

Bio

Ročník 30 • Číslo 1/2020

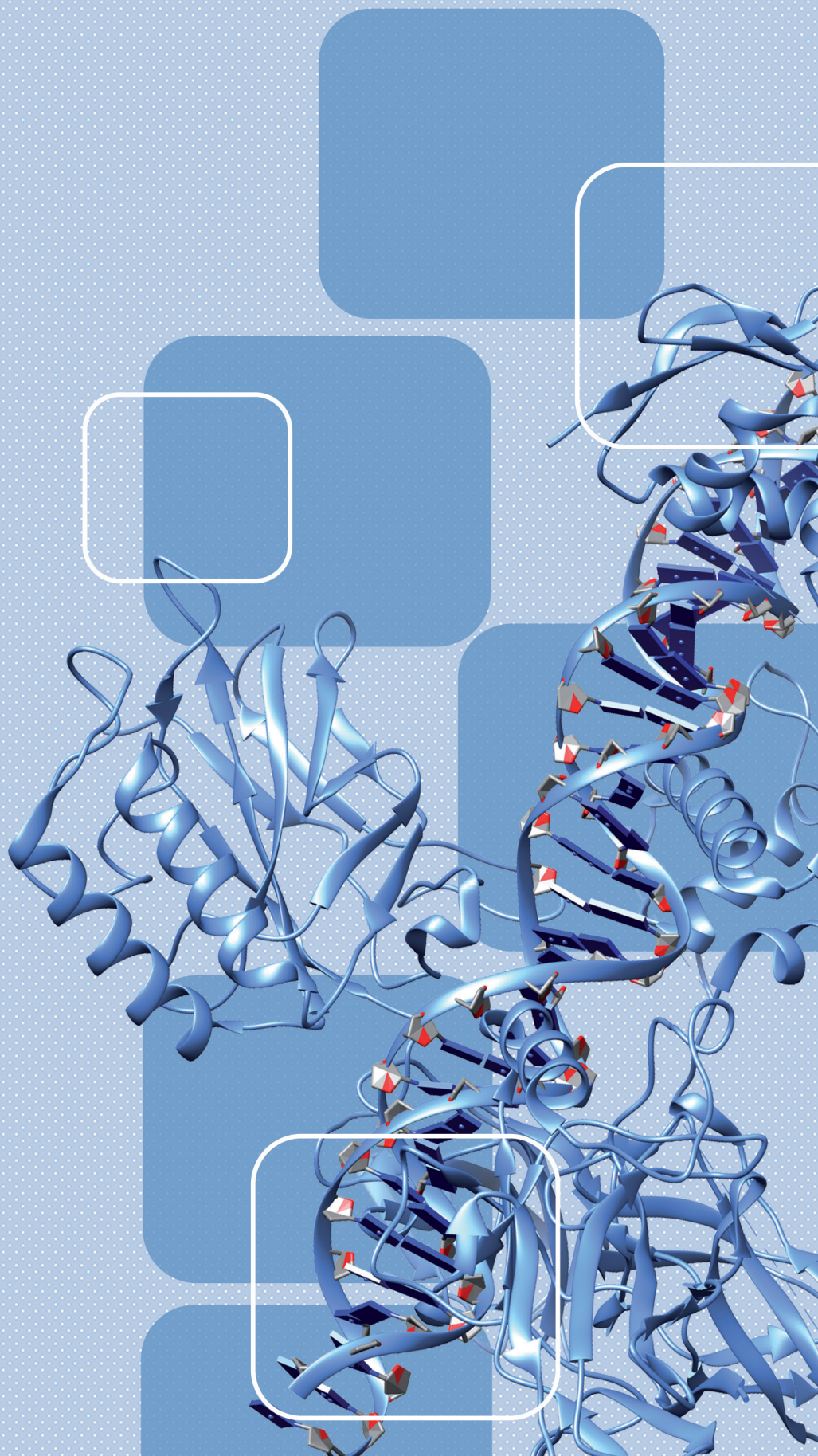
prospect

**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, 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.efb-central.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:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
UCT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

rádi bychom Vám připomněli, že UNESCO na svém 40. zasedání v minulém roce vyhlásilo **4. březem světovým inženýrským dnem**. Vše důležité o tomto dni se dozvíte na webových stránkách <http://worldengineeringday.net>. Vše doporučujeme si tyto stránky otevřít a seznámit se s důvody, které UNESCO vedly k zavedení tohoto významného svátku všech inženýrů. V předvečer svátku všech inženýrů naší planety uspořádala naše střešní organizace ČSVTS setkání všech našich spolků, na kterém bývalý předseda p. doc. Ing. Zdeněk Trojan, CSc. EUR ING přednesl obsáhlou přednášku na téma „Postavení a úloha inženýrství a inženýrů a techniků v současné společnosti“ a připomněl i historii inženýrských spolků v českých zemích. Setkání mělo slavnostní charakter, vedení ČSVTS připravilo velmi vkusné informativní panely, výstavku publikací spolků svazu i diskusi při číši vína.

V současnosti, jak všichni dobře víte, čelíme velikému problému v celosvětovém šíření koronaviru označovanému jako COVID-19. Konečně dochází k celosvětové koordinaci opatření proti jeho šíření a doufejme, že tato opatření přinesou co nejdříve pozitivní výsledky. Věříme proto, že naše symposium Biotech 2020 (www.biotech2020.cz) budeme moci realizovat v plánovaném termínu. Pokud se ukáže, že to nebude možné, odložíme jeho konání na leden 2021.

Jako vždy si všimneme některých zajímavostí o kterých se píše v odborné literatuře. Běžné cigarety jsou v poslední době nahrazovány „elektronickými cigaretami“, které jsou často deklarovány jako méně škodlivé než běžné kouření. Bohužel tak tomu rozhodně být nemusí. E-cigarety vytvářejí aerosol, který kuřák inhaluje. Tento aerosol obsahuje řadu substancí, které mohou způsobovat alergické a imunologické reakce a dráždění přítomnými chemikáliemi. V řadě případů způsobují značné potíže v dýchání, bolesti na prsou vedoucí k hospitalizaci a dokonce i k úmrtí (v Illinois a Oregonu v USA). Vzniklá „plicní nemoc“ je nevratná, a proto je možné jen doporučit se elektronickým cigaretám vyhnout.

Všeobecně je známo, že nadměrná konzumace alkoholu může způsobit těžké poškození jaterní tkáně. Od r. 1962 je známo, že k poškození jater může dojít i v případě abstinenta. Ludvig a spol. v r. 1980 označili chorobu jako nealkoholická steatosa a v současnosti je považována za součást metabolického syndromu. V nedávné době byly publikovány informace, že příčinou této choroby může být i bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Je to podmíněný patogen. Zdravý člověk může být jejím nosičem a nemá vůbec žádné problémy. Případné problémy se řeší podáváním antibiotik, ale při nakažení v cizině byly zaznamenány i problémy s kmeny rezistentními vůči antibiotikům. Zde však chceme ukázat na publikovaný případ Číňana, který trpěl opilstí, i když žádný alkohol nepil. Alkohol mu vyráběly střevní bakterie v množství, které dosáhlo až neuvěřitelných 4 promile. Ukázalo se, že dotýčný pacient měl ve stolici téměř 20 % bakterií *Klebsielly* ze všech bakterií střevní mikrofory. Důvodem byla vysoká konzumace cukrů v přijímané potravě.

Velké environmentální nebezpečí je spatřováno ve zvyšující se koncentraci CO₂ v atmosféře, které se přispívají současné klimatické změny představované především zvyšováním teplot ovzduší. V tomto ohledu je povzbuzující práce vědců z izraelského Weizmannova Institutu publikovaná v časopise Cell 179(6), 1255-63, 2019. Autoři nejprve identifikovali geny odpovědné za fixaci uhlíku z CO₂ do organických molekul, které vložili do *E.coli* a zároveň odstranili geny cukerného metabolismu. Geneticky modifikované bakterie pak produkovaly olej místo cukrů. Práce naznačila experimentální přístup jak přeměnit plyný CO₂ na užitečnou „biomasu“ a řešit problém zvyšování teploty atmosféry („zachránit planetu“).

Milí čtenáři, přejeme Vám příjemné prožití jara a blízkých velikonočních svátků bez hrozby koronaviru. Těšíme se, že s dalším číslem našeho Biopropectu bude hrozba onemocnění nebezpečným virem již minulostí.

Se srdečnými pozdravy se s Vámi loučí
Jan Káš a Petra Lipovová



**WORLD
ENGINEERING
DAY** FOR SUSTAINABLE
DEVELOPMENT

4th March – the World Engineering Day for Sustainable Development

Realizing the key role of engineering for humanity and its environment, UNESCO, with support of all its member countries and more than 80 engineering organizations worldwide, decided to proclaim the 4th March every year as the World Engineering Day for Sustainable Development, to engage with governments, industries, non-governmental organizations and the public at large to address the need for engineering capacity and the quality of engineers to solve the world's most pressing problems.

Be an Engineer and Create a Better Future for the World

KRYSTALOVÁNÍ JAKO CESTA K DŮKAZU PROTEINOVÉ POVAHY ENZYMŮ: HISTORICKÝ EXKURZ

Marek Šebela

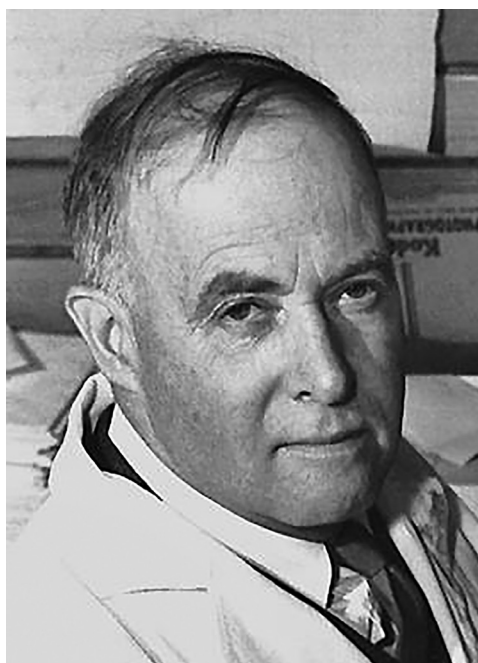
Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci; marek.sebela@upol.cz

Úvod

V tomto stručném přehledu jsou zmíněny osudy a vědecké úspěchy tří amerických biochemiků aktivních v prvních desetiletích 20. stol. James B. Sumner¹, Moses Kunitz² a John H. Northrop³ se zapsali do povědomí především úspěšnými experimenty s krystalizací enzymů, které tehdy ještě nebyly cestou k určování prostorové struktury, nicméně napomohly k definitivnímu potvrzení skutečnosti, že enzymy – biokatalyzátory chemických reakcí v živých organismech – jsou proteiny.

James Batcheller Sumner

(*19. 11. 1887 – †12. 8. 1955)



Obr. 1: James Batcheller Sumner. Fotografie z roku 1946 (Wikimedia Commons).

Sumner (obr. 1) byl prvním biochemikem, který krystaloval enzym. Šlo tehdy o ureasu katalyzující rozklad močoviny na amoniak a oxid uhličitý. Výsledek, ačkoli převratný, byl ve své době přijat s nedůvěrou či dokonce výsměchem¹. Opakovanými důkazy však autor vehementně potvrdil svoje závěry. Přispěl tak ke konečnému pochopení dnes samozřejmě přijímaného faktu, že enzymy patří mezi proteiny. Narodil se v Cantonu u Bostonu, jeho předkové přišli do Ameriky z Anglie před polovinou 17. stol. Dědeček měl továrnu na zpracování bavlny a farmu, otec vlastnil venkovský statek. Už jako dítě proto mohl Sumner pozorovat parní a pletací stroje a zvířata na farmě. Na střední škole si oblíbil chemii a fyziku. Trpěl však výrazným hendikepem. Při lovecké výpravě ho postřelil společník

do levé ruky, která byla amputována nad loktem. Musel se proto přeučit na praváka, avšak i se svým postižením sportoval, hrál tenis, lyžoval, plaval, bruslil, věnoval se střelbě, nebo jezdil na kánoí¹.

Od r. 1906 studoval na Harvardu elektrické inženýrství, které brzy vyměnil za studium chemie. Již jako student publikoval jako spoluautor se svým profesorem práci o syntéze alkaloidu papaverinu. Po ukončení studia v r. 1910 šel nejdříve pracovat do strýcovy přádelny. Po půl roce dostal nabídku učit jeden semestr chemii a fyziologii na Koleji Mt. Allison v Sackvillu, Nový Brunšvik (Kanada). Pak ještě krátce působil jako asistent na Worcesterstské polytechnice v Massachusettsu. Následně odešel na lékařskou fakultu Harvardu, kde do studoval biochemii u Otto Folina (1867 – 1934), chemika pocházejícího ze Švédska, který se zabýval analytickými mikrometodami. Folin spolu s rumunským stážiistou jménem Vintilă Ciocâlțeu (1890 – 1940) vyvinuli činidlo pro stanovení fenolových látek („Folin-Ciocalteu Reagent“, FCR). Absolvoval v r. 1913 a v r. 1914 získal doktorát, disertace se zabývala tvorbou močoviny v těle živočichů, spolupracoval s Cyrusem H. Fiskem (1890 – 1978)⁴, objevitelem kreatinfosfátu (1927).

Poté nastoupil na Cornellovu univerzitu v Ithace, stát New York, kde působil na lékařské fakultě. Byl docentem a později profesorem na katedře fyziologie a biochemie. V r. 1938 přešel na zoologii na přírodovědecké fakultě. V r. 1945 pak zakotvil na zemědělské fakultě, katedra biochemie a výživy. Byl zde od r. 1947 ředitelem laboratoře chemie enzymů. V l. 1920 – 21 absolvoval postdoktorský pobyt na lékařské fakultě Bruselské univerzity v Belgii. V l. 1929 byl na stáži u nobelisty Hanse von Eulera (1873 – 1964) na Stockholmské univerzitě a konečně v r. 1937 na univerzitě v Uppsale. Na Cornellu především učil biochemii s velkým úvazkem, ku pomoci měl pouze jediného asistenta, příležitosti k vědecké práci měl málo. Publikoval na téma bioanalytických metod, čímž se zabýval už na Harvardu. Šlo o stanovení amoniaku a močoviny např. ve svalu a moči¹.

Byl fascinován problémem podstaty enzymů a rozhodl se získat čistý enzym. Zvolil si ureasu z fazole *Canavalia ensiformis* odkud předtím krystaloval i dva globuliny. Cesta ke krystalickému enzymu trvala téměř 10 let, zkoušel mnoho metod, nakonec využil relativně jednoduché procedury založené na extrakci fazolové mouky zředěným acetonem. Krystaly se objevily v chlazeném filtrátu a byly vyčištěny promytím acetonem. Po jejich rozpuštění ve vodě šlo naměřit vysokou aktivitu a test na obsah proteinů byl pozitivní. První dokončené výsledky s krystalizací byly publikovány v Journal of Biological Chemistry v r. 1926^{5,6}. Publikace byla přijata s nedůvěrou, zejména Richardem M. Wilstätterem (1872 – 1942) a jeho žáky v Německu, kteří předpokládali

dali, že enzymy nejsou proteinové povahy a oponovali, že byl krystalován pouhý proteinový nosič enzymu. V následujících letech Sumner podpořil svoji převratnou práci dalšími publikovanými daty (téměř 20 prací)¹.

V r. 1929 John H. Northrop (1891 – 1987) z Rockefellerova ústavu v Princetonu, New Jersey, uveřejnil krystalizaci pepsinu⁷ a později s Mosesem Kunitzem (1888 – 1978) popsali krystalizace trypsinu⁸ a chymotrypsinu⁹. Ještě několik let ale trvalo, než se všeobecně akceptovalo, že enzymy jsou proteiny. Sumner rovněž krystaloval katalasu, což bylo publikováno v r. 1937 s Alexanderem L. Duncem (1909 – 1997)¹⁰. Ten později jako první vyslovil hypotézu, že DNA by mohla být vzorem (templátem) pro tvorbu RNA a následně proteinů, předpověděl genetický kód (1952/1953)¹¹. Objevil také skleněný homogenizátor pojmenovaný po něm umožňující izolaci malých organel, jako jsou mitochondrie. Celkem Sumner připravil více než tucet krystalických enzymů. V r. 1946 získali James B. Sumner, John H. Northrop a Wendell M. Stanley (1904 – 1971) Nobelovu cenu za chemii (krystalizace enzymů). Při přípravě čtyřdílné knihy o enzymech (1950 – 1952), do které přispívalo 78 vědců a jež měla 2800 stran, Sumner nejen odborně posuzoval všechny příspěvky, ale i osobně ověřoval v laboratoři některé metodiky¹.

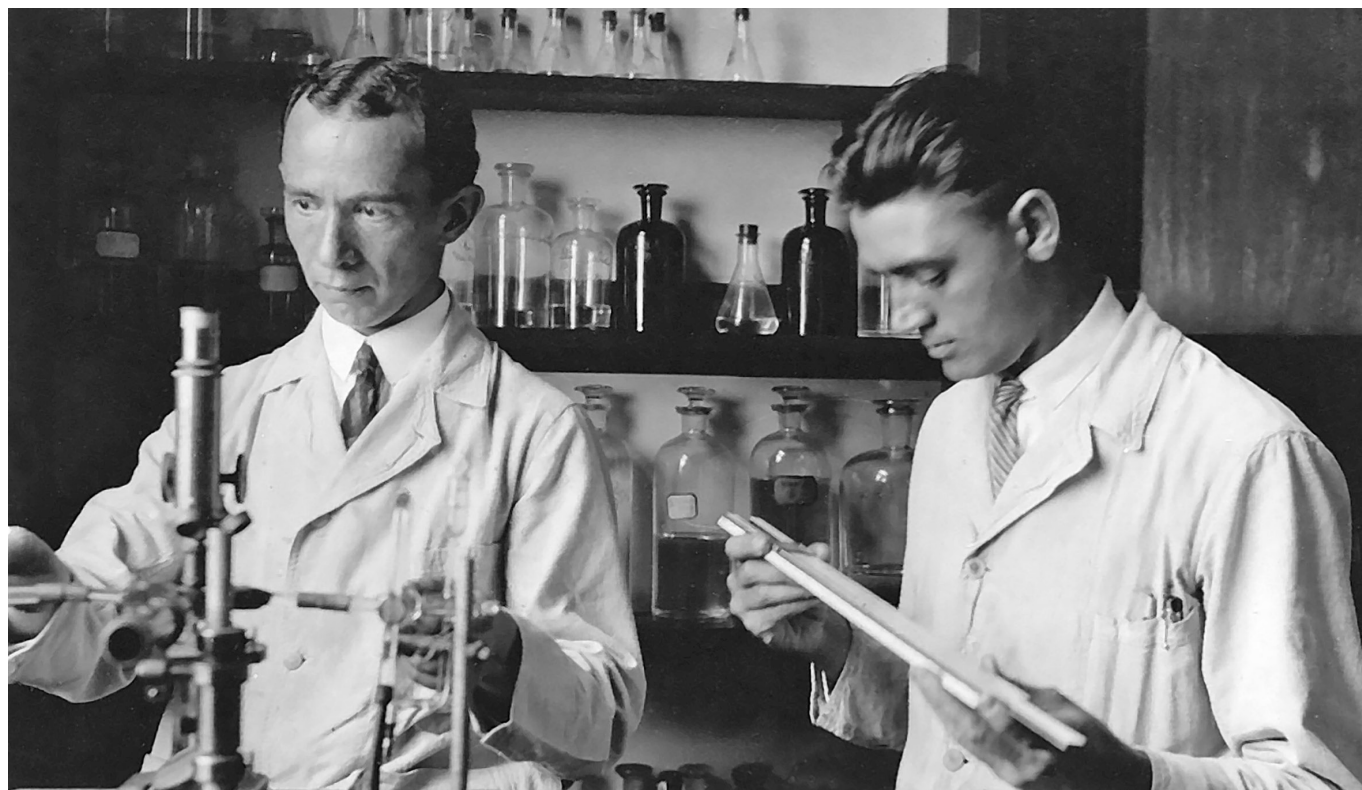
Moses Kunitz

(*19. 12. 1887 – † 20. 4. 1978)

Kunitz (obr. 2) izoloval a krystaloval několik enzymů a jejich prekurzorů. Přispěl tak významnou měrou k potvrzení skutečnosti, že enzymy jsou proteiny. Krystalizaci ribonukleasy a deoxyribonukleasy bylo možné potvrdit

jejich vysokou specifíčností, což v experimentech jiných vědců pomohlo vysvětlit funkci RNA a DNA². Narodil se v ruském městě Slonim (pak 1921 – 1939 Polsko, nyní Bělorusko) odkud odešel do USA. V r. 1909 se usadil v New Yorku. Studoval chemii na vysoké škole Cooper Union, v r. 1916 zde získal bakalářský titul. Pokračoval v oboru elektrické inženýrství, v r. 1919 nastoupil na Kolumbijskou univerzitu (1922 magisterské studium, 1924 doktorát v oboru biologická chemie).

Již v době studií, jelikož navštěvoval večerní kurzy, pracoval Kunitz jako laborant na Rockefellerově ústavu pro lékařský výzkum ve fyziologické laboratoři u Jacquese Loeba (1859 – 1924). S ukončením doktorského studia zde získal stálé místo. Jeho nadřízeným byl od r. 1924 John H. Northrop (1891 – 1987), který měl zájem o pokračování v práci na viskozitě, bobtnání a vlivu solí na vlastnosti proteinů². Spolupráce Kunitze s Northropem dohromady trvala více než 30 let. V r. 1926 s ním odešel do pobočky Rockefellerova ústavu v Princetonu, kde se rozvinul výzkum proteolytických enzymů. Northrop se věnoval pepsinu a Kunitz trypsinu, protože tyto proteiny už tehdy byly dostupné komerčně a daly se dočistit. V Princetonu se podařilo krystalovat zymogeny a posléze i aktivní trávicí enzymy. Krystaly trypsinu byly poprvé připraveny na počátku 30. let⁸. Zjistilo se, že konverze trypsinogenu na trypsin je autokatalytická¹² a přeměna chymotrypsinogenu na chymotrypsin pak v určité analogii probíhá působením trypsinu⁹. Během skladování čistého chymotrypsinu (α -chymotrypsin) si Kunitz povšiml, že vznikají aktivní autolytické produkty, které pojmenoval β - a γ -chymotrypsin¹³. Zajímavé bylo jeho náhodné zjištění, že trypsinogen skladovaný v roztoku HCl se proti očekávání aktivoval. Posléze v zásobní láhvi s ky-



Obr. 2: Moses Kunitz (vlevo) s kolegou N. Westem. Fotografie z roku 1924 (The Embryo Project Encyclopedia, <https://embryo.asu.edu>).

selinou chlorovodíkovou objevil jako nečistotu plíseň *Penicillium*, která produkovala enzym efektivně štěpící trypsinogen. Plíseň izoloval, napěstoval a z ní získal tuto proteasu, která mu umožnila přípravu kvalitnějšího trypsinu z trypsinogenu¹⁴.

Dalšími proteiny krystalovanými Kunitzem byly inhibitory trypsinu z pankreatu a ze sóje. Nalezením inhibitoru v pankreatu byla zodpovězena otázka, proč je tam trypsinogen inaktivní, když pH je optimální pro aktivaci². Studoval i proces interakce s inhibitory. V l. 1939–40 Kunitz izoloval a krystaloval ribonukleasu (RNasu) z pankreatu¹⁵. Zjistil, že tento protein je extrémně stabilní a vydrží být aktivní i po povaření. Později následovala deoxyribonukleasa (DNasa)¹⁶. Malá množství toho enzymu rozkládala DNA izolovanou z pneumokoků (transformační princip ze známého pokusu Averyho, MacLeoda a McCartyho z r. 1944), což vedlo k potvrzení DNA jako nositelky dědičné informace¹⁷.

Kunitz také před válkou krystaloval hexokinasu a další enzymy². Pro krystalizaci proteinů měl velký talent a kompetenci. Jiné oddělení Rockefellerova ústavu vyvíjelo snahu krystalovat jistý rostlinný protein (v zájmu amerického ministerstva obrany), avšak neúspěšně. Vzorek byl proto zaslán Kunitzovi s žádostí o pomoc s krystalizací². Obdržel protein odpoledne, rozpustil ve vodě, rozdělil na díly a ve zkumavkách přidal postupně rostoucí množství zředěné HCl. V jedné z prostředních zkumavek se objevil precipitát. Do druhého dne protein v lednici vykristaloval. Po návratu do New Yorku a přeměně Rockefellerova ústavu na univerzitu se stal emeritním profesorem. Jak o něm řekl jeho nadřízený John H. Northrop, byl nápaditým a trpělivým výzkumníkem s teoretickými znalostmi a technickým nadáním. Byl schopen vyřešit každý problém, kterému se v laboratoři věnoval.

John Howard Northrop

(*5. 7. 1891 – †27. 5. 1987)

Americký biochemik Northrop (obr. 3) prokázal, že pepsin a trypsin jsou proteiny³. Důležitost tohoto výsledku byla ve všeobecném pochopení, že enzymy jsou proteinové povahy. V r. 1946 získal Nobelovu cenu za chemii spolu s chemikem Jamesem B. Sumnerem a biochemikem/virologem Wendellem B. Stanleyem. Byl potomkem anglických imigrantů ze 17. stol., v rodu bylo několik vzdělanců a podnikatelů. Oba jeho rodiče byli zaměstnání na univerzitě, otec však zahynul při požáru ještě před jeho narozením. Matka syna vedla k přírodním vědám. Navštěvoval Kolumbijskou univerzitu v New Yorku a titul bakaláře získal v r. 1912. Magisterské studium chemie ukončil v r. 1913, spolu s ním studoval např. George Scatchard (1892 – 1973), pozdější odborník na enzymovou kinetiku. Jeho doktorské studium bylo zaměřeno na obsah fosforu ve škrobu, absolvoval v r. 1915. Jacques Loeb, biolog původem z Německa, ho přijal na Rockefellerův ústav pro lékařský výzkum. Na Rockefellerově ústavu (v 50. letech přeměněn na univerzitu), zůstal Northrop řadu let. V letním období pracoval v laboratoři ve Woods Hole, Massachusetts. V r. 1917 se oženil, a protože nerad dojížděl do New Yorku, přešel do pobočné laboratoře patologie živo-

čichů v Princetonu, New Jersey (1926). Northrop byl fyzicky velmi zdatný³, provozoval kanoistiku, šermoval, střílel, jezdil na koni, měl rád lov ryb i lov se psy (ale výzkum na zvířatech považoval za nechutný). Měl však výrazné problémy se sluchem a vyhýbal se proto vědeckým konferencím. Byl vcelku podnikavý (farmářství, výpravy na kánoí – sjíždění peřejí). V redakci časopisu *Journal of General Physiology* působil téměř 70 let jako editor.



Obr. 3: John Howard Northrop. Fotografie z roku 1934 (The Embryo Project Encyclopedia, <https://embryo.asu.edu>).

S Loebem se nejdříve věnoval studiu environmentálních faktorů ovlivňujících dědičnost³. Zjistil, že octomilky žijí déle při nižší teplotě navzdory vyšší energetické spotřebě. Mouchy pěstoval ve sterilních podmínkách stovky generací ve tmě, což nemělo vliv na jejich životní parametry. Během 1. světové války byla poptávka po výrobě nedostatkových chemikálií³, studovala se např. mikrobiální produkce acetonu. Northrop vzpomínal v této souvislosti případ Chaima Weizmana (1874 – 1952), později prvního prezidenta Izraele, který pomoci procesu acetonového-butanolového-ethanolového kvašení cukrů (*Clostridium acetobutylicum*) dokázal nahradit výpadek acetonu pro výrobu výbušniny kordit v Anglii. Po skončení války se vrátil na Rockefellerův ústav, s Loebem studoval např. heliotropismus krabů *Limulus* a Donnanovy rovnováhy. S Mosesem Kunitzem sledoval micelární vlastnosti želatiny, s jinými kolegy pak např. aglutinaci bakterií a krvinek. Významný byl především výzkum kinetiky pepsinu a trypsinu včetně inhibičního efektu některých produktů štěpení. Pověřil si, že proteolytické enzymy nepoškozují struktury živých organismů, zatímco mrtvé buňky jsou rychle rozkládány.

V Princetonu Northrop vytvořil skupinu s Mosesem Kunitzem a Mortimerem (Timem) Louisem Ansonem (1901 – 1968). Dalšími členy byli zpočátku Albert P. Krueger (1902 – 1982) a pak Roger M. Herriott (1908 – 1992)³. Northrop izoloval pepsin už na počátku 20. let, ale nebyl schopen ho krystalovat. Sumnerův úspěch s krystalizací ureasy (1926)^{5,6} znamenal povzbuzení a návrat k pepsinu, který se nakonec podařilo získat v krystalickém stavu (1929)⁷. Jeho proteinová povaha byla demonstrována řadou experimentů (precipitační frakcionace). Důkazem byla nemožnost oddělit protein od enzymové aktivity. Pro další důkaz proteinové povahy se použil test rozpustnosti (Sørensenův test), kdy se u čisté látky po určitém rozpouštění množstvím dostává saturace. Změnami pH a koncentrace soli dostával křivky rozpustnosti, které odpovídaly teorii pro jednu čistou látku. V r. 1933 bylo v Evropě popsáno, že pepsinová aktivita se váže na proteiny ze semen melounu, což se vysvětlovalo jako „přenos aktivní skupiny“ (proti proteinové podstatě)¹⁸. Northrop opakovaným postupem potvrdil tuto vazbu, ale po okyselení roztoku pepsin příslušné proteiny rozštěpil a bylo možné jej znovu získat nezměněný v krystalickém stavu¹⁹. V té době Kunitz pracoval na izolaci krystalického trypsinu. Northrop studoval reverzibilní tepelnou denaturaci trypsinu a zjistil shodu mezi aktivitou a obsahem proteinu během denaturace²⁰. To bylo jedním z důkazů (kromě testů rozpustnosti), že trypsin je protein.

Dalším předmětem zájmu byly viry. Zkoumán byl virus mozaiky brambor a virus mozaiky tabáku (TMV)³. Studovaly se bakteriofágy infikující kolonie stafylokoků. Poté co Wendell Stanley na Rockefellerově ústavu krystaloval TMV, věnoval se Northrop od r. 1936 stafylokokovému fágů. Ze stovek litrů lyzátu precipitoval fága a prokázal v něm nukleovou kyselinu, v TMV byla v té době jinými potvrzena RNA. Role nukleových kyselin nebyla ještě známa, předpokládalo se, že fágy vznikají z prekurzorových proteinů. Následoval výzkum protilátek. Northrop připravil v krystalickém stavu protilátku (antitoxin) vázající toxin záškrtu²². Během druhé světové války se zabýval metodikou detekce toxických chemikálií. V r. 1946 byl oceněn Nobelovou cenou za chemii, byla to první Nobelova cena za práci vykonanou na Rockefellerově ústavu.

Literatura

1. Maynard LA: *Biogr. Mem. Natl. Acad. Sci.* 31, 378 (1958).
2. Herriott RM: *Biogr. Mem. Natl. Acad. Sci.* 58, 305 (1989).
3. Herriott RM: *Biogr. Mem. Natl. Acad. Sci.* 63, 423 (1994).
4. Fiske CH, Sumner JB: *J. Biol. Chem.* 18, 285 (1914).
5. Sumner JB: *J. Biol. Chem.* 69, 435 (1926).
6. Sumner JB: *J. Biol. Chem.* 70, 97 (1926).
7. Northrop JH: *Science* 69, 580 (1929).
8. Northrop JH, Kunitz M: *Science* 73, 262 (1931).
9. Northrop JH, Kunitz M: *Science* 78, 558 (1933).
10. Sumner JB, Dounce AL: *Science* 85, 366 (1937).
11. Dounce AL: *Nature* 172, 541 (1953).

Na rok 1951 bylo ohlášeno zrušení laboratoře v Princetonu. Northrop tedy přijal od r. 1949 místo profesora na Kalifornské univerzitě v Berkeley na západním pobřeží (bakteriologie a biofyzika), kde se vrátil ke studiu bakteriofága³. Zajímal se o buněčné změny v lysogenních buňkách *Bacillus megatherium*, které indukovaly produkci fágů – fosfát ji inhiboval a hořčík zvyšoval. Northrop ve svých závěrech předpověděl pozdější výsledky experimentů Hersheye a Chaseové (1952) o důležitosti nukleové kyseliny jako transformačního principu²³. Lysosenzitivní buňky jsou ty, které mohou být infikované fágem; přeživší infikované buňky mohou nést virus v neinfekční (lysogenní) formě. Northrop prokázal, že rychlost indukování produkce fágů u lysogenních buněk je srovnatelná s rychlostí jejich mutace na rezistenci vůči antibiotikům.

Závěr

Určování prostorové struktury proteinů po jejich krystalizaci a rentgenové difrakční analýze krystalů je dnes tématem učebnic biochemie a považuje se za zavedený postup v rámci rozvíjejícího se oboru strukturní biologie. Databáze PDB (Protein Data Bank) aktuálně obsahuje 134 409 struktur proteinů určených rentgenovou krystalografií (březen 2020). Jen prosté vyhledávání s klíčovým slovem „enzyme“ zobrazuje 14 572 databázových odkazů. Lze tedy říci, že enzymy již byly krystalovány v počtu desítek tisíc. Porovnání tohoto čísla s pouhými několika enzymy krystalovanými výše představenými biochemiky první poloviny 20. století je měřítkem doby téměř 100 let, jež uplynula od publikování prvních úspěšných krystalizací enzymů, a vyzdvihuje experimentální možnosti moderní vědy. Na druhé straně, tehdejší zájem a invence biochemiků byly klíčové z několika důvodů. Především zvládli s minimálním vybavením a běžným materiálem vyřešit problém proteinové povahy enzymů, který měl výrazný dopad na vývoj biochemie jako vědní disciplíny vůbec, a k tomu zavedli postupy, jejichž dalším zdokonalováním se došlo až k dnešním soupravám reagentů pro optimalizaci podmínek krystalizace. Zajímavé jsou v tomto ohledu zejména Kunitzovy experimenty, kdy vystavoval proteiny působení silných kyselin nebo vyšších teplot, čemuž se už jeho současníci s přirozenými obavami vyhýbali.

12. Kunitz M, Northrop JH: *Science* 80, 190 (1934).
13. Kunitz M: *J. gen. Physiol.* 22, 207 (1938).
14. Kunitz M: *J. gen. Physiol.* 21, 601 (1938).
15. Kunitz M: *J. gen. Physiol.* 24, 15 (1940).
16. Kunitz M: *Science* 108, 19 (1948).
17. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M: *J. Exp. Med.* 79, 137 (1944).
18. Waldschmidt-Leitz E, Kofrányi E: *Naturwissenschaften* 10, 206 (1933).
19. Northrop JH: *J. Gen Physiol.* 17, 165 (1933).
20. Northrop JH: *J. Gen Physiol.* 16, 323 (1932).
21. Northrop JH: *J. Gen Physiol.* 21, 335 (1938).
22. Northrop JH: *J. Gen Physiol.* 25, 465 (1942).
23. Hershey AD, Chase M: *J. Gen Physiol.* 36, 39 (1952).

CHARAKTERIZACE BAKTERIÍ RODU *Kocuria*

Anastasiia Vasyliuk

Ústav Biotechnologie, VŠCHT v Praze; vasyliua@vscht.cz

Úvod

Bakterie rodu *Kocuria* jsou morfologicky podobné bakteriím rodů *Staphylococcus* a *Micrococcus*. Tento rod byl původně řazen mezi bakterie rodu *Micrococcus*, později byl v roce 1995 na základě fylogenetických a chemotaxonomických analýz začleněn do samostatného rodu *Kocuria* na základě molekulárních metod zahrnujících sekvenaci genu pro 16S rRNA^{1,2}. Jedná se o gram-pozitivní, aerobní koky, které se vyskytují ve dvojicích, krátkých řetzcích či tetradách. Přirozeně se vyskytují v půdě, vodě a jsou součástí mikrobioty kůže a sliznic u člověka a zvířat^{1,3,4}. Bakterie rodu *Kocuria* jsou zodpovědné za různé typy infekcí, běžně používané fenotypové testy však často nesprávně identifikují izoláty rodu *Kocuria*, které jsou pak zaměněny za bakterie rodu *Staphylococcus*⁵.

Charakteristika

Rod *Kocuria* patří do třídy *Actinobacteria*, řádu *Actinomycetales* a čeledi *Micrococcaceae*. Tyto bakterie byly poprvé identifikovány a popsány slovenským mikrobiologem Milošem Kocurem², dlouholetým správcem brněnské Československé sbírky mikroorganismů, po němž byl následně tento rod, zavedený v roce 1995², pojmenován. Tento rod patří mezi gram-pozitivní, nesporeující, striktně aerobní mikroorganismy, s výjimkou *Kocuria kristinae*, která je fakultativně anaerobní; *Kocuria marina*, která je schopná růst v přítomnosti 5 % CO₂; a kmene *Kocuria rhizophila* DC2201, který je schopen anaerobního metabolismu⁶⁻⁸.

V roce 2003 rod *Kocuria* obsahoval pět druhů, konkrétně *Kocuria rosea*, *Kocuria varians*, *K. kristinae*, *Kocuria palustris* a *K. rhizophila*. Později Gundlapally et al. (2003) identifikovali šestý druh, který pojmenovali *Kocuria polaris*, protože byl izolovaný z antarktického vzorku⁹. V současné době je známo 28 druhů *Kocuria* identifikovaných na základě studií genů pro 16S rRNA. Druhy *Kocuria*, které byly dosud popsány zahrnují *Kocuria aegyptia*, *Kocuria assamensis*, *Kocuria arsenatis*, *Kocuria atrinae*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria dechangensis*, *Kocuria erythromyxa*, *Kocuria flava*, *Kocuria gwangalliensis*, *Kocuria halotolerans*, *Kocuria himachalensis*, *Kocuria indica*, *Kocuria koreensis*, *Kocuria kristinae*, *Kocuria marina*, *Kocuria oceani*, *Kocuria palustris*, *Kocuria pelophila* (Obr. 1), *Kocuria polaris*, *Kocuria rhizophila*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Kocuria salina*, *Kocuria sediminis*, *Kocuria soli*, *Kocuria turfanensis*, *Kocuria tytonis*, *Kocuria varians*².

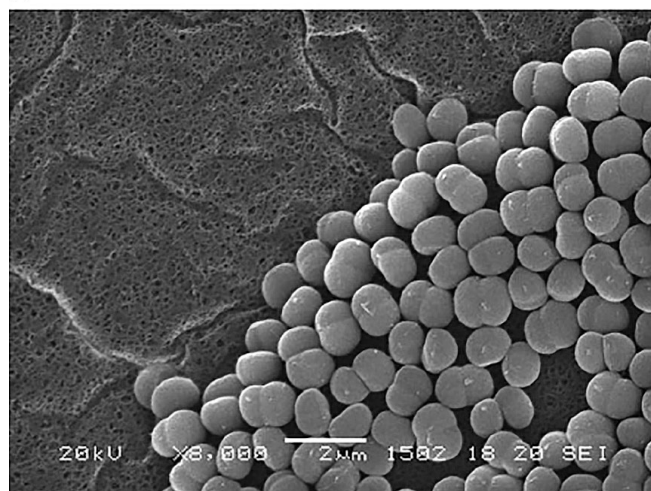
Od ostatních zástupců řádu *Actinomycetales* může rod *Kocuria* odlišit na základě přítomnosti hlavních aminocukrů galaktosaminu a glukosaminu v buněčné stěně. Mezi další odlišnosti patří přítomnost peptidoglykanu typu L-Lys-Ala₃₋₄ a polárních lipidů difosfoglycerolu a fosfoglycerolu. Bakterie rodu *Kocuria* mohou produkovat menachinony, které jsou hydrogenovány (dominantní je MK-7(H₂) a MK-8(H₂) nebo MK-9(H₂)),

tedy menachinony s 7 až 9 isoprenoidními jednotkami. Obsah guaninu a cytosinu v jejich DNA se pohybuje kolem 60 – 75 mol% v závislosti na druhu².

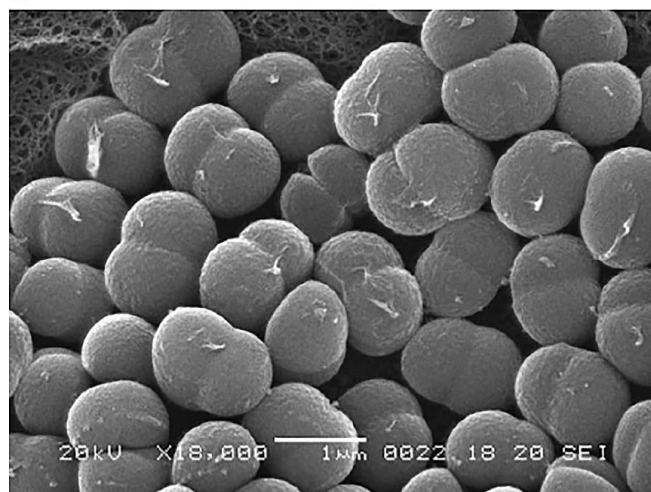
Výskyt

Bakterie rodu *Kocuria* jsou součástí přirozené mikrobioty kůže a sliznic u člověka a zvířat, dále jsou přítomny ve vodě či v půdě². *K. aegyptia* byla izolována z alkalického vzorku půdy v Egyptě¹⁰, další studie prokázaly přítomnost bakterie *K. marina* v mořském sedimentu ve východním Sibiřském moři⁸. V syrovém kuřecím mase byla zjištěna přítomnost bakterie *K. carniphila*¹¹. *K. polaris* byla izolována ze vzorku kyanobakteriální matrice pocházející z Antarktidy⁹. Bakterie *K. rhizophila* a *K. palustris* byly izolovány z orobince úzkolistého (*Typha angustifolia*), který roste v řece Dunaj¹². V Koreji byly identifikovány další dva druhy: *K. koreensis* a *K. salsicia*, které byly izolovány z joetgalu, což je tradiční fermentovaný mořský pokrm¹³. Yun et al. (2011)

(a)



(b)



Obr. 1: Fotografie z elektronového rastrovacího mikroskopu bakterií *Kocuria pelophila* kultivované na médiu NBRC 802 po dobu 24 h, při teplotě 28 °C (úsečka 2 µm (a), 1 µm (b))¹⁹.

izolovali bakterii *K. salsicia* též z pokrmu nazývaný 'gajami-sikhae', což je slaná fermentovaná potravin (například z platýse)¹⁴. Na pobřeží Gwangalli (Jižní Korea) byl izolován druh *K. gwangalliensis*¹⁵, zatímco druh *K. halotolerans* byl izolován ze vzorku slané půdy odebrané v lesní rezervaci v Číně¹⁶. Bakterie *K. flava* a *K. turfanensis* byly izolovány ze vzduchu v Sin-ťiang, Ujgurská autonomní oblast, Čína¹⁷. Ve 4200 m nad hladinou moře v Himalájích byla pod ledovcem izolována bakterie *K. himachalensis*¹⁸.

Biochemické a fyziologické vlastnosti

Jedná se o nezapouzdřené, nepohyblivé koky, které netvoří endospory. Zástupci rodu *Kocuria* jsou mezofilní, katalasa pozitivní, obecně nehalofilní a chemoorganotrofní mikroorganismy².

Optimální růstové podmínky se pro jednotlivé druhy liší, většina roste v rozmezí teplot 20 – 37 °C a obecně vyžadují lehce zásadité pH.

Většina zástupců vytváří na počátku 2 – 3 mm velké, vyvýšené, konvexní, kulaté kolonie. Kolonie mohou mít barvu oranžovou, růžovou, červenou, žlutou nebo krémovou¹.

Zástupci rodu *Kocuria* jsou často zaměňovány v klinických mikrobiologických laboratořích jako koagulaza-negativní *Staphylococci* (CoNS) na základě gramové reakce, katalasa pozitivních a koagulasa negativních vlastností¹.

Klinický profil rodu *Kocuria*

V roce 1974 byla poprvé identifikována bakterie *K. kristinae* jako původce infekčního onemocnění močových cest¹¹. Přestože dříve nebylo známo, že bakterie rodu *Kocuria* způsobují infekce, v poslední době dochází ke stále vyššímu výskytu různých typů infekcí způsobenými těmito bakteriemi a to pravděpodobně díky lepším diagnostickým identifikačním metodám²⁰. Infekce způsobené bakteriemi *Kocuria* napadají oslabené jedince a jsou tedy spojeny s různými nemocemi, například s různými druhy rakoviny, akutní cholecystitidou a dalšími metabolickými poruchami^{7, 21}.

Snížená propustnost buněčné stěny a přítomnost efluxních pump se podílí na rezistenci různých druhů *Kocuria* vůči léčivům. Kromě rezistence na nitrofurantoin/furazolidon byla také prokázána rezistence na aminoglykosidové antibiotikum kanamycin. Variabilní rezistence bakterií byla pozorována k β -laktamovým, chinolonovým, linkosamidovým a kotrimoxazolovým antibiotikům. Naopak nebyla prokázána rezistence ke glykopeptidům, streptograminům, kyselině fusidové, rifampicinu nebo linezolidu²².

Zástupci rodu *Kocuria*

Kocuria kristinae je gram-pozitivní, fakultativně anaerobní kokk vyskytující se v tetrádách. Dříve tato bakterie byla známá pod názvem *Micrococcus kristinae* a poprvé byla popsána v roce 1947³. Tato bakterie se nachází na pokožce a sliznici jako součást přirozené mikroflóry, jen zřídka byla izolována z klinických vzorků a je tedy považována za oportunního patogena. Může např. způsobit infekce u pacientů, kteří mají zavedené katétry²³.

Kocuria rosea je gram-pozitivní, striktně aerobní bakterie, která je schopna růst na TSA (tryptonový sójový agar) médiu, a přestože ve většině publikací je charakterizována jako nepatogenní kmen, který kolonizuje kůži a sliznici, v některých studiích byla označena za oportunního patogena^{24, 25}. Altunas a kol. (2004) poprvé popsali infekci související s *K. rosea* u pacienta s centrálním žilním katétre²⁶.

Kocuria polaris je gram-pozitivní, aerobní, nepohyblivý kokk, který se vyskytuje ve dvojicích či tetrádách. Bakterie na médiu s peptonem a kvasničným extraktem vytváří 1 až 2 mm velké, hladké, oranžové kolonie. Teplotní rozmezí, při kterém *K. polaris* roste, je 5 až 30 °C a teplotní optimum pro růst je kolem 20 °C. Bakterie tolerují 2 až 9 % NaCl v médiu. Gundlapally a kol. (2003) izolovali bakterii *K. polaris* ze vzorku kyanobakteriální matrice pocházející z Antarktidy. Studie prokázala, že buňky obsahují šest různých pigmentů⁹.

Biotechnologické aplikace rodu *Kocuria*

Mikrobiální produkce proteas

O mikrobiální proteasy je stále větší zájem v mnoha oblastech, jako jsou environmentální vědy, biomedicína a biotechnologie. Mezi nerozpustné proteinové makromolekuly patří keratin a kolagen. Jejich mikrobiální biodegradace závisí na sekreci extracelulárních enzymů se schopností působit na pevný substrát²⁷.

Strukturní protein keratin je odolný vůči aktivitě široké škály proteas. Některé druhy hub a bakterií mohou degradovat keratin za předpokladu, že produkují enzymy nazývané keratinasy^{28, 29}.

Bernal a kol. (2006) identifikovali a izolovali gram-pozitivní bakterii *K. rosea* LPB-3 degradující peří jako zdroj uhlíku, energie a dusíku. Dále byla u této bakterie zjištěna keratinasová aktivita, která vykazovala mimořádnou stabilitu při vysokých teplotách (70 – 90 °C). Vysoká tepelná odolnost umožňuje průmyslovým procesům pracovat při vysoké teplotě, která minimalizuje riziko mikrobiální kontaminace. Dále bylo zjištěno, že keratinasa izolovaná z *K. rosea* je stabilní v rozmezí alkalického pH (10 – 11) a to umožňuje zlepšení procesů s extrémními požadavky na pH, například v kožedělném průmyslu²⁷.

Kolagen je ve vodě nerozpustná bílkovina, která tvoří přibližně třetinu všech proteinů v těle savců. Kolagen je produkován různými buňkami a díky tomu se i jednotlivé typy od sebe liší³⁰. Murphy et. al. (1991) porovnávali schopnosti metaloproteinasy degradovat kolagen typu IV. Všechny studované enzymy degradovaly kolagen tohoto typu³⁰.

Mikrobiální produkce bakteriocinů

Bakteriociny jsou přirozeně se vyskytující antimikrobiální, ribosomálně syntetizované peptidy, které jsou produkovány různými bakteriemi³¹. Bakteriociny by mohly pomoci chránit potraviny před kontaminací, problém je však pochopení interakcí mezi potravinovými přísadami a bakteriociny. Mezi další problematické podmínky patří pH, teplota skladování a podmínky při zpracování^{32, 33}. Mezi bakteriociny patří nisin, antimikrobiální peptid produkováný bakteriemi *Lacto-*

*coccuslactis*³⁴. Bakterie *Kocuria varians* NCC 1482 izolovaná ze salámu produkuje variacin, lantibiotikum stejné třídy antimikrobiálních peptidů jako je nisin. Variacin inhibuje růst potravinových bakteriálních patogenů, jako je *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum* nebo bakterií způsobujících kažení potravin jako je rod *Enterococcus*³⁵. Variacin vykazuje široké inhibiční účinky a je stabilní při vysokých teplotách a neutrálním pH. Díky těmto vlastnostem by mohl být využit jako nové přírodní konzervační činidlo³⁴.

Mikrobiální produkce biosurfaktantů

Biosurfaktanty patří mezi amfifilní látky, obsahují totiž hydrofilní a hydrofobní část. Díky těmto vlastnostem mají schopnost snižovat mezifázové povrchové napětí. Většina surfaktantů je v současné době syntetizována chemickou cestou, syntetické surfaktanty ale mohou mít negativní vlivy na životní prostředí. Proto se výzkum v poslední době zaměřil na mikrobiální produkci biosurfaktantů³⁶.

Mikroorganismy produkují biosurfaktanty většinou na povrchu buněk či jako extracelulární metabolity³⁷. Organismy produkující biosurfaktanty jsou různorodé a byly izolovány z nejrůznějších prostředí včetně půdy, mořské vody, mořských sedimentů a z ropných polí³⁸. Strukturní rozmanitost těchto metabolitů vede k širokému spektru potenciálních průmyslových aplikací včetně výroby potravin, kosmetiky, farmaceutických výrobků, zemědělství, zlepšení využití ropy a mnoha dalších³⁹. Produkce extrémofilními mikroorganismy má obzvláště slibný potenciál uplatnění a to díky vysoké stabilitě mikrobiálních produktů⁴⁰.

Sarafin *et al.* (2014) testovali osm halofilních bakterií na produkci povrchově aktivních látek. Mezi testovanými bakteriemi byla testována bakterie *Kocuria marina* BS-15, u které byla prokázána produkce biosurfaktantů. Biosurfaktanty pocházející z *Kocuria marina* BS-15 emulgovaly více než 50 % ropy, kokosového oleje, slunečnicového oleje, olivového oleje a kerosenu ve srovnání s ostatními testovanými bakteriálními kmeny³⁶.

Literatura

1. Kandi V, Palange P, Vaish R, et al.: *Cereus*. 8, (2016).
2. Stackebrandt E, Koch C, Gvozdiak O, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 45, 682 (1995).
3. KLOOS WE, Tornabene TG, SCHLEIFER KHJI-JoS, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 24, 79 (1974).
4. Uzair B, Menaa F, Khan BA, et al.: *Microbiol. Res.* 206, 186 (2018).
5. Savini V, Catavittello C, Masciarelli G, et al.: *J. med. Microbiol.* 59, 1395 (2010).
6. Takarada H, Sekine M, Kosugi H, et al.: *J. bacteriol.* 190, 4139 (2008).
7. Ma ES, Wong CL, Lai KT, et al.: *BMC Infect., Dis.* 5, 60 (2005).
8. Kim SB, Nedashkovskaya OI, Mikhailov VV, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1617 (2004).
9. Reddy GS, Prakash JS, Prabakar V, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 183 (2003).
10. Li WJ, Zhang YQ, Schumann P, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 733 (2006).

Mikrobiální produkce pigmentů

Využití přírodních pigmentů v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu se v posledních letech zvyšuje⁴¹. Výhodou výroby pigmentů z mikroorganismů je jejich snadný a rychlý růst v levném kultivačním mediu, nezávislost na vnějších podmínkách a schopnost produkovat pigmenty různých barev⁴².

Karotenoidy se dělí na dvě základní skupiny: karoteny a jejich okysličené deriváty nazývané xantofyly. V rostlinách, řasách a fotosyntetických bakteriích hrají pigmenty hlavní roli při fotosyntéze. Tyto pigmenty se objevují i u některých nefotosyntetických bakterií a kvasinek, kde slouží k ochraně proti světlu a kyslíku. Vora *et al.* (2015) extrahovali oranžové a žluté pigmenty bakterií izolovaných z půdy z oblasti Kharaghoda (Indie). Halofilní, gram-pozitivní bakterie byly identifikovány jako *Kocuria* spp. Nejvyšší extrakce těchto pigmentů byla získána při použití směsi 85 % methanol: aceton (2:1). Na základě absorpčního spektra byly tyto pigmenty zařazeny mezi karotenoidy⁴².

Závěr

Bakterie rodu *Kocuria* patří mezi gram-pozitivní, nepohyblivé, aerobní bakterie, které se přirozeně vyskytují na kůži či sliznici savců, v půdě a vodě. Přítomnost bakterií rodu *Kocuria* byla také zjištěna v syrovém kuřecím mase, v orobinci úzkolistém či v tradičním fermentovaném mořském pokrmu (joethal). Onemocnění způsobená těmito bakteriemi jsou spíše vzácná, přesto by se neměla podceňovat a je potřeba nalézt vhodné identifikační metody pro bakterie *Kocuria*. Bakterie rodu *Kocuria* patří mezi slibné mikroorganismy, které by se mohly v budoucnu využívat k produkci enzymů, biosurfaktantů či pigmentů v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

Poděkování

Tato práce byla vypracována za finanční podpory grantu GAČR 18-26463S.

11. Tvrzova L, Schumann P, Sedláček I, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 139 (2005).
12. Kovács G, Burghardt J, Pradella S, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49, 167 (1999).
13. Park E-J, Kim M-S, Roh SW, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 914 (2010).
14. Yun J-H, Roh SW, Jung M-J, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 286 (2011).
15. Seo YB, Kim D-E, Kim G-D, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2769 (2009).
16. Tang SK, Wang Y, Lou K, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1316 (2009).
17. Zhou G, Luo X, Tang Y, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1304 (2008).
18. Mayilraj S, Kroppenstedt R, Suresh K, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1971 (2006).
19. Hamada M, Shibata C, Tamura T, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 3276 (2016).

Literatura (pokračování)

20. Purty S, Saranathan R, Prashanth K, et al.: *Emerging Microbes infect.* 2, e71 (2013).
21. Basaglia G, Carretto E, Barbarini D, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 40, 311 (2002).
22. Savini V, Catavittello C, Masciarelli G, et al.: *J. Med. Microbiol.* 59, 1395 (2010).
23. Tewari R, Dudeja M, Das AK, et al.: *J. Clin. Diagn. Res. : JCDR.* 7, 1692 (2013).
24. Adang R, Schouten H, Blijham GJL: *Leukemia* 6, 224 (1992).
25. Magee J, Burnett I, Hindmarch J, et al.: *J. Hospital Infect.* 16, 67 (1990).
26. Altuntas F, Yildiz O, Eser B, et al.: *BMC Infect., DiS.* 4, 62 (2004).
27. Bernal C, Cairo J, Coello NJE, et al.: *Enzyme Microb. Technol.* 38, 49 (2006).
28. Onifade A, Al-Sane N, Al-Musallam A, et al.: *Biore-sour. Technol.* 66, 1 (1998).
29. Santos RM, Firmino AA, De Sa CM, et al.: *Curr. Microbiol.* 33, 364 (1996).
30. Murphy G, Cockett MI, Ward R, et al.: *Biochem. J.* 277, 277 (1991).
31. De Vuyst L, Vandamme EJ: Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, in: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Springer, 91 (1994).
32. Jones LJC: *Can. J. Microbiol.* 20, 1257 (1974).
33. Jung D-S, Bodyfelt FW, Daeschel MA: *J. Dairy Sci.* 75, 387 (1992).
34. O'mahony T, Rekhif N, Cavadini C, et al.: *J. Appl. Microbiol.* 90, 106 (2001).
35. Pridmore D, Rekhif N, Pittet AC, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1799 (1996).
36. Sarafin Y, Donio MBS, Velmurugan S, et al.: *Saudi J. Biol. Sci.* 21, 511 (2014).
37. Karanth NGK, Deo PG, Veenanadig NK: *Curr. Sci.* 77, 116 (1999).
38. Bodour AA, Drees KP, Maier RM: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3280 (2003).
39. Pastewski S, Hallmann E, Medrzycka K: *Environ. Eng. Sci.* 23, 579 (2006).
40. Donio MBS, Ronica FA, Viji VT, et al.: *SpringerPlus.* 2, 149 (2013).
41. Unagul P, Wongs P, Kittakoo P, et al.: *J. Ind. Micro-biol. Biotechnol.* 32, 135 (2005).
42. Vora J, Jain N, Modi HJ: *J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 4, 850 (2015).

Souhrn

Vasyliuk A.: Charakteristika bakterií rodu *Kocuria*

Bakterie rodu *Kocuria* patří mezi gram-pozitivní, nesporulující, převážně aerobní koky, které se vyskytují ve dvojicích, krátkých řetězcích či tetradách. Dříve byl tento rod řazen mezi bakterie rodu *Micrococcus*, ale na základě fylogenetických a chemotaxonomických analýz byl začleněn do samostatného rodu *Kocuria*. Bakterie rodu *Kocuria* jsou morfologicky podobné bakteriím *Staphylococcus* a *Micrococcus*. S bakteriemi *Staphylococcus* jsou často zaměňovány při běžných fenotypových testech. V současné době je známo 28 druhů *Kocuria*, které se vyskytují v půdě, ve vodě, na kůži či sliznici lidí a zvířat. Některé druhy *Kocuria* mohou způsobovat zdravotní problémy, které jsou spojeny s dalšími nemocemi. Některé druhy se naopak mohou využít k produkci enzymů, biosurfaktantů či pigmentů v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu. Jejich produkce extrémofilními kmeny rodu *Kocuria* má velký potenciál díky zvýšené stabilitě mikrobiálních produktů.

Klíčová slova: *Kocuria*, *Micrococcaceae*, identifikační systém, gram-pozitivní koky, výskyt, *K. kristinae*, *K. rosea*, *K. polaris*

Summary

Vasyliuk A.: Characteristic of the genus *Kocuria*

All of the recognize species of *Kocuria* are gram-positive coccoid, non-endospore-forming, aerobic, which are arranged in pairs, short chains or tetrads. The genus *Kocuria* was previously belongs to the family *Micrococcaceae*. On the basis of the phylogenetic and chemotaxonomic analyses, it was incorporated into a separate genus *Kocuria*. *Kocuria* are morphologically similar to bacteria *Staphylococcus* and *Micrococcus*. They are often confused with bacteria *Staphylococcus* by conventional phenotypic tests. At present, there are known 28 species of *Kocuria*, which occur in soil, water, skin or mucous membranes of humans and animals. Some species of *Kocuria* can cause healthy problems that are associated with other diseases. On the other hand some species can be used to produce enzymes, biosurfactants or pigments in the food, cosmetic or pharmaceutical industries. Their production of extremophilic strains of the genus *Kocuria* has great potential due to the increased stability of microbial products.

Keywords: *Kocuria*, *Micrococcaceae*, identification system, gram-positive cocci, located, *K. kristinae*, *K. rosea*, *K. polaris*

ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY NANOČÁSTIC KOVŮ – NANOČÁSTICE ZLATA

Anna Miškovská, Jana Michailidu, Alena Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, miskovsa@vscht.cz

Úvod

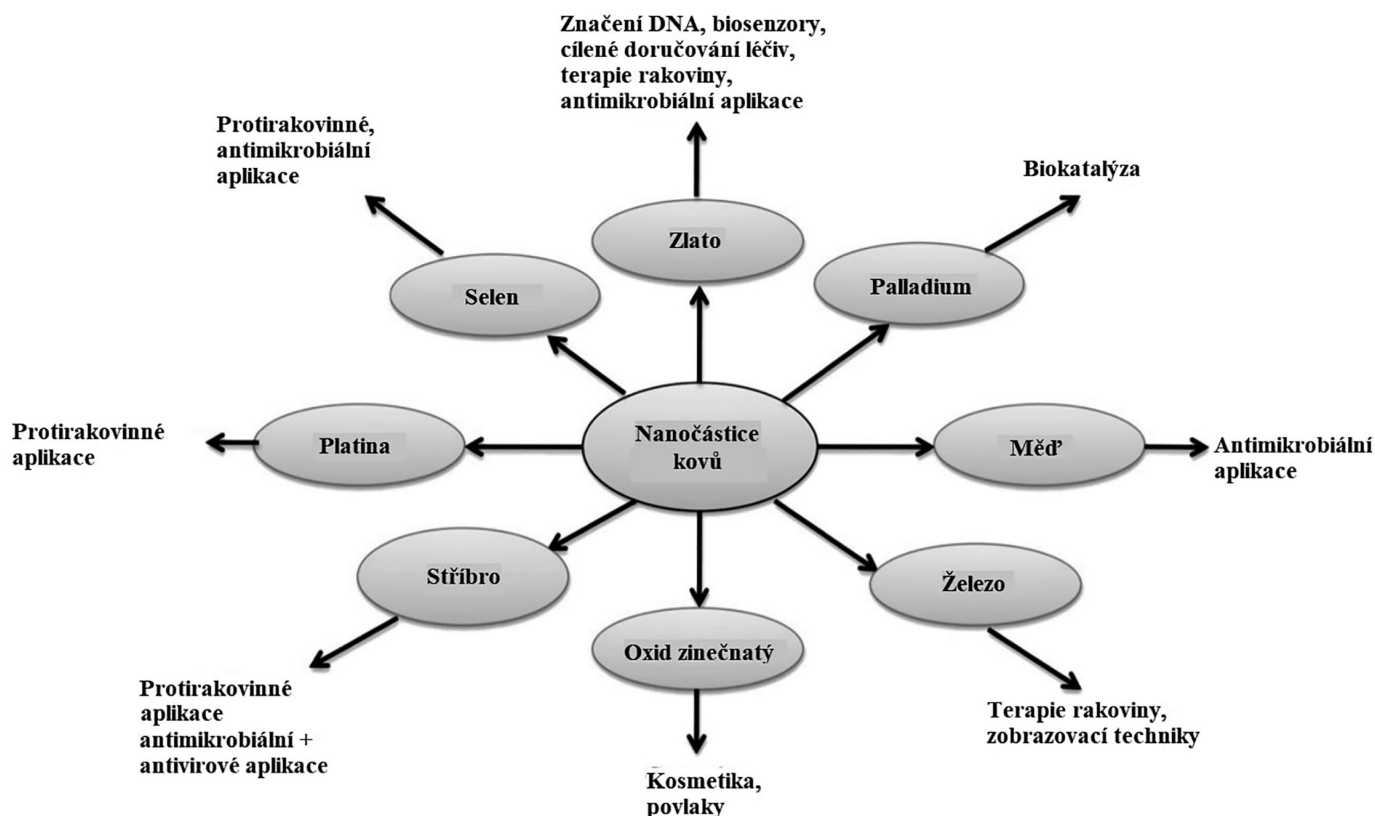
Nanočástice definujeme jako nanoobjekty, jejichž všechny tři vnější rozměry spadají do intervalu 1 – 100 nm¹. Tvoří jakýsi most mezi makromateriály a atomárními či molekulárními strukturami². Jedním z důsledků miniaturizace je změna fyzikální a chemické charakteristiky daného materiálu³. Díky jedinečným optickým, elektrickým, magnetickým a katalytickým vlastnostem jsou kovové nanočástice velmi diskutovaným tématem posledních desetiletí a v současnosti představují pro lidstvo obrovský potenciál v mnoha odvětvích, jako jsou medicína, chemie, biotechnologie, elektronika a kosmetika⁴. Nanotechnologie využívající kovy se dnes stávají také nedílnou součástí mnoha nových biomedicínských technik, kde jsou mimo jiné využívány pro svoje antimikrobiální účinky. Toto využití mají především nanočástice zlata (Au), stříbra (Ag), platiny (Pt) a mědi (Cu)⁵.

Nanočástice kovů

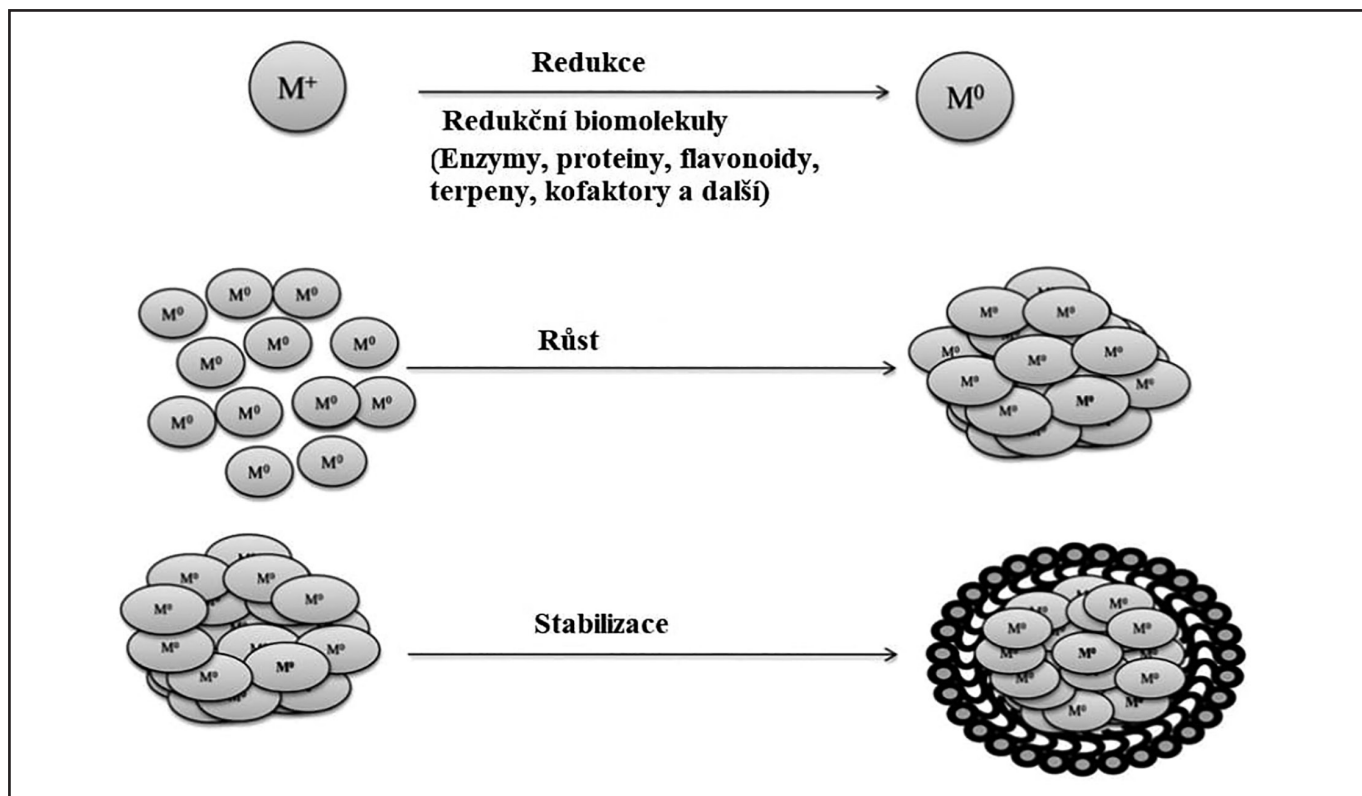
Nanočástice kovů byly lidmi nevědomky využívány již ve starověku. Jednu z nejznámějších historických ukázek využití nanočástic kovů představují Lykúrgovy poháry, jejichž vznik datujeme do čtvrtého století našeho letopočtu. Tyto poháry obsahují směs zlatých, stříbrných a měděných nanočástic ve specifickém poměru, který

pohárům propůjčuje velmi zvláštní optické vlastnosti. Ty způsobují, že se pohár při transmisi záření jeví jako vínově červený a naopak při odrazu záření jako zelený (tzv. dichroismus)^{4,6}. Dalším důkazem využívání kovových nanočástic našimi předky je objevení nanočástic zlata v okenních mozaikách evropských kostelů, kde jsou to právě nanočástice kovů, které propůjčují sklu rozmanité barvy⁷. Kromě zajímavých optických vlastností byly kovy ve starověku využívány také pro své antibakteriální účinky. Známé je především historické využití stříbra⁸. Starověcí Egypťané údajně házeli stříbrné mince do studny s pitnou vodou ve snaze předejít biologické kontaminaci⁴.

V současnosti nalézají kovové nanočástice uplatnění téměř ve všech technologických odvětvích lidské činnosti. Příkladem mohou být aplikace nanočástic kovů v elektronice, kde se používají k povrchovým úpravám elektronických součástek². Nanočástice ušlechtilých kovů, zejména platiny, vykazují značnou katalytickou aktivitu, a proto se uplatňují jako katalyzátory chemických reakcí⁴. Dalšími oblastmi, které jsou bezpochyby ovlivněny nanotechnologiemi jsou medicína a biotechnologie (Obr. 1). Jako velmi perspektivní se jeví použití nanočástic kovů v kombinaci s antibiotiky. Synergickým působením těchto dvou antibakteriálních činidel je totiž mnohdy možné překonat stávající rezistenci mikroorganismů k danému antibiotiku⁵. Dále se nano-



Obr. 1: Aplikace nanočástic kovů v biotechnologiích (upravené podle Mittal, et al.2013).



Obr. 2: Mechanismus vzniku nanočástic kovů metodami bottom-up (M^+ – iont kovu) (upravené podle Mittal, et al.2013).

částice kovů používají v oblastech medicíny jako jsou zobrazovací techniky a cílený transport léčiv^{9,10}. Konkrétně nanočástice zlata jsou využívány k vpravování molekul DNA do buněk (genové inženýrství), cílenému transportu léčiv, detekci a zobrazování intracelulárních molekul, diagnostice či k fototermální terapii^{11,12}. Nanočástice však zaujímají své místo také v mnoha dalších odvětvích, jako jsou například bioremediace, kosmetika či elektrochemie².

Možnosti přípravy kovových nanočástic

S rostoucím zájmem o nanočástice je nutné se zabývat způsobem jejich výroby. Neustálý rozvoj chemického průmyslu s sebou nese řadu rizik pro životní prostředí. Proto je důležité zohledňovat možné důsledky přípravy kovových nanočástic při zvětšování měřítka do průmyslových objemů. Techniky přípravy nanočástic se obecně dělí do dvou skupin na tzv. top-down a bottom-up. Metoda top-down je založena na zmenšování větších částic do nanoměřítka, například mechanickým působením, či prostřednictvím tepla. Naproti tomu metodou bottom-up jsou k sobě skládány jednotlivé atomy (molekuly) a tvoří se tak větší nanocelky¹³.

Pro syntézu nanočástic kovů byla použita celá řada experimentálních přístupů ať už chemických, fyzikálních či biotechnologických⁷. Ačkoliv jsou fyzikální a chemické přístupy v současnosti využívány, nesou s sebou i celou řadu problémů. Fyzikální metody jsou velmi náročné na spotřebu energie, a tudíž jsou většinou i velmi nákladné. Vedle toho metody chemické bývají mnohdy ekonomicky výhodnější, nicméně k tvorbě nanočástic tímto způsobem jsou často využívána toxická činidla, nebo chemické látky způsobující vznik toxických produktů^{7,14}. Rostoucí zájem o životní prostředí motivoval

výzkumníky k hledání nových, ekologicky šetrnějších přístupů přípravy kovových nanočástic⁷. Mezi takové přístupy spadají metody biologické, využívající k syntéze nanočástic biologické materiály jako jsou mikroorganismy, rostliny a rostlinné extrakty². Většinu biologických metod přípravy kovových nanočástic řadíme mezi metody typu bottom-up (Obr. 2)¹⁵.

Velká pozornost je věnována přípravě nanočástic pomocí rostlinných extraktů, jelikož se jedná o metody jednoduché, rychlé, šetrné a ekonomicky výhodné, které mívají snadný scale up. Schopnost rostlinných extraktů redukovat soli kovů je nám známa již od počátku 20. století. Bioredukce kovových nanočástic v tomto případě probíhá za pomoci biomolekul, jež jsou v rostlinných extraktech přirozeně přítomné. Mezi tyto molekuly patří zejména enzymy, aminokyseliny, proteiny, vitamíny, polysacharidy či organické kyseliny¹⁴. Obecně jsou ale rostlinné extrakty pro biosyntézu nanočástic důležité nejen z hlediska redukce kovové soli za vzniku příslušných nanočástic, ale také z hlediska jejich následné stabilizace¹⁶. Typickým postupem pro syntézu nanočástic pomocí rostlinného extraktu bývá smíchání vodného extraktu s vodným roztokem soli příslušného kovu. Směs se nejčastěji ponechává reagovat při pokojové teplotě a celá reakce probíhá v řádech několika minut¹⁵.

Antibakteriální účinky nanočástic kovů

Mikrobiální infekce jsou v dnešní době jednou z hlavních příčin všech chronických onemocnění a úmrtí na světě⁵. S nově přibývajícími rezistencemi patogenních mikroorganismů k dosavadním antimikrobiálním látkám roste zájem o alternativní řešení¹⁷. Jako velmi perspektivní se jeví využití antimikrobiálního působení,

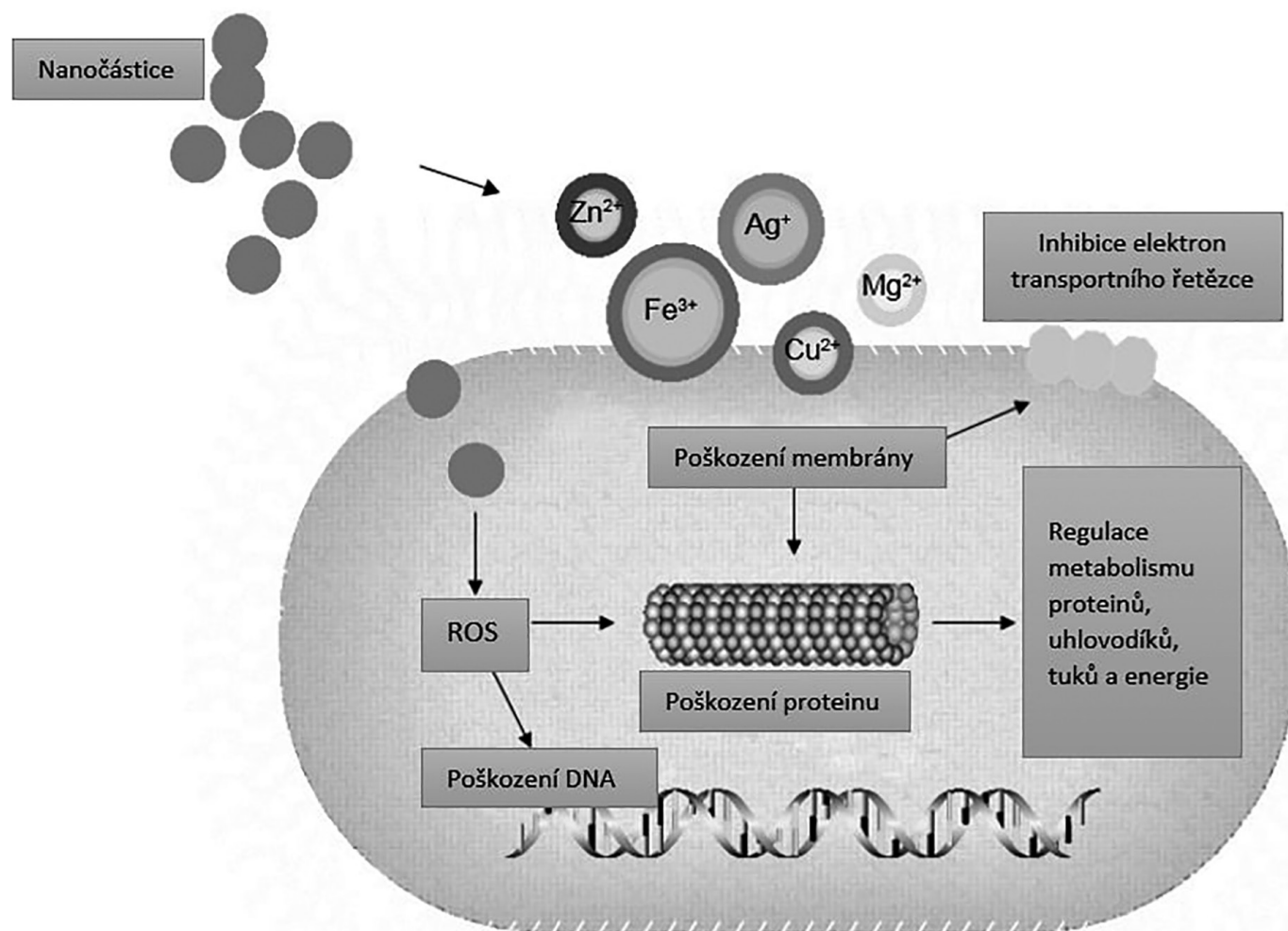
kterým se vyznačují některé nanočástice kovů. Antibakteriální účinky kovů jako jsou stříbro, zlato, měď, titan či zinek jsou známy již po celá staletí¹⁸. Nízký poměr objemu k ploše povrchu, který je pro nanočástice charakteristický, může antimikrobní účinky kovů ještě zvýšit¹⁸. I z těchto důvodů se dnes věnuje tématu využití nanočástic čím dál více pozornosti. Snahou výzkumníků je odhalit rozsah antimikrobiálních aplikací nanočástic a porozumět mechanismům, jakými je výsledných efektů dosaženo. Velké naděje se přikládají především kombinaci současných antibakteriálních látek s nanočásticemi kovů⁵.

V současné době se již nanočástice kovů aktivně používají za účelem eliminace bakteriálních infekcí. Jako příklad lze uvést použití stříbrných nanočástic v obvazech na poranění kůže, kde stříbro prokazatelně inhibuje růst bakterií, a podstatně tak snižuje dobu hojení¹⁹. Mezi další medicínské aplikace nanočástic kovů patří antibakteriální povlaky implantátů, jako jsou umělé srdeční chlopně, katetry či zubní náhrady, kde se nanočástice využívají taktéž k zamezení vzniku bakteriální infekce⁵.

Obrovskou výhodou kovových nanočástic je, že mechanismus vzniku rezistence k většině antibiotik není v jejich případě relevantní. Je tomu tak, protože nanočástice způsobují mikrobiální inhibici, aniž by bylo nutné proniknout do buňky. Dosud jsou nám známy tři

mechanismy, kterými nanočástice dosahují antibakteriální aktivity. Prvním ze způsobů je změna povrchového náboje buněk, která vede ke změně integrity a permeability membrány, což může zapříčinit až buněčnou smrt⁵. Dále mohou nanočástice vyvolávat vznik reaktivních forem kyslíku (ROS), a působit tak buňkám oxidační stres. Při interakci s buněčnými strukturami jsou ROS zodpovědné za změnu permeability membrány, zvýšení exprese apoptických proteinů, potlačení aktivity některých periplazmatických enzymů (proteinů) a poškození DNA. Posledním z mechanismů je navození intracelulárních změn vyplývajících z interakcí kovových nanočástic s vnitrobuněčnými molekulami (např. DNA a proteiny) (Obr. 3)⁵. Některé odborné studie se také zmiňují o antibakteriálních účincích zapříčiněných přímo ionty příslušného kovu, které jsou uvolňovány z povrchu nanočástic²⁰ (Besinis a kol., 2014).

Kompletní mechanismus antibakteriálního působení všech nanočástic kovů však prozatím není plně znám²¹. Výsledný efekt působení nanočástic na mikroorganismy mimo jiné závisí na jejich morfologii a fyzikálně-chemických vlastnostech. Bylo například dokázáno, že je rozsah antimikrobiálních účinků do značné míry ovlivněn velikostí a tvarem nanočástic (nanokuličky, nanotyčinky a další)^{22,23}. Konkrétně u měděných nanočástic bylo zjištěno, že ty s menšími rozměry mají vyšší antibakteriální aktivitu²⁴. Je tomu tak, protože menší



Obr. 3 Mechanismus působení nanočástic kovů na bakteriální buňku (upravené podle Wang, et al. 2017).

nanočástice (s nízkou úrovní aglomerace) mají větší povrch dostupný k solubilizaci měděných iontů a k interakci s bakteriální membránou, čímž se stávají pro buňky toxičtější¹⁸. Co se týká tvaru nanočástic, byla provedena studie zabývající se antibakteriálními účinky nanočástic stříbra různých tvarů (trojúhelníkových, sférických, tyčkovitých) na bakterii *Escherichia coli*. Nejvyšší antibakteriální aktivitu vykazovaly stříbrné nanočástice s půdorysem tvaru trojúhelníku²³.

Antibakteriální účinky nanočástic zlata

Zlato je velmi vzácný kov, který sehrál důležitou roli v naší historii a hraje ji bezpochyby dodnes. Pro své vlastnosti, jako jsou relativní měkkost a inertnost, se zlato využívalo již v dávných dobách pro výrobu šperků a pro ražení mincí. Také zlaté nanočástice mají dlouhou historii. První záznamy o jejich nevědomém používání se týkají výroby červeně (rubínově) zbarveného skla²⁵. Teprve až o mnoho let později bylo zjištěno, že jsou to právě nanočástice, co propůjčuje sklu rubínovou barvu. Předpokládá se, že se červené sklo pomocí zlata vyrábělo již ve středověku, nicméně doložitelné zmínky pocházejí až z konce sedmnáctého století²⁵. V současné době mají zlaté nanočástice mnoho využití (katalýza, biomedicína, diagnostika, elektronika a další).

V souvislosti s působením na živé organismy jsou nanočástice zlata označovány jako biologicky inertní²⁶. Přestože pro zlaté nanočástice není antibakteriální působení charakteristické, existuje na toto téma mnoho odborných studií. Dosavadní výsledky poukazují na rozmanitost jejich antibakteriální aktivity v souvislosti se způsobem výroby a způsobem modifikace jejich povrchu. Dále je rozsah antibakteriálních účinků závislý také na velikosti a koncentraci nanočástic. Ze zmíněných faktorů se jako klíčový pro míru antibakteriálního působení ukazuje právě způsob modifikace povrchu. Jelikož má zlato vysokou afinitu k atomům síry, bývá povrch nanočástic často kovalentně upraven molekulami thiolu, popřípadě se pro vyšší rozmanitost funkcionalizace používají organothioly.

Další z možností je modifikace povrchu pomocí sorpce či elektrostatických interakcí²⁶. Bylo prokázáno, že nanočástice vyrobené chemickými postupy, které jsou

funkcionalizované pomocí běžně používaných stabilizátorů (např. polyvinylpyrrolidon) téměř postrádají antibakteriální aktivitu²⁷. Jinak je tomu u nanočástic zlata připravovaných biologickými metodami. Takto připravené nanočástice totiž naopak mnohdy vykazují vysokou antibakteriální účinnost. V případě biosyntézy pomocí rostlinných extraktů jsou připravené nanočástice stabilizovány biomolekulami pocházejícími právě z daného extraktu. Antibakteriální účinky takto připravených nanočástic zlata byly prokázány například proti *E. coli*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* a *Proteus vulgaris*^{28,29,30,31,32}. K výslednému efektu může nicméně přispívat také antibakteriální působení samotného extraktu³³.

Mechanismus účinku zlatých nanočástic byl sledován na bakterii *E. coli* a bylo zjištěno, že antibakteriální aktivita je zprostředkována dvěma hlavními mechanismy. Prvním z nich je změna membránového potenciálu vedoucí k inhibici aktivity ATPázy a poklesu hladiny ATP. Druhým je pak inhibice podjednotky ribozomu a následně proteosyntézy. V této studii bylo také zjištěno, že na rozdíl od většiny ostatních nanočástic kovů, působení zlata nezahrnovalo mechanismus související s generací ROS, které jsou toxické i pro savčí buňky³⁴. Skutečnost, že jsou zlaté nanočástice považovány za netoxické pro živočišné buňky, je důvodem, proč mají tak velký potenciál v oblasti biomedicíny. Mírná toxicita byla pro savčí buňky zaznamenána pouze u nanočástic zlata o velmi malém průměru (3 nm)³⁵, nicméně ve většině terapeutických oblastí jsou využívány nanočástice zlata o rozměrech 5 nm a více³⁶.

Závěr

Neustálý rozvoj nanomateriálů přináší inovativní možnosti v oblasti vývoje nových antimikrobiálních látek. Zejména v době, kdy velmi rychle vzrůstá počet bakterií rezistentních ke stávajícím antibakteriálním látkám, je zapotřebí hledat alternativní přístupy k řešení infekcí způsobených právě takovými patogeny. Antibakteriální aktivita nanočástic kovů by mohla být jedním z budoucích řešení problémů spojených s multirezistentními bakteriemi a poskytovat levnou a šetrnou alternativu ke konvenčním metodám léčby.

Literatura

1. ČSN P CEN ISO/TS 27687 (2011). *Nanotechnologie – Termíny a definice nanoobjektů – Nanočástice, nanovlákně a nanodeska*, Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
2. Thakkar KN, Mhatre SS, et al.: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6(2), 257 (2010).
3. Fedlheim DL and Foss CA: *Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications*, CRC press (2001).
4. Siegel J and Staszek VM: *Chem. Listy* 108, 1102 (2014).
5. Wang L, Hu C, et al.: *International journal of nanomedicine* 12, 1227 (2017).
6. Barber D and Freestone IC: *Archaeometry* 32(1), 33 (1990).
7. Adil SF, Assal ME, et al.: *Dalton Transactions* 44(21), 9709 (2015).
8. Klasen H: *Burns* 26(2), 131 (2000).
9. Erathodiyil N and Ying JY: *Accounts of chemical research* 44(10), 925 (2011).
10. Schröfel A, Kratošová G, et al.: *Acta biomaterialia* 10(10), 4023 (2014).
11. Dykman L and Khlebtsov N: *Acta Naturae (англоязычная версия)* 3, 2(9), (2011).
12. Giljohann DA, Seferos DS, et al.: *Angewandte Chemie International Edition* 49(19), 3280 (2010).
13. Mijatovic D, Eijkel JC, et al.: *Lab on a Chip* 5(5), 492 (2005).
14. Iravani S: *Green Chemistry* 13(10), 2638 (2011).
15. Mittal AK, Chisti Y, et al.: *Biotechnology advances* 31(2), 346 (2013).
16. Kumar V and Yadav SK: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84(2), 151 (2009).

Literatura (pokračování)

17. Dizaj S, Lotfipour F, et al.: *Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications* 44,278 (2014).
18. Fernando S, Gunasekara T, et al.: *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases* 8(1), 2 (2018).
19. Li C, Fu R, et al.: *International journal of nanomedicine* 8,4131 (2013).
20. Besinis A, De Peralta T, et al.: *Nanotoxicology* 8(1), 1 (2014).
21. Hajipour MJ, Fromm KM, et al.: *Trends in biotechnology* 30(10), 499 (2012).
22. Fellahi O, Sarma RK, et al.: *Nanotechnology* 24(49), 495101 (2013).
23. Pal S, Tak YK, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73(6), 1712 (2007).
24. Padil VVT and Černík M: *International journal of nanomedicine* 8, 889 (2013).
25. Louis C and Pluchery O: Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology, World Scientific (2012).
26. Zhang Y, Shareena Dasari TP, et al.: *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 33(3), 286 (2015).
27. Amin RM, Mohamed MB, et al.: *Nanomedicine* 4(6), 637 (2009).
28. Ahmad B, Hafeez N, et al.: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89, 414 (2017).
29. Asmathunisha N and Kathiresan K: *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4(1), (2013).
30. Bhau B, Ghosh S, et al.: *Adv Mater Lett* 6(1), 55 (2015).
31. Geethalakshmi R and Sarada D: *International journal of nanomedicine* 7, 5375 (2012).
32. Lakshmanan A, Umamaheswari C, et al.: *Journal of Nanoscience and Technology* 76 (2016).
33. Annamalai A, Christina V, et al.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 108, 60 (2013).
34. Cui Y, Zhao Y, et al.: *Biomaterials* 33(7), 2327 (2012).
35. Lara Y, Nguyen T, et al.: *Nano Today* 6, 585 (2011).
36. Alkilany AM and Murphy CJ: *Journal of nanoparticle research* 12(7), 2313 (2010).

Souhrn

Miškovská A., Michailidu J., Čejková A.: Antibakteriální účinky nanočástic kovů – nanočástice zlata

Technologie využívající nanočástice se v posledních letech stávají nedílnou součástí mnoha odvětví lidské činnosti. Konkrétně nanočástice kovů jsou pro mnoho oblastí zajímavé především díky unikátním vlastnostem, kterých nabývají díky svému vysokému specifickému povrchu. Jednou z oblastí bezpochyby značně ovlivněnou nanotechnologiemi je biomedicína. Nanočástice kovů, jako je zlato či stříbro, mají v současnosti v biomedicině celou škálu využití. Konkrétně zlaté nanočástice se používají například v kontextu cíleného transportu léčiv, genového inženýrství, diagnostiky, zobrazovacích technik či fototermální terapie. Jednou z vlastností, kterou kovové nanočástice disponují, je mimo jiné antimikrobiální aktivita. Tomuto tématu se věnuje velká pozornost se snahou odhalit rozsah a mechanismus antimikrobiálního působení. Jako velmi perspektivní se jeví především použití kovových nanočástic v boji proti rezistentním bakteriím. Zvláštní pozornost si díky své nízké toxicitě pro živočišné buňky zaslouží nanočástice zlata, jejichž antibakteriální účinky byly prokázány proti řadě podmíněně patogenních bakterií. Nedílnou součástí využívání nanočástic je pak také otázka jejich výroby. Je velmi důležité hodnotit postupy průmyslové produkce kovových nanočástic s cílem nalézt metody šetrné, nezatěžující životní prostředí.

Klíčová slova: Nanotechnologie, nanočástice kovů, antibakteriální účinky, biomedicína

Summary

Miškovská A., Michailidu J., Čejková A.: Antibacterial effects of metal nanoparticles – gold nanoparticles

In recent years, nanotechnology has become increasingly important in many areas of human activity. Metal nanoparticles are interesting, specifically, in many sectors due to their unique properties, resulting from a high specific surface area. One of the areas undoubtedly affected by nanotechnologies is biomedicine. Metal nanoparticles such as gold or silver already have a variety of applications in biomedicine. Gold nanoparticles, in particular, are used for targeted drug delivery, genetic engineering, diagnostics, imaging techniques, and photothermal therapy. Another feature of metal nanoparticles is, inter alia, antibacterial activity. A great attention is paid to the understanding of mechanism and range of their antibacterial activity. The use of metal nanoparticles to combat resistant bacteria is particularly promising. Gold nanoparticles deserve special attention due to their low toxicity to animal cells. The antibacterial activity of gold nanoparticles has also been demonstrated against a number of bacterial opportunistic pathogens. The increasing use of nanoparticles is associated with an issue which is their production. It is very important to study the industrial production methods of metal nanoparticles in order to find cost-effective and eco-friendly methods.

Keywords: Nanotechnology, metal nanoparticles, antibacterial effects, biomedicine

LIDSKÉ MONOAMINOOXIDASY A JEJICH INHIBITORY

Dominik Maršík

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; marsikd@vscht.cz

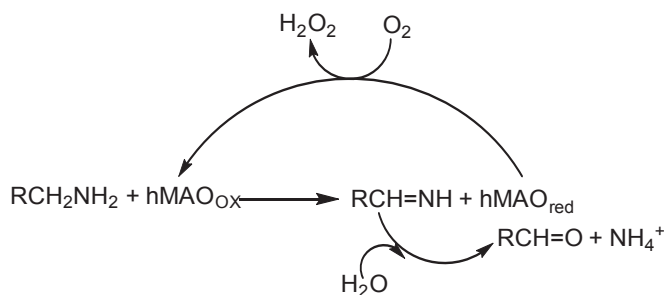
Úvod

Lidské monoaminoxidasy (hMAOs) jsou enzymy katalyzující oxidativní deaminaci neurotransmiterů. Rozlišujeme dvě isoformy – hMAO A a hMAO B, které mají i přes vysokou podobnost některé odlišné funkce, s kterými souvisí i rozdíly v jejich tkáňové distribuci. Těchto odlišností bylo již využito v terapii deprese a Parkinsonovy choroby. V dnešní době je cílem nalézt nové velmi specifické inhibitory, které by minimalizovaly vedlejší účinky doposud používaných terapeutik a obecně zlepšily jejich farmakologické vlastnosti. Toho lze efektivněji docílit porozuměním rozdílů ve struktuře a funkci hMAOs. Strukturní studie umožnily vývoj ireversibilních inhibitorů. Nově objevené sloučeniny by mohly rozšířit indikace inhibitorů hMAOs a zcela tak naplnit jejich terapeutický potenciál.

Funkce a lokalizace hMAOs

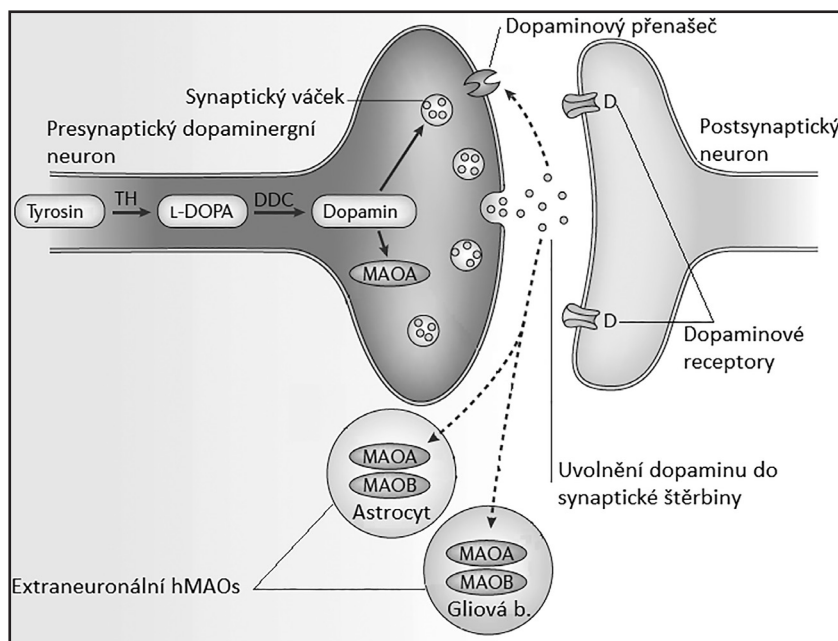
Lidské monoaminoxidasy (hMAOs) jsou intracelulární enzymy spojené s mitochondriální membránou. Vyskytují se téměř ve všech tkáních lidského organismu, kde katalyzují oxidativní deaminaci neurotransmiterů, exogenních aminů a xenobiotik. Produkty této reakce jsou peroxid vodíku, příslušný aldehyd a v závislosti na povaze substrátu amoniak nebo substituovaný amin (Obr. 1)¹⁻³.

Obě isoformy hMAOs se liší i substrátovou specifitou. Serotonin je přednostně katalyzován působením hMAO A, zatímco benzylamin a 2-fenylethylamin jsou preferenčně oxidovány hMAO B. Obě isoformy hMAOs účinně oxidují katecholaminy dopamin, noradrenalin a adrenalin²⁻⁴, jejich tkáňová distribuce však není rovnoměrná. V prenatálním vývoji převažuje v organismu hMAO A, kdežto množství hMAO B velmi rychle narůstá až po porodu³. V těle dospělého člověka se ve většině tkání již vyskytují enzymy oba. Nejvyšší množství hMAO A je exprimováno v játrech, plicích, placentě a tenkém střevě. Naopak ve slezině je úroveň exprese velmi nízká a lymfocyty s krevními destičkami hMAO A neobsahují. Forma B je lokalizována především v tenkém střevě, játrech a mozku, menší množství obsahují plíce, slinivka břišní, kůže, slezina a placenta hMAO B neobsahuje⁵. Konkrétně v mozku jsou hMAOs nejvíce distribuovány v basálních gangliích a hypothalamu. Basální ganglia, serotoninergní neurony a astrocyty obsahují převážně hMAO B, oproti tomu v katecholaminergních neuronech převyšuje aktivita hMAO A³.



Obr. 1: Schéma katalytického působení hMAOs. Substrát je pomocí enzymu oxidován na imin, který je dále hydrolyzován na odpovídající aldehyd a amoniak. Redukovaný enzym se za vzniku peroxidu vodíku opět oxiduje¹.

S tkáňovou distribucí úzce souvisí funkce hMAOs, které chrání organismus před nadměrným množstvím biogenních aminů. Aminy mohou být degradovány přímou oxidací z krve nebo je preventivně zabráněno jejich vstupu do krevního řečiště či přes hematoencefalickou bariéru k mozkové tkáni. V nervovém systému chrání tkáň před poškozením vlivem exogenních aminů a zasahují do procesu neurotransmise, kde ukončují působení neurotransmiterů a regulují jejich skladování. Při uvolnění neurotransmiterů do synaptické štěrby může být část degradována vlivem extraneuronálních hMAOs obsažených v gliových buňkách nebo astro-



Obr. 2: Syntéza dopaminu a jeho degradace pomocí hMAOs. Prekurzorem pro biosyntézu katecholaminů je L-tyrosin, který je působením tyrosinhydroxylasy (TH) hydroxylován na L-DOPA. Pro vznik dopaminu musí být L-DOPA dekarboxylována L-DOPA-dekarboxylasou (DDC). Vzniklý neurotransmitter je ukládán do synaptických váčků nebo může být degradován působením intraneuronálních hMAOs. Po uvolnění do synaptické štěrby mohou být neurotransmitery dále degradovány extraneuronálními hMAOs, které jsou umístěny v astrocytech nebo gliových buňkách. Zbýlá část je po neurotransmisí mechanismem zpětného vychytávání odstraněna ze synaptické štěrby³.

cytech. Většina neurotransmiterů je však zpětně vychytána do presynaptického neuronu, kde jsou uskladněny do synaptických váčků. Jejich část může být degradována působením intraneuronálních hMAOs (Obr. 2)³.

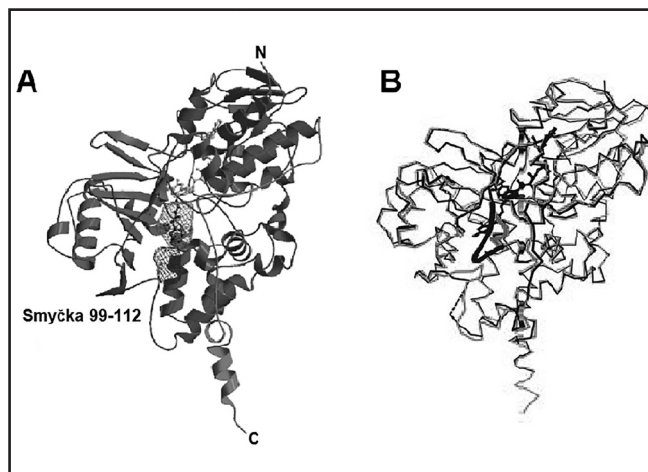
Struktura hMAOs

Krystalografické studie hMAOs byly prováděny ve vazbě s inhibitory⁶⁻⁹. hMAO B krystalizuje jako dimer, zatímco hMAO A jako monomer. Za monomerní stav hMAO A je pravděpodobně zodpovědná selektivní mutace v Glu151→Lys, která nebyla nalezena u MAO jiného obratlovce. Tato specifická mutace na povrchu proteinu zřejmě destabilizuje dimerní stav⁷.

Strukturně jsou si hMAOs velmi podobné. V primární struktuře proteinu se shodují přibližně ze 70 %, molární hmotnost mají okolo 60 kDa⁹ a obsahují stejnou prosthetickou skupinu FAD, která je absolutně nezbytná pro katalytickou funkci. FAD je v proteinu umístěn naproti aktivnímu místu enzymu a k proteinu se kovalentně váže thioetherovou vazbou mezi methylem isoalloxazinového kruhu a Cys406 u hMAO A nebo Cys397 u hMAO B (Obr. 3). Celý protein je zakotven v mitochondriální membráně prostřednictvím C-koncového α -helixu^{7,8}.

Významné strukturní rozdíly nalézáme při pohledu do aktivních míst obou enzymů. Aktivní místo hMAO A obsahuje jednu substrátovou dutinu, zatímco hMAO B obsahuje dutiny dvě (Obr. 4 A)^{7,8}. Na stavbě dutin se v hMAOs podílí dvacet převážně aromatických nebo alifatických aminokyselin zajišťujících hydrofobní prostředí. Celkem se dutiny hMAOs liší v 7 aminokyseli-

nách, které řídí rozpoznávání substrátů⁷. Za rozdělení dutin u hMAO B je konkrétně zodpovědný postranní řetězec Ile199 (Obr. 5), který zaujímá různé prostorové konformace a slouží jako „brána“ mezi dutinou vstupní a vlastní substrátovou dutinou^{8,10}. Na odlišný tvar a velikost dutin má hlavní vliv rozdílná konformace smyčky 210-216 v hMAO A, která je delší než odpovídající smyčka hMAO B (Obr. 4 B). Popsané strukturní rozdíly mají za následek, že rozdělená dutina aktivního místa hMAO B je celkově kratší a hlubší než dutina hMAO A⁷.

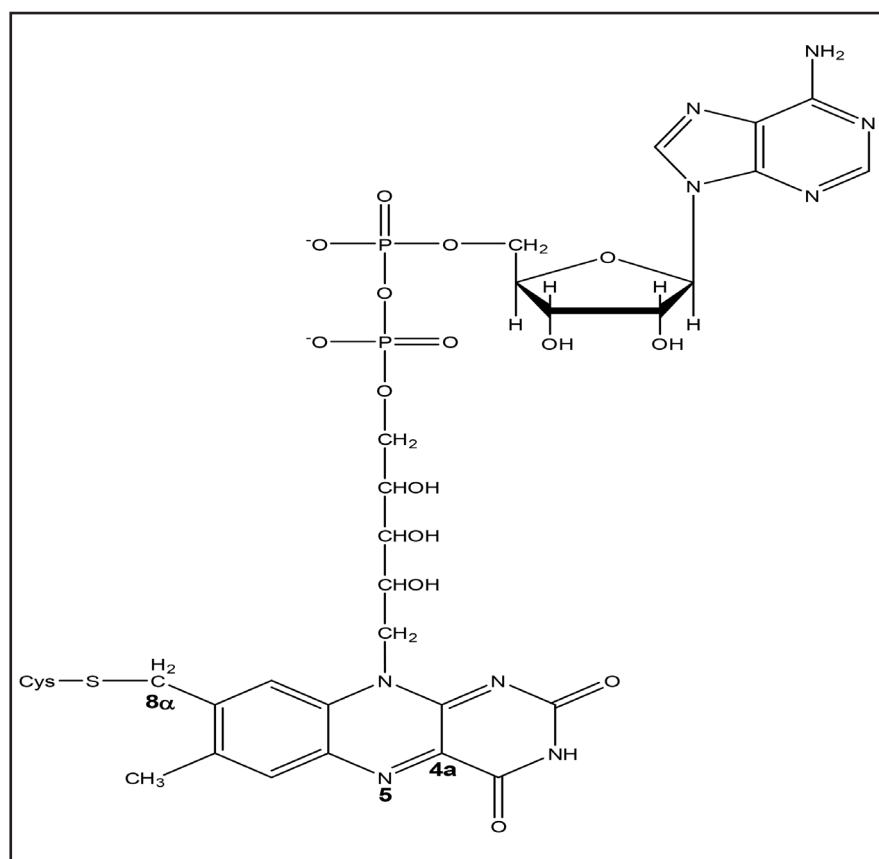


Obr. 4: Struktura hMAOs po krystalizaci proteinu ve vazbě s inhibitory. Na obrázku A je znázorněna struktura hMAO B. Celý protein je ukotven v mitochondriální membráně pomocí C-koncového α -helixu⁶. Na obrázku B jsou zakresleny oba enzymy v překryvu – hMAO A (černá), hMAO B (šedá). V aktivním místě je tučně znázorněn rozdíl v konformaci smyčky 210-216 hMAO A a v odpovídající smyčce 201-206 hMAO B⁷.

Interakce inhibitorů s hMAOs

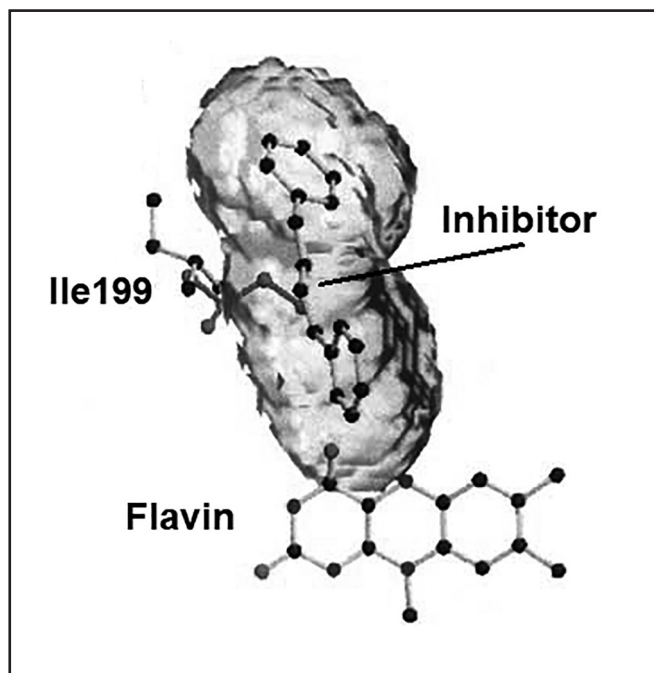
Úspěšná rekombinantní exprese a popis strukturních rozdílů hMAOs ve vazbě s inhibitory významně napomohly k pochopení mechanismu inhibice a poskytly důležité informace pro návrh vysoce specifických inhibitorů. Ireversibilní inhibitory hMAOs se nejčastěji kovalentně připojují k enzymu přes N(5) flavinu. V případě hMAO B byl ale rovněž popsán mechanismus, při kterém se konkrétně tranylcypromin váže do pozice C(4a) (Obr. 3)^{8,11}.

Naopak reversibilní inhibitory zasahují přímo do dutin aktivních míst hMAOs a interagují zde nekovalentně s aminokyselinovými zbytky^{8,10,12-15}. Při tomto typu inhibice je u hMAO B důležitá konformace Ile199 (Obr. 5). Pokud inhibitor zasahuje do obou dutin, Ile199 zaujímá „otevřenou“ konformaci a dutiny již nejsou ničím strukturně odděleny. Inhibitory interagující s oběma dutinami vykazují vyšší specifitu k hMAO B než k hMAO A^{8,14}. Rostoucí afinitu potvrzují studie



Obr. 3: Struktura a vazba kofaktoru FAD v hMAOs⁸.

na isatinu a kofeinu, které interagují pouze s dutinou pro substrát, zatímco jejich deriváty i s dutinou vstupní v blízkosti flavinu¹³. Trvalou fúzi dutin mohou způsobit také kovalentně vázané inhibitory, jako příklad může sloužit *N*-(2-aminoethyl)-*p*-chlorbenzamid⁸.



Obr. 5: Strukturní příklad inhibitoru způsobujícího fúzi dutin hMAO B. Ile199 je při vazbě reversibilního inhibitoru 1,4-difenyl-2-butenu v „otevřené“ konformaci a dutiny aktivního místa již nejsou ničím odděleny. Ile199 rozdělující aktivní místo na dvě dutiny. Tuto „uzavřenou“ konformaci zaujímá například ve vazbě s isatinem⁸.

Klinické využití hMAOs inhibitorů

Inhibitory hMAOs patří k nejdéle používaným antidepresivům. Později se jejich klinické využití rozšířilo o léčbu Parkinsonovy choroby³. Pacienti trpící depresí mají nízké hladiny neurotransmiterů serotoninu a noradrenalinu, které mohou být způsobeny mimo jiné nadměrnou expresí hMAO A v mozku^{1, 3}. Při terapii je vhodné využívat selektivní inhibitory hMAO A, i přestože v serotoninergních neuronech převažuje množství hMAO B. Po podání selektivních inhibitorů hMAO B nedochází ke zvýšení množství serotoninu. Hlavní úlohou hMAO B v serotoninergních neuronech je pravděpodobně degradace cizorodých aminů, které by mohly vstoupit do synaptických váček. V důsledku toho by byla snížena čistota serotoninu vyplaveného do synaptické štěrbin³. Koncentraci neurotransmiterů lze také zvýšit podáním inhibitorů zpětného vychytávání, které brání jejich transportu ze synaptické štěrbin do presynaptického neuronu. Díky zvýšenému množství neurotransmiterů mohou být receptory na postsynaptickém neuronu účinněji stimulovány. Selektivní inhibitory zpětného vychytávání jsou v dnešní době léčivy první volby v terapii deprese¹.

Při léčbě Parkinsonovy choroby se naopak využívá inhibice hMAO B, která je převládající formou v mozku^{1, 3}. Terapie je založena na potlačení vzniku neurotoxického aldehydu po oxidativní deaminaci dopaminu^{3, 16}. Pa-

cienti trpící Parkinsonovou chorobou mají v substantia nigra výrazně snížené množství aldehyddehydrogenasy¹⁷, která 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd (DOPAL) fyziologicky degraduje. Doposud neoxidovaný dopamin kondenzuje s DOPAL za vzniku tetrahydropapaverolinu (THP), který může způsobovat degradaci dopaminergních neuronů a podílet se na vzniku parkinsonského syndromu¹⁸. Při Parkinsonově chorobě se inhibitory hMAO B kombinují s L-DOPA, která je prekurzorem dopaminu (Obr. 2) a zvyšuje jeho koncentraci v mozku. Inhibicí enzymu je navíc zastavena jeho katalytická aktivita, což napomáhá udržet terapeutickou hladinu dopaminu a snižovat dávky L-DOPA potřebné pro navození léčebného efektu¹.

Následující možnosti využití inhibitorů hMAOs jsou ve fázi klinických studií a sleduje se u nich terapeutický efekt, který není přímo spojen se zvýšením množství neurotransmiterů, jako tomu je u léčby deprese^{1, 3, 24}. Produkty oxidativní deaminace (Obr. 1) jsou stále biologicky aktivní látky^{2, 3} a účastní se řady dějů v organismu, jako například při tvorbě paměti¹⁹ nebo regulaci spánku²⁰. Amoniak a peroxid vodíku produkovány v nadměrném množství působí neurotoxicky^{19, 21-23}. Proto se sleduje účinek inhibitorů hMAOs při léčbě Alzheimerovy choroby, při které je zvýšená aktivita hMAO B a v jejím důsledku množství peroxidu vodíku a volných oxidativních radikálů. Přesná příčina degenerace neuronů při tomto onemocnění však není známa. V určitých oblastech mozku byly při Alzheimerově chorobě stanoveny nízké koncentrace acetylcholinu, který se účastní učení a paměťových funkcí. Inhibitory hMAO B v kombinaci s inhibitory acetylcholinesterasy by mohly být v budoucnu vhodnými terapeutiky^{1, 3}.

Ke zvýšené tvorbě peroxidu vodíku a volných radikálů dochází také v případě, kdy buňky nejsou dostatečně zásobeny kyslíkem rozpuštěným v krvi. K takové situaci dochází při srdeční nebo mozkové ischemii. Reaktivní formy kyslíku se hromadí v hypoxické tkáni a po opětovném uvolnění krevního průtoku neboli reperfuzi poškozují okolní tkáň a vzniká zánět. V klinických studiích bylo prokázáno, že inhibitor hMAO B snižoval poškození periferní tkáně a podporoval zotavení po infarktu^{3, 25}.

Negativní účinky spojené s užíváním inhibitorů hMAOs

Jedním z hlavních důvodů, proč byly ireversibilní a neselektivní inhibitory hMAOs nahrazeny inhibitory zpětného vychytávání nebo reversibilními látkami jsou závažné vedlejší účinky. Enzym inaktivovaný ireversibilním inhibitorem je trvale nefunkční a k obnovení funkce dochází až po jeho syntéze. Při inhibici hMAOs dochází obecně k nárůstu množství biogenních aminů. Obzvláště nebezpečná je zvýšená koncentrace tyraminu, který je ve střevech fyziologicky metabolizován hMAO A. Při inhibici hMAO A přechází exogenně přijímaný tyramin do krve a ve vysokém množství indukuje uvolňování adrenalinu z periferních adrenergních neuronů, který začne zesilovat aktivitu sympatiku. Stále zrychlující kardiovaskulární systém může dospět až do stavu označovaného jako hypertenzní krize. Popsaná interak-

ce mezi léčivem a potravinou se nazývá „cheese effect“, protože tyramin je obsažen v řadě fermentovaných potravin, zejména ale v sýrech¹. U selektivních ireversibilních inhibitorů hMAO B tento problém není, protože převládající formou ve střevech je hMAO A a tyramin je stále účinně degradován. Reversibilní inhibitory hMAO A také „cheese effect“ nezpůsobují, protože tyramin je schopný v trávicím systému vytlačit inhibitor z aktivního místa enzymu a v centrální nervové soustavě hMAO A účinně inhibuje³.

Nežádoucí účinek způsobí samozřejmě i příliš vysoká koncentrace neurotransmiteru v synaptické štěrbině, která hrozí při nesprávném užívání inhibitorů hMAOs. Při těžkých depresích lze kombinovat inhibitory hMAO A se selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu. Nadměrné dávky této kombinace způsobují až u 50 % léčených tzv. „serotoninový syndrom“, který je doprovázený celou řadou závažných příznaků a ohrožuje pacienta na životě. Tento stav je předvídatelný a pacient musí být o riziku informován. U poučeného pacienta je v případě vzniku syndromu vyšší šance na včasnou diagnostiku a léčbu. Serotoninový syndrom mohou vyvolat i volně prodejné léky, například sirup proti kašli obsahující dextromethorfan^{1, 26}.

Závěr

Inhibitory hMAOs našly uplatnění v léčbě Parkinsonovy choroby a deprese. V budoucnu by mohly být díky neuroprotektivním účinkům registrovány pro léčbu dalších neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy choroby. Jejich působením dochází ke snížení koncentrace peroxidu vodíku a reaktivních volných radikálů. Tato vlastnost by mohla být využita jako podpůrná terapie při mozkové a srdeční ischemii. Jejich aplikace je však silně závislá na mechanismu účinku. Neselektivní ireversibilní inhibitory hMAOs jsou spojeny s řadou rizik a závažných vedlejších účinků včetně hepatotoxicity a hypertenzní krize. Tyto problémy se podařilo eliminovat s použitím reversibilních selektivních inhibitorů hMAO A, které mají výrazně lepší bezpečnostní profil a jsou velmi účinné při léčbě deprese starších pacientů. Nicméně ireversibilní inhibitory hMAO A účinkovaly také při těžkých depresích, a i v případech, kdy inhibitory zpětného vychytávání a ostatní antidepresiva selhala. Díky strukturním studiím se podařilo připravit další selektivní a reversibilní inhibitory hMAOs. Nově nalezené sloučeniny mohou celkově zlepšit účinnost a bezpečnost těchto léčiv anebo rozšířit jejich využití o další onemocnění^{1, 3, 27}.

Literatura

1. Kumar B, Gupta VP, Kumar V: *Curr. Drug Targets* 18, 87 (2017).
2. Weyler W, Hsu YPP, Breakefield XO: *Pharmac. Ther.* 47, 391 (1990).
3. Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF: *Nature Rev. Neurosci.* 7, 295 (2006).
4. Geha RM, Rebrin I, Chen K, et al.: *J. Biol. Chem.* 276, 9877 (2001).
5. Bortolato M, Chen K, Shih JC: *Handbook of Behavioral Neuroscience* 21, 203 (2010).
6. Binda C, Newton-Vinson P, Hubálek F, et al.: *Nature Struct. Biol.* 9, 22 (2002).
7. De Colibus L, Li M, Binda C, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12684 (2005).
8. Edmondson DE, Mattevi A, Binda C, et al.: *Curr. Med. Chem.* 11, 1983 (2004).
9. Hubálek F, Pohl J, Edmondson DE: *J. Biol. Chem.* 278, 28612 (2003).
10. Binda C, Li M, Hubálek F, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9750 (2003).
11. Gooden DM, Schmidt DMZ, Pollock JA, et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 3047 (2008).
12. Hubálek F, Binda C, Khalil A, et al.: *J. Biol. Chem.* 280, 15761 (2005).
13. Manley-King CI, Bergh JJ, Petzer JP: *Bioorg. Med. Chem.* 19, 261 (2011).
14. Manley-King CI, Bergh JJ, Petzer JP: *Bioorg.* 40, 114 (2012).
15. Son SY, Ma J, Kondou Y, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5739 (2008).
16. Lamensdorf I, Eisenhofer G, Harvey White J, et al.: *Brain. Res.* 868, 191 (2000).
17. Galter D, Buervenich S, Carmine A, et al.: *Neurobiol., Dis.* 14, 637 (2003).
18. Shin MH, Jang JH, Surh YJ: *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1185 (2004).
19. Klann E, Thiels E: *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23, 359 (1999).
20. Jouvet M: *Science* 163, 32 (1969).
21. Halliwell B: *J. Neurochem.* 59, 1609 (1992).
22. Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR: *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 303 (2004).
23. Yang L, Omori K, Suzukawa J, et al.: *Neurosci. Lett.* 357, 73 (2004).
24. Yamasa M, Yasuhara H: *Neurotoxicology* 25, 215 (2004).
25. Slezak J, Tribulova N, Pristacova J, et al.: *Am. J. Pathol.* 147, 772 (1995).
26. SÚKL: Farmakoterapeutické informace 2015, 1. <http://www.sukl.cz/sukl/2015>, staženo 24. března 2020.
27. Mitsuhiro Y, Yasuhara H: *Neurotoxicology* 25, 215 (2004).

Souhrn

Maršík D.: Lidské monoaminoxidasy a jejich inhibitory

Lidské monoaminoxidasy (hMAOs) jsou mitochondriální enzymy katalyzující degradaci biogenních aminů. Téměř ve všech tkáních nalézáme dvě isoformy – hMAO A a hMAO B. Inhibitory hMAO A patří mezi dlouhodobě nejpoužívanější antidepresiva. Díky strukturním studiím, které odhalily rozdíly mezi oběma isoformami, mohou být efektivně navrhovány velmi specifické reversibilní inhibitory. Možnost použití inhibitorů zacílených pouze proti jednomu z enzymů významně zlepšuje jejich terapeutický potenciál. Dnes se inhibitory hMAO B standardně používají k léčbě Parkinsonovy choroby a další možnosti aplikací jsou ve fázi klinického testování. Tento článek shrnuje základní problematiku hMAOs a jejich inhibitorů.

Klíčová slova: lidské monoaminoxidasy, inhibitory monoaminoxidas, reversibilní inhibitory, ireversibilní inhibitory, deprese, Parkinsonova choroba

Summary

Maršík D.: Human monoamine oxidases and their inhibitors

Human monoamine oxidases (hMAOs) are mitochondrial enzymes that catalyze degradation of biogenic amines. In almost all tissues are found two isoforms – hMAO A and hMAO B. Inhibitors of hMAO A belongs to one of the longest used antidepressants. Specific reversible inhibitors could be effectively designed due to structural studies that reveal differences between both isoforms. The possibility of application of inhibitors targeting only one of the enzymes significantly improves their therapeutic potential. hMAO B inhibitors are currently commonly used to treat Parkinson's disease. Other applications of hMAO B inhibitors are in the clinical trial phase. This article summarizes basic issues of hMAOs and their inhibitors.

Keywords: human monoamine oxidases, monoamine oxidase inhibitors, reversible inhibitors, irreversible inhibitors, depression, Parkinson's disease

OBSAH

Úvodem	1
Šebela M.: Krystalování jako cesta k důkazu proteinové povahy enzymů: historický exkurz	2
Vasyliuk A.: Charakterizace bakterií rodu <i>Kocuria</i>	6
Miškovská A., Michailidu J., Čejková A.: Antibakteriální účinky nanočástic kovů – nanočástice zlata	10
Maršík D.: Lidské monoaminoxidasy a jejich inhibitory	15

CONTENT

Editorial	1
Šebela M.: Crystallization as a way to prove the protein nature of enzymes: historical excursion	2
Vasyliuk A.: Characteristic of the genus <i>Kocuria</i>	6
Miškovská A., Michailidu J., Čejková A.: Antibacterial effects of metal nanoparticles – gold nanoparticles	10
Maršík D.: Human monoamine oxidases and their inhibitors	15

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí 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, Albertrtov 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., Videňská 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 nekládejte 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 nebo na 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 or 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
vydáváných 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).