

Bio

Ročník 32 • Číslo 4/2022

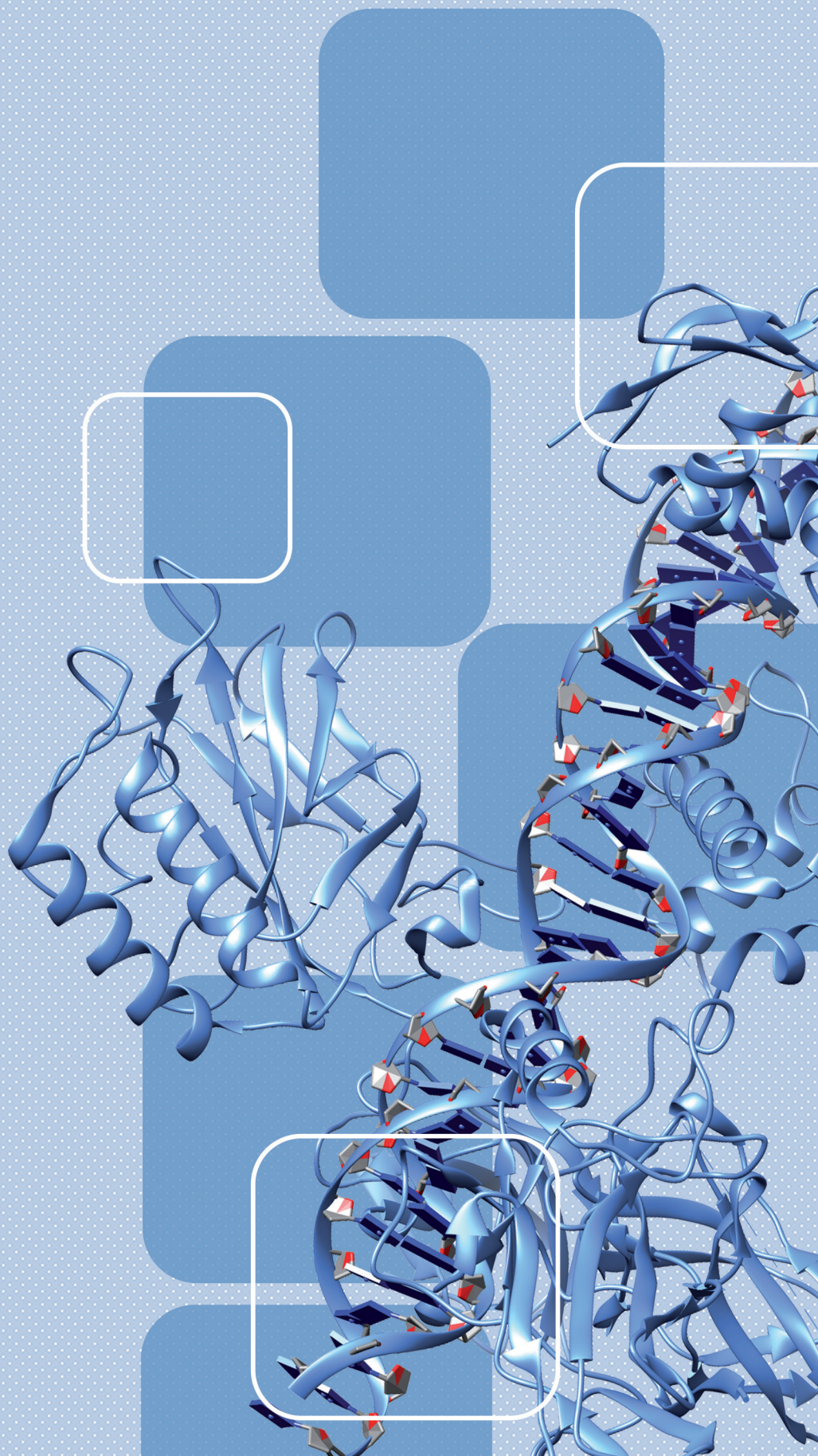
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

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

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

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

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

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

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

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

For more information contacts the editorial board or directly:

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

ÚVODEM

Vážení přátelé,

Jako každoročně proběhla v listopadu valná hromada naší střešní organizace Českého svazu vědeckotechnických společností z.s., kde se podrobně hodnotily výsledky za ¾ letošního roku a výhled do roku příštího. Zmiňuji si o této obvyklé události proto, že Svaz zvládl současnou velice složitou ekonomickou situaci výjimečně dobře a je i skvěle připraven na nástrahy, které nás čekají v roce příštím. Tato skvělá zpráva byla možná jen díky obětavé práci, vědomostem i osobním zkušenostem všech funkcionářů i regulérních zaměstnanců Svazu. Tradiční skvělá prezentace výkonného místopředsedy Ing. Vladimíra Poříze podrobně osvětlila delegátům valné hromady všechny kroky, které vedení svazu podniklo k zajištění úspěšného zvládnutí stávajících i očekávaných problémů. Valná hromada přijala jednomyslně nového člena svazu „Sdružení pracovníků dezinfekce, dezinfekce a deratizace České republiky z.s.“ Nový člen ČSVTS spolupracuje s řadou stávajících členů ČSVTS, je členem „Confederation of European Pest Management Association“ a vydává vlastní časopis. Zapojení nového člena jistě dále posílí aktivity ČSVTS.

Pozornost byla pochopitelně věnována i přípravám významného mezinárodního kongresu WEC 2023 (7th World Engineering Convention), který se uskuteční příští rok v Praze ve dnech 11 – 13 října (www.wec2023.com) v kongresovém centru. Připomínáme, že již byla otevřena registrace. Neváhejte a využijte této vzácné příležitosti zúčastnit se, pokud možno aktivně, této výjimečné příležitosti. Pochopitelně včasným přihlášením ušetříte na vložném.

Na podzim byly uděleny Nobelovy ceny. Nobelovy ceny jsou udělovány na základě závěti Alfreda Nobela od r. 1901. Cena se skládá z medaile, osobního diplomu a peněžité premie. Od r. 1902 se většina cen předávána švédským králem na slavnostním večeru, který se koná vždy 10. prosince ve výroční den Nobelovy smrti. Nobelova cena za mír je ve stejný den předávána v Oslu. Biotechnologům je nejbližší **Nobelova cena za fyziologii a lékařství (medicínu).**

Pro mnohé bylo překvapením za co byla letos Nobelova cena v tomto oboru udělena. Cenu v tomto oboru získal švédský genetik Svante Pääbo za popsání genomu a evoluce vyhynulých pravěkých lidí. Pääbo zkoumal DNA neandrtalců a při tom objevil novou nepopsanou skupinu předků, kterým se začalo říkat denisované. Tyto denisované se křížili s našimi předky Homo sapiens. Uvádí se, že 1 – 4 % genomu současného Evropana nebo Asiaty pochází od neandrtalců. Např. se uvádí, že neandrtalci nám předali geny zlepšující náš imunitní systém nebo např. Tibeťané mohou přežívat ve vysokých výškách díky genům získaných od denisovanů. Svante Pääbo působí na Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology

v Lipsku. Svante se narodil ve Stockholmu v r. 1955 estonské chemičce Karin Pääbo (1925 – 2013), která během 2. světové války emigrovala do Švédska v r. 1944. Pääbo studoval na univerzitě v Uppsale od r. 1975, kde také získal, Ph.D. v r. 1986 za práci „Jak E 19 protein adenovirů moduluje imunitní systém“. Je považován za zakladatele paleogenetiky, vědy studující genetiku prvních lidí. Má fascinující h-index (167 podle Google Scholar a 133 podle Scopus) a fantastický počet nejrůznějších ocenění.

Informace o všech Nobelových cenách za rok 2022 lze si přečíst např. na <https://magazin.signal.cz/2210/nobelovy-ceny-2022>.

V letošním roce si Vysoká škola chemicko-technologická v Praze připomíná 70 let od svého založení, resp. oddělení od Českého učení technického a vytvoření samostatné vysoké školy o třech fakultách. Při této příležitosti bylo publikováno mnoho článků připomínajících historické události a zejména velice zajímavá publikace „Zaostřeno na chemii“ Kapitoly z historie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, kterou sepsaly Věra Dvořáčková a Ivana Lorencová. Předmluvu napsala předsedkyně Akademie věd ČR Eva Zažímalová a publikaci uvedl i generální ředitel Národního technického musea Karel Ksandr. Zajímavé články k tomuto významnému výročí doporučujeme k přečtení v Chemických listech 116, 589-591 (2022) a v Potravinářské revue 2022/5, str. 96 (<http://www.agral.cz>)

Milí čtenáři,

přejeme Vám příjemné prožití vánočních svátků a po celý příští rok pevné zdraví a úspěšné překonání všech problémů, které nás v příštím roce čekají. Těšíme se na Vaši podporu a zajímavé příspěvky do Bioprospectu.

Se srdečným pozdravem
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová



SBÍRKA MIKROORGANISMŮ ÚSTAVU BIOCHEMIE A MIKROBIOLOGIE (DBM) – STRUČNÉ PŘEDSTAVENÍ KOLEKCE

Dana Savická

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

Naše sbírka byla založena v roce 1954 (pod názvem Sbírká kvasinek a průmyslově důležitých mikroorganismů) profesorkou Ludmilou Šilhánkovou, která byla po řadu let její vedoucí. V 60. letech jsme vstoupili do Federace československých (později českých) sbírek mikroorganismů (FCCM). Od roku 1994 je vedoucím sbírky prof. Tomáš Ruml a kurátorkou Ing. Dana Savická.

Zkratka názvu neboli **akronym naší sbírky je DBM**. Toto označení se musí udávat před každým kmenem, který je součástí kolekce. Uchovávané jak bakterie, tak mikroskopické houby (plísňe a kvasinky). Recentně jsou zařazeny rovněž patentové kmeny traustochytriálních organismů, patřící do eukaryotní vývojové větve Stramenopila (*Schizochytrium*, *Japanochytrium*).

Kmeny jsou uloženy jednak jako živé kultury (především na šikmých agarrech), druhým způsobem je zmrazení na – 80 °C. Z hlediska bezpečnosti podle Světové zdravotnické organizace (WHO) se jedná o izoláty patřící do kategorie 1 a 2, tudíž o kmeny s relativně nízkým patogenním a infekčním potenciálem.

Světové sbírky uchovávaných kultur se dělí do několika kategorií, počínaje velkými veřejnými sbírkami, přes specializované kolekce zaměřené na určitý taxon mikroorganismů, konče sbírkami pracovními. Sbírká našeho ústavu patří do poslední zmíněné kategorie. Kmeny jsou využívány především k pedagogickým účelům, a to jak pro základní výuku mikrobiologie na VŠCHT, tak pro potřeby bakalářských, magisterských či doktorských prací. Provoz sbírky je plně financován z prostředků Ústavu biochemie a mikrobiologie, kmeny jsou pro pedagogické a vědecké účely poskytovány zdarma. Pro pracovníky VŠCHT je k dispozici katalog – <https://biomikro.vscht.cz/66832>, aktualizace provedena podle ipn.dsmz.de a indexfungorum.org.

Bakteriologickou část sbírky (cca 100 kmenů) představuje především soubor potravinářských kontaminantů. Jedná se např. o rody *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Cronobacter*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* aj. Významnou část tvoří i klinické izoláty především z rodu *Staphylococcus*. Rovněž jsou zastoupeny některé rostlinné patogeny či kmeny s průmyslovým významem. Číslo DBM má i rozsáhlá pracovní sbírka doc. I. Hochela zahrnující izoláty rodu *Cronobacter* (cca 600 kmenů).

Jádrem sbírky Ústavu biochemie a mikrobiologie je **kolekce mikroskopických vláknitých hub a kvasinek**. Jedná se o soubor cca 170 kvasinkových kmenů a cca 500 kmenů vláknitých mikromycetů (pod čísly DBM + pracovní sbírka DS). Zastoupeny jsou

jak askomycetní tak bazidiomycetní kvasinkové rody (např. *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamomyces*, *Debaryomyces*, *Scheffersomyces*, *Meyerozyma*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Cryptococcus* a řada dalších). Z vláknitých hub máme velký soubor zygomycetů (Mucoromycota) – např. rody *Mucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Thamnidium*, *Absidia*, *Mycocladius* aj. Největší část tvoří kmeny askomycetů (Ascomycota) a rovněž některé mikroskopické bazidiomycety. Z askomycetních hub můžeme uvést běžné rody jako *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, ale i méně časté nebo méně známé houby – např. rod *Leptosphaeria*, *Monascus*, *Exophiala*, *Ascosphaera*, *Talaromyces*, *Arthrrium*, *Oidiodendron* aj. V kolekci jsou i bazidiomycetní houby např. *Wallemia*, *Trametes* či *Rhizoctonia*.

Kromě zařazení našich kmenů do výuky a výzkumných projektů, je jejich další významné využití v rámci **kurzů** pořádaných naším ústavem. V posledních 10 letech to byl opakovaně kurz pro pracovníky v mlékařském průmyslu – např. pro firmu Madeta (zaměření bylo na nejčastější kontaminanty mlékařských výrobků jako je rod *Cladosporium*, *Phoma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Geotrichum* aj.).

Dále několikrát proběhlo školení pracovníků firmy Coca-Cola, jak na mezinárodní úrovni, tak pro české pracovníky. Zde byl požadavek na předvedení nejproblemovějších mikromycetů pro toto průmyslové odvětví. Kromě běžných rodů *Penicillium* a *Cladosporium* se jednalo o *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum*, *Byssosclamyces fulva*, *Cadophora*, *Phialophora* a z kvasinek *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* a *Dekkera bruxellensis*.

O úvod do klasické identifikace mikroskopických hub projeví zájem i jiné laboratoře – např. pracovníci čistých farmaceutických prostor firmy Sotio. Zde se jednalo o celou skupinu hub vyskytujících se v ovzduší. Tyto houby jsou v naší sbírce zastoupeny v hojném počtu.

Houby kontaminující archiválie, knihy a umělecké předměty byly náplní dalšího školení s využitím našeho sbírkového fondu. Součástí naší sbírky jsou i rody s výraznou celulolytickou aktivitou (jako např. *Myxotrichum* či *Chaetomium*), které jsou pro tyto substráty nevítaným kontaminantem.

Další kurzy jsme uspořádali pro jednotlivce, většinou z řad dálkově studujících posluchačů. Jednalo se o uvezení do problematiky mikroskopických vláknitých hub s aplikací získaných poznatků jak ve vlastní laboratoři,

tak při bakalářské či diplomové práci. Patří sem i pravidelná prezentace našich mikromycetů v rámci Dne otevřených dveří či Festivalu vědy a techniky (dnes Vědafest).

Využití uchovávaných kmenů je, v neposlední řadě, i v roli srovnávacího materiálu při identifikaci kontaminace potravin (ale i jiných komodit), které jsou zpracovávány naší akreditovanou mikrobiologickou laboratoří pod vedením prof. Demnerové a Ing. Kadavé (Zkušební laboratoř Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT FPBT).

Sbírka mikroskopických hub se stále rozrůstá o nové taxony (především se jedná o izoláty z naší mykologické laboratoře). Dochází k rozšiřování sbírkového portfolia tak, abychom mohli co nejlépe vyhovět studentům či frekventantům kurzů v jejich specifických požadavcích.

V současné době, na základě molekulárních studií, probíhají velké změny v nomenklatuře hub. Jednak jsou zaváděny nové rody, jednak dochází k synonymizaci současných názvů, takže je potřebná neustálá aktualizace z platných databází jmen (Index Fungorum, Mycobank). V budoucnosti by tudíž ve sbírce bylo potřeba udělat řadu zpřesňujících identifikací pomocí sekvenčních technik. Následným krokem by potom mohlo být zavedení další techniky uchovávání kmenů, a to pomocí lyofilizace. To by se mělo týkat nejen mykologické, ale i bakteriologické části sbírky.

Poděkování: děkuji prof. Vojtěchu Spiwokovi a Dr. Janu Säckému za umístění sbírkových dat na stránky VŠCHT.

SYNTÉZA NANOČÁSTIC POMOCÍ BIOLOGICKÝCH SYSTÉMŮ A JEJICH ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI

Olga Maťátková a Jana Michailidu

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; olga.matatkova@vscht.cz

Úvod

Fyzikální a chemické vlastnosti nanočástic (tj. objektů, jejichž jeden, dva nebo tři rozměry se pohybují v rozmezí 1 – 100 nm) se mohou významně lišit od vlastností makroskopických materiálů a právě tyto unikátní vlastnosti jsou důvodem jejich stále rozšiřnějšího využití v moderních aplikacích. Hlavní důvod této změny je zvyšování poměru počtu atomů v povrchové vrstvě vůči počtu atomů v jádru částice. Například pro nanočástici o třinácti atomech je procento zastoupení povrchových atomů až 92 %¹. Jedněmi z nejčastěji používaných typů nanočástic jsou nanočástice kovů, a to buď čistých kovů, nebo slitin. Nemusí se vyskytovat pouze jako produkty cílené syntézy, ale mohou vznikat i v přírodě, například vulkanickou aktivitou. Asi nejznámějším příkladem historického využití nanočástic je povrch mezopotámské keramiky datovaný do 9. století před naším letopočtem. Vrstvy nanočástic, které jsou od sebe stejně vzdáleny, způsobují posun vlnové délky světla na základě změny fáze díky interferenci na dvou vrstvách, čímž dochází k unikátním barevným změnám. Principy interakcí nanočástic s biologickými systémy i životním prostředím jsou nyní postupně objasňovány a nachází využití v moderní medicíně, průmyslu, energetice, kosmetice a mnoha dalších oborech².

Zelená syntéza nanočástic

Metody zelené syntézy využívají pro přípravu nanočástic látky s organickým původem a toto odvětví technologie syntézy nanočástic zaznamenává významný rozvoj, především díky velké efektivitě, ekonomickým a ekologickým aspektům včetně šetrnosti těchto metod k životnímu prostředí³. Biosyntéza nanočástic kovů byla již provedena s využitím různých biologických systémů, mezi něž patří mikroorganismy, rostliny, řasy ale

i izolované části těchto systémů jako jsou enzymy nebo flavonoidy. Pro redukci kovových iontů dodávaných do systému v podobě prekursoru kovu (většinou jeho soli či kyseliny) je v biologických systémech využíváno enzymů, alkaloidů, polyfenolů, flavonoidů, karboxylových kyselin a celé řady dalších látek. Stabilita nanočástic je dosažena díky navázání biomolekul na již syntetizované nanočástice – tzv. „capping“. Stabilizačními látkami, jež udělují disperzi vzniklých nanočástic stabilitu jsou pak nejčastěji makromolekulární látky (např. proteiny či polysacharidy)⁴.

Syntéza nanočástic pomocí rostlinných extraktů je moderní a velmi slibná metoda jejich přípravy, její velkou výhodou je možnost využití odpadů zemědělských rostlin a extraktů z nich. V závislosti na druhu rostliny, ze kterého se získal extrakt lze rychle připravit stabilní nanočástice s různou velikostí, tvarem a z různých prvků. Princip této syntézy spočívá v extrakci redukujících a stabilizujících molekul z částí rostliny do použitého extrakčního činidla. Nejčastějšími redukčními a stabilizačními látkami, které se hojně vyskytují v pletivech rostlin jsou flavonoidy, taniny, polyfenoly, glykosidy, sacharidy a další⁵.

Antimikrobiální vlastnosti biosyntetizovaných nanočástic

Do klasifikací nanočástic lze zařadit i většina biologických molekul, jakou jsou peptidy nebo oligonukleotidy, ale například i viry, což vede k širokému spektru potenciálních interakcí nanočástic s těmito molekulami a jejich návaznými biologickými systémy.

Antimikrobiální účinek stříbra je znám již tisíciletí, byl využíván jak v jeho makroskopické podobě u užitečných předmětů, tak v podobě koloidního stříbra v medicíně. Mechanismus biologického působení stříbra díky své

multimodální aktivitě dosud není úplně prozkoumán napříč všemi biologickými systémy, existuje ale řada již známých mechanismů, zahrnující indukci oxidativního stresu tvorbou reaktivních kyslíkových částic, interakce s energetickým metabolismem, DNA a RNA, narušení syntézy buněčných stěn či přímé porušení integrity buněčných stěn a membrán v důsledku přítomnosti nanoobjektů na buněčném povrchu⁶. Nanočástice kovů se do buňky dostávají buď přímým průchodem (platí pro nanočástice s rozměry menšími než 10 nm) či po narušení buněčných obalů. Přítomnost peptidoglykanu u grampozitivních bakterií tento transport výrazně omezuje, což má za následek menší inhibiční účinky nanočástic vůči tomuto buněčnému typu⁷.

Rovněž nanočástice zlata mohou vykazovat antimikrobiální účinek. Tato aktivita byla popsána jak u samotných nanočástic zlata, tak pro jejich kompozity s antibiotiky nebo např. ve spojení s iradiací⁸. I mechanismy působení nanočástic zlata zahrnují řadu různých postupů, jako je změna membránového potenciálu či inhibice proteosyntézy, nicméně u nich na rozdíl od nanočástic stříbra nebyla prokázána tvorba reaktivních kyslíkových částic.

Literatura:

1. Kvítek O, Slepíčka P, et al.: *Nanoscale* 110, 922 (2016).
2. Heiligtag F, Niederberger M: *Mater Today* 16, 262 (2013).
3. Iravani S: *Green Chemistry* 13(10), 2638 (2011).
4. Kharissova O. V., Kharisov B. I., et al.: *R Soc Open Sci* 6(11), 191378 (2019).
5. Ovais M, Khalil AT, et al.: *Appl Microbiol Biotechnol* 102(16):6799 (2018).

Mezi další významné antimikrobiální aktivity nanočástic kovů patří jejich interakce s adhezaními buňkami tvořícími biofilm. Biofilm, tedy společenství mikrobiálních buněk přichycených na povrch, žijících v trojrozměrné ochranné matrix složené z extracelulárních polymerních látek prokazuje vysokou odolnost vůči antimikrobiálním agens⁹. Nanočástice interagují kromě přímých interakcí s buňkami i s polymery v extracelulární matrix biofilmu. Díky těmto interakcím dochází k agregaci nanočástic v biofilmu a zhoršení jejich difuzních schopností, zároveň ale může tímto způsobem docházet k narušení jeho struktury a jeho rozvolnění, což v kombinaci s výše uvedenými principy působícími na metabolicky aktivní buňky vede k spojenému antimikrobiálnímu a antibiofilmovému působení¹⁰.

Závěrem lze vyvodit, že metody zelené syntézy nanočástic kovů pomocí biologických systémů mají významný potenciál jak z hlediska srovnání jejich výroby s metodami fyzikálně-chemickými, tak z hlediska srovnání jejich antimikrobiálních aktivit s tradičními desinfekčními činidly. Potenciál těchto metod spočívá v možnosti zapojení do principů cirkulární ekonomiky za snížení nákladů produkce, efektivnějšího využití odpadů a celkově příznivým ekonomickým i ekologickým aspektům.

6. Dakal TC, Kumar A, et al.: *Front Microbiol* 16 (2016).
7. Gurunathan S., Han J., et al.: *Biomed Res Int* e535796 (2013).
8. Zhang Y., Shareena Dasari T. P. et al.: *J Environ Sci Health C* 33(3), 286 (2015).
9. Donlan RM: *Emerg Infect Dis* 8(9), 881 (2002).
10. Li X., Yi-Cheun Y., et al.: *Chem Commun* 51: 282 (2015).

Souhrn

Maťátková O., Michailidu J.: Syntéza nanočástic pomocí biologických systémů a jejich antimikrobiální vlastnosti

Metody zelené syntézy nanočástic zaznamenávají v současnosti významný rozvoj, především díky velké efektivitě, ekonomickým a ekologickým aspektům včetně šetrnosti těchto metod k životnímu prostředí. Tyto metody využívají pro přípravu nanočástic látky s organickým původem, které zajišťují redukcující a stabilizující funkce pro přípravu disperze nanočástic spektra kovů. Zvláště výhodné je využití rostlinných odpadů pro získání extraktů obsahujících celou řadu látek s redukční a biologickou aktivitou. V závislosti na druhu rostliny, ze kterého se získal extrakt lze rychle připravit stabilní nanočástice s různou velikostí, tvarem a z různých prvků. Takto získané nanočástice mají významný potenciál jak z hlediska srovnání jejich výroby s metodami fyzikálně-chemickými, tak z hlediska srovnání jejich antimikrobiálních aktivit s tradičními desinfekčními činidly. Potenciál těchto metod spočívá v možnosti zapojení do principů cirkulární ekonomiky za snížení nákladů produkce, efektivnějšího využití odpadů a celkově příznivým ekonomickým i ekologickým aspektům.

Klíčová slova: nanočástice kovů; biosyntéza; rostlinné extrakty; antimikrobiální působení

Summary

Maťátková O., Michailidu J.: Synthesis of nanoparticles using biological systems and their antimicrobial properties

The methods of green synthesis of nanoparticles are currently undergoing important development, mainly due to high efficiency, economic, ecological and environmentally friendly approach. Green methods use for the preparation of nanoparticles organic compounds, which provide reducing and stabilizing functions for the dispersion of metal nanoparticles. The use of plant waste materials is especially advantageous, as they contain a wide range of substances with reducing and biological activity. Different plant species and parts provide extracts for quick and reliable methods for preparation of stable dispersions with various sizes and shapes of nanoparticles. These nanoparticles have significant potential both their comparison with physico-chemical methods of production and in their antimicrobial activities. The potential of green biosynthesis methods lies in their contribution to the principles of circular economy for reducing production costs, efficient use of waste materials and overall favorable economic and ecological aspects.

Keywords: metal nanoparticles; biosynthesis; plant extracts; antimicrobial properties

MOŽNOSTI KONTINUÁLNÍHO MĚŘENÍ KONCENTRACE OXIDU DUSNATÉHO VE VODNÉM ROZTOKU

Radim Staněk¹, Jana Zábranská²

¹Královéhradecká provozní, a. s., Hradec Králové, ²Ústav technologie vody a prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; radim.stanek@khp.cz

Stavy nestability během biologického odstraňování dusičnanů při čištění průmyslových odpadních vod aktivovaným kalem často doprovází tvorba oxidu dusnatého, který se za přítomnosti kyslíku rychle oxidační na oxid dusičitý. Denitrifikace jako způsob biologického odstraňování dusičnanů z odpadních vod je sledem reakcí prováděných několika skupinami bakterií, kdy jsou dusičnany postupně redukovány až na plynný dusík. Jednotlivé kroky kontinuálního procesu závisí na mnoha faktorech, které pro úspěšný a vyrovnaný průběh procesu musí být v optimálním rozmezí. Pokud dojde z nějakého důvodu k porušení rovnováhy, neprobíhá denitrifikace až na plynný dusík, ale začne se tvořit oxid dusnatý jako nezpracovaný meziprodukt a stabilita a účinnost procesu se snižuje. Na tyto nežádoucí stavy by bylo možno rychleji zareagovat technologickými protipatřeními, pokud by byla přítomnost oxidu dusnatého zjištěna již v počátcích jeho vývinu ve vodné fázi. Při hledání vhodného měřicího zařízení byly posuzovány vlastnosti a možnosti existujících typů senzorů pro měření NO.

Přehled principů on-line měření koncentrace oxidu dusnatého ve vodných roztocích

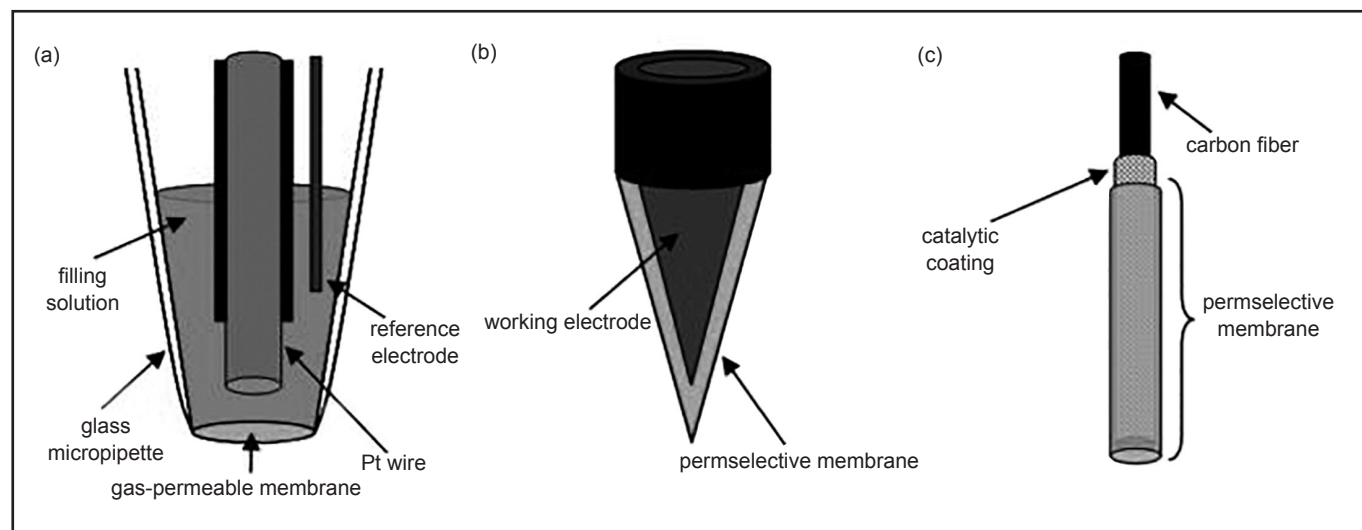
Elektrochemická detekce

Pro měření NO v roztoku byla vyvinuta a přizpůsobena široká škála senzorů. Zatímco konstrukce těchto zařízení se značně liší, vlastní snímače jsou typicky složeny z povrchu schopného elektrooxidace nebo redukce NO a mechanismu zabráňujícímu elektroaktivním interferencím. Pro tento účel je běžně používána

permselectivní membrána. Typy senzorů mohou být rozděleny následovně: ve stylu Shibuki, s permselectivní membránou a s permselectivní membránou s pevným katalyzátorem (viz Obr. 1).

Senzory NO typu Shibuki jsou modifikovanými verzemi senzoru kyslíku (O₂), který byl poprvé popsán Lelandem Clarkem v roce 1956. Tento snímač obsahuje mikropipetu naplněnou elektrolytem, do které je umístěn platinový a referenční stříbrný vodič, a je pokryta tenkou vrstvou plynopropustné membrány. Nízkomolekulární plyny (např. NO a O₂) snadno difundují přes membránu na povrch elektrody, zatímco větší neprochází. Použitím negativního nebo pozitivního potenciálu na platinové elektrodě jsou elektroaktivní látky na povrchu elektrody redukovány nebo oxidovány, výsledkem je proud úměrný koncentraci analytu. Shibuki informoval o výrobě prvního NO-selektivního senzoru v roce 1990. Byl u něj použit potenciál pozitivní elektrody (tj. elektrooxidace) pro oxidaci a detekci NO. Tento typ snímače měří NO s přiměřenou selektivitou vůči dusitanu, ale citlivost snímače není stabilní v průběhu času, mezi snímači byly rozdíly od 2,5 do 106,3 pA/nM NO, což vedlo k nestabilním měřením. Senzor nebyl snadno přizpůsobitelný miniaturizaci (o průměru > 150 μm) kvůli složitosti konstrukce a požadavku na vnitřní plnicí roztok.

NO-elektrody s pevnou permselectivní membránou byly vyvinuty k eliminaci interního plnicího elektrolytu. Elektroda z ušlechtilého kovu nebo uhlíku je pokryta typicky hydrofobní membránou propustnou pro zájmový analyt, ale nepropustnou pro jiné elektroaktivní interference. Jednoduchá konstrukce pevných permselectivních elektrod umožňuje jejich snadnější miniaturizaci.



Obr. 1: Schématické diagramy čidel NO (a) Shibukiho typu, (b) s pevnou permselectivní membránou, (c) s pevným katalyzátorem

Při vrstvení více druhů membrán na elektrodě může být senzorová selektivita laděna tak, aby rozlišovala širokou škálu interferencí včetně dusitanu, dopaminu a acetaminofenu, což umožňuje jednoznačné určení koncentrace NO v biologickém prostředí. Oxid dusnatý se měří přímo buď elektrooxidací nebo elektroredukcí.

K dalšímu snížení účinku elektroaktivních interferencí na NO-selektivní elektrodě byly vyvinuty pevné katalytické elektrody. Zatímco konstrukce je podobná pevné permselektivní elektrodě, katalytické elektrody obsahují mediátory (např. metaloporfyriny a kovové ftalokyaniny) buď přímo na povrchu elektrody nebo v permselektivní membráně. Zahrnutím mediátoru schopného katalyzovat oxidaci nebo redukci NO se snižuje velikost snímaného elektrochemického potenciálu (pro měření NO) a minimalizuje rušení od ostatních elektroaktivních druhů. Při kombinaci s permselektivní membránou poskytují pevné katalytické elektrody jedinečnou selektivitu. Podobně jako u pevné permselektivní elektrody se NO přímo měří buď katalytickou elektrooxidací nebo elektroredukcí⁶.

Chemiluminiscenční sondy

K detekci NO v kapalných i plynných vzorcích mohou být použity chemiluminiscenční sondy. Obecné schéma pro detekci NO v tekutých vzorcích chemiluminiscencí zahrnuje aktivaci guanylylcykasy expozicí NO, způsobující převedení guanosin trifosfátu (GTP) na guanosin 3, 5-cyklický monofosfát (cGMP), což vede k uvolnění pyrofosfátu, který pak může reagovat s adenosintrifosfát sulfurylasou (ATP-sulfurylasa) za vzniku ATP. ATP, který je tvořen touto sérií reakcí, je pak schopen reagovat se systémem luciferinu a luciferázy, aby emitoval záření při 560 nm. Výhoda chemiluminiscenčního systému spočívá v tom, že je schopen detekovat NO v nM koncentracích, protože počáteční interakce guanylylcykasy s NO vede k 200násobnému lineárnímu zvýšení. Chemiluminiscenční sondy mají některé nevýhody, včetně neschopnosti detekovat NO *in vivo*.⁸

Fluorescenční sondy

Metody detekce fluorescence jsou atraktivní alternativou k dříve zmíněným senzorům vzhledem k jejich schopnosti detekovat jak extracelulární, tak intracelulární NO, stejně jako jejich schopnost poskytovat prostorové i časové informace. Byly vyvinuty různé typy fluorescenčních NO senzorů, včetně *o*-diaminoaromatických sloučenin, luminiscenčních lanthanidových komplexů, komplexy přechodných kovů, kvantové tečky a senzory uhlíkových nanotrubiček. Každý typ fluorescenčního senzoru má různé pozitivní a negativní vlastnosti; dále jsou uvedeny některé z hlavních fluorescenčních senzorů s diskusí o jejich výhodách a nevýhodách.

Společným přístupem pro vývoj senzorů NO je použití *o*-diaminoaromatických molekul jako je 4,5-diaminofluorescein, běžně známý jako DAF-2. Některé *o*-diaminosenzory mají bohužel nevýhody včetně falešně pozitivního signálu při vystavení působení kyseliny dehydroaskorbové (DHA) a kyseliny askorbové (AA). Výzkumná skupina Shear vyvinula v roce 2010 nový snímač NO, nazvaný NO550, který má vysokou specifickou, nereaguje na lokalizované proteiny a není citlivý na rozdíly v pH, což je výhodné, protože různé intrace-

lulární oddíly mají různé hodnoty pH. NO550 ukazuje červeně posunutě 1500násobné zvýšení fluorescence a nereaguje na jiné reaktivní druhy kyslíku a dusíku. Jedna nevýhoda NO550 je, že má omezenou rozpustnost ve vodě, takže není ideální pro biologické studie.

Alternativní metodou detekce NO fluorescence je použití komplexů na bázi přechodného kovu, které vytvářejí zářivý fluorescenční signál. U komplexů na bázi přechodných kovů je fluorofor vázán na přechodný kov a vykazuje velmi slabý signál, ale reakce s NO způsobuje posunutí fluoroforu a obnovení fluorescence. Bohužel, komplexy na bázi kovů jsou nerozpustné ve vodě a vytvářejí dobrý NO senzor pro organická rozpouštědla, ale opět nejsou optimální pro biologické studie.

Protože se předpokládá, že rozpustnost ve vodě je důležitou vlastností biologických senzorů, Naganova skupina vyvinula luminiscenční lanthanidový komplex, který po vystavení působení 50 μ M vodného NO vykazoval 50tinásobné zvýšení luminiscence (excitace 500 nm a emise 980 nm). Výhoda senzoru Nagano před dříve vyvinutými komplexy Yb^{3+} spočívá v tom, že jejich sonda je funkční ve vodných systémech, má excitační vlnovou délku, která může být produkována dvou fotonovou technologií a má emisní vlnovou délku v blízké infračervené oblasti, kde voda a krev absorbují světlo minimálně.

V roce 2017 byl vyvinut nový fluorescenční senzor NO, nazvaný NCNO, který je založen na N-nitrosační reaktivitě, aby se zabránilo nespecifickým reakcím z DHA, AA a reaktivních druhů kyslíku. NCNO kovalentně váže dvoufotonový fluorofor na monoalkyl-substituovaný *p*-fenylendiamin. Vzhledem k tomu, že dva fotony mají emisní vlnovou délku větší než 600 nm, sonda NCNO může být detekována hluboko uvnitř tkáně a bylo prokázáno, že detekuje NO generaci v myším modelu ischemického reperfusního poškození. Jedním z nedostatků detekčního systému NCNO je zjištění N-nitrosace, nikoliv celkové koncentrace NO, takže pro určení skutečné koncentrace NO v roztoku / tkáni je třeba použít předpoklady a modely.

Kvantové tečky (QD) jsou třídou nanočástic, která mohou fluoreskovat na mnoha různých vlnových délkách (s úzkými emisními spektry), nepodléhají rychlé degradaci (photobleaching) a vydávají světlo více než 100 krát silnější než organická barviva. Kvantové tečky se ukázaly jako vynikající turn-on/off chemosenzory pro různé analyty prostřednictvím připojení na analyt citlivých molekul na povrch QD. Nedávno byl vyvinut fluorescenční senzor pro NO, nazvaný Fe (III) -QD-nanoprobe, s CdSe-ZnS QDs poskytujícími základní / fluorescenční část senzoru a tris (dithiokarbamat) železa (III), působící jako molekuly reagující na NO. Fe (III) -QD-nanosonda vykazovala odpověď závislou na dávce NO, která byla stabilní po dobu přes hodinu a specifickou vůči NO ve srovnání s dusitanem, dusičnanem a jinými reaktivními druhy kyslíku / dusíku. Bohužel, nanočástice Fe (III) -QD se nevratně mění expozicí NO a lze je tedy použít pouze pro jednu studii. Přestože se jednalo o první zveřejněný příklad QD čidla pro NO, je možné, že další optimalizace umožní obnovení snímače a použití pro více cyklů.

Uhlíkové nanotrubicе jsou další třídou nanočástic, která nedávno prokázala, že působí jako biologický senzor. Uhlíkové nanotrubicе jsou různorodou skupinou částic, které fungují odlišně v závislosti na jejich chiralitě (úhel jejich uhlíkových vazeb vzhledem ke směru trubice). Polovodičové jednorozměrné uhlíkové nanotrubicе (SWNT) jsou jednorozměrné čisté uhlíkové látky, které fluoreskují v blízké infračervené oblasti (900 – 1500 nm), když jsou excitovány viditelným světlem (500 – 850 nm). Vlnová délka, při níž SWNT fluoreskuje (s úzkým emisním spektrem) závisí na jejich chiralitě, a proto, podobně jako QD, může být v rámci jediného řešení diferencováno více SWNT. Výzkumná skupina Strano vyvinula NO senzory SWNT obalením specifickými polymery, včetně 3,4-diaminofenyl-funkcionalizovaného dextranu nebo krátkých oligonukleotidových sekvencí jako (AAAT) 7 a (AT) 15, které vykazují změnu intenzity fluorescence při expozici NO. Senzory SWNT mají mnoho výhod oproti jiným fluorescenčním čidlům, jako je malý vliv fotobleachingu, schopnost být detekován Ramanovým rozptylem, kromě fluorescenčního signálu a emise v blízké infračervené oblasti, kde krev a voda neabsorbují velké procento světla. Nedostatkem aktuálních NO senzorů na bázi SWNT je, že vypínají fluorescenční senzory a zvyšují obtížnost dlouhodobého sledování NO v systému.

Genetické biosenzory

Zajímavým novým způsobem detekce NO v jedné buňce je přidání genetických materiálů, které kódují vizuální odezvu signálu za přítomnosti NO. Ronald Malli a kolegové vyvinuli systém, v němž transkripční faktor *Escherichia coli* (*E. coli*) citlivý na NO je konjugován s fluorescenčními variantami proteinů, které jsou potom převzaty buňkami. Když byly tyto fluorescenční sondy testovány s HeLa buňkami, bylo prokázáno, že jsou absorbovány a exprimovány podobně jako jiné geneticky kódované sondy. Ukázalo se, že NO sondy reagují okamžitě na NO s reverzibilním signálem, což umožňuje dlouhodobé vyšetřování dynamiky NO uvnitř buněk in vitro. Výzkumné úsilí se zaměřuje na využití tohoto systému k vývoji modelu in vivo. Jedna z hlavních překážek, která stále zabraňuje využití sond in vivo, spočívá v tom, že fluorescenční emisní rozsah, který je v současné době používán, je obtížné vizualizovat v hloubce uvnitř tkáně.⁷

Z provedené literární rešerše je zřejmé, že senzory na NO sice existují, ale mají svá omezení a jsou primárně určeny pro měření v biologických vzorcích pro medicínské účely a dále vyvíjeny se snahou o miniaturizaci. Jejich vlastnosti nesplňují nároky dlouhodobého kontinuálního měření NO v prostředí denitrifikujícího aktivovaného kalu v provozu čištění odpadních vod.

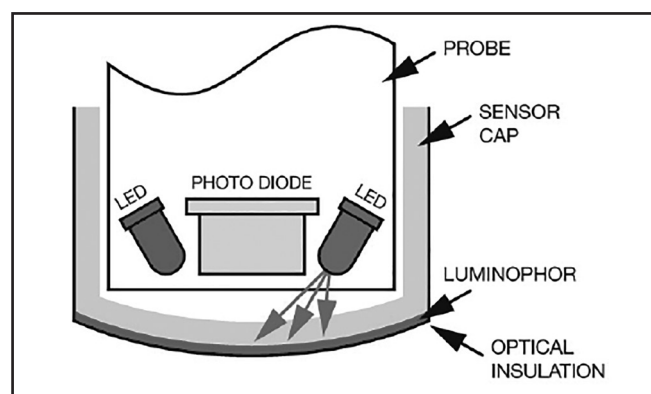
Nová možnost on-line měření koncentrace rozpuštěného oxidu dusnatého

Pro běžné sledování stavu denitrifikačního procesu jsou v denitrifikačním reaktoru umístěny sondy na měření koncentrace dusičnanového a dusitanového dusíku, nerozpuštěných látek a pH. Pro ověření ano-

xických podmínek je instalována ještě optická luminiscenční sonda na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku.

Princip on-line měření rozpuštěného kyslíku optickou luminiscenční sondou LDO

LDO senzor se sestává z diody emitující modré světlo, diody emitující červené světlo a křemíkového fotodetektoru. Čepička senzoru je pokryta luminoforem na bázi platiny, který je excitován modrým světlem z diody. (Obr. 2.) Luminofor je potažen na vnější straně černou polystyrenovou vrstvou pro optickou izolaci, poskytující ochranu proti světlem vyvolané degradaci luminoforu (fotobleachingu).⁸



Obr. 2: Senzor optické luminiscenční sondy pro měření rozpuštěného kyslíku.

Modrá excitační LED je sinusově modulovaná na frekvenci související s luminoforovou dobou dohasínání a její horní a dolní hranicí. Měřený parametr je fázové zpoždění (v podstatě časové zpoždění) mezi excitujícím modrým LED signálem a detekovanou červenou emisí z luminoforu, přičemž fázové zpoždění je nepřímo úměrné množství rozpuštěného kyslíku v blízkosti luminoforu, typicky kyslík ve sledované vodě. Tato technika fázové modulace se používá k měření doby dohasínání kyslíkem zhasené luminiscence.

Použití technologie fázové modulace znamená, že kolísání intenzity modré LED nebo degradace luminoforu nemají žádný zřetelný dopad na měření po celou dobu životnosti snímače. Navíc vzhledem k inverznímu vztahu mezi koncentrací kyslíku a fázovým zpožděním emitovaného červeného světla je poměr signál / šum zvláště výhodný pro měření velmi nízkých koncentrací rozpuštěného kyslíku. Konečně modré a červené LED diody jsou alternativně přepínány mezi měřicími cykly, což umožňuje, aby červená LED poskytla interní referenci pro optické a elektronické cesty signálu. Tato interní reference koriguje změny v elektronice fázového měření vyvolané změnou teploty nebo časem.⁸

Použití LDO sondy pro měření koncentrace NO ve vodě

Právě optická luminiscenční sonda v některých momentech procesu denitrifikace vykazovala tak výrazný nárůst signálu, který nemohl odpovídat reálným kon-

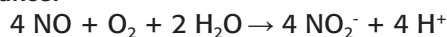
centracím kyslíku. Při zkoumání tohoto jevu bylo zřejmé, že sonda reaguje na zvýšenou koncentraci oxidu dusnatého, který je sice jedním z meziproduktů denitrifikační reakce, ale za normálního stavu procesu okamžitě dále zreaguje. K ověření tohoto předpokladu bylo nutno zjistit odezvu této kyslíkové sondy na různé koncentrace oxidu dusnatého ve vodě za nepřítomnosti kyslíku.

Podobné zjištění, že při denitrifikačním testu optická sonda na měření kyslíku registrovala vysoké hodnoty, přestože do reaktoru nebyl přiváděn žádný kyslík, v roce 2016 zveřejnila S. Klaus a kol.⁹ Vrchol signálu odpovídal přidávku NO_2^- . To vedlo k hypotéze, že dusitan nebo jiný denitrifikační meziprodukt vytváří pozitivní interferenci optického senzoru kyslíku. Cílem jejich studie bylo určit, které meziprodukty denitrifikace zasahují do měření koncentrace rozpuštěného kyslíku. Test prováděli s aktivovaným kalem z procesu nitrifikační/denitrifikační. Rozpuštěný kyslík byl sledován pomocí sondy Hach LDO 101, která vykazovala vysoké hodnoty, i když reaktor nebyl provzdušňován a byl zamezen přístup vzduchu. Počáteční dávka dusitanů do reaktoru způsobila okamžitě zvýšení koncentrace NO v kapalně fázi a následně pomalejší nárůst koncentrace N_2O . Zvýšení koncentrace NO odpovídá zvýšení hodnot signálu DO na sondách Hach LDO a YSI FDO. Dále prokázali, že rušivý vliv na LDO sondu působí NO, nikoli N_2O .

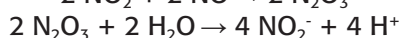
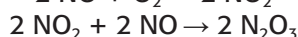
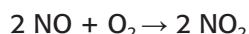
Interference LDO sondy na oxid dusnatý byla tedy potvrzena i jinými autory, ale zatím nebyla známa závislost signálu sondy na koncentraci rozpuštěného NO, aby bylo možno kvantifikovat jeho množství a na jeho základě navrhnout provozní opatření. K realizaci tohoto záměru byla zjišťována odezva kyslíkové sondy na nastavené koncentrace oxidu dusnatého ve vodě za nepřítomnosti kyslíku.

Pro dosažení přesného popisu závislosti signálu optické kyslíkové sondy na koncentraci NO bylo klíčové znát koncentraci nasyceného roztoku NO za daného tlaku a teploty. Většina autorů se shoduje na maximální rozpustnosti NO ve vodě při teplotě 20 °C a tlaku 1,013 kPa 2 mmol/l.^{1, 2, 3, 4} Další důležitou otázkou bylo chování NO ve vodě obsahující kyslík, protože pro kalibraci byl připravován nasycený roztok NO ve vodě, která na počátku určité množství kyslíku obsahovala. Stejně tak v měrné cele byla destilovaná voda s rovnovážnou koncentrací kyslíku.

Ignarro a kol.⁵ ve své práci uvádějí, že NO je ve vodných roztocích obsahujících kyslík oxidován dle následující reakce:



Mechanismus výše uvedené reakce není přesně znám, ale může být reprezentován následujícím způsobem:



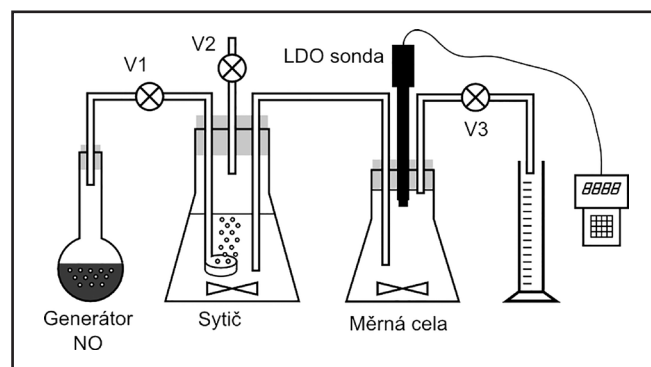
Výše uvedená chemická reakce vyžaduje rychlou sérii reakcí bezprostředně po vzniku NO_2 , aby se udržovala koncentrace NO_2 dostatečně nízká, aby nedošlo k vytvoření znatelného množství N_2O_4 , který by jinak vytvořil NO_3^- spolu s NO_2^- dle následující reakce:



Oxidace NO ve vodném roztoku obsahujícím kyslík je z hlediska reakční kinetiky reakcí 2. řádu, to znamená, že rychlost oxidace NO je úměrná čtverci jeho koncentrace.⁵

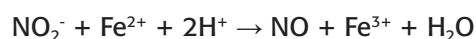
Kalibrace LDO sondy pro stanovení NO rozpuštěného ve vodě

Základem pro provedení kalibrace bylo připravit nasycený roztok oxidu dusnatého a absorpci plynného oxidu dusnatého ve vodě za daných podmínek tlaku a teploty. K provedení pokusu byla sestavena aparatura na obr. 3.

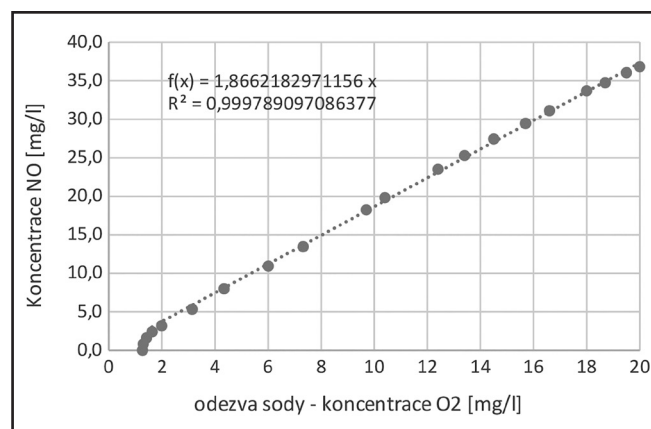


Obr. 3: Schema aparatury pro vývin NO, přípravu nasyceného roztoku a jeho dávkování do měrné cely.

Příprava oxidu dusnatého probíhala podle následující reakce:



Jako zdroj dusitanů byl použit dusitan sodný, jako zdroj dvojmocného železa síran železnatý a k oxyselení kyselina sírová. Oxid dusnatý byl připravován dle výše uvedené reakce v generátoru. Z něho byl přiváděn do sytiče, ve kterém se připravoval nasycený roztok oxidu dusnatého. Ten byl postupně přepouštěn do měrné cely, ve které byla umístěna LDO sonda. V následujícím kalibračním grafu na obrázku 4 jsou vyneseny hodnoty vypočítané koncentrace oxidu dusnatého a odpovídající odezva LDO sondy.



Obr. 4: Závislost koncentrace NO na signálu LDO sondy

Na obrázku 4 je tečkovaně znázorněna lineární regrese a nad ní je uvedena rovnice včetně výpočtu regresního koeficientu. Od koncentrace NO 2,4 mg/l

(0,08 mmol/l) je závislost odezvy sondy na koncentraci NO lineární a lze ji vyjádřit následujícím vztahem:

$$\text{Koncentrace NO [mg/l]} = 1,866 \times \text{odezva LDO sondy [mg O}_2\text{/l]}$$

Citlivost LDO sondy na rozpuštěný oxid dusnatý je tedy skoro 2x vyšší než na samotný rozpuštěný kyslík. Zároveň je jasné, že tímto postupem není možné při kalibraci zachytit velmi nízké koncentrace. Možným vysvětlením je, že oxidace NO, jakožto reakce 2. řádu, při nízkých koncentracích probíhá již velmi pomalu. V systému tak koexistují poměrně dlouhou dobu oba rozpuštěné plyny. Naproti tomu v reálném denitrifikačním reaktoru není kyslík přítomen vůbec, protože je okamžitě spotřebován na oxidaci přidávaného substrátu. A tak je možné detekovat LDO sondou pouze oxid dusnatý již od velmi nízkých koncentrací a používat zjištěný kalibrační koeficient.

Literatura

1. Zacharia IG, Deen WM: Ann Biomed Eng. 33(2), 214 (2005).
2. John N. Armor: J. Chem. & Engin. Data, 19(1), 82 (1974).
3. Ignarro LJ: Nitric Oxide, Biology and Pathobiology, Academic Press (2000).
4. Budavari, S. (ed.): Merck and Co., Inc., 1996., p. 1131
5. Ignarro LJ, Fukuto JM, et al.: Proc Natl Acad Sci USA 90(17), 8103 (1993).
6. Privett BJ, Shin JH, et al.: Chem Soc Rev. 39(6), 1925 (2010).
7. Iverson NM, Hofferber EM, Stapleton JA: Chemosensors 6(1), 8 (2018).
8. Mitchel TO: Hach Company, LDO White Paper 2006
9. Klaus S, Sadowski M, et al.: Environmental Engineering Science 34(9) (2017).

Souhrn

Staněk R., Zábranská J.: Možnosti kontinuálního měření koncentrace oxidu dusnatého ve vodném roztoku

Stavy nestability během denitrifikace při čištění průmyslových odpadních vod aktivovaným kalem často doprovází tvorba oxidu dusnatého, který se za přítomnosti kyslíku rychle oxiduje na oxid dusičitý. Na tyto nežádoucí stavy by bylo možno rychleji zareagovat technologickými protipatřeními, pokud by byla přítomnost oxidu dusnatého zjištěna již v počátcích jeho vývinu ve vodné fázi. Při hledání vhodného typu senzoru pro měření NO bylo zjištěno, že senzory sice existují, ale jsou primárně určeny pro měření v biologických vzorcích pro medicínské účely a jejich vlastnosti nesplňují nároky dlouhodobého kontinuálního měření NO při denitrifikaci. Pro přímé měření koncentrace rozpuštěného NO bylo využito potvrzeného silného signálu optické luminiscenční kyslíkové sondy na rozpuštěný NO. Byla provedena kalibrace sondy až do koncentrace 36,8 mg/l NO ve vodě. Kontinuální měření koncentrace oxidu dusnatého jako kontrola jeho vzniku při denitrifikaci je velice užitečný nástroj pro okamžité zjištění počínající nerovnováhy denitrifikačního procesu a tím pro včasný technologický zásah.

Klíčová slova: denitrifikace, vznik NO, měření koncentrace NO, LDO kyslíková sonda

Summary

Staněk R., Zábranská J.: Possibilities of continuous measurement of nitric oxide concentration in aqueous solution

Instability conditions during the denitrification in industrial wastewater treatment with activated sludge are often accompanied by the formation of nitric oxide, which is rapidly oxidized to nitrogen dioxide in the presence of oxygen. While searching for a suitable type of sensor for NO measurement, it was found that sensors are primarily intended for measurement in biological samples for medical purposes and their properties do not meet the demands of long-term continuous measurement of NO during denitrification. The confirmed strong signal of the optical luminescent oxygen probe for dissolved NO in an oxygen-free environment was used to direct measurement of the concentration of dissolved NO. The probe was calibrated up to a concentration of 36.8 mg/l NO in water. Continuous measurement of the concentration of nitric oxide as a control of its formation during denitrification is a very useful tool for the immediate detection of the starting imbalance of the denitrification process and thus for timely technological intervention.

Keywords: Denitrification, Formation of NO, Measurement of NO concentration, LDO oxygen probe

Závěr

Při kontrole stavu denitrifikace bylo prokázáno, že optická luminiscenční sonda na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku reaguje na přítomnost oxidu dusnatého rozpuštěného ve vodném prostředí. Z kalibrace odezvy sondy na přídavky oxidu dusnatého bylo zjištěno, že odezva na oxid dusnatý má téměř dvojnásobnou citlivost proti kyslíku. Za nepřítomnosti kyslíku je odezva sondy lineární až do svého maximálního rozsahu, což reprezentuje 36,8 mg/l NO a je schopna detekovat i velmi nízké koncentrace. Kontinuální měření koncentrace oxidu dusnatého jako kontrola jeho vzniku při denitrifikaci je velice užitečný nástroj pro okamžité zjištění počínající nerovnováhy denitrifikačního procesu a tím pro včasný technologický zásah a zabránění vzniku problematické situace vedoucí ke snížení účinnosti denitrifikace.

TECHNOLÓGIA REPROGRAMOVANIA NÁDOROVÝCH BUNIEK A JEJ TERAPEUTICKÝ A EXPERIMENTÁLNY POTENCIÁL V ONKOLÓGII

Ján Strnadel¹, Romana Záhumenská¹, Dominika Hajdúchová³, Sandra Meršaková¹, Jana Juhásová², Michal Pokusa³, Henrieta Škovierová¹, Slavomíra Nováková¹, Blažej Palkoci⁴, Martin Vojtko⁴, Miroslav Pindura⁴, Roman Kyčina⁴, Marek Smolár⁴, Vladimír Nosál⁵, Michal Kalman⁶, Juraj Marcinek⁶, Lukáš Plank⁶, Martin Kertys⁷, Nela Žideková⁷, Kristián Pršo⁷, Hana Studenová⁸, Barbora Mitrušková⁹, Dušan Braný¹, Ľudovít Laca⁴, Ján Janík⁴, Erika Halašová¹, Egon Kurča⁵, Renata Péčová³, Štefan Juhás²

¹Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin), Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ²Ústav živočíšnej fyziológie a genetiky AV ČR, v.v.i, Liběchov, Česká republika, ³Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ⁴Chirurgická klinika a transplantáčne centrum, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ⁵Neurologická klinika, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin, Slovenská republika, ⁶Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ⁷Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ⁸Ústav makromolekulárnej chemie AV ČR, Praha, Česká republika, ⁹Oddelenie lekárskej genetiky, Univerzitná nemocnica Martin, Slovenská republika; jan.strnadel@uniba.sk

Úvod

Technológia reprogramovania somatických buniek do indukovaných pluripotentných kmeňových buniek, objavená prof. Shinyom Yamanakom v roku 2006 a ocenená Nobelovou cenou za fyziológiu a medicínu už v roku 2012 predstavuje revolučný medzník v dejinách regeneratívnej medicíny a *in vitro* modelovania chorôb^{1,2}. Molekulárne indukovaný návrat finálnej diferencovanej bunky „v čase“ až do štádia pluripotentnej kmeňovej bunky pomocou kokteilu iba štyroch transkripčných Yamanakových faktorov a jej následná re-diferenciácia do iného typu bunky v sebe ukrýva významný terapeutický potenciál pre rôzne oblasti regeneratívnej medicíny. Pre oblasť onkologického výskumu je táto technológia zaujímavá z dvoch hlavných dôvodov. Prvým je možnosť prípravy terapeuticky aplikovateľných autológnych buniek, ktoré môžu kolonizovať a následne regenerovať orgány alebo tkanivá, poškodené progresiou nádorov alebo s ňou spojenou terapeutickou intervenciou. Druhým a nemej významným dôvodom je možnosť štúdia procesu geneticko-epigenetickej dediferenciácie nádorových buniek s rôznym stupňom diferenciácie. Indukovaný návrat nádorovej bunky do štádia s menšou mierou diferenciácie môže prispieť k pochopeniu mechanizmov, zodpovedných za samotnú premenu somatickej bunky na bunku s potenciálom vytvoriť nádor³.

Indukovaná pluripotencia v onkológii

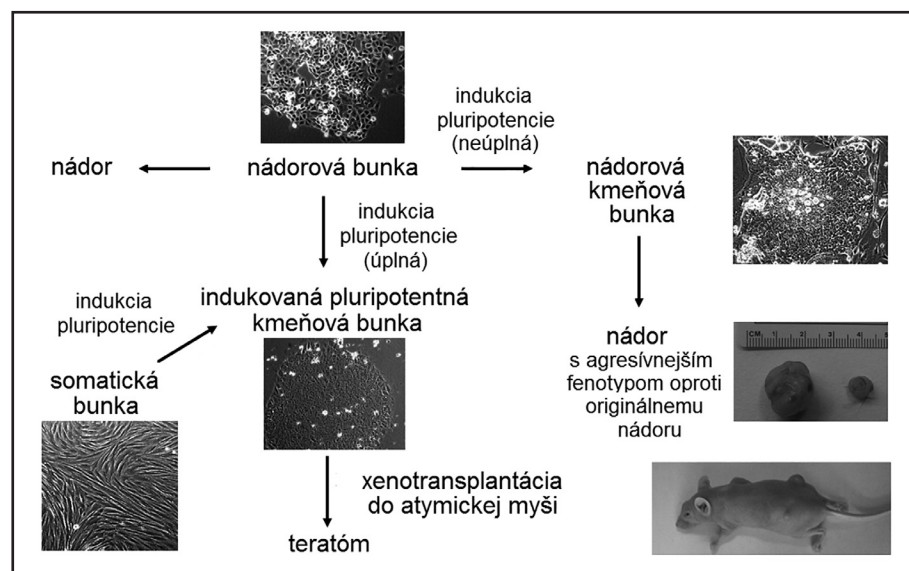
Príprava indukovaných pluripotentných kmeňových buniek z diferencovaných somatických buniek riadenou transdukciami (prenosom pomocou virálnych vektorov) alebo transfekciou (nevirálnymi, fyzikálno-chemickými metódami) štyroch transkripčných faktorov, identifikovaných Dr. Shinyom Yamanakom v roku 2006 neostala nepovšimnutá ani v oblasti onkologického výskumu. Už spomenutá možnosť prípravy terapeuticky aplikovateľných buniek, ktoré by po transplantácii na miesto, poškodené samotným rastom nádoru alebo

terapeutickým zásahom (napr. rádioterapiou) dokázali poškodenú časť tkaniva alebo orgánu regenerovať a to dokonca bez nutnosti použitia agresívnej imunosupresívnej liečby⁴. Samotné terapeutické bunky je totiž možné pripraviť priamo z kožných alebo krvných buniek pacienta a takto pripravené bunky sú teda autológne (organizmu vlastné, imunologicky kompatibilné). Do objavenia technológie reprogramovania buniek podmienku autológnej terapie nespĺňali žiadne pluripotentné kmeňové bunky. Onkologický pacient, devastovaný už samotnou agresívnou protinádorovou liečbou môže vďaka tejto technológii prijať terapeutické bunky, ktoré nie je nutné „ochrániť“ pred predačným tlakom imunitného systému v dôsledku imunologickej inkompatibility použitím imunosupresívnych liečiv⁴. Samotné terapeutické bunky je pritom vo väčšine prípadov možné pripraviť v dostatočnom množstve z malého množstva krvi alebo kožnej biopsie už v priebehu niekoľkých týždňov.

Indukovaná pluripotencia a nádorové kmeňové bunky

Nemenej dôležitú možnosťou využitia technológie prípravy indukovaných kmeňových buniek predstavuje dediferenciácia nádorových buniek do tzv. nádorových kmeňových buniek^{4,5}. Nádorové kmeňové bunky predstavujú minoritnú populáciu buniek s potenciálom regenerovať nádor po terapeuticko-terapeutickej intervencii⁵. Ich prítomnosť už bola dokázaná v rozličných typoch nádorov⁶. Nádorové kmeňové bunky (označované aj ako „cancer stem cells“) sa vyznačujú značnou mierou rezistencie voči chemoterapeutikám a rádioterapii. Táto rezistencia sa využíva aj pri experimentálnom dôkaze ich prítomnosti v nádorovom tkanive. Zaujímavá je schopnosť ich progresie v *in vitro* podmienkach v 3D kultúrach⁷ (väčšina typov buniek totiž pri nemožnosti „ukotvenia“ na povrch kultivačnej platničky po niekoľkých pasážach zahynie), táto schopnosť sa tiež využíva pri ich štúdiu. Viaceré štúdie dokázali, že niektoré podmienky, prítomné v tkanive nádoru (hypoxia, nutričný deficit) vedú

k zvýšeniu percentuálneho zastúpenia nádorových kmeňových buniek ako odpovede na vznikajúce stresové podmienky (v tomto procese je možné vidieť analógiu so vznikom rezistentných foriem baktérií). Zvýšenie percentuálneho zastúpenia nádorových kmeňových buniek však nemusí vyplývať z „prerušenej“ dormancie týchto záložníckych buniek a následnej mitotickej aktivity. Naopak, samotné nádorové kmeňové bunky môžu vzniknúť *de novo* v procese dediferenciácie viac, či menej diferencovaných buniek pod vplyvom exprese kombinácie určitých transkripčných faktorov. Práve tento poznatok umožnil experimentálnu prípravu a štúdium nádorových kmeňových buniek pomocou indukovanej pluripotencie. V rámci jedného takého experimentu sa autorovi podarilo pripraviť technológiou indukovanej pluripotencie nádorové bunky s vyšším percentuálnym zastúpením nádorových kmeňových buniek (originálne bunky, použité na reprogramovanie pochádzali z bunkovej línie ľudského pankreatického adenokarcinómu), čo sa prejavilo takmer 12-násobným zväčšením objemu nádoru oproti nádoru, vzniknutom po injikovaní nereprogramovaných buniek v experimentálnom zvierati – atymickej myši (Obr. 1).



Obr. 1: Indukovaná pluripotencia a jej potenciálne využitie v onkologickom výskume a regeneratívnej medicíne. Zdroj fotografií – vlastné experimenty.

Terapia nádorov pomocou indukovanej pluripotencie

Úspešné reprogramovanie somatickej bunky do štádia pluripotencie alebo do indukovanej pluripotentnej kmeňovej bunky je v experimentálnych podmienkach nutné dokázať pomocou tzv. *teratoma assay* metódy (Obr. 1). Pluripotentné kmeňové bunky majú totiž po injikovaní do podkožia alebo svalu (možné sú aj iné miesta transplantácie) imunodeficientnej (tzv. *nude*) myši schopnosť vytvoriť po niekoľkých týždňoch *teratóm* – nádor tvorený bunkami, ktoré charakterizujú tri embryonálne zárodočné vrstvy (ektoderm, endoderm a mezoderm). Vytvorenie benígneho nádoru (teratómu) je praktickým potvrdením úspešne realizovaného procesu reprogramovania (nereprogramované somatické bunky nemajú schopnosť vytvoriť teratóm).

Viaceré vedecké tímy, pracujúce v oblasti onkologického výskumu si položili otázku, či je rovnako možné do štádia pluripotencie reprogramovať aj agresívne typy nádorových buniek a či by sa takto reprogramovaná bunka následne prejavila *in vivo* vytvorením „iba“ teratómu a nie agresívnym nádorom s veľmi malígnym fenotypom⁴. Predstava je rovnako absurdná, ako lákavá (z dôvodu, že v prípade niektorých neliečiteľných malignít jednoducho nevieme ako ďalej). Predstavme si situáciu, ktorá by snád v prípade prekonania všetkých technologických prekážok snád nemusela byť úplne absurdnou – pacientovi s diagnózou PDAC (duktálny adenokarcinóm pankreasu) by sa (snád pomocou transkripčných faktorov, viazaných na nanočastice alebo pomocou chemického kokteilu) lokálne reprogramoval nádor do štádia pluripotencie, v dôsledku čoho by následne došlo k jeho premene na relatívne neškodný teratóm. Viaceré *in vitro* štúdie už prebehli na rozličných typoch nádorov (osteosarkóm, nádor prostaty, prsníka apod.) s výsledkami, ktoré možno považovať za relatívne optimistické. Spomínané štúdie však zároveň ukázali, že v prípade neúplného reprogramovania nádorových buniek dochádza k vzniku veľmi agresív-

ných foriem nádorov (pravdepodobne v dôsledku indukcie už spomenutých nádorových kmeňových buniek). Liečba nádorov pomocou technológie reprogramovania buniek by preto mohla byť značne riziková (dopraviť potrebné transkripčné faktory kvantitatívne v *in vivo* podmienkach, v organizme pacienta totiž vôbec nie je triviálna záležitosť) a jej použitie by muselo byť podmienené rozsiahlymi klinickými testami a testami bezpečnosti. V každom prípade nemožno ignorovať potenciál takejto technológie vo vzťahu k malignitám.

Indukovaná pluripotencia pri testovaní chemoterapie

Zmeny vo fenotype nádorovej bunky, prechádzajúcej procesom reprogramovania do štádia s nižšou formou diferenciácie je nutné študovať aj vo vzťahu k návrhu nových kandidátnych liečiv a chemoterapeutík. Pokiaľ by bolo možné pomocou tejto technológie identifikovať liečivá, účinne zaberajúce na rôzne štádia diferenciácie nádorovej bunky, takáto terapia by sa následne dala nazvať „dynamickou“ alebo „heuristickou“ (heuristická analýza pri návrhu antivírusových softvérov dokáže predikovať novo vznikajúce formy počítačových vírusov). Zmeny fenotypu nádorovej bunky pri reprogramovaní *in vivo* alebo *in vitro* prebiehajú na genetickej a epigenetickej a na úrovni metylácie DNA. Pri reprogramovaní niektorých typov nádorových buniek dochádza k „silencingu“ nádor špecifických epigenetických zmien, k aktivácii nádor-supresorových génov a k supresii onkogénov. Terapia, zasahujúca originálne nádorové

bunky, ako aj bunky v rôznom štádiu reprogramovania by sa takto mohla stať univerzálnejšou a efektívnejšou.

Záver

Objavenie technológie indukovanej pluripotencie umožňujúcej prípravu autológnych terapeuticky aplikovateľných buniek a prípravu *in vitro* modelov pre ochorenia, pri ktorých je zdroj testovaných buniek nedostupný (resp. dostupný len za cenu veľmi invazívnych zákrokov) otvorilo nové možnosti aj v oblasti onkologického výskumu. Možnosť reprogramovať nádorovú bunku do štádia pluripotencie s následnou riadenou diferenciáciou do buniek s nemalígnym fenotypom je možné považovať za výzvu v oblasti výskumu nových onkoterapií. Aj keď podobné vízie sú ešte stále len v rovine experimentálnych realizácií, progres v oblasti výskumu indu-

kovanej pluripotencie dáva nádej, že terapie založené na princípe dediferenciácie nádorovej bunky, spojené s vymazaním nádorového fenotypu pôvodnej bunky, budú v blízkej budúcnosti oveľa bližšie k realite. Dovtedy významnou úlohou indukovaných pluripotentných kmeňových buniek v oblasti onkológie a regeneratívnej medicíny ostáva možnosť prípravy autológnych buniek, použiteľných na regeneráciu tkaniva poškodeného progresiou nádoru alebo terapeutickou intervenciou.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore *Agentúry na podporu výskumu a vývoja* (APVV-21-0372). Projekt podporil aj výskumný program č. 18 „Preklinické testovanie potenciálnych liečiv“ Strategie AV21 (Akademie věd ČR) a projekt Institucionální podpory RVO: 67985904.

Literatura

1. Takahashi K, Yamanaka S: Cell. 126(4), 663 (2006).
2. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/summary/>, stiahnuté 23. novembra 2022.
3. Kim J, Zaret, KS: The EMBO journal. 34(6), 739 (2015).
4. Barczak W, Golusiński P, Luczewski L, et al.: Biotechnology letters 38(10), 1665 (2016).
5. Vlasi E, Pajonk F: Seminars in cancer biology, 31, 28 (2015).
6. Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, et al.: Frontiers in immunology 11, 1280 (2020).
7. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, et al.: Cancer science 108(3), 283 (2017).

Souhrn

Strnádel J., et al.: Technológia reprogramovania nádorových buniek a jej terapeutický a experimentálny potenciál v onkológii
Objev indukované pluripotence v roce 2006 umožnil revoluční způsob získávání autologních terapeuticky aplikovatelných buněk, a možnost modelovat jakékoliv onemocnění v *in vitro* podmínkách. Možnost vrátit libovolnou, finálně diferencovanou buňku „v čase“ zpátky do stádia pluripotence je zajímavé i pro oblast onkologického výzkumu. Tato technologie umožnila studium procesů spojených s rozvojem nádorového fenotypu buňky a taky s přechodem nádorové buňky do stádia s nižší mírou diferenciace. Reprogramování buněk do indukovaných pluripotentních kmenových buněk také pomáhá mnohem lépe studovat raritní populaci buněk, přítomných v nádorech – tzv. nádorové kmenové buňky. Indukovaná pluripotence některých typů nádorových buněk, spojená s jejich následnou řízenou diferenciací by se zároveň mohla stát jednou z možných terapeutických aplikací v onkológii.

Klíčová slova: indukované pluripotentní kmenové bunky, indukovaná pluripotencie, reprogramování buněk, teratom, dediferenciace, terapie rakoviny

Summary

Strnádel J., et al.: Tumor cell reprogramming technology and its therapeutic and experimental potential in oncology

Discovery of technology of induced pluripotency that allows the generation of autologous therapeutically applicable cells and generation of *in vitro* cell models for diseases with limited (or highly invasive) access to tested cells has also opened new horizons in the field of oncology research. The unique ability to reprogram the cancer cell into pluripotency with subsequent directed differentiation into cell with no malignant phenotype should be considered as a challenge in the field of new oncotherapy development. Although still considered to be realistic only on the level of experimental approach, the recent progress in the field of induced pluripotency gives the hope that dedifferentiation-based therapies connected with the erase of malignant phenotype of original cancer cell will be more realistic in near future. By then, the most important role of induced pluripotency in oncology remains in the field of regenerative therapy as a source of autologous cells for regeneration of tissues or organs damaged by tumor growth or aggressive therapy

Keywords: induced pluripotent stem cells, induced pluripotency, cell reprogramming, teratoma, dedifferentiation, cancer therapy

MODELOVÉ CUPREDOXINY (AZURIN A DALŠÍ) VYUŽÍVANÉ PRO STUDIUM STRUKTURNĚ FUNKČNÍCH VZTAHŮ ELEKTRON-TRANSPORTNÍCH SYSTÉMŮ PROTEINOVÉ POVAHY

Roman Tuzhilkin, Miroslav Šulc

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

Úvod – Cupredoxiny a jejich struktura

Jednou z mnoha skupin proteinů jsou proteiny schopné vazby iontů kovů, v kterých hrají tyto kovy jednak strukturní, ale i funkční roli. V závislosti na specifitě vázaného kovu mohou takové proteiny vykazovat redoxní vlastnosti a tak se účastnit elektron-transportních (z angl. electron transfer, ET) dějů. Významnou rodinou takových metaloproteinů jsou cupredoxiny (angl. Blue Copper Proteins).

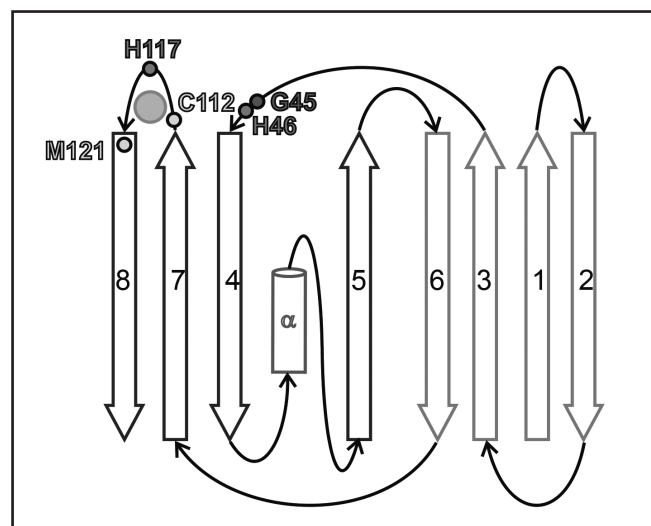
Cupredoxiny jsou malé ve vodě dobře rozpustné redoxně aktivní proteinové přenašeče jednoho elektronu bez další vlastní katalytické aktivity a jak již název napovídá, obsahují ve své struktuře atom mědi (Cu lat. *Cuprum*). Jedním ze známých zástupců této skupiny je protein plastocyanin, který se podílí na ET přenosu při fotosyntéze rostlin a řas, kde přenáší elektrony z cytochromu b_6f na fotosystém I. Dalším příkladem proteinu z této skupiny je rusticyanin, který přenáší elektrony při anaerobní oxidaci $Fe(II+)$ na $Fe(III+)$ u bakterií (*A. ferrooxidans*), konkrétně mezi cytochromem c Cys2 a cytochromem c_4 -typ Cys1. Do skupiny cupredoxinů patří též další proteiny: azurin, stellacyanin nebo amicyanin¹.

Díky snadnému přechodu mezi dvěma oxidačními stavy atomu mědi, $Cu(I+)$ a $Cu(II+)$, patří měď spolu se železem k nejvíce využívaným biogenním iontům kovů (d-prvků) pro ET děje v prokaryotních i eukaryotních organismech. Iont $Cu(II+)$ s neúplně zaplněným d^9 orbitalem tvoří paramagnetické a barevné komplexy, zatímco v $Cu(I+)$ je d^{10} orbital iontu diamagnetický a jeho komplexy jsou bezbarvé¹. Komplexy $Cu(II+)$ v organismech můžeme rozdělit podle doménové organizace na šest typů: typ 1, typ 2, typ 3, CuA, CuB a CuZ². U většiny cupredoxinů (např. plastocyanin, rusticyanin, amicyanin) se vyskytuje Cu centrum prvního typu (typ 1). Toto centrum můžeme také nalézt u řady enzymů jako jsou například askorbát oxidasa (EC 1. 10. 3.3, PDB 1AOZ) nebo NO_2^- reduktasa (nitrit reduktasa, EC 1. 7. 2.1)^{1,3}. Enzym nitrit reduktasa (*P. denitrificans*) kromě centra typu 1 obsahuje i centrum typu 2 a tato dvě centra mohou evokovat podobnost s centrem typu CuA, které obsahuje koordinované 2 atomy Cu. Tato podobnost byla zkoumána z důvodu možného evolučního vývoje center typu 1, 2 a CuA a také z pohledu strukturně-funkčních fylogenetických souvislostí^{4,5}.

Centrální ion mědi je v cupredoxinech koordinován silnými interakcemi s atomy nejen postranních řetězců blízkých aminokyselin. Ve většině případů je koordinací sféra tvořena pomocí dvou atomů dusíku Nε v imidazolovém cyklu dvou postranních řetězců aminokyselin histidinu (His) a atomem síry Sy aminokyseliny

cysteinu (Cys). Obě vazby $Cu(II+)$ -Nε(His) jsou krátké a pevné a jejich délka se pohybuje v rozsahu vzdáleností 1,9 až 2,1 Å. Vazba $Cu(II)$ -Sy(Cys) je o něco delší a pohybuje se v rozmezí 2,1 až 2,3 Å^{1,3}. Čtvrtým ligandem koordinovaným na Cu je typicky, ale ne vždy atom síry Sδ methioninu, který tvoří kompletní koordinací sféru $Cu(II+)$ iontu. Tato axiální vazba $Cu(II)$ -SδMet je ovšem slabší než ostatní, její délka se pohybuje mezi 2,8 a 3,1 Å¹.

Cupredoxiny jsou tvořeny ve své primární struktuře řetězcem 90 až 160 aminokyselin¹. V roce 1978 byla publikována na základě rentgenostrukturní analýzy krystalu první 3D struktura cupredoxinu plastocyaninu⁶, na kterou navázalo mnoho dalších krystalografických studií. Obecně je prostorová struktura cupredoxinů formována různým počtem sekundárních motivů, α-helixů a také β-struktur, které ale v celku vytvářejí téměř ve všech cupredoxinech strukturu osmi β-skládaných listů formovaných do β-soudku s motivem Řeckého klíče (angl. Greek key β-barrel) (Obr. 1), včetně již zmíněných enzymů nitrit reduktasy, plastocyaninu, či azurinu^{4,7}. Současně z již získaných rentgenostrukturních dat lze konstatovat, že 3D uspořádání páteře proteinu cupredoxinů vykazuje v okolí centrálního iontu kovu



Obr. 1: Diagram znázorňující topologii sekundární struktury azurinu: β-struktury skládaného listu jsou znázorněny šipkami (čísla jsou odlišeny dvě uspořádání s motivem Řeckého klíče – 1,2,3 a 6 / 4,5,7,8), α-helix je znázorněn válcem, ligandy (aminokyseliny koordinací sféry) ionu mědi jsou znázorněny korálkem s popisem třípísmenným kódem aminokyseliny a pozicí v primární sekvenci azurinu, centrální atom mědi je znázorněn šedivým kruhem. Obrázek upraven z původní práce Liu a spolupracovníci (2014)⁸.

značnou míru strukturní podobnosti a to nejen motivem, ale i vlastním uspořádáním smyček a jejich vzájemnou orientací a geometrií⁸.

Redox vlastnosti Cupredoxinů

Cupredoxiny v přírodě pokrývají velkou škálu redoxních potenciálů (E^0). Počínaje stellacyaninem (*Rhus vernicifera*) s potenciálem ~ 184 mV (**koordinační sféru** tvoří aminokyseliny **His46, Cys89, Gln89, His94**), přes azurin (*P. aeruginosa*) s potenciálem ~ 310 mV (**koordinační sféru** a blízké okolí tvoří aminokyseliny Met44, **Gly45, His46, Asn47, Cys112, Phe114, Gly116, His117 a Met121**), až po rusticyanin (*A. ferrooxidans*) s potenciálem ~ 680 mV (**koordinační sféru** a blízké okolí tvoří aminokyseliny Phe83, **Gly84, His85, Ser86, Cys138, Ile140, His143 a Met148**). Tyto potenciály se stanovují ve srovnání se standardní vodíkovou elektrodou a vyjadřují míru schopnosti redoxního systému převést jednoho z reaktivních partnerů do oxidovaného stavu. Čím je $E^0 > 0$, tím je redoxní partner lepším oxidačním činidlem. Naopak čím je $E^0 < 0$, tím je lepším redukčním činidlem. V elektron-transportním řetězci se redoxní potenciály všech participujících přenašečů postupně zvyšují, a tak se tyto přenašeče snáze redukují, např. kyslík (E^0 0,82 V)⁹ na konci dýchacího řetězce se redukuje nejsnadněji.

Redoxní potenciál přirozeně se vyskytujícího se azurinu (WT, angl. Wild Type) v bakterii *P. aeruginosa* se pohybuje v rozmezí hodnot 310 až 360 mV a to v závislosti na podmínkách a metodice stanovení¹⁰. Azurin lze ale také různě modifikovat pomocí místně cílená mutagenese (z angl. Site-Directed Mutagenesis) nebo záměnou typu centrálního iontu kovu v aktivním centru. Takto modifikované azuriny pak vykazují širší škálu redoxních potenciálů než vlastní azurin WT, obvykle poskytují hodnoty přibližně ve škále od 90 mV do 640 mV¹¹. Nejvyššího dosud dosaženého redoxního potenciálu až 970 mV se podařilo dosáhnout u azurinu modifikovaného záměnou aminokyselin (Met44Phe, Asn47Ser, Phe114Asn, Gly116Phe a Met121Leu). Naproti tomu nejnižšího potenciálu bylo dosaženo u niklem substituovaných analogů azurinu: pro záměnu aminokyselin (Asn47Ser, Phe114Asn, a Met121Leu) hodnotu -590 mV¹², pro niklem substituovaný WT hodnotu -810 mV, a nejnižší hodnota -954 mV byla popsána u niklem substituovaného proteinu se záměnou aminokyseliny Met121E¹³.

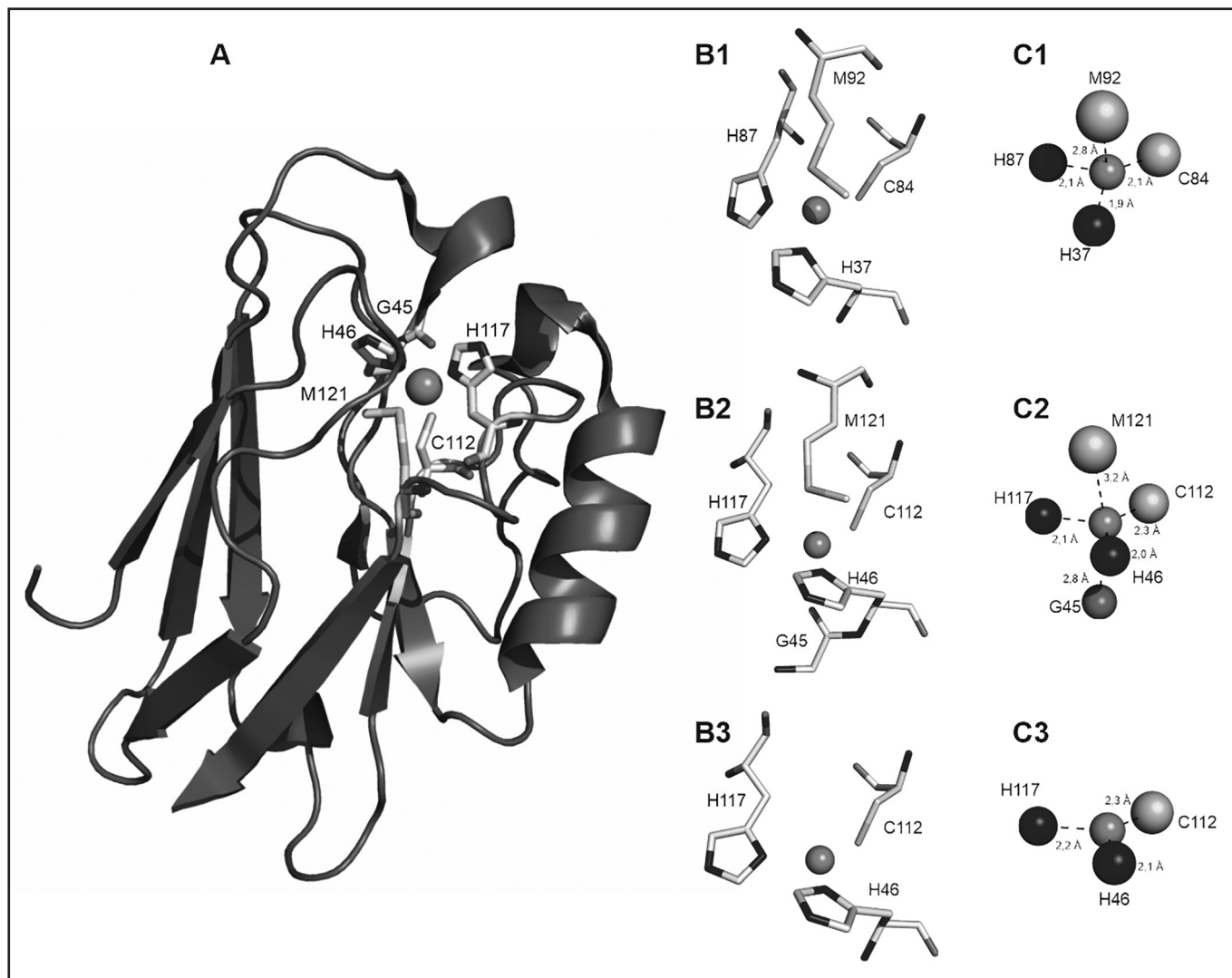
Pro studium modifikací redox vlastností azurinu byly využito aminokyselinových záměn v pozici axiálního ligandu Met121 s použitím různých aminokyselin analogů (oxomethioninu/222 mV, Met121Gln/285 mV, Met/310 mV, difluoromethioninu/329 mV, selenomethioninu/348 mV, trifluoromethioninu/379 mV, Met121Leu/Phe/Thr/412 mV, či norLeu/449 mV). Při těchto záměnách docházelo k minimálním strukturním perturbacím Cu centra (data z EPR spekter) a minimálním změnám UV-ViS spektroskopických charakteristik (drobný „blue shift“ pásu přenosu náboje kopírující trend rostoucí elektronegativity ligandu), avšak byl zaznamenán značný rozdíl hodnot redukčních potenciálů (více jak 227 mV)^{14,15}.

Azurin – struktura a funkce

Azurin je jedním z nejvíce studovaných malých modelových cupredoxinů z pohledu jednoelektronových přenosů v průběhu ET a redoxních procesů v řadě biologických systémů (anaerobní respirace, oxidativní deaminace primárních aminů či denitrifikace). Současně je zkoumán také vliv modifikace jednotlivých aminokyselin jednak na stabilitu aktivního centra azurinu¹⁶ ale také na redoxní stav iontu mědi¹³. Studie z roku 2005 pojednává o roli a vlivu samotného kovového iontu při stabilizaci a tvorbě 3D struktury vlastního proteinu¹⁷.

Primární sekvence azurinů je tvořena řetězcem 120 až 130 aminokyselin, je tedy o něco větší než plastocyanin. Již zmiňovaný azurin z *Pseudomonas aeruginosa* (PDB kód 4AZU) obsahuje 128 aminokyselin s hodnotou teoretického izoelektrického bodu 5,72¹⁸. Experimentálně zjištěné (např. izoelektrickou fokusací) i teoreticky vypočtené hodnoty pI azurinu se liší v závislosti na metodice stanovení a hodnota se pohybuje v rozsahu od 5,7 do 5,4^{19,20,21}. Také sekundární struktura azurinu se od plastocyaninu mírně liší. Plastocyanin (PDB kód 4PCY) obsahuje pouze jeden α -helix, zatímco azurin má ve své sekundární struktuře jeden α -helix navíc¹. Nicméně jak již bylo zmíněno, oba tyto proteiny obsahují strukturu specifickou pro cupredoxiny (z angl. cupredoxin fold), kterou je β -soudek dvou motivů Řeckého klíče⁴.

Koordinační sféra Cu u azurinu je mírně odlišná od ostatních cupredoxinů (Obr. 2). Tato sféra je tvořena na rozdíl od plastocyaninu (atom mědi je koordinován čtyřmi aminokyselinovými ligandy: His37, His87, Cys84, Met92) pěti ligandy v uspořádání trigonální bipyramidy se základnou tvořenou dvěma atomy dusíku His46 a His117 a jedním atomem síry Cys112. V jedné axiální poloze se nachází atom síry Met121. Druhou axiální polohu zaujímá jako pátý ligand karbonylový kyslík Gly45¹. Stablnější komplex s koordinačním číslem pět, který má tvar deformované trigonální bipyramidy vykazuje spíše měďnatý kation Cu(II+). Tvar koordinačního okolí je ovšem závislý na oxidačním stavu centrálního iontu mědi. Měďný kation Cu(I+) upřednostňuje spíše koordinaci se třemi (His46, His117, Cys112) ligandy ve tvaru trigonálně planárním^{22,23,24}. Je zajímavé, že změna oxidačního stavu centrálního iontu mědi ovlivňuje i hodnotu isoelektrického bodu azurinu: hodnota pI Cu(I+) je 5. 6. Současně ztráta centrálního iontu vede u apo-formy k hodnotě pI 5.8²⁵. Na rozdíl od plastocyaninu, který vytváří v koordinační sféře pouze jednu vodíkovou vazbu v okolí Cys84 (zřejmě díky sterickému ovlivnění blízkým Pro v pozici 86), je u azurinu kromě nejbližšího okolí centrálního iontu, primární koordinační sféry, i síť vzdálenějších vodíkových můstků, sekundární koordinační sféra, která také může ovlivňovat jeho vlastnosti a to jak chráněním Cu-vazebního místa před působením vody, zvýšením redukčního potenciálu a snížením reorganizační energie pro ET. Především vodíkové vazby v okolí atomu síry Sy Cys112, které jsou tvořeny s amidovým dusíkem páteře sousedního Asn47 a Phe114 (o délce 3.6 Å, respektive 3.4 Å), vytvářejí tetrahedrální geometrii spolu s S–Cu koordinační vazbou (o délce 2.27 Å) a S–C β kovalentní vazbou. Kromě těchto dvou



Obr. 2: Prostorové uspořádání struktury vybraných cupredoxinů: A) 3D struktura cupredoxinu azurinu z *P. aeruginosa* (PDB struktura 4AZU): dva ekvatoriální histidiny (His46 a His117), jeden ekvatoriální cystein (Cys112), axiální methionin (Met121) a k němu v trans-poloze přítomný karbonyl glycinu (Gly45) jsou znázorněny tyčkovým modelem, atom Cu. **B)** Koordinační sféra s preferovanou strukturou okolí centrálního iontu mědi: **B1)** plastocyaninu Cu(II+) (PDB struktura 1PLC), **B2)** azurinu Cu(II+) (PDB struktura 4AZU), **B3)** plastocyaninu Cu(I+) (PDB struktura 1E5Y). **C)** Preferované koordinační okolí iontu Cu v jednotlivých 3D strukturách cupredoxinů, vzdálenosti byly stanoveny a jsou vyjádřeny v jednotkách Å s použitím programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.3 Schrödinger, LLC).

vodíkových vazeb popsaných v okolí Cys112, jsou další tvořeny amidovou skupinou postranního řetězce Asn47 s karbonylem a hydroxy-skupinou Ser113, a v okolí se vyskytují i interakce His46-Phe115, His117-molekula⁸.

Koordinační sféra a redox stav centrálního iontu mědi či jeho záměna za jiný ion kovů významně ovlivňuje hodnotu molárního absorpčního koeficientu a tedy i UV-ViS charakteristiky, které se také mohou lišit v závislosti na metodice daného měření a na jeho podmínkách stanovení. Při spektrofotometrickém měření Cu (II+) azurinu vykazuje UV-ViS spektrum dvě maxima při vlnových délkách 280 nm a 630 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} \sim 9000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a $\epsilon_{630\text{nm}} \sim 5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)²⁶. Předpokládá se, že absorpce záření o vlnové délce 600 nm odpovídá LMCT přechodu $\text{S}(\text{Cys})\text{p}\pi \rightarrow \text{Cu}_{x-2-y}^{2-2}$ (z angl. ligand to metal charge transfer)¹⁵, kdežto série slabých absorpčních maxim v rozsahu vlnových délek 650 – 1050 nm odpovídá přechodu $d \rightarrow d$ nebo pře-

chodu ligandového pole²⁷. Protože maximum při vlnové délce 280 nm odpovídá přítomnosti aromatických aminokyselin a je typické pro proteinovou složku, lze poměrem hodnot absorpčních při daných vlnových délkách 630 nm/280 nm lze také určit čistotu preparátu azurinu (pro azurin nabývá teoretický poměr hodnoty 0,6 a pro skutečné preparáty v závislosti na proteinové čistotě či obsahu Zn/Cu dosahuje hodnot 0,3 – 0,5). Přenos elektronu a změna oxidačního stavu centrálního atomu mědi na Cu(I+) vede k výraznému poklesu hodnoty maxima absorpce při 630 nm, což lze s úspěchem využít pro stanovení či charakterizaci ET přenosu. Záměna centrálního iontu mědi například za zinek vede k ztrátě maxima absorpce při 630 nm a také redox vlastností azurinu.

Atom Cu může být v azurinu WT nahrazen jinými ionty kovů, například Ni(II+)²⁸, Co(II+)²⁹ nebo Zn(II+)³⁰ což vede nejen k zvýšení hodnoty pl pro všechny uve-

Tabulka I: Délky koordinačně kovalentních vazeb v koordinační sféře azurinu s rozdílným centrálním iontem kovu (M). Délky vazeb jsou uvedeny v Å. Dále je uvedeno jejich pH v izoelektrickém bodě a PDB kód. Převzato, doplněno a upraveno³³.

azurin (<i>P. aeruginosa</i>)	pH	M-N3 (His46)	M-S (Cys112)	M-N3 (His117)	M-S (Met121)	M-O (Gly45)	PDB
Cu(II+)	5,5	2,08	2,24	2,01	3,15	2,97	4AZU
Ni(II+)	5,7	2,15	2,49	2,07	3,34	3,35	1NZR
Co(II+)	5,7	2,39	2,34	2,27	3,56	2,23	1VLX
Zn(II+)	5,7	2,07	2,3	2,01	3,38	2,32	1E67

dené kovy, ale i ke strukturním změnám v koordinační sféře centrálního iontu kovu se změnou jejich vlastností (Tabulka I). Pokud je atom Cu(II+) ve struktuře azurinu nahrazen atomem Zn(II+), změní se geometrie koordinační sféry z trigonální bipyramidy na nepravidelný tetraedr. Ligand Met121 přestává být koordinován na Zn(II+), kovový ion a karbonylový kyslík Gly45 se k sobě více přiblíží a délka vazby se zkracuje o 0,03 nm³⁰. Pokud je atom Cu nahrazen atomem Ni, délka vazby mezi kovovým atomem a ligandy Cys112 a Gly45 se výrazně zvětší. Vazba s His117 zůstává prakticky stejná a délky vazeb s ostatními ligandy se zvětší jen nepatrně. V případě náhrady atomu Cu za atom Co, dojde k výraznému zvětšení délek koordinačně kovalentních vazeb s ligandy His46, His117 a Met121. Délka vazby s Cys112 se nepatrně zvětší a naopak délka vazby s Gly45 se zmenší. Ačkoli jsou Ni(II+) i Co(II+) redoxně aktivní ionty, Ni-azurin a Co-azurin jsou ve vodných roztocích redoxně neaktivní³¹. Azurin obsahující zinek také není redoxně aktivní, protože samotný atom Zn může mít jen jeden možný oxidační stav a to Zn(II+)³².

Azurin – fyziologická funkce

Jak již bylo řečeno, azurin se například podílí na anaerobní respiraci³⁴ nebo také na oxidativní deaminaci primárních aminů³⁵. Můžeme jej najít u denitrifikačních bakterií jako jsou *Pseudomonas* nebo *Alcaligenes*, ve kterých se účastní procesu denitrifikace. Denitrifikace je součástí koloběhu dusíku a některé půdní organismy ji používají k získání energie. Při tomto procesu jsou dusitany/dusičnany redukovány přes oxidy dusíku (N₂O, NO) až na plynný N₂, který je uvolňován do atmosféry. Tyto redukční reakce jsou katalyzovány enzymem nitritreduktasou. Azurin při procesu denitrifikace přenáší elektrony z cytochromu c₅₅₁ právě na tento enzym^{28,36}. Elektrony jsou transportovány z NADH na NO_x reduktasy (např. nitrát nebo nitrit reduktasy) přes komplex I, ubiquinon/ubichinol, komplex III a cytochrom c. V průběhu tohoto procesu jsou protony pumpovány přes membránu komplexem I, komplexem III a cytoplasmatickou nitrát reduktasou. Celková bilance je 6 protonů na přenos jednoho elektronového redox páru³⁷. Principem všech elektron-transportních řetězců je přenos elektronu z donoru s vysokým potenciálem (NADH/
/NAD⁺ E° = +320 mV) na akceptor s nízkým potenciálem (aerobně: O₂ E° = -820 mV, nebo anaerobně: např. NO₃ E° = -400 až -700 mV) za tvorby H⁺ gradien-

tu na membráně. K tomuto procesu nedochází jedním krokem, ale je rozdělen do několika ET procesů s využitím intermediárních přenašečů. Roli intermediárních přenašečů v dýchacím řetězci plní především molekuly na bázi nikotinových, flavinových a chinonových kofaktorů nebo metaloproteiny či hemoproteiny s rozdílnou hodnotou E°. Je pozoruhodné, že celou škálu v přírodě používaného rozsahu potenciálů (-700 až 800 mV) lze pokrýt kombinací pouze tří typů metaloproteinů: Fe-S proteinů (E° v rozsahu -700 až 500 mV), cytochromů (E° v rozsahu -500 až 350 mV) a cupredoxinů (E° v rozsahu 100 až 800 mV). Nicméně jak již bylo řečeno, v laboratoři lze dosáhnout modifikací samotného azurinu pomocí místně cílené mutagenese a kombinací záměny centrálního iontu (Cu a Ni) hodnot potenciálů E° v rozsahu hodnot od -1,0 až po +1,0 V¹³.

Azurin – využití pro studium ET přenosu

Přenos elektronu mezi proteiny je jednou ze základních biochemických reakcí stěžejních nejen pro energetický metabolismus. Uplatňuje se například při fotosyntetických procesech v rostlinách, přenosech v dýchacím řetězci při aerobní či anaerobní (např. bakterie) respiraci nebo procesech sekundárního metabolismu (např. odbourávání xenobiotik v 1. fázi biotransformace)³. Každá redox reakce, která vede k přenosu elektronu, vyžaduje nejméně dva partnery – oxidovaný akceptor elektronu a redukovaný donor elektronu. Výsledkem přenosu je redukovaný akceptor a oxidovaný donor³⁸. Od 90. letech minulého století byla vyslovena řada různých hypotéz o mechanismech tohoto přenosu. Některé z nich předpokládaly, že transport elektronu od donoru k akceptoru nezávisí na detailní struktuře proteinu a protein se chová jako homogenní medium (podobný „organickému sklu“). Naproti tomu další mechanismus předpokládá, že se protein chová jako heterogenní medium a transport probíhá definovanou cestou, která zahrnuje určité kovalentní a vodíkové vazby³⁹. V současnosti se přikláníme k mechanismu ET, který úzce souvisí se strukturou proteinu (intraproteinový ET) nebo celého intermediárního redox komplexu (interproteinový ET). Kromě těchto čistě korpuskulárních modelů je třeba zmínit také kvantový pohled, který se uplatňuje při interpretaci řady ET jevů. Pro studium ET jsou využívány proteiny modelových cupredoxinů (plastocyanin, azurin a další) s modifikací (obvykle komplexem iontu přechodného kovu, který

vytváří jedno z redoxních míst: donor nebo akceptor). V následujícím textu se zaměříme na výsledky výzkumu ET autorů H. B. Graye a J. R. Winklera se spolupracovníky na modelovém cupredoxinu azurinu, při kterém byly popsány mechanismy těchto procesů spolu s jejich kinetikou pomocí kinetických parametrů a tak byl vytvořen základ a upřesnění představ a hypotéz ET.

Jedním z možných a využívaných systémů pro studium ET přenosu mezi Cu(II+) azurinu a komplexem iontu kovů navázaným na povrchovou aminokyselinu azurinu v různých polohách je komplex iontu Re(I+) , v kterém jsou koordinovány tři pozice molekulou CO, jedna molekulou 4,7-dimethyl-1,10-fenantrolinu (z angl. 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline, dmp) a poslední pozice je koordinována atomem dusíku heterocyklického imidazolu postranního řetězce histidinu umístěným v poloze na povrchu proteinu. Konkrétním příkladem je poloha 124 (His124) $[\text{Re(I+)}(\text{CO})_3(\text{dmp})(\text{His124})]$, kdy tento His124 je zaměněn za v přirozeném proteinu přítomný threonin, který je lokalizován na povrchu proteinu v C-terminální struktuře β -skládaného listu. Současně daný protein nese tři různé záměny v pozici 122, kde přirozeně přítomný Lys je nahrazován postupně Tyr, Trp anebo Phe ($\text{mutLys122Tyr}/\text{mutLys122Trp}/\text{mutLys122Phe}$) pro studium ET přenosu v závislosti na charakteru tohoto přestupního můstku v blízkosti Met121 (jeden z ligandů centrálního iontu Cu(II+)) a tedy ve vhodné vzdálenosti od donoru i akceptoru elektronu²². Vzdálenost Re(I+) od indolového cyklu postranního řetězce Trp122 je 8.9 Å a celková vzdálenost k centrálnímu iontu mědi je 19.4 Å (PDB struktura 2I7O). Současně s ohledem na protokol modifikace povrchového His124 komplexem Re byl substituován povrchový histidin v pozici 83 za glutamin (mutHis83Gln) aby nedocházelo k paralelní parazitické vazbě Re-komplexu na pozici 83. Po excitaci komplexu s jednomocným rheniem elektromagnetickým zářením (z angl. photoinduced electron transfer), který je vázán na His124, je elektron dočasně lokalizován v π -konjugovaném systému dmp (z angl. metal-to-ligand-charge-transfer: přenos elektronu, z atomového orbitalu kovu do molekulového orbitalu ligandu), který je v rovnováze se systémem aniont radikálu ligandu dmp ($\text{dmp}^{\bullet-}$) s elektronovým přenosem z Trp122 a ion Re(II+)^* se dostává zpět do svého základního stavu Re(I+) a vznikající kationt radikál Trp122 ($\text{Trp122}^{\bullet+}$) je redukován jednomocnou mědí Cu(I+) azurinu, která se oxiduje na dvojmocnou Cu(II+) a tak poskytuje spektroskopicky zachytitelnou změnu UV-Vis²². Z výsledků je zřejmé, že přítomnost Trp v pozici 122 umožňuje a upřednostňuje dvoukrokový přeskok elektronu $\text{Cu(I+)} \rightarrow (\text{Trp122})^{\bullet+} \rightarrow \text{Re(II+)}^*$ před mechanismem přímého „tunelování“ elektronu $\text{Cu(I+)} \rightarrow \text{Re(II+)}^*$. V tomto systému je 300x rychlejší (časová konstanta ≈ 40 ns), hodnota vypočtené potenciálové bariéry mezi donorem a akceptorem činí 0,15 eV a energetický rozdíl prvního endergonického kroku přenosu $(\text{Trp122})^{\bullet+}/(\text{Trp122})^0$ a Re(II+)^* komplex/ Re(I+) komplex odpovídá zhruba -0,03 eV a tedy splňuje podmínku maximálního rozdílu, ne většího než 0,2 eV, standardní Gibbsovy reakční energie pro první endergonický krok dvoukrokového ET mechanismu (pro vzdálenosti vyšší než 20 Å). Naproti tomu

v případě přítomného Phe122 nebo Tyr122 je hodnota energetického rozdílu přibližně 0,17 eV, což vede k velmi pomalému ET přenosu mechanismem dvoukrokového přeskoku elektronu a z kinetického hlediska bude nejspíše upřednostněn jednokrokový mechanismus tunelování⁴⁰.

Další variantou využití azurinu pro studium ET přenosu donor-můstek-akceptor je tvorba pěti dalších variant s různě povrchově umístěným His s rostoucí vzdáleností donoru a akceptoru (R_{DA} v Å) pro vazbu trojmocného komplexu ruthenia Ru(III+) jako akceptoru a centrální Cu(I+) azurinu jako donoru: $\text{Ru(III+)}\text{His122-Cu(I+)} \approx 15,9$, $\text{His82} \approx 16,9$, $\text{His109} \approx 17,9$, $\text{His124} \approx 20,6$, $\text{His107} \approx 25,7$, a $\text{His126} \approx 26,0$ ⁴¹. Při optimalizovaných experimentálních podmínkách (standardní reakční Gibbsova energie, $\Delta G^0 = -0,7$ eV, a rozpadová konstanta $\beta = 1,1 \text{ Å}^{-1}$) byla závislost doby ET na vzdálenosti redoxních míst podobná místům s propojením prostým alifatickým nasyceným řetězcem $[-(\text{CH}_2)_n-]$ a aromatický charakter systému donor-můstek-akceptor zajišťuje rychlejší přenos, na rozdíl od alifatických uhlovodíků či alifatických postranních řetězců aminokyselin. Na základě porovnání hodnot ionizačních energií alifatických ($\approx 9,6$ eV) a aromatických aminokyselin (Phe $\approx 9,4$ eV, Tyr $\approx 8,5$ eV a Trp $\approx 7,8$ eV) byl vysloven předpoklad, že v proteinech budou pro přenos elektronů upřednostňovány aromatické aminokyseliny před alifatickými⁴².

Obdobný efekt a urychlení ET přenosu nejen díky zvýšení „aromaticity“ ale i vznikem delokalizovaných elektronů heterocyklických struktur (např. páru Trp-Trp), které mohou vytvářet tzv. patrové interakce podobné tvorbě interakcí mezi heterocykly bází uvnitř dvoušroubovice DNA (z angl. „ π - π stacking interaction“) je využití modifikovaného azurinu komplexem rhenia $[\text{Re(I+)}(\text{CO})_3(\text{dmp})(\text{His126})]\text{Trp124Trp122}$, kde celková vzdálenost Re(I+) k centrálnímu iontu mědi je 22.9 Å a vzájemná vzdálenost indolových cyklů postranního řetězce Trp122 a Trp124 je 3.6 – 4.1 Å (PDB struktura 6MJS). Celkové prodloužení dráhy oproti $[\text{Re(I+)}(\text{CO})_3(\text{dmp})(\text{His124})]\text{Trp122}$ vedlo pouze k drobnému nárůstu nicméně řádově shodné hodnotě časové konstanty (≈ 70 ns). Žádná světlem iniciovaná Cu(I+) oxidace komplexem Re(I+) nebyla pozorována u dvou mutací $[\text{Re(I+)}(\text{CO})_3(\text{dmp})(\text{His126})]\text{Phe124Trp122}$ a $[\text{Re(I+)}(\text{CO})_3(\text{dmp})(\text{His126})]\text{Trp124Phe122}$. Proces několikakrokového přeskoku elektronu dramaticky zvyšuje (9000x) možnosti a schopnosti ET přenosu v proteinech, kdy jeden vložený aminokyselinový zbytek Trp akceleroval ET faktorem $\approx 10^2$, zatímco dva arteficiálně vložené sousední Trp v „ π - π stacking“ interakci urychlují ET proces faktorem $\approx 10^4$ oproti jednokrokovému procesu $\text{Cu(I+)} \rightarrow \text{Re(II+)}^*$ mechanismem „tunelování“⁴³.

Závěr

Presentovaný souhrn literárních poznatků ukazuje současné poznatky, používané metodické a experimentální postupy a možnosti výzkumu ET přenosu v proteinech a proteinových komplexech v jejich strukturně funkční souvislostech, které byly publikovány za poslední dvě dekády. Popisované děje na modelových metaloproteinech – cupredoxinech – objasňují, jak je

možné ovlivnit nejen redoxní potenciál (v případě azurinu od hodnot $-1,0$ do $+1,0$ V v závislosti na změnách aminokyselin v koordinační sféře či specifitě a povaze centrálního iontu), spektrální vlastnosti (existence redox závislých maxim UV-ViS spektra), ale i vlastní ET přenos přítomností rozdílných aminokyselinových postranních řetězců (většinou s přítomnými atomy s volnými elektronovými páry) a jednoznačný podíl aroma-

tických aminokyselin na urychlení přenosu elektronu v proteinové struktuře.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory GAČR projektu č. 20-28126S, GAUK projektu č. 1538119 a dále poskytovatele (MŠMT) v rámci projektu SVV 260572/2022.

Literatura

1. Pérez-Henarejos SA, Alcaraz LA, Donaire A: Arch Biochem Biophys. 584, 134 (2015).
2. Nersissian AM, Shipp EL: Adv Protein Chem. 60, 271 (2002).
3. Warren JJ, Ener ME, Vlček Jr. A., et al: Coord. Chem. Rev. 256, 2478 (2012).
4. Savelieff MG, Wilson TD, Elias Y, et al: Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 7919 (2008).
5. Harris RL, Eady RR, Hasnain SS, Sawers RG: Arch Microbiol. 186, 241 (2006).
6. Colman, P, Freeman H, Guss J et al: Nature 272, 319 (1978).
7. Dennison Ch: Coordination Chemistry Reviews 249, 3025 (2005).
8. Liu J, Chakraborty S, Hosseinzadeh P, et al: Chem. Rev. 114, 4366–69 (2014).
9. Berg JM, Tymoczki JL, Stryer L: Biochemistry. 5th edition San Francisco: W. H. Freeman 2002
10. Berry SM, Baker MH, Reardon NJ: J Inorg Biochem 104, 1071 (2010).
11. Marshall NM, Garner DK, Wilson TD et al: Nature. 462, 113 (2009).
12. Sinicropi A: Inorganica Chimica Acta 470, 360 (2018).
13. Hosseinzadeh P, Marshall NM, Chacón KN et al: Proc Natl Acad Sci U S A 113, 262 (2016).
14. Garner DK, Vaughan MD, Hwang HJ, et al: J Am Chem Soc. 128, 15608 (2006).
15. Solomon EI, Penfield KW, Gewirth AA, et al: Inorg. Chim. Acta 243, 67 (1996).
16. Yanagisawa S, Dennison C: J Am Chem Soc. 125, 4974 (2003).
17. Alcaraz LA, Donaire A: FEBS Letters 579(23), 5223 (2005).
18. ExPASy – Compute pI/Mw tool [online, 2022-11-18]. dostupné z: https://web.expasy.org/compute_pi/
19. Augustin A, Davies DM, Sykes AG et al: J Biol Chem 258, 6405 (1983).
20. Margoliash E, Schejter A: Adv Protein Chem. 21, 113 (1966).
21. Bunkute E, Cummins Ch, Crofts FJ, et al: Bioinformatics 31, 295 (2015).
22. Winkler JR; Gray HB: Chem. Rev. 114, 3369 (2014).
23. van Gastel M, Coremans WA, Mol J, et al: J. Biol. Inorg. Chem. 4, 257 (1999).
24. Nar H, Messerschmidt A, Huber R, et al: J Mol Biol. 221, 765 (1991).
25. van de Kamp M, Silvestrini MC, Brunori M et al: Eur J Biochem 194, 109 (1990).
26. Leckner J, Bonander N, Wittung-Stafshede P: Biochimica et Biophysica Acta 1342, 19 (1997).
27. Gewirth AA, Solomon EI: J. Am. Chem. Soc. 110, 3811 (1988).
28. Tsai LC, Sjölin L, Langer V, et al: Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 51, 711 (1995).
29. Bonander N, Vännngård T, Tsai LC, et al: Proteins 27, 385 (1997).
30. Nar H, Huber R, Messerschmidt A, et al: Eur J Biochem. 205, 1123 (1992).
31. Amdursky N, Sepunaru L Raichlin S et al.: Advanced Science 2, 2198 (2015).
32. Lawrance GA: Introduction to Coordination Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd 2009.
33. Warren JJ, Lancaster KM, Richards JH, et al: J Inorg Biochem. 115, 119 (2012).
34. Estrada E, Uriarte E: Comput Biol Chem 29, 345 (2005).
35. de Rienzo R, Gabdoulline R, Menziani MC, et al: Protein Sci 9, 1439 (2000).
36. Silvestrini MC, Falcinelli S, Ciabatti I, et al: Biochimie. 76, 641 (1994).
37. Chen J, Strous M: Biochim. Biophys. Acta, BBA – Bioenerg. 1827, 136 (2013).
38. Kleanthous C: Protein-protein Recognition. Oxford University Press, 2000.
39. Sigfridsson K: Photosynthesis Research 57, 1 (1998).
40. Voityuk AA: J. Phys. Chem. B. 115, 12202 (2011).
41. Gray HB, WinklerJR: Proc. Natl. Acad. Sci.; 102, 3534 (2005).
42. Winkler JR, Gray HB: J. Am. Chem. Soc.; 136, 2930 (2014).
43. Takematsu K, Williamson HR, Nikolovski P, Kaiser JT, Sheng Y, Pospíšil P, Towrie M, Heyda J, Hollas D, Zális S, Gray HB, Vlček A, Winkler JR: ACS Cent Sci. 5, 192 (2019)

Souhrn

Tuzhilkin R., Šulc M.: Modelové cupredoxiny (azurin a další) využívané pro studium strukturně funkčních vztahů elektron-transportních systémů proteinové povahy

Biochemické děje jako fotosyntéza a respirace, při nichž dochází k redoxním reakcím a přenosu elektronů pomocí kaskád proteinových molekul, souhrnně je označujeme jako elektron-transportní systémy, jsou pro život na Zemi klíčové a nezbytné. Vhodným modelovým proteinem pro studium strukturně funkčních vztahů elektron-transportních systémů proteinové povahy a vlivu aminokyselinových zbytků či záměny centrálního kovu na redox procesy je azurin, který patří do rodiny malých rozpustných cupredoxinů a podílí se na přenosu elektronů při anaerobní respiraci bakterií rodu *Pseudomonas*.

Klíčová slova: elektron-transportní přenos, cupredoxiny, azurin, redox vlastnosti.

Summary

Tuzhilkin R., Šulc M.: Model cupredoxines (azurin and others) employed to study of structural functional relationships within protein electron-transport systems

Biochemical processes like photosynthesis and cellular respiration, which involve redox reactions and are facilitated by electron transfer through a cascade of protein molecules, commonly referred to as electron-transfer systems, play a key role in all life on Earth. Azurin is a suitable model to study structural properties of such electron-transfer systems and the role of individual amino acid residues or the central metal ion in redox reactions. This protein belongs to the family of small soluble electron transporters known as cupredoxines and has a physiological role during anaerobic respiration in *Pseudomonas* bacterial species.

Keywords: electron transfer, cupredoxines, azurin, redox properties

OBSAH

Úvod	33
Savická D.: Sbírka mikroorganismů Ústavu biochemie a mikrobiologie – stručné představení kolekce	34
Mařátková O., Michailidu J.: Syntéza nanočástic pomocí biologických systémů a jejich antimikrobiální vlastnosti	35
Staněk R., Zábranská J.: Možnosti kontinuálního měření koncentrace oxidu dusnatého ve vodném roztoku	37
Strnádel J., et al.: Technológia reprogramovania nádorových buniek a jej terapeutický a experimentálny potenciál v onkológii	42
Tuzhilkin R., Šulc M.: Modelové cupredoxiny (azurin a další) využívané pro studium strukturně funkčních vztahů elektron-transportních systémů proteinové povahy	45

CONTENT

Editorial	33
Savická D.: Collection of microorganisms of the Department of Biochemistry and Microbiology – brief introduction of the collection	34
Mařátková O., Michailidu J.: Synthesis of nanoparticles using biological systems and their antimicrobial properties	35
Staněk R., Zábranská J.: Possibilities of continuous measurement of nitric oxide concentration in aqueous solution	37
Strnádel J., et al.: Tumor cell reprogramming technology and its therapeutic and experimental potential in oncology	42
Tuzhilkin R., Šulc M.: Model cupredoxines (azurin and others) employed to study of structural functional relationships within protein electron-transport systems	45

REDAKČNÍ RADA

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

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

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

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

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

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

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

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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

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

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

BIOPROSPECT

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

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

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

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

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

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

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