

## STUDY OF EPIGENETIC THERAPEUTICS - 5-AZACYTIDINE DERIVATIVES

**KHUSHBOO AGRAWAL, IVO FRYDRYCH, PETR DŽUBÁK, MARIÁN HAJDÚCH**

Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, 779 00 Olomouc  
hajduchm@gmail.com

Aberrant DNA methylation is a major hallmark of cancer. Hypermethylation of gene promoter sequences in cancer cells results in transcriptional silencing of tumor suppressor genes and contribute to malignant transformation. Therefore, hypermethylation has long been explored in cancer patients, including those with acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) as a therapeutic target. The cytosine analogues 5-azacytidine (Vidaza) and 2'-deoxy-5-azacytidine (Dacogen) function as DNA methyltransferase inhibitors and have shown substantial potency in reactivating epigenetically silenced tumor suppressor genes *in vitro* and are currently most advanced drugs for epigenetic cancer therapies. Despite encouraging results, mechanisms of *in-vivo* resistance to these nucleoside analogues are complex and remain unresolved due to which their clinical application is limited, thereby urging the need for introduction and testing of new drugs with more potential efficacy towards demethylation. To characterize the demethylating activity of wide range of compounds with the main focus on 5-azacytidine nucleosides and their derivatives, we successfully established a fluorescence detection system with very high sensitivity that involves an endogenous promoter CGI of FLJ32130 gene which was found to be methylated in human colon cancer cell line; HCT116 and respond sensitively to 2'-deoxy-5-azacytidine. Furthermore, to investigate the mechanisms of resistance we we have developed HCT116 cell line resistant to 2'-deoxy-5-azacytidine. Testing and validation of demethylating agents using fluorescence detection system together with molecular profiling of resistant HCT116 cells is currently ongoing process.

This work was supported by Internal grant of Palacky University (LF\_2012\_018), BIOMEDREG (CZ.1.05/2.1.00/01.0030) and Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (FR-TI4/625).

### ROLE NAD(P)H:CHINONOXIDOREDUKTASY V METABOLICKÉ AKTIVACI KARCINOGENNÍ ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY I *IN VIVO*

**FRANTIŠEK BÁRTA<sup>a</sup>, KATEŘINA LEVOVÁ<sup>a</sup>, VOLKER M. ARLT<sup>b</sup>, EVA FREI<sup>c</sup>, HEINZ H. SCHMEISER<sup>c</sup>, MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Katedra biochemie, PřF Univerzita Karlova v Praze, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>King's College London, UK; <sup>c</sup>Německé centrum pro výzkum rakoviny, D-69 120 Heidelberg

frantisek.barta@centrum.cz

Karcinogenní a nefrotoxický alkaloid, aristolochová kyselina I (AAI), způsobuje specifické onemocnění označované jako nefropatie vyvolaná AAI (Aristolochic Acid Nephropathy, AAN). Jedná se o onemocnění charakterizované chronickým ledvinným selháním, tubulointersticiální fibrosou a nádory močových cest. AAI je rovněž hlavní příčinou podobné ledvinné fibrosy provázené nádory močových cest, balkánské endemické nefropatie (BEN). Nezodpovězenou otázkou etiologie těchto onemocnění je skutečnost, že ne všichni jedinci vystavení působení AAI onemocní uvedenými chorobami. Jedním z vysvětlení mohou být rozdílné hladiny a aktivity enzymů metabolizujících AAI, determinujících aktivaci či detoxifikaci AAI. AAI je metabolizována dvěma typy reakcí. Buď je oxidačně detoxifikována na demethylovaný metabolit, aristolochovou kyselinu Ia (AAIa) nebo je redukčně aktivována na cyklický *N*-acylnitreniový ion tvořící kovalentní adukty s DNA. Nejvýznamnějším enzymem participujícím na redukční aktivaci AAI *in vitro*, který může determinovat vývoj AAN nebo BEN, je NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO1). Otázkou zůstává, zda stejný enzym aktivuje AAI též *in vivo*.

Pro určení participace NQO1 v aktivačním metabolismu AAI *in vivo* bylo využito inhibitoru tohoto enzymu, dikumarolu. Ten je efektivním inhibitorem redukční aktivace AAI katalyzované NQO1 *in vitro*. Nicméně, *in vivo* dikumarol překvapivě nepůsobil jako inhibitor tvorby aduktů AAI s DNA. Premedikace laboratorních potkanů uvedeným inhibitorem před jejich vystavením AAI vedla totiž místo předpokládaného snížení tvorby aduktů AAI s DNA k jejich vyšší tvorbě *in vivo*. Dikumarol podaný před aplikací AAI zvířatům tedy působí jiným mechanismem, než je jeho inhibiční vliv na NQO1. Sledování exprese NQO1 v testovaných orgánech vysvětlilo zjištěné výsledky. Dikumarol podaný experimentálním zvířatům před AAI indukuje expresi NQO1. Navíc, k indukci NQO1 vede nejen kombinované podání obou látek, ale i podání AAI či dikumarolu samotných. Zvýšená exprese NQO1 korelovala s tvorbou aduktů AAI s DNA *in vivo*; zvýšené hladiny NQO1 a jeho enzymové aktivity *in vivo* vedly ke zvýšené tvorbě aduktů AAI s DNA. NQO1 je tedy enzymem, který je za aktivaci AAI (tvorbu aduktů s DNA) *in vivo* jednoznačně zodpovědný.

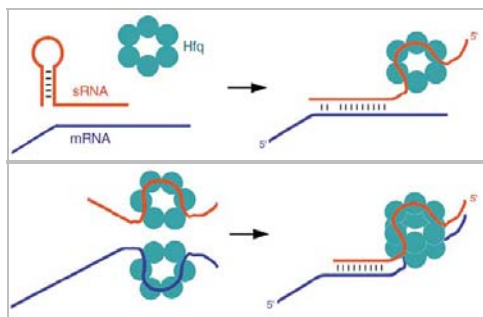
Podporováno GAČR (projekt 303/09/0472) a Univerzitou Karlovou (projekt UNCE 204025/2012).

### IDENTIFIKACE MALÝCH REGULAČNÍCH RNA V GENOMU *Bordetella pertussis*

**ILONA BÍBOVÁ<sup>a,b</sup>, KRISTINA KEIDEL<sup>a</sup>, DAVID HOT<sup>c</sup>, FABIAN AMMAN<sup>d</sup>, PETER ŠEBO<sup>a</sup> a BRANISLAV VEČEREK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>MBÚ AV ČR, 142 20 Praha 4, <sup>b</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, 166 28 Praha 6, <sup>c</sup>LTGA, Institut Pasteur de Lille, Lille, U1019, France, <sup>d</sup>Inst. Theor. Chem., University of Vienna, Vienna, A-1090, Austria  
bibovai@vscht.cz

V posledním desetiletí si malé nekódující RNA (sRNA) získaly pozornost jako nový typ regulátorů genové exprese. Tyto regulační sRNA se díky částečné komplementaritě vážou k cílové mRNA a ovlivňují účinnost její translace. Protein Hfq, bakteriální RNA chaperon, je díky svým RNA-vazebným vlastnostem důležitým prostředníkem těchto RNA-RNA interakcí (obr. 1) a hraje také důležitou úlohu ve virulenci patogenních bakterií<sup>1</sup>.



Obr. 1. sRNA-mRNA interakce zprostředkované proteinem Hfq<sup>2</sup>

V této práci se snažíme objasnit roli RNA chaperonu Hfq a sRNA ve virulenci *Bordetella pertussis*, původce černého kašle. Metodami cílené mutagenese jsme připravili kmen s deletovaným *hfq* genem a využitím řady molekulárně-biologických metod jsme porovnali jeho vlastnosti s původním rodičovským wild-type (wt) kmenem se zřetelem na změny ve virulenci. Zjistili jsme, že delece *hfq* genu v *B. pertussis* způsobuje sníženou produkci některých virulenčních faktorů jako je např. adenylát cyklázový toxin. Následně *in vivo* experimenty na myším infekčním modelu prokázaly, že u *hfq* mutanta došlo ke snížení jeho virulence.

Toto pozorování naznačuje, že také sRNA by mohly hrát roli v regulaci virulence *B. pertussis*. Proto jsme se je rozhodli identifikovat použitím různých přístupů (bioinformatika, microarray analýza a sekvenace vzorků RNA izolovaných z wt kmene a *hfq* mutanta). Pomocí bioinformatiky byla predikována řada sRNA, z nichž jsme k bližšímu ověření vybrali ty, jejichž existence byla také potvrzena microarray analýzou a sekvenací RNA. Tyto sRNA byly dále ověřeny Northern blotem. Na základě těchto výsledků jsme připravili kmeny *B. pertussis*, které obsahují delece v úsecích genomu odpovídajících identifikovaným sRNA. Předpokládáme, že nám tyto mutanty pomohou objasnit roli nalezených sRNA ve virulenci.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P302/11/1940.

#### LITERATURA

1. Vogel J., Luisi B.F.: Nat. Rev. Microbiol. 9, 578 (2011).
2. Storz G., Opdyke J. A., Zhang A.: Curr. Opin. Microbiol. 7, 143. (2004).

## STRUKTURA SUPERKOMPLEXU ESCRT-I/II VYŘEŠENÁ POMOCÍ HYBRIDNÍCH METOD (SAXS, TRET a DEER) A KRYSTALOGRAFIE

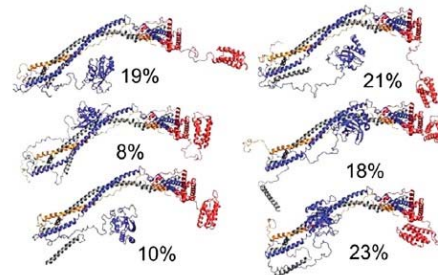
EVŽEN BOUŘA, BARTOSZ ROZYCKI

UOCHB, Flemingovo náměstí 542/2 160 00 Praha-Dejvice  
boura@uochb.cas.cz

Dráha ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) je vysoce konzervovaná transportní dráha u všech eukaryot. ESCRT proteiny hrají klíčovou roli při transportu ubiquitovaných transmembránových proteinů do lysozómu pro degradaci<sup>1</sup>. Klíčovými hráči jsou i) ESCRT-0 komplex, který zajišťuje kumulaci cargo proteinů, ii) ESCRT-I a ESCRT-II komplexy, kteří ohýbají membránu a iii) ESCRT-III komplex, který membránu „stíhává“. Celá mašinerie je pak recyklována pomocí VPS4 AAA ATPasy. Kromě transportu je důležité zmínit, že tato dráha je zneužívána většinou obalených virů, jako je třeba HIV-1, pro pučení ven z buňky.

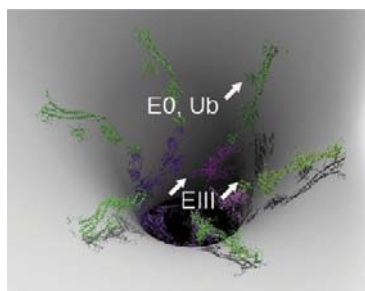
Vznik vezikul je esenciální biologický proces, obzvláště pro transport transmembránových proteinů. ESCRT komplexy katalyzují pučení ve směru ven z cytosolu. Tento proces se liší od všech ostatních popsáných mechanismů tím, že při něm nevzniká proteinový „kabát“ okolo nascentního veziklu. Nedávno bylo ukázáno pomocí *in vitro* rekonstituce, že molekulární mechanismus funkce ESCRT-I a ESCRT-II protein komplexů, spočívá v jejich schopnosti ohýbat membránu<sup>2</sup>.

ESCRT-I je heterotetramer složený z Vps23, Vps28, Vps37 a Mvb12. ESCRT-II je heterotetramer složený z 2x Vps25, Vps22 a Vps36. Přestože většina domén z ESCRT dráhy byla již vykrytalizována, vnitřní flexibilita znemožnila krystalizaci celých ESCRT komplexů. Proto jsme zvolili hybridní přístup a rafinovali jsme strukturu ESCRT-I<sup>3</sup> (viz obr. 1), ESCRT-II a ESCRT-I/II komplexů proti datům získaným z malouhlového rozptylu paprsků X (SAXS), jednomolekulového Förstrova rezonančního přenosu energie a elektron elektron rezonance.



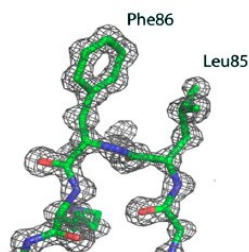
Obr. 1. Struktura heterotetramerního ESCRT-I komplexu spolu s relativním zastoupením jednotlivých konformací

Tento postup vygeneroval 18 reprezentativních struktur pro ESCRT-I/II superkomplex, které zahrnují struktury velmi kompaktní i struktury hodně extendované. Ovšem většina struktur má tvar půlměsíce. To nám umožnilo vytvořit první detailní mechanistický model ESCRT dráhy. V tomto modelu ESCRT-I/II stabilizuje nascentní membránový krček (viz obr. 2) a koordinuje vazbu cargo proteinů<sup>4,5</sup>.



Obr. 2. Šest kopií ESCRT-I (zeleně) a ESCRT-II (fialově) poskládáno paralelně v nascentním membránovém krčku

Dále nás zajímalo, jak je ESCRT-I proteinový komplex zneužíván virem HIV. Proto jsme vyřešili strukturu MABP domény, která je součástí ESCRT-I komplexu specifická jen pro vyšší eukaryota. Zjistili jsme, že MABP doména je membrán vázající doména a jako taková rekrutuje ESCRT-I komplex na membránu. Vazbu na membránu zajišťuje hydrofobní smyčka, která z proteinu vyčnívá a interkaluje se do membrány (obr. 3)<sup>6</sup>.



Obr. 3. Hydrofobní smyčka MABP domény v experimentální elektronové hustotě

#### LITERATURA

- Hurley J.H., Hanson P.I.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11, 556 (2010).
- Wollert T., Hurley J.H.: *Nature* 464, 864 (2010).
- Boura E., Rózycki B., Herrick D.Z., Chung H.S., Vecer J., Eaton W.A., Cafiso D.S., Hummer G., Hurley J.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 9437 (2011).
- Boura E., Rózycki B., Chung H.S., Herrick D.Z., Canagarajah B., Cafiso D.S., Eaton W.A., Hummer G., Hurley J.H.: *Structure* 20, 874 (2012).
- Boura E., Ivanov V., Carlson L.A., Mizuuchi K., Hurley J.H.: *J. Biol. Chem.* 287, 28144 (2012).
- Boura E., Hurley J.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 1901 (2012).

#### ROLE DESATURAS MASTNÝCH KYSELIN PŘI BIOSYNTÉZE ČMELÁČÍCH FEROMONŮ

ALEŠ BUČEK<sup>a</sup>, HEIKO VOGEL<sup>b</sup>, DARINA PRCHALOVÁ<sup>a</sup>, ULLRICH JAHN<sup>a</sup>, PETR ŠEBESTA<sup>a</sup>, IRENA VALTEROVÁ<sup>a</sup>, IVA PICOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Str. 8, D-07745, Jena, Německo  
Bucek@uochb.cas.cz

Desaturasy mastných kyselin (FAD, z angl. Fatty Acid Desaturase, E.C. 1.14.19.1) jsou integrální enzymy membrán endoplasmatického retikula, které zavádí dvojné vazby do řetězců mastných kyselin (MK). FAD se vyskytují v všech eukaryotních organismů a zásadně se podílejí na udržování fyzikálních vlastností membrán desaturací MK membránových lipidů. U hmyzu, zejména u dvoukřídlých (mouchy) a mūr, však FAD získaly zcela novou úlohu v biosyntéze sexuálních feromonů - látek, které specificky zprostředkují páření mezi jedinci téhož druhu. Tyto látky jsou nejčastěji nenasycené estery, alkoholy a aldehydy s alifatickým řetězcem odvozeným od MK.

Cílem práce bylo určit úlohu FAD v produkci druhově specifických samčích sexuálních feromonů u zástupců blanokřídlého hmyzu: čmeláka hájového (*Bombus lucorum*), čmeláka skalního (*B. lapidarius*) a čmeláka zemního (*B. terrestris*), jež patří k našim nejrozšířenějším druhům čmeláků a dramaticky se liší ve složení samčího feromonu<sup>1</sup>. V této skupině hmyzu byla dosud identifikována pouze jedna FAD<sup>2</sup>.

Pro identifikaci FAD genů byla vyzolována celková RNA z feromonové žlázy a tukové tkáně samců čmeláků. RNA-seq sekvenční technologií byly vytvořeny transkriptomové databáze, v nichž bylo predikováno šest FAD genů. Pro další charakterizaci byly vybrány SPVE a NPVE FAD, jejichž transkripty byly specificky abundantní ve feromonových žlázách a jejichž relativní zastoupení bylo potvrzeno qPCR. NPVE a SPVE geny byly vneseny do kvasinkového expresního vektoru a exprimovány v kmenu *S. cerevisiae*, jež nese deletovaný gen pro svou jedinou FAD a neprodukuje nenasycené MK.

Analýza MK izolovaných z transformovaných kvasinkových kmenů ukázala, že NPVE desaturasy zavádějí dvojnou vazbu na pozici  $\Delta^9$  do MK s délkou řetězce C<sub>14</sub> až C<sub>18</sub> a mohou produkovat majoritní složky samčích feromonů čmeláka hájového a skalního. SPVE desaturasy vykazovaly unikátní  $\Delta^4$  desaturasovou aktivitu, jež byla doposud zjištěna jen u některých myříkotvarých rostlin (*Apiales*).

Tato práce vznikla za podpory GAČR grantu 203/09/1446.

#### LITERATURA

- Valterová I., Urbanová K.: *Chem. Listy*. 91, 846 (1997).
- Matoušková P., Luxová A., Matoušková J., Jiroš P., Svatoš A., Valterová I., Pichová I.: *ChemBioChem*. 9, 2534 (2008).

#### PREFERENCE VAZBY PROTEINU p53 K CÍLOVÝM SEKVENCÍM S POTENCIÁLEM TVORBY KŘÍŽOVÉ STRUKTURY V PROMOTORU GENU p21

JAN COUFAL, VÁCLAV BRÁZDA, EVA BRÁZDOVÁ-JAGELSKÁ, HANA PIVOŇKOVÁ, MIROSLAV FOJTA

Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno

Protein p53 se specificky váže na DNA a iniciuje nebo

blokuje expresi mnoha genů v závislosti na podmínkách v buňce. Produkty těchto genů mohou zastavit buněčný cyklus (p21), vyvolat apoptózu (PUMA, NOXA) nebo zastavit transkripci a translaci antiapoptotických genů (miRNA).

Testovali jsme interakci proteinu p53 s přirozenými (p21, gadd45, mdm2 a rbc) i uměle vytvořenými (P1, P2) cílovými sekvencemi *in vitro*. Jedna z nejlépe interagujících sekvencí pocházela z promotoru genu p21. Tu jsme proto vybrali pro další experimenty. Protein p21 hraje také významnou roli v nádorech jak u jejich vzniku tak následně při léčbě. Pomocí pokusů *in vitro* jsme ukázali, že se p53 preferenčně váže na DNA s p53 cílovými vazebnými sekvencemi. Superhelicitu DNA ještě zvyšuje afinitu proteinu p53 k vazbě na cílové sekvence. Analýzou *in silico* promotoru p21 jsme zjistili výskyt několika sekvencí, které teoreticky mohou vytvořit křížovou strukturu. Dále jsme studovali vazbu proteinu p53 k některým těmto sekvencím prostřednictvím chromatinové imunoprecipitace v nádorových liniích MCF7 a HCT116 za použití běžných cytostatik (5-flourouracil, doxorubicin, roscovitina a *cis*-platina). Po imunoprecipitacích jsme analyzovali množství proteinu p21 pomocí westernového přenosu ve vzorcích, u kterých jsme zjistili vazbu p53 k promotoru p21. Následně jsme stejnou metodou testovali posttranslační modifikace serinu 15 a serinu 392 v proteinu p53.

Naše výsledky ukazují, že protein p53 se neváže ke všem známým cílovým sekvencím v promotoru p21 genu, ale vybere si preferenčně místa, která vytváří křížovou strukturu. Také mutantní protein p53 je schopen specifické interakce s některými vazebnými místy v DNA. Konfokální mikroskopii jsme ukázali lokalizaci proteinů p53 a p21. Po genotoxickém zásahu se protein p53 akumuloval v jádře a docházelo k výraznému zvýšení množství proteinu p21 v buňce.

*Tato práce byla financována z grantu GACR 301/10/1211 a P301/11/2076.*

## VÍCEFUNKČNÍ TRIFLUORMETHYLKETONY JAKO STAVEBNÍ BLOKY KONSTITUČNÍ DYNAMICKÉ CHEMIE

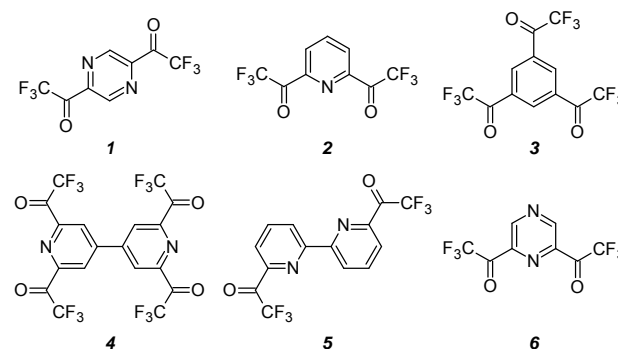
**RADEK COUFAL, TOMÁŠ KUP, VLADIMÍR NOSEK, DUŠAN DRAHOŇOVSKÝ\***

*Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta  
Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2  
coufalr@natur.cuni.cz, dusan.drahonovsky@natur.cuni.cz*

Konstituční dynamická chemie<sup>1</sup> se zabývá studiem tvorby dynamických systémů, které jsou schopny prostřednictvím reverzibilních kovalentních a nekovalentních interakcí reagovat na působení různých fyzikálních či chemických stimulů (re)-adaptací konstituce zúčastněných molekul. Příkladem reverzibilního kovalentního spojení je např. tvorba hemiacetalů<sup>2</sup>, iminů či hydrazonů<sup>1</sup>.

V naší skupině byla připravena řada vícefunkčních trifluormethylketonů, resp. jejich hydrátů, odvozených od

některých (hetero)aromátů (obr. 1). Klíčovým krokem přípravy těchto látek byla reakce příslušných esterů s TMS-CF<sub>3</sub> iniciovaná CsF<sub>3</sub>. Tyto reakce však v naprosté většině případů nebylo možné provést bez aktivace výchozího esteru pomocí Lewisovy kyseliny (nejčastěji Sc(OTf)<sub>3</sub>).



Obr. 1. Připravené vícefunkční trifluormethylketony

U těchto derivátů byl zjištěn potenciál tvořit poměrně vysoké zastoupení hemiacetalů v reakci s alkoholy<sup>4</sup>. Byla také provedena řada NMR studií, dokazující dynamický charakter vznikajících hemiacetalů<sup>4</sup>. Na základě dosavadních výsledků bude dále zkoumáno využití těchto látek především jako stavebních bloků dynamických polymerů.

*Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MS0021620857.*

## LITERATURA

1. Lehn J.-M.: Chem. Soc. Rev. 36, 151 (2007).
2. Drahoňovský D., Lehn J.-M.: J. Org. Chem. 74, 8428 (2009).
3. Singh R. P., Cao G., Kirchmeier R. L., Shreeve J. M.: J. Org. Chem. 64, 2873 (1999).
4. Coufal R. *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2012.

## ŘÍZENÉ VYLUČOVÁNÍ SUBMIKROMETROVÝCH OBJEKTŮ Z ALGINÁTOVÝCH ČÁSTIC

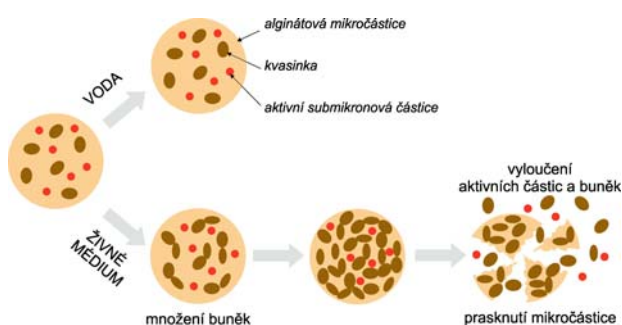
**JITKA ČEJKOVÁ, FRANTIŠEK ŠTĚPÁNEK**

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Laboratoř  
chemické robotiky, Technická 3, 166 28 Praha 6  
jitka.cejkova@vscht.cz*

Cílem předložené práce je vyvinout novou metodu pro řízené vylučování submikrometrových objektů z alginátových mikročástic. Existuje mnoho spouštěcích mechanismů, jak uvolnit aktivní látky z nosičů, např. změnou teploty, změnou pH, ozářením<sup>1</sup>. Naše metoda je založena na rozpadu nosné částice pomocí růstu kvasinek zabudovaných do alginátového gelu. Obrázek 1 znázorňuje schematicky tento princip: Je-li kompozitní alginátová částice obsahující kvasinky a aktivní částice (lipozomy, magnetické nanočástice) v prostředí bez živin, je stabilní po dlouhou

dobu a nic z jejího obsahu se neuvolňuje. Je-li však takováto mikročástice vystavena živnému médiu, kvasinky se začnou množit a jejich rapidní růst vede k roztržení částice a uvolnění nejen buněk, ale právě i aktivních submikronových částic. Takovéto mikročástice mohou představovat umělé spory, tedy objekty, které jsou za nepříznivých podmínek neaktivní a zaktivují se jen v podmínkách vhodných pro růst kvasinkových buněk. Mikro kapsle tohoto typu by mohly najít uplatnění např. pro vylučování fungicidů či pesticidů.

V rámci této experimentální práce byly pomocí technologie *InkJet Printing*<sup>2</sup> připraveny hybridní alginátové částice obsahující kvasinky v různých koncentracích. Byl studován růst buněk vedoucí k rozpadu částice a ukázáno vylučování modelových submikronových částic (liposomy a magnetické nanočástice).



Obr. 1. Schematické znázornění principu biologicky spouštěného vylučování submikrometrových objektů z alginátových mikročástic

Tato práce vznikla za podpory grantu Evropské výzkumné rady CHOBOTIX 200580.

#### LITERATURA

- Esser-Kahn A.P., Odom S.A., Sottos N.R., White S.R., Moore J.S.: *Macromolecules* 44, 5539 (2011).
- Dohnal J., Štěpánek F.: *Chem. Eng. Sci.* 66, 3829 (2011).

#### PROTEOMICKÉ PROFILOVÁNÍ BUNĚK DĚTSKÉ AKUTNÍ LEUKEMIE

**DANIELA ČERNÁ<sup>a</sup>, VERONIKA KANDEROVÁ<sup>a</sup>, JAN STUHLÝ<sup>a</sup>, KAREL FIŠER<sup>a</sup>, WEIWEI WU<sup>b</sup>, ANDERS HOLM<sup>b</sup>, ONDŘEJ HRUŠÁK<sup>a</sup>, FRIDTJOF LUND-JOHANSEN<sup>b</sup>, TOMÁŠ KALINA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> CLIP-Cytometrie, Klinika dětské hematologie a onkologie  
2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, 150 00 Praha 5; <sup>b</sup> Dpt. of Haematology, Rikshospitalet, Oslo, 02770, Norway  
cerna.daniela@lfmotol.cuni.cz

Akutní leukemie (AL) je nejčastější malignitou dětského věku charakteristická množstvím aberací na úrovni DNA, mRNA i proteinů. Funkční důsledky DNA a mRNA aberací zatím nejsou na buněčné úrovni zcela objasněny. Proto se v současné době věnuje mnoho úsilí vývoji

senzitivnějších nástrojů, které mohou odhalit nové diagnostické a prognostické znaky. SEC-MAP (Size-exclusion Chromatography - Microsphere-based Affinity Proteomics) je soubor 1728 populací fluorescenčně značených latexových mikrokuliček, z nichž každá nese protilátku proti různým lidským proteinům<sup>1</sup>. Nabitinylované buněčné proteiny separujeme na gelové chromatografii na 24 frakcí, které následně inkubujeme s mikrokuličkami SEC-MAP a vazbu detegujeme cytometricky pomocí fluorescenčně značeného streptavidinu. Doposud jsme vyšetřili expresi cytoplasmatických (n=980) a membránových (a DNA-vazebných) (n=769) proteinů u 69 diagnostických vzorků AL. Díky schopnosti SEC-MAP rozlišit proteiny dle hydrodynamického poloměru jsme zjistili proteolýzu u 12 vzorků, které jsme následně z analýzy vyřadili. Analýzu výsledků jsme provedli pomocí automatického softwaru vytvořeném v R-project<sup>2</sup>. Pro normalizaci dat proteinové exprese jsme použili normalizaci loess běžně používanou při mRNA expresním profilování. Takto jsme identifikovali 77 proteinů/proteinových forem (např. SH2D1A, FAS, LAT, KIT, CD72) diferencially exprimovaných mezi jednotlivými kategoriemi AL s ohledem na buněčný typ (B-buněčné, T-buněčné, myelocytární), genotyp (řízní geny, aneuploidie) a odpověď na léčbu. Zjistili jsme např. vyšší expresi cAMP-dependentní proteinkinasy PRKACA u TEL-AML1 pozitivních AL. V současné době data verifikujeme pomocí jiných proteomických metod, např. WB. Protože detegujeme nejen expresi proteinů, ale také jejich velikost, přítomnost v komplexu a dokonce lokalizaci v buňce, řadí se tak SEC-MAP k novým metodám funkční proteomiky kombinující kapacitu DNA microarrays a dostupnost průtokové cytometrie v „high-throughput“ hodnocení leukemických vzorků.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK č. 596912.

#### LITERATURA

- Wu W., Slastad H., de la Rosa Carillo D., Frey T., Tjønnfjord G., Boretti E., Aasheim H.C., Horejsi V., Lund-Johansen F.: *Mol. Cell. Proteomics* 8, 245 (2009).
- Stuhlý J., Kanderová V., Fišer K., Cerná D., Holm A., Wu W., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T.: *Cytometry A* 81, 120 (2012).

#### GEMINÁLNÍ BIS(FOSFINÁTY)

**TOMÁŠ DAVID<sup>a</sup>, PAVLÍNA KŘEČKOVÁ<sup>a</sup>, SOŇA PROCHÁZKOVÁ<sup>a</sup>, JANA HAVLÍČKOVÁ<sup>a</sup>, JAN KOTEK<sup>a</sup>, VOJTĚCH KUBÍČEK<sup>a</sup>, PETR HERMANN<sup>a</sup>, IVAN LUKES<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Katedra anorganické chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2  
tdavid275@gmail.com

Geminální bis(fosfináty) představují slibnou stavební jednotku pro tvorbu makrocyclických ligandů vhodných pro komplexaci radionuklidů používaných v nukleární medicíně.

Prednosť takovýchto ligandů by měla být vysoká rychlost komplexace, která by výrazně zkrátila čas od přípravy radionuklidu po jeho aplikaci.

Geminální bis(fosfináty) jsou vzhledem ke své jednoduché struktuře překvapivě málo prozkoumanou skupinou sloučenin. Proto byly nejprve připraveny jednoduché geminální bis(fosfináty) a aminobis(fosfináty). Bylo zjištěno, že některé deriváty nejsou ve vodném roztoku neomezeně stabilní narušují od analogických geminálních bis(fosfonátů). Stabilita je navíc silně závislá na pH a na typu postranních substituentů. Dále byly zkoumány acidobazické a koordinační vlastnosti pomocí potenciometrie. Většina studovaných ligandů vykazuje vysokou bazicitu atomů dusíku oproti jednoduchým aminomethylfosfinátům, což koresponduje s vysokými hodnotami stabilizačních konstant komplexů s vybranými dvojmocnými kovy. Krystalová struktura dvou komplexů byla zjištěna pomocí RTG analýzy. Významný vliv na koordinační okolí má hydroxylová skupina přítomná na centrálním atomu uhlíku (byla pozorována neobvyklá dvojjaderná a kubánová struktura).

Výše uvedené poznatky byly využity k návrhu a posléze i k syntéze bis(fosfinátových) derivátů makrocyclických ligandů. Předběžné výsledky ukazují, že připravené deriváty tvoří vysoce stabilní komplexy a jsou schopny velmi rychle komplexace již při nízkých hodnotách pH.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/10/P153 a GAUK 310011.*

#### **POROVNANIE VÝSKYTU „LYZYL OXIDÁZA-LIKE“ ENZÝMOV V KONTROLNEJ A KERATOKONICKEJ ROHOVKE**

**LUBICA ĐUĐÁKOVÁ, ŠÁRKA KALAŠOVÁ, KATEŘINA JIRSOVÁ\***

*Laboratoř biologie a patologie oka, Ústav dědičných metabolických poruch, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2  
katerina.jirsova@lf1.cuni.cz*

Rodina lyzyl oxidázy, zahrňující lyzyl oxidázu (LOX) a čtyři LOX-like enzymy, katalyzuje tvorbu vazeb mezi elatínovými a kolagenovými vlákny. LOX a LOX-like proteiny se liší hlavně ve své N-terminální sekvenci, která jim dodává specifické funkce. Nedávno jsme popísali nižší aktivitu a nepravidelnou distribúciu LOX v keratokonických (KC) rohovkách v porovnaní so zdravými kontrolami. Aby sme rozšířili vedomosti o enzýmoch tvoriacich väzby medzi kolagénmi, zamerali sme sa na detekciu ostatných členov tejto enzýmovej rodiny v zdravej a KC rohovke.

Použili sme kryorezy ľudskej kontrolnej a KC rohovky. Expresia LOX-like enzýmova bola sledovaná pomocou nepriamej fluorescenčnej imunohistochémie a použitím myších protilátok anti-LOX-like 1 (sc-166632, Santa Cruz) a anti-LOX-like 2 (ab60753, Abcam) a králičích anti-LOX-like 3 (sc-68939, Santa Cruz) a 4 (ab88186, Abcam). Intenzita signálu bola hodnotená na fluorescenčnom mikroskope a za použitia škály: 0: bez signálu, 1: slabý, 2: stredne silný, 3: silný signál.

Slabý signál LOX-like 1 sme pozorovali v kontrolných ako aj KC vzorkách a bol reprezentovaný bodkovaným vzorom. Po použití LOX-like 2 protilátky sme pozorovali stredne silný až silný signál v epiteli, strome a endoteli kontrolných rohoviek. Nepravidelný signál v epiteli a gradientové znižovanie intenzity signálu od stredne silného po slabý sme pozorovali v strome KC rohoviek. Po použití LOX-like 3 protilátky sme pozorovali mierne až intenzívne farbenie epitelu a endotelu v kontrolných i KC vzorkách. Intenzita signálu v stromálnej oblasti kontrolných vzoriek bola slabá a takmer úplne chýbala vo väčšine KC vzoriek. Stredne silný až silný signál v epiteli a endoteli a stredne silný signál v strome s bodkovaným vzorom sme pozorovali kontrolných a KC rohoviek za použitia protilátky LOX-like 4.

LOX-like enzymy boli po prvý krát popísané v ľudskej kontrolnej a KC rohovke. Takmer žiadny rozdiel sme nenašli medzi kontrolnými a KC rohovkami vo farbení s protilátkami LOX-like 1 a 4. Pokles v intenzite signálu protilátok LOX-like 2 a 3 v KC vzorkách by mohol indikovať, že i ďalší členovia tejto enzýmovej rodiny sú zapojení v patogenéze keratokonu.

*Tato práca vznikla za podpory grantu PRVOUK-P24/LF1/3.*

#### **ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA PCR AMPLIKONŮ S INKORPOROVANÝMI NUKLEOBÁZEMI ZNAČENÝMI ELEKTROCHEMICKY AKTIVNÍMI FUNKČNÍMI SKUPINAMI**

**ZDENKA DUDOVÁ-VYCHODILOVÁ\*\*<sup>a</sup>, HANA PIVOŇKOVÁ<sup>a</sup>, JAN ŠPAČEK<sup>a</sup>, VERONIKA RAINDLOVÁ<sup>b</sup>, MICHAL HOCEK<sup>b</sup>, MIROSLAV FOJTA<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
dudova@ibp.cz*

Modifikace molekul DNA značkami (funkčními skupinami), které je „zviditelní“ mezi jinými biomolekulami a v ideálním případě i několikanásobně zvýší citlivost techniky, kterou použijeme k jejich detekci, je velmi oblíbená. V praxi jsou obvykle využívány fluorescenční značky (např. fluorescein). V naší laboratoři se zabýváme aplikací funkčních skupin, které je možné detegovat elektrochemickými metodami<sup>1,2</sup>, tedy na základě přenosu elektronů mezi elektrodou a danou skupinou během redoxních dějů. Pokud k výměně elektronů dochází, mluvíme o elektrochemicky aktivních skupinách (značkách). Kromě jiných jsme začali analyzovat chování funkčních skupin formylthiofenu navázaných na cytosiny a inkorporované do DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Délka modifikovaných ampliconů je 474 bp. Tato modifikace může sloužit jako adaptor pro připojení dalších skupin, je detegovatelná elektrochemicky a rovněž může sloužit pro studium vlivu modifikace DNA na její strukturu a její adsorpci na površích. Pro studium posléze zmíněných jevů byla využita voltametrie s nvruceným střídavým napětím

(ACV). Ukázalo se, že s nárůstem počtu modifikovaných cytosinů v řetězci DNA dochází ke zvýšení její afinity k povrchu elektrody, což se projeví na její desorpci v oblasti negativních potenciálů. Měření modifikovaných PCR ampliconů cyklickou volumetrií (CV) ukázala katodický pik kolem potenciálu  $-1,09$  V spojený s redukcí formylové skupiny a adsorpčně-desorpční signál před pikem CA indikující redukcí cytosinu a adeninu. V současné době probíhá obdobná analýza s DNA amplicony nesoucími jiné externí skupiny.

*Tato práce vznikla za podpory grantu P206-12-G151.*

#### LITERATURA

1. Hocek M., Fojta M.: Chem. Soc. Rev. 40, 5802 (2011).
2. Raindlova V., Pohl R., Klepetářová B., Havran L., Šimková E., P. Horáková P., Pivoňková H., Fojta M., Hocek M.: Chempluschem 77, 652 (2012).

#### PROLYLENDOPEPTIDASA Z KREVNIČKY STŘEVNÍ *Schistosoma mansoni*

**PAVLA FAJTOVÁ<sup>a,b</sup>, JANA VÁCHOVÁ<sup>a</sup>, ADÉLA JÍLKOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ VONDRÁŠEK<sup>a</sup>, JAN DVOŘÁK<sup>c</sup>, CONOR R. CAFFREY<sup>d</sup>, MICHAEL MAREŠ<sup>a</sup>, MARTIN HORN<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>1. lékařská fakulta UK, 121 08, Praha 2; <sup>c</sup>Ústav molekulární genetiky AV ČR, 142 20, Praha 4; <sup>d</sup>Sandler Center for Drug Discovery, CIQB (Q3), UCSF, 1700 4<sup>th</sup> Street, 94158, San Francisco, California, USA  
fajtova@uochb.cas.cz

*Schistosoma* je jedno z nejzávažnějších parazitárních onemocnění s více než 240 miliony nakažených lidí. Je způsobeno krevničkami, motolicemi rodu *Schistosoma*. Prolylendopeptidasa (SmPEP) z krevničky střevní *Schistosoma mansoni* představuje nový potenciální cíl pro léčbu schistosomózy.

SmPEP byla detegována v extraktu z dospělých červů pomocí enzymové aktivity, fluorescenční aktivní próby a imunoreaktivity. Funkční SmPEP byla připravena jako rekombinantní protein v bakteriálním expresním systému a byla chromatograficky purifikována. Substrátová specifita SmPEP byla analyzována *in vitro* pomocí syntetických peptidových knihoven a přirozených peptidových substrátů a dále *in silico* pomocí 3D modelu SmPEP konstruovaného homologickým modelováním. Na základě těchto výsledků byly navrženy a syntetizovány nové peptidomimetické inhibitory SmPEP, které byly účinné *in vitro* a v testech *in vivo* potlačovaly životaschopnost krevniček.

Tato práce přináší první strukturně-funkční analýzu SmPEP jako potenciálního cíle pro vývoj nových inhibičních léčiv.

*Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR 302/11/1481 a projektu RVO61388963.*

#### FRUKTOSA-KYSLÍKOVÝ BIOPALIVOVÝ ČLÁNEK NA BÁZI CHITOSANU A UHLÍKOVÝCH NANOČÁSTIC

**JAROSLAV FILIP, JANA ŠEFČOVIČOVÁ, JÁN  
TKÁČ**

*Oddelenie glykobiotechnológie, Chemický ústav, Centrum glykomiky, SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava  
jaroslav.filip@savba.sk*

Biopalivové články (biobaterie) jsou zařízení k jednorázové transformaci chemické energie dodávaného biopaliva na elektrickou energii pomocí spřažené oxidace substrátu na anodě a redukce depolarizátoru na katodě. Obě reakce jsou katalyzovány pomocí enzymů či celých mikrobiálních buněk, imobilizovaných na povrch anody a katody<sup>1</sup>. Značné zvýšení množství i stability imobilizovaných enzymů, a tedy i efektivity biobaterií, je možné díky využití nanomateriálů v imobilizačním elektrodovém rozhraní.

V příspěvku je popsána konstrukce elektrodového rozhraní na bázi uhlíkových nanočástic KetjenBlack (KB) a uhlíkových nanotrubiček (CNTs). Efektivita KB pro adsorpci elektrokatalytických enzymů byla popsána především ve spojení s maticemi z flourových hydrofobních polymerů, jež byly v této práci nahrazeny dostupnějším biopolymerem chitosanem (CHI). Celková vodivost elektrodového rozhraní byla zvýšena inkorporací CNTs. Na elektrody modifikované směsí KB-CNT/CHI byly nasorbovány enzymy fruktosa dehydrogenasa (FDH; anoda) a bilirubin oxidasa (BOD; katoda) s následnou charakterizací elektrod pomocí cyklické voltamperometrie; FDH i BOD byly schopny katalyzovat oxidaci/redukci daného substrátu za vzniku měřitelné proudové odezvy.

Tyto elektrody byly použity na konstrukci fruktosakyslíkového BFC poskytujícího maximální napětí 655 mV a maximální výkon 50  $\mu\text{W cm}^{-2}$  při napětí 300 mV. Tyto hodnoty byly zjištěny za normálních podmínek; navíc díky absenci elektronových mediátorů není nutné oddělovat anodický a katodický prostor, což vede k dalšímu snížení ceny zařízení. Zároveň lze KB-CNT/CHI nanokompozit využít pro přípravu velkoplošných, levných a efektivních bioelektrod mimo jiné i díky pozitivnímu vlivu chitosanu na správnou orientaci BOD a efektivní výměnu náboje mezi elektrodou, biokatalyzátory a elektrolytem<sup>2</sup>.

*Práce byla vytvořena realizací projektu "CEntrum pre Materiály, vrstvy a systémy pre Aplikácie a CHEmické procesy v extrémnych podmienkach" – etapa II (www.machina.sk). Tato práce byla podporovaná Agenturou na podporu výzkumu a vývoje na základě smlouvy č. APVV-0282-11.*

#### LITERATURA

1. Filip J., Gemeiner P., Tomčík P., Tkáč J.: Chem. Listy 106, 158 (2012).
2. Filip J., Šefčovičová J., Gemeiner P., Tkáč J.: Electrochim. Acta 87, 366 (2013).

## TRANSFORMACE LNU SETÉHO GENEM *HisCUP* PRO ZVÝŠENÍ AKUMULACE TĚŽKÝCH KOVŮ

**JAN FIŠER<sup>a</sup>, MIROSLAVA VRBOVÁ<sup>b</sup>, MARTINA NOVÁKOVÁ<sup>a</sup>, TOMÁŠ MACEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Vysoká škola chemicko-technologická, FPBT, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 16628 Praha

<sup>b</sup>Agritec s.r.o., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk  
fiserj@vscht.cz

Kontaminace životního prostředí těžkými kovy je celosvětově závažný problém, na jehož řešení se může vedle klasických fyzikálně-chemických dekontaminačních postupů podílet také bioremediace. Důležitou bioremediační metodou je tzv. fyto-remediace, která využívá rostliny pro akumulaci těžkých kovů do nadzemních sklíditelných částí. Rostliny přirozeně akumulující vysoké koncentrace těžkých kovů ovšem často pomalu rostou a netvoří dostatek biomasy. Proto je snaha zvýšit schopnost akumulace těžkých kovů u rostlin s vhodnými růstovými vlastnostmi pomocí molekulárně genetických technik.

Metalothioneiny jsou proteiny účastníci se homeostázy kovů v eukaryotních organismech a jejich potenciál vázat těžké kovy byl v této práci využit k přípravě transgenních rostlin se zvýšenou schopností akumulace těžkých kovů. Gen *CUP1* kóduje kvasničný metalothionein a pro další zvýšení vazebné kapacity byl fúzován s histidinovou kotvou (*HisCUP*). Gen *HisCUP* byl vložen pod konstitutivním promotorem viru kvěťákové mozaiky do rostlinného vektoru pGreen0029, který obsahuje gen pro rezistenci ke kanamycinu umožňující selekci transgenních rostlin. Expres genu *HisCUP* v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum*) byla potvrzena metodou transientní exprese na úrovni mRNA i proteinu. Metalothionein *HisCUP* byl prokázán imunochemickou detekcí a, po fúzi genu *HisCUP* s genem pro GFP, rovněž emitovaným fluorescenčním zářením. Pro trvalou transformaci byl zvolen len setý (*Linum usitatissimum*) jako představitel technické plodiny mírného pásma s dobře zvládnutou agrotechnikou. Pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí vektor s genem *HisCUP* bylo připraveno 8 linií transgenních rostlin selektovaných na médiu s kanamycinem a ze 7 z nich se podařilo získat semena. Přítomnost genu *HisCUP* v genomech rostlin T1 generace byla potvrzena u všech 7 linií. Nyní probíhají pokusy o ověření zvýšené akumulace těžkých kovů v nadzemních částech transgenního lnu setého.

Tato práce byla podporována granty MŠMT LH12087 a GAČR P501/12/P521.

## VLIV INHIBITORŮ HISTONDEACETYLAS NA PROTINÁDOROVÝ ÚČINEK CYTOSTATIK

**TOMÁŠ GROH<sup>a\*</sup>, JAN HRABĚTA<sup>b</sup>, JITKA POLJAKOVÁ<sup>a</sup>, TOMÁŠ ECKSCHLAGER<sup>b</sup>, MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Katedra biochemie, PŘF UK v Praze, Albertov 2030, 128 40 Praha 2; <sup>b</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie, UK v Praze, 2. LF a FN v Motole, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5  
grohtomasmail@gmail.com

Etoposid (VP-16), inhibitor topoisomerasy II, se používá v léčbě zhoubných nádorů včetně neuroblastomu (NBL). Inhibice topoisomerasy II v nádorových buňkách narušuje integritu DNA a indukuje buněčnou smrt. Jiným mechanismem působí na nádorové buňky cisplatina (CDDP), která se váže kovalentně na DNA a která vede k inhibici replikace a transkripce ovlivňující buněčný cyklus a indukci apoptózy. V této studii jsme testovali účinek VP-16 a CDDP na lidské NBL linie v kombinaci s jedním z inhibitorů histondeacetylas (HDAC), kyselinou valproovou (VPA). VPA se používá k léčbě epilepsie a bipolárních poruch. Její protinádorové účinky, které souvisí s inhibicí HDAC, však byly popsány teprve nedávno. V naší práci byl studován účinek VP-16 a CDDP v kombinaci s VPA na NBL linie včetně jejich chemorezistentních subklonů v podmínkách normoxie a hypoxie (1% O<sub>2</sub>). Použité koncentrace cytostatik a VPA byly analogické jejich hladinám v séru léčených pacientů. Výsledky MTT testu a vyšetření apoptózy prokazují, že NBL buněčné linie jsou citlivé k VP-16, CDDP i VPA. Za podmínek hypoxie se protinádorové účinky CDDP a VP-16 snižovaly, účinek VPA na NBL buňky hypoxie neovlivnila. Vliv VPA na cytotoxicitu CDDP a VP-16 se liší v závislosti na sledu aplikace těchto látek. Nejúčinnější cytotoxicita byla nalezena po preinkubaci buněk s VP-16 či CDDP, následovaná kultivací buněk s VPA. Naopak obrácené pořadí inkubací (preinkubace buněk s VPA před kultivací s VP-16 či CDDP) cytotoxicitu cytostatik mírně snižovalo. Tento rozdíl lze vysvětlit ovlivněním buněčného cyklu NBL při preinkubaci s VPA, která způsobuje zadržení buněk v G0/G1 fázi, ve které jsou buňky k VP-16 i CDDP málo citlivé. Obdobně, ale i protichůdné výsledky byly popsány u různých nádorových linií inkubovaných s cytostatiky a inhibitory HDAC. Zjištěné výsledky mohou mít praktický význam pro léčebné postupy v klinické onkologii.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK č. 635712/2012 a GAČR P301/10/0356.

## SELEKTÍVNÁ VÁZBA PROTEÍNU p53 A BRCA-1 KU KRÍŽOVÝM ŠTRUKTÚRAM DNA

**LUCIA HÁRONÍKOVÁ, VÁCLAV BRÁZDA**

Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.,  
Královopolská 135, 612 65 Brno  
luh@ibp.cz

Proteiny p53 a BRCA-1 sú produktmi nádorových supresorových génov a podieľajú sa na oprave DNA. Pri ich poškodení dochádza často k nádorovým ochoreniam. U obidvoch proteínov hrá kľúčovú úlohu v ich funkčnej väzbe k DNA. Afinita k DNA je ovplyvnená prítomnosťou špecifickej väzbovej sekvencie, topológiou molekuly a jej dĺžkou. V posledných rokoch bola dokázaná preferenčná



vázba proteínov k negatívne superhelikálnym DNA, s potenciálom tvoriť krížové štruktúry<sup>1,2</sup>. Takéto štruktúry vznikajú prirodzene v DNA pri rôznych biologických procesoch ako napríklad replikácia, oprava poškodenej DNA, rekombinácia. V tejto práci boli skúmané väzby proteínov p53 a BRCA-1 fragmentu (AK 444 – 1057) voči rôznym štruktúram DNA charakteristickými pre poškodenie DNA, konkrétne oligonukleotidy tvoriace ss, ds, CC a GT nespárované báze, krížovú štruktúru a výdut'. V nekompetičných experimentoch na nedenurovanom polyakrylamidovom géle sme dokázali väzbu p53 k fluorescenčne značeným oligonukleotidom. p53 sa najlepšie viazal k oligonukleotidu tvoriaceho krížovú štruktúru, a to už pri molárnom pomere oligonukleotid: p53 1:0,5. U iných štruktúr oligonukleotidov bola pozorovaná väzba až pri vyšších molárnych pomeroch. Podobne reaguje aj proteín BRCA-1, ktorý sa viaže s krížovou štruktúrou už od pomere oligonukleotid: BRCA-1 1:0,5. V kompetičných experimentoch sme dokázali preferenciu proteínov ku krížovej štruktúre oproti iným oligonukleotidom. Zatiaľ čo 20-násobok lineárnej DNA u proteínu p53 vedie k zrušeniu väzby s krížovou formou len o 45 %, u proteínu BRCA-1 je to 58 %. Väzba proteínov na krížové štruktúry bola zobrazená aj pomocou mikroskopie atomárnych síl. Preskúmanie povahy väzby proteínov BRCA-1 a p53 k DNA môže viesť k lepšiemu porozumeniu dejov odohrávajúcich sa v biologických systémoch závislých na týchto proteínoch.

*Tato práce vznikla za podpory grantu P301/11/2076.*

#### LITERATÚRA

1. Paleček E., Brázda V., Jagelska E., Pečinka P., Karlovská L., Brázdová M.: *Oncogene* 23, 2119 (2004).
2. Brázda V., Jagelská E. B., Liao C. C. J., Arrowsmith Ch. H.: *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27, 97 (2009).

#### ÚLOHA ATREMINU PRI PAŽERÁKOVEJ HYPERSENZITIVITE: NAŠE PRVÉ VÝSLEDKY

**JOZEF HATOK<sup>a,b,\*</sup>, PETER BÁNOVČIN<sup>a,c</sup>,  
LENKA SURDENÍKOVÁ<sup>a,d</sup>, RÓBERT DUŠENKA<sup>a,e</sup>,  
SVETLANA GROBARČIKOVÁ<sup>a,e</sup>,  
ALEXANDER SVERSTAD<sup>a,d</sup>, JURAJ HALIČKA<sup>a,d</sup>,  
MARIÁN KOLLÁRIK<sup>a,d</sup>**

<sup>a</sup>Johns Hopkins School of Medicine, USA; <sup>b</sup>\*Ústav lekárskej biochémie, <sup>c</sup>Interná klinika Gastroenterologická; <sup>d</sup>Ústav patologickej fyziológie, <sup>e</sup>Urologická klinika JLF v Martine UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovensko  
hatok@jfmed.uniba.sk

Hypersenzitívny pažerák je stav, pri ktorom vznikajú algické senzácie ako je pyrôza, nekardiálna bolesť na hrudníku aj u pacientov s negatívnymi endoskopickými a histologickými zmenami a s fyziologickým časom kontaktu žalúdočnej kyseliny so sliznicou pažeráku. Jedným z hlavných mechanizmov vzniku týchto stavov je práve hypersenzitivita na úrovni aferentných nervov, pričom mechanizmy navodzujúce dlhodobú neuroplastickú hypersenzitivitu ezofageálnych aferentných nervov nie sú

objasnené. Aj na základe nami dosiahnutých výsledkov môžeme v súčasnosti povedať, že pažerák je inervovaný tromi podtypmi nocireceptorov: spinálnymi i vágovými jugulárnymi neurokrestálneho pôvodu a vágovými nodóznymi plakodálného pôvodu. Podľa súčasných poznatkov sú neurotrofické faktory jediné známe molekuly vznikajúce pri zápale schopné navodiť dlhodobé zmeny v aferentných nervoch. Neurotrofický faktor artemin (člen rodiny GDNF), signalizovaný preostredníctvom tyrozín kinázového receptora GFR $\alpha$ 3, je jedným z predpokladaných adeptov schopných indukovať zmeny v patomechanizmoch neuropatickej viscerálnej bolesti.

Cieľom našich experimentov bolo: 1) špecifikovať podtyp aferentných nervov inervujúcich mukózu pažeráka u morčiat, 2) stanoviť expresiu arteminu v humánných biotických vzorkách sliznice s refluxnou ezofagitídou.

Ako metódy sme použili: *in vivo* transfekciu aferentných neurónov s adeno-asociovaným vírusom produkujúcim Green fluorescent protein, single cell RT-PCR a kvantitatívnu PCR. Naše predbežné výsledky, ktoré sú v súlade s našou hypotézou, jednoznačne poukazujú nato, že: a) sliznica pažeráka je inervovaná neurokrestálnymi a nie plakodálnymi zakončeniami, b) práve neurokrestálne (80-90%) exprimujú receptor pre artemin GFR $\alpha$ 3, c) expresia arteminu je 5-násobne zvýšená v biopických vzorkách sliznice pažeráku u pacientov s refluxnou ezofagitídou.

Na záver môžeme konštatovať, že artemin hrá rolu v mechanizme navodenia ezofageálnej hypersenzitivity. Komplexné pochopenie mechanizmov vzniku a perzistencie viscerálnej hypersenzitivity by otvorilo nové možnosti v manažmente a liečbe pacientov s terapeuticky náročnými funkčnými ochoreniami gastrointestinálneho traktu.

*Táto práca bola podporená projektom "CEVYPET" spolufinancovaným zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.*

#### DESIGN NANODIAMANTOVÝCH POVRCHŮ: MOLEKULÁRNÍ LEGO V ROZTOKU

**JAN HAVLÍK<sup>a,b,\*</sup>, IVAN ŘEHOŘ<sup>a</sup>, PETR CÍGLER<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, 128 43 Praha 2  
havlík@uochb.cas.cz

Fluorescenční nanodiamanty jsou nadějným materiálem s velkým potenciálem využití v oblasti netoxických nosičů léčiv a nezhášivých nanosenzorů. Uplatnění nanodiamantů coby široce použitelného biosenzoru vyžaduje navrzení vhodné architektury jejich povrchu, umožňující připojení žádaných funkčních molekul při současném zachování koloidní stability. Kovalentním navázáním hydrofobní vrstvy na povrch nanodiamantů jsme vytvořili částice zcela stabilní v hydrofobním prostředí. Tyto částice je možné využít jako platformu pro vytváření lipozomům podobných struktur, při zachování všech výhod plynoucích z použití pevných částic. Ukázali jsme také, že vytvořením lipidické dvojvrstvy

pomocí modifikovaných lipidů je možné připravit koloidně zcela stabilní částice, jejichž funkční vlastnosti lze volit změnou typu funkcionalizace. V současné době dále pokračujeme ve studiu vzniku struktur a jejich možných aplikací.



**VLIV JMV3002, JMV4208 A JMV2959, DLOUHODOBĚ PŮSOBÍCÍCH NEPEPTIDOVÝCH ANTAGONISTŮ GHRELINU, NA MYŠÍ MODEL OBEZITY INDUKOVANÉ VYSOKOTUKOVOU DIETOU**

**MARTINA HOLUBOVÁ<sup>a</sup>, VERONIKA NAGELOVÁ<sup>a</sup>, LENKA MALETÍNSKÁ<sup>a</sup>, BLANKA ŽELEZNÁ<sup>a</sup>, MARTIN HALUZÍK<sup>b</sup>, ZDENA LACINOVÁ<sup>b</sup>, PETRA KAVÁLKOVÁ<sup>b</sup>, JEAN-ALAIN FEHRENTZ<sup>c</sup>, JEAN MARTINEZ<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>ÚOCHB AV ČR, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>3. interní klinika I.LF UK a VFN, 128 08 Praha 2; <sup>c</sup>IBMM, UMR 5247, CNRS-UMI-UMII, Faculté de Pharmacie, 15 Av. Ch. Flahault, 34093 Montpellier, France  
holubova@uochb.cas.cz

Ghrelin, hormon sekretovaný zejména buňkami sliznice žaludku, je doposud jediným známým centrálně působícím orexigenním peptidem pocházejícím z periferie. Působí jako krátkodobý metabolický signál pocitu hladu a dlouhodobý signál adiposity, podporuje pozitivní energetickou bilanci organismu, zvyšuje příjem potravy a následně i tělesnou hmotnost<sup>1</sup>. Blokování či neutralizace signalizace ghrelinu prostřednictvím antagonistů ghrelinového receptoru GHS-R1 se tedy jeví jako potenciální terapeutický přístup vhodný pro snížení hmotnosti při léčbě obezity<sup>2</sup>.

Naši kolegové z CNRS v Montpellier ve Francii syntetizovali řadu stabilních antagonistů ghrelinového receptoru založených na substituovaných 1,2,4-triazolech. Jejich dávkově závislý inhibiční účinek na příjem potravy jsme prověřili v krátkodobém testu po jednorázovém

subkutánním podání hladovým štíhlým myším. Cílem předkládané studie bylo ověřit efekt tří z těchto látek (JMV4208, JMV3002 a JMV2959) na příjem potravy, tělesnou hmotnost a metabolické parametry po dlouhodobém podávání myším s obezitou indukovanou vysokotukovou dietou.

Testované látky byly podávány subkutánně dvakrát denně po dobu 14 dnů, v dávkách 10 a 20 mg/kg/den. JMV4208 a JMV3002 signifikantně snížily příjem potravy a způsobily 10%, resp. 15% úbytek tělesné hmotnosti. Při podání ve vyšší dávce došlo k signifikantnímu úbytku podkožní a perirenální tukové tkáně, v případě JMV3002 i tukové tkáně abdominální. Obě látky také snížily hmotnost jater, zmírnily steatózu vyvolanou podáváním vysokotukové diety a mírně zlepšily hodnoty metabolických parametrů (glukosa, insulin, leptin, adiponektin, triglyceridy, volné mastné kyseliny). Podávání JMV2959 mělo obdobný efekt, ten však vzhledem ke vzniku lokálních zánětů v místě aplikace nelze plně přičíst anorexigennímu působení látky. Získaná data naznačují možné budoucí využití JMV4208 či JMV3002 v terapii obezity.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA UK č. 560112.*

**LITERATURA**

1. Tschöp M., Smiley D.L., Heiman M.L.: *Nature* 407, 908 (2000).
2. Nass R., Gaylann B.D., Thorner M.O.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 340, 106 (2011).

**STUDIUM BIOLOGICKÝCH AKTIVIT ALKALOIDŮ IZOLOVANÝCH Z *Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. & KOERTE (FUMARIACEAE)**

**JAKUB CHLEBEK<sup>a</sup>, KATEŘINA MACÁKOVÁ<sup>a</sup>, LUCIE CAHLÍKOVÁ<sup>a</sup>, LUBOMÍR OPLETAL<sup>a</sup>, FRANCESCA MANCINI<sup>b</sup>, ANGELA DE SIMONE<sup>b</sup>, VINCENZA ANDRISANO<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, ADINACO Research Group, FarmF UK, 500 05 Hradec Králové; <sup>b</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italy  
Jakub.Chlebek@faf.cuni.cz

Hlízy dymnivky duté (*Corydalis cava*, Fumariaceae) byly vybrány jako zdroj isochinolinových alkaloidů pro studium jejich vybraných biologických aktivit potenciálně využitelných v terapii Alzheimerovy choroby. Ze sumárního ethanolového extraktu hlíz byl nejprve připraven alkaloidní koncentrát obsahující terciární alkaloidy. Tento alkaloidní extrakt byl dále zpracováván běžnými chromatografickými metodami (sloupcová chromatografie, preparativní TLC), které vedly k izolaci 15 isochinolinových alkaloidů. Izolované alkaloidy byly testovány *in vitro* na inhibici erytrocytární AChE, sérové BuChE, BACE1 a schopnost zhášet volné radikály.

Inhibice AChE a BuChE byla měřena modifikovanou spektrofotometrickou Ellmanovou methodou<sup>1</sup>. (+)-Kanadalin

inhiboval AChE i BuChE způsobem závislý na dávce ( $IC_{50} = 20,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$  a  $85,2 \pm 3,2 \mu\text{M}$ ). (+)-Kanadin byl neúčinnějším inhibítorem AChE ( $IC_{50} = 12,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ), zatímco ( $\pm$ )-korykavidin a (+)-bulbokapnin byly efektivními inhibitory BuChE ( $IC_{50} = 46,2 \pm 2,4 \mu\text{M}$  a  $67,0 \pm 2,1 \mu\text{M}$ ). Další izolované alkaloidy byly považovány za neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

Zhášecí aktivita volných radikálů byla testována DPPH testem<sup>2</sup>. Nejvyšší aktivitu vykazovaly (–)-skulerin, (–)-sinoakutin a (+)-bulbokapnin ( $EC_{50} = 102 \pm 6,2 \mu\text{M}$ ,  $209 \pm 8,1 \mu\text{M}$  a  $279 \pm 16,7 \mu\text{M}$ ). Další alkaloidy byly považovány za neaktivní ( $EC_{50} > 1000 \mu\text{M}$ ).

Inhibice BACE1 izolovaných látek byla měřena na multijamkovém spektrofluorometru metodou využívající FRET princip<sup>3</sup> a pomocí imobilizovaného enzymového reaktoru zapojeného do HPLC systému (hrBACE1-IMER metoda)<sup>4</sup>. (–)-Korykavamin a (+)-korynolin inhibovaly BACE1 ve FRET testu ( $IC_{50} = 41,16 \mu\text{M}$  a  $IC_{50} = 33,59 \mu\text{M}$ ) i v hrBACE-IMER metodě ( $IC_{50} = 1690 \mu\text{M}$  a  $IC_{50} = 59,07 \mu\text{M}$ ). Ostatní sloučeniny byly neaktivní nebo nevykazovaly závislost mezi koncentrací látky a enzymovou inhibicí.

*Tato práce vznikla za podpory grantů GA UK 122309, SVV-2012-265002 a projektu TEAB, č. CZ.1.07/2.3.00/20.0235.*

#### LITERATURA

1. Bajgar J.: Voj. Zdrav. Listy 49, 78 (1972).
2. Polasek M., Skala P., Opletal L., Jahodar L.: Anal. Bioanal. Chem. 379, 754 (2004).
3. Mancini F., Andrisano V. J.: Pharm. Biomed. Anal. 52, 355 (2010).
4. Mancini F., Naldi M., Cavrini V., Andrisano F.: Anal. Bioanal. Chem. 388, 1775 (2007).

#### FYZIKÁLNĚ CHEMICKÝ POHLED NA OTEVÍRÁNÍ MEMBRÁN POMOCÍ DIMETHYLSULFOXIDU, VLIV BĚŽNĚ PŘÍTOMNÝCH KATIONTŮ

*Tato práce je dedikována památce doc. Detlefa Schrödera – skvělého vědce, výtečného odborníka nejen na poli fyzikální organické chemie i velkého člověka.*

**JANA JAKLOVÁ DYTRTOVÁ<sup>a\*</sup>, MICHAL JAKL<sup>b</sup>,  
MICHAL STRAKA<sup>a</sup>, TOMÁŠ NAVRÁTIL<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>ÚOCHB AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Dept Agro-Environ. Chem. Plant Nutr., ČZU v Praze, 165 21 Praha; <sup>c</sup>ÚFCH J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., 182 23, Praha 8  
dytrtova@uochb.cas.cz

Dimethylsulfoxid (DMSO) se v praxi běžně využívá k tzv. otevírání membrán pro látky, které samovolně (nebo jen v omezené míře) fosfolipidovými membránami neprocházejí. Jeho spíše empirické využití v této oblasti lze nalézt jak v medicíně, tak i v zemědělství<sup>1,2</sup>. Samotný mechanismus působení DMSO dosud nebyl uspokojivě objasněn. Důvodem je především obtížnost provádění experimentů ve vodném prostředí<sup>3,4</sup>. Působení DMSO na fosfolipidy v biologických membránách je velmi závislé na dalších přítomných složkách. V příspěvku je popsáno

působení vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na přímou interakci s fosfolipidy. Vápenaté kationty tvoří ve vodném prostředí s DMSO komplexy obecného složení:  $[\text{Ca}(\text{DMSO})_x(\text{H}_2\text{O})_y]^{2+}$ , kdy  $x$  nabývá hodnot 2 až 6 v závislosti na teplotě a  $y$  0 až 2. Tyto komplexy jsou velmi stabilní, k čemuž přispívá i tvorba intramolekulární vodíkové vazby. Tyto komplexy byly studovány experimentálně pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a stability vzniklých komplexů byly ověřeny výpočtem.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT (S grant).*

#### LITERATURA

1. Gurtovenko A.A., Anwar J.: J. Phys. Chem. B 111, 10453 (2007).
2. Williams A.C., Barry B.W.: Adv. Drug Del. Rev. 64 Supplement, 128 (2012).
3. Notman R., Noro M., O'Malley B., Anwar J.: J. Am. Chem. Soc. 128, 13982 (2006).
4. Notman R., den Otter W.K., Noro M.G., Briels W.J., Anwar J.: Biophys. J. 93, 2056 (2007).

#### ZAPOJENÍ KOMPONENT FOSFOLIPIDOVÉHO SIGNÁLNÍHO SYSTÉMU A CYTOSKELETU V DRÁŽE KYSELINY SALICYLOVÉ V *Arabidopsis thaliana*

**MARTIN JANDA, JINDŘIŠKA MATOUŠKOVÁ,  
VLADIMÍR ŠAŠEK, LENKA BURKETOVÁ, OLGA  
VALENTOVÁ**

Laboratoř biochemie rostlin, Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, 166 28 Praha 6; Laboratoř patofyziologie rostlin, ÚEB AV ČR, v.v.i., 165 02 Praha 6  
matesjanda@gmail.com

V procesu rostlinné „imunity“ se rozehrává orchestr komplexních dějů, které nakonec vyústí v účinnou obrannou odpověď vůči biotickému stresu. „Zpráva“ o působení stresu je mezi povrchem buňky a jádrem zprostředkovávána rozličnými signálními drahami, které jsou mezi sebou vzájemně propojené. Jednou z nejvýznamnějších je dráha kyseliny salicylové (SA), která je v rámci obranných mechanismů rostlin velmi intenzivně studována již více než 20 let. Klíčovým proteinem této signalizace je NPR1 (nonpathogenesis related protein 1). Ten se vyskytuje v cytosolu rostlinné buňky jako oligomer. Při akumulaci SA v buňce však monomerizuje a tento monomer přechází do jádra buňky, kde indukuje transkripci obranného genu *PR1* (pathogenesis related 1)<sup>1,2</sup>. Bylo popsáno, že dráha SA je ovlivněna interakcí s fosfolipidovým systémem, konkrétně fosfolipasou D (PLD, EC 3.1.4.4)<sup>3</sup>. Ta je v *Arabidopsis thaliana* kódována 12 různými geny<sup>4</sup>. PLD štěpí fosfolipidy za vzniku polární hlavičky a kyseliny fosfatidové (PA), která je významným sekundárním poslem<sup>5</sup>.

Pomocí RT-PCR jsme prokázali, že butanol, jenž ovlivňuje aktivitu PLD, blokuje transkripci *PR-1* (pathogenesis related protein 1) v přítomnosti SA. S využitím mutantů NPR1-GFP jsme pomocí fluorescenční mikroskopie pozorovali

vali, že *n*-butanol snižuje akumuláciu monomeru NPR1 v jádre. V našej ďalšej práci sa zameriujeme na zistenie, ktorá z isoform PLD je zodpovedná za nami zistené efekty v SA dráze. Na základe analýzy verejne dostupných transkriptomických dát boli vytipované kandidátne isoformy, z ktorých transkripcia sa zvyšuje po ošetrovaní SA. V súčasnej dobe sa snažíme pomocou stratégie artificial microRNA<sup>4</sup> vytvoriť mutantné rastliny s umlčenými kandidátnymi geny PLD.

Dále jsme při studiu dráhy SA zjistili, že v této signální dráze je zapojen doposud neznámým způsobem aktinový cytoskelet. Ošetřili jsme rostliny *Arabidopsis* cytoskeletárními drogami a pomocí RT-PCR sledovali zvýšenou expresi *PRI*. Zároveň jsme v experimentech *in vivo* pozorovali, že SA způsobuje rozpad aktinových filament, podobným způsobem jako po ošetření cytoskeletárními drogami. Naším dalším cílem je zjistit, jakým způsobem je aktinový cytoskelet zapojen v signální dráze SA.

*Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 21/ 2013) a grantu GAČR 501/11/1654.*

#### LITERATURA

1. Mou Z., Fan W., Dong X.: *Cell* 113, 935 (2003).
2. Wu Y., Zhang D., Chu J.Y., Boyle P., Wang Y., Brindle I.D., De Luca V., Després C.: *Cell Rep.* 6, 639 (2012).
3. Krinke O., Flemr M., Vergnolle C., Collin S., Renou J.P., Taconnat L., Yu A., Burketová L., Valentová O., Zachowski A., Ruelland E.: *Plant Physiol.* 1, 424 (2009).
4. Wang X.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 408 (2002).
5. Bargmann B.O.R., Munnik T.: *Current Opin. Plant Biol.* 9, 515 (2006).
6. Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., Weigel D.: *Plant Cell.* 5, 1121 (2006).

#### ÚLOHA VÁPNIKA V PATOFYZIOLOGICKOM PROCESE FIBROTICKEJ JAZVY

**KATARÍNA JAŠKOVÁ<sup>a</sup>, DANA JURKOVIČOVÁ<sup>a</sup>,  
MICHAL CAGALINEC<sup>b</sup>, EUBICA LACINOVÁ<sup>a</sup>,  
MICHAELA PAVLOVIČOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, SR; <sup>b</sup>Oddelenie farmakológie, Lekárska fakulta, Ravila 19, 504 11 Tartu, Estónsko  
katarina.jaskova@savba.sk

V neurónoch Ca<sup>2+</sup> kontroluje procesy ako plasticita a synaptický prenos. Porucha v regulácii koncentrácie Ca<sup>2+</sup> narušuje životaschopnosť neurónu a jeho fyziologické funkcie.

Na štúdium zapojenia vápnikových transportérov v neurodegeneratívnom procese sme použili model *in vitro* fibrotickej jazvy<sup>1</sup>. Tvorená je z primárnej kultúry cerebelárnych granulórných neurónov (CGNs) rastúcich na primárnych ko-kultúrach kortikálnych astrocytov a meningeálnych fibroblastov, ku ktorým bol pridaný transformačný

rastový faktor β1 (TGF-β1). Spojenie astrocytov a fibroblastov vedie k tvorbe hustej siete so zreteľným ohraničením jazvy (tzv. glia limitans), ktorá oddeľuje poškodenú léziu alebo zápal od okolitého zdravého tkaniva.

Sledovali sme zmeny v génovej expresii vnútrobunkových vápnikových transportérov (IP<sub>3</sub>R1, IP<sub>3</sub>R2, RyR1, RyR2, SERCA2) a transportéra v plazmatickej membráne (NCX) na úrovni mRNA a v prípade IP<sub>3</sub>R1 aj na úrovni proteínu. Zmeny sme sledovali v našom modeli fibrotickej jazvy po ovplyvnení s 2-APB (neselektívny blokátor IP<sub>3</sub> receptorov) a LY364947 (selektívny blokátor tyrozín kinázovej domény receptora pre TGF-β1). Z morfológie hľadiska sme sledovali zmeny v dĺžkach neuritov CGNs a zo štruktúrneho hľadiska hustotu a lokalizáciu IP<sub>3</sub>R1 po vystavení CGNs účinkom odlišných modulátorov.

Zistili sme, že patofyziologické podmienky indukované pomocou TGF-β1 viedli k zníženiu génovej expresie všetkých vápnikových transportérov na úrovni mRNA. Aplikácia 2-APB znížila génovú expresiu len IP<sub>3</sub>R1 a IP<sub>3</sub>R2. LY364947 potvrdil účinok TGF-β1 a navrátil hladiny mRNA u všetkých transportérov na úroveň kontrolných neurónov. Rovnaký efekt sme pozorovali tiež na úrovni proteínu IP<sub>3</sub>R1. TGF-β1 mal vplyv aj na skrátenie dĺžok neuritov CGNs a na presun IP<sub>3</sub>R1 z perinukleárneho do jadrového priestoru.

Patofyziologický model *in vitro* fibrotickej jazvy mal vplyv nielen na skrátenie dĺžok neuritov, ale aj na zmeny v génovej expresii vápnikových transportérov. Vplyva teda na zmeny neuronálnej Ca<sup>2+</sup> homeostázy.

*Tato práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0097/11 a APVV-0212.10.*

#### LITERATÚRA

1. Kimuro-Kuroda J., Teng X., Komuta Y., Yoshioka N., Sango K., Kawamura K., Raisman G., Kawano H.: *Mol. Cell Neurosci.* 43, 2 (2010).

#### VYUŽITÍ FOTOAKTIVOVATELNÝCH NANOSOND A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE KE STUDIU STRUKTURY A INTERAKCÍ CYTOCHROMU P-450 2B4 A CYTOCHROMU B<sub>5</sub>

**TOMÁŠ JEČMEN<sup>a,b</sup>, RENATA ŠNAJDROVÁ<sup>a,b</sup>,  
MONIKA KOBEROVÁ<sup>b</sup>, VĚRA ČERNÁ<sup>b</sup>, DANIEL  
KAVAN<sup>a,b</sup>, PETR NOVÁK<sup>a,b</sup>, PETR HODEK<sup>b</sup>,  
MIROSLAV ŠULC<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vítězská 1083, Praha,  
<sup>b</sup>Univerzita Karlova, Hlavova 8, Praha  
tomas.jecmen@centrum.cz

V organizme se na detoxikaci cizorodých látek, metabolismu léčiv a bohužel také aktivaci některých karcinogenů podílí systém membránových monoxygenas – cytochromů P-450 (P450). Jedním z jejich redoxních partnerů je cytochrom b<sub>5</sub>, který kromě přenosu druhého elektronu v reakčním cyklu P450 může stimulovat jeho katalytickou aktivitu.

Pro studium struktury a interakcí obou cytochromů v lipidické membráně jsme vyvinuli novou metodu fotosíťování. Nejprve jsme exprimovali fotoaktivovatelnou nanosondu – cytochrom  $b_5$ , jehož 3 methioniny (dva lokalizované v membránové doméně, jeden ve spojení membránové a katalytické domény) jsou nahrazeny fotoaktivovatelným analogem foto-methioninem. Ozářením ekvimolární směsi nanosondy a P450 2B4 rekonstituovaných s lipidickou membránou jsme získali 3 kovalentní komplexy o různé stechiometrii<sup>1</sup>. Binární komplex jsme dále analyzovali pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením.

Možnou interpretaci identifikovaných kovalentních spojení jsou dva odlišné způsoby vzájemné orientace obou cytochromů: první umožňuje přenos elektronů z cytochromu  $b_5$  na P450, druhá naopak ze sterických důvodů přenos elektronů neumožňuje, nabízí ovšem možné vysvětlení podstaty modulace katalytických vlastností P450. V neposlední řadě se nám díky naší nové metodě také podařilo optimalizovat rekonstituční protokol, který lépe odpovídá „*in vivo*“ – transmembránovému – uchycení proteinů.

Pro snadnější identifikace protein-proteinových interakcí a určení vlivu jednotlivých foto-methioninů při tvorbě kovalentních komplexů byly zkonstruovány mutanty nanosondy, které v aminokyselinové sekvenci obsahují vždy pouze jeden foto-methionin, a s nimi byly následně síťovací experimenty zopakovány.

Získané strukturální informace budou dále využity pro zpřesňování „*in silico*“ modelů interakce zkoumaných proteinů.

Finanční podpora: GAČR P207/12/0627, UNCE 204025/2012.

#### LITERATURA

1. Koberova M., Jecmen T., Sulc M., Cerna V., Krizek R., Hudecek J., Stiborova M., Hodek P.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 125, 8 (2013).

#### STATINY OVLIVŇUJÍ PLURIPOTENCI LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

**ŠÁRKA JELÍNKOVÁ, TAMÁS TEREH, IVANA AČIMOVIČ, LUKÁŠ BÁLEK, PETR DVOŘÁK, VLADIMÍR ROTREKL**

Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, budova A3, 625 00 Brno  
356972@mail.muni.cz

Lidské embryonální kmenové buňky (hESC) mají schopnost diferencovat do libovolného buněčného typu. Pluripotence je předurčuje k využití pro buněčnou terapii v klinické medicíně. Takovému využití předchází nutnost dlouhodobé propagace *in vitro*. Dlouhodobá kultivace však vede k postupné ztrátě jejich kmenových vlastností a stability genomu – tzv. adaptaci na podmínky *in vitro*<sup>1</sup>.

Tato studie se zaměřila na studium kmenových vlastností a genomové integrity hESC kultivovaných v přítom-

nosti statinů, inhibitorů 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reduktasy. Statiny jsou běžně používané jako léky na hypercholesterolemii. Dále jsou zkoumány cesty působení, a to především na různé typy nádorových buněk přes signální dráhy se zapojenými Ras proteiny<sup>2-5</sup>. Ras proteiny vyžadují pro svoji aktivaci modifikaci geranylgeranylpyrofosfátem, jehož syntéza je v buňce blokována statiny<sup>6</sup>. Není však jasné, na jakých dalších drahách se účinky statinů také projevují. Přestože ve světě běží bohatý výzkum vlivu statinů na vaskulární systém a nádorové buňky, co se kmenových buněk týče, vliv statinů je v podstatě neznámý.

V této práci byl analyzován bezprostřední vliv statinů na kmenové vlastnosti buněk a jejich efekt po následné selekci při kultivaci hESC v přítomnosti statinů a to z hlediska adaptace na dlouhodobou kultivaci. Jako model adaptace byly použity buňky nízkých pasáží (neadaptované: pasáž 20-50) a vysokých pasáží (adaptované: pasáž > 100). Vliv statinů byl studován na hESC kultivovaných na podpůrné vrstvě myších embryonálních fibroblastů (MEF), ze kterých byly manuálně selektovány pouze hESC pro analýzy, nebo na bezbuněčné podpůrné matici (BD Matrigel<sup>TM</sup>).

Změny kmenovosti hESC jsou často spojeny se změnou morfologie kolonií. Selektce se skutečně projevila zlepšením morfologie. Po působení statinů byl pozorován vyšší poměr jasně ohraničených a velmi kompaktních kolonií hESC oproti rozvolněným, někdy i částečně diferenciovaným, koloniím hESC adaptovaných na dlouhodobou kultivaci *in vitro*.

Krom morfologických změn kolonií hESC byl prokázán efekt statinů na pluripotenci. Působení statinů zvýšilo hladinu pluripotenčního markeru Oct3/4 (zjištěnou za pomoci imunohistochemického barvení) u neadaptovaných hESC a hladina dalšího markeru pluripotence NANOG zůstala nezměněna. Na druhou stranu, exprese Oct3/4, zjištěná pomocí PCR po zpětné transkripci (RT-PCR), byla zvýšena u adaptovaných hESC kultivovaných na MEF.

Z hlediska diferenciačních schopností hESC adaptovaných na kultivaci *in vitro* byla kvalitativně posouzena tvorba embryoidních tělísek (EB) ze statiny ošetřených hESC. Jejich morfologická analýza ukázala pozitivní vliv působení statinů na hESC.

Statiny tak otevírají cestu, která může vést k překonání překážek bránících dlouhodobé kultivaci hESC *in vitro* a jejich možnému budoucímu využití v klinické medicíně.

Tato práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury České republiky (Grant č. P302/12/G157) a projektu FNUSA-ICRC (č. CZ.1.05/1.1.00/02.0123) z Evropského fondu regionálního rozvoje.

#### LITERATURA

1. Krutá M., Bálek L., Hejnová R., Dobšáková Z., Eisellová L., Matulka K., Bárta T., Fojtík P., Fajkus J., Hampl A., Dvořák P., Rotrekl V.: *Stem Cells* 2012, 1549.
2. Dimitroulakos J., Ye L. Y., Benzaquen M., Moore M. J., Kamel-Reid S., Freedman M. H., Yeger H., Penn L. Z.: *Clin. Cancer Res.* 7, 158 (2001).

- Mantha A. J., Hanson J. E., Goss G., Lagarde A. E., Lorimer I. A., Dimitroulakos J.: *Clin. Cancer Res.* 11, 2398 (2005).
- Mantha A. J., McFee K. E., Niknejad N., Goss G., Lorimer I. A., Dimitroulakos J.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129, 631 (2003).
- Zhao T. T., Le Francois B. G., Goss G., Ding K., Bradbury P. A., Dimitroulakos J.: *Oncogene* 29, 4682 (2010).
- Xia Z., Tan M. M., Wong W. W., Dimitroulakos J., Minden M. D., Penn L. Z.: *Leukemia* 15, 1398 (2001).

### ZÁSADNÍ VLIV KONZERVOVANÝCH EKTODOMÉNOVÝCH CYSTEINŮ NA FUNKCI P2X7 RECEPTORU.

**MARIE JINDŘICHOVÁ\*, PAVLO KUZYK, HANA ZEMKOVÁ**

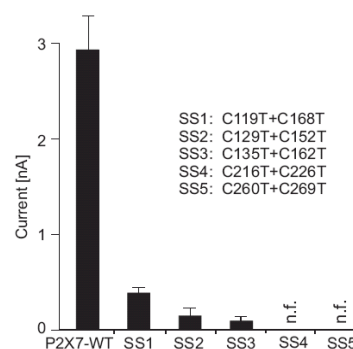
*Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Vítězská 1083, 142 20 Praha 4*

*jindrichova@biomed.cas.cz*

Purinergní P2X receptory, aktivované extracelulárním ATP (adenosin 5'-trifosfátem), reprezentují nový strukturální typ ligandem otevíraných iontových kanálů. U savců bylo doposud identifikováno sedm P2X podjednotek (P2X1-P2X7), které se formují do funkčních homomerů nebo heteromerů. Podjednotky se skládají ze dvou transmembránových domén, intracelulárního N- a C- konce a rozsáhlé extracelulární kličky, kde dochází k navázání ATP s následným tokem kationtů (zejména  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) skrze centrální kanál aktivovaného P2X receptoru<sup>1</sup>. V rámci P2X rodiny se významně odlišuje P2X7 receptor. Nejvýraznějším rysem je to, že v dlouhodobé přítomnosti agonisty receptor nedesenzitizuje jako ostatní P2X podtypy, ale jeho póř dilataje a dosahuje propustnost pro organické kationty. Tvorba póř v plazmatické membráně je spojena s nekontrolovaným vstupem  $\text{Ca}^{2+}$ , navíc aktivace receptoru stimuluje signální dráhy vyvolávající apoptózu. Naopak v přítomnosti nízké koncentrace agonisty stimuluje P2X7 receptor buněčnou proliferaci. P2X7 gen je vysoce polymorfní, jeho exprese a vlastnosti jsou změněny v nádorových buňkách<sup>2</sup>.

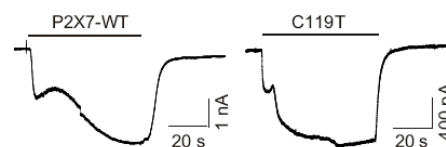
Společným rysem všech P2X receptorů je přítomnost deseti konzervovaných cysteinových zbytků v extracelulární doméně<sup>3</sup>. Tvoří následující intramolekulární disulfidové můstky (P2X7 číslování): Cys119-Cys168 (SS1), Cys129-Cys152 (SS2), Cys135-Cys162 (SS3), Cys216-Cys226 (SS4) a Cys260-Cys269 (SS5). Jako první jsme ukázali úlohu těchto cysteinů a disulfidových můstků v transportu a funkci P2X7 proteinu. Pomocí mutagenese *in vitro* a elektrofyziologie jsme testovali vliv cysteinů na kinetiku receptoru. Cysteinová rezidua byla zaměněna za treonin, jedno-/dvou- bodové mutace exprimovány v lidských embryonálních ledvinových buňkách (HEK293) a proudy indukované pomocí BzATP (selektivní P2X7 agonista) byly měřeny technikou terčíkového zámku. Membránová exprese byla detegována biotinylací.

Maximální amplituda proudové odpovědi ( $I_{\text{max}}$ ) byla u nemutovaného P2X7 receptoru (P2X7-WT)  $2.9 \pm 0.4$  nA. Nejprve jsme otestovali dvoubodové mutanty, kdy byly na treonin zaměněny oba cysteinové zbytky jednotlivých párů. Dvoubodová SS1 mutace (C119T+C168T) měla maximální odpověď zredukovanou na 14% ve srovnání s P2X7-WT receptorem. Mutace dalších cysteinových párů SS2 (C129+C152), SS3 (C135+C162), SS4 (C216+C226) nebo SS5 (C260+C269) vyústila ve vznik nefunkčních nebo málo funkčních receptorů s hodnotou  $I_{\text{max}}$  redukovanou o více než 95% (obr. 1). Biotinylace odhalila, že SS1-SS5 dvoubodové mutace mají nízkou membránovou expresi a jsou převážně lokalizovány intracelulárně.



Obr. 1. Maximální proudové odpovědi u P2X7-WT a dvoubodových mutací disulfidových můstků

Jednobodová mutace C119T neměla na rozdíl od dvoubodové C119T+C168T sníženou hodnotu  $I_{\text{max}}$  a měla zachovanou schopnost dilatace póř (obr. 2). Záchranu funkce receptoru pravděpodobně způsobuje vazba volného Cys168 s jiným reziduem. Jednobodová mutace C168T stejně jako ostatní jednobodové mutace byly nefunkční.



Obr. 2. Časový průběh proudové odpovědi vyvolané dlouhodobou aplikací BzATP (300 mikrom)

Výsledky ukazují, že SS můstky jsou nezbytné pro normální transport P2X7 proteinu do membrány a jeho normální funkci. Protože v některých typech nádorů je P2X7 povrchová exprese abnormálně zvýšena, regulace povrchové exprese může představovat významnou cestu k modulaci receptorových funkcí při patologických stavech.

*Práce vznikla za podpory grantu GAČR P304-12-P371.*

#### LITERATURA

- North R. A.: *Physiol Rev.* 82, 4 (2002).
- White N., Burnstock G.: *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 4 (2006).
- Ennion S. J., Evans R. J.: *Mol Pharmacol.* 61, 2 (2002).

## ANALÝZA BIOCHEMICKÝCH A MOLEKULÁRNYCH MARKEROV POŠKODENIA BIOMAKROMOLEKÚL V SLINÁCH PACIENTOV S PERIODONTITÍDOU

**NATÁLIA KAMODYOVÁ<sup>a,\*</sup>, LENKA BAŇASOVÁ<sup>b</sup>,  
KATARÍNA JANSÁKOVÁ<sup>c</sup>, PETER CELEC<sup>a,c,d</sup>**

<sup>a</sup>Ústav molekulárnej biomedicíny, LF UK, 81108 Bratislava; <sup>b</sup>PearlDental, Kaštieľska 2, 82105 Bratislava; <sup>c</sup>Katedra molekulárnej biológie, PrF UK, 84215 Bratislava; <sup>d</sup>Ústav patologickej fyziológie, LF UK, 81108 Bratislava  
n.kamodyova@gmail.com

Periodontálne ochorenia predstavujú významný stomatologický problém<sup>1</sup>. Oxidačný stres je zahrnutý v patogenéze periodontitídy<sup>2</sup>. V predchádzajúcich štúdiách sa ukázala významná asociácia medzi salivárnymi markermi lipoperoxidácie a stavom periodontitídy<sup>3</sup>. Cieľom tejto štúdie bolo stanoviť vzťahy medzi ďalšími markermi oxidačného stresu a antioxidačného statusu, molekulárnymi markermi a klinickými parametrami periodontálneho statusu.

Vzorky celkových slín boli odobraté od 23 pacientov s chronickou periodontitídou (vek 43,0 ± 7,6) a 19 kontrolných pacientov (vek 39,1 ± 8,8). U pacientov boli stanovené nasledujúce klinické parametre - BOP, SBI, PI, PPD a CAL. Oxidačný stres v slinách bol stanovený na základe koncentrácie látok reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS), produktov pokročilej oxidácie proteínov (AOPP), koncových produktov pokročilej glykozylácie (AGEs) a hladín celkovej antioxidačnej kapacity (TAC) a antioxidačnej schopnosti redukovať železitý kation (FRAP). Celkové množstvo bakteriálnej DNA a množstvo a integrita ľudskej DNA boli stanovené pomocou real-time PCR analýzy.

Klinické parametre boli významne horšie v skupine pacientov s chronickou periodontitídou v porovnaní s kontrolnou skupinou. Salivárne koncentrácie TBARS boli vyššie u mužov s periodontitídou v porovnaní s kontrolnou skupinou mužov o 192 % ( $p < 0,01$ ). Hladiny TAC a FRAP boli nižšie u žien s periodontitídou v porovnaní s kontrolnou skupinou žien o 54 % pri oboch parametroch ( $p < 0,01$ ). Salivárne TBARS korelovali s BOP, SBI, PPD a CAL ( $p < 0,05$ ). Zistili sme asociáciu medzi antioxidačnými markermi TAC a FRAP a PPD  $\leq 3$  mm a CAL  $\leq 3$  mm ( $p < 0,01$ ). Množstvo bakteriálnej DNA a množstvo a integrita ľudskej DNA sa významne nelíšili medzi pacientmi s periodontitídou a kontrolnými pacientmi.

Výsledky našej štúdie rozširujú možnosti objasnenia patogenézy a liečby periodontitídy prostredníctvom palety salivárných markerov oxidačného stresu a antioxidačného statusu.

Táto práca vznikla za podpory APVV grantu VMSP-II-0027-09.

### LITERATÚRA

- Rylev M., Kilian M.: J. Clin. Periodontol. 35, 346 (2008).
- Chapple I.L., Matthews J.B.: Periodontol. 2000 43, 160 (2007).

- Celec P., Hodosy J., Celicova V., Vodrazka J., Cervenka T., Halcak L., Bozek P., Kopani M., Kudela M.: Dis. Markers 21, 133 (2005).

## PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE PROTEINU S UNIKÁTNÍ SEKVENCÍ - POTENCIÁLNÍHO LEKTINU Z *Agaricus bisporus*

**EVA KAVKOVA<sup>a</sup>, JAN KOMÁREK<sup>b,c</sup>, MICHAELA WIMMEROVA<sup>a,b,c</sup>**

<sup>a</sup>Ústav biochemie a <sup>b</sup>NCBR, PrF MU, Kotlářská 2, 602 00 Brno; <sup>c</sup>CEITEC, MU, Žerotínovo nám. 9, 602 00 Brno  
kavkova@mail.muni

Lektiny jsou proteiny neimunitního původu, které mají schopnost reverzibilně vázat sacharidy. Vyskytují se u většiny organismů a hrají důležitou roli při procesu rozpoznávání v rámci jednoho organismu i mezi organismy navzájem. Díky schopnosti specificky vázat určité sacharidové struktury našly lektiny řadu praktických aplikací. Mohou sloužit pro specifický transport léčiv, využívají se v histochemii při zkoumání změn glykosylace na povrchu buněk<sup>1</sup>. Rada lektinů má rovněž imunomodulační, protinádorové nebo insekticidní vlastnosti či mitotickou aktivitu<sup>2</sup>.

Naše práce se zabývá přípravou a charakterizací potenciálního lektinu AB2L z *Agaricus bisporus* (žampion dvouvýtrusý), který nevykazuje významnou sekvenční homologii s žádnými proteiny v databázi NCBI a rovněž pro něj nebyly nalezeny vhodné strukturální homology při predikci terciární struktury. Protein AB2L byl nalezen v lyzátu z *A. bisporus* pomocí afinitní interakce se sacharidovými sorbenty (vsádková metoda) a identifikován hmotnostní spektrometrií. Vzhledem k malému obsahu lektinů v plodnicích hub byl protein AB2L, na jehož N-konec byla připojena histidinová kotva, připraven rekombinantní technologií s využitím expresního systému *E. coli*. Následnou purifikací metaloafinitní chromatografií, se podařilo získat protein v dostatečném množství a čistotě pro další experimenty. CD spektrometrií bylo zjištěno, že sekundární struktura proteinu AB2L je tvořena z převážně většiny  $\alpha$ -helixy. Oligomerní stav proteinu byl zkoumán pomocí analytické ultracentrifugy metodou sedimentační rychlosti. Rovněž bylo provedeno měření sedimentační rovnováhy. Pro protein AB2L byly nalezeny vhodné krystalizační podmínky a jeho struktura bude určena rentgenovou strukturální analýzou. Tento potenciální lektin bude dále charakterizován speciálními metodami (SPR, ITC).

Vlastnosti a vazebné schopnosti proteinu AB2L by mohly najít využití v biotechnologii či medicíně.

Tato práce vznikla za podpory projektu CEITEC – Středoevropský technologický institut CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.

### LITERATURA

- Sharon N., Lis H.: Glycobiology 14, 53 (2004).

2. Lam S. K., Ng T. B.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 45 (2011).

### EXPRESNÍ PROFIL VYBRANÝCH IMUNITNÍCH GENŮ U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI KRVETVORNÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

**PETRA KLEVCOVÁ<sup>a</sup>, FRANTIŠEK MRÁZEK<sup>a</sup>, REGINA FILLEROVÁ<sup>b</sup>, ZDENKA NAVRÁTILOVÁ<sup>a</sup>, ANTONÍN VÍTEK<sup>c</sup>, MICHAEL DOUBEK<sup>d</sup>, MARTIN PETŘEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratoř imunogenomiky a imunoproteomiky; <sup>b</sup>Ústav imunologie, LF UP, Olomouc; <sup>c</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; <sup>d</sup>Fakultní nemocnice Brno.  
Petra.klevcova@seznam.cz

Reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) je závažnou komplikací alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk<sup>1</sup> (aHSCT). Hlavními efektorovými buňkami GVHD jsou alogenní T-lymfocyty, významnou úlohu sehrávají také molekuly směřující T-lymfocyty do místa postižení. Cílem této práce bylo proto stanovit expresi aktivačních molekul Th1 (TBX21)<sup>2</sup> a Th2 (GATA3)<sup>3</sup> lymfocytů a lymfocytárních integrinů (ITGA4 a ITGB7)<sup>4</sup>.

Série vzorků periferní krve od šestnácti pacientů indikovaných k aHSCT byla odebrána do protektivního média před zahájením přípravného režimu (chemoterapie), v den podání štěpu kmenových buněk (před podáním) a dále 14, 21, 28, 100 a 180 dní po transplantaci. Relativní exprese mRNA výše uvedených genů byla stanovena metodou qRT-PCR.

Přípravný režim před transplantací snížil expresi ITGB7 a GATA3 ( $P = 0,003$ ;  $P = 0,0001$ ). Relativní exprese TBX21 byla po přípravném režimu naopak zvýšena ( $P = 0,015$ ) a klesla po transplantaci ( $P = 0,035$ ). Ve vzorcích odebraných 100 a 180 dní po transplantaci se exprese ITGB7 a GATA3 v průměru vrátila k hodnotám naměřeným před zahájením přípravného režimu. U TBX21 se relativní exprese ve vzorcích ze dne 100 a 180 po transplantaci zvýšila oproti stavu před přípravným režimem ( $P = 0,005$ ;  $P = 0,022$ ). Exprese ITGA4 nebyla signifikantně ovlivněna a také se nezměnila celou sledovanou dobu po transplantaci.

Naše pilotní data naznačují, že u pacientů indikovaných k HSCT snižuje přípravný režim expresi aktivátoru Th2 imunitní odpovědi (GATA3) a integrinu ITGB7. Relativní exprese genu TBX21 (Th1 marker) se zvyšuje po chemoterapii, klesá po převodu dárcovských buněk a opět se zvyšuje s odstupem po transplantaci. Po rozšíření souboru budeme naše data hodnotit také ve vztahu k výskytu a závažnosti GVHD.

*Tato práce vznikla za podpory projektů IGA MZ ČR NT12454, IGA UP 2013\_009 a CZ.1.05/2.1.00/01.0030.*

- Ferrara J. L., Levine J. E., Reddy P., Holler E.: Lancet 373, 1550 (2009).
- Szabo S. J., Kim T. S., Costa G. L., Zhang X., Fathman C. G., Glimcher L. H.: Cell 100, 655 (2000).

- Lee H. J., Takemoto N., Kurata H., Kamogawa Y., Miyatake S., O'Garra A., Arai N.: J. Exp. Med. 192, 105 (2000).
- Rose D. M., Alon R., Ginsberg M. H.: Immunol. Rev. 218, 126 (2007).

### ÚLOHA BIELKOVÍN HSP70 A HSP90 V PROGRAMOVANEJ BUNKOVEJ SMRTI V LEUKEMICKEJ BUNKOVEJ LÍNII HL-60

**KATARÍNA KLIKOVÁ\*, ANDREA ŠTEFANIKOVÁ, IVANA PILCHOVÁ, KATARÍNA KLAČANOVÁ, JOZEF HATOK, PETER RAČAY**

Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Ústav lekárskej biochémie, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovensko  
kataklikova@gmail.com

K leukémiám s najvyšším percentom úspešnosti v liečbe môžeme zaradiť akútnu promyelocytovú leukémiu (APL). Z epidemiologického hľadiska incidencia APL sa pohybuje okolo 0,7 prípadov na milión obyvateľov za rok. Mikrogranulárny variant APL tzv. M3 (podľa FAB klasifikácie) predstavuje leukemická bunková línia HL-60. Charakteristickou črtou buniek pri APL je porucha vyzrievania nad štádiom promyelocytu. V prípade APL ide o translokáciu medzi chromozómami 15 a 17 tzv. t(15;17)(q22;q12). V liečbe akútnych leukémií sú v súčasnosti v predklinickom a klinickom testovaní rôzne druhy molekúl ako napr. inhibítory proteazómu (bortezomib), inhibítory histónových deacetyláz (butyrát sodný), príp. inhibítory bielkovín bunkového stresu. V posledných rokoch sa ukazuje, že jedným z molekulových mechanizmov podmieňujúcich prežívanie a citlivosť leukemických buniek na cytotatiká je zvýšená expresia bielkovín bunkového stresu, ktoré významným spôsobom zasahujú do iniciácie apoptózy. Nové možnosti v terapii onkologických ochorení predstavujú práve antiapoptické bielkoviny (blokujúce apoptózu), kam patria bielkoviny tepelného šoku Hsp70 a Hsp90. Hsp70 a Hsp90 sú významným negatívnym regulátorom vonkajšej (receptorovej) a vnútornej (mitochondriálnej) dráhy apoptózy. V našej práci sme zamerali na sledovanie účinku inhibítorov bielkovín tepelného šoku pre Hsp70 (pifitrín- $\mu$ , metylénová modrá) a pre Hsp90 (tanespimycín, skr. 17-AAG) v rôznych koncentráciách na prežívanie a chemosenzitivitu leukemických buniek HL-60 samostatne alebo v kombinácii s vybranými druhmi cytotatik (cytarabín, daunorubicín a mitoxantrón) po 24, 48 a 72 hodinách. Zmeny v hladinách bielkovín Hsp70 a Hsp90 sme sledovali po pôsobení tepelného šoku (42 °C, 2 h), po pôsobení inhibítorov metylénová modrá a 17-AAG westernblotovou analýzou. Naše výsledky naznačujú, že k zvýšeniu hladiny Hsp70 došlo 24 h a 48 h po ovplyvnení buniek tepelným šokom. Metylénová modrá s koncentraciami 0,5  $\mu\text{mol/l}$  a vyššími viedla k zníženému relatívnemu prežívaniu HL-60. Metylénová modrá (0,5  $\mu\text{mol/l}$ ) v kombinácii s daunorubicínom viedla k zvýšenej citlivosti HL-60 v porovnaní s ostatnými cytotatikami. Pifitrín- $\mu$  s koncentraciami 20  $\mu\text{mol/l}$  a vyššími viedol



k zníženému relatívnemu prežívaniu HL-60. Štúdium vzájomných interakcií medzi apoptózou a pôsobením bielkovín tepelného šoku by mohol prispieť k lepšiemu chápaniu chemorezistencie leukemických buniek.

*Táto práca vznikla za podpory Grantu Univerzity Komenského UK/108/2012.*

### PŘÍPRAVA FOTO-CYTOCHROMU B<sub>5</sub> JAKO NOVÉHO NÁSTROJE PRO STUDIUM INTERAKCÍ REAKČNÍCH PARTNERŮ V MONOOXYGENASOVÉM SYSTÉMU CYTOCHROMU P450

**MONIKA KOBEROVÁ<sup>a</sup>, TOMÁŠ JEČMEN<sup>a,b</sup>, MIROSLAV ŠULC<sup>a,b</sup>, VĚRA ČERNÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ HUDEČEK<sup>a</sup>, MARIE STIBOROVÁ, PETR HODEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>UK v Praze, Katedra biochemie, 128 40 Praha 2,

<sup>b</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4  
koberova.monika@seznam.cz

Cytochrom b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>) je považovaný za fakultatívni součást monooxygenasového systému. Může stimulovat, inhibovat nebo neovlivňovat reakce katalyzované monooxygenasovým systémem. Podstata mechanismu působení nebyla dosud zcela objasněna.

Pro studium role cyt b<sub>5</sub> v tomto systému byl exprimován a purifikován modifikovaný cyt b<sub>5</sub>, který obsahuje foto-reaktivní analog methioninu s diazirinovým kruhem (foto-cyt b<sub>5</sub>). Po fotoaktivaci UV zářením vzniká vysoce reaktivní karbeniový intermediát, který může vytvářet kovalentní vazbu s blízkým aminokyselinovým řetězcem druhého proteinu nebo jinou molekulou a kovalentně propojit reakční partnery.

Připravený foto-cyt b<sub>5</sub> byl použit k identifikaci interakcí s cytochromem P450 2B4 (CYP2B4). Reakční směs, obsahující foto-cyt b<sub>5</sub> a CYB2B4 v ekvimolárním poměru, byla fotolyzována a produkty byly separovány SDS elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Na elektroforeogramu byly detegovány 3 kovalentní komplexy o vyšší relativní molekulové hmotnosti než má CYP2B4. Kovalentní komplexy byly následně proteolyticky štěpeny a analyzovány hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF/TOF), která prokázala, že CYP2B4 a foto-cyt b<sub>5</sub> vytvářejí heterooligomery v molárním poměru 1:1, 1:2 a 2:1.

Množství vytvořených kovalentních komplexů bylo výrazně zvýšeno v přítomnosti substrátu CYP2B4, diamantanu. Tyto výsledky ukazují, že vazba substrátu zvyšuje afinitu mezi cytochromem P450 a cyt b<sub>5</sub> (cit.<sup>1</sup>).

*Tato práce vznikla za podpory GAČR (305/09/H008, P207/12/0627, P301/10/0356 a 303/09/0472) a projektu Univerzity Karlovy v Praze (UNCE 204025/2012).*

#### LITERATURA:

1. Koberová M., Ječmen T., Šulc M., Černá V., Kizek R., Hudeček J., Stiborová M., Hodek P.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 125, 8 (2013).

### TIOREDOXÍNREDUKTÁZA - NOVÝ TERČ PRE VÝVOJ LIEČIV

**MICHAELA KOHÁRYOVÁ<sup>a\*</sup>, JIŘÍ BRYNDA<sup>b,c</sup>, PAVLÍNA ŘEZAČOVÁ<sup>b,c</sup> a MARTA KOLLÁROVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Prírodovedecká fakulta UK, 842 15 Bratislava; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AVČR, 166 10 Praha 6;

<sup>c</sup>Ústav molekulární genetiky AVČR, 142 20 Praha 4  
koharyova@fns.uniba.sk

Tioredoxínový systém a jeho proteínové zložky tioredoxín (Trx) a tioredoxínreduktáza (TrxR) boli identifikované v organizmoch na všetkých evolučných stupňoch - od archaia cez prokaryoty až po eukaryoty, vrátane človeka.

Redoxná homeostáza vo vybraných modelových organizmoch (aktinomycéty *S. coelicolor* a *M. tuberculosis*) je udržiavaná výlučne prostredníctvom tioredoxínového systému, a to z dôvodu, že tieto baktérie nedokážu syntetizovať glutatión a neobsahujú ani žiadny podobný systém s oxidačno-redukčnou schopnosťou. TrxR je jediný známy enzým schopný za fyziologických podmienok redukovať oxidovaný Trx<sup>1</sup>. Vďaka výrazným odlišnostiam v molekulovej hmotnosti, štruktúre, substrátovej špecificite a aj v mechanizme účinku sa bakteriálne TrxR stávajú terapeutickým terčom pre vývoj nových antibiotík a inhibítorov<sup>2</sup>. Pre vyriešenie 3D štruktúr proteínov a následný vývoj nových liečiv je limitujúcim faktorom príprava difrakčujúcich kryštálov a získanie kvalitných štruktúrnych údajov. Hoci je štruktúra TrxR *M. tuberculosis* známa, jej parametre v rozlíšení 3 Å sa ukázali ako nepostačujúce pre vývoj účinného inhibítora<sup>3</sup>. Pomocou difúzie cez plynnú fázu, použitím visiacej a sediacej kvapky sme vykryštalizovali jej príbuznú, rekombinantnú TrxR zo *S. coelicolor* (TrxB SCO3890). Ihličkovité kryštály narástli v podmienke: 0.2 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 M bis-Tris pH 5.5, 25% PEG 3350 a kryštál difraktoval do vzdialenosti 2.4 Å (cit.<sup>4</sup>). Kvalita difrakčných údajov bola postačujúca na výstavbu štruktúrneho 3D modelu. Vyriešená 3D štruktúra sa použije na cieleň návrh a následné testovanie nových látok s inhibičnými vlastnosťami.

#### LITERATÚRA

1. Powis G., Montfort W. R.: *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 421 (2001).
2. Luthman M., Holmgren A.: *Biochemistry* 21, 6628 (1982).
3. Akif M., Suhre K., Verma C., Mande S. C.: *Acta Crystallogr. D; Biol. Crystallogr.* 61, 1603 (2005).
4. Koháryová M., Brynda J., Řezáčová P., Kollárová M.: *Acta Cryst. F* 67, 917 (2011).

## OVLIVNĚNÍ TOXICITY XENOBIOTIK POMOCÍ MIR-29

**SOŇA KOLLINEROVÁ, MARTIN MODRIANSKÝ**

Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta,  
Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc  
sonakoll@seznam.cz

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující jednořetězcové RNA tvořící nedávno objevenou skupinu regulátorů genové exprese na post-transkripční úrovni. Schopnost miRNA podílet se na regulaci biologických procesů, jako je buněčná proliferace, diferenciace nebo apoptóza, dává předpoklad jejich zapojení do procesu kancerogeneze<sup>1</sup>. MiR-29 se vyskytuje ve třech izoformách – miR-29a, miR-29b a miR-29c a je známa jako nádorový supresor, neboť regulací anti-apoptotických proteinů Tcl-1 a Mcl-1 blokuje apoptosu<sup>2</sup>.

MiRNA mohou přímo nebo nepřímo regulovat enzymy ovlivňující metabolizaci léčiv a následkem toho ovlivňují kapacitu a distribuci léčiv odražející se v pozměněné citlivosti buněk k toxinům<sup>3</sup>. Proto jsme se zaměřili na studium potenciálně synergického účinku miR-29 s vybranými cytostatiky – azacytidinem a etoposidem. HeLa buňky byly transfekovány syntetickými prekurzory pro miR-29, čímž jsme dosáhli více jak 1000 násobného zvýšení exprese miR-29, a následně buňky vystavily působení cytostatiky. Azacytidin inhibuje DNA methyltransferasy (DNMT), což ovlivňuje expresi genů. MiR-29 také negativně regulují DNMT, proto lze očekávat navýšení toxicity. Etoposid zastavuje buněčné dělení v G1/S fázi, s čímž souvisí schopnost miR-29 inhibovat CDK6, která je důležitá v G1/S fázi. Působením kombinace cytostatika s miR-29 došlo ke zvýšení toxicity. Výsledky těchto experimentů naznačují možné budoucí využití miR-29 v biologické léčbě nádorových onemocnění.

*Tato práce vznikla za podpory grantu LF\_2013\_008.*

### LITERATURA

1. Bartel D. P.: Cell 116, 281 (2004).
2. Kriegel A. J., Liu Y., Fang Y., Ding X., Liang M.: Physiol. Genomics 44, 237 (2012).
3. Choudhuri S.: J. Biochem. Mol. Toxicol. 24, 195 (2010).

### ADJUVANTNÍ ÚČINEK ADENYLÁTCYKLÁZOVÉHO TOXOIDU: MECHANISMUS AKTIVACE IMUNITNÍCH FUNKCÍ DENDRITICKÝCH BUNĚK

**MARTINA KOSOVÁ<sup>a</sup>, IRENA ADKINS<sup>a</sup>, RADOVAN FIŠER<sup>b</sup>, JAKUB TOMALA<sup>a</sup>, ONDŘEJ ČERNÝ<sup>a</sup>, JIŘÍ MAŠÍN<sup>a</sup>, LENKA SADÍLKOVÁ<sup>a</sup> a PETER ŠEBO<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, <sup>b</sup>Přírodovědecká fakulta UK v Praze, 128 43 Praha 2, Albertov 6,  
kosova@biomed.cas.cz

Adenylátcyklázový toxin (CyaA) je důležitým faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis* – původce černého kašle. Tento toxin se váže na myeloidní fagocytické buňky exprimující  $\beta 2$  integrin CD11b/CD18 (CR3 nebo Mac-1) a translokuje svou enzymatickou adenylátcyklázovou doménu dovnitř buněk, kde katalyzuje tvorbu klíčové signální molekuly, cAMP. Při translokaci adenylátcyklázové domény dochází zároveň ke vstupu iontů  $Ca^{2+}$  do buňky a ke tvorbě kation-selektivních kanálů, kterými unikají  $K^+$  ionty z buňky. Geneticky připravený toxoid, postrádající adenylátcyklázovou aktivitu (CyaA-AC<sup>-</sup>), je nyní klinicky testován jako nástroj pro dopravu antigenních epitopů do dendritických buněk a navození antigen-specifické imunitní odpovědi  $CD8^+$  T lymfocytů. Kromě schopnosti CyaA-AC<sup>-</sup> dopravit antigen pro vyštěpení v cytosolu buněk a následnou prezentaci na molekulách MHC I, je pro navození T buněčné imunity též důležité adjuvantní působení toxoidu, které doposud nepopsaným mechanismem aktivuje maturaci dendritických buněk.

CyaA-AC<sup>-</sup> spouští fenotypickou maturaci dendritických buněk derivovaných z myši kostní dřeně (DC) projevující se zvýšenou expresí povrchových molekul MHC II, CD80, CD86, CD40 a CD54. Expres těchto povrchových molekul po inkubaci s toxoidem byla vyšší i u DC derivovaných z myši, které měli vyřazený gen pro expresi některých signálních molekul participujících na rozpoznávání patogenů, což pravděpodobně značí, že toxoid maturuje DC nezávisle na těchto molekulách a zároveň to ukazuje čistotu vzorků toxoidu. Při této fenotypické maturaci DC dochází také k produkci cytokinu IL-6 a chemokinů KC, LIX nebo MCP-1, zároveň ale toxoid nevyvolává produkci prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-12 nebo IL-1 $\beta$ . Toxoidem aktivované DC nicméně mají schopnost vyvolat u  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T buněk antigen-specifickou produkci cytokinů IFN- $\gamma$  a IL-17. Působení CyaA-AC<sup>-</sup> dále vyvolává expresi CCR7 a produkci PGE2, což přispívá ke zvýšené spontánní i chemotaktické migraci DC. S použitím toxoidu se sníženou kanálotvornou aktivitou (CyaA-QR-AC<sup>-</sup>) jsme ukázali, že schopnost toxoidu permeabilizovat membrány a vyvolávat únik  $K^+$  z buněk je klíčová pro aktivaci protein kináz p38 a JNK, které regulují maturaci a migraci v DC. Dendritické buňky ze slezin myši, kterým byl intravenózně podán toxoid, mají vyšší expresi CD86, než DC z kontrolních myši.

Tyto výsledky ukazují, že mechanismus adjuvantního působení závisí na kanálotvorné aktivitě toxoidu CyaA-AC<sup>-</sup>, která vyvolává únik  $K^+$  iontů z buněk a tím aktivuje kinázy p38 a JNK, jež jsou součástí obranného mechanismu proti působení pórtvorných toxinů.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 310/08/0447 a 310/09/P582.*

## FOSFONÁTOVÉ OLIGONUKLEOTIDY S ATOMEM SÍRY V INTERNUKLEOTIDOVÉ VAZBĚ

ONDŘEJ KOSTOV\*, IVAN ROSENBERG

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,  
Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6  
kostov@uochb.cas.cz

Nahrazení fosfodiesterové C3'-O-P-O-C5' vazby v oligodeoxynukleotidech fosfonátovým C3'-O-P-C-O-C5' uskupením vedlo k významnému zvýšení hybridizační schopnosti s komplementárním RNA řetězcem<sup>1,2</sup>. Navíc hybridní duplex obsahující takto modifikované DNA vlákno stimuloval aktivitu RNasy H<sup>3</sup>. Kromě toho, zavedení tohoto typu fosfonátové vazby do 2',5' oligoadenylátů zachovalo vlastnosti agonisty RNasy L (lit.<sup>4</sup>). Toto zjištění nás vedlo ke studiu nukleosid-5'-S-metylfosfonátů<sup>5</sup>, 5'-O-metylfosfonthioátů, a 5'-O-metyl-(H)-fosfinátů.

Pro přípravu nukleosid 5'-S-metylfosfonátů **1b** (Schéma 1) jsme vyvinuli dvě metody, vhodné pro fosfotriesterovou kondenzaci oligonukleotidů bez oxidačního kroku, který by jinak vedl ke vzniku nežádoucích S-oxidů.

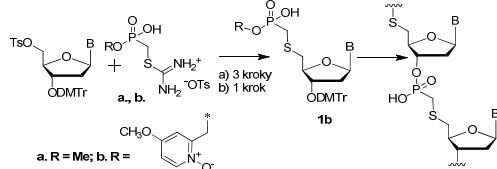


Schéma 1

Nukleosid-5'-O-metyl-(H)-fosfinát **2** byly připraveny přímou alkyací nukleosidu **3** syntonem **4** (ref.<sup>6</sup>) (Schéma 2). Monomer **2** byl inkorporován do oligomeru H-fosfonátovou metodou a vzniklá vazba byla oxidována sírou.

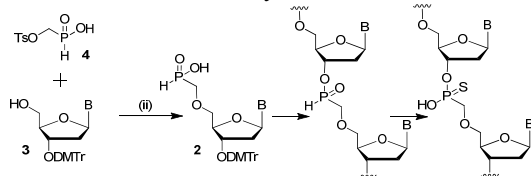


Schéma 2

Práce byla podpořena grantem GA ČR 202/09/0193 a výzkumným projektem ústavu RVO: 61388963.

### LITERATURA

- Rosenberg I. v: *Frontiers in Nucleosides and Nucleic Acids* (Schinazi, R.F. and Liotta, D.C. eds.); IHL Press: Tucker, GA, str. 519–548 (2004)
- Rosenberg Ivan et al.: Rukopis v přípravě.
- Šípová Hana et al.: Rukopis v přípravě.
- Páv O., Panova N., Šnášel J., Zborníková E., Rosenberg I.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 181 (2012).
- Kóšiová I., Buděšínský M., Panova N., Rosenberg I.: *Org. Biomol. Chem.* 9, 2856 (2011).
- Barral K., Priet S., Céline M., Sire J., Neyts J., Balzarini J., Canard B., Alvarez K.: *Eur. J. Med. Chem.* 45, 849 (2010).

## NOVÉ MRI KONTRASTNÍ LÁTKY VYUŽÍVAJÍCÍ PŘENOSU SATURACE

TEREZA KRCHOVÁ<sup>a</sup>, JAN KOTEK<sup>a</sup>, DANIEL JIRÁK<sup>b</sup>, JANA HAVLÍČKOVÁ<sup>a</sup>, IVANA CÍSAŘOVÁ<sup>a</sup>, PETR HERMANN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra anorganické chemie, PŘF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie, IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4  
tereza.krchova@natur.cuni.cz

Tomografie magnetické rezonance (MRI) je důležitou zobrazovací a diagnostickou metodou klinické medicíny. Poskytuje snímky s vysokým prostorovým rozlišením (pod 1 mm<sup>3</sup>) a zajišťuje jak anatomické informace, tak data o funkčním stavu různých orgánů. V porovnání s radiomedicínskými zobrazovacími metodami PET, SPECT nebo CT nevyužívá MRI vysoceenergetického ionizujícího záření, jedná se tedy o metodu relativně bezpečnou a neinvazivní.

Ke zlepšení kontrastu patologií či různých specifických tkání v MRI obrazu slouží kontrastní látky. Vedle klasických kontrastních látek T<sub>1</sub> a T<sub>2</sub>, které ovlivňují relaxaci protonů vody, začala být pozornost věnována tzv. kontrastním látkám typu CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer), které jsou založeny na přenosu saturace prostřednictvím chemické výměny mezi vyměnitelnými protony vody a dané diamagnetické či paramagnetické látky, a které vykazují vhodné vlastnosti pro rozvoj nových aplikací v MRI. Zobrazení za použití těchto látek je řízeno radiofrekvenčními pulzy

o specifické frekvenci, která je charakteristická pro daný vyměnitelný proton. Pozorovaný kontrast je tedy podle potřeby možné „zapnout“ a „vypnout“<sup>1</sup>.

Tato práce byla zaměřena na přípravu makrocyclických ligandů odvozených od skeletu DO3A s vyměnitelnými protony na koordinujících se aminových skupinách pendantních ramen, u kterých byly po komplexaci s ionty Eu<sup>3+</sup> a Yb<sup>3+</sup> studovány vlastnosti související s požadavky kladenými na výše zmíněné kontrastní látky CEST. Po optimalizaci parametrů a podmínek pro měření experimentů CEST NMR byly u roztoků připravených komplexů studovány možnosti přenosu saturace ze signálu vyměnitelného protonu daného komplexu na signál H<sub>2</sub>O v roztoku v závislosti na různých parametrech. Bylo zjištěno, že u některých komplexů k přenosu saturace skutečně dochází a v Z-spektrech (tj. v závislosti relativní intenzity signálu vody na presaturační frekvenci) je možné signály CEST- pozorovat. Efekt CEST byl studován také pomocí MRI skeneru na pracovišti v IKEM. I tyto experimenty CEST přinesly pozitivní výsledky a to i při hodnotách pH odpovídajících fyziologickým podmínkám. Komplexy připravených ligandů mají tedy velký potenciál pro další využití v MRI a jejich vlastnosti budou dále studovány.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR P207/11/1437.

### LITERATURA

- Woods M., Woessner D. E., Sherry A. D.: *Chem. Soc. Rev.* 35, 500 (2006).

**REKOMBINANTNÍ POLYEPITOP ODVOZENÝ  
Z VYBRANÝCH TYPŮ OSPC *Borrelia burgdorferi*  
INDUKUJE IMUNITNÍ ODPOVĚĎ PROTI  
ŠIROKÉMU SPEKTRU ANTIGENNÍCH VARIANT  
PATOGENNÍCH BORRELIÍ**

**MICHAL KRŮPKA<sup>a</sup>, JOSEF MAŠEK<sup>b</sup>, ROMANA  
CAHLÍKOVÁ<sup>a</sup>, BARBORA KNOPPOVÁ<sup>a</sup>, MAREK  
ŠEBELA<sup>c</sup>, JAROSLAV TURÁNEK<sup>b</sup>, MILAN RAŠKA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Ústav imunologie, LF UP, Hněvotínská 3, Olomouc;

<sup>b</sup> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, Brno;

<sup>c</sup> Katedra biochemie, PŘF UP, Šlechtitelů 11, Olomouc  
krupka.olomouc@gmail.com

Lymeská borelióza je na území západní Evropy a USA nejčastější infekční choroba přenosná ze zvířete na člověka. Původcem onemocnění jsou bakterie druhového komplexu *Borrelia burgdorferi*, přenášené na člověka klíštětem. Onemocnění může přecházet do chronické, obtížně léčitelné fáze. Prevence onemocnění vhodnou očkovací látkou by mohla komplikacím předejít. Outer surface protein C (OspC) lokalizovaný v zevní membráně Borelií patří mezi nejvýznamnější kandidátní antigeny budoucí vakcíny. Jeho vysoká variabilita však zabraňuje použití jeden OspC antigen k vyvolání efektivní imunitní odpovědi bránící infekci širokým spektrem popsaných kmenů Borelií.

V naší studii jsme vytvořili fúzní chimerický rekombinantní protein (CHOspC), složený z imunodominantních domén OspC proteinů popsaných u klinicky nejvýznamnějších kmenů Borelií, fúzovaný na N<sup>o</sup> konci s His-tag značkou pro metaloafinitní purifikaci. Protein byl exprimován v *E. coli* a purifikován pomocí metaloafinitní agarosové kolony a následně pomocí preparativních elektroforetických metod. Identita proteinu byla potvrzena pomocí MALDI-TOF.

CHOspC byl použit v kombinaci s Freundovým adjuvans k experimentální imunizaci myši kmene Balb/C (5 ♀♀). Po čtrnácti dnech od ukončení imunizace bylo odebráno sérum ke stanovení hladiny protilátek specificky reagujících s různými OspC proteiny pomocí metod Western blot a Anti-Borrelia line blot (Euroline). Jako kontrola bylo použito sérum myši imunizovaných standardním OspC antigenem kmene *B. burgdorferi* B31 a myši imunizovaných nepříbuzným antigenem Hsp90 *Candida albicans*.

Séra myši vakcinovaných CHOspC specificky reagovala na Western blotu s celobuněčným lyzátem *B. burgdorferi* a na diagnostickém Anti-Borrelia line-blotu se všemi přítomnými OspC antigeny (*B. burgdorferi*, *B. afzelii* a *B. garinii*), kdežto séra myši vakcinovaných standardním OspC reagovala s buněčným lyzátem výrazně slaběji a v testu line-blot reagovala pouze s jedním OspC. Polyepitopová vakcína tak nabízí možnou cestu k řešení problému variability povrchových antigenů borelií při návrhu preventivní vakcíny proti Lymeské borelióze.

Projekt byl podpořen granty: LF\_2012\_011, LF\_2013\_013, TA01011165 a GAP304/10/1951.

**S-NITROSOGLUTATHIONREDUKTASA U *Brassica oleraceae* A *Lactuca sativa***

**LUCIE KUBIENOVÁ<sup>\*</sup>, TEREZA TICHÁ, MARTINA  
TYLICOVÁ, DAVID KOPEČNÝ, LENKA LUHOVÁ,  
MAREK PETŘIVALSKÝ**

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita  
Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
lkubienova@seznam.cz

Jedním z hlavních faktorů regulace celkového množství S-nitrosoglutathionu (GSNO) jako nejrozšířenějšího S-nitrosothiolu je aktivita enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR). GSNOR náležející do rodiny alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1) je označován také jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284) a má stěžejní úlohu v katabolismu GSNO, zprostředkovaně i regulaci celkové hladiny S-nitrosothiolů a podílí se tím na ochraně buněk před nitrosativním stresem. GSNOR a příslušné geny byly již charakterizovány například u *Solanum lycopersicum* (SIGSNOR)<sup>1</sup> a *Arabidopsis thaliana* (AtGSNOR)<sup>2</sup>. Prezentovaná práce je zaměřena na biochemickou charakterizaci rostlinné GSNOR z *Brassica oleraceae* (BoGSNOR) a *Lactuca sativa* (LsGSNOR). Geny pro BoGSNOR (GenBank JX104828, 1140 bp) a LsGSNOR (GenBank JX104827, 1134 bp) byly exprimovány v *Escherichia coli* produkující rekombinantní proteiny nesoucí 6xHis-tag na N-konci a výsledné enzymy byly purifikovány na koloně Co(II)-IDA-Sepharose a nebo na komerčních kolonkách HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Spin. Byly určeny kinetické parametry purifikovaných enzymů, včetně pH a teplotního optima, substrátové specifity a inhibičních vlastností vybraných sloučenin. BoGSNOR a LsGSNOR vykazují velmi podobné molekulově-kinetické vlastnosti s SIGSNOR<sup>1</sup>, AtGSNOR<sup>2</sup> a s rekombinantní lidskou GSNOR (hGSNOR)<sup>3</sup>. Významným rozdílem oproti hGSNOR je nízká reaktivita dosud studovaných rostlinných enzymů s hydroxymastnými kyselinami. Tyto rozdíly jsou způsobené přítomností anion-vazebné kapsy v aktivním místě enzymu, jak bylo prokázáno detailní funkční a strukturální analýzou SIGSNOR<sup>1</sup>. Byla studována role GSNOR při vývoji rostlin, a to u pěti genotypů *Lactuca* spp. lišících se mírou rezistence k patogenu *Bremia lactucae* a u *B. oleraceae*. Genotypy citlivé k napadení *B. lactucae* vykazovaly téměř dvojnásobně vyšší GSNOR aktivitu a genovou expresi v kořenech i listech ve srovnání s rezistentními genotypy.

Tato práce vznikla za podpory grantu LH11013.

LITERATURA

1. Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Táche R., Luhová L., Barroso J.B., Petřivalský M.: *Biochimie* 95, 889 (2013); doi: 10.1016/j.biochi.2012.12.009.

- Achkor H., Díaz M., Fernández M.R., Biosca J.A., Parés X., Martínez M.C.: *Plant Physiol.* 132, 2248 (2003).
- Staab C.A., Flander J., Brandt M., Lenggqvist J., Grafstrom R., Hoog J.: *Biochem. J.* 413, 493 (2008).

### BIOCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE FOSFOENOLPYRUVÁT KARBOXYKINASY Z *Mycobacterium tuberculosis*

**IVA MACHOVÁ, JAN SNÁŠEL, IVA PİCHOVÁ**

Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v.v.i.,  
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
machova@uochb.cas.cz

*Mycobacterium tuberculosis* je významný lidský patogen, který ročně způsobí smrt až 1,7 milionů lidí na celém světě<sup>1</sup>. Zásadním problémem infekcí *M. tuberculosis* je jeho schopnost přežívat v hostitelském organismu v perzistentním stavu, tj. bez jakýchkoliv symptomů nemoci. Předpokládá se, že až 1/3 světové populace je latentně infikována tímto patogenem a přibližně v 10 % případů dojde k propuknutí aktivní formy nemoci<sup>2</sup>. Přechod mezi latentní a aktivní formou představuje velkou změnu i na úrovni metabolismu bakterie. Pochopení molekulární podstaty tohoto přechodu je důležité pro identifikaci míst pro zásah nových potenciálních léčiv.

Cílem této práce je charakterizace jednoho z významných enzymů centrálního metabolismu této patogenní bakterie – fosfoenolpyruvát karboxykinázy (Pepck), E.C. 4.1.1.32, která zprostředkovává propojení mezi anaplerotickými a glukoneogenetickými procesy. V naší studii jsme se zabývali jak substrátovou specifitou, tak i ostatními biofyzikálními parametry, jakými jsou závislosti sledovaných reakcí na pH, inkubační teplotě, přítomnosti kofaktorů či vlivu oxido-redukčního potenciálu prostředí na aktivitu enzymu. Předběžné informace o prostorovém uspořádání byly získány pomocí gelové permeační chromatografie, analytické ultracentrifugace a měřeními cirkulárního dichroismu.

Pepck z *M. tuberculosis* patří mezi tzv. GDP/GTP dependentní kinasy. Pomocí bodové mutagenese jsme potvrdili důležitost přítomnosti tří konzervativních fenylalaninových zbytků pro vazbu GDP/GTP, které jsou nepostradatelné pro účinnou katalýzu reakcí probíhajících jak v glukoneogenetickém, tak v anaplerotickém směru.

Tato práce vznikla za podpory *SysteMtb Collaborative Project (245187)*, financovaného ze *Sedmého rámcového programu Evropské komise*.

#### LITERATURA

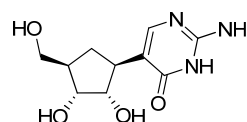
- Rustad R. D., Sherrid A. M., Minch J. K., Sherman D. R.: *Cell. Microbiol.* 11, 1151 (2009).
- Akolo C., Adetifa I., Shepperd S., Volmink J.: *Cochrane. Database Syst. Rev.* 1, CD000171 (2010); DOI: 10.1002/14651858.CD000171.pub3.

### SYNTÉZY KARBOCYKLIČKÝCH NUKLEOSIDOVÝCH ANALOGŮ

**LUKÁŠ MAIER, ONDŘEJ HYLSE, KAMIL PARUCH\***

Masarykova univerzita, Ústav chemie, Kamenice 5, 625 00 Brno; Mezinárodní centrum klinického výzkumu - Centrum biomolekulárního a buněčného inženýrství, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91 Brno  
paruch@chemi.muni.cz

Analogy nukleosidů, kde je nahrazen sacharidový zbytek příslušným karbocyklickým motivem, tvoří zajímavou skupinu látek. Vzhledem k tomu, že mnoho těchto analogů je biologicky aktivních, jsou tyto sloučeniny v popředí zájmu organických chemiků i biologů<sup>1</sup>. Syntézy těchto látek jsou často odlišné od již dobře propracované metodologie používané u klasických nukleosidových analogů s centrálním sacharidovým motivem<sup>2</sup>. Tato práce se zabývá syntézou karbocyklického analogu pseudoisocytidinu **1** a příbuzných sloučenin<sup>3</sup>.



**1**

Byla vyvinuta flexibilní diastereoselektivní syntéza umožňující selektivní manipulaci substituentů v pozicích 2', 3' a 5', které hrají klíčovou roli v biologické aktivitě těchto látek (Schéma 1)<sup>4</sup>.

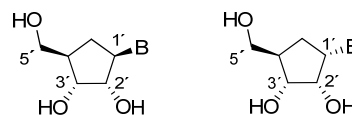


Schéma 1. Obecná struktura připravených karbocyklických nukleosidů

Námi vyvinutá metodologie navíc umožňuje zavést kvartérní 1'-OH skupinu na cyklopentanový skelet (Schéma 2)<sup>5</sup>. Tento strukturně nový typ nukleosidových analogů může přinést nové informace o vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou nukleosidových analogů.

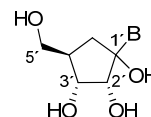


Schéma 2. Obecná struktura připravených karbocyklických nukleosidů s OH skupinou v pozici 1'

Tato práce vznikla za podpory grantů FN u sv. Anny v Brně – Mezinár. ctr. klin. výzkumu (FNUSA – ICRC; CZ.1.05/1.1.00/02.0123) a programu SoMoPro (projekt SRGA771); financována EU v rámci 7 RP (FP/2007-2013), grant č. 229603 a spolufinancován JM krajem.

## LITERATURA

1. Herdewijn P., v knize: *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*; Wiley-VCH, Weinheim 2002.
2. Agrofoglio L., Suhas E., Farese A., Condom R., Challand R. S., Earl R. A., Guedj R.: *Tetrahedron* 50, 10611 (1994).
3. Burchenal J. H., Ciovacco K., Kalaher K., O'Toole T., Kiefner R., Dowling M. D., Chu C. K., Watanabe K. A., Wempen I., Fox J. J.: *Cancer Res.* 36, 1520 (1976).
4. Maier L., Paruch K.: *XIV<sup>th</sup> Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry*, Brno, Czech Republic (2011).
5. Maier L., Hylse O., Paruch K.: New carbocyclic nucleoside analog. In *4th EuCheMS Chemistry Congress, book of abstracts. Prague, Czech Republic 2012*.

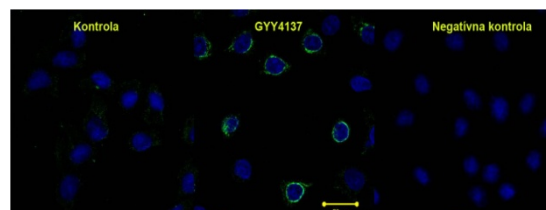
**SULFIDOVÁ SIGNALIZÁCIA ZVYŠUJE EXPRESIU  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  VÝMENNÍKA A POTENCUEJE EXPRESIU BETA ADRENERGICKÝCH RECEPTOROV**

**JANA MARKOVÁ<sup>a</sup>, LUBOMÍRA LENČEŠOVÁ<sup>a</sup>, SOŇA HUDECOVÁ<sup>a</sup>, LUCIA CSADEROVÁ<sup>b</sup>, KAROL ONDRIAS<sup>a</sup>, OEGA KRÍŽANOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied a <sup>b</sup>Molekulárno medicínske centrum, Vlárská 5, 833 34 Bratislava

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výmenník (NCX) je antiportérový membránový proteín vápnikových iónov, ktorý sa zúčastňuje na vápnikovej homeostáze. Zmeny v expresii a funkcii NCX sú spojené s rozvojom mnohých ochorení ako napríklad ischemia, hypertenzia, diabetes a iné. Je známe, že  $\beta$  adrenergická signalizácia zohráva významnú úlohu pri regulácii vápnikovej homeostázy a aj pri regulácii NCX v srdcovom tkanive<sup>1</sup>. Zmeny v expresii a funkcii NCX v súvislosti s nádorovými ochoreniami sú však pomerne málo známe. Sirovodík ( $\text{H}_2\text{S}$ ) je novoobjavený gasotransmitter, ktorý bol donedávna známy len ako toxický plyn.  $\text{H}_2\text{S}$  sprostredkováva indukciu angiogenézy a môže zohrávať ochrannú úlohu v procese arteriosklerózy a hypertenzie<sup>2</sup>. Je tiež známy pre svoj anti-apoptotický, alebo pro-apoptotický účinok<sup>3</sup>. Preto našim cieľom bolo preštudovať vzťah  $\beta$  adrenergických receptorov s NCX, zistiť, či  $\text{H}_2\text{S}$  moduluje vzťah  $\beta$  adrenergických receptorov a NCX a preštudovať ich vzájomný mechanizmus. Ako model nádorových ochorení sme použili stabilnú bunkovú líniu HeLa. Ako  $\text{H}_2\text{S}$  donor sme použili morfolín-4-ium-4-methoxyfenyl (morfolino) fosfínodithioát GYY4137 (10  $\mu\text{M}$ ), ktorý uvoľňuje  $\text{H}_2\text{S}$  oveľa pomalšie než NaHS (lit.<sup>4</sup>)

Zistili sme že  $\text{H}_2\text{S}$  zvyšuje expresiu NCX na úrovni mRNA a proteínu.



Obrázok 1. Imunofluorescenčne značený NCX (zelená farba) v kontrolných a v GYY4137 ovplyvnených HeLa bunkách. Negatívna kontrola bola značená bez primárnej protilátky.

Táto sulfidová regulácia NCX funguje prostredníctvom NF- $\kappa$ B transkripčného faktora, keďže po utlmení NF- $\kappa$ B sme nárast expresie NCX v skupine ovplyvnenej GYY4137 nepozorovali. Aktivita NCX po ovplyvnení GYY4137 bola zvýšená. Po pridaní dithiothreitolu (DTT), ktorý redukuje disulfidové väzby bol nárast aktivity NCX zablokovaný. Zvýšená aktivita NCX v dôsledku pôsobenia  $\text{H}_2\text{S}$  môže mať za následok narušenie vápnikovej homeostázy a môže prispievať k zmenenej regulácii vápnika v nádorových bunkách.

Zistili sme, že sulfidová signalizácia má vplyv aj  $\beta$  adrenergické receptory. Pôsobením  $\text{H}_2\text{S}$  sa zvýšila expresia  $\beta 1$  a  $\beta 3$  adrenergických receptorov. Expresia  $\beta 2$  adrenergického receptora sa po ovplyvnení GYY4137 nemenila v porovnaní s kontrolnou skupinou buniek, ani na úrovni mRNA, ani na úrovni proteínu. Pomocou metódy imunoprecipitácie NCX sme pozorovali koimunoprecipitáciu NCX s  $\beta 1$  a  $\beta 3$  typom adrenergického receptora. Pôsobením GYY4137 sme pozorovali zvýšené množstvo  $\beta 1$  a  $\beta 3$  adrenergických receptorov koimunoprecipitovaných s NCX. Pomocou imunofluorescenčnej metódy sme takisto pozorovali kolokalizáciu  $\beta 1$  a  $\beta 3$  adrenergických receptorov s NCX. Na základe týchto výsledkov teda predpokladáme, že  $\beta 1$  a  $\beta 3$  adrenergické receptory môžu byť s NCX funkčne a fyzicky prepojené. Prepojenie úlohy adrenergických receptorov a vápnikovej signalizácie cez NCX v regulácii onkologických ochorení predstavuje možný sľubný cieľ potenciálnej liečby a prevencie.

Táto práca vznikla za podpory grantov APVV/0045/11 CEMAN a ITMS 26240220071.

## LITERATÚRA

1. Mani S. K., Egan E. A., Addy B. K., Grimm M., Kasiganesan H., Thiyagarajan T., Renaud L., Brown J. H., Kern Ch. B., Menick D. R.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 342 (2010).
2. Liu Y.-H., Lu M., Hu L.-F., Wong P. T.-H., Webb G. D., Bian J. S.: *Antioxidants Redox Signal* 17, 141 (2012).
3. Wang R.: *Physiol. Rev.* 92, 791 (2012).
4. Lee Z. H., Zhou J., Chen CH.-S., Zhao Y., Tan CH.-H., Li L., Moore P.K., Deng L.-W.: *PLoS ONE* 6, e21077 (2011).

**In vivo MLSB RESISTANCE – A MODEL STUDY****DURDICA MAROSEVIC, D. CERVINKOVA, H. VLKOVA, Z. JAGLIC \****Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno  
marosevic@vri.cz; jaglic@vri.cz*

Extensive use of antimicrobial agents in the treatment of animal infections or their use as prophylactic agents present a possibility and risk for the selection of resistant bacteria, which could be either causative agents of a specific disease or just a part of commensal microbiota. With the ever growing fear of entering the post-antibiotic era, food producing animals are identified as a potential source of resistant strains that could be transmitted to humans through the food chain<sup>1</sup>. This study examined the effect of the pressure of three different antibiotics (tylosin, lincomycin and tetracycline) on the spread of a genetic determinant of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) resistance (conjugative plasmid pAMβ1 carrying the *ermB* gene encoding for MLS<sub>B</sub> resistance<sup>2</sup>) *in vivo*. For that purpose, four weeks old chickens colonized with *Enterococcus faecalis* carrying pAMβ1 (the challenge strain) were perorally exposed to the antibiotics during one week. The spread of *ermB* gene within intestinal microflora was monitored through a two week period by qPCR.

qPCR revealed a high prevalence of the *ermB* gene in the faecal DNA during and one week after the antibiotic treatment. Increase of *ermB* was observed with all antibiotics during the whole monitored period, whereas the challenge species *E. faecalis* rapidly declined over time. This suggests that the genetic determinant of resistance (pAMβ1) was rather transferred and spread through the intestinal microflora other than *E. faecalis*. Currently, metagenomic analyses (454 pyrosequencing) of faecal DNA are in progress to provide a more detailed insight into the microbiome of the chicken intestine.

Different species of the genera *Enterococcus* and *Streptococcus* were isolated from cloacal swabs taken at four different time points during and after antibiotic treatment. Most of them expressed a high level resistance to erythromycin, lincomycin and tetracycline and all isolates were positive for *ermB* by PCR. Macrorestriction analysis (PFGE) of *E. faecalis* and *Enterococcus faecium* revealed four different clones (those of *E. faecalis* differed from the challenge strain). This again implies that MLS<sub>B</sub> resistance spread within intestinal microflora considering the challenge strain as a donor. At the moment, plasmid restriction analysis is in progress to elucidate whether the isolates harbour the same plasmid as that of the challenge strain.

Similar as already reported in piglets<sup>3</sup> and turkey<sup>4</sup> the results of this study imply that under specific (tylosin, lincomycin) and even non-specific (tetracycline) antibiotic pressure, bacteria tend to mobilize and exchange genetic material between different species in the chicken intestinal microflora and that the faeces could represent a potential source of resistant strains in the environment.

*The work was supported by the Ministry of Agriculture CR (projects QH91231 and Mze0002716202) and by the*

*Ministry of Education, Youth and Sports CR (project CZ 1.05/2.1.00/01.0006; ED 0006/01/01 AdmireVet).*

## LITERATURE

- Hanssen A. M., Sollid J. U. E.: FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46, 8 (2006).
- Pucci M. J., Monteschio M. E., Kemker C. L.: Appl. Environ. Microbiol. 54, 281 (1988).
- Martel A., Meulenaere V., Devriese L.A., Decostere A., Haesebrouck F.: Microb. Drug Resist. 9, 293 (2003).
- Jaglic Z., Vlkova H., Bardon J., Michu E., Cervinkova D., Babak V.: Zoonoses Publ. Health 59, 202 (2012).

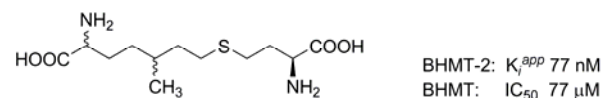
**PURIFIKACE A STABILIZACE LIDSKÉ BETAIN-HOMO-CYSTEIN S-METHYLTRANSFERASY 2 A VÝVOJ JEJÍCH PRVNÍCH INHIBITORŮ****JANA MLÁDKOVÁ, VÁCLAV VANĚK, TOMÁŠ ELBERT, MILOŠ BUDEŠINSKÝ, JIŘÍ JIRÁČEK***Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,  
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6*

Betain-homocystein S-methyltransferasa 2 (BHMT-2) je cytosolický metaloenzym katalyzující přenos methylové skupiny z S-methylmethioninu na L-homocystein za vzniku dvou molekul L-methioninu<sup>1</sup>. Dalšími savčími enzymy účastnicími se remethylace homocysteinu jsou pouze betain-homocystein S-methyltransferasa (BHMT) a methionin synthasa.

BHMT-2 má ze 73 % stejnou aminokyselinovou sekvenci jako BHMT a oba enzymy se vyskytují pouze v játrech a ledvinách<sup>2</sup>. Fyziologické funkce BHMT-2 dosud nejsou známé a to i proto, že se jedná o velmi nestabilní enzym a také z důvodu absence selektivních inhibitorů.

V této studii<sup>3</sup> byla úspěšně získána stabilní lidská rekombinantní BHMT-2 pomocí kopurifikace s lidskou rekombinantní BHMT. Inhibitory BHMT-2 byly navrženy a syntetizovány jako analogy přechodného stavu substrátů či produktů. (2S,8RS,11S)-5-Thia-2,11-diamino-8-methyldodeka-nová kyselina je první účinný a zároveň selektivní inhibitor BHMT-2 (obr. 1).

Stabilizace BHMT-2 kopurifikací s BHMT naznačuje oligomerizaci těchto podobných enzymů *in vivo*. Účinný a selektivní inhibitor BHMT-2 bude velmi užitečný v následujících studiích fyziologických funkcí BHMT-2 *in vivo*.



Obr. 1. Struktura prvního selektivního inhibitoru BHMT-2

*Autoři děkují za podporu grantu GA ČR P207/10/1277 a výzkumnému záměru ÚOCHB AV ČR, v.v.i. RVO:61388963.*

## LITERATURA

- Szegedi S. S., Castro C. C., Koutmos M., Garrow T. A.: J. Biol. Chem. 283, 8939 (2008).

- Chadwick L. H., McCandless H. E., Silverman G. L., Schwartz S., Westaway D., Nadeau J. H.: *Genomics* 70, 66 (2000).
- Mládková J., Vaněk V., Buděšinský M. G., Elbert T., Demianová Z., Garrow T. A., Jiráček J.: *J. Med. Chem.* 55, 6822 (2012).

### VLIV ELICITINŮ NA ODEZVU BIOFOTONŮ U ROSTLIN *Nicotiana tabacum*

PAVLA MORICOVÁ<sup>a</sup>, JANA PITERKOVÁ<sup>a</sup>, LENKA LUHOVÁ<sup>a</sup>, MAREK PETŘIVALSKÝ<sup>a</sup>, PETR ILÍK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemie, <sup>b</sup>Centrum regionu Haná pro biotechnol. a zemědělský výzkum, <sup>b</sup>Katedra biofyziky PŘF Univerzity Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
moricovapavla@seznam.cz

Termínem biofotony se označují fotony emitované v rozsahu vlnových délek 300–800 nm nepřetržitě ze všech žijících biologických systémů. Mechanismus emise biofotonů spočívá v tvorbě metastabilních excitovaných molekul vznikajících oxidačními reakcemi. Rozkladem přechodných sloučenin, jako jsou karbonyly a singletový kyslík, se vytváří řetězové reakce, které jsou pravděpodobně zdrojem emise biofotonů. Zvýšená lokální tvorba biofotonů se spolu s lipidickou peroxidací vyskytuje během oxidačního a nitrosativního stresu. U rostlin byla emise fotonů pozorována při klíčení semen, po infekci patogenem, při teplotním stresu, nedostatku vody nebo po ošetření těžkými kovy<sup>1</sup>.

Elicitiny jsou velmi účinné elicitory, které vyvolávají obrannou reakci u rostlin. Jde o malé extracelulární proteiny sekretované rody *Phytophthora* a *Pythium* z řádu *Pythiales* oddělení *Oomycet* vyvolávající hypersenzitivní reakci u některých rostlinných druhů z čeledi *Solanaceae* a *Brassicaceae*. Elicitiny se do buněk dostávají prostřednictvím specifických receptorů a v buňce způsobují aktivaci MAP-kinas, změny v intracelulárních hodnotách pH nebo tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS)<sup>2</sup>.

Produkce biofotonů byla sledována v listech a buněčné suspenzi *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi po přidávku elicitinů oligandrinu, kryptogeinu a jeho mutantů L41F, V84F, V84F/L41F, L80F/V84F lišících se ve schopnosti stimulovat produkci ROS spojenou s následnou hypersenzitivní reakcí a tvorbou nektrózy. Lokální výskyt biofotonů byl detegován již 6 h po lokální infiltraci elicitinu kryptogeinu a jeho mutantů V84F a L80F/V84F, které výrazně stimulují produkci ROS. V průběhu nasávání roztoků elicitinů řapíkem listu a u buněčné suspenze byla tvorba biofotonů zpožděna. Modulátory ROS byly využity pro studium role na produkci biofotonů. Inhibitory superoxididismutasy, NADPH-oxidasy a peroxidasy snížily produkci biofotonů. Zvýšená hladina malondialdehydu 6 h po infiltraci elicitinu kryptogeinu a mutantů V84F a L80F/V84F poukazuje na probíhající proces lipidické peroxidace spojený s pozorovanou rozsáhlou nektrózou.

Tento výzkum byl podpořen grantem GAČR P501/12/0590.

### LITERATURA

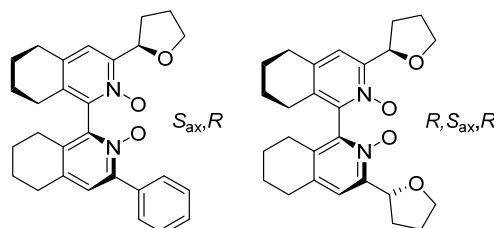
- Birtic S., Ksas B., Genty B., Mueller M. J., Triantaphylides C. Havaux M.: *Plant J.* 67, 1103 (2011).
- Angelova Z., Georgiev S., Roos W.: *Biotechnol. Biotech. Eq.* 20, 72 (2006).

### ENANTIOSELEKTIVNÍ ALLYLACE THIOFEN-2-KARBALDEHYDU

PETR MOTLOCH, MARTIN KOTORA\*

Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2  
kotora@natur.cuni.cz

Různě substituované chirální bipyridin-*N,N'*-dioxidy vystupující jako Lewisovy báze se v poslední době ukazují jako jedny z nejvhodnějších katalyzátorů pro enantioselektivní allylace aromatických aldehydů, jak z důvodu vysokých asymetrických indukci, tak i z důvodu používaného množství (většinou 1 mol%)<sup>1</sup>. Tyto Lewisovy báze je možné připravit snadnou cyklotrimerizací hexadekatetraynu s chirálními nitrily, čímž se získá celá řada katalyzátorů (obr. 1)<sup>2,3</sup>.



Obr. 1. Příklad připravených Lewisových bází

Katalytická aktivita a míra asymetrické indukce výše zmíněných katalyzátorů byla studována u enantioselektivní allylace thiofen-2-karbaldehydu (schéma 1). Vhodnou volbou použitého katalyzátoru, rozpouštědla a teploty byly nalezeny optimální podmínky pro velmi vysokou asymetrickou indukci (až 97 % ee)<sup>4</sup>. Připravený opticky čistý homoallylový alkohol **1** bude dále využit pro nový způsob enantioselektivní přípravy antidepressiva (*S*)-duloxetinu.

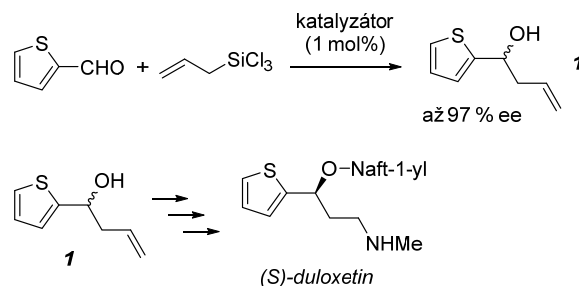


Schéma 1. Enantioselektivní allylace thiofen-2-karbaldehydu

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/11/0587 a výzkumného záměru MS0021620857.



## LITERATURA

1. Yus M., Gonzalez-Gomez J. C., Foubelo F.: *Chem. Rev.* 111, 7774 (2011).
2. Hrdina R., Dracinsky M., Valterova I., Hodacova J., Cisarova I., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* 350, 1449 (2008).
3. Kadlcikova A., Hrdina R., Valterova I., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* 351, 1279 (2009).
4. Motloch P.: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2012.

### ÚLOHA IZOFOREM PROTEINU P63 V BIOLOGII TRIPLE-NEGATIVNÍHO KARCINOMU PRSU

**MARTA NEKULOVÁ<sup>a</sup>, JITKA HOLČÁKOVÁ<sup>a</sup>, PHILIP J. COATES<sup>b</sup>, BOŘIVOJ VOJTĚŠEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno,  
<sup>b</sup>Tayside Tissue Bank, University of Dundee, Dundee, UK  
 marta.nekulova@mou.cz

Protein p63 z rodiny nádorového supresoru p53 je nezbytný pro správný vývoj epithelií a epidermálních struktur. V buňkách se vyskytuje v podobě dvou N-koncových izoform. Plnodělková izoforma TAp63 má podobně jako p53 schopnost spustit apoptózu v reakci na poškození DNA, v lidských tkáních se však v mnohem větší míře vyskytuje zkrácená izoforma ΔNp63, a to především v bazálních progenitorových buňkách epidermis a jiných epithelií, prostaty a prsu. Její zvýšená hladina byla popsána u většiny dlaždicobuněčných karcinomů a je považována za potenciální marker nádorových kmenových buněk. U adenokarcinomu prsu naopak dochází k vymizení exprese ΔNp63, výjimkou je skupina tzv. triple-negativních karcinomů prsu (ER-, PR-, HER2-), kde je hladina ΔNp63 zvýšená. Cílem této práce je blíže popsat význam proteinu p63 u tohoto typu karcinomu, který se vyznačuje vysokou agresivitou, nízkou citlivostí k biologické léčbě a špatnou prognózou pro pacienta.

Jako studijní model byla použita triple-negativní buněčná linie MDA-MB-468, do které byly stabilně transfekovány dva plazmidy umožňující indukovat v buňkách expresi jednotlivých izoform p63 pomocí tetracyklinu. Po indukci exprese ΔNp63, ne však TAp63, došlo ke změně morfologie buněk a postupné ztrátě jejich adheze k podkladu. Pro triple-negativní karcinomy prsu je charakteristická zvýšená exprese receptoru epidermálního růstového faktoru, EGFR. Vysoká hladina EGFR a aktivace této signální dráhy je zároveň u některých buněčných linií spojena s poklesem buněčné adheze. V rámci tohoto projektu bylo prokázáno, že indukce exprese ΔNp63, ne však TAp63, vede u buněk MDA-MB-468 k aktivaci signální dráhy EGFR a následné ztrátě adheze. Sníženou adhezí buněk mělo za následek i působení epidermálního růstového faktoru, ligandu EGFR. Naopak zablokování EGFR specifickou monoklonální protilátkou vedlo ke zvýšení podílu přisedlých buněk.

Dále bylo provedeno srovnání expresních profilů buněk bez indukce a s indukovanou expresí izoform p63 pomocí

cDNA mikročipů. Byla zjištěna změna exprese mnoha genů, jejichž produkty se podílejí na remodelaci cytoskeletu, adhezi a migraci buněk a budou předmětem dalšího výzkumu. Projekt bude dále pokračovat imunohistochemickým barvením setu bazálních karcinomů a SILAC studií změn exprese proteinů na povrchu buněk po indukci ΔNp63.

*Tato práce vznikla za podpory Evropského fondu pro regionální rozvoj a státního rozpočtu ČR (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a IGA NT/13794-4/2012.*

### ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY Z JEDU DIVOCE ŽIJÍCÍ VČELY ODSTRAŇUJÍ BIOFILM A PŮSOBÍ SYNERGICKY S ANTIBIOTIKY PROTI *Pseudomonas aeruginosa*

**ONDŘEJ NEŠUTA\*, LENKA MONINCOVÁ, ZDENĚK VOBURKA, LUCIE BEDNÁROVÁ, JIŘINA SLANINOVÁ, VÁCLAV ČEŘOVSKÝ**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,  
 Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
 nesuta@uochb.cas.cz

Antimikrobiální peptidy izolované z jedu hmyzu řádu blanokřídlých (Hymenoptera) jsou známé pro jejich široké spektrum antimikrobiálních účinků zahrnující Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie a kvasinky, včetně patogenů<sup>1,2</sup>.

V této práci představujeme nově objevený α-helikální peptid, nazvaný HYL, izolovaný z extraktu jedových včků divoce žijící včely *Hylaeus signatus* pomocí RP-HPLC. Metodami Edmanova odbourávání a ESI-QTOF MS byla určena jeho aminokyselinová sekvence a přesná molekulová hmotnost: H-Gly-Ile-Met-Ser-Ser-Leu-Met-Lys-Lys-Leu-Ala-Ala-His-Ile-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (1696.98 Da).

HYL a jeho analoga jsme připravili metodou syntézy peptidů na pevné fázi. HYL vykazoval antimikrobiální a antifungální aktivitu a nebyl toxický vůči eukariotním buňkám. Změny ve struktuře HYL za účelem zlepšení antimikrobiálních aktivit většinou vedly ke zvýšení hemolytické aktivity jako míry toxicity. Navržený analog HYL-6 byl silně aktivní proti multi-rezistentním klinickým izolátům *Staphylococcus aureus* (*S.a.*) a *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a.*) a nebyl hemolytický. Následným zkoušením na modelech biofilmů tvořených *S.a.* a *P.a.* jsme prokázali, že některé ze studovaných peptidů významně snižují množství taktó uskupených bakteriálních buněk. Testování HYL a jeho analog v kombinaci s různými antibiotiky proti *P.a.* ukázalo, že některá z nich působí synergicky s tetracyklinem a rifampicinem.

Na základě hlubšího studia zmíněných jevů předpokládáme, že tyto peptidy usnadňují vstup antibiotika do bakteriální buňky narušením ochranné bariéry, kterou tvoří bakteriální membrána. Tato vlastnost činí z antimikrobiálních peptidů vhodné kandidáty pro kombinační terapii.

Tato práce vznikla za podpory Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, projekt RVO 61388963.

## LITERATURA

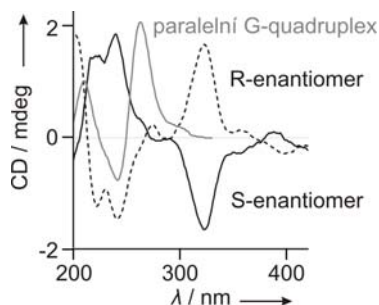
1. Monincová L., Buděšinský M., Slaninová J., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Fučík V., Borovičková L., Bednářová L., Straka J., Čeřovský V.: *Amino Acids* 39, 763 (2010).
2. Slaninová J., Putnová H., Borovičková L., Šácha P., Čeřovský V., Monincová L., Fučík V.: *Cent. Eur. J. Biol.* 6, 150 (2011).

## NOVÉ STABILIZÁTORY G-KVADRUPLEXŮ: DNA POLYMERÁZOVÁ STOP ESEJ VS. ECD

JANA NOVOTNÁ<sup>a\*</sup>, PAVLA HUBÁLKOVÁ<sup>b</sup>, MARIE URBANOVÁ<sup>c</sup>, LENKA POHLOVÁ<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Ústav anal. chemie, <sup>b</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, <sup>c</sup>Ústav fyziky a měřicí techniky, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6; <sup>d</sup>Katedra buněčné biologie, UK v Praze, 128 44 Praha 2  
jana.novotna@vyscht.cz

V posledních letech zaznamenaly rozmach obory zabývající se terapeutickým potenciálem malých molekul, které mohou stabilizovat nebo narušit G-kvadruplex – strukturu tvořenou oblastmi DNA a RNA bohatými na guanin. Různé biologicky relevantní struktury G-kvadruplexu DNA poskytují platformu pro terapeutické ovlivnění genové exprese právě malými molekulami.



Obr. 1. Příklad spektra ECD paralelně uspořádaného modelového G-kvadruplexu a zástupce z testovaných látek

V naší práci se zabýváme možnostmi stabilizace paralelně uspořádaných DNA G-kvadruplexů chirálními aromáty. Přestože se spektra oligonukleotidu a ligandů překrývají (obr. 1), zvolili jsme pro sledování změn sekundární struktury vlivem teploty elektronový cirkulární dichroismus (ECD) – tato spektrální metoda je vůči těmto změnám obzvláště citlivá. Další výhodou ECD je, že jsme relativně rychle schopni zjistit, zda nedochází k degradaci některé ze složek systému oligonukleotid-ligand. Spektroskopie ECD nám tak poskytuje mnoho informací ohledně stavu a interakcí jednotlivých složek. Relevanci výsledků ECD jsme podpořili DNA polymerázovou esejí, kde jsme díky delšímu řetězci oligonukleotidu blíže reálnému stavu. Zjistili jsme, že substituce aromatického skeletu připravených látek významně ovlivňuje účinnost

stabilizace G-quadruplexů. Kombinace výsledků obou metod slouží nejen pro zhodnocení účinnosti jednotlivých ligandů, ale také jako preselektce pro následné biologické experimenty a hlavně jako zpětná vazba pro skupinu syntetiků, kteří tyto ligandy připravují.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR (č. 21/2013) a GA ČR (P208/11/0105).

## LITERATURA

1. Bryan T. M., Baumann P.: *Mol. Biotechnol.* 49, 198 (2011).

## FLUOROVANÉ FOSFONÁTY A JEJICH VYUŽITÍ V ORGANICKÉ SYNTÉZE

STANISLAV OPEKAR, PETR BEIER\*

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha  
opekar@uochb.cas.cz; beier@uochb.cas.cz

Již poměrně dlouho jsou známy biologické vlastnosti fosfonátů a některé jejich aplikace v organické syntéze. Fosfonáty obsahují C–P vazbu, která je na rozdíl od fosfátové O–P vazby odolná vůči hydrolyze. Zavedení fluoru do  $\alpha$  polohy fosfonátů zvyšuje jejich kyselost a jejich podobnost fosfátům, čehož se dá využít například pro inhibici některých enzymů<sup>1</sup>.

V naší laboratoři se zabýváme chemií fluorovaných fosfonátů, které využíváme pro přípravu fluorovaných látek. Deriváty fluormethylfosfonátu, jako jsou například diethyl difluormethylfosfonát (**1**)<sup>2</sup>, tetraethyl fluormethylenbisfosfonát (**2**)<sup>3</sup> nebo diethyl fluorfenylsulfonylethylfosfonát (**3**)<sup>4</sup>, se dají využít v organické syntéze jako nukleofilní fluoralkylační činidla.

Podařilo se nám vyvinout metodu pro přípravu diethyl fluornitromethylfosfonátu (**4**), nové látky, která spadá do rodiny výše uvedených derivátů. **4** podléhá v bazickém prostředí reakcím s aldehydy za vzniku potenciálně biologicky aktivních geminálních fluor-nitro-olefinů **5**. Konjugovaná adice **4** na Michaelovské akceptory v bazickém prostředí představuje syntetickou metodu pro přípravu  $\alpha$ -fluor- $\alpha$ -nitrofosfonátů **6**.

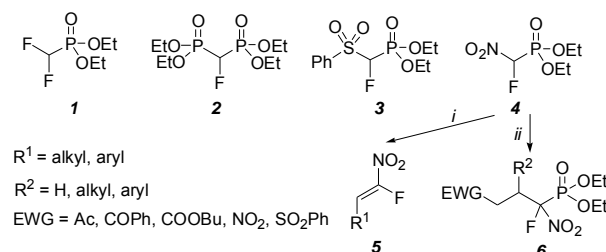


Schéma i) R<sup>1</sup>CHO, báze, THF, -78 °C až 0 °C; ii) EWG-CH=CH-R<sup>2</sup>, iPr<sub>2</sub>NH, THF, -30 °C až 25 °C.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 203/08/P310 a výzkumného plánu AV ČR (RVO: 61388963).

## LITERATURA

1. Romanenko V.D., Kukhar V. P.: *Chem. Rev.* 106, 3868 (2006).
2. Chumikhin K. S., Kadyrov A. A., Pasternak P. V., Chkanikov N. D.: *Russ. Chem. Rev.* 79, 371 (2010).
3. Beier P., Opekar S., Zibinsky M., Bychinskaya I., Prakash G. K. S.: *Org. Biomol. Chem.* 9, 4035 (2011).
4. Koizumi T., Hagi T., Horie Y., Takeuchi Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 35, 3959 (1987).

## STEREOSELEKTIVNÍ SYNTÉZA C-ANALOGU SIALYL LEWIS X

**BEÁTA OROSOVÁ, KAMIL PARKAN, LADISLAV KNEŽO**

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
orosovb@vscht.cz*

Sacharidy, vyskytující se ve formě glykoproteinů<sup>1</sup> na povrchu buněčných membrán tvoří tzv. „sacharidový kód“, který je specificky rozpoznáván proteinovými receptory. Tyto interakce jsou základem mezibuněčné komunikace a významně ovlivňují mnohé, životně důležité procesy, které mohou být pro organismus jednak velmi užitečné (např. rozmnožování), ale i fatální jako např. různé záněty, virová resp. bakteriální infekce nebo rakovinová metastáze.

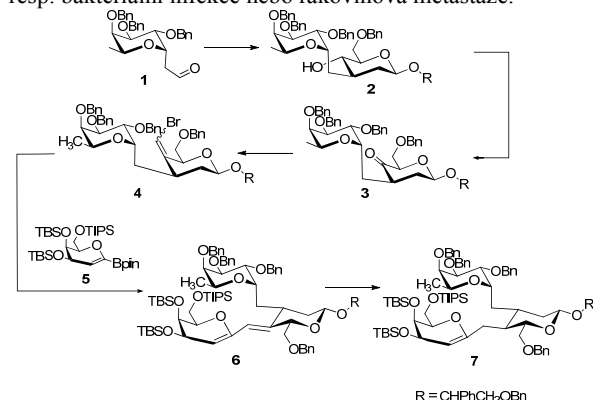


Schéma 1.

Naším cílem je využití Pd-katalyzovaného kaplingu pro syntézu C-analogu trisacharidového epitopu tzv. Sialyl Lewis X 7, který je odpovědný za zánětlivá onemocnění, vyskytuje se na povrchu rakovinných buněk, ale je také velmi důležitý při procesu oplodnění<sup>2</sup>.

Pro přípravu C-trisacharidu 7 jsme využili v naší laboratoři ověřený stereoselektivní postup<sup>3</sup>, kterým je možné z komerčně dostupné L-fukosy připravit v multigramovém množství potřebný keton 3, který lze Wittigovou reakcí převést na potřebný bromid 4. Využitím Suzukiho reakce a následně stereoselektivní hydroborace byl získán zmíněný C-analog epitopu Sialyl Lewis X 7 (Schéma 1).

*Tato práce vznikla za podpory grantu IGA 342 88 1232, GAČR P207/12/P713.*

## LITERATURA

1. Yu L.-G.: *Glycoconj. J.* 24, 411 (2007).
2. Pang P.-C., Chiu P. C. N., Lee C.-L., Chang L.-Y., Panico M., Morris H. R., Haslam S. M., Khoo K.-H., Clark G. F., Yeung W. S. B., Dell A.: *Science* 333, 1761 (2011).
3. Parkan K., Werner L., Lövyová Z., Prchalová E., Knežo L.: *Carbohydr. Res.* 345, 352 (2010).

## BIFUNKČNÍ CHELATANTY PRO SELEKTIVNÍ KOMPLEXACI MĚDI

**MONIKA PAÚROVÁ, JAN KOTEK, PETR HERMANN**

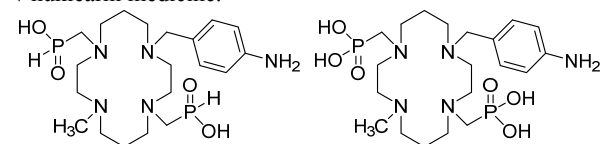
*Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2  
monika.paurova@natur.cuni.cz*

V posledních letech jsou ve větší míře studovány bifunkční makrocyclické ligandy vhodné pro radioizotopy mědi (např. <sup>61</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu a <sup>67</sup>Cu). Vznikající koordinační sloučeniny díky svým vhodným fyzikálním a chemickým vlastnostem nacházejí široké uplatnění na poli nukleární medicíny, a to jak v diagnostice, tak i v terapii nádorového onemocnění.

Na základě předchozích výsledků<sup>1,2</sup> byly připraveny a studovány dva nové cyklamové bifunkční deriváty (obr. 1) nesoucí fosfinátové pendantní skupiny 4-methyl-11-(p-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,8-bis-(metylenfosfinová kyselina) a fosfonátové pendantní skupiny 4-methyl-11-(p-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,8-bis(metylenfosfonová kyselina).

Ligandy byly zkoumány z hlediska termodynamické stability a kinetické inertnosti jejich komplexů. Ze získaných hodnot protonizačních konstant a konstant stabilit komplexů přechodných kovů (Cu, Zn, Ni) bylo potvrzeno, že plně substituované ligandy jsou velmi vhodnými kandidáty pro selektivní komplexaci dvojmočné mědi, neboť tvoří s kovem velmi stabilní komplexy ( $\log \beta_{ML} = 18,3$  a  $23,2$  pro fosfinát a fosfonát). Kysele katalyzovanou dekomplexací (acid-assisted decomplexation) byla zjištěna malá kinetická inertnost u obou vzniklým komplexů (poločas disociace v 1M HClO<sub>4</sub> je 47 s a 44 s pro fosfinát a fosfonát, 25 °C).

Tyto vlastnosti nabízejí možnost využití těchto látek při separaci radioizotopů mědi (oddělení mateřských/dceřinných izotopů zinku a niklu) a následně použití radioizotopů v nukleární medicíně.



Obr. 1. Strukturální vzorce ligandů

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR P207/11/1437.*

## LITERATURA

1. Svobodová I., Lubal P., Havlíčková J., Kotek J., Hermann P., Lukeš I.: *Dalton Trans.* 2006, 5184.

2. Svobodová I., Havlíčková J., Plutnar J., Lubal P., Kotek J., Hermann P.: Eur. J. Inorg. Chem. 2009, 3577.

**c-Myb-ŘÍZENÁ DEREGLACE MAPK p38 A JNK: POTENCIÁLNÍ MECHANISMUS REZISTENCE NÁDOROVÝCH BUNĚK KOLOREKTA K CYTOTOXICKÝM AGENS**

**LUCIE PEKARČÍKOVÁ\*, LUCIA KNOPFOVÁ, JAN ŠMARDA**

*Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00, Brno  
Pekarcikova.Lucie@seznam.cz*

Naše studie se zabývá funkcí proteinu c-Myb v biologii kolorektálních karcinomů a jejich odpovědi na chemoterapii. c-Myb se jako transkripční faktor uplatňuje v procesech buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy. Jeho exprese je nezbytná hlavně v nezralých buňkách hematopoetického systému, ale také v dalších typech tělních tkání jako jsou např. tkáň epitelální. Změna fyziologické hladiny proteinu c-Myb má transformační potenciál a současné studie dokládají deregulovanou hladinu proteinu c-Myb v různých typech solidních nádorů - střevních, prsních karcinomech, nádorech hlavy, krku, prostaty<sup>1</sup>. Nadměrná exprese genu MYB je spojena s špatnou prognózou pacientů s kolorektálními nádory<sup>2</sup>. Aktuálním problémem při léčbě nádorů je rezistence nádorových buněk k chemoterapii. Objasněním funkce proteinu c-Myb v procesech podporujících přežívání buněk po expozici cytotoxickými látkami můžeme přispět k efektivnějšímu zacílení léčby nádorů s deregulovanou hladinou proteinu c-Myb.

Jako modelový systém pro studium funkce proteinu c-Myb v regulaci buněčné smrti/přežívání jsme vytvořili deriváty buněčných linií CT26 a HCT116 odvozené z kolorektálních karcinomů s ektopickou expresí genu *c-myb* (MYBup buněčné linie). Výsledky měření buněčné viability průtokovou cytometrií ukazují významně vyšší přežívání buněčných linií MYBup po expozici cisplatině a doxorubicinu v porovnání s kontrolními liniemi. Zaměřili jsme se na identifikaci efektorů proteinu c-Myb pro objasnění tohoto účinku. Metodou westernového přenosu jsem v CT26 a HCT116 vystavených cisplatině zjistili korelaci hladiny proteinu c-Myb s aktivací proteinů, které jsou součástí signálních drah podporujících buněčné přežívání a proliferaci. U buněčných linií MYBup jsme detegovali zvýšenou hladinu fosforylovaných forem proteinů p38 a c-Jun. Využitím specifických inhibitorů fosforylace proteinů studujeme signální souvislost mezi zvýšenou hladinou proteinů p-p38 a p-c-Jun a lepším přežíváním buněk střevního karcinomu s ektopickou expresí genu *c-myb*.

Z výsledků naší studie vyplývá, že transkripční faktor c-Myb aktivuje signální dráhy p38 a JNK a podporuje buněčné přežívání v přítomnosti cytotoxických látek.

*Tato práce je podporována grantem NT-13441 IGA MZ ČR a CZ.1.07/2.3.00/20.0183 ESF.*

LITERATURA

1. Persson M., Andrén Y., Mark J., Horlings H. M., Persson F., Stenman G.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 18740 (2009).
2. Biroccio A., Benassi B., D'Agnano I., D'Angelo C., Buglioni S., Mottolese M., Ricciotti A., Citro G., Cosimelli M., Ramsay R., Calabretta B., Zupi G.: Am. J. Pathol. 158, 1289 (2001).

**VLIV MUTACE H71A V KAPSIDOVÉM PROTEINU MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU NA TVORBU NEZRALÝCH RETROVIROVÝCH ČÁSTIC**

**RŮŽENA PÍCHALOVÁ, ŠÁRKA PĚCHOŮKOVÁ, TIBOR FŮZIK, PAVEL ULBRICH, TOMÁŠ RUML**

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

Skládání virionů je klíčovým krokem životního cyklu retrovirů. Při tomto procesu nejdříve dochází k tvorbě tzv. nezralé částice, která je tvořena radiálně uspořádanými strukturálními polyproteiny Gag, seskupenými do nedokonale uzavřené, téměř sférické, hexamerní mřížky. Poté nezralá částice opouští hostitelskou buňku a Gag je štěpen na jednotlivé funkční domény. Tím dochází ke strukturální přestavbě nezralé částice a vzniku infekčního, zralého, virionu<sup>1</sup>. Pro detailní pochopení procesu skládání je nutná podrobná znalost struktury nezralého viru. V loňském roce byla pomocí kryo-elektronové mikroskopie vyřešena struktura nezralé částice Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV) s vysokým rozlišením<sup>3</sup>, což umožnilo zobrazit uspořádání kapsidového proteinu (CA) v rámci této částice. Ukázalo se, že histidin (H71), který je součástí čtvrtého  $\alpha$ -helixu v N-terminální doméně (NTD) CA M-PMV, se účastní trimerní intermolekulární interakce mezi dvěma sousedními dimery NTD CA<sup>3</sup>. Již dříve bylo zjištěno, že samotný polyprotein Gag je schopný tvořit nezralé virum-podobné částice (VLP) *in vitro*<sup>2</sup>. V této práci jsme studovali *in vitro* tvorbu VLP z delečního mutantu Gag M-PMV, konkrétně z fúzního kapsidového a nukleokapsidového proteinu s mutací H71A a zjišťovali jsme, zda je výše popsaná interakce nutná pro skládání VLP *in vitro*. Retrovirový protein byl produkován v buňkách *Escherichia coli*, ze kterých byl izolován v dostatečném množství a čistotě. Skládání a morfologie VLP byla analyzována pomocí transmisní elektronové mikroskopie a ultracentrifugace v sacharosovém gradientu a SDS-PAGE. Získané výsledky přispívají k detailnímu pochopení procesu skládání retrovirových částic a mohly by napomoci cílenému návrhu inhibitorů tohoto procesu.

*Tato práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.21/2013) a z grantu GA ČR (P302/12/1895).*

LITERATURA

1. Briggs J. A., Kräusslich H. G.: J. Mol. Biol. 410, 491 (2011).

- Gheysen D., Jacobs E., de Foresta F., Thiriart C., Francotte M., Thines D., de Wilde M.: *Cell* 59, 103 (1989).
- Bharat T. A. M., Davey N. E., Ulbrich P., Riches J. D., de Marco A., Rumlova M., Sachse C., Ruml T., Briggs J. A. G.: *Nature* 487, 385 (2012).

### VPLYV BORTEZOMIBU NA EXPRESIU BIELKOVÍN BCL-2 RODINY A INICIÁCIU MITOCHONDRIÁLNEJ APOPTÓZY V NEURONÁLNYCH BUNKÁCH

**IVANA PILCHOVÁ\***, KATARÍNA KLIKOVÁ,  
ANDREA ŠTEFÁNIKOVÁ, KATARÍNA  
KLAČANOVÁ, PETER RAČAY

*Univerzita Komenského v Bratislave, Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Malá Hora 4, 036 01 Martin  
iv.pilchova@gmail.com*

Spoločným znakom pre závažné neurodegeneratívne ochorenia je akumulácia nerozpustných proteínových agregátov spojená s poruchou ich degradácie. S obdobným javom sa stretávame aj v selektívne zraniteľných oblastiach hipokampu po ischemii. Po 15-minútovej globálnej ischemii indukovanej pomocou 4-cievneho podväzu (4-VO) u potkana, dochádza ku masívnemu hromadeniu polyubikvitinovaných zhlukov bielkovín s molekulovou hmotnosťou vyššou ako 110 kDa (cit.<sup>1</sup>). Ischemiou indukovaná tvorba agregátov a následná indukcia proteazomálneho stresu je jednou z možných príčin oneskorenej smrti neurónov, ktorej mechanizmus ešte nie je úplne neobjasnený. Zamerali sme sa preto na sledovanie účinkov bortezomibu (Velcade, PS-341), selektívneho inhibítora 26S proteazómu, na ľudskú glioblastómovú bunkovú líniu T98G. Prežívanie buniek sme hodnotili MTT testom s koncentráciou bortezomibu od 5 do 100 nM. Výrazný toxický účinok sa prejavoval v koncentráciách vyšších ako 10 nM a po viac ako 24 hodinách inkubácie. Získané výsledky boli porovnané s relatívnym množstvom bielkovín stanoveným Western blot analýzou z lyzáto buniek po 4 a 24 hodinovej inkubácii s rôznymi koncentraciami bortezomibu. Ku signifikantnému nárastu hladiny polyubikvitinovaných agregátov väčších ako 110 kDa dochádzalo po 4 aj 24 hodinách, aj keď 4-hodinová inkubácia s bortezomibom nie je asociovaná s iniciáciou apoptózy a poklesom prežívania buniek T98G. Bortezomib indukuje stresovú odpoveď už po 4 hodinách kultivácie a to vo forme signifikantne zvýšenej hladiny bielkoviny tepelného šoku Hsp70, ktorá má cytoprotektívnu funkciu. Po 24 hodinách sa okrem Hsp70 signifikantne zvýšila aj hladina Hsp90, no bez pozitívneho efektu na prežívanie buniek. Účinok bortezomibu na zmenu relatívnych hladín proteazómom regulovaných bielkovín z Bcl-2 rodiny, ktoré sú zodpovedné za reguláciu apoptózy, sa prejavuje až po 24 hodinách. Dochádza ku poklesu hladiny antiapoptickej bielkoviny Mcl-1 a naopak ku zvýšeniu hladiny proapoptickej bielkoviny Noxa, no rozdiely oproti bazálnym hodnotám nie sú štatisticky významné. Naše výsledky potvrdzujú, že bortezomib má na bunky T98G toxický vplyv,

ktorý indukuje stresovú odpoveď a ústi do apoptózy. Zároveň indukuje tvorbu polyubikvitinovaných agregátov bielkovín, ktoré nie sú primárnou príčinou iniciácie apoptózy.

*Tato práca bola podporená grantom APVV-0245-11 a GUK 59/2012.*

### LITERATÚRA

- Račay P.: *Cell Mol. Neurobiol.* 32, 1 (2012).

### VROZENÉ ERYTHROCYTÁRNÍ ENZYMOPATIE V ČR

**PAVLA POSPÍŠILOVÁ<sup>a</sup>**, RENÁTA MOJZÍKOVÁ<sup>a</sup>,  
**MARTINA DIVOKÁ<sup>b</sup>**, DAGMAR POSPÍŠILOVÁ<sup>c</sup>,  
**JAROSLAV ČERMÁK<sup>d</sup>**, MARTINA SUKOVÁ<sup>e</sup>,  
**VLADIMÍR DIVOKÝ<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav biologie, LF UP, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc,  
<sup>b</sup>Hemato-onkologická klinika a <sup>c</sup>Dětská klinika FN a LF UP Olomouc, <sup>d</sup>ÚHKT Praha, <sup>e</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie FN Motol, Praha  
pavla.pospisilova@upol.cz*

Enzymopatie, genetické onemocnění vyznačující se vrozenými abnormalitami erytrocytárních enzymů, jsou jednou z příčin rozvoje vrozené nesférocytární hemolytické anémie (HNSHA). Mezi nejrozšířenější enzymové defekty patří deficit glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PD) a pyruvátkinasy (PK). Základní screeningové testy jsou schopny určit pouze pravděpodobnou příčinu hemolytické anémie, ale neumožňují již dále rozlišit defekty mezi jednotlivými enzymy. Přesná diagnóza je stanovena až na základě snížené aktivity daného enzymu a následně potvrzena molekulárně-genetickou analýzou<sup>1</sup>.

V naší laboratoři jsme zavedli screeningové metody, které napomáhají rozlišit defekty mezi jednotlivými skupinami enzymopatií vedoucí k hemolytické anémii. Tyto metody zahrnují stanovení koncentrace oxidovaného a redukovaného glutathionu (defekt glutathionového metabolismu erytrocytu), ADP a ATP (nedostačující glykolýza) prostřednictvím HPLC-MS/MS a spektrofotometrického stanovení poměru pyrimidinových a purinových bází určujícího deficit enzymu pyrimidin-5'-nukleotidasy. Současně byla zoptimalizována metodika stanovení aktivit 16 enzymů, jejichž defekt může vést k HNSHA.

Analýzy byly aplikovány na 19 pacientech s podezřením na hemolytickou anémii způsobenou enzymopatií. U 11 z nich byl potvrzen enzymový deficit – G6PD (4) a PK (7). Osekvenováním genu *G6PD* byly prokázány mutace vedoucí k aminokyselinové záměně D282H (varianta G6PDSeattle), F381L (varianta G6PDolomouc, sourozenci) a F216T. V případě genu *PKLR* prokázala molekulárně-genetická analýza mutace vedoucí k záměně aminokyselin R510Q, R532W, R498H, R486W, D293V a G275R s různou četností výskytu. Většina mutací genů *G6PD* a *PKLR* patří ke známým, běžně se vyskytujícím mutacím; některé z nich byly popsány i v české populaci<sup>2</sup>. Výjimkou jsou mutace

F216T (gen *G6PD*) a D293V (gen *PKLR*), které doposud nebyly v literatuře popsány.

*Tato práce vznikla za podpory grantu NT11208 (IGA MZ ČR).*

#### LITERATURA

1. Arya R., Layton D. M., Bellingham J. A.: *Blood Rev.* 9, 3 (1995).
2. Lenzner C., Nürnberg P., Jacobasch G., Gerth C., Thiele B. J.: *Blood* 89, 5 (1997).

### ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY PYRIMIDINOVÝCH DERIVÁTŮ A JEJICH STABILITA V DMSO

**ELIŠKA PROCHÁZKOVÁ<sup>a</sup>, ANNA BŘEZINOVÁ, LUCIE ČECHOVÁ, PETR JANSA, ANTONÍN HOLÝ, HELENA MERTLÍKOVÁ-KAISEROVÁ, MARTIN DRAČÍNSKÝ**

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha prochazkova@uochb.cas.cz*

Substituované pyrimidiny se v buňkách přirozeně vyskytují nejen jako prekurzory pro biosyntézu nukleotidů, základních stavebních jednotek DNA, ale fungují také jako koenzymy a sloučeniny s makroergní vazbou (analogy adenosintrifosfátu, ATP). Modifikované pyrimidiny vykazují celou řadu biologických účinků, zejména virostatické<sup>1</sup>, antibiotické<sup>2</sup> a cytostatické<sup>3</sup>.

U di- a trisubstituovaných 5-aminopyrimidinů byly objeveny také antioxidační<sup>4</sup> vlastnosti, které byly pozorovány pomocí dvou *in vitro* experimentů a na buněčném modelu. V obou *in vitro* experimentech byla nejvyšší antioxidační aktivita zjištěna u 2,4,6-trisubstituovaných 5-aminopyrimidinů, zatímco na buněčném modelu byly zcela neaktivní. Důvodem by mohla být omezená průchodnost přes buněčnou membránu, a proto byly připraveny jejich lipofilnější deriváty, u kterých byla antioxidační aktivita prokázána. Látky s nejvyšší antioxidační aktivitou byly současně nejvíce náchylné k oxidaci dimethylsulfoxidem<sup>5</sup> (DMSO). Zásobní roztoky látek v DMSO se již po několika hodinách velmi výrazně zbarvily a jejich antioxidační aktivita klesla. Oxidační produkty byly identifikovány pomocí UV/VIS, NMR a HR-MS a byl navržen reakční mechanismus. Je pravděpodobné, že mechanismus antioxidačního účinku trisubstituovaných 5-aminopyrimidinů úzce souvisí se schopností těchto látek se oxidovat vlivem DMSO v poloze 5. Přestože se DMSO velmi často používá jako rozpouštědlo v biochemických experimentech, je nutné mít na paměti, že jeho oxidační účinky mohou velmi negativně ovlivňovat získané výsledky. Prokázali jsme, že pro sledování antioxidační aktivity látek je DMSO jako solvent zcela nevhodný, protože může testované látky přednostně oxidovat a produkty této oxidace už pak žádné antioxidační vlastnosti nevykazují.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR #1M0508 a je součástí projektu číslo Z40550506 AV ČR.*

#### LITERATURA

1. Holý A., Votruba I., Merta A., Černý J., Veselý J., Vlach J., Šedivá K., Rosenberg I., Otmar M., Hřebabecský H., Trávníček M., Vonka V., Snoeck R., De Clercq E.: *Antiviral Res.* 13, 295 (1990).
2. Hawser S., Lociuo S., Islam K.: *Biochem. Pharmacol.* 71, 941 (2006).
3. Lee J., Kim K. H., Jeong S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4203 (2011).
4. Procházková E., Jansa P., Dračinský M., Holý A., Mertlíková-Kaiserová H.: *Free Rad. Res.* 46, 61 (2012).
5. Procházková E., Jansa P., Březinová A., Čechová L., Mertlíková-Kaiserová H., Holý A., Dračinský M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6405 (2012).

### HYBRIDNÍ NANOSYSTÉMY OXID TITANIČITÝ-FOSFONÁT PRO DIAGNOSTIKU A TERAPII

**IVAN ŘEHOŘ<sup>a</sup>, JAN ČERNÝ<sup>b</sup>, PAVLA JENDELOVÁ<sup>c</sup>, DANIEL JIRÁK<sup>d</sup>, IVAN LUKES<sup>b\*</sup>**

*<sup>a</sup>UOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>PřF UK, Albertov 6, 128 40 Praha 2; <sup>c</sup>ÚEM AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; <sup>d</sup>IKEM, Vídeňská 1958, 140 21 Praha 4 lukes@natur.cuni.cz*

Multimodální diagnosticko-terapeutická nanosonda zcela nového typu byla připravena a úspěšně použita pro zobrazování buněk a pro zabíjení rakovinných buněk za podmínek *in-vitro*<sup>1</sup>. Nanočástice TiO<sub>2</sub> tvoří jádro sondy, na kterém jsou pomocí fosfonových skupin připojeny dva typy molekul – cheláty gadolinia(III) zodpovědné za kontrast v tomografii magnetické rezonance (MRI) a fluorescenční značky pro optické zobrazování. Připravená sonda vykazuje vysokou <sup>1</sup>H *r*<sub>1</sub> relaxivitu<sup>2</sup> stejně jako hustotu relaxivity – klíčové parametry pro její použití v MRI. Přítomnost fluorescenční značky umožňuje její vizualizaci pomocí fluorescenční mikroskopie.

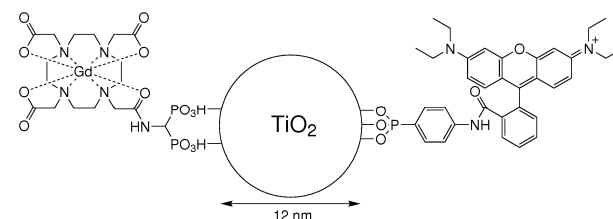


Schéma 1. Struktura připravené nanosondy

Použitelnost sondy pro medicínské zobrazování byla studována na řadě typů živých buněčných linií<sup>1,3</sup>. Sonda nevykazovala toxicitu v žádném z uvedených modelů a bylo zjištěno její dlouhodobé skladování v lyzozomech. Označené buňky byly úspěšně vizualizovány *in-vitro* pomocí fluorescenční mikroskopie a MRI. Bylo demonstrováno, že netoxická biokompatibilní sonda může být použita k zabíjení rakovinných buněk UV zářením. Dosažené výsledky

prokazují aplikovatelnost nového druhu nanosondy pro diagnostiku a terapii a představují přínos porozumění interakce mezi fosfonovými kyselinami a oxidickými povrchy<sup>4</sup>.

## LITERATURA

1. Řehoř I., Vilímová V., Jendelová P., Kubiček V., Jiráček D., Herynek V., Kapcalová M., Kotek J., Černý J., Hermann P., Lukeš I.: *J. Med. Chem.* 54, 5185 (2011).
2. Řehoř I., Kubiček V., Kotek J., Hermann P., Lukeš I., Száková J., Vander Elst L., Muller R. N., Peters J. A.: *J. Mater. Chem.* 19, 1494 (2009).
3. Berkova Z., Jirak D., Zacharovova K., Lukes I., Kotkova Z., Kotek J., Kacanka M., Kaman O., Rehor I., Hajek M., Saudek F.: *ChemMedChem*.10.1002/cmdc.201200439.
4. Řehoř I., Kubiček V., Kotek J., Hermann P., Száková J., Lukeš I.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2011, 1981.

### ROZDÍLNÁ REAKTIVITA ALKYL ARYL SULFONŮ S BÁZEMI A TRANSMETALACE GENEROVANÝCH KARBANIONTŮ

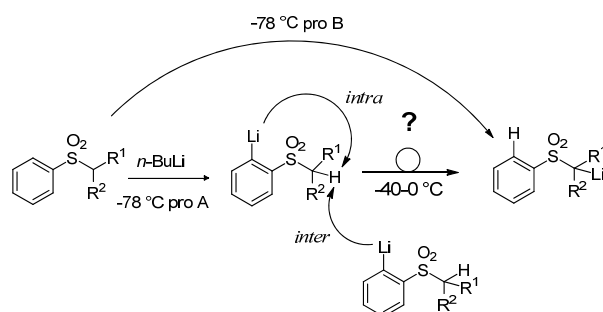
**LUCIE ŘEHOVÁ, ULLRICH JAHN**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.,  
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha  
rehova@uochb.cas.cz, jahn@uochb.cas.cz

Silně elektrony přitahující sulfonylová skupina, podobně jako karbonylová skupina, způsobuje zvýšení kyselosti sousedních  $\alpha$ -protonů. Deprotonace těchto látek je proto relativně snadná. Na tomto efektu je založena Juliaova olefinace a jí příbuzné reakce.

Nedávno byl objeven neočekávaný průběh v metalacní selektivitě  $\beta,\beta$ -disilylovaného sulfonu<sup>1</sup>. Tato sloučenina podléhá nejprve řízené *ortho*-metalaci, nehledě na přítomnost  $\alpha$ -protonu, výsledná aryl lithná sůl se následně po zahřátí přesmykne na původně očekávanou sulfonylalkyl lithnou sůl.

V tomto příspěvku bude prezentována detailní studie reaktivity rozvětvených alkyl fenylyl sulfonů s báze. Bude pojednáno o tom, jak struktura výchozího sulfonu ovlivňuje regioselektivitu deprotonace.



A:  $R^1, R^2 = CH_2iPr$  nebo větší

B:  $R^1, R^2 = CH_2CH_3$  nebo menší

Zabývali jsme se též otázkou, zda přesmyk probíhá inter- či intramolekulárně. V příspěvku budou prezentovány výsledky cross-over experimentů, stejně tak jako kinetické studie transmetalace. Při těchto experimentech byly pozorovány značné kinetické izotopové efekty, jak pro počáteční deprotonaci, tak pro transmetalaci. Tyto efekty velkou měrou ztěžují určení mechanismu transmetalace.

Tato práce vznikla za podpory grantu P207/11/1598 (GA ČR), RVO: 61388963 (UOCHB AV ČR) a MSM0021620857 (MŠMT ČR).

## LITERATURA

1. Puget B., Jahn U.: *Synlett* 2010, 2579.

### DERIVÁTY KYSELINY BETULINOVÉ INHIBUJÍ AKTIVITU TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ GLI A PROLIFERACI NÁDOROVÉ LINIE GLIOBLASTOMU

**JIRÍ ŘEHULKA<sup>a</sup>, IVO FRYDRYCH<sup>a</sup>, PETR DŽUBÁK<sup>a</sup>, MILAN URBAN<sup>b</sup>, JAN ŠAREK<sup>b</sup>, MARIÁN HAJDÚCH<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Laboratoř experimentální medicíny, ÚMTM LF UP v Olomouci, 779 00 Olomouc; <sup>b</sup>Katedra organické chemie, ÚMTM PřF PP v Olomouci, 779 00 Olomouc  
hajduchm@gmail.com

Inhibitory dráhy sonic hedgehog jsou novou skupinou léčiv solidních nádorů, ve kterých je tato dráha aktivní. Signální dráha sonic hedgehog má důležitou úlohu v embryonálním vývoji, avšak mutace v receptoru pro sekretovaný protein sonic hedgehog homolog (Shh) jsou příčinou vzniku např. bazocelulárního karcinomu. Konstitutivní aktivace dráhy vede ke zvýšené expresi onkogenů regulovaných transkripčními faktory Gli1 a Gli2. V souboru malých molekul odvozených od kyseliny betulinové jsme identifikovali 3 strukturně blízké inhibitory Gli1/2 zprostředkované transkripce v buněčné linii lidského glioblastomu U87-MG. Pomocí RT-PCR byla ověřena downregulace mRNA transkriptů vybraných cílových genů, mezi které patří Bcl2, cyclin D1 i samotný Gli2. Studované sloučeniny snižovaly proliferaci buněk glioblastomu U87-MG, ve kterých je dráha sonic hedgehog aktivní, a způsobovaly blok v G1 fázi buněčného cyklu. V další práci chceme zjistit, zda studované látky modulují aktivitu Gli1 a Gli2 na úrovni transkripčních faktorů anebo působí výše v signální dráze jako specifické inhibitory dráhy sonic hedgehog.

Tato práce vznikla za podpory grantů: UP (LF\_2012\_018), BIOMEDREG (C.1.05/2.1.00/01.0030), TE01020028.

## CHARAKTERIZACE ROLE PROTEINU RecQ4 V HOMOLOGNÍ REKOMBINACI

**HANA SEDLÁČKOVÁ, ZDENKA BARTOŠOVÁ, LUMÍR KREJČÍ**

Laboratory of Recombination and DNA Repair, National Centre for Biomolecular Research and Department of Biology, Masaryk University, Kamenice 5/A7, 625 00 Brno  
hsedlackova@mail.muni.cz

Rothmund-Thomsonův syndrom (RTS) je autozomální recesivní onemocnění. Typickým klinickým příznakem RTS je červená vyrážka, známá jako poikiloderma. Pacienti navíc trpí očním zákalem, kosterními defekty a vyšší náchylností k rakovině kůže a kostí<sup>1-3</sup>. Mutace v genu RECQ4, které byly zjištěny u pacientů s RTS, vedou k produkci nefunkčních verzí proteinu RecQ4. Zkrácené verze proteinu RecQ4 pak mohou způsobit poruchy v opravných mechanismech DNA, jejichž výsledkem je rozsáhlé poškození lidské genetické informace<sup>4,6</sup>.

Domény proteinu RecQ4 jsou velmi podobné jako u ostatních členů RecQ helikas, avšak jeho helikasová aktivita není zatím zcela objasněna a přesná funkce proteinu RecQ4 je dosud neznámá. Nicméně, nedávná genetická data ukazují, že protein RecQ4 by mohl mít velmi důležitou roli při replikaci a opravě DNA pomocí homologní rekombinace (HR)<sup>7</sup>.

Podářilo se nám identifikovat funkční interakci mezi RecQ4 a strukturálně specifickou endonukleázou Mus81/Eme1, která se podílí na rozkládání rekombinační meziproductů a zastavené replikační vidlice, a také zmapovat interakční doménu uvnitř RecQ4, která je zodpovědná za tuto interakci. Následně byla také objevena schopnost RecQ4 a jeho zkrácených verzí stimulovat endonukleázovou aktivitu komplexu Mus81/Eme1 na syntetických DNA strukturách představující potenciální *in vivo* substráty. Dále byly také zkoumány DNA vazebné vlastnosti proteinu RecQ4, který obsahuje jednu předpokládanou DNA vazebnou doménu. Avšak při bližším studiu jsme identifikovali více DNA vazebných domén, které by mohly mít velký význam při úloze RecQ4 v HR.

Všechny tyto údaje poukazují na důležitou roli proteinu RecQ4 při regulaci rekombinace a replikace. Nicméně, další studie pro pochopení molekulárního mechanismu a role proteinu RecQ4 při vzniku velmi zákeřného onemocnění jako je RTS jsou nezbytné.

### LITERATURA

1. Varughese M., Leavey P., Smith P., Sneath R., Breatnach F., O'Meara A.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118, 389 (1992).
2. Dick D. C., Morley W. N., Watson J. T.: Clin. Exp. Dermatol. 7, 119 (1982).
3. Drouin C. A., Mongrain E., Sasseville D., Bouchard H. L., Drouin M.: J. Am. Acad. Dermatol. 28, 301 (1993).
4. Kitao S., Shimamoto A., Goto M., Miller R. W., Smithson W. A., Lindor N. M., Furuichi Y.: Nat. Genet. 22, 82 (1999).
5. Lindor N. M., Furuichi Y., Kitao S., Shimamoto A.,

Arndt C., Jalal S.: Am. J. Med. Genet. 90, 223 (2000).

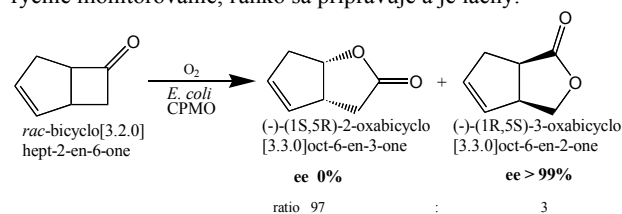
6. Balraj P., Concannon P., Jamal R., Beghini A., Hoe T. S., Khoo A. S., Volpi L.: Mutat. Res. 508, 99 (2002).
7. Hickson I. D.: Nat. Rev. Cancer 3, 169 (2003).

## BIOSENZOR NA SLEDOVANIE PRIEBEHU BAEYEROVEJ-VILLIGEROVEJ BIOOXIDÁCIE

**ANDREA SCHENKMAYEROVÁ\*, JAROSLAV KATRLÍK, MAREK BUČKO, PETER GEMEINER**

Odd. glykobiotechnologie Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, SR  
chemasch@savba.sk

Bayerove-Villigerove (BV) oxidácie sa väčšinou uskutočňujú použitím geneticky upravených buniek *E. coli* s nadexprimovaným enzýmom zo skupiny Bayerovych-Villigerovych monooxygenáz (BVMO)<sup>1</sup>. BVMO umožňujú selektívnu oxidáciu ketónov na estery alebo laktóny využívané vo farmaceutickom priemysle, prípadne ako arómy<sup>2</sup>. Aj keď boli vyvinuté spektrofotometrické metódy na sledovanie aktivity BVMO<sup>3</sup>, priebeh reakcie sa zvyčajne monitoruje plynovou chromatografiou. My sme sa rozhodli pripraviť biosenzor, ktorý je rozmerovo malý, umožňuje rýchle monitorovanie, ľahko sa pripravuje a je lacný.



Obr. 1. Schéma biooxidácie<sup>4</sup>

*E. coli* s nadexprimovanou cyklopentanón monooxygenázou boli využité ako biorozpoznávací zložka. Baktérie boli imobilizované v polyelektrolytovom géle vo forme membrány, ktorá bola upevnená na kyslíkovú mikroelektrodu umožňujúcu citlivé meranie s nízkym šumom. Takto pripravený biosenzor umožnil odčítanie signálu analytu do 30 s od jeho prídavku a pre (±)-cis-bicyklo[3.2.0]hept-2-én-6-ón bol lineárny rozsah kalibračnej krivky 2-130 μM a citlivosť 1,8 nA/μM. Nebola zaznamenaná odozva na žiadny z testovaných interferentov. Počas jedného týždňa skladovania pri 4 °C nebol pozorovaný pokles citlivosti biosenzora. Vyvinutý biosenzor bol použitý pri off-line monitorovaní celého priebehu BV biooxidácie.

Táto práca bola podporovaná z grantu VEGA č. 1/0229/12 a na základe zmluvy č. APVV-0302-10.

### LITERATÚRA

1. Schenk Mayerová A., Bučko M., Gemeiner P.: Chem. Listy 106, 750 (2012).
2. Fink M.J., Rudroff F., Mihovilovic M.D.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 21, 6135 (2011).



3. Linares-Pasténa J.A., Chávez-Lizárraga G., Villagomez R., Mamo G., Hatti-Kaul R.: *Enzyme Microb. Technol.* 50, 101 (2012).
4. Mihovilovic M.D., Rudroff F., Grötzl B., Kapitan P., Snajdrova R., Rydz J., Mach R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 3609 (2005).

## SYNTEZA BICYKlickÝCH PEPTIDOMIMETIK NA PEVNÉ FÁZI

**EVA SCHÜTZNEROVÁ<sup>a,\*</sup>, ALLEN G. OLIVER<sup>b</sup>, JAROSLAV ZAJÍČEK<sup>b</sup>, VIKTOR KRCHNÁK<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Dept of Organic Chemistry, Fac. Sci, Palacky University, 771 46 Olomouc; <sup>b</sup>Dept of Chemistry and Biochemistry, 251 Nieuwland Sci. Ctr, U of Notre Dame, Indiana 46556, USA [schutznerova@orgchem.upol.cz](mailto:schutznerova@orgchem.upol.cz)

Zatímco objevy prvních léčiv byly spíše náhodné, v průběhu farmaceutického výzkumu se utvořil nový obor - medicínální chemie. Spojuje organickou chemii, biochemii a farmakologii a umožňuje cílenou syntézu nových biologicky aktivních látek. Jednou z velmi efektivních metod syntézy je kombinatoriální chemie s použitím syntézy na pevné fázi<sup>1</sup>.

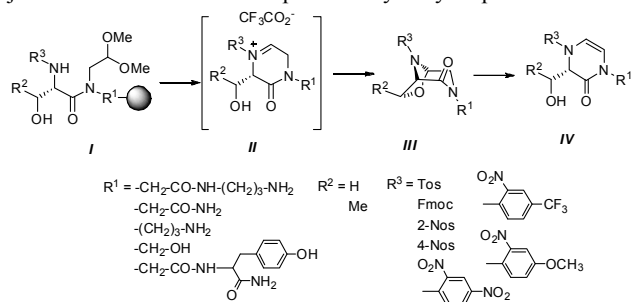


Schéma 1. Schéma syntézy látek **III** a **IV** z acyklického prekursoru **I** přes iminiový ion **II**

V této práci popisujeme stereoselektivní syntézu (1*S*,5*S*)-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oktanů **III** na pevné fázi s využitím strategie typické pro Merrifieldovu<sup>2</sup> peptidovou syntézu. Tento přístup nám umožnil připravit malou knihovnu látek svou strukturou podobných látkám přírodním - tropanovým alkaloidům<sup>3</sup>. Na pevné fázi byly připraveny acyklické intermediáty **I**, které se působením kyseliny trifluoroctové jednak štěpily z pryskyřice a zároveň docházelo k tandemové cyklizaci iminiového iontu **II** a nukleofilní adici, která vedla k izolaci dvou produktů **III** a **IV**. Byl studován vliv substituentů s různým elektronovým efektem na vznik **III** a **IV**. Připravené látky byly podrobeny biologickému testování.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR ME09057 a P207/12/0473 od GAČR.

## LITERATURA

1. Hampl F., Rádl S., Paleček J.: *Farmakochemie*. 1. vyd. VŠCHT v Praze, Praha 2002.
2. Merrifield R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 (1963).

3. O'Hagan D.: *Nat. Prod. Rep.* 17, 435 (2000).

## NOVÉ VAKCINAČNÍ NÁSTROJE PRO INDUKCI T-BUNĚČNÉ IMUNITY

**ONDŘEJ STANĚK<sup>a,b,\*</sup>, L. MAJLESSI<sup>c,d</sup>, I. LINHARTOVÁ<sup>a</sup>, C. LECLERC<sup>c,d</sup>, P. ŠEBO<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4; <sup>b</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6; <sup>c</sup>Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie, <sup>d</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U883, 75724 Paris Cedex 15, France [stanek@biomed.cas.cz](mailto:stanek@biomed.cas.cz)

Pro mnoho vakcinačních, imunoterapeutických a částečně také diagnostických aplikací je velmi důležité indukovat specifickou imunitu zprostředkovanou a T lymfocyty. To stále ale představuje technický problém. Prezentace antigenu (Ag) specifickým T-lymfocytům totiž závisí na způsobu doručení Ag do antigen prezentujících buněk (APC). Pro prezentaci epitopů na MHC II molekulách specifickým CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub> buňkám je žádoucí doručení Ag do endosomu APC, zatímco epitopů na MHC I molekulách cytotoxickým CD8<sup>+</sup> T lymfocytům (CTL) vyžaduje doručení Ag do křížově-prezentující organely nebo cytosolu APC.

Nově jsme pro tyto účely vyvinuli alternativní a vysoce flexibilní systém, který umožňuje cílení Ag do APC přes různé povrchové receptory. Nejdříve jsou geny pro antigeny fúzovány se čtecím rámcem kódujícím streptavidin (SA) a z hybridního genu je pak exprimován fúzní Ag-SA nebo SA-Ag protein jako tetramer s velmi vysokou afinitou k biotinu. K zacílení do různých subtypů APC jsou pak připraveny komplexy Ag-SA s biotinylovanými monoklonálními protilátkami (biot.mAb) specificky rozeznávajícími povrchové receptory APC.

Pro ověření účinnosti vyvinutého systému byly použity epitopy ze slepičího ovalbuminu a mykobakteriální antigeny CFP-10, ESAT-6 a Tb10.4, které byly geneticky připojeny na N- nebo C-konec streptavidinu. Ag-SA nebo SA-Ag proteiny byly produkovány a izolovány jako rozpustný tetramer, který byl následně smíchán s biot.mAb proti receptorům CD11b, CD11c, MHC II a DEC 206 za vzniku komplexu Ag-SA-biot.mAb. Indukce specifických T-buněčných odpovědí byla analyzována na myších dendritických buňkách *in vitro* a *in vivo*. Z výsledků vyplývá, že pro indukci účinné imunitní odpovědi je třeba velmi nízké dávky Ag (~ 1 nM). V závislosti na použité protilátce byl Ag prezentován *in vivo* jak v komplexu s MHC I, tak i s MHC II glykoproteiny, což umožnilo navodit specifické CTL tak CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub> imunitní odpovědi proti daným antigenům.

## ANALOGY FLUORESCeinu S NEAROMATICkýMI SUBSTITUENTY V POLOZE 9 A JEJICH FOTOCEMIE

PETER ŠEBEJ<sup>a</sup>, PETER ŠTACKO<sup>a</sup>, JÜRGEN WINTNER<sup>b</sup>, TOMÁŠ SLANINA<sup>a</sup>, PAVEL MÜLLER<sup>b</sup>, JAMALUDIN AL-ANSHORI<sup>a</sup>, LOVELY A. P. ANTONY<sup>a</sup>, JAKOB WIRZ<sup>b</sup>, PETR KLÁN<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí a Ústav chemie, PřF MU Brno; <sup>b</sup>Department of Chemistry, Universität Basel, Klingelbergstrasse 80, CH-4056 Basel, Švýcarsko [sebej@mail.muni.cz](mailto:sebej@mail.muni.cz)

Pyroninová a xanthenonová barviva, analogy fluoresceinu, jsou široce využívány v biomolekulárních vědách jako fluorofory<sup>1,2</sup>. Téměř všechny známé strukturální motivy tohoto typu obsahují aromatický substituent v poloze 9 tricyklického chromoforu.

Připravili jsme dvě nové třídy málo prozkoumaných analogů těchto barviv s nearomatickými substituenty v poloze 9 a prozkoumali jejich fotochemii.

Xanthen-9-ylmethyllová skupina se ukázala jako perspektivní fotolabilní chránící skupina pro karboxylové a fosforečné kyseliny odstupující po ozáření viditelným (zeleným) světlem (Schéma a)<sup>3</sup>.

Strukturně podobný pyroninový chromofor po ozáření (žlutým světlem) odštěpuje dithianový motiv a zároveň dochází k rozštěpení vazby uhlík-uhlík (Schéma b).<sup>4</sup> Oba tyto procesy lze jednoduše sledovat pomocí změn absorpce a fluorescence, což je příslib možných zajímavých aplikací diskutovaných procesů.

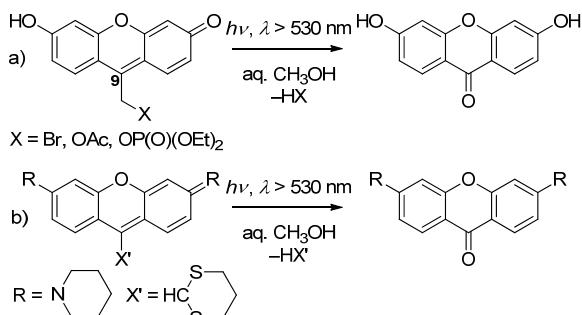


Schéma. Fotochemické štěpení a) esteru kyseliny xanthen-9-yl-methanolu a b) vazby uhlík-uhlík v pyroninovém barvivu

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR (203/09/0748) a Evropské unie (CETOEN, CZ.1.05/2.1.00/01.0001) spravovaném MŠMT ČR.

### LITERATURA

- Ueno T., Nagano T.: *Nat. Methods* 8, 642 (2011).
- Beija M., Afonso C.A.M., Martinho J.M.G.: *Chem. Soc. Rev.* 38, 2410 (2009).
- Šebej P., Wintner J., Müller P., Slanina T., Al Anshori J., Antony L.A.P., Klán P., Wirz J.: *J. Org. Chem.* 78, 1883 (2013); DOI: 10.1021/jo301455n.
- Štacko P., Šebej P., Veetil A.T., Klán P.: *Org. Lett.* 14, 4918 (2012).

## KATALYTICKÝ MECHANISMUS ŠTĚPENÍ GLYKOSIDICKÉ VAZBY 8-OXOG ENZYMEM hOGG1 – TEORETICKÝ MODEL

JAKUB ŠEBERA<sup>a\*</sup>, LUKAŠ TRANTÍREK<sup>b</sup>, YOSHIYUKI TANAKA<sup>c</sup>, VLADIMÍR SYCHROVSKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Národní centrum pro výzkum biomolekul a CEITEC, MU, 602 00, Brno; <sup>c</sup>Laboratory of Molecular Transformation, Tohoku University, Aobayama, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578 Japan [sebera@uochb.cas.cz](mailto:sebera@uochb.cas.cz)

Oprava poškozené DNA patří mezi základní obranné mechanismy buňky určené k ochraně genetického kódu v živých organismech<sup>1</sup>. Jednou z často poškozených DNA bází je guanin, který se vlivem reaktivních kyslíkatých částic může změnit na 8-oxoguanin (8-oxoG). Je prokázáno, že tato báze může být příčinou vzniku rakoviny<sup>2</sup>. Oxidovaný guanin může být opraven celou škálou opravných enzymů z rodiny DNA glykosylas. V této práci jsme se zabývali mechanismem štěpení glykosidické vazby 8-oxoG enzymem hOGG1.

V současné době existují dvě krystalové struktury, které zachycují interakci hOGG1 a substrátu, DNA obsahující 8-oxoG. Na základě rozboru těchto struktur jsme metodami kvantové chemie studovali již dříve navržené reakční mechanismy a navrhli nový reakční mechanismus. V nově navrženém mechanismu, klíčové reziduum hOGG1, protonizovaný lysin 249, atakuje glykosidický dusík N9 oxidovaného guaninu. Dusík N9 má díky snížené aromaticitě 8-oxoG a zejména díky stabilizaci zajištěné enzymem hOGG1 schopnost interagovat s  $\text{NH}_3$  skupinou lysinu 249. Díky této koordinaci může dojít k energeticky výhodné substituci glykosidické vazby 8-oxoG za kovalentní N9-H vazbu v jediném reakčním kroku. Teoreticky vypočtená aktivační energie tohoto nově navrženého mechanismu<sup>3</sup> je v plném souladu s experimentálně naměřenou aktivační bariérou a v porovnání s ostatními konkurenčními mechanismy je energeticky nejméně náročná. Nový mechanismus využívá neplanarity glykosidického dusíku<sup>4</sup> 8-oxoG a tím nabízí nový pohled na mechanismy podobných enzymatických reakcí.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 13-27676S.

### LITERATURA

- Lindahl T., Wood R. D.: *Science* 286, 1897 (1999).
- Hainaut P., Hernandez T., Robinson A., Rodriguez-Tome P., Flores T., Hollstein M., Harris C. C., Montesano R.: *Nucl. Acids Res.* 26, 205 (1998).
- Šebera J., Trantírek L., Tanaka Y., Sychrovský V.: *J. Phys. Chem. B* 116, 12535 (2012).
- Sychrovský V., Foldynová-Trantírková S., Špačková N., Robeyns K., Van Meervelt L., Blankenfeldt W., Vokáčová Z., Šponer J., Trantírek L.: *Nucl. Acids Res.* 37, 7321 (2009).

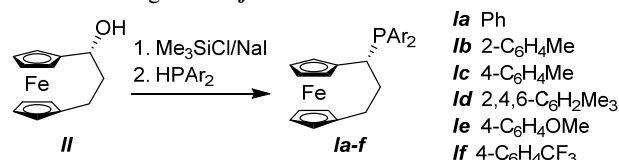
## SYNTÉZA, MOLEKULOVÁ STRUKTURA A KATALYTICKÉ VLASTNOSTI ASYMETRICKÝCH FERROCENOFANOVÝCH FOSFINŮ

**KAREL ŠKOCH, IVANA CÍSAŘOVÁ, PETR  
ŠTĚPNÍČKA\***

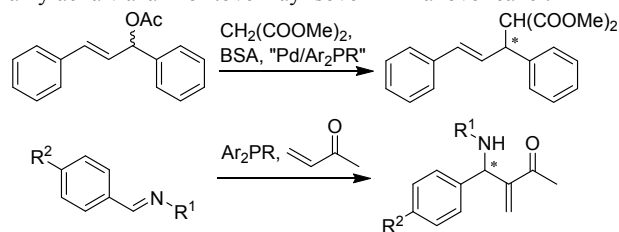
*Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2  
karel.skoch@natur.cuni.cz*

Chirální fosfinoferrocenové ligandy byly již mnohokrát úspěšně použity v asymetrické katalýze. Jejich úspěch stimuloval vývoj nových ferrocenových fosfinů<sup>1</sup> a to včetně derivátů přemostěných ferrocenů, tzv. ferrocenofanů. Ačkoliv již byla připravena ferrocenfanová analoga úspěšných ligandů<sup>2</sup>, dosud nebyla věnována pozornost ligandům obsahující asymetrický uhlík jako jediný prvek chiralit.

Pro přípravu monodentátních fosfinoferrocenofanů **Ia-f** se jevila nejsnazší „one-pot“ reakce synteticky dostupného<sup>3</sup> chirálního alkoholu **II** s odpovídajícím diarylfosfinem<sup>4</sup>. Při zachování konfigurace stereogenního centra tato reakce poskytuje vysoké výtěžky pro celou řadu diarylfosfinů a byla využita k přípravě série šesti elektronově i stericky odlišných C-chirálních ligandů **Ia-f**.



Koordinace vlastnosti nových fosfinů byly studovány v modelových reakcích **Ia** s ionty palladnatými a ligandy byly testovány ve dvou typově odlišných katalytických reakcích: v palladiem katalyzované asymetrické allylové alkylyci a v aza-Moritově-Baylisově-Hillmanově reakci.



*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR P207/10/0176.*

### LITERATURA

- Gomés Arrayás R., Adrio J., Carretero J. C.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 7674 (2006).
- (a) Kutschera G., Kratky C., Weissensteiner W., Widham M.: *J. Organomet. Chem.* 508, 195 (1996). (b) Liptau P., Seki T., Kehr G., Abele A., Fröhlich R., Erker G., Grimme S.: *Organometallics* 22, 2226 (2003).
- Cayuela E. M., Xiao L., Sturm T., Manzano B. R., Jalon F. A., Weissensteiner W.: *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 861 (2000).
- Šebesta R., Toma Š., Sališová M.: *Eur. J. Org. Chem.* 692 (2002).

## NANODIAMANTY JAKO CÍLENÉ FLUORESCENČNÍ ZNAČKY

**JITKA ŠLEGEROVÁ<sup>a,b,\*</sup>, IVAN ŘEHOŘ<sup>a</sup>, PAVEL  
ŠÁCHA<sup>a</sup>, JAN RICHTER<sup>c</sup>, PETR CÍGLER<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Katedra biochemie PŘF UK v Praze, 128 43 Praha 2; <sup>c</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., 142 20 Praha 4; slegerova@uochb.cas.cz*

Fluorescenční nanodiamanty jsou zajímavou alternativou k dosud používaným fluorescenčním značkám. Mezi jejich nejvýznamnější výhody patří extrémně stabilní fluorescence nepodléhající fotodestrukcí (jevu typickému pro organická barviva a biologické fluorofory) a blikání (charakteristickému pro kvantové tečky). Velmi významnou vlastností nanodiamantů, kterou kvantové tečky postrádají, je biokompatibilita a nízká toxicita, umožňující používání nanodiamantů pro biologické aplikace. Cílem této práce je efektivně připojit na povrch nanodiamantů biomolekuly schopné cílení rakovinných buněk a tím i jejich vizualizace. Imobilizací více cílících biomolekul na povrchu nanodiamantu dochází v důsledku jevu multivalence k mnohonásobnému zvýšení afinity k buněčnému receptoru a tedy k zesílení interakce biomolekul s rakovinnou buňkou. Pro snadnější a účinnější funkcionalizaci povrchu byly nanodiamanty dekorovány vrstvou zesíťovaného silikagelu a hydrofilního polymeru. U takto funkcionalizovaných nanodiamantů byly dosaženy klíčové vlastnosti pro bioaplikace, jako je koloidní stálost v prostředí s iontovou silou, protein rezistentní povrchu, zúžení distribuce velikosti částic či zlepšení jejich kulatosti. Pro připojení biomolekul na povrch byla použita alkyn-azid cykloadice katalyzovaná měďnými ionty. Biomolekuly i povrch nanodiamantu byly proto funkcionalizovány buď alkynovými nebo azidovými skupinami. Internalizace konjugátů fluorescenčních nanodiamantů s cílícími molekulami (transferinem a ligandy glutamát karboxypeptidasy II) do rakovinných buněk byla poté pozorována pomocí konfokální mikroskopie. Práce představuje integrovaný přístup k biokompatibilizaci a cílení anorganických fluorescenčních částic: struktura vytvořená na jejich povrchu transformuje koloidně nestabilní struktury na biokompatibilní platformu vhodnou pro biokonjugace a následné selektivní cílení.

## STUDIUM STRUKTURNĚ-FUNKČNÍHO MECHANISMU LIDSKÉHO REGULAČNÍHO PROTEINU 14-3-3 $\zeta$

**RENATA ŠNAJDROVÁ<sup>a,b</sup>, TOMÁŠ JEČMEN<sup>a,b</sup>, TOMÁŠ OBŠIL<sup>b</sup>, MIROSLAV ŠULC<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha,

<sup>b</sup>Univerzita Karlova, Hlavova 8, Praha

snajdrova@biomed.cas.cz

Proteiny rodiny 14-3-3 se účastní regulace celé řady buněčných procesů: mimo jiné buněčné signalizace, apoptózy nebo suprese nádorového bujení. Jedná se o konzervované molekuly exprimované ve všech eukaryotních buňkách. Jejich všestrannost tkví ve schopnosti vázat a ovlivňovat aktivitu řady funkčně velmi rozdílných substrátových proteinů. Jedním z předpokládaných regulačních mechanismů je tvorba homodimerního komplexu následovaná vazbou a modulací aktivity fosforylovaného substrátu/proteinu. Ačkoli se jejich studiu z pochopitelných důvodů věnuje velká pozornost, podstata strukturního mechanismu funkce proteinů 14-3-3 není dosud zcela odhalena.

Projekt je zaměřen na strukturně-funkční studium modelové lidské isoformy 14-3-3 $\zeta$  s cílem objasnit roli flexibilních částí v mechanismu interakce a vazby studovaných proteinů. Metodicky je využita kombinace hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS), síťovacích technik (chemického síťování pomocí EDC karbodiimidu nebo pomocí fotoaktivovaných proteinových nanosond) a H/D výměny. Nová a unikátní metoda fotoaktivovaných proteinových nanosond je založena na inkorporaci fotoaktivovatelného analogu Met přímo do sekvence studovaného proteinu, který po fotolýze napadá jakýkoli aminokyselinový zbytek v blízkém okolí za vzniku kovalentní vazby. Vzniklé cross-linky jsou pak identifikovány pomocí MS s vysokým rozlišením a tandemové MS/MS a získaná data jsou s využitím 3D *in silico* modelování převedena do popsáných rentgenostrukturních dat proteinu 14-3-3 $\zeta$ .

Potvrdili jsme, že mutant 14-3-3 $\zeta$ Ser58Asp (simulující monomerní formu fosforylovaného 14-3-3 v této pozici) zůstává ve formě monomeru. Výsledky s homodimerním 14-3-3 $\zeta$  ukázaly ve shodě s předchozími studiemi, že N-terminální část jedné podjednotky je v interakci s druhou podjednotkou přes helixy  $\alpha C'$  a  $\alpha D'$  společně s flexibilní smyčkou C/D. Dále bylo zjištěno, že k interakci mezi dvěma monomery 14-3-3 $\zeta$  rovněž přispívají nově nalezené iontové páry spojující Glu81 s Lys8 nebo s N-terminální aminokupinou<sup>1</sup>.

Získané výsledky potvrdily využitelnost zvoleného postupu k zachycení interakcí a strukturních mechanismů proteinu 14-3-3 $\zeta$  v homo či heterodimerních komplexech s vazebnými partnery.

*Tato práce vznikla za podpory GA ČR (P207/12/0627), projektu UK (UNCE 204025/2012) a GA UK.*

### LITERATURA

- Haladová K., Mrázek H., Ječmen T., Halada P., Man P., Novák P., Chmelík J., Obšil T., Šulc M.: *J. Struct. Biol.* 179, 10 (2012).

## PORUŠENÁ FUNKCE INSULINOVÉ SIGNALIZAČNÍ KASKÁDY A ZVÝŠENÁ PATOLOGICKÁ FOSFORYLACE PROTEINU Tau V HIPOKAMPU STARÝCH fa/fa (ZUCKER) POTKANŮ

**ANDREA ŠPOLCOVÁ<sup>a</sup>, BARBORA MIKULÁŠKOVÁ<sup>b</sup>, KATARÍNA KRŠKOVÁ<sup>b</sup>, LUCIA GAJDOŠECHOVÁ<sup>b</sup>, ŠTEFAN ZÓRAD<sup>b</sup>, RAFAL OLSZANECKI<sup>c</sup>, LENKA MALETÍNSKÁ<sup>a</sup>, BLANKA ŽELEZNÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 166 10

Praha 6; <sup>b</sup>Ústav experimentální endokrinologie SAV, 833 06

Bratislava; <sup>c</sup>Jagellonská univerzita, Ul. Golebia 24, Krakov,

310 07, Polsko

spolcova@uochb.cas.cz

Alzheimerova nemoc (AN) je neurodegenerativní onemocnění mozku, které je nejčastější příčinou vzniku demence. Mezi závažné rizikové faktory ovlivňující rozvoj AN patří vysoký věk a diabetes mellitus druhého typu (DM2T)<sup>1</sup>. Nedávné studie prokázaly, že snížená funkce insulinové signalizační kaskády v centrální nervové soustavě vede k patologické fosforylaci proteinu Tau, který je důležitý pro stabilizaci struktury neuronů<sup>2</sup>.

V naší studii byla metodou Western blotu pomocí specifických protilátek sledována insulinová signalizační kaskáda a patologická fosforylace proteinu Tau v hipokampu mladých (stáří 12 týdnů) a starých (stáří 33 týdnů) fa/fa (Zucker) potkanů, kteří mají nefunkční leptinový receptor, což vede k rozvoji obezity a insulinové rezistence.

V porovnání s mladými potkany docházelo u starých fa/fa potkanů, i starých štíhlých kontrolních jedinců, ke snížení fosforylace proteinů insulinové signalizační kaskády: PDK1 (fosfoinositid-dependentní proteinkinasa-1, Ser214), Akt (proteinkinasa B, PKB, Ser473) a GSK-3 $\beta$  (glykogen syntasa kinasa-3 $\beta$ , Ser9). Fosforylace Ser9 inhibuje kinasovou aktivitu GSK-3 $\beta$ . Je-li fosforylace na Ser9 snížena, aktivita GSK-3 $\beta$ , jedné z hlavních kinas proteinu Tau, se zvýší<sup>3</sup>. V důsledku snížení fosforylace Ser9 v GSK-3 $\beta$  došlo ke zvýšení patologické fosforylace proteinu Tau (Ser396) u starých potkanů oproti mladým jedincům. U obézních fa/fa potkanů byla fosforylace Tau vyšší než u stejně starých štíhlých kontrol.

V této práci bylo prokázáno, že snížení funkce insulinové signalizační kaskády v hipokampu starých potkanů, obézních fa/fa i štíhlých kontrol, vede k patologické fosforylaci proteinu Tau. Jelikož hladina glukosy v krvi u starých fa/fa potkanů byla jen mírně zvýšená, zdá se, že patologická fosforylace proteinu Tau nastává už při prediabetickém stavu insulinové rezistence bez hyperglykémie. Přesný mechanismus a úloha leptinu však musí být dále prozkoumány.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GACR P303/12/0576 a RVO:61388963 (Česká republika), VEGA 2/0089/11 (Slovensko) a 803/N-Słowacja/2010/0 (Polsko).*

### LITERATURA

- Liu Y., Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Gong C-X.: *J. Pathol.* 225, 54 (2011).

- Deng Y., Li B., Liu Y., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Gong C.-X.: *Am. J. Pathol.* 175, 2089 (2009).
- Takashima A.: *J. Alzheimers Dis.* 9 (3 Suppl), 309 (2006).

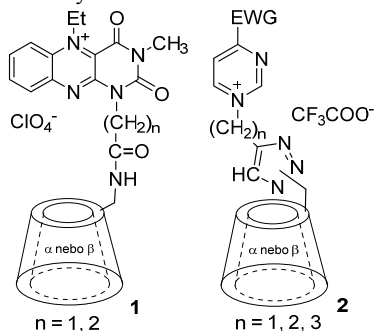
## SUPRAMOLEKULÁRNÍ KATALYZÁTORY STEREOSELEKTIVNÍCH OXIDACÍ NA BÁZI KONJUGÁTŮ CYKLODEXTRINU S HETEROARENIOVÝMI SOLEMI

**JIŘÍ ŠTURALA, RADEK CIBULKA**

*Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28  
Praha 6  
jiri.sturala@vscht.cz*

Flavin-cyklohextrinové konjugáty **1** představují jedny z dosud neúčinnějších organokatalyzátorů enantioselektivních oxidací sulfidů na sulfoxidy peroxidem vodíku. Vysoká enantioselektivita je zajištěna přítomností cyklohextrinu, který je schopen komplexovat lipofilní substrát ve své kavitě. I když jsou flavinové katalyzátory účinné, jejich syntéza je relativně obtížná a stabilita nízká. Formálním zjednodušením flavinového skeletu dojdeme k diaziniovým solím, které se také ukázaly být účinnými katalyzátory oxidací peroxidem vodíku. Pyraziniové<sup>2</sup> a hlavně pyrimidiniové soli jsou jednoduché na syntézu a mají vysokou stabilitu při zachování vlastností flavinových katalyzátorů.

Na základě poznatků o vysoké účinnosti pyrimidiniových solí při katalýze oxidací jsme navrhli katalyzátory **2**, které by byly dostupnější a stabilnější oproti flavinovým analogům **1**. Dalším rozdílem je připojení cyklohextrinové jednotky k redox-aktivnímu centru pomocí „click chemistry“.



Flavin-cyklohextrinové a Pyrimidin-cyklohextrinové konjugáty

V prezentaci bude ukázáno studium reaktivity substituovaných pyrimidiniových solí a její porovnání s dosud používanými flaviniovými a pyraziniovými solemi. U pyrimidiniových solí byla studována kinetika oxidace modelového substrátu – thioanisolu, schopnost tvořit adukty s nukleofily a elektrochemické vlastnosti v závislosti na pozici a typu substituentu na pyrimidiniovém jádře. Rychlostní konstanty a půlvalné potenciály byly použity ke konstrukci Hammettovských závislostí. Dále byla studována metodika připojení pyrimidiniových solí k modelovým azidům prostřednictvím „click chemistry“.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/12/0447.*

## LITERATURA

- Mojr V., Buděšínský M., Cibulka R., Kraus T.: *Org. Biomol. Chem.* 9, 7318 (2011).
- Kafka F., Cibulka R., Dvořáková H., Gunnoo S., Měnová P., Šanda M.: *Adv. Synth. Catal.* 353, 865 (2011).

## REDOXNÍ STAV CENTRÁLNÍCH DOMÉN PROTEINŮ p63 A p73 REGULUJE SEKVENČNĚ SPECIFICKOU VAZBU

**VLASTIMIL TICHÝ, LUCIE NAVRÁTILOVÁ,  
MATEJ ADÁMIK, MARIE BRÁZDOVÁ**

*Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65  
Brno  
vlastik@ibp.cz*

Proteiny rodiny p53 jsou známy především pro jejich úlohu při prevenci karcinogeneze, avšak proteiny p63 a p73 hrají významnou roli také ve vývoji a diferenciaci<sup>1,2</sup>. Při odpovědi buňky na stres vyvolaný změnou redoxního stavu dochází k oxidaci transkripčního faktoru p53. Oxidace jeho centrální vazebné domény (DBD), která je mezi členy rodiny p53 strukturálně i sekvenčně vysoce homologní, ovlivňuje mezi jinými sekvenčně specifickou vazbu na DNA<sup>3,4</sup>. Centrální doména proteinu p53 obsahuje evolučně konzervované cysteiny, přičemž tři z nich se podílí na koordinaci zinečnatého iontu. Oxidace těchto cysteinů znemožňuje vazbu zinku, což následně způsobuje konformační změny a ztrátu DNA vazebné schopnosti proteinu<sup>5</sup>. Proteiny p63 a p73 mají také svou úlohu v p53 aktivovaných drahách při odpovědi na stres. Díky strukturální a sekvenční podobnosti rozpoznávají vazebné elementy proteinu p53, ale také svá unikátní vazebná místa. Vliv změny redoxního stavu na vazebné vlastnosti proteinů p63 a p73 však dosud nebyl popsán.

V naší práci porovnáváme vliv oxidace centrálních domén proteinů p53, p63 a p73 na jejich sekvenčně specifickou vazbu. Změna redoxního stavu vyvolaná oxidačním činidlem diamidem inhibovala u všech proteinů vazbu k sekvenci typické pro p53 (p53CON). Zjistili jsme, že samotná interakce proteinů s DNA stejně jako přidávek zinečnatých iontů má ochranný účinek před následnou oxidací. Dále byla prokázána možnost částečné reverzibility oxidace u všech vazebných domén, nejnárodněji u proteinu p63.

*Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR P301/10/2370 a 13-36108S.*

## LITERATURA

- Mills A. A., Zheng B., Wang X. J., Vogel H., Roop D. R., Bradley A.: *Nature* 398, 708 (1999).
- Pozniak C. D., Radinovic S., Yang A., McKeon F., Kaplan D. R., Miller F. D.: *Science* 289, 304 (2000).

- Fojta M., Kubiarova T., Vojtesek B., Palecek E.: J. Biol. Chem. 274, 25749 (1999).
- Klein C., Georges G., Kunkele K. P., Huber R., Engh R. A., Hansen S.: J. Biol. Chem. 276, 37390 (2001).
- Cho Y., Gorina S., Jeffrey P. D., Pavletich N. P.: Science 265, 346 (1994).

## IZOFORMY MYOZINU 1C V BUNKOVOM JADRE A ICH VZÁJOMNÉ VZŤAHY

**TOMÁŠ VENIT\***, RASTISLAV DZIJK, ALŽBĚTA KALEDOVÁ, JANA ROHOŽKOVÁ, PAVEL HOZÁK

*Oddelení biologie buněčného jádra, Ústav molekulární genetiky, AVČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
Tomas.Venit@img.cas.cz*

Jadrový myozín I (NM1) je izoformou cytoplazmatického myozínu 1C a vzniká alternatívnym štartom transkripcie z Myo1c génu, pričom na N-terminálnom konci molekuly obsahuje 16 aminokyselín navyše oproti Myo1c proteínu. Predošlé štúdie odhalili rolu NM1 v transkripcii prostredníctvom RNA Polymerázy I a II, v prestavbe chromatinu a v pohybe chromozómov. Prvých 16 aminokyselín, ktoré sú špecifické pre NM1, boli považované za jadrový lokalizačný signál, ktorý smeruje NM1 do jadra. Štúdiom delečných mutantov sme objavili, že jadrový lokalizačný signál sa nachádza v strednej časti molekuly a preto je spoločný pre obe izoformy Myo1c proteínu.

Za účelom lepšieho pochopenia funkcií NM1 sme pripravili génový knock-out tohto proteínu bez zmeny expície cytoplazmatického Myo1c proteínu. Po širokosiahlej fenotypizácii sme prekvapivo nenašli žiaden zjavný fenotyp súvisiaci s popísanými funkciami NM1 v bunkovom jadre. Naproti tomu, sme objavili zmenu v minerálnej hustote kostného tkaniva a v počte a veľkosti červených krviniek u mutantných myši. Tieto zmeny však nesúvisia s jadrovými procesmi ale naopak poukazujú na doteraz nepreskúmanú funkciu NM1 proteínu v cytoplazme.

Otázkou ostáva, ako je možné, že mutantné myši prežívajú napriek potrebe NM1 v procese transkripcie. Keďže sme dokázali, že cytoplazmatický Myo1c je schopný presunu do jadra rovnakým spôsobom ako NM1, testovali sme jeho schopnosť nahradiť NM1 v procese transkripcie. V U2OS bunkách s redukovanou expresiou oboch izoform a následným exprimovaním exogénneho Myo1c proteínu sme merali mieru RNA Pol I transkripcie a zistili, že exogénne exprimovaný Myo1c proteín dokáže funkčne nahradiť NM1 proteín. Zároveň sme dokázali, že Myo1c sa viaže na CTD doménu RNA polymerázy II a dá sa predpokladať, že bude plniť rovnakú funkciu ako NM1 i v transkripcii prostredníctvom tejto polymerázy. Nakoniec sme merali celkovú distribúciu oboch izoform v jadre a v cytoplazme a mieru expície Myo1c u NM1 mutantných myši. Distribúcia oboch izoform je porovnateľná a delécia NM1 génu nevedie k nadmernej expresii Myo1c proteínu. Preto predpokladáme, že výskyt oboch izoform v bunkovom jadre je nadbytočný a obe izoformy sa v procese transkripcie vzájomne nahrádzajú.

*Táto práca vznikla za podpory grantov z GAČR 204/09/4048 a P305/11/2232, z TAČR TE01010118, z MŠMT LH12143, inštitucionálneho grantu AV0Z50520514 a grantu GAUK 253189.*

## AMELOBLASTIN, VNITRŇNĚ NESTRUKTUROVANÝ PROTEIN SKLOVINY, TVORÍ NADMOLEKULÁRNÍ STRUKTURY PŘES KRÁTKÝ N-TERMINÁLNÍ SEGMENT KÓDOVANÝ EXONEM 5

**TOMÁŠ WALD**, ADRIANA OSIČKOVÁ, MIROSLAV ŠULC, OLDŘICH BENADA, ALENA SEMERÁDTOVÁ, LENKA ŘEŽÁBKOVÁ, VÁCLAV VEVERKA, LUCIE BEDNÁROVÁ, JAN MALÝ, PAVEL MACEK, PETER ŠEBO, IVAN SLABÝ, JIŘÍ VONDRÁŠEK, RADIM OSIČKA\*

*Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha  
wald@biomed.cas.cz*

Vývoj zubní skloviny, nejtvrđší substance živého organismu, je zajišťována evolučně velmi konzervovaným procesem biomineralizace a kontrolována extracelulárními matrixovými proteiny. Vnitřně nestrukturovaný matrixový protein ameloblastin (AMBN) je nejvíce zastoupeným ne-amelogeninovým proteinem vyvíjející se skloviny. Pomocí transgenů myši, která exprimovala AMBN zkrácený o segment kódovaný exony 5 a 6 (AMBN $\Delta$ 5-6) bylo ukázáno, že AMBN je zásadním elementem pro správný vývoj zubní skloviny. Navíc bylo ukázáno, že by AMBN mohl být adhezivní molekulou regulující diferenciaci a proliferaci ameloblastů. Vzhledem k obtížím přípravy rekombinantního AMBN dosud chybí detailní strukturní a funkční studie tohoto proteinu.

V této práci jsme vytvořili protokol pro produkci vysoce čistého nedegradovaného lidského AMBN v množstvích, která umožňují strukturně tento protein charakterizovat. Pomocí gelové permeační chromatografie, analytické ultracentrifugace, transmisní elektronové mikroskopie a mikroskopie atomárních sil ukazujeme, že AMBN asociuje do nadmolekulárních struktur tvaru stučky s průměrnou výškou 0,18 nm a šířkou 18 nm. Tyto nadmolekulární struktury vykazovaly různou délku v rozmezí desítek až stovek nanometrů. Následně provedená deleční analýza a NMR spektroskopie ukazuje, že AMBN tvoří nadmolekulární struktury přes krátký N-terminální segment kódovaný exonem 5. Tento segment obsahuje dvě nezávisle strukturované oblasti.

Námi prezentovaná data mohou vysvětlit fenotyp pozorovaný u mutantní myši exprimující AMBN $\Delta$ 5-6, u níž nedocházelo k tvorbě správně orientované skloviny.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR P302/10/0427.*



## REJSTRÍK AUTORŮ

Aćimović, Ivana	417	Hajdúch, Marián	405, 435
Adámik, Matěj	441	Halička, Juraj	413
Adkins, Irena	422	Haluzík, Martin	414
Agrawal, Khushboo	405	Hároníková, Lucia	412
Al-Anshori, Jamaludin	438	Hatok, Jozef	413, 420
Amman, Fabian	405	Havličková, Jana	409, 423
Andrisano, Vincenza	414	Havlík, Jan	413
Antony, Lovely A. P.	438	Hermann, Petr	409, 423, 431
Arlt, Volker M.	405	Hocek, Michal	410
Bálek, Lukáš	417	Hodek, Petr	416, 421
Bañasová, Lenka	419	Holčáková, Jitka	420
Bánovčín, Peter	413	Holm, Anders	409
Bárta, František	405	Holubová, Martina	414
Bartošová, Zdenka	436	Holý, Antonín	434
Bednářová, Lucie	429, 442	Horn, Martin	411
Beier, Petr	430	Hot, David	405
Benada, Oldřich	442	Hozák, Pavel	442
Bibová, Ilona	405	Hraběta, Jan	412
Bouřa, Evžen	406	Hrušák, Ondřej	409
Brázda, Václav	407, 412	Hubálková, Pavla	430
Brázdová, Marie	441	Hudecová, Soňa	426
Brázdová-Jagelská, Eva	407	Hudeček, Jiří	421
Brynda, Jiří	421	Hylse, Ondřej	425
Březinová, Anna	434	Chlebek, Jakub	414
Buček, Aleš	407	Ilík, Petr	428
Bučko, Marek	436	Jaglic, Z.	427
Budešínský, Miloš	427	Jahn, Ullrich	407, 435
Burketová, Lenka	414	Jakl, Michal	415
Caffrey, Conor R.	411	Jaklová Dytrová, Jana	415
Čagalínek, Michal	416	Janda, Martin	415
Čahlíková, Lucie	414	Jansa, Petr	434
Čahlíková, Romana	424	Janšáková, Katarína	419
Celec, Peter	419	Jašková, Katarína	416
Cervinkova, D.	427	Ječmen, Tomáš	416, 421, 440
Cibulka, Radek	441	Jelínková, Šárka	417
Cigler, Petr	413, 439	Jendelová, Pavla	434
Císařová, Ivana	423, 439	Jilková, Adéla	411
Coates, Philip J.	420	Jindřichová, Marie	418
Coufal, Jan	407	Jiráček, Jiří	427
Coufal, Radek	408	Jirák, Daniel	423, 434
Csaderová, Lucia	426	Jirsová, Kateřina	410
Čechová, Lucie	434	Jurkovičová, Dana	416
Čejková, Jitka	408	Kalašová, Šárka	410
Čermák, Jaroslav	433	Kalendová, Alžběta	442
Černá, Daniela	409	Kalina, Tomáš	409
Černá, Věra	416, 421	Kamodyová, Natália	419
Černý, Jan	434	Kanderová, Veronika	409
Černý, Ondřej	422	Katrlík, Jaroslav	436
Čeřovský, Václav	429	Kaválková, Petra	414
David, Tomáš	409	Kavan, Daniel	416
De Simone, Angela	414	Kavková, Eva	419
Divoká, Martina	433	Keidel, Kristina	405
Divoký, Vladimír	433	Klačanová, Katarína	420
Doubek, Michael	420	Křačanová, Katarína	433
Dračínský, Martin	434	Klán, Petr	438
Drahoňovský, Dušan	408	Klevcová, Petra	420
Đudáková, Ľubica	410	Kliková, Katarína	420
Dudová-Vychodilová, Zdenka	410	Kniežo, Ladislav	431
Dušenka, Róbert	413	Knopfová, Lucia	432
Dvořák, Jan	411	Knoppová, Barbora	424
Dvořák, Petr	417	Koberová, Monika	416, 421
Dzizjak, Rastislav	442	Koháryová, Michaela	421
Džubák, Petr	405, 435	Kollárik, Marián	413
Eckschlager, Tomáš	412	Kollárová, Marta	421
Elbert, Tomáš	427	Kollinerová, Soňa	422
Fajtová, Pavla	411	Komárek, Jan	419
Fehrentz, Jean-Alain	414	Kopečný, David	424
Filip, Jaroslav	411	Kosová, Martina	422
Fillerová, Regina	420	Kostov, Ondřej	423
Fišer, Jan	412	Kotek, Jan	409, 423, 431
Fišer, Karel	409	Kotora, Martin	428
Fišer, Radovan	422	Krejčí, Lumír	436
Fojta, Miroslav	407, 410	Krchňák, Viktor	437
Frei, Eva	405	Krchová, Tereza	423
Frydrych, Ivo	405, 435	Křižanová, Oľga	426
Füzik, Tibor	432	Kršková, Katarína	440
Gajdošechová, Lucia	440	Křečková, Pavlína	409
Gemeiner, Peter	436	Křupka, Michal	424
Grobarčíková, Svetlana	413	Kubíček, Vojtěch	409
Groh, Tomáš	412	Kubienová, Lucie	424

Kup, Tomáš	408	Rotrekl, Vladimír	417
Kuzyk, Pavlo	418	Rozycki, Bartosz	406
Lacinová, Lubica	416	Ruml, Tomáš	432
Lacinová, Zdena	414	Řehoř, Ivan	413, 434, 439
Leclerc, C.	437	Řehová, Lucie	435
Lenčešová, Eubomíra	426	Řehulka, Jiří	435
Levová, Kateřina	405	Řezáčová, Pavlína	421
Linhartová, I.	437	Řežábková, Lenka	442
Luhová, Lenka	424, 428	Sadilková, Lenka	422
Lukeš, Ivan	409, 434	Sedláčková, Hana	436
Lund-Johansen, Fridtjof	409	Semerádtová, Alena	442
Macáková, Kateřina	414	Schenkmyerová, Andrea	436
Macek, Pavel	442	Schmeiser, Heinz H.	405
Macek, Tomáš	412	Schütznerová, Eva	437
Machová, Iva	425	Slabý, Ivan	442
Maier, Lukáš	425	Slanina, Tomáš	438
Majlessi, L.	437	Slaninová, Jiřina	429
Maletínská, Lenka	414, 440	Snášel, Jan	425
Malý, Jan	442	Staněk, Ondřej	437
Mancini, Francesca	414	Stiborová, Marie	405, 412, 421
Mareš, Michael	411	Straka, Michal	415
Marková, Jana	426	Stuchlý, Jan	409
Marosevic, Durdica	427	Suková, Martina	433
Martinez, Jean	414	Surdeníková, Lenka	413
Mašek, Josef	424	Sverstad, Alexander	413
Mašín, Jiří	422	Sychrovský, Vladimír	438
Matoušková, Jindřiška	415	Šácha, Pavel	439
Mertlíková-Kaiserová, Helena	434	Šarek, Jan	435
Mikulášková, Barbora	440	Šašek, Vladimír	414
Mládková, Jana	427	Šebej, Peter	438
Modrianský, Martin	422	Šebela, Marek	424
Mojzík, Renáta	433	Šebera, Jakub	438
Monincová, Lenka	429	Šebesta, Petr	407
Moricová, Pavla	428	Šebo, Peter	405, 422, 437, 442
Motloch, Petr	428	Šefčovičová, Jana	411
Mrázek, František	420	Škoch, Karel	439
Müller, Pavel	438	Šlegerová, Jitka	439
Nagelová, Veronika	414	Šmarda, Jan	432
Navrátil, Tomáš	415	Šnajdrová, Renata	416, 440
Navrátilová, Lucie	441	Špaček, Jan	410
Navrátilová, Zdenka	420	Špolcová, Andrea	440
Nekulová, Marta	429	Štacko, Peter	438
Nešuta, Ondřej	429	Štefáníková, Andrea	420
Nosek, Vladimír	408	Štěpánek, František	408
Novák, Petr	416	Štěpnička, Petr	439
Nováková, Martina	412	Šturala, Jiří	441
Novotná, Jana	430	Šulc, Miroslav	416, 421, 440, 442
Obšil, Tomáš	440	Tanaka, Yoshiyuki	438
Oliver, Allen G.	437	Tereh, Tamás	417
Olszanecki, Rafał	440	Tichá, Tereza	424
Ondriaš, Karol	426	Tichý, Vlastimil	441
Opekar, Stanislav	430	Tkáč, Ján	411
Opletal, Lubomír	414	Tomala, Jakub	422
Oroszová, Beáta	431	Trantírek, Lukáš	438
Osička, Radim	442	Turánek, Jaroslav	424
Osičková, Adriana	442	Tylichová, Martina	424
Parkan, Kamil	431	Ulbrich, Pavel	432
Paruch, Kamil	425	Urban, Milan	435
Paúrová, Monika	431	Urbanová, Marie	430
Pavlovičová, Michaela	416	Váchová, Jana	411
Pěchoučková, Šárka	432	Valentová, Olga	415
Pekarčíková, Lucie	432	Valterová, Irena	407
Petřek, Martin	420	Vaněk, Václav	427
Petriválský, Marek	424, 428	Večerek, Branislav	405
Pichalová, Růžena	432	Venit, Tomáš	442
Pichová, Iva	407, 425	Veverka, Václav	442
Pilchová, Ivana	420, 433	Vítek, Antonín	420
Piterková, Jana	428	Vlkova, H.	427
Pivoňková, Hana	407, 410	Voburka, Zdeněk	429
Pohlová, Lenka	430	Vogel, Heiko	407
Poljaková, Jitka	412	Vojtěšek, Bořivoj	429
Pospíšilová, Dagmar	433	Vondrášek, Jiří	411, 442
Pospíšilová, Pavla	433	Vrbová, Miroslava	412
Prchalová, Darina	407	Wald, Tomáš	442
Procházková, Eliška	434	Wimmerová, Michaela	419
Procházková, Soňa	409	Wintner, Jürgen	438
Račay, Peter	420	Wirz, Jakob	438
Raindlová, Veronika	410	Wu, Weiwei	409
Raška, Milan	424	Zajíček, Jaroslav	437
Richter, Jan	439	Zemková, Hana	418
Rohožková, Jana	442	Zórad, Štefan	440
Rosenberg, Ivan	423	Železná, Blanka	414, 440