmírné technologie, mikrogravitace

## Summary

Long-term space flights or even permanent residence of the human race on other planets require the presence of other living organisms, especially plants. These would provide a number of functions, from the production of food or vitamins to the recycling of the atmosphere of space laboratories. However, they would also be exposed to the effects of the space environment, especially radiation or the absence of natural gravity, which could affect physiological, genetic, and epigenetic processes – both negatively, in terms of the smooth functioning of cosmic greenhouses, and positively, potentially leading to various alternative breeding procedures and their products. It is these products that could prove useful in addressing the current challenges of extreme stress in different parts of our planet. What of the current state of information about “cosmic breeding” can be classified as professional reality, or just fiction? The seminar on space biotechnologies included a discussion of both the traditions of domestic study of plant geotropism mechanisms at our scientific institutions, as well as the current local and international research into this phenomenon using cutting-edge molecular techniques.

**Keywords:** space biotechnology, microgravity

# MIKROBIOLOGIE ANAEROBNÍ DEGRADACE ORGANICKÝCH LÁTEK S DŮRAZEM NA METHANOGENEZI – BIOMETHANIZACE

Dana Pokorná

Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice

E-mail: [Danka.Pokorna@vscht.cz](mailto:Danka.Pokorna@vscht.cz)

## Úvod

Řešení problému globálního oteplování v důsledku emisí oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) ze spalování fosilních paliv, přitahuje čím dál více pozornosti v rámci vývoje a využití alternativních obnovitelných zdrojů energie. Jedním z nich je bioplyn, který vzniká během biochemického procesu, který se nazývá anaerobní fermenta-

ce. Jedná se o velmi složitý biologický proces, který se skládá z dílčích na sebe navazujících kroků – hydrolýzy, acidogeneze, acetogeneze a methanogeneze<sup>1</sup>. Za každou fázi je zodpovědná specifická skupina mikroorganismů – hydrolytické fermentační a acetogenní bakterie, syntrofní acetogeny a methanogenní mikroorganismy, přičemž je důležitá jejich metabolická



součinnost. Všechny zmíněné fáze probíhají s různou kinetickou rychlostí, přičemž stupeň methanogeneze je nejpomalejší. Methanogeny jsou totiž pomalu rostoucí a citlivé na změny technologických parametrů. Činností všech zmíněných skupin mikroorganismů je komplexní organický substrát metabolizován přes řadu meziproductů, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, alkoholy a nižší mastné kyseliny, hlavně máselná a propionová, které jsou však nakonec přeměněny syntrofními acetogeny na přímý prekurzor tvorby methanu, kyselinu octovou. Methan tak může být tvořen methanogeny z omezeného množství substrátů, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>, kyseliny octové a methyl sloučenin.

Všechny možné reakce vedoucí k tvorbě methanu jsou uvedeny v Tabulce I<sup>1</sup>, základní charakteristiky některých methanogenů v Tabulce II.<sup>2</sup>

**Tabulka I.** Reakce vedoucí k tvorbě methanu

$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$
$4 \text{ HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
$4 \text{ CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
$4 \text{ CO} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ H}_2\text{CO}_3$
$4 (\text{CH}_3)\text{N} + 6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{ CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 4 \text{ NH}_3$
$2 (\text{CH}_3)_2\text{NH} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ NH}_3$
$4 (\text{CH}_3)\text{NH}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_3$
$2 (\text{CH}_3)\text{S} + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$
$4 \text{ Me}^0 + 8 \text{ H}^+ \text{CO}_2 \rightarrow 4 \text{ Me}^{++} + \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$

**Tabulka II.** Základní charakteristiky vybraných methanogenů

	Substrát	optimální teplota (°C)	optimální pH
<i>Methanobacterium bryantii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	37	6.9 – 7.2
<i>Methanobacterium formicicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	37 – 45	6.6 – 7.8
<i>Methanobacterium thermoalcaliphium</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	58 – 62	8.0 – 8.5
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	65 – 70	7.0 – 8.0
<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	55 – 65	7.0 – 7.5
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	37 – 39	–
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	37 – 39	–
<i>Methanothermus fervidus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	83	< 7
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	65	–
<i>Methanococcus valtaei</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	35 – 40	6.0 – 7.0
<i>Methanococcus vannielii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	65	7.0 – 9.0
<i>Methanomicrobium mobile</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	40	6.1 – 6.9
<i>Methanolacinia paynteri</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	40	7.0
<i>Methanospirillum hungatei</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formate	30 – 40	–
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	methanol, acetate	35 – 40	6.5
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , methanol, methyamines, acetate	35 – 40	5.0 – 7.0
<i>Methanosarcina mazei</i>	methanol, methyamines, acetate	30 – 40	6.0 – 7.0
<i>Methanosarcina thermophila</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , methanol, methyamines, acetate	50	6.0 – 7.0
<i>Methanococcoides methylutens</i>	methanol	42	7.0 – 7.5
<i>Methanosaeta coccilii (soehngeni)</i>	acetate	35 – 40	7.0 – 7.5
<i>Methanosaeta thermophila</i>	acetate	55 – 60	7.0

**Tabulka III.** Taxonomie methanogenních Archeí<sup>2,3</sup>

<b>Domain</b>	<b>Phylum</b>	<b>Class</b>	<b>Order</b>	<b>Family</b>	<b>Genus</b>	<b>Species</b>				
Archaea	Methanogenic archaea	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<b>Methanobacterium</b>	<i>Methanobacterium formicicum</i>				
						<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>				
						<i>Methanobacterium bryantii</i>				
						<b>Methanobrevibacter</b>	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>			
							<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>			
							<i>Methanobrevibacter smithii</i> (formly <i>Methanobacterium ruminantium</i> )			
						<b>Methanosphaera</b>				
						<b>Methanothermobacter</b>				
								Methanothermaceae	<b>Methanothermus</b>	
								Methanococci	Methanococcales	Methanocaldococcaceae
	<b>Methanotorris</b>									
Methanococcaceae	<b>Methanococcus</b>	<i>Methanococcus vannielli</i>								
		<i>Methanococcus voltae</i>								
	<b>Methanothermococcus</b>									
Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiales	Methanocellaceae							
			Methanocorpusculaceae	<b>Methanocorpusculum</b>						
			Methanomicrobiaceae	<b>Methanomicrobium</b>	<i>Methanomicrobium mobile</i>					
				<b>Methanoculleus</b>						
				<b>Methanofollis</b>						
				<b>Methanogenium</b>						
				<b>Methanolacinia</b>						
				<b>Methanoplanus</b>						
			Methanoregulaceae							
			Methanospirillaceae	<b>Methanospirillum</b>	<i>Methanospirillum hungatei</i>					
			Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<b>Methanosarcina</b>					<i>Methanosarcina barkeri</i>
										<i>Methanosarcina mazei</i>
										<i>Methanosarcina acetivorans</i>
					<b>Methanococcoides</b>					
					<b>Methanohalobium</b>					
					<b>Methanohalophilus</b>					
					<b>Methanolobus</b>					
					<b>Methanomethylovorans</b>					
					<b>Methanimicrococcus</b>					
					<b>Methanosalsum</b>					
					Methanosaetaceae					<b>Methanosaeta</b>
					Methanothermococcaceae		<i>Methanothermococcus okinawensis</i>			
					Methanopyri	Methanopyrales	Methanopyraceae			

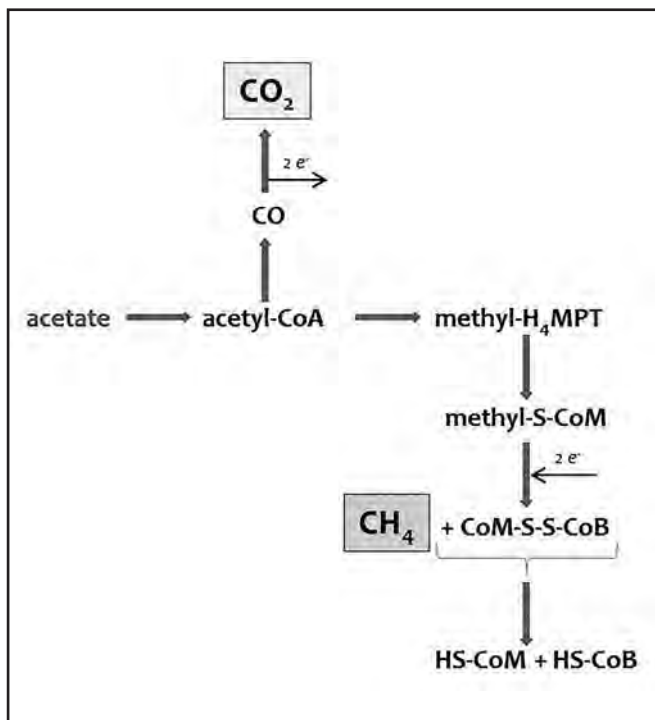


## Mikrobiologie tvorby methanu – methanogenní *Archaeae*

Methanogeny jsou mikroorganismy patřící do domény *Archaeae*. Mají vysoce specifické požadavky na substrát i životní podmínky a vzhledem ke svým vlastnostem se často stávají limitující skupinou celého anaerobního procesu. Zpracovávají omezené typy substrátů: hydrogenotrofní methanogeny tvoří methan ze směsi  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2$ , acetotrofní methanogeny zpracovávají kyselinu octovou a substrátem mohou být také methylované sloučeniny, které jsou substrátem pro methylotrofní methanogeny<sup>2</sup>.

### Acetotrofní methanogeny

Acetotrofní methanogeny metabolizují na methan kyselinu octovou podle dráhy na Obr. 2. Mezi nejvýznamnější acetotrofy patří mikroorganismy z rodu *Methanosarcinaceae* a *Methanosaetaceae*. Jejich zastoupení je mimo jiné ovlivněno koncentrací  $\text{NH}_3$  a nižších mastných kyselin. Zatímco při vysokých koncentracích těchto látek převládají *Methanosarcinaceae*, jejich počet s klesající koncentrací  $\text{NH}_3$  a nižších mastných kyselin klesá a začíná dominovat *Methanosaetaceae*. Obecně je možno říci, že vláknité acetotrofní methanogeny jsou na koncentraci amoniaku, sulfanu a nižších mastných kyselin mnohem citlivější než hydrogenotrofní mikroorganismy nebo acetotrofové rodu *Methanosarcinaceae*<sup>8</sup>. *Methanosarcinaceae* se vyskytují ve formě nepravidelných shluků, které je chrání před nebezpečným chemickým prostředím. Obecně je však aktivita acetotrofů a methanogenů ovlivněna hlavně nedisocioványi formami těchto látek<sup>9</sup>.



**Obr. 1.** Metabolické dráhy acetotrofních methanogenů. Upraveno podle<sup>4</sup>.

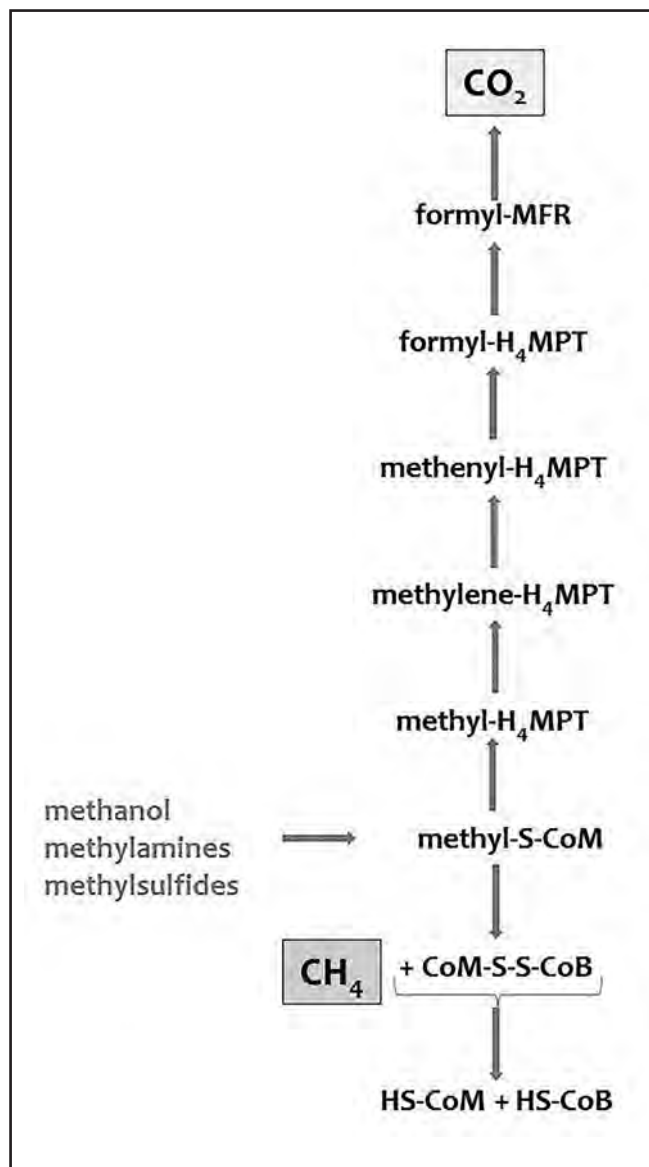
*Methanosaeta* spp. převládají při nízkých koncentracích kyseliny octové a v granulovaném kalu, zatímco *Methanosarcinaceae* spp. převažují při vysokých

koncentracích kyseliny octové při nestabilním procesu a ve vločkovém kalu<sup>10,11</sup>.

Porovnáním mezofilních a termofilních podmínek bylo zjištěno, že za termofilních podmínek zcela převažují hydrogenotrofní methanogeny a acetotrofní methanogeny rodu *Methanosarcinaceae*, zatímco termofilní *Methanosaeta* nebyly pozorovány. Důležitou úlohu sehrává rovněž koncentrace vodíku, kdy acetotrofní methanogeny mohou soutěžit s acetogeny<sup>2</sup>.

Obecně je tak možno říci, že *Methanosarcinaceae* převažují ve společenství vločkových acetotrofních methanogenů, při vysokých koncentracích kyseliny octové, za termofilních podmínek a v případech, kdy se během zapracování reaktoru vyskytly problémy. *Methanosaetaceae*, naopak převažuje za mezofilních podmínek ve formě granulovaného kalu, při nižších koncentracích kyseliny octové v dobře zapracovaných reaktorech. Významnými parametry, které ovlivňují výskyt a aktivitu acetotrofů jsou hydraulická doba zdržení (HRT), pH a teplota<sup>2</sup>.

Metabolické dráhy acetotrofních methanogenů jsou patrné z Obr. 1



**Obr. 2.** Metabolické cesty methylotrofních methanogenů. Upraveno podle<sup>4</sup>.

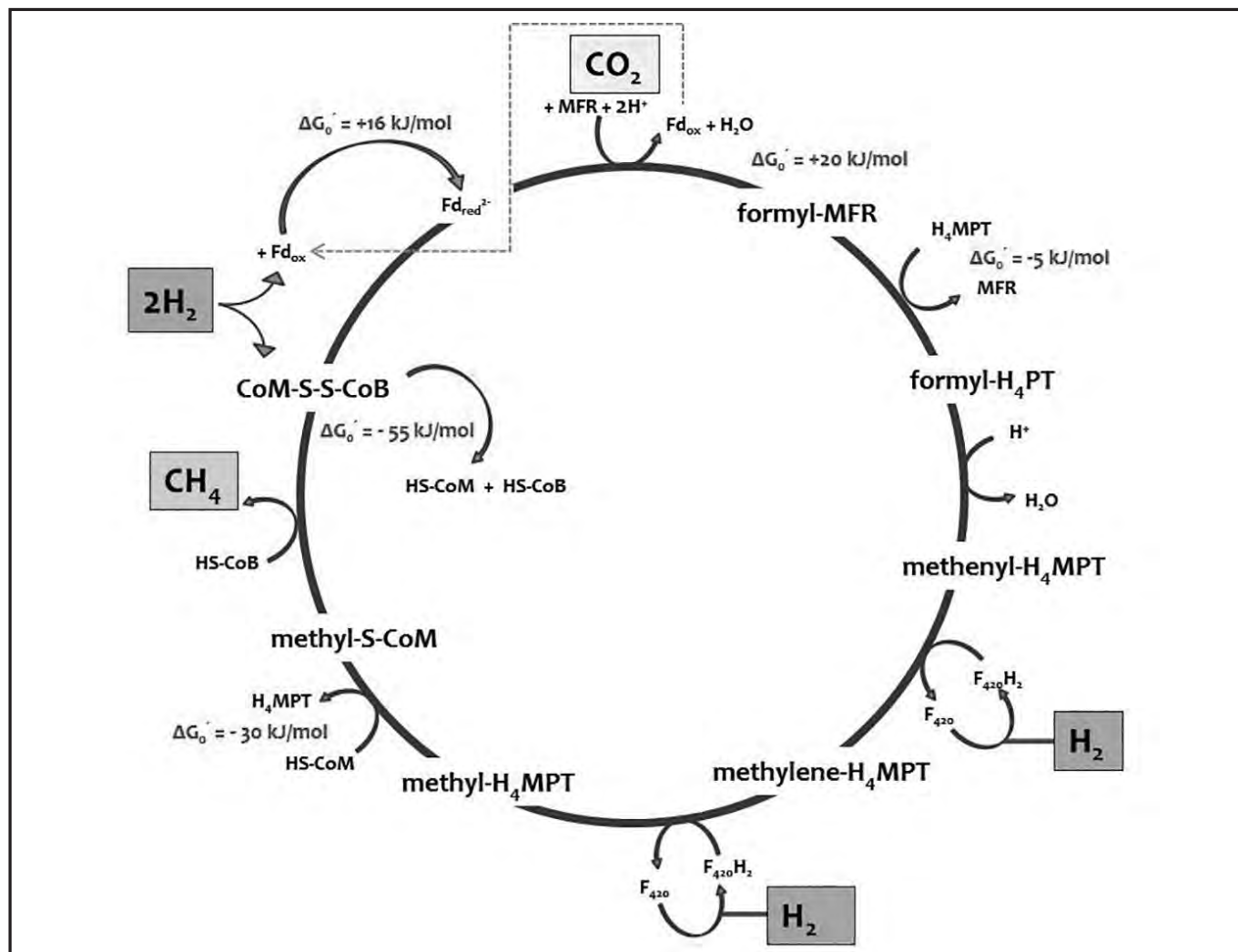
### Methylotrofní methanogeny

Methylotrofní methanogeny jsou třetí skupinou mikroorganismů, které tvoří methan. Jejich substráty jsou sloučeniny obsahující jeden atom uhlíku. Kromě methanolu, kyseliny mravenčí, methylaminů a methylsulfidů, mohou metabolizovat rovněž některé methylované ethanolaminy (N,N,N-trimethylethanolamin a N,N-dimethylethanolamin), které jsou nejprve demethylovány druhy *Methanococoides*, přičemž produkováné ethanolaminy jako meziprodukty jsou dále využity některými *Clostridium* spp. a sulfát-redukujícími bakteriemi např. *Desulfofrigus*<sup>12</sup>. Stejně je možné pomocí *Methanococoides* spp. metabolizovat N,N,N-trimethylglycine (Tabulka IV)<sup>13</sup>.

Metabolické cesty methylotrofních methanogenů jsou zobrazeny na Obr. 2.

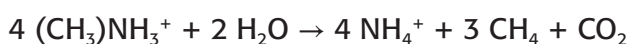
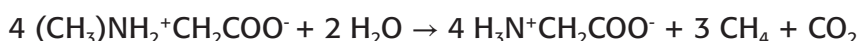
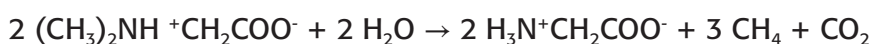
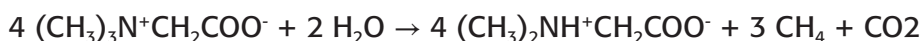
### Hydrogenotrofní methanogeny

Činnost hydrogenotrofních methanogenů je pro stabilitu celého procesu velice důležitá. Metabolizují vodík a CO<sub>2</sub> na methan a udržují tak koncentraci vodíku na úrovni, která umožňuje stabilní průběh celého anaerobního procesu. K redukci CO<sub>2</sub> nevyužívají jako elektron donor pouze vodík, ale také kyselinu mravenčí a některé alkoholy. Redukce CO<sub>2</sub> probíhá jako tzv. Wolfův cyklus hydrogenotrofních methanogenů v několika krocích (Obr. 3).



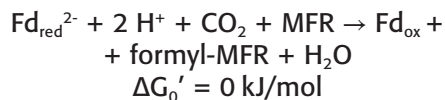
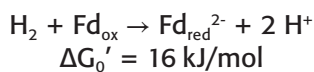
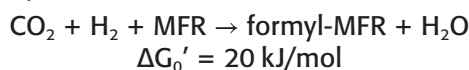
**Obr. 3.** Wolfův cyklus redukce CO<sub>2</sub> činností hydrogenotrofních methanogenů (MFR – methanofuran, H<sub>4</sub>MPT – tetrahydromethanopterin, CoM – coenzym M, CoB – coenzym B, Fd – ferredoxin). Upraveno podle<sup>4,6,7</sup>.

### Tabulka IV. Reakce methylotrofních methanogenů



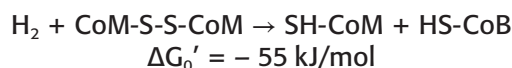


Hydrogenotrofní methanogeneze začíná redukcí CO<sub>2</sub> na formyl skupinu methanofuranu (formyl-MFR) do které je zapojen jako elektronový přenašeč ferrodioxin (Fd)<sup>4,5</sup>.



Následně je formyl skupina transportována na elektronový přenašeč tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT) a dehydratována na methenyltetrahydromethanopterin (methenyl-H<sub>4</sub>MPT). Elektron donor redukuje elektronový přenašeč koenzym F<sub>420</sub> na F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> pomocí hydrogenáz, formate-dehydrogenáz a alkohol-dehydrogenáz. F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> potom slouží jako reduktant pro druhý stupeň redukce methenyl-H<sub>4</sub>MPT na methylene-H<sub>4</sub>MPT a dále na methyl-H<sub>4</sub>MPT. Methyl skupina je potom transportována na další elektronový přenašeč – sulfhydryl coenzyme M (HS-CoM) a redukována na CH<sub>4</sub> za současné oxidace HS-CoM a HS-CoB za vzniku heterodisulfidu CoM-S-S-CoB. Následná elektronová bifurkace probíhá v komplexu heterodisulfid reduktázy, přičemž dochází k redukcí heterodisulfid CoM-S-S-CoB na regenerovaný HS-CoM a HS-CoB a oxidované formy ferrodioxinu Fd<sub>ox</sub> na Fd<sub>red</sub><sup>2-</sup>, který je použit na redukcí CO<sub>2</sub> v prvním stupni celého cyklu.

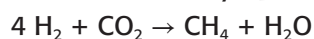
Redukce heterodisulfidu CoM-S-S-CoB na regenerovaný HS-CoM a HS-CoB energeticky vyrovnává nedostatek energie u reakce tvorby formyl-MFR<sup>4,5</sup>.



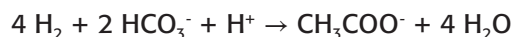
## Biotransformace CO<sub>2</sub> pomocí externího vodíku na biomethan

Jak již bylo řečeno, bioplyn obsahuje kromě methanu, který je energetickou složkou bioplynu sloužící k výrobě elektrické energie a tepla, také nemalý podíl oxidu uhličitého. Jeho zastoupení závisí na složení zpracovávaného substrátu a na technologických parametrech celého procesu. Biomethanizace je slibnou technologií pro zušlechťování bioplynu a alternativním přístupem k získání většího množství energie, kterou lze využít ve stávajících distribučních sítích zemního plynu.

Zvýšení podílu methanu v bioplynu lze dosáhnout biokonverzí CO<sub>2</sub> za přítomnosti externě dodávaného vodíku na biomethan právě činností hydrogenotrofních methanogenů podle Sabatierovy reakce, kdy je na 1 mol CO<sub>2</sub> třeba dodat 4 moly H<sub>2</sub>.



V anaerobní kultuře se za daných podmínek mohou vyskytovat také homoacetogenní bakterie. Methan je pak produkován buď přímo činností hydrogenotrofních methanogenů z vodíku a CO<sub>2</sub> a jednak nepřímo prostřednictvím homoacetogenů. Ty metabolizují H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> na kyselinu octovou, která je substrátem pro acetotrofní methanogeny.



Pokud chceme považovat vzniklý biomethan za obnovitelný zdroj energie, je třeba k redukcí CO<sub>2</sub> použít tzv. zelený vodík, tedy vodík vyrobený elektrolýzou vody elektrickou energií pocházející z obnovitelných zdrojů (solární, větrné, vodní elektrárny). Ty produkují energii v závislosti na počasí a vzhledem k nevyrovnanému poměru výroby a její spotřeby může dojít k jejímu přebytku. Ten je potom vzhledem k jeho záporné ceně vhodné využít k výrobě zeleného vodíku.

Dodávání vodíku do anaerobní fermentace je v zásadě ovlivněné a omezeno dvěma zásadními limitacemi – metabolickou a fyzikálně-chemickou.

Metabolická limitace úzce souvisí s metabolismem syntrofních acetogenů, pro něž je zvýšený parciální tlak vodíku inhibiční. Tyto mikroorganismy za těchto podmínek nedokáží přeměňovat kyseliny propionovou a máselnou na kyselinu octovou, která je substrátem pro důležitou skupinu acetotrofních methanogenů. Je tak ovlivněna účinnost rozkladu původního substrátu a tím i výtěžnost bioplynu z něj. Během tohoto procesu se také může vzhledem ke spotřebě CO<sub>2</sub> významně zvýšit pH až nad 8, což opět zpomaluje některé mikrobiální procesy, zejména methanogenezi, protože optimální pH methanogenů se nachází v úzkém rozmezí kolem pH 7. V reaktorech, do nichž je za účelem vzniku biomethanu dodáván externě vodík, je významně modifikována mikrobiální komunita.

Kromě metabolické limitace je třeba vzít v úvahu rovněž fyzikálně-chemické omezení, spočívající v rozpustnosti vodíku do kapalné fáze. Rychlost přestupu vodíku lze vyjádřit vztahem

$$r_t = 22,4 k_L a (\text{H}_{2\text{gTh}} - \text{H}_2)$$

kde

r<sub>t</sub> – rychlost přestupu vodíku z plynné do kapalné fáze – L/(L·d),

H<sub>2gTh</sub> – teoretická hodnota rozpustnosti vodíku podle Henryho zákona,

H<sub>2</sub> – měřená hodnota rozpuštěného vodíku,

k<sub>L</sub>a – koeficient přestupu vodíku do kapalné fáze.

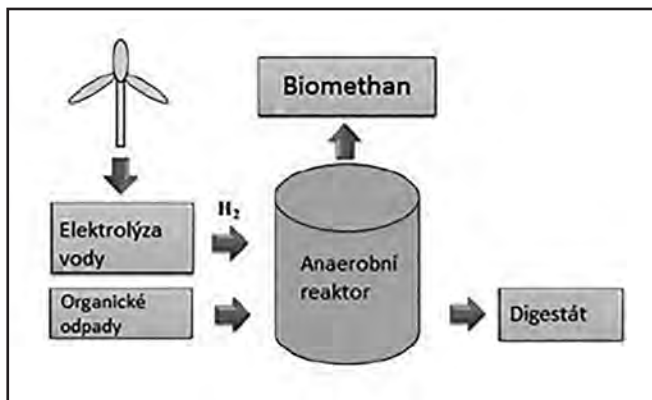
Hodnotu k<sub>L</sub>a a tím i rychlost přestupu vodíku je možno zvýšit mícháním směsi a vhodným zařízením použitým pro dávkování vodíku do reaktoru. Např. zvýšení rychlosti míchání z 500 min<sup>-1</sup> na 800 min<sup>-1</sup> umožnilo navýšení zatížení reaktoru vodíkem ze 6 L/(L·d) na 24 L/(L·d) a dosáhnout obsahu methanu v bioplynu 90 %<sup>14</sup>. Ke zlepšení přestupu vodíku z plynné do kapalné fáze a zároveň minimalizování obsahu vodíku ve zušlechtěném bioplynu je možné k dávkování vodíku do systému s úspěchem použít membránové moduly<sup>15</sup>.

## Technologická uspořádání biologické konverze CO<sub>2</sub> z bioplynu

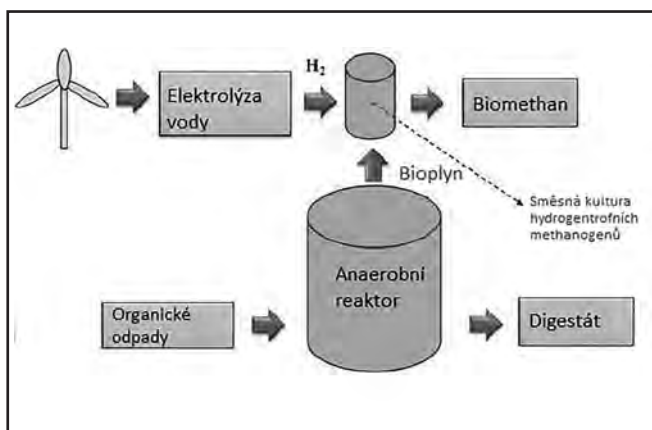
Způsob, jakým je do systému dodáván vodík, určuje následně technologické uspořádání celého procesu.

*In-situ* uspořádání spočívá v přímém dávkování vodíku do anaerobního fermentoru, ve kterém probíhá anaerobní rozklad organického substrátu a produkce

bioplynu (Obr. 4). Výsledným produktem je zušlechťený bioplyn obsahující asi 80 % methanu. Vyšších koncentrací je jen těžko možno dosáhnout, protože zvýšená koncentrace vodíku může vést k inhibici anaerobní kultury, zejména syntrofních acetogenů, jak bylo popsáno výše.



**Obr. 4.** Technologické uspořádání biomethanizace *in-situ*



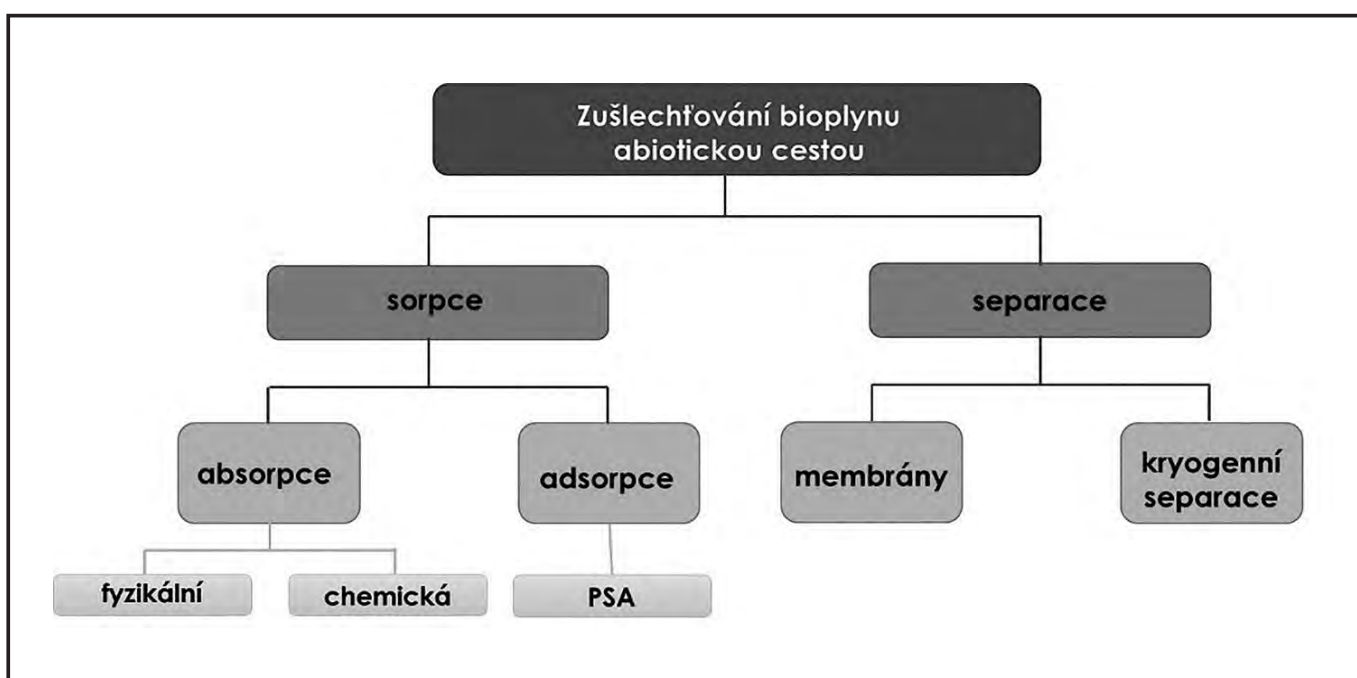
**Obr. 5.** Technologické uspořádání *ex-situ*

Při *ex-situ* uspořádání je CO<sub>2</sub> nejdříve z bioplynu vyprán v pračce plynu. Vypírací kapalina obsahující zachycený CO<sub>2</sub> je následně vedena do externího bioreaktoru. Ten je konstruován jako skrápěná kolona, ve které je na nosičích imobilizována kultura hydrogenotrofních methanogenů (Obr. 5). Tuto biokonverzi je tedy možno lépe řídit bez omezení pro biokulturu produkující bioplyn. Vzhledem k možnosti vyššího zatížení vodíkem je tak možno dosáhnout i vyšší koncentrace methanu ve zušlechťeném bioplynu, a to více než 95 %. To odpovídá legislativním požadavkům na případné vtlačení tohoto plynu do sítě zemního plynu. Jedním z velmi důležitých faktorů, které je třeba hlídat je rozpustnost plynů, zejména CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>, závisící hlavně na teplotě. V případě termofilního procesu (55 °C) probíhají sice rychleji biologické procesy, za to se však snižuje rozpustnost plynů v kapalině oproti procesu mezofilnímu (36 °C).

Kombinací obou uvedených technologických schémat je hybridní uspořádání, kdy je do anaerobního reaktoru vedena jen část vodíku tak, aby nedošlo k poškození biokultury. Bioplyn částečně obohacený o biomethan je potom vedena do externího bioreaktoru, kam je dávkována druhá část vodíku. Hovoříme o *hybridním uspořádání*.

### Biologická konverze CO<sub>2</sub> z jiných zdrojů

Kromě CO<sub>2</sub> obsaženého v bioplynu je možné využít tuto biotechnologii i pro CO<sub>2</sub> z jiných zdrojů. Lze sem zařadit i CO<sub>2</sub>, který je získán z bioplynu fyzikálně-chemickými metodami (Obr. 6). Jedná se o úpravu bioplynu na biomethan odstraněním CO<sub>2</sub>. Mezi nejrozšířenější metody separace CO<sub>2</sub> z bioplynu patří membránová separace, adsorpce na různých sorbentech – PSA (pressure swing adsorption), absorpce ve vodě a dalších rozpouštědlech nebo kryogenní separace. Jedná se o metody účinné, ale investičně i provozně



**Obr. 6.** Odstraňování CO<sub>2</sub> z bioplynu abiotickou cestou



velmi finančně náročné. Navíc neřeší problém, jak naložit s odstraněným oxidem uhličitým. Ten je následně možné použít právě pro jeho biokonverzi s vodíkem na methan. Kromě toho jako zdroj CO<sub>2</sub> mohou sloužit odpadní plyny z různých fermentačních výrob, např. z výroby ethanolu.

## Závěr

Biotechnologie tvorby bioplynu anaerobní fermentací organických látek obsažených v čistírenských kalesch a organických odpadech poskytuje cenný zdroj obnovitelné energie. Nedílnou součástí mikrobiálního konsorcia jsou methanogenní Archaea, bez jejichž činnosti by energetická složka bioplynu, methan, nevznikla. Jsou to mikroorganismy velmi citlivé na životní podmínky a jakékoliv citelnější změny v technologických

parametrech, zejména mimo jejich optimální teplotu, pH, zatížení atd. mohou vést ke zhroucení celého procesu. Je tedy třeba se na tuto technologii dívat skrze požadavky těchto mikroorganismů.

Významnou roli hrají tyto mikroorganismy při zúšlechťování bioplynu na biomethan jako alternativního paliva k zemnímu plynu. A to buď biologickou konverzí CO<sub>2</sub> přímo v bioplynu nebo CO<sub>2</sub> odstraněného z bioplynu různými abiotickými metodami. Kromě toho se jako vhodný zdroj jeví i plynné produkty fermentačních výrob, např. z výroby ethanolu.

## Poděkování

Tato práce vznikla za podpory TA ČR projektu TK01030051 „Biomethanizace oxidu uhličitého na biomethan s využitím vodíku“

## Literatura

1. Borja R.: *Biogas Production*, 2.55, in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press: Burlington. 785-798, 2011.
2. Demirel B. and Scherer p. : *Rev Environ Sci Bio/ Technol*, 7(2): 173-190, 2008.
3. Ferry, J.G. and Kstead K.A.: *Nature Publishing Group*. 288-314, 2007.
4. Costa KC and Leigh JA.: *Curr Opin Biotechnol*, 2014. 29: p. 70-75, 2014.
5. Kaster AK, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(7), 2981-2986, 2011.
6. Martin W.F.: *FEBS Lett*, 586(5), 485-493, 2012.
7. Thauer RK.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(38), 15084-15085, 2012.
8. Karakashev D, Batstone DJ., Angelidaki, I.: *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 331-338, 2005.
9. El-Mashad H. et al.: *Bioresour Technol*, 95(2), 191-201, 2004.
10. Shin HS et al.: *Water Res*, 35(14), 3441-3447, 2001.
11. Zheng, D., Raskin, L et al.: *Bioresour Technol*, 39(3), 246-262, 2000.
12. Watkins A., Roussel EG., Webster, G., Parkes, R.J., Sass, H.: *Appl Environ Microbiol*, 78(23), 8298-8303, 2012.
13. Watkins A, Roussel EG. et al.: *Appl Environ Microbiol*, 80(1), 289-293, 2014.
14. Luo G, Angelidaki I.: *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 3739-3744, 2013.
15. Wang W, Xie L. et al.: *Bioresour Technol*, 146, 234-239, 2013.

## Souhrn

Methanogenní *Archaea* hrají významnou roli ve společenství mikroorganismů, které za anaerobních podmínek metabolizují organický substrát na plynný produkt – bioplyn. Vzhledem k jejich metabolismu se jedná o citlivé mikroorganismy, které vyžadují striktní anaerobní podmínky, stálou teplotu a pH a další technologické parametry. Methanogeny zpracovávají celou řadu substrátů, podle jejich metabolismu je dělíme na hydrogenotrofní, acetotrofní a methylotrofní. Velký význam v současné době energetických změn, které kladou důraz na zelenou energii, představují hydrogenotrofní methanogeny. Ty jsou v přítomnosti externího vodíku schopny redukovat CO<sub>2</sub> obsažený vedle CH<sub>4</sub> v bioplynu. Vznikající biomethan tak zvyšuje energetickou výtěžnost bioplynu.

**Klíčová slova:** hydrogenotrofní, acetotrofní, methylotrofní, methanogeny, bioplyn, biomethan

## Summary

Methanogenic *Archaea* play an important role in the community of microorganisms that metabolize organic substrate under anaerobic conditions into a gaseous product – biogas. Due to their metabolism, they are very sensitive microorganisms that require strictly anaerobic conditions, constant temperature and pH and other technological parameters. Methanogens process a wide range of substrates and are classified as hydrogenotrophic, acetotrophic and methylotrophic according to their metabolism. Hydrogenotrophic methanogens are of great importance in the current area of energy change that emphasizes green energy. In the presence of external hydrogen, these can reduce CO<sub>2</sub> contained alongside with CH<sub>4</sub> in biogas. The resulting biomethane thus increases the energy yield of biogas.

**Keywords:** hydrogenotrophic, acetotrophic, methylotrophic, biogas, biomethane

# KALMODULIN – STRUKTURNĚ FUNKČNÍ POPIS A JEHO ROLE V BAKTERIÁLNÍ PATOGENESI

Vladimír Ondruška, Věra Černá, Miroslav Šulc

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, miroslav.sulc@natur.cuni.cz

## Úvod – funkce Kalmodulinu

Kalmodulin (CaM, z angl. CALcium MODULated protein) je evolučně velmi konzervovaný a široce rozšířený cytosolární protein. Je exprimován ve většině typů eukaryotních buněk a tvoří až 0.1 % všech proteinů. Účastní se celé řady regulací či modulací buněčných dějů díky své interakci s cílovou proteinovou molekulou, která je iniciována změnou intracelulární koncentrace vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Mezi ovlivňované buněčné procesy můžeme zařadit regulaci metabolismu či svalové kontrakce, vnitrobuněčnou signalizaci, regulaci synaptické plasticity, syntézy neurotransmiterů a hormonů, regulaci zánětlivé a imunitní odpovědi, dlouhodobé zesílení signalizace, regulaci apoptózy, buněčné proliferace a fertilizace, regulaci buněčného cyklu, ale i příklady možného zneužití působení kalmodulinu v procesu bakteriální patogenese virulentními faktory patogenních mikroorganismů.<sup>1,2,3</sup>

K jeho interakčním partnerům, které pozitivně ovlivňuje a aktivuje řadíme mnoho enzymů: např. adenylát-cyklasu, CaM dependentní proteinkinasu II,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM kinasy (CAMK, např. lehkého řetězce myosinu) či rostlinnou  $\text{NAD}^+$  kinasu, nukleotid fosfodiesterasy, fosforylasy,  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  ATPasy, iontové kanály a akvaporiny (např. na vápníku závislé draselné kanály). Současně CaM funguje jako senzor vápníku modulující kontakty endoplasmatického retikula s ostatními organelami (např. při tvorbě autofagosomů), či spolu s proteiny centrinem a centrosomovým proteinem (CP110) reguluje cyklus centrosomu, cytokinesi a genomovou stabilitu.<sup>1,3</sup>

## Kalmodulin – strukturně funkční popis a interakce

Primární sekvence kalmodulinů jsou z pohledu mezidruhového srovnání silně konzervované (při srovnání lidské a rostlinné sekvence dosahuje hodnota identity 90 %). Tento poměrně malý protein tvořený v lidském organismu 148 aminokyselinami (přibližně 16.8 kDa) je kódován u člověka třemi geny na chromosomech 14, 2 a 19 (isoformy 1, 2 a 3). Ve své primární sekvenci obsahuje více jak 30% kyselých aminokyselin, aspartát a glutamát, což koresponduje s nízkou hodnotou isoelektrického bodu (CALM1\_HUMAN, P0DP23, teoretická hodnota pI 4.09). V lidském organismu byla popsána řada post-translačních modifikací CaM, mezi které patří odštěpení N-terminálního methioninu, následná acetylace takto vzniklého N-terminálního alaninu a epsilon aminoskupiny v postranním řetězci lysinu v pozici 22 a 95, methylace epsilon aminoskupiny v postranním řetězci lysinu v pozici 116 (až třemi methylovými skupinami), tvorba isopeptidové vazby (Lys v pozici 22 s C-terminálním Gly proteinu SUMO),

a několik fosforylací hydroxy skupin v postranním řetězci serinu, threoninu či tyrosinu.<sup>3</sup> Dominantní sekundární strukturou je alfa-helix, který tvoří čtyři supra-sekundární uspořádání „helix-loop-helix“, tzv. „EF-hand“, kde každé koresponduje s jedním vazebným místem pro vápenatý iont. Vazebná místa poskytují hodnotu disociační konstanty pro  $\text{Ca}^{2+}$  iont cca  $10^{-6}$  M (intracelulární cytosolární koncentrace vápníku je 0.1  $\mu\text{M}$ , zatímco extracelulární plasmatická koncentrace je přibližně 1.4 mM).<sup>4</sup> Překvapivě nemají všechna vazebná místa shodnou afinitu pro vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a C-koncová doména má vyšší vazebnou afinitu než N-terminální vazebná doména.<sup>5</sup> Celá molekula CaM v relaxovaném uspořádání je tvořena dvěma globulárními doménami (každá obsahuje dvě vazebná místa pro vápenaté ionty), propojenými flexibilním centrálním raménkem. Každé jednotlivé vazebné místo pro vápenaté ionty je tvořeno v primární sekvenci přibližně 12za sebou jdoucími převážně negativně nabitými aminokyselinami (kromě již zmiňovaných kyselin – asparagové a glutamové – se vyskytuje i asparagin). Po vazbě  $\text{Ca}^{2+}$  iontů se tvoří v N- a C-koncové doméně CaM dvojice strukturního motivu „helix-loop-helix“ okolo každého  $\text{Ca}^{2+}$  iontu na obou koncích spojovacího páteřního hydrofobního helixu a tato konformační změna a flexibilita tohoto spojovacího raménka vede k vazbě na amfifilně-bazické povrchové helixy celé řady proteinů, které patří mezi interakční partnery CaM.<sup>2</sup> Kalmodulin samotný nemá žádnou známou enzymovou aktivitu a je tedy jen přenašečem signálu zvýšené cytosolární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Z pohledu kinetiky tvorby komplexu  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM by byl kalmodulin nejspíše špatným buněčným receptorem  $\text{Ca}^{2+}$ , nicméně jeho afinita k vápenatému iontu výrazně roste v přítomnosti cílového proteinového ligandu – interakčního partnera CaM, kdy dochází k termodynamickému párování a tvorbě komplexu  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM přizpůsobené přítomností konkrétní cílové molekuly.<sup>6</sup>

Kalmodulin je schopný interakce s celou řadou proteinů (interakčních partnerů) obsahující doménu vazající CaM, která může v sekvenci obsahovat tři typy vazebných motivů. Při vazbě se kromě konformačního mechanismu uplatňuje i vzájemně vyvolané konformační změny.<sup>7</sup> První z vazebných motivů pro CaM, který je nezávislý na vazbě  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, je označován jako IQ motiv podle nejčastěji se vyskytujících aminokyselin na začátku jeho sekvence. V motivu je variabilně přítomný isoleucin následovaný konzervovaným glutaminem, který v sekvenci 14aminokyselin obsahuje pozičně konzervované umístění bazických a hydrofobních aminokyselinových zbytků (celý konsensuální motiv obsahuje sekvenci [FILV]Qxxx[RK]Gxxx[RK]xx[FILVWY]). Ostatní dva vazebné motivy, které jsou závislé na vazbě  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, obsahují konzervované



umístění hydrofobních aminokyselin v pozicích 1-14 nebo 1-5-10-15.<sup>1,8</sup> IQ motiv je přítomný například u regulační domény myosinu z měkkýšů, u kterých k regulaci stahu kosterního svalstva nedochází na rozdíl od obratlovců pomocí systému tropomyosin-troponin.<sup>9</sup> Dalším zástupcem je neurogranin, kde inhibice jeho postsynaptické funkce je zprostředkována zabráněním vazby CaM díky fosforylaci jeho zmíněného IQ motivu pomocí protein kinasy C.<sup>10</sup>

Mezi nejznámější interakční ligandy CaM závislé na přítomnosti vápenatých iontů patří kinasa lehkého řetězce myosinu (MLCK, z angl. myosin light-chain kinase). Vazba CaM na tuto MLCK kinasu vede k její aktivaci s následnou fosforylací lehkého řetězce myosinu a aktivaci kontrakce hladkého svalstva.<sup>11</sup> Vazba CaM ovlivňuje také enzymovou aktivitu kinasy fosforylasy, která aktivuje glykogen fosforylasu, která je poté schopná katalyzovat fosforolytické odštěpování glukosa-1-fosfátu z glykogenu, nebo ovlivňuje GAP-43 (z angl. „growth-associated protein“), Ca<sup>2+</sup>/CaM-závislou protein kinasu II, fosfatasu atd.<sup>12,13,14</sup> Kalmodulin také hraje klíčovou roli v blokaci funkce hormonu kalcitoninu a tak je schopen ovlivnit hladinu vápenatých iontů v krvi, ale současně CaM aktivovaný vazbou Ca<sup>2+</sup> iontů může inhibovat vápníkové kanály v membráně sarkoplasmatického retikula (ryanodinový receptor) a tak zabránit transportu Ca<sup>2+</sup> iontů z cytosolu do endoplasmatického retikula.<sup>15</sup>

## Kalmodulin – příprava preparátů a výzkum jejich aktivity

Pro izolaci CaM či jeho částečně načištěných frakcí z nativního biologického materiálu byla od 70. let minulého století použita celá řada technik a biologická aktivita frakce obsahující CaM byla obvykle demonstrována či testována na změně enzymové aktivity vazebného proteinu (např. cyklické 3',5'-nukleotid fosfodiesterasy).<sup>16</sup> V prvopočátcích byl purifikační proces kombinací srážení sulfátem amonným, následně gelově permeční, adsorpční (fosfát vápenatý/hydroxylapatit) a poté aniontově výměnné ionexové chromatografie (např. purifikace CaM z lidského/prasečího/hovězího mozku, rostlinného materiálu, hub či korálů).<sup>16,17,18,19</sup> Případně k dalšímu nabohacení byl použit krok afinitní chromatografie s využitím perfenazinu či flufenazinu jako ligandu navázaného na chromatografický nosič.<sup>20,21</sup> Následně byl izolační postup optimalizován s využitím hydrofobní chromatografie na fenyl-Sepharose a testován pro izolaci CaM z celé řady fylogeneticky odlišných druhů a po detailní charakterizaci a sekvenčním srovnáním byla zjištěna velká míra mezidruhové sekvenční homologie. Dalším krokem ve výzkumu byla purifikace proteinů interagujících s CaM a studium a charakterizace těchto interakcí pomocí připravených afinitních chromatografických nosičů s vázanými purifikovanými preparáty CaM s použitím CNBr aktivované Sepharosy.<sup>19</sup>

V dnešní době je CaM většinou purifikován s využitím změny hydrofobicity proteinu spojené se strukturální změnou po vazbě vápenatých iontů z rekombinantně exprimované bakteriální kultury. Expres proteinu pro-

bíhá při nižší teplotě, cca při 25 °C po dobu 20 hodin, bez post-translačních modifikací. Po sklizení bakteriální kultury *E.coli* centrifugací je CaM izolován z cytosolu po lýzy buněk, které předchází štěpení buněčné stěny s využitím lysozymu (50 µg/ml, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1-2 mM EDTA, 0.2-2 mM redukční činidlo, např. β-merkapt ethanol či DTT, 0.1-0.5 mM PMSF, pH 7.0-7.2) s následným zamražením (teplota -20 °C přes noc) a alternativně zařazeným krokem sonikace po rozmražení (opakovaná pulsní sonikace sondou za stálého chlazení). Po centrifugaci, je supernatant titrován vápenatými ionty na ledu (finální koncentrace 5 mM CaCl<sub>2</sub>) a následuje hydrofobní chromatografie na fenyl-Sepharose ekvilibrované 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.0. Vazba CaM z proteinového preparátu na nosič je umožněna strukturální změnou CaM po vazbě Ca<sup>2+</sup> iontů, kdy se odkrývá hydrofobní spojovací alfa-helix. Následně je kolona promyta stejným pufrům s 5x nižší koncentrací vápenatých iontů a následuje další odmytí nespecificky vázaných kontaminujících proteinů pufrům s 5x nižší koncentrací vápenatých iontů a 5x vyšší koncentrací NaCl (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.0). K eluci CaM je použit pufr bez vápníku s přítomným chelatačním činidlem schopným CaM odebrat všechny vázané ionty (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7.0). Jako finální purifikační krok bývá po koncentraci spojených frakcí z hydrofobní chromatografie zařazena gelová permeační chromatografie (např. SEC-70, BioRad), která může být využita kromě purifikace i pro výměnu pufru a probíhá při vyšší koncentraci soli (150-250 mM NaCl), v redukčním prostředí a v přítomnosti 1-2 mM CaCl<sub>2</sub>, případně následuje dialýza v přítomnosti chelatačních činidel s cílem odstranění proteinově vázaných vápenatých iontů.

## Vápník – jeho funkce v buňce a interakce s kalmodulinem

Jak již bylo řečeno, koncentrace vápenatých iontů je výrazně odlišná ve vnitrobuněčném cytosolu (basální koncentrace je přibližně 0.1 µM) a v extracelulárním prostoru (přibližně 1 mM). Její hodnota se může měnit v čase v závislosti na regulaci vnitrobuněčné signalizace a může dojít k 10-100 násobnému zvýšení cytosolární koncentrace v závislosti na regulaci buněčné funkce.<sup>22</sup> Většina vápenatých iontů vstupuje do buňky skrze vápníkové kanály řízené především napětím na membráně (z angl. voltage-gated channel), vazbou ligandu (z angl. ligand-gated channel), nebo pomocí kombinace obou procesů pro přesnou kontrolu toku iontů. U potenciálově excitovatelných buněk (např. kosterní nebo srdeční svalové buňky a neurony) vede depolarizace membrány ke krátkodobému nárůstu intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů až k hodnotě 1 µM. Mezi tyto typy vápníkových kanálů řadíme: (i) L-typ (L z angl. „Long-Lasting“), které se vyskytují v celé řadě buněk v lidském těle, (ii) T-typ (T z angl. „Transient“), které se nacházejí kromě neuronů v osteocytech a thalamu, (iii) N-typ (N z angl. „Neural“), s výskytem v centrálním a periferním nervovém systému, (iv) R-typ (R z angl. „Residual“), který byl nalezen

v neuronech, a (v) P-typ (P z angl. „Purkyně“/Q-typ) přítomný v Purkyňových buňkách a granulocytech mozečku.<sup>23</sup>

Mezi ligandy/receptory řídící funkci vápníkových kanálů patří IP<sub>3</sub> receptor (inositol 1,4,5-trifosfát), který je součástí transdukční dráhy receptorů spojených s G-proteiny, a ryanodinový receptor (CICR, z angl. „Calcium Induced Calcium Release“), který reguluje uvolnění vápníku z lumen endoplasmatického/sarkoplasmatického retikula ve svalových buňkách.<sup>24</sup> Dále mezi ně patří adenin dinukleotid fosfát kyseliny nikotinové a fosfolipasa A2beta ovlivňující TPC kanál (z angl. „Two-Pore Channel“) v endosomální/lysosomální membráně schopný přenosu sodných, vápenatých a potenciálně i vodíkových iontů.<sup>25</sup> V plasmatické membráně je přítomný transportér „store-operated channel“, který zprostředkovává cytoplasmatickou signalizaci nezávislou na čerpání vápníku z endoplasmatického/sarkoplasmatického retikula.<sup>26</sup> Mezi další sloučeniny, které jsou schopné ovlivnit funkci vápníkových kanálů L-typu, patří syntetické molekuly využívané farmakologicky jako jejich blokátory (např. zástupci dihydropyridinů, fenylalkylaminy a benzodiazepiny), které redukuje transport vápníku do buněk hladkého svalstva srdeční či cévní stěny, a proto se užívají jako léčiva na snížení krevního tlaku.<sup>27</sup>

Signalizací přes změnu cytosolární koncentrace vápenatých iontů funguje známá regulační dráha fosfolipasy C (PLC). Receptory spojené G-proteiny či tyrosinkinasami aktivují PLC, která hydrolyzuje fosfatidyl inositol 4,5-bisfosfát na IP<sub>3</sub>, který indukuje vylití Ca<sup>2+</sup> iontů membránovým kanálem z endoplasmatického retikula, a diacylglycerol aktivuje proteinkinazu C (PKC). Mezi další signalizace, kde ionty Ca<sup>2+</sup> hrají roli druhého posla, patří aktivace proteinu kalmodulinu, který po vazbě iontů Ca<sup>2+</sup> vytváří komplex Ca<sup>2+</sup>/CaM schopný interakce: (i) přímo s efektorovými proteiny, nebo (ii) s Ca<sup>2+</sup>/CaM závislými kinasami (CaMK), které patří mezi Ser/Thr kinasy, jejichž fosforylačním místem jsou postranní řetězce serinu nebo threoninu efektorových proteinů.<sup>28</sup> Mezi nejvýznamnější členy této rodiny patří Ca<sup>2+</sup>/CaM závislé proteinkinasy kinasy (CaMKK), a dále CaMKI a CaMKIV, které jsou součástí CaMK kaskády. Mezi ostatní členy této rodiny patří již zmíněná kinasa myosinu MLCK nebo CaMKII a CaMKIII. Pro poslední zmíněnou CaMKIII byl dosud popsán jediný substrát – elongační faktor 3.<sup>29</sup> Z uvedené rodiny CaMKK byly u savců v cytoplazmě a jádru popsány dosud dvě isoformy označované jako CaMKK1 a CaMKK2, jejichž aktivace je odlišná.<sup>30</sup> U CaMKK1 závisí výhradně na vazbě Ca<sup>2+</sup>/CaM komplexu. CaMKK je autoinhibována prostřednictvím svého C-koncového úseku (CaMKK sekvence v pozici 435-440), který je schopný interakce s vysoce konzervovanou oblastí přibližně 250aminokyselin tvořící kinasovou doménu. Ta je tvořená vazebnými doménami pro ATP a substrát, které jsou propojeny malou spojovací oblastí.<sup>31,32</sup> Po vazbě Ca<sup>2+</sup>/CaM komplexu na svou vazebnou doménu CaMKK, která se částečně překrývá s autoinhibiční doménou, může dojít k uvolnění autoinhibiční domény z kinasové domény CaMKK a tato strukturální změna se projeví plně funkční kinasovou aktivitou. Naproti tomu CaM-

KK2 obsahuje N-koncovou sekvenci v úseku 129-151, která může potlačit autoinhibiční schopnosti svého C-koncového úseku, a tedy způsobí kinasovou aktivitu CaMKK2 nezávislou na interakci s komplexem Ca<sup>2+</sup>/CaM.<sup>30</sup> Fosforylace obou isoforem CaMKK pomocí protein kiny A na Ser458 brání vazbě Ca<sup>2+</sup>/CaM komplexu na její vazebnou doménu a negativně ovlivňuje kinasovou aktivitu CaMKK.<sup>33</sup> Aktivovaná CaMKK má celou řadu substrátů, jako je CaMKI, CaMKIV, protein kiny B a proteinkinasa aktivovaná AMP.<sup>30</sup> Vápník je tedy široce rozšířená signální molekula, která hraje roli druhého posla v regulaci řady fyziologických dějů od svalové kontrakce, neuronální transmise, buněčného pohybu, fertilizace, proliferace, regulace neurogenese a synaptické plasticity, a v případě vysoké cytosolární koncentrace je i příčinou buněčné apoptosy.<sup>34,35</sup> Nicméně nesmíme zapomínat i na další biochemické funkce vápníku jako je regulace enzymové aktivity, permeability iontových kanálů a iontových pump či ovlivnění cytoskeletu.<sup>28,36</sup>

## Kalmodulin – role v bakteriální patogenesi (příklad černého kašle, *Bordetella pertusis*)

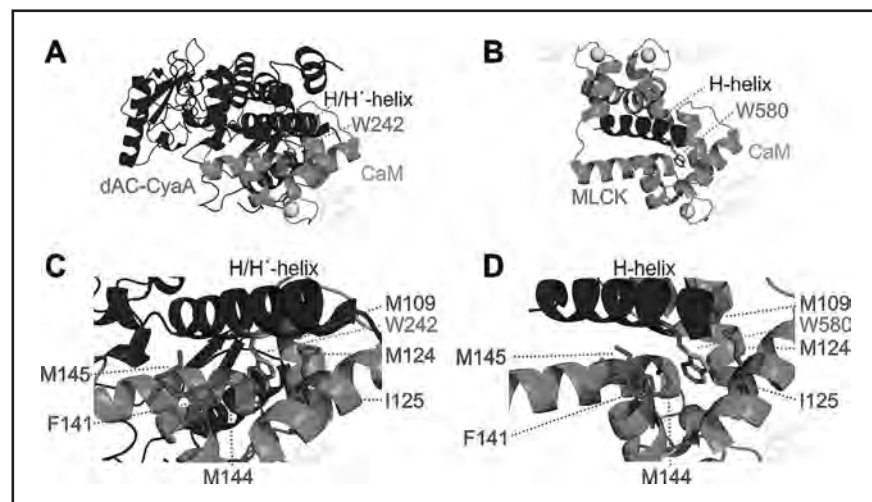
Celá řada bakteriálních patogenů produkuje širokou škálu virulentních faktorů, které se podílejí na interakci patogen-hostitel: (i) umožňují bakterii kolonizovat vhodné místo v hostiteli, (ii) participují na rozhraní patogen-hostitel (např. filamentosní hemaglutinin, FHA), (iii) umožňují u intracelulárních patogenů vstoupit či opustit buňky hostitele, (iv) poskytují bakterii nutriční výhodu či živiny na úkor hostitele (např. produkce sideroforů pro získání iontů železa), (v) způsobují přežití patogenu v hostiteli a poskytují možnost uniknout obrannému systému hostitele díky imunosupresi a vyhnout se buněčnému imunitnímu systému (např. adenylát cyklosový toxin, CyaA), (vi) umožňují bakterii produkovat toxiny způsobující toxickou reakci či nemoc organismu (např. adenylát cyklosový a pertusový toxin). Poslední kategorie uvedených virulentních faktorů patří k početně největší a lze ji rozdělit do dvou skupin na endo a exo toxiny. Molekuly exotoxinů s aktivní sekrecí vykazují celou řadu aktivit od inhibice klíčových biochemických metabolických drah cílových buněk až po schopnost způsobit vážné poškození buněk či tkání hostitele pomocí cytotoxické aktivity (např. neurotoxiny, hepatotoxiny a enterotoxiny). Exotoxiny patří k extrémně imunogenním molekulám, které aktivují humorální odpověď imunitního systému produkcí protilátek proti dané molekule toxinu.<sup>37</sup>

Gram negativní, obligatorně aerobní, patogenní kokobacil, *Bordetella pertusis*, je příčinou v poslední době se šířícího onemocnění známého jako černý kašel nebo pertuse. Bakterie jsou rozptýleny ve vzdušném aerosolu a po inkubační době 6-20 dní od vstupu do dýchacích cest dochází k postupné kolonizaci respiračního systému s typickým projevem přerušovaného, suchého, dávivého kašle s typickou nemožností nádechu, kdy tento stav může vyvrcholit až následným dávením. Infekce se většinou objevují u malých dětí do věku jednoho roku bez imunizace, či u jedinců



s porušenou imunitou. Původní vakcinace usmrce-  
ným mikroorganismem byla nahrazena acelulární vak-  
cínou (v dnešní době v ČR např. hexavakcína), která  
výrazně snižuje druhotné negativní účinky imunizace  
se zachováním snížení mortality onemocnění spolu  
s omezením propuknutí onemocnění v populaci.<sup>38,39,40</sup>  
Mezi virulentní faktory této bakterie patří adenylát  
cyklasový toxin (CyaA) a pertusový toxin, filamentózní  
hemagglutinin (FHA), pertaktin, fimbrie a tracheální  
cytotoxin.<sup>41</sup> Bakterie *B. pertusis* infikuje hostitele a ko-  
lonizuje epitelální buňky dýchacích cest a plic pomocí  
adhesinu, proteinu FHA (220 kDa), který je schopný  
vazby minimálně čtyřmi vazebnými doménami s ce-  
lou řadou buněčných povrchů a vazebných partnerů/  
receptorů. Je schopný adherence i na cilie epitelálních  
buněk respiračního traktu obsahující sialované cuk-  
erné zbytky a tak zabrání mechanickému odstranění  
z respiračního traktu působením tohoto řasinkového  
epitelu. Kromě tohoto děje byla popsána i interakce  
FHA s vlastním adenylát cyklasovým toxinem CyaA.<sup>42</sup>  
Tento bifunkční toxin CyaA (178 kDa, 1706 aminoky-  
selin s post-translační modifikací dvou lysinů palmy-  
toylací, Lys860 a Lys983) obsahuje N-terminální ade-  
nylát cyklasovou doménu třídy II sensitivní k vazbě  
CaM (sekvence 1-373). Následuje centrální hemoly-  
sinová doména schopná formovat transmembránové  
póry (sekvence 500-700, stimulace influxu Ca<sup>2+</sup> iontů).  
Na C-konci je doména obsahující 42 repetitivních se-

kvencí, které jsou schopné vazby vápenatých iontů,  
následovaná sekrečním signálem pro sekreční systém  
typu I. Tento toxin po pravděpodobné interakci s bu-  
něčným receptorem (např. komplementový receptor 3  
nebo integrin CD11b/CD18) prochází přímo povrchem  
membrány a translokuje svojí N-terminální adenylát  
cyklasovou doménu (40 kDa) do cytosolu napadené  
buňky, kde je aktivována její enzymová adenylát cyk-  
lasová aktivita vazbou buněčného CaM aktivovaného  
současným influxem Ca<sup>2+</sup> iontů skrze transmembráno-  
vé póry centrální hemolysinové domény toxinu CyaA,  
což vede k následné nekontrolované přeměně ATP  
za vzniku cAMP.<sup>43,44</sup> Nárůst koncentrace této klíčové  
signalizační molekuly následně vede například ke ztrá-  
tě baktericidní aktivity fagocytujících buněk.<sup>45</sup> Podrobný  
strukturní model interakce C-terminální části CaM  
s adenylát cyklasovou doménou CyaA (obrázek 1 A),  
nebo CaM s vazebným peptidem MLCK (obrázek 1 B) je  
dostupný v PDB databázi (2COL a 1CDL).<sup>46,47,48,49</sup> První  
model získaný na základě rentgenostrukturní analýzy  
heterodimeru popisuje klíčovou interakci H/H'-helixu  
CyaA (pozice v sekvenci 235-259) s C-koncovou do-  
ménou Ca<sup>2+</sup>/CaM. Nezbytným interagujícím aminoky-  
selinovým postranním řetězcem CyaA je Trp242, který  
svým planárním hydrofobním systémem interaguje  
z každé své strany s trojicí aminokyselin kalmodulinu  
Phe91, Met141 a Met145 z jedné a s Met109, Met124  
a Ile125 z druhé strany (obrázek 1C).<sup>46</sup> Potvrzení dů-  
ležitosti této vazby demonstrovala redukce vazby a následně aktivity ade-  
nylát cyklasů po oxidaci methioninů  
CaM nebo v případě připraveného ar-  
teficiálního proteinu CyaA s bodovou  
záměnou aminokyseliny Trp242Gly.<sup>50</sup>  
Obdobný model a kontaktní aminoky-  
seliny CaM lze nalézt v interakci s am-  
fipatickým helixem MLCK (sekvence  
577-602)<sup>47</sup>, jak zobrazuje obrázek 1D.  
Naproti tomu v obdobné interakci  
CaM s kalmodulin dependentní ade-  
nylát cyklasovou doménou virulentního  
faktoru způsobujícího edém z bakte-  
rie *Bacillus anthracis* hraje obdob-  
nou roli také H helix tohoto toxinu,  
avšak klíčovou aminokyselinou je zde  
v pozici 525 Lys525, který tvoří solný  
můstek s Glu114 CaM<sup>51,52</sup>, přičemž  
Gln562 odpovídající svou pozicí klíčové  
aminokyselině Trp242 z CyaA hraje  
v interakci s kalmodulinem minimální  
roli. Je ale třeba podotknout, že afinita  
CyaA k CaM je přibližně 100 krát vyšší,  
než v případě faktoru způsobujícího  
edém z *B. anthracis*.



**Obr. 1: Celkový a detailní pohled na prostorové uspořádání kalmodulinu s vazebnými ligandy:** (A) celkový pohled na strukturu C-terminální domény kalmodulinu (CaM, zeleně) s vázanými ionty Ca<sup>2+</sup> (žlutě) v interakci s adenylát cyklázovou doménou CyaA (modře) (PDB struktura 1COL), (B) celkový pohled na strukturu CaM (zeleně) s vázanými ionty Ca<sup>2+</sup> (žlutě) v interakci s vazebným peptidem MLCK (PDB struktura 1CDL), (C) detailní 3D struktura C-koncové vazebné domény CaM (zeleně), vázaných vápenatých iontů (žlutě) a H/H'-helixu CyaA (modře) (PDB struktura 1COL) se zvýrazněnými aminokyselinami CaM Phe91, Met141, Met145, Met109, Met124 a Ile125 (červeně) a CyaA Trp242 (světle modře), a (D) detailní 3D struktura interakční domény CaM (zeleně), vázaných vápenatých iontů (žlutě) s vazebným amfifilním helixem MLCK (PDB struktura 1CDL) (modře) se zvýrazněnými aminokyselinami CaM Phe91, Met141, Met145, Met109, Met124 a Ile125 (červeně) a MLCK Trp580 (světle modře).<sup>46,47,48,49</sup>

S použitím programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2. 3. 3 Schrödinger, LLC).

Z výše uvedeného je zřejmé, že kalmodulin hraje v obou případech klíčovou roli iniciátora vnitrobuněčného spuštění toxické aktivity jejich virulentních faktorů a jeho protein-proteinová interakce po vnitrobuněčné aktivaci významně participuje na procesu bakteriální patogenese.



## Závěr

Prezentovaný souhrn literárních poznatků ukazuje současné znalosti o důležitém regulačním proteinu kalmodulinu a uvádí metodické postupy jeho purifikace a funkčního výzkumu. Současně je nastíněn metabolismus a signalizace zprostředkovaná přes vápenaté ionty a jejich vliv na strukturně funkční chování kalmodulinu s jeho následnou rolí v interakci s vazebnými

partnery se zaměřením na roli v bakteriální patogenesi, která je nejen v současnosti aktuální.

## Poděkování

Tato práce vznikla za podpory GAČR projektu č. 20-28126S a dále poskytovatele (MŠMT) v rámci projektu SVV 260691/2024.

## Literatura

1. Tidow H, Nissen P: *FEBS J.* 280 (21), 5551 (2013).
2. Chin D, Means AR: *Trends in Cell Biol.* 10 (8): 322 (2000).
3. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0DP23/entry> (získané 2024-02-27)
4. Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ: *Biochem J.* 405 (2), 199 (2007).
5. Yang JJ, Gawthrop A, Ye Y: *Protein Pept Lett.* 10 (4), 331 (2003).
6. Swulius MT, Waxham MN: *Sciences.* 65, 2637, (2008).
7. Wang Q, Zhang P, Hoffman L, et al: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110 (51), 20545 (2013).
8. Rhoads AR, Friedberg F: *FASEB J.* 11 (5), 331–40 (1997).
9. Houdusse A, Cohen C: *Structure.* 4 (1), 21 (1996).
10. Hoffman L, Chandrasekar A, Wang X, et al: *J Biol Chem.* 289 (21), 14644 (2014).
11. Tansey MG, Luby-Phelps K, Kamm KE, et al: *J Biol Chem.* 269 (13), 9912 (1994).
12. Nishizawa Y, Okui Y, Inaba M, et al: *J Clin Investig.* 82 (4), 1165 (1988).
13. Skene JH: *Neurosci Res Suppl.* 13, S112 (1990).
14. Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, et al: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (24), 11175 (1995).
15. Walsh MP: *Mol Cell Biochem.* 135 (1), 21 (1994).
16. Cheung WY: *Biochem Biophys Res Commun.* 38 (3), 533 (1970).
17. Sharma RK, Wang JH: *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 10, 187 (1979).
18. Kobayashi N, Nakao Y, Kishihara M, et al: *Life Sci.* 29 (26), 2781 (1981).
19. Lukas TJ, Watterson DM: *Methods Enzymol.* 157, 328 (1988).
20. Charbonneau H, Cormier MJ: *Biochem Biophys Res Commun.* 90 (3), 1039 (1979).
21. Rocher MA, Martin MP, Toro MJ, et al: *J Chromatogr.* 368 (2), 462 (1986).
22. Clapham DE: *Cell.* 131 (6), 1047 (2007).
23. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J: *Cell Biology.* Philadelphia: Saunders Elsevier 2007.
24. Rang HP: *Pharmacology.* Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003.
25. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9ULQ1/entry> (získané 2024-02-27)
26. Putney JW, Steinckwich-Besançon N, Numaga-Tomita T et al: *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1864 (6), 900 (2017).
27. Olson K: *Poisoning & drug overdose.* New York: McGraw-Hill Medical 2011.
28. Koolman J, Röhm KH: *Color Atlas of Biochemistry.* New York: Thieme. 2005.
29. Nairn AC, Palfrey HC: *J Biol Chem.* 262, 17299 (1987).
30. Kukimoto-Niino M, Yoshikawa S, Takagi T, et al: *J Biol Chem.* 286, 22570 (2011).
31. Adams JA: *Chem rev.* 101, 2271 (2001).
32. Soderling TR: *Trends Biochem Sci.* 24, 232 (1999).
33. Osawa M, Tokumitsu H, Swindells MB, et al: *Nat Struct Mol Biol.* 6, 819 (1999).
34. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1 (1), 11 (2000).
35. Joseph SK, Hajnóczky G: *Apoptosis.* 12 (5), 951 (2007).
36. Ali ES, Hua J, Wilson CH, et al: *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1863 (9), 2135 (2016).
37. Murray PR.; Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology, Philadelphia: Elsevier 2005.*
38. Ladant D, Ullmann A: *Trends Microbiol.* 7 172 (1999)
39. Carbonetti NH, Artamonova GV, Andreasen C, et al: *Infect Immun.* 73, 2698 (2005).
40. Sebo P, Osicka R, Masin J: *Expert Rev Vaccines.* 13 1215 (2014).
41. Loch C: *Int Microbiol.* 2 (3), 137 (1999).
42. Zaretsky FR, Gray MC, Hewlett EL: *Mol Microbiol.* 45, 1589 (2002).
43. Osicka R, Osickova A, Hasan S, et al: *Elife.* 4.pii:e10766 (2015).
44. Osickova A, Masin J, Fayolle C, et al: *Mol Microbiol.* 75, 1550 (2010),
45. Vojtova J, Kamanova J, Sebo P: *Curr Opin Microbiol.* 9 (1), 69 (2006).
46. Guo Q, Shen Y, Lee YS, et al: *EMBO J.* 24, 3190 (2005).
47. Ikura M, Clore GM, Gronenborn AM, et al: *Science.* 256 (5057), 632 (1992).
48. PDB 2COL, <https://doi.org/10.2210/pdb2COL/pdb> (získané 2024-02-27)
49. PDB 1CDL, <https://doi.org/10.2210/pdb1CDL/pdb> (získané 2024-02-27)
50. Vouquier S, Mary J, Dautin N, et al: *J Biol Chem.* 279, 30210 (2004).
51. Drum CL, Yan SZ, Bard J, et al: *Nature* 415, 396 (2002).
52. Shen Y, Lee Y-S, Soelaiman S, et al: *EMBO J.* 21, 6721 (2002)

## Souhrn

Kalmodulin (CaM, z angl. CALcium MODULated proteIN) participuje na regulaci či modulaci celé řady buněčných dějů v závislosti na interakci s cílovou proteinovou molekulou, která je iniciována změnou intracelulární koncentrace vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a strukturální změnou kalmodulinu po vazbě  $\text{Ca}^{2+}$ . CaM je široce rozšířený a evolučně velmi konzervovaný malý cytosolární protein, který je vhodným proteinovým modelem pro studium strukturně funkčních vztahů protein-proteinových interakcí od buněčné signalizace a regulace metabolismu až po studium některých případů bakteriální patogenese.

**Klíčová slova:** kalmodulin,  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, protein-proteinové interakce, bakteriální patogenese

## Summary

Calmodulin (CaM, CALcium MODULated proteIN) participates in the regulation or modulation of a number of cellular processes depending on the interaction with the target protein molecule, which is initiated by an accumulation of the intracellular calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and a structural rearrange of calmodulin after  $\text{Ca}^{2+}$  binding. CaM is a widely distributed and evolutionarily highly conserved small cytosolic protein that is a suitable protein model for the study of structure-function relationships in protein-protein interactions ranging from cell signalling and metabolic regulation up to the study of some cases of bacterial pathogenesis.

**Keywords:** calmodulin,  $\text{Ca}^{2+}$  ions, protein-protein interaction, bacterial pathogenesis



## OBSAH

<b>Úvodem</b>	<b>1</b>
Opatrný Z., Lencová S.: <b>Vesmírné biotechnologie – mikrogravitace s českou stopou</b>	<b>2</b>
Pokorná D.: <b>Mikrobiologie anaerobního rozkladu organických látek s důrazem na methanogenezi – biomethanizace</b>	<b>6</b>
Ondruška V., Černá V., Šulc M.: <b>Calmodulin – strukturně funkční popis a jeho role v bakteriální patogenesi</b>	<b>14</b>

## CONTENT

<b>Editorial</b>	<b>1</b>
Opatrný Z., Lencová S.: <b>Space biotechnology – microgravity with czech footprint</b>	<b>2</b>
Pokorná D.: <b>Microbiology of anaerobic digestion of organic matter with emphasis on methanogenesis – biomethanation</b>	<b>6</b>
Ondruška V., Černá V., Šulc M.: <b>Calmodulin – structural-functional description and its role in bacterial pathogenesis</b>	<b>14</b>



## REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Dana Pokorná, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)  
doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)  
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)  
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)  
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)  
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PŘF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)  
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PŘF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)  
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6  
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1  
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6  
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PŘF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno  
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6  
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4  
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice  
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov  
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PŘF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

---

## POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: *Disertační práce*, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nevkládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu [jan.kas@vscht.cz](mailto:jan.kas@vscht.cz) nebo na [petra.lipovova@vscht.cz](mailto:petra.lipovova@vscht.cz). Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z.: *Diploma thesis*, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address [jan.kas@vscht.cz](mailto:jan.kas@vscht.cz) or [petra.lipovova@vscht.cz](mailto:petra.lipovova@vscht.cz). More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.



# **BIOPROSPECT**

Vydavatel:  
**BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST**  
Technická 3  
166 28 Praha 6  
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:  
**MK ČR E 19409**

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik  
vydávaných v ČR

Tiskne:  
VENICE Praha, s.r.o.  
Za Hanspaulkou 13/875  
160 00 Praha 6

**ISSN 1210-1737** (Print)  
**ISSN 2570-8910** (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)  
jsou archivovány Národní knihovnou ČR ([www.webarchiv.cz](http://www.webarchiv.cz)).