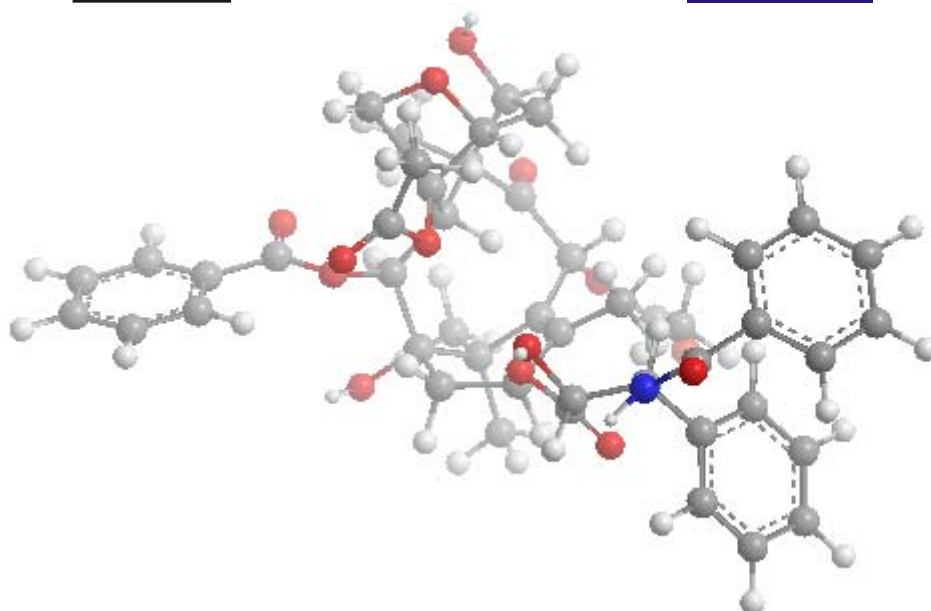




SIGMA-ALDRICH



IX. MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ
MLADÝCH BIOLOGŮ,
BIOCHEMIKŮ
A CHEMIKŮ
pořádané firmou Sigma-Aldrich

26.5. – 29.5. 2009

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali
Radmila Řápková, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

IX. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků z Čech a Slovenska

Globalizace nezadržitelně ovlivňuje náš život a je mnohými kritizována. Jsou však i pozitivní aspekty. Společnost Sigma-Aldrich, pečující o blaho chemiků tak, jak si kdysi předsevzal její zakladatel, pan doktor Alfred Bader, pečuje o toto blaho nejen v zemích Českých, ale i na Slovensku.

Budiž vzdána čest a poklona paní ředitelce Daniele Dornerové, která se rozhodla před cca třemi roky rozšířit úspěšnou a do značné míry i prestižní soutěž mladých chemiků, biochemiků a biologů ze zemí českých i na Slovensko. Mírné počáteční rozpaky se téměř okamžitě rozplynuly a dnes je tato soutěž Slovensko – Česká tak, jako by jí bývala od počátku věků.

Řekl jsem, že je to soutěž prestižní a mohu to doložit. Chemici z chemických společností okolních států slídí kolem a pátrají, jak by takovou soutěž mohli uspořádat i oni, za pomoci místních zastoupení firmy. Pokud se to povede, měla paní ředitelka a s ní i zosnovatel této akce, kolega Martin Fusek kdysi též vizi, že by mohlo vzniknout cosi jako mezinárodní finále. Pokud vznikne, klobouk dolů. A pokud se to nepovede, budeme mít v Čechách a na Slovensku stále naši „Ameriku“, akci, která získala toto kolokviální pojmenování po jednom z míst u Valašského Meziříčí, kde se konal jeden z prvních ročníků.

Americe zdar!

Pavel Drašar

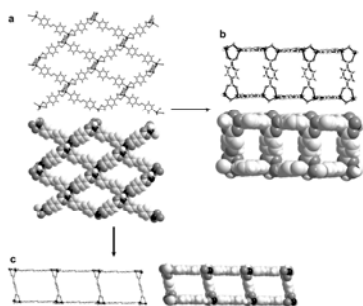
PRÍPRAVA, VLASTNOSTI A ŠTRUKTÚRA NOVÝCH
METAL-ORGANIC FRAMEWORKS NA BÁZE
4,4'-AZO(BIS)PYRIDÍNU

**MIROSLAV ALMÁŠI^{a*}, VLADIMÍR ZELENÁK^a,
ZUZANA VARGOVÁ^a a IVANA CÍSAŘOVÁ^b**

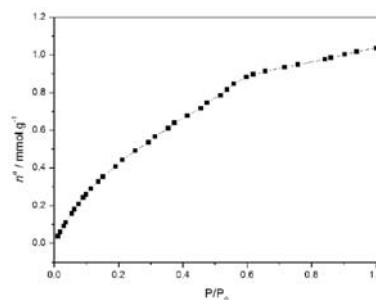
^aKatedra anorganickej chémie, Prírodovedecká fakulta
UPJŠ, Moyzesova 11, 041 54 Košice, Slovensko, ^bKatedra
anorganické chemie, Prírodovedecká fakulta UK, Praha,
Česká republika
almo2@szm.sk

Príprava, štúdium vlastností a aplikácii zlúčenín typu metal-organic frameworks (MOF) je jednou z veľmi perspektívnych oblastí dnešnej materiálovej a anorganickej chémie. MOF sa skúmajú z hľadiska možného použitia ako nosičov liečiv, katalyzátorov alebo účinných sorbentov pre záchyt a uskladnenie technologicky dôležitých plynov. Klasické MOF, napríklad zlúčeniny MOF-5 alebo MIL-101, obsahujú ako základné stavebné jednotky kation kovu a 1,4-benzéndikarboxylát (BDC) alebo 1,3,5-benzéntrikarboxylát (BTC) ako náboj kompenzujúci anión. V našej práci sme pri syntéze zlúčenín používali okrem týchto stavebných jednotiek aj 4,4'-azo(bis)pyridín (AZPY) ako neutrálny mostíkový ligand (linker).

Pri syntéze zlúčenín sme použili difúzne techniky s využitím semipermeabilnej membrány ako aj hydrotermálne syntézy v autoklávach. Použitím týchto techník sme pripravili nové zlúčeniny zloženia $\{[\text{Zn}(\text{AZPY})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{BDC})\cdot\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**I**), $\{[\text{Zn}(\text{AZPY})(1,4\text{-BDC})]\}_n$ (**II**), $\{[\text{Zn}_2(\text{OH})(\text{AZPY})(1,4\text{-BDC})_{1.5}]\cdot\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**III**) (Obr.1), $\{[\text{Zn}_3(\text{AZPY})_2(\text{BTC})_2(\text{H}_2\text{O})_6]\cdot 14\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**IV**), $\{[\text{Cu}(\text{AZPY})(\text{HBTC})(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{AZPY}\}_n$ (**V**). Pripravené zlúčeniny boli charakterizované štruktúrne použitím rtg. monokryštálovej štruktúrnej analýzy ako aj bežnými fyzikálnochemickými metódami. U zlúčeniny **III**, ktorá vo svojej štruktúre obsahuje dutiny a otvorené kanály sme študovali sorpciu oxidu uhličitého volumetrickou metódou (obr. 2). Sorpčná kapacita oxidu uhličitého, stanovená pri teplote 273 K a odčítaná pri hodnote relatívneho tlaku $P/P_0=0.9$ bola 1.04 mmol/g.



Obr. 1. Štruktúra $\{[\text{Zn}_2(\text{OH})(\text{AZPY})(1,4\text{-BDC})_{1.5}]\cdot\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**III**)



Obr. 2. Štúdium sorpcie oxidu uhličitého na **III**

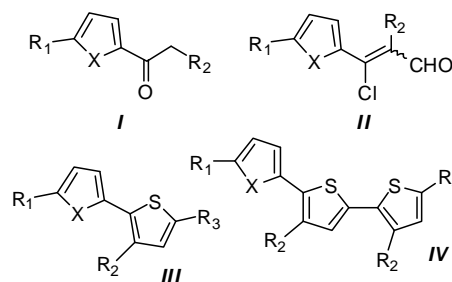
Táto práca bola podporovaná STREP projektom 6. RP “DeSANNs” (č. FP6-SES6-020133), Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. RPEU-0027-06 (OrNaMat) a projektom VEGA MŠ SR (č. 1/0119/08).

SYNÉZA π -KONJUGOVANÝCH
OLIGOETEROCYKLOV S VYSOKÝM STUPŇOM
ŠTRUKTURÁLNEJ HOMOGENITY

ANITA ANDICSOVÁ a DANIEL VÉGH

Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Oddelenie organickej chémie,
Radlinského 9, SK-812 37 Bratislava
anita.andics@gmail.com

V súčasnosti je veľký záujem o funkcionalizované oligo- a polyheterocykly s vysokým stupňom štruktúrnej homogenity, ktoré sa vyznačujú nekonvenčnými elektrickými, optickými a magnetickými vlastnosťami. Design π -konjugovaných oligoheterocyklov s vysokým stupňom homogenity je prednostne založený na „stepwise“ koncepcii¹. Perspektívnou reakciou syntézy prekursorov takýchto látok je Vilsmeierova formylácia.



$R_1 = \text{H, Cl, CH}_3, \text{fluorene}; R_2 = \text{H, CH}_3, \text{CN};$
 $R_3 = \text{COOCH}_3, \text{H}; X = \text{CH=CH, S, N-CH}_3$

V trojstupňovej syntéze je prvým krokom príprava enolizovateľných karbonylových zlúčenín **I** acetyláciou. Druhým krokom je Vilsmeierova-Hackova-Arnoldova reakcia², kde izolovaným produktom je β -chlór akroleín **II**, ktorý v ďalšom stupni cyklizuje na substituovaný tiofén **III**. K pripravenému diméru **III** sa po opakovanom použití

popísaných krokov prisyntetizuje ďalší kruh, teda sa získava oligoheterocyklus s vysokým stupňom homogenity **IV**.

Syntézou nových heterocyklických zlúčenín s presne definovanou štruktúrou sa získavajú nové materiály využiteľné v elektrotechnike, optoelektronike, nanotechnológiách.

Táto práca vznikla za podpory grantu: VEGA 1/4453/07.

LIETRATÚRA

- Müllen K., Wegner G.: v knihe *Electronic Materials: The Oligomer Approach*, Wiley-VCH, New York 1998.
- Arnold Z., Žemlička J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 24, 2385 (1959).

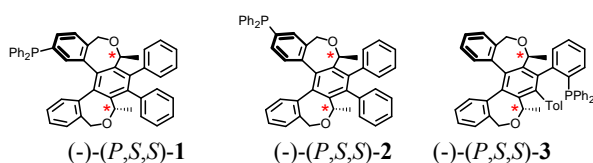
PŘÍPRAVA FOSFINOVÝCH LIGANDŮ S HELIKÁLNÍ CHIRALITOU PRO APLIKACE V ASYMETRICKÉ KATALÝZE

ANGELINA ANDRONOVA, IRENA G. STARÁ*
a **IVO STARÝ***

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

Funkcionalizované neracemické helicity se jeví jako slibné ligandy pro použití v různých enantioselektivních reakcích katalyzovaných komplexy tranzitních kovů. V naší laboratoři byla vyvinuta diastereoselektivní syntéza helicity, inherentně chirálních trojrozměrných struktur, založená na [2+2+2] cyklotrimerizaci umožňující připravit tyto látky v preparativním měřítku a ve vysoké optické čistotě^{1,2}.

Byl vypracován jednoduchý a modulární syntetický přístup vedoucí k pentacyklickým helickým fosfinům (-)-(P,S,S)-**1**, (-)-(P,S,S)-**2** a (-)-(P,S,S)-**3**. Klíčová cykloisomerizace příslušných trienů za katalýzy CpCo(CO)₂ probíhá ve vysokém výtěžku a s vynikající diastereoselektivitou (> 99 % *de*).



V příspěvku bude podrobně diskutována optimalizace cyklotrimerizačních reakcí trienů i finální transformace na difenylfosfinoderiváty. Rovněž budou zmíněny aplikace takto připravených chirálních P-ligandů v enantioselektivní katalýze.

Podporováno Grantovou agenturou ČR (reg.č. 203/07/1664 a 203/09/1766) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumné centrum: Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg.č. LC512).

LITERATURA

- Starý I., Stará I. G., Alexandrová Z., Sehnal P., Teplý F., Šaman D., Rulíšek L.: *Pure Appl. Chem.* 78, 495 (2006).

- Sehnal P., Krausová Z., Teplý F., Stará I. G., Starý I., Rulíšek L., Šaman D., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 73, 2074 (2008).

OXIDAČNÝ STRES A POLYMORFIZMUS GLUTATIÓN-S-TRANSFERÁZY U ASTMY BRONCHIALE

EVA BABUŠÍKOVÁ^a, MILOŠ JESEŇÁK^b, JOZEF HATOK^a, JANA JUREČEKOVÁ^a, PETER BÁNOVČIN^b a DUŠAN DOBROTA^a

Univerzita Komenského v Bratislave, ^aÚstav lekárskej biochemie, ^bKlinika detí a dorastu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovensko
babusikova@jfmed.uniba.sk

Astma bronchiálne (AB) je komplexné zápalové ochorenie dýchacích ciest, ktoré spôsobuje variabilnú obštrukciu dýchacích ciest so spontánnou reverzibilitou a so zvýšenou vnímavosťou dýchacích ciest na podnety vonkajšieho prostredia. Prominentnými príznakmi AB sú kašeľ, pískot, dyspnoe a pocity napätia v hrudníku. Mnohé štúdie naznačujú, že dôležitým činiteľom sú genetické faktory. Vzťah medzi génmi na chromozómoch 5, 11 a 13 z hľadiska priority defektu vo vzťahu k dedičnosti AB je stále neobjasnený. Astma však nie je jednoduchá genetická abnormalita, ale zložitá multigenetické ochorenie so silným vplyvom prostredia. Ukazuje sa, že oxidačný stres a produkcia reaktívnych foriem kyslíka (ROS) majú dôležitú úlohu v patogenéze AB. Vyššie eukaryotické organizmy nemôžu existovať bez kyslíka, pretože mnohé esenciálne vnútrobunkové reakcie, v ktorých je potrebný kyslík, tvoria ROS. Toxicite spojenej s neprimeranou produkciou týchto zlúčenín sa predchádza antioxidantnými obrannými systémami, ktoré poskytujú zdravé bunkové prostredie. Oxidačné vzplanutie je pri astme výsledkom mnohých nešpecifických zápalových ciest, na druhej strane viaceré mediátory astmatického zápalu sú efektívnymi spúšťačmi produkcie ROS. Napriek tomu, že ROS sa pripisuje úloha v rôznych ochoreniach dýchacích ciest, existuje veľmi málo štúdií uskutočnených na ľudskej populácii. V našej štúdii sme stanovovali markery oxidačného stresu a sledovali polymorfizmus glutatión-S-transferázy (GST) u detí, ktorým bola diagnostikovaná astma. Celkové množstvo tiolových skupín sa štatisticky významne nezmenilo u detí s astmou v porovnaní s kontrolnou skupinou detí, hoci ich koncentrácia sa znížila. Koncentrácia reaktívnych produktov s kyselinou tiobarbiturovou bola u detí s astmou 0,0902 ± 0,003 nmol/mg a u kontrolnej skupiny 0,0710 ± 0,004 nmol/l, čo predstavuje štatisticky významné zvýšenie (*P* < 0,05). Neprítomnosť alely pre GST-M1 predstavovala 2,33krát väčšiu pravdepodobnosť na rozvinutie astmy. Prítomnosť a neprítomnosť génu pre GST-T1 bola rovnaká v oboch sledovaných populáciách. U detí s astmou bol v porovnaní s kontrolou výraznejšie zastúpený polymorfizmus Ile/Val a Val/Val pre GST-P1. U kontrolnej skupiny prevažoval typ Ile/Ile. Získané výsledky naznačujú, že zvýšený oxidačný stres, GST-M1 nulový polymorfizmus a GST-P1 Val/Val

polymorfismus může zohrávat úlohu v patogenéze astmy bronchiale u dětí v Žilinském kraji.

Tato práce vznikla za podpory grantu Ministerstva Zdravotnictva Slovenskej Republiky 2007/47-UK-12.

VLIV DEPRIVACE A NADBYTKU ŽELEZA A VLIV ETHANOLU NA EXPRESI MOLEKUL ÚČASTNÍČÍCH SE TRANSPORTU NETRANSFERINOVÉHO ŽELEZA PŘES PLAZMATICKOU MEMBRÁNU BUNĚK VYBRANÝCH LIDSKÝCH LINIÍ

KAMILA BALUŠÍKOVÁ, JITKA NEUBAUEROVÁ, MARKĚTA DOSTALÍKOVÁ-ČIMBUROVÁ a JAN KOVÁŘ

*Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie - Oddělení buněčné a molekulární biologie, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Ruská 87, 100 00 Praha 10
kamilabalusikova@seznam.cz*

Orgánem, který je z hlediska metabolismu železa nejvíce poškozován, jsou játra. K poškození dochází zejména při zvýšených hladinách železa v organismu, neboť játra jsou schopna akumulovat jeho nadměrné zásoby uvnitř hepatocytů. Důležitým faktorem je proto mechanismus transportu železa, a to konkrétně netransferinového železa, u jaterních buněk.

Známými molekulami účastnicemi se transportu netransferinového železa jsou DMT1 (divalent metal transporter 1), membránový importér železa, Dcytb (duodenal cytochrom b-like), membránová ferrireduktasa, ferroportin, membránový exportér železa, hephaestin, membránová ferroxidasa, a ceruloplasmin, cytoplazmatická ferroxidasa.

Cílem naší práce bylo zjistit, zda při deprivaci, respektive nadbytku železa, dochází ke změně exprese daných molekul a tedy k případné regulaci absorpce či vylučování železa těmito proteiny u jaterních buněk. Jako model nám posloužily buňky lidského hepatocelulárního karcinomu HEP-G2. V souvislosti se skutečností, že také u alkoholických pacientů dochází ke zvýšené akumulaci železa v játrech, což může mít za následek rozvoj alkoholického jaterního onemocnění (ALD), přičemž mechanismus absorpce železa v játrech u ALD není dosud plně objasněn, jsme sledovali, jak expresi transportních molekul ovlivňuje navíc přítomnost ethanolu v médiu.

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný mechanismus regulující vylučování iontů železa z těla, je hladina železa v organismu regulována především absorpcí železa z potravy střevními enterocyty. Jako další model jsme proto zvolili buňky lidského kolorektálního karcinomu Caco-2, přičemž nás dále zajímalo, zda mechanismus transportu železa, na úrovni vstupu železa do organismu, může ovlivňovat i alkohol procházející trávicím traktem.

Ukázali jsme, že změny v dostupnosti železa, tj. deprivace železa a nadbytek železa¹, respektive přítomnost ethanolu, ovlivňují expresi DMT1, Dcytb, ferroportinu,

hephaestinu a ceruloplasminu na úrovni mRNA i proteinů v závislosti na daném typu buněk.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru 3. LF UK: VZ MSM0021620814.

LITERATURA

1. Balusikova K., Neubauerova J., Dostalíkova-Cimburova M., Horak J., Kovar J.: Mol. Cell. Biochem. 321, 123 (2009).

LIDSKÉ EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY AKTIVUJÍ MOLEKULÁRNÍMI MECHANISMY, KTERÉ JSOU ZAPOJENY DO SIGNÁLNÍCH DRAH PŘI POŠKOZENÍ DNA

TOMÁŠ BÁRTA^{a,b}, VLADIMÍR VINARSKÝ^a, ZUZANA HOLUBCOVÁ^a, DÁŠA DOLEŽALOVÁ^{a,b}, PETR DVOŘÁK^{a,b} a ALEŠ HAMPL^{a,b}

*^aOddělení molekulární embryologie, Ústav experimentální medicíny AVČR, v.v.i., Kamenice 5, 625 00 Brno-Bohunice,
^bBiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno-Bohunice
tom.barta@gmail.com*

Lidské embryonální kmenové (hES) buňky jsou pluripotentní buňky derivované z embryoblastu preimplantačních blastocyst. Díky své schopnosti diferencovat se do všech zárodečných vrstev jsou potencionálním zdrojem pro buněčnou terapii. Potencionální využití v buněčné terapii je však limitováno akumulací poškození DNA během kultivace hES buněk *in vitro*.

V somatických buňkách jsou v průběhu buněčného cyklu strategicky rozmístěny kontrolní body, které zajišťují integritu genomu. Regulace kontrolních bodů a buněčného cyklu v embryonálních kmenových buňkách se liší od regulace v diferencovaných somatických buňkách. Cílem této studie bylo zjistit, zda hES buňky obsahují molekulární komponenty zapojené do ATM/ATR signalizace a zda mají plně vyvinuty a funkční G1/S a G2/M kontrolní body.

V této studii jsme stanovili efekt různých dávek UVC záření na hES buňky. Zjistili jsme, že poškození DNA v G1 fázi způsobuje akumulaci hES buněk v G1/S fázi buněčného cyklu, což naznačuje přítomnost G1/S kontrolního bodu. CDK2 a regulátoři její aktivity (Cdc25A a p21) jsou klíčové molekuly, které jsou odpovědné za blok v G1/S kontrolním bodu. Při poškození DNA dochází k rychlé aktivaci stresových drah (p38, p53) s následnou degradací Cdc25A a snížením aktivity CDK2 i CDK1. U hES buněk není za snížení aktivit CDK1/2 zodpovědný p21, ale rychlá degradace aktivační Cdc25A fosfatasy.

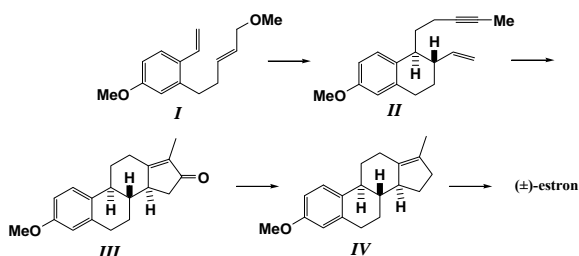
Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021622430, AV0Z50390512, AV0Z50390703, 1M0538, LC06077, LSHG-CT-2006-018739.

FORMÁLNÍ TOTALNÍ SYNTÉZA ESTRONU

ROBERT BETÍK^a a MARTIN KOTORA^{a,b}^aKatedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2^bÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
rbetik@seznam.cz; kotora@natur.cuni.cz.

Naším cílem bylo vyvinout novou stereoselektivní a enantioselektivní metodu přípravy látek se steroidním skeletem, která by umožňovala přípravu jejich *ent*-derivátů. Nedávno byl publikován nový syntetický postup přípravy steroidního skeletu, který byl založený na opakované cyklizaci α,ω -dienů pomocí Cp_2ZrBu_2 a následné reakci s allylhalogenidy^{1,2}. Byla jím i realizována formální totální syntéza estronu³. My jsme se rozhodli tuto metodiku modifikovat a zefektivnit.

Nová formální totální syntéza estronu využívá cyklizace dienu **I** (přípraveného podle literatury^{1,2}) pomocí Cp_2ZrBu_2 následované reakcí s 2-brombuta-2,3-dienem katalyzované CuCl . Cyklizace probíhá diastereoselektivně v jednom kroku za vzniku enynu **II**. Dalším krokem, při němž vznikají steroidní kruhy C a D, je Pausonova-Khandova reakce enynu **II** zprostředkovaná $\text{Co}_2(\text{CO})_8$, která vedla, téměř kvantitativně a diastereoselektivně, k derivátu **III**. Posledním krokem je redukce keto skupiny pomocí směsi $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$. Tato reakce poskytla známý meziprodukt **IV**, který může být převeden na estron ve 2 krocích⁴. Celkově byl meziprodukt **IV** připraven z komerčně dostupných látek v 7 krocích (50 %). Nejnovější výsledky ukazují, že modifikace tohoto postupu umožní i enantioselektivní přípravu derivátu **IV**.



Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

LITERATURA

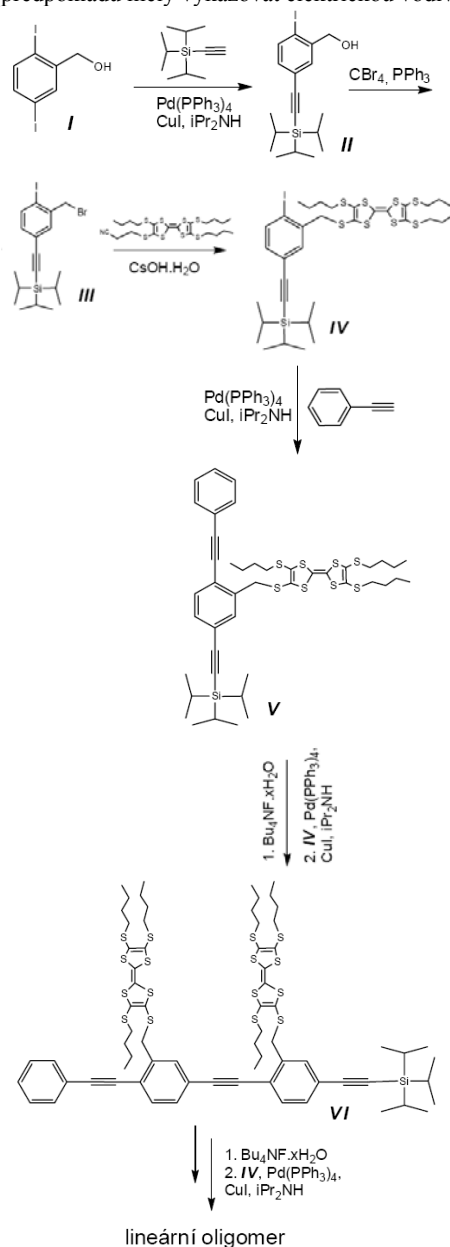
- Herrmann P., Kotora M., Buděšínský M., Šaman D., Čiřáková I.: *Org. Lett.* 8, 1315 (2006).
- Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *Chem. Lett.* 36, 1268 (2007).
- Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *J. Org. Chem.* 73, 6202 (2008).
- Barlett P. A., Johnson, W. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7501 (1973).

OLIGOFENYLENACETYLENY NESOUCÍ TETRATHIAFULVALENOVÉ JEDNOTKY JAKO MATERIÁLY PRO MOLEKULÁRNÍ ELEKTRONIKU

VÁCLAV DEKOJ, MARTIN BĚLOHRADSKÝ a IVO STARÝ*

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

Připravované lineární oligomery by dle všech předpokladů měly vykazovat elektrickou vodivost.



Schema 1. Základní koncepce přípravy lineárních oligomerů

K využití naznačené syntetické cesty došlo díky objevu selektivity Sonogashirovy reakce I → II, kde je jod v meta-poloze reaktivnější a očekávaný izomer látky II při ní vůbec nevzniká. Je tedy možné jednoduchou syntetickou sekvencí syntetizovat oligomery s jistotou ekvidistance tetrathiafulvalenových (TTF) jednotek. Na oligomerech bude studována změna absorpce v UV-VIS oblasti v závislosti na oxidačním stavu TTF jednotek a dále také srovnání elektrochemických a absorpčních vlastností jednotlivých oligomerů v závislosti na počtu TTF jednotek v oligomeru.

RICINUSIN– NOVÝ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTID Z KLÍŠTĚTE *Ixodes ricinus*

VERONIKA DORŇÁKOVÁ^{a,*}, NATALIIA RUDENKO, MARYNA GOLOVCHENKO a LIBOR GRUBHOFFER

*Biologické Centrum v.v.i., AV ČR - Parazitologický ústav a Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
dornav00@prf.jcu.cz*

Nový gen kódující antimikrobiální protein – ricinusin – byl charakterizován u klíštěte *I. ricinus*. Získaná 405 bp dlouhá cDNA obsahuje jeden čtecí rámec (135 aminokyselin), který kóduje protein velký 14,5 kDa s 19 aminokyselin dlouhou signální sekvencí. Ricinusin obsahuje konzervativní šestici cysteinů typickou pro defensiny a unikátní HEAHEAHEA repetice, čímž se od defensinů liší. Analýza proteinové sekvence prokázala podobnost ricinusinu k antimikrobiálním proteinům z klíštěte *Boophilus microplus* (microplusin)¹ a *Amblyomma hebraeum* (hebraein)² se stejnými vlastnostmi. Ricinusin se tímto stal třetím členem nové rodiny klíšťecích obranných proteinů bohatých na histidin.

Diferenciální exprese ricinusinu byla indukována sáním u larvy, nymfy i dospělci. Výrazná exprese tohoto genu ve slinných žlázách a ve střevě ukázala, že ricinusin se podílí na širokém spektru imunitních reakcí. Analýza genomové sekvence ricinusinu prokázala přítomnost intronů. Rekombinantní protein, získaný pomocí bakteriálního expresního systému, byl použit pro testování antimikrobiální aktivity ricinusinu a jeho účinnosti proti patogenům. Byla určena minimální inhibiční koncentrace (MICs) ricinusinu proti jednotlivým Gram-negativním a Gram-positivním bakteriím.

Tato práce vznikla za podpory grantu MSM 6007665801 a C06009 (Ministerstvo školství ČR), Grantová agentura České Republiky (524/03/H133 a 524/06/1479), Z60220518 (výzkumný projekt Parazitologického ústavu AV ČR).

LITERATURA

1. Fogaça A.C., Lorenzini D.M., Kaku L.M., Esteves E., Bulet P., Daffre S.: *Dev.Comp. Immunol.* 28, 191 (2004).

2. Lai R., Takeuchi H., Lomas L.O., Jonczy J., Rigden D.J., Rees H.H., Turner P.C.: *FASEB J.* 18, 1447 (2004).

FIBRINOGENU PODOBNÉ PROTEINY U KLÍŠTĚTE *Dermacentor marginatus*

JARMILA DUPEJOVÁ^{a,*}, JÁN ŠTĚRBA^a, MARIE VANCOVÁ^{a,b}, VOJTĚCH KOVÁŘ^{a,b} a LIBOR GRUBHOFFER^{a,b}

*^aPřírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, ^bParazitologický ústav, Biologické centrum, AVČR, v.v.i, Branišovská 31, České Budějovice
dupejova@paru.cas.cz*

Proteiny FReD (fibrinogen-related domain) patří mezi lektiny a u bezobratlých živočichů se pravděpodobně účastní procesů přirozené imunity. Z hemolymfy klíštěte *Ornithodoros moubata* byl již dříve izolován a charakterizován FReD protein Dorin M. V této práci byly identifikovány a charakterizovány metodami analytické biochemie a molekulární biologie další podobné proteiny u klíštěte *Dermacentor marginatus*.

Konkrétní proteiny FReD1, 2, 3 a 4 byly detegovány protilátkami proti Dorinu M. Všechny tyto proteiny jsou glykosylovány, a mají vazebnou specifitu pro *N*-acetyl hexosaminy, sialoglykoproteiny a kyselinu sialovou.

FReD1 (36 kDa) je modifikován glykany obsahujícími D-mannosu a terminální D-galaktosu; FReD2 a FReD3 (79/80 kDa) jsou pravděpodobně izomery, které ve svých glykanech obsahují D-mannosu a terminální kyselinu sialovou; FReD4 (177 kDa) ve svých glykanech o obsahuje D-mannosu.

Imunofluorescencí bylo prokázáno, že se všechny proteiny nachází ve střevě, FReD1 a 2/3 byly lokalizovány v hemocytech a FReD1 a 4 ve slinných žlázách *D. marginatus*.

Na základě molekulárně biologických analýz byl dále u *D. marginatus* identifikován protein DMFREP1. Nukleotidová a aminokyselinová sekvence potvrdily, že je tento protein blíže příbuzný FReD proteinu z klíštěte *Ixodes ricinus*, *Ixoderinu A*. Další dva nové proteiny FReD byly nalezeny u klíšťat *Haemaphysalis punctata* a *Hyalomma impeltatus*. Fylogenetické analýzy třech nových proteinů FReD potvrdily jejich příbuznost s ostatními klíšťecími proteiny FReD, a stejně tak i s Tachylektiny 5A a 5B (*Tachypleus tridentatus*). Jejich sekvence jsou uloženy v databázi Genbank pod čísly FJ176386, FJ176387, FJ176388.

TOTÁLNÍ SYNTÉZA 4-F₃₁-NEUROPROSTANU A JEHO 4-EPIMERU

**BARBARA EIGNEROVÁ^{a,b}, THIERRY DURAND^c
a MARTIN KOTORA^{a,b}**

^aKatedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, 128 43 Praha 2; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha 6; ^cIBMM, UMR CNRS 5247, Université Montpellier 1 et 2, Faculté de Pharmacie, 15. Av. Ch. Flahault, F-34093 Montpellier cedex 05, France
katora@natur.cuni.cz

Polynenasycené mastné kyseliny (PMK) hrají klíčovou roli v obraně organismů vůči oxidativnímu stresu. Působením volných radikálů jsou přeměňovány *in vivo* na odbouratelné organické sloučeniny jako neuroprostany, isoprostany a fytoprostany. Nedostatek PMK může být příčinou vážných neuronálních poškození, o jejichž rozsahu vypovídá měření koncentrace neuroprostanů v nervové tkáni. Pro širší biologickou studii vyvstal požadavek na větší množství 4-F₃₁-neuroprostanu **Ia**, a tudíž byla v rámci tohoto projektu vypracována jeho první totální syntéza¹. Příprava intermediátu **IV** je popsána ve 13 krocích^{2,3}, následuje krucální připojení dvou postranních řetězců Wittigovou a Horner-Wadworth-Emmonsovou olefinací (schéma 1)¹. Biologická studie bude zahrnovat i zkoumání fluorovaných analogů těchto sloučenin.

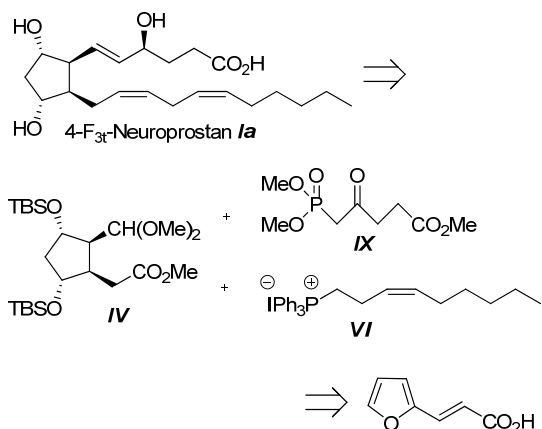


Schéma 1. Retrosyntéza 4-F₃₁-neuroprostanu **Ia**

Tato práce vznikla za podpory Centra pro nová antivirotika a antineoplastika MŠMT (projekt č. 1M0508) a grantů č. MSM0021620857 MŠMT a University Montpellier 1 BQR-2008.

LITERATURA

1. Auvinet A.-L., Eignerová B., Guy A., Kotora M., Durand T.: *Tetrahedron Lett.*, v tisku.
2. Pinot E., Guy A., Guyon A. L., Rossi J. C., Durand T.: *Tetrahedron: Asymmetry* 16, 1893 (2005).
3. Pinot E., Guy A., Fournial A., Balas L., Rossi J. C., Durand T.: *J. Org. Chem.* 73, 3063 (2008).

KOMPLEXNÁ ÚLOHA FGF-2 U ĽUDSKÝCH EMBRYONÁLNYCH KMEŇOVÝCH BUNIEK

**LÍVIA EISELLEOVÁ^a, KAMIL MATULKA^a,
MICHAELA KUNOVÁ^a, VLADIMÍR
ROTREKL^a, ALEŠ HAMPL^{a,b} a PETR DVOŘÁK^{a,b}**

^aBiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bOddělení molekulární embryologie, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Kamenice 5, 625 00 Brno
eiselle@med.muni.cz

Ľudské embryonálne kmeňové (hES) bunky sú unikátnym bunkovým typom, ktorý prináša predovšetkým dva veľké prísľuby: pochopenie molekulárnych mechanizmov ľudského vývinu a chorôb, a stávajú sa zároveň nekonečným zdrojom pre bunkové terapie. Zásadným krokom k naplneniu oboch týchto smerov je otázka, ako udržať a expandovať hES bunky v nediferencovanom stave bez genetických abnormalít. Naše súčasné poznatky o optimálnom kultivačnom prostredí zahŕňajú okrem iného aj niektoré rastové faktory, z nich najdôležitejší, ktorý sa rutinne používa ako prídavok do kultivačného média, je FGF-2 (fibroblastový rastový faktor 2).

V predošlých štúdiách sme ukázali, že prídavok exogénneho FGF-2 stimuluje MAPK signálnu dráhu aktiváciou FGFRs (FGF receptorov) a expresiou "kmeňových" génov, a potláča gény apoptózy a bunkovej smrti. Naša súčasná štúdia demonštruje komplexnú úlohu FGF-2 u hES buniek: priamo podporuje ich samoobnovu (endogénny FGF-2) a stimuluje bunkové prežívanie a adhéziu (exogénny FGF-2), čo sú dva javy, ktoré nepriamo vplyvajú na nediferencovaný rast. Syntéza FGF-2 u hESCs sa zvyšuje v odpovedi na stresové podmienky a zároveň FGF-2 zohráva protektívnu úlohu pri apoptóze indukovanej stresom. Ukazujeme tiež, že exogénny FGF-2 zvyšuje klonogénnu schopnosť hESCs. Tieto dáta naznačujú, že prídavok exogénneho FGF-2 prispieva významnou mierou k preživanju a adhézii hES buniek.

Táto práca vznikla za podpory Ministerstva športu, mládeže a telovýchovy (MSM0021622430, LC06077, 1M0538) a Akadémie Věd ČR (AV0Z50390512, AV0Z50390703).

STUDIUM DYNAMIKY MOLEKUL VODY V ÚSTÍ TUNELU HALOGENALKANDEHALOGENAS

**ANDREA FOŘTOVÁ^a, JAN SÝKORA^b, AGNIESZKA
OLŽYŇSKÁ^b, JAN BREZOVSKÝ^a, ZBYNĚK
ZDRÁHAL^c, MARTIN HOF^b a JIŘÍ DAMBORSKÝ^a**

^aLoschmidtovy laboratoře, PŘF MU, 62500 Brno; ^bInstitut fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., 182 23 Praha 8; ^cOddělení funkční genomiky a proteomiky, PŘF MU, 625 00 Brno
andrea@chemi.muni.cz

Halogenalkandehalogenasy (EC 3.8.1.5) jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují štěpení vazby mezi

uhlíkem a halogenem v řadě halogenovaných alifatických uhlovodíků. Aktivní místo vnořeno mezi hlavní a čepičkovou doménu halogenalkandehalogenas je spojeno s povrchem proteinu tunelem, který slouží jako transportní cesta pro substráty a produkty. Ústí tunelu představuje evolučně nejvariabilnější oblast enzymu.

Tato práce je zaměřena na studium dynamiky molekul vody v blízkosti ústí tunelu u dvou halogenalkandehalogenas DbjA a DhaA s použitím časově rozlišené fluorescenční spektroskopie a počítačové simulace molekulové dynamiky. Pro použití časově rozlišené fluorescenční spektroskopie je nutné protein označit fluorescenční sondou. V projektu jsme využili mechanismus kovalentního označení halogenalkandehalogenas nesoucích mutaci v katalytickém histidinu fluorescenční sondou kumarin a vyvinuli jsme protokol umožňující specifické označení ústí tunelu a současnou eliminaci volných a nespecificky vázaných molekul kumarinu. Časově rozlišená emisní spektra komplexu kumarinu s halogenalkandehalogenasou prokázala rozdíly v polaritě, dostupnosti a pohyblivosti sondy a jejího okolí u obou studovaných enzymů. Kumarin vázaný v halogenalkandehalogenase DbjA je pohyblivější a vykazuje vyšší míru hydratace než sonda vázaná v halogenalkandehalogenase DhaA. Okolí kumarinu vázaného v halogenalkandehalogenase DbjA ukazuje vyšší polaritu a nižší viskozitu než je tomu u DhaA. Experimentální data korespondují výsledky získanými z výpočtů molekulové dynamiky. Výsledky odrážejí geometrii ústí tunelu patrnou z krystalové struktury obou enzymů. Dynamika solventu v ústí tunelu bude studována u dalších halogenalkandehalogenas a jejich variant konstruovaných místně-cílenou mutagenézí.

Tato práce vznikla za podpory GA ČR 203/08/0114 (M.H., J.D.), MŠMT ČR (J.S.), LC06010 (J.B.), MSM0021622412 (J.D.), MSM0021622413 (A.J.) a MSM0021622415 (Z.Z.).

BENZOTRISTIAZOL - NOVÁ ŠTRUKTÚRNA DOMÉNA PRE ZLÚČENINY S NELINEÁRNO OPTICKOU ODOZVOU

ANDREA FÜLÖPOVÁ, PAVOL ZAHRADNÍK a IVICA SIGMUNDOVÁ

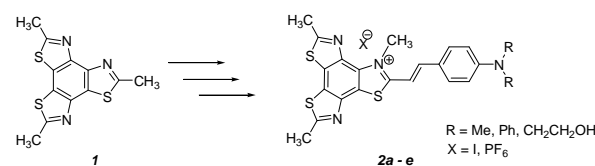
Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
fulopovaa@fns.uniba.sk

Organické molekuly obsahujúce vo svojej štruktúre konjugované systémy vykazujú zaujímavé elektrické, spektrálne a iné vlastnosti. Všeobecne tieto zlúčeniny možno popísať schémou donor – π -konjugovaný systém – akceptor. V súčasnosti sa rozvíja štúdium kvadrupolárnych a oktapolárnych štruktúr. Tieto zlúčeniny vykazujú nelineárne optické vlastnosti, t.j. po prechode žiarenia s veľkou intenzitou cez ne dochádza k zmenám fyzikálnych vlastností žiarenia. Je možné pozorovať NLO javy ako napr. zdvojnásobenie frekvencie žiarenia alebo dvojfotónovú absorpciu, teda súčasnú absorpciu dvoch fotónov a prenos

energie na jeden elektrón. Toto nazývame aj kubickou nelineárnou optickou odozvou. Materiály s NLO vlastnosťami majú široké uplatnenie nielen vo fotonike, prenose optických údajov, ale aj v neinvazívnej biomedicínskej diagnostike a terapii.

Z hľadiska chemickej štruktúry a fotochemickej a termickej stability sú vhodnými derivátmi látky obsahujúce heterocykly. Zameriavame sa na syntézu a teoretické štúdium spektrálnych vlastností a elektrónových charakteristík oktapolárnych štruktúr, konkrétne derivátov benzotristiazolu. Na teoretické štúdium elektrónových vlastností cieľových zlúčenín boli použité semiempirické kvantovochemické výpočty.

Naším cieľom bolo optimalizovať prípravu 2,3,8-trimetylbistiazolo[4,5-e; 5,4-g]-1,3-benzotiazolu (**1**), pripraviť jeho deriváty (**2a - e**) a študovať ich elektrické a optické vlastnosti.



INTERAKCE STRUKTURNÍ A OBALOVÝCH PROTEINŮ U RETROVIRŮ

PETRA GRZNÁROVÁ^a, JAN LIPOV^a, JASMINE RAINEY^b, ERIC HUNTER^b a TOMÁŠ RUMIL^a

^aVysoká škola chemicko technologická Praha, Technická 3, 166 28 Praha; ^bYerkes National Primate Research Center, Gatewood Rd 954, Atlanta 30329, USA
petra.grznarova@vscht.cz

Transport retrovirových obalových glykoproteinů a jejich interakce se strukturním polyproteinem Gag v pozdní fázi životního cyklu viru zatím nejsou plně objasněny. Tento projekt je zaměřen na retroviry typu D, mezi které patří i Mason-Pfizerův opičí virus, jehož částice jsou skládány v cytoplasmě infikované buňky a následně transportovány k plasmatické membráně.

Pro studium transportu obalových glykoproteinů a jejich interakcí s polyproteinem Gag byly připraveny konstrukty pro expresi obalových glykoproteinů fúzaných s fluorescenčním proteinem (žlutý, modrý a červený fluorescenční protein), a to vložením genu pro daný fluorescenční protein za sekvenci kódující cytoplasmatický konec povrchové podjednotky obalových glykoproteinů. Dále byly připraveny i konstrukty pro expresi retrovirového strukturního polyproteinu Gag fúzaného se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), a to vložením genu pro GFP do expresního vektoru obsahujícího gen pro polyprotein Gag a sekvenci pro obalové glykoproteiny. Správnost vložení byla ověřena sekvencí a plasmidy byly transfekovány do buněk tkáňové linie COS-1 (buňky ledvin opice *African green monkey*). V různých časových intervalech od transfekce byly tyto buňky pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Expresie fúzních

proteinů a jejich inkorporace do složených virových částic byla ověřena pomocí tzv. „pulse chase“ experimentu. Transport obou polyproteinů v reálném čase byl sledován i v dalších dvou buněčných liniích. Pohyb virových proteinů značených fluorescenčními proteiny v infikované buňce a jejich potenciální interakce byly pozorovány pomocí „Delta Vision Live Imaging“ mikroskopu v reálném čase. Prvotní pozorování naznačují, že Gag migruje v kooperaci s obalovými glykoproteiny a buněčnými vesikuly. Tento předpoklad bude předmětem podrobnějšího ověřování v dalších experimentech.

Tato práce vznikla za podpory grantů Ministerstva školství IM6837805002, MSM 514 6046137305, ME 904 a Grantové agentury České republiky KAN200100801, KAN208240651.

ZMENY SYNTÁZ OXIDU DUSNATÉHO V PRIEBEHU ISCHÉMIE A REPERFÚZIE MYOKARDU A OVPLYVNENIE SIMVASTATÍNOM

**ANNA HARČÁROVÁ^a, MONIKA BARTEKOVÁ^b,
PETER KRÉNEK^a, ADRIANA ADAMEOVÁ^a, JANA
MATEJÍKOVÁ^b, TÁŇA RAVINGEROVÁ^b
a MAGDALÉNA KUŽELOVÁ^a**

^a*Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta UK, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava; ^bÚstav pre výskum srdca SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava
harcarova@fpharm.uniba.sk*

Oxid dusnatý produkovaný endotelovou NO syntázou (eNOS) znižuje ischemicko-reperfúzne poškodenie myokardu (IRPM), nadmerná produkcia indukovateľnou NO syntázou (iNOS) priebeh ischemie a reperfúzie zhoršuje¹. Diabetes, hypercholesterolémia a niektoré hypolipidemiká ovplyvňujú expresiu a funkčnosť syntáz NO. Naše predchádzajúce výsledky dokázali, že uvedené faktory významným spôsobom zasahujú do procesu IRPM². Cieľom práce preto bolo sledovať zmeny expresie proteínov eNOS, jej aktívnej fosforylovanej formy pSer1177eNOS a iNOS počas ischemie a reperfúzie myokardu potkanov s vyvolaným diabetom (streptozotocín, 80 mg/kg *i.p.*) a hypercholesterolémiou (tukovo-cholesterolová diéta, 20 g/deň) a premedikovaných hypolipidemikom simvastatínom podávaným ako súčasť stravy (10 mg/kg/deň). Globálna ischemia (30 min) a reperfúzia (120 min) sa vyvolala na izolovaných srdciach podľa Langendorffa. Expresia vybraných proteínov sa sledovala v ľavej komore myokardu s využitím metód SDS-PAGE a Western Blot.

Počas ischemie sa vo všetkých sledovaných skupinách signifikantne znížil ($P < 0,01$) podiel fosforylovanej formy eNOS v tkanive ľavej komory myokardu. Po dvojhodinovej reperfúzii sme významné obnovenie fosforylácie zaznamenali len u kontrolných zvierat ($P < 0,001$) a potkanov s indukovaným diabetom a hypercholesterolémiou premedikovaných simvastatínom ($P < 0,001$). V celkovej expresii eNOS sme nezaznamenali významné zmeny. Premedikácia diabeticko-hypercholesterolemických potkanov simvastatínom signifikantne znížila expresiu iNOS v porovnaní

s rovnakou nepremedikovanou skupinou ($P < 0,05$). Simvastatín ovplyvnil expresiu iNOS a dynamiku fosforylácie eNOS, čo môže prispievať k protektívnym účinkom na IRPM.

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 1/4296/07 a FaFUK/34/2008.

LITERATÚRA

1. Judgutt B. I.: Heart Fail. Rev. 7, 391 (2002).
2. Adameová A., Kuželová M., Faberová V., Švec P.: Pharmazie 61, 807 (2006).

KOLONIE *S. cerevisiae* A ROLE *FLO11* A DALŠÍCH GENŮ V JEJICH STRUKTUROVANOSTI

**MARKÉTA HILSKÁ, BLANKA JANDEROVÁ
a ZDENA PALKOVÁ**

*Katedra genetiky a mikrobiologie, Univerzita Karlova, Viničná 5, 128 44 Praha 2
mark.hill@post.cz*

Buňky kvasinky *S. cerevisiae* vytvářejí při růstu na pevném médiu kolonie představující mnohobuněčné organizované struktury, ve kterých dochází k mezibuněčným interakcím. Tyto interakce pak mají vliv na formování a morfolonii kvasinkové kolonie, která je za daných podmínek charakteristická pro určitý rod, druh i kmen¹. Kvasinkové kolonie druhu *S. cerevisiae* jsou obvykle nestrukturované, téměř hladké, kmen *S. cerevisiae* $\Sigma 1278$ však vytváří kolonie silně zvrásněné. Roli ve vytváření této morfologie by mohl hrát protein buněčné stěny Flo11 či další komponenty buněčné stěny.

Cílem této práce bylo pokusit se objasnit roli genu *FLO11* a dalších genů podílejících se na syntéze buněčné stěny, v morfolonii kolonií kmene ΣS^h odvozeného od *S. cerevisiae* $\Sigma 1278$. Byl studován vliv různých zdrojů uhlíku na morfolonii kolonií a buněk, schopnost buněk zarůstat do agaru a vytvářet agregáty. V koloniích byla sledována exprese *FLO11* s použitím Northern blot analýzy a měřením fluorescence fúzního proteinu Flo11-GFP. Časový průběh lokalizace proteinu Flo11-GFP v buňkách byl sledován také pomocí fluorescenční mikroskopie. Výsledky experimentů ukazují, že kvantita a lokalizace fúzního proteinu Flo11-GFP, v daném čase vývoje kolonie závisí na zdroji uhlíku v kultivačním médiu. Expresie *FLO11* na médiích se zdrojem uhlíku glycerolem nebo ethanolem byla oproti fermentovatelným zdrojům výrazně vyšší. Glycerol a ethanol tedy pozitivně ovlivňují expresi genu *FLO11*, jejíž vyšší intenzita zároveň odpovídala výraznějšímu zvrásnění kolonií. Dále byl u kmenů s delecemi některých genů sledován vliv změn v obsahu komponent buněčné stěny na zvrásněnost kolonií.

Práce byla podporována granty IAA500200506 a LC531.

LITERATURA

1. Palková, Z., Váchová, L.: Int. Rev. Cytol. 225, 229 (2003).

CENTROSOMÁLNÍ ABNORMALITY - POTENCIÁLNÍ ZDROJ GENETICKÉ NESTABILITY LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK?

**ZUZANA HOLUBCOVÁ^a, TOMAŠ BÁRTA^{a,b}, DÁŠA
DOLEŽALOVÁ^{a,b}, PETR DVORÁK^{a,b} a ALEŠ
HAMPL^{a,b}**

^aBiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita,
Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bOddělení molekulární
embryologie, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.,
Kamenice 5, 625 00 Brno
zholub@med.muni.cz

Lidské embryonální kmenové (hES) buňky jsou nediferencované pluripotentní buňky derivované z lidské blastocysty. Mohou dát vzniknout jakémukoli buněčnému typu lidského těla a tím představují obrovský příslib pro buněčnou terapii budoucnosti. Jejich praktickému uplatnění v regenerativní medicíně se však staví do cesty skutečnost, že během *in vitro* kultivace tyto buňky hromadí spontánní mutace, jejichž výsledkem může být nádorová transformace. Genetickou nestabilitu buněk řady maligních nádorů provází výskyt centrosomálních abnormalit. Zjistili jsme, že kultury hES buněk se vyznačují zvýšeným výskytem buněk, které vykazují numerické aberace centrosomů. Frekvence výskytu centrosomálních abnormalit v hES buňkách je do značné míry ovlivnitelná kultivačním povrchem. Během dlouhodobé *in vitro* propagace hES buněk frekvence multicentrosomálních mitos klesá, pravděpodobně jako výsledek „adaptace“ hES buněk na kultivační podmínky. K redukci numerických centrosomálních aberací vede také chemická inhibice CDK2, jejíž aktivita v hES buňkách je neobyčejně vysoká. Tato kinasa je klíčová pro start centrosomální duplikace. Také hladina kinasy Aurora A, další molekuly spojené se zvýšeným výskytem nadpočetných centrosomů, je v hES buňkách velmi vysoká ve srovnání s lidskými somatickými buňkami. Navíc chemická inhibice její aktivity je doprovázena snížením frekvence multicentrosomálních mitos. Na základě těchto pozorování předpokládáme, že CDK2 a Aurora A se spoluúčastní na hyperamplifikaci centrosomů v hES buňkách. Abnormální mitotická dělení iniciovaná přespočetnými centrosomy se pak mohou stát zdrojem genetické nestability v kulturách lidských embryonálních kmenových buněk.

Tato práce vznikla za podpory MSM0021622430, AV0Z50390512, AV0Z50390703, IM0538, IQS500040507, NR/9293-3/200.

VÝBĚR REFERENČNÍCH GENŮ PRO STUDIUM ZMĚN GENOVÉ EXPRESE BĚHEM ŽIVOTA SAMCŮ ČMELÁKA ZEMNÍHO (*Bombus terrestris*)

**DARINA HORŇÁKOVÁ, PETRA MATOUŠKOVÁ,
JIRÍ KINDL, IRENA VALTEROVÁ a IVA PICHOVÁ**

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

Čmeláci jsou důležitými opylovači rostlin a představují vhodný model pro studium komunikace sociálního hmyzu. Pro řadu aktivit, jako např. pro značkování území a páření využívají feromony, které jsou druhově vysoce specifické. U čmeláka *B. terrestris* dochází s věkem ke kvalitativnímu i kvantitativnímu složení sexuálních feromonů, související se změnou struktury sekrečních buněk labiální žlázy samečka¹. Naším cílem je určit, které enzymy se podílejí na biosyntéze feromonů, a sledovat profil exprese genů kódujících tyto enzymy u *B. terrestris* různého stáří.

Biologická variabilita vzorků a správná kvantifikace mRNA transkripčních hladin genů vyžadují identifikaci vhodných referenčních genů, které doposud nebyly pro čmeláky identifikovány. Pomocí programů geNorm² a NormFinder³ jsme z 9 kandidátů vybrali geny pro arginin kinasu a fosfolipasu A2, které mají nejstabilnější úroveň exprese v labiální žláze i v tukovém tělese *B. terrestris* různého stáří a které mohou sloužit jako referenční geny pro normalizaci qPCR experimentů pro *B. terrestris*.

Tato práce vznikla za podpory grantu 203/09/1446 od GA ČR.

LITERATURA

- Šobotník J., Kalinová B., Cahlíková L., Weyda F., Ptáček V., Valterová I.: *J. Insect. Physiol.* 54, 1 (2008).
- Vandesompele J., De P. K., Pattyn F., Poppe B., Van R. N., De P. A., Speleman F.: *Genome Biol.* 3, 7 (2002).
- Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F.: *Cancer Res.* 64, 15 (2004).

VLIV PROBIOTICKÝCH KULTUR NA REGULACI EXPRESE ZÁNĚTLIVÝCH GENŮ V MAKROFÁZÍCH

JAN HOŠEK^a a MILAN BARTOŠ^{a,b}

^aVeterinární a farmaceutická univerzita Brno,
Farmaceutická fakulta, Palackého 1-3, 612 42 Brno;
^bGenex CZ, Viniční 235, 615 00 Brno
hosekj@vfu.cz

Probiotika jsou skupina specifických nepatogenních mikroorganismů, které vykazují pozitivní efekt na zdraví. Zahrnují nejen léčiva nebo potravinové doplňky, ale také bakteriální kultury obsažené v jídle, např. kysané mléčné výrobky. Přesný mechanismus jejich působení však doposud není, přes intenzivní studium, uspokojivě vysvětlen.

Jako zánět se označuje souhrn fyziologických reakcí na porušení integrity organismu, které vedou k ochraně proti infikování poškozeného místa, k lokalizaci poškození a zhojení. V regulaci zánětu a imunitní odpovědi hrají důležitou roli makrofágy.

V této práci jsme zkoumali vliv probiotické kultury *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium sp.* na expresi mRNA prozánětlivých genů pro TNF α (Tumor necrosis

factor α) a MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) a protizánětlivého genu pro ZFP36 (Zinc finger protein 36). Jako biologický objekt jsme zvolili makrofágy odvozené z buněčné linie THP-1. Makrofágy byly ošetřeny tepelně inaktivovanými probiotickými kulturami a následně byla sledována jejich schopnost modulovat expresi vybraných genů, resp. zánětlivou reakci vyvolanou lipopolysacharidy (LPS).

L. acidophilus indukoval statisticky nevýznamně nižší expresi všech sledovaných genů než *Bifidobacterium sp.* Spolupůsobení LPS a probiotických bakterií vykazovalo rysy kompetice u exprese TNF α a ZFP36 1 h po stimulaci. U exprese MCP-1 se naopak objevoval aditivní účinek obou komponent. Statisticky významný po 4 h stimulaci LPS byl aditivní efekt na expresi MCP-1 při ošetření *L. acidophilus* a kompetitivní účinek na expresi TNF α u *Bifidobacterium sp.*

Výsledky této studie ukazují zvýšenou schopnost *Bifidobacterium sp.* indukovat prozánětlivý expresní profil u makrofágů. Fyziologické a patofyziologické konsekvence toho zjištění budou dále podrobněji zkoumány a objasněny.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA VFU 112/2008/FaF a TANDEM FT-TA5/025, Ministerstvo průmyslu a obchodu České republiky.

HOMEBOXOVÉ GENY V GENOMU A TRANSKRIPTOMU SLADKOVODNÍ MEDÚZY *CRASPEDACUSTA SOWERBYI*. POTENCIÁLNÍ ÚLOHA *POU* GENŮ V EVOLUCI SMYSLOVÝCH ORGÁNŮ

**MILUŠE HROUDOVÁ, JAKUB RÍDL, HYNEK
STRNAD, ČESTMÍR VLČEK, PETR VOJTA, PAVEL
VOPÁLENSKÝ a VÁCLAV PAČES**

Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky,
Videňská 1083, 142 20 Praha 4
hroudova@img.cas.cz

Sladkovodní medúza *Craspedacusta sowerbyi* je zástupcem živočišného kmene žahavci (*Cnidaria*, třída *Hydrozoa*), který se v posledních letech stal předmětem intenzivního studia v oblasti molekulární genetiky a vývojové biologie. Komplexní genom žahavců kontrastující s jednoduchou stavbou jejich těl je v mnoha ohledech podobnější genomům obratlovců včetně člověka, než je tomu u některých evolučně vyšších modelových organismů (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*).

Významnou skupinou genů regulujících ontogenezi jsou homeoboxové geny. Kódují transkripční faktory a jejich nukleotidové sekvence jsou silně konzervovány napříč celou živočišnou říší. V raných stádiích vývoje organismu se podílejí na formování důležitých morfologických znaků, jako je například tělesná symetrie, na vývoji nervové soustavy a smyslových orgánů. Některé z nich jsou součástí významných signálních drah.

V rámci tohoto projektu byly v genomu *Craspedacusta sowerbyi* pomocí sekvencí z příbuzných žahavců

identifikovány 4 homeoboxové geny patřící do rodiny *POU* a 6 genů rodiny *SINE*. U genů *POU* byly metodou *in situ* hybridizace na celém jedinci lokalizovány oblasti jejich exprese. Byla připravena a částečně sekvenována kosmidová genomová knihovna *Craspedacusta sowerbyi* za účelem získání přehledu o struktuře genomu tohoto sladkovodního žahavce. Dále byla zkonstruována BAC genomová knihovna pro snadnou identifikaci a sekvenaci dalších homeoboxových genů a jejich okolí. Další část této práce spočívá ve studiu a porovnání transkriptomu *Craspedacusta sowerbyi* a *Tripedalia cystophora* (zástupce žahavců třídy *Cubozoa*). Pro sekvenování genomové DNA a cDNA využíváme moderní sekvenační technologie GS20, FLX a Titanium.

Z počtu genů na jeden průměrně 35 kb dlouhý insert v kosmidové knihovně lze usuzovat na velikost genomu *Craspedacusta sowerbyi* kolem 220 MB. Transkriptom dospělého jedince (medúzy) *Craspedacusta sowerbyi* obsahuje kolem tří tisíc unikátních genů včetně 22 genů homeoboxových. Z porovnání počtu *POU* a *SINE* genů v genomu a transkriptomu vyplývá, že se do mRNA medúzy transkribují všechny geny *POU* a polovina genů *SINE*, což svědčí o jejich významné úloze v dospělém stádiu. Expresí genů *POU6* a *POU4F3* kolokalizuje souměrně ve středu kvadrantů zvonu medúzy v místech, kde se předpokládá kumulace senzorických receptorů. Nukleotidové sekvence genů *POU4F1*, *POU4F2* a *POU4F3* poukazují na pravděpodobnou existenci společného pragenomu *POU4* před evolucioním vznikem žahavců. V transkriptomu larvy *Tripedalia cystophora* je téměř pět tisíc unikátních genů včetně 16 genů homeoboxových. Vyšší množství transkribovaných genů v tomto případě odpovídá potřebě součinnosti více faktorů v rané ontogenezi živočicha.

Tato studie byla podporována výzkumnými záměry a granty MŠMT 1M6837805002 (Center for Applied Genomics) a NB Project AC CZ AV0Z50520514.

EXPRESNÍ ANALÝZA GENŮ IMUNITNÍHO SYSTÉMU V PATOGENEZI DIABETU 1 TYPU

**MILUŠE HUBÁČKOVÁ^a, ZBYNĚK HALBHUBER^b,
VENDULA ŠTAVÍKOVÁ^a, MÁRIA KRIVJANSKÁ^b
a KATEŘINA ŠTECHOVÁ^a**

^a2. LF Univerzity Karlovy a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06
Praha 5; ^bCentral European Biosystems, U Habrovky
247/11, 140 00 Praha 4
milka@centrum.cz

Diabetes 1. typu (T1D) je orgánově specifické Th1 autoimunitní onemocnění. Th1 lymfocyty infiltrují Langerhansovy ostrůvky a jimi produkované cytokiny podporují selektivní destrukci beta buněk cytotoxickými lymfocyty, což vede zpočátku k nedostatečné a posléze nulové produkci inzulínu. Cílem studie tedy bylo analyzovat genomovou expresi některých imunoregulačních genů v mononukleárních buňkách periferní krve před a po stimulaci syntetickými diabetogenními autoantigeny. Pro některé

cytokiny (Th1, Th2, Th3 a Th17) byla expresní data korelována také s výsledky proteinových microarray.

Pro pilotní studii byly získány vzorky 6 pacientů s T1D, 14 příbuzných diabetika (5/14 bylo pozitivních aspoň na jednu autoprotilátku = skupina DRLpoz) a 4 zdravých kontrol. Poté byly buňky periferní krve stimulovány diabetogenními peptidy (derivovaný peptid 3 GAD65, peptid IA2 a proinzulin). Cytokiny byly měřeny pomocí ELISA a kvantitativní proteinové microarray, genová exprese pak pomocí high density Phalanx gene microarray s 30968 genomovými a 1082 kontrolními próbami. Pro následnou analýzu pak bylo vybráno 58 imunoregulačních genů.

Po specifické stimulaci byla nalezena nejvyšší genová exprese u skupiny DRLpoz. Tyto osoby mají pozitivní autoprotilátky, ale normální intravenózní toleranční glukosový test. U skupiny DRLpoz byla nalezena významně vyšší exprese pro: IFN-gamma, IL-1, -2, -6, -13, -22, -31, GATA-3, JUNB, IL-6R, STAT-6, TGF-beta. Nejvýznamnější deregulace byla zjištěna u IL-23R: 12krát pro DRLpoz a 23krát pro T1D pacienty. U T1D pacientů byla nalezena po stimulaci buněk významná aktivace genů IL-2, IL-33 a JUNB a deregulace IL-4, STAT-6 a GATA-3. Data proteinových microarray byla v souladu s daty genových expresí.

Výsledky pilotní studie naznačují, že nejen buňky Th1, ale i nerovnováha buněk Th2/Th17 může být v patogenezi T1D velmi důležitá. Další studium je však nezbytné.

Tato práce byla podporována projekty č.: 00064203 a NPVII 2B06019.

PŘÍPRAVA TERAPEUTICKY AKTIVNÍCH PEPTIDŮ V BAKTERIÍCH *Escherichia coli*

ZUZANA CHRASTILOVÁ^{a,b}, BARBORA HOUSKOVÁ^a, KLÁRA RICHTEROVÁ^a, MARTINA HLADÍKOVÁ^c, AKSANA DZIAHTSIARYK^c, MARTINA MACKOVÁ^a, VLADIMÍR KRÁL^{a,b} a JOST LUDWIG^{c,d}

^aVŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie, 166 28 Praha 6; ^bZentiva a.s. Praha, 102 37 Praha 10; ^cJihočeská univerzita, Ústav fyzikální biologie, 373 33 Nové Hradky; ^dUniversität Bonn, IZMB / MolekulareBioenergetik, Kirschallee 1, D-53115 Bonn, Německo
zuzana.chrastilova@vscht.cz

Pozice a význam peptidových a proteinových léčiv ve farmaceutickém průmyslu neustále sílí a stává se jeho nezastupitelnou součástí. Tzv. biofarmaceutika či bioléčiva se využívají pro léčbu řady dříve neléčitelných nebo obtížně léčitelných nemocí, jako je rakovina, autoimunitní onemocnění, cukrovka atd. V minulosti se peptidy a proteiny s farmakologickým účinkem získávaly extrakcí z přírodních zdrojů, nyní se jejich výroba přesouvá k novým, moderním technologiím, a to především k technologiím využívajícím DNA rekombinantní techniky, které navíc umožňují úpravu peptidů a proteinů „na míru“ tak, aby měly optimální farmakologické vlastnosti.

Cílem naší práce je vybrat a připravit vhodný expresní systém pro produkci terapeutického peptidu ve vysokých výtěžcích, tento peptid izolovat a purifikovat z mikrobiální kultury a nakonec připravit ve vhodné lékové formě, která peptid ochrání a dopraví do cílového místa v organismu.

Pro produkci terapeutického peptidu (TP) byla zvolena bakterie *Escherichia coli* a bylo testováno několik expresních systémů: a) exprese samotného genu pro TP, b) exprese s využitím fúzního proteinu (exprese genu pro TP ve fúzi s genem pro protein vázající maltosu (maltose binding protein, MBP)) a c) exprese s využitím genové polymerace (exprese genu pro TP v osmi kopiích, tzv. TP oktameru).

Připravili jsme několik expresních systémů využívajících výše zmíněné přístupy s cílem zvýšit výtěžek produkce peptidů v bakteriích *Escherichia coli*. Přístupy s využitím fúzního proteinu (b) a s využitím genové polymerace (c) se ukázaly jako vhodné metody přípravy terapeutických peptidů v *E. coli*. Nejvyšší výtěžky poskytuje technika genové polymerace. V současné době se zabýváme přípravou lékové formy připraveného peptidu s využitím nanočástic vhodného biodegradovatelného polymeru.

Tato práce vznikla za podpory grantu MPO 2A-2TP1/030 a MSM 6046137305.

ÚLOHA AROMATICKÝCH REZIDUÍ TRANSMEMBRÁNOVÝCH DOMÉN VE STRUKTUŘE A FUNKCI P2X RECEPTORŮ

MARIE JINDŘICHOVÁ^a, VOJTĚCH VÁVRA^a, TOMÁŠ OBŠIL^a, S. S. STOJILKOVIČ^b a HANA ZEMKOVÁ^a

^aFyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; ^bSection on Cellular Signaling, Program in Develop. Neuroscience, NICHD, NIH, Bethesda, USA
jindrichova@biomed.cas.cz

Purinergní P2X receptory (P2XR) jsou iontové kanály aktivované extracelulárním ATP. Jsou důležité při přenosu bolesti, kontrakci hladkých svalů, imunitní odpovědi a mnoha jiných fyziologických procesech. U obratlovců bylo doposud objeveno sedm P2X podjednotek (P2X1-7). Každá podjednotka se skládá ze dvou transmembránových domén (TM1, TM2), spojených extracelulární klíčkou obsahující ATP vazebné místo a intracelulárního N- a C-konce. Obě TM domény mají helikální uspořádání, tvoří pór iontového kanálu a jsou zapojeny v mechanismu jeho otevírání a zavírání (gating). TM1 doména nepřímým způsobem ovlivňuje citlivost P2XR k ATP. Použili jsme alaninovou skenovací mutagenezi a elektrofyziologickou techniku „patch clamp“ a identifikovali jsme aromatická rezidua TM1 domény P2X4R, která jsou důležitá pro funkci receptoru. Zaměnili jsme za alanin také aromatická rezidua v horní části TM1 u receptorů P2X1, P2X2, P2X3 a P2X7. Náhrada konzervovaného TM1 tyrosinu měla receptor-specifický účinek: u P2X1 vznikl nefunkční receptor; P2X2, P2X3 a P2X4 mutace měly zvýšenou citlivost k ATP doprovázenou prodlouženým uzavíráním iontového kanálu.

Funkce receptoru P2X7 nebyla významně ovlivněna. Alaninová záměna některých dalších aromatických reziduí v horní části TM1 domény P2X receptorů měla podobný, avšak menší účinek. U P2X4R jsme zjistili, že náhrada konzervovaného tyrosinu za další aminokyseliny způsobí zvýšení citlivosti receptoru v pořadí: Gly > Ile > Ala > Cys > Trp > Phe > Tyr. Dále jsme zjistili, že dvojitě mutovaný receptor se kinetikou podobá divokému typu P2X4R, pokud alaninem byla nahrazena aromatická rezidua nacházející se na stejné straně TM1 helixu jako konzervovaný tyrosin, a naopak mutace nacházející se na opačné straně helixu byla bez účinku. Výsledky prokázaly, že aromatická rezidua v horní části TM1, především konzervovaný tyrosin, jsou důležitá pro vazbu ATP a gating iontového kanálu P2X receptorů.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA AV IAA500110910.

NOVÉ *N,N*-DIOXIDY V ASYMETRICKÉ SYNTÉZE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

ANETA KADLČÍKOVÁ^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, 128 43 Praha 2; ^bÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, 166 10 Praha 6
daise@seznaml.cz; kotora@natur.cuni.cz

Deriváty chirálních bipyridinů jsou jedny z nejvíce využívaných katalyzátorů v asymetrické syntéze, kde vystupují buď jako Lewisovské báze nebo mohou sloužit jako ligandy pro přechodné kovy. My bychom chtěli představit novou metodu pro přípravu nových nesymetricky substituovaných chirálních bis(tetrahydroisochinolinů), jejichž oxidací vzniknou dva diastereomerní bis(tetrahydroisochinolin)-*N,N*-dioxidy. Tato metoda spočívá v [2+2+2]-cyklotrimerizaci tetraynu s benzonitrilem a (*R*)-tetrahydrofuran-2-karbonitrilem za použití katalyzátoru CpCo(CO)₂ za vzniku bis(tetrahydroisochinolinu), který byl poté oxidován pomocí kyseliny *meta*-chlorperoxybenzoové na příslušný *N,N*-dioxid (schéma 1)¹⁻³.

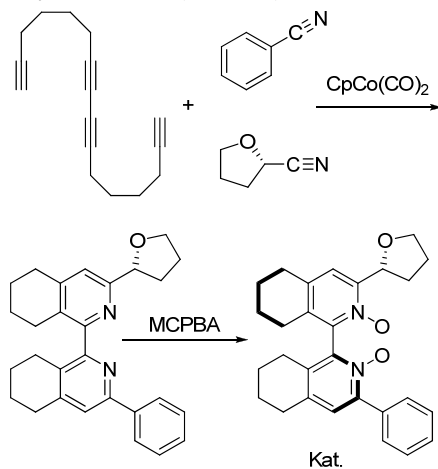


Schéma 1

Vzniklé (*R,R*)- a (*S,S*)-diastereomery byly od sebe odděleny jednoduchou sloupcovou chromatografií na silikagelu. Katalytická aktivita a asymetrická indukce připravených *N,N*-dioxidů byla vyzkoušena v allylačních reakcích benzaldehydů. Optická čistota získaných homoallylalkoholů dosahovala 96%ee (schéma 2). Tyto homoallylalkoholy sloužily jako chirální synthony pro přípravu intermediátů využitelných v syntéze přírodních látek (schéma 2).

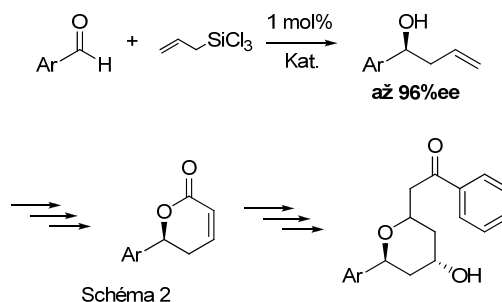


Schéma 2

Tato práce vznikla za podpory Centra základního výzkumu MŠMT (projekt č. LC06070, Struktura a syntetické aplikace komplexů přechodných kovů GA ČR (projekt č. 203/05/0102).

LITERATURA

- Hrdina R., Kadlčíková A., Valterová I., Hodačová J., Kotora, M.: *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 3185 (2006).
- Hrdina R., Valterová I., Hodačová J., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* 349, 822 (2007).
- Hrdina R., Dračinský, M., Valterová, I., Hodačová J., Císařová I., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* 350, 1449 (2008).

PROTEIN C-MYB SNÍŽUJE FREKVENCÍ APOPTÓZY BUNĚK KARCINOMU STŘEVA BEZ ÚČASTI PROTEINU COX2

LUCIA KNOPFOVÁ, KRISTINA NEŠPOROVÁ, PETR BENEŠ a JAN ŠMARDA

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
l.knopfova@seznam.cz

Kolorektální karcinom představuje jedno z nejčastějších nádorových onemocnění postihující obyvatele průmyslových zemí. Proces transformace střevních buněk zahrnuje postupné hromadění mutací a/nebo změny exprese několika protoonkogenů a nádorových supresorů. Jedním z nich je protoonkogen *c-myb*. Hladina proteinu *c-Myb*, který funguje jako transkripční faktor a podílí se na regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy, je v buňkách střevních nádorů často zvýšena. Mezi geny, jejichž exprese je regulována proteinem *c-Myb* a jejichž zvýšená aktivita byla také prokázána ve střevních nádorech, patří *cox-2* kódující

cyklooxygenasu 2. Inhibitory Cox-2 jsou považovány za perspektivní protinádorová léčiva. Význam aktivace Cox-2 pro pronádorový účinek proteinu c-Myb ve střečních buňkách je tedy z klinického hlediska zajímavý a není dosud objasněn.

Cílem tohoto projektu je určit funkci proteinu c-Myb v řízení apoptózy střečních buněk a objasnit význam Cox-2 při zprostředkování účinků tohoto transkripčního faktoru. Připravili jsme deriváty buněčných linií karcinomu střeva HCT116 a HT-29 se zvýšenou, resp. sníženou hladinou c-Myb. Ověřili jsme korelaci mezi hladinou proteinu c-Myb a mírou exprese *cox-2*. Testovali jsme citlivost buněk se změněnou hladinou proteinu c-Myb ke dvěma induktorům apoptózy: k cis-platině a TRAILu. Podařilo se nám prokázat, že buňky se zvýšenou hladinou c-Myb jsou k cis-platině i TRAILu odolnější než buňky kontrolní. Analogicky, buňky se sníženou hladinou c-Myb byly k uvedeným induktorům apoptózy citlivější. Následně jsme v buňkách vystavených cis-platině a TRAILu inhibovali aktivitu Cox-2. Zjistili jsme, že inhibice Cox-2 zvyšuje viabilitu buněk ovlivněných induktory apoptózy. Tyto výsledky dokazují, že protein c-Myb snižuje frekvenci apoptózy buněk karcinomu střeva a tento anti-apoptotický účinek není zprostředkován cyklooxygenasou 2.

Tato práce byla podporována granty 204/08/H054 a 301/09/1115 GAČR a MSM0021622415 MŠMT a IAA501630801 GAAV ČR.

ŠTUDIUM PROTEÍNŮ TIAREDOXÍNOVÉHO SYSTÉMU BAKTÉRIE *Streptomyces coelicolor* A3(2)

MICHAELA KOHÁRYOVÁ^a, PETRA ŠTEFANKOVÁ^a, IMRICH BARÁK^b a MARTA KOLLÁROVÁ^a

^a*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava;* ^b*Ústav molekulární biologie SAV, Dúbravská cesta, 845 51 Bratislava 45 kollarm@fns.uniba.sk*

Všetky aeróbní organizmy napřík tomu, že žijí vo vysoko oxidačnom prostredí (21 % kyslíka na úrovni hladiny mora), vnútro buniek uchovávajú v redukovanom stave. V cytoplazme boli identifikované dva dôležité systémy, ktoré uchovávajú redukovaný stav proteínov: tioredoxínový systém a glutatión/glutaredoxínový systém¹. Gram-pozitívna pôdna baktéria *S. coelicolor* A3(2) je unikátnym modelovým organizmom, pretože nedokáže syntetizovať glutatión. Tioredoxínový systém je jej hlavným redoxným systémom udržiavajúcim redoxnú homeostázu, ovplyvňujúcim aktivitu mnohých ďalších bielkovín a zúčastňujúcim sa ochrany pred oxidačným stresom. Genóm *S. coelicolor* A3 (2) kóduje až 3 gény pre tioredoxíny, 2 gény pre pravdepodobné tioredoxíny, 1 gén pre tioredoxínreduktázu a ďalšie dva pre pravdepodobnú tioredoxínreduktázu. Skonštruovali sme nadprodukčné kmene v bunkách *E. coli* pre tioredoxín A, A2, A3 a tioredoxínreduktázu B. Proteíny sme izolovali a charakterizovali ich vlastnosti. Tioredoxín A2 a A3 vykazujú odlišné vlastnosti v porovnaní s tioredoxínom A.

Tioredoxínreduktáza B má vyššiu afinitu k tioredoxínu A. Podarilo sa nám vyriešiť kryštalovú štruktúru tioredoxínu A v rozlíšení 1,5 Å (cit.²).

LITERATÚRA

- Holmgren A.: Thioeredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 237 (1985).
- Štefanková P., Maderová J., Barák I., Kollárová M., Otwinowski Z.: *Acta Crystallogr. F* 61, 1 (2005).

NOVÉ POLYMERY PRO KRYSALIZACI BIOLOGICKÝCH MAKROMOLEKUL: APLIKACE NA PROTEIN CD69

PETR KOLENKO^{a,b}, JAN DOHNÁLEK^{a,c}, JARMILA DUŠKOVÁ^a, TOMÁŠ KOVAL^c, TEREZA SKÁLOVÁ^a, ANDREA ŠTĚPÁNKOVÁ^{a,b} a JINDŘICH HAŠEK^a

^a*Ústav makromolekulární chemie AV ČR, 162 06 Praha 6;* ^b*Katedra inženýrství pevných látek, FJFI, ČVUT, Trojanova 13, 120 00 - Praha 2;* ^c*Fyzikální ústav AV ČR, Cukrovarnická 10, 162 00 Praha 6*
kolenpe1@jfifi.cvut.cz, hasek@imc.cas.cz

Krystalizace biologických makromolekul je nejproblematičtějším krokem při určování 3D struktur biologických makromolekul. Omezené množství polymerů používaných v komerčních krystalizačních sadách volá po návrhu a testování nových polymerů nebo ko-polymerů. Databáze struktur proteinů (PDB) poskytuje záznamy o stovkách struktur, ve kterých byly pozorovány interakce polymer-protein^{1,2}. Tyto interakce byly analyzovány, aby byl umožněn racionální návrh nových polymerů s potenciálem krystalizovat doposud neúspěšně testované a nové proteiny i jejich komplexy.

Soubor osmi nových polymerů byl úspěšně testován na několika proteinech. Nejlepší difrakční kvalitu prokázaly krystaly extracelulární domény lidského receptoru CD69 připravené pomocí nového polymeru. Struktura CD69 byla určena v rozlíšení 1,37 Å, což je nejvyšší rozlíšení ze všech známých struktur tohoto proteinu. Struktura podává detailnější náhled na intra- a intermolekulární interakce proteinu CD69.

Bylo prokázáno, že nové polymery použité v námi připravené krystalizační sadě jsou vhodnými kandidáty rozšiřujícími nízký počet polymerů používaných v komerčních sadách. Některé z nich mohou být použity dokonce jako kryoprotektanty.

Tato práce vznikla za podpory GA AV ČR (projekt IAA 500500701), GA ČR (projekt 305/07/1073) a Integrovaného projektu SPINE2-Complexes Evropské komise číslo 031220.

LITERATURA

- Berman H.M., Westbrook J., Feng Y., Gilliland G., Bhat T.N., Weissi H., Shindzalov I.N., Bourne P.E.: *Nucleic Acid Res.* 28, 235 (2000).
- Hašek J.: *Z. Kristallogr. Suppl.* 23, 613 (2006).

PURIFIKÁCIA REKOMBINANTNÉHO TRANSKRIPČNÉHO FAKTORA NFI PRE ANALÝZU A IDENTIFIKÁCIU PROTEÍNOVÝCH PARTNEROV

**GABRIEL KOLLÁROVIČ^a, DUŠANA MAJERA^b,
KATARÍNA LUCIAKOVÁ^a a PETER BARÁTH^a**

^aÚstav experimentálnej onkológie SAV, Vlárská 7, 833 91 Bratislava, Slovenská republika ^bPresent address: Jozef Stefan Institute, Jamova 39, SI-1000, Ljubljana, Slovenia
gabriel.kollarovic@savba.sk

Transkripčný faktor NFI (Nuclear Factor I) hrá dôležitú úlohu v signálnych dráhach, ktoré vedú k vývinu a diferenciácii buniek u vyšších eukaryotov¹. Pri štúdiu expície génu pre translokátor adenínových nukleotidov – 2 (*ant2*) sme identifikovali NFI ako transkripčný faktor zodpovedný za represiu transkripcie v G₀ fáze bunkového cyklu². Cieľom tejto práce bolo exprimovať a purifikovať rekombinantný NFI proteín s N-terminálnymi značkami His6 a GST a identifikovať proteínových partnerov NFI pomocou afinitnej chromatografie.

Pri snahe o priamu purifikáciu NFI proteínov prostredníctvom fúznych značiek sme zaznamenali výskyt kopurifikovaných kontaminantov. Tieto kontaminanty sme odstránili prepurifikáciou na imobilizovanom heparíne, ktorý svojom štruktúrou mimikuje DNA molekulu. Po úspešnej purifikácii rekombinantného NFI-A1 na Heparin-Sepharose a následne na Ni- a GSH-Sepharose s výtazkom 3 až 10 µg purifikovaného proteínu na liter bakteriálnej kultúry sme potvrdili jeho funkčnosť pomocou EMSA a DNase1 protection assay. Použitím takto pripravenej proteínovej návnady sme metódou afinitnej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie identifikovali niekoľko potenciálnych partnerov NFI-A1, s ktorých heRNP K a eEF1A môžu hrať úlohu pri rastom regulovanej expície génov.

Za analýzu pomocou hmotnostnej spektrometrie ďakujem RNDr. Zbynkovi Zdráhalovi, PhD., z Ústavu experimentálnej biológie Masarykovskej Univerzity, Brno. Táto práca bola podporovaná grantmi APVT, č. 26-002102 a VEGA, č. 2/6060/26 a č. 2/0074/08.

LITERATÚRA

1. Gronostajski R. M.: *Gene* 249, 31 (2000).
2. Luciaková K., Baráth P., Poliaková D., Persson A., Nelson B., D.: *J. Biol. Chem.* 278, 30624 (2003).

PŘÍPRAVA APO-CYTOCHROMU b₅ HETEROLOGNÍ EXPRESÍ V *Escherichia coli* A JEHO VYUŽITÍ PRO OBJASNĚNÍ MECHANISMU PŮSOBNÍ CYTOCHROMU b₅ V REAKCÍCH KATALYZOVANÝCH CYTOCHROMY P450

**VĚRA KOTRBOVÁ, DAGMAR AIMOVÁ, MAREK
INGR, LUCIE BOŘEK-DOHALSKÁ a MARIE
STIBOROVÁ**

*Katedra biochemie, PŘF UK, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
verakotrbova@centrum.cz*

Cytochrom b₅ (cyt b₅) je hemoprotein lokalizovaný v membránách endoplasmatického retikula, kde se podílí na reakcích katalyzovaných cytochromy P450 (CYP). V závislosti na izoformě CYP a použitím substrátu, působí buď jako stimulator nebo inhibitor CYP, anebo jako protein, který aktivitu CYP neovlivňuje. Předpokládá se, že působení cyt b₅ může vycházet ze dvou mechanismů: (i) jeho přímé participace na přenosu elektronů na CYP a (ii) jeho allosterického působení na konformaci CYP. K vysvětlení, jakým mechanismem cyt b₅ reakce CYP skutečně ovlivňuje, je tedy nezbytné posoudit efekt nejen nativního cyt b₅, ale i vzhledem k přítomnosti hemového kofaktoru schopný přenosu elektronů, ale i cyt b₅, u něhož je tato neproteinová prosthetická skupina odstraněna (apo-cytochrom b₅, apo-cyt b₅). Postup pro efektivní odstranění hemové složky z nativního cyt b₅, a tedy získání apo formy v jeho přirozené konformaci, není dosud znám. V našich experimentech jsme zkoušeli dva potenciální postupy. Jedním byla extrakce hemu z nativního cyt b₅ chemickou cestou, acetonem při pH 3. Tento postup však vedl k denaturaci jeho proteinové molekuly. Druhou metodou byla příprava apo-cyt b₅ heterologní expící v *E. coli*. Pro přípravu apo-cyt b₅ byl vyvinut originální postup jeho expice, a to za absence prekurzoru syntézy hemu v růstovém médiu pro produkci bakteriální kmen. Gen pro membránovou formu králíčího cyt b₅ byl připraven z komerčně syntetizovaných oligonukleotidů pomocí PCR a správnost jeho sekvence byla ověřena sekvenováním. Expresním vektorem z plasmidu pET-22b byly transformovány buňky *E. coli* BL-21 (DE3) Gold. Produkce apo-cyt b₅ byla indukována pomocí IPTG. Rekombinantní apo-cyt b₅ byl izolován z membránové frakce, do které byl exprimován, solubilizací a purifikací ionexovou chromatografií na DEAE-Sepharose CL6B. Purifikovaný apo-cyt b₅ byl úspěšně rekonstituován na nativní, hemovou, plně funkční formu titrací roztokem heminu. Ta vykazovala identické vlastnosti jako nativní cyt b₅ jater králíka.

Podporováno MŠMT ČR (MSM0021620808), GA UK (127208) a GA ČR (203/09/0812).

NEZVYKLÁ REGIOSELEKTIVITA V CHEMII THIACALIXARENŮ (META-SUBSTITUCE) A JEJÍ VYUŽITÍ PRO SYNTÉZU ANIONTOVÝCH A FULLERENOVÝCH RECEPTORŮ

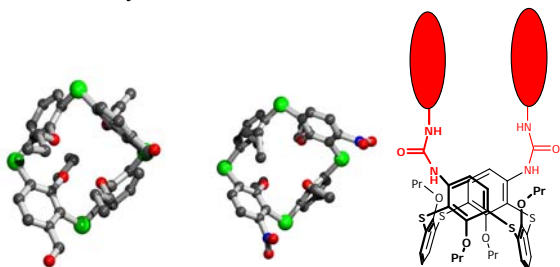
**ONDŘEJ KUNDRÁT^a, JAN KROUPA^a, VÁCLAV
EIGNER^b, MICHAELA POJAROVÁ^b, STANISLAV
BŮHM^a, JAN BUDKA^a, IVAN STIBOR^a a PAVEL
LHOTÁK^a**

^aÚstav organické chemie, ^bÚstav chemie pevných látek,
VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
kundrao@vscht.cz

Supramolekulární chemie využívá slabých, tzv. ne vazebných interakcí k návrhu a syntéze látek schopných rozpoznávat a tvořit komplexy s kationty, anionty, případně neutrálními látkami, a to v mnoha případech s vysokou selektivitou.

Deriváty thiacalix[4]arenu hrají ve skupiny relativně snadno modifikovatelných makrocyclů významnou roli. Protože dosud je známa jediná práce zabývající se S_E aromatickou tetraalkylovaného derivátu thiacalixarenu, zaměřili jsme se na tento typ reakcí. Byl proveden systematický výzkum nitrace, bromace, sulfonace a přímé formylace. Vůbec poprvé byly syntetizovány deriváty se substituenty v *meta*-polohách, oproti tomu v calixarenové chemii dochází za daných podmínek výhradně k *para*-substituci.

Takto připravené deriváty byly dále převedeny na iminové a močovinné receptory, jejichž komplexační chování vůči aniontům a fullerénům C_{60} a C_{70} v různých rozpouštědlech pomocí 1H NMR anebo UV-VIS titrací jsou právě studovány.



Obr. 1. Krystalografické struktury formyl- (vlevo) a nitro-derivátu (uprostřed), ukázka struktury aniont/fullerenového receptoru (vpravo)

Tento výzkum byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (grant 104/07/1242 a grant 203/09/0691).

APOPTÓZA NEUTROFILŮ PO KULTIVACI S BAKTERIEMI

TEREZA LANGROVÁ^a a PETR SLÁMA^{a,b}

^aMendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ^bVýzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno
xlangrov@node.mendelu.cz

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která představuje geneticky řízený sled morfologických a biochemických pochodů. Apoptóza může být vyvolána nejen regulátory vývoje organismu, ale také působením toxických faktorů¹. Mezi morfologické změny apoptotických buněk patří kondenzace cytoplasmy a chromatinu jádra - karyopyknosis, svraštění buněk a zaškrcování cytoplasmatické membrány - zeiosis a fragmentace buněk do apoptotických tělísek. Mezi biochemické znaky apoptózy patří vedle fragmentace jaderné DNA také translokace fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu cytoplasmatické

membrány. Annexin V je protein, který se váže s fosfatidylserinem a umožňuje tak detekci apoptotických buněk průtokovou cytometrií².

V této studii byly neutrofilů získané výplachem mléčné žlázy jalovic kultivovány po dobu šesti hodin s bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis* a bylo zjišťováno, jak tato kultivace ovlivní apoptózu neutrofilů a dynamiku změn, které během apoptózy probíhají. Podíl apoptotických buněk byl zjišťován průtokovým cytometrem po barvení Annexinem V a propidium jodidem, stádia apoptózy světelnou mikroskopií.

Výsledky ukázaly, že interakce obou bakterií s neutrofilů vede k výraznému poklesu počtu apoptotických buněk a také ve změnu zastoupení jednotlivých stádií apoptózy. Statisticky velmi významně vyšší podíl byl zaznamenán v počtu apoptotických tělísek u buněk kultivovaných s bakteriemi. *S. aureus* a *S. uberis* jsou původci zánětu mléčné žlázy skotu. Výsledky studie prokázaly, že ovlivňují fyziologické funkce buněk obranného systému – neutrofilů. Ve studiu apoptózy buněk imunitního systému organismu je nutné pokračovat a zjištěné skutečnosti pak využít v prevenci a terapii zánětlivých onemocnění.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE0002716202.

LITERATURA

1. Squier M. T., Sehnert A. J., Cohen J. J.: J. Leukoc. Biol. 57, 1 (1995).
2. Zhang G., Gurtu V., Kain S. R., Yan G.: Biotechniques. 23, 3 (1997).

IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE ISOFLAVONOIDŮ V AVOKÁDU AMERICKÉM (*Persea americana*)

PETRA LANKOVÁ^a, JELENA A. PROKUDINA^a, LADISLAV KOKOŠKA^b a OLDŘICH LAPČÍK^a

^aFakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6; ^bČeská zemědělská univerzita v Praze, Institut tropů a subtropů, 165 21 Praha 6
petralankova@vscht.cz

Isoflavonoidy (3-fenylchromony) jsou charakteristické sekundární metabolity bobovitých rostlin (Leguminosae), postupně ale narůstá evidence o jejich výskytu v řadě dalších taxonů¹.

V této studii jsme testovali zástupce čeledi Lauraceae (vavřínovité). Listy a plody avokáda amerického (*Persea americana*) byly lyofilizovány, rozemlety a extrahovány směsí methanol – voda 70 : 30. Extrakty byly analyzovány následujícími dvěma metodami:

a) Extrakty byly frakcionovány semipreparativní HPLC na reverzní fázi C18 a poté analyzovány ELISA metodami specifickými pro daidzein, genistein, biochanin A a jejich deriváty v polohách 7 a 4¹.

b) Extrakty byly analyzovány pomocí HPLC-MS-SIM.

V rostlině byly zaznamenány frakce, jejichž imunochemické charakteristiky a retenční časy odpovídaly

standardům daidzeinu, genisteinu, isoformononetinu, formononetinu, biochaninu A.

Jedná se o první průkaz jednotlivých isoflavonoidů u zástupce čeledi Lauraceae.

Práce vznikla za podpory projektů 525/09/0994 GAČR a MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Macková Z., Koblůvská R., Lapčík O.: *Phytochemistry* 67, 849 (2006).

ÚLOHA CYTOSKELETU A FOSFOLIPASY D V SIGNÁLNÍCH KASKÁDÁCH PŘI OBRANNÉ REAKCI ROSTLIN

JINDŘIŠKA MATOUŠKOVÁ^{a,c}, ZUZANA NOVOTNÁ^a, JAN PETRÁŠEK^{b,c}, KATEŘINA SCHWARZEROVÁ^b, LUCIE KUBÍNOVÁ, LENKA BURKETOVÁ^{a,c}, JIŘINA DUŠKOVÁ a OLGA VALENTOVÁ^a

^aVysoká škola chemicko-technologická, 166 28 Praha 6;

^bPřírodovědecká fakulta UK, 128 43 Praha 2; ^cÚstav experimentální botaniky, 165 02 Praha 6
jinmat@centrum.cz

Po napadení rostliny patogenem nastává komplexní obranná odpověď. Rostlinná buňka reaguje současně na několika úrovních například změnou elektrických potenciálů na membránách, mechanickým přeskupováním cytoskeletu¹ a organel uvnitř buňky a biochemickými změnami např. aktivací enzymů a produkcí sekundárních posílů a potažmo efektorových proteinů a jiných sloučenin. Tyto tři druhy změn se různě kombinují při indukci a uskutečňování signálních kaskád, které nakonec vyústí v obrannou odpověď². Tím, že buňka reaguje na několika úrovních současně, zajišťuje větší robustnost, rychlost, a tak i efektivitu celé reakce. Pochopit a popsat načasování a propojení všech reakcí je úkol nadmíru složitý.

Naším úkolem je najít souvislost mezi signální kaskádou kyseliny salicylové a dynamikou aktinových filament a mikrotubulů. Spojovacím článkem těchto dvou systémů by mohla být fosfolipasa D - PLD. V práci bylo prokázáno, že po ošetření kyselinou salicylovou nedochází u rostlin *Arabidopsis thaliana* (s inzerční mutací v genu pro fosfolipasu D- *PLDγ3*) ke zvýšené expresi PR proteinů (pathogen related). Expresie těchto PR proteinů je produktem signální kaskády, ve které je zapojena kyselina salicylová³. Isoforma fosfolipasy D- *PLDγ3* navíc přímo interaguje s aktinem. Dále byla sledována dynamika mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu po aplikaci kyseliny salicylové v netransformovaných a transgenních rostlinách *A. thaliana* s cytoskeletem vizualizovaným pomocí navázaného GFP a u rostlin *A. thaliana* s inzerční mutací genu pro fosfolipasu D- *PLDγ3*.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT (výzkumné centrum LC06034).

LITERATURA

1. Kobayashi I., Hakuno H.: *Planta* 217, 340 (2003).
2. Wang X.: *Plant Physiol.* 139, 566 (2005).
3. Durrant W.E., Dong X.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185 (2004).

STUDIUM DIFUZE V ČÁSTICOVÝCH KOMPOZITECH NA EPOXIDOVÉ BÁZI

TOMÁŠ MOŤKA a JAROMÍR ŠŤUPÁREK

*Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice
tomas.motka@student.upce.cz*

Epoxidové pryskyřice mají díky svým vlastnostem velmi široké použití v mnoha průmyslových odvětvích včetně tradičního využití ve stavebnictví a průmyslu nátěrových hmot. Díky svým vynikajícím elektroizolačním vlastnostem nacházejí také uplatnění v elektrotechnickém průmyslu jako izolanty a zalévací prostředky. Mezi další vhodné vlastnosti patří skvělá adheze, dobrá odolnost proti mechanickému namáhání, chemická a tepelná odolnost. Částicové kompozity, vzniklé přidáním poměrně nízkého množství plniv a jiných přísad, mají výrazně lepší vlastnosti než samotná epoxidová matrice¹.

Pochody vedoucí ke zhoršení či úplné ztrátě vlastností systému je nutno posuzovat komplexně jako souhrn několika fyzikálně-chemických procesů, které jsou navzájem propojeny a ovlivněny. Jedním z těchto procesů je difuze pronikajícího agresivního média, nejčastěji kapaliny, vytvrzeným epoxidovým systémem.

Metody hodnocení mechanické vlastnosti exponovaného kompozitu jsou například dynamická termomechanická analýza (DMA) a termomechanická analýza (TMA). Mezi již klasické způsoby studia difuze patří metoda optické mikroskopie, jenž je založena na expozici vzorku sledovaného systému v obarveném roztoku difundující kapaliny a následné optické detekci postupu difuzního čela barviva matricí. Další metoda mikroskopových sklíčků využívá základních principů metody optické mikroskopie, umožňuje však oproti metodě optické mikroskopie studium difuze i u plněných, mírně průsvitných epoxidových systémů. Vzhledem ke změnám v matrici, způsobené difundující kapalinou, dochází pronikajícím světlem k jeho lomu na rozhraní „exponované matrice – neexponovaná matrice“ a tím i k vytvoření difuzního čela. A to po expozici v roztoku neobarvené difundující kapaliny².

Cílem práce je postihnout souvislosti mezi mechanickými vlastnostmi a stupněm difuze v závislosti na stupni vytvrzení epoxidového systému a obsahu částicového plniva.

LITERATURA

1. Kalenda P., Kalendová A.: *Dyes and Pigments* 27, 305 (1995).
2. Mořka T.: *Studium vlastností zalévací epoxidové pryskyřice Veropal 148, Pardubice, (2005)*

ANALÝZA EXPRESE A FUNKCE MICRORNA U CHRONICKÉ LYMFATICKÉ LEUKÉMIE

MAREK MRÁZ, KARLA MALINOVÁ, ŠÁRKA PAVLOVÁ, JIRÍ MAYER a ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ

*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno
marek.mraz@email.cz*

Představy o komplexnosti regulace genové exprese byly nedávno rozšířeny o úlohu molekul microRNA (miRNA), což jsou vysoce konzervované RNA tvořící 3-5 % ze všech genů v lidském genomu (tj. cca 1000 genů). miRNA ovlivňují stabilitu a translaci mRNA cílových genů a mají zásadní funkce v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze¹. Prvním potvrzením významu miRNA u nádorů bylo zjištění o lokalizaci dvou miRNA *miR-15a* a *miR-16-1* v oblasti 13q14, která je deletována u 50 % případů chronické lymfatické leukémie (CLL). Za protein regulovaný těmito miRNA byl později označen Bcl2, který se významně podílí na deregulaci apoptózy a buněčného cyklu u CLL. K vzniku dalších defektů v regulaci bun. cyklu může docházet v průběhu onemocnění (např. delece/mutace p53) a tím k progresi choroby. V naší práci jsme se zaměřili na analýzu exprese miRNA u nejagresivnějšího subtypu onemocnění s delecí/mutací genu p53 a hledání miRNA hrajících úlohu v patogenezi CLL.

Pro analýzy byla odebrána periferní krev 30 pacientů s CLL, u nichž byly zjištěny standardní prognostické údaje (FISH, mutační status p53, mutační status těžkého řetězce imunoglobulinu (IgV_H), exprese ZAP±). Pomocí metodiky qRT-PCR (35 vybraných miRNA) a microArray byla v separovaných nádorových buňkách studována exprese miRNA. Byla zjištěna snížená exprese tří miRNA – *miR-34a*, *miR-29c* a *miR-17-5p* – u pacientů s deletovaným a/nebo mutovaným p53 (del/mut p53 n=12 vs. wt p53 n=18)². Tyto miRNA regulují proteiny často studované v souvislosti s patogenezi CLL. *miR-34a* reguluje expresi Bcl2 proteinu a *miR-29c* reguluje proto-onkogeny Tc11 a Mcl1, jejichž abnormální exprese je známa z myších modelů vzniku CLL. *miR-17-p* je regulována c-myc (klastř *miR-17-92*) a řídí expresi E2F1, p21, cyklinu D1. Výsledky naznačují, že analýza exprese miRNA může být nástrojem pro určení prognózy a přístupu k terapii pacientů. Vzhledem k předpokládanému vlivu zmíněných miRNA na další důležité proteiny mohou tyto hrát podstatnou roli v samotné kancerogenezi CLL^{2,3}.

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR/9293-3/2007.

LITERATURA

1. Kusenda B., Mráz M., Mayer J., Pospíšilová Š.: *Biomedical Papers* 150, 205 (2006).
2. Mráz M., Malinová K., Kotašková J., Pavlová Š., Tichý B., Malčíková J., Staňo Kozubík K., Šmardová J., Brychtová Y., Doubek M., Trbušek M., Mayer J., Pospíšilová Š.: *Leukemia*, e-pub ahead of print (22 Jan., 2009), doi:10.1038/leu.2008.377.

3. Mráz M., Pospíšilová Š., Malinová K., Šlapák I., Mayer J.: *Leukemia and Lymphoma*, v tisku (2009)

EFEKT NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN NA BUNĚČNOU SMRT VYVOLANOU PŮSOBENÍM NASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN

VLASTA NĚMCOVÁ-FÜRSTOVÁ, TEREZA KOPSKÁ a JAN KOVÁŘ

*Oddělení buněčné a molekulární biologie ÚBBMB & Centrum pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy, 3. lékařská fakulta UK, Ruská 87, 100 00 Praha 10
vlasta.furstova@tiscali.cz*

Chronicky zvýšená hladina mastných kyselin (MK) v krvi přispívá u nemocných s diabetem 2. typu k úbytku pankreatických beta buněk, a to zejména mechanismem buněčné smrti (apoptózy). Na experimentálním modelu linie lidských pankreatických beta buněk NES2Y jsme již dříve ukázali, že saturované MK (e.g. kyselina palmitová a stearová), na rozdíl od nenasycených MK (kyselina palmitolejová a olejová) indukují v koncentraci 1 mM a vyšších buněčnou smrt¹. Cílem práce bylo otestovat vliv nenasycených MK na proapoptické působení nasycených MK u buněčné linie NES2Y.

Nenasycené MK již od koncentrace 0,2 mM kompletně inhibují apoptotický efekt 1 mM koncentrace nasycených MK ($P < 0,01$), jak jsme zjistili spočtením živých buněk po 96 hodinách inkubace buněk NES2Y s testovanými MK. Po indukci buněčné smrti působením nasycených MK (1 mM, 24 h) jsme detegovali signifikantní zvýšení hladiny aktivované kaspasy-2 ($P < 0,02$) a mírné zvýšení hladiny aktivovaných kaspas-8 a kaspas-9 ($P < 0,05$). Nedetegovali jsme však signifikantní zvýšení hladiny aktivované kaspasy-3. Hladinu aktivovaných kaspas výrazně snížila přítomnost nenasycených MK ($P < 0,05$). Působení nasycených MK nevyvolalo ve sledovaných buňkách zvýšení hladiny „reactive oxygen species“ (ROS) ani výrazné snížení mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$), které by předcházelo aktivaci kaspas.

Buněčná smrt indukovaná nasycenými MK u pankreatických beta buněk je zprostředkována zejména aktivací kaspasy-2 bez aktivace kaspasy-3 a nedochází při ní k výrazným změnám v hladinách ROS a v úrovni $\Delta\psi_m$. Nenasycené MK jsou schopny efektivně inhibovat buněčnou smrt indukovanou působením nasycených MK včetně aktivace kaspas. Výsledky našich experimentů poukazují na skutečnost, že mitochondriální dráha indukce apoptózy není hlavní drahou buněčné smrti spouštěné působením nasycených MK.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem 3. LF UK MSM 0021620814.

LITERATURA

1. Furstova V., Kopska T., James R.F., Kovar J.: *Life Sci.* 82, 684 (2008).

EXPRESÍ GENŮ OPERONU PRO KONVERZI ALDOXIMŮ, NITRILŮ A AMIDŮ Z *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* A4

ADAM PAVLÍK, O. VOLKOVA, M. KNOPPOVÁ,
J. NEŠVERA a M. PÁTEK

Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Vítězská 1083, 142 20 Praha 4
adam.pavlik@biomed.cas.cz

Kmen *Rhodococcus erythropolis* A4 produkuje vysoké aktivity nitrilhydratasy (>14000 U/L) a amidasy (>1700 U/L) v kulturách, u nichž byly optimalizovány zdroje živin a induktorů. Tyto enzymy lze využít pro hydrolyzu alifatických i aromatických nitrilů a amidů. Geny pro podjednotky nitrilhydratasy byly klonovány a izolací okolních chromosomových oblastí byl nalezeny geny odpovědné za dráhu přeměny aldoximů na karboxylové kyseliny. Kompletní sekvence tohoto úseku (9552 bp, GenBank Acc. No. AM946017) zahrnuje osm stejně orientovaných genů řídících metabolismus aldoximů, nitrilů a amidů: *nhr4* (regulátor 4), *oxd* (aldoximdehydratasa), *nhr2* (regulátor 2), *nhr1* (regulátor 1), *ami* (amidasa), *nha1*, *nha2* (alfa a beta podjednotky nitrilhydratasy) a *nhr3* (regulátor 3). RNA-hybridizace neprokázala společný velký transkript těchto genů, ale kratší transkripty pokrývající 1 až 4 geny. Gen pro amidasu (*ami*) je přepisován samostatně (transkript 1,6 kb), dále společně s geny *nha1*, *nha2* (transkript 3 kb) a do společného transkriptu genů *ami*, *nha1*, *nha2* a *nhr3* (5 kb). Fragmenty obsahující potenciální promotorové oblasti operonu byly klonovány v *promoter-probe* vektoru pEPR1. Transkripční aktivitu vykazovaly oblasti před geny *oxd*, *nhr2*, *nhr1*, *ami*, *nha1* a *nhr3*. Metodou *primer-extension* byl nalezen transkripční počátek genu *ami*. S použitím DNA-afinitní chromatografie a hmotnostní spektrometrie jsou vyhledávány proteiny, které se vážou na regulační oblast genu *ami*. Gen *ami* byl klonován v expresních vektorech pEXT20 (exprese v *Escherichia coli*) a pFEX16 (exprese v *R. erythropolis*). Aktivita enzymu produkovaného buňkami *E. coli* potvrdila, že pro expresi genu pro amidasu v heterologním systému není potřeba přítomnost dalšího genu (např. aktivátoru). Cílem analýz mechanismu regulace genu *ami* a jeho homologní nebo heterologní exprese je získat kmen, který by vykazoval vysokou aktivitu amidasy.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT LC06010 BIOTRANS.

INTERAKCE N-TERMINÁLNÍHO ZBYTKU KYSELINY MYRISTOVÉ S MATRIXOVÝM PROTEINEM MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU

JAN PRCHAL^a, MICHAL DOLEŽAL^a, JIŘÍ VLACH^a,
JAN LIPOV^a, MICHAELA RUMLOVÁ^b, ERIC
HUNTER^c, TOMÁŠ RUML^a a RICHARD HRABAL^{a*}

^aVysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5 CZ-166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie,

CZ-166 10 Praha 6; ^cEmory Vaccine Center at Yerkes Nat. Primate Res. C., Atlanta, USA
richard.hrabal@vscht.cz

Polyprotein Gag je prekursorem všech strukturních proteinů a hraje významnou úlohu při tvorbě a pučení virové částice. N-terminální doména Gag, matrixový protein (MA), interaguje s buněčnou membránou, protože je na povrchu nezralé virové částice. MA interaguje s cytoplasmatickou membránou pomocí kladně nabitých zbytků aminokyselin a myristoylu kovalentně připojeného k N-terminálnímu glycinu. Bylo popsáno několik jedno a vícebodových mutací MA, které ovlivňují životní cyklus M-PMV¹.

V naší práci jsme se zaměřili na určení molekulární podstaty změny fenotypu způsobené mutacemi T411/T781 a Y28F/Y67Fv M-PMV MA. Částice nesoucí tyto mutace nejsou schopny pučet skrz cytoplasmatickou membránu a akumulují se u ní^{1,2}.

Určili jsme třírozměrné struktury obou mutantů a divokého typu MA pomocí NMR spektroskopie. Mutace nezpůsobila zásadní změny celkové struktury proteinu, ale zmutované hydrofobní aminokyseliny jsou orientovány do jádra proteinu, kde mohou interagovat se zbytkem kyseliny myristové. Tato zjištění podporují hypotézu, že zvýšení hydrofobicity jádra proteinu brání uvolnění myristoylu pro interakci s membránou, a tak brání pučení nezralých virových částic z buňky. Pro potvrzení této hypotézy jsme se zaměřili na určení struktury myristoylovaného MA s důrazem na interakci myristoylu s jádrem proteinu a na rozdíly mezi mutanty a divokým typem.

Tato práce byla financována z prostředků: Ministerstvo školství ČR 1M6837805002, MSM 6046137305 a ME 904, GAČR # 203/07/0872 a grant # CA 27834 od National Institutes of Health

LITERATURA

1. Rhee S. S., Hunter E.: EMBO J. 10, 535 (1991).
2. Stansell E., Tytler E., Walter M. R., Hunter E.: J. Virol. 78, 5023 (2004).

NEUROBLASTOMOVÁ BUNĚČNÁ LINIE REZISTENTNÍ K ELLIPTICINU – GENETICKÁ A EXPRESNÍ CHARAKTERISTIKA

PAVEL PROCHÁZKA^{a*}, JITKA POLJAKOVÁ^{a,b},
ANTONÍN LIBRA^c, MARTIN BUNČEK^c,
JAN HRABĚTA^a, MARIE STIBOROVÁ^b
a TOMÁŠ ECKSCHLAGER^a

^aKlinika dětské hematologie a onkologie UK, 2. LF, 150 06 Praha 5, ^bKatedra biochemie PřF UK, 128 40 Praha 2, ^cGeneri Biotech, 500 11 Hradec Králové
proch.pavel@gmail.com

Neuroblastom vysokého rizika (HR NBL) je jedním z nejhůře léčitelných nádorů dětského věku. Stále se proto hledají nové léky a léčebné postupy. Jedním z nich může být i cytostatikum ellipticin, u kterého jsme prokázali

cytotoxický efekt na buňky HR NBL *in vitro*. Interkalace do DNA a inhibice topoizomery II alfa (*TOP2A*) jsou považovány za jedny z hlavních mechanismů jeho cytotoxického účinku. Ellipticin působí po metabolické aktivaci také jako alkylační činidlo, kovalentně modifikující DNA. Významným faktorem ovlivňujícím jeho účinek a specificitu může být i rozdílná individuální výbava enzymů důležitými pro jeho bioaktivaci. Cílem naší práce bylo poznat mechanismy, které vyvolávají rezistenci vůči ellipticinu. Lidská HR NBL linie rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4rELLI) byla získána dlouhodobou kultivací UKF-NB-4 s postupně se zvyšující koncentrací ellipticinu. UKF-NB-4rELLI jsme analyzovali pomocí komparativní genomové hybridizace, změny chromosomových oblastí ověřili fluorescenční *in situ* hybridizací, expresi genů jsme testovali metodou expresní „microarray“ a ověřili RT PCR. Zjistili jsme změny v expresi řady genů. Za nejvýznamnější u rezistentní linie považujeme snížení exprese topoizomery 1 a 2A, provážené ztrátou zmožení genu *TOP2A*. Dalším mechanismem, který může být zodpovědný za rezistenci vůči ellipticinu, je zvýšená exprese antiapoptotického genu *Bcl-2*. Apoptózu je možné zablokovat i delecí genu *BAX*. UKF-NB-4rELLI¹ má oblast 19q s lokalizací genu *BAX* „deletovanou“, exprese mRNA *BAX* však zůstává beze změn. Oblasti chromosomů 7q21 (*MDR1*), 10q24 (*MRP2*), 12q13-14 (*LRP1*), 16p13 (*MRP1*), bývají u chemorezistentních nádorů amplifikované. UKF-NB-4rELLI žádné takové změny, ani změny exprese na úrovni mRNA, nevykazuje. Na úrovni proteinu jsme však našli zvýšení exprese *LRP* a *MRP2*. Získané výsledky potvrzují, že rezistence vůči ellipticinu je podmíněna několika rozdílnými mechanismy.

Práce vznikla za podpory MŠMT (MSM0021620813) a GA UK (7926/2007).

PEPTIDOGLYKÁNOVÉ HYDROLÁZY Z ČELADE *Enterococcaceae* AKO POTENCIÁLNE ENZYBIOTIKÁ

LENKA SERENČOVÁ, MÁRIA PIKNOVÁ, PETER PRISTAŠ a PETER JAVORSKÝ

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Šoltésovej 4-6,
040 01 Košice
serencova@saske.sk

Hydrolázy bakteriálnych bunkových stien sú v súčasnosti značne študovanou triedou enzýmov. Ich substrátom je najdôležitejšia zložka bunkových stien baktérií – peptidoglykán. Vďaka ich úzkej cieľovej špecificite a nízkej pravdepodobnosti vzniku rezistencie sa uvažuje o možnostiach ich terapeutického využitia, ako alternatívy klasických antibiotík¹. Purifikované peptidoglykánové hydrolázy majú oproti bežne používaným antibiotikám niekoľko výhod, predovšetkým cieleňé usmrcovanie antibioticky rezistentných patogénnych baktérií, schopnosť, ktorú zabezpečujú ich CWT (cell wall tagreting) domény².

V poslednej dobe sa jednou z hlavných príčin nozokomiálnych infekcií stávajú enterokoky³. O peptidoglykánových hydrolázach s cieľovou špecificitou proti tejto

skupine baktérií existuje len málo poznatkov. V našej práci sme sa zamerali na štúdium enterolyzínu A (EnlA), peptidoglykánovej hydrolázy s lytickou aktivitou proti širokému spektru potenciálnych patogénov, vrátane enterokokov. EnlA bol na našom ústave heterologicky exprimovaný a purifikovaný, ako rekombinantný, biologicky aktívny proteín⁴. V našej práci sme študovali modulárnu organizáciu EnlA s využitím komparatívnej sekvenčnej analýzy. Následnou fúziou CWT domény EnlA so zeleným fluorescenčným proteínom (GFP) a testovaním tohto fúzneho proteínu sme potvrdili predpokladanú funkciu CWT domény a jej význam pre cieľovú špecificitu EnlA. Podobným spôsobom plánujeme kombinovať CWT a katalytické domény rôznych peptidoglykánových hydroláz s cieľom pripraviť nové, účinnejšie a úzko cieľovo špecifické enzýmy.

Táto práca bola podporovaná grantom APVV-0586-07 a VEGA 2/0006/08.

LITERATÚRA

1. Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. Q.: *J. Appl. Microbiol.* 104, 1 (2008).
2. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A.: *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 231, 366 (2006).
3. Sood S., Malhotra M., Das B. K., Kapil A.: *Indian J. Med. Res.* 128, 111 (2008).
4. Nígutová K., Serenčová L., Píknová M., Javorský P., Pristas P.: *Protein Expr. Purif.* 60, 20 (2008).

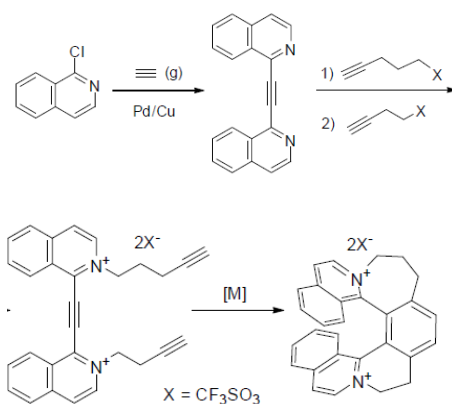
[7]HELQUAT: FLEXIBILNÍ SYNTÉZA SYMETRICKÝCH A NESYMETRICKÝCH HELIKÁLNÍCH DIKATIONTŮ

**LUKÁŠ SEVERA^a, IVANA ČÍSAŘOVÁ^b,
DAVID ŠAMAN^a a FILIP TEPLÝ^{a,*}**

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bKatedra anorganické
chemie, Přírodovědecká fakulta UK, 128 43 Praha 2
severa@uochb.cas.cz

Byl vyvinut modulární vysoce praktický syntetický přístup k nové skupině vodorozpustných fluorescentních dikationických helikálních struktur se sedmi kondenzovanými kruhy – [7]helquatům. Prvním krokem této přípravy je Sonogashirův kaplink chloroisochinolinu s plynným acetylenem. Pro syntézu symetrických [7]helquatů je produkt biskvarternizován příslušným triflátem za vzniku symetrického triynu¹, při přípravě nesymetrických struktur se provede nejprve monokvarternizace prvním triflátem v toluenu a po izolaci se monokation kvarternizuje jiným triflátem v dichlormethanu za vzniku nesymetrického triynu. Následuje klíčová [2+2]cykloisomerace² triynu, kdy vzniká příslušný [7]helquat. Na purifikaci kationických struktur není třeba chromatografie – stačí promytí vhodnými rozpouštědly či extrakce. Struktury některých triynů a helquatů byly potvrzeny rentgenovou difrakcí¹.

Dikationty plánujeme testovat jako organokatalyzátory. Na základě podobnosti s viologeny lze očekávat herbicidní aktivitu³. Možná interakce s DNA je zkoumána.



Projekt byl podpořen projekty UOCHB (Z4 055 0506) a GA ČR (203/09/0705).

LITERATURA

- Adriaenssens L., Severa L., Šálová T., Císařová I., Pohl R., Šaman D., Rocha S.V., Finney N.S., Pospíšil L., Slaviček P., Teplý F.: *Chem. Eur. J.* 15, 1072 (2009).
- [2+2+2] cykloizomerace jako klíčový krok syntézy neionických helikálních struktur byla vyvinuta ve skupině Dr. Starého: Stará I.G., Starý I., Kollárová A., Teplý F., Šaman D., Tichý M.: *J. Org. Chem.* 63, 4046 (1998).
- Khambay B. P. S., Bromilow R. H., v knize: *The New Chemistry*, s. 232. (Hall N., ed.) Cambridge University Press 2000.

FOSFANYL FERROCENOVÉ AMIDY NESOUCÍ 2-HYDROXYETHYLOVÉ SKUPINY NA AMIDOVÉM DUSÍKU

JIŘÍ SCHULZ, IVANA CÍSAŘOVÁ
a PETR ŠTĚPNIČKA*

Univerzita Karlova v Praze, PřF, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
schulz@natur.cuni.cz, stepnic@natur.cuni.cz

Během studia koordinačních vlastností a katalytického uplatnění fosfinoferrocenových karboxylových kyselin¹ jsme se zaměřili rovněž na studium odvozených fosfinoamidů. S cílem navázat na předchozí práci² jsme se rozhodli připravit dva nové fosfinoferrocenové amidy nesoucí 2-hydroxyethyllové skupiny na amidovém dusíku a studovat jejich koordinační vlastnosti a možnosti katalytického využití.

Amidy **1** a **2** byly připraveny amidací 1'-(difenylofosfino)-ferrocenkarboxylové kyseliny (HdPf)^{1,3}. Tyto ligandy mohou díky svému polárnímu charakteru a možnosti tvorby vodíkových vazeb vykazovat zvýšenou rozpustnost

v polárních organických rozpouštědlech a také sloužit jako synthony pro supramolekulární chemii komplexů přechodných kovů. Z tohoto důvodu byly připraveny rovněž palladnaté komplexy (**3**, L = 1; **4**, L = 2). Pomocí rentgenostrukturní analýzy bylo zjištěno, že připravené ligandy i jejich palladnaté komplexy tvoří v pevném stavu komplikované supramolekulární struktury prostřednictvím vodíkových vazeb, měnící se od jednorozměrných řetězců až po trojrozměrné molekulární sítě. Katalytická aktivita palladnatých komplexů **3** a **4** byla testována v palladiem katalyzované Suzukiho reakci fenyloborité kyseliny s arylbromidy ve vybraných polárních rozpouštědlech.

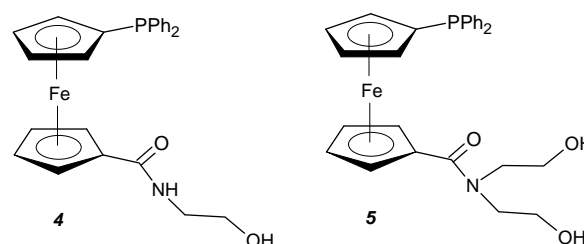


Schéma 1. Fosfanylamidy **1** a **2**

LITERATURA

- Štěpnička P.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005, 3787.
- Štěpnička P., Schulz J., Císařová I., Fejfarová K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 72, 453 (2007).
- Podlaha J., Štěpnička P., Ludvík J., Císařová I.: *Organometallics* 15, 543 (1996).

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE HYBRIDIZACE DNA AFLATOXINOGENNÍCH PLÍSNÍ S VYUŽITÍM UHLÍKOVÝCH ELEKTROD

PETRA ŠNĚVAJSOVÁ^a, LUKÁŠ TISOŇ^a
a JARMILA VYTRÁSOVÁ^b

^a Katedra analytické chemie, FCHT, Univerzita Pardubice, 532 10 Pardubice; ^b Katedra biologických a biochemických věd, FCHT, Univerzita Pardubice, 530 03 Pardubice
petra.snevajsova@upce.cz

Bioanalytické stanovení DNA má obvykle za úkol určit přítomnost určité sekvence nukleotidů ve vzorku. Pro analýzu se využívá hybridizace vzorku s komplementární sekvencí (sondou či próbou) na základě komplementarity bazí v DNA. K elektrochemické detekci hybridizace DNA se nejvíce používají elektrody uhlíkové a zlaté. Detekce hybridizace DNA na elektrodách využívá nejrůznějších principů, včetně vlastní elektroaktivity DNA, elektrochemicky aktivních indikátorů, kovalentně značených signálních sond¹ atd.

Cílem práce je zavést metodiku pro elektrochemickou detekci vybraného úseku DNA kódujícího biochemickou cestu syntézy aflatoxinu B₁ u některých kmenů plísní rodu *Aspergillus*. Princip metody se zakládá na aktivitě enzymu alkalické fosfatasy (ALP). Cílová DNA je nejdříve imobilizována na povrch elektrody, poté hybridizuje se sondou značenou biotinem. Na biotin je navázán konjugát

streptavidinu s ALP. Alkalická fosfatasa katalyzuje přeměnu elektroinaktivního substrátu 1-naftylfosfátu na elektroaktivní produkt 1-naftol, jehož signál je detegován voltametriky.

K tomuto účelu bylo využito tříelektrodeového uspořádání, kdy jako měrná elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (CPE) nebo uhlíková tištěná elektroda (SPCE), srovnávací argentchloridová elektroda a jako pomocná elektroda platinová. Metoda byla nejdříve optimalizována pro syntetické oligonukleotidy. Nejvhodnější parametry jednotlivých kroků elektrochemické detekce hybridizace DNA byly následně využity při analýze vzorků DNA izolovaných z některých kmenů aspergilů.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR (MŠM0021627502), GA ČR (203/08/1536; 203/09/0148) a LC 06035.

LITERATURA

1. Vacek J., Masařík M., Paleček E., Fojta M.: Čs. Čas. Fyz. 56, 293 (2006).

AKCEPTORY A SEKUNDÁRNÍ ZDROJE SINGLETOVÉHO KYSLÍKU A JEJICH SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY S CYKLODEXTRINŮ

LENKA SLAVĚTÍNSKÁ^a, JIŘÍ MOSINGER^b a PAVEL KUBÁT^c

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha 6; ^bKatedra anorganické chemie, PřF UK, 128 40 Praha 2; ^cÚstav fyzikální chemie AV ČR, 182 23 Praha 8
slavetinska@uochb.cas.cz

Singletový kyslík ¹O₂ našel uplatnění především díky svému silnému cytotoxickému a oxidativnímu působení v řadě aplikací, jako jsou např. fotodynamická léčba nádorových onemocnění a aterosklerosy, inaktivace virů a bakterií, fotodesinfekce mikrobiálně znečištěných vod a vývoj nových ekologicky šetrných herbicidů a insekticidů¹. Singletový kyslík reaguje [4+2] cykloadicí s aromatickými sloučeninami (anthracenové a naftalenové deriváty) za vzniku různě stabilních endoperoxidů. Jejich termolýzou dochází ke zpětné reakci, při které vzniká původní sloučenina a uvolňuje se kyslík, částečně v singletovém stavu. Takovéto aromatické sloučeniny pak mohou být označovány za akceptory a sekundární zdroje ¹O₂ (cit.^{2,3}).

Cyklodextriny CD jsou známé tvorbou inkluzních „host-guest“ komplexů s řadou organických i anorganických molekul vázaných do cyklodextrinové kavity kombinací hydrofobních a elektrostatických interakcí. Tvorba „host-guest“ komplexů má za následek změnu fyzikálních a fotofyzikálních vlastností inkludovaných látek. Cyklodextriny jsou studovány zejména jako nosiče léků, neboť zvyšují stabilitu „guest“ molekul vůči tepelné degradaci, zvyšují jejich rozpustnost a také biologickou aktivitu⁴.

V této studii byla připravena série vodorozpustných aromatických endoperoxidů využitelných jako sekundární zdroje ¹O₂, u nichž byla prokázána schopnost vytvářet „host-guest“ komplexy s cyklodextriny. Sledován byl také vliv cyklodextrinů na fyzikální a fotofyzikální vlastnosti inkludovaných akceptorů/sekundárních zdrojů ¹O₂.

LITERATURA

1. Schweitzer C., Schmidt R.: Chem. Rev. 103, 1685 (2003).
2. Aubry J. M., Pierlot C., Rigaudy J., Schmidt R.: Acc. Chem. Res. 36, 668 (2003).
3. Slavětinská L., Mosinger J., Kubát P.: J. Photochem. Photobiol., A: 195, 1 (2008).
4. Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).

NOVÉ MOŽNOSTI PŘI DETEKCI LATENTNÍ INFEKCE BAKTERIÍ *Mycobacterium tuberculosis* – STANOVENÍ CYTOKINŮ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE A KVANTITATIVNÍHO PCR

ONDŘEJ STANĚK^a, IRENA LINHARTOVÁ^a, ILONA BÍBOVÁ^a, MARCELA ŠIMŠOVÁ^b a PETER ŠEBO^a

^aMikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, Václavská 1083, 142 20 Praha 4; ^bProteix s.r.o., Nad Safinou II/365, 252 42 Vestec
stanek@biomed.cas.cz

V poslední době opět stoupá počet lidí nakažených tuberkulózou a to nejen v rozvojových zemích třetího světa, ale v důsledku migrace také v zemích vyspělých. Odhaduje se, že jedna třetina světové populace je nakažena latentní formou tohoto onemocnění, otevřená forma se následně rozvine u desetiny takto infikovaných, v polovině případů v prvních dvou letech po kontaktu s bakterií. Každý člověk s otevřenou formou tuberkulózy pak přibližně infikuje dalších 10-15 lidí. Kritickým bodem v boji proti této zákeřné nemoci je včasné a přesné odhalení latentní infekce bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI). V současné době pro tyto účely nejpoužívanější Tuberkulinový kožní test, založený na stimulaci PPD (Purified Protein Derivative), je však nepřesný díky křížovým reakcím s antigeny environmentálních mykobakterií a používané BCG vakcíny. Tento nedostatek se podařilo vyřešit u nových diagnostických testů použitím antigenů CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein) a ESAT-6 (6-kDa early secreted antigenic target). Ty jsou kódovány v lokusu RD1 (Region of Difference) přítomném pouze u infekčních kmenů. Tyto antigeny společně s antigenem Tb 7.7 jsou používány v komerčně dostupném kitu „Quantiferon TB-gold in tube“ pro detekci latentní tuberkulózy, založeném na *in vitro* restimulaci T-buněčné odpovědi v krvi pacienta provázenou zvýšenou expresí IFN- γ , který je následně stanoven metodou ELISA. Porovnávali jsme hladinu IFN- γ po *in vitro* restimulaci periferních mononukleárních krevních buněk jak volnými antigeny CFP-10, Esat-6 a Tb 7.7, tak i ekvimolárním komplexem CFP-10/Esat-6, směsí všech tří antigenů a ve formě antigen-fúzního proteinu s adenylát

cyklázovým toxoidem, jako nosiče a dopravce antigenu. Hladina IFN- γ byla stanovena pomocí průtokové cytometrie (FACS) a kvantitativním PCR (q-PCR). Získaná data byla souběžně porovnávána s komerčním kitem Quantiferonem TB-gold. Z prvních výsledků je patrné, že pro stimulaci buněk s kvantifikací na průtokovém cytometru a q-PCR je třeba jen čtvrtiny času a díky dostatečně nízkému detekčnímu limitu je využito i velmi nízkého počtu paměťových T-buněk. Mezi další výhody patří možnost stanovit počet CD4+ a CD8+ T-buněk uvolňujících IFN- γ u metody průtokové cytometrie, což je obzvláště důležité u CD4+ deficientních pacientů a u q-PCR je podstatnou výhodou možnost snadného stanovení ostatních cytokinů.

Tato práce vznikla za podpory grantů KAN200520702 a NPVII 2B06161.

ANALÝZA EXPRESE CYKLINU D1 U LYMFOMU Z BUNĚK PLÁŠŤOVÉ ZÓNY

LENKA ŠTEFANČÍKOVÁ^{a,b}, MOJMÍR MOULIS^{a,c}, PAVEL FABIAN^d, IVA FALKOVÁ^a, INGRID VÁŠOVÁ^e a JANA ŠMARDOVÁ^{a,b,c}

^aÚstav patologie a ^eInterní hematologická klinika, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, ^bÚstav experimentální biologie, PŘF MU, 611 37 Brno, ^cLF MU, 662 43 Brno, ^dOddělení patologie, MOU, Žlutý kopec 7, 565 53 Brno stefancikoval@seznam.cz

Lymfom z buněk pláštěvé zóny (mantle cell lymphoma, MCL) je vzácné, agresivní a prognosticky málo příznivé nádorové onemocnění. Vzniká abnormální proliferací B buněk ve vnějším okraji folikul lymfatických uzlin. Cytogeneticky je MCL charakterizován translokací t(11;14)(q13;q32), která je přítomná v nádorové tkáni téměř všech pacientů. Tato translokace vede k předřazení zesilovače transkripce genu pro těžký řetězec imunoglobulinu před gen pro cyklin D1. Důsledkem je vysoká exprese cyklinu D1, regulátoru buněčného cyklu.

Detailně jsme analyzovali cyklin D1 v nádorové tkáni 33 pacientů s MCL diagnostikovaných ve FN Brno v letech 2003 až 2008. Translokaci t(11;14) jsme stanovovali fluorescenční hybridizací *in situ* (FISH). Zvýšenou hladinu mRNA cyklinu D1 jsme zjišťovali kompetitivně reverzně transkriptázovou PCR (RT-PCR) a množství proteinu jsme detegovali westernovým přenosem a imunohistochemicky. Výsledky všech metod spolu korelovaly. U 31 případů (94 %) jsme prokázali translokaci t(11;14) a zvýšenou hladinu jak mRNA, tak proteinu cyklinu D1. Ke stanovení proteinu cyklinu D1 westernovým přenosem jsme použili dvě protilátky (SP4 a CD1.1). Zatímco protilátka SP4 byla vysoce citlivá a specifická a detegovala pouze cyklin D1, protilátka CD1.1 ukazovala u některých případů vedle cyklinu D1 i další protein. Na základě jeho molekulové hmotnosti a srovnáním s výsledky kompetitivní RT-PCR se mohlo jednat o cyklin D2. To jsme prokázali protilátkou Ab-4 specifickou pro cyklin D2, která jasně určila jeho zvýšenou hladinu u 2 případů (6 %) bez t(11;14). Onkogenní účinek

cyklinu D1 je u těchto vzácných případů MCL nahrazen cyklinem D2.

Práce byla podpořena IGA MZ NR/9305-3, MŠMT 0021622415 a GA ČR 204/08/H054.

PREFERENČNÍ SELEKCE ISOMERU D-GALAKTONO-1,5-LAKTONU ENZYMEM β -GALAKTOSIDASOU Z *Arthrobacter* sp. C2-2 PRO VAZBU DO AKTIVNÍHO MÍSTA

ANDREA ŠTĚPÁNKOVÁ^{a,b}, TEREZA SKÁLOVÁ^b, JAN DOHNÁLEK^b, JARMILA DUŠKOVÁ^b, PETR KOLENKO^b, JINDŘICH HAŠEK^b a PETRA LIPOVÁ^c

^aKatedra inženýrství pevných látek, FJFI, ČVUT, Trojanova 13, 120 00 Praha 2; ^bÚstav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 00 Praha 6; ^cKatedra biochemie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6

Stanovení třidimenzionální (3D) struktury nativního enzymu a 3D struktur jeho komplexů s různými ligandy v řadě případů pomohlo vysvětlit mechanismus katalyzované reakce. Struktura přirozeného typu enzymu β -galaktosidasy¹ z antarktické bakterie *Arthrobacter* sp. C2-2, vyřešená v naší laboratoři, je nyní doplněna o struktury komplexů tohoto enzymu se třemi různými ligandy. Tato série komplexů enzymu vysvětluje strukturální změny způsobené vazbou jednotlivých typů (analog tranzitního stavu, produkt, inhibitor) ligandů do aktivního místa enzymu.

Molekula inhibitoru D-galaktonolaktonu byla nalezena v aktivním místě enzymu ve své méně stabilní formě² – jako D-galaktono-1,5-lakton, ačkoli krystal byl máčen v roztoku isomeru D(-)-galaktono-1,4-laktonu (Sigma-Aldrich, synonymum D(-)-galactonic acid γ -lactone). Přítomnost isomeru δ -galaktonolaktonu je důsledek specifity enzymu. Tento δ isomer vytváří specifické kontakty s Glu442 a iontem Na⁺, které by v případě přítomnosti isomeru γ nebyly možné. Vazba molekuly D-galaktono-1,5-laktonu do aktivního místa způsobuje rozsáhlé strukturální změny enzymu, které budou diskutovány.

V další prezentované 3D struktuře je molekula produktu D-galaktosy navázána v podobné poloze a také vytváří specifické kontakty s Glu442 a iontem Na⁺. V případě komplexu enzymu s inhibitorem – isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) – je molekula IPTG navázána v jiné poloze v aktivním místě, ale hydroxyly 4- a 6- vytvářejí stejné specifické interakce jako u předchozích dvou komplexů.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA AV (projekt KJB500500512), GA ČR (projekt 305/07/1073) a IGS ČVUT (projekt CTU0803914).

LITERATURA

- Skálová T., Dohnálek J., Spiwok V., Lipová P., Vondráčková E., Petroková H., Dušková J., Strnad H., Králová B., Hašek J.: J. Mol. Biol., 353, 282 (2005).

2. Bierenstiel M., Schalf M.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1474.

MOLEKULÁRNÍ A FUNKČNÍ ANALÝZA PROTEINŮ INTERAGUJÍCÍCH S ADAPTÉROVÝM PROTEINEM Daxx

JAN ŠVADLENKA, LUKÁŠ ČERMÁK, JAN BRAŽINA a LADISLAV ANDĚRA

*Oddělení buněčné signalizace a apoptózy, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, 142 20 Praha 4
Jan.Svadlenka@img.cas.cz*

Daxx je multifunkční adaptérový protein. Podílí se na apoptotické signalizaci po aktivaci receptorů Fas, TGFβ či při oxidačním stresu a glukosové deprivaci, potlačení jeho exprese ovlivňuje citlivost některých buněčných linií k apoptóze a jeho genetická inaktivace vede k úhynu myších zárodků v důsledku masivní apoptózy¹. O komplexnosti dějů, jichž se Daxx účastní, svědčí i jeho úloha při regulaci transkripce. Daxx je převážně jaderný protein asociovaný s chromatinem a PML-tělísky^{2,3}, který interaguje s mnoha transkripčními faktory (např. NF-κB, p53, Smad4, aj.) a zřejmě prostřednictvím své asociace s histoneacetylásami HDAC1 a 2, proteinem asociovaným s DNA-metylasou DMAP1 či chromatinremodelující ATPasou ATRX, aj. se podílí na jejich represi¹.

Pro objasnění funkce proteinu je důležité poznání jeho interaktomu. Proto jsme se zaměřili na vyhledání nových interakčních partnerů proteinu Daxx v kvasinkovém dvojhybridním systému. Kromě dvou jeho již dříve popsaných interakcí s ATRX a DMAP1 jsme takto našli 10 dalších potenciálních interakčních partnerů, např. tumor-supresorovou chromatin-remodelující ATPasu Brg1 či ubikvitin-hydrolasu asociovanou s komplexem BRCA1 BAP1. Daxx s těmito proteiny interaguje jak *in vitro*, tak po nadprodukci v buňkách HEK293FT. Navíc kolokalizuje s Brg1 na promotorech některých genů a potlačení jeho exprese vede k inhibici aktivace těchto genů indukované Brg1. Náš následující výzkum se zaměřil na podrobnější charakterizaci uvedených interakcí a objasnění úlohy proteinu Daxx při regulaci funkce těchto interakčních partnerů.

LITERATURA

- Salomoni P., Khelifi A. F.: Trends. Cell Biol. 16, 2 (2006).
- Pluta A. F., Earnshaw W. C., Goldberg I. G.: J. Cell Sci. 111, 14 (1998).
- Ishov A. M., Sotnikov A. G., Negorev D., Vladimirova O. V., Neff N., Kamitani T., Yeh E. T., Strauss J. F. 3rd, Maul G. G.: J. Cell Biol. 147, 2 (1999).

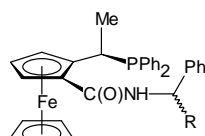
FOSFINOFERROCENOVÉ KONJUGÁTY VYBRANÝCH AMINOKYSELIN – SYNTÉZA, KOORDINAČNÍ VLASTNOSTI A KATALYTICKÉ POUŽITÍ

JIŘÍ TAUCHMAN, IVANA CÍSAŘOVÁ a PETR ŠTĚPNIČKA*

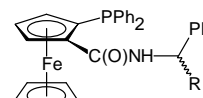
*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
tauchman@natur.cuni.cz, stepnic@natur.cuni.cz*

Naše skupina se dlouhodobě zabývá chemií fosfinokarboxylových kyselin odvozených od ferrocenu¹. V poslední době jsme se zaměřili především na fosfinoferrocenové amidy a to včetně chirálních sloučenin použitelných v asymetrické katalýze (např. **1–3**)^{2,3}.

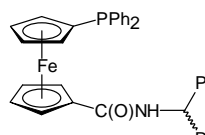
Spektrum připravených sloučenin jsme nedávno rozšířili o nové karboxyfosfino-ferrocenové deriváty s aminokyselinovými pendanty, viz např. sloučenina **4**. Koordinační vlastnosti jednoduchého amidu **4** a ligandů příbuzných byly zkoumány v palladnatých komplexech a jejich katalytické vlastnosti testovány v Suzukiho-Miyauraově reakci prováděné v různých rozpouštědlech. Chirální obdoby ligandu **4** (odvozené od chirálních aminokyselin a/nebo chirálních ferrocenových fosfinokarboxylových kyselin) byly rovněž připraveny a testovány v asymetrické allylové alkylyci.



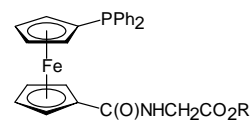
1
R = H (*R_p, R*)
R = Me (*R_p, R, R*), (*R_p, R, S*)



2
R = H (*S_p*)
R = Me (*S_p, R*), (*S_p, S*)



3
R = Me (*R*), (*S*)



4
R = H, Me

Tato práce je součástí projektů MŠMT ČR (LC06070 a MSM0021620857).

LITERATURA

- Štěpnička P.: Eur. J. Inorg. Chem. 2005, 3787.
- Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: Eur. J. Inorg. Chem. 2007, 2274.
- Lamač M., Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: Organometallics 26, 5042 (2007).

**VAZBA MUTANTNÍ FORMY PROTEINU p53
K INTRONOVÝM A INTERGENNÍM SEKVENCÍM
TVOŘÍCÍM TRIPLEX DNA REGULUJE EXPRESI
GENŮ U BUNĚK U251**

**VLASTIMIL TICHÝ^a, TIMO QUANTE^b, LARS
TÖGEL^b, KORDEN WALTER^b, LUCIE
NAVRÁTILOVÁ^a, MATĚJ LEXA^c, WOLFGANG
DEPERT^b, GENRICH V. TOLSTONOG^b, EMIL
PALEČEK^a a MARIE BRÁZDOVÁ^{a,b*}**

^aBiofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., 612 65 Brno; ^bTumor Virology, HPI for Experimental Virology and Immunology, D-20251 Hamburg, BRD; ^cMasarykova univerzita, Fakulta informatiky, 602 00 Brno, ČR

Mutace v genu pro TP53 je častou příčinou výskytu karcinomů u lidí. Nejvíce modifikací tohoto genu je tvořeno missense bodovou mutací (změna jedné aminokyseliny), díky které jsou mutantní proteiny p53 (mutp53) funkčně pozmeněny. Mutp53 proteiny přitom ztrácí schopnost sekvenčně specifické vazby na DNA, a tím i funkce nádorového supresoru, a naopak získávají vlastnosti onkogenní. V naší práci jsme spojili chromatinovou imunoprecipitaci (ChIP) s DNA klonováním a sekvenováním (ChIP-cloning) k identifikaci vazebných míst mutp53 proteinů v glioblastomové linii U251 a dokázali jsme jejich funkčnost jak *in vitro* tak *in vivo*. Pomocí gelové retardací analýzy (EMSA) jsme potvrdili, že získané sekvence jsou rozpoznávány izolovaným rekombinantním proteinem R273H především v superhelikální DNA. Vazebná místa lokalizovaná především do intronových oblastí genů měla repetitivní charakter nezbytný pro tvorbu sekundárních struktur stabilizovaných superhelicitou DNA, jejichž výskyt se nám podařilo dokázat pomocí S1 nukleasy. Navíc funkční analýzy vedly k identifikaci genů *PPARGC1A* a *FRMD5*, které jsou regulovány mutp53 prostřednictvím vazby na zmíněné sekvence DNA a pravděpodobně také díky asociaci s jadernou matrix a transkripčními faktory Sp1 a YY1.

Na základě těchto poznatků se domníváme, že onkogenní funkce mutp53 proteinu mohou být způsobeny jeho interakcí s intronovými a intergenními sekvencemi tvořícími sekundární struktury, které vedou k regulaci specifických genů na základě reorganizace chromatinu.

Tato práce vznikla za podpory grantu EC QLGA-CT-2001-52001, EC MERG-6-CT-2005-014875, MŠMT IK04119, GA ČR 204/06/P369 a 204/08/1560 a Výzkumného Centra LC06035.

**ZNAČENÍ DNA STABILNÍMI ISOTOPY: VZTAH
MEZI METABOLICKÝM DĚJEM A JEHO
MIKROBIÁLNÍMI PŮVODCI**

**ONDŘEJ UHLÍK^{a,b}, KATEŘINA JEČNÁ^a, MARTINA
MACKOVÁ^a, ČESTMÍR VLČEK^c, PETR ŠTURSA^a
a TOMÁŠ MACEK^{a,b}**

^aFPBT VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha 6; ^cÚstav molekulární genetiky AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
ondrej.uhlik@seznam.cz

Molekulárně biologické techniky v posledních letech rozšířily možnosti studia bakteriálních populací, mimo jiné hlavních účastníků bioremediace kontaminovaných lokalit, často nekultivovatelných a tedy neidentifikovatelných v laboratoři. Revoluční metoda, která umožňuje najít vztah mezi metabolickým dějem probíhajícím v prostředí a identitou jeho mikrobiálních původců, je založena na značení DNA stabilními isotopy uhlíku ¹³C. Jejím principem je inkubace environmentálního vzorku s ¹³C-značeným substrátem, který část bakteriální populace využívá jako zdroj uhlíku, a dochází tak k inkorporaci isotopů ¹³C do DNA. Následná izolace celkové DNA a ultracentrifugace v gradientu cesné soli umožňuje oddělení ¹³C-DNA od neznačené DNA inaktivní části populace. Získaný metagenom je dále využíván pro sekvenční analýzu zajišťující taxonomické zařazení populací i analýzu funkčních genů. Uvedenými postupy byly charakterizovány bakteriální populace metabolizující bifenyly v půdě kontaminované polychlorovanými bifenyly (PCB) a v rhizosféře křenu selského rostoucího v této zemině. Analýza knihoven genů 16S rRNA sestavených z ¹³C-DNA ukázala, že metabolismu bifenyly v nevegetované půdě dominují bakterie rodu *Paenibacillus*, zatímco v rhizosféře křenu selského to jsou bakterie rodu *Hydrogenophaga*. Analýza funkčních genů nasvědčuje tomu, že tyto bakterie jsou schopny degradovat obdobné spektrum PCB jako kmen *Pseudomonas alcaligenes* B-357. Další bakterie metabolizující bifenyly přísluší rodům *Achromobacter*, *Variovorax*, *Methylovorus*, *Methylophilus*, a některé bakterie se nepodařilo na úrovni rodu identifikovat a je možné, že se jedná o dosud nepopsané rody. Výsledky této práce poukazují na vliv rostlin na aktivitu jednotlivých populací. Zároveň potvrzují nezastupitelnou úlohu techniky značení DNA stabilními isotopy v mikrobiální ekologii.

Tato práce vznikla za podpory projektů MSMT NPVII 2B0 8031, GA ČR 525/09/1058, MSM 6046137305 a Z 40550506.

**VYUŽITÍ 1-ADAMANTYLU PRO MODIFIKACI
BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK**

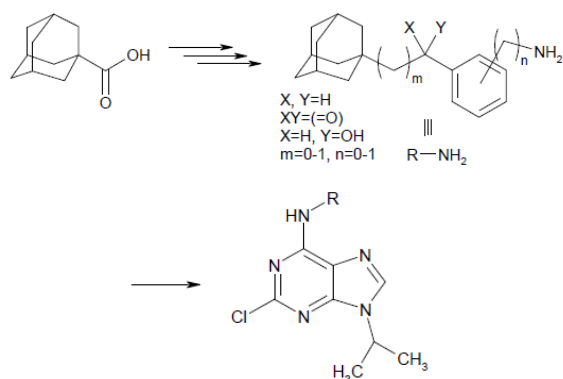
**ROBERT VÍCHA^{*}, MICHAL ROUCHAL a ZUZANA
KOZUBKOVÁ**

Ústav chemie, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Náměstí T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
rvicha@ft.utb.cz

V roce 1964 byly poprvé popsány antivirové účinky 1-adamantylaminu¹, což spolu s objevem metody syntézy adamantanu použitelné i v průmyslovém měřítku², vyvolalo prudký rozvoj chemie derivátů adamantanu. V současné době nachází sloučeniny obsahující ve struktuře

adamantanový skelet uplatnění v celé řadě oblastí, zejména pak v chemii léčiv a polymerních materiálu. Jistým pojítkem mezi těmito dvěma oblastmi je schopnost adamantanu vytvářet relativně pevné inkluzní komplexy s cyklodextriny, čehož se využívá pro transport léčiv biologických systémech nebo pro tvorbu supramolekulárních polymerních asambláží.

Protože použití jednoduchých, komerčně dostupných derivátů adamantanu (adamantylamin či deriváty kyseliny adamantankarboxylové) může vést ke ztrátě biologických účinků díky značné sterické náročnosti adamantanu³, připravili jsme sérii anilinů a benzylaminů substituovaných v poloze *meta* nebo *para* 1-adamantylem, odděleným od aromatického kruhu linkerem s proměnnou polaritou (viz Schéma 1) a studovali jsme strukturu jejich komplexů s β -cyklodextrinem (CD) a vliv na inhibiční aktivitu derivátů purinu vůči CDK 2. U samotných aminů s polárními substituenty byla prokázána v roztoku i v pevné fázi tvorba dimerů stabilizovaných vodíkovými vazbami. Komplexy aminů s CD pak vykazovaly pseudorotaxanovou strukturu. Pozitivní výsledek představuje pozorovaná inhibiční aktivita některých nových purinových derivátů srovnatelná s analogy bez adamantylového substituentu a neovlivněná komplexací s CD.



Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 203/06/P362.

LITERATURA

1. Davies W. L., Grunert R. R., Haff R. F., McGahen J. W., Neumayer E. M., Paulshock M., Watts J. C., Wood T. R., Hermann E. C., Hoffmann C. E.: *Science* 144, 862 (1964).
2. Schleyer P. von R.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292 (1957).
3. Otyepka M., Kryštof V., Havlíček L., Siglerová V., Strnad M., Koča J.: *J. Med. Chem.* 43, 2506 (2000).

IZOLACE A CHARAKTERIZACE KATECHOL-1,2-DIOXYGENASY KVASINKY *Candida tropicalis* PARTICIPUJÍCÍ NA BIODEGRADACI FENOLICKÝCH LÁTEK

L. VILÍMKOVÁ, V. KREMLÁČKOVÁ, J. PÁČA Jr., J. PÁČA a MARIE STIBOROVÁ

*Katedra biochemie, PŘF, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2
lenvil@post.cz*

Biodegradace chemických látek mohou probíhat díky metabolickému potenciálu řady mikroorganismů, kdy dochází k začlenění metabolitů xenobiotika do jejich intermediárního metabolismu. U kvasinky *Candida tropicalis* byla zjištěna schopnost využívat fenol jako hlavní zdroj uhlíku a energie. Pro nás je tedy vhodným mikroorganismem pro studium enzymů podílejících se na degradaci fenolu. Naše laboratoř pracuje s kmenem Ct2, který byl izolován z kontaminované půdy na Mostecku.

Fenol indukuje u kvasinky *C. tropicalis* tvorbu enzymů podílejících se na jeho degradaci. V cytoplasmě je lokalizovaná NADPH-dependentní fenolhydroxylasa (EC 1.14.13.7), která katalyzuje 1. krok degradace, tedy oxidaci fenolu na katechol. Enzym katechol-1,2-dioxygenasa (EC 1.13.11.1) poté štěpí vzniklý katechol tzv. *ortho*-dráhou (intradiolovým štěpením) na kyselinu *cis,cis*-mukonovou. Ta je dále odbourána až na sukcinát a acetyl-CoA.

Výše zmíněné enzymy byly z cytosolu izolovány za použití chromatografie na sloupci DEAE-Sepharose (k eluci proteinů byl použit gradient NaCl). Eluát byl rozdělen na frakce, ve kterých byla detekována fenolhydroxylasová a katecholdioxygenasová aktivita. Tyto frakce byly poté separátně dialyzovány a podrobeny rechromatografií na DEAE-Sepharose. Nakonec byly získané enzymové preparáty lyofilizovány a v této formě zmrazeny pro další experimenty. Purifikovaná katechol-1,2-dioxygenasa byla částečně charakterizována. Jedná se o dimer, jehož molekulová hmotnost byla určena pomocí gelové chromatografie na sloupci Sephadexu G-100 a SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). pH optimum tohoto enzymu leží v oblasti pH 7,5–9,5. Provedena byla rovněž *N*-terminální sekvenace.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR (303/05/2195 a 104/04/0686) a MŠMT ČR (0021620808).

MOŽNÉ VYUŽITÍ VIROVÝCH ČÁSTIC JAKO VEKTORŮ PRO DORUČENÍ GENŮ

IRENA VORÁČKOVÁ, PAVEL ULBRICH, TIBOR FŮZIK a TOMÁŠ RUML

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28, Praha 6; Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum aplikované genomiky
irena.vorackova@vscht.cz*

Při genových terapiích se jako nosičů (vektorů) terapeutických genů nejčastěji používá replikačně defektních virů. V poslední době se začínají intenzivněji využívat upravené virové částice. Tyto částice mají některé vlastnosti podobné celým virům, ale jsou neinfekční, protože neobsahují žádné virové geny.

Naše práce je zaměřena na terapeutické využití upravených virových částic odvozených od Mason-Pfizerova

opičího viru, který patří mezi retroviry. Již dříve jsme prokázali tvorbu částic z retrovirového strukturního polyproteinu Gag v systému *in vitro* v přítomnosti různých typů nukleových kyselin (RNA, DNA). Takto vzniklé částice se po modifikaci povrchu určitými oligopeptidy dají využít buď jako vektory pro genové terapie či pro imunizace. Peptidy, vystavené na povrchu částic, by měly interagovat s receptory cílových buněk a doručit tak prostřednictvím částic nesený gen do buňky či sloužit jako antigen pro tvorbu protilátek.

Byly vybrány oligopeptidy, které by měly interagovat s receptory prostatických nádorových buněk a vaskulárních endoteliálních buněk. Byla potvrzena tvorba modifikovaných částic v přítomnosti RNA i DNA. Byl testován vstup částic s inkorporovaným genem pro zelený fluorescenční protein (GFP) do specifických tkáňových kultur. Zatím nebyla potvrzena exprese GFP v buňkách inkubovaných s modifikovanými částicemi. Nyní se proto zaměřujeme na průkaz interakce částic s receptory příslušných buněk pomocí imunofluorescenční mikroskopie či přenosu virových proteinů na membránu s následnou imunochemickou detekcí.

Pro imunizace byla vybrána část sekvence prostatického membránového antigenu a částicemi s touto sekvencí byly imunizovány myši. Obdrželi jsme monoklonální protilátky, které jsou nyní testovány. Na využití tohoto systému je podána patentová přihláška.

Tato práce je podporována granty 1M6837805002, MSM 6046137305, KJB 50127070 a SCO/06/E001.

ZOBRAZOVÁNÍ DISTRIBUCE LIPIDŮ NA POVRCHU ROSTLIN A HMYZU METODOU MALDI IMAGING

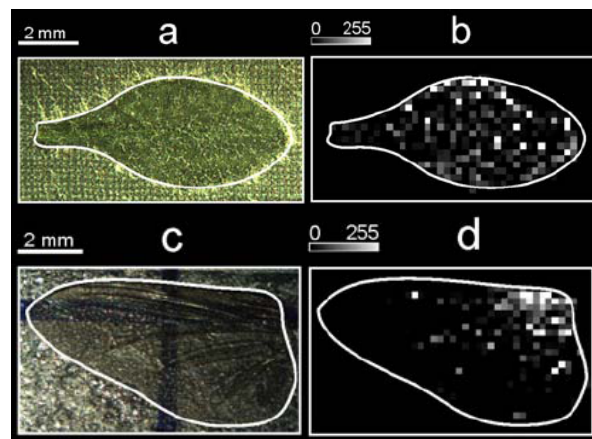
VLADIMÍR VRKOSLAV^a, ALEXANDER MUCK^b,
JOSEF CVAČKA^a a ALEŠ SVATOŠ^b

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6; ^bMax Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Str. 8, D-07745 Jena, Germany
vrkoslav@uochb.cas.cz

Povrch těla vyšších rostlin a hmyzu je pokryt vrstvou kutikulárního vosku. Složení kutikulárních vosků se u jednotlivých organismů liší, vždy se ale jedná o látky s nízkou polaritou. Kutikulární vosky mají hlavně ochrannou funkci, ale některé jeho složky také mohou hrát důležitou roli v komunikaci hmyzu nebo ovlivňovat vztahy mezi rostlinami a jejichmi škůdci. Znalost lokalizace lipidů na povrchu organismů může výrazně přispět k pochopení těchto vztahů.

V předloženém projektu jsme demonstrovali využití metody MALDI imaging pro mapování lipidů na listech rostlin a křídlech hmyzu. Sledována byla distribuce voskových esterů (WE) a uhlovodíků (HC). Jako matrice byla použita kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB), její lithná (LiDHB) a sodná (NaDHB) sůl. Homogenní vrstvy LiDHB a NaDHB byly vytvořeny sprejováním. DHB byla deponována sublimací. Při ionizaci s matricí NaDHB byly ve spektrech identifikovány molekulové adukty WE [M+Na]⁺.

U vzorků pokrytých DHB docházelo k ionizaci WE také. Kationizačním činidlem se staly sodné a draselné ionty přítomné na povrchu biologického materiálu. Pokud byla použita matrice LiDHB, ve spektrech byly pozorovány navíc ionty odpovídající lithným aduktům HC. Na obrázku jsou uvedeny fotografie listu rostliny *Arabidopsis thaliana* pokrytého matricí (a), distribuce WE C46H92O2 na jeho povrchu (b), fotografie křídla mouchy *Neobellieria bullata* (c) a distribuce HC C39H76 (d).



Obr. 1.

Vyvinutá metoda je vhodným nástrojem pro zobrazování distribuce lipidů na kutikule hmyzu a rostlin.

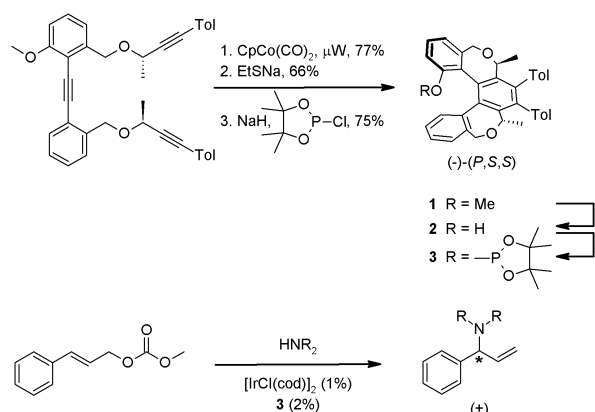
Tato práce byla financována z výzkumného záměru č. Z40550506 a z grantu GA ČR 203/09/0139.

VYUŽITÍ HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH LIGANDŮ V ENANTIOSELEKTIVNÍ KATALÝZE

JAROSLAV ŽÁDNÝ, NATHAN C. CLEMENCE,
ZUZANA KRAUSOVÁ, IRENA G. STARÁ*
a IVO STARÝ*

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

Helikálně chirální sloučeniny byly doposud jen omezeně využívány v asymetrické syntéze. Důvodem byla jejich obtížná příprava v opticky čisté formě. Pomocí [2+2+2] diastereoselektivní cyklotrimerizace¹ trynů se podařilo syntetizovat methoxyhelicen **1** o vysoké optické čistotě (>99 % *ee*). Následným odchráněním byl připraven příslušný helicenol **2**, který byl reakcí s chlórdioxfosfolanem převeden na fosfit **3**. Tento chirální ligand byl využit v asymetrické allylové aminaci se sekundárními aminy² katalyzované komplexem iridia, kdy bylo dosaženo enantiomerního nadbytku až 82 % *ee*.



Bylo tak potvrzeno, že uvedené helicity a jejich deriváty představují skupinu látek potencionálně zajímavou pro využití v enantioselektivních reakcích katalyzovaných komplexy přechodných kovů.

Podporováno GA ČR (reg.č. 203/07/1664 a 203/09/1766), MŠMT (Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg.č. LC512).

LITERATURA

- Sehnal P., Krausová Z., Teplý F., Stará I. G., Starý I., Rulišek L., Šaman D., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 73, 2074 (2008).
- Ohmura T., Hartwig J. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 15164 (2002).

MECHANISMUS VAZBY SMH PROTEINŮ NA TELOMERICKOU DNA

MICHAL ZIMMERMANN, CTIRAD HOFER, PAVLA ŠULTESOVÁ, IVA MOZGOVÁ, PETRA PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFŮVÁ a JIŘÍ FAJKUS

Oddělení Funkční Genomiky a Proteomiky PřF MU,
 Kamenice 5, 625 00 Brno
 zimmer@sci.muni.cz

Telomery jsou nukleoproteinové struktury, které chrání konce chromozomů a zajišťují zachování stability a integrity genomu. Výzkum struktury a regulace délky telomer je v současné době v centru vědeckého zájmu, zejména díky prokázané souvislosti mezi zkracováním telomer a stárnutím buněk (sencence) na jedné straně a mechanismem zachování délky telomer při přeměně zdravých buněk na buňky rakovinné (karcinogeneze) na straně druhé.

Telomery modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* jsou tvořeny mnohonásobným opakováním sekvence 5'-TTTAGGG-3'. Předchozí studie zabývající se hledáním telomer-vazebných proteinů u *Arabidopsis* identifikovaly jako možné kandidáty na tuto funkci proteiny rodiny Single-Myb-Histone (SMH), nazývané AtTRB. AtTRB proteiny se *in vitro* váží na dvouřetězcovou telomerickou DNA a jsou

schopny interagovat s proteinem AtPOT1, účastnícím se regulace délky telomer.

Náplní práce je kvantitativní popis interakcí DNA a SMH proteinů AtTRB1 a AtTRB3 *in vitro*. Pomocí spektroskopického měření anizotropie fluorescence a gelové retardační analýzy byla stanovena stoichiometrie vazby a afinita proteinů AtTRB k DNA o různém počtu telomerických repetit. Měření afinity za podmínek různé iontové síly umožnilo určit podíl specifických interakcí na tvorbě komplexu. Na základě získaných výsledků byl nově navržen možný funkční model vytváření komplexu proteinů AtTRB a telomerové DNA¹. Detailní popis interakcí zástupců SMH proteinů a telomerické DNA přispěl k pochopení strukturní dynamiky telomer.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR č. MSM0021622415 a GAČR č. 521/08/P452 a 204/08/H054.

LITERATURA

- Hofr C., Šultesová P., Zimmermann M., Mozgová I., Procházková Schruppřová P., Wimmerová M., Fajkus J.: *Biochem. J.* 419, 221 (2009).



SIGMA-ALDRICH

REJSTRÍK AUTORŮ

Adameová, Adriana	436	Hladíková, Martina	439
Aimová, Dagmar	442	Hof, Martin	434
Almáši, Miroslav	429	Hofr, Ctírad	455
Anděra, Ladislav	451	Holubcová, Zuzana	431, 437
Andicsová, Anita	429	Horňáková, Darina	437
Andronova, Angelina	430	Hošek, Jan	437
Babušíková, Eva	430	Housková, Barbora	439
Balušíková, Kamila	431	Hrabal, Richard	446
Bánovčín, Peter	430	Hraběta, Jan	446
Barák, Imrich	441	Hroudová, Miluše	438
Baráth, Peter	442	Hubáčková, Miluše	438
Bárta, Tomáš	431, 437	Hunter, Eric	435, 446
Barteková, Monika	436	Chrastilová, Zuzana	439
Bartoš, Milan	437	Ingr, Marek	442
Bělohradský, Martin	432	Janderová, Blanka	436
Beneš, Petr	440	Javorský, Peter	447
Betík, Robert	432	Ječná, Kateřina	452
Bibová, Ilona	449	Jeseňák, Miloš	430
Böhm, Stanislav	442	Jindřichová, Marie	439
Bořek-Dohalská, Lucie	442	Jurečková, Jana	430
Brázdová, Marie	452	Kadlčíková, Aneta	440
Bražina, Jan	451	Kindl, Jiří	437
Brezovský, Jan	434	Knopfová, Lucia	440
Budka, Jan	442	Knoppová, M.	446
Bunčec, Martin	446	Koháryová, Michaela	441
Burketová, Lenka	444	Kokoška, Ladislav	443
Cisařová, Ivana	429, 447, 448, 451	Kolenko, Petr	441, 450
Clemence, Nathan C.	454	Kollárová, Marta	441
Cvačka, Josef	454	Kollárovič, Gabriel	442
Čermák, Lukáš	451	Kopská, Tereza	445
Damborský, Jiří	434	Kotora, Martin	432, 434, 440
Dekoj, Václav	432	Kotrbová, Věra	442
Deppert, Wolfgang	452	Koval, Tomáš	441
Dobrota, Dušan	430	Kovář, Jan	431, 445
Dohnálek, Jan	441	Kovář, Vojtěch	433
Dohnálek, Jan	450	Kozubková, Zuzana	452
Doležal, Michal	446	Král, Vladimír	439
Doležalová, Dáša	431, 437	Krausová, Zuzana	454
Dorňáková, Veronika	433	Kremláčková, V.	453
Dostalíková-Čimbuřová, Markéta	431	Krivjanská, Mária	438
Dupejová, Jarmila	433	Kroupa, Jan	442
Durand, Thierry	434,	Křenek, Peter	436
Dušková, Jarmila	441, 450	Kubát, Pavel	449
Dušková, Jiřina	444	Kubínová, Lucie	444
Dvořák, Petr	431, 437	Kundrát, Ondřej	442
Dziahtsiaryk, Aksana	439	Kuželová, Magdaléna	436
Eckschlager, Tomáš	446	Langrová, Tereza	443
Eigner, Václav	442	Lanková, Petra	443
Eignerová, Barbara	434	Lapčík, Oldřich	443
Fabian, Pavel	450	Lexa, Matěj	452
Fajkus, Jiří	455	Lhoták, Pavel	442
Falková, Iva	450	Libra, Antonín	446
Forťová, Andrea	434	Linhartová, Irena	449
Fülöpová, Andrea	435	Lipov, Jan	435, 446
Füzik, Tibor	453	Lipovová, Petra	450
Golovchenko, Maryna	433,	Luciaková, Katarína	442
Grubhoffer, Libor	433	Ludwig, Jost	439
Grubhoffer, Libor	433	Macek, Tomáš	452
Grznárová, Petra	435	Macková, Martina	439, 452
Halbhuber, Zbyněk	438	Majera, Dušana	442
Hampl, Aleš	431, 437	Malinová, Karla	445
Harčárová, Anna	436	Matejčíková, Jana	436
Hašek, Jindřich	441	Matoušková, Jindřiška	444
Hašek, Jindřich	450	Matoušková, Petra	437
Hatok, Jozef	430	Mayer, Jiří	445
Hilská, Markéta	436	Mosinger, Jiří	449

Mořka, Tomáš	444	Štechová, Kateřina	438
Moulis, Mojmír	450	Štěpánková, Andrea	441, 450
Mozgová, Iva	455	Štěpnička, Petr	448, 451
Mráz, Marek	445	Štěřba, Ján	433
Muck, Alexander	454	Štursa, Petr	452
Navrátilová, Lucie	452	Šultesová, Pavla	455
Němcová-Fürstová, Vlasta	445	Švadlenka, Jan	451
Nešporová, Kristina	440	Tauchman, Jiří	451
Nešvera, J.	446	Teplý, Filip	447
Neubauerová, Jitka	431	Tereza, Skálová	450
Novotná, Zuzana	444	Tichý, Vlastimil	452
Obšil, Tomáš	439	Tisoň, Lukáš	448
Olžyňska, Agnieszka	434	Tögel, Lars	452
Páca, J.	453	Tolstonog, Genrich V.	452
Páca, J. Jr.	453	Uhlík, Ondřej	452
Pačes, Václav	438	Ulbrich, Pavel	453
Paleček, Emil	452	Valentová, Olga	444
Palková, Zdena	436	Valterová, Irena	437
Pátek, M.	446	Vancová, Marie	433
Pavlík, Adam	446	Vargová, Zuzana	429
Pavlová, Šárka	445	Vášová, Ingrid	450
Petrášek, Jan	444	Vávra, Vojtěch	439
Pichová, Iva	437	Végh, Daniel	429
Piknová, Mária	447	Vícha, Robert	452
Pojarová, Michaela	442	Vilímková, L.	453
Poljaková, Jitka	446	Vinarský, Vladimír	431
Pospíšilová, Šárka	445	Vlach, Jiří	446
Prchal, Jan	446	Vlček, Čestmír	438, 452
Pristaš, Peter	447	Vojta, Petr	438
Procházka, Pavel	446	Volkova, O.	446
Procházková Schruppfová, Petra	455	Vopálenský, Pavel	438
Prokudina, Jelena A.	443	Voráčková, Irena	453
Quante, Timo	452	Vrkoslav, Vladimír	454
Rainey, Jasmine	435	Vytřasová, Jarmila	448
Ravingerová, Táňa	436	Walter, Korden	452
Rídl, Jakub	438	Zahradník, Pavol	435
Richterová, Klára	439	Zdráhal, Zbyněk	434
Rouchal, Michal	452	Zeleňák, Vladimír	429
Rudenko, Nataliia	433	Zemková, Hana	439
Ruml, Tomáš	435, 446, 453	Zimmermann, Michal	455
Rumlová, Michaela	446	Žádný, Jaroslav	454
Serenčová, Lenka	447		
Severa, Lukáš	447		
Schulz, Jiří	448		
Schwarzerová, Kateřina	444		
Sigmundová, Ivica	435		
Skálová, Tereza	441		
Sláma, Petr	443		
Slavětínská, Lenka	449		
Staněk, Ondřej	449		
Stará, Irena G.	430, 454		
Starý, Ivo	430, 432, 454		
Stibor, Ivan	442		
Stiborová, Marie	442, 446, 453		
Stojilkovič, S. S.	439		
Strnad, Hynek	438		
Svatoš, Aleš	454		
Sýkora, Jan	434		
Šaman, David	447		
Šebo, Peter	449		
Šimšová, Marcela	449		
Šmarda, Jan	440		
Šmardová, Jana	450		
Šněvajsová, Petra	448		
Šňupárek, Jaromír	444		
Ščavíková, Vendula	438		
Štefančíková, Lenka	450		
Štefanková, Petra	441		

