

# B I P R O S P E C T

Dvacátýtřetí ročník  
Číslo 3/2013

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

## BULLETIN BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

**zakládajícího člena Českého svazu  
vědeckotechnických společností  
(ČSVTS)**

**a**

**člena „European Federation  
of Biotechnology“ (EFB)**

### Redakční rada

Doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D.  
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6  
(Editor in Chief)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.  
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.  
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Alena Čejková, CSc.  
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6  
(Editor)

Ing. Martina Nováková, Ph.D.  
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

RNDr. Milan Fránek, DrSc.  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství  
Hudcova 70, 621 32 Brno

Doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.  
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6  
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala  
Teva, Ostravská 29, 747 70 Opava

Ing. Jan Kopečný, DrSc.  
(Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.  
(Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci)

Doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc.  
(Ústav biochemie, PřF MU, Brno)

RNDr. Ivan Babůrek, CSc.  
(Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.  
(Katedra biochemie PřF UK, Praha)

Doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.  
(Endokrinologický ústav, Praha)

<http://bts.vscht.cz>

---

# B I P R O S P E C T

**23th Volume  
No. 3/2013**

---

Society address: Institute of Chemical 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

---

## **BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY**

member of European Federation  
of Biotechnology

### **SUMMARY**

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 and Slovak 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. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak 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 cooperations 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 and Slovak Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech and Slovak biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:

Petra Lipovová, PhD. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 443 028

e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

# ÚVODEM

Vážení přátelé,

ve druhém letošním čísle našeho Bioprospectu jsme Vás podrobně informovali, jak pokračují přípravy mezinárodního biotechnologického symposia BIOTECH 2014 a 6. Česko-švýcarského symposia, které se uskuteční příští rok, a to ve dnech 11. – 14. 6. 2014 v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích. Rádi bychom Vás požádali, abyste sledovali webové stránky symposia [www.biotech2014.cz](http://www.biotech2014.cz), které průběžně aktualizujeme. Opakovaně Vás všechny co nejrůzněji zveme k aktivní i pasivní účasti, a dále k představení svých aktivit formou výstavních stánků, inzerátů, reklamních spotů i dalších forem propagace Vaší činnosti. Pořadatelé symposia jsou připraveni s Vámi projednat způsob propagace a domluvit se na podmínkách spolupráce. Od výrobních podniků, distributorů i dalších organizací bychom uvítali vypsání stipendií pro účast studentů (t.j. zaplacení jejich účastnického poplatku). Vaši spolupráci oceníme nejrůznějšími formami propagace Vaší společnosti či instituce po vzájemné dohodě.

Vědeckým pracovníkům připomínáme možnost publikace přehledných článků z jejich oboru ve zvláštním čísle prestižního časopisu *Biotechnology Advances* (impakt faktor trvale kolem 10).

V prvním letošním čísle Bioprospectu jsem si připomněl několik významných výročí, které podstatně ovlivnily rozvoj všech věd o životě a samozřejmě i nevídaný pokrok v oblasti biotechnologií (objasnění struktury DNA – 60 let, zavedení polymerasové řetězové reakce – 30 let a ukončení projektu lidského genomu – 10 let). I dnes bychom rádi připomněli některé další významné úspěchy na poli vědeckého pokroku.

Ke zpracování a prezentaci informací používáme dnes počítače téměř ve všech oborech lidské činnosti, včetně biotechnologií. Pro interakci s počítačem byly, kromě klávesnice, zkoušena nejrůznější zařízení. Nejvýznamnější úlohu v tomto směru sehrála a stále hraje „počítačová myš“, která letos slaví 50 let. Její první prototyp začal fungovat v laboratoři Douglase Engelbarta právě v r. 1963. Původní myš byla dřevěná krabíčka se dvěma velkými kolečky a kabelem, který ji spojoval s počítačem. V r. 1968 na přednášce v San Franciscu prezentoval Engelbart asi tisícovce počítačových odborníků možné úkony s myší. Jednalo se o úkony, které dnes běžně provádí téměř každý uživatel počítače. Zhruba v r. 1970 nahradil Bill English z firmy Xerox Engelbartova kolečka kuličkou. Později (na přelomu století, experimentálně již v r. 1980) byla kulička nahrazena optickým senzorem ([www.techtydenik.cz](http://www.techtydenik.cz)).

Rychle se rozvíjející a perspektivní technikou, která se postupně uplatňuje v nejrůznějších oborech, včetně medicíny i potravinářství, je trojrozměrný tisk. Tak např. byla publikována úspěšná implantace čelisti vytvořená metodou 3D tisku i „vytisknutí“ lidského ucha z živých buněk a alginátového hydrogelu. Problémem zůstává konstrukce 3D tiskárny, která by zachovala biologickou funkci různých typů buněk. K přípravě tkání a orgánů jsou propracovávány i jiné techniky. V tomto směru nás zaujala zpráva o úspěších výzkumné skupiny vedené Dr. Jürgenem Knoblichem z Ústavu molekulární biotechnologie rakouské akademie věd (IMBA – [www.imba.oeaw.ac.at](http://www.imba.oeaw.ac.at)), která pomocí pluripotentních kmenových buněk připravila lidskou mozkovou tkáň (M.A. Lancaster, M. Renner, C.-A. Martin, D. Wenzel, L.S. Bicknell, M.E. Jurlles, T. Homfray, J.S. Penninger, A.P. Jackson, J.A. Knoblich: Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, doi: 10.1038/nature12517). Ve výzkumu jsou ovšem nejen lidské tkáně, které by mohly nahradit tkáně poškozené úrazy, nemocemi či opotřebením, ale i tkáně pro potravinářské účely. Výroba masa v laboratoři nespočívá jen v přípravě svaloviny. Namnoženým svalovým buňkám je třeba upravit vzhled, dát konzistenci skutečného masa a doplnit sensorické vlastnosti. V Londýně připravili pro novináře hamburger z „masa“ vyrobeného v laboratoři. Toto „maso“ bylo připraveno kultivací kravských kmenových buněk (z dospělého zvířete) ve fetálním hovězím séru. Podobné pokusy se provádějí i v jiných laboratořích. Cena takovýchto vzorků je dosud závratná a kvalita zatím špatná.

V tomto čísle, kromě odborných příspěvků, Vás budeme informovat o oficiálním otevření Centra pro zemědělský a biotechnologický výzkum v Olomouci, které bylo vybudováno s přispěním Evropské unie, o Světovém biotechnologickém kongresu v Bostonu a symposiu „Green for Good“ v Olomouci.

Odborné články v tomto čísle jsou věnovány nanočásticím a jejich vlivu na buněčný systém, adipokinu visfatinu a přípravě a využití galaktooligosacharidů.

Závěrem tohoto úvodníku bychom Vám rádi popřáli mnoho úspěchů ve Vaší práci ve zbývajících částech roku.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

# ZPRÁVA ZE SVĚTOVÉHO BIOTECHNOLOGICKÉHO KONGRESU V BOSTONU

**World Biotechnology Congress 2013** se konal od 3. do 6. června v Bostonu (Massachusetts) v J. B. Hynes Veterans Memorial Convention Center. (Je to velký complex přednáškových sálů a víceúčelových prostor propojený s nabídkou hotelů, nákupních center, restaurací i vyhlídkové věže pojmenovaný po významném bostonském primátorovi). Projednávaná problematika zahrnovala 8 tematických okruhů (Pharmaceutical Biotechnology, Plant and Environment, Industrial and Manufacturing, Medical Biotechnology, Business Development, Regenerative Medicine, Marine Biotechnology, Other Areas). Z názvu tematických okruhů vyplývá, že každý, kdo se chtěl kongresu zúčastnit, zde našel

příležitost. Zajímavostí kongresu bylo, že se s ním paralelně konal další kongres, a to "Drug Discovery & Therapy World Congress 2013". Každodenní dvě plenární přednášky byly pro oba kongresy stejné a po nich se účastníci rozcházeli do jednacích sekcí obou kongresů. Tento trik a řada dalších byly ukázkou jak organizátoři obou kongresů (společnost Eureka) mohli ušetřit na nákladech. Na kongresu bylo předneseno 150 přednášek a prezentováno 132 posterů. Určitou nevýhodou bylo, že postery byly vyvěšeny a prezentovány vždy jen jeden den a abstrakta byla k dispozici jen na CD a ne v tištěné formě. Positivní byla jistě relativně vysoká účast z naší republiky, a to 8 účastníků.

## ZPRÁVA Z KONFERENCE „ZELENÁ PRO LEPŠÍ BUDOUCNOST“ V OLOMOUCI

**Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum ve spolupráci s Evropskou biotechnologickou federací a Biotechnologickou společností ČR uspořádalo ve dnech 17. – 21. června konferenci s názvem Olomouc Biotech 2013: Plant Biotechnology – Green for Good II, na kterou se sjely vědecké špičky v oblasti biotechnologií rostlin z celého světa.**

Cílem konference, která navázala na stejnojmennou akci z roku 2011, bylo podnítit spolupráci mezi různými oblastmi výzkumu, vývoje a inovací biotechnologií rostlin. Během pěti dnů se diskutovalo o tématech jako genomika obilovin, zlepšování užitných vlastností rostlin, reakce rostlin na stresové podněty a zvyšování jejich odolnosti vůči stresu nebo bioenergetika a propojení biotechnologického průmyslu s akademickou sférou. Účastníci konference intenzivně diskutovali rovněž o možnostech využití geneticky modifikovaných rostlin

v souvislosti s plány Evropské unie na rozvoj bio-ekonomiky.

Konferenci zahájil krátkým vystoupením prof. Jan Káš, předseda Biotechnologické společnosti ČR. Z významných hostů na konferenci vystoupili například prezident Evropské biotechnologické federace prof. Marc Van Montagu z univerzity v belgickém Ghentu, který je průkopníkem v oboru genetické transformace rostlin a kterého během jeho pobytu v Olomouci zastihla zpráva o zisku prestižního ocenění „World Food Prize“, obdoby Nobelovy ceny za zemědělství (<http://www.worldfoodprize.org/>). Mezi pozvanými hosty byl i prof. Heribert Hirt, představitel Evropské organizace pro rostlinnou vědu (EPSO), což je nezávislá akademická organizace sdružující více než 226 výzkumných institucí a univerzit s cílem zvýšit dopad vědy a výzkumu rostlin v Evropě. Do Olomouce zavítala také Dr. Kristin Bilyeu, jejíž výzkum se zaměřuje především na zdokonalování skladby

zrna sojových bobů pro zlepšení výživnosti potravin a krmiv. Dr. Bilyeu pracuje pro americké ministerstvo zemědělství, které řídí zemědělskou výzkumnou politiku USA. Mezi zvanými hosty byl i Anastasios Melis, profesor Kalifornské univerzity v Berkeley, jehož zaměřením je fotosyntéza a bioenergetika rostlin; prof. Tony Bacic z univerzity v Melbourne, který se mimo jiné zabývá strukturou, funkcemi a biosyntézou komplexních sacharidů a funkční genomikou obilovin; prof. Irene Lichtscheidl z Vídeňské univerzity, jejíž specializací jsou fyto-remediace a další významní odborníci. V neposlední řadě přijel i Dr. Yuri Gleba, generální ředitel společnosti Icon Genetics, která vyvíjí a produkuje nové proteiny a biofarmaceutika za využití rostlin jako hostitelů.





Konference se zúčastnilo 38 přednášejících z Evropy, USA, Austrálie či Japonska a více než 80 posluchačů. Účastníci konference měli možnost si prohlédnout nové objekty a laboratoře všech oddělení, včetně výzkumných skleníků a polí C. R. Haná. Součástí programu byla i posterová sekce, kde měli příležitost prezentovat výsledky svého výzkumu všichni účastníci, kteří neměli přednášku. Z celkového počtu 28 studentských posterů velmi dobré úrovně byly vědeckou radou konference vybrány tři nejlepší. Vítězkou studentské soutěže se stala Veronika Smékalová, postgraduální studentka biochemie z olomoucké laboratoře profesora Jozefa Šamaj. Ocenění za druhé a třetí místo si odnesli Hele-

na Staňková a Ankush Prasad. Věcné ceny do soutěže věnovala společnost MERCI, s.r.o.

Jak ředitel C. R. Haná prof. Ivo Frébort, tak jeho vědecký ředitel prof. Jaroslav Doležel, vyjádřili ve svých závěrečných projevech potěšení nad hladkým průběhem pětidenní akce a naznačili, že se v budoucnu možná dočkáme konference Green for Good s pořadovým číslem tři.

**Karolina Chvátalová a Ivo Frébort,**  
C.R. Haná, Olomouc  
(karolina.chvatalova@upol.cz)

## BIOTECHNOLOGICKÉ CENTRUM V OLOMOUCI OFICIÁLNĚ ZAHÁJILO ČINNOST V NOVÝCH PROSTORÁCH

**Čtyři nové výzkumné objekty včetně skleníků a dopravní a technické infrastruktury převzali dne 17. června 2013 od zhotovitele stavby zástupci Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum. Slavnostní akt oficiálně ukončil budování olomouckého pracoviště, v němž vědci z tuzemska i zahraničí využívají nejmodernější přístroje a technologie.**

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum ([www.cr-hana.eu](http://www.cr-hana.eu)) je výsledkem spolupráce mezi Univerzitou Palackého v Olomouci a olomouckými pracovišti Výzkumného ústavu rostlinné výroby a Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Každý zúčastněný subjekt do projektu vybudování centra vložil své nejlepší odborníky, specifické know-how a vybrané špičkové technologie. Centrum umožnilo podstatné rozšíření výzkumných kapacit univerzity i jejích partnerů, koncentraci vědeckého potenciálu na jednom místě a na české poměry nebývalou internacionalizaci výzkumných týmů.

Centrum se podařilo vybudovat díky mnohaletému úsilí realizačního a vědeckého týmu vedeného ředitelem Centra prof. Ivo Frébortem, vědeckým ředitelem prof. Jaroslavem Doleželem a projektovou manažerkou Ing. Janou Zimovou.

Kvalitní základní výzkum a efektivní přenos výsledků vědy a výzkumu do aplikační sféry jsou jedny z hlavních cílů činnosti centra. Mezi další cíle intenzivnější uplatňování progresivních biotechnologií v aplikační sféře a posílení konkurenceschopnosti regionálních podniků. Centrum regionu Haná vytváří spojení mezi akademickou a podnikatelskou sférou zejména v oblasti zemědělství, ale i s přesahem do farmacie a dalších oborů. Prioritou je orientace na společnosti v České republice, v současnosti jsou ale hlavními partnery zejména zahraniční a nadnárodní společnosti.

Vznik Centra regionu Haná v areálu Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého na ulici Šlechtitelů podpořila Evropská unie a státní rozpočet ČR částkou 808 milionů korun. Celkové investiční výdaje projektu, které zahrnují stavební a inženýrské práce či vybavení výzkumnými přístroji a technologiemi, dosáhly bezmá-

la 636 milionů korun. Vědci již od ledna tohoto roku využívají technologie a přístroje, z nichž některé jsou v Česku ojedinělé a i v Evropě se jimi může pochlubit jen několik výzkumných center. Dvojpodlažní budovy jsou vysoce účelové a zcela podřízené vědeckému výzkumu a náročným požadavkům nejmodernějšího přístrojového vybavení, které si žádalo sofistikované řešení vzduchotechniky, chlazení, elektroinstalací a inteligentního řízení. Součástí budov jsou například fytotronové komory s unikátní technologií pro fenotypizaci rostlin.

Stavba, již předcházely intenzivní administrativní a investiční přípravy a projektové práce, byla zahájena v březnu 2011 a trvala 24 měsíců. Zhotovitelem bylo sdružení firem VCES, a. s., Eurogema CZ, a. s., a MERCI, s. r. o.

Výzkum v Centru se soustřeďuje do pěti výzkumných programů, které jsou vzájemně provázané a komplexně pokrývají celé spektrum oborů: Proteínová biochemie a proteomika (garant prof. Marek Šebela), Chemická biologie a genetika (prof. Miroslav Strnad), Nové materiály a metody šlechtění rostlin (prof. Jaroslav Doležel), Rostlinné biotechnologie (prof. Jozef Šamaj) a Fytofarmy a genové zdroje zelenin a speciálních plodin (Dr. Karel Dušek). Zájem o práci v centru projevil mnozí vědci ze zahraničí. Z celkového počtu 300 přihlášených z 30 států z celého světa, včetně Japonska a USA, bylo během minulých dvou let celkem přijato 31 nových vědeckých pracovníků a 32 doktorandů. Nyní v centru pracuje 130 vědců 12 národností. Mezi nejvýznamnější z nich patří prof. Katsuyuki Tanizawa a prof. Takashi Endo, kteří do Centra „přestoupili“ po ukončení své aktivní kariéry na Osaka, respektive Kyoto University.

Již během minulého roku se vědeckým týmům Centra podařilo dosáhnout zajímavých výsledků. Byly identifikovány geny řídící infekci žita houbou *Claviceps purpurea*, což poznatek nabízí možnost zlepšit produkci ergoidních alkaloidů pro farmaceutický průmysl. Jako příspěvek světovému projektu čtení genomu pšenice byla dokončena fyzická mapa krátkého ramene chromozómu 7D vhodná pro sekvenování. Byla také

vyvinuta nová metoda pro identifikaci houbových patogenů na napadených listech rostlin pomocí hmotnostní spektrometrie a byl objasněn mechanismus vzniku některých reaktivních forem kyslíku, které se tvoří v rámci primárních reakcí fotosyntézy u rostlin za stresových podmínek. V roce 2012 se vědečtí pracovníci Centra podíleli na publikaci 80 článků v časopisech s průměrným impakt faktorem 4,285, včetně dvou článků v prestiž-

ním časopise Nature, jednom článku v časopise Nature Communications a dále vydali dvě knihy v nakladatelství Springer.

Na mezinárodní úrovni se Centrum stalo regionální kanceláří zastupující Českou republiku (Regional Branch Office) u Evropské biotechnologické federace (EFB; [www.efb-central.org](http://www.efb-central.org)), což mu umožňuje ve spolupráci s Biotechnologickou společností ČR realizovat

řadu aktivit s mezinárodním dopadem a dále rozvíjet bohaté profesní kontakty jednotlivých výzkumných týmů s institucemi a firmami zúčastněnými v této federaci. Spolupráce Centra s EFB je podpořena tím, že viceprezident EFB prof. Brian F. C. Clark je členem vědecké rady Centra. Na kongresu EFB v Istanbulu v září 2012 byl ředitel CRH prof. Ivo Frébort zvolen do správní rady této federace, což by mělo v budoucnu vést k ještě bližšímu propojení aktivit s EFB.

**Karolina Chvátalová,**  
C.R. Haná, Olomouc  
([karolina.chvatalova@upol.cz](mailto:karolina.chvatalova@upol.cz))



## PŮL STOLETÍ VĚDECKÉ ČINNOSTI ÚSTAVU ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY AV ČR, V.V.I.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. si letos připomněl kulaté jubileum – 50 let od zahájení své vědecké činnosti. Jeho hlavním zaměřením je studium unikátních vlastností divokých, domácích i laboratorních zvířat. Jako den oslav byl vybrán čtvrtek 23. května 2013, kdy se v prostorách areálu ústavu v Liběchově dopoledne uskutečnila minikonference spojená s prezentací laboratoří ÚŽFG AV ČR, odpoledne pak byli oceněni vynikající pracovníci ústavu. Pozvaní hosté si též mohli prohlédnout celý výzkumný areál a slavnostní program byl zakončen zahradním rautem. Akce se zúčastnili význační reprezentanti středočeského kraje, představitelé vysokých škol, členové vedení akademie i zástupci jednotlivých ústavů AV ČR stejně jako zájemci o vědu a bývalí zaměstnanci.

Pracoviště v Liběchově vzniklo k 1. listopadu 1954 rozhodnutím Československé akademie zemědělských věd (ČSAZV) jako Laboratoř biologie rozmnožování hospodářských zvířat. K 1. lednu 1963 zřídila ČSAV Laboratoř fyziologie a genetiky živočichů se dvěma pracovišti – Oddělením fyziologie v Uhřetěvsi a Oddělením genetiky v Liběchově. K 1. 2. 1973 byly laboratoře změněny na Ústav fyziologie a genetiky živočichů ČSAV. Změna orientace ústavu vedla k jeho přejmenování na Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR

k 1. 1. 1993, a současný název Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. platí od 1. 1. 2007.

Původní badatelská témata, zpočátku téměř plně orientovaná na aplikovaný zemědělský výzkum se postupně měnila a ztrácela svoji aplikační orientaci. Po období akcentování otázek inseminace se pozornost soustředila na samičí pohlavní buňku, její oplodnění, sledování preimplantačního vývoje savčího embrya, definování podmínek pro experimenty s oocyty *in vitro*, genové exprese v průběhu raného vývoje a výstupy do transplantace embryí. Vznikla tak celá škola, která se dosud úspěšně rozvíjí a jejíž poznatková základna stojí u základů dnešních směrů klonování savců, asistované reprodukce a studia regulace buněčného cyklu.

Úkoly, na nichž vědci ÚŽFG AV ČR v současnosti pracují, se pohybují od výrazně biomedicínských až po témata orientovaná na biodiverzitu. Propojeny jsou společnou linií sledování fyziologických a genetických parametrů, včetně aplikace obdobných experimentálních metod. Aktuálně řešená výzkumná zadání nejsou tradována na jiných vědeckých pracovištích v ČR a charakterizuje je zpravidla rozsáhlá mezinárodní spolupráce. Ústav se také vyznačuje unikátním chovem miniprasat, jež je využíván i mnoha domácími a zahra-

ničními subjekty. Z aktuálně řešených témat tyto nejzajímavější:

### **Projekt ExAM**

Z prostředků evropských strukturálních fondů vzniká v Liběchově nové centrum špičkových laboratoří PIGMOD (Pig Models of Diseases), jehož výstupy by měly směřovat především do aplikační sféry. Plánovaný výzkum by měl vést k identifikaci nových biomarkerů a ověřování terapeutických postupů především u míšním poškození, neurodegenerativních onemocněních a u lidského melanomu. Podařilo se vytvořit model Huntingtonovy choroby, který je využíván jak v USA, tak i Evropě. Spolupráce laboratoří centra PIGMOD s aplikační sférou bude vedle základního výzkumu představovat podstatnou část objemu vědecké činnosti. Již nyní se laboratoře centra podílejí na řešení řady projektů financovaných soukromými firmami či nadacemi, jako je například HighQ, Neuralstem či Synovo.

### **Odolnost nádorů proti lékům**

Byly analyzovány změny proteinů doprovázející rozvoj rezistence k působení inhibitoru cyklin-dependentních kináz, boheminu, který představuje slibnou alternativu v moderní protinádorové léčbě. Naše výsledky ukázaly, že kritickou úlohu v odolnosti vůči působení inhibitorů cyklin-dependentních kináz hrají proteiny Rho GDP-dissociation inhibitor 2, Y-box binding protein 1 a HSP70/90 organizing protein. Navíc byla prokázána role těchto proteinů v odolnosti vůči jiným typům protinádorových léčiv, jako jsou vinkristin nebo daunorubicin.

### **Obnova chrupu**

Náhrada chybějícího zubu kopírováním vývojového procesu formování zubu představuje mnohem přirozenější alternativu k implantátům. Přitom je nutno vytvořit funkční interakce mezi zubem, okolní kostí a periodontem. Aktuální výzkum v kraniofaciální genetice se proto zaměřuje na mechanismy zodpovědné za správné buněčné a molekulární interakce nejenom v rámci specifického orgánu, ale také v kontextu s přilehlými strukturami. Výsledek studií poskytuje 3D rekonstrukce prvního myšího moláru (M1) během postnatálního období doplněné lokalizací proliferace a apoptózy a je-

jich souvislosti s remodelací okolních struktur a formováním alveolární kosti. Vývoj náhradní dentice je sledován u zástupců plazů i savců, kteří mají schopnost vyměnit zuby jednou či několikrát za život.

### **Anaerobní mikrobiomy**

Anaerobní mikroorganismy v trávicím traktu zvířat a lidí svými počty několikrát převyšují počty eukaryotických buněk hostitele. Často rozhodují o využívání složek potravy a chrání hostitele proti patogenním mikroorganismům. Změny mikrobiální populace v tomto prostředí mohou vést nebo jsou příznakem zánětlivých střevních onemocnění případně i karcinomu střeva. Podařilo se popsat bakteriální chitinolytickou populaci v bacheru přežvýkavců i u lidí. U býložravců se kromě bakterií se na utilizaci krmiva v bacheru podílejí i anaerobní houby. Mnohé izoláty vykazovaly unikátní aktivity fibrolytických enzymů, které bylo možné využít v různých technologiích. V současnosti probíhá projekt 7RP Rumonomics, zaměřený na rozsáhlou analýzu střevních mikrobiomů krav a sobů.

### **Molekulární ekologie**

Hlavním předmětem tohoto výzkumu je odpověď živočichů na změny klimatu na příkladu norníka rudého. Snažíme se identifikovat klíčové geny zodpovědné za ekologické adaptace. Našimi dalšími výzkumnými tématy jsou ochranná genetika, fylogeografie a molekulární systematika žab a hadů, fylogeografie a interakce historického a antropogenního toku genů u kaprovitých ryb, a evoluční genetika holarktických perlooček *Daphnia*. Současně se studují možnosti omezení produkce metanu v hospodářských chovech přežvýkavců.

ÚŽFG AV ČR patří v systému Akademie věd ČR k ústavům střední velikosti. Skládá se z 11 laboratoří lokalizovaných v Liběchově, Praze a Brně. Ústav má několik společných pracovišť s vysokými školami i s jinými výzkumnými ústavami v ČR, byl zapojen do Centra buněčné terapie a tkáňových náhrad, Centra pro výzkum biodiverzity, Centra nádorové proteomiky a rozvíjí rozsáhlou mezinárodní spolupráci s renomovanými vědeckými pracovišti od amerického až po asijský kontinent.



# VISFATIN – ADIPOKIN S POTENCIÁLEM V LÉČBĚ PORUCH ASOCIOVANÝCH S OBESITOU?

Vojtěch Škop, Petr Svoboda, Edita Křížová, Jarmila Zídková

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, skopv@vscht.cz

## Úvod

V dnešní době je pozornost klinického výzkumu a praxe intenzivně zaměřena na civilizační choroby, mezi které je řazena také obezita. Obezitu nebo nadváhu mělo celosvětově v roce 2008 podle Světové zdravotnické organizace 35% dospělé populace, přičemž počet těchto osob se od roku 1980 zdvojnásobil. Problém obezity spočívá převážně v doprovodných komplikacích, mezi které patří zejména insulinová rezistence a kardiovaskulární poruchy.

Zvětšující se velikost a množství adipocytů při obesitě vede ke změnám v metabolických a sekrečních vlastnostech tukové tkáně. Zvětšení adipocytu nad určitou úroveň vede k resistenci dané buňky k účinkům insulinu<sup>1</sup>. Dojde tak ke snížení příjmu glukosy a mastných kyselin z krevního oběhu adipocytu a ke zvýšení lipolysy a sekrece mastných kyselin, které jsou normálně insulinem inhibovány. Zvýšená hladina mastných kyselin a triacylglycerolů vede k ukládání lipidů mimo tukovou tkáň, což má za následek insulinovou resistenci dalších tkání<sup>2,3</sup>.

Kromě volných mastných kyselin jsou však z tukové tkáně sekretovány také adipokiny – hormony tukové tkáně. První adipokin byl objeven teprve v roce 1994, od této doby se však tuková tkáň stala místem předního zájmu vědeckého zkoumání a dnes již bylo identifikováno více než 20 adipokinů. Adipokiny se podílejí na regulaci metabolismu sacharidů, lipidů, ale i imunitní odpovědi a zánětu. S rozvojem obezity (růstem velikosti i počtu adipocytů) dochází k dysregulaci sekrece adipokinů, což významně přispívá k rozvoji insulinové rezistence a následně i diabetu mellitu 2. typu a dalších poruch. Při neustálém růstu tukové tkáně dochází dále k její infiltraci imunitními buňkami (zejména makrofágy), které zde produkují prozánětlivé cytokiny, čímž mimo jiné ovlivňují sekreci adipokinů a zhoršují insulinovou senzitivitu<sup>1,4</sup>.

Možnost ovlivnění sekreční funkce adipocytů a makrofágů přítomných v tukové tkáni, případně účinku a množství sekretovaných adipokinů a cytokinů má v budoucnosti obrovský potenciál při léčbě poruch asociovaných s obesitou. Nejprve je však nezbytné detailně pochopit funkce a význam všech adipokinů. Bez těchto poznatků je pravděpodobné, že léčba nebude mít očekávaný účinek, jak se již před nedávnou dobou stalo při podávání rekombinantně připraveného adipokinu leptinu<sup>5</sup>.

Jedním z adipokinů, kterým je připisován potenciál pro budoucí léčbu poruch spojených s obesitou je visfatin. Nicméně názory na funkci a mechanismus působení tohoto adipokinu jsou v literatuře značně nejed-

notné. Tento článek podává informace o současných názorech na význam visfatinu v metabolismu sacharidů a lipidů, jeho úlohu v imunitním systému, mechanismus jeho působení a sekrece, se zaměřením na historický vývoj těchto poznatků.

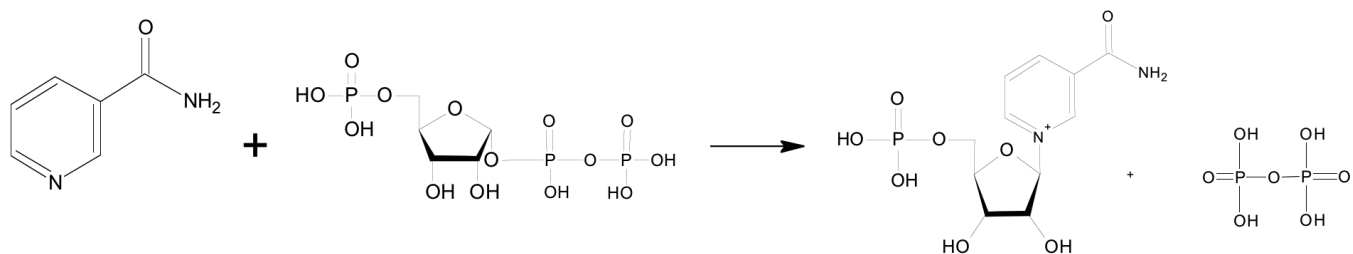
## Objevení a popis visfatinu

Visfatin byl objeven v roce 2005 týmem doktora Fukuhary na základě rozdílné genové exprese mezi viscerální a podkožní tukovou tkání. Podle místa exprese svého genu dostal visfatin jméno, které je složeninou slov visceral fat adipokin. Již v první práci, která se visfatinem jako adipokinem zabývá, byla naznačena jeho biologická významnost a mechanismus působení. Bylo zjištěno, že se jeho množství v plasmě zvyšuje při obesitě a že je schopen po vpravení do organismu snižovat hladinu krevní glukosy a podporovat příjem glukosy adipocytu *in vitro*. Přidání visfatinu do kultivačního media také stimulovalo diferenciaci 3T3-L1 adipocytů. Protože působení visfatinu bylo v mnoha případech stejné s insulinem, byl zkoumán efekt visfatinu na insulinovou signální kaskádu. Bylo zjištěno, že visfatin indukuje fosforylaci insulinového receptoru a dalších proteinů. Působení visfatinu a insulinu bylo v těchto pokusech aditivní. Podle výsledků v této práci by se visfatin měl vázat na insulinový receptor v jiném místě než insulin a měl by být schopen napodobovat jeho působení. Proto byl visfatin označen jako insulin mimetický adipokin. Dalším důležitým objevem v práci doktora Fukuhary bylo zjištění primární struktury visfatinu, která byla stejná jako struktura již v té době známého imunomodulačního cytokinu, růstového faktoru pre-B lymfocytů (pre-B cell colony-enhancing factor, PBEF). Vzhledem k tomu, že insulin a insulinu podobné růstové faktory (insulin like growth factors, IGFs) jsou také schopny potencovat tvorbu pre-B lymfocytů, předpokládal Fukuhara, že působení visfatinu v imunitním systému je dalším insulin mimetickým efektem<sup>6</sup>. Visfatin se poměrně rychle dostal do podvědomí široké vědecké veřejnosti, přestože je jeho koncentrace v krvi za fyziologických podmínek tak nízká, že by neměla mít zásadní vliv na metabolismus<sup>6,7</sup>.

Na rozdíl od některých jiných adipokinů koncentrace visfatinu roste se zvyšujícím se množstvím tukové tkáně a přitom ve svém působení podporuje činnost insulinu. Z tohoto důvodu by visfatin u obesních jedinců mohl mít v organismu určitou ochrannou úlohu před rozvojem diabetu mellitu 2. typu. To způsobilo, že mu vědci do budoucna připisovali možné využití v klinické praxi<sup>8</sup>.

Nejasnosti ohledně visfatinu vznikly poté, co byl tým doktora Fukuhary nucen přehodnotit mechanismus





**Obr. 1:** Reakce katalysovaná nikotinamidfosforibosyltransferasou, první krok biosynthesy nikotinamidadenindinukleotidu (NAD) z nikotinamidu, takzvané cesty šetřící nikotinamid.

jeho působení prostřednictvím insulinového receptoru zhruba rok a půl po vydání publikace s výše popsanými výsledky. Důvodem přehodnocení bylo, že se dalším laboratorním nepodařilo jejich výsledky zopakovat<sup>9</sup>. Mechanismus působení visfatinu tak dodnes nebyl jednoznačně vysvětlen.

## Enzymová aktivita visfatinu

Důležitou informací, kterou Fukuhara ve své publikaci neuvědíl, je enzymová aktivita PBEF nalezená tři roky před objevem visfatinu (v roce 2002). Na základě sekvenci homologie se ukázalo, že PBEF má významnou podobnost s bakteriálním enzymem nikotinamidfosforibosyltransferasou (NamPRTasa, EC 2.4.2.12). Současně byla prokázána tato aktivita u PBEF imunoafinitně izolovaného z myších jater. NamPRTasa katalysuje spojení nikotinamidu s 5-fosforibosyl-1-pyrophátem za vzniku nikotinamidmononukleotidu (NMN) (Obr. 1), což je krok který určuje rychlost celé této reakční dráhy a tím i množství NAD v buňce<sup>10,11</sup>.

Nikotinamidové nukleotidy jsou esenciální kofaktory, které se účastní prakticky všech buněčných metabolických drah, zejména jako oxidační nebo redukční činidla. Kromě této role koenzymů oxidoreduktas mají nikotinamidové nukleotidy důležitou funkci jako prekursory důležitých regulačních molekul<sup>10,12</sup>. V poslední době je právě neredoxním reakcím, jichž se NAD v buňce účastní, přiřkládán zásadní význam.

NAD může sloužit například jako substrát pro důležité kovalentní modifikace proteinů, které, podobně jako fosforylace, slouží k regulaci aktivity daných proteinů. Tyto kovalentní modifikace v jádře regulují zejména replikaci DNA, transkripci, opravné mechanismy DNA, rekombinaci, buněčnou proliferaci a buněčnou smrt. NAD se dále účastní změn ve struktuře chromatinu čímž je regulován přístup transkripčních enzymů. Vyčerpání NAD je pak pro buňku jeden z prvních signálů pro zahájení buněčné smrti. Proto je důležitá správná regulace dráhy, která z nikotinamidu syntetisuje zpět NAD a jejíž rychlost je určována NamPRTasou<sup>12</sup>.

Objev NamPRTasové aktivity vrhl na PBEF jiné světlo. PBEF byl původně objeven jako cytokinu podobná molekula, která je schopná ve spolupráci s IL7 a faktorem kmenových buněk (stem cell factor, SCF) podporovat tvorbu kolonií pre-B buněk<sup>13</sup>. Další práce pak ukázaly, že exprese PBEF je indukována zánětlivým a bakteriálním stimulem v imunitních, ale i epitheliálních a dalších buňkách<sup>14</sup>. Objevením NamPRTasové aktivity PBEF vznikl názor, že PBEF nepůsobí jako cytokin, ale všechny jeho funkce jsou zprostředkovány NamPRTasovou

aktivitou<sup>10</sup>. Tuto teorii podporuje zvýšený požadavek na množství NAD u proliferujících buněk a potřeba NAD při likvidaci pathogenních mikroorganismů pomocí tzv. oxidačního vzplanutí<sup>10,15</sup>. Vzhledem k tomu, že PBEF/NamPRTasa má v syntese NAD klíčovou úlohu, musí být při vysokých nárocích na množství NAD (např. při proliferaci buněk a zánětu) exprese genu pro tento enzym zvýšena. Další nejasností v působení PBEF je jeho dosud neznámý receptor a signální dráha, kterou aktivuje. To naznačuje, že jeho působení v imunitním systému je spojeno spíše s potřebou NAD, než s cytokinovou aktivitou<sup>16</sup>. Na druhou stranu však extracelulární PBEF aktivuje řadu dějů, jako je tvorba cytokinů a kostimulačních molekul<sup>17,18</sup>, které se obtížně vysvětlují jen zvýšenou syntésou NAD, ke které by navíc mělo docházet intracelulárně.

## Alternativní mechanismus působení visfatinu/PBEF/NamPRTasy

Přestože byly výsledky o mechanismu působení visfatinu prostřednictvím vazby na insulinový receptor přehodnoceny<sup>9</sup>, poměrně velké množství studií potvrzuje, že zvýšené koncentrace visfatinu jsou spojeny s obezitou, insulinovou resistencí, diabetem 2. typu a kardiovaskulárními chorobami<sup>19</sup>. Podařilo se také potvrdit, že myši s mutovanou jednou alelou visfatinu vykazují sníženou glukosovou toleranci<sup>20</sup>. Jaký je tedy mechanismus působení visfatinu, když neaktivuje insulinový receptor, ale přitom má vliv na hladinu krevní glukosy? Na rozdíl od Fukuhary *et al.*, kteří publikovali objevení visfatinu a nezjistili významný vliv delece jedné alely visfatinu na hladinu insulinu u myší<sup>6</sup>, u stejného modelu Revollo *et al.* našli významné narušení glukosou stimulované sekrece insulinu<sup>20</sup>. Ve své publikaci přisuzují insulin mimetické působení visfatinu jeho NamPRTasové aktivitě. Předpokládá se zde, že extracelulární visfatin sekretovaný adipocyty katalysuje tvorbu NMN, který je transportován do  $\beta$ -buněk pankreatu, kde dojde ke zvýšení množství NAD. NAD následně pravděpodobně prostřednictvím výše popsaných mechanismů zvýší syntésu a sekreci insulinu, což vede ke snížení hladiny krevní glukosy<sup>20</sup>. Tento model však nevysvětluje insulin mimetické působení visfatinu na buněčné linie adipocytů a osteoblastů<sup>6,21</sup>, kde se jedná o izolovaný typ buněk, a efekt visfatinu tedy nemůže být zprostředkován zvýšením sekrece insulinu v pankreatu.

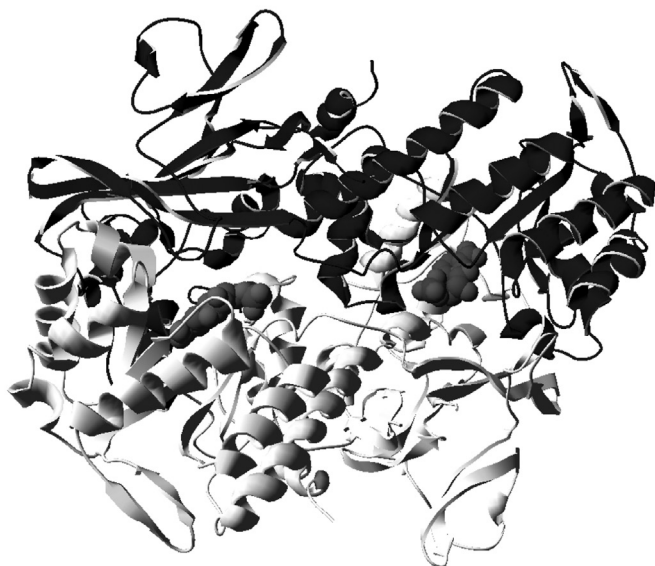
## Struktura visfatinu

Savčí gen pro visfatin/PBEF/NamPRTasu kóduje protein o velikosti 491 aminokyselin a molekulové hmot-

nosti 52 kDa<sup>14</sup>. Jedná se o evolučně konzervativní protein, vykazující významnou podobnost s NamPRTasami ostatních eukaryot, včetně metazoí i prokaryot<sup>10</sup>.

Lidský gen pro visfatin má velikost 34,7 kbp, obsahuje 11 exonů a 10 intronů. Analýza sekvence před počátkem transkripce odhalila přítomnost dvou promotorů, z nichž oba obsahují hormonálně regulovatelné prvky a vazebná místa pro transkripční faktory typické pro transkripci cytokinů. Ze struktury genu dále vyplývají dvě zjištění, ze kterých vyvstává otázka o působení visfatinu/PBEF jako adipokinu/cytokinu. Prvním z nich je nepřítomnost klasického sekvenčního motivu, který se vyskytuje u ostatních cytokinů, druhým je struktura mRNA, ve které chybí cytokin-specifická sekreční sekvence<sup>14</sup>.

Struktura proteinu z různých organismů byla stanovena na základě rentgenokrystalografických měření. Porovnání struktury s dalšími fosforibosyltransferasami ukázalo, že NamPRTasa náleží do třídy dimerních fosforibosyltransferas typu II. Ačkoliv s nimi postrádá sekvenční identitu, prostorová struktura je homologická. Visfatin tvoří dimer s rozsáhlým mezimolekulárním povrchem o celkové ploše 8,077 Å<sup>2</sup>. Na rozhraní mezi jednotlivými monomery leží dvě aktivní místa. Do struktury každého aktivního místa zasahují oba monomery (Obr. 2). Vazba NMN v aktivním místě je zprostředkována  $\pi$ - $\pi$  interakcemi mezi nikotinamidem z NMN, fenylalaninem (Phe) na pozici 193 jednoho řetězce a tyrosinem (Tyr) na pozici 18 druhého řetězce. Tyto interakce jsou obecným rysem fosforibosyltransferas II typu. Unikátní interakcí, která je pravděpodobně zodpovědná za substrátovou specifitu visfatinu, je vodíková vazba mezi aspartátem (Asp) na pozici 219 a amidové skupiny nikotinamidu. Visfatin dále obsahuje další důležitá residua účastnící se vazby NMN a nejspíše i katalytického účinku<sup>22</sup>.



**Obr. 2:** Znárodnění prostorové struktury visfatinu. Visfatin je složený ze dvou identických podjednotek (na obrázku jsou barevně odlišeny) na jejichž rozhraní jsou dvě katalytická místa (na obrázku je pozice katalytických míst ukázána pomocí navázaného produktu reakce-NMN). Struktura byla stažena z databáze RCSB PDB pod označením 2H3D a zobrazena pomocí Swiss PDB Viewer.

## Sekrece visfatinu

Většina sekretovaných proteinů obsahuje ve své struktuře aminoterminální signální sekvenci, která se skládá z 13 – 36 hydrofobních aminokyselin a umožňuje ko-translační přenos proteinu do endoplasmatického retikula (ER). Signální sekvence je v ER odštěpena a dochází k dalším posttranslačním modifikacím (vznik disulfidových vazeb, glykosylace). Výsledný protein je zabalen do váčku a transportován ke Golgiho komplexu (GK), kde pokračují posttranslační modifikace. Z GK poté sekretovaný protein zabalený v dalším váčku putuje k okraji buňky, kde dojde po fusi sekrečního váčku s membránou k jeho uvolnění do extracelulárního prostoru<sup>23</sup>.

Jak již bylo naznačeno, visfatin postrádá signální sekvenci a nemůže být výše popsaným způsobem sekretován. Navíc inhibitory sekrece prostřednictvím ER-GK cesty nemají na sekreci visfatinu vliv<sup>24</sup>. Jednou možností sekrece visfatinu je jeho uvolnění po smrti adipocytu. Při zvýšeném množství tukové tkáně dochází k hypertrofii adipocytů, které následně ve vyšší míře umírají, a visfatin je uvolňován do krve. Tímto způsobem je možné vysvětlit vyšší koncentrace visfatinu u obesních jedinců<sup>25</sup>.

Druhým možným vysvětlením je aktivní sekrece visfatinu z buněk jinou než klasickou sekreční dráhou. Tato možnost je podpořena zejména vysokými koncentracemi visfatinu v mediu buněčných linií adipocytů 3T3-L1 a HIB-1B a hepatocytů HepG2, které jsou srovnatelné s koncentracemi ostatních adipokinů a výrazně vyšší než množství jiných intracelulárních proteinů. Na druhou stranu však inhibice známých cest neklasické sekrece, kterými je například tvorba mikrověsikulů nebo ABC transportér, nevedla ke změně v sekreci visfatinu. Visfatin také neobsahuje žádné ze známých míst pro štěpení caspasou 1, jež je součástí další neklasické sekreční dráhy<sup>20,24,18,26</sup>. Pokud je visfatin z buněk sekretován, je mechanismus této sekrece prozatím neznámý, což podporuje teorie, které jeho funkci spojují s enzymovou aktivitou místo jeho působení jako adipokinu/cytokinu.

## Závěr

Visfatin byl původně popsán jako insulin mimetický adipokin, jehož dalšími funkcemi jsou enzymová aktivita (katalýza prvního kroku biosynthesy NAD z nikotinamidu) a role v regulaci imunitního systému. Protože koncentrace visfatinu roste se zvyšujícím se množstvím tukové tkáně a přitom ve svém působení podporuje činnost insulinu, bylo visfatinu přisuzováno možné využití v klinické praxi. V pozdější době se však objevila řada nejasností spojených zejména s jeho sekrecí a vazbou na insulinový receptor. Vlivem těchto nejasností jsou názory na mechanismus působení visfatinu v metabolismu glukosy a v imunitním systému stále nejednotné a definitivní odpověď na otázku o jeho funkci a sekreci dodnes chybí.

## Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory grantů GAČR 13-04580S, IAA600110902 a MŠMT 6046137305, dále byla financována z účelové podpory na specifický výzkum (MŠMT č. 20/2013).

## Literatura:

1. Mlejnek P, Zídková J, Sajdok J: *Bioprospect* 17, 56 (2007).
2. Masopust J: *Labor. Aktuell* 4, 5 (2005).
3. Trachta P, Haluzík M: *DMEV* 15, 83 (2012).
4. Sell H, Eckel J: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 13, 366 (2010).
5. Sucharda P: *Vesmí* 76, 133 (1997).
6. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al.: *Science* 307, 426 (2005).
7. Blahoš J, Zmrazil V: *Endokrinologie interdisciplinární obor* 1st ed., Triton: Praha (2006).
8. Polák J, Klimčáková E, Kováčiková M, et al.: *Interní medicína pro praxi* 10, 443 (2006).
9. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al.: *Science* 318, 565 (2007)
10. Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, et al.: *Eur. J. Immunol.* 32, 3225 (2002).
11. Revollo JR, Grimm AA, Imai S: *J. Biol. Chem.* 279, 50754 (2004).
12. Magni G, Amici A, Emanuelli M, et al.: *Cell Mol. Life Sci.* 61, 19 (2004).
13. Samal B, Sun Y, Stearns G, et al.: *Mol. Cell Biol.* 14, 1431 (1994).
14. Luk T, Malam Z, Marshall JC: *J. Leukoc. Biol.* 83, 804 (2008).
15. Hořejší V, Bartůňková J: *Základy imunologie*. 3rd ed., Triton, Praha (2005).
16. Jacques C, Holzenberger M, Mladenovic Z, et al.: *J. Biol. Chem.* 287, 15100 (2012).
17. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al.: *J. Immunol.* 178, 1748 (2007).
18. ommer G, Garten A, Petzold S, et al.: *Clin. Sci. (Lond)* 115, 13 (2008).
19. Chang YH, Chang DM, et al.: *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27, 515 (2011).
20. Revollo JR, Körner A, Mills KF, et al.: *Cell Metab.* 6, 363 (2007).
21. Xie H, Tang SY, Luo XH, et al.: *Calcif. Tissue Int.* 80, 201 (2007).
22. Wang T., Zhang X., Bheda P, et al.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 661 (2006).
23. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed., WH Freeman, New York (2008).
24. Tanaka M, Nozaki M, Fukuhara A, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 194 (2007).
25. Stephens JM, Vidal-Puig AJ: *Curr. Opin. Lipidol.* 17, 128 (2006).
26. Garten A., Petzold S., Barnikol-Oettler A, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 376 (2010).

## Souhrn

### Škop V.: Visfatin – adipokin s potenciálem v léčbě poruch asociovaných s obezitou?

Jedním z velkých problémů současné celosvětové populace je neustále se zvyšující výskyt obezity. Problém obezity spočívá zejména v doprovodných komplikacích, mezi které patří insulinová rezistence a kardiovaskulární poruchy. Nedávno objevenou úlohou tukové tkáně je sekrece tkáňových hormonů – adipokinů, které se účastní řady regulačních pochodů. Jedním z adipokinů je visfatin, který byl popsán v roce 2005, a bylo mu přisuzováno insulin mimetické působení. Dále bylo ukázáno, že visfatin má v organismu ještě další role – roli imunomodulačního cytokinu PBEF a enzymu nikotinamidfosforibosyltransferasy. Protože však zatím nebyl nalezen receptor, na který by se visfatin vázal, ani nebyla objevena cesta jeho sekrece, zůstává otázkou, zda visfatin plní všechny úlohy které mu jsou přisuzovány.

**Klíčová slova:** obezita, insulin, visfatin, PBEF, nikotinamidfosforibosyltransferasa, NAD, adipokin, cytokin

## Summary

### Škop V.: Visfatin – adipokine with the potential in the treatment of disorders associated with obesity?

Increasing incidence of obesity is one of the major challenges of the current global population. The most serious problem of obesity are accompanying complications, including insulin resistance and cardiovascular disorders. Recently was discovered new role of adipose tissue – secretion adipokines. Adipokines are tissue hormones which are involved in numerous regulatory processes. Visfatin has been described in 2005 as insulin mimetic adipokine. Furthermore, it was shown that visfatin has another role – the role of immunomodulatory cytokine PBEF and enzyme nicotinamide phosphoribosyltransferase. But now there is question whether visfatin has all of these roles, because visfatins secretion pathway and visfatin receptor has not yet been found.

**Keywords:** obesity, insulin, visfatin, PBEF, nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAD, adipokines, cytokines

# NANOČÁSTICE A JEJICH VLIV NA BUNĚČNÝ SYSTÉM

Karolína Pádrová

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze, padrovak@vscht.cz

## Úvod

Vědecký výzkum zabývající se problematikou nanomateriálů je z historického hlediska poměrně mladým vědním oborem. Počátek vývoje nanotechnologií je datován do první poloviny 80. let.<sup>1</sup> V současné době nalezy nanotechnologie uplatnění v řadě různých oborů, nejen v průmyslu nebo medicíně, ale také v kosmetice nebo potravinářství. Při řešení environmentální proble-

matiky se využívá degradačních schopností některých nanočástic (př. nanočástice nulmocného nanoželeza).

## Nanomateriály

Nanotechnologie pracují s materiály, jejichž alespoň jeden rozměr je menší než 100 nm. Z molekulárního hlediska to znamená, že jedna nanočástice, v závislosti na své velikosti, může být tvořena 10 až 10<sup>6</sup> atomy



či molekulami. Na úrovni nanometrů neplatí běžné fyzikální zákony, ale ani zákony kvantové chemie. Vlastnosti a chování nanomateriálů představují jakýsi mezi stupeň spojující tyto dvě oblasti.<sup>2</sup>

V nanomateriálech jsou často přítomny silné chemické vazby. Proto může docházet k značné delokalizaci valenčních elektronů, jejíž míra závisí na velikosti systému. Nepatrná změna velikosti se rovněž projeví na změně struktury. Tyto skutečnosti jsou příčinou fyzikálně-chemických vlastností odlišujících tyto materiály od chování chemicky stejných látek větších rozměrů a i nepatrná změna ve velikosti může vést k překvapujícím a nepředvídatelným účinkům. Změnou velikosti lze ovlivnit například magnetické a optické vlastnosti, chemickou reaktivitu, vodivost, bod tání či povrchovou aktivitu.<sup>2</sup>

Na základě chemického složení mohou být nanomateriály rozděleny do tří skupin. První skupina zahrnuje nanomateriály na bázi uhlíku. Uhlíkaté nanomateriály mohou vytvářet různé struktury, jako jsou fullereny, nanotrubičky, nanovlákná a nebo vlastní nanočástice. Druhou skupinu představují nanomateriály, jejichž základ představuje minerál (kovy a jejich oxidy). Takovéto nanočástice lze dále rozdělit na redoxně aktivní a inertní. Třetí skupinou jsou tzv. hybridní nebo binární nanočástice, které jsou tvořeny dvěma a více různými sloučeninami nebo prvky.<sup>3</sup>

Jedinečné vlastnosti nanomateriálů mohou přinést velký pokrok ve vývoji nových technologií. Významné je také potenciální uplatnění v regenerativní medicíně, což zahrnuje vývoj nových nosičů pro léčiva, léčbu rakoviny, tkáňové inženýrství a buněčnou terapii, ale také diagnostiku.<sup>4</sup> Na druhou stranu existuje celá řada studií popisujících možný negativní dopad přítomnosti nanomateriálů na okolní prostředí. Jejich aplikace proto může představovat potenciální riziko nejen pro buňky a buněčné organismy, ale také pro lidské zdraví.

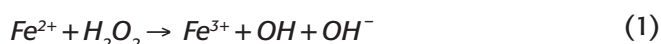
## Toxicita nanomateriálů – mechanismy

Nanočástice díky své velikosti mohou interagovat a snadno pronikat do biologických systémů. Biologická aktivita nanočástic závisí na několika různých parametrech, vedle velikosti je to také tvar, stupeň krystalinity, chemické složení a povrchové vlastnosti (specifický povrch, porosita, náboj a povrchová modifikace). Značná toxicita nanočástic je limitujícím faktorem omezujícím jejich širší aplikaci v praxi. Avšak mechanismy, kterými různé nanočástice ovlivňují životaschopnost buněk, nebyly zatím zcela detailně objasněny a jsou předmětem současného výzkumu.<sup>5</sup>

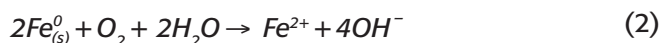
## Oxidativní stress

Toxicita většiny známých nanomateriálů je často dáвана do souvislosti s jejich schopností indukovat produkci velkého množství reaktivních forem kyslíku (ROS) s následným vznikem oxidativního stresu. Vysoké koncentrace ROS způsobují v buňce peroxidace lipidů, oxidace proteinů, dále indukují vznik mutací a zlomů DNA. Poškození intoxikované buňky mohou být tak rozsáhlá, že často dochází k apoptose. Nejčastěji je produkce ROS spojována s vystavením buněčného

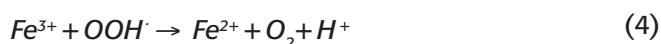
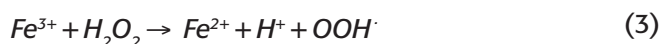
organismu účinkům nanočástic nulmocného nanoželeza (nZVI) a s mechanismem Fentonovy reakce. Fentonova reakce byla popsána již koncem 19. století britským vědcem H. J. H. Fentonem (rovnice 1).<sup>6</sup>



nZVI v přítomnosti kyslíku, který může být rozpuštěný ve vodném prostředí nebo za anoxických podmínek přímo reakcí s vodou, oxidují na železnaté ionty (rovnice 2).<sup>6</sup>



$Fe^{2+}$  následně vstupují do výše uvedené Fentonovy reakce probíhající v cytosolu (rovnice 1). Produkty této reakce jsou  $Fe^{3+}$ , hydroxylové anionty a radikály. Především vysoce reaktivní hydroxylové radikály jsou zodpovědné za poškození biomolekul.  $Fe^{3+}$  mohou následně reagovat s peroxidem vodíku nebo hydroperoxidovým radikálem, čímž dochází k regeneraci  $Fe^{2+}$  (rovnice 3 a 4), které opět mohou vstoupit do Fentonovy reakce.<sup>7</sup> Mechanismem Fentonovy reakce mohou být rovněž oxidovány  $Fe^{2+}$  vznikající oxidací nZVI extracelulárně. Tyto ionty mohou do cytosolu pronikat prostřednictvím aktivního transportu nebo samovolně již poškozenou buněčnou membránou.<sup>6</sup>



Oxidativní stress může být také indukován přítomností nanočástic jiných přechodných kovů, jako jsou například oxidy Ag, Si, Ti, Zr, Ce nebo Hf.<sup>8</sup> Kovové ionty uvolněné z příslušných nanomateriálů (př.  $Cu^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cr^{5+}$  nebo  $Ni^{2+}$ ) jsou mechanismem analogickým Fentonovy reakci oxidovány za produkce ROS.<sup>9</sup> V této souvislosti je nutné zmínit jeden z klíčových faktorů hrající důležitou roli v mechanismu toxického působení nanočástic a ovlivňující cytotoxicitu nanomateriálů. Jedná se o rozpustnost nanočástic v prostředí, tedy schopnost uvolnění kovových iontů. Brunner a kol. ve své práci uvádějí, že toxicita rozpustných nanočástic oxidů kovů byla mnohem vyšší, než je tomu v opačném případě.<sup>10</sup> Například nanočástice ZnO nebo FeO vykazují vyšší rozpustnost a tudíž vyšší akutní toxicitu než nanočástice s extrémně nízkou rozpustností, jako jsou  $CeO_2$  a  $TiO_2$ . Uvolňování iontů z nanočástic pravděpodobně souvisí s jejich poměrně velkým měrným povrchem, dále závisí na teplotě a pH prostředí. Snížením rozpustnosti nanočástic oxidů kovů by mohlo poskytnout možné řešení, jak snížit jejich toxicitu.<sup>11, 12</sup>

Ne všechny nanočástice jsou vzhledem ke své elektronové konfiguraci nebo povrchovým vlastnostem schopné spontánní generace ROS. Ke vzniku oxidativního stresu však dochází také v důsledku schopnosti jejich interakce se strukturálními komponenty buněk. Je pozoruhodné, že některé nanočástice dokáží cíleně poškozovat různými mechanismy mitochondrie. Narušením elektronového toku vnitřní membránou, disipací membránového potenciálu či depolarizací membrány dochází k produkci  $O_2^-$  a uvolnění pro-apoptických faktorů.<sup>13</sup>

### Interakce nanočástic s buňkou

Produkce ROS neprobíhá pouze v cytosolu. V důsledku blízkého kontaktu nanočástic s buňkami a jejich adsorpci na buněčný povrch dochází k poškození membrány, kterou mohou snadněji pronikat další nanočástice do cytosolu. Buněčná membrána je tvořená převážně lipidová dvouvrstvou, která je atakována vznikajícími ROS. Po interakci nenasycených lipidových řetězců s hydroxylovými radikály dochází k odštěpení atomu vodíku za vzniku radikálové formy příslušné mastné kyseliny. Tímto je iniciován řetězový sled radikálových reakcí dalších lipidů. Tento jev vede k narušení permeability buněčné membrány, ztrátě její integrity a při rozsáhlejších poškozeních k buněčné smrti. Poškozující efekt vyvolávají rovněž produkty peroxidace lipidů rozpustné ve vodě (např. aldehydy), které mohou difundovat z membrány do cytosolu a dalších buněčných kompartmentů. Jejich přítomnost v buňce může vyvolávat agregaci proteinů a inhibiči funkce řady enzymů.<sup>6</sup> Vzhledem k této skutečnosti, je pravděpodobné, že vzájemné fyzické interakce nanočástice-buňka, představují v mechanismu toxického působení klíčový krok. V oblastech aplikací, kde je toxicita nanočástic nežádoucí (př. aplikace nZVI v remediacích), jsou studovány protektivní účinky huminových látek. Huminové látky mají schopnost vázat se na povrch buněk i nanočástic a na základě mechanismu elektrostérické repulze snížit četnost těchto interakcí.<sup>14</sup>

Skutečnost, že odlišné druhy mikroorganismů reagují na přítomnost stejného typu a koncentrace nanočástic odlišně, dokládá, že míra toxicity závisí také na typu mikroorganismu, respektive exponované buňky. Kasemets a kol. studovali vliv nanočástic ZnO a CuO na kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinka prokázala určitou rezistenci vůči účinkům těchto nanočástic na rozdíl od jiných jednobuněčných organismů (např. bakterie *Staphylococcus aureus* nebo řasa *Pseudokirchneriella subcapitata*). Podobný jev byl pozorován také u gram-pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* po expozici nZVI. Jistá odolnost některých mikroorganismů vůči účinkům nanočástic je pravděpodobně zapříčiněna rigidnější buněčnou stěnou, která do jisté míry znemožňuje internalizaci nanočástic do buňky.<sup>14, 15</sup> Přesto však v důsledku působení uvolněných iontů a následnému vzniku ROS v blízkosti buněčného povrchu po čase dochází k poškození buněčné stěny a vniknutí nanočástic do buňky.<sup>15</sup>

Protisté a živočichové mají na rozdíl od kvasinek a bakterií vyvinutý systém umožňující internalizaci částic mikro- i nano-rozměrů. V případě savčích buněk byl prokázán příjem nanočástic pomocí různých procesů včetně fagocytózy a endocytózy.<sup>15</sup>

### Nanočástice z chemicky inertního materiálu

Za chemicky inertní materiály jsou označovány ušlechtilé kovy, mezi které patří například zlato, stříbro nebo platina. V současné době významné skupiny nanočástic těchto materiálů představují nanočástice na bázi zlata a stříbra. Přestože, jsou tyto materiály obecně považovány za netoxické, jejich nanočástice mohou mít rovněž negativní dopad na životaschopnost buněk a životní prostředí.

### Nanočástice stříbra

Nanočástice stříbra se ukázaly být velmi účinnými antimikrobiálními látkami nejen proti bakteriím, ale také virům a eukaryotům. Rizikem při jejich použití jako dezinficiencium je prokázaná toxicita vůči savčím buňkám.<sup>16</sup> Rovněž čisté stříbro není biologicky dobře využitelné a ve větších množstvích může vyvolat omezení zbarvením argyria (otrava stříbrem projevující se šedým zbarvením pokožky, očního bělma a poškozením jater).<sup>17</sup>

Mechanismus působení stříbra je založen na interakcích s thiolovými skupinami enzymů dýchacího řetězce bakteriální buňky. Stříbro se váže na bakteriální buněčnou stěnu a membránu, a tak dochází k inhibici respirace. Podobně působí také nanočástice, které mají navíc díky své velikosti schopnost pronikat do cytosolu, kde interagují s fosfátovými skupinami makromolekul (př. DNA), čímž dochází také k inhibici buněčného dělení. Dále mají nanočástice stříbra schopnost uvolňovat stříbrné ionty do prostředí, což umocňuje jejich baktericidní aktivitu.<sup>16</sup>

V současné době jsou nanočástice stříbra studovány pro jejich potencionální využití v medicíně jako antimikrobiální látky, které jsou účinné i vůči patogenům rezistentním k antibiotikům.<sup>16</sup>

### Nanočástice zlata

Nanočástice zlata (AuNp) byly pro jejich optické vlastnosti technologicky využívány již od starověku. Tzv. rozpustné zlato bylo používáno především k barvení skla, ale také k léčení některých chorob (př. syfilis). Na konci 19. století Michael Faraday získal redukci vodného roztoku tetrachlorzlatitanu první stabilní vodnou disperzi nanočástic zlata. V současné době má vývoj a výzkum AuNp význam především z hlediska potenciální aplikace v medicíně. Nanočástice zlata jsou studovány pro možné uplatnění jako biosenzory či bioznačky, při fototerapeutické terapii, jako cílené nosiče pro léčiva nebo nosiče pro genové terapie. Jsou snadno syntetizovatelné, jejich koloidní roztoky jsou poměrně stabilní, nepodléhají korozi, snadno interagují s biologickými molekulami a díky jejich optickým vlastnostem jsou dobře vizualizovatelné. Z hlediska potenciálních medicínských aplikací je důležité, aby použité materiály byly biokompatibilní a netoxické.<sup>18</sup>

Přestože byly z počátku AuNp považovány za bezpečné nanomateriály, bylo zjištěno, že nulmocné nanočástice zlata a jeho oxidy mohou mít negativní dopad na životaschopnost exponovaných buněk. První studie, které byly provedené na laboratorních zvířatech, popisují, že po injekci AuNp do organismu docházelo k vyvolání zánětlivých reakcí, akumulaci nanočástic v retikulárních buňkách lymfatické tkáně a aktivaci jak buněčné tak humorální imunity.<sup>19</sup> Existují však také studie, které toxické účinky AuNp nepotvrzují. Například Connor a kol., kteří sledovali vliv kulových, 18 nm velkých částic, povrchově modifikovaných (biotinem, citrátem), toxicitu AuNp vůči studovaným lidským buňkám neprokázali.<sup>20</sup>

Také v případě AuNp míra toxicity závisí na velikosti, tvaru, funkcionalizaci povrchu a typu exponované buňky. Obecně se uvádí, že vyšší toxicitu vykazují AuNp

sférické a menších rozměrů, protože jsou snadněji přijímány buňkou.<sup>21</sup> Pan a kol. studovali účinky 1,4 nm velkých AuNp, povrchově modifikovaných trifenylofosfinem. Bylo zjištěno, že vyvolávají u exponovaných buněk vznik oxidativního stresu, čímž nepřímo způsobují nekrózu a poškození mitochondrií. Stejně modifikované nanočástice o velikosti 15 nm již žádnou cytotoxicitu nevykazovaly.<sup>22</sup> Rovněž bylo zjištěno, že AuNp o velikosti 1 – 2 nm se ochotně ireverzibilně váží na klíčové biopolymery (například vazba 1,4 nm AuNp na DNA), čímž dochází k inhibici jejich funkce.<sup>19</sup> Avšak autoři Brayner a kol. ve své studii uvádějí, že jimi testované povrchově modifikované sférické AuNp o rozměrech 3,5 nm nevykazovaly žádný negativní účinek. Buňkami byly endocytovány, ale nepůsobily letálně.<sup>23</sup> V tomto případě tedy AuNp o takto malé velikosti životaschopnost buněk neovlivnily. Zdá se, že modifikace povrchu AuNp má klíčový význam ovlivňující jeho chování vůči biologickému činiteli, a to více, než je tomu v případě jiných typů nanočástic.

Vstup AuNp do buňky významně ovlivňuje povrchový náboj nanočástice. Kationické a anionické AuNp jsou buňkou internalizovány odlišnými mechanismy. Zatímco kationické nanočástice jsou záporně nabitým buněčným povrchem přitahovány, anionické nanočástice musejí překonat energetickou bariéru, aby se mohly k membráně přiblížit. Díky tomu kladně nabitě nanočástice nepodléhají endocytóze a mohou přímo pronikat lipidickou dvojrůstvou. Při prostupu vznikají v membráně hydrofilní póry a dochází k značnému poškození lipidické složky v jejich okolí. Zatímco endocytóza záporně nabitých nanočástic probíhá na povrchu a jsou tak během prostupu izolované od okolního prostředí v endozomech. Goodman a kol. zjistili, že po-

kud byl povrch AuNp modifikován kationickou skupinou, vykazovaly tyto nanočástice v průměru dokonce dvacetí sedmi násobně vyšší toxicitu.<sup>24</sup>

Literatura také uvádí, že přítomnost AuNp může v některých případech indukovat vznik oxidativního stresu. Jai a kol. studovali přítomnost AuNp v krevním séru. Bylo zjištěno, že nanočástice mohou katalyzovat produkci NO, které následně interagují se superoxidy za vzniku nebezpečných peroxynitrátů (ONOO<sup>-</sup>) a dochází ke vzniku oxidativního stresu. Tato skutečnost může komplikovat použití AuNp v humánní medicíně.<sup>25</sup> Vznik oxidativního stresu v důsledku expozice buněk AuNp popsali také Li a kol. Účinky AuNp sledovali *in vitro* na buňkách lidské zárodečné plicní tkáně. V přítomnosti koncentrace nanočástic 1 nmol/l byl po 72 h zaznamenán výrazný pokles počtu životaschopných buněk a dále bylo zjištěno, že docházelo k poškození DNA v důsledku vzniku vyšší koncentrace ROS v cytosolu.<sup>26</sup>

## Závěr

V současné době jsme schopni připravit nepřeborné množství různých typů nanomateriálů odlišujících se svými vlastnostmi. Vzhledem k jejich potenciálním možným aplikacím je důležité, aby se výzkumné úsilí v oblasti nanotechnologie zaměřilo především na problematiku nanotoxikologie a objasnění biologických účinků nanočástic na živé organismy a životní prostředí. Porozumění mechanismům toxického působení nanomateriálů by usnadnilo vývoj bezpečnějších preparátů, ale také řešení problematiky protekce exponovaných buněk vůči jejich toxickým účinkům.

## Literatura:

- Whitesides GM: *Small*. 1, 172 (2005).
- Klabunde JK (2002): Introduction to nanotechnology, In: *Nanoscale Materials in chemistry*. (Klabunde J. K. ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1-13.
- Stone V, Nowack B, et al.: *Sci. Total Environ.* 408, 1745 (2010).
- Kubínová S, Syková E: *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* 19, 144 (2010).
- Nel A, Xia T, et al.: *Science* 311, 622 (2006).
- Ševců A, El-Temsah YS, et al.: *Microbes Environ.* 26, 271 (2011).
- Prousek J: *Pure Appl. Chem.* 79, 2325 (2007).
- García-Saucedo C, Field JA, et al.: *J. Hazard Mater.* 192, 1572 (2011).
- Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford; New York 2007.
- Brunner TJ, Wick P, et al.: *Environ. Sci. Technol.* 40, 4374 (2006).
- Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, et al.: *Waste Manag.* 29, 2587 (2009).
- Chang Y-N, Zhang M, et al.: *Materials* 5, 2850 (2012).
- Sharifi S, Behzadi S, et al.: *Chem. Soc. Rev.* 41, 2323 (2012).
- Chen J, Xiu Z, et al.: *Water Res.* 45, (2011).
- Kasemets K, Ivask A, et al.: *Toxicol In Vitro* 23, 1116 (2009).
- Rai M, Yadav A, et al.: *Biotechnol Adv.* 27, 76 (2009).
- Park SW, Shin HT, et al.: *Ann. Dermatol.* 25, 111 (2013).
- Sperling RA, Rivera GP, et al.: *Chem. Soc. Rev.* 37, 1896 (2008).
- Khlebtsov N, Dykman L: *Chem. Soc. Rev.* 40, 1647 (2011).
- Connor EE, Mwamuka J, et al.: *Small*. 1, 325 (2005).
- Murphy CJ, Gole AM, et al.: *Acc Chem Res.* 41, 1721 (2008).
- Pan Y, Leifert A, et al.: *Small*. 5, (2009).
- Brayner R: *Nano. Today*. 3, 48 (2008).
- Goodman CM, McCusker CD, et al.: *Bioconjugate Chem.* 15, 897 (2004).
- Jia HY, Liu H, et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 131, 10 (2009).
- Li JJ, Zou L, et al.: *Adv. Mater.* 20, 138 (2008).



## Souhrn

### Pádrová K.: Nanočástice a jejich vliv na buněčný systém

Nanotechnologie jsou významným rozvíjejícím se vědním oborem, který by mohl přispět k rozvoji v řadě oblastí. V současné době však zatím nebyly zcela objasněny mechanismy, zahrnující jejich toxicitu, kterými nanočástice působí na biologické systémy. Tato skutečnost omezuje rozšíření možných aplikací nanočástic v praxi.

**Klíčová slova:** nanotechnologie, toxicita, nanočástice železa nulové valence, nanočástice stříbra, nanočástice zlata

## Summary

### Pádrová K.: Nanoparticles and their effect on cell system

Nanotechnology is an important developing scientific branch which could contribute to progress in many areas. However, mechanisms of nanoparticles impact on biological systems, including their toxicity, have not been elucidated. This fact restricts nanoparticles extension of application in practice.

**Keywords:** Nanotechnology, toxicity, nano-scale zerovalent iron, silver nanoparticles, gold nanoparticles

# GALAKTOOLIGOSACHARIDY: ŠTRUKTÚRA, VLASTNOSTI A MOŽNOSTI PŘÍPRAVY

Helena Hronská, Monika Vidová, Silvia Tokošová, Michal Rosenberg

Ústav biotechnológie a potravinárskej technológie, FCHPT STU Bratislava, helena.hronska@stuba.sk

## Úvod

Galaktooligosacharidy predstavujú skupinu veľmi významných oligosacharidov, ktoré patria medzi prebiotiká. Prebiotikami označujeme nestráviteľné časti potravín sacharidickej povahy prechádzajúce tráviacim traktom bez toho, aby boli utilizované alebo degradované. Selektívne stimulujú rast prospešných črevných baktérií a bránia rozmnožovaniu patogénnych enterokokov, enterobaktérií či klostridií. V súčasnosti sa využívajú ako funkčné zložky potravín vzhľadom na ich nízky kalorický obsah, prebiotickú aktivitu a minimálny negatívny vplyv na zubnú sklovinu. Najrozšírenejší spôsob prípravy galaktooligosacharidov je enzýmovou syntézou s využitím  $\beta$ -galaktozidáz pričom ako substrát je využívaná laktóza.

## Štruktúra a fyzikálno-chemické vlastnosti galaktooligosacharidov

Galaktooligosacharidy (GOS) sú krátkoreťazcové sacharidy skladajúce sa z 2 – 20 molekúl galaktózy

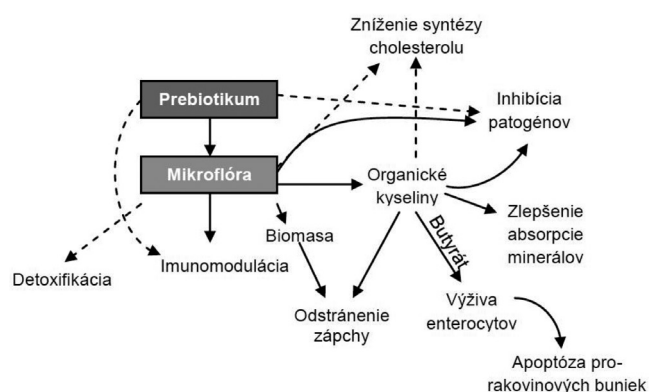
a 1 molekuly glukózy. Všeobecný vzorec GOS je D-glukóza- $[\beta$ -D-galaktóza] $_n$ , kde  $n$  vyjadruje počet galaktózových jednotiek a glukóza je vždy terminálnou sacharidickou jednotkou. GOS majú synonymické označenie oligogalaktóza, oligogalaktozylaktóza, oligolaktóza alebo transgalaktooligosacharidy (TOS). Galaktooligosacharidy sa prirodzene vyskytujú v obilninách, špargli, cesnaku, cibuli, póre ale aj v banánoch či hrozienkach<sup>1</sup>. Sú stabilné aj pri vyšších teplotách, napr. po 10 minútach zahriatia pri 160 °C a neutrálnej hodnote pH, pri 120 °C a pH 3 a pri teplote 100 °C a pH 2 (za týchto podmienok je viac ako polovica sacharózy degradovaná). Stabilita galaktooligosacharidov je vyššia ako stabilita fruktooligosacharidov. Vďaka  $\beta$ -konfigurácii sú galaktooligosacharidy odolné voči hydrolýze ľudských slín a žalúdočných štiav, pretože enzýmy v nich selektívne štiepia  $\beta$ -väzby<sup>2</sup>. Sladivosť, rozpustnosť, schopnosť tvorby kryštálov, osmolalita a reaktivita (Maillardove reakcie) týchto zlúčenín sa znižuje s rastúcim počtom molekúl v reťazci, na rozdiel od ich viskozity. Všeobecné fyzikálnochemické vlastnosti GOS sú zhrnuté v Tab. I.

Tab. I: Základné fyzikálno-chemické vlastnosti GOS<sup>3</sup>.

Rozpustnosť	vo vode rozpustné, okolo 80 % (w/w)
Vzhľad	priesvitné/bezfarebné
Viskozita	podobná kukuričnému sirupu s vysokým obsahom fruktózy
Tepelná stabilita	pri 160 °C (10 min, pH 7), 100 °C (10 min, pH 2), 37 °C (mesiace, pH 2)
Bod mrazu	znižujú bod mrazu potravín
Bod zmáčania	majú schopnosť udržiavať vysokú vlhkosť, čo bráni ich vysušovaniu
Sladivosť	0,3- až 0,6-krát ako sacharóza
Kalorická hodnota	1,7 kcal.g <sup>-1</sup>

## Prebiotické vlastnosti GOS

Na prvý pohľad je slovo prebiotikum veľmi podobné slovu probiotikum. Mohlo by sa tak zdať, že ide o synonymum. Každé však znamená niečo iné. Probiotiká sú živé nepatogénne mikroorganizmy osídľujúce tráviaci systém ľudí a zvierat, ktoré pozitívne ovplyvňujú zdravie a fyziológiu hostiteľa. Prebiotikami označujeme nestráviteľné časti potravy sacharidickej povahy správajúce sa ako nerozpustná vláknina. Prechádzajú bez zmeny až do hrubého čreva kde sú utilizované črevnou mikrofórou. Tým stimulujú rast a aktivitu prospešných črevných baktérií a potláčajú aktivitu patogénnych mikroorganizmov. Najpoužívanejšími prebiotikami sú komerčne vyrábané galaktooligosacharidy. Podporujú metabolické aktivity baktérií, výsledkom ktorých je syntéza prospešných látok a enzýmov. S dozrievaním črevného systému paralelne dozrieva aj imunitný systém a spolu tvoria jeden úzko spolupracujúci komplex. Až 80 % imunitného systému je prepojeného na intestinálny trakt. Okrem toho boli dokázané pozitívne účinky pro- a prebiotík na redukciu sérového cholesterolu, syntézu biologicky aktívnych látok (vitamíny, organické kyseliny, a pod.), potlačenie laktózovej intolerancie ale aj kardiovaskulárny systém<sup>1</sup>. Na Obr. 1 je znázornený predpokladaný mechanizmus účinku prebiotík<sup>4</sup>.



**Obr. 1:** Mechanizmy účinku prebiotík. Plné čiary ukazujú relatívne dobre preskúmané mechanizmy účinku; prerušované čiary označujú menej preskúmané, alebo skôr predpokladané účinky prebiotík<sup>4</sup>.

## Aplikácia a trh GOS

Podobne ako aj ostatné nestráviteľné oligosacharidy, GOS majú príjemnú chuť a môžu zlepšiť štruktúru a plnosť chuti potravín, pričom majú podobné vlastnosti ako sacharóza. GOS sú rezistentné voči slinnej amyláze, nie sú utilizované orálnou mikrofórou a môžu byť teda využívané ako nekariogénne náhrady sladidiel. Galaktooligosacharidy sa považujú vo všeobecnosti za bezpečné látky, pretože sa prirodzene vyskytujú v mlieku. Vďaka ich nestráviteľnosti nemajú žiadny vplyv na hladinu glukózy v krvi.

GOS sa využívajú predovšetkým ako prídavné látky v potravinárskom priemysle. Vďaka ich stabilite môžu byť GOS pridávané do širokej škály jedál. Chlieb, ako aj väčšina iného pečiva, je vhodným kandidátom pre aplikáciu GOS, pretože počas kysnutia a pečenia

nie sú galaktooligosacharidy utilizované ani štiepené. Navyše, vďaka ich vlastnosti zachovania vysokej vlhkosti bránia nadmernému vysušeniu chleba a zlepšuje sa aj jeho celkový chuťový profil. V poslednom období sa GOS objavujú ako zložky nápojov (ovocné džúsy a iné kyslé nápoje), náhradnej stravy, fermentovaných mliek a cukrárenských výrobkov. V sladených nápojoch vystupujú ako sirupová zložka (vďaka svojej sladivosti), pričom sú odolné voči kyslému prostrediu, ktoré vytvárajú obvykle prítomné kyseliny (kyselina askorbová, alebo citrónová). Veľkou cieľovou skupinou pre odbyt GOS sú nesporne dojčenské mlieka a široká paleta detských pokrmov. Doplnené detské jedlá obsahujú 6 až 7,2 g/l GOS spolu s 0,6 až 0,8 FOS. Špecializované potraviny pre seniorov a nemocničných pacientov sú tiež sľubnou oblasťou pre aplikácie GOS<sup>1,3</sup>.

Okrem potravinárskeho odvetvia nachádzajú GOS využitie v kozmetickom a farmaceutickom priemysle vďaka svojim fyziologickým vlastnostiam. V skutočnosti, prebiotické oligosacharidy môžu selektívne stimulovať „prospešné“ baktérie nachádzajúce sa na ľudskej koži a pre tieto účely boli už vyvinuté aj kozmetické prípravky. Vo farmaceutickom priemysle sú GOS zložkami niektorých liečiv ako aj alternatívou pri antibiotickej liečbe. Tráviaci trakt jedincov užívajúcich s antibiotikami súčasne probiotiká sa rekolonizuje a obnovuje rýchlejšie. Aby probiotické kultúry mohli v hrubom čreve prežiť, potrebujú potravu. Tou sú práve prebiotiká. Optimálnym sa v poslednom období ukazuje užívanie synbiotík, teda preparátov, ktoré sú kombináciou pro- a prebiotík<sup>1</sup>.

Nestráviteľné oligosacharidy sa pridávajú aj do potravy pre dobytok, domáce zvieratá, hydinu, ošípané a vo vodnom hospodárstve. Dôvody sú podobné ako u ľudí: zlepšenie zdravotného stavu a rastu zvierat, zlepšenie črevnej mikrofóry, minimalizácia používania antibiotík, zabránenie predčasnému úmrtiu a redukcia fekálneho zápachu. Potrava prežuvavcov s obsahom GOS pozitívne vplyva aj na potlačenie produkcie metánu<sup>3</sup>.

Ako ukazujú štúdie svetových analytických spoločností (Frost&Sullivan, GIA) svetový trh s prebiotikami kontinuálne rastie už niekoľko rokov. Súvisí to najmä z čoraz väčším záujmom obyvateľstva vyspelých krajín o zdravý životný štýl a zdravé potraviny. Obe štúdie predpovedajú do roku 2015 rast trhu s prebiotikami, pričom americký trh s prebiotikami presiahne z hľadiska predaja 220 miliónov amerických dolárov, zatiaľ čo európsky predaj by mal v rovnakom čase dosiahnuť až 1,08 miliardy amerických dolárov<sup>6</sup>. Firmy neustále prichádzajú s novými výrobkami na trh s funkčnými potravinami v podobe zdravých nápojov, biopotravín, potravín pre deti a zvieratá. V Európe neustále narastá počet producentov, ktorí sa zameriavajú na nové spôsoby aplikácií prebiotík najmä v oblasti mäsa a ľahkých jedál. Zatiaľ čo fruktooligosacharidy a inulín sú na trhoch už dobre známe prebiotiká, ostatné druhy prebiotík ešte len prichádzajú „na výslnie“. Galaktooligosacharidy ako prebiotiká predstavujú rýchlo sa rozvíjajúci segment európskeho potravinového a nápojového trhu. Výrobou a aplikáciou GOS sa z globálneho hľadiska venuje malé množstvo firiem a iba nie-

ktoré z nich používajú GOS pre svoje vlastné produkty. Na európskom trhu ma dominantné postavenie holandská spoločnosť Friesland Food Domo s takmer 87% podielom na trhu. Medzi významných svetových producentov GOS patria aj ďalšie firmy ako je Yakult Honsha (Japonsko) alebo GTC Nutrition (USA). Priemerná cena GOS na trhu sa pohybuje v intervale \$5,3 – \$5,8 za kilogram<sup>7</sup>.

## Príprava GOS

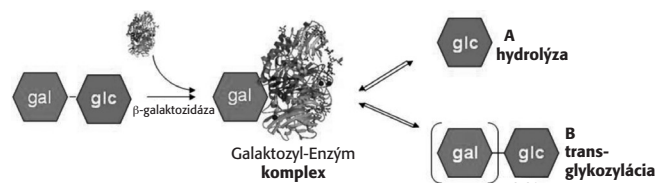
Príprava galaktooligosacharidov môže prebiehať pomocou chemickej syntézy alebo enzymaticky s využitím  $\beta$ -galaktozidáz. Pri chemickej syntéze predstavuje vytvorenie špecifických glykozidových väzieb náročnú výzvu pre odborníkov a to z niekoľkých dôvodov. Veľmi dôležitý je výber ochranných skupín, vhodné donory a akceptory skupín, katalyzátory a reakčné podmienky pre dosiahnutie správnej stereochemie želaného výsledného produktu. Pri enzymových reakciách sú produkované najmä disacharidy a v menšom množstve tri- a vyššie oligosacharidy. Priebeh enzymových reakcií závisí od rôznych faktorov napríklad od koncentrácie substrátu (čím vyššia koncentrácia laktózy, tým vyššie množstvo GOS), ale aj od pôvodu a koncentrácie enzýmu. Enzýmy pochádzajúce z rôznych zdrojov syntetizujú rôzne typy a množstvo oligosacharidov. Pre koncentráciu  $\beta$ -galaktozidáz platí: čím nižšia koncentrácia enzýmu, tým vyššie množstvo GOS, pričom pri vysokej koncentrácii enzýmu bola u niektorých enzymových preparátov pozorovaná najmä tvorba disacharidov<sup>8</sup>.

## Biotechnologická príprava

V súčasnosti sú v priemyselnom meradle pri príprave galaktooligosacharidov preferované najmä enzýmy. Enzymovo katalyzovaná príprava GOS využíva glykozyltransferázy (EC 2.4.x.x) alebo glykozylhydrolázy (EC 3.2.1.x) izolované z rôznych mikrobiálnych zdrojov. Sú to enzýmy zodpovedné za prenos glykozylovej časti z donoru sacharidu na akceptor. Glykozyltransferázy využívajú sacharidový donor obsahujúci nukleozidfosfát alebo fosfolipid ako zvyškovú skupinu. Aj keď sú tieto enzýmy vysoko regio-selektívne, stereo-selektívne a účinné, nepoužívajú sa v priemyselnej produkcii GOS kvôli ich nedostupnosti, vysokej cene ich komerčných enzymových preparátov a potrebe špecifických sacharidových nukleotidov ako substrátov. V priemyselnej praxi sa preto na produkciu GOS využívajú glykozylhydrolázy, pričom spomínané nevýhody transferáz odpadajú. Tieto enzýmy sú dostupnejšie v porovnaní s glykozyltransferázami, ale na druhej strane sú všeobecne menej stereoselektívne.

Konverzia laktózy na GOS pomocou  $\beta$ -galaktozidáz je kineticky kontrolovaná reakcia, prebiehajúca prostredníctvom súťaženia medzi hydrolýzou a transglykozyláciou. Inak povedané, počas tejto enzymovej reakcie termodynamicky podporovaná hydrolýza laktózy – tvorba D-galaktózy a D-glukózy – súťaží s transferázovou aktivitou, pri ktorej dochádza k tvorbe komplexnej zmesi galaktooligosacharidov s rozličnou štruktúrou (Obr. 2). Preto je dôležitá znalosť časového priebehu konverzie

laktózy pre určenie bodu maximálneho výťažku želaného produktu<sup>3</sup>.



**Obr. 2:** Reakčná schéma pre enzymovú aktivitu  $\beta$ -galaktozidázy: A – hydrolýza, B-transgalaktozylácia.

Transglykozylácia predstavuje medzimolekulové aj vnútramolekulové reakcie. Vnútramolekulový alebo riadený transfer galaktozylu na D-glukózu dáva regio-izoméry z laktózy. Medzimolekulová alebo neriadená transgalaktozylácia je cesta, pomocou ktorej sú z laktózy pripravené di-, tri-, tetra- sacharidy a prípadne dlhšie GOS. Alternatívnou metódou k transglykozylácii z disacharidu je produkcia GOS pomocou reverznej hydrolýzy. Pri reverznej hydrolýze dochádza k syntéze GOS z monosacharidov, reakcia prebieha do ustálenia rovnováhy. Rovnovážne výťažky sú oveľa nižšie, hlavne tvorba disacharidov (10 – 25% w/w) a niekoľko percent trisacharidov (alebo vyšších oligosacharidov). Avšak, z tejto reakcie nevzniká žiadny vedľajší produkt hydrolýzy, a keď sa kombinuje s efektívnym procesom separácie tak je možné dosiahnuť výťažky okolo 100%<sup>9</sup>.

Spektrum produktov získaných počas štiepenia laktózy – spojenie galaktózových jednotiek a účinnosť transglykozylácie, závisí od zdroja enzýmu a fyzikálno-chemických podmienok v reakčnom prostredí. Interakcie medzi galaktozyl-akceptorom a aktívnym miestom enzýmu pravdepodobne hrajú významnú úlohu pri formovaní intermolekulových produktov. Inými slovami, schopnosť enzýmu pojať galaktozyl-akceptor v susedstve aktívneho miesta počas katalytického momentu a priestorová orientácia galaktozyl-akceptora sú pravdepodobne kľúčovými faktormi v efektívnosti transglykozylácie a v pozícii nových glykozidických väzieb<sup>3</sup>.

Ako už bolo v úvode napísané, na produkciu GOS z laktózy je možné využiť mikroorganizmy ako aj enzýmy z nich izolované. Keďže ide o intracelulárny enzým, proces izolácie  $\beta$ -galaktozidázy znamená ďalšie náklady a časové nároky na celú technológiu výroby GOS. Navyše pri hydrolýze laktózy a tvorbe GOS dochádza nevyhnutne k hromadeniu glukózy a galaktózy ako vedľajších produktov enzymovej reakcie. Prítomnosť týchto monosacharidov je nežiadúca, pretože cieľom je produkovať tri- a vyššie oligosacharidy. Biotechnologická príprava GOS však na rozdiel od chemickej syntézy nevyžaduje potrebu ochrany chemických skupín, prebieha pri miernejších podmienkach a nezaťažuje životné prostredie. V dôsledku toho je transglykozylácia laktózy pomocou  $\beta$ -galaktozidázy častejšie využívaná pre syntézu GOS<sup>10</sup>. Reakčné podmienky je potrebné udržať tak, aby transgalaktozyláčna aktivita prevyšovala hydrolytickú. Optimálne hodnoty pH a teploty procesu prípravy GOS závisia od mikroorganizmu, z ktorého bol enzým izolovaný. Napr.  $\beta$ -galaktozidázy z vláknitých húb majú optimálnu hodnotu pH 2,5 – 4,5, zatiaľ čo z kvasiniek



alebo baktérií je to 6,0 – 7,0. Čo sa týka teploty, optimálne teploty popisované v literatúre sú 50 a 65°C, avšak závisí to od zdroja enzýmu<sup>11</sup>.

Svetoví producenti GOS ako Friesland Foods Domo (Holandsko) a Yakult Honsha Co. (Japonsko) používajú enzýmy izolované z *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae* a *Streptococcus thermophilus*. Produkcia a spektrum oligosacharidov závisí samozrejme tiež od zdroja enzýmu. Vzhľadom na vysokú cenu  $\beta$ -galaktozidáz sa opakované využitie buniek alebo izolovaných enzýmov dostáva čoraz častejšie do popredia výskumu. V literatúre je popísaný napr. proces využitia celých bakteriálnych buniek *Bifidobacterium bifidum*, u ktorých je enzým viazaný v bunkách a pred samotným použitím buniek sa tieto iba permeabilizujú použitím rozpúšťadla, aby sa zrýchlila difúzia laktózy. Bunky je možné niekoľkokrát opakovaně využiť na produkciu GOS. Po 12-tich opakovaných použitiach klesne konverzia laktózy iba o 10 %<sup>12</sup>.

Perspektívnym modelom pre priemyselnú produkciu GOS sa ukazuje byť využitie imobilizovanej  $\beta$ -galaktozidázy. Opakované využitie enzýmov by mohlo sčasti kompenzovať firmám finančnú stratu, ktorá súvisí s izoláciou  $\beta$ -galaktozidáz z mikroorganizmov. V literatúre je možné nájsť veľa druhov nosičov a techník imobilizácie. Je dôležité si uvedomiť, že imobilizácia  $\beta$ -galaktozidáz za účelom hydrolyzy laktózy nie je efektívna súčasne aj pre maximálnu produkciu GOS. Súvisí to s odlišnými reakčnými podmienkami pre transgalaktozyláciu, ako sú vyššie koncentrácie laktózy (30 – 40 hm.%), zvýšená reakčná teplota, nízka aktivita vody v reakčnom médiu, ale aj napr. veľkosťou molekúl produktu. Navyše, pri niektorých imobilizačných technikách môže dôjsť v priebehu imobilizácie k vysokej až úplnej strate enzýmovej aktivity  $\beta$ -galaktozidázy. Všetky tieto faktory je potrebné zohľadniť pri výbere vhodného nosiča a techniky imobilizácie. Veľmi dobré výsledky boli dosiahnuté napr. s kovalentne naviazanou  $\beta$ -galaktozidázou z *Kluyveromyces fragilis* na guľičky celulózy,  $\beta$ -galaktozidázou z *E.coli* na agarózu,  $\beta$ -galaktozidázou z *A. niger* viazanou na alginátové guľičky sieťované glutaraldehydom alebo aj adsorpciou enzýmu na keramický povrch monolitu. Vo všetkých prípadoch bola zachovaná aktivita 72 – 90 % pôvodnej enzýmovej aktivity<sup>11</sup>. Cheng a jeho kolektív dosiahol výťažky 41 % GOS z 36 % (hm.) laktózy imobilizáciou  $\beta$ -galaktozidázy do chitozánu, čo boli podobné výťažky GOS ako s voľným enzýmom (43 %) <sup>13</sup>.

## Faktory ovplyvňujúce produkciu GOS

### Substráty pre produkciu GOS

Jednou z výhod produkcie GOS je, že nevyžaduje drahú základnú surovinu. Srvátka, ktorá vzniká ako vedľajší produkt pri výrobe syrov, je bohatým zdrojom laktózy. Obsah sušiny je okolo 6,5 %, z čoho asi 4,8 % tvorí laktóza, 0,6 % proteíny, 0,15 % kyselina mliečna, 0,25 % tvoria neproteínové dusíkaté látky a 0,1 % tuk. Po zakoncentrovaní srvátky vzniká produkt bohatý na obsah laktózy. Na rozdiel od minulosti, srvátka už nie je považovaná za odpadnú látku. V dnešnej dobe ekonomické a ekologické dôvody určujú,

že srvátka by mala byť efektívnejšie využívaná. Najbežnejšou metódou získavania laktózy priamo zo srvátky alebo zo srvátkového permeátu je kryštalizácia presýteného roztoku.

### Počiatočná koncentrácia laktózy a reakčná teplota

Údaje uvádzané v publikáciách ukazujú, že maximálne výťažky GOS sú do značnej miery ovplyvnené počiatočnou koncentráciou laktózy. Optimálne koncentrácie laktózy sa pohybujú v rozmedzí 30 – 40 % (w/v). Pri koncentrácii laktózy väčšej ako 30 % sa jej vplyv na výťažky GOS výrazne znížil, aj keď u niektorých mikroorganizmov, resp. enzýmov z nich izolovaných boli popísané výnimky (*B. bifidum*<sup>14</sup> alebo niektoré rekombinantné kmene *E. coli*<sup>15</sup>).

Rozpustnosť laktózy pri laboratórnej teplote je relatívne nízka a stúpa so zvyšujúcou sa teplotou reakčnej zmesi. Niekoľko štúdií bolo zameraných na skúmanie nových zdrojov termostabilných glykozylyhydroláz. Glykozidázy termofilných mikroorganizmov *S. solfataricus*, *P. furiosus*, *Thermus sp.*, *T. caldophilus*, *C. saccharolyticus*, *T. maritima* sú príkladmi enzýmov, ktoré sú aktívne pri teplote 80°C a viac. Zdá sa, že vysoká teplota tiež podporuje transgalaktozyláciu vzhľadom k hydrolyze. Avšak, boli popísané aj opačné zistenia – vedci zistili len nepatrný alebo žiadny vzťah medzi teplotou a produkciou GOS pomocou enzýmov z *P. furiosus*, *B. circulans*, *A. oryzae*, *K. lactis* a *K. marxianus* <sup>16</sup>.

### Izolácia GOS a/alebo inhibítorov z reakčnej zmesi

„Čisteniu“ získaných zmesí GOS od mono- a disacharidov je venovaná v praxi zvýšená pozornosť a to nielen z dôvodu samotnej čistoty produktu, ale aj z aplikačných dôvodov. Komerčne dostupné prípravky galaktooligosacharidov, ktoré obsahujú značné množstvo monosacharidov a laktózu, nie sú vhodné pre ľudí s ochorením diabetes mellitus a zvlášť pre ľudí s laktózovou intoleranciou.

Ako je uvádzané v literatúre, maximálne výťažky GOS pohybujúce sa od 15 % do 77 % boli dosiahnuté keď konverzia laktózy bola medzi 45 % až 95 % v závislosti od zdroja enzýmu a podmienok produkcie<sup>3</sup>. Zmes GOS produkovaná transglykozyľáciou obsahuje teda vždy určité množstvo nezreagovanej laktózy a monosacharidy. Efektívne odstránenie týchto „nečistôt“ umožňuje komercializáciu produktov GOS s pridanou hodnotou.

Separácia monosacharidov vo veľkom meradle je zvyčajne vedená pomocou chromatografických metód – využitie ióno-výmenných živíc alebo aktívnym uhlím. Aktívne uhlie má vyššiu afinitu pre oligosacharidy v porovnaní s mono- a disacharidmi, čo je výhodnejšie v aplikácii na priemyselnej úrovni. Posledné štúdie z tejto oblasti sa venujú porovnávaniu frakčionáčnych techník pre získanie veľkého obsahu zmesi GOS. Chromatografické metódy, pri ktorých získame frakcie na základe molekulovej hmotnosti sa javia ako najvhodnejší spôsob pri získavaní frakcií s vysokou čistotou, čo umožňuje purifikáciu GOS s rôznym stupňom polymerizácie.

Skúmané sú aj iné postupy pre čistenie pripravených zmesí GOS, ako je napríklad selektívna fermentácia vykonávaná pomocou navrhnutých charakteristických mikroorganizmov. Kvasinky *S.cerevisiae* boli použité pre zlepšenie čistoty komerčnej zmesi GOS získanej použitím  $\beta$ -galaktozidázy z *B. circulans*. Týmto postupom boli úplne odstránené monosacharidy. Ten istý prístup bol aplikovaný pri purifikácii zmesi GOS pripravenej pomocou kmeňa *B.bifidum*<sup>14</sup>. Kvasinky *K. marxianus* boli použité pre purifikáciu zmesi GOS pripravenej  $\beta$ -galaktozidázou kmeňa *B.circulans*, pričom čistota GOS stúpila z 38 % na 97 % pomocou selektívnej fermentácie mono- a disacharidov (laktóza). Pre lepšiu purifikáciu bola pre selektívnu fermentáciu monosacharidov a laktózy použitá kombinácia *S.cerevisiae* a *K.lactis* pri zmesi GOS produkovanej pomocou kmeňa *P. expansum*. Celková čistota GOS stúpila z 29 % na 98 %<sup>17</sup>.

Splechna a kolektív pripravili zmes GOS s využitím rekombinantnej  $\beta$ -glykozidázy kmeňa *Sulfolobus solfataricus* (70°C, laktóza 270g/l)<sup>18</sup>. Po reakcii vznikla zmes obsahujúca 46 % monosacharidov, 13 % laktózy a 41 % GOS. Laktóza bola selektívne oxidovaná fungálnou celobiózdahydrogenázou a následne boli kyselina laktobiónová a monosacharidy odstránené iónovýmennou chromatografiou. Finálny produkt obsahoval 97 % GOS, 1,2 % laktózy a 2,1 % monosacharidov. Celkový výťažok GOS predstavoval 25 % vzhľadom na počiatočné množstvo laktózy.

Rovnaký problém sa snažili riešiť aj Cheng a kol. (2006), ktorí sa zaoberali produkciou vysokopurifikovaných zmesí GOS pomocou fermentácie s kvasinkami *Kluyveromyces marxianus*. Pre svoju štúdiu použili tri rôzne  $\beta$ -galaktozidázy pochádzajúce z kmeňov *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* a *Bacillus sp.* pre prípravu zmesi GOS z laktózy. Táto zmes bola ďalej fermentovaná pomocou kvasiniek, pričom došlo k využitiu glukózy, galaktózy, laktózy a iných disacharidov. Vysoký obsah GOS bol teda úspešne dosiahnutý enzymatickým procesom a fermentáciou pomocou kvasiniek<sup>13</sup>.

Jednou z limitácií použitia  $\beta$ -galaktozidáz pre produkciu galaktooligosacharidov je problém s dosiahnutím úplnej hydrolýzy laktózy, pretože enzým je inhibovaný produktami (glukóza a galaktóza). Inhibícia galaktózou je efektívnejšia v porovnaní s glukózou pri použití nízkych koncentrácií laktózy pri hydrolýze. Avšak transglykozylačná reakcia pre produkciu galakto-oligosacharidov nastáva zvyčajne pri vysokých koncentráciách laktózy (200 – 600 g.dm<sup>-3</sup>). Rozdiel medzi koncentraciou glukózy a galaktózy pri vysokej koncentrácii laktózy sa zvyšuje so stúpajúcou produkciou galaktooligosacharidov pretože galaktóza je využívaná v procese transgalaktozylácie. To znamená, že jedno-

značne žiaduci enzým pre produkciu GOS je enzým s výrazne nízkou glukózovou inhibíciou. Glukóza bola identifikovaná ako kompetitívny inhibítor  $\beta$ -galaktozidázy kmeňov *L. reuteri*, *S.solfataricus* a nekompetitívny inhibítor u kmeňa *Thermus sp.* Kompetitívne inhibítory súperia so substrátom o aktívne miesta enzýmu, zatiaľ čo nekompetitívne inhibítory sa viažu mimo aktívneho centra enzýmu. Účinnosť nekompetitívnych inhibítorov môže byť redukovaná pomocou imobilizácie a štruktúrnej modifikácie  $\beta$ -galaktozidáz. Takýto spôsob zníženia účinku nekompetitívnej inhibície bol uskutočnený imobilizáciou  $\beta$ -galaktozidázy z *K. lactis* a *Thermus sp.*<sup>19</sup>

V literatúre sa môžeme stretnúť ešte s jedným prístupom efektívneho odstraňovania glukózy z reakčnej zmesi na produkciu GOS. Je to priama kultivácia kmeňa *B. bifidum*, pri ktorej dochádza k tvorbe GOS<sup>14</sup>. Kultivácia založená na tomto procese môže byť vedená ak sú glykozylázy mikroorganizmov viazané v bunkovej stene alebo sú vylučované do kultivačného média. Jednou z výhod takejto kultivácie je, že glukóza a galaktóza môžu byť využité počas rastu buniek, čím sa redukuje ich množstvo vo výslednej zmesi sacharidov, a teda dosiahnu sa vyššie výťažky GOS. Toto zlepšenie výťažkov GOS vychádza z faktov, že glukóza, ktorá preukázala inhibičný vplyv na syntézu GOS je využívaná pre rast buniek. Na druhej strane, GOS musia byť separované zo zmesi kumulovaných mikrobiálnych produktov a z iných esenciálnych zložiek alebo zložiek využívaných pre rast buniek, ktoré sú zahrnuté v kultivačnom médiu (dusíkaté látky, vitamíny, stopové prvky...).

## Záver

Galaktooligosacharidy (GOS) a všeobecne oligosacharidy sa tešia v poslednom období čoraz väčšej pozornosti a to predovšetkým vďaka svojim prospešným účinkom na zdravie a ich širokému uplatneniu ako prebiotckej zložky potravín. Hlavným substrátom pre ich výrobu je v súčasnosti srvátka, ktorá vzniká ako vedľajší produkt pri výrobe syrov a obsahuje laktózu. Tá je štiepená účinkom mikrobiálnych  $\beta$ -galaktozidáz za vzniku GOS. Zúžitkovanie srvátky na výrobu produktu s pridanou hodnotou zatriktívnilo celý proces výroby GOS a zvýšilo záujem trhu o tieto produkty.

## Podakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre dopytovoorientovaný projekt: Vybudovanie experimentálnej overovacej jednotky zameranej na biotechnologickú produkciu špeciálnych chemikálií, ITMS 26240220057, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



## Literatura:

1. Vidová M, Hronská H, Tokošová S, et al.: *Potravinářství* 7, 28 (2013).
2. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R: *Int. Dairy J.* 9, 69 (1999).
3. Torres DPM, Gon P, Teixeira JA, et al.: *Compr. Rev. Food Sci. F.* 9, 438 (2010).
4. Ouwehand AC, Derrien M, de Vos W, et al.: *Curr. Opin. Biotech.* 16, 212 (2005).
5. Frost&Sullivan Research Services: Strategic Analysis of the European Human Food and Beverage Prebiotics Market. 2008.
6. Global Industry Analysts: A US&European Market Report. 2010.
7. <http://www.alibaba.com/showroom/galactooligosaccharides.html>, stiahnuté 23. augusta 2013.
8. Hellerová K, Čurda L: *Czech J. Food Sci.* 27, 572 (2009).
9. Bruins ME, Strubel M, Van Lieshout JTF, et al.: *Enzyme Microb. Technol.* 33, 3 (2003).
10. Mannucci F: Dizertačná práca. Institute of Technology Dublin 2009.
11. Grosová Z, Rosenberg M, Rebroš M: *Czech J. Food Sci.* 26, 1 (2007).
12. Wong C, Kimura T: US5876981. 1999
13. Cheng ChCh, YU MCh, Cheng TCh, et al.: *Biotechnol. Lett.* 28, 793 (2006).
14. Goulas A, George T, Glenn RG: *Int. Dairy J.* 17, 648 (2007).
15. Ji ES, Park NH, Oh DK: *World J. Microb. Biot.* 21, 759 (2005).
16. Tokošová S.: Diplomová práca. FCHPT STU Bratislava 2012.
17. Li Z, Xiao M, Lu L, et al.: *Process Biochem.* 43, 896 (2008).
18. Splechna B, Petzebauer I, Baminger U, et al.: *Enzyme Microb. Tech.* 29, 434 (2001).
19. Mateo C, Monti R, Pessela BCC, et al.: *Biotechnol. Progr.* 20, 1259 (2004).

## Súhrn

**Hronská H., Vidová M., Tokošová S., Rosenberg M.: Galaktooligosacharidy: štruktúra, vlastnosti a možnosti prípravy**  
(GOS) sú nestráviteľné sacharidy známe ako prebiotiká – môžu stimulovať rast a aktivitu prospešnej črevnej mikroflóry (bifidobaktérie a laktobacily) a inhibujú rast potenciálne patogénnych baktérií. GOS sú komerčne vyrábané z laktózy pomocou mikrobiálnej  $\beta$ -galaktozidázy. Tieto enzýmy katalyzujú hydrolyzu, ako aj transgalaktozyláciu laktózy. Pomer medzi týmito reakciami sa líši v závislosti od zdroja enzýmu a podmienok enzymovej. V poslednom období, inovačné stratégie pre syntézu GOS zahŕňajú imobilizáciu enzýmov a využitie srvátky ako základnej suroviny.

**Kľúčové slová:** prebiotikum, galaktooligosacharidy,  $\beta$ -galaktozidáza

## Summary

**Hronská H., Vidová M., Tokošová S., Rosenberg M.: Galactooligosaccharides: structure, properties and preparation**  
Galacto-oligosaccharides (GOS) are non-digestible carbohydrates know as a prebiotic – can stimulate growth and activity of beneficial intestinal microflora (bifidobacteria and lactobacilli) and inhibit the growth of potentially pathogenic bacteria. GOS are commercially produced from lactose using microbial  $\beta$ -galactosidases. These enzymes catalyze hydrolysis as well as the transgalactosylation of lactose. The proportion between these reactions varies depending on the source of the enzyme and conditions of enzymatic reaction. More recently, an innovative strategies for GOS synthesis are immobilization of enzymes and usage of whey as a source of the lactose.

**Keywords:** prebiotic, galacto-oligosaccharides,  $\beta$ -galactosidase

# SIMULACE SBALOVÁNÍ PROTEINŮ

## Vojtěch Spiwok

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, vojtech.spiwok@vscht.cz

Znalost prostorových struktur řady proteinů a jejich komplexů je považována, spolu se znalostí genomu, za největší výtěžek současné biologie. Namísto abstraktního pohledu na bílkoviny jako na „měkkou hmotu“ si je nyní můžeme prohlížet s atomárním rozlišením. O významu, který je přičítán prostorovým strukturám proteinů, svědčí řada Nobelových cen, které byly v posledních letech uděleny průkopníkům strukturální biologie. Od roku 2000 je možné mezi strukturálně biologické Nobelovy ceny za chemii zařadit ty z roku 2002 (Kurt Wüthrich – NMR), 2003 (Roderick MacKinnon – struktury iontových kanálů), 2006 (Roger D. Kornberg – struktury RNA-polymeras a dalších proteinů), 2009 (Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz a Ada E. Yonath – struktura a funkce ribosomu)

a 2012 (Robert Lefkowitz a Brian Kobilka – struktury receptorů vázaných na G-proteiny). Znalost prostorové struktury proteinů umožňuje nejen studovat „anatomii“ enzymů, transportních bílkovin a nejrůznějších molekulárních „strojů“, ale je také považována za klíč k návrhu nových léčiv.

Zájem o strukturální biologii vedl k výstavbě mnoha synchrotronů, tedy velkých urychlovačů elektronů, které slouží jako zdroj kvalitního rentgenového záření pro difrakční experimenty. Na evropském kontinentu se podle dostupných informací ([www.lightsources.org](http://www.lightsources.org)) nachází 26 aktivních synchrotronů. I když strukturální biologové nejsou jedinými „konzumenty“ synchrotronového záření, jejich podíl na užívání těchto zařízení je ale značný a má vzestupnou tendenci. Budoucnost



strukturní biologie je možné vidět i v projektech jako je ELI – Extreme Light Infrastructure ([www.eli-beams.eu](http://www.eli-beams.eu)). Rovněž investice do strukturně biologické instrumentace pro NMR a elektronovou mikroskopii jsou v posledních letech značné.

Jistou alternativou k experimentální strukturní biologii jsou snahy o předpovídání prostorových struktur na počítači. Tyto metody je možné rozdělit podle toho, jestli vycházejí ze známých experimentálně vyřešených prostorových struktur podobných proteinů, nebo jestli předpovídají struktury bez jakýchkoliv vzorů. První skupina metod, alespoň v základních rysech, funguje velmi rychle a relativně přesně. Pokud chceme například vědět, jak vypadá zaječí hemoglobin a známe jeho aminokyselinovou sekvenci, pak jeho strukturu můžeme předpovědět na základě struktury například lidského hemoglobinu. Metoda je samozřejmě příliš hloupá na to, aby se vypořádala s konformačními změnami proteinu, tedy model zaječího hemoglobinu bude ve stejné konformační formě jako jeho lidský vzor. Pro hledání molekulární podstaty zaječí rychlosti, návrh cílených mutací nebo proteinových chimér to ale často může stačit. Zájemce o tuto oblast bych si dovilil odkázat na soutěž Critical Assessment of protein Structure Prediction (CASP, [predictioncenter.org](http://predictioncenter.org)). Tato soutěž spočívá v tom, že jsou vybrány zajímavé proteiny a jejich struktury jsou paralelně předpovídány modeláři a experimentálně řešeny strukturními biologii. Modeláři musí nejprve předložit své modely a ty jsou potom konfrontovány s experimentem. Vývoj této oblasti byl charakterizován postupným zvyšováním přesnosti v minulých letech, přičemž v posledních ročnících se zdá, že metody narážejí na své limity.

Bohužel, na mapě strukturní biologie existuje řada bílých míst. Jedná se například o špatně krystalizovatelné membránové proteiny nebo jiné proteiny vzdorující strukturně biologickým snahám. Struktury takovýchto proteinů tedy není možné předpovědět na základě podobných struktur, neboť žádné takové struktury jednoduše nejsou k dispozici. Další skupinou proteinů, o nichž nemáme dostatek strukturních informací, jsou různé amyloidy a jiné špatně sbalené formy proteinů. Můžeme sice zjistit, jak vypadá „zdravá“ forma proteinu, kterou je možné studovat konvenčními metodami strukturní biologie, ale „nemocná“ forma může vypadat zcela jinak. Pro tyto případy, a nejen pro ně, jsou vyvíjeny metody, které umožňují předpovídat struktury proteinů bez experimentálních vzorů.

Asi největší výzvou v oblasti molekulárního modelování je předpovídání struktur proteinů simulací jejich sbalování. Pokud vezmeme protein v denaturované (plně rozvinuté) konformaci, pak je možné, alespoň v principu, simulovat proces sbalování od rozvinuté do plně sbalené, tedy nativní struktury. V praxi tato myšlenka, alespoň zatím, narážejí na jednu nepřekonatelnou překážku. Pomocí simulace molekulové dynamiky je možné simulovat řádově nanosekundy ze života proteinu za jeden den provozu osobního počítače na plný výkon. Ty nejmenší proteiny (většina biochemiků by jim pořád říkalo peptidy) se sbalují v mikrosekundových měřících. Pro simulaci procesu sbalování by tedy bylo nutné počítač „škvářit“

po dobu desítek, ale spíše stovek či dokonce tisíců dní. Sbalování velkých a farmaceuticky zajímavých proteinů trvá o několik řádů déle.

Zoufalou situaci spojenou se snahami simulovat sbalování proteinu na osobním počítači je možné, alespoň částečně, zmírnit využitím některého ze superpočítačových center. Do osmdesátých let byly vysoce výkonné počítače vyvíjeny tak, aby jeden počítač, myšleno jeden procesor, měl co nejvyšší výkon. V devadesátých letech ale začaly být dostupné levné osobní počítače a jejich komponenty, což zcela změnilo strategii vývoje nových vysoce výkonných počítačů. Namísto snah vytvořit nějaký superprocesor začali tvůrci těchto strojů v čím dál větší míře spojovat levné osobní počítače, jejich procesory nebo velmi podobné kusy hardware. V případě simulace molekulové dynamiky to znamená vyvíjet takové algoritmy, které umožňují výpočty efektivně rozložit na několik procesorů, tedy paralelizovat. Rozdělit výpočet na více procesorů ale není vůbec snadné. Při simulaci molekulární dynamiky zpravidla simulujeme časový vývoj nějaké krychle obsahující několik tisíc atomů. První co nás napadne je rozdělit krychli na menší chlívěčky a každý chlívěček simulovat zvlášť. Interakce atomů jsou ale nejen „intrachlívěčkové“, ale i „interchlívěčkové“. Jednotlivé chlívěčky tedy není možné simulovat nezávisle na sobě, ale procesy musí spolu neustále komunikovat. Efektivní naprogramování takovéto komunikace je důležité pro dosažení dobrého „škálování“. Díky pokrokům v této oblasti je možné s většinou programových balíčků provádět simulace na desítkách a v mnoha případech i stovkách nebo tisících procesorech.

Vysoce výkonné počítače byly v minulosti vyhrazeny pro armády vyvíjející jaderné zbraně, ropné společnosti zpracovávající geologická data nebo pro meteorology. Simulátoři molekulární dynamiky, a zvláště ti, kteří se zaměřují na biomolekulární systémy, se v posledních letech stávají hlavními klienty počítačových center. V Čechách mohou zájemci o náročné výpočty využívat centra CERIT-SC ([www.cerit-sc.cz](http://www.cerit-sc.cz)) a Metacentrum ([www.metacentrum.cz](http://www.metacentrum.cz)) a od jara 2013 i centrum IT4 Inovations ([www.it4i.cz](http://www.it4i.cz)), které během nejbližší doby v něj vyroste jeden z největších počítačů v Evropě. Žebříček pěti set nejvýkonnějších počítačů na světě je zveřejňován jednou za půl roku a je možné jej nalézt na adrese [www.top500.org](http://www.top500.org). V červnu roku 2013 mu dominuje s 3 120 000 procesorovými jádry čínský superpočítač Tainhe-2 (což snad znamená „mléčná dráha“), který patří Národní univerzitě obranné techniky ve městě Čchang-ša. Český počítač se v něm nacházel naposledy před přibližně deseti lety a jednalo se o počítač patřící jedné telekomunikační společnosti.

Nejen mnoha procesory je superpočítač živ. V posledních letech získalo velkou popularitu využívání grafických karet. Vývoj počítačových her náročných na grafiku vedl k vývoji výkonných grafických karet. Grafické karty mohou být zkroceny tak, aby místo fotorealistického stínování nebezpečných monster prováděly nejrůznější vědecké výpočty. Budoucnost využívání grafických karet v molekulárních simulacích a dalších výpočtech je natolik slibná, že je dnes možné koupit i „grafickou“

kartu, která slouží pouze k urychlování výpočtů a už ani nemá zásuvku pro připojení monitoru.

Alternativou k superpočítačovým centrům jsou projekty distribuovaných výpočtů, z nichž neznámější je projekt Folding@Home ([folding.stanford.edu](http://folding.stanford.edu)).<sup>1</sup> Dobrovolníci mohou zapojit své osobní počítače a laptopy do projektu tak, že si na ně nainstalují příslušný program. Ten umožní využít počítač v době, kdy se na něm nepracuje a provádět na něm vědecké výpočty. Projekt Folding@Home má takto k dispozici více než 250 tisíc počítačů, které tvoří jakýsi globální superpočítač. Takovýto superpočítač umožnil simulaci například sbalování villinové vlásenky a proteinu NTL9 s detailním popisem kinetiky a všech intermediátů<sup>2</sup> či sbalování proteinu BBA5 (několik desítek tisíc nanosekundových simulací).<sup>3</sup>

Počítače dostupné v superpočítačových centrech jsou v podstatě obyčejné počítače, jen pospojované do velkého celku. Z takového počítačového centra by až na výjimky bylo možné vykuchat nějaký počítač a učinit z něj obyčejné PC-čko. Zcela jinou strategií je vývoj specializovaných počítačů určených pro molekulární simulace. Těto oblasti dominují aktivity firmy D. E. Shaw Research. David E. Shaw v osmdesátých letech působil jako počítačový vědec na Columbia University. To ho přestalo bavit a vrhl se na vydělávání peněz. V devadesátých letech založil investiční fond a začal působit na Wall Street. V rámci těchto aktivit začal pomocí vysoce výkonných počítačů využívat neefektivnosti finančních trhů. Vydělal tak dostatek peněz, že je dnes 134 nejbohatším Američanem ([www.forbes.com/profile/david-shaw/](http://www.forbes.com/profile/david-shaw/)). Vydělávání peněz jej asi také omrzelo a místo toho, aby létal baló-

nem kolem světa nebo zakládal politická hnutí, vrhl se na simulaci molekulární dynamiky. Místo řešení problému silou, tedy vytvářením obrovských, ale v podstatě obyčejných počítačů, vytvořil počítač, jehož hardware je speciálně navržen a vytvořen pro molekulární simulace. Jejich počítač Anton (pojmenováno na počest Antona van Leeuwenhoeka), který má 512 procesorů a vejde se do rozumně veliké místnosti v centru New Yorku, dokáže simulovat desítky mikrosekund až milisekundy ze života proteinů, tedy řádově déle než by dovedlo 512 klasických procesorů pospojovaných do paralelního počítače. Pomocí tohoto počítače například provedli úspěšnou simulaci vazby ligandu na receptor (15 – 30  $\mu$ s simulace),<sup>4</sup> sbalování několika menších proteinů (0.6 – 49  $\mu$ s simulace),<sup>5</sup> aktivaci napětově řízeného draselného kanálu (150 – 260  $\mu$ s simulace),<sup>6</sup> alosterické aktivace  $\beta(2)$ -adrenergního receptoru (cca 10  $\mu$ s simulace),<sup>7</sup> sbalování ubiquitinu z plně denaturované konformace (celkem téměř 2 ms)<sup>8</sup> nebo aktivující konformační změny v EGFR kinasy (několik cca 25  $\mu$ s simulací).<sup>9</sup> Kromě společnosti D. E. Shaw Research vlastní stroj Anton několik málo akademických výpočetních center, například to v Pittsburghu.

Zcela jinou alternativou k používání vysoce výkonných počítačů, grafických karet, distribuovaných výpočtů nebo speciálních počítačů je vývoj a používání metod, které využívají nejrůznější fyzikální principy pro získání informací o dlouhých časových měřítkách z krátkých simulací. Vzhledem k tomu, že se jedná o oblast zasluhující samostatný přehled, a že se jedná o mou vášeň, dovolil bych si přehled těchto metod nechat na některé z příštích vydání.

## Literatura:

1. Shirts M, Pande VS: *Science* 290, 1903 (2000).
2. Bowman GR, Pande VS: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 10890 (2010).
3. Snow CD, Nguyen H, Pande VS, Gruebele M: *Nature* 420, 102 (2002).
4. Dror RO, Pan AC, Arlow DH, Borhani DW, Maragakis P, Shan Y, Xu H, Shaw DE: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13118 (2011).
5. Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror RO, Shaw DE: *Science* 334, 517 (2011).
6. Jensen MØ, Jogini V, Borhani DW, Leffler AE, Dror RO, Shaw DE: *Science* 336, 229 (2012).
7. Nygaard R *et al.*: *Cell* 152, 532 (2013).
8. Piana S, Lindorff-Larsen K, Shaw DE: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 5915 (2013).
9. Shan Y, Arkhipov A, Kim ET, Pan AC, Shaw DE: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 7270 (2013).

## Souhrn

### Spiwok V.: Simulace sbalování proteinů

Trojrozměrné struktury proteinů je možné předpovídat tak, že vezmeme denaturovaný protein a na počítači simulujeme proces jeho sbalení. Tento článek shrnuje úspěchy i úskalí tohoto postupu, zejména využití vysoce výkonných počítačů, projektů distribuovaných výpočtů, grafických karet a specializovaných počítačů.

**Klíčová slova:** simulace molekulové dynamiky; sbalování proteinů; strukturní biologie

## Summary

### Spiwok V.: Protein Folding Simulations

The three-dimensional structure of a protein can be predicted by a simulation of its folding from fully denaturated state. This article review success stories as well as pitfalls of this approach, namely applications of high performance computers, distributed computing projects, graphical processing units and specialised hardware.

**Keywords:** molecular dynamics simulation; protein folding; structural biology

## OBSAH

<b>Úvodem</b>	<b>33</b>
<b>Zpráva ze světového biotechnologického kongresu v Bostonu</b>	<b>34</b>
<b>Zpráva z konference „Zelená pro lepší budoucnost“ v Olomouci</b>	<b>34</b>
<b>Biotechnologické centrum v Olomouci oficiálně zahájilo činnost v nových prostorách</b>	<b>35</b>
<b>Půl století vědecké činnosti Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.</b>	<b>36</b>
Škop V.: <b>Visfatin – adipokin s potenciálem v léčbě poruch asociovaných s obezitou?</b>	<b>38</b>
Pádrová K.: <b>Nanočástice a jejich vliv na buněčný systém</b>	<b>41</b>
Hronská H., Vidová M., Tokošová S., Rosenberg M.: <b>Galaktooligosacharidy: struktúra, vlastnosti a možnosti přípravy</b>	<b>45</b>
Spiwok V.: <b>Simulace sbalování proteinů</b>	<b>50</b>

## CONTENTS

<b>Editorial</b>	<b>33</b>
<b>Report on the World Congress of Biotechnology in Boston</b>	<b>34</b>
<b>Report on the conference „Green for a better future“ in Olomouc</b>	<b>34</b>
<b>Biotechnology centre in Olomouc officially inaugurated the new facilities</b>	<b>35</b>
<b>Half of a century of scientific activities at the Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i.</b>	<b>36</b>
Škop V.: <b>Visfatin – adipokine with the potential in the treatment of disorders associated with obesity?</b>	<b>38</b>
Pádrová K.: <b>Nanoparticles and their effect on cell system</b>	<b>41</b>
Hronská H., Vidová M., Tokošová S., Rosenberg M.: <b>Galactooligosaccharides: structure, properties and preparation</b>	<b>45</b>
Spiwok V.: <b>Protein Folding Simulations</b>	<b>50</b>

## POKYNY PRO AUTORY

Rukopisy je třeba zaslat v elektronické formě e-mailem na adresu [jan.kas@vscht.cz](mailto:jan.kas@vscht.cz) nebo na [petra.lipovova@vscht.cz](mailto:petra.lipovova@vscht.cz). Rukopis musí být opatřen plným jménem autora, názvem jeho pracoviště a e-mailovou adresou autora.

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, klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova.

Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu práce, a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Seznam citací musí být uveden v závěru článku. Zkratky časopisů se používají podle Chemical Abstract Service Source Index.

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *J.Biochem.* 148, 502 (1997).

Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.

Lowestein K A: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 1979.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 3. září 1999.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi. Každý obrázek musí být opatřen legendou umístěnou pod obrázkem, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky zasílejte **zvlášť** v některém z běžných formátů např. TIF, JPG, CDR, EPS.

Technické parametry: typ písma Arial velikost 11, řádkování jednoduché.



# **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**

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

**ISSN 1210-1737**

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností